

2 Material und Methoden

2.1 Tiere

Für die Versuche wurden männliche, zwischen fünf und zehn Monaten alte Balb/c Mäuse verwendet. Die Tiere stammten aus dem Institut für Infektionsmedizin und wurden unter kontrollierten Bedingungen mit Futter und Wasser ad libitum bei definierter Temperatur und Luftfeuchtigkeit in einem 12 h Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Virusserologische Kontrollen wurden regelmäßig vom Institut für Versuchstierzucht in Hannover / D durchgeführt.

2.2 Peritonealleukozyten naiver Mäuse

2.2.1 Gewinnung naiver residenter Peritonealleukozyten

Zur Gewinnung von naiven Peritonealzellen (PZ) wurde eine Peritoneallavage durchgeführt. Hierfür wurden die Mäuse mit Kohlendioxid und anschließender cervicaler Dislokation getötet. Nach Desinfektion (70% Alkohol) wurde das Fell im Abdominalbereich abgehoben und wenige Millimeter eingeschnitten. Durch simultanen cranialen und caudalen Zug erfolgte die Freilegung des Peritoneums. Anschließend wurden 10 ml PBS (Dulbeccos Phosphate-Buffered-Solution, mit Magnesium und Kalzium, Bio Whittaker, Walkersville, MD, USA) intracavitär injiziert und nach leichter Massage der Peritonealhöhle reaspiert. Auf diese Weise konnten $2-4 \times 10^6$ Peritonealleukozyten pro Maus gewonnen werden. Nach der Zentrifugation (Heraeus, Hanau, D) der Zellsuspensionen für 10 min bei 300 g wurden die Zellen in Gentamicin-haltigem ($5 \mu\text{g} / \text{ml}$) Zellkulturmedium (RPMI 1640, Biochrom KG, Berlin, D) aufgenommen und auf die benötigte Zellzahl eingestellt.

2.2.2 Fraktionierung der Peritonealleukozyten

Für die Durchführung der Untersuchungen war eine Fraktionierung der Peritonealleukozyten erforderlich. Zur Depletion von Makrophagen in einer Peritonealzellsuspension nutzten wir deren Eigenschaft zur unspezifischen Kunststoffadhärenz (Nelson, Parhar et al. 1990; Kaufmann and Kabelitz 1998). Die bei der Peritoneallavage gewonnenen Peritonealzellen (PZ) wurden nach der Zentrifugation (Heraeus, 10 min, 300 g) in Zellkulturmedium (Instamed Trockenmedium RPMI 1640 mit L-Glutamin, ohne NaHCO₃, Biochrom KG, Berlin, D) mit Penicillin / Streptomycin (Biochrom KG, Berlin, D) oder im Falle von infizierten Ansätzen mit 5 µg / ml Gentamicin (Biochrom KG, Berlin, D), supplementiert mit 10 % fetalem Kälberserum (FBS, Biochrom KG, Berlin, D) aufgenommen und auf die benötigte Zellkonzentration eingestellt. Von dieser Suspension wurde die später benötigte Menge der Gesamtpopulation abpipettiert und im Begasungsbrutschrank (Heraeus, Hanau, D) bei 37 °C und 7.5 % CO₂ aufbewahrt. Der andere Teil wurde mit reichlich Medium in einer Zellkulturflasche (Nunc, Wiesbaden, D) in einer maximalen Dichte von 2×10^7 PZ / 25 cm² (Kaufmann and Kabelitz 1998) für 3 h im Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit sedimentierten die PZ auf den Flaschenboden und adhärten.

Zur Gewinnung einer Makrophagen-*depletierten* Population wurde der zellhaltige Überstand abgegossen und nach Zentrifugation (10 min, 300 g) auf die benötigte Zellzahl eingestellt.

Zur Gewinnung einer Makrophagen-*angereicherten* Population wurde der Zellrasen zweimal mit 20 ml Nährmedium gewaschen. Die zurückgebliebenen adhären Zellen wurden mittels Zellschaber und jeweils 20 ml Medium zweimal von der Oberfläche geschabt und nach der Zentrifugation auf die Zielzellzahl eingestellt. Auf diese Weise konnten drei verschiedene Populationen, die unfraktionierte Gesamtpopulation, die Makrophagen-depletierte Fraktion nicht-adhären Zellen und die Makrophagen-angereicherte Fraktion in den Versuchen eingesetzt und auf ihre zytotoxische Potenz untersucht werden.

