

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Puffer Allgemein

3.1.1.1 PBS (*phosphate buffered saline*)

- 1000ml H₂O bidest
- 8,0g NaCl (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- 0,2g KCl (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- 0,2g KH₂PO₄ (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- 1,42g Na₂HPO₄ x2H₂O (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- pH auf 7,2 eingestellt, Lösung autoklaviert

3.1.1.2 PBS/BSA

- 500ml PBS
- 2,5g BSA (Sigma, München, Deutschland)
- Lösung steril filtriert (0,2 µm Ø)

3.1.1.3 PBS/BSA/Azid

- 500ml PBS
- 2,5g BSA (Sigma, München, Deutschland)
- 1ml 10% NaN₃ (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Lösung steril filtriert (0,2 µm Ø)

3.1.1.4 Erylysepuffer

- 500ml H₂O bidest.
- 0,5g KHCO₃ (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- 4,15g NH₄Cl (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- 18,5mg EDTA (Sigma, München, Deutschland)
- Lösung mit HCl einstellen auf pH 7,43
- Lösung steril filtriert (0,2 µm Ø)

3.1.2 Lösung für die Dichtezentrifugation

- Percoll Separating Solution, Dichte 1,124 (Biochrom AG, Berlin, Deutschland), verdünnt mit RPMI-Medium (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland), als 40% (v/v) Percolllösung und als 70% (v/v) Percolllösung.

3.1.3 Spezielle Puffer für den ELISPOT-Essay

3.1.3.1 PBS/3%BSA

- PBS
- 3% BSA (Sigma, München, Deutschland)
- Lösung steril filtriert (0,2 µm Ø)

3.1.3.2 PBS/3%BSA/Tween

- PBS
- 3% BSA (Sigma, München, Deutschland)
- 0,05% Tween 20 (Merck, München, Deutschland)
- Lösung steril filtriert (0,2 µm Ø)

3.1.3.3 TRIS/Tween

- 1l H₂O bidest
- 7,3 g Trisma Pre-Set Crystals pH 7,8 (Sigma, München, Deutschland)
- 0,05% Tween 20 (Merck, München, Deutschland)

3.1.3.4 AMP-Puffer

- 95ml 2-Amino-2-methyl-1-propanol (Sigma, München, Deutschland)
- 1000ml H₂O bidest
- 150 mg MgCl₂ (Sigma, München, Deutschland)
- 100µl Triton X-405 (Sigma, München, Deutschland)
- mit HCl auf pH 10,25 eingestellt
- steril filtriert und bei 4C° gelagert

3.1.3.5 Development-Puffer

- 80% (v/v) AMP-Puffer mit 0,1% BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat) (Sigma, München, Deutschland)
- 20% (v/v) H₂O mit 3% Agarose Typ I: Low EEO (Sigma, München, Deutschland)

Herstellung des Puffers im Methodenteil unter dsDNA-ELISPOT beschrieben.

3.1.4 Spezielle ELISA-Puffer

3.1.4.1 PBS/5%FCS

- PBS
- 5% (v/v) FCS (Sigma, München, Deutschland)

3.1.4.2 *PBS/5%FCS/Tween*

- PBS/5%FCS
- 0,1% (v/v) Tween 20 (Merck, München, Deutschland)

3.1.4.3 *PBS/Tween mit 1%Trockenmilch*

- PBS
- 0,1% (v/v) Tween 20 (Merck)
- 1% (v/v) Trockenmilch (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)

3.1.4.4 *Substratlösung*

- 15ml Citratpuffer (0,1 mol Citronensäuremonohydrat, 0,1 mol Tri-Natriumcitrat, auf pH 5 einstellen) (Roth, München, Deutschland)
- 7,5mg POD (Sigma, München, Deutschland)
- 7,5µl H₂O₂ (Roth, München, Deutschland)

3.1.4.5 *Stopplösung*

- 100ml 1-molare H₂SO₄ (Roth, München, Deutschland)
- 0,63g Na₂SO₃ x7 H₂O (Roth, München, Deutschland)
- 0,315g Na₂SO₃ (Roth, München, Deutschland)

3.1.4.6 *Carbonatpuffer*

- 75ml 0,1 molare NaHCO₃-Lösung (Roth, München, Deutschland)
- 25ml 0,1 molare Na₂CO₃-Lösung (Roth, München, Deutschland)

3.1.5 Spezielle Lösungen für die intrazelluläre FACS-Färbung

3.1.5.1 *PBS/BSA/Azid mit Saponin*

- 500ml PBS/BSA/Azid
- 2,5g Saponin (Sigma, München, Deutschland)

3.1.5.2 *2% Formaldehyd*

- 70% Formaldehyd (Roth, München, Deutschland) verdünnt mit PBS.

3.1.6 Medien

3.1.6.1 *Medium zur Zellkultivierung*

- RPMI 1640 Medium mit 2mM L-Glutamine (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland)

- 10% (v/v) FCS (hitzeinaktiviertes fetales bovines Serum) (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
- 100 Einheiten/ml Penicillin G und 100µg/ml Streptomycin (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland)
- 50 µM 2-Mercaptoethanol (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

3.1.7 Mediumzusatz ConASup

ConASup (Con-A Supernatant) ist der sterilfiltrierte Kulturüberstand von Ratten Splenozyten, die für 24h mit Conavalin A stimuliert wurden. Das ConASup wurde bei -70°C gelagert und als Zusatz (20% Volumenprozent) zum Medium bei der Kultivierung von Zellen für den dsDNA-ELISPOT verwendet.

3.1.7.1 Serumfreies Medium für den ZytokinELISPOT

- AIM-V serumfreies Lymphozytenmedium (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

3.1.8 Antikörper

3.1.8.1 MACS-Beads

- CD45R (B220) Microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland)
- CD90 Microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland)

3.1.8.2 Antikörper und sekundäre Reagenzien für ELISPOT und ELISA

- Anti-Murines-IgG-Alkalische Phosphatase (polyklonal) (Caltag, Burlingame, USA)
- Anti-Murines-IgG2a-Alkalische Phosphatase (polyklonal) (Caltag, Burlingame, USA))
- Anti-Murines-IgM/A/G-Alkalische Phosphatase (polyklonal) (Caltag, Burlingame, USA))
- Streptavidin-Alkalische Phosphatase (Sigma, München, Deutschland))
- Anti-IFN γ Antikörperpärchen (Coating- und biotinilierter Nachweisantikörper) (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland).
- Anti-IFN γ -Antikörper XMG1.2 (DRFZ) als CoatingAntikörper und Anti-IFN γ -Antikörper biotiniliert AN 17.18.24 (DRFZ) als Nachweisantikörper.
- Anti-Murines-IgG-POD (polyklonal) (Sigma, München, Deutschland)
- Murines Anti-dsDNA-IgG MRSS-1/D2D4 (ATCC, Rockville, USA) und Anti-SmD1-IgG für die ELISA-Standardkurve (aus Poolserum von MRL/lpr-Mäusen)

