

3 Material und Methoden

3.1 Zellkulturbedingungen

Die für das Projekt verwendeten Zellen (Zelllinien und Primärmaterial) wurden in einem Inkubator bei 37°C in einer humiden Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert. Im Folgenden wird ein Überblick über Behandlung und Kultivierung der Zellen gegeben.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer Zählkammer und war Voraussetzung für die exakte Bestimmung und Kontrolle der Zellzahl bei der Passagierung und Aussaat der Zellen. Um dabei tote von lebenden Zellen unterscheiden zu können, wurde die Zellsuspension 1:2 mit einer 10 prozentigen Trypanblau-Lösung angefärbt. Die Differenzierung der toten Zellen von den lebenden fand gleichzeitig mit der Zellzählung anhand einer Blaufärbung im Vergleich zu vitalen Zellen statt.

3.1.1 Adhärenente Zelllinien

Zur Produktion retroviraler Zellkulturüberstände und deren Titration (Bestimmung der Zahl der infektiösen Viruspartikel) wurden die beiden adhärenenten Zelllinien Phoenix-GP bzw. NIH3T3 verwendet. Dem Kulturmedium Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Gibco, Karlsruhe, Deutschland) wurden 10% fötales Kälberserum (FKS, Biochrom AG, Hamburg, Deutschland), 100 µg/ml Streptomycin, 100 IE/ml Penicillin (Biochrom AG, Hamburg, Deutschland), 5 mM HEPES (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und 1 mM Natriumpyruvat (Biochrom AG, Hamburg, Deutschland) zugesetzt. Im Folgenden wird dieses Medium als Vollmedium bezeichnet.

Zum Ablösen und Verdünnen der adhärenenten Zellen von Zellkulturschalen wurde den Zellen soviel Trypsin (Biochrom AG, Hamburg, Deutschland) zugesetzt, dass sie vollständig benetzt waren. Nach 2 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit Vollmedium ab gespült, (ein Teil) in frisches Vollmedium überführt und mehrmals resuspendiert. Das führte zu einer gleichmäßigen Vereinzelnung der Zellen, die dadurch sehr gleichmäßig in neuen Zellkulturschalen anwuchsen.

NIH3T3

NIH3T3 Zellen sind eine aus embryonalen Fibroblasten der Maus isolierte Zelllinie. Sie durchlaufen einen kompletten Zellzyklus in ca. 24 Stunden. Um einem Überwachsen der Zellkulturschale und damit einem Absterben der Zellen vorzubeugen, wurden die Zellen zwei Mal pro Woche 1:10 ausgedünnt. Dazu löste man die Zellen mit Trypsin wie oben beschrieben von der Platte ab, resuspendierte sie und gab 1/10 des Gesamtvolumens auf eine neue Zellkulturschale, wo die Zellen

wieder adhären und proliferieren. Für die unter Kapitel 3.1.5 beschriebene Titration wurden die Zellen nach der Ablösung von der Platte in einer Dichte von 1×10^5 / ml ausgesät.

Phoenix-GP

Phoenix-GP Zellen basieren auf 293T-Zellen, einer menschlichen, embryonalen Nierenzelllinie. Sie zeichnen sich durch eine effektive Transfektionsrate bei Kalzium-Phosphat Transfektionen aus. Im Labor von G. Nolan (Stanford Universität, Medical Department, USA) wurden die Zellen so genetisch verändert, dass aus retroviralen Plasmiden Retroviren produziert werden können. Dazu transfizierte man Konstrukte in diese Zellen, die für die Expression von retroviralem *gag/pol* (der Genabschnitt *gag* kodiert für Kapsidproteine, der Genabschnitt *pol* kodiert für die reverse Transkriptase des Retrovirus), sowie die *ecotrope* (nagerzellenpathogene) Hülle verantwortlich waren. Da diese Zellen das retrovirale Plasmid, das für LMP2A kodiert, zu einem Retrovirus „verpacken“, werden sie auch als Verpackungszelllinie bezeichnet. In dieser Arbeit dienten diese Zellen der Herstellung der retroviralen Zellkulturüberstände. Um eine bessere Effizienz der Virusproduktion zu erreichen, wurden zusätzlich zum LMP2A-kodierenden Plasmid Plasmide transfiziert, die für die *ecotrope* Hülle sowie für Kapsidproteine (*gag*) und reverse Transkriptase (*pol*) kodieren. Die Zellen wurden alle zwei Tage wie oben beschrieben 1:5 ausgedünnt. Sollten die Zellen für eine Transfektion eingesetzt werden, wurden sie in einer Dichte von $3,2 \times 10^6$ / 10 ml Vollmedium ausgesät.

3.1.2 Fötale Leberzellen

Nach Entnahme und Vereinzelung der fötalen Leberzellen (siehe Kapitel 3.2) wurden die Zellen für 48 Stunden in Stammzellproliferationsmedium kultiviert.

Die Kultivierungsbedingungen wurden im Rahmen der Arbeit neu etabliert.

Das Stammzellproliferationsmedium ist ein Mediumgemisch aus 50 % DMEM (Gibco, Karlsruhe, Deutschland), 50 % Iscove's modified Dulbecco's Medium (IMDM) (Gibco, Karlsruhe, Deutschland), 10 % fötalem Kälberserum (FKS, Biochrom AG, Hamburg, Deutschland), 100 µg / ml Streptomycin, 100 IE / ml Penicillin (Biochrom AG, Hamburg, Deutschland), 2 mM N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamine (Biochrom AG, Hamburg, Deutschland), 5×10^{-5} M 2-Mercaptoethanol, 10 ng / ml murines Interleukin 3 (IL3), 10 ng / ml murines Interleukin 6 (IL6) und 50 ng / ml muriner Stammzellfaktor (SCF) (Tebu, Offenbach, Deutschland). Das Medium mit seinen Zusätzen diente der Stimulation der Proliferation der fötalen hämatopoietischen Stammzellen. SCF und IL6 unterstützen das Wachstum der Stammzellen, IL3 lenkt die weitere Entwicklung der Stammzellen in Richtung Lymphozyten.

3.1.3 Stimulation von B-Zellen

Die Reaktion von B-Zellen auf verschiedene Stimuli wie die B-Zell-abhängige Stimulans durch IgM(F(ab'))₂ (mausspezifischer Antikörper aus der Ziege, Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, USA) oder das B-Zell-unabhängige LPS (Lipopolysaccharid aus E.coli, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) kann in Proliferations-Assays untersucht werden. Dazu wurden die sortierten B-Zellen (siehe Kapitel 3.6.2) in einer Konzentration von 1×10^5 / ml in B-Zell-Medium (RPMI (Gibco, Karlsruhe, Deutschland), 10 % FKS, 100 g / ml Streptomycin, 100 IE / ml Penicillin, 5×10^{-5} M 2-Mercaptoethanol) aufgenommen. In einem Volumen von je 100 µl erfolgte die Kultivierung der B-Zellen in 96-Loch-Platten. In jeweils Dreifachansätzen fand eine Stimulation mit 1, 3 und 6 µg / ml Endkonzentration IgM(F(ab'))₂ bzw. LPS über 66 Stunden statt.

48 Stunden nach Beginn der Stimulation wurden 5 µCi [³H] Thymidin (Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland) / 100 µl B-Zell-Medium zugegeben. Das Thymidin wurde von den Zellen je nach Proliferationsaktivität mehr oder weniger stark eingebaut. Die später gemessene β-Strahlung konnte als Maß für die Proliferation gelten. Nach weiteren 18 Stunden Kultivierung wurden die Zellen bei -20°C eingefroren.

Nach dem Auftauen der Zellen konnten die Platten mit Hilfe eines Zellerntegeätes (Tomtec, Perkin Elmer, Boston, USA) automatisiert geerntet werden. Hierbei wurden die Zellen in ein Filterpapier (Printed Filtermate A, Perkin Elmer, Boston, USA) überführt und dabei aufgeschlossen. Unter Erhitzung (Microsealer, Wallac, Perkin Elmer, Boston, USA) wurde dann die DNA der Zellen mit Szintillations-Medium (Melti Lex™ A, Perkin Elmer, Boston, USA) in Verbindung gebracht. Ein Szintillationsgerät (Liquid Scintillation Counter 1450 Microbeta Plus, Wallac, Perkin Elmer, Boston, USA) zählte die Zerfälle pro Minute (*counts per minute*). Die Höhe der Zerfälle wurde mit der Proliferation der Zellen korreliert. Je mehr radioaktiv markiertes Thymidin eingebaut wurde, desto höher war die Proliferationsrate der untersuchten Zellen.

3.1.4 Produktion retroviraler Überstände

Spezielle für das latente Membranprotein 2A (LMP2A) des Epstein-Barr Virus kodierende Retroviren, die für die Infektion hämatopoietischer Stammzellen der Mäuse benötigt wurden, konnten mit Hilfe der Verpackungszelllinie Phoenix-GP hergestellt werden. Durch Kalzium-Phosphat Transfektion wurden die retroviralen Plasmide in die Phoenix-GP Zellen eingebracht. Die Zellen dienten der Verpackung und der Vervollständigung der viralen DNA-Anteile zu einem *ecotropen* (also nagerzellenpathogenen) Retrovirus. Ziel war es, die Viren, die in den Zellkulturüberstand abgegeben wurden, dort anzureichern und zu ernten.

Diese Methode wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit etabliert.

Für die Durchführung der Kalzium-Phosphat Transfektion wurden am Vortag $3,2 \times 10^6$ Phoenix-GP-Zellen in einer Zellkulturschale mit 10 cm Durchmesser (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) ausgesät. Ein Zusatz von 25 μM Chloroquine zum Medium machte die Zellen für die Präzipitate durchlässiger.