2.2.3 Zytologie

2.2.3.1 Anfertigen der Zytospinpräparate

Zur Beurteilung, Charakterisierung und Quantifizierung der eingesetzten Peritonealzellpopulationen wurden Zytospinpräparate angefertigt. Hierzu wurden 100 µl der Peritonealzell-suspensionen in die Trichter entsprechender Zentrifugeneinsätze (Cytofuge 2, Statspin, Norwood, Ma, USA) pipettiert und anschließend auf die Oberfläche von Glasobjektträgern (Menzel, Braunschweig, D) zentrifugiert (4 min, 700 U / min). Die Zytospinpräparate trockneten für 24 h bei Raumtemperatur und wurden anschließend gefärbt (2.2.3.2).

2.2.3.2 Färbung der Zytospinpräparate

Die Zytospinpräparate wurden nach Pappenheim gefärbt.

Hierzu wurde unverdünnte May-Grünwald-Lösung bei einer Färbedauer von 5 min verwendet. Die Giemsa-Lösung wurde 1 : 20 mit Aqua dest. verdünnt (20 min Färbedauer). Nach beiden Färbeschritten wurden die Objektträger mit Aqua dest. kurz abgespült.

2.2.3.3 Auswertung der Zytospinpräparate

Bei allen Versuchen wurden Zytospinpräparate der eingesetzten Zellpopulationen hergestellt. Diese wurden wie zuvor beschrieben nach Pappenheim gefärbt. Während die Zellzahl vor den Versuchen mittels der Neubauer-Zählkammer eingestellt wurde, dienten die Zytospinpräparate der Auszählung der quantitativen Anteile der unterschiedlichen Zellspezies. Nach morphologischen Kriterien wurden die Makrophagen, Lymphozyten und Granulozyten identifiziert und bei einer 40x Vergrößerung gezählt.

2.3 Bakterien

2.3.1 Die *Listeria monocytogenes ActA*⁻ Mutante

Zur Infektion der Hepatozyten diente *Listeria monocytogenes ActA*⁻, eine Mutante, bei der aufgrund einer Inaktivierung eines virulenzassoziierten Gens das 610 Aminosäuren lange Actinbindungsprotein (ActA) nicht gebildet wird. Dieses Dimer ist normalerweise für die Bindung von Actin und weiterer Zytoskelettproteine sowie die Polymerisierung des G-Actins zum F-Actin verantwortlich und dient außerdem der intrazellulären Fortbewegung des Bakteriums sowie der Zell-Zell-Ausbreitung (Tilney and Portnoy 1989; Domann, Wehland et al. 1992; Temm-Grove, Jockusch et al. 1994; Smith and Portnoy 1997; Cossart and Lecuit 1998; Chakraborty 1999). Die Bakteriummutante wurde uns freundlicherweise von Prof. T. Chakraborty aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Gießen zur Verfügung gestellt.

2.3.2 Anzucht der Bakterien

Zur Infektion der Hepatozyten musste eine konstante Bakterienmenge eingesetzt werden. Die bei -70 °C gelagerten Bakterien wurden im Wasserbad aufgetaut und nach Anfertigung einer Verdünnungsreihe in Trypticase-Soja-Bouillon (TSB) vermehrt. Insgesamt wurden acht Verdünnungsstufen (jeweils 1 : 10) angefertigt, wobei jeweils 1 ml der Verdünnung zu 9 ml TSB gegeben wurden. Um eine größere Bakterienzahl zu erzielen, wurde von den Verdünnungsstufen Fünf bis Acht jeweils 1 ml in 150 ml Bouillon pipettiert. Alle Bakterienkulturen wurden bei normaler Atmosphäre und 37 °C für 16 h auf einem Kreisschüttler (55 U / min, KS 501 D, Janke & Kunkel, IKA Labortechnik, D) inkubiert. Im Anschluss an die Bebrütung wurde diejenige Bakteriensuspension zur Weiterverarbeitung ausgewählt, die eine submaximale Trübung (logarithmische Vermehrungsphase) aufwies. Zur Konzentrierung und zum Waschen wurde die Listeriensuspension in Zentrifugenröhrchen (Blue Cap, Nunc, Wiesbaden, D) überführt und zentrifugiert (30 min, 2000 g, Heraeus). Die Resuspension der Bakterien erfolgte in PBS (Bio Whittaker). Diese Suspension wurde aliquotiert und bei -70 °C eingefroren. Um die Bakterienkonzentration und die