3.1.8.3 FACS Antikörper, sekundäre Reagenzien und PJ

- Anti-CD3-FITC 145-2C11 (hergestellt im DRFZ)
- Anti-CD4-Cy5 GK1.5 (hergestellt im DRFZ)
- Anti-CD4-PE GK1.5 (hergestellt im DRFZ)
- Anti-CD25 biotiniliert 7D4 (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland)
- Anti-CD28-DIG 37.51 (hergestellt im DRFZ)
- Anti-CD44-DIG IM7 (hergestellt im DRFZ)

- Anti-CD45RB-FITC 16A (hergestellt im DRFZ)
- Anti-CD62L-DIG MEL-14 (hergestellt im DRFZ)
- Anti-CD69 biotiniliert H1.2F3 (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland)
- Anti-CD71-PE C2 (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland)
- Anti-B220-Cy5 RA3-6B2 (hergestellt im DRFZ)
- Anti-IFN γ -FITC AN18.17.24 (hergestellt im DRFZ)
- Anti-TNF α -FITC MP6-XT22 (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland)
- Anti-IL4-DIG 11B11 (hergestellt im DRFZ)
- Anti-IL10-DIG JES5-2A5.11 (hergestellt im DRFZ)
- Isotyp-Kontrolle Ratten IgG-FITC R3-34 (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland)
- Anti-DIG-Cy5 1.71.256 (Roche, Mannheim, Deutschland – Kopplung mit Flurochrom im DRFZ)
- Anti-DIG-PE 1.71.256 (Roche, Mannheim, Deutschland – Kopplung mit Flurochrom im DRFZ)
- Streptavidin-PerCP (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland)
- Propidium Jodid (PJ) (Sigma, München, Deutschland)

3.1.9 Peptide

- SmD1₍₈₃₋₁₁₉₎ Peptid (VEPKVKSKKREAVAGRGRGRGRGRGRGRGRGGPRR) (Dr. Henklein, Biochemie der HU-Berlin; Deutschland)
- Randomisiertes SmD1₍₈₃₋₁₁₉₎ Peptid (CREKGRVGRGRPAVGRRGVGRPGRRGSRARGEKGRK) (Dr. Henklein, Biochemie der HU-Berlin). Das randomisierte Peptid ist zusammengesetzt aus den selben Aminosäuren wie das SmD1₍₈₃₋₁₁₉₎ Peptid, allerdings in zufälliger Sequenz. Die Peptide wurden nach der Methode von Atherton et al. synthetisiert.

3.1.10 Weitere Materialien und Geräte

- Ionomycin (Sigma, München, Deutschland) als 1mg/ml Lösung in DMSO
- PMA (Sigma, München, Deutschland)
- Brefeldin A (Sigma, München, Deutschland) als 5mg/ml Lösung in 70%Ethanol (Merck, München, Deutschland)
- Cell Strainer (Zellsieb) 70 μ m \varnothing (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)
- Metall-Rundsieb (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- 96-Well Platte mit flachem Wellboden, aus Polystyrene hochbindend, steril und unsteril (Corning, Schipohl-Rijk, Niederlande)
- MACS LS-Säulen und entsprechende Magnete und Halterungen (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland)
- Petrischalen (Corning, Schipohl-Rijk, Niederlande)
- 48- und 12-Well Platten zur Zellkultivierung (Corning, Schipohl-Rijk, Niederlande)
- Multistix zur Analyse der Proteinurie der Mäuse (Bayer Diagnostics, München, Germany)
- FACSCalibur 4-Farben Durchflusszytometer (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)

3.2 Mäuse und Maushaltung

Die Mäuse wurden vom Bundesinstitut für Risikobewertung in Marienfelde, Berlin, bezogen und im Mausstall des DRFZ Berlin gehalten. Aufzucht und Haltung erfolgte unter SPF-Bedingungen (SPF – specific pathogen free) und entsprechend den gesetzlichen Richtlinien. Fütterung erfolgte ad libidum.

In den Versuchen wurde mit den beiden Mausstämmen BWF1 und MRL/lpr gearbeitet. Beide Mausstämme gelten als murine Modelle für den SLE. Als Kontrollmäuse wurden CWF1-Mäuse verwendet. Dabei handelt es sich um die F1 Nachkommenschaft von NZW- und Balb/c-Mäusen. Diese Mäuse sind dem BWF1-Stamm genetisch ähnlich, beide Mausstämme sind MHC-kompatibel (beide Stämme haben den MHC Haplotyp H2^{d.z}). Die CWF1-Mäuse erkrankten jedoch nicht an einem Lupus-Syndrom, allenfalls findet sich bei alten Tieren eine leichte Proteinurie (bis~30-100 mg/dl).

Des Weiteren wurden in einzelnen Experimenten Balb/c Mäuse verwendet. Dabei handelt es sich um gesunde Mäuse.

3.3 Methoden zur Zellgewinnung

3.3.1 Isolierung von Splenozyten

Die Mäuse wurden durch Genickbruch getötet und ihr Fell mit 70%Ethanol desinfiziert. Anschließend wurden Fell und Unterhaut von der Körperfaszie getrennt, die Bauchhöhle eröffnet und die Milz entnommen. Die Milzen wurden in vorgelegtem PBS/BSA kühl bis zur Weiterverarbeitung an der Cleanbench zwischengelagert. Unter der Cleanbench wurden die Organe mit sterilem PBS/BSA abgespült und mit dem Kolben einer 5ml Einmalspritze durch ein Falcon-Cellstrainer mit 70µm Ø gedrückt (jeweils 2 Milzen pro Cellstrainer). Die so gewonnene Zellsuspension wurde 10 min mit 301g bei 4C° zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Entfernen der Erythrozyten wurde das Zellpellet in 5ml Erylysepuffer resuspendiert und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Hierbei werden selektiv die Erythrozyten lysiert, während die anderen Zellen unbeschadet bleiben. Nach Ablauf der 5min wurde zum Entfernen des Erylysepuffers die Suspension mit 20ml PBS/BSA aufgefüllt und die Suspension zentrifugiert (301g, 10 min bei 4C°) und der Überstand verworfen. Makroskopisch gewinnt das Pellet eine hellgelbe Farbe, wodurch sich der Erfolg der Erythrozytenlyse kontrollieren lässt. Die Splenozyten wurden im gewünschten Volumen aufgenommen.

