

## Kapitel 3

### Material und Methode

---

#### 3.1 Zellkulturmedien und -bedingungen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Rosewell Park Memorial Institute Medium (RPMI) 1640 (Gibco BRL, Grand Island, USA), ergänzt durch Zugabe von 100 U/ml Penicillin, 0,1mg/ml Streptomycin, 0,3mg/ml Glutamin und 5% fötalem Kälberserum (FCS) (PAA, Linz, Österreich).

Alle Zellen wurden in Petrischalen (Greiner) oder 12/24/96-Loch-Zellkulturplatten bei 37°C und 5,5% CO<sub>2</sub> in einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre in einem Begasungsbrutschrank (Heraeus, Berlin, Deutschland) kultiviert. Die 96-Loch-Platten wurden mit Zellophanfolie umwickelt, um die geringen Volumina (max. 200µl) vor dem Verdunsten zu schützen.

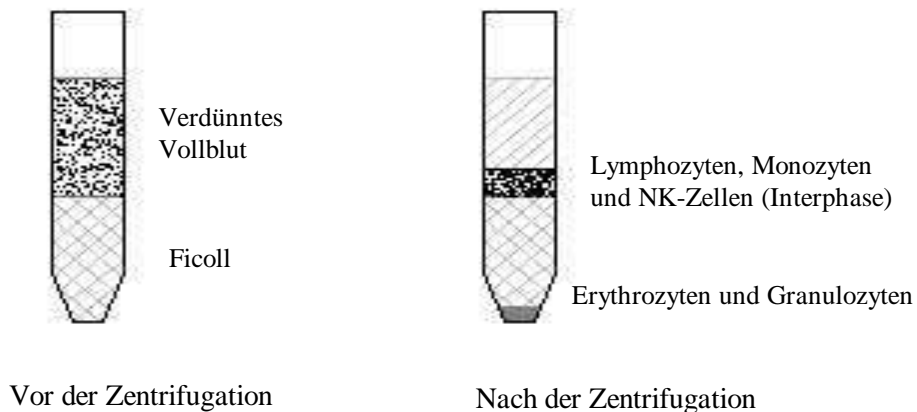
#### 3.2 Methoden der Zelltrennung

##### 3.2.1 Isolierung humaner mononuklearer Zellen aus peripherem Blut

Periphere mononukleare Zellen (B-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, T-Zellen, Thrombozyten) können mit Hilfe eines Ficoll-Gradienten durch eine isopyknische Zentrifugation von Erythrozyten, Granulozyten und toten Zellen getrennt werden. Zur Gewinnung von PBMC wurden "Buffy-Coats" von gesunden Spendern verwendet. Dabei handelt es sich um Vollblutkonzentrate, aus denen das Serum für den medizinischen Gebrauch abgepresst wurde. Der "Buffy-Coat" wird in 50ml Schraubdeckelröhrchen überführt und 20 Min. bei 800g ohne Bremse zentrifugiert. Danach wird die Interphase (in der sich die Leukozyten befinden) abgenommen, mit sterilem PBS/BSA aufgefüllt und auf einen Ficoll-Gradienten (12ml, RT) geschichtet. Das Patientenvollblut wurde 1:1 mit PBS/BSA verdünnt und direkt auf den Ficoll

geschichtet. Ficoll ist ein ungeladenes Sucrose-Polymer, dessen Dichte so eingestellt ist, daß Erythrozytenaggregate und tote Zellen die Ficollschicht passieren. Granulozyten dringen in die Ficollphase ein, während Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten sich in der Interphase ansammeln (siehe Bild 1). Nach Zentrifugation wurde die Interphase abgenommen und dreimal mit PBS/BSA gewaschen. Die Zellen werden in PBS/BSA resuspendiert und bis zur Weiterbehandlung bei 4°C gelagert.

### Dichtestufengradientenzentrifugation



#### **Bild 1: Isolierung von mononuklearen Zellen aus dem Vollblut**

Verdünntes Vollblut (1:1 mit PBS/BSA) wird auf ein Kissen aus Ficoll-Hypaque geschichtet. Man verwendet dabei Ficoll-Hyperque mit einer größeren Dichte (1,07g/L) als Lymphozyten und Monozyten, jedoch mit einer geringeren Dichte als Erythrozyten, Granulozyten, Hefen und Zelltrümmer. Durch die Zentrifugation (20min, 800g) werden Lymphozyten, Monozyten und NK-Zellen in die Grenzschicht zwischen Vollblut und Ficoll-Paque Puffer gebracht und können abpipettiert werden. Erythrozyten, Granulozyten, Hefen und Zelltrümmer wandern durch die Grenzschicht in das Ficoll.