Reinheit der Kultur zu überprüfen, wurden zwei Aliquots aufgetaut und wie unten beschrieben auf Nährböden ausplattiert.

2.3.3 Zellzahlbestimmung

Für die Konzentrationsbestimmung einer Bakteriencharge, wurde ein Aliquot aufgetaut und 100 µl der Suspension auf einer Trypticase-Soja-Agarplatte ausplattiert und weitere 100 µl der Suspension mit 900 µl PBS (Bio Whittaker) verdünnt. Es wurden acht Verdünnungsstufen mit der Verdünnung 1 : 10 hergestellt. Die Nährböden wurden für 24 h bebrütet und anschließend durch Auszählen der nicht-konfluierenden Kolonien und Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor die Zellzahl bestimmt.

2.4 Hepatozyten

2.4.1 Zelllinie

Für die Versuche wurde die embryonale, adhärenent wachsende Hepatozytenzelllinie BNL CL.2 (TIB 73) von *Mus musculus* Balb/c von der „American Type Culture Collection“ (ATCC, Manassas, Virginia, USA) verwendet.

2.4.2 Zellkultur

Die Leberzellen (TIB 73) wurden in Zellkulturflaschen (Nunc) mit Nährmedium (RPMI 1640, Biochrom KG) in einer feuchtigkeitsgesättigten Atmosphäre inkubiert (37 °C, 7.5 % CO₂). Dem Zellkulturmedium wurden 5 % fötales, bovines Serum (FBS, Biochrom KG), 2 mM L-Glutamin (200 mM, Biochrom KG Seromed, Berlin, D) und die Antibiotika Penicillin (50 U / ml) / Streptomycin (50 µg / ml) (10000 IE / ml / 10 mg/ml, Biochrom KG, Berlin, D) zugesetzt. Das Nährmedium wurde sowohl bei der Zubereitung als auch nach der Supplementierung mit FBS und L-Gln unter Verwendung von Membranfiltern sterilfiltriert (Membrex 25, 0.2 µm Porengröße, MembraPure GmbH, Bodenheim, D).

Sobald die Zellen einen geschlossenen einschichtigen Zellrasen (Monolayer) bildeten und das Nährmedium verworfen worden war, diente Trypsin-EDTA-Lösung (0.05% / 0.02% w/v in PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺, Biochrom KG, Berlin, D) zum Ablösen der adhärenenten Zellen. Hierzu wurden einige Milliliter der sterilfiltrierten, auf 37 °C erwärmten Enzymlösung in die Zellkulturflasche pipettiert und wenige Minuten im Brutschrank (Haereus) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 40 ml Medium suspendiert. Nach der Zentrifugation (10 min, 300 g, Heraeus) wurde der entstandene Bodensatz resuspendiert und erneut in 40 ml frischem Medium zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, bevor die Hepatozyten zur Expansion auf zwei Zellkulturflaschen verteilt wurden oder in den Experimenten eingesetzt werden konnten.

2.4.3 Kryokonservierung und Rekultivierung der Hepatozyten

Zur Konservierung und Aufbewahrung der Leberzellen wurden diese, wie zuvor beschrieben, von den Zellkulturflaschen (Nunc) abgelöst und gewaschen. Parallel wurde die Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer (Brand, Wertheim, D) bestimmt. Der Bodensatz aus den Zentrifugenröhrchen (Blue Cap, Nunc, Wiesbaden, D) wurde in 4 °C kaltem FBS / 10 % DMSO-Lösung (Dimethylsulfoxid, reinst, Serva, Heidelberg, D) aufgenommen, so dass eine Zellsuspension mit der Konzentration 1×10^7 Zellen / ml entstand. Das Einfrieren erfolgte in Ein-Milliliter-Portionen in Kryoröhrchen (1,8 ml, Nunc, Wiesbaden, D), versehen mit einem abdichtenden Kryoflex-Schlauch (Nunc, Wiesbaden, D), bei -70 °C in einer Styroporbox. Nach drei Tagen schloss sich die Endlagerung in Thermosbehältern, gefüllt mit flüssigem Stickstoff, an.