3.3.2 Isolierung von Leukozyten aus den Nieren

Um sicherzugehen, dass die isolierten Zellen aus dem Nierengewebe stammen und nicht aus dem Blut, wurde der Kreislauf der Mäuse *in situ* mit ca.24ml PBS gespült. Dadurch wurde das

Blut aus dem Kreislauf und dem Nierengewebe gewaschen. Hierzu wurde nach dem Töten der Tiere und Eröffnen von Bauch- und Brusthöhle der rechte Herzvorhof aufgeschnitten. Dann wurde mit einer Spritze der linke Ventrikel punktiert und langsam 24ml PBS infundiert (diese Menge ist mehr als das 10fache Blutvolumen einer Maus). So wird der gesamte Kreislauf der Tiere mit PBS durchspült, das Blut-PBS-Gemisch verlässt den Kreislauf durch den eröffneten rechten Vorhof und die Organe werden deutlich erkennbar heller (Leber und Nieren verändern ihre Farbe von dunkelrot zu hellbraun). Nach dem Spülen wurden die Nieren entnommen und in kühlem PBS/BSA bis zur Weiterverarbeitung an der Cleanbench zwischengelagert.

Am Sterilarbeitsplatz wurden die Nieren mit dem Kolben einer 5ml Einwegspritze durch ein vorher per Abkochen desinfiziertes Metallsieb gerieben. Die so gewonnene Zellsuspension wurde für 10min mit 301g bei 4° zentrifugiert. Das Problem bei der Isolierung von Leukozyten aus den Nieren ist, dass im Gewebe relativ wenig Leukozyten, dafür aber reichlich andere Zellen wie Epithel- und Mesangiumzellen enthalten sind. Um die Leukozyten von den anderen Zellen zu trennen, ist eine Percoll-Dichtezentrifugation nötig. Diese Spezialzentrifugation macht sich die unterschiedliche Dichte der Zellen zu Nutze und trennt die Zellsuspension anhand eines Dichtegradienten. Hierfür wurde in 15ml Falcon-Röhrchen jeweils 2,5 ml einer 70%Percoll-Lösung vorgelegt (70% Percoll, 30% RPMI-Medium). Die Zellen wurden in einer 40%Percolllösung (40%Percoll, 60% Medium) resuspendiert. Diese Zell-Percoll suspension wurde vorsichtig über das vorgelegte 70%ige Percoll übergeschichtet. Anschließend wurden die Röhrchen für 30 min mit 1700g bei RT in einer Zentrifuge ohne schnelle Beschleunigung oder Zentrifugenbremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation fanden sich Epithelzellen und Zellschrott oberhalb der Percoll 40% Schicht, die Leukozyten zwischen der 40% und der 70% Percollschicht und einige wenige Erythrozyten unter der 70% Percollschicht. Zuerst wurde der oberflächliche Zellschrott und Epithelzellen mit einer Pasteurpipette und Vakuumpumpe abgesaugt und verworfen. Danach wurde die Leukozytenschicht vorsichtig mit einer Pipette aufgenommen und in vorgelegtes PBS/BSA gegeben. Um restliches Percoll zu entfernen, wurde die Zellsuspension 2mal mit PBS/BSA aufgefüllt, jeweils anschließend zentrifugiert (301g, 10 min bei 4C°) und der Überstand verworfen.

3.3.3 Magnetische Zellsortierung (MACS)

3.3.3.1 Prinzip

Ziel ist die Isolierung oder Depletierung von Zellen anhand von Oberflächenmarkern. Dazu werden monoklonale Antikörper gegen den entsprechenden Oberflächenmarker verwendet, die mit kleinen superparamagnetischen Partikeln (ca. 50 nm) verbunden sind (sogenannte Antikörperbeads). Das zu trennende Zellgemisch wird mit den Antikörperbeads inkubiert und so die gewünschten Zellen über die Antikörper magnetisch markiert. Anschließend wird die Zellsuspension über eine mit Stahlwollmatrix gefüllten Säule gegeben, die in einem Magnetfeld

aufgehängt ist, wodurch die mit den Antikörperbeads markierten Zellen in der Säule zurückgehalten werden, alle anderen Zellen hingegen die Säule passieren. Danach wird die Säule aus dem Magnetfeld entnommen, wodurch nun die magnetisch markierten Zellen eluiert werden können.

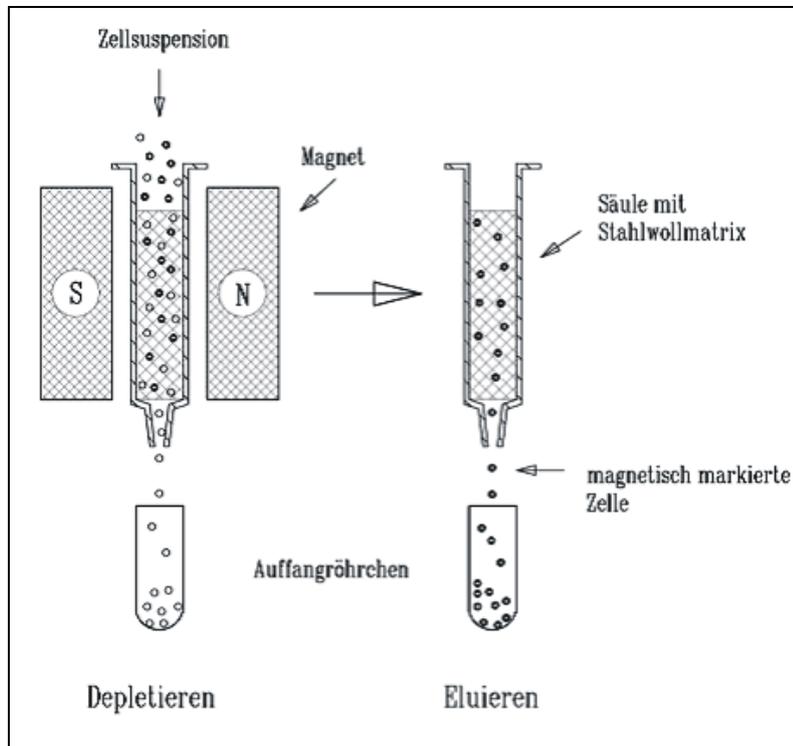


Abbildung 5: Prinzip der MACS-Zelltrennung. Die mit den Antikörperbeads markierten Zellen sind als dunkle Kugeln dargestellt, die unmarkierte Negativfraktion als helle Kugeln.

