

3 METHODEN

Falls nicht anders vermerkt, wurden die Arbeitsprotokolle den Methodensammlungen von Jones (Jones, 1996), Poirier (Poirier, 1997), Sambrook (Sambrook, 1989) und Lindl (Lindl, 1989) sowie der CD- bzw. Online-Version des *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products* (Haughland, 2001) und *Current Protocols* (Robinson, 1999) entnommen.

3.1 Präparation mononukleärer Zellen

3.1.1 Präparation mononukleärer Zellen mittels Vacutainer System

Antikoaguliertes (Heparin, EDTA) Vollblut oder Knochenmark wurde in ein Vacutainer CPT-Röhrchen gegeben und gegebenenfalls mit mit 20% FBS supplementiertem RPMI 1640-Medium auf insgesamt 6-8 mL aufgefüllt. Das gefüllte Röhrchen wurde für 20 Minuten bei 1500 x g mit Bremse bei Raumtemperatur (18-21°C) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Ring der Mono- und Lymphozyten, der sich ausgebildet hatte mit einer sterilen Pasteur-Pipette abgenommen und in ein Reagenzröhrchen umgefüllt. Dort wurde die Zellsuspension mit RPMI 1640-Medium, (20% FBS) verdünnt und anschließend für 5 Minuten bei 300 x g mit Bremse zentrifugiert. Der Vorgang des Waschens wurde noch einmal wiederholt. Anschließend wurde die Gesamtzellzahl bestimmt (siehe Kapitel 3.4.2) und die Zellen auf Kulturflaschen mit RPMI 1640-Medium (20% FBS) aufgeteilt oder kryokonserviert.

3.1.2 Präparation mononukleärer Zellen mittels Ficoll

Antikoaguliertes (Heparin, EDTA) Vollblut oder Knochenmark wurden im Verhältnis 1:2 mit PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gemischt. Danach wurde das Lymphozytentrennmedium (Ficoll) mit jeweils der gleichen Menge an verdünntem Vollblut überschichtet. Dieses 2-Phasen-System wurde bei Raumtemperatur für 20 Minuten mit 700 x g ohne Bremse zentrifugiert. Der weißliche Ring über dem Ficoll, der die Lympho- und Monozyten beinhaltete, wurde anschließend mit einer sterilen Pasteur-Pipette abgenommen, in ein Reagenzröhrchen (15 mL) überführt, mit PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ verdünnt und 10 Minuten bei 700 x g mit Bremse zentrifugiert. Der Vorgang des Waschens wurde einmal wiederholt, anschließend die Gesamtzellzahl bestimmt (siehe Kapitel 3.4.2) und die Zellen auf Kulturflaschen mit

RPMI 1640-Medium (20% FBS) aufgeteilt oder kryokonserviert. Die Isolation der mononukleären Zellen wurde stets unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

3.2 Separation CD 34+-Zellen mittels *Multi-Parameter Magnetic Cell Sorting* (MACS)

Mit Hilfe von MS+-Trennsäulen ist es möglich, Zellen, die auch nur in geringer Anzahl in einer heterogenen Zellsuspension vorhanden sind, mittels positiver oder negativer Selektion in Verbindung mit dem MiniMACS-System zu isolieren (Miltenyi, 1990; Kato, 1993; Miltenyi, 1994). Die zu trennenden Zellen müssen als Einzelzellen in Suspension vorliegen und es dürfen keine Klumpen, Aggregate oder Teilchen größer als 30 µm enthalten sein.

Alle Arbeitsschritte wurden mit gekühlten Reagenzien und Arbeitsmaterialien gemäß den Vertreiberangaben und unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Selbst hergestellte Puffer wurden vor Gebrauch sterilfiltriert.

3.2.1 Präparation der MS+-Trennsäulen

Nach der Befestigung des MiniMACS-Magneten an der MiniMACS-Magnetwand erfolgte das Einsetzen der MS+-Trennsäule in den Magneten mit einem unter der MS+-Trennsäule platzierten Auffangröhrchen. 500 µL des entgasten MACS-Puffers (PBS ohne Ca²⁺ und ohne Mg²⁺, mit 0,5% BSA und 2 mM EDTA) wurden auf eine Säule gegeben und in dem Auffangröhrchen unter der Säule gesammelt. Ein neues Auffangröhrchen wurde unter der MS+-Trennsäule platziert, um dort später die nicht markierten Zellen zu sammeln.

3.2.2 Magnetische Markierung der Zellen

Die frisch mittels Ficoll gewonnenen oder aufgetauten mononukleären Zellen wurden zweimal mit MACS-Puffer gewaschen und schließlich eine maximale absolute Zellzahl von 10⁸ Zellen in 300 µL Puffer aufgenommen. Um unspezifische Bindungen der *CD34 Multisort MicroBeads* zu verhindern, erfolgte die Zugabe von 100 µL des *FcR Blocking Reagenz* zu der Zellsuspension. Anschließend wurden 100 µL der *CD34 Multisort MicroBeads* hinzugefügt, das Gemisch auf dem Horizontalrotationsschüttler gemischt und anschließend bei 6-12°C für 30 Minuten inkubiert. Schließlich wurden die Zellen mit 4,5 mL MACS-Puffer verdünnt, bei

300 x g für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand entfernt und je nach Größe des Pellets 500 µL-1000 µL des MACS-Puffers dazugegeben.

3.2.3 Magnetische Separation der markierten Zellen

Auf die zuvor präparierte Säule wurden die Zellsuspension und anschließend nacheinander dreimal je 500 µL MACS-Puffer gegeben. Die MACS-Puffer-Zellsuspensions-Mischung, welche die MS+-Trennsäule durchlaufen hatte, wurde in einem darunter platzierten Auffangröhrchen gesammelt und verworfen. Anschließend wurde die Säule aus dem Magneten entfernt und auf ein neues Auffangröhrchen gesetzt. Eine erneute Spülung der Säule mit 500 µL des MACS-Puffers erfolgte, wodurch die entsprechende zuvor magnetisch markierte Zellpopulation aus der Säule gewaschen wurde. Die in dem untergestellten Röhrchen gesammelte, positive Fraktion wurde anschließend mit RPMI 1640-Medium (20% FBS) verdünnt und für 10 Minuten bei 700 x g zentrifugiert. Schließlich erfolgte die Aufnahme der Zellen in RPMI 1640-Medium (20% FBS) und die Weiterverarbeitung. Die *MicroBeads* verblieben auf den Zellen.

3.3 CFU Assay³

Mononukleäre Zellen wurden für die Ansätze mit Thymoglobulin von Mérieux mit RPMI 1640-Medium (20% FBS) auf $12,8 \times 10^6$ Zellen/mL eingestellt. Bei reinen CD34+-Zellen wurden die Ansätze auf $12,8 \times 10^4$ Zellen/mL eingestellt. 30 µL dieser Zellsuspension wurden 3,05 mL frisch aufgetautem MethoCult H4431 Medium zugesetzt. Für eine Endkonzentration von 1000 µg/mL ATG wurden dem Zell-MethoCult-Gemisch 770 µL der Stocklösung des Thymoglobulins von Mérieux zugesetzt, für 100 µg/mL 770 µL einer mit RPMI 1640-Medium (20% FBS) 1:10 verdünnten, frisch angesetzten ATG-Lösung. Für eine 10 µg/mL Endkonzentration wurde 1:100 verdünnt, für 1 µg/mL 1:1000 und für 0,1 µg/mL 1:10000. Jeweils 770 µL dieser Lösungen wurden dem MethoCult mit den Zellen zugesetzt. Für die Ansätze mit Lymphoglobulin von Mérieux wurden die Zellen auf $2,4 \times 10^6$ Zellen/mL bei mononukleären Knochenmarkzellen bzw. auf $2,4 \times 10^4$ Zellen/mL bei CD 34+-Zellen mit RPMI 1640-Medium (20%FBS) eingestellt.

