

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Ausgießstation	Tissue-Tek [®] Dispensing Console, Sakura, Niederlande
Cell Harvester	LKB Wallace, Finnland
Controller	LKB GP-10, Pharmacia, Schweden
Coulter Counter	Coulter Ac.T diff, Beckmann Coulter, Krefeld
Durchflusszytometer	FACSCalibur, Beckton Dickinson, U.S.A.
Einbettstation	Hypercenter XP, Thermo Electron, Shandon, Karlsruhe
Eindeckstation	Tissue-Tek [®] SCA, Sakura, Niederlande
Einstabmesskette	pH/Pt 1000 Elektrode SE 100, Knick, Berlin
ELISA-Reader	TECAN Spectra Mini AP, Crailsheim
Färbestation	Varistain 24-4, Shandon, Karlsruhe
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Fraktionssammler	UNO II, Whatmann Biometra, Göttingen
Inkubator	US Autoflow, NUAIRE [™] , U.S.A.
Mikrotom	HM 330, Microm, Walldorf
Peristaltische Pumpe	Peristaltic Pump P-1, Pharmacia, Schweden
pH-Meter	PH-Meter 766 Calimatic, Knick, Berlin
Photometer	Ultrospec 1100 pro, Amersham Pharmacia, Freiburg
Schreiber	BIOSTATOR [®] Recorder-A, Miles, Frankfurt am Main
Sterile Werkbank	NU-440-600 E; NUAIRE [™] , U.S.A.
Szintillations-Zähler	LKB Wallace, Finnland
UV-Photometer	2238 UVICORD SII, LKB Bromma, Pharmacia, Schweden
Waage	BP 1200, Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Köttermann, Uetze/Hänigsen
Zentrifuge	Megafuge 1.0 R, Heraeus, Hanau
Zählkammer (Neubauer)	0,0025 mm ² , la fontaine, Forst

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Amersham Biosciences (Freiburg)	Sephadex G-25-Säule
BD Biosciences (Heidelberg)	Zellsieb (70 µm)
Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)	Separationssäulen
NUNC (Wiesbaden)	Einwegmaterial

3.1.3 Antikörper und Primer

Acris Antibodies GmbH (Hiddenhausen)	monoklonales anti-Human IL-4; polyklonales anti-Human IL-12
BD Biosciences (Heidelberg)	2.4G2 (anti-Maus CD16/CD32); 53-6.7-Biotin (anti-Maus CD8a); B1-PE (anti-Human $\gamma\delta$ TCR); B27-APC (anti-Human IFN- γ); BN13-APC (anti-Human CD152); FN50-FITC (anti-Human CD69); GL3-Biotin (anti-Maus $\gamma\delta$ TCR); GL3-FITC (anti-Maus $\gamma\delta$ TCR); GL3-PE (anti-Maus $\gamma\delta$ TCR); GK1.5-FITC (anti-Maus CD4); GK1.5-PE (anti-Maus CD4); H1.2F3-PE (anti-Maus CD69); H57-597-Biotin (anti-Maus β TCR); JES3-19F1-APC (anti-Human IL-10); MP4-25D2-APC (anti-Human IL-4); MQ1-17H12-APC (anti-Human IL-2); RPA-T4-FITC (anti-Human CD4); Streptavidin-FITC; Streptavidin-Horseradish Peroxidase; Streptavidin-PE; T10B9.1A-31-PE (anti-Human $\alpha\beta$ TCR)

Dianova (Hamburg)	ChromPure Syrian Hamster IgG
Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)	Anti-Biotin MicroBeads; Anti-PE MicroBeads; CD4CD25 ⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit (human); TCR $\gamma\delta$ MicroBead Kit (human)
TIB Molbiol (Berlin)	Primer TNF ^{ΔARE} antisense: 5'-CCT TCC TCA CAG AGC CAG CCC CCT C-3' Primer TNF ^{ΔARE} sense: 5'-AAT TAC GGT TAG GCT CCT GTT TCC-3'; Primer IL-2 antisense: 5'-TC GAA TTC GCC AAT GAC AAG ACG CT-3'; Primer IL-2 sense: 5'-CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT-3'; Primer 003 IL-2: 5'-GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C-3'; Primer IL-10 antisense: 5'-AGG GTA ATA GGT GCT GGA AAT AGG-3'; Primer pIL-2 sense: 5'-CCC TAT CAC TCT TTA ATC ACT ACT CA-3'

3.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Amersham Biosciences (Freiburg)	[6- ³ H]-Thymidin; Percoll; Protein A Sepharose CL-4B; Protein G HiTrap
Beckmann Coulter GmbH (Krefeld)	AcT Pak; AcT Rinse; AcT 4C ES Kontrolle
Biochrom KG (Berlin)	Biocoll Separation Solution (Ficoll)

BD Biosciences (Heidelberg)	FACS-Flow
Calbiochem (Schwalbach)	Biotinamidocaproate-N-Hydroxysuccinimidester (Biotin-X-NHS); Collagenase Typ II (4000 U/L); DNAse (225.000.000 U); Ionomycin
Fluka (Seelze)	Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester (CFSE); Dinatriumhydrogenphosphat; Natriumhydrogencarbonat; Natriumhydrogenphosphat; Trypanblau; Wasserstoffperoxid (35%)
Invitrogen (Karlsruhe)	DNA-Leiter (50 bp, 100 bp); HBSS; HEPES; Magnesiumchlorid (50 mM); PCR-Puffer (10x, ohne Mg); TBE-Puffer (10x)
ICN Biomedicals (Ohio, U.S.A.)	Dextransulfat (MG 36.000-50.000)
Merck (Darmstadt)	Agarose; Ammoniumchlorid; Borsäure; Giemsa; May-Grünwald; Natriumcarbonat; Natriumchlorid; Natriumhydrogensulfat; Natriumhydroxid; Salzsäure (36%)

PAA (Cölbe)	PBS-Dulbecco (10x) w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺ ; RPMI 1640 mit Glutamin; Penicillin; Streptomycin
Promega (Mannheim)	DNA Purification Kit
Roth (Karlsruhe)	dNTP's (10 mM); Formalin 37%; Natriumhypochlorid (12%); Trisma Ultra
SIGMA (Deisenhofen)	Brefeldin A; β-Mercaptoethanol; Concalavin A; Dithiothreitol (DTT); Di-Kaliumhydrogenphosphat; DMSO (99%); Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA); Ethidiumbromid; Fluorescein-Isothiocyanat (FITC); Kaliumdihydrogenphosphat; Kaliumhydrogencarbonat; Natriumcitrat; ortho-Phenyldiamin (OPD); Propidiumiodid (PI); Rinderserumalbumin (BSA); Saccharose; Saponin; Sephadex G-50; taq-Polymerase; Tween 20; Zitronensäure

