

2. Versuchsaufbau, Material und Methodik

2.1 Übersicht

Im Folgenden wird ein Versuchsaufbau mit dem Ziel beschrieben, die Sauerstoffanionenbildung von Monozyten und neutrophilen Granulozyten unter verschiedenen Stimulationsbedingungen zu messen (vgl. Pick, (1986)).

2.2 Zellseparation und Kultur von Mono- und Granulozyten

2.2.1 Material und Geräte

Material:

- Histopaque 1119 (Sigma)
- Ficollpaque 1070 (Pharmacia)
- HBSS ohne Sodium Bicarbonate und Phenol Red (Sigma)
- Onkovertin 6% (Braun)
- Medium, bestehend aus M199 (Gibco), 10% fetalem Kälberblut, (Gibco), und Antibiose (Penicillin, Streptomycin, Neomycin (Sigma))
- Tryphanblau (Biochrom KG)
- Blue Max Röhrrchen (Becton Dickinson)

Geräte:

- 96-Well Tissue Culture Cluster (Costar)
- Coulter Counter
- Temperierbare Zentrifuge: Minifuge GL (Haereus Christ)

2.2.2 Zellseparation

Die Zellseparation wurde unter Ausnutzung der verschiedenen spezifischen Gewichte der einzelnen Blutkomponenten erreicht. Hierzu wurden als Dichtegradienten 10ml Histopaque 1119, 10ml Ficollpaque 1070 und das heparinisierte, im Verhältnis 1:1 mit HBSS verdünnte Vollblut in ein Blue Max Röhrrchen übereinander geschichtet.

Anschließend wurde das Röhrrchen 20 Minuten bei 1700 Umdrehungen in einer Minifuge GL zentrifugiert (G-Zahl =387,7). Dabei wurde die Bremse nicht eingesetzt. Nach dem Zentrifugieren bildeten sich drei Phasen im Röhrrchen:

ein Überstand, ein Monozyten-Lymphozytenring und der Rest des Blutsediments mit vorwiegend neutrophilen Granulozyten und Erythrozyten. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen, der Monozyten-Lymphozytenring in ein Blue Max Röhrchen gegeben und zweifach mit HBSS gewaschen (10 Minuten bei 1000 Umdrehungen, G-Zahl=134,2). Die gewaschenen Monozyten-Lymphozyten wurden gezählt (Coulter Counter); der Monozytenanteil und der Vitalitätsgrad (mit Tryphanblau) mikroskopisch bestimmt. Auf diese Weise wurde die Menge an Zellsuspension ermittelt, die 10^5 vitale Monozyten enthält. Diese wurde mit der Menge Medium ergänzt, so daß sich in je 0,1 ml der Suspension 10^5 vitale Monozyten befanden. Je 0,1 ml dieser Suspension wurde in jede Vertiefung einer Platte 96-Well Tissue Culture Cluster eingesetzt und zwei Stunden lang im Brutschrank bei 37 Grad Celsius mit 10% Kohlendioxid inkubiert.

Das verbliebene Blutsediment wurde mit Onkovertin 6% (Braun) im Verhältnis 1:1 gemischt und bis zur Sedimentierung der Erythrozyten etwa eine Stunde lang stehen gelassen. In der oberen Phase befanden sich jetzt die neutrophilen Granulozyten, welche abpipettiert und mit HBSS gewaschen wurden. Verbliebene Erythrozyten wurden anschließend mittels hypotoner Lyse (0,2% NaCl Lösung für 30 Sek.) entfernt. Die Vitalitätsprüfung, Zählung und Einbringung in die Wellen wurden wie bei den Monozyten durchgeführt und die Zellen zwei Stunden lang im Brutschrank inkubiert.

2.3 Zellstimulation

2.3.1 Materialien

- Cytochrom- C, Typ 4 (Sigma)
- Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA) (Sigma)
- NAF (Natriumfluorid Sigma)
- SOD (Superoxiddimutase Sigma)
- GM-CSF (Sigma)

2.3.2 Cytochrom-C

Cytochrom-C wurde bei -70 Grad Celsius gekühlt verwahrt und circa 15 Minuten vor dem Abwiegen bei Raumtemperatur aufgetaut.

Für die Stammlösung wurden 7,94 mg Cytochrom-C in jeweils einem ml HBSS aufgelöst, so daß in dem Reaktionsansatz mit anteilig 50 Prozent der Stammlö-

sung Cytochrom-C eine Arbeitsendkonzentration von 3,97 mg Cytochrom-C entstand.