Zum Auftauen der Leberzellen wurden diese rasch im Wasserbad (Heraeus, Hanau, D) erwärmt und anschließend in 40 ml, 37 °C warmes Nährmedium (RPMI 1640, Biochrom) mit den zuvor beschriebenen Zusätzen gegeben. Im Anschluss an die in „Zellkultur“ ausgeführten Waschschriffe erfolgte die Aufnahme in frischem Medium und die Inkubation.

2.4.4 Zellzählung mit der Neubauer-Zählkammer

In den Versuchen wurden definierte Zellzahlen eingesetzt. Für die Bestimmung der Hepatozyten- bzw. der Peritonealleukozyten-Konzentration stand die Neubauer-Zählkammer (Brand, Wertheim, D) zur Verfügung. Als Farbstofflösung diente Trypanblau (0.5 % in physiologischer Kochsalzlösung, Biochrom KG, Berlin, D), welches die Beurteilung der Zellviabilität erlaubt. Lebende Zellen schließen den Farbstoff aus und erscheinen unter dem Mikroskop ungefärbt, während tote Zellen die Fähigkeit der Trypanblauexklusion durch Zellmembranschädigung verloren haben. Die zu bestimmende Zellsuspension wurde in einem geeigneten, definierten Mischungsverhältnis in Trypanblau aufgenommen, auf dem Vibrationsschüttler (Victor Recker, Berlin, D) gemischt und in den dafür vorgesehenen Bereich am Rande des Deckglases pipettiert. Die lebenden Zellen in allen vier Kammerquadranten wurden bei einhundert- bis einhundertsechzigfacher Vergrößerung unter

dem Mikroskop (Zeiss, Göttingen, D) gezählt. Der Mittelwert dieser Zählung wurde mit dem Verdünnungsfaktor und dem Kammerfaktor (10^4) multipliziert.

2.4.5 Kultur der Hepatozyten in Mikrotiterplatten

Um bei reduziertem Materialbedarf eine größere Anzahl von Versuchsgruppen zuzulassen, wurde das zuvor in diesem Institut angewandte Makroverfahren verlassen und eine Miniarisierung des Versuchsansatzes durchgeführt. Hierzu geschah die Einsaat der Hepatozyten in flachbodigen 96-Well-Mikrotiterplatten (Nunclon Delta MicroWell Platten, F-Boden, Wiesbaden, D). Pro Well wurden 100 μ l einer Hepatozytensuspension mit einer Konzentration von 1×10^6 / ml eingesetzt. Das hierbei verwendete Nährmedium (RPMI 1640, Biochrom) entsprach der zuvor beschriebenen Zusammensetzung. Die Versuchsansätze wurden im Brutschrank inkubiert. Dabei sedimentierten die Zellen auf den Boden der Mikrotiterplatten, adhärten und hatten nach 24 h einen geschlossenen, einschichtigen Zellrasen ausgebildet. Die Intaktheit des entstandenen Monolayers wurde vor weiteren Versuchsschritten mittels eines Invertmikroskops (Leitz, Weslar, D) überprüft und dokumentiert.

2.4.6 Infektion der Hepatozytenmonolayer

Die geschlossenen einschichtigen Leberzellrasen wurden mit der Defektmutante *Listeria monocytogenes ActA⁻* infiziert. Hierzu wurde ein Aliquot einer Bakteriencharge bekannter Konzentration aufgetaut und mit Nährmedium (RPMI 1640, Biochrom), supplementiert mit L-Gln und 5 % FBS, verdünnt. Das Medium enthielt keine Antibiotika, um die Infektion der Hepatozyten nicht zu beeinträchtigen. Die Infektionsdosis betrug in den Versuchen 5×10^5 Bakterien / Well. Da das vorangegangene vierundzwanzigstündige Wachstum der Hepatozyten in einem Penicillin- und Streptomycin-haltigen Milieu stattfand, mussten die Wells zum Entfernen der Antibiotika zweimal vorsichtig mit 100 μ l Medium gespült werden. Im Anschluss daran konnten die Bakterien in die Wells pipettiert werden.