3.1.5 Zytokine und Stimulanzen

BD Biosciences (Heidelberg)	Human IL-2 OptEIA Set; Human IL-10 OptEIA Set; Human IFN- γ OptEIA Set; Mouse IL-2 OptEIA Set; Mouse IL-6 OptEIA Set; Mouse IFN- γ OptEIA Set, Mouse TNF- α OptEIA Set
MSD (Haar)	Natriumalendronat (Fosamax [®])
PeproTech EC (London, UK)	rekombinantes humanes Interleukin-4 (rhu IL-4); rekombinantes humanes Interleukin-12 (rhu IL-12)
Promega (Mannheim)	TGF- β E _{max} [®] Immuno Assay System
R&D Systems (Wiesbaden)	anti-Maus IL-4; anti-Maus IL-4 biotinyliert; Maus IL-4 Protein; anti-Maus IL-10; anti-Maus IL-10 biotinyliert; Maus IL-10 Standard
SIGMA (Deisenhofen)	Isopentenylpyrophosphat (IPP); rekombinantes humanes Interleukin-2 (rhu IL-2)

3.1.6 Lösungen und Puffer

40% Percoll	40% Percoll-Stammlösung in PBS (1x)
44% Percoll	44% Percoll-Stammlösung in PBS (1x)
67,5% Percoll	67,5% Percoll-Stammlösung in PBS (1x)
Bindungspuffer (Protein A)	1,5 M NaCl, 0,75 M Glycin, 0,1% NaN ₃
Bindungspuffer (Protein G)	20 mM Kaliumphosphat, pH 7,0
Biotin-Farblösung	5 mg Biotin-X-NHS pro mL Dimethylformamid (DMF)
Blockpuffer (Proliferationstest)	0,1% BSA in PBS, sterilfiltriert (0,2 μ m)
Blockpuffer (ELISA)	5% FCS (hitzeinaktiviert) in PBS
Coating Buffer (ELISA, Proliferationstest)	0,05 M NaHCO ₃ und 0,05 M Na ₂ CO ₃ mischen bis pH 9,5; sterilfiltriert

Coating Buffer (TNF- α -ELISA)	0,1 M Natriumphosphat, pH 6,0
Dialysepuffer	0,1 M Tris-HCl, 0,2 M NaCl, 0,1 % NaN ₃ , pH 7,4
Elutionspuffer (Protein G)	0,1 M Glycin-HCl, pH 2,7
Elutionspuffer A (Protein A)	0,1 M Zitronensäure, pH 2,0
Elutionspuffer B (Protein A)	0,1 M Natriumcitrat, pH 8,9
FACS-Puffer	100 mL PBS (10x), 0,5% BSA, 0,1% NaN ₃ pro Liter aqua dest.
FITC-Farblösung	5 mg Fluorescein-Isothiocyanat pro mL DMSO
Giemsalösung	500 μ L Giemsa, 19,5 mL Phosphatpuffer
HEPES-Bicarbonatpuffer	21 g/L Natriumhydrogencarbonat, 100 mM HEPES, pH 7,2, sterilfiltriert
Kopplungspuffer (Biotinylierung)	0,1 M NaHCO ₃ , pH 7,7
Kopplungspuffer (FITC-Markierung)	0,1 M Na ₂ CO ₃ , 0,1 M NaHCO ₃ , 0,1 M NaCl, pH 9,2
Ladepuffer	0,01 g SDS, 2,5 mg Bromphenolblau, 0,3 mL Glycerin pro mL Aqua Spüllösung
Lysepuffer	8,9 g/L NH ₄ Cl, 1 g/L KHCO ₃ , 0,038 g/L EDTA, pH 7,3, sterilfiltriert
MACS-Labeling-Puffer	2mM EDTA in PBS (1x)
MACS-Separation-Puffer	0,5% BSA, 2mM EDTA in PBS (1x)
Markierungspuffer	0,05 M Borsäure, 0,2 M NaCl, pH 7,4
Percoll-Stammlösung	10% PBS (10x) in Percoll 100%
Spüllösung (Protein A)	PBS, 0,1% NaN ₃

3.1.7 Zellmedien

5% Waschmedium	Fetales Kälberserum 5% (30 min bei 56°C hitzeinaktiviert), 0,05 mM β -Mercaptoethanol in RPMI 1640 mit Glutamax
Collagenase-Medium	20 mL Komplettmedium, 1.792 U/mL Collagenase Typ II, 400 μ L DNase I (1 mg/mL)
Einfriermix	200 μ L DMSO, 600 μ L Fetales Kälberserum 5% (30 min bei 56°C hitzeinaktiviert), 200 μ L Komplettmedium
HBSS-CMF	5 mM EDTA; 0,02% DTT in HBSS (w/o Ca^{2+} , Mg^{2+})
Human- Komplettmedium	Humanserum 10% (30 min bei 56°C hitzeinaktiviert), Penicillin (10^5 U/L), Streptomycin (10^5 μ g/L), Glutamin (3 mM) in RPMI 1640 mit Glutamax
Maus- Komplettmedium	Fetales Kälberserum 10% (30 min bei 56°C hitzeinaktiviert), Penicillin (10^5 U/L), Streptomycin (10^5 μ g/L), Glutamin (4 mM) in RPMI 1640 + 50 μ M β -Mercaptoethanol
serumfreies Medium	RPMI 1640 + Penicillin (10^5 U/L), Streptomycin (10^5 μ g/L), Glutamin (4 mM)

3.1.8 Versuchstiere (Mäuse)

Wildtyp (Wt)	C57BL/6	Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Berlin
$\gamma\delta$ T-Zelldefizient ($\gamma\delta$ TCR ko)	B6.129P2-Trcd ^{tm1Mom}	The Jackson Lab, Maine, U.S.A.
IL-2 defizient (IL-2 ko)	B6.129P2-IL2 ^{tm1Hor}	Prof. I. Horak, FMP, Berlin
IL-10 transgen (IL-10 tg)	C57BL/6-IL10tg	Mitch Kronenberg, Ph.D., La Jolla Institute, Kalifornien, U.S.A.
IFN- γ defizient (IFN- γ ko)	C57BL/6-Ifngr ^{tm1}	Dr. Klemm, BfR, Berlin und The Jackson Lab, Maine, U.S.A.
TNF ^{ΔARE}	B6.129Sv-TNF ^{ΔARE}	Dr. G. Kollias, Hellenic Pasteur Institute, Athen, Griechenland