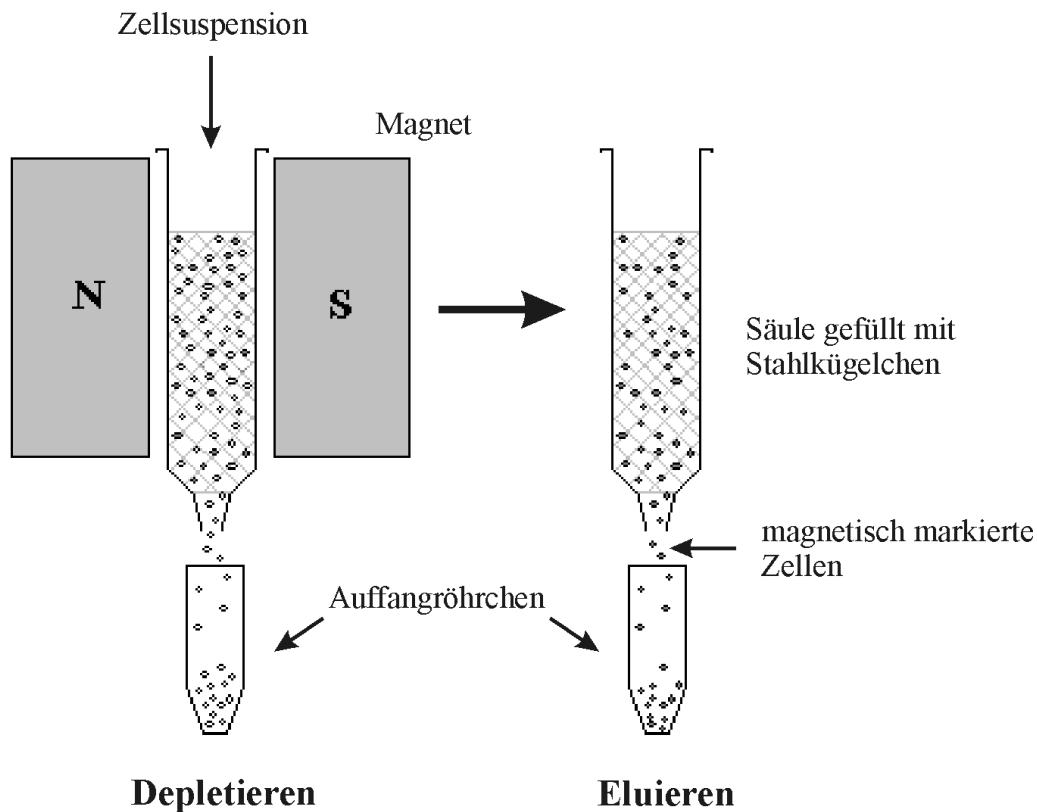
### 3.2.3 Magnetische Zellsortierung

Zur Isolierung verschiedener Zellen wurde das magnetische Zelltrennungssystem MACS (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) verwendet (Miltenyi et al., 1990).

Bei diesem System werden sehr kleine, supermagnetische Partikel (ca. 50nm) eingesetzt, die nicht viel größer als Antikörper sind. Die Antikörper können ähnlich wie Fluorochrome auf verschiedene Weise mittels monoklonaler Antikörper spezifisch an bestimmte Zellen gebunden werden. Die Bindung kann direkt über Antikörper-Magnetpartikel-Konjugate erfolgen oder indirekt über anti-Antikörper-Magnetpartikel-Konjugate. Die Trennung spezifisch markierter Zellen von unmarkierten Zellen erfolgt in einem Hochgradienten-Magnetfeld, das durch Insertion einer aus ferromagnetischen Stahlpartikeln bestehenden Säulenmatrix in das Magnetfeld eines Hochleistungspermanentmagneten erzeugt wird (siehe Bild 2). Wird die Zellsuspension über die Säule gegeben, bleiben die magnetisch markierten Zellen an den Stahlkugeln hängen, während die unmarkierten Zellen die Säule durchlaufen und als negative Fraktion aufgefangen werden. Die markierten Zellen lassen sich durch Ausspülen der Säule außerhalb des Magnetfeldes gewinnen (Elution). Das MACS- System kann zur Anreicherung oder zum Ausschluß einer Zellpopulation (Depletion) aus einer Gesamtzellpopulation eingesetzt werden. Zur Kontrolle der Separation werden Originalfraktion, negative und positive Fraktion anschließend durchflußzytometrisch analysiert. Folgende Reagenzien und Materialien wurden von Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach) zur Verfügung gestellt:

CD4 MultiSort MicroBeads, CD45RA MicroBeads, CD45RO MicroBeads, CD31 MicroBeads (Klon156.15), anti-NP MicroBeads, MS+ Säulen, VS+ Säulen, Stopp-Reagenz, Release-Reagenz.

Magnetische Zellsortierung



**Bild 2: Magnetische Zellsortierung mit MACS**

Eine Zellsuspension, die mit Antikörpern supermagnetisch und fluoreszent markierte und unmarkierte Zellen enthält, wird über eine mit Stahlkügelchen gefüllte Säule gegeben, die sich in einem starken Magnetfeld befindet. Die markierten Zellen bleiben im Hochgradientenfeld an den Stahlkügelchen hängen, während die unmarkierten Zellen die Säule durchlaufen. Entfernt man die Säule anschließend, lassen sich die Zellen leicht und vollständig eluieren.

3.2.4 Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung

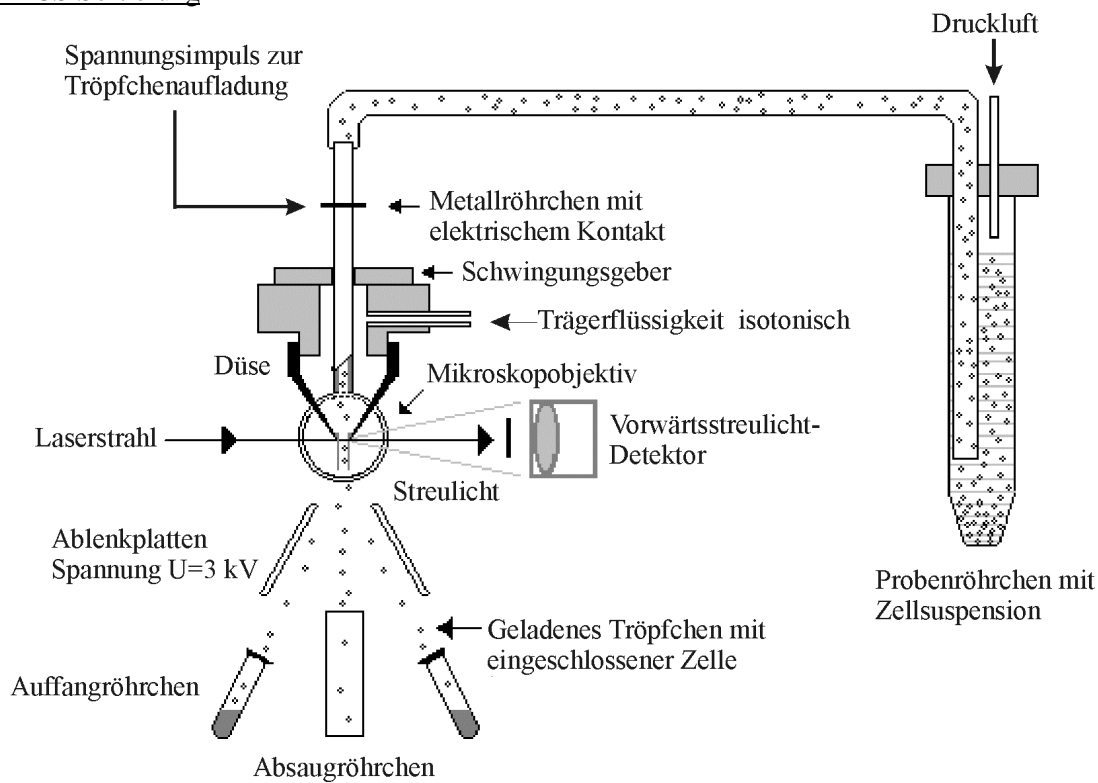
Eine Zellsuspension, die mit fluoreszenten Antikörpern gefärbte Zellen enthält (siehe Abb.8), wird mit Druckluft aus dem Probenröhrchen durch einen dünnen Schlauch und ein Metallröhrchen in eine Düse gepreßt. Die Zellen treten aus dem Metallröhrchen in das Zentrum der Düse ein und aus der 70µm weiten Öffnung wieder aus. Von der Seite wird eine isotone Hüllflüssigkeit zugeführt. Die Zellen werden innerhalb der Düse enorm beschleunigt (bis zu 10000g), wodurch sie einer erheblichen Belastung ausgesetzt werden. Die Geschwindigkeit der Zellen beim Austritt aus der Düse beträgt ca. 9m/s. Etwa 0,3mm unterhalb der Düsenöffnung trifft ein fokussierter Laserstrahl den austretenden Flüssigkeitsstrahl. Die den Laserstrahl passierenden Zellen streuen das Licht in verschiedene Richtungen, zusätzlich senden