Um den Kontakt von Bakterien und Hepatozyten zu intensivieren und die Zellinvasion der Bakterien zu beschleunigen, wurden die Mikrotiterplatten zentrifugiert (10 min, 100 g, Labufuge II, Heraeus, Hanau, D). Während der folgenden zweistündigen Inkubation im Brutschrank (37 °C, 7.5 % CO₂, Heraeus) invadierten die Listerien in die Leberzellen. Nach diesem Vorgang wurden alle Wells zweimal mit 5 µg / ml Gentamicin-haltigem Medium (RPMI 1640, Biochrom) gewaschen. Gentamicin hat in dieser geringen Konzentration keine bakterizide Wirkung auf intrazellulär befindliche Bakterien (Wood, Maroushek et al. 1993; Drevets, Canono et al. 1994) und diente hier der Abtötung der extrazellulär vorliegenden Listerien. Die Wirksamkeit dieses Verfahrens konnte durch Ausplattierung des Kulturüberstandes auf Nährböden gezeigt werden. Zur Etablierung der Infektion schloss sich an den Waschvorgang eine vierundzwanzigstündige Inkubation an.

2.4.7 Stimulierung der Zellkulturen mit Lipopolysaccharid

Vor der Zugabe der Peritonealzellen wurden in einigen Versuchen ein Lipopolysaccharid (LPS von *E. coli*, Serotyp 0111:B4, Sigma-Aldrich Deisenhofen, D) hinzugegeben, in der Konzentration 10 µg / ml (Heneka, Loschmann et al. 1998). Hierzu wurde das bei -20 °C in der Konzentration 1 mg LPS / ml RPMI 1640 eingefrorene LPS aufgetaut, in dem Verhältnis 1 : 10 mit dem in den Versuchen verwendeten Medium verdünnt und anschließend 20 µl dieser Lösung zu den entsprechenden Versuchsgruppen gegeben.

2.4.8 Färbung und Fixierung der Zellkulturen

Nach Versuchsende wurden die Zellkulturüberstände vorsichtig abgenommen und versuchsgruppenweise in Kryoröhrchen (Nunc) bei -20 °C eingefroren oder sofort weiteren Untersuchungen zugeführt. Anschließend wurden die Zellrasen mit Giemsa-Lösung (Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung, Merck, Darmstadt, D) zur späteren computergestützten Quantifizierung der entstandenen Läsionen gefärbt. Hierzu wurden 100 µl des Farbstoffes in jedes Well gegeben und nach fünf Minuten Färbedauer mit 200 µl Aqua dest. / Well gespült.

2.5 Immunmodulatoren

2.5.1 Antikörper

2.5.1.1 *Anti-TNF- α mAk*

Die Bildung von Tumornekrosefaktor Alpha (TNF- α) ist neben der Phagozytose und der Stickstoffmonoxid-Synthese der bekannteste Effektormechanismus von Makrophagen (Mannel 1986; Mannel and Echtenacher 2000). In einigen Versuchen wurden neutralisierende Antikörper gegen TNF- α (anti-TNF- α mAk) eingesetzt.

Der verwendete Antikörper (anti-TNF- α mAk, R&D Systems, Kat. Nr. AB-410-NA) besitzt die folgenden Neutralisationseigenschaften: 0.2-0.6 $\mu\text{g} / \text{ml}$ anti-TNF- α mAk neutralisieren 0.25 ng / ml rmTNF- α im murinen L-929 Zytotoxizitätsassay; dies entspricht 2.7×10^5 WHO-Units / μg Protein. Auf der Basis von Arbeiten von Hartung et al. mit isolierten Kupffer-Zellen, die mit LPS (10 $\mu\text{g} / \text{ml}$) stimuliert wurden, wurde die für eine Neutralisation des TNF- α Effektes erforderliche Dosis berechnet. Der mAk wurde danach in zwei Konzentrationen, 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ und 20 $\mu\text{g} / \text{ml}$, eingesetzt (Hartung and Wendel 1991).