3.3.3.2 Durchführung der MACS-Zelltrennung

Die zu trennende Zellsuspension (bis zu max. $1 \cdot 10^8$ Zellen Gesamtzellzahl, in der Praxis die Splenozyten aus 2 Milzen) wurde in $900 \mu\text{l}$ kühlem PBS/BSA aufgenommen und $100 \mu\text{l}$ Antikörperbeads hinzugegeben. Zur Isolierung von T-Zellen wurden CD90 Mikrobeads verwendet, zur Isolierung von B-Zellen wurden CD45R (B220) Mikrobeads benutzt (also jeweils monoklonale Antikörper gegen CD90 bzw. CD45R, gekoppelt mit magnetischen Mikropartikeln). Das Zell-Antikörperbead-Gemisch wurde für 15 min im Kühlschrank inkubiert, wobei die Suspension alle 5 min kurz geschüttelt wurde. Es ist zu erwähnen, dass auch alle nachfolgenden Schritte möglichst im Kühlen bzw. mit kühlen Puffern durchgeführt wurden. Nach Ablauf der 15 min. wurde zum Entfernen von ungebundenen Antikörperbeads die Zellsuspension mit 10ml PBS/BSA aufgefüllt und für 10min mit $301g$ bei 4°C zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden die Säulen für die Zellseparation vorbereitet. Dazu wurden LS-Säulen in die magnetische Haltevorrichtung geklemmt, und 3mal mit 2ml PBS/BSA gespült. Nach der Zentrifugation der Zellen wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 2 ml PBS/BSA

aufgenommen und über die vorbereitete Säule gegeben und 5mal mit 2ml PBS/BSA nachgespült. Dabei wurde die Negativfraktion (also die für den entsprechenden Oberflächenmarker negativen Zellen) aufgefangen. Im darauffolgenden Schritt wurde die Säule aus der magnetischen Halterung entnommen und die Positivfraktion mit 5ml PBS/BSA oder direkt mit Medium eluiert.

3.3.4 Zellzählung mit der Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl einer Zellsuspension wurde eine Probe der Suspension entnommen und mit Trypananblau-Lösung verdünnt. Trypananblau färbt tote Zellen, lebende Zellen hingegen bleiben ungefärbt. Die verdünnte Zellsuspension wurde dann in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und mit Hilfe eines Lichtmikroskops die Anzahl an Lebendzellen pro Kästchen der Zählkammer bestimmt. Lebende Zellen stellen sich als homogene, helle Kugeln dar, während tote Zellen blau angefärbt sind und sich Zellschrott als unregelmäßige, kantige Strukturen darstellt. Die vier Quadranten a 16 Kästchen der Zählkammer wurden ausgezählt, der Wert gemittelt und die Zellzahl mit folgender Formel errechnet:

$$(Zellen \text{ in } 16 \text{ Kästchen}) * (\text{Verdünnungsfaktor}) * 10^4 = \text{Zellzahl/ml Zellsuspension}$$

Das Ergebnis entspricht der Lebendzellzahl pro ml in der Zellsuspension.

3.3.5 Fixieren von Zellen

Für die intrazelluläre Färbung von Zytokinen mit Durchflusszytometrie müssen die Zellen fixiert werden. Dazu wurden die Zellproben (bis zu $5 \cdot 10^6$ Zellen in 1ml) in Eppendorfgefäßen (fassen bis zu 1,5ml) zentrifugiert (380g, 10min, 4C°), der Überstand verworfen und das Zellpellet in 400µl 2%Paraformaldehyd für 20min bei RT inkubiert. Nach Ablauf der 20min wurden die Proben 2mal mit 1000µl PBS/BSA/Azid aufgefüllt, zentrifugiert (380g, 10min, 4C°) und der Überstand verworfen. Nach diesen zwei Waschschrritten wurden die Zellen in 1000µl PBS/BSA/Azid aufgenommen. Die fixierten Zellen wurden im Kühlschrank gelagert und innerhalb von 7 Tagen analysiert.

3.4 Methoden zur Analyse der Zellen und Zellfunktion

3.4.1 Kurzkultivierung von Zellen zur Induktion der Autoantikörperproduktion

3.4.1.1 Prinzip

T-Helferzellen können die Produktion von Autoantikörpern induzieren, sie sind dafür, zumindest für den Klassenwechsel von IgM zu IgG, sogar unabdingbar. Für diesen Prozess sind nötig: Erstens autoreaktive B-Zellen, zweitens ein Antigen, welches von den B-Zellen aufgenommen

und auf MHCII-Komplexen präsentiert wird und drittens T-Zellen, die das präsentierte Antigen erkennen und infolgedessen die B-Zellen zur Autoantikörperproduktion und zum Klassenwechsel zu IgG anregen. Dieser Vorgang ist auch *in vitro* möglich: B- und T-Zellen werden zum einen mit und zum anderen ohne Antigen kokultiviert. Nach 5d Kokultur kann die Anzahl an autoantikörperproduzierenden B-Zellen/Plasmazellen (dsDNA-ELISPOT) und die Konzentration von Autoantikörpern im Kulturüberstand bestimmt werden (dsDNA- und SmD1₍₈₃₋₁₁₉₎-ELISA). Auf diese Weise ist es möglich zu testen, ob auf ein bestimmtes Antigen reaktive Zellen vorhanden sind und ob dieses Antigen in der Lage ist, die Produktion von bestimmten Antikörpern zu induzieren. Um auszuschließen, dass das Antigen die B-Zellen direkt zur Antikörperproduktion anregt, also ohne dass eine Interaktion mit T-Zellen nötig wäre, werden jeweils auch B-Zellen alleine mit und ohne Antigen kultiviert.

3.4.1.2 Kultivierung der Zellen

Es wurden jeweils $2 \cdot 10^6$ aufgereinigte T-Zellen (weniger sind auch möglich) und $2 \cdot 10^5$ B-Zellen kokultiviert, bzw. B-Zellen alleine kultiviert (als Kontrolle). Als Kulturmedium wurde RPMI verwendet (mit 10%FCS, P/S und ME wie im Materialteil beschrieben) mit 20%Volumenprozent ConASup als Zusatz, Antigen wurde in entsprechender Konzentration zugesetzt. Als Antigen wurde das SmD1₍₈₃₋₁₁₉₎ Peptid und als Kontrollantigen randomisiertes SmD1₍₈₃₋₁₁₉₎ Peptid verwendet. Die Zellen wurden in 48er oder 12er Wells für 5d im Brutschrank kultiviert. Nach Ablauf der 5d wurden die Kulturen mikroskopisch beurteilt, die Zellen für den dsDNA-ELISPOT-Essay entnommen und Kulturüberstand zur späteren ELISA-Analyse entnommen und eingefroren (bei -30C°).