die zuvor mit fluoreszierenden Antikörpern gekoppelten Zellen Fluoreszenzlicht aus. Das von den Zellen in Richtung des Lasers gestreute Licht wird von einer speziellen Optik in einem relativ engen Winkel erfaßt und mit einem Lichtsensor als sogenanntes Vorwärtsstreulicht gemessen (FSC), das ein Maß für die Größe der Zellen ist. Das vom Mikroskopobjektiv hinter der Düse aufgefangene Licht ist das sogenannte Seitwärtsstreulicht (SSC) und das emittierte Fluoreszenzlicht der Antikörper-Fluoreszenzkonjugate. Während das Seitwärtsstreulicht ein Maß für die Granularität der Zellen ist, ist das Fluoreszenzlicht für die verwendeten Fluorochrome spezifisch. Es wird durch einen optischen Interferenzfilter nach Wellenlängen getrennt und gelangt auf die hochempfindlichen Lichtsensoren. Die verschiedenen Signale einer Zelle werden durch eine spezielle Elektronik weiterverarbeitet und graphisch dargestellt (Abb.1).

In dieser Arbeit wurde die „Dot-Plot“ Darstellung gewählt, eine zweidimensionale Darstellung zweier Parameter. Jede Zelle wird entsprechend ihrer Werte für Parameter 1 (X-Achse) und Parameter 2 (Y-Achse) zwischen X- und Y-Achse als Punkt eingetragen. Auf dem „Dot-Plot“ lassen sich Flächen (Gates) für die Sortierung markieren (Abb.12). Die betreffenden Zellen werden dann von der Elektronik abgelenkt.

Die Zellen fliegen nach der Messung zum Abrißpunkt, wo der Flüssigkeitsstrahl durch einen piezoelektronischen Schwingungsgeber stabilisiert, in Tröpfchen aufbricht (20-200000 Tröpfchen/sec). Dabei werden die Zellen in einzelne Tröpfchen verpackt. Soll eine Zelle isoliert werden, wird das Tröpfchen kurz vor dem Abreißen vom Strahl mit einer elektrischen Ladung versehen. Es durchfliegt ein elektrostatisches Feld, das von zwei geladenen Metallplatten (3kV) erzeugt wird, und wird in Richtung des Auffangröhrchens bzw. der Kulturplatte abgelenkt.

FACS Sortierung



**Bild 3: Schematische Darstellung der Apparatur für die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS)**

Die zum Teil mit fluoreszierenden Antikörpern markierte Zellsuspension wird mit Druckluft durch eine Düse gepreßt, gleichzeitig wird eine Trägerflüssigkeit zugeführt. Unterhalb der Düsenöffnung trifft der Flüssigkeitsstrahl auf einen fokussierten Laserstrahl. Die den Laserstrahl passierenden Zellen streuen das Laserlicht, die markierten Zellen emittieren zusätzlich Fluoreszenzlicht. In Richtung des Laserstrahls wird das Vorwärtsstreulicht gemessen, im rechten Winkel das Seitwärtsstreulicht und die Fluoreszenzen. Am Abrißpunkt bricht der Flüssigkeitsstrahl in Tröpfchen auf. Die Tröpfchen können während des Abreißens vom Flüssigkeitsstrahl mit elektrischer Ladung versehen werden, indem kurzfristig der gesamte Flüssigkeitsstrahl aufgeladen wird. Geladene Tröpfchen mit den gewünschten Zellen werden beim Durchfliegen des elektrischen Feldes zwischen den geladenen Ablenkplatten in die jeweiligen Auffangröhrchen bzw. direkt in die Kulturplatte abgelenkt.