3.1.9 Hybridome

145-2C11 (anti-Maus CD3)	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, U.S.A.
UC7-13D5 (anti-Maus $\gamma\delta$ TCR)	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, U.S.A.
OKT3 (anti-Human CD3)	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, U.S.A.
BW828 (anti-Human CD28)	Dr. Kurrle, Behringwerke AG, Marburg

3.2 Methoden

3.2.1 Aufzucht und Behandlung von Versuchstieren

Die Labormäuse wurden in Gruppen von bis zu 7 Tieren gehalten. Tiere, die auf C57BL/6-Hintergrund gezüchtet wurden, wurden aufgrund ihres aggressiveren Verhaltens nur als gleichgeschlechtliche Geschwister in einem Käfig gehalten. Zur Verpaarung wurden Weibchen zu den Männchen in den Käfig gesetzt. Bis auf die Tiere, denen chemisch eine Colitis induziert wurde, wurden alle Versuchstiere im SPF-Bereich der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM) der Charité gehalten. Die Mäuse für die Versuche mit chemisch-induzierter Colitis waren in der konventionellen Haltung des FEM. Alle Tiere erhielten autoklaviertes Futter und steriles Tränkwasser *ad libitum*.

Das Gewicht der Tiere und ihr klinischer Zustand wurden regelmäßig kontrolliert. Sie wurden im Alter von 3 Wochen einmalig für die genotypische Bestimmung an der Schwanzspitze geschnitten. Blutentnahmen erfolgten i.d.R. zu drei verschiedenen Zeitpunkten, vor und während des Versuches aus der Schwanzvene und nach Versuchsende aus dem Herzen. Monoklonale Antikörper (mAk) wurden in einem Injektionsvolumen von 200 μ L intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Für die Depletion von $\gamma\delta$ T-Zellen wurde der mAk UC7-13D5 (nachfolgend 13D5 genannt) eingesetzt. Die initiale Dosis betrug 400 μ g, gefolgt von wöchentlichen Dosen á 200 μ g. Im Modell der chemisch-induzierten Colitis erfolgte die Antikörperbehandlung jeden dritten Tag.

Kontrolltiere erhielten nach dem gleichen Behandlungsschema Hamster IgG. Für die Depletion der $\gamma\delta$ T-Zellen standen zwei anti- $\gamma\delta$ TCR Antikörper zur Auswahl, der verwendete mAk 13D5 und der mAk GL3, der allerdings *in vitro* eine Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Zellen (Zytokinsekretion und Zytolyse)³³ und lediglich eine Herunterregulierung des TCR jedoch keine $\gamma\delta$ T-Zelldepletion¹³⁰ zeigte.

Die Tötung der Tiere erfolgte mittels CO₂-Inhalation nach Versuchsende oder elektiv bei auffälligen Krankheitszeichen (Gewichtsabnahme über 20%, Schmerzkrümmung, Lethargie und/oder struppiges Fell).

Alle an den Mäusen durchgeführten Versuche waren durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit (LAGetSi) genehmigt (G0069/01).

3.2.2 Colitis-Induktion

Bei den immunologischen Colitis-Modellen (IL-2 ko und TNF^{ΔARE} Mäuse) handelt es sich um Tiere, die spontan eine Darmentzündung entwickeln. IL-2 ko Mäuse entwickeln im Alter von 4-9 Wochen eine chronische Entzündung des Kolons, die histologisch der CU beim Menschen ähnelt. TNF^{ΔARE}-Mäuse haben hohe Konzentrationen an frei zirkulierendem TNF. Die multimorbiden Tiere entwickeln nach 2-4 Wochen CED mit MC-Phänotyp.

Die Induktion einer chemischen Colitis erfolgte entweder über die orale Gabe von Dextransulfat (DSS) oder mittels intrarektaler Applikation von Picrylsäure (Trinitrobenzolsulfonsäure, TNBS) in ethanolischer Lösung. Eine DSS-Colitis wurde bei 8-10 Wochen alten Mäusen (auf C57BL/6-Hintergrund) durch Verabreichung von 2,5% DSS über das Tränkewasser induziert. Da C57BL/6-Mäuse gegenüber TNBS-induzierter Colitis resistent sein sollen, wurden die Tiere 7 Tage vor intrarektaler Applikation (2,0 % TNBS in 150 μ L 50% v/v Ethanol) durch epikutane Applikation vorsensibilisiert. Den Tieren wurde das Bauchfell rasiert und 2,5% TNBS in 150 μ L 50% v/v Ethanol auf die Haut gepinselt. Die intrarektale Applikation des TNBS erfolgte über einen Nabelgefäßkatheter (\varnothing 0,8 mm, 6 cm tief eingeführt). Nach Injektion wurde der Katheter vorsichtig entfernt und die Tiere ca. 30 Sekunden kopfüber gehalten, um einen Rückfluss zu verhindern.

3.2.3 Zellkultur

Alle Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Zur Zellernte und für Medienwechsel wurden die Zellen durch Abschlagen von den Wänden der Zellkulturgefäße gelöst und bei 1200 rpm über 5 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in frischem, 37°C-warmem Medium resuspendiert. Permanente Zelllinien wurden in Kompletmedium kultiviert und alle zwei Tage 1:3 gesplittet.

Die Zellzahlbestimmung erfolgte durch Färbung mit Trypanblau. Die Zellsuspension wurden mit Trypanblau (0,5%) 1:2 verdünnt. Ein Aliquot wurde unter ein Deckglas auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Die Auszählung von vier Quadranten (je 16 Einzelquadrate) erfolgte lichtmikroskopisch. Ein Quadrant enthält 0,1 µL Zellsuspension. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde die Zellsuspension 1:2 mit Trypanblau (0,5%) versetzt und 5-10 min bei RT inkubiert. Tote Zellen erschienen unter dem Lichtmikroskop blau gefärbt, lebende Zellen blieben ungefärbt.

Zum Einfrieren wurden Zellen verwendet, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden. In der Regel besaß die Zellsuspension eine Dichte von 5×10^6 Zellen pro Milliliter. Die Suspension wurde zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde im Rücklauf suspendiert und in eiskaltem Medium aufgenommen. Die Suspension wurde in ein Cryoröhrchen überführt und eiskalter, doppeltkonzentrierter Einfriermix tropfenweise zugegeben. Die Cryoröhrchen wurden umgehend bei -80°C eingefroren und später unter Flüssigstickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden die Cryoröhrchen kurz geöffnet, um eingedrungenen Flüssigstickstoff abzugießen und dann im 37°C Wasserbad kurz aufgetaut. Die Suspension wurde in vorgewärmtes Medium überführt und zentrifugiert. Nach Zellzählung wurden 10^5 Zellen/mL in Kulturflaschen oder Mikrotiterplatten eingesät. Alle Arbeiten erfolgten unter einer sterilen Werkbank.