2.3.3 PMA, NAF

Das in destilliertem Wasser und Dimethylsulfid (DMSO) gelöste PMA (1mg PMA in 0,5 ml DMSO) wurde mit Aqua destilata auf 12,5 ml aufgefüllt und in verschlossenen Röhrchen zu je 50 μ l (0,08mg/ml) bei -70 Grad Celsius gelagert und 15 Minuten vor der Verwendung bei Raumtemperatur aufgetaut und folgend mit HBSS auf 10 ml aufgefüllt und anschließend mit HBSS im Verhältnis 1:10 zur Stammlösung verdünnt. Die so hergestellte Stammlösung hatte eine Konzentration von 40ng/ml.

Die Trockensubstanz NAF wurde bei Raumtemperatur in einem Exicator gelagert. Es wurden 3.34 mg NAF in je einem ml HBSS gelöst, was einer Konzentration von 80 nmol/l entspricht.

2.3.4 GM-CSF

Primer wurden den Zellen schon in der Inkubationsphase zugefügt und bewirken in Verbindung mit den Stimuli eine vermehrte Sauerstoffanionenbildung. 150 μ g GM-CSF wurden in 2.66 ml Aqua destillata aufgelöst. 1:10000 verdünnt und zu je 50 μ l (4000pg/ml) bei -70 Grad Celsius gelagert und 15 Minuten vor der Verwendung bei Raumtemperatur aufgetaut und folgend mit HBSS auf 10 ml aufgefüllt und anschließend mit HBSS im Verhältnis 1:10 zur Stammlösung verdünnt (20pg/ml). Vorinkubiert wurde mit GM-CSF in einer Endkonzentration von 5pg/ml.

2.3.5 Superoxiddismutase

SOD (Superoxiddismutase Sigma) wurde bei -70 Grad Celsius gelagert und circa 15 Minuten vor dem Gebrauch bei Raumtemperatur aufgetaut und die 1.1mg in 0,55 ml destilliertem Wasser gelöst, wodurch eine Stammlösung mit einer Konzentration von 2 mg/ml entsteht.

2.4 Meßsystem und Messung der Sauerstoffanionenbildung

2.4.1 Material und Geräte

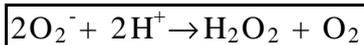
-96-Well Tissue Culture Cluster (Costar)

-Anthos Reader

-Brutschrank

2.4.2 Meßsystem

Der Messvorgang beruht auf der Eigenschaft des Cytochrom-C Typ 4, durch Sauerstoffradikale reduziert zu werden. Reduziertes Cytochrom-C zeigt eine höhere Absorption von Licht der Wellenlänge 550nm gegenüber dem oxidierten Cytochrom-C. Die abgegebene Sauerstoffanionenmenge in der Vertiefung kann anhand der Absorptionsdifferenz zwischen Vertiefung und der Grundabsorption festgestellt werden. Die Grundabsorption wird in einer Kontrollvertiefung festgestellt, in der die Reaktion zwischen Cytochrom-C und Sauerstoffanionen spezifisch unterbunden wird. Dies wurde durch die Zugabe von Superoxiddismutase (SOD) erreicht. SOD katalysiert die folgende Reaktion.



So wird die Reduktion von Cytochrom-C mittels O_2^- verhindert.

Nach Pick et al. (1986) lässt sich aus der so ermittelten Absorptionsdifferenz die Sauerstoffanionenbildung pro Vertiefung (10^5 Zellen) nach folgender Formel errechnen:

$$\frac{\text{Absorptionsdifferenz bei 550 nm}}{\text{Vertiefung}} \times 15,87 = \text{nmol O}_2^- \text{ pro}$$

Da es das Ziel der Messung war, den Umfang der Steigerung der Sauerstoffanionenbildung auf bestimmte Stimuli zu messen, musste eine unspezifische Steigerung der Sauerstoffanionenbildung durch Pyrogene, Bakterien etc. ausgeschlossen werden. Eine Überprüfung erfolgte durch Vertiefungen, denen kein Stimulans zugesetzt wurde. Eine unspezifisch ausgelöste Sauerstoffanionenbildung, wie z.B. durch Verkeimung des Versuchsansatzes, zeigt sich in einer den Basalwert dieser Zellen überschreitenden Sauerstoffanionenbildung in den Kontrollvertiefungen.

Abschließend wurden die verschiedenen Reaktionsmixturen (Cytochrom-C, Cytochrom C-PMA, Cytochrom-C-NAF, Cytochrom-C-PMA-SOD) ohne Zellen in Vertiefungen gegeben, um eine unterschiedliche Grundextinktion der

Reaktionsmixturen auszuschließen, wie es z.B. bei fehlerhaftem Abwiegen der Versuchsreagenzien auftreten kann.

2.4.3 Messung

Messungen wurden in 15-minütigem Abstand durchgeführt. Hierbei wurde die Messplatte für etwa 40 Sekunden aus dem Brutschrank genommen. Die Messung erfolgte über einen Messzeitraum von 90 Minuten mit einer Lichtwellenlänge von 550nm. Der Anthos Reader bestimmte bei der Messung den Anteil des absorbierten Lichtes in den einzelnen Wellen.