### 3.3 Antikörper

#### 3.3.1 Monoklonale Antikörper gegen humane Zytokine

Antikörper	Klon	Isotyp	Quelle	Markierung	Referenz
IL-2	N7.48A	mIgG2a	Dr C.Heusser, Ciba-Geigy, Basel, Schweiz	PE FITC DIG	Sander et al., 1991; Björk et al., 1992; Jung et al., 1993
IL-4	4D9	mIgG1	Dr C.Heusser, Ciba-Geigy, Basel, Schweiz	DIG PE NP	Sander et al., 1991; Jung et al., 1993
	7A3-3	mIgG1			
IFN- $\gamma$	GZ-4	mIgG1	Boehringer Mannheim	DIG FITC	Sander et al., 1991; Jung et al., 1993
	4SB3	mIgG1		DIG FITC	Maeger et al., 1984
	4515	mIgG1	Hölzel- Diagnostika	DIG FITC	
IL-12	C.8.6.2.2 p40+p70	mIgG1			Andrea et al., 1992
	C.8.1.1 p40+p70				
TNF- $\alpha$		mIgG1	Hölzel- Diagnostika	FITC	

3.3.2 Monoklonale Antikörper gegen humane Zelloberflächenmoleküle

Antikörper	Klon	Isotyp	Quelle	Markierung	Referenz
CD3	UCHT1	mIgG1	Pharmingen		
CD28	CD28.2	mIgG1	Immunotech, Marseille, France		McMichael et al., 1987 Olive et al., 1995
CD4	LEU-3a	IgG1K	Pharmingen	FITC PE CyChrome	Wang et al., 1990
CD45RO	UCHL1	IgG2a	"	FITC PE	Ryu et al., 1990
CD45RA	158.4D3	IgG	"	FITC PE Biotin	Newman et al., 1990
CD31	156.1	mIgG1	"	NP FITC PE	Mueller et al., 1989

2.3.3 Antikörper für IFN- $\gamma$  Quantifizierung durch fluoreszente Beads

Antikörper	Klon	Quelle	Markierung
IFN- $\gamma$	4515	Hölzel- Diagnostika	
IFN- $\gamma$	4311	Endogen, Cambridge, USA	PE



### 3.3.4 Sekundärantikörper

- DIG-spezifische Fab-Fragmente aus SchafsIgG (SaDIG) (Boehringer Mannheim)
- NP-spezifischer mAK S43-10
- Streptavidin-FITC (SA-FITC) (Boehringer Mannheim)
- SA-PE (Southern Biotechnology Associates)
- SA-Cychrome (Pharmingen)

### 3.4 Kopplung von Haptenen und Fluorochromen an Antikörper

Den Methoden zur Konjugation von Antikörpern ist gemeinsam, daß primäre Aminogruppen des Antikörpers an der Kopplungsreaktion beteiligt sind. Deshalb sind Anzahl und Position primärer Amine bei monoklonalen Antikörpern ein limitierender Faktor, und aus diesem Grunde dürfen keine anderen Amine im Reaktionsansatz enthalten sein.

Der Kopplung von Biotin, DIG und NP liegt eine Reaktion von N-Hydroxy-Succinimidestern mit primären Aminen des Antikörpers zugrunde. Hierbei handelt es sich um einen nukleophilen Angriff eines deprotoniertenamins auf eine Esterbindung, Verdrängung des N-Hydroxysuccinimids und Bildung einer Amidbindung. Diese nukleophile Substitution wird durch einen alkalischen pH begünstigt, da dieser die deprotonierte Form der Amine stabilisiert.