3.4.2 Anti-dsDNA-AntikörperELISPOT

3.4.2.1 Prinzip des Nachweissessays

Ziel des Essays ist, die Anzahl an Anti-dsDNA-Antikörper-produzierenden Plasmazellen zu bestimmen. Nach der Kokultur der T- und B-Zellen mit oder ohne Antigen werden die Zellen auf mit ds-DNA beschichtete Wells transferiert und für 8-14h im Brutschrank inkubiert. Überall dort, wo eine B- bzw. Plasmazelle zu liegen kommt, die Antikörper gegen dsDNA sezerniert, binden diese Antikörper an die DNA am Boden des Wells. Nach 8-14h Inkubationszeit werden alle Zellen und ungebundene Antikörper aus den Wells gewaschen, nur die gebundenen Antikörper bleiben an der dsDNA-Beschichtung haften. Ein mit dem Enzym Alkalischer Phosphatase (AP) gekoppelter Antikörper gegen murines IgG (oder gegen andere Isotypen) dient als Nachweisantikörper: Er haftet an die an der DNA gebundenen IgG-Antikörper, ungebundener Nachweisantikörper wird aus den Wells gewaschen. Im letzten Schritt wird das Substrat der Alkalischen Phosphatase in einer warmen Agarose-Lösung in die Wells gegeben. Überall dort, wo Nachweisantikörper mit AP an das DNA-Coating gebundene Antikörper gebunden haben,

setzt das Enzym AP sein Substrat um, wodurch blauer Farbstoff entsteht. Die schnell abkühlende Agarose wird fest und verhindert so, dass sich der gebildete Farbstoff in der Lösung verteilt, stattdessen bleibt der Farbstoff an seinem Bildungsort lokalisiert. Überall dort, wo eine Anti-dsDNA-IgG produzierende B-Zelle lag wird ein blauer Punkt (Spot) sichtbar. Die blauen Punkte werden gezählt, und somit die Anzahl der entsprechenden B-Zellen bestimmt.

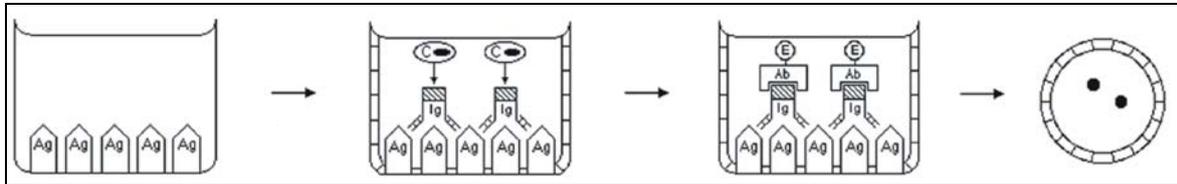


Abbildung 6: Prinzip des ELISPOTS zum Nachweis von Anti-dsDNA-produzierenden Zellen: Ein Well wird mit Antigen (dsDNA) beschichtet und blockiert. Dann werden Ak-produzierende Zellen in das Well gebracht, Antikörper gegen das Antigen bleiben an diesem haften. Die am Antigen haftenden Ak's werden mit Enzym (E) markierten Antikörpern nachgewiesen; überall dort wo eine entsprechende Zelle zu liegen kam, entsteht ein Spot.

3.4.2.2 Durchführung

- Co-Kultivierung der Zellen für 5d (wie oben beschrieben).
- Beschichtung (Coating) der Platten: 96-Well-Platte, high binding, wurde mit jeweils 100µl/well mit 1mg/ml methyliertem-BSA in PBS beschichtet und 2h bei RT und 24h im Kühlschrank inkubiert. Diese Beschichtung der Platten mit methyliertem BSA ermöglicht die Bindung von DNA am Boden der Platten. Nach der Inkubation wurden die Platten 3mal mit jeweils 100µl PBS/well gewaschen. Dann wurde die dsDNA Lösung, 1mg/ml in PBS, jeweils 100µl/Well auf die Platte aufgebracht und für 2h bei RT und 24h im Kühlschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Platte erneut 3mal mit PBS (100µl/Well) gewaschen. Die Platte kann frisch verwendet oder eingefroren und bei -30°C gelagert werden.
- Vor dem Transferieren der Zellen wurden die dsDNA-Platten 1mal mit RPMI gewaschen und anschließend zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen mit Medium 100µl/well für 1-2h bei RT inkubiert (Blockierung). Unmittelbar vor Transfer der Zellen wurde das Medium aus den Wells gekippt und die Platte auf einem Zellstofftuch ausgeschlagen. Dieser gesamte Arbeitsschritt wurde an der Cleanbench unter sterilen Bedingungen vollzogen. Die Platte wurden zwar unter unsterilen Bedingungen gecoatet, durch das Spülen und Blockieren mit sterilen Lösungen und unter sterilen Bedingungen sollte der Keimdruck reduziert werden.
- Nach 5d wurden die Cokulturen mikroskopisch begutachtet und abgebrochen. Unter der Cleanbench wurden die Zellen vorsichtig mit einer 1000µl Pipette resuspendiert und in sterile 1,5ml Eppendorfgefäße übertragen. In diesen Eppendorfgefäßen wurden die Zellen zentrifugiert (380g, 10min). Der Überstand wurde entnommen und zur späteren ELISA-Analyse eingefroren (bei -30°C). Die Zellen wurden in frischem Medium ohne ConASub-

Zusatz resuspendiert und Antigen entsprechend den vorherigen Kulturbedingungen hinzugegeben. Dann wurden die Zellen in jeweils 3 Wells (Triplets) der vorbereiteten dsDNA-Platte gegeben. Das Auftragen in je 3 Wells dient als Dreifachbestimmung, um die statistische Signifikanz zu erhöhen. Hierbei wurden entweder alle Zellen einer Kultur auf 3 Wells aufgetragen, oder die Zellsuspension verdünnt und die Zellen in verschiedenen Zelldichten in die je 3 Wells gegeben (Verdünnungsreihe). Als Negativkontrollen wurde in ein Triplett nur Medium gegeben und in ein Triplett B-Zellen die keine T-Zellhilfe erhalten haben. Als Positivkontrolle wurde in 3 Wells entweder aufgereinigte murine Anti-dsDNA-Antikörper 1:100 in Medium oder Serum von alten BWF1-Mäusen (enthält Anti-DNA-Antikörper) verdünnt mit Medium gegeben. Anschließend wurden die dsDNA-Platten mit den Zellsuspensionen für 8-14h im Brutschrank inkubiert. Es wurde darauf geachtet, dass die Platten während der Inkubationszeit nicht mehr bewegt wurden (ansonsten besteht die Gefahr, dass die Antikörper-produzierenden-Zellen wandern und mehr als einen oder undeutliche Spots hinterlassen).