3.2.3.1 *in vitro*-Kultivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen

Für die Kultivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen *in vitro* wurden zuerst periphere Lymphozyten aus humanem Vollblut (PBL) isoliert. Hierfür wurden aus 50-100 mL heparinisiertem Vollblut (von gesunden, weiblichen und männlichen Spendern mittleren Alters) mononukleäre Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Nach Abseren (Zentrifugation bei 2000 rpm für 10 min bei RT ohne Bremse) des Vollblutes

wurde das korpuskuläre Konzentrat mit dem gleichen Volumen Ficoll unterschichtet und bei 2100 rpm für 20 min bei RT ohne Bremse zentrifugiert. Die peripheren mononukleären Zellen wurden aus der Interphase entnommen. Diese PBL wurden mit einer Dichte von 10^6 Zellen/mL in Kulturplatten (24-well) eingesät und mittels Zugabe verschiedener Zytokine, Antikörper und Stimulanzen in Human-Komplettmedium kultiviert. Es sollte diejenige Stimulationen bestimmt werden, die zu einer hohen Ausbeute von $\gamma\delta$ T-Zellen führte.

Im Stimulationsansatz mit Phosphoantigenen wurde Isopentylpyrophosphat (IPP) in verschiedenen Konzentrationen (1-5 $\mu\text{g/mL}$) mit und ohne Zugabe von rekombinantem Interleukin (rIL)-2 (50-200 U/mL) untersucht sowie Alendronat (1-10 μM) unter Zugabe von rIL-2 (50-200 U/mL). Ferner wurden die Kulturen unter Th1-„priming“ (rIL-12, anti-IL-4) und Th2-„priming“ (rIL-4, anti-IL-12) Bedingungen durchgeführt, um die Differenzierung der $\gamma\delta$ T-Zellen in Th1- oder Th2-Zellen zu untersuchen. Hierfür wurde das rekombinante Zytokin in einer Konzentration von 10 ng/mL und der Antikörper in einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/mL}$ eingesetzt.

Je nach Wachstumsdichte wurden die Kulturen an verschiedenen Tagen gesplittet (1:2). Sezernierte Zytokine wurden aus dem Kulturüberstand mittels ELISA und die Verteilung der Zellpopulationen durchflusszytometrisch bestimmt.

3.2.4 Antikörpergewinnung

Monoklonale Antikörper (mAk) aus Hybridomzellüberständen wurden mittels Affinitätschromatographie über Protein A- oder Protein G-Sepharose gewonnen. Protein A und G sind bakterielle Proteine mit hoher Affinität zum Fc-Teil einiger IgG-Isotypen (Protein A bindet IgG₁, 2a und 2b, Protein G bindet IgG₁, 2a, 2b und 3). Die Bindungsaffinität des Fc-Teils zu Protein A oder G nimmt mit sinkendem pH-Wert ab, d.h. gebundene Antikörper werden mit sinkendem pH-Wert eluiert.

Für die Aufreinigung über Protein A-Sepharose wurden ca. 1,5 L Überstand durch Zugabe von Glycin und NaCl gesalzen, mittels 10 M NaOH ein pH-Wert von 8,9 eingestellt und sterilfiltriert (0,45 μm Nalgene). Der vorbehandelte Überstand wurde mit einem Volumenstrom von 1 mL/min über die gespülte Säule geführt. Für die Elution wurde die Säule an ein UV-Photometer angeschlossen und die Absorption des Eluats bei 280 nm gemessen. Die Änderung der Absorption wurde mittels Schreiber erfasst und dokumentiert. Die Säule wurde zuerst mit Bindungspuffer

gespült bis alle ungebundenen Stoffe von der Säule entfernt waren. Die Elution der Antikörper erfolgte mittels pH-Verschiebung; hierfür wurden die Elutionspuffer A und B in bestimmten Verhältnissen gemischt, um verschiedene pH-Werte zu erhalten. Die Steuerung erfolgte über einen Controller. Die Elution von IgG₁ erfolgte bei pH 6,0 (89% Puffer B), die von IgG_{2a} bei pH 4,5 (56% Puffer B) und IgG_{2b} wurde bei pH 3,5 (26% Puffer B) eluiert. Die erwünschten Fraktionen wurden gepoolt, neutralisiert und unter Vakuum in Kollodiumhülsen eingeengt. Anschließend wurde die Suspension 24 Stunden gegen PBS (1x) dialysiert. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bestimmt und nach folgender Formel berechnet:

$$A_{280} = 1,4 = 1 \text{ mg/mL.}$$

Für die Aufreinigung über Protein G-Sepharose wurden ebenfalls 1,5 L Hamster- oder Ratten-Hybridomüberstand mit 1M NaOH auf pH 7,0 eingestellt und sterilfiltriert (0,45 µm Nalgene). Die Säule wurde mit 10 Säulenvolumen Bindungspuffer gespült und der vorbehandelte Überstand mit einem Volumenstrom von 1 mL/min über die Säule geführt. Anschließend wurde die Säule an ein UV-Photometer angeschlossen, das mit einem Schreiber und Tropfensammler verbunden war. Um alle ungebundenen Stoffe von der Säule zu waschen, wurde mit ca. 10 Säulenvolumen Bindungspuffer gespült. Anschließend wurde mit Glycinpuffer (pH 2,7) eluiert. Es wurden 5 mL-Fractionen gesammelt. In die Sammelröhrchen wurde Tris-HCl (pH 9) vorgelegt, um säurelabile Antikörper umgehend zu neutralisieren. Die erwünschten Fraktionen wurden gepoolt, und der Pool unter Vakuum in Kollodiumhülsen eingeengt. Anschließend wurde die Suspension 24 Stunden gegen PBS (1x) dialysiert. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bestimmt, nach obiger Formel berechnet und Aliquots bei -20°C gelagert.

Die Arbeiten erfolgten größtenteils im Kühlraum oder unter Eiskühlung.

3.2.5 Antikörpermarkierung

Für die Verwendung der aufgereinigten Antikörper in der Durchflusszytometrie wurden diese markiert. Die Antikörper wurden entweder biotinyliert oder mit dem Farbstoff Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) gekoppelt. FITC-markierte Antikörper können für die direkte FACS-Färbung verwendet werden. Biotinylierte Antikörper

müssen mit einem Farbstoff-markierten Sekundärantikörper (z.B. Streptavidin-PE) gegengefärbt werden.