³ Angaben hierzu u.a. aus StemCell Technologies (StemCell Technologies, 2003).

Die Zellen wurden zu 3,5 mL MethoCult H4431-Medium gegeben und diesem Gemisch für eine Endkonzentration von 1000 µg/mL ATG 190 µL des Lymphoglobulins zugesetzt. Für die Konzentrationen von 100 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL und 0,1 µg/mL wurden mit RPMI 1640-Medium (20% FBS) Verdünnungen von je 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000 hergestellt und davon je 190 µL zu den Zellen im MethoCult Medium gegeben. Den Kontrollen wurde anstelle des ATG RPMI 1640-Medium (20% FBS) zugesetzt, im Falle des Thymoglobulins 770 µL, bei Lymphoglobulin 190 µL. Das Zell-MethoCult-Gemisch mit ATG wurde gut gemischt und bei Raumtemperatur 15 Minuten im Dunkeln belassen, bis es blasenfrei war. Anschließend wurde je 1 ml Medium-Zellgemisch mit einer Tuberkulin-Spritze in eine Zellkultur Petrischale mit Raster gegeben (1×10^5 Zellen/Schale) und mit einem Deckel versehen. Je sechs Schalen mit Zell-Medium-Gemisch wurden zusammen mit einer NUNC-Zellkultur-Petrischale ohne Raster, gefüllt mit Aqua dest. und ohne Deckel, für die Inkubation im Brutschrank in eine große Zellkultur Petrischale gestellt.

Alle Arbeitsschritte erfolgten an einer Sterilbank mit sterilen Reagenzien.

Nach einer Inkubationsdauer von 14 Tagen im Feuchtbrutschrank bei 37°C und 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit wurden die entstandenen *Cluster*, *granulocyte-monocyte colony forming units (CFU-GM)*, die *erythroid burst forming units (BFU-E)*, die *erythrocyte colony forming units (CFU-E)* und gemischte Kolonien (*CFU-GEMM*), die sowohl granulozytäre-monozytäre als auch erythrozytäre Elemente enthalten, mit einem inversen Mikroskop ausgezählt. Gruppen von mehr als 40 Zellen wurden als Kolonie definiert (Eaves, 1995).

3.4 Bestimmung der Zellzahl

3.4.1 Bestimmung der Zellzahl mittels Trypanblau

Die jeweilige Zellsuspension wurde mit Trypanblau im Verhältnis 1:10 verdünnt. Danach erfolgte die Bestimmung der Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer (Hämocytometer). Dazu wurden unter einem inversen Mikroskop (Phasenkontrast) bei 100facher Vergrößerung zweimal 16 Felder der Zählkammer ausgezählt, der Mittelwert der jeweiligen Summen gebildet und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die Zellzahl berechnet. Gleichzeitig konnte der Prozentsatz der vitalen Zellen, d. h. der nicht angefärbten Zellen, bezogen auf die Gesamtzellzahl bestimmt werden, da Trypanblau nur durch die Zellmembran toter Zellen diffundieren kann und somit nur diese blau anfärbt.

3.4.2 Bestimmung der Zellzahl mittels Türkscher Lösung

Nach der Gewinnung der Zellen mittels Ficoll erfolgte die Bestimmung der Zellzahl mittels gepufferter Türkscher Lösung. Türksche Lösung färbt selektiv nur die kernhaltigen Zellen an, wodurch es möglich wurde, die eventuell noch vorhandenen Erythrozyten und Thrombozyten auszugrenzen und die genaue Anzahl der Lymphozyten bzw. mononukleären Zellen zu bestimmen. Die jeweilige Zellsuspension wurde mit Türkscher Lösung 1:10 verdünnt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte wie oben beschrieben mit der Neubauer-Zählkammer.

3.5 Kryokonservierung der Zellen

Falls die aus der jeweiligen Blutprobe isolierten mononukleären Zellen nicht sofort weiter verarbeitet werden konnten, wurden die Zellen in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff bei -196°C eingefroren. Hierzu wurden Zellen (1×10^6 - 1×10^7) in 1 mL Einfriermedium (RPMI 1640, 20% FBS, 10% DMSO) resuspendiert.

3.6 Auftauen der Zellen

Kryoröhrchen mit tiefgefrorenen Zellen wurden einzeln aus dem Stickstoff entnommen und im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Um die Vitalität der Zellen zu erhalten, wurden die aufgetauten Zellen durch sofortige Zugabe von vorgewärmtem Medium (20% FBS) verdünnt, anschließend mit $700 \times g$ bei 20°C für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Der Waschvorgang wurde wiederholt, die Zellen anschließend erneut in Medium aufgenommen und die Zellzahl und Vitalität mittels Trypanblau oder Türkscher Lösung bestimmt und die Zellen weiterverarbeitet.

Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

3.7 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden den Vertreiberangaben folgend kultiviert. Sämtliche Arbeitsschritte im Rahmen der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen mit sterilen Materialien und Reagenzien an einer für Arbeiten mit Zytostatika geeigneten Sterilbank durchgeführt. (Lindl, 1989; Jones, 1996; Poirier, 1997).

Alle selbst hergestellten Lösungen wurden vor Gebrauch sterilfiltriert.

Wenn vom Vertreiber nicht anders empfohlen, erfolgte die Kultivierung der Zelllinien bei 37°C, 5% CO₂, 95% relativer Luftfeuchtigkeit im Feuchtbrutschrank in Zellkulturflaschen in RPMI 1640-Medium (supplementiert mit 10% FBS, 2 mmol/L L-Glutamin und Antibiotika, Penicillin 100 U/mL, Streptomycin 100 µg/mL, und Phenolrot). Die Zelldichte wurde alle 2-3 Tage bestimmt und die Zellen nach den vom Vertreiber empfohlenen Richtlinien verdünnt.

Die aus dem peripheren Blut isolierten mononukleären Zellen, sowie die KG-1a-Zellen wurden in supplementiertem Medium RPMI 1640-Medium, (20% FBS) kultiviert.

3.7.1 Inkubation von Zellen mit IgG-Kontrollantikörpern

Den in Gewebekulturplatten überführten und nach Vertreiberangaben kultivierten KG-1a-Zellen wurden entweder Pferde-IgG- oder Kaninchen-IgG-Kontrollantikörper in den Endkonzentrationen von 0 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL bzw. 1000 µg/mL über einen Zeitraum von bis zu 10 Tagen hinzugefügt. Jeden zweiten Tag erfolgte die Bestimmung der Zellzahl und die gegebenenfalls notwendige Verdünnung der Zellen. Zu den Zeitpunkten 0, 2, 4, 7, 10 Tage erfolgte eine 7-AAD-Färbung mit anschließender durchflusszytometrischer Messung.