- Nach 8-14h wurden die Zellen von der Platte gewaschen. Die Platten wurden zuerst ausgeschlagen und dann 5mal gründlich mit 150µl PBS/3%BSA/Tween gewaschen. Die Lösung wurde mit einer Multikanalpipette in die Wells gegeben und dann ca.20mal wieder aufgezogen und wieder zurück in die Wells gegeben, um auch haftende Zellen zu resuspendieren und zu entfernen. Nach jedem Waschschrift wurde die Platte ausgeschlagen. Anschließend wurde mikroskopisch kontrolliert, ob auch alle Zellen aus den Wells gewaschen worden waren.
- Nach dem Waschen wurde der Nachweisantikörper auf die Platte gegeben. Der AP-gekoppelte Nachweisantikörper (Anti-Maus-IgG, Anti-Maus-IgA/M/G oder Anti-Maus-IgG2a) wurde 1:500 verdünnt in PBS/3%BSA/Tween. Es wurden jeweils 100µl/Well gegeben und 1h bei RT oder über Nacht im Kühlschrank inkubiert.
- Vorbereitung des Development-Puffers: 80%Volumenprozent besteht aus AMP-Puffer mit 0,1%Gewichtsprozent BCIP (8 mg BCIP werden in 8ml AMP-Puffer gelöst). 20%Volumenprozent des Development-Puffers besteht aus 3% Agarose-Lösung. Die Agarose wurde eingewogen, das entsprechende Volumen an H₂O hinzugegeben, und zusätzlich eine Pasteurpipette als Siedepunkt in das Röhrchen gegeben. Dann wurde die Agarose-Lösung vorsichtig in der Mikrowelle so lange bis zum Aufkochen erwärmt, bis keine Schlieren mehr in der Agaroselösung sichtbar und die Lösung vollkommen klar war. Sowohl die BCIP- als auch die Agaroselösung wurden separat in ein auf 65°C vorgeheiztes Wasserbad gestellt. Nach 10min (in denen sich die Temperatur beider Lösungen auf 65°C angleicht) wurden die beiden Lösungen gepoolt, und weitere 10 min im Wasserbad belassen.
- Kurz vor Zugabe des Development-Puffers wurde die Nachweisantikörperlösung aus den Platten abgekippt und ausgeschlagen, dann wurden die Wells zum Entfernen

überschüssigen Nachweisantikörpers 3mal mit jeweils 100 μ l/well Tris/Tween-Puffer oder PBS/3%BSA/Tween gespült.

- Der Development-Puffer wurde aus dem Wasserbad entnommen und zügig je 100 μ l in jedes Well gegeben. Luftblasen in der Lösung wurden mit einer Nadel angestoßen und entfernt. Dann wurden die Platten zum schnellen Abkühlen für 10min in den Kühlschrank gestellt. Danach wurden die Platten zuerst 10min bei RT und dann 2h im Brutschrank inkubiert.
- Die Spots wurden an einem Lichtmikroskop ausgezählt. Die Anzahl an Spots in den 3 Wells eines Triplets wurde gemittelt und die Standardabweichung berechnet.

3.4.3 Autoantikörper-ELISA

3.4.3.1 Prinzip

Ziel ist die Bestimmung der Konzentration eines Autoantikörpers in einer Lösung. Dazu wird eine 96-Well-Platte mit dem entsprechenden Antigen beschichtet, und anschließend werden unspezifische Bindungen blockiert. Dann inkubiert man die Platte mit Proben der zu bestimmenden Lösungen. Parallel werden zur Erzeugung einer Standardkurve Lösungen mit bekannter Konzentration des Autoantikörpers aufgetragen. Nach der Inkubation wird ungebundener Antikörper von der Platte gewaschen, die an das Antigen gebundenen Antikörper bleiben in den Wells haften. Als Nachweisantikörper gibt man mit einem Enzym gekoppelte, gegen murines IgG gerichtete Antikörper in die Wells. Diese binden die in den Wells haftenden Autoantikörper, überschüssiger Nachweisantikörper wird im folgenden Waschschritt entfernt. Im letzten Schritt gibt man das chromogene Substrat in die Wells, dass an den Nachweisantikörper gekoppelte Enzym setzt das Substrat in ein farbiges Produkt um (Farbreaktion). Nach kurzer Inkubationszeit wird die Umsetzung von Substrat durch die Zugabe von Säure gestoppt (pH-Abhängigkeit der Enzymreaktion). Die bis dahin umgesetzte Menge Substrat zu Farbstoff ist proportional zu der Menge des am Antigen gebundenen Autoantikörpers. Photometrisch wird die Farbintensität der einzelnen Proben bestimmt; anhand der Proben mit bekannter Autoantikörperkonzentration wird eine Standardkurve erstellt. Anhand dieser Standardkurve wird die Konzentration des Antikörpers in den einzelnen Proben ermittelt.

3.4.3.2 Anti-dsDNA-ELISA

- Beschichtung von hochbindenden 96-Well Polystyren-ELISA-Platten mit dsDNA wie beim dsDNA-ELISPOT beschrieben.
- Platte wurde 3mal mit PBS gewaschen (100 μ l/Well), anschließend mit PBS/5% FCS (100 μ l/Well) 30 min bei RT blockiert.

- Die Blockierungsfüssigkeit wurde abgekippt und die Proben aufgetragen. Kulturüberstände wurden 1:2 oder 1:4 in PBS/5%FCS/0,1%Tween verdünnt. 50 µl jeder Probe wurde in jeweils 2 Wells gegeben (Doppelbestimmung). Als Standardkurve wurde murines Anti-dsDNA-IgG in 8 Wells gegeben, als Verdünnungsreihe jeweils 1:2 verdünnt (also die erste Probe unverdünnt, die achte Probe 1:128 verdünnt). Als Leerwert wurde in 2 Wells nur PBS/5%FCS/0,1%Tween gegeben. Die Proben wurden 2h bei RT (oder über Nacht im Kühlschrank) inkubiert.
- Die Platten wurden mit PBS/0,1%Tween gewaschen und ausgeschlagen. Anschließend wurde Peroxidase (POD) gekoppelter anti-murines-IgG Nachweisantikörper (1:1000 verdünnt in PBS/0,1%Tween mit 5%Gelafusal und 2%Polyethylenglycol) in die Wells gegeben und 2h bei RT (oder über Nacht im Kühlschrank) inkubiert.
- Die Platten wurden 3mal mit PBS/0,1%Tween gewaschen und ausgeschlagen. Dann wurde je 50µl Substratlösung in die Wells gegeben. Nach ca. 5min, wenn die Farbe der Lösungen sichtbar umschlägt, wurde 150µl Stopplösung in jedes Well gegeben, um die Farbreaktion zu beenden.
- Die Farbstoffkonzentration der einzelnen Lösungen wurde am Photometer bestimmt, und die Konzentration der einzelnen Proben über die Standardkurve bestimmt.

3.4.3.3 *Anti-SmD1-ELISA*

- Beschichtung von hochbindenden 96-Well Polystyren-ELISA-Platten mit SmD1₍₈₃₋₁₁₉₎. Dazu wurde eine 0,5% Lösung von SmD1₍₈₃₋₁₁₉₎ in Carbonatpuffer zubereitet und jeweils 50µl dieser Lösung in jedes Well gegeben. Die Platten wurden 8h bei RT oder 12h im Kühlschrank inkubiert, dann abgekippt und eingefroren.
- Kurz vor der Weiterverwendung wurden die Platten aufgetaut und 3mal mit PBS/Tween gewaschen und mit PBS/Tween mit 1% Trockenmilch 100µl/Well für 1h bei RT blockiert.
- Die Platten wurden abgekippt und die Proben aufgetragen. Kulturüberstände wurden 1:2 oder 1:4 in PBS/Tween mit 1% Trockenmilch verdünnt. 50 µl jeder Probe wurde in jeweils 2 Wells gegeben (Doppelbestimmung). Als Standardkurve wurde murines anti-SmD1 -IgG in 8 Wells gegeben, als Verdünnungsreihe jeweils 1:2 verdünnt. Als Leerwert wurde in 2 Wells nur PBS/Tween mit 1% Trockenmilch gegeben. Die Proben wurden 2h bei RT (oder über Nacht im Kühlschrank) inkubiert.
- Das weitere Vorgehen entspricht dem Anti-dsDNA-Antikörper-ELISA.