Die Kalzium-Phosphat Transfektion wurde mit Hilfe des *Calcium Phosphate Transfection Kits* von Invitrogen (Gronigen, Niederlande) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden 5 μg des retroviralen Plasmids (2551_pSF11 (SHX)-LMP2A), 15 μg eines Plasmids für retrovirales *gagpol* (M57) und 2 μg eines Plasmids für die *ecotrope* Hülle des Retrovirus (K73) verwendet. Die Plasmide wurden dem Labor freundlicherweise von Prof. Dr. C. Baum (Medizinische Hochschule Hannover, Deutschland) und Prof. Dr. W. Hammerschmidt (GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, München, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Nach ca. 18 Stunden konnte das Medium von den Zellen entfernt und durch 8 ml frisches Medium ersetzt werden. 48 und 72 Stunden nach der Transfektion wurden die retroviralen Überstände geerntet und bei -80°C eingefroren.

Um eine Kontamination der Überstände mit abgelösten Phoenix-GP-Zellen zu vermeiden, wurden die Überstände 5 Minuten bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert und in ein frisches Röhrchen (15 ml, Falcon, Heidelberg, Deutschland) überführt, bevor sie eingefroren wurden. Ca. 100 μl wurden für die Titration in ein Reaktionsgefäß mit 1,5 ml Volumen aliquotiert.

3.1.5 Titration der viralen Überstände

Um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit der Versuche zu gewährleisten, wurden die fötalen hämatopoietischen Stammzellen immer mit der gleichen Mengen an Viruspartikeln infiziert. Dazu musste der Titer jedes viralen Überstandes bestimmt werden. Er ist ein Maß für die Anzahl der infektiösen Viren pro Milliliter Zellkulturüberstand.

Diese Verfahrensweise wurde im Rahmen der Arbeit etabliert.

Zur Titration wurden vormittags in 24-Loch-Platten 1×10^5 NIH3T3-Zellen je Loch ausgesät. 3-5 Stunden später wurde das Medium durch 1 ml frisches Medium je Loch ersetzt, dem 4 μg / ml Polybrene (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) zugesetzt wurden. Der Zusatz von Polybrene verbesserte die Infektionseffizienz durch die Retroviren.

Die in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aliquotierten viralen Überstände wurden auf Eis aufgetaut. 5, 10 und 20 µl jedes Überstandes wurden auf je ein Loch pipettiert. Nach 60-minütiger Zentrifugation bei 2000 rpm und 32°C wurden die Zellen zur Infektion über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Morgen wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt. 48 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen durch Zugabe von 100 µl Trypsin vom Boden der Schale abgelöst, mit PBS gewaschen und in 500 µl PBS je well aufgenommen. Durch FACS-Analysen (durchflußzytometrische Analysen, siehe Kapitel 3.5) wurde der Anteil an grün-fluoreszierenden Zellen bestimmt. Die grüne Fluoreszenz ist in Form von eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*) auf einem Abschnitt des transfizierten retroviralen Plasmids kodiert. Es wird bei erfolgreicher Infektion der Zellen mit dem Retrovirus exprimiert.

Mit Hilfe folgender Formel wurde der Titer bestimmt:

$$\frac{n^{NIH3T3} \cdot n^{eGFP} \cdot 2}{Vol \cdot 100}$$

wobei

n^{NIH3T3}	Anzahl der ausgesäten NIH3T3-Zellen
n^{eGFP}	Anzahl der grün fluoreszierenden Zellen
Vol	Volumen der zugegebenen Menge des viralen Überstandes (ml)

3.1.6 Konzentrierung der viralen Überstände

Für einen Teil der Versuche wurden höhere Titer als die der regulär produzierten viralen Überstände benötigt. Dafür konnten die viralen Überstände konzentriert werden. Zunächst wurden die bei -80°C gelagerten Überstände auf Eis aufgetaut und danach in Polycarbonat-Röhrchen (Sorvall, Newtown, USA) überführt. Nach dreistündiger Zentrifugation mit 20000 x g bei 4°C wurde das Medium vorsichtig abgesaugt. Die Viren wurden in etwa einem Zehntel des vorherigen Volumens aufgenommen (ca. 1 ml). Eine Inkubation bei 4°C über Nacht ermöglichte eine vollständige Resuspendierung der Viren.

3.1.7 Kryolagerung von Zellen

Da nicht alle Zelllinien über den gesamten Zeitraum der Arbeit kultiviert wurden oder wegen besserer Qualität regelmäßig frisch ausgesät werden mussten, empfahl sich eine Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff. Zum Einfrieren wurden etwa 2×10^6 Zellen abzentrifugiert (1200 rpm, 5 min), in 1 ml DMEM-Medium mit 30 % FKS und

10 % DMSO resuspendiert und in ein 2 ml-Gefäß (NUNC-Cryotube™, Wiesbaden, Deutschland) pipettiert. Um die Zellen schonend abzukühlen, wurde das Röhrchen in einer Einfrierbox der Firma NUNC (Wiesbaden, Deutschland) mit Isopropanolmantel auf -80°C abgekühlt. Eine längere Lagerung der Zellen fand anschließend in flüssigem Stickstoff statt. Zur Wiederverwendung wurden die Zellen etwa 3 Minuten in einem 37°C warmen Wasserbad angetaut. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig in 15 ml vorgewärmten Kulturmedium gewaschen und in ein Kulturgefäß mit frischem Medium überführt.

3.2 Präparation der fötalen Leberzellen und Transplantation

3.2.1 Entnahme der Föten

12-14 Tage nach der Gestation fand die Entnahme der Föten aus den trächtigen Weibchen statt. Die Weibchen wurden zuvor durch Genickbruch getötet (dies entspricht den Richtlinien des GV-Solas/FELASA (Gesellschaft für Versuchstierkunde - Society for Laboratory Animal Science, Hannover, Deutschland/Federation of European Laboratory Animal Science Associations, London, UK) und der Tierkörper zur Desinfektion in 70%-igen Ethanol getaucht. Unter sterilen Bedingungen wurde der Bauchraum durch einen Schnitt entlang der Linea Alba eröffnet. Nach Anlegen zweier Entlastungsschnitte senkrecht in Richtung beider Kniefalten wurde der Uterus entnommen und auf Eis in Stammzellproliferationsmedium (ohne Zytokine) gelegt.

Mit Hilfe von Schere und chirurgischer Pinzette wurden die Föten vorsichtig und möglichst ohne Kontakt zu maternalem Gewebe, um eine Kontamination mit diesem zu verhindern, aus dem Uterus isoliert und ebenfalls auf Eis in Stammzellproliferationsmedium (ohne Zytokine) gelegt.

Der Kopf des Fötus wurde entfernt und in PBS aufgenommen. Er diente später der DNA-Isolierung für die Genotypisierung des Fötus durch PCR (siehe Kapitel 3.4.1).

Die fötale Leber ist zwischen dem 12. und 14. Tag nach Gestation ca. $1,5 \times 1,5$ bis 3×3 mm groß. Sie ist sehr leicht durch ihre dunkel rotbraune Farbe vom restlichen fötalen Gewebe zu unterscheiden. Sie wurde aus dem Fötus entfernt und ebenfalls in Stammzellproliferationsmedium (ohne Zytokine) auf Eis gelegt.

3.2.2 Herstellung einer Einzelzellsuspension und Kultivierung

Um eine Einzelzellsuspension herzustellen, wurde das Organ samt Medium mit einer 20G Kanüle in eine Spritze gezogen und durch eine 26G Kanüle wieder herausgedrückt. Dieser Vorgang wurde 3 bis 4-mal wiederholt.

Nach Vereinzelung der Zellen wurden diese in einer Konzentration von 1×10^6 / ml in Stammzellproliferationsmedium kultiviert. Die Zytokine wurden nach Beendigung der Genotypisierung zu den Wildtyp- und Knockout- Zellen gegeben. Um eine unnötige Stimulation von heterozygoten Zellen zu vermeiden, wurden die Zytokine erst nach der Genotypisierung zugesetzt.

3.2.3 Retrovirale Infektion fötaler Leberzellen

Diese Methode wurde im Rahmen der Arbeit etabliert.

Die retrovirale Infektion der fötalen Leberzellen fand in 6-Loch Schalen statt.

Dazu wurde jede der 6 Wachstumsflächen nach Angaben des Herstellers mit $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ RetroNectin™ (BioWhittaker Europe, Taufkirchen, Deutschland) beschichtet. An das RetroNectin™ konnten im Folgenden die Retroviren binden. Hierzu wurde 1 ml der retroviralen Überstände auf die beschichtete Platte gegeben und 30 Minuten bei 4°C und 2000 rpm zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde so oft mit jeweils frischem Überstand wiederholt, bis eine MOI (*Multiplicity of Infection*) von 3 erreicht war. Eine MOI von 3 bedeutet, dass auf eine Zelle 3 Viren treffen. Insgesamt war zu berücksichtigen, dass nur etwa die Hälfte der vorhandenen Viren an das RetroNectin™ bindet.

Die fötalen Leberzellen wurden in einer Konzentration von 1×10^6 / ml in Stammzellproliferationsmedium auf die Viren gegeben und über Nacht im Brutschrank kultiviert.

Am Morgen und am Abend des folgenden Tages wiederholte sich die Infektion der Zellen in gleicher Weise.

Im Anschluss an die dritte Infektion erfolgte nach 24 Stunden eine durchflußzytometrische Analyse (siehe Kapitel 3.5) der Zellen im Hinblick auf deren grüne Fluoreszenz. Diese war Folge der eGFP-Expression des Retrovirus'. Es wurden ca. 6-8 % grün fluoreszierende Zellen gemessen. Daraufhin wurden die Zellen in die Empfängermäuse transplantiert.