Für die Konjugation von Phycoerythrin (PE) an Antikörper werden beide Reaktionspartner zuvor über Amine derivatisiert. An PE werden Maleimid- und an den Antikörper Thiolgruppen gekoppelt. In der eigentlichen Kopplungsreaktion reagieren Maleimide mit protonierten Sulfhydrylgruppen unter Bildung stabiler Thioetherbindungen. Um eine Hydrolyse der Maleimide zu vermeiden und die Thiole in reduziertem Zustand zu stabilisieren, findet die Reaktion bei pH 6-7 statt. Um ein Ausbleichen der Fluorochrome und deren Konjugate zu vermeiden, müssen diese vor Lichteinstrahlung geschützt werden.

### 3.4.1 Kopplung von Succinimidestern

Zur Kopplung verwendete Succinimidester:

Dig Digoxigenin-3-O-Methylcarbonyl-e-Aminocapronsäure-N-Hydroxysuccinimidester (Boehringer Mannheim)

NP 3-Nitro-4-Hydroxyphenyl-Acetyl-N-Hydroxysuccinimidester (Genosys Biotechnologies, The Woodlands, USA)

Biotin Sulfosuccinimidyl-6-(biotinamido)-Hexanoat (Pierce, Rockford, IL, USA)

FITC Fluorescein 5-isothiocyanat (Sigma, Deutschland)

Cy5 Cy5-OSu Bisfunctional Dye (BDS Inc., Pittsburgh, USA)

Die Antikörper werden vor der Kopplung, falls notwendig, durch Gelchromatographie über PD-10- oder Nap5-Säulen (Pharmacia, Uppsala, Schweden) von Azid befreit und in Boratpuffer pH 8,5 (bzw. pH 9,5 für FITC) überführt. Die Proteinkonzentration wurde auf ca. 1mg/ml eingestellt. Die zu koppelnden Succinimidester werden in Dimethylsulfoxid (DMSO) in einer Konzentration von 2mg/ml gelöst und in einem 10-50 molaren Überschuß zur Antikörperlösung hinzugegeben. Diese Mischung wird eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln gerührt/inkubiert und anschließend über eine PD-10 Säule gegeben, um freies Hapten/Fluorochrom zu entfernen. Das Konjugat wird über Nacht gegen PBS/NaN<sub>3</sub> bei 4°C dialysiert. Entstandene Aggregate werden durch Zentrifugation entfernt. Die Aufbewahrung der Konjugate erfolgt bei -70°C im PBS/0,05%NaN<sub>3</sub>.

### 3.4.2 Kopplung von Phycoerythrin (PE)

#### I. Modifizierung des Antikörpers

Der zu konjugierende Antikörper wird bei einer Konzentration von 5-10mg/ml in PBS/2mMEDTA pH 7,5 dialysiert.

Pro Milligramm gekühlten Antikörper werden 3µl einer N-Succinimidyl-S-acetylthioacetat-Lösung (SATA) (5mg/ml SATA in DMSO) zugegeben und anschließend bei RT für 30-60 min gerührt. Mittels einer NAP-10-Säule (Pharmacia, Uppsala, Schweden) wird der SATA-Ak danach in PBS/EDTA pH 6,5 umgepuffert.

## II. Modifizierung des PE:

R-Phycoerythrin (gelöst in 60%igem Ammoniumsulfat/100mM Phosphat/0,01% NaN<sub>3</sub>) (Cyanotech Corporation, Kailua-Koua, Hawaii, USA) wird abzentrifugiert und bei einer Konzentration von 5mg/ml in PBS/EDTA pH 7,5 resuspendiert. Pro mg PE werden anschließend 6,7µl Sulfo-succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexan-1-carboxylat (Sulfo-SMCC) (5mg/ml in DMSO) langsam zugegeben und der Ansatz 30-60min bei RT gerührt. Mittels einer NAP-10-Säule wird das SMCC-PE in PBS/EDRA pH 6,5 umgepuffert.

## III. Entfernen der Schutzgruppe vom SATA-Ak:

Zur SATA-Ak-Lösung werden 10µl einer Hydroxylamin-Lösung (2,5M Hydroxylamin-HCL in PBS/EDTA, pH 6,5) tropfenweise zugegeben. Die Lösung wird langsam 30-60min bei RT gerührt.