3.7.2 Apoptoseinduktion in Zellen mit ATG, Zytostatika, Arsenitrioxid

Exponentiell wachsende Zelllinien (HL-60, Jurkat, K-562, KG-1a, NB-4, U-937) wurden in Zellkulturflaschen über Zeiträume von bis zu zehn Tagen mit ATG in den Endkonzentrationen von 0 µg/mL, 0,1 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL, 1000 µg/mL oder Zytostatika (Etoposid 50 µM) oder Arsenitrioxid (5 µM) inkubiert. Alle vier genannten ATG-Präparationen fanden Anwendung. Jeden zweiten Tag wurde die Zellzahl bestimmt und je nach Bedarf Verdünnungen, den jeweiligen Richtlinien entsprechend, hergestellt. Falls notwendig, wurden aus den jeweiligen Stammlösungen der Reagenzien in dem für die jeweilige Zelllinien entsprechenden Medium Verdünnungen hergestellt. Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. An den Tagen 0, 2, 4, 7 und 10 wurde eine Annexin/7-AAD-Doppelmarkierung der Zellen mit anschließender durchflusszytometrischer Analyse durchgeführt (Schrezenmeier, 2001).

3.7.3 Inkubation mononukleärer Zellen von MDS-Patienten mit ATG

Die aus peripherem Blut isolierten mononukleären Zellen von MDS-Patienten wurden mit ATG Tecelac oder Lymphoglobulin (Mérieux) in Konzentrationen von 0 µg/mL, 10 µg/mL und 100 µg/mL bis zu vier Tage in RPMI 1640-Medium (20% FBS) inkubiert. Die durchflusszytometrische Analyse der CD3/7-AAD oder CD34/7-AAD doppeltmarkierten Zellen erfolgte an den Tagen 0 und 4.

3.7.4 Apoptoseverhalten von Zelllinien bei Koinkubation mit ATG und Etoposid

KG-1a-Zellen wurden mit ATG Tecelac in den Konzentrationen 0 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL, 1000 µg/mL bzw. mit Zytostatika (Etoposid, VP-16) in den Konzentrationen 2 µM, 10 µM und 50 µM bis zu sieben Tage nach Vertreiberangaben koinkubiert. Die Bestimmung der Zellzahl und eine gegebenenfalls notwendige Verdünnung erfolgten jeden zweiten Tag. An den Tagen 0, 2 und 7 erfolgte eine Annexin/7-AAD-Färbung mit anschließender Analyse der Zellen am Durchflusszytometer.

3.7.5 Apoptoseverhalten von Zelllinien bei Koinkubation mit ATG und G-CSF

KG-1a-Zellen wurden mit Lymphoglobulin (Mérieux) in Endkonzentrationen von 0 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL bzw. 1000 µg/mL mit 5 ng/mL oder mit 50 ng/mL des Wachstumsfaktors G-CSF oder mit 50 µM Etoposid (VP-16) koinkubiert. Jeden zweiten Tag erfolgten Bestimmungen der Zellzahl und die gegebenenfalls notwendigen Verdünnungen. Die durchflusszytometrische Analyse der Annexin/7-AAD doppeltmarkierten Zellen erfolgte an den Tagen 0, 2 und 7.

3.7.6 Koinkubation von Zellen mit ATG und Z-DEVD-FMK

Die Zellen der Zelllinie NB-4 wurden aus einer Zellkulturflasche in eine 48-Napf-Zellkulturplatte in einer vom Vertreiber empfohlenen Konzentration überführt und mit ATG in den Endkonzentrationen 0 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL bzw. 1000 µg/mL oder 50 µM Etoposid und mit dem Caspasen-Inhibitor Z-DEVD-FMK (50 µM) koinkubiert. Z-DEVD-FMK bindet durch seinen Fluoromethylketonrest irreversibel an aktivierte Caspasen und bewirkt dadurch eine Inhibition aktivierter Caspasen. Es werden vorwiegend die Caspase-3, aber auch die Caspasen-6, -7, -8 und -10 inhibiert. In den Koinkubationsansätzen wurde der

Caspasen-Inhibitor eine Stunde vor dem ATG den Zellen hinzugefügt. Versuche wurden für alle vier ATG-Präparationen durchgeführt. Zu den Zeitpunkten 0 Stunden und 48 Stunden erfolgte eine 7-AAD-Färbung mit anschließender Messung der Zellen am Durchflusszytometer.

3.7.7 Koinkubation von Zellen mit ATG und Cyclosporin A (CsA)

CsA und Verapamil sind Substanzen, welche dafür bekannt sind, dass sie die Zellen dabei unterstützen, die *multiple drug resistance* zu überwinden, indem sie die Funktion des Glykoprotein-P (MDR) blockieren. Bereits mehrfach wurde bei KG-1a-Zellen die Expression von MDR nachgewiesen (Efferth, 1997; Mongkonsritragoon, 1998). Aufgrund dieser Tatsache konnte auch dieser Versuch mit KG-1a-Zellen durchgeführt werden.

Den in Zellkulturflaschen kultivierten KG-1a-Zellen wurden ATG (Lymphoglobulin oder Tecelac) in den Endkonzentrationen von 0 µg/mL, 10 µg/mL bzw. 100 µg/mL, Arsentrioxid (1 µM), Cyclosporin A (250 µg/L bzw. 5000 µg/L), Verapamil (20 µM) und DMSO einzeln oder in Kombination hinzugefügt. Die Zellen wurden bis zu 7 Tage inkubiert und nach Bedarf auf die vom Vertreiber empfohlene Zelldichte verdünnt. Die durchflusszytometrische Analyse der 7-AAD markierten Zellen erfolgte an den Tagen 0, 4 und 7.

3.7.8 Inkubation von Jurkat-Zellen mit ATG und 7C11 oder SM 1/23

Jurkat-Zellen, die sich in mit 10% FBS supplementiertem RPMI 1640-Medium befanden, wurden in ein Reagenzröhrchen (50 mL) überführt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Die Zellen wurden in PBS resuspendiert und wiederum zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes erfolgte die Aufnahme der Zellen in serumfreies QBSF 51-Medium und die Überführung in Zellkulturplatten für die weiteren Versuche. Das QBSF 51-Kulturmedium wurde gewählt, um eine eventuell vorhandene Wechselwirkung der im Serum (FBS) vorhandenen Proteine auf die Antikörperwirkung, vor allem des inhibierenden Antikörpers, zu vermeiden.

Koinkubation mit ATG und dem CD95-Antikörper 7C11

Je 3 mL der Jurkat-Zellen wurden mit ATG Tecelac oder Lymphoglobulin (0 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL, 1000 µg/mL), Etoposid (50 µM), dem monoklonalen,

inhibierenden CD95-Antikörper SM 1/23 (500 ng/mL) und dem monoklonalen, induzierenden CD95-Antikörper 7C11 (5 ng/mL) einzeln und in Kombination versetzt. Als Isotypenkontrolle wurden ein entsprechender IgM-Antikörper (5 ng/mL) und ein IgG-Antikörper (500 ng/mL) eingesetzt. Die durch die Zugabe der Substanzen entstanden unterschiedlichen Volumina wurden mit PBS ausgeglichen. Die Zellen wurden über 24 Stunden inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0 Stunden und 24 Stunden erfolgte eine 7-AAD Markierung der Zellen mit einer sich anschließenden Messung der Zellen am Durchflusszytometer.

