

12. Experimenteller Teil

12.1 Testsubstanzen

Gallussäure wurde von Fa. Roth, Karlsruhe bezogen. Die Quercetin- und Kaempferolglykoside wurden von Dr. D. Ercil, Hacettepe Universitysi, Ankara aus *Geranium pyrenaicum* isoliert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Corilagin wurde aus einer vorgereinigten Fraktion aus *Pelargonium reniforme* (Latté, 1999) mittels HPLC isoliert. Alle anderen Substanzen sind großzügige Gaben von Prof. T. Yoshida, Okayama University, Japan, und von Dr. Foo, New Zealand Institute for Industrial Research, New Zealand.

12.2 Geräte

Sterilbank	Fa. Gelaire
Brutschrank (25 °C bzw. 37 °C)	Fa. Heraeus
Sterile Mikrotiterplatten	Fa. Falcon
Lichtmikroskop	Zeiss Axiovert 35
Zentrifuge	Ultrafuge 1960, Fa. Heraeus
ELISA-Reader Spectra Fluor	TECAN GmbH
Thermo-Cycler	Techne-Genius
Photometer zur RNA-Messung	Pharmacia Biotech, Frankfurt a. M.
Elektrophoresekammer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Netzgerät für Gelelektrophorese	Biometra, Göttingen
Digitalkamera Mitsubishi P35D	INTAS, Brüssel

12.3 Isolierung und Strukturaufklärung von Corilagin

42,6 mg einer vorgereinigten Ethylacetat-Fraktion aus der Krautdroge von *Pelargonium reniforme* (Geraniaceae) (Latté, 1999) wurden in 1,5 mL Methanol gelöst und mittels semi-präparativer HPLC (Shimadzu, Eurosher 100 C-18) an RP-18-Material mit einem H₂O-MeOH-Gradienten (1:0 – 0:1 in 30 min) aufgetrennt. Die Fraktion bei Rt 8,7 min wurde aufgefangen, eingedampft und im Vakuum bei 35 °C z. T. eingetrocknet (Ausbeute: 31,2 mg). Die chromatographischen und spektroskopischen Daten stimmen mit denen in der Literatur (Latté, 1999) überein.

12.4 Immunologische, toxikologische und molekularbiologische Arbeitstechniken

12.4.1 Nährmedien

RPMI 1640 – Medium	Fa. Biochrom, Berlin
FCS (für Säugerzellen)	Fetales Kälberserum, Fa. BioWhitaker
FCS (für Leishmanien)	Fetales Kälberserum, Fa. PAA
R0-Medium	RPMI 1640 mit 1% Penicillin/ Streptomycin
R5-Medium	95 Teile R0 mit 5 Teilen FCS
R10-Medium	90 Teile RPMI 1640 mit 10 Teilen FCS
HBSS	Fa. Serva, Heidelberg

12.4.2 Reagenzien

Actinomycin D-StammLösung 1%

10 mg Actinomycin D werden in 10 mL R5-Medium gelöst und eingefroren. Erst vor Versuchsbeginn wird die Lösung aufgetaut und auf 37°C erwärmt.

Agarose (High Grade, Fa. Serva)

Zur Herstellung eines 1,5%igen Agarosegels werden 1,5 g Agarose in 100 mL TAE-Puffer aufgeschlämmt und bis zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen wird die flüssige Masse in die Gelkammer gegossen.

Blaumarker

0,5 mg Xylencyanol und 1,5 mg Bromphenolblau werden in 10 mL Glycerol gelöst und aliquotiert.

Essigsäure 33%

132 mL Essigsäure (96%) werden mit 252 mL Aqua dest. verdünnt.

Ethanol zum Waschen von RNA-Präzipitaten

75 mL absolutes, RNase-freies Ethanol werden mit 25 mL bidestilliertem Wasser vermischt und bei -20°C aufbewahrt.

Ethidiumbromid

In die flüssige, handwarme Agaroselösung wird Ethidiumbromid-Stocklösung (1% in Wasser) zu 0,005 % Endkonzentration pipettiert.

Größenmarker für Gelelektrophorese (Promega, Madison, USA)

DNA-Fragmente von 100 bp, 200 bp, 500 bp, 1000 bp und 1500 bp zur Längenbestimmung von PCR-Produkten

Griß-Reagenz

Lösung A: 1%ige Sulfanilamid-Lösung (4-Aminobenzensulfonamid); 10 g Sulfanilamid werden in 1000 mL ortho-Phosphorsäure (2,5%) gelöst.

Lösung B: Eine 0,1%ige N-(1-Naphtyl)-ethylendiamindichlorid-Lösung; 1 g dieses Reagenzes wird in 1000 mL Aqua dest. gelöst.

Die einzelnen Lösungen werden bis zum Gebrauch unter Lichtausschluss bei 4 °C gelagert und das Reagenz durch Mischen gleicher Volumina unmittelbar vor Gebrauch hergestellt.

Isopropanol, zur RNA-Präzipitation

Absolutes, RNase freies Isopropanol wird zu 50 mL aliquotiert und bei Raumtemperatur RNase-frei gelagert.

Kristallviolettlösung 0,5%

5 g Kristallviolett (4-[4,4'-Bis(dimethylamino)benzhydryliden]-N,N-dimethyl-2,5-cyclohexadienyliden-ammoniumchlorid) werden in 1000 mL Methanol (20%) gelöst.

Lysis-Medium

380 µL 1%ige SDS-Lösung (s.u.), erstellt durch 1:19 (V/V) Verdünnung einer sauren 20%igen SDS-Lösung mit RPMI 1640 – Medium, werden mit 50 mL R0-Medium versetzt. Vor Gebrauch wird das Medium auf 37 °C erwärmt.