Für die Markierung wurde die Antikörpersuspension über eine Sephadex G-25-Säule umgepuffert (Kopplungspuffer). Zur FITC-Markierung wurde diese Antikörpersuspension mit FITC-Farbstofflösung im Dunkeln 4 Stunden bei RT schüttelnd inkubiert (50 µg FITC pro mg Antikörper). Nicht gebundenes FITC wurde durch Filtration über Sephadex G-25 entfernt. Für die Biotinylierung wurde die Antikörpersuspension mit Biotin-Farblösung versetzt (50 µL pro mg Antikörper) und 30 min im Dunkeln schüttelnd inkubiert. Nicht gebundenes Biotin wurde durch Filtration über Sephadex G-25 entfernt.

3.2.6 Zellisolierung

Nach Versuchsende wurden die Tiere mittels CO₂-Inhalation getötet und sezirt. Den Tieren wurden Milz, mesenteriale Lymphknoten, Kolon und bei TNF^{ΔARE}-Mäusen zusätzlich das Ileum entnommen.

3.2.6.1 Isolierung von Splenozyten

Die Milz wurde mit der Rückseite eines Spritzenkolbens zerrieben und durch ein Zellsieb (70 µm Maschenweite) gegeben. Die Zellen wurden nach ausgiebiger Spülung mit serumfreiem Medium abzentrifugiert (1200 rpm, 10 min, RT) und in 5% Waschmedium resuspendiert. Nach hypotonischer Lyse der Erythrozyten wurden die Splenozyten gewaschen und in Kompletmedium aufgenommen.

3.2.6.2 Isolierung von Lymphozyten aus mesenterialen Lymphknoten

Mesenteriale Lymphknoten wurden mit der Rückseite eines Spritzenkolbens zerrieben und durch ein Zellsieb (70 µm Maschenweite) gegeben. Die Zellen wurden mit 5% Waschmedium gespült, gewaschen und nachfolgend in Kompletmedium aufgenommen.

3.2.6.3 *Isolierung von Lamina propria Lymphozyten*

Lamina propria Lymphozyten (LPL) wurden aus dem Kolon und dem Ileum isoliert. Hierfür wurden das Kolon bzw. Ileum nach Sektion von Fäzes, Fett und Peyer'schen Plaques befreit, längs aufgeschnitten und in ca. 0,5 cm² große Stücke geschnitten. Zur Auflösung der Epithelschicht wurden die Darmstücke in HBSS-CMF schüttelnd bei 37°C inkubiert. Während der 45-minütigen Inkubationszeit wurde das Medium zweimal gewechselt. Nach Zentrifugation (IEL befanden sich im Überstand) wurden die Darmstücke in Collagenase-Medium aufgenommen und über einen Zeitraum von 90 min schüttelnd bei 37°C inkubiert. Nach Verdau von Gewebe und DNA wurde die Zellsuspension durch ein Zellsieb (70 µm Maschenweite) gegeben, mit 5% Waschmedium gewaschen und einer Percoll-Dichtegradientenzentrifugation (100% / 40%) unterworfen. Die LPL wurden aus der Interphase entnommen, zweimal gewaschen und in Kompletmedium aufgenommen.

3.2.6.4 *Isolierung muriner $\gamma\delta$ T-Zellen*

Für den Transfer von $\gamma\delta$ T-Zellen in Mäuse mit chemisch-induzierter Colitis, wurden $\gamma\delta$ T-Zellen aus Milz und mesenterialen Lymphknoten von Wildtyp- oder IL-10 transgenen Mäusen isoliert. Nach Lymphozytenisolierung (siehe 3.2.6.1 und 3.2.6.2) wurden erst Zellen, die keine T-Zellen sind (CD11b⁺, CD45R⁺, DX5⁺ und Ter-119⁺) und anschließend CD4⁺ T-Zellen mittels magnetisch aktivierter Zellsortierung (MACS) depletiert. Die MACS-Technologie beruht auf der Separation magnetisch markierter Zellen von unmarkierten Zellen in einem magnetischen Feld unter Verwendung von MACS-MicroBeads (an mAk gekoppelte supermagnetische Partikel), MACS-Säulen (aus ferromagnetischen Kugeln) und MACS-Separatoren (permanentes Magnetfeld). Bei der Positivselektion wird die gewünschte Zellpopulation magnetisch markiert, und beim Säulenlauf im magnetischen Feld auf der Säule zurückgehalten während unmarkierte Zellen die Säule passieren. Nach Entfernung der Säule aus dem Separator, d.h. nach Entfernung aus dem magnetischen Feld, kann die Positivfraktion von der Säule eluiert werden. Bei der Negativselektion werden die unerwünschten Zellen magnetisch markiert und auf der Säule zurückgehalten, während die gewünschte Zellpopulation (unmarkiert) die Säule passiert.

Für die T-Zellanreicherung wurde die Lymphozytensuspension gewaschen und der Überstand komplett abgenommen. Das Zellpellet wurde in 40 µL MACS-Puffer und 10 µL Biotin-Antikörper-Cocktail per 10^7 Zellen resuspendiert. Diese Suspension wurde 10 min im Kühlschrank inkubiert und anschließend mit 30 µL MACS-Puffer und 20 µL anti-Biotin-MicroBeads per 10^7 Zellen versetzt. Nach 15-minütiger Inkubation im Kühlschrank und zweimaligem Waschen wurde das Pellet in 1000 µL MACS-Puffer resuspendiert und über eine LD-Separationssäule gegeben. Die Negativfraktion (T-Zellen) wurde gewaschen, in 90 µL MACS-Puffer und 10 µL anti-CD4-MicroBeads per 10^7 Zellen resuspendiert. Nach 15 min Inkubation im Kühlschrank wurde die Suspension zweimal gewaschen und in 500 µL MACS-Puffer resuspendiert. Die Separation erfolgte über eine MS-Separationssäule. Die Negativfraktion ($CD4^-$ T-Zellen) wurde in 40 µL MACS-Puffer per 10^6 Zellen resuspendiert und mit 1 µg FITC-markiertem anti- $\gamma\delta$ TCR Ak per 10^6 Zellen versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation (4°C) wurden die Zellen gewaschen und mittels Diva cell sorter der Flow Cytometry and Cellsorting Core Facility am Deutschen Rheuma Forschungszentrum (DRFZ) auf dem Campus Mitte der Charité sortiert. Nur 100% reine $\gamma\delta$ T-Zellen wurden in Versuchsmäuse transferiert.