Koinkubation von ATG mit dem CD95-Antikörper SM 1/23

3 mL der Jurkat-Zellen wurden mit ATG Tecelac oder Lymphoglobulin in den Endkonzentrationen 0 µg/mL, 100 µg/mL oder 1000 µg/mL, Etoposid (50 µM), dem monoklonalen, induzierenden CD95-Antikörper 7C11 (5 ng/mL) und dem monoklonalen inhibierenden CD95-Antikörper SM 1/23 (500 ng/mL) einzeln und in Kombination versetzt und über 48 Stunden inkubiert. Der inhibierende CD95-Antikörper SM 1/23 wurde den Zellen eine Stunde vor dem ATG hinzugegeben. Als Isotypenkontrollen wurden ein entsprechender IgG-Antikörper (500 ng/mL) und ein IgM-Antikörper (5 ng/mL) eingesetzt. Die unterschiedlichen Volumina wurden mit PBS ausgeglichen. Zu den Zeitpunkten 0 Stunden und 48 Stunden erfolgte eine 7-AAD-Färbung mit anschließender Messung der Zellen am Durchflusszytometer.

3.7.9 Inkubation von KG-1a-Zellen mit ATG zum Nachweis aktivierter Caspasen

KG-1a-Zellen wurden mit ATG in den Konzentrationen von 0 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL oder 1000 µg/mL bis zu 7 Tage inkubiert. Jeden zweiten Tag wurde die Zellzahl bestimmt und je nach Bedarf wurden Verdünnungen den jeweiligen Richtlinien entsprechend hergestellt. An den Tagen 0, 2, 4 und 7 erfolgten Färbungen mit CaspACE™ FITC-VAD-FMK, PhiPhiLux-G₂D₂ (GDEVVDGI), Kaninchen-Anti-Human-PARP-cleavage-site-(214/215)-FITC, Kaninchen-Anti-Human-Aktivierte-Caspase-3-PE und einer unspezifischen Isotypenkontrolle, mit anschließender durchflusszytometrischer Untersuchung der spezifischen Antikörperbindungen.

3.8 Zellfärbungen

Wenn keine weiteren Angaben gemacht werden, wurden für die Färbungen 5×10^5 - 2×10^6 Zellen verwendet.

3.8.1 CD34+- und CD 45+-Doppelmarkierung

Circa 1×10^6 mononukleäre Zellen pro Rundbodenröhrchen, wurden mit 3 mL PBS verdünnt und bei 4°C mit 300 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Es folgte die Zugabe von 25 µL Kaninchenserum, 25 µL humanem IgG (Venimmun, 12 mg/mL) und je 20 µL IgG₁-FITC und IgG₁-PE in das Kontrollröhrchen und 25 µL Kaninchenserum, 25 µL humanem IgG (Venimmun, 12 mg/mL), 20 µL Anti-CD34-PE und 20 µL Anti-CD45-FITC in das Probenröhrchen. Die Ansätze wurden für 30 Minuten lichtgeschützt auf Eis inkubiert.

Den aus dem Stickstofftank entnommenen Zellen wurden anschließend zur Vitalitätsbestimmung 100 µL Propidiumjodid (PI) (Stammlösung 1 mg/ml PBS, 0,1% NaN₃, frisch 1:500 verdünnt) hinzugefügt. PI ist ein fluoreszierendes, an doppelsträngige DNA und RNA bindendes Reagenz und besitzt keine Basenspezifität. In lebenden Zellen kann die Substanz nicht in das Zellinnere gelangen, kann jedoch durch die Zellmembran apoptotischer Zellen in das Innere penetrieren und dort an die DNA bzw. RNA der Zellen binden. Die Inkubation mit PI erfolgte für 10 Minuten unter Lichtabschluss auf Eis. Es schloss sich das einmalige Waschen der Zellen mit PBS an. In der darauf folgenden durchflusszytometrischen Messung wurden die Zellen auf die Bindung der spezifischen Antikörper und auf ihre Vitalität untersucht.

Mit dieser Färbung wurde der Anteil der lebenden CD34+-Zellen bestimmt, um eventuell eine anschließende Isolierung dieser Zellen mittels *Multi-Parameter Magnetic Cell Sorting* (MACS) durchzuführen.

3.8.2 Annexin V-FITC/7-AAD-Doppelmarkierung

Apoptose ist charakterisiert durch eine Vielzahl morphologischer Zellveränderungen, wie z. B. Veränderungen in der Plasmamembran, die zu den frühen Veränderungen im Rahmen der Apoptose gehören. Hierbei wird das Membran-Phospholipid Phosphatidylserin (PS) von der zytoplasmatischen Membranseite auf die extrazelluläre Seite verlagert (Castedo, 1996).

Annexin V ist ein 35-36 kDa Ca^{2+} abhängiges phospholipidbindendes Protein mit einer hohen Affinität zu Phosphatidylserin und bindet somit an Zellen mit extrazellulärem PS. Annexin V-FITC ist dadurch gut zur Identifikation apoptotischer Zellen mittels Durchflusszytometrie geeignet. Da eine Phosphatidylserinexposition auf der extrazellulären Membranseite auch bei nekrotischen Zellen auftritt, wurde die Annexin V-FITC-Färbung in der Regel mit einer Vitalitätsfärbungen mit PI oder mit 7-AAD kombiniert.

7-AAD (7-Amino Actinomycin D) ist eine fluoreszierende Substanz, die nach Bindung an DNA-Moleküle, mit hoher Selektivität zwischen den Basen Cytosin und Guanin (Chen Chiao, 1979; Philpott, 1996), ihre fluoreszierenden Eigenschaften ändert (Gill, 1975). In vitale Zellen wird 7-AAD nicht aufgenommen. Im Laufe der Apoptose verändert sich jedoch die Zellmembran, so dass 7-AAD in des Zellinnere gelangen und mit der DNA interagieren kann (Schmid, 1994a; Schmid, 1994b). Mit Hilfe einer 7-AAD-Färbung ist es möglich, lebende, apoptotische, nekrotische (Philpott, 1996; Lecoeur, 1998) und sogenannte *apoptotic bodies* (von den apoptotischen Zellen abgespaltene Vesikel) (Lecoeur, 1997; Lecoeur, 1998), zu unterscheiden.

Die Färbung wurde ähnlich, wie bei Philpott (Philpott, 1996) beschrieben, durchgeführt (Rojewski, 2002).

Die aus den Zellkulturflaschen entnommenen Zellen wurden in Reagenzröhrchen (15 mL) überführt und bei Raumtemperatur für 5 Minuten bei 300 x g mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und je nach Zellmenge wurden bis zu 2 mL Annexin V-Binde-Puffer (ABP) hinzugefügt, die Zellen mittels eines Horizontalrotationsschüttlers gemischt und anschließend unter den selben Bedingungen wie zuvor zentrifugiert. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurde den Zellen 400 μL verdünntes Pferdeserum hinzugefügt und der Ansatz für 15 Minuten im Dunkeln auf Eis belassen. Die Röhrchen wurden mit ABP auf 1,2 mL aufgefüllt und bei 6500 x g für 1 Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Den Zellen wurden 100 μL ABP und 5 μL Annexin V-FITC hinzugefügt. Das Gemisch wurde für 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit ABP und der Aufnahme der Zellen in 300 μL Puffer folgte die Zugabe von 50 μL 7-AAD. Die Zellen wurden gut gemischt und 20 Minuten bei 4°C inkubiert, mit ABP verdünnt und bei 6500 x g für 1 Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen nochmals gewaschen und je nach Zellzahl in mindestens

200 μ L ABP aufgenommen und für die anschließende durchflusszytometrische Analyse in ein Rundbodenröhrchen überführt.