Magnesiumchlorid-Lösung

Mehrere Aliquots zu je 1 mL werden in einer Konzentration von 25 mM mit der Taq-Polymerase automatisch mitgeliefert.

MTT-Reagenz

100 mg MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-diphenyltetrazoliumbromid] werden in 20 mL Phosphatpuffer (pH 7,2) gelöst, sterilfiltriert und maximal 2 Wochen bei 4°C aufbewahrt.

D-NMMA-Lösung 2%

Negativkontrolle für L-NMMA; Einwaage von 20 mg N^G-Monomethyl-D-Arginin in 10 mL R10-Medium

L-NMMA-Lösung 2%

Einwaage von 20 mg N^G-Monomethylarginin in 10 mL R10-Medium

Physiologischer Phosphatpuffer pH 7,2

8,0 g Natriumchlorid, 0,2 g Kaliumchlorid, 0,1 g Calciumchlorid, 0,1 g Magnesiumchlorid, 3,18 g Natriummonohydrogenphosphat und 0,2 g Kaliumhydrogenphosphat werden in Aqua dest. zu 1000 mL gelöst.

Postlysis-Medium (Berens und Marr, 1978; Kiderlen und Kaye, 1990)

Das Medium setzt sich auf 100 mL wie folgt zusammen:

	V [mL]	[%]
R0-Medium	54,0	
FCS (PAA)	17,0	17
Natriumpyruvat-StammLösung	1,7	1,0
HEPES-StammLösung	1,7	1,0
Makrophagenüberstand	25,0	15
Pferdeserum	5	5
D-Glucose	0,2	0,2

Reaktionspuffer für Reverse Transkription

50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT ; dieser Puffer wird als 5x-Konzentrat mit der Reversen Transkriptase geliefert und gemäß dem Herstellerprotokoll verwendet.

Random Hexamer Primers (Promega, Madison, USA)

In der Konzentration 500 µg/mL geliefert und bei -20 °C gelagert.

Reaktionspuffer für PCR

10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 50 mM KCl, 0,1 % Triton X-100; dieser Puffer wird als 10x-Konzentrat mit der Taq-Polymerase geliefert und gemäß dem Herstellerprotokoll verwendet.

Primer (Warschkau und Kiderlen, 1999; Baker et al., 2000)

Für die PCR wurden die folgenden Primerpaare eingesetzt: HGPRT (362 bp), sense 5' -GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GTT G- 3'; antisense 5' -GAG GGT AGG CTG GCC TAT AGG CT- 3'; IL-1 (400 bp) sense 5' -GCA ACT GTT CCT GAA CTC A- 3'; antisense 5' -CTC GGA GCC TGT AGT GCA G- 3' IL-10 (256 bp) sense 5' -TAC CTG GTA GAA GTG ATG CC- 3' antisense 5' -CAT CAT GTA TGC TTC TAT GC- 3'; IL-12 (312 bp) sense 5' -CGT GCT CAT GGC TGG TGC AAA G- 3' antisense 5' -CTT CAT CTG CAA GTT CTT GGG C- 3'; IL-18 (440 bp) sense 5' -ACT GTA CAA CCG GAG TAA TAC GG- 3'; antisense 5' -AGT GAA CAT TAC AGA TTT ATC CC- 3'; TNF-α (276 bp) sense 5' -ATG AGC ACA GAA AGC ATG ATC- 3' antisense 5' -TAC AGG CTT GTC ACT CGA ATT- 3'; IFN-α (692 bp) sense 5' -AAC AGC CCA GAG GAC AAA CAG CAT CTT CAA G-3'; antisense 5' -AAA TCA TGC ACA AAT GAC TGA TAT TTC TG-3'; IFN-γ (405 bp) sense 5' -TAC TGC CAC GGC ACA GTC ATT GAA 3'; antisense 5' -GCA GCG ACT CCT TTT CCG CTT CCT- 3'; iNOS (798 bp) sense 5' -CAT GGC TTG CCC CTG GAA GTT TCT CTT CAA AG- 3'; antisense 5' -GCA GCA TCC CCT CTG ATG GTG CCA TCG- 3'.

Reverse Transkriptase M-MLV (Promega, Madison, USA)

Die verwendete Reverse Transkriptase ist ein *E. coli* exprimiertes rekombinantes Enzym (200 U/µL) des murinen Leukämievirus. Es handelt sich außerdem um eine Punktmutante ohne RNase H-Aktivität, so dass in einer DNA/RNA-Heteroduplex der RNA-Anteil nicht abgebaut wird. Gegenüber anderen kommerziell erhältlichen Reversen Transkriptasen ist die M-MLV-RTase von Promega zwar nur durchschnittlich prozessiv, zeichnet sich dafür aber durch geringe Hintergrundaktivität aus.

Rekombinantes murines Interferon- γ (r-mu-IFN- γ)

Von der kommerziell erhältlichen StammLösung (Fa. Bender & Co GmbH, Wien) werden 2 μ L (entspricht 2×10^5 U/mL) mit 4 mL R0-Medium versetzt (entspricht 200 U/ mL)

Saure SDS-Lösung (20%)

40 g Natriumdodecylsulfat werden in 200 mL Aqua dest. gelöst und mit 1 M Acetatpufferlösung auf pH 4,7 eingestellt.

Taq-Polymerase

Hitzestabile DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR); Das von Promega, Madison bezogene Enzym repliziert DNA mit einem Temperaturoptimum von 70-75°C, besitzt neben der 5'→3'-Syntheseaktivität eine 5'→3'-Exonukleaseaktivität und wird in der Aktivität 5 U/ μ L geliefert.