2.5.1.2 *Anti-IFN- γ mAk*

Der in der Arbeit verwendete Interferon Gamma Antikörper (Anti-IFN- γ mAk, purified rat anti mouse IFN- γ , Kat. Nr. 18181, Pharmingen, Hamburg, D) diente der Ermittlung der Spezifität der Interferon-vermittelten Wirkung. $2 \times 10^7 / \text{ml}$ Milzzellen produzieren unter Stimulation mit hitzegetöteten Listerien (HKL, 1×10^7) ca. 14000 pg IFN- γ / ml (Reutzel-Selke 1997). In unserem Ansatz wurden 2×10^5 PZ / Well eingesetzt. Der vorhandene Anti-IFN- γ mAk hat bei einer Konzentration von 1 ng / ml eine Neutralisationskapazität von 0,05-0,15 μg IFN- γ / ml (ND 50). Unter diesen Bedingungen sollten bis zu 300 pg IFN- γ vollständig blockiert werden. Zu diesem Zweck wurden 1 μg mAk / Well (5 $\mu\text{g} / \text{ml}$) eingesetzt.

2.5.1.3 Kontrollantikörper

Als Kontrollantikörper (Negativkontrolle) wurden gereinigte IgG-Antikörper nicht-immunisierter Tiere (Goat IgG, Prod. Nr. I5256, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D) in äquivalenten Konzentrationen eingesetzt.

2.5.2 NO-Synthasehemmer

2.5.2.1 L-NMMA

N^G-Monomethyl-L-Arginin Monoacetat (L-NMMA, Calbiochem / Novabiochem, Kat. Nr. 475892, Bad Schwalbach, D) ist entsprechend seiner chemischen Struktur ein kompetitiver Inhibitor der verschiedenen Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS). In den Versuchen wurden 1-10 mM Lösungen eingesetzt (Faraci, Nagel et al. 1996).

Als Negativkontrolle wurde das inaktive D-Isomer (D-NMMA, Calbiochem) in den gleichen Konzentrationen verwendet.

2.5.2.2 Aminoguanidin

Aminoguanidin (Aminoguanidine Hemisulfate Salt, Kat. Nr. A-7009, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D) ist ein selektiver Antagonist der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS = NOS2) (Ruetten and Thiemermann 1996; Sveinbjornsson, Olsen et al. 1996; DeGeorge, Heck et al. 1997; Brune, von Knethen et al. 1998). Mit der als Salz vorliegenden Substanz wurde eine 5 mM Lösung in PBS hergestellt. Diese Konzentration liegt über denen verschiedener experimenteller Arbeiten, bei denen eine vollständige Hemmung der iNOS bedingten NO-Produktion erreicht wurde (Faraci, Nagel et al. 1996; Sveinbjornsson, Olsen et al. 1996; Heneka, Loschmann et al. 1998).

2.5.3 Interferon Gamma

Interferon Gamma (IFN- γ) ist ein multifunktionales Zytokin, welches unter anderem eine Aktivierung von Makrophagen hervorruft (Farrar and Schreiber 1993).

In dieser Arbeit wurden 1-100 U des gentechnisch hergestellten IFN- γ (IFN- γ , rekombinant, Maus, Kat. Nr. 19301T, Pharmingen, Hamburg, D) eingesetzt. Der Antikörper wurde mit sterilem PBS (Bio Whittaker) verdünnt, so dass eine Konzentration von 10 mg / ml (5000 U / ml) entstand. Von dieser Ausgangslösung wurden die im Text angegebenen Mengen in die Probengefäße gegeben.

2.6 Quantifizierung der Läsionen (Plaques) in Monolayern

2.6.1 Fotodokumentation der Monolayer

Die in den Mikrotiterplatten gefärbten Monolayer wurden mit einer Spiegelreflexkamera (Contax 167MT1, Makroobjektiv: Zeiss, S-Planar, 1:2.8, f: 60 mm) auf einem Lichtkasten (Desaga, Heidelberg, D) fotografiert. Der Objekt-Objektivabstand war definiert. Für die spätere planimetrische digitale Auswertung wurden immer jeweils vier Wells dokumentiert.