3.2.6.5 *Isolierung humaner $\gamma\delta$ T-Zellen*

Humane $\gamma\delta$ T-Zellen wurden aus PBL aus dem Vollblut gesunder Spender mittels MACS isoliert. Die PBL-Suspension wurde mit PE-markiertem anti- $\gamma\delta$ TCR mAk versetzt und inkubiert (1 µg mAk per 10^6 Zellen, 15 min, 4°C). Nach zweimaligem Waschen wurde die Suspension in 80 µL MACS-Puffer und 20 µL anti-PE-MicroBeads per 10^7 Zellen resuspendiert. Nach Inkubation (15 min, 4°C) wurde die Suspension gewaschen und in 500 µL MACS-Puffer resuspendiert. Die Separation erfolgte über eine MS-Säule, wobei die Positivfraktion ein zweites Mal über die Säule geführt wurde. Die Bestimmung der Reinheit erfolgte durchflusszytometrisch. Verwendet wurden $\gamma\delta$ T-Zellen mit über 98%iger Reinheit.

3.2.6.6 *Isolierung humaner $CD4^+CD25^+$ T-Zellen*

Um die Eigenschaften regulatorischer T-Zellen ($CD4^+CD25^+$ und $\gamma\delta$ T-Zellen) miteinander vergleichen zu können, wurden $CD4^+CD25^+$ T-Zellen mittels MACS aus

humanen PBL isoliert. Zuerst wurden alle Zellen, die nicht CD4⁺ sind aus der Suspension depletiert und anschließend die unmarkierten CD4⁺ T-Zellen auf CD25-Expression sortiert. Hierfür wurde die Lymphozytensuspension gewaschen und der Überstand komplett abgenommen. Das Zellpellet wurde in 90 µL MACS-Puffer und 10 µL Biotin-Antikörper-Cocktail per 10⁷ Zellen resuspendiert. Diese Suspension wurde 10 min im Kühlschrank bei 4°C inkubiert und anschließend mit 20 µL anti-Biotin-MicroBeads per 10⁷ Zellen versetzt. Nach 15-minütiger Inkubation (4°C) und zweimaligem Waschen wurde das Pellet in 1000 µL MACS-Puffer resuspendiert und über eine LD-Separationssäule gegeben. Die Negativfraktion (CD4⁺ T-Zellen) wurde gewaschen, in 90 µL MACS-Puffer und 10 µL anti-CD25-MicroBeads per 10⁷ Zellen resuspendiert. Nach 15 min Inkubation bei 4°C wurde die Suspension zweimal gewaschen und in 500 µL MACS-Puffer resuspendiert. Die Separation erfolgte über eine MS-Säule, wobei die Positivfraktion (CD4⁺CD25⁺ T-Zellen) ein zweites Mal über die Säule geführt wurde. Die Bestimmung der Reinheit erfolgte durchflusszytometrisch und verwendet wurden ausschließlich CD4⁺CD25⁺ T-Zellen mit >98% Reinheit. Für die allogene Cokultivierung von CD4⁺ T-Zellen mit $\gamma\delta$ T-Zellen bzw. CD4⁺CD25⁺ T-Zellen wurde nach dem ersten MACS-Schritt ein Aliquot von CD4⁺ T-Zellen abgenommen und gewaschen.

3.2.7 Molekularbiologische Methoden

Für die genotypische Bestimmung der Versuchstiere wurden diese in der 3.-4. Lebenswoche an der Schwanzspitze geschnitten. Aus der Schwanzspitze wurde genomische DNA isoliert, die gewünschte Sequenz mittels Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) vermehrt und gelelektrophoretisch ausgewertet.

3.2.7.1 DNA-Isolierung

Die präparative Isolierung der DNA wurde entsprechend dem Protokoll des DNA Purification Kit durchgeführt. Hierbei erfolgt nach Verdau des Gewebes die selektive Fällung von DNA. Konzentration und Reinheit der isolierten DNA wurden photometrisch bei 260 und 280 nm bestimmt. Die dsDNA-Konzentration (mg/mL) ist das Produkt der Absorption bei 260 nm und dem Faktor 50. Die Reinheit ergibt sich

aus dem Quotienten der Absorptionen bei 260 und 280 nm. DNA mit einem Reinheitsquotienten zwischen 1,8 und 2,1 wurde in der PCR verwendet.

3.2.7.2 PCR

Für die Replikation eines bestimmten Bereiches der genomischen DNA, verwendet man Strang (*sense*)- und Gegenstrang (*antisense*)-Oligonucleotidprimer, die zu den flankierenden Sequenzen der gewünschten Region komplementär sind. Nach Denaturierung der DNA binden die Primer beim erneuten Zusammenlagern (*annealing*) an die komplementären Sequenzen. Hitzestabile *taq*-Polymerase verlängert (*extension*) die Primer entlang der genomischen DNA, die praktisch als Matrize fungiert. Durch Wiederholung der Zyklen (denaturation, annealing, extension) erhält man eine Vielzahl an DNA-Fragmenten mit der gewünschten Sequenz.

Die TNF^{ΔARE}-PCR bestand aus 30 Zyklen. Die Prä-Denaturierung dauerte 5 min bei 94°C. Die Replikationszyklen umfassten Denaturierung (2 min, 94°C), Annealing (1 min, 57°C) und Extension (1 min, 72°C). Die abschließende Extension dauerte 5 min. Bei der IL-2-PCR gab es nach 7-minütiger Prä-Denaturierung bei 94°C 40 Zyklen mit Denaturierung (24 sec, 94°C), Annealing (22 sec, 64°C) und Extension (1 min und 22 sec, 72°C) sowie eine 5-minütige abschließende Extension. Die IL-10-PCR bestand ebenfalls aus 30 Zyklen, die sich nach 10-minütiger Prä-Denaturierung bei 95°C in Denaturierung (40 sec, 95°C), Annealing (1 min, 58°C) und Extension (1 min, 72°C) gliederte. Die finale Extension bei 72°C dauerte 7 min.

3.2.7.3 Gel-Elektrophorese

Die Auswertung der PCR-Produkte erfolgte mittels Gel-Elektrophorese. Hierbei laufen die negativ geladenen DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld durch ein Agarose-Gel. Die Laufgeschwindigkeit wird hauptsächlich durch die Fragmentgröße bestimmt (kleinere Fragmente haben eine schnellere Laufgeschwindigkeit als größere). Zur Größenbestimmung der DNA-Abschnitte lässt man einen Größenmarker, sog. DNA-Leitern, mitlaufen.