TAE-Puffer

Zur Herstellung von 20xTAE werden Tris und Natriumacetat gelöst. Bei Bedarf werden 20 mL 20xTAE-Puffer mit Aqua dest. auf 1000 mL aufgefüllt.

Trizol (Gibco Life Technologies)

Phenolhaltiges Reagenz zum Aufschluss von Zellen und Gewebe und der Isolierung von gesamt-RNA (Chomczynski und Sacchi, 1987)

Trypanblau-Lösung

100 mg Trypanblau [(3,3'-[3,3'-Dimethyl-4,4'-biphenylylen)-bis(azo)]-bis(5-amino-4-hydroxy-2,7-naphthalindisulfonsäure)-tetranatriumsalz] werden in 100 mL einer 0,9%igen Natriumchlorid-Lösung gelöst und mit 20 mg Natriumazid konserviert. Die Gebrauchslösung wird durch eine 1:10 (V/V) - Verdünnung mit Phosphatpuffer (pH 7,2) hergestellt.

Trypsin/EDTA-Lösung 10%

1 Teil der Trypsin-EDTA-Lösung (Fa. Gibco) wird mit 9 Teilen Phosphatpuffer (pH 7,2) verdünnt.

12.4.3 Zell-Linien

Viren:

Enzephalomyokarditis (EMC)-Virus

Das Virusmaterial stammt vom Fraunhofer-Institut für Toxikologie, Hannover, und wird am Robert Koch–Institut tiefgekühlt gelagert. Die verwendete Kultur wird vor Versuchsbeginn aufgetaut und als Stammkultur angezüchtet. Der Einsatz der Virussuspension erfolgt nach Verdünnung von 10 µL Stammkultur mit 4,99 mL R0-Medium, von der 100 µL nachfolgend mit 19,9 mL R0-Medium zur Gebrauchslösung verdünnt werden. Diese erstellte Virussuspension wird sofort weiterverwendet.

Zell-Linien (Säuger)

L-929 (TNF)	murine Fibroblastenlinie, sensitiv für TNF
L929 (IFN)	murine Fibroblastenlinie, sensitiv für IFN
B9	murines B-Zell-Hybridom, sensitiv für IL-6
RAW 264.7	murine makrophagenähnliche Zell-Linie

Parasiten (alle Gattung *Leishmania*, Trypanosomatidae)

<i>L. major</i> LV39	(kutane Leishmaniose)
<i>L. donovani</i> LV9	(viszerale Leishmaniose)
<i>L. tropica</i>	(kutane Leishmaniose)
<i>L. killicki</i>	(kutane Leishmaniose)
<i>L. aethiopica</i>	(diffus-kutane Leishmaniose)
<i>L. amazonensis</i>	(mukokutane Leishmaniose)
<i>L. guyanensis</i>	(mukokutane Leishmaniose)

L. major LV39 und *L. donovani* LV9 entstammen der London School of Hygiene and Tropical Medicine und werden am Robert Koch-Institut in Kultur gehalten. Die übrigen genannten Spezies sind Patientenisolat und werden als Referenzstämme im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie der Charité gehalten.

12.4.4 Prüfung auf Pyogene (Endotoxinbestimmung)

Die Überprüfung erfolgt mit dem semiquantitativen *in vitro* Limulustest (Roslanski und Novitsky, 1991) der Fa. Sigma, St. Louis. Die Durchführung und Auswertung erfolgt unter sterilen Bedingungen gemäß mitgeliefertem Protokoll. Alle verwendeten Testsubstanzen sind nach diesem Test endotoxinfrei.

12.4.5 Kultivierung und Isolierung von RAW 264.7-Zellen

Die murine makrophagenähnliche Zell-Linie RAW 264.7 (Raschke et al., 1978) wurde zur Verfügung gestellt von Dr. M. Masihi, Robert Koch-Institut, Berlin und als adhärente Dauerkultur in R10-Medium vermehrt. Zur Isolierung der Zellen wird das Medium verworfen und gegen PBS ausgetauscht, welches ebenfalls sofort verworfen und gegen eiskaltes PBS ersetzt wird. Der sich einstellende Verlust an Ca^{2+} -Ionen sowie die niedrige Temperatur führen zum Verlust der Adhärenz, so dass sich die Zellen leicht durch Hin- und Herpipettieren mit einer 10-mL-Glaspipette abspülen lassen. Die in PBS suspendierten Zellen werden in ein 50-mL-Falconröhrchen überführt und 10 min bei $250 \times g$ bei $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wird das Zellpellet in geringem Volumen HBSS resuspendiert, das Röhrchen mit HBSS aufgefüllt und erneut abzentrifugiert. Diese Waschprozedur wird dreimal durchgeführt, wobei vor dem letzten Waschgang ein Aliquot für die Zellzahlbestimmung entnommen wird. Nach dem Waschen und der Auszählung wird das Zellpellet in R10-Medium resuspendiert und auf den gewünschten Titer eingestellt.

12.4.6 Kultivierung von Leishmanien

Leishmania major LV39, *Leishmania tropica* und *Leishmania guyanensis* werden am RKI in BalbC-Mäusen passagiert und in flüssigem Stickstoff kryokonserviert.