## IV. Kopplung des SATA-IG mit SMCC-PE:

Pro mg SATA-Ak-Lösung werden tropfenweise 4mg SMCC-PE zugegeben und für 30-60min bei RT gerührt. Zum Abstoppen der Reaktion werden pro ml Konjugat 5µl 50mM 2-Mercaptoethanol (2-ME) zugesetzt und der Ansatz für 15min bei RT gerührt. Nach Zugabe von 10µl 50mM N-ethyl-maleimid (5mg/ml in DMSO) pro ml Konjugat wird erneut 15min bei RT gerührt. Das Ak-PE-Konjugat wird dann mittels einer NAP-10-Säule oder Dialyse in PBS/NaN<sub>3</sub> umgepuffert.

### **3.5 Polyklonale in vitro Th- Zell-Stimulation**

MACS-isolierte CD4<sup>+</sup> Th-Zellen oder Subpopulationen dieser Zellen wurden in einer Zellkonzentration von  $1-2 \times 10^6$  /ml in RPMI 1640 (Zusätze siehe oben) aufgenommen. Zur 6h-Stimulation wurde Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA), 5ng/ml und Ionomycin, 1µg/ml (Sigma, Deisenhofen) verwendet. Für die letzten zwei Stunden wurde der Sekretionsinhibitor Brefeldin A, 5µg/ml (Sigma, Deisenhofen) zugegeben.

## **2.6 Coaten von Zellkulturplatten mit immobilisierten $\alpha$ CD3 (UCHT1) und $\alpha$ CD28 (CD28.2) -Antikörpern**

96- oder 24-Loch-Platten (Costar, Niederlande) wurden mit 50 bzw. 200ml/well Antikörper/PBS-Lösung über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Hierbei wurde, wenn nicht anders beschrieben, je 1 $\mu$ g und 5 $\mu$ g der immobilisierten  $\alpha$ CD3- und  $\alpha$ CD28-Antikörper eingesetzt. Direkt vor Kultivierung der Zellen wurde die Antikörper/PBS-Lösung vorsichtig abpipettiert und die Löcher 2-3mal mit PBS gewaschen, um die gelösten Antikörper zu entfernen.

## **3.7 Immunfluoreszenzfärbungen**

### **3.7.1 Fixierung von Zellen in Suspension**

Die Zellen werden einmal mit PBS gewaschen, dann bei  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in 2% Formaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland) in PBS aufgenommen und danach 20min bei RT fixiert. Anschließend werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und zuletzt in PBS/BSA/ $\text{NaN}_3$  mit  $1-2 \times 10^6$  Zellen/ml resuspendiert. Bis zur Färbung werden die Zellen bei 4°C aufbewahrt.

### **3.7.2 Intrazelluläre Färbung von Zytokinen**

Für intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbungen werden die Zellen mit Formaldehyd fixiert und mit Saponin permeabilisiert. Saponin muß bei allen Färbe- und Waschschritten der intrazellulären Färbung anwesend sein, da die Permeabilisierung der Zellmembran durch Saponin reversibel ist. Die Markierung der intrazellulären Zytokine erfolgt entweder durch Hapten-konjugierte Antikörper und Fluorochrom-konjugierte Sekundäntikörper gegen das jeweilige Hapten oder durch direkt Fluorochrom-konjugierte Antikörper gegen das jeweilige Antigen.

### 3.7.3 Färbung von Zelloberflächenmolekülen auf lebenden Zellen

Die Zellen werden in PBS/BSA/ $\text{NaN}_3$  gewaschen und für 10min bei  $4^\circ\text{C}$  mit fluoreszent markierten Antikörpern inkubiert. Anschließend werden die Zellen wieder gewaschen und durchflußzytometrisch analysiert. Unmittelbar vor der Messung wird der Zellpopulation Propidiumjodid (PJ) (0,2-1ng/ml) zugesetzt, um tote Zellen zu markieren. PJ lagert sich in die DNA ein, nachdem es durch die beschädigte Zellmembran in die Zelle gelangt ist.

Bei gleichzeitiger intrazellulärer und Oberflächenfärbung werden erst die Oberflächenfärbungen in PBS und dann die intrazellulären Markierungen in Saponinpuffer durchgeführt.