2.6.2 Digitalisierung

Die entwickelten Diapositive (Ektachrome 64T Kunstlichtfilm, Kodak, E) wurden digitalisiert und als Kodak-Foto-CD-Dateien mit Farbkorrektur auf Compact Discs gespeichert (Unicolor, Berlin, D).

2.6.3 Computergestützte Bildanalyse

Die planimetrische Auswertung der Fotodateien erfolgte auf einem Apple Power Macintosh™ G3 PC mit Hilfe der Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop™ 5.5. und einem Zusatzmodul für die Quantifizierung von Flächen (KPT 3.0).

Die Kodak-Foto-CD-Dateien wurden in einer Auflösung von 512 x 768 Bildpunkten (Pixel) in Adobe Photoshop™ 5.5 mit den entsprechenden Quell- und Zielfiltern geöffnet. Jedes digitalisierte Foto zeigte jeweils zwei der vier Probengefäße einer Versuchsgruppe. Das Farbfoto wurde in ein Graustufenbild mit drei Tonwertstufen (Weiß, Grau und Schwarz) umgewandelt. Mit dem kreisförmigen Auswahlinstrument wurde ein Kreis mit einer dem Monolayer entsprechenden Größe (Durchmesser 130 Pixel) eingestellt und anschließend die Gesamtfläche mit dem Filter KPT 3.0 Selection Info berechnet.

Die weißen Pixel wurden markiert und mit dem Filter KPT 3.0 Selection Info gezählt. Auf diese Weise konnte die Anzahl der weißen Pixel (Plaques) im Verhältnis zur Gesamtfläche des Monolayers berechnet werden.

2.7 Analyse der Zellkulturüberstände

Nach vorsichtigem Abpipettieren der Zellkulturüberstände der einzelnen Probengefäße, wurden die Überstände von den vier Wells einer Versuchsgruppe in Kryoröhrchen (Nunc) gepoolt. Für die Analyseverfahren, die eine Kryokonservierung nicht zulassen, wurden die Überstände sofort der Analyse zugeführt. In den anderen Fällen erfolgte die Lagerung bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.7.1 Stickstoffmonoxidnachweis

Zum Nachweis von Stickstoffmonoxid, einem instabilen Radikal, wird das daraus entstehende stabile Nitrit (NO_2^-) herangezogen. Nitrit bildet mit einer Sulfanylgruppe im sauren Milieu eine Diazoverbindung, welche in einem zweiten Reaktionsschritt an ein Diamin gekoppelt wird (Griess-Reaktion) und einen fotospektrometrisch messbaren Metaboliten darstellt (Griess 1879; Green, Wagner et al. 1982; Guevara, Iwanejko et al. 1998).

Als Standard wurde NaNO_2 (Kat. Nr. S-2252, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D) in Medium (RPMI 1640, Biochrom) gelöst, so dass eine 100 mM Stammlösung entstand. Hiervon wurde eine Verdünnungsreihe angefertigt (1 μM bis 100 μM).

Für die Analyse der Proben wurden jeweils 50 μl des Überstandes in die Vertiefungen von 96-Well-Flachbodenplatten transferiert. Daneben wurden jeweils 50 μl des Standards als Duplikate in aufsteigender Konzentration eingebracht. Frisches Nährmedium diente als Leerwert.

Zuerst wurden 50 μl Sulfanylamid (Kat. Nr. S-9251, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D) (1 % w / v, in 2,5 % H_3PO_4 , Kat. Nr. P-6560, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D) zu allen Wells hinzugegeben, und anschließend 50 μl Naphthylethylendia-

min (Kat. Nr. N-9125, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D) (0,001 % w / v, in 2,5 % H₃PO₄) hinzugefügt. Nach maximal 30 min Dauer für die Farbreaktion wurden die Extinktionswerte der Lösungen fotospektrometrisch (Tecan Spectra) bei 540 nm bestimmt.

2.7.2 Zytokinnachweis

Die Quantifizierung von IFN- γ und TNF- α erfolgte mittels ELISA.