Leishmania donovani LV9 wird im Hamster passagiert und kryokonserviert. Die nach Isolierung aus Patienten an der Charté in ausreichenden Mengen angezüchteten Isolate von *L. killicki*, *L. aethiopica* und *L. amazonensis* werden ohne Tierpassage unter Kryokonservierung gelagert. Bei Bedarf werden die Parasiten aufgetaut, in $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ warmes R10-Medium überführt und bei 1800 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird in R5-Medium überführt. Zur Aufrechterhaltung der

Promastigotenkultur werden diese alle 3-4 Tage 1:10 mit R5-Medium verdünnt und subkultiviert. Die überschüssigen Promastigoten werden je nach Bedarf direkt für die Verwendung in Experimenten aufgereinigt oder gemäß Infektionsschutzgesetz (Hofmann, 2004) entsorgt.

12.4.7 Infektion von Makrophagen mit Leishmanien

RAW-Zellen und Leishmanien werden in einer Neubauer-Zählkammer mit 40x Vergrößerung gezählt, wobei Makrophagen 1:2 mit Trypanblau, Leishmanien zur Immobilisierung 1:2 mit Formalin versetzt werden. Für eine spätere Ausplattierung in 96-well-Mikrotiterplatten werden 1×10^7 Makrophagen in 2 mL R10-Medium resuspendiert. 4×10^8 Leishmanien werden in 500 μ L R10-Medium resuspendiert und zur Infektion in die Zellsuspension einpipettiert und resuspendiert. Der Ansatz wird für zwei Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, wobei alle 30 Minuten sanft geschüttelt wird. Pro verwendeter Leishmanienspezies wird ein solcher Ansatz mitgeführt, zuzüglich einem Kontrollansatz mit nicht infizierten Zellen. Nach Ablauf der Inkubation werden die Kulturen viermal für 8 Minuten bei 1200 U/min gewaschen und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Nach der letzten Waschung werden die infizierten Zellen in 10 mL R10-Medium resuspendiert. In jedes Well der Mikrotiterplatte werden 1×10^5 Zellen/100 μ L pipettiert und diese Platten für 18 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert (Kiderlen und Kaye, 1990).

12.4.8 Prüfung auf Effekt gegenüber Amastigoten

Für die Prüfung auf einen antileishmaniellen Effekt gegen das intrazelluläre Stadium werden die im vorigen Absatz beschriebenen 96-well-Mikrotiterplatten verwendet. Nach Ablauf der 18-stündigen Ruhephase wird das jeweils erste Well einer Reihe mit 100 μ L R10-Medium auf 200 μ L aufgefüllt und mit 4 μ L der zu testenden Substanz (als Stammlösung: 20 mg/mL in DMSO) versetzt. Eine Mehrkanalpipette wird in die 200 μ L Gesamtlösung eingetaucht, und nach Resuspendieren werden 100 μ L abgenommen und in die nächste Reihe überführt. Der Vorgang wird über die ganze Platte vollzogen und zum Schluss jedes Well auf 200 μ L mit R10-Medium aufgefüllt. Infolgedessen entsteht eine geometrische Verdünnungsreihe der jeweiligen Testsubstanz im Konzentrationsbereich 200 μ g/mL bis 0,1 μ g/mL. Als Negativkontrolle dient ein

Well mit 200 μL R10-Medium, als Positivkontrollen jeweils ein Well mit 100 U/mL r-mu-IFN- γ , eines mit 10 ng/mL LPS und eines mit 100 U/mL IFN- γ + 10 ng/mL LPS. Dieser Ansatz wird 72 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

12.4.9 Prüfung auf Freisetzung von NO (Griess-Test)

Nach 72-stündiger Inkubation werden 100 μL Überstände abgenommen und auf eine zweite Mikrotiterplatte übertragen. In jede dieser Vertiefungen werden 100 μL Griess-Reagenz hinzugefügt, 3 Minuten geschüttelt und die Absorption photometrisch bei 550 nm vermessen.

12.4.10 Prüfung auf Leishmanienviabilität von Amastigoten

Im Anschluss an den Griess-Test werden die entnommenen 100 μL Medium durch 100 μL Lysis-Medium ersetzt und 18 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird sanft geschüttelt und die Lysis mit 150 μL Postlysis-Medium gestoppt. Die Mikrotiterplatten werden dann 96 h bei 25 °C und 5% CO₂ inkubiert, um aus den freigesetzten Amastigoten die Umwandlung ins Promastigotenstadium und eine Proliferation zu ermöglichen. Danach werden in jedes Well 10 μL MTT-Lösung gegeben und weitere 6 h inkubiert, 50 μL saure 20%iger SDS-Lösung zugegeben und über Nacht bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Die Formazanbildung wird photometrisch bei 570 nm gemessen.

12.4.11 Prüfung auf Zytotoxizität gegenüber RAW-Zellen

Je 10 μL der MTT-StammLösung/100 μL Probe werden mit der jeweiligen Zellsuspension vermischt und 6 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird die Reaktion mit 50 μL saurer SDS-Lösung gestoppt und über Nacht inkubiert. Die Auswertung erfolgt photometrisch bei 570 nm.

12.4.12 Leishmanizidität gegenüber Promastigoten

In die Vertiefungen einer 96-Well-Mikrotiterplatte werden 100 μL R5-Medium vorgelegt. Es wird das jeweils erste Well einer Reihe mit R5-Medium auf 200 μL aufgefüllt und mit 4 μL der zu testenden Substanz (als StammLösung: 20 mg/mL in DMSO) versetzt. Mit Hilfe einer Mehrkanalpipette werden nach Resuspendieren 100 μL abgenommen und seriell über die ganze Platte verdünnt. Zum Schluss wird jedes Well auf 200 μL mit einer Suspension

promastiger Leishmanien des Titors 5×10^4 /100 μ L R5-Medium aufgefüllt; so dass letztlich eine geometrische Verdünnungsreihe der jeweiligen Testsubstanz im Konzentrationsbereich 200 μ g/ mL bis 0,1 μ g/ mL vorliegt. Nach 96 h Inkubation bei 25 °C und 5% CO₂ werden 10 μ L MTT-Lösung hinzugegeben und für weitere 6 h inkubiert, danach 50 μ L saure 20%iger SDS-Lösung zugegeben und über Nacht bei 37 °C gelagert. Die Leishmanienproliferation wird photometrisch bei 570 nm gemessen.