## 2.8 Durchflußzytometrie

Die Prinzipien dieser Methode sind anderweitig ausführlich beschrieben (Radbruch 1992). Bei der durchflußzytometrischen Analyse werden Zellen anhand ihrer Lichtstreuungseigenschaften und bis zu fünf weiteren Parametern anhand emittierter Fluoreszenzstrahlung auf Einzelzellebene charakterisiert.

Die gefärbten Zellen passieren in einem Flüssigkeitsstrom hydrodynamisch fokussiert nacheinander einen Laserstrahl, eventuell anschließend einen zweiten. Dabei werden geeignete Fluorochrome zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt. Zusätzlich streuen die Zellen das auftreffende Licht. Das in einem geringen Winkel ( $3\text{-}10^\circ$ ) gestreute Licht wird als "Vorwärtsstreulicht" FSC bezeichnet und korreliert in erster Näherung mit der Zellgröße. Das um  $90^\circ$  reflektierte Licht wird als Seitwärtsstreulicht (SSC) bezeichnet und korreliert mit der Granularität und der Membranfaltung der Zelle. Neben diesen beiden Parametern stehen für die Messungen des emittierten Fluoreszenzlichtes drei Systeme aus Bandpaßfiltern und Photoröhren zur Verfügung, in der Regel für 530nm (Fluoreszenzkanal FL1), 585nm (FL2) bzw.  $>650\text{nm}$  (FL3) (über den ersten Laser). Über einen zweiten Dioden-Laser kann ein zusätzlicher Fluoreszenzparameter durch eine zweite (veränderte) Anregungswellenlänge zur Verfügung stehen (FL4: 670nm). Hiermit ist bei einer großen Zellzahl eine schnelle, quantitative, sechs Parameter umfassende Analyse möglich.

Für die durchflußzytometrische Analyse wurde ein FACS-Calibur (Becton-Dickinson) mit einem luftgekühlten Argonlaser und einem zweiten, roten Dioden-Laser verwendet. FSC und SSC-Signale wurden mit linearer, die Fluoreszenzsignale in logarithmischer Verstärkung aufgenommen. In der Regel wurden die Daten von 10.000 Zellen pro Probe aufgenommen. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der Cellquest Research Software (Becton-Dickinson).

Die Daten wurden entweder als eindimensionale Histogramme oder zweidimensionale "Punkt-Bilder" ("Dot-Plots") dargestellt und analysiert.

Als Fluorochrome wurden FITC (Floureszeinisothiocyanat, FL1), PE (Phycoerythrin, FL2), CyChrome (FL3), PerCP (FL3) und Cy5 (FL4) verwendet. Durch das Setzen von Analysefenstern konnten Zellpopulationen selektiv analysiert werden. Die durch PJ gefärbten toten Zellen konnten aufgrund der sich durch die Färbung ergebenden Streueigenschaften durch ein Analysefenster ausgeschlossen werden.

### **3.9 Quantifizierung der IFN- $\gamma$ Konzentration in Zellkulturüberständen durch fluoreszente Beads**

Die von U. Karkmann in unserem Labor etablierte Methode basiert auf der spezifischen Antigenerkennung von Antikörpern. Der 1.IFN- $\gamma$ -Antikörper (4515) wird an Polymer-Beads (Bangs Laboratories, Fishers, Indiana) gekoppelt. (Die Kopplung wurde von U. Karkmann durchgeführt). Nach einer halben Stunde Inkubation des gelösten Antigens (je 200ml Standard und Proben) mit ca. 200.000 gekoppelten Beads (bei RT) wird die Mischung bei 13000U zentrifugiert und einmal mit PBS/BSA/Azid gewaschen. Das Pellet wird in 100ml PBS/BSA aufgenommen, anschließend erfolgt die Zugabe des 2.PE-gekoppelten IFN- $\gamma$  Antikörper (4311). Nach Mischen und einer weiteren Inkubationszeit von 20 Minuten bei RT erfolgt ein erneuter Waschschrift und die Resuspension des Pellets in 0,5ml PBS/BSA. Die Proben und die Standardreihe werden durchflußzytometrisch analysiert, als Standard wird rekombinantes humanes IFN- $\gamma$  in einer Anfangskonzentration von 50ng/ml verwendet. Die Auswertung der Daten erfolgt mit dem von U. Karkmann erstellten Analyseprogramm.