Für die Bestimmung der DNA-Fragmente erfolgte der Probenlauf im 2%igen Agarosegel (+ 10 µL Ethidiumbromid). Die PCR-Produkte wurden 1:5 mit Ladepuffer verdünnt, in Geltaschen pipettiert und ca. 1,5 Stunden bei 80 V Gleichstrom

aufgetrennt. Die Auftrennung wurde unter UV-Licht kontrolliert und fotografisch dokumentiert.

3.2.8 Analytik

Die humorale Immunantwort durch B-Zellen lässt sich relativ einfach durch die Messung von Antikörperreaktionen nachweisen. Die T-Zellvermittelte Immunantwort ist wesentlich schwerer zu bestimmen. Die T-Zellantwort unterteilt sich in zwei Phasen. In der Induktionsphase werden die T-Zellen zur Teilung (*Proliferation*) und Differenzierung angeregt. In der Effektorphase führen sie ihre Funktion aus. Meistens weist man das Vorhandensein von T-Zellen, die auf ein spezifisches Antigen reagiert haben, *in vitro* dadurch nach, dass die T-Zellen in Gegenwart desselben Antigens proliferieren. Die Proliferation von T-Zellen nach verschiedenen Stimuli wird durch den Einbau von [6-³H]-Thymidin in die zelluläre DNA bestimmt. Der Proliferationstest sagt jedoch nichts über die Effektorfunktion aus. T-Zellen besitzen mehrere grundlegende Effektorfunktionen; CD8⁺ T-Zellen (zytotoxische T-Zellen) töten infizierte Zellen ab und verhindern somit die Vermehrung intrazellulärer Krankheitserreger, CD4⁺ T-Zellen (T-Helferzellen) können mittels Zytokinsekretion B-Zellen oder Makrophagen aktivieren. Somit eignet sich der Nachweis von Zytokinen, die von Th-Zellen sekretiert werden zum indirekten Nachweis ihrer Effektorfunktion.

3.2.8.1 Proliferationstest

Die Teilungsrate anti-CD3/CD28 stimulierter Lymphozyten, die aus Lamina propria, Milz und mesenterialen Lymphknoten isoliert wurden, wurde über den Einbau radioaktiver Substanzen bestimmt. Hierfür wurden hydrophile 96 well-Rundbodenplatten mit anti-CD3-Antikörper (anti-Maus CD3 ϵ [Klon 145-2C11] bzw. anti-Human CD3 [Klon OKT3]) in Standardkonzentration (10 μ g/mL Coating Buffer) beschichtet. Freie Bindungsstellen auf dem Kunststoffträger wurden mit 0,1% BSA abgesättigt. Die Einsaatdichte betrug 10⁶ Zellen pro mL Komplettmedium, welches 1 μ g/mL anti-CD28-Antikörper (anti-Maus CD28 [Klon 37.51] bzw. anti-Human CD28 [Klon BW828]) enthielt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relative Luftfeuchtigkeit über 96 Stunden. Nach 72 Stunden wurde mit [6-³H]-Thymidin-

Lösung (0,5 µCi pro well) gepulst. Nach dem Ernten auf Glasfilterpapier erfolgte die Auszählung mittels Szintillations-Zähler.

Für die Suppressionsversuche wurde die Proliferation mittels Carboxyfluorescein-markierter Zellen durchflusszytometrisch bestimmt, da bei dieser Methode ausschließlich die Proliferation markierter Zellen bestimmt wird. Dies ist von essentieller Bedeutung, da die Suppressionsuntersuchungen in Cokultur durchgeführt wurden. Würde der Einbau von [6-³H]-Thymidin gemessen werden, würden alle Zellen in der Kultur erfasst werden, d.h. auch die supprimierenden Zellen. Für die durchflusszytometrische Proliferationsbestimmung wurden die Zielzellen (PBL, CD4⁺) mit Carboxyfluorescein (CFSE) markiert. Hierfür wurden 10⁷ Zellen in einem Milliliter PBS resuspendiert und nach Zugabe von 1 µM CFSE bei RT 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimalig mit Komplettmedium gewaschen und auf 2 x 10⁶ Zellen/mL eingestellt. Von dieser Suspension wurden für die Monokultur 100 µL pro well in hydrophilen 96 well-Rundbodenplatten eingesät und verschiedentlich stimuliert. Für die Cokultivierungsversuche wurden jeweils 50 µL der CFSE-markierten Zellsuspension und der unmarkierten supprimierenden T-Zellen pro well in verschiedenen Stimulationsansätzen eingesät. Die Einsaat erfolgte in Dreifachansätzen, d.h. drei wells pro Stimulation und Tag. Die Grundeinstellung des Instrumentensettings am FACS erfolgte an Tag 1, die Messung der Proliferation an Tag 4 und 6. Direkt vor der FACS-Messung wurde den Ansätzen 1 µL Propidiumiodid (PI) zugegeben, das nur in Zellen mit permeabler Membran (nekrotische Zellen) eindringt. Somit wurde ausschließlich die Proliferation vitaler Zielzellen (PI⁻CFSE⁺) gemessen. Die Kultivierung erfolgte in folgenden Ansätzen: unstimuliert, anti-CD3/CD28 (s. oben) und anti-CD3/CD28 + 50 U/mL rhu IL-2.

3.2.8.2 ELISA

Stimulierte T-Zellen sezernieren Zytokine, die aus dem Kulturüberstand mittels enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) mit hoher Empfindlichkeit und Genauigkeit nachgewiesen werden können. Isolierte Zellen (mLKL, Splenozyten, LPL aus Ileum und Kolon) wurden in 24-well Platten mit einer Einsaatdichte von 10⁶ Zellen/mL über 48 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relative Luftfeuchtigkeit inkubiert. Für den ELISA wurden unmarkierte anti-Zytokin-Antikörper (Fang-Antikörper, *coating*-Antikörper) auf Maxisorb[®]-Mikrotiter-

platten fixiert und freie Bindungsstellen auf dem Kunststoffträger mit Blockpuffer abgesättigt. Der 48-Stunden-Überstand der Stimulationsversuche wurde in verschiedenen Verdünnungen hinzugefügt. Nach Inkubation wurde ungebundenes Zytokin von der Platte gewaschen und gebundenes durch einen zweiten anti-Zytokin-Antikörper (biotinylierter Detektionsantikörper) nachgewiesen. Dieser Detektionsantikörper war gegen ein anderes Epitop gerichtet als der *coating*-Antikörper. Nach dem Entfernen überschüssigen Detektionsantikörpers, wurde an gebundene Detektionsantikörper markiertes Streptavidin gekoppelt. Das Streptavidin war mit Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) konjugiert, welches in der Substratlösung enthaltenes ortho-Phenyldiamin (OPD) oxidierte. Der gebildete gelbe Farbstoff wurde photometrisch bei 450 nm (630 nm Referenzfilter) gemessen und die Zytokinkonzentration über eine Standardkurve bestimmt.

