

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Verwendete Geräte und Materialien

2.1.1 Geräte

Eismaschine AF10	Scotsman, Mailand, Italien
Gefrierschränke	Sanyo, München
Kühlschränke	Siemens, Berlin
Pipettierhilfe Pipetboy plus	Tecnomara Biosciences, Fernwald
Schüttler, Vortex MS2 Minishaker	IKA-Werke GmbH & Co KG, Staufen
Waagen	Sartorius, Göttingen
Bestrahlungsanlage Gamma Cell 40	Atomic Energy, Mississauga, Kanada
Inkubationsschränke	Jouan, Unterhaching
Lichtmikroskop	Olympus, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	Fein-Optik, Blankenburg
Sterilwerkbank	Heraeus, Hanau
Zentrifuge	Jouan, Unterhaching
Multipipette	Labsystems, Helsinki, Finnland
Orbitalschüttler	Eppendorf, Hamburg
Photometer Anthos Reader	Anthos Mikrosysteme, Köln
IMMULITE	DPC Biermann Inc., Bad Nauheim
Wasserbad	Grant, Barrington, England
Durchflusszytometer <i>FACScan</i>	Becton Dickinson, Heidelberg
Micronicständer	Lelystad, Holland

2.1.2 Computer-Software

CellQuest	Becton Dickinson, Heidelberg
Word 2000	Microsoft, Unterschleißheim
Excel 2000	Microsoft, Unterschleißheim
SPSS Win 7.0 - 10.0	SPSS Inc., Chicago, USA

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Feinpipette Research	Eppendorf, Hamburg
Einwegpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner, Frickenhausen
Einweg-Pasteurpipetten	Greiner, Frickenhausen
4,5 ml Heparin-Monovette	Saarstedt, Nümbrecht
10 ml Citrat-Monovette	Saarstedt, Nümbrecht
6-Well Flachboden-Kulturplatten	Falcon, Oxnard, USA
24-Well Flachboden-Kulturplatten	Falcon, Oxnard, USA
50 ml Kulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
Glaswaren (Bechergläser, Messzylinder)	Schott, Mainz
12x75 mm Falcon-Röhrchen (5 ml)	Falcon, Oxnard, USA
Micronic-Röhrchen	Lelystad, Holland
Einwegpipetten	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1 ml)	Greiner, Frickenhausen
Polypropylenröhrchen (50 ml)	Falcon, Oxnard, USA
Polysterolröhrchen (10 ml)	Greiner, Frickenhausen
Eppendorf Röhrchen (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg

2.1.4 Chemikalien, Zellkulturmedien, Zellstimulatoren

Aqua bidest.	Braun, Melsungen
--------------	------------------

Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, Steinheim
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Äthylendiaminotetraacetat (EDTA)	Saarstedt, Nümbrecht
Fetales Kälberserum	Seromed, Berlin
Ficoll Paque Zellseparationslösung	Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schw.
Heparin	Biochrom, Berlin
L-Glutamin	Sigma, Steinheim
Natriumazid	Sigma, Steinheim
RPMI 1640 Kulturmedium	Biochrom, Berlin
Trypanblau	Biochrom, Berlin
Trypsin-EDTA	Biochrom, Berlin
FACS-Flow	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Lyse	Becton Dickinson, Heidelberg
Lipopolysaccharid (LPS)	<i>E. coli</i> -Stamm 0127:B8, Sigma, Steinheim

Zellkulturmedien und Puffer:

PBS

8 g	NaCl
0,2 g	KCl
1,44 g	Na ₂ HPO ₄
0,24 g	KH ₂ PO ₄
	in 1 l Aqua bidest., pH 7,4

Medium für die PBMC- und Jurkatzellen-Kultur

2 mM	L-Glutamin
------	------------

10 % (v/v)	FCS
	in RPMI 1640

Medium für die Vollblutkultur

10 U/ml	Heparin
	in RPMI 1640

FACS-Puffer

0,1 % (w/v)	Natriumazid
2 % (v/v)	FCS
	in PBS

Annexin-Bindungspuffer

10 mM HEPES/HCl (pH 7,4)