3.2.4 Transplantation

Als Empfängermäuse dienten subletal mit 8 Gy bestrahlte (durchgeführt mit Blutbestrahlungsgerät OB 29 Cs-137, Heraeus, Wehrheim, Deutschland) B-Zell-defiziente IgH^{-/-} Mäuse im Alter von 8-10 Wochen.

Die retroviral infizierten Zellen wurden gezählt und in einer Konzentration von 1×10^7 / ml in IMDM mit 100 U / ml Penicillin und 100 μg / ml Streptomycin aufgenommen.

Über eine Injektion in die Schwanzvene erfolgte die Transplantation von 2×10^6 Zellen pro Maus.

3.3 Probenentnahme aus Mäusen

Um den Phänotyp der Mäuse zu charakterisieren war es notwendig, verschiedene Gewebe mit verschiedenen Methoden zu untersuchen.

Alle Methoden sowie die Tötung der Mäuse genehmigte das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin, V B, Alt-Friedrichsfelde 60, 10315 Berlin in den zuvor von Frau Dr. Franziska Jundt gestellten Tierversuchsanträgen 89/99 und 119/02.

Im Folgenden sollen die Methoden, die zur Probenentnahme dienten, beschrieben werden.

3.3.1 Narkose

Die Mäuse wurden durch Inhalation von Äther narkotisiert. Dazu wurde der Äther auf ein saugfähiges Tuch gegeben, das sich im Deckel eines Glasbehälters befand. Die Maus wurde in den Glasbehälter gesetzt. Anhand der Narkosestadien nach Guendel wurde die Tiefe der Narkose bestimmt. Im Stadium III (chirurgische Toleranz) war es möglich, Blutentnahmen vorzunehmen.

3.3.2 Tötung

Die Mäuse wurden durch Genickbruch getötet. Dies entspricht den Richtlinien des GV-Solas/FELASA.

3.3.3 Blutentnahme

Nach der Narkotisierung der Maus erfolgte die Blutentnahme retrobulbär. Dazu wurde eine Glaskapillare vorsichtig hinter den Bulbus geführt und durch leichtes Drehen das retrobulbäre Kapillargeflecht erreicht. Das Blut stieg in die Glaskapillare und konnte aus dieser in ein Reaktionsgefäß überführt werden.

Für FACS-Analysen (siehe Kapitel 3.5) war eine Hemmung der Gerinnung des Blutes mit Natriumcitrat notwendig. Außerdem wurden die Erythrozyten hypoton lysiert um ein Verkleben der Probe im Gerät zu verhindern, sowie unspezifische Antikörperbindungen an die Erythrozyten zu vermeiden.

Die Lyse erfolgte 10 Minuten bei Raumtemperatur in 15 ml Puffer mit folgender Zusammensetzung:

4,15 g Ammoniumchlorid (NH_4Cl),
0,84 g Dinatriumhydrogencarbonat ($\text{Na}_2(\text{H})\text{CO}_3$),
1 ml 0,5 M EDTA (pH 8),
ad 500 ml destilliertes Wasser.

Der pH-Wert wurde mit 0,1 M Salzsäure auf 7,3 eingestellt.

Danach wurde der Lysepuffer mit 15 ml PBS / 2 % FKS inaktiviert. Nach einer Zentrifugation von 10 Minuten bei 1500 rpm, wurden die Zellen in 5 ml PBS aufgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gestellt.

3.3.4 Sektion

Die Sektion erfolgte nach der Tötung der Maus durch Genickbruch.

Der Körper wurde auf dem Rücken liegend mit vier Nadeln an den distalen Extremitäten auf einer Styroporunterlage fixiert.

Mit einer Schere wurde die Bauchdecke entlang der Linea Alba bis auf Höhe des Sternums eröffnet, ohne dabei das Bauchfell zu verletzen. Ein intaktes Bauchfell erleichterte das Auffinden der Kniefaltenlymphknoten, die sich direkt im subkutanen Fettgewebe befinden. Nach Anlegen von Entlastungsschnitten entlang der Rippenbögen und in Richtung Kniefalten konnte die Bauchdecke aufgeklappt und ebenfalls mit Nadeln fixiert werden. Zur Präparation der inneren Organe (Milz und Lymphknoten) musste schließlich das Bauchfell eröffnet werden.

3.3.4.1 Entnahme und Aufbereitung der Lymphknoten

Entnommene Kniefalten- und Darmlymphknoten dienten den Untersuchungen.

Für histologische Schnitte wurden die Lymphknoten auf Trockeneis in Tissue-Tek (Miles, Elkhart, USA) eingefroren und bei -80°C gelagert.

Für FACS-Analysen und zur Zellsortierung wurde die Kapsel der Lymphknoten angeschnitten und die Lymphknoten durch einen Nylon Zellfilter (*Cell Strainer*, Falcon, Heidelberg, Deutschland) mit $100\ \mu\text{m}$ Porengröße gedrückt. Durch Resuspendierung mit 20G und 26G Kanülen konnten die Zellen in eine Einzelzellsuspension überführt werden. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Zellen in PBS auf Eis gelagert.

3.3.4.2 Entnahme der Milz

Nach der Trennung von Gefäßen, Bändern und Bindegewebe ist es möglich, die Milz zu entnehmen.

Für histologische Schnitte wurde die Milz auf Trockeneis in Tissue-Tek eingefroren und bei -80°C gelagert.

Für FACS-Analysen und zur Zellsortierung wurde die Kapsel der Milz angeschnitten und die Milz durch einen Nylon-Zellfilter gedrückt. Durch Resuspendierung mit 20G und 26G Kanülen konnten die Zellen in eine Einzelzellsuspension gebracht werden.

Da der Anteil der Erythrozyten in der Milz sehr hoch ist, mussten diese zunächst wie für das Blut schon beschrieben (siehe Kapitel 3.3.3) hypoton lysiert werden, bevor die Zellen weiterverarbeitet wurden.

3.3.4.3 Entnahme des Knochenmarks

Femur und Tibia wurden entnommen, von Muskulatur gesäubert und in PBS auf Eis gestellt. Durch Fixation mit einer anatomischen Pinzette war es möglich, eine Seite zu eröffnen und das geschlossene Ende mit einer 26G Kanüle an einer 1 ml Spritze, gefüllt mit PBS, zu durchstechen. So konnte das Knochenmark herausgespült und in PBS auf Eis aufgefangen werden. Die hämatopoietischen Zellen des Knochenmarks wurden durch eine 26G Kanüle in Einzelzellen resuspendiert.

Für FACS-Analysen und zur Zellsortierung war eine Erythrozytenlyse notwendig, wie sie schon für das Blut beschrieben wurde.

3.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)–Analysen

Taq DNA-Polymerase und der dazugehörige Puffer wurden von der Firma Roche (Mannheim, Deutschland) bezogen. Die PCR-Analysen wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die optimalen Schmelztemperaturen der Oligonukleotide wurden über einen Temperaturgradienten in einem speziellen PCR Cycler (Gradientcycler, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) ermittelt. Als Anhaltswert für die getesteten Temperaturen wurde die theoretische Schmelztemperatur (T_m) für die Primer durch folgende Formel bestimmt:

$$T_m = 2^{\circ}\text{C} \cdot (A + T) + 4^{\circ}\text{C} \cdot (G + C)$$

Für die Extension wurden 90 sec pro 1000 zu amplifizierende Basen angenommen. Die Anzahl der Zyklen war abhängig von den Primern und lag je nach Primerpaar zwischen 30 und 38.

3.4.1 Typisierung der I κ B α -Mäuse und Föten

Aus den Verpaarungen von heterozygoten I κ B α -Mäusen entstehen nach den Mendelschen Regeln 1/2 heterozygote Nachkommen (+/-), 1/4 Knockout-Nachkommen (-/-) und 1/4 Wildtyp-Nachkommen (+/+). Um die Genotypen der Föten zu bestimmen, konnte aus einem Teil des Kopfes jedes Föten extrahierte DNA eingesetzt werden. Die Nachkommen wurden mit Hilfe von DNA, die aus der kupierten Schwanzspitze gewonnen wurde, genotypisiert.

Dazu wurde das jeweilige Gewebe eine Stunde lang bei 55°C in 200 μ l Lysepuffer (100 μ l 10 x PCR-Puffer, 45 μ l 1% 4-Noniphenolpolyethylenglycol (NP40, Roche, Mannheim, Deutschland), 45 μ l 1% Tween 20 (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), 20 μ l 10 μ g/ μ l Proteinase K (Sigma), 790 μ l destilliertes Wasser) inkubiert. Daraufhin war es erforderlich, die Restaktivität der Proteinase K durch Erhitzen des Lysates für 10 Minuten auf 95°C zu inhibieren. Mit Hilfe des *Spin Tissue Kits* von Invitex (Berlin, Deutschland) wurde die DNA nach den Angaben des Herstellers extrahiert.

Die Bestimmung der Genotypen fand mittels PCR statt.

Folgende Primer wurden hierbei verwendet:

I κ B α 59wt: 5' – cag ccc cgc aca gcc atg ttt cag – 3'

I κ B α 39wt: 5' – cat gga gtc cag gcc gct gtc gtc – 3'

I κ B α 39rec: 5' – tcg cca ttc agg ctg cgc aac tgt – 3'

Die Reaktionsansätze setzten sich wie folgt zusammen:

Identifizierung des rekombinanten Allels:

2 μ l des DNA-Eluates,
 6 μ l MgCl₂ (Promega, 25 mM),
 3 μ l dNTP-Mix (je 10 mM),
 0,5 μ l I κ B α 59wt (50 mM),
 0,5 μ l I κ B α 39rec (50 mM),
 5 μ l 10 x Taq-Polymerase Puffer,
 0,2 μ l Taq-DNA-Polymerase (5 U/ml),
 ad 50 μ l destilliertes Wasser.