Um vor allem dem ATG die Möglichkeit einer Bindung an die Zellen zu geben, wurden die Zellen an Tag 0, nach der Entnahme aus der Zellkulturflaschen mit ihren jeweiligen Reagenzien, vor ihrer Weiterverarbeitung noch für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die anschließenden Schritte folgten wie oben beschrieben.

Da eine hohe Korrelation der durch Annexin V-FITC- und durch 7-AAD-Färbung erhaltenen Werte für apoptotische Zellen besteht, wurde bei einigen Versuchen auf eine Annexin V-FITC-Färbung verzichtet und nur eine 7-AAD-Färbung durchgeführt. Diese erfolgte wie oben beschrieben jedoch in PBS anstelle des Annexin-Binde-Puffers .

Im Ergebnisteil sind nur die durch die 7-AAD-Färbung erhaltenen Messwerte dargestellt.

3.8.3 CD3+/7-AAD- und CD34+/7-AAD-Doppelmarkierung mononukleärer Patientenzellen

Zellen wurden aus den Zellkulturflaschen entnommen, in Spitzröhrchen überführt und für 5 Minuten bei 300 x g mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und je nach vorhandener Zellmenge wurden bis zu 2 mL PBS zum Waschen hinzugefügt. Es folgte das Mischen der Zellen auf einem Horizontalrotationsschüttler mit anschließender Zentrifugation. Daraufhin wurde den Zellen 1,2 mL verdünntes Pferdeserum hinzugefügt, um unspezifische Bindungen zu verhindern, und der Ansatz wurde für 15 Minuten im Dunkeln bei 4°C belassen. Es folgte die Aufteilung der 1,2 mL pro Röhrchen auf drei 1,5 mL-Polypropylen-Reaktionsgefäße zu je 400 μ L. Die Röhrchen wurden mit PBS auf 1,2 mL aufgefüllt und bei 6500 x g für 1 Minute zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und den Zellen anschließend 100 μ L PBS und 20 μ L des jeweiligen Antikörpers (Anti-CD3-FITC oder Anti-CD34-FITC oder IgG₁-FITC als Negativ-Kontrolle) hinzugesetzt. Das Gemisch wurde für 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Dem einmaligen Waschen der Zellen mit PBS folgte die Aufnahme in 300 μ L PBS mit Hinzufügen von 50 μ L 7-AAD. Die Zellen wurden gut gemischt und bei 4°C inkubiert. Nach 20 Minuten folgte die Verdünnung der Zellen mit PBS und die Zentrifugation bei 6500 x g für 1 Minute. Der Überstand wurde verworfen und der Waschvorgang noch einmal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen je nach Zellzahl in mindestens 200 μ L PBS aufgenommen und in ein

Rundbodenröhrchen überführt. Sofort im Anschluss erfolgte die durchflusszytometrische Untersuchung der spezifischen Antikörperbindung und der Fluoreszenzintensität.

Für eine Messung an Tag 0 wurden die Zellen, nachdem sie den Zellkulturflaschen mit ihren jeweiligen Reagenzien entnommen wurden, vor der Zentrifugation noch für 15 Minuten auf Eis inkubiert, um vor allem dem ATG die Möglichkeit einer Bindung an die Zellen zu geben. Anschließend wurde wie oben beschrieben verfahren.

3.8.4 Färbung mit dem Antikörper CD95-FITC Klon DX2

direkt nach ATG Zugabe

Die gemäß den Vertreiberrichtlinien kultivierten Zellen der Zelllinie KG-1a wurden aus einer Zellkulturflasche entnommen und in ein Reagenzröhrchen überführt. Die Zellen wurden für 10 Minuten bei 300 x g zentrifugiert, der Überstand anschließend abpipettiert, die Zellen mit PBS verdünnt, nochmals zentrifugiert und der Überstand verworfen. Den Zellen wurden PBS und ATG hinzugefügt, so dass Endkonzentrationen von 0 µg/mL, 0,1 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL und 1000 µg/mL ATG erreicht wurden. Alle Ansätze wurden auf Eis im Dunkeln für 30 Minuten inkubiert, anschließend mit PBS verdünnt, wie oben beschrieben zentrifugiert und der Überstand verworfen. Den Zellen wurden 200 µL PBS zugegeben. Das Volumen wurde auf zwei 1,5 mL-Polypropylen-Reaktionsgefäße gleichmäßig verteilt. Den Zellen im ersten Röhrchen wurden 20 µL des FITC-markierten CD95-Antikörpers DX2, den Zellen im zweiten Röhrchen als entsprechende Isotypenkontrolle 20 µL eines IgG₁-FITC Antikörpers hinzugefügt. Es folgte die Inkubation der Zellen für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln, die anschließende Verdünnung mit PBS und die Zentrifugation bei 6500 x g für eine Minute. Der Überstand wurde abgenommen, der Waschvorgang noch einmal wiederholt, die Zellen in 300 µL PBS aufgenommen und in ein Rundbodenröhrchen für die sich sofort anschließende durchflusszytometrische Messung überführt. Dieser Versuch wurde mit allen vier genannten ATG-Präparationen durchgeführt.

nach Inkubation mit ATG

KG-1a-Zellen wurden mit ATG in den Endkonzentrationen 100 µg/mL und 1000 µg/mL auf 12-Napf-Zellkulturplatten angesetzt. 2 mL wurden entnommen und in Reagenzröhrchen überführt. An Tag 0 verblieben die Zellen noch für 30 Minuten auf Eis. Danach wurden die

Zellen, wie auch zu den Zeitpunkten 12 Stunden und 24 Stunden, abzentrifugiert. Es erfolgte die Zugabe von PBS mit erneuter Abzentrifugation. Der Überstand wurde abgenommen und dem Pellet wurden 200 μL PBS hinzugegeben. Je 100 μL wurden in ein 1,5 mL-Polypropylen-Reaktionsgefäß überführt und mit entweder 20 μL FITC-markiertem CD95-Antikörper oder mit 20 μL der zugehörigen Isotypenkontrolle IgG-FITC versetzt. Es folgte eine Inkubation der Zellen für 30 Minuten im Dunkeln mit anschließender Verdünnung mit PBS und Zentrifugation. Der Vorgang des Waschens wurde noch einmal wiederholt und die Zellen anschließend in ein Rundbodenröhrchen zur durchflusszytometrischen Messung überführt. Alle vier genannten ATG-Präparationen wurden eingesetzt.

3.8.5 Indirekte Färbung mit dem CD95-Antikörper SM 1/23

Die KG-1a-Zellen (1×10^6 - 4×10^6) wurden aus der Zellkulturflasche entnommen und in ein Reagenzröhrchen (15 mL) überführt. Es folgte eine Zentrifugation der Zellen bei $300 \times g$ für 10 Minuten und die Abnahme des entstandenen Überstandes. Die Zellen wurden noch einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit PBS und ATG (alle vier genannten Präparationen) versetzt, so dass Endkonzentrationen von 0 bis 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ATG entstanden. Es erfolgte eine 30-minütige Inkubation der Zellen im Dunkeln auf Eis. Die Zellen wurden einmal gewaschen und anschließend in 200 μL PBS aufgenommen. Das Volumen wurde auf zwei 1,5 mL-Polypropylen-Reaktionsgefäße gleichmäßig verteilt. Den 100 μL der Zellsuspension wurden je 20 μL des CD95-Antikörpers SM 1/23 oder als entsprechende Isotypenkontrolle 20 μL eines IgG_{2b}-Antikörpers hinzugefügt. Eine Inkubation der Zellen für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln, sowie ein zweimaliges Waschen mit PBS folgten. Den in 100 μL PBS aufgenommenen Zellen wurden 20 μL des sekundären Antikörpers Ratte-Anti-Maus-IgG_{2b}-FITC hinzupipettiert und der Ansatz wurde für 20 Minuten wie oben beschrieben inkubiert. Der sekundäre Antikörper wurde, um unspezifische Bindungen zu vermeiden, vor der Zugabe noch für 20 Minuten mit 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ATG inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS und der anschließenden Aufnahme der Zellen in PBS erfolgte sofort die durchflusszytometrische Analyse der Zellen.