140 mM NaCl

2,5 mM CaCl₂

2.1.5 Zelllinie, Zytokine, Antikörper, Zellfärbung, Test-Kits und ELISA

ACC 282, Jurkat-Zellen, humane

T-Lymphozyten-Tumorzellen

DSMZ, Braunschweig

humanes rekombinantes Interleukin-10

(hu rIL-10)

R&D Systems, Wiesbaden

humaner rekombinanter Wachstumsfaktor-β 1

(hu rTGF-β1)

R&D Systems, Wiesbaden

humanes rekombinantes Interferon- γ (hu rIFN- γ)	Thomae-Boehringer Ingelheim, Biberach
lösliches CD14 (sCD14) ELISA	JBL, Hamburg
TNF- α Detektionskit (IMMULITE)	DPC Biermann Inc., Bad Nauheim
<i>Phagotest</i> mit nicht opsonierten <i>E. coli</i>	Orpegen Pharma, Heidelberg
humanes rekombinantes Annexin V-FITC	Alexis, Grünberg
Zellmembranfarbstoff (grün) PKH 67-GL	Sigma, Steinheim

Antikörper:

Spezifität	Klon	Markierung	Isotyp	Quelle
CD14, human	RMO52	-	Maus IgG2a	Immunotech, Krefeld
CD14, human	M5E2	PE	Maus IgG2a	Becton Dickinson, Heidelberg
CD14, human	M5E2	PerCP	Maus IgG2a	Becton Dickinson, Heidelberg
Isotyp-Kontrolle	20102.1	-	Maus IgG2a	R&D Systems, Wiesbaden

2.2 Methoden

2.2.1 Probanden

In die Untersuchungen wurden 10 gesunde Normalprobanden (überwiegend Laborpersonal) einbezogen, vier davon waren weiblich. Das Alter lag zwischen 22 und 38 Jahren. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme war bei keinem der Spender eine Infektions-, Autoimmun- oder sonstige Erkrankung bekannt.

2.2.2 Zellpräparation und Zelllinien

2.2.2.1 Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC)

Zur Gewinnung von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) wurde mittels Monovettensystem (Zitrat-Monovette) Blut aus der Vena cubitalis gewonnen.

Die Weiterverarbeitung und Kultivierung erfolgte unter sterilen Bedingungen.

Das peripherenvenöse Blut wurde 1:2 mit PBS verdünnt, und 7 ml davon wurden mit einer Einwegpipette in einem 10 ml Polyesterolröhrchen auf 3 ml Ficoll-Paque überschichtet. Es erfolgte eine schonende Dichtegradientenzentrifugation bei 390 g über 40´ bei Raumtemperatur. Es entstanden vier Phasen. Die oberste Phase enthielt das verdünnte Plasma und Thrombozyten. Der darunter liegende weiße Ring enthielt die mononukleären Zellen (PBMC) (60-70 % Lymphozyten, 30-40 % Monozyten). Darunter befand sich das Zellseparationsmedium über dem Pellet aus Erythrozyten und Granulozyten.

Die PBMC wurden mit einer Pasteurpipette geerntet und in 50 ml Falcon-Röhrchen zweimal gewaschen. Die erste Zentrifugation erfolgte bei 290 g, die zweite bei 210 g für jeweils 10´ und bei Raumtemperatur.

Ein Zellaliquot wurde für die Bestimmung der Zellzahl in einer 0,001 % Trypanblaulösung suspendiert, um die vitalen von den nicht vitalen Zellen zu unterscheiden. Die Zählung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Dann wurden die mononukleären Zellen in dem Medium für die PBMC-Kultur aufgenommen und auf 1×10^6 Zellen / ml eingestellt.

2.2.2.2 Heparinisiertes peripherenvenöses Vollblut

Für die Vollblutkulturen wurde mittels Monovettensystem (Heparin-Monovette) venöses Blut gewonnen. Dieses wurde 1:2 mit dem Medium für die Vollblutkultur verdünnt.

2.2.2.3 Jurkat-Zellen

Um die Regulation der CD14-abhängigen Phagozytose nachweisen zu können, benötigten wir apoptotische Zellen. Diese sollten jedoch ständig zur Verfügung stehen und sich von Versuch zu Versuch möglichst wenig unterscheiden. Darum entschieden wir uns für eine Zelllinie. Im Folgenden wurde mit den einfach zu handhabenden Jurkat-Zellen (ACC 282, humane T-Lymphozyten-Tumorzellen DSMZ, Braunschweig) gearbeitet, in denen für die Untersuchungen Apoptose durch Bestrahlung ausgelöst wurde (siehe unter 2.2.7.1).