Identifizierung des Wildtyp-Allels:

50 μ l des DNA-Eluates wurden eingedampft und im Reaktionsansatz eluiert.
 6 μ l MgCl₂ (Roche, 25 mM),

3 μ l dNTP-Mix (je 10 mM),
 0,5 μ l I κ B α 59wt (50 mM),
 0,5 μ l I κ B α 39wt (50 mM),
 5 μ l 10x Taq-Polymerase Puffer,
 0,2 μ l Taq-DNA-Polymerase (5 U/ml),
 ad 50 μ l destilliertes Wasser.

Die Amplifikation erfolgte unter folgenden Bedingungen:

3 Minuten 94°C; 30 Zyklen: 40 Sekunden 63°C, 90 Sekunden 72°C, 40 Sekunden 94°C, 1 Minute 63°C; 10 Minuten 72°C, 4°C bis zur Entnahme.

Zur Ermittlung des Wildtyp-Allels wurden die Primer I κ B α 59wt und I κ B α 39wt eingesetzt. Das zu erwartende Amplifikat war 220 Basenpaare (bp) lang. Zur Ermittlung des Knockout-Gens wurden die Primer I κ B α 59wt und I κ B α 39rec eingesetzt. Es entstand ein Amplifikat von 180 bp. Föten, die beide Amplifikate aufwiesen, waren heterozygot. Beispiele für die Genotypisierung sind in Abbildung 9 gegeben.

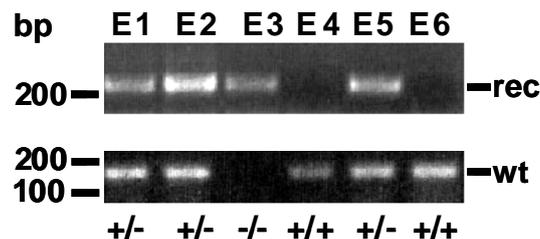


Abb. 9: PCR-Analyse der Typisierung der Embryonen

Die oberen Banden identifizierten das rekombinante Allel, die unteren das Wildtyp-Allel. Die Genotypen der Embryonen (E1-E6) sind unterhalb der Banden dargestellt. Embryonen, in denen beide Gene amplifiziert wurden, waren heterozygot (+/-) für I κ B α , Embryonen, die nur das rekombinante Gen aufwiesen, waren knockout Embryonen (-/-), und Embryonen, die nur die Wildtyp-Bande zeigten, hatten eine physiologische Expression des Gens (+/+). E1, E2 und E5 sind demzufolge heterozygot, E3 ist ein Knockout-Embryo und E4, E6 sind Wildtyp-Embryonen.

In dergleichen Weise wurden auch die Nachkommen aus der Zucht typisiert. Es wurden I κ B α heterozygote Tiere mit C57BL/6 Mäusen (Charles River Laboratories, Wilmington, USA) gekreuzt. Da auch die I κ B α heterozygoten Tiere aus C57BL/6 Mäusen generiert wurden, handelte es sich hierbei um eine Rückkreuzung. Aus diesen Verpaarungen waren 1/2 Wildtyp-Nachkommen und 1/2 heterozygote Nachkommen zu erwarten. Die Wildtyp-Nachkommen wurden getötet, während die heterozygoten entweder zur Zucht mit C57BL/6 Mäusen, oder (zur Generierung von Knockout-Föten) mit ebenfalls heterozygoten Nachkommen verpaart wurden.

3.4.2 Reverse Transkription (RT)-PCR

Die Aktivität verschiedener Gene in immunologisch aktiven Geweben wie Milz, Knochenmark und Lymphknoten der Chimären auf transkriptioneller Ebene wurde durch RT-PCR analysiert. Dazu wurde aus den wie in Kapitel 3.6.2 beschrieben, sortierten Zellen mit Hilfe des *Rneasy Mini Kits* von Invitrogen (Groningen, Holland) nach Anweisungen des Herstellers RNA isoliert. Die Konzentration wurde mit dem Photometer (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg) bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen. Dabei gilt folgende Beziehung:

$$OD_{260} 1 = 40 \mu\text{g ssRNA}$$

Das Verhältnis von OD_{260}/OD_{280} gibt Auskunft über die Reinheit der Präparation. Ein Faktor zwischen 1,8 und 2 steht für eine proteinarme Lösung.

Jeweils 0,1 μg der gesamtzellulären RNA wurde mit 100 pmol Oligo-(dT₁₅)-Primern 5 min lang bei 65°C denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Die Elongationsreaktion mit *Superscript™ II-Reverse Transkriptase* (Invitrogen, Groningen, Holland) erfolgte nach Angaben des Herstellers. In der sich anschließenden PCR-Reaktion wurden je nach Primerpaar 1-2 μl cDNA aus 20 μl des RT-Reaktionsansatzes eingesetzt. Um zu kontrollieren, ob eine gleichmäßige Menge an cDNA eingesetzt wurde, war zu jeder Präparation eine Kontroll-PCR auf β_2 -Microglobulin obligatorisch. Bei gleichmäßiger Beladung waren hier die Banden gleichstark ausgeprägt und dienten somit als interne Referenz.

Tab. 1: Amplifikationsbedingungen der RT-PCRs

Pax5	19 μl	destilliertes Wasser	Id2	19 μl	destilliertes Wasser
30 Zyklen	2,5 μl	10xPuffer(15 mM MgCl ₂)	32 Zyklen	2,5 μl	10xPuffer
Annealing-Temperatur: 61,5°C	1 μl	MgCl ₂ (25 mM)	Annealing-Temperatur: 58°C	1 μl	MgCl ₂
Amplifikat-Größe: 501 bp	0,5 μl	dNTP (10 mM)	Amplifikat-Größe: 293 bp	0,5 μl	dNTP
	0,5 μl	Primer-F (50 μM)		0,5 μl	Primer-F
	0,5 μl	Primer-R (50 μM)		0,5 μl	Primer-R
	0,3 μl	Taq (1 U / μl)		0,3 μl	Taq
	1 μl	cDNA		1 μl	cDNA
EBF	19 μl	destilliertes Wasser	LMP2A	37,7 μl	destilliertes Wasser
32 Zyklen	2,5 μl	10xPuffer	35 Zyklen	5 μl	10xPuffer
Annealing-Temperatur: 58°C	1 μl	MgCl ₂	Annealing-Temperatur: 58°C	2 μl	MgCl ₂
Amplifikat-Größe: 398 bp	0,5 μl	dNTP	Amplifikat-Größe: 233 bp	1 μl	dNTP
	0,5 μl	Primer-F		1 μl	Primer-F
	0,5 μl	Primer-R		1 μl	Primer-R
	0,3 μl	Taq		0,3 μl	Taq
	1 μl	cDNA		2 μl	cDNA

Jagged 1	16,5 µl	destilliertes Wasser	Hes1	19 µl	destilliertes Wasser
35 Zyklen	2,5 µl	10xPuffer	34 Zyklen	2,5 µl	10xPuffer
Annealing-Temperatur: 58°C	1 µl	MgCl ₂	Annealing-Temperatur: 63°C	1,5 µl	MgCl ₂
Amplifikat-Größe: 364 bp	1 µl	dNTP	Amplifikat-Größe: 280 bp	0,5 µl	dNTP
	1 µl	Primer-F		0,5 µl	Primer-F
	1 µl	Primer-R		0,5 µl	Primer-R
	0,3 µl	Taq		0,3 µl	Taq
	2 µl	cDNA		2 µl	cDNA
Notch1	19 µl	destilliertes Wasser	β₂-mikroglobulin	19 µl	destilliertes Wasser
35 Zyklen	2,5 µl	10xPuffer	30 Zyklen	2,5 µl	10xPuffer
Annealing-Temperatur: 58 °C	0 µl	MgCl ₂	Annealing-Temperatur: 57°C	1,5 µl	MgCl ₂
Amplifikat-Größe: 358 bp	0,5 µl	dNTP	Amplifikat-Größe: 162 bp	0,5 µl	dNTP
	0,5 µl	Primer-F		0,5 µl	Primer-F
	0,5 µl	Primer-R		0,5 µl	Primer-R
	0,3 µl	Taq		0,3 µl	Taq
	1,5 µl	cDNA		1 µl	cDNA

Die Bedingungen, unter denen die Amplifikationen stattfanden, wurden wie folgt etabliert:

Pax5, Id2, EBF, Jagged1, LMP2A, β₂-Microglobulin:

5 Minuten 94°C; individuelle Zyklenzahl (siehe Tabelle 1): 15 Sekunden 94°C, 30 Sekunden individuelle Annealingtemperatur (siehe Tabelle 1), 75 Sekunden 72°C; 90 Sekunden 72°C; 5 Minuten 72°C, 4°C bis zur Entnahme.

Notch1:

5 Minuten 94°C; 35 Zyklen: 30 Sekunden 94°C, 30 Sekunden 58°C , 90 Sekunden 72°C, 90 Sekunden 72°C; 5 Minuten 72°C, 4°C bis zur Entnahme.

Entwicklung der Primersequenzen

Über die Nukleotid-Suchfunktion des NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) konnten die mRNA-Sequenzen der verschiedenen untersuchten Gene festgestellt werden. Um innerhalb dieser Sequenzen mögliche Primer zu finden, war es erforderlich, diese Sequenzen über ein Suchprogramm nach Abschnitten zu durchsuchen, die bestimmte Bedingungen erfüllten. So sollten die Primer etwa 20 Basen lang sein, einen GC-Gehalt von nicht mehr als ca. 60 % aufweisen. Außerdem sollte die Amplifikatlänge zwischen 200 und 500 Basenpaaren (bp) liegen. Das verwendete Programm *Primer 3* wurde vom Howard Hughes Medical Institute, dem National Institutes of Health und National Human Genome Research Institute entwickelt und der Öffentlichkeit unter http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi zur Verfügung gestellt. Um mögliche Sequenzhomologien zu anderen Gensequenzen zu erkennen, war ein

Vergleich der Sequenzen mit dem Mausgenom über die *BLAST*-Funktion des NCBI obligatorisch. Erst wenn dieser Vergleich keine Homologien mit anderen Genen ergab, wurden die Primerpaare eingesetzt.