12.4.13 TNF-Induktionsvermögen der Testsubstanzen

Je 5×10^6 nicht infizierte bzw. infizierte RAW-Zellen in 2 mL R10 werden in die Vertiefungen einer 12-well-Mikrotiterplatte ausplattiert, 18 h inkubiert, das Medium gegen 2 mL frisches R5 ausgetauscht und die zu testenden Substanzen in einer ihrem IC₅₀-Wert entsprechenden Konzentration eingebracht. Nach einer weiteren Inkubation von 18 h werden die Überstände abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

Zellen der murinen Fibroblastenlinie L929(TNF) werden in R5-Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ gehalten. Das Kulturmedium in der Nährflasche wird verworfen und die adhärenen Zellen in der Flasche mit 10 mL HBSS gespült. Das HBSS wird ebenfalls verworfen, in die Flasche 5 mL Trypsin/EDTA-Lösung gegeben und 15 min bei 37 °C, 5% CO₂ inkubiert. Die enzymatische Ablösung der Zellen wird durch Zugabe von 5 mL R5-Medium gestoppt und die Zellsuspension in Falconröhrchen gesammelt. Zur Zellgewinnung wird die Suspension zweimal bei 250 x g 12 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und 3 mal mit 10 mL HBSS gewaschen. Die Zellen werden in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und auf einen Titer von 3×10^5 /mL in R5-Medium eingestellt. In jedes Well einer 96-well-Mikrotiterplatte werden 100 μ L dieser Zellsuspension pipettiert, so dass sich in jedem Well 3×10^4 Zellen befinden. Als Kontrollen werden in zwei Vertiefungen Mediumkontrollen (zellfrei), in weiteren zwei Vertiefungen Negativkontrollen (Zellen mit R5-Medium) und eine Vertiefung eine Positivkontrolle (Zellen in R5-Lösung mit 5 μ L einer auf 10 U/mL eingestellten TNF-Lösung pipettiert). Die ausplattierten Mikrotiterplatten werden über Nacht bei 37 °C, 6% CO₂) inkubiert. Aus den über Nacht inkubierten Zellsuspensionen werden die Überstände von den adhärenen Zellen abgesaugt und gegen R5-Medium mit 4 μ g/mL

Actinomycin D ausgetauscht. 100 μL der zu testenden Überstände werden in die ersten Wells einer jeden Reihe pipettiert und über die Platte hinweg austitriert. Die so bestückten Mikrotiterplatten werden bei 37 °C 5% CO_2 18 h inkubiert und nach Ablauf dieser Zeit anhand der Positivkontrolle mikroskopisch auf hinreichende Zell-Lyse kontrolliert. Das Medium der Mikrotiterplatte wird verworfen und die Platte auf Flies trocken geklopft. In jede Vertiefung werden 100 μL einer 0,5%igen Kristallviolettlösung gefüllt und 3 min angefärbt. Anschließend wird die Färbelösung verworfen, jede Mikrotiterplatte 4 mal mit Wasser gewaschen, auf Flies trocken geklopft und 30 min bei 50 °C nachgetrocknet. In jede Vertiefung werden anschließend 100 μL 33% Essigsäure gefüllt, die Mikrotiterplatten 10 min geschüttelt und die Absorption bei 490 nm photometrisch gemessen (Whiteside, 2002).

12.4.14 IFN-Induktionsvermögen der Testsubstanzen mit Hilfe des EMC-Virus/L929 (IFN) -Testmodells

Je 5×10^6 nicht infizierte bzw. infizierte RAW-Zellen in 2 mL R10 werden in die Vertiefungen einer 12-well-Mikrotiterplatte ausplattiert, 18 h inkubiert, das Medium gegen 2 mL frisches R5 ausgetauscht und die zu testenden Substanzen in einer ihrem IC_{50} -Wert entsprechenden Konzentration eingebracht. Nach einer weiteren Inkubation von 18 h werden die Überstände abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

In 100mL-Kulturschalen werden L929(IFN)-zellen angezüchtet, trypsinisiert, gewaschen und gezählt. Die Suspension wird auf 2×10^5 Zellen/ mL eingestellt und in Mikrotiterplatten mit 2×10^4 Zellen/ Vertiefung pipettiert, die über Nacht bei 37 °C, 5% CO_2 inkubiert werden. Anschließend wird der Überstand jeweils durch je 100 μL Mediumkontrolle, Zellkontrolle, Viruskontrolle mit r-mu-IFN- γ -Standard (100 U/ mL) und den zu testenden Überständen ersetzt, die alle linear verdünnt werden. Diese Ansätze werden 8 h bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert und anschließend in die Viruskontrolle, IFN- γ -kontrolle und den Testansätzen 100 μL der Virus-Gebrauchssuspension pipettiert und über Nacht bei 37°C, 5% CO_2 ,erneut inkubiert. Nach 22 Stunden zeigt sich vollausgeprägte Virusaktivität (in der Viruskontrolle muss eine Lysis deutlich ausgeprägt sein), so dass der Versuch durch Verwerfen des Mediums abgebrochen wird. In jedes Well

werden 100 μL Kristallviolett-Lösung pipettiert. Nach drei Minuten Färbezeit wird das Farbreagenz verworfen und die Mikrotiterplatten mit Wasser nachgewaschen und bei 50 °C 10 min nachgetrocknet. In die vollständig trockenen Vertiefungen werden 100 μL Essigsäure (33%) pipettiert und 10 Minuten geschüttelt. Die Bestimmung der Absorption nach Kristallviolettfärbung erfolgt photometrisch bei 490 nm. Die mittlere Absorption der r-mu- γ -IFN-Kontrolle wird einer 100 %igen und die der Viruskontrolle einer 0 %igen Virusprotektion gleich gesetzt (Marucci et al., 1982; Whiteside, 2002).