Tab.1

Schematische Darstellung eines Versuchsaufbaus einer Costar 96 Platte. In die mit Buchstaben gekennzeichneten Wellen (Mulden in der Platte, in die die Zellen einpipettiert werden) werden nach Abpipettieren des Inkubationsmediums die Reaktionsmixturen hinzugegeben.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a	PMA	PMA+ GM-CSF	NAF	NAF+ GM-CSF	LW							PMA
b	PMA	PMA+ GM-CSF	NAF	NAF+ GM-CSF	LW							NAF
c	PMA	PMA+ GM-CSF	NAF	NAF+ GM-CSF	LW							LW
d	PMA	PMA+ GM-CSF	NAF	NAF+ GM-CSF	LW							SOD
e												
f												
g												
h	SOD	SOD	SOD	SOD								

PMA steht für die Reaktionsmischung mit dem Stimulans PMA. Jeder so gekennzeichneten Welle wurden 100µl der Reaktionsmischung, bestehend aus 50µl Cytochrom C (7,94mg/ml), 25µl HBSS und 25µl PMA (40ng/ml), zugesetzt. In der Reaktionsmischung wurde also eine Endkonzentration von 10 ng/ml PMA erreicht.

PMA +GM-CSF steht ebenfalls für Wellen, in denen die oben beschriebene Reaktionsmischung mit dem Stimulans PMA eingesetzt wurde. Im Unterschied zu den oberen vier Wellen in der ersten Spalte wurden in den mit PG gekennzeichneten Wellen die Zellen in der Inkubationsphase zusätzlich mit GM-CSF (5pg/ml Medium) inkubiert.

Die in der dritten Spalte mit NAF markierten Wellen wurden mit je 100µl einer Reaktionsmischung mit NAF stimuliert, bestehend aus 50µl Cytochrom-C (7,94mg/ml), 25µl HBSS und 25µl NAF (80 nmol/l= 3,34mg/ml). In der Reaktionsmischung wurde also eine Endkonzentration von 20 nmol/l NAF erreicht.

Mit NAF + GM-CSF gekennzeichnete Wellen wurden wie die mit NAF gekennzeichneten Wellen mit der Reaktionsmischung mit NAF stimuliert; zusätzlich wurden die Zellen in der Inkubationsphase jedoch noch mit GM-CSF (5pg/ml Medium) inkubiert.

In mit LW gekennzeichnete Wellen wurden 100µl einer Reaktionsmischung ohne Stimulus eingegeben, bestehend aus 50µl Cytochrom-C (7,94mg/ml) und 50µl HBSS.

Mit SOD gekennzeichnete Wellen wurden mit 100µl der Reaktionsmischung, bestehend aus 50µl Cytochrom-C (7,94mg/ml), 25µl SOD (2mg/ml) und 25µl PMA (40ng/ml), zugesetzt. In der Reaktionsmischung wurde also eine Endkonzentration von 0,5 mg/ml SOD erreicht.

Jede Reaktionsmischung wird nun in zellfreie Wellen eingegeben, um sicherzustellen, daß sich die Grundextinktion der Reaktionslösungen nicht unterscheidet (siehe Spalte 12 Tab.1).

Daraus ergibt sich, daß für diesen Versuchsaufbau 0,9 ml der PMA-Reaktionsmischung (neun Wellen mit je 0,1 ml), 0,9ml der NAF-Reaktionsmischung, 0,5 ml der Leerwert-Reaktionsmischung und 0,5 ml der SOD-Reaktionsmischung benötigt werden. Unter Berücksichtigung eines Mehrbedarfs an Reaktionsmischung, zum Beispiel durch Verlust beim Pipettieren etc., läßt sich der Gesamtbedarf der gemeinsamen Komponenten, wie beispielhaft in der Tabelle 2 gezeigt, feststellen.

Tab.2

Beispielhafte Darstellung des Bedarfs an Reaktionslösungen für den in Tab.1 gezeigten Versuchsaufbau mit Darstellung des Gesamtbedarfs an den Stammlösungen in der untersten Spalte.

	Stammlösungen:				
	Cytochrom C	PMA	NAF	HBSS	SOD
PMA- Reaktionslösung 1,2ml	0,6ml	0,3ml	-----	0,3ml	-----
NAF- Reaktionslösung 1,2ml	0,6ml	-----	0,3ml	0,3ml	-----
Leerwert- Reaktionslösung 0,8ml	0,4ml	-----	-----	0,4ml	-----
SOD- Reaktionslösung 0,8ml	0,4ml	0,2ml	-----	-----	0,2ml
<i>Stammlösungen</i>	<i>2,0ml</i>	<i>0,5ml</i>	<i>0,3ml</i>	<i>1,0ml</i>	<i>0,2ml</i>
Gesamtbedarf					