Tab. 2: Folgende Primersequenzen wurden von der Firma Biotex (Berlin, Deutschland) synthetisiert

Primerbenennung	Sequenzen
β -2-microglobulin-F	ttctgggtgctgtctcactg
β -2-microglobulin-R	ccgttcttcagcatttggat
EBF-F	ccaactcaccctatgccatt
EBF-R	gcaaggctcgggtattttgtt
Id2-F	ccaatcttttcaggacttt
Id2-R	tccccatggtgggaatag
LMP2A-F	tccatctgcttctggctctt
LMP2A-R	atgagtcacccgtggaga
Notch1-F	gccacatgtgagaatgatgc
Notch1-R	acctattgctgcatccac
Jagged1-F	agtgccagagctgaaccg
Jagged1-R	ctaaggctgcaatcaccattagg
Pax5-F	cagcaaaattcttggcaggt
Pax5-R	tgctgtgtgaacaggtctcc

3.4.3 Agarosegel-Elektrophorese

Die Amplifikate aus PCR und RT-PCR konnten im Agarosegel sichtbar gemacht werden. Dazu war es erforderlich, Agarose zu einem bestimmten Prozentsatz in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA) durch Erhitzung in der Mikrowelle (Bosch) zu lösen. Für Amplifikate bis zu 250 bp enthielt das Gel 2 % Agarose, bei bis zu 550 bp großen Amplifikaten enthielt es 1,5 % Agarose. Dem flüssigen Gel wurden etwa 40 ng/ml Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe, Deutschland) zugesetzt. Das Ethidiumbromid lagert sich in DNA-Stränge ein und kann durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die Gele wurden in Gelelektrophorese-Apparaturen der Firma peQLab (Erlangen, Deutschland) gegossen und nach Erhärtung einem Spannungsfeld ausgesetzt. Bei einer Spannung von 120 V liefen die auf das Gel aufgetragenen Proben etwa 35 min lang in Richtung Anode. Anhand eines Größenstandards (100 bp Plus, Gibco, Karlsruhe, Deutschland) konnte auf die Größe der Amplifikate und somit auf deren Spezifität zurückgeschlossen werden.

Auf einem UV-Licht Tisch (Biometra TI 3, Göttingen, Deutschland) war es durch Anregung des Ethidiumbromid möglich, die Banden sichtbar zu machen und über eine installierte Kamera (Biometra BioDoc OCD-Camera) zu fotografieren. Die Bilder konnten mit Hilfe von Biometra BioDoc II-Software bearbeitet und entweder über den

Sony Video Graphic Printer UP-890CE ausgedruckt oder elektronisch gespeichert werden.

Anhand der Intensität der Banden besteht die Möglichkeit, die transkriptionelle Aktivität bestimmter Gene in den Zellen abzuschätzen.

3.4.4 Quantifizierung der Banden

Durch die Interkalierung von Ethidiumbromid in die amplifizierten cDNA-Stränge konnten diese durch UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die Stärke der Banden spiegelt die Menge an amplifizierter cDNA wider und ist so Maßstab für die Transkription von Genen. Um eine objektive Beurteilung der Stärke der Banden zu ermöglichen, wurden diese mit Hilfe der ImageQuant® Software (Amersham, Freiburg) quantifiziert. Alle Banden wurden relativ zur Wildtyp-I κ B α Probe gemessen, die als Stärke 1 (bzw. 100%) definiert wurde. Zur Korrektur des Hintergrundes wurden die Funktionen der Volumen Integration und lokaler Durchschnitt verwendet.

3.5 Durchflußzytometrische Analysen (FACS)

Die Charakterisierung verschiedener Zellpopulationen in Milz, Knochenmark und peripherem Blut erfolgte mit Hilfe der Durchflußzytometrie.

Einzelzellen einer Zellsuspension können durch Durchflußzytometrie in einem FACS™-Gerät (Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) analysiert werden. Nach Färbung von Zellen mit Antikörpern, die an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind, kann man in der FACS-Analyse auf der Basis repräsentativer Zellen bestimmen, welcher Anteil von Zellen einer Population ein bestimmtes Protein exprimieren und welches relative Expressionsniveau erreicht wird.

Die Zellen passieren in einem Flüssigkeitsstrom einen Laser, der die Fluoreszenzfarbstoffe zum Leuchten bringt. Jede Zelle, die den Laser passiert, bricht dabei den Lichtstrahl, was zur Streuung des Lichts führt. Die Streuung des Lichtes wird durch verschiedene Parameter wie Zellgröße und Granularität beeinflusst.

Folgende optische Parameter konnten gleichzeitig gemessen werden:

Vorwärtsstreulicht (FSC = *forward scatter*): Das hier gemessene Streulicht dient als Maß für die Größe der Zellen. Große Zellen streuen das Licht stärker als kleine.

Seitwärtsstreulicht (SSC = *sideward scatter*): Die Intensität dieses Streulichtes ist abhängig von der Granularität der Zellen. Hierauf hat beispielsweise die Größe des Zellkerns Einfluss. Höhere Granularität bedingt eine stärkere Lichtstreuung. Abbildung 10 zeigt die Punktdiagramm- (*Dot Plot*-) Darstellung eines Vorwärts-/Seitwärtsstreulicht Bildes des peripheren Blutes einer Maus.

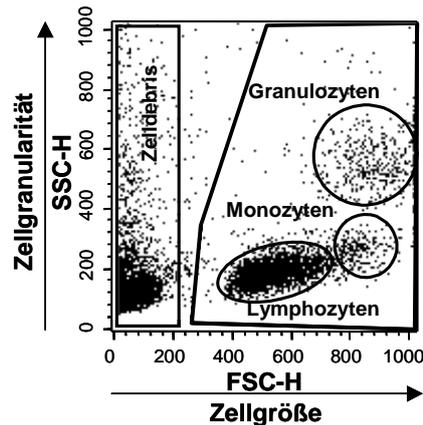


Abb. 10: Punktdiagramm Darstellung des peripheren Blutes

Punktdiagramm (*Dot Plot*) Darstellung eines Forwärts-/Seitwärtsstreulichtbildes des peripheren Blutes. Je weiter rechts sich die Zellen im Diagramm befinden, desto größer sind sie, was mit einer stärkeren Lichtstreuung einhergeht. Je weiter oben die Zellen im Diagramm liegen, desto höher ist ihre Granularität, was ebenfalls die Lichtstreuung steigert.

Fluoreszenz: Spezielle Filtersysteme brechen das seitwärts gestrahlte Licht in vier verschiedene Spektralbereiche. Damit ist es möglich, Einzel- bis Vierfach-Fluoreszenzen zu messen, was eine gleichzeitige Analyse mehrerer Zelloberflächenmarker erlaubt.

Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe unterscheiden sich dadurch, dass sie mit unterschiedlichen Wellenlängen angeregt werden oder das Licht in unterschiedlicher Wellenlänge emittieren.

Die Farbstoffe R-Phycoerythrin (PE) und TriColor (TC) sowie das von den Zellen exprimierte Protein enhanced Green Fluoreszent Protein (eGFP) werden mit einem Argon Laser der Wellenlänge 488 nm angeregt. Der Farbstoff Allophycocyanin (APC) lässt sich mit einem Helium-Neon-Laser der Wellenlänge 633 nm anregen.

Die Emissionsmaxima der Farbstoffe liegen bei folgenden Wellenlängen:

R-Phycoerythrin	→	578nm
TriColor	→	670nm
<i>enhanced Green Fluoreszent Protein</i>	→	510nm
Allophycocyanin	→	660nm

3.5.1 Fluoreszenzkomensation

Da sich die Emissionsspektren der Farbstoffe zum Teil überschneiden, ist es bei einigen Färbungen notwendig, die Intensität zu korrigieren.

Für die Kompensation einer unerwünschten Einstrahlung einer Fluoreszenz in einen überlappenden Fluoreszenzkanal kann diese anteilig von der gewünschten Emission subtrahiert werden (z.B. bei PE-Einstrahlung in den TC-Kanal: [%] TC – [%] PE). Hierfür müssen eigens geeignete Kontrollansätze angesetzt werden (z.B. IgM PE / B220 TC).

Das Gerät, das verwendet wurde, war das *FACS Calibur*® von Beckton Dickinson (Heidelberg, Deutschland). Die Auswertungen erfolgten mit *Cell Quest Pro* Software (Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland).

3.5.2 Färbung der Zellen

Milz, Knochenmark und Blut wurden, wie schon unter Kapitel 3.3 beschrieben, in Einzellzellsuspension verbracht.

Vor der Färbung wurden die Zellen noch einmal in PBS gewaschen.

Pro Färbungsansatz von Zellen aus Milz und Knochenmark wurden 2×10^5 Zellen eingesetzt. Die gesamten Zellen nach der Lyse von ca. 200 μ l Blut wurden auf maximal 10 Färbungen aufgeteilt. Die Färbungen wurden in 96-Loch-Rundboden Platten durchgeführt. Die Milz- und Knochenmarkzellen wurden in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen/25 μ l/Färbung, die Zellen aus dem Blut in 25 μ l/Färbung in Färbepuffer (PBS/2 % FKS) mit 2 % Rattenserum aufgenommen. Das Rattenserum diente der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen durch die aus Rattenserum gewonnenen Antikörper, die für die Färbungen eingesetzt wurden.