Die Jurkat-Zellen wurden in Medium für die Jurkatzellkultur aufgetaut, gewaschen und in 50 ml-Kulturflaschen im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ gezüchtet. Dabei wurden alle 2-3 Tage 50 % der Zelllösung entnommen und durch neues Medium ersetzt.

2.2.3 Einfluss von Zytokinen auf die monozytäre Expression CD14 und die Freisetzung von löslichem CD14 in PBMC-Kulturen Untersuchungen

Zur Bestimmung der Regulation der Expression des membrangebundenen CD14 (mCD14) auf Monozyten und der Freisetzung von löslichem CD14 (sCD14) wurden je 500 µl PBMC-Suspension in ein Well einer 24-Well-Kulturplatte übertragen.

Die Zellen wurden dann mit hu rIL-10, hu rIFN-γ oder hu rTGF-β versetzt und bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Zytokinzugabe. Zur Ermittlung der zeitlichen Abhängigkeit der Effekte wurden die PBMC mit 10 ng/ml der jeweiligen Zytokine für 12, 24 und 48 Stunden inkubiert. Zur Untersuchung der Dosisabhängigkeit erfolgte die Inkubation mit 0, 0,1, 1 und 10 ng/ml der entsprechenden Zytokine für 24 Stunden.

2.2.4 sCD14-Enzymimmunoassay (ELISA)

2.2.4.1 Überstandsgewinnung

Nach der Inkubation der PBMC-Kulturen wurden die Zellen resuspendiert, in 1,5 ml Eppendorf Röhrchen übertragen und für 10´ bei 210 g zentrifugiert. Die Überstände wurden in 0,5 ml-Eppendorf-Röhrchen abgenommen und bis zur Durchführung des sCD14-ELISA bei -70°C gelagert.

2.2.4.2 Protokollzusammenfassung

Der sCD14-ELISA ist ein Sandwich-Enzymimmunoassay mit einem oligoklonalen und einem monoklonalen Antikörper zum Nachweis von löslichem CD14. Der oligoklonale Antikörper ist an die Mikrotiterplatte immobilisiert. Die Proben und die Standards werden in einem ersten Schritt zusammen mit dem Biotin-konjugierten monoklonalen Antikörper inkubiert. Hierbei wird das sCD14 wie ein Sandwich auf der einen Seite durch den oligoklonalen Antikörper auf der Mikrotiterplatte und auf der anderen Seite durch den monoklonalen Antikörper gebunden bzw. eingeschlossen. Nach einem ersten Waschschrift wird das Streptavidin-Peroxidase-Konjugat dazugegeben, welches spezifisch an das Biotin des monoklonalen anti-CD14-Antikörpers bindet. So bindet in jedem Well genau soviel Peroxidase, wie sCD14 an die Antikörper gebunden wurde. Nach dem Entfernen der nichtgebundenen Peroxidase in einem weiteren Waschschrift und der Zugabe der TMB-Substratlösung entsteht durch die Aktivität der Peroxidase eine Farbreaktion der Substratlösung, welche durch die Zugabe einer Säurelösung gestoppt wird. Die optische Dichte der Einfärbung kann mit einem Photometer gemessen werden. Da die Färbung proportional zur Konzentration ist, kann mit Hilfe der gleichzeitig bestimmten Standardkurve auf die sCD14-Konzentration in der jeweiligen Probe geschlossen werden. Die Standards umfassen neben dem Nullstandard den Bereich von 6 bis 96 ng/ml. Die untere Nachweisgrenze wird mit <1 ng/ml angegeben.

Die genaue Durchführung des sCD14-ELISA erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers.