3.4.4 IFN γ Zytokin-ELISPOT

3.4.4.1 Prinzip

Ziel des Essays ist der Nachweis einzelner IFN γ sezernierender Zellen. Dazu wird zuerst eine 96-Well Platte mit monoklonalem anti-IFN γ -Antikörper beschichtet. Der Antikörper bindet mit seinem Fc-Teil an den Boden der Wells, die Antigenbindungsstellen bleiben frei. Zellen werden in den Wells inkubiert und überall dort, wo eine Zelle IFN γ sezerniert, bindet das Zytokin an die Anti-IFN γ -Antikörper-Beschichtung. Nach der Inkubation werden die Zellen aus den Wells gewaschen und biotinierter Anti-IFN γ -Antikörper (Nachweisantikörper) hinzugegeben. Dieser Antikörper muss auf den ersten, „Coating“-Antikörper abgestimmt sein, in dem Sinne, dass beide unterschiedliche Epitope des IFN γ binden, also beide Antikörper an ein und dasselbe IFN γ -Molekül gleichzeitig binden können. Der Nachweisantikörper bindet also das an dem „Coating“-Antikörper fixierte IFN γ . Nach dem Waschen der Platten gibt man ein Streptavidin-Alkalische Phosphatase (AP) Konjugat dazu. Dieses bindet an das Biotin des Nachweisantikörpers. Ähnlich wie beim Anti-dsDNA-ELISPOT ist nur dort das Enzym AP, wo Zellen etwas bestimmtes produziert haben, in diesem Fall IFN γ . Gibt man nun Development-Puffer in die Wells (Substrat in warmer Agaroselösung), so werden dort blaue Spots sichtbar, wo IFN γ produzierende Zellen lagen.

Dieser Essay wurde zum Nachweis spezifischer T-Zellen eingesetzt. Th1-T-Zellen und CD8 T-Zellen sezernieren IFN γ , wenn ihnen ein passendes Antigen präsentiert wird. In den vorliegenden Experimenten wurden T-Zellen mit APC's und mit oder ohne Antigenzugabe kokultiviert. Die APC's nehmen das Antigen auf und präsentieren es den T-Zellen. Nimmt durch Antigenzugabe die Anzahl an Spots zu, so lässt sich schlussfolgern, dass für das Antigen spezifische Zellen vorhanden sind, die mit IFN γ -Produktion auf „ihr“ Antigen reagieren.

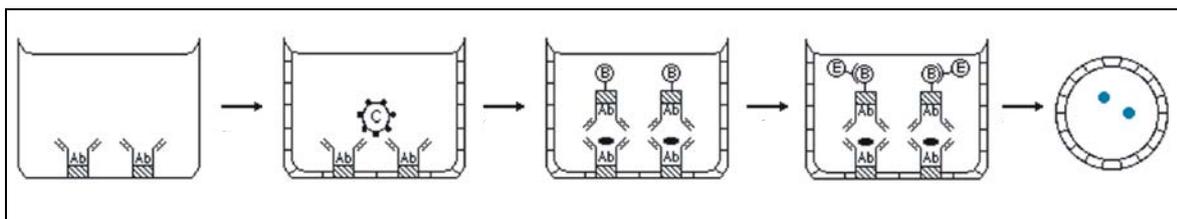


Abbildung 7: Prinzip des ZytokinELISPOTS. Wells werden mit Anti-Zytokin-Antikörpern (Coating) beschichtet, dann werden Zellen in den Wells inkubiert. Dort, wo eine Zelle das entsprechende Zytokin sezerniert, bindet dieses an die Antikörper. Nach Entfernen der Zellen wird ein biotinierter (B) Nachweisantikörper hinzugegeben, der an den Coating-Antikörpern haftendes Zytokin bindet. Ein Streptavidin-Enzym (E) Konjugat bindet die biotinierten Nachweisantikörper; überall dort, wo das jeweilige Zytokin produziert wurde, entsteht ein Spot.

3.4.4.2 Durchführung

- Beschichten einer sterilen, hochbindenden 96-Well Platte mit flachem Wellboden. Jeweils 50µl einer 5µg/ml Anti-IFN γ -Antikörperlösung in PBS wurde in jedes Well gegeben. Die Platte wurde ÜN im Kühlschrank oder 1h im Brutschrank inkubiert.
- Die Antikörperlösung wurde ausgeschlagen und die Platte 1mal mit PBS/3%BSA (100µl/Well) gewaschen. Dann wurde die Platte zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen 1h mit PBS/3%BSA 100µl/Well bei RT inkubiert.
- Die Blockierungslösung wurde ausgeschlagen und die Platte 1mal mit PBS (100µl/Well) gewaschen.
- Die Zellen wurden in AIM-V Kulturmedium mit und ohne Antigenzugabe in je 3 Wells (Triplett) gegeben. Als Antigen wurde das Smd1₍₈₃₋₁₁₉₎ Peptid und als Kontrollantigen randomisiertes Smd1₍₈₃₋₁₁₉₎ Peptid verwendet. Es wurden jeweils $2 \cdot 10^5$ - $1 \cdot 10^6$ Zellen/Well in 100µl Medium aufgetragen, aufgereinigte T- und B-Zellen im Verhältnis von 10:1 oder unsortierte Leukozyten. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit PMA/Ionomycin stimuliert und in 3 Wells gegeben, als Negativkontrolle wurde nur Medium in 3 Wells gefüllt. Die Zellen wurden 3d im Brutschrank kultiviert.
- Nach den 3d wurden die Zellen von der Platte gewaschen. Dazu wurden die Platten 5mal mit 150µl/Well PBS/3%BSA/Tween gewaschen. Die Waschlösung wurde jeweils 20mal wiederaufgezogen und zurück in die Wells gegeben und dann ausgeschlagen, um auch adhaerente Zellen zu lösen.
- Der Nachweisantikörper wurde 4-5µg/ml in PBS/3%BSA/Tween in die Wells gegeben und 1h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Nachweisantikörperlösung ausgeschlagen und die Platte 3mal mit PBS/3%BSA/Tween gespült.
- Streptavidin-AP wurde 1:500 verdünnt in PBS/3%BSA/Tween in die Wells gegeben und 1h bei RT inkubiert.
- Der Development-Puffer wurde wie beim Anti-dsDNA-ELISPOT beschrieben vorbereitet.
- Die Streptavidin-AP Lösung wurde ausgeschlagen und die Platte 3mal mit PBS/3%BSA/Tween gespült. Anschließend wurden zügig 100µl/Well Development Puffer auf die Platte gegeben. Luftblasen wurden mit einer Nadel zerstochen, dann wurde die Platte aufeinanderfolgend 10min im Kühlschrank, 10min bei RT und 2h im Brutschrank inkubiert.
- Die Spots wurden am Lichtmikroskop ausgezählt. Die Spotzahlen eines Triplett wurden gemittelt und die Standardabweichung errechnet.