Die jeweiligen Antikörper wurden in der nachfolgenden Tabelle 3 zu entnehmenden Endkonzentration eingesetzt. Sie wurden in 25 μ l Färbepuffer/Färbung vorgemischt und auf die Zellsuspensionen gegeben.

Tab. 3: Für FACS-Analysen verwendete Antikörper

Antikörper	Farbstoff	Hersteller	Quelle	Verdünnung
B220	PE	Pharmingen, Heidelberg	Ratte	1/200
B220/CD45R	TC	Caltag, Burlingame, USA	Ratte	1/200
IgM	PE	Pharmingen	Ratte	1/100

Nach einer Inkubation von 30 Minuten auf Eis bei Dunkelheit wurden die Zellen mit je 200 μ l Färbepuffer gewaschen und 10 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in einem Volumen von 250 μ l PBS aufgenommen und zur Messung in FACS-Röhrchen überführt.

3.6 Zellsortierungsverfahren

Um in Western Blot Analysen und RT-PCR's eine Analyse der B-Zellen durchführen zu können, war es notwendig, die B-Zellen aus Milz und Knochenmark zu isolieren.

3.6.1 Aufreinigung der B-Zellen aus der Milz durch MACS®-Säulen

Wie schon im Kapitel 3.3.4.2 beschrieben, wurden die Zellen aus der Milz vereinzelt. Die B-Zell-Separation erfolgte mit Hilfe des *B-cell Isolation Kit, mouse* der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland) nach den Anleitungen des Herstellers. Alle Zellen mit Ausnahme der B-Zellen wurden durch einen Antikörpercocktail (CD43, CD4, Ter-119) markiert. Die an die Zellen gebundenen Antikörper konnten im nächsten Schritt an Magneten in der Größe kolloidaler Teilchen gebunden werden. Eine Aufreinigung über eine *MACS-LS®*-Säule, die sich in einem Magneten befand, trennte die magnetisch markierten Zellen von den unmarkierten B-Zellen. Diese konnten die Säule passieren und wurden in 15 ml Röhrchen aufgefangen. Die Methode ermöglicht die Aufreinigung von B-Zellen ohne deren Stimulation durch Antigenkontakt, also von so genannten *untouched* B-Zellen. Bis zur Verwendung wurden die Zellen bei -80°C gelagert.

3.6.2 Zellsortierung nach Fluoreszenz

Bei dieser Form der Zellsortierung wurde eine Eigenschaft der Zellen ausgenutzt, die sie durch die Infektion mit Retroviren erhalten hatten. Nach dem erfolgreichen Einbau des retroviral kodierten eGFP zusammen mit LMP2A in das Genom der Stammzellen, konnte hier die Expression des eGFP zur Sortierung genutzt werden.

Für den Vergleich der Eigenschaften von LMP2A-exprimierenden und nicht exprimierenden B-Zellen in RT-PCR und B-Zell-Stimulations-Analysen war es notwendig, die verschiedenen Zellen durch Sortierung zu trennen. Die B-Zellen wurden wie in Kapitel 3.5 beschrieben mit dem PE-markierten Pan-B-Zell-Marker B220 angefärbt. So waren über die eGFP-Expression LMP2A-positive von -negativen Zellen zu unterscheiden sowie über die Färbung von B220 B-Zellen von nicht-B-Zellen.

Für die Zellsortierung konnte der *FACS Diva®* Zellsortierer der Firma Beckton Dickinson eingesetzt werden. Die Sortierung wurde am Deutschen Rheumaforschungszentrum in Berlin durch Herrn Thoralf Kaiser (Charité/MPIIB/DRFZ Flow cytometry und cellsorting core facility, Berlin, Deutschland) durchgeführt.

3.7 Proteinpräparation

Um im Western Blot und in der Gelretardation (siehe Kapitel 3.9 und 3.10) spezielle Proteine analysieren zu können, wurde ein Gesamtzell-Proteinextrakt aus den Zellen gewonnen.

Dies geschah durch eine Hochsalzlyse. Dazu wurden $1-5 \times 10^6$ Zellen in 100-200 μl Lysepuffer für 15 min auf Eis lysiert, dann bei 15000 rpm und 4°C in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Das Gesamtprotein befand sich im Überstand, der bis zur Verwendung bei -80°C gelagert wurde.

Ein Zusatz von Proteinase- und Phosphataseinhibitoren zum Hochsalz-Lysepuffer verhinderte die unspezifische Lyse der Proteine, Detergentien unterstützten die Aufschlüsselung der Zellstrukturen.

Der eingesetzte Lysepuffer war wie folgt zusammengesetzt:

20 μl 1 M HEPES,

70,4 μl 5 M Natriumchlorid (NaCl),

1 μl 0,5 M Ethylendiamintetraacetat (EDTA),

1 μl 1 M Magnesiumchlorid (MgCl_2),

0,2 μl 0,5 M Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraacetat (EGTA),

1 μl 10 mg/ml Pefablock (Proteinaseinhibitor),

100 μl NP 40 (Detergens),

5 μl 100 mM Dithiothreitol (DTT) (Detergens),

5 μl 200 mM Sodiummolybdat (Phosphataseinhibitor),

1 μl 1mg/ml Aprotinin (Proteinaseinhibitor),

ad 1 ml destilliertes Wasser.

3.8 Proteinmengenbestimmung nach Bradford

Da im Western Blot nicht nur die qualitative Aussage über das Vorhandensein eines Proteins interessant ist sondern auch die quantitative Aussage, wie stark die Expression im Vergleich zu anderen Zellen ist, muss von jedem Gesamtproteinextrakt die gleiche Menge verwendet werden. Deshalb muss die Gesamtproteinmenge jeder einzelnen Probe zuvor bestimmt werden.

Die Proteinmengenbestimmung nach Bradford basiert auf einer spezifischen Farbreaktion, bei der Coomassie Brilliantblau G250 verwendet wird. Dieser Farbstoff reagiert mit den Proteinen und bildet Komplexe, die ein Absorptionsmaximum bei

$\lambda = 595 \text{ nm}$ haben, während der ungebundene Farbstoff ein Absorptionsmaximum bei 465 nm zeigt. Das Verfahren eignet sich gut, um Proteinmengen im Bereich von $1\text{-}10 \mu\text{g}$ Gesamtprotein zu bestimmen.

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem BioRad[®]-Proteinassay (BioRad, München, Deutschland). Als Standard diente Rinderserumalbumin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in den Konzentrationen von $1\text{-}10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Zur Bestimmung des Gesamtproteins wurde $1 \mu\text{l}$ des Gesamtproteins in 0.5 ml Assay-Puffer aufgenommen und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend konnten die Proben im Eppendorf Biophotometer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) vermessen werden. Als Referenz zur Berechnung der Werte diente ein proteinfreier Ansatz.

3.9 Western Blot Analysen, Immunoblottingverfahren

Mit Hilfe des Immunoblottings können einzelne Proteine aus einem Gesamt-Proteinpool (z.B. Gesamtzelllysate) aufgetrennt und mit Antikörpern quantifiziert und qualifiziert werden. Dabei sorgen denaturierende Agenzien dafür, dass die Eigenladung der Proteine neutralisiert wird, die Proteine bei Anlegen eines elektrischen Feldes zur Anode wandern und nach Molekülgrößen aufgetrennt werden können (je kleiner das Molekül bzw. die molekulare Masse ist, desto schneller wandert es). Mit Hilfe von Farbmarkern (*Rainbow Marker High Molecular Weight* und *Low Molecular Weight*, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) kann dann die Größe der Proteine bestimmt werden. Nach Überführen der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (*Blotting*) kann durch einen spezifischen Antikörper ein Protein identifiziert werden.

Die verwendeten Puffer und Lösungen werden hier tabellarisch in ihrer Zusammensetzung aufgeführt:

Blockpuffer

50 ml 1 M Tris pH 7,5,
30 ml 5 M Natriumchlorid (NaCl),
10 g Magermilchpulver,
10 ml 10 % Triton x 100,
ad 1 l destilliertes Wasser.

Blotpuffer

1 l 20 % Methanol,
29,1 g 20 mM Tris,
14,65 g 150 mM Glycin,

9 ml 20 % SDS,
ad 5 l destilliertes Wasser.

10 x Laufpuffer

60,4 g Tris,
376 g Glycin,
200 ml 10 % SDS,
ad 2 l destilliertes Wasser.

4 x Lämmli-Puffer

2 ml 1 M Tris pH 6,8 (= 200 mM),
4 ml 100 % Glycerol (= 40 %),
1,6 g SDS (= 16 %),
2 ml 100 % 2-Mercapto-Ethanol (= 20 %),
100 µl 2 % Bromphenolblau (= 0,02 %),
ad 10 ml destilliertes Wasser.

3.9.1 Denaturierende Elektrophorese

Mit Hilfe von Acrylamid-Gelen können Proteine der Größe nach aufgetrennt werden. Das Sammelgel (mit 5% Acrylamid) dient dazu, die aufgetragenen Proteinproben an einer Front auszurichten, so dass sie nahezu gleichzeitig in das Trenngel (mit 8-12% Acrylamid) übergehen können. Hier werden sie der Größe nach aufgetrennt.

Dabei können für verschiedene Proteine, je nach Molekülgröße des gesuchten Proteins, unterschiedlich dichte Acrylamid-Gele und damit Gele mit verschieden großen Poren hergestellt werden. Möchte man beispielsweise Proteine von 30 bis 70 kDa nachweisen, so empfiehlt sich ein 12 %-iges Gel. Größere Proteine bis zu 200 kDa lassen sich gut in einem 8 %-igen Gel auftrennen.