3.8.6 ATG-Titration im sekundären Antikörper Ratte-Anti-Maus-IgG_{2b}-FITC

Um einen eventuellen negativen Einfluss des ATG im sekundären Antikörper Ratte-Anti-Maus-IgG_{2b}-FITC auf die Messung auszuschließen, wurde die zuvor beschriebene Färbung durchgeführt, jedoch mit Konzentrationen von 0 µg/mL, 0,1 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL und 250 µg/mL ATG im sekundären Antikörper für die ATG-Konzentration 0 µg/mL, 0,1 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL und 100 µg/mL in der Ausgangsprobe. Nach der Inkubation auf Eis wurden den Zellen nicht 200 µL, sondern 600 µL PBS zugegeben. Diese wurden dann auf sechs Röhrchen zu je 100 µL aufgeteilt und mit den entsprechenden Antikörpern mit den verschiedenen ATG-Konzentrationen versetzt. Dieser Versuch erfolgte für beide ATG-Präparationen von Mérieux.

3.8.7 Nachweis aktivierter Caspasen mittels CaspACETM FITC-VAD-FMK

CaspACETM FITC-VAD-FMK ist ein FITC-markiertes Konjugat des irreversiblen Caspasen-Inhibitors VAD-FMK. Es ist zellpermeabel und bindet direkt an das katalytische Zentrum von aktivierten Caspasen. Die Färbung wurde nach den Herstellerempfehlungen durchgeführt.

1 mL der in Zellkultur gehaltenen KG-1a-Zellen wurde in ein 1,5 mL-Polypropylen-Reaktionsgefäße überführt. Es wurde CaspACETM FITC-VAD-FMK-Lösung in einer Endkonzentration von 10 µM hinzupipettiert und alles gut gemischt. Es folgte die Inkubation der Zellen für 20 Minuten bei 37°C im Dunkeln. Anschließend wurden diese mit 300 x g für 5 Minuten zentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 1 mL 0,5%igem Formaldehyd aufgenommen und bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss für 30 Minuten inkubiert. Danach erfolgte das einmalige Waschen mit PBS, die Aufnahme der Zellen in 300 µL PBS und die Überführung in ein Rundbodenröhrchen um die Fluoreszenzintensität am Durchflusszytometer zu bestimmen (Schrezenmeier, 2001).

An Tag 0 verblieben die Zellen nach ATG-Zugabe noch für 30 Minuten auf Eis, bevor die CaspACETM FITC-VAD-FMK-Zugabe erfolgte. Anschließend wurde wie oben beschrieben verfahren.

3.8.8 Nachweis aktivierter Caspasen mittels PhiPhiLux-G₂D₂

PhiPhiLux-G₂D₂ (GDEVDGI) ist ein fluoreszenzmarkiertes Substrat aktivierter Caspasen (Rano, 1997; Thornberry, 1997). Die aktivierten Caspasen bewirken durch die Spaltung des PhiPhiLux-G₂D₂ die Anregung der Fluoreszenz mit folgenden Charakteristika λ_{ex} = 552 nm und λ_{em} = 580 nm des zuvor nicht fluoreszierenden Substrates. Die Färbung der Zellen wurde anhand der Vertreiberangaben durchgeführt.

Die aus der Zellkultur in ein 1,5 mL-Polypropylen-Reaktionsgefäß entnommenen Zellen wurden abzentrifugiert und der Überstand komplett entfernt. 5×10^5 - 1×10^6 Zellen wurden in 60 µL PhiPhiLux-G₂D₂ Lösung (10 µM) aufgenommen. Es wurden 6 µL FBS hinzugefügt und die Zellen vorsichtig durchmischt. Die anschließende Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei 37°C. Schließlich wurden die Zellen mit 1 mL gekühltem Durchflusszytometrie-Waschpuffer (DFZWP) verdünnt und abzentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde nochmals wiederholt. Es folgte die Aufnahme der Zellen in 300 µL des Puffers und die anschließende Überführung in ein Rundbodenröhrchen zur Fluoreszenzmessung (Schrezenmeier, 2001).

An Tag 0 verblieben die Zellen nach ATG-Zugabe noch für 30 Minuten auf Eis, bevor die Zellen abzentrifugiert wurden und die PhiPhiLux-G₂D₂ (GDEVDGI) Zugabe erfolgte. Anschließend wurde wie oben beschrieben verfahren.

3.8.9 Nachweis der zytoplasmatischen Proteine Caspase-3 und PARP

Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) ist ein 116 kDa Protein, welches z. B. durch DNA-Strangbrüche aktiviert wird. Im Apoptoseverlauf wird PARP von einigen Caspasen in ein 89 kDa und ein 24 kDa großes Stück gespalten (Soldani, 2001). Der FITC-markierte Antikörper Kaninchen-Anti-Human-PARP-cleavage-site-(214/215) erkennt nur das 89 kDa große Spaltstück, nicht jedoch ungespaltenes PARP und kann somit zur Erkennung apoptotischer Zellen eingesetzt werden.

Die aus der Zellkultur entnommenen Zellen (2×10^6 - 6×10^6) wurden in ein Reagenzröhrchen (15 mL) überführt und mit 300 x g für 5 Minuten bei 20°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen mit 1 mL PBS verdünnt, nochmals zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Das Zellpellet wurde aufgewirbelt und zu den Zellen wurden je nach Zellmenge 300-600 µL der Dako A Fixierungslösung gegeben und bei Raumtemperatur für exakt 15 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5 mL PBS. Die Zellen

wurden, wie oben beschrieben, zentrifugiert und der Überstand bis auf ca. 50 μL abgesaugt. Die bereits aufgewirbelten Zellen wurden für genau 15 Minuten mit 400 μL der Dako B Permeabilisierungslösung bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden je 100 μL Zell-Permeabilisierungslösung-Suspension in einem 1,5 mL-Polypropylen-Reaktionsgefäß mit entweder 20 μL Kaninchen-Anti-Human-Aktivierete-Caspase-3-PE, 10 μL Kaninchen-Anti-Human-PARP-cleavage-site-(214/215)-FITC oder 10 μL mit der zugehörigen Isotypenkontrolle der eingesetzten Antikörper versetzt. Die Zellen wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss inkubiert und anschließend mit 1 mL PBS verdünnt. Die Zellen wurden zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellen in 300 μL PBS in ein Rundbodenröhrchen überführt und durchflusszytometrisch auf die Bindung der spezifischen Antikörper untersucht.

Sowohl der Kaninchen-Anti-Human-PARP-cleavage-site-(214/215)-Antikörper als auch der Kaninchen-Anti-Human-Aktivierete-Caspase-3-Antikörper sind polyklonale Antikörper. Da für diese polyklonalen Isotypen der Antikörper keine entsprechenden Kontrollantikörper existieren, wurde auf monoklonale IgG-Antikörper (FITC oder PE) zurückgegriffen, um die Eigenfluoreszenz der Zellen zu bestimmen (Radbruch, 1992; Owens, 1995; Jarosqski, 1997). An Tag 0 verblieben die Zellen nach ATG-Zugabe noch für 30 Minuten auf Eis bevor die Abzentrifugation und die Zugabe der Antikörper erfolgte. Anschließend wurde wie oben beschrieben verfahren.