Da das Zytokin durch die Bindung zweier Antikörper nachgewiesen wird, spricht man vom sogenannten Sandwich-ELISA, der hochspezifisch ist, da Zytokine, die mit einem Antikörper kreuzreagieren, mit großer Wahrscheinlichkeit nicht auch noch an einen zweiten binden.

3.2.8.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zum Nachweis bestimmter Antigene auf der Zelloberfläche oder innerhalb der Zelle mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern. Im Durchflusszytometer wird die Zellsuspension in eine Trägerflüssigkeit eingebracht. Die Zellen werden durch die höhere Strömungsgeschwindigkeit der Trägerflüssigkeit vereinzelt und an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Durch das Argon-Laserlicht werden die Fluoreszenzfarbstoffe angeregt und emittieren ihrerseits Fluoreszenzlicht. Die emittierten Fluoreszenzen werden durch verschiedene Photozellen detektiert. Bei der konventionellen Durchflusszytometrie können pro Zelle drei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe und vier weitere Parameter gleichzeitig gemessen werden. Zwei dieser zusätzlichen Parameter (FSC und SSC) erlauben eine Unterscheidung der Zellen auf Grund von morphologischen Zellparametern (Zellgröße und Granularität).

Für die Messung von Oberflächen-Antigenen wurden 10^6 Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und nach Absättigung unspezifischer Bindungen durch Zugabe von 1 μg Fc-Block (anti-Maus CD16/CD32) oder 5 μg Humanserum mit einem oder

mehreren Fluoreszenz-markierten Antikörpern in optimaler Konzentration 10 min auf Eis inkubiert. Die markierten Zellen wurden zweimal gewaschen und im FACS gemessen (50.000 Zellen der ausgewählten Lymphozytenpopulation). Wurden unmarkierte Primär-Antikörper verwendet, musste in einem zweiten Schritt mit einem Fluoreszenz-markierten Sekundär-Antikörper gegengefärbt werden. Für die Bestimmung intrazellulärer Zytokine wurden die Zellkulturen in den letzten 6 Stunden der Kultivierung mit einem intrazellulärem Protein-Transport-Inhibitor (Brefeldin A) behandelt, um die Sekretion der Zytokine zu unterbinden. Anschließend wurden die Zellen geerntet, gewaschen, fixiert und in Saponin (0,5%) resuspendiert. Das Saponin permeabilisiert die Zellmembran. Nach 15-minütigen Inkubation bei RT mit Fluoreszenz-markiertem Antikörper, der gegen ein bestimmtes Zytokin gerichtet ist, wurden die markierten Zellen zweimal gewaschen, in FACS-Puffer resuspendiert und im FACS gemessen (50.000 Zellen der ausgewählten Lymphozytenpopulation).

3.2.8.4 Histologie

Nach Tötung der Versuchstiere wurden Proben von terminalem Ileum (bei TNF^{ΔARE} Mäusen), Zökum und Kolon entnommen, in 4%igem Formaldehyd (Formalin) fixiert, entwässert und in Paraffin eingebettet. Die Schnitte (2 μm) wurden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt und der Grad der Entzündung (Score) makroskopisch und mikroskopisch durch Verwendung eines modifizierten Scoring-Systems nach Neurath et al.¹⁰³ bestimmt:

Makroskopisch

- 0 kein Hinweis auf Entzündung
- 1 Erytheme
- 2 Erytheme, leichte Ödeme, kleine Erosionen
- 3 ≥ 2 blutende Ulzerationen und/oder Entzündungen und/oder moderate Adhäsionen
- 4 ernste Ulzerationen und/oder Stenosen mit prästenotischen Dilatationen und/oder ernsthaften Adhäsionen

Mikroskopisch

- 0 keine Entzündungszeichen
- 1 niedrige Infiltration von Entzündungszellen (z.B. neutrophile Granulozyten)
- 2 geringe Infiltration von Entzündungszellen

-
- 3 hohe Infiltration von Entzündungszellen, hohe vaskuläre Dichte, Darmwandverdickungen
 - 4 transmurale Infiltration von Entzündungszellen, Becherzellverlust, hohe vaskuläre Dichte, starke Darmwandverdickungen, Ulzerationen und/oder Kryptenabszesse

3.2.8.5 Hämogramm

Nach Tötung der Versuchstiere wurde Blut direkt aus dem Herzen entnommen und mit 10%igem EDTA versetzt (30 μ L EDTA pro mL Blut). Die Erstellung eines Blutbildes erfolgte automatisch mittels eines Coulter Counter. Für die Erstellung der Differentialblutbilder wurden Blutausstriche angefertigt (5 μ L Blut wurden auf einen Objektträger gegeben, mit einem Deckgläschen ausgestrichen und luftgetrocknet). Die getrockneten Blutausstriche wurden anschließend nach Pappenheim gefärbt. Hierfür wurden die Blutausstriche 3 min mit frisch filtrierter May-Grünwald-Lösung gefärbt. Anschließend wurde für 1 min die gleiche Menge Phosphatpuffer zugegeben und abgespült. Abschließend wurde für 15 min mit Giemsa (2,5%) gefärbt und der Ausstrich mit Wasser gespült. Konnten die Blutausstriche nicht direkt gefärbt werden, wurden sie für 5 min mit Methanol fixiert und mit Giemsa-Färbelösung für 15 min gefärbt. Anschließend wurden die Ausstriche mit Wasser abgespült. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch.

3.2.8.6 Statistik

Zur Überprüfung einer statistischen Hypothese und ihrer Signifikanz (Signifikanztest) wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney U-Test (Rangsummentest) angewendet, bei dem die Mediane zweier Populationen miteinander verglichen werden. Die U-Statistik gilt als signifikant ($P < 0,05$), wenn die mittleren Rangplätze (Mediane) voneinander verschieden sind. Die Auswertung erfolgte mittels SPSS für Windows und parameterfreie Daten wurden mittels Boxplot (Median, obere und untere Quartile sowie Maximum und Minimum) oder Streudigramm (Einzelwerte und Mittelwert) dargestellt. Um die Überlebensrate der Versuchsgruppen miteinander zu vergleichen, wurde der nicht-parametrische Kaplan-Meier Test angewendet und die Daten in der Kaplan-Meier Kurve dargestellt.