Bei der Identifikation von LMP2A, dessen molekulare Masse ca. 58 kDa beträgt, wurde ein 12 %-iges Trenngel verwendet.

Zusammensetzung der Gele:

Sammelgel (mit 5% Acrylamid):

3,6 ml destilliertes Wasser; 625 µl 1 M Tris pH 6,8; 625 µl 40 % Acrylamid; 50 µl 10 % Sodiumdodecylsulfat (SDS); 400 µl 10% Ammoniumpersulfat (APS); 40 µl N,N,N',N',-Tetramethylendiamin (TEMED)

Trenngel (mit 12% Acrylamid):

5,2 ml destilliertes Wasser; 4,7 ml 1 M Tris pH 8,8; 2,5 ml 40 % Acrylamid; 125 µl 10 % SDS; 600 µl 10 % APS; 60 µl TEMED

Das Acrylamid dient als Quervernetzer. APS startet die Polymerisierung des Gels und TEMED beschleunigt die Reaktion. Als Tensid fungiert hier das SDS und sorgt damit für die Denaturierung der aufgetragenen Proteine.

Für das Gießen der Gele wurden Gelkammern (BioRad, München, Deutschland) genutzt. Dabei wurde im ersten Schritt die frisch zubereitete Trenngel-Lösung zwischen zwei Glasplatten gegossen, mit Ethanol überschichtet und zur Polymerisierung bereitgestellt. Nach Abgießen des Ethanols konnte ein Kamm eingehängt und das Sammelgel auf die Trenngelschicht gegeben werden. War auch dieses polymerisiert, wurde der Kamm entfernt. Nun wurde die Elektrophoresekammer mit Laufpuffer aufgefüllt und die vorher 1:4 mit Lämmli-Probenpuffer auf ein Gesamtvolumen von 20 µl versetzten und 10 min bei 95°C denaturierten Proben vorsichtig in die Taschen des Gels aufgetragen. Zusätzlich wurde 10 µl der Farbmaler-Lösung in eine Tasche aufgetragen.

Marker:

205 kDa → blau (Myosin),

116 kDa → türkis (β-Galaktosidase),

66 kDa → pink (Albumin),

45 kDa → gelb (Ovalbumin),

29 kDa → orange (Carboanhydrase),

20 kDa → grün (Trypsin Inhibitor).

Anschließend wurde eine elektrische Spannung angelegt. Für die Ausrichtung der Proteine im Sammelgel lag diese bei ca. 80 V (für ca. 20 min.), danach bei 100-120 V für den Trennprozess im Trenngel. Die Auftrennung der Proben nahm ca. 2-3 Stunden in Anspruch.

3.9.2 Blotting

Durch *Blotting* transferiert man die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland).

Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel vorsichtig von seinen anhaftenden Glasplatten abgelöst und auf eine zuvor in Blotpuffer äquilibrierte, Nitrocellulosemembran gelegt. Diese legte man zwischen, ebenfalls in Blotpuffer getränkte, dicke Filterpapiere und legte ein elektrisches Feld an. Dieses elektrische

Feld war senkrecht zur ersten Laufrichtung orientiert (oben: Kathode; unten: Anode), so dass die Proteine auf die Nitrocellulose überwechselten.

Der Transfer erfolgte für ca. 30 min bei 20 V im Transblot SD der Firma BioRad (München, Deutschland). Hierbei handelte es sich um ein so genanntes *semidry* System, bei dem der Transfer nicht in einem Becken mit Puffer stattfindet, sondern zwischen mit Puffer angefeuchteten Filterpapieren.

3.9.3 Kontrolle der gleichmäßigen Beladung anhand der Ponceau-Färbung

Zur Proteinfärbung mit dem Ponceaufarbstoff wurde die Membran etwa 5 Minuten gefärbt. Dabei wurde das Gesamtprotein auf der Membran angefärbt. So konnte gezeigt werden, dass die Proben auf dem Blot gleichmäßig aufgetragen wurden. Von jeder Probe wurden 30 µg eingesetzt. Um semiquantitative Vergleiche zwischen den Expressionsstärken eines Genproduktes in verschiedenen Proben zu machen, ist zu gewährleisten, dass von jeder Probe gleichmäßig viel Gesamt-Protein aufgetragen wird.

3.9.4 Detektion des Proteins

Nach dem Transfer wurde die Nitrocellulose-Membran in eine Schale gelegt und für 60 min auf dem Schüttler bei Raumtemperatur mit Blockpuffer (ca. 10 ml) inkubiert. Dies diente dazu, unspezifische Bindungen auf dem Blot mit Hilfe des Milchpulvers im Blockpuffer zu blockieren.

Auch alle folgenden Arbeitsschritte erfolgten auf dem Schüttler.

Die Membran wurde bei Raumtemperatur zwei Stunden mit dem primären Antikörper inkubiert. Der primäre Antikörper zur Detektion von LMP2A wurde von Frau Dr. Kremmer, Institut für Immunologie, GSF, München in Ratten hergestellt und unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Nach einem Waschvorgang über 3 x 10 min mit Blockpuffer erfolgte dann die Inkubation des Blots mit dem sekundären, gegen den primären gerichteten Antikörper (Peroxidase-konjugierter Anti-Ratte-Antikörper) für 30 min bei Raumtemperatur. Vor der Entwicklung des Blots erfolgte ein Waschschritt mit Blockpuffer für 3 x 10 min.

3.9.5 Entwicklung mit ECL-Detektionskit

Die vom Antikörper detektierte Bande konnte mit Hilfe des ECL-Kits (Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland, Lösung A und B in einem Verhältnis 1:1) sichtbar gemacht werden. Das Prinzip ist, dass die ECL-Reaktion durch die Peroxidase, die an den sekundären Antikörper gekoppelt ist, gestartet wird. Dies dauerte ca. 1-2 min. Anschließend erfolgte die Entwicklung, mit der man die Banden auf einem

Röntgenfilm sichtbar machen kann. Dazu wurde die Membran in Klarsichtfolie eingewickelt und ein Film (Kodak X-OMAT LS, Cedex, Frankreich) mit dieser Membran in der Filmkassette 8 Stunden exponiert. Die exponierten Filme wurden daraufhin entwickelt. Das gesuchte Protein war dann als schwarze Bande sichtbar. Mit Hilfe des Markers konnte die Größe des Proteins ermittelt werden.

3.10 Gelretardationsanalysen (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA)

Die erhöhte DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B in mit I κ B α -knockout hämatopoietischen Stammzellen transplantierten Mäusen konnte mittels Gelretardation nachgewiesen werden. Diese basiert auf der Tatsache, dass sich ein DNA-Protein-Komplex im Polyacrylamidgel langsamer im elektrischen Feld bewegt, als die Proteine ohne DNA-Bindung. Da der Transkriptionsfaktor NF- κ B über spezifische DNA-Bindungsstellen verfügt, ist es möglich diese Bindungen an ein Oligonucleotid, das radioaktiv markiert wird, nachzuweisen.

3.10.1 Hybridisierung des NF- κ B-DNA Oligonucleotids

Zwei komplementäre Nucleotidstränge mit Sequenzhomologie zur Bindungssequenz von NF- κ B im H2K Promotor und jeweils einem 5' AGCT Überhang wurden hybridisiert. Folgende Nucleotide wurden verwendet:

H2K 2001 +: 5' AGC TCA GGG CTG GGG ATT CCC CAT CTC CAC AGG 3'

H2K 2001 -: 5' AGC TCC TGT GGA GAT GGG GAA TCC CCA CCG CTG 3'

In Hybridisierungspuffer (250 μ l 1M Tris pH8, 70 μ l 5M NaCl, 180 μ l destilliertes Wasser) wurden die Stränge 10 min bei 95°C denaturiert. Eine langsame Abkühlung im Heizblock über Nacht ermöglichte eine Anlagerung der Stränge aneinander. Die hybridisierten Stränge konnten bei -20°C gelagert werden.

3.10.2 Radioaktive Markierung des Oligonucleotids

An die Basen des hybridisierten Oligonucleotids wurde eine mit 32 P radioaktiv angereicherte Base gebunden. In der vorliegenden Arbeit wurde radioaktiv markiertes CTP verwendet.

250 ng des H2K-Oligonucleotids wurden dabei eingesetzt. Zusammen mit 2,5 μ l 10 x Klenow Puffer (Roche, Mannheim, Deutschland), 1,8 μ l 5 mM dNTP (ohne CTP) (Roche, Mannheim, Deutschland), 1,5 MBq α - 32 P dCTP (Nunc, Wiesbaden, Deutschland), 6 U Klenow-Enzym (Roche, Mannheim, Deutschland) fand bei 37°C für 30-45 Minuten die Synthese-Reaktion statt.

Sepharose-Säulen, die zur Trennung von nicht gebundenen $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP und in den Oligonucleotidstrang eingebautem α P³² d CTP notwendig waren, wurden für 2 Minuten bei 1100xg gepackt (*Quick Spin Columns*, Roche, Mannheim, Deutschland). Eine Aufreinigung des Oligonucleotidstranges über die Säulen erfolgte durch eine Zentrifugation bei 1100 x g für 4 Minuten.

Um zu bestimmen, wie stark die radioaktive Markierung war, wurden die Zerfälle pro Minute (*counts per minute*) im Scintillationsmeßgerät (*Liquid Scintillation Counter*, Perkin Elmer, Boston, USA) mit Scintillationsflüssigkeit (Rotiszint Eco Plus, Roth, Karlsruhe, Deutschland) gemessen.