3.8.10 Proliferationsassay durch PKH26-Markierung

PKH26 ist ein fluoreszenzmarkiertes, stabiles, aliphatisches Molekül, welches mit der Zellmembran interagieren kann (Horan, 1989). In die Zellmembran integriert, nimmt die Konzentration von PKH26 bei jeder Zellteilung ab, da der Farbstoff gleichermaßen auf die bei jeder Zellteilung entstehenden Tochterzellen weitergegeben wird.

Die Färbung der Zellen mit PKH26 *Fluorescent Cell Linker Kit* wurde, wie vom Hersteller empfohlen, durchgeführt. Ca. 2×10^7 Zellen wurden in ein Spitzröhrchen überführt und einmal mit Medium (RPMI 1640) ohne Serum gewaschen. Je 1×10^7 Zellen wurden in ein Röhrchen mit serumfreiem Medium überführt. Die Zellen beider Röhrchen wurden für 5 Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 25 μL abpipettiert, die Zellen resuspendiert, 1 mL *Diluent C* hinzugefügt und der Ansatz gut gemischt. Zur Markierung der

Zellen wurde die doppelte Menge des Fluoreszenzfarbstoffes eingesetzt und die Inkubationszeit verdoppelt, um eine ausreichend hohe Fluoreszenzintensität der Zellen zu erzielen (Rojewski, 2002). In das erste Röhrchen, in dem die Zellen gefärbt werden sollten, wurde 1 mL einer 4 μ M PKH26-*Diluent-C*-Lösung hinzugegeben. Da die Zellen durch die erhöhte Inkubationszeit länger dem *Diluent C* ausgesetzt waren, wurden die Zellen in dem zweiten Röhrchen, die als ungefärbte Kontrolle dienen sollten, ebenfalls mit diesem Reagenz behandelt. Den Kontrollzellen wurde ein Milliliter *Diluent C*, jedoch nicht mit dem Farbstoff PKH26, sondern mit dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels (70%-ige Ethanollösung) hinzugefügt. Dieser Arbeitsschritt wurde durchgeführt, um eventuell vorhandene unspezifische Effekte, die durch eine im Vergleich zu den Herstellerangaben verlängerten Inkubation mit erhöhten Mengen an Färbelösung mit *Diluent C* entstehen, zu kompensieren. Die Zellen wurden gut gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur unter gelegentlicher Bewegung inkubiert. Die Färbung wurde durch Zugabe von je 2 mL FBS in beide Röhrchen gestoppt. Nach einer Minute wurden 4 mL RPMI 1640-Medium (10% FBS) hinzugegeben, die Zellen für 10 Minuten bei 400 x g und 25°C zentrifugiert und der Überstand anschließend abgenommen. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Die Zellen wurden auf Zellkulturflaschen aufgeteilt und mit ATG (Tecelac und Lymphoglobulin in Endkonzentrationen von 10 μ g/mL und 100 μ g/mL) bis zu 16 Tage inkubiert. Die verwendeten PKH26-Konzentrationen zeigten in nicht mit ATG-behandelten Zellen keine toxischen Effekte. Dies wurde auch bei Experimenten mit Zytokin-aktivierten Killerzellen und Lymphozyten *in vivo* beschrieben (Wallace, 1993).

Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen mit sterilen Materialien und Reagenzien durchgeführt.

Eine durchflusszytometrische Messung eines Aliquots der PKH-gefärbten Zellen bzw. deren Kontrollen erfolgte jeden zweiten Tag.

3.9 Durchflusszytometrie

Für alle durchflusszytometrischen Analysen wurde das Gerät FACScan von BD verwendet. Die Datenaufnahme und Auswertung erfolgte mit der CellQuest Software nach dem Benutzerhandbuch (CellQuest™ Software User's Guide, 1996).

3.9.1 Prinzip

Das Prinzip der Durchflusszytometrie ist die Analyse von Einzelzellen auf der Grundlage von Fluoreszenzsignalen und Streulicht (Radbruch, 1992; Ormerod, 1994; Owens, 1995; Jarosqueski, 1997; Robinson, 1999; Haughland, 2001). Relative Zellgröße, Granularität sowie bis zu fünf oder gar mehr verschiedene Fluoreszenzfarben (je nach Modell) können gleichzeitig ermittelt werden.

Das Gerät besteht aus einem optischen System und einem Flüssigkeitssystem. Die sich im Probenröhrchen befindenden Zellen werden mittels Überdruck über eine Stahlkapillare in die Messküvette eingebracht. Dort werden sie von einer Trägerflüssigkeit umgeben und stark beschleunigt. Somit ist gewährleistet, dass die Zellen die Messküvette als Einzelzellen passieren und der Laser jede einzelne Zelle erfassen kann.

Die Laserlichtstreuung wird durch die Zellgröße, die Struktur der Zellmembran sowie intrazelluläre Bestandteile beeinflusst. Das auftreffende Laserlicht wird zunächst hauptsächlich in zwei Richtungen gestreut und dort gemessen. Das Licht wird zum einen in Vorwärtsrichtung, also entlang des Anregungsstrahls gemessen und als Vorwärtsstreulicht (*forward light scatter*, FSC) bezeichnet und dient als Maß für die Zellgröße. Zum anderen befindet sich im rechten Winkel zum Laserstrahl der Streulichtdetektor für die Seitwärtsstreuung (*side scatter*, SSC). Die Seitwärtsstreuung gilt als Maß für die Granularität und die Oberflächenbeschaffenheit der Zellen. Somit hat jede Zellpopulation (mononukleäre Zellen, Lymphozyten usw.) eine definierte Lage im Vorwärts-/Seitwärtsscatter und kann bei der Wahl geeigneter Regionen isoliert betrachtet werden.

Mit Fluoreszenzdetektoren kann das Licht verschiedener Wellenlängen erfasst werden. Fluoreszenzfarbstoffe wie z. B. Fluoresceinisothiocyanat (FITC) oder Phycoerythrin (PE) für die Immunfluoreszenz oder Propidiumjodid (PI) oder 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) zur DNA-Analyse emittieren nach Anregung durch einen Argonlaser ($\lambda = 488 \text{ nm}$) für die einzelnen Substanzen charakteristische Wellenlängen (FITC $\lambda_{\text{max}} = 525 \text{ nm}$, PI $\lambda_{\text{max}} = 620 \text{ nm}$, PE $\lambda_{\text{max}} = 576 \text{ nm}$, 7-AAD $\lambda_{\text{max}} = 660 \text{ nm}$, PKH26 $\lambda_{\text{max}} = 567 \text{ nm}$, PhiPhiLux-G₂D₂ $\lambda_{\text{max}} = 580 \text{ nm}$). Diese Emissionsmaxima werden von mehreren Detektoren simultan registriert. Da sich die Emissionsspektren teilweise überschneiden, muss dies bei der Fluoreszenzanalyse berücksichtigt werden. Dies geschieht durch die sogenannte

Kompensation, bei der die vom jeweiligen Detektor gemessene Fluoreszenz um den Anteil korrigiert wird, der von einem anderen Farbstoff stammt.