12.4.15 Prüfung auf Induktion von IL-6 mit B9-Zellen

Je 5×10^6 nicht infizierte bzw. infizierte RAW-Zellen in 2 mL R10 werden in die Vertiefungen einer 12-well-Mikrotiterplatte ausplattiert, 18 h inkubiert, das Medium gegen 2 mL frisches R5 ausgetauscht und die zu testenden Substanzen in einer ihrem IC_{50} -Wert für antileishmanielle Aktivität entsprechenden Konzentration eingebracht. Nach einer weiteren Inkubation von 18 h werden die Überstände abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

Zellen der B9-Hybridomalinie werden in R5-Medium mit IL-6-Zusatz als Suspensionskultur gehalten. Unmittelbar vor Versuchsbeginn wird die Suspension in ein Falcon-Röhrchen überführt und 10 min bei 250 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet in 10 mL HBSS resuspendiert und gewaschen. Der Waschvorgang wird 4 mal durchgeführt, um Reste des (IL-6-haltigen!) Kulturmediums vollständig zu entfernen. Nach der letzten Waschung wird das Zellpellet mit R5-Medium auf einen Titer von 1×10^5 /mL eingestellt.

In die Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte werden 100 μL R5-Medium vorgelegt. In die ersten Wells einer jeden Reihe werden 100 μL der zu testenden Überstände pipettiert und über die Platte 1:1 seriell verdünnt. Anschließend werden in jedes Well 100 μL der B9-Zellsuspension pipettiert und die Platte für 72 h bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit werden in jedes Well 10 μL MTT-Lösung hinzugegeben. Es erfolgt eine Weiterinkubation für 6 h, die durch Zugabe von 50 μL saurer 20%iger SDS-Lösung abgebrochen wird. Die IL-6-abhängige Zellproliferation wird photometrisch bei 570 nm gemessen (Aarden et al., 1987; Helle et al., 1998)

12.5 Molekularbiologische Techniken

12.5.1 Isolierung von gesamt-RNA aus adhärennten Zellen

In den Vertiefungen einer 12-Well-Mikrotiterplatte werden 5×10^6 infizierte oder nicht infizierte Zellen eingesät und 18 h in Ruhe inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit den Testsubstanzen in der ihrem IC_{50} -Werten entsprechenden antileishmaniellen Konzentration aktiviert. Ansätze nicht aktivierter Zellen und solche mit IFN- γ +LPS-Aktivierung werden parallel mitverfolgt. Nach 3 h Inkubation bei 37 °C und 5% CO_2 wird die Aktivierungsphase durch Verwerfen des Überstandes und Einfrieren des Zellrasens abgebrochen. Zur RNA-Isolierung, modifiziert nach Chomczynski und Sacchi (1987), wird der Zellrasen mit 1 mL Trizol überschichtet, das entstehende Lysat mehrmals resuspendiert und in Mikrozentrifugengefäße überführt. Nach 3 min Inkubation bei Raumtemperatur wird jeder Ansatz mit 200 μ L Chloroform versetzt und nach 10 min bei Raumtemperatur 15 min 12000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Danach wird die obere, wässrige Phase, in der sich die RNA angereichert hat, in ein mit 500 μ L Isopropanol gefülltes Gefäß überführt; die untere, phenolische Phase sowie die mittlere, denaturierte Proteine enthaltende Festphase werden entsorgt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur zur Ausfällung der RNA erfolgt eine Zentrifugation für 10 min bei 12000 x g und 4°C. Der Überstand wird vorsichtig abgekippt und das RNA-Pellet durch Resuspendieren in 1 mL eiskaltem 75%igen Ethanol und anschließendem Zentrifugieren für 5 min bei 8000 x g und 4°C gewaschen und erneut präzipitiert. Der Überstand wird verworfen und das RNA-Pellet durch 30minütige Lagerung des umgedrehten Gefäßes auf Flies getrocknet. Anschließend wird die RNA mit 25 μ L bidestilliertem Wasser überschichtet und durch Inkubation für 10 min bei 58 °C in Lösung gebracht. Für eine Ausbeute- und Qualitätsbestimmung werden 5 μ L dieser RNA-Lösung zu 95 μ L Wasser gegeben und diese RNA-Lösung in die Quarzküvette eines Photometers überführt. Menge und Reinheit der RNA werden über den Absorptionsquotienten bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Dieser sollte bei 1,8 liegen; die Ausbeute liegt zwischen 20 und 40 μ g RNA. Die RNA-Lösung wird mit Aqua bidest. auf 1 μ g/ μ L eingestellt und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