3.10.3 Gelretardation

Die für die Gelretardation verwendeten Gele waren 5 %-ige Polyacrylamid-Gele folgender Zusammensetzung:

3,6 ml 10 x TBE-Puffer (108 g Tris, 55 g Borsäure, 40 ml 0,5 M EDTA, ad 1 l destilliertes Wasser),
250 μl 10 %-iges APS,
25 μl TEMED,
4,5 ml 40%-iges Polyacrylamid,
29,5 ml destilliertes Wasser.

Zunächst wurden die Gele zwischen 2 Glasplatten polymerisiert. Ein dabei eingeschobener Kamm sorgte für Gelaussparungen, die für die Beladung mit den Proben notwendig waren.

Für die Gelretardation benötigte man 5 μg der wie in Kapitel 3.7 beschrieben aufgereinigten und vermessenen Proteine. Für Supershift-Analysen, in denen die Untereinheiten p50 bzw. p65 von NF- κ B durch Bindung an spezifische Antikörper identifiziert werden sollten, wurden die Proteine für 10 Minuten mit 2 μl der Antikörper auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die Proteine bzw. die Protein-Antikörper Gemische mit je 10 μl 2 x Shift Puffer (40 mM Hepes, 120 mM Kaliumchlorid (KCl), 8 % Ficoll), 1 μl DTT, 1 μl 10 mg/ml Rinder Serumalbumin (BSA), 1 μl Poly [d(i-c)] (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und 20000 counts des gelabelten Oligonucleotids gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit bindet das Oligonucleotid an spezifische Bindungsstellen der Proteine. Daraufhin erfolgte die Beladung des Gels mit den Proben. Da die Probenlösungen farblos und somit nicht im Gel zu sehen waren, wurde zur Orientierung eine Tasche mit Lämmli-Puffer beladen. Das Gel wurde so lange in TBE-Puffer einer Spannung von etwa 200 V ausgesetzt, bis die Blaufront des Lämmli-Puffers ca. 5 cm vor Gelende angelangt war.

Nach der Ablösung des Gels von den Glasplatten war es erforderlich, das Gel auf Filterpapier mit Hilfe einer Vakuumpumpe auf einem Trockentisch zu trocknen.

Das getrocknete Gel wurde über Nacht bei -80°C in einer Röntgenfilmkassette mit einem Film inkubiert, der am nächsten Tag entwickelt werden konnte.

Eine Bindung des radioaktiv markierten NF- κ B-Oligonucleotids an das Protein konnte durch das Vorhandensein und die Stärke der Belichtung des Filmes an einer bestimmten Stelle festgestellt werden.

3.11 Immunhistologische Analysen

Bei immunhistologischen Analysen können Proteine in Gewebeschnitten durch Antikörper markiert und sichtbar gemacht werden. Mikroskopisch lässt sich so die Expression des Proteins und dessen Lokalisation (Zytoplasma, Zellmembran, Zellkern) bestimmen.

3.11.1 Anfertigung der Schnittpräparate

Die wie in Kapitel 3.3.4 beschrieben eingefrorenen Gewebe (Milz und Lymphknoten) konnten mit Hilfe eines Kryotoms (2800 Frigocut, Reichert-Jung, Deutschland) bei einer Temperatur von ca. -20°C 6 μm dünn geschnitten und auf Objektträger (ChemMate™ Capillary Gap Microscope Slides, 75 μm , Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark) aufgebracht werden. Es folgte eine 10 minütige Fixierung in Aceton. Nach etwa 20 minütiger vollständiger Trocknung bei Raumtemperatur konnten die Schnitte bei -80°C bis zur Verwendung gelagert werden.

3.11.2 Immunhistochemische Färbungen

Die bei -80°C gelagerten Schnitte wurden langsam zwischen 2 Karton-Objektträgerhaltern aufgetaut. Daraufhin wurden sie für 45 Minuten in Formalin fixiert, in der aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und 45 Minuten lang bei 63°C im Trockenschrank getrocknet. Nach vollständiger Trocknung konnte der primäre Antikörper 4H11 (LMP2A) in der Verdünnung 1:10 in RPMI-FKS (50 ml 10 x RPMI, 50 ml inaktiviertes FKS, 0,5 g Na-Azid, ad 500ml destilliertes Wasser, pH 7,4-7,6) über Nacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert werden.

Am nächsten Morgen war es erforderlich, den Antikörper durch intensives Abspülen mit Tris-Waschpuffer (0,04 M Tris-HCl, 0,007 M Tris-Base, 0,18 M NaCl, pH 7,5) zu entfernen. In einer Verdünnung von 1:50 in RPMI-FKS mit 10 % Humanserum (Biseko, Biotest Pharma GmbH, Dreieich, Deutschland) konnte der sekundäre Antikörper (Kaninchen anti Ratte Immunglobuline, Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark) für 30 Minuten auf den Präparaten in der feuchten Kammer inkubiert werden. Der Alkalische Phosphatase-Anti Alkalische Phosphatase Komplex gegen

Ratten Antigene (APAAP, Ratte, Monoclonal, Dako Cytomation) wurde nach Abspülen des sekundären Antikörpers in einer Verdünnung von 1:50 in RPMI-FKS für 30 Minuten inkubiert. Um das Signal zu verstärken, erfolgte die Wiederholung der Inkubation des sekundären Antikörpers und des APAAP Komplexes für je 15 Minuten. Die Alkalische Phosphatase reagierte mit dem Substrat der Entwicklungslösung (10 ml ChemMate™ AP Substrat Buffer, 1 Tropfen Levamisol, je 400 µl Chromogen Red 1, 2, 3, Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark) zu einem roten Reaktionsprodukt. Die Inkubation mit der Entwicklungslösung dauerte ca. 30 Minuten.

Der immunhistochemischen Färbung folgte eine Kernfärbung mit Hämalaun nach Mayer. Die Präparate wurden 1 Minute in einer Küvette in Hämalaun Lösung (3 g Hämatoxylin, 0,6 g Natriumjodat, 150 g Kalium-Alaun wurden auf ein Volumen von 3 l mit destilliertem Wasser aufgefüllt und über Nacht gerührt; am nächsten Tag wurden 150 g Chloralhydrat und 3 g Zitronensäure zugegeben und erneut über Nacht gerührt; alle Chemikalien stammten von der Firma Merck, Darmstadt, Deutschland) inkubiert und daraufhin ca. 1 Minute unter fließendem warmem Leitungswasser gebläut.

Mit 62°C warmer Kaisers Glyceringelatine (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurden die Präparate zur Konservierung eingedeckt.

3.12 Statistische Auswertungen

Die erhobenen FACS-Daten konnten mit Hilfe statistischer Testmethoden analysiert werden. Ausgeschlossen aus der Analyse wurden alle Mäuse, die weniger als 20 % grün fluoreszierende Zellen aufwiesen, um eine ausreichende Rekonstitution LMP2A-positiver Zellen zu gewährleisten. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS 11.0 für Windows (SPSS.Inc, Chicago, USA). Die Auswahl der Testmethoden fand nach Beratung durch das Institut für Biometrie der veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin statt.

3.12.1 Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben

Der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben ist ein nichtparametrischer Test, der nicht voraussetzt, dass für die betreffenden Daten eine Normalverteilung in der Grundgesamtheit angenommen werden kann. Es wird lediglich angenommen, dass die Messgrößen stetig und symmetrisch verteilt sind. Die Nullhypothese ist, dass sich die Messgrößen nicht unterscheiden.

Zur Analyse werden zunächst die Differenzen aus den Wertepaaren gebildet und mit Vorzeichen aufgelistet. Eine Rangliste aus den Absolutwerten der Differenzen wird erstellt. Daraufhin werden die Ränge addiert, die zu den Rängen mit dem selteneren

Vorzeichen gehören (Testgröße R). Die Nullhypothese wird abgelehnt, falls die Testgröße kleiner gleich einem tabellierten Wert ist.

Mithilfe der entsprechenden Formeln und Tabellen wird die Signifikanz berechnet.

Der Wilcoxon-Test wurde zur Auswertung der Daten angewendet, die die gleiche Zellpopulation innerhalb einer Maus betrafen.

3.12.2 U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney

Der U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney ist ein nichtparametrischer Zwei-Stichproben-Test für zwei unabhängige Stichproben. Auch er setzt für die Messgrößen keine Normalverteilung voraus. Die Nullhypothese ist ebenfalls, dass sich die Messgrößen nicht unterscheiden.

Zur Analyse werden die Werte aus zwei Stichprobengruppen zusammengeführt, und eine Rangliste nach Absolutwerten wird aufgestellt. Allen Daten wird so eine Rangzahl zugeordnet. Anschließend trennt man die beiden Stichproben wieder und addiert die Rangzahlen jeder Gruppe. Durch Einsatz in Formeln und Hinzuziehen von Tabellen ergibt sich die Signifikanz.

Der U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney wurde verwendet, um Daten zu vergleichen, die in den unterschiedlichen Gruppen der Mäuse erhoben wurden.

3.12.3 Student's t-Test

Beim t-Test handelt es sich um einen parametrischen Test, d.h. es wird davon ausgegangen, dass für die betreffenden Daten eine Normalverteilung in der Grundgesamtheit angenommen werden kann. Mit dessen Hilfe können Mittelwerte aus zwei Stichproben verglichen werden. Das Konfidenzintervall wurde als 95 % festgelegt. Bevor die Mittelwerte errechnet wurden, wurde überprüft, dass die Intra-Varianzen der Stichproben nicht signifikant unterschiedlich waren. Die Daten wurden als unabhängige Datensets verglichen.

Der t-Test wurde angewendet, um *in vitro* erhobene Daten über das Proliferationsverhalten kultivierter Zellen mit und ohne LMP2A Expression bzw. mit und ohne permanente Aktivität von NF- κ B zu vergleichen.