3.9.2 Signalverarbeitung

Beim passieren des Analysepunktes in der Messküvette sendet jede Zelle Signale aus, die von den Detektoren empfangen und über elektronische Schaltungen gemessen, quantifiziert und schließlich auf einen Computer übertragen werden.

3.9.3 Zellmessung

Nach der Färbung der Zellen mit den entsprechenden Antikörpern oder Reagenzien, wurden die Zellen sofort durchflusszytometrisch untersucht. Die Geräteeinstellung erfolgte durch die Aufnahme der Negativ-Kontrollen und der Positiv-Proben.

Im Vorwärts-/Seitwärtsstreulicht wurden die Zellen so eingestellt, dass der Zelldebris gerade noch zu erkennen war und die zu betrachtende Zellpopulation gut abzugrenzen war (siehe Abb. 3.1).

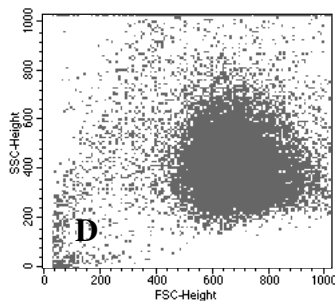


Abb. 3.1: Einstellung der Zellen im Vorwärts-/Seitwärtsstreulicht zu Beginn der Messungen am Durchflusszytometer; D=Debris.

Mit Hilfe der jeweiligen Positiv- und Negativ-Kontrollen erfolgte nacheinander die Einstellung der für die jeweilige Färbung notwendigen Fluoreszenzen in den entsprechenden Fluoreszenzkanälen (FL) (FL1: Detektor für Licht der Wellenlänge 530 nm, FL2: Detektor für Licht der Wellenlänge 542-585 nm, FL3: Detektor für Licht der Wellenlänge 670 nm; FL1=FITC, FL2=PE, PhiPhiLux-G₂D₂, PKH26, FL3=7-AAD, PI) (siehe Abb. 3.2-3.4)

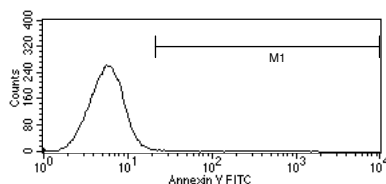


Abb. 3.2: Einstellung der FL1: Detektor für Licht der Wellenlänge 530nm. FL1=FITC; M1 siehe Abschnitt 3.9.4.

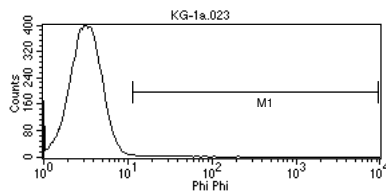


Abb. 3.3: Einstellung der FL2:

Detektor für Licht der Wellenlänge 542-585 nm.
FL2=PE, PhiPhiLux-G2D2, PKH26;
M1 siehe Abschnitt 3.9.4.

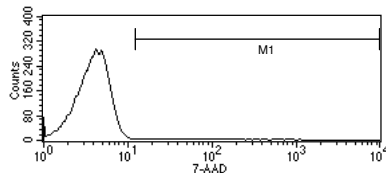


Abb. 3.4: Einstellung der FL3:

Detektor für Licht der Wellenlänge 670 nm
FL3=7-AAD, PI; M1 siehe Abschnitt 3.9.4.

Anschließend erfolgte die erforderliche Fluoreszenzenkompensation. Bei der folgenden Datenaufnahme wurden, wenn möglich, 50.000 Zellen pro Ansatz mit einer Aufnahmezeit < 2000 Zellen/s gemessen. Hierdurch sollte eine unerwünschte simultane Messung mehrerer Zellen vermieden werden.

3.9.4 Datenauswertung

Mit Hilfe der CELLQuest-Software erfolgte die Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen am Macintosh. Zunächst wurde um die zu analysierende Zellpopulation eine Region (R1) gesetzt, so dass tote Zellen und Debris ausgeschlossen wurden (siehe Abb. 3.5)

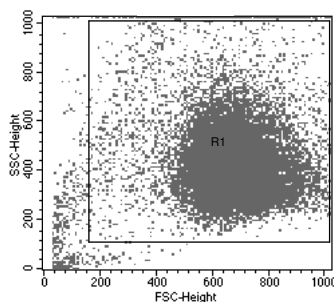


Abb. 3.5: Definition einer Region R1

um die zu analysierende Zellpopulation zu Beginn der Datenauswertung.

Die Analyse der Fluoreszenz erfolgte anschließend in Histogrammen oder Punktdiagrammen. Das Punktdiagramm (*Dot Plot*) wird auch als *Zweiparameterdarstellung* bezeichnet. Bei dieser Art der Darstellung werden zwei Parameter miteinander korreliert, z. B. Vorwärtsstreulicht und Fluoreszenz. Auf diese Weise ist eine optische Unterscheidung zwischen nicht angefärbten, einfach und doppelt angefärbten Zellen möglich. Die eingeblendeten Quadrantentrennlinien wurden so gelegt, dass ein Grossteil der Zellen der Negativ-Kontrolle im unteren linken Quadranten lagen (siehe Abb. 3.6).

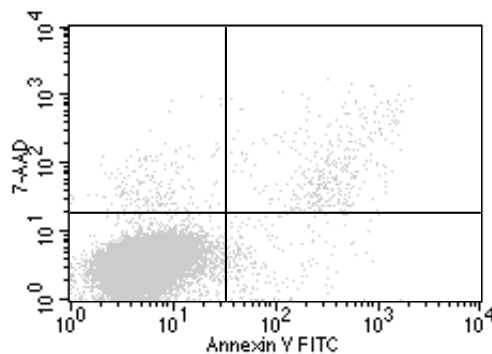


Abb. 3.6: Darstellung der Zellen im *Dot Plot* zur Auswertung der durchflusszytometrischen Messdaten.

Das Histogramm wird auch als Einparameterdarstellung bezeichnet. Hierbei wird die Fluoreszenzintensität gegen die Zellzahl angezeigt. Anhand der Histogrammdarstellung der Negativ-Kontrolle wurde der Marker M1 gesetzt, um so bei den zu untersuchenden Proben den Anteil der positiv gefärbten Zellen bestimmen zu können (siehe Abb. 3.7).

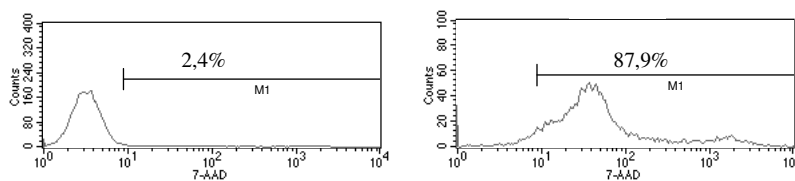


Abb. 3.7: Darstellung der Messwerte im Histogramm mit setzen des Markers M1 zur Bestimmung der Anzahl apoptotischer Zellen.

Um eine übersichtliche Darstellung der so ermittelten Messwerte zu erhalten, wurden zur Erstellung von Tabellen und Graphiken weitere Computeranwendungen (Excel, PowerPoint, Canvas) eingesetzt.

3.10 Statistische Auswertung

Bei Mehrfachmessungen (≥ 3) wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen mit dem Programm Excel (Microsoft) bestimmt.

Teilweise sind neben den Mittelwerten und Standardabweichungen auch die Korrelationskoeffizienten und die p-Werte des Student's T-Tests (StatView, Firma Abacus Concepts) zur Signifikanzangabe dargestellt.