2.2.5 CD14-Expression auf Monozyten

2.2.5.1 Färbung der Zellen

Nach dem Ende der Inkubationszeit wurden die PBMC in den Kulturplatten resuspendiert und je 100 µl Zellsuspension pro Ansatz in ein Micronic-Röhrchen überführt. Nach der Zugabe von 10 µl PE-markiertem anti-CD14-Antikörper folgte eine Inkubation von 30' bei 4°C im Dunkeln. Nach der Antikörperinkubation wurden die Zellen mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen und für 5' bei 4°C und 200 g zentrifugiert. Dann wurden die Überstände bis auf ca. 50 bis 100 µl abgesaugt und die Zellen in den Micronic-Röhrchen auf einem Schüttler resuspendiert.

Zur Bestimmung der monozytären CD14-Expression im Vollblut wurden nach der jeweiligen Kultur 50 µl Blut mit 10 µl PE-markiertem anti-CD14-Antikörper in einem

Micronic-Röhrchen versetzt und für 30´ bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Dann wurden die Röhrchen mit je 1 ml FACS-Lyse-Lösung aufgefüllt. Die Erythrozytenlyse erfolgte im Dunkeln für 10´ bei Raumtemperatur. Nach der folgenden Zentrifugation (200 g, 4°C, 5´) wurde der Überstand abgesaugt und dann das Pellet noch einmal mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen (200 g, 4°C, 5´).

2.2.5.2 Messung der CD14-Expression

Die monozytäre CD14-Expression wurde mittels Durchflusszytometrie an einem FACScan-Gerät bestimmt. Hierzu werden die Zellen an einem Laser (Argon-Laser, 488 nm) vorbeigeleitet. Durch das Streulicht kann man auf die Größe und Granularität der Zellen schließen. Es können aber auch die Fluoreszenzintensitäten in verschiedenen Wellenlängenbereichen analysiert werden. Durch die Verwendung von unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (FITC, PE oder PerCP), die durch die Anregung des Lasers in unterschiedlichen Fluoreszenzbereichen, Fluoreszenz 1-3 (FL1-3), leuchten, können an diesem Gerät bis zu drei Fluoreszenzen unterschieden werden. So leuchtet FITC in der ersten Fluoreszenz (FL1; Emissionsmaximum bei 525 nm), PE in der zweiten Fluoreszenz (FL2; Emissionsmaximum bei 578 nm) und PerCP in der dritten Fluoreszenz (FL3; Emissionsmaximum bei 680 nm). Durch die Kopplung von spezifischen Antikörpern gegen Oberflächenantigene mit einem Fluoreszenzfarbstoff kann man über die Fluoreszenzintensität in einem bestimmten Fluoreszenzbereich die Expression eines Antigens quantitativ ermitteln. Die Fluoreszenzintensität ist dann proportional zur Expression des Antigens. Diese Informationen über Größe, Granularität und die jeweilige Fluoreszenzintensität werden dabei jeder einzelnen Zelle zugeordnet und gespeichert.

Am FACScan wurden 30.000 Zellen pro Ansatz gemessen und mit der CellQuest-Software (Becton Dickinson, San Jose, USA) analysiert. Die Monozyten wurden auf Grund ihrer Größe und Granularität von den anderen Zellpopulationen abgegrenzt (gated). Das Monozytengate wurde dann auf die Fluoreszenzintensität in der zweiten Fluoreszenz (FL2) ausgewertet, welche durch die Bindung der PE-markierten Antikörpers proportional zur monozytären CD14-Expression ist.

Die Fluoreszenzintensität wird als MFI (mittlere Fluoreszenzintensität) angegeben; dabei handelt es sich um den GeoMean, d.h. den geometrischen Mittelwert, der verschiedenen Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Zellen.

2.2.6 CD14-abhängige Phagozytose von *E. coli*-Bakterien

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt auf der Regulation der CD14-abhängigen Phagozytose und hier besonders der von Gram-negativen Bakterien. Diese CD14-Abhängigkeit zeigten wir durch die Blockade der Phagozytose durch einen anti-CD14 Antikörper. Für die Interpretation der Ergebnisse war es interessant, die Bindungsregion des Antikörpers auf dem CD14-Molekül zu kennen. Darum führten wir einen Versuch zum funktionellen Nachweis der Bindungsstelle durch.