12.5.2 Reverse Transkription (RT)

Für jeden Ansatz werden 2,5 μL der auf 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ eingestellten RNA-Lösung, 2 μL Random Hexamer Primer-Lösung und 5,5 μL Aqua bidest. in ein Mikrozentrifugenröhrchen vorgelegt und zur Denaturierung der RNA für 5 min auf 70 °C erhitzt. Während dieser Zeit wird eine Gebrauchslösung der übrigen Komponenten vorbereitet, indem pro Ansatz 5 μL des 5fachen Reaktionspuffers, 2 μL dNTPs, 1 μL Reverse Transkriptase und 8 μL Aqua bidest. in einem Gefäß zusammengemischt werden. Nach der Denaturierung werden die Proben unverzüglich auf Eis gelagert und 15 μL der Gebrauchslösung hinzugegeben. Um zu gewährleisten, dass sich alle Komponenten wirklich zusammen am Gefäßboden konzentrieren, werden alle Proben kurz anzentrifugiert. Zur Reaktion werden die Proben in einem Thermocycler für 60 min bei 37 °C inkubiert und anschließend entweder direkt als cDNA in einer PCR eingesetzt oder bei -20 °C gelagert. Für jeden Ansatz wird eine RT-Negativkontrolle mitgeführt, die alle Komponenten außer Reverser Transkriptase enthält.

12.5.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Pro cDNA-Ansatz und einzusetzendem Primerpaar wird 1 Mikrozentrifugenröhrchen vorbereitet. In jedes dieser Röhrchen werden 2,5 μL Aqua bidest, 3 μL cDNA-Lösung und je 2,5 μL Primer (sense) und Primer (antisense) vorgelegt. Für die übrigen Komponenten wird eine Gebrauchslösung hergestellt, indem pro PCR-Ansatz 27 μL Aqua bidest, 5 μL an konzentriertem Reaktionspuffer, 5 μL der 25 mM MgCl_2 -Lösung, 2,5 μL dNTP-Lösung, 2,5 μL DMSO und 0,5 μL Taq-Polymerase zusammengemischt werden. Von dieser Gebrauchslösung werden in jeden PCR-Ansatz 43 μL einpipettiert und die Proben im Thermocycler dem folgenden Programm unterworfen: Initialer Denaturierungszyklus mit 5 min bei 95 °C, 35 Zyklen mit einem Denaturierungssegment von 93 °C für 60 s, „Annealing“-segment von 63 °C für 60 s und dem Synthesesegment von 72 °C für 60 s. Zum Abschluss aller ansynthetisierten Stränge erfolgt ein Finalzyklus von 5 min bei 72 °C. Eine

Ausnahme bildet der Ansatz mit Primern für iNOS, deren Annealingtemperatur gleich der Synthesetemperatur ist und bei dem ein Programm bestehend aus 40 Zyklen mit 93 °C für 60 s und 90 s bei 72 °C gefahren wird. Die PCR-Produkte werden unmittelbar im Anschluss gelelektrophoretisch analysiert oder bei -20 °C eingefroren (Baumforth et al., 1999; Kessler et al., 1999; Sharma et al., 2002).

12.5.4 Agarose-Gelelektrophorese

1,5 g Agarose werden in 100 mL TAE-Puffer aufgeschlämmt und für einige Minuten bis zum Sieden erhitzt, bis eine klare, leicht viskose Lösung entsteht, die man unter leichtem Rühren wieder erkalten lässt. Die richtige Temperatur zum Eingießen ist erreicht, wenn das Glasgefäß schmerzfrei auf den Handrücken gepresst werden kann. Die noch flüssige Agarose wird in die Form einer Gelkammer gegossen, wobei ein Gelkamm die späteren Geltaschen ausspart. Sobald das Gel ausgelatinisiert ist, wird der Kamm aus dem Gel gezogen und die gesamte Gelkammer mit TAE-Puffer gefüllt, und zwar mindestens so voll, dass das Gel deutlich überschichtet ist. Zum Auftragen der Proben werden 8 µL des jeweiligen PCR-Produkts mit 2,5 µL Blaumarker vermischt und das gesamte Volumen in die Geltaschen pipettiert. Eine Bahn wird für den Größenmarker benötigt, die übrigen Bahnen stehen den zu analysierenden PCR-Proben zur Verfügung. An die Gelkammer wird eine Spannung derart angelegt, dass die negativ geladenen Nukleinsäuren zum positiven Pol gezogen werden. Das Netzgerät wird auf 100 V, 65 mA eingestellt. Nach 45 min wird das Gel aus der Kammer entnommen und 15 min in einer Wanne mit 0,005%iger wässriger Ethidiumbromidlösung gefärbt und anschließend zum Auswaschen von Hintergrundfärbung für 10 min in Wasser differenziert. Die noch nicht sichtbaren DNA-Banden erscheinen werden zur visuellen Detektion mit UV-Licht von 250-360 nm angeregt. Das Gel wird zur Dokumentation fotografiert.