3.4.5 Durchflusszytometrie

3.4.5.1 Prinzip des Durchflusszytometers

Mit dem Durchflusszytometer können die relative Zellgröße, die relative Granularität oder Komplexität von Zellen und die relative Intensität von verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen in/an Zellen gemessen werden. Mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern ist es so möglich, bestimmte Oberflächenmoleküle oder intrazelluläre Zellprodukte nachzuweisen.

Das Durchflusszytometer saugt die Zellen in einer Zellsuspension an und injiziert die Zellsuspension in einen parallelen Strom von Trägerflüssigkeit (hydrodynamische Fokussierung). Auf diese Weise passieren die Zellen vereinzelt und genau in der Mitte des Flüssigkeitsstrahls eine Messkammer, wo sie von einem fokussierten Laserstrahl getroffen werden. Der Laserstrahl wird beim Auftreffen auf die Zellen gestreut und regt Fluorochrome an. Lichtdetektoren registrieren die Lichtstreuung und die Fluoreszenz der Farbstoffe. Das Seitwärtsstreulicht des Lasers (Side Scatter, SSC) entspricht der Granularität und Komplexität der Zellen, das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) ist proportional zur Zellgröße. Anhand des SSC und FSC können Lymphozyten von anderen Zellen und Zellschrott unterschieden werden.

Die vom Laser angeregten Fluorochrome emittieren Licht einer bestimmten Wellenlänge. Wenn sich die Wellenlängen des emittierten Lichtes der Fluorochrome ausreichend unterscheiden, kann die Intensität verschiedener Fluorochrome gleichzeitig gemessen werden.

Die Lichtdetektoren wandeln Lichtimpulse in elektronische Signale um, die erhobenen Daten werden an einen Rechner übermittelt, der die Messwerte jeder Zelle darstellt und speichert. Zur Auswertung der Daten wird die Intensität der verschiedenen Lichtsignale angezeigt. Anhand dessen ist es möglich, gezielt Zellpopulationen zu identifizieren und diese mit sogenannten Gates separat zu analysieren.

3.4.5.2 Färben von Oberflächenmolekülen (CD's)

Mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern (i.d.R. monoklonale Antikörper) werden spezifisch bestimmte Oberflächenmoleküle (CD: cluster of differentiation) angefärbt.

- Eine Lösung mit den Antikörper-Fluorochrom-Konjugaten wurde vorbereitet. Die Antikörper wurden in den entsprechenden Titern in PBS/BSA verdünnt. Zusätzlich wurde der Lösung zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen Ratten-IgG (die Mehrzahl der Antikörperklone gegen murine Antigene stammen aus Ratten) und Fc-Rezeptor-Block zugesetzt.

- Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (380g, 10min bei 4°) und der Überstand abgesaugt und verworfen. Das Zellpellet wurde in jeweils 100µl Antikörperlösung resuspendiert und 10min bei RT im Dunkeln inkubiert.
- Nach den 10min wurden die Proben mit 1000µl PBS/BSA aufgefüllt, zentrifugiert (380g, 10min bei 4°) und der Überstand verworfen.
- Wenn bei einer Antikörperkombination ein zweiter Färbeschritt notwendig war (z.B. bei biotiniertem Primäantikörper zweiter Färbeschritt mit Fluorochrom konjugiertem Streptavidin), wurden die Zellen in der zweiten Färbelösung resuspendiert und verfahren wie bei der ersten Färbung.

Bei Abschluss der Färbung wurden die Zellen in 500µl PBS/BSA resuspendiert und bis zur Analyse kühl und lichtgeschützt aufbewahrt.

3.4.5.3 Färben von toten Zellen mit Propidium Jodid

Propidium Jodid (PJ) ist ein Farbstoff, der tote und nicht mehr intakte Zellen anfärbt, nicht jedoch lebende Zellen. Eine 0,1mg/ml PJ Lösung wurde kurz vor der Analyse der Zellen 1:500 mit der Zellsuspension vermischt und die Suspension gut durchmischt. Tote/nicht mehr intakte Zellen erscheinen daraufhin im FL3 Fluoreszenzkanal des Durchflusszytometers als positiv.

3.4.5.4 Färbung von intrazellulären Molekülen (Zytokinen)

Die Färbung von intrazellulären Molekülen funktioniert nach demselben Prinzip wie die Färbung von Oberflächenmolekülen, mit zwei wesentlichen Unterschieden:

- Die Antikörperlösung wurde in PBS/BSA/Azid mit 0,5% Saponin angesetzt. Das Saponin bewirkt eine Perforation der Zellen, wodurch die Antikörperlösung auch in das Zellinnere gelangen kann. Auf diese Weise können intrazelluläre Moleküle angefärbt werden; das gleichzeitige Anfärben von Oberflächenmarkern ist möglich. Nach dem Färbeschritt und Waschschritt mit saponinhaltiger Lösung wurden die Zellen in PBS/BSA/Azid ohne Saponin aufgenommen, wodurch sich die Poren in den Zellmembranen wieder verschließen.
- Die Zellen müssen zum Anfärben intrazellulärer Moleküle fixiert sein.

3.4.6 Stimulation von Zellen zur Zytokinproduktion für die FACS-Analyse

Die T-Zellen wurden in RPMI-Medium zuerst mit PMA/Ionomycin (PMA 10ng/ml, Ionomycin 1µg/ml Endkonzentration) stimuliert. Diese beiden Chemikalien simulieren Stimulation des T-Zell-Rezeptors und Costimulation, wodurch alle T-Zellen unabhängig von ihrer Rezeptorspezifität angeregt werden. Nach 2h Inkubation im Brutschrank wurde der Zellsuspension Brefeldin A zugesetzt (10µg/ml Endkonzentration). Diese aus Pilzen stammende Substanz stört die Funktion des endoplasmatischen Retikulums und des Golgi Apparates.

Dadurch werden die produzierten Zytokine nicht aus den Zellen sezerniert, sondern sammeln sich in den Zellen an, wo sie dann durchflusszytometrisch nachgewiesen werden können. Nach weiteren 2h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen fixiert.

3.5 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des Student'schen t-Test und Microsoft Excel statistisch ausgewertet.