Wie auch in der Fragestellung formuliert, sollte auch die Effektivität der CD14-abhängigen Phagozytose im Vergleich zur uneingeschränkten Phagozytose untersucht werden. Als Modell für die uneingeschränkte Phagozytose diente Vollblut, welchem opsonierte *E. coli*-Bakterien zugesetzt wurden. Die CD14-Abhängigkeit wurde durch die Verwendung nicht-opsonierter *E. coli* und den Entzug von freiem Kalzium durch die Zugabe von EDTA erreicht. Die Bindung des Kalzium durch das EDTA verhindert zum einem das Ablaufen der Komplementkaskade zur Opsonierung der nicht-opsonierten Bakterien. Zum anderem wird auch die Kalzium-abhängige Phagozytose über die Antikörper- und Komplementrezeptoren verhindert. Die CD14-Abhängigkeit der Kalzium-unabhängigen über CD14 vermittelten Phagozytose konnte dann durch die Blockade durch einen anti-CD14-Antikörper nachgewiesen werden. So war es möglich die Leistungsfähigkeit der CD14-abhängigen Phagozytose mit der uneingeschränkten Phagozytose im Vollblut zu vergleichen. Außerdem konnte so auch die Regulation der CD14-abhängigen Phagozytose untersucht werden.

2.2.6.1 *Charakterisierung des anti-CD14- Antikörpers RMO52*

Um den in den weiteren Untersuchungen verwandten anti-CD14-Antikörper RMO52 hinsichtlich der Erkennung eines für die LPS/LBP-Bindung notwendigen Epitopes am CD14-Molekül zu charakterisieren, wurde der Einfluss einer RMO52-Vorinkubation der Monozyten auf die LPS-induzierte monozytäre Sekretion von TNF- α untersucht.

Dazu wurde heparinisiertes Vollblut 1:2 mit RPMI 1640 verdünnt und in drei Aliquots aufgeteilt. Das erste Aliquot diente als unbehandelte Kontrolle, dem zweiten Aliquot wurden 25 μ g/ml des anti-CD14-Antikörpers RMO52 und dem dritten Aliquot 25 μ g/ml eines Isotypkontrollantikörpers (IgG2a) zugesetzt. Nach einer Vorinkubation von 30' wurden die Zellen mit 500 pg/ml LPS (Lipopolysaccharid) für 4 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ stimuliert. Zur Gewinnung der Überstände wurden die Aliquots für 10' bei 210 g zentrifugiert, abgenommen und dann 1:10 mit PBS verdünnt. Die TNF- α -Konzentration in

den Überständen wurde mittels IMMULITE-Gerät bestimmt. Dieses halbautomatische Analyse-Gerät arbeitet nach dem Prinzip eines Festphase-Chemilumineszenz Immunoassays. Der Kalibrationsbereich für TNF- α liegt bei 1,7 bis 1000 pg/ml.

Die genaue Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.2.6.2 Phagozytose von *E. coli*-Bakterien

Nachdem die Vollblutkulturen mit den verschiedenen Zytokinen inkubiert worden waren, wurden je 100 μ l Vollblutkultur-Probe in ein 12x75 mm Falcon-Röhrchen gegeben und für 10' auf Eis gestellt. Nach der Zugabe von 20 μ l eiskalter opsonierter oder nicht-opsonierter FITC-markierter *E. coli*-Bakterien wurden die Röhrchen gevortext. Die Verarbeitung auf Eis sollte den vorzeitigen Beginn der Phagozytose schon direkt nach der Bakterienzugabe verhindern.

Der eigentliche Phagozytoseschritt wurde nun durch das Einsetzen der Röhrchen in ein 37°C warmes Wasserbad für alle Ansätze zeitgleich begonnen. Nach einer 20'-Inkubation wurde die Phagozytose durch die erneute Umsetzung der Röhrchen auf Eis gestoppt. Kontrollansätze mit Inkubation im Eisbad anstelle der Inkubation im warmen Wasserbad hatten gezeigt, dass die Lagerung auf Eis die Phagozytose der *E. coli* vollständig verhindert.

Die quantitative Bestimmung der Phagozytose wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Die Menge der durch die Zelle phagozytierten FITC-markierten Bakterien spiegelt sich in der Fluoreszenzintensität der ersten Fluoreszenz wider.