12.6 ELISA

12.6.1 Bestimmung von IFN- α

Unmittelbar vor Analyse wird 1x Waschpuffer aus dem Konzentrat hergestellt und auf 4 °C gebracht. Mit Hilfe des murinen IFN- α werden durch Verdünnen in Dilutionspuffer Maßlösungen für eine Standardkurve (0 pg/mL - 500 pg/mL) hergestellt. Jeweils 100 μ L der Vergleichslösungen für die Standardkurve sowie der zu analysierenden Zellüberstände werden in die Wells einer 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert und die Platte abgedeckt bei Raumtemperatur für 1 h gelagert. Während dieser Zeit wird das Antikörperkonzentrat 1: 200 in Dilutionspuffer verdünnt. Nach der Inkubation wird der Überstand aus den Wells verworfen und die Platte einmal mit 1 x Waschpuffer gewaschen und die Platte zum Trocknen umgedreht auf Flies gelagert. Anschließend werden 100 μ L der Antikörperlösung in jedes Well pipettiert, die Platte abgedeckt und für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Etwa 45 min vor Ende dieser Inkubation wird das lyophilisierte Meerrettich-Peroxidase-Konjugat mit 100 μ L destilliertem Wasser rekonstituiert und unmittelbar vor Verwendung 1:500 mit Peroxidase-Konjugat-Dilutionspuffer verdünnt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird der Überstand aus den Wells verworfen, dreimal mit 1 x Waschpuffer gewaschen und umgedreht auf Flies gelagert. In jedes Well werden 100 μ L Meerrettich-peroxidase-Konjugat-Lösung pipettiert und die Platte abgedeckt bei Raumtemperatur für 1 h gelagert. Die ausgeleerten Wells werden viermal mit Waschpuffer gewaschen und die Platte wiederum umgedreht auf Fliespapier gelagert. Auf die getrockneten Wells werden 100 μ L TMB-Substrat-Lösung (Frey et al., 2000) pipettiert, die Platte abgedeckt und für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 100 μ L Stop-Lösung abgebrochen und das Ergebnis nach 5 Minuten bei 450 nm photometrisch bestimmt.

12.6.2 Bestimmung von IFN- γ

Zur Vorbereitung des IFN- γ -ELISA wird der Erstantikörper (R4-6A2) auf 7,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Beschichtungspuffer eingestellt und zu je 50 μL in eine 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert. Die Platte wird abgedeckt über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wird die Platte über Flies ausgeklopft und durch Einpipettieren von jeweils 300 $\mu\text{L}/\text{well}$ PBS-Tween mit 60 s Einwirkzeit 3 mal gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wird die Platte mit einem Fön vollständig getrocknet. Zum Blocken werden in jedes Well 200 μL PBS + 10 % FCS pipettiert und die Platte abgedeckt 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird 4 mal mit PBS-Tween gewaschen und danach wieder getrocknet. Je 100 μL eines jeden zu bestimmenden Zellüberstands werden in die freien Wells pipettiert. Für die Standardkurve werden aus der r-mu-IFN- γ -Stocklösung Verdünnungen mit PBS + 10 % FCS hergestellt, von denen ebenfalls 100 μL in die Wells pipettiert werden. Eine Negativkontrolle mit 100 μL Medium, aber ohne Probe, wird mitgeführt. Die so präparierte Mikrotiterplatte wird abgedeckt bei 4 °C über Nacht inkubiert, dann über Flies ausgeklopft, 6 mal mit PBS-Tween gewaschen und mit einem Fön getrocknet. Der Zweitantikörper (AN-18) wird auf 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mit PBS + 10 % FCS eingestellt und 100 μL dieser Verdünnung in jedes Well pipettiert. Nach 45 min Inkubation bei Raumtemperatur wird die Platte 8 x mit PBS-Tween gewaschen. Zur Vorbereitung der Detektion wird der Streptavidin-Peroxidase-Komplex 1:500 in PBS + 10 % FCS verdünnt. Von dieser Verdünnung werden in jedes Well 100 μL pipettiert. Die Platte wird abgedeckt 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 10 x mit PBS-Tween gewaschen und getrocknet. Das in Aliquots zu je 5 mL eingefrorene ABTS-Substrat wird kurz vor Verwendung aufgetaut, jeweils mit 5 μL Perhydrol versetzt und von dieser aktivierten Substratlösung in jedes Well 100 μL pipettiert. Nach 15 Minuten wird die Reaktion durch 100 μL 20%ige SDS-Lösung abgestoppt und die Extinktion bei 405 nm photometrisch gemessen.

12.6.3 Bestimmung von IL-12

Zur Vorbereitung wird der Primärantikörper in einer Konzentration von 7,5 µg/mL in Beschichtungspuffer (0,1 M NaHCO₃ pH 8,2) verdünnt. Mit je 100 µL dieser Antikörper-Verdünnung wird eine 96-well-Mikrotiterplatte über Nacht bei 4°C beschichtet. Ungebundener Antikörper wird durch zweimaliges Waschen mit Waschpuffer (PBS + 0,05% Tween20) entfernt. Nach Absättigung freier Bindungsstellen am Plattenboden durch Blockierungspuffer (PBS + 10 % FCS) für zwei Stunden bei Raumtemperatur und zweimaligem weiteren Waschen mit Waschpuffer werden mit rekombinatem murinen IL-12 durch Verdünnen in Dilutionspuffer Maßlösungen für eine Standardkurve (0 pg/mL - 500 pg/mL) hergestellt und jeweils 100 µL der Vergleichslösungen für die Standardkurve sowie der zu analysierenden Zellüberstände in die Wells einer 96-well-Mikrotiterplatte einpipettiert. Nach Inkubation über Nacht bei 4°C wird der Überstand verworfen, ungebundenes oder unspezifisch gebundenes Protein durch 4 mal Waschen entfernt und 100 µL einer Lösung des biotinylierten Sekundärantikörpers zu 2 µg/mL für 1 h bei Raumtemperatur hinzugegeben. Nach Verwerfen des Überstands und 4 mal Waschen wird mit streptavidin-gekoppelter Peroxidase in 100 µL PBS + 10% FCS für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend ungebundenes Konjugat durch viermaliges Waschen entfernt. Als Substrat werden 100 µL TMB-Lösung (Frey et al., 2000) auf die gebundenen Komplexe pipettiert. Innerhalb von 15 Minuten setzt die Peroxidase daraus konzentrationsabhängig einen blauen Farbstoff frei. Die Reaktion wird durch 100 µL 0,1 N HCl abgebrochen und der blaue Farbstoff in einen gelben überführt, der spektralphotometrisch bei 430 nm gemessen wird.