Der Coating-Antikörper (100 μ l mit 1 μ g / ml, purified rat anti mouse IFN- γ , Kat. Nr. 18181, Pharmingen, Hamburg, D in 0,1 ml NaHCO₃ in 500 ml PBS) adhärierte über Nacht bei 4 °C in Mikrotiterplatten (96 Well, Flachboden, Nunc). Zum Blocken unspezifischer Bindungen kam nach zweimaligem Waschen der Wells mit PBS (Bio Whittaker) 200 μ l / Well Blockungspuffer zum Einsatz. Der Puffer bestand aus 3 % BSA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D) in PBS und 0,02 % NaN₃, 1 : 500. Der Ansatz wurde für eine halbe Stunde bei 37 °C inkubiert, bevor die Platten viermal mit PBS / Tween 20 (2 x 10⁵ : 1, Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat, Kat. Nr. P-1379, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D) gespült wurden.

100 μ l vom IFN- γ -Standard und 100 μ l der zu analysierenden Überstände wurden in die entsprechend gekennzeichneten Wells gegeben, mit Haushaltsfolie vor Verdunstung geschützt und für 4 h bei Raumtemperatur gelagert. Der Standard bestand aus IFN- γ (IFN- γ , rekombinant, Maus, Kat. Nr. 19301T, Pharmingen, Hamburg, D), welches in einer Konzentration von 10 ng / ml vorlag. Eine Verdünnung von 1 : 2 erfolgte mit dem zuvor beschriebenen PBS / Tween, so dass eine geometrische Verdünnungsreihe entstand und die kleinste Standardkonzentration bei 156,25 pg lag.

Nach einem viermaligen Waschvorgang wurde der Detektionsantikörper (Biotin rat anti mouse IFN- γ , Kat. Nr. 18112D, Pharmingen, Hamburg, D) in einer Konzentration von 1 μ g / ml aufgetragen. Die Verdünnung des Antikörpers erfolgte auch hier in PBS / Tween; 100 μ l wurden je Well eingesetzt. Nach der Inkubation in einer angefeuchteten Atmosphäre (45 min, 37 °C) wurde der enzymtragende dritte Antikörper benutzt. Hierzu wurden alle Wells sechsmal mit PBS / Tween gewaschen und anschließend 100 μ l Antikörperlösung

(Streptavidin-AKP, Kat. Nr. 13043E, Pharmingen, Hamburg, D) in einer Verdünnung von 1 : 2000 in PBS / Tween in jedes Well gegeben. Der Ansatz wurde, mit einer Plastikfolie vor Verdunstung geschützt und bei 37 °C für eine Stunde in der feuchten Kammer inkubiert.

Bevor das Substrat (Alkaline Phosphatase Substrate Kit, Kat. Nr. 172-1063, Bio-Rad, München, D) eingesetzt wurde, wurden die Mikrotiterplatten sechsmal mit PBS / Tween gewaschen. Das Substrat wurde in Diethanolaminpuffer gelöst und zu je 100 µl auf die Probengefäße verteilt.

Nach 30 min bei Zimmertemperatur wurde die Farbreaktion durch Zugabe von jeweils 100 µl 0,4 M Natriumhydroxid-Lösung gestoppt und die Extinktion der gelben Farblösung fotometrisch bei 405 nm (Tecan Spectra) quantifiziert.

Der TNF- α -ELISA wurde analog mit folgenden Antikörpern durchgeführt:

Coating-Antikörper: purified rat anti mouse TNF- α , 0.5 mg / ml Kat. Nr. 18311D, Pharmingen, Hamburg, D.

Detektionsantikörper: Biotin rat anti mouse TNF- α , 1 mg / ml Kat. Nr. 18352D, Pharmingen, Hamburg, D.

2.8 Statistik

Zur statistischen Analyse der Daten wurden zwei verschiedene statistische Tests herangezogen. Der nicht-parametrische Man-Whitney-Test diente der Signifikanzprüfung der unterschiedlichen Plaqueindices (Zytotoxizität). Für den Vergleich der Zahlenwerte der Analyse der Zellkulturüberstände (ELISA, Griess-Reaktion) wurde der parametrische zweiseitige Student t-Test benutzt. Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0.05$.

2.9 Genehmigungen

2.9.1 Tierschutz

Aktenzeichen A 0382/94

2.9.2 Gentechnik

Genehmigung nach § 6 Abs. 4 GenTG für Gen-Anlage 118/95