Um jedoch nur eine Auswertung der in die Monozyten aufgenommenen Bakterien zuzulassen und die an der Außenseite der Membran gebundenen *E. coli* vom Nachweis auszuschließen, wurden direkt nach dem Phagozytoseschritt 100 μ l Quenching-Lösung hinzugegeben. Der in der Quenching-Lösung enthaltene Farbstoff ist komplementär zu der durch FITC nach Anregung ausgestrahlten Fluoreszenz. Durch Bindung des Farbstoffes an die FITC-Moleküle wird deren Fluoreszenz absorbiert. Nur die in die Monozyten aufgenommenen FITC-markierten *E. coli* wurden durch die Zellmembran vor der Wirkung des Quench-Farbstoffes geschützt und damit im Durchflusszytometer nachweisbar.

Nach zweimaligem Waschen mit je 3 ml Waschlösung (5 Minuten, 250 g, 4°C) wurden die Waschlösungsüberstände bis auf gut 100 μ l verworfen und darin die Zellpellets resuspendiert.

Quenching-Lösung und Waschlösung sind im *Phagotest* enthalten.

Je 100 µl Zelllösung pro Ansatz wurden in einem Micronic-Röhrchen mit 10 µl PE-markiertem anti-CD14-Antikörper gemischt (geschüttelt) und für 20' bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Diese Markierung dient der späteren Identifizierung der Monozyten, da nur die Monozyten eine große, deutlich CD14-positive Population darstellen.

Nach der CD14-Färbung wurden in den Vollblutsuspensionen die Erythrozyten mit FACS-Lyse-Lösung osmotisch zerstört und nachfolgend mit FACS-Puffer ausgewaschen (siehe 2.2.3.1).

Die Auswertung erfolgte am FACScan mittels CellQuest-Software. Um die Phagozytoseleistung der Monozyten zu bestimmen, wurde die CD14-positive Monozytenpopulation elektronisch gated und die Fluoreszenzintensität der von den Monozyten aufgenommenen FITC-markierten *E. coli* analysiert.

2.2.6.3 Untersuchung des Einflusses von Zytokinen auf die CD14-abhängige Phagozytose E. coli-Bakterien

Zur Untersuchung der Regulation der Phagozytoseleistung wurde 1 ml verdünntes heparinisiertes Vollblut in ein 2 ml-Eppendorf-Röhrchen gegeben und mit oder ohne hu rIL-10, hu rIFN- γ oder hu rTGF- β versetzt. Die Konzentration der Zytokine betrug jeweils 10 ng/ml. Die Inkubation der Kulturen mit hu rIL-10-Zugabe erfolgte für 24 Stunden und die Inkubation der hu rIFN- γ - und hu rTGF- β -Kulturen erfolgte für 48 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank.

2.2.6.4 Erreichen der CD14-Abhängigkeit und deren Nachweis

Für den Nachweis der CD14-Abhängigkeit der *E. coli*-Phagozytose wurde das mit den Zytokinen vorkultivierte Vollblut vor der Bakterienzugabe mit oder ohne blockierenden anti-CD14-Antikörper RMO52 bzw. Isotyp-Kontrollantikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Findung einer blockierenden Antikörperkonzentration wurden Vorversuche mit 1 µg/ml, 5 µg/ml und 25 µg/ml RMO52 durchgeführt. Wie im Ergebnisteil beschrieben, stellte sich eine Konzentration von 25 µg/ml als optimal heraus, warum im weiteren nur noch mit dieser Konzentration gearbeitet wurde.

Nach dieser Antikörperinkubation wurden EDTA in einer Endkonzentration von 1,4 mM hinzugegeben, um das freie Kalzium zu binden und dadurch die CD14-Abhängigkeit der

Phagozytose zu erreichen.

Die Verhinderung der Phagozytose durch die CD14-Blockade mittels anti-CD14 Antikörper weist die CD14-Abhängigkeit nach.

2.2.6.5 Analyse der Leistungsfähigkeit der CD14-abhängigen Phagozytose

Zum Nachweis der Leistungsfähigkeit stellten wir der CD14-abhängigen Phagozytose von nicht-opsonierten *E. coli*-Bakterien die uneingeschränkte Phagozytose von opsonierten *E. coli*-Bakterien im Vollblut gegenüber. Die CD14-Abhängigkeit der Phagozytose der nicht-opsonierten *E. coli* wurde durch die Zugabe von EDTA erreicht und durch die Blockade mittels anti-CD14-Antikörper RMO52 nachgewiesen. Zur Darstellung der Effektivität der uneingeschränkten Phagozytose von opsonierten und nicht-opsonierten *E. coli* im Vollblut wurde auf die Zugabe von EDTA verzichtet. Um einen möglichen Anteil der CD14-vermittelten Phagozytose an der uneingeschränkten Phagozytose von opsonierten *E. coli* zu zeigen, wurde auch hier CD14 durch den anti-CD14-Antikörper RMO52 blockiert.

Im Ergebnisteil wird der Versuchsaufbau zum Nachweis der Effektivität der CD14-abhängigen Phagozytose noch einmal genauer beschrieben.

2.2.7 Untersuchung des Einflusses von Zytokinen auf die CD14-abhängige Phagozytose von apoptotischen Zellen

2.2.7.1 Induktion der Apoptose von Jurkat-Zellen

In Vorbereitung auf den Phagozytostest wurden die aus den Kulturflaschen entnommenen Jurkat-Zellen in ein 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt und mit 40 Gy in der Bestrahlungsanlage Gamma Cell 40 bestrahlt. Danach wurden die Zellen auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und zu je 3 ml pro Well in einer 6-Well-Kulturplatte inkubiert (37°C, 5 % CO₂).

Die Apoptose der Jurkat-Zellen wurde durch die Exposition von Phosphatidylserin (PS) auf der Außenseite der Membran nachgewiesen. Phosphatidylserin ist bei vitalen Zellen streng auf der Innenseite der Membran angeordnet. Diese Ordnung der Membran kann von apoptotischen Zellen nicht mehr aufrecht erhalten werden und so gelangt es auch auf die Außenseite. Mit Hilfe von Annexin V, einem Liganden des Phosphatidylserin, kann das Phosphatidylserin auf den Zellen nachgewiesen werden. Durch die Kopplung von

rekombinantem Annexin V mit dem FITC-Farbstoff können die apoptotischen Zellen Fluoreszenz-markiert und mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden.

Nach der Inkubation der bestrahlten Jurkat-Zellen wurden 50 µl Zellsuspension in ein Micronic-Röhrchen überführt und einmal mit 1 ml PBS gewaschen und für 5´ bei 4°C und 200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Probe mit 200 µl Annexin-Bindungspuffer aufgefüllt und die Röhrchen gevortext. Dann wurden 2 µl Annexin V-FITC dazugegeben und für 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert, die Zellen in 1 ml Bindungspuffer gewaschen und in 50 µl resuspendiert. Die Messung erfolgte am FACScan-Durchflusszytometer. Die Jurkat-Zellen wurden dann auf die Fluoreszenzintensität in der ersten Fluoreszenz (FL1) ausgewertet. Durch das Setzen eines Kursors wurden die Zellen in Phosphatidylserin-positive und –negative Zellen unterschieden. Die Position des Kursors wurde mit Hilfe von nichtgefärbten Kontrollproben anhand der Autofluoreszenz festgelegt.

2.2.7.2 Phagozytose von apoptotischen Jurkat-Zellen

Die Bestimmung der monozytären Phagozytoseleistung von apoptotischen Zellen erfolgte größtenteils nach dem gleichen Protokoll wie die der nicht-opsonierten *E. coli*. Darum wird im Folgenden nur auf die Unterschiede eingegangen.

Um die Phagozytose der apoptotischen Zellen nachweisen zu können, mussten auch die Jurkat-Zellen mit einem Farbstoff markiert werden. Dies wurde mit dem Zellmembranfarbstoff PKH-67 erreicht. Der in der Durchflusszytometrie in der ersten Fluoreszenz leuchtende Farbstoff lagert sich fest in die Membran ein und wird dann nicht mehr an andere Zellen abgegeben.

Unmittelbar vor dem Phagozytostest wurden die Jurkat-Zellen mit dem Membranfarbstoff gefärbt. Dazu wurden die Zellen aus der Kulturplatte geerntet (ca. 2×10^7 Zellen) und einmal mit serumfreien Medium (RPMI 1640) gewaschen. Nach der Zentrifugation (400 g, 5´, Raumtemperatur) wurde der Überstand vollständig entfernt. Die Zellen wurden dann in Diluent C, enthalten im Test-Kit des Membranfarbstoffes, resuspendiert und mit 5 µM PKH-67 für 2 Minuten gefärbt. Die Färbung wurde durch die Proteine, welche in dem zugegebenen serumhaltigen Medium (Medium für die Jurkat-Zellkultur) enthalten sind, gestoppt. Nach der Färbung wurden die Jurkat-Zellen noch zweimal mit 10 ml des serumhaltigen Mediums gewaschen (400 g, 5´, Raumtemperatur) und auf 2×10^7 Zellen/ml eingestellt.

Die Phagozytose der apoptotischen Zellen wurde in einem uneingeschränkten

Vollblutsystem untersucht, da in diesem Fall die Regulation der monozytären Phagozytoseleistung generell nicht bekannt war, eine deutliche CD14-Abhängigkeit der uneingeschränkten Phagozytose durch Makrophagen in der Literatur bereits beschrieben wurde [1073], und so auch im Vergleich Rückschlüsse auf die Bedeutung der CD14-abhängigen Phagozytose in Bezug auf die Gesamtpotenz der Phagozytose zu ziehen waren. Darum wurde hier von einer EDTA-Zugabe abgesehen und so ein uneingeschränktes Modell geschaffen.

Des Weiteren stellte sich eine Phagozytosezeit von 90´ als günstig heraus, da man nach dieser Zeit bei der durchflusszytometrischen Analyse ein deutliches Signal durch die aufgenommenen Jurkat-Zellen erkennen konnte.

Um auch hier nur die Phagozytose der in die Zelle aufgenommenen Jurkat-Zellen nachzuweisen, wurden die Zellen nach dem Phagozytoseschritt im Wasserbad mit je 100 µl EDTA/Trypsin-Lösung behandelt, um die möglicherweise anhaftenden Jurkat-Zellen von der Monozytenmembran zu lösen. (Bei zwei Vorversuchen zeigte sich eine um durchschnittlich 8,2 % geringere Fluoreszenzintensität durch die Zugabe von EDTA/Trypsin.)

Die Markierung der CD14-positiven Zellen erfolgte hier mit PerCP-markierten anti-CD14 Antikörpern.

Mittels Durchflusszytometrie wurde die Phagozytoseleistung der CD14-positiven Zellen (Monozyten) durch die Analyse der Fluoreszenzintensität der aufgenommenen markierten apoptotischen Jurkat-Zellen bestimmt. Durch das Setzen eines Cursors wurden die Monozyten in Phagozytose-positive und –negative Zellen unterschieden. Die Position des Cursors wurde mit Hilfe von Kontrollproben ohne Zusatz von markierten Jurkat-Zellen anhand der Autofluoreszenz festgelegt.

Um zu zeigen, dass diese Phagozytose von dem Vorhandensein von apoptotischen Zellen abhängig war, wurden als Kontrolle auch Versuche mit nicht-apoptotischen Jurkat-Zellen durchgeführt.

2.2.8 Statistik

Die Daten werden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (mean \pm SEM) angegeben und dargestellt. Die Ergebnisse wurden einer statistischen Analyse unterzogen. Der Einfluss der Zytokine auf die Regulation der monozytären CD14-Expression, der sCD14-Freisetzung und der Phagozytose wurden mit dem Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben untersucht. Eine signifikante Dosis- und Zeitabhängigkeit wurde

mit Hilfe des Friedman-Tests nachgewiesen.

Die Signifikanz wird in unterschiedlichen Niveaus angegeben: Signifikanzniveau 1 ($p < 0,05$) bedeutet, dass die Irrtumswahrscheinlichkeit für eine Aussage geringer als 5 % ist. Die Irrtumswahrscheinlichkeit für Signifikanzniveau 2 ($p < 0,01$) beträgt weniger als 1 %, bei Signifikanzniveau 3 ($p < 0,001$) weniger als 0,1 %.

Die statistischen Analysen wurden mit der SPSSTM Software (SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt.