

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Zelllinien

2.1.1 C57BL/6 rag-1^{-/-} Mäuse (RAG-1 Mäuse)

Sechs bis acht Wochen alte weibliche C57BL/6 rag-1^{-/-} Mäuse wurden von der Zentralen Versuchstierzucht (ZVZ, Bundesinstitut für Risikobewertung) bezogen und unter keimfreien Bedingungen in einzelbelüfteten Käfigen bis zum jeweiligen Versuch gehalten. Futter und Wasser wurden sterilisiert und ohne Beschränkungen (ad libidum) verabreicht.

2.1.2 C57BL/6 Wildtyp-Mäuse (WT Mäuse)

Sechs bis acht Wochen alte weibliche, syngene, immunkompetente C57BL/6 Mäuse wurden von der Zentralen Versuchstierzucht (ZVZ, Bundesinstitut für Risikobewertung) bezogen und in der offenen Käfighaltung bis zum Versuchsbeginn gehalten. Nach der Infektion wurden die Tiere ebenfalls unter keimfreien Bedingungen in einzelbelüfteten Käfigen gehalten.

2.1.3 Zelllinien und Hybridome

Tab.: 2 Zelllinien und Hybridome			
Name	Beschreibung	Referenz	Bezugsquelle
CTLL-1 ATCC, TIB 214	murine T-Zelllinie	(Giorgi und Warner, 1981; Gillis und Smith, 1977)	P. Kaye; London School of Hygiene Tropical Medicine, Großbritannien
KY-1 Zellen	murine LAK Zelllinie	(Karlhofer et al., 1995)	W. Yokoyama; Howard Hughes Medical Institute, Washington University School of Medicine, St. Louis, USA
IL-2 transfizierte X63Ag8 653	Myelom-Zelllinie	(Karasuyama et al., 1988)	P. Kreamsner, Landesinstitut für Tropenmedizin; Berlin, Deutschland
Hybridom M5/114; ATCC, TIB 120	anti MHC II (I-A ^{bdq} -I-E ^{dk})	Springer T, Sidney Farber Cancer Inst., Boston	P. Kaye; London School of Hygiene Tropical Medicine, Großbritannien
Hybridom RB6-8C5	anti GR-1	Dynax, San Francisco (R. Coffman)	M.P. Schön, Hautklinik, Heinrich Heine- Universität Düsseldorf
Hybridom AN18.17.24	anti IFN- γ	(Prat et al., 1984)	H.-U. Weltzien MPI- Immunobiologie Freiburg, Deutschland
Hybridom 24G2 ATCC, HB 197	anti CD16/CD32	(Unkeless, 1979)	R. A. Kroczeck, Robert Koch- Institut Berlin
Hybridom R4-6A2 ATCC HB170	anti IFN- γ	(Spitalny und Havel, 1984)	P. Kaye; London School of Hygiene Tropical Medicine, Großbritannien
Hybridom Jes 6 1A12	anti IL-2	(Abrams et al., 1992)	Dynax, Palo Alto, USA
Hybridom JES 5-2A5	anti IL-10	Dynax, San Francisco (K.W. Moore)	G. Bancroft, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, Großbritannien
Hybridom Cl:A3-	anti F4/80	(Austyn und Gordon, 1981)	P. Kaye; London School of Hygiene Tropical Medicine, Großbritannien

2.1.4 Auftauen der Hybridome und Zelllinien

Die in flüssigem Stickstoff eingelagerten Hybridome oder Zelllinien wurden schnell bis 4 °C aufgetaut. Bei Temperaturen über 4 °C wirkt das im Einfriermedium enthaltene DMSO (Merck, vergl. Tab. 8) toxisch auf die Zellen, daher erfolgten alle weiteren Arbeitsschritte unter Kühlung in einem Eisbad. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen übertragen und mit ca. 4 ml 4 °C kaltem Kulturmedium (vergl. Tab. 7 und 15) tropfenweise unter ständigem Schütteln versehen. Hierdurch sollte ein langsames Angleichen der Zellen an den im Kulturmedium herrschenden osmotischen Druck ermöglicht werden, gleichzeitig

sollte der DMSO-Anteil des Einfriermediums verdünnt werden. 8 ml 4 °C kaltes Kulturmedium wurden direkt hinzupipettiert, und die Zellen wurden abzentrifugiert (4 °C, 10 min, 250 x g). Danach wurden die Zellen in 10 ml 37 °C warmem Kulturmedium (s.o.) resuspendiert, in 100 ml Zellkulturflaschen überführt und im Brutschrank inkubiert.

2.1.5 Einfrieren von Hybridomen und Zelllinien

Die Hybridome oder Zelllinien wurden in der logarithmischen Wachstumsphase aus der Zellkulturflasche in sterile 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und abzentrifugiert (4 °C, 10 min, 250 x g). Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und in 10 ml 4 °C kaltem Kulturmedium resuspendiert. Dann wurden die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und einer Trypanblaufärbung (Gipco) gezählt.

Die Zellzählung gegen Trypanblau ermöglicht die Differenzierung zwischen lebenden Zellen (farblos) und toten Zellen (blau eingefärbt). Die Zellen wurden danach abzentrifugiert (4 °C, 10 min, 250 x g), in einem Verhältnis von $1,0 \times 10^6$ lebenden Zellen / 0,5 ml in kaltem Einfriermedium I (vergl. Tab. 8) resuspendiert und dann auf die Einfrierröhrchen (Neolab, Berlin) portioniert. Zu den 0,5 ml Zellsuspension pro Einfrierröhrchen wurden 0,5 ml kaltes Einfriermedium II (vergl. Tab. 8) hinzupipettiert, gut durchmischt und sofort danach wurden die Einfrierröhrchen in einen Nalgene Cryo 1 °C Freezing Container (Nalge, Rochester, New York, USA) überführt und bei -70 °C langsam eingefroren. Ein langsames Einfrieren der Zellen mit einem hohen Proteinanteil im Einfriermedium sollte die Bildung von Eiskristallen verhindern, welche die Zellmembranen zerstören können. Nach zwei Tage bei -70 °C wurden die Einfrierröhrchen in flüssigem Stickstoff bei ca. -170 °C eingelagert.

2.1.6 Kontrolle der Antikörperproduktion von Hybridomzellen

In Verlauf der Kultivierung können Hybridomzellen durch genetische Veränderung ihre Fähigkeit verlieren, Antikörper zu produzieren (Peters und Baumgarten, 1990).

Durch die Dot-Blot Analyse wurden im Vorfeld Hybridome ausgesondert, die keine Antikörper mehr produzierten. Hierzu wurden 5 µl bis 10 µl Hybridomüberstand auf eine Nitrozellulose-Membran (Schleicher & Schüll, Dassel) aufgetropft. Über die unterschiedliche Ladung von Protein und Membran lagerten sich alle im Überstand vorhandenen Proteine in die Membran ein. Danach wurde die Membran über 30 min in proteinhaltigen Blockierungspuffer (vergl. Tab. 34) geschwenkt, um die Bindungskapazität der Membran für Proteine abzusättigen. Dann wurde die Membran zweimal für 10 min in Waschpuffer (vergl. Tab. 35) gewaschen. Ein biotinylierter, gegen Ratten-Immunglobuline gerichteter Antikörper

(vergl. Tab. 36) wurde in einem Verhältnis von 1:1000 in Waschpuffer verdünnt und die Membran wurde für 30 min in dieser Lösung inkubiert. Dieser Antikörper markierte spezifisch die auf der Nitrozellulose gebundenen Immunglobuline aus den Hybridomüberständen. Danach wurden die Membran dreimal für jeweils 10 min in Waschpuffer gewaschen und dann in einer 1:1000 verdünnten Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Streptavidin Lösung wiederum 30 min inkubiert (vergl. Tab. 37). Über die spezifische Bindung von Streptavidin an die Biotinmoleküle wurden die Detektionsantikörper mit einer Peroxidase gekoppelt. Die Membran wurde erneut dreimal für jeweils 10 min in reichlich Waschpuffer gewaschen. Die feuchte Membran wurde auf eine dünne, saubere Plastikfolien gelegt und auf die Membran wurde eine 1:1 Mischung von Lösung A und Lösung B (Renaissance Kit, NEN, Dreieich) gemäß Herstellerangaben verteilt. Hierauf wurde eine zweite Plastikfolie gelegt. Auf diese Folien wurde dann ein Röntgenfilm (BioMax Light Film, Eastman Kodak Company, Rochester, New York) gelegt und bis zu 30 Sekunden bei Raumtemperatur in einer Dunkelkammer belichtet. Die spezifisch an Immunglobulinen aus den Hybridomüberständen gebundene Peroxidase setzte das Substrat um und im Verlauf dieser Chemolumineszenzreaktion wurde Licht emittiert, das dann zu einer Belichtung des Röntgenfilms führte. Dieser Film wurde dann mit Hilfe eines Entwicklungsautomaten (Kodak) entwickelt und zeigte durch eine Schwärzung antikörperproduzierende Hybridome an.

Die spezifische Reaktion der Antikörper auf ihr Antigen wurde über eine Cold-Block Analyse getestet (vergl. 2.5.4) oder wahlweise über die unter 2.5.3 beschriebenen Methode bei membranständigen Antigenen.

2.1.7 Herstellung von Hybridomüberständen für die Antikörperaufreinigung

Für die Anzucht von monoklonalen Hybridomen in der Rollerflaschen-Kultur wurden mindestens $1,0 \times 10^7$ lebende Zellen (negativ in der Trypanblau-Färbung) eingesetzt. Diese Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und in 100 ml mit IgG gereinigtem FCS versetzten R10 Medium aufgenommen (vergl. Tab. 9). Dann wurden die Zellen in eine mit CO₂-begaste, auf 37 °C vortemperierte, sterile Rollerflasche mit ca. 200 ml R10 Medium überführt. Die CO₂-Begasung half, den pH-Wert der Zellsuspension während der Wachstumsphase zu stabilisieren. Die Rollerflasche wurde steril verschlossen und unter ständigem Umwälzen inkubiert, bis ein Anwachsen der Zellen durch Verfärbung des Mediums deutlich sichtbar war. Ein Aliquot des Überstandes wurde für eine spätere Analyse der Antikörperproduktion

entnommen. Die Rollerflasche wurde mit R10 Medium (s.o.) aufgefüllt. Dieser Ablauf wurde wiederholt, bis in der Rollerflasche ca. 1800 ml Hybridom-Zellsuspension enthalten waren. Nach dem Absterben von ca. 80 % der Zellen (80 % Trypanblau-positive Zellen) wurde die Inkubation gestoppt und der Immunglobulin-haltige Überstand gesammelt. Die Zellen wurden bei 8000 x g über 15 min bei 4 °C (GSA-Fest-winkel-Rotor und Ultrazentrifuge, beides von der Firma Sorvall) abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf einen pH-Wert von 7,0 bis 7,5 mit Neutralisationspuffer (vergl. Tab. 19) eingestellt und mit 10 %-iger Natriumazidlösung auf eine Endkonzentration von 0,05 % Natriumazid eingestellt. Dann wurde der Überstand mit einem Filter der Porengröße 0,22 µm sterilfiltriert, um zu verhindern, dass bei der anschließenden Säulenchromatographie die Säule verstopft oder verunreinigt wurde.

2.1.8 Aufreinigung der Hybridomüberstände mittels Säulenchromatographie

Für die Aufreinigung der Antikörper aus den Hybridomüberständen wurde eine Säule mit der Matrix „Pharmacia Gamma Bind Plus“ (Pharmacia, Uppsala, Schweden) verwendet. Die Säule wurde mit PBS vorgespült (zum Herausspülen des Lagerpuffers, vergl. Tab. 21, wurden mindestens 50 ml PBS verwendet). Jeder Pufferwechsel und alle Änderungen der Säulen-anordnung wurden luftblasenfrei durchgeführt. Der Hybridomüberstand wurde mit einer Geschwindigkeit von ca. 2,5 ml/min mittels Schlauchpumpe (Econo Pump, Bio-Rad) bei 4 °C zweimal über die Säule transportiert, um eine effektive Bindung der Antikörper an das Säulenmaterial zu ermöglichen. Nach abgeschlossener Beladung der Säule wurde das Säulenmaterial mittels entgastem, sterilem PBS gewaschen. Hierbei wurden das auf der Säule verbleibende Medium sowie alle nicht gebundenen Mediumbestandteile entfernt. Die Elution des gebundenen Antikörpers erfolgte durch eine pH-Änderung von 7,0 auf 2,7 mittels Elutionspuffer (vergl. Tab. 18). Die Elution wurde über einen Durchfluss-UV-Detektor (Pharmacia) kontrolliert und durch einen angeschlossenen Schreiber (Pharmacia) protokolliert. Die gemäß Schreiberprofil eluierten Fraktionen wurden mit sterilem Neutralisationspuffer (vergl. Tab. 19) auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt und über 48 h unter mehrmaligem Wechsel der Lösungen gegen PBS dialysiert. Das Säulenmaterial wurde ausgiebig mit sterilem PBS gespült und mittels Lagerpuffer (vergl. Tab. 21) steril gehalten.

2.1.9 Qualitätskontrolle der gereinigten Antikörper

2.1.9.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Methode zur Bestimmung des Molekulargewichtes und zur Kontrolle der Reinheit von Proteinen durch Vergleich mit den Molekulargewichten von bekannten Standardproteinen eines Proteinmarkers (Laemmli, 1970). Die Gellösungen, der Probenpuffer und der Laufpuffer enthalten Natriumdodecylsulfat (SDS). Dieses Molekül hat zwei Funktionen: erstens werden durch Bindung der SDS-Moleküle an hydrophobe Regionen des Proteins die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen dieser Proteine denaturiert; zweitens werden die Proteine hierdurch proportional zu ihrer Masse negativ geladen, was in einem konstanten Verhältnis von Ladung des Proteins zu dessen Masse resultiert. Die Wanderung der Proteine in dem elektrischen Feld durch die Gelmatrix hindurch erfolgt dann aufgrund der Ladung der Proteine. Bei einigen Proteinen sind die Untereinheiten über Disulfidbrückenbindungen kovalent miteinander verbunden. Diese Bindungen werden durch Zugabe von freien Sulfhydrylgruppen, zum Beispiel durch β -Mercaptoethanol (Gipco) oder Dithiothreitol (DTT, Sigma-Aldrich Chemie) zu dem Probenpuffer, getrennt.

Die über die Säulenchromatographie aufkonzentrierten und gereinigten Antikörper wurden mit Hilfe der SDS-PAGE kontrolliert, ob sie im Zuge der Aufarbeitung degeneriert oder proteolytisch gespalten worden waren. Hierzu wurden 15 μ l der gereinigten Antikörperlösung und 10 μ l Molekulargewichtsstandard (*broad range* Marker, Bio-Rad) mit je 5 μ l sechsfach konzentriertem Probenpuffer (reduzierend und nicht reduzierend, vergl. Tab. 45) versetzt und 5 min bei 95 °C in einem Thermoblock (G. Kisker, Steinfurt) inkubiert. Die Elektrophorese wurde mit einem 10 %-igen Trenngel und einem 4 %-igen Sammelgel durchgeführt. Der Aufbau der Elektrophoresekammer Mini-Protean II (Bio-Rad) erfolgte gemäß den Herstellerangaben, die hier kurz dargestellt sind:

Zwei saubere, fettfreie, Glasplatten (12 cm x 10 cm) wurden mit Abstandhaltern (Stärke ca. 1 mm) in die Haltevorrichtung der Gelkammer geklemmt. In den Zwischenraum dieser Glasplatten wurde erst die Trenngel-Lösung (vergl. Tab. 43) eingefüllt, nach dem Auspolymerisieren wurde auf das Trenngel dann die Sammelgel-Lösung (vergl. Tab. 44) aufgefüllt. In die noch nicht auspolymerisierte Sammelgel-Lösung wurde ein Teflonkamm gesteckt, der die Aussparungen für die späteren Probenaschen bildete. Die auspolymerisierten Gele wurden dann in einen vertikalen Klemmrahmen der Laufkammer eingepasst und dieser Rahmen in den Puffertank eingehängt. Die Apparatur wurde mit

Laufpuffer (vergl. Tab. 46) gefüllt, der Kamm wurde entfernt und die Probenaschen des Gels wurden mit Laufpuffer luftblasenfrei ausgespült. Anschließend wurden etwa 20 µl Probe (2 µg – 20 µg Protein) mit Hilfe einer Mikroliterspritze (Hamilton-Bonaduz, Bonaduz, Schweiz) in die Taschen eingefüllt und die Elektrophorese mit 100 V gestartet. Sobald die durch das Bromphenolblau im Probenpuffer sichtbar gemachten Proben das Sammelgel durchwandert hatten, wurde die Spannung auf 200 V (ca. 40 mA) erhöht. Die Elektrophorese wurde gestoppt, als die Bromphenolfront der Proben das untere Ende des Trenngels erreicht hatte (Laufzeit ca. 1 h).

2.1.9.2 Western-Blot

Nach der Elektrophorese wurden die Gele aus der Kammer genommen und in die Halterung für die Mini Trans-Blot Tankbloteinheit (Bio-Rad) gemäß den Angaben des Herstellers eingelegt. Hierzu werden zwei Schwämme, vier auf Gelgröße zugeschnittene Filterpapiere und eine zugeschnittene Nitrozellulose Membran (Schleicher & Schüll) in Transferpuffer (vergl. Tab. 47) eingelegt. Bei dem Zusammensetzen der Halterung war strikt darauf zu achten, dass die Membran und die Filterpapiere luftblasenfrei an dem Acrylamidgel anlagen. Die Halterung mit der Membran und dem Gel wurde in die Blotvorrichtung eingeklemmt und in den Puffertank eingehängt. Der Transfer der Proteine auf die Nitrozellulose-Membran erfolgte bei 110 mA / 50 V über Nacht bei ca. 8 °C.

Danach wurde das Gel daraufhin überprüft, ob ein vollständiger Transfer der Proteine auf die Membran stattgefunden hatte. Hierzu wurde das Gel mit einer Coomassie Färbelösung (vergl. Tab. 48) über ca. 30 min eingefärbt, danach wurden eventuelle Proteinbanden mittels Entfärbelösung (vergl. Tab. 49) sichtbar gemacht. Nach dem Transfer konnten stets keine Proteinbanden im Gel mehr detektiert werden.

Die Membran wurde 30 min in einem Blockierungspuffer (vergl. Tab. 34) geschwenkt und analog der unter 2.10.3.1 beschriebenen Methode behandelt und entwickelt.

Die durch den Detektionsantikörper (vergl. Tab. 36 und Tab. 37) spezifisch markierten Proteinbanden hatten unter nicht reduzierenden Bedingungen ein Molekulargewicht von ca. 150 kDa. Unter reduzierenden Bedingungen konnten Proteinbanden bei ca. 50 kDa (schwere Ketten der Antikörper) und ca. 25 kDa (leichte Ketten der Antikörper) detektiert werden. Je nach Vollständigkeit der Reduktion der Cystin-Disulfidbindungen durch den Probenpuffer waren jedoch auch noch Kombinationen von schweren und leichten Ketten sichtbar. Degenerierte Antikörper oder proteolytisch abgebaute Antikörper zeigten kein distinktes

Bandenmuster mehr in der beschriebenen Weise auf und wurden für weitere Analysen nicht eingesetzt.

2.1.10 Protein-Quantifizierung nach Bradford

Dieses Nachweisverfahren basiert auf der Bindung von Coomassie Brilliant Blue G250 Farbstoff an basische und aromatische Aminosäurereste, speziell Arginin. Das Absorptionsmaximum des Farbstoffes liegt im Wellenlängenbereich von 495 nm bis 595 nm. Proportional zu der Proteinkonzentration wird eine Intensivierung der Färbung und damit eine Erhöhung der Absorption gemessen. Im Vergleich mit bekannten Konzentrationen von Proteinstandards wie Albumin oder Immunglobulin kann die Konzentration von unbekanntem Proben ermittelt werden.

Für die Standardkurve wurden Immunglobulin-Verdünnungen eingesetzt (Bio-Rad). Aus der Stammlösung wurden Verdünnungen hergestellt, wobei jede Verdünnung eine 1:2 Verdünnung der vorhergehenden darstellte (Verdünnungsreihe: 1380 µg/ml; 690 µg/ml; 345 µg/ml; 173 µg/ml; 86 µg/ml; 43 µg/ml, 22 µg/ml; Puffer). Die zu bestimmenden Proteinlösungen wurden mindestens in 4 Stufen verdünnt. Für jede Verdünnungsstufe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. In eine MTP96 (Greiner) wurden 20 µl der Verdünnungen der Standardkurve und der zu bestimmenden Proteinlösungen einpipettiert. Hierzu wurden 30 µl des Bradford-Reagenz (Bio-Rad) pipettiert und dieser Ansatz wird bei Raumtemperatur mindestens 5 min auf einem Schüttler durchmischt. Pro Probe wurden 120 µl destilliertes Wasser (H₂O dest.) hinzugegeben und die Proben wurden erneut auf dem Schüttler bei moderater Geschwindigkeit 5 min durchmischt. Je nach Proteinkonzentration schlug die Färbung der Lösung in den Wells von hellgrün (niedriger Proteingehalt) bis kobaltblau (hoher Proteingehalt) um. Diese Farbänderung wurde photometrisch über die Absorptionsänderung bei 620 nm mit einer Referenzmessung bei 492 nm im ELISA-Lesegerät (SpectraFluor) und der Easywin basic Software (beides Tecan) gemessen. Die Nachweisgrenze lag im Durchschnitt bei ca. 86 µg/ml. Die Auswertung der Messdaten wurde mit Hilfe der Software EXCEL '97-2003 (Microsoft) durchgeführt.

Das Bradford-Reagenz (Protein Dye, Bio-Rad) war nicht für die Analyse von Proteinlösungen mit Detergenzien (z.B. Nonidet-P40) geeignet. Der Hersteller weist in diesem Zusammenhang ausdrücklich auf Interaktionen von Pufferbestandteilen, wie Detergenzien, mit dem Protein bzw. mit dem Farbstoff hin, die zu falsch positiven Ergebnissen führen können.

2.2 Erreger

2.2.1 Passage von *Listeria monocytogenes*

C57BL/6 Mäuse wurden mit $4,0 \times 10^3$ koloniebildenden Einheiten (*colony forming units*, cfu) vitaler *Listeria monocytogenes* Bakterien (Stamm EGD Serotyp 1/2b, abgekürzt VL) / 300 µl intravenös infiziert. Nach zwei Tagen wurde die Milz steril entnommen und homogenisiert. Die isolierten Bakterien wurden über Nacht bei 36 °C in Tryptikase-Soja-Bouillon (Oxoid, Basingstoke, Großbritannien) in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Um Mediumanteile zu entfernen, wurden die Bakterien dreimal mit PBS gewaschen (Zentrifugation bei Raumtemperatur über 15 min mit 2.000 x g). Anschließend wurden die Bakteriensuspensionen aliquotiert und bei -70 °C eingefroren. Um die Bakterientiter, die nach dem Einfrieren tatsächlich in den Experimenten eingesetzt wurden, möglichst genau zu bestimmen, wurde ein Aliquot der Listerien aufgetaut. Für die Bestimmung der Bakterientiter wurde dieses in unterschiedlichen Verdünnungsstufen auf Tryptikase-Soja-Agarplatten (Oxoid) ausplattiert, über Nacht wurden die Platten bei 36 °C inkubiert und danach die cfu bestimmt.

2.2.2 Gewinnen von Hitze-inaktivierten *Listeria monocytogenes*

Ein Teil der vital eingefrorenen Listerien wurde in einem Wasserbad bei 62 °C für eine Stunde inkubiert und dadurch abgetötet. Die Wirkung der Hitzebehandlung wurde überprüft, indem ein Aliquot der Bakterien anschließend auf Tryptikase-Soja-Agar ausplattiert wurde. Nach der Hitzebehandlung konnte keine Koloniebildung mehr beobachtet werden. Für den Einsatz der Hitze-inaktivierten *Listeria monocytogenes* (engl.: *heat killed Listeria monocytogenes*, HKL) wurden die Bakterienzahlen (cfu) der lebenden Listerien in der jeweiligen Charge nach einmaligem Auftauen zugrunde gelegt.

2.3 Infektionen mit *Listeria monocytogenes*

RAG-1 Mäuse und syngene WT Mäuse wurden mit $5,0 \times 10^6$ cfu *Listeria monocytogenes* in 300 µl PBS intravenös in die Schwanzvene infiziert. Kontrollen wurden nicht behandelt. Nach 5 h, 9 h, 19 h und 29 h wurden die Tiere durch cervikale Dislokation getötet und Blut, Leber und Milz wurden entnommen.

Das Blut wurde 2 h bei Raumtemperatur (RT) stehen gelassen, bis sich ein Blutkuchen gebildet hatte. Die Proben wurden dann bei RT 5 min mit 5000 x g abzentrifugiert und das Serum in neue Eppendorfreaktionsgefäße überführt und bei -70 °C eingefroren. Leber und

Milz wurden, wie unter 2.4 beschrieben, bei jedem Tier separat aufgearbeitet und die Einzelzellsuspensionen wurden wie unter 2.5 beschrieben markiert und analysiert.

Aufgrund der in diesen Experimenten applizierten Bakterienlast überlebten die Tiere die systemische Infektion in Regel nicht länger als 48 h.

2.4 Organ-Einzelzellsuspensionen

2.4.1 Einzelzellsuspensionen der Milz

Die Maus wurde durch cervikale Dislokation getötet und die Milz wurde steril herauspräpariert. Anschließend wurde die Milz für den Transport in ein tariertes Röhrchen mit 5 ml kaltem, sterilem PBS (Eisbad) überführt. Das Milzgewicht wurde bestimmt und in einer sterilen Werkbank (Klasse II Werkbank 425-600, Typ A/B3, NuAire, USA) wurde die Milz weiter bearbeitet. Die Organkapsel wurde an beiden Enden aufgeschnitten und in einer Petrischale mit 10ml kaltem PBS, FKS 10 % IgG-frei (vergl. Tab. 17), wurden die Zellen mittels einer gebogenen Kanüle (26 Gauge, Braun) herausgestrichen.

Bei der Aufarbeitung konnte gezeigt werden, dass bei der Verwendung von normalem FKS die Erythrozyten der Milzzellsuspensionen aggregieren. Bei der Verwendung von IgG gereinigtem FKS traten diese Effekte nicht mehr auf. Für die Aufreinigung des FKS wurde die unter 2.1.8 beschriebene Säulenchromatographie verwendet, wobei die eluierten Immunglobuline verworfen wurden. Nach der Aufreinigung wurde das FKS sterilfiltriert (0,22 µm Filter) und als FKS IgG-frei verwendet.

Mit Hilfe einer Eppendorfpipette und einer blauen Spitze wurden die Zellen resuspendiert, so dass eine Einzelzellsuspension entstand. Diese Zellsuspension wurde dann über einen 70 µm Zellsieb (Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) in ein 50 ml Röhrchen (Greiner, Nürtingen) überführt; hierbei wurde die Zellsuspension stets in einem Eisbad gekühlt. Durch das Zellsieb wurden grobe Organreste und Erythrozytenaggregate weitestgehend zurückgehalten, damit bei einer späteren durchflusszytometrischen Analyse die dünnen Kapillaren des Durchflusszytometers nicht verstopfen konnten.

Die Zellzahl der kernhaltigen Milzzellen wurde dann durch Gegenfärbung mit einer Türk-Färbelösung (Gipco BRL, Paisley Großbritannien) über eine Zählkammer nach Neubauer ermittelt.

2.4.2 Einzelzellsuspensionen der Leber

Die Maus wurde durch cervikale Dislokation getötet, die Leber wurde steril herauspräpariert und in ein Röhrchen mit 20 ml kaltem, sterilem PBS überführt. In einer sterilen Werkbank (NuAire) wurde die Leber in einen sterilen Probenbeutel (Carl Roth, Karlsruhe) überführt. Zusätzlich wurden 3 ml kaltes, steriles PBS (vergl. Tab. 16) hinzupipettiert. Mit einem Pistill wurde die Leber in dem Probenbeutel vorsichtig zerrieben und so ein Leberhomogenat hergestellt (Gesamtvolumen des Homogenates: 4 ml). Ein 100 µl Aliquot des Homogenates wurde für spätere Bakterientiter-Bestimmungen entnommen und bei -70 °C eingefroren (vergl. 2.4.2.1). Das restliche Homogenat wurde in eine Petrischale überführt und mit 5 ml Verdau-Medium (vergl. Tab. 13) im Brutschrank für 30 min inkubiert. Danach wurde das Leberhomogenat mit weiteren 10 ml PBS verdünnt und aus den noch vorhandenen Organteilen wurden mit Hilfe einer 10 ml Glaspipette und mehrmaligem Aufziehen noch vorhandene Leukozyten herausgespült. Die Petrischale wurde mit 20 ml kaltem PBS nachgespült. Dieses verdünnte Leberhomogenat wurde dann über ein 70 µm Zellsieb (Falcon) in ein 50 ml Röhrchen überführt und somit von den groben Organresten befreit. Die verbleibende Zellsuspension wurde abzentrifugiert (4 °C, 10 min, 250 x g.). Die milchige Eintrübung des Überstandes zeigte einen hohen Fettanteil an. Der Überstand wurde mit einer Glaspipette vorsichtig entfernt, da das Pellet (1) aufgrund des noch hohen Fettanteils nicht verfestigt war. Um den Fettanteil zu reduzieren, wurde dieses Pellet mindestens zweimal mit PBS gewaschen und danach in 7 ml kaltem WSC-Medium (vergl. Tab. 10) resuspendiert. Die Suspension wurde mit 3 ml Percoll (30 % Percoll; Amersham Pharmacia Biotechnology, Freiburg) versetzt und gut resuspendiert. Danach wurde sie 20 min bei 4 °C mit 870 x g ohne Bremse zentrifugiert, um die Hepatozyten und Zelltrümmer von den Leukozyten und Erythrozyten zu trennen. Die auf dem Percoll liegenden Zelltrümmer und Hepatozyten sowie das Percoll-haltige Medium wurden verworfen und das Pellet (2) wurde zweimal mit WSC-Medium gewaschen. Danach wurde die Leukozytenzahl mittels Türks-Färbelösung (Gipco) und einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.4.2.1 Infektionskontrollen

Das Leberhomogenat (100 µl) wurde mit sterilem PBS verdünnt. Jeder Verdünnungsschritt (Verdünnungsfaktor 1:10) wurde auf einem Schüttler in der höchsten Stufe mindestens 30 Sekunden durchmischt. Ein Volumen von 50 µl der einzelnen Verdünnungen wurde auf Tryptoses-Soja Agarplatten (Oxoid) ausplattiert. Als Negativkontrolle wurden 50 µl PBS ausplattiert, als Positivkontrolle wurden Verdünnungen der Infektionslösung ausplattiert. Die

Tryptose-Soja Agarplatten wurden mit flexibler Folie umschlossen, um die Platten vor dem Austrocknen zu schützen, und über Nacht in einem Brutraum bei 36 °C inkubiert. Danach wurden die Kolonien (cfu) ausgezählt.

2.4.3 Inhibition des intrazellulären Vesikeltransportes

Für die Analyse von intrazellulären Zytokinsignalen auf Einzelzellniveau nach Infektion oder der in vitro Stimulation wurden die Einzelzellsuspensionen der Organe in einem Gentamicin- (15 µg/ml, Invitrogen, Karlsruhe) und Brefeldin A- (10 µg/ml, Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen) haltigen WSC-Medium (vergl. Tab. 10) aufgenommen.

Gentamicin ist ein Aminoglykosid-Antibiotikum aus *Micromonospora purpurea* oder *M. echinospora*. Es bindet an die 30S Untereinheit des bakteriellen Ribosoms. Hierbei werden in erster Linie extrazelluläre Bakterien abgetötet, da es in dem sauren Milieu des späten Phagosoms, unter anderem von MΦ, in eine protonisierte Form überführt wird, die nicht mehr bakterizid wirkt (Hof et al., 1997).

Brefeldin A (BFA) ist ein Stoffwechselprodukt von *Penicillium brefeldianum*. Es verändert die Struktur des Golgi-Apparates reversibel und inhibiert somit den Vesikeltransport vom Golgi-Apparat zur Zellmembran. Auf diese Weise wird die Exozytose von Proteinen, unter anderem den Zytokinen, unterbunden. Für vier Stunden wurden die Organeinzelsuspensionen in vitro im Brutschrank inkubiert, danach wurden die Zellen gesammelt.

2.4.4 Erythrozytenlyse und Blockade der Fc-Rezeptoren

Die Organeinzelsuspensionen enthielten zu diesem Zeitpunkt der Aufarbeitung, abhängig von dem aufgearbeiteten Organ, einen relativ hohen Anteil an Erythrozyten. Diese Zellen waren kleiner als die Leukozyten, störten jedoch aufgrund der Quantität die durchflusszytometrische Analyse. Für die hypotone Lyse der Erythrozyten wurden 9 Teile der Erythrozytenlyse-Lösung A und 1 Teil der Erythrozytenlyse-Lösung B unmittelbar von der Lyse zusammengegeben (vergl. Tab. 22). Die Lyse wurde bei Einzelzellsuspensionen der Milz 3 – 4 Minuten durchgeführt, bei Einzelzellsuspensionen der Leber 7 – 9 Minuten. Danach wurde die Lyse durch Zugabe des doppelten Volumens PBS gestoppt und die Zellen wurden abzentrifugiert (4 °C, 10 min, 250 x g). Das Pellet wurde dann in einem von der Zellzahl (vergl. 2.4.1 und 2.4.2) abhängenden Volumen mit einfach konzentriertem FACS-Blockpuffer (vergl. Tab. 24) aufgenommen (50 µl / 5,0 x 10⁵ WSC) und für 15 min in ein Eisbad gestellt.

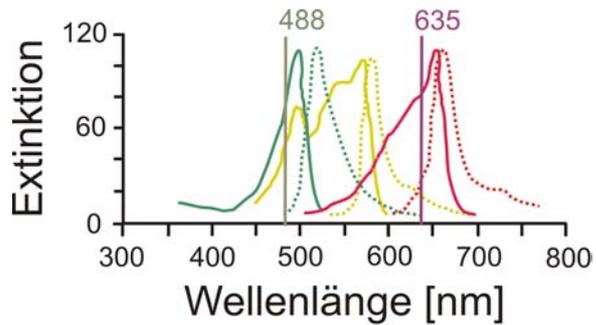
Die Rezeptoren Fc γ I (CD64), Fc γ II (CD16) und Fc γ III (CD32) binden in erster Linie IgG Komplexe über den Fc-Teil der Antikörper. Über diese Rezeptoren erkennen Effektorzellen die mit Antikörper besetzten Ziele, die dann spezifisch angegriffen werden können. Daher werden diese Rezeptoren auf der Membranoberfläche von verschiedenen Effektorzellen des Immunsystems exprimiert, z.B. NK-Zellen, Granulozyten, Monozyten, M Φ oder B-Zellen. Eine unspezifische Bindung von Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern an diese Rezeptoren führt zu einer Erhöhung Hintergrundsignalen, welches die Diskriminierung von Zellpopulationen bei der durchflusszytometrischen Analyse erschwert. Diese unspezifische Bindung wurde durch eine Blockade dieser Rezeptoren mit Hilfe von einem gegen die Fc-Rezeptoren gerichteten Antikörper (Klon 24G2, „FC-Block“, BD-Pharmingen) verhindert.

2.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die simultane Erfassung von diversen physikalischen Parametern wie der Granularität der Zelle, der relativen Zellgröße und der relativen Fluoreszenzintensität der markierten Zellen.

Für die direkte Markierung von Zellen wurden Antikörper verwendet, die an charakteristische Oberflächenmoleküle der Zellen (Zellmarker) banden oder intrazellulär für Zytokine spezifisch waren. An diese Antikörper waren unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe direkt kovalent gekoppelt (vergl. 2.11.). Bei der indirekten Markierung von Zellen waren die Antikörper biotinyliert oder nicht gekoppelt. Die Biotin-gekoppelten Antikörper wurden in einem zweiten Markierungsschritt über Fluoreszenzfarbstoff-gekoppeltes Streptavidin detektiert. Nicht gekoppelte, zellgebundene Antikörper wurden über spezifische, fluoreszenzmarkierte Anti-Immunglobuline detektiert. Aufgrund der hohen Hintergrundsignale war die indirekte Markierung von Zellen für die Analyse von intrazellulären Zytokinen nicht geeignet.

Die Fluoreszenzfarbstoffe, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Abb. 5 dargestellt. Diese Farbstoffmoleküle werden durch Laserlicht einer bestimmten Wellenlänge angeregt. Bei dem Rückfall in den Normalzustand emittiert dieser Farbstoff Licht einer für ihn charakteristischen Wellenlänge (vergl. Abb. 5). Auf diese Weise können die Eigenschaften der mit unterschiedlichen Farbstoffen markierten Zellen gleichzeitig erfasst und analysiert werden.

Abb. 13 Absorptions- und Emissionswellenlängen von Fluoreszenzfarbstoffen

Die Abbildung zeigt die Absorptionsspektren und die Emissionsspektren der in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe: Fluoresceinisothiocyanat (FITC), R-Phycoerythrin (PE), Allophycocyanin (APC).

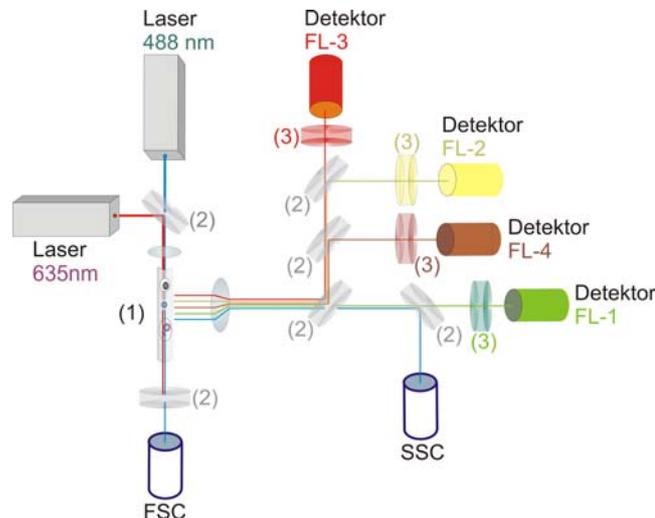
	FITC	PE	APC
Absorption	— 494 nm	— 496 nm — 546 nm	— 650 nm
Emission 519 nm 578 nm 660 nm

Die markierten Zellen (vergl. 2.5.1 und 2.5.2) wurden bei der Analyse im Durchflusszytometer über eine dünne Kanüle in einem laminaren Probenstrom vereinzelt, so dass nur eine Zelle pro Zeiteinheit an einer Messkammer vorbeigeführt wurde. Das von den markierten Zellen gestreute Licht und die Emissionen der Fluoreszenzfarbstoffe wurden von speziellen Filtern in verschiedene Wellenlängen zerlegt und durch Detektoren (Photoelektronenvervielfacher) analysiert.

Das in dieser Arbeit eingesetzte Durchflusszytometer FACSCalibur (Becton Dickinson) war in der Lage, über zwei Laser mit den Wellenlängen 488 nm und 635 nm maximal vier unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe anzuregen (Abb. 5 und Abb. 6). Durch verschiedene Filter wurde von den Detektoren nur Licht in einem bestimmten Wellenlängenbereich erfasst. Die „grüne“ Fluoreszenzemission (FL-1, 515 nm - 545 nm; FITC), die „gelbe“ Fluoreszenzemission (FL-2: 564 nm - 606 nm; PE) und die „rote“ Fluoreszenzemission (> 670 nm; Propidiumjodid, vergl. 2.5.1.1) wurden durch die Anregung mit dem 488 nm Laser erzeugt. Optional konnte der 635 nm Laser hinzugeschaltet werden. Dieser ermöglichte ebenfalls eine Messung im „roten“ Fluoreszenzbereich (FL-4, in der Abb. 6 braun dargestellt; APC). Der Detektor erfasste durch seinen vorgelagerten Filter den Bereich von 653 nm - 669 nm (Shapiro, 2003). Die Photoelektronenvervielfacher verstärkten elektronisch das einfallende Licht und gaben die gemessenen Signale an einen Computer weiter. Die gemessenen Parameter wurden über eine Software (CellQuestPro, Becton Dickinson) statistisch ausgewertet und konnten dann durch unterschiedliche Abbildungen dargestellt

werden. In dieser Arbeit wurde vornehmlich die zweidimensionale Dot-Plot-Abbildung und die Histogramm-Darstellung gewählt.

Abb. 14 Schematische Darstellung der Optik des FACSCalibur



In der Messkammer (1) wurden markierte Zellen durch die zwei Laser mit unterschiedlicher Wellenlänge beleuchtet. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden angeregt, Licht charakteristischer Wellenlängen zu emittieren, und das eingestrahlte Licht wurde, abhängig von der Zellgröße und Granularität, gestreut. Das reflektierte und emittierte Licht wurden über verschiedene halbdurchlässige Spiegel (2) und verschiedene Filter (3) in separate Wellenlängenbereiche aufgeteilt und von Photoelektronenvervielfachern (Detektor FL-1 bis FL-4) detektiert. (Darstellung nach Katalog Becton Dickinson, 2004)

2.5.1 Die direkte und indirekte Markierung von Membranproteinen

Nach der Inkubation in einfach konzentriertem FACS-Blockpuffer wurden die Zellen auf 96 Well-Mikrotiterplatten (MTP96, Greiner) ausplattiert ($5,0 \times 10^5$ Zellen/Well in $50 \mu\text{l}$ FACS-Blockpuffer). Die Zellen wurden abzentrifugiert (4°C , 5 min, $250 \times g$) und mit optimalen Konzentrationen von Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern inkubiert, die spezifisch für spezielle Oberflächenmarker waren (vergl. 2.11). Zur Bestimmung der optimalen Konzentration wurden die einzelnen Antikörper in verschiedenen Konzentrationen auf Milzzellen von RAG-1 Mäusen gegen analoge Konzentrationen einer Isotypkontrolle (vergl. 2.5.4) austitriert. Die Konzentration mit der besten Signaltrennung der markierten Subpopulation wurde in den Experimenten eingesetzt. Eine Isotypkontrolle ist ein Antikörper, der in der gleichen Spezies generiert wurde und den gleichen Subtyp aufweist wie der markierende Antikörper, aber nicht spezifisch an die Zielzellen bindet und somit auch keine Zellpopulation markiert (Shapiro et al., 2003).

Die Zellen wurden, je nach den Anforderungen des Experimentes, in einem ersten Inkubationsschritt mit nur einem Antikörper oder mit einer Kombination von verschiedenen Antikörpern gegen unterschiedliche Oberflächenantigene markiert. Die Inkubationszeit betrug

35 min in einem dunkel gehaltenen Eisbad. Bei längerer Lichtexposition bestand die Möglichkeit, dass die Fluoreszenzfarbstoffe „ausleuchteten“, d.h. die Fähigkeit verloren, nach der Anregung durch das Laserlicht Photonen in ihren charakteristischen Wellenlängen zu emittieren.

Die Zellen wurden abzentrifugiert (4 °C, 5 min, 250 x g) und der Überstand wurde durch ruckartiges Ausschlagen aus den Wells der MTP96 verworfen. Danach wurden die Zellen der einzelnen Proben mit 100 µl FACS-Puffer / Well (vergl. Tab. 23) überschichtet und resuspendiert, dann erneut abzentrifugiert. Dieser Schritt wird im Folgenden als „Waschen“ bezeichnet. In einem zweiten Inkubationsschritt wurden Biotin-gekoppelte Antikörper mit an Streptavidin kovalent gebundenen Fluoreszenzfarbstoffen 35 min in einem dunkelgehaltenen Eisbad inkubiert. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert und nicht gebundenes, Floreszenzfarbstoff-gekoppeltes Streptavidin wurde durch einmaliges Waschen mit FACS-Puffer entfernt.

Bei einer durchflusszytometrischen Analyse der auf der Oberfläche markierten Zellen mit einer Ausschlussfärbung der toten Zellen und Zelltrümmer wurden diese mit 200 µl FACS-Puffer / Well in Messröhrchen (Costar, Corning, USA) überführt (vergl. 2.5.1.1 und 2.5.1.2) und bis zu der Messung am Durchflusszytometer in einem Eisbad gekühlt.

Für eine weitere Markierung von intrazellulären Proteinen wurden die Zellen fixiert (vergl. 2.5.2).

2.5.1.1 Unterscheiden von lebenden und toten Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie

Tote Zellen, degenerierte Zellen und Zelltrümmer stellen bei der durchflusszytometrischen Analyse ein Problem dar. Die Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper interagieren unspezifisch mit den Proteinen der toten und degenerierten Zellen. Durch diese Interaktion wird das Hintergrundsignal bei der Messung erhöht und es kann zu falsch positiven Signalen bei der Analyse der Messdaten kommen (Sasaki et al., 1987; vergl. 2.5.4.1).

Für einen Ausschluss dieser Hintergrundsignale wurde daher ca. 0,5 min bis 1 min vor der Messung eine Propidiumjodid-Lösung (vergl. Tab. 25, Endkonzentration: 0,33 µg/ml) zu den in 200 µl resuspendierten Zellen aus den Wells hinzupipettiert. Propidiumjodid (PJ) ist ein Farbstoff, der mit der DNA von Zellen interagiert. Diese Interaktion findet aber nur bei Zellen statt, deren Zellmembran nicht mehr intakt ist, d.h. nur tote oder absterbende Zellen werden

durch PJ markiert. Hierdurch ist eine Diskriminierung von lebenden Zellen und toten Zellen möglich (Sasaki et al., 1987).

2.5.1.2 Detektion von apoptotischen Zellen mit Hilfe von Annexin V

Apoptose oder der „programmierte Zelltod“ ist ein normaler physiologischer Prozess, der schon während der Embryonalentwicklung stattfindet und später bei der Regeneration und Instandhaltung von Geweben eine wesentliche Rolle spielt. Der Apoptoseprozess ist durch verschiedene morphologische und molekularbiologische Veränderungen der Zelle charakterisiert, in deren Verlauf Veränderungen der Plasmamembranen auftreten, eine Kondensation des Zytoplasmas und des Kernes bis hin zu Fragmentierung der DNA (*DNA-laddering*). Am Ende des Prozesses zerfällt die abgestorbene Zelle in *apoptotic bodies*, die, ohne eine Entzündungsreaktion auszulösen, von gewebeständigen Phagozyten eliminiert werden (BD Biosciences Pharmingen, Apoptosis). In apoptotischen Zellen wird in einem sehr frühen Stadium dieses Prozesses das Membranlipid Phosphatidylserin von der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran auf die Membranaußenseite transloziert und damit der Umgebung präsentiert. Annexin V ist ein 35 kDa bis 40 kDa großes Protein, das Ca^{2+} -abhängig mit hoher Affinität an Phosphatidylserin bindet. Auf diese Weise ist ein Erkennen von Apoptose in einem frühen Stadium durch Fluoreszenzfarbstoff-gekoppeltes Annexin V mit Hilfe der Durchflusszytometrie möglich. Da auch bei nekrotischen Prozessen und bei späten Apoptosestadien Phosphatidylserin auf der Zellmembran exprimiert wird, ist eine Unterscheidung mit Propidiumjodid (PJ) notwendig. In einem frühen Apoptosestadium zeigen die Zellen noch keine Markierung durch Propidiumjodid [Annexin V(+)/PJ(-)], in einem späten Apoptosestadium werden die Zellen jedoch durch Propidiumjodid mit angefärbt [Annexin V(+)/PJ(+)] (Vermees et al., 1995).

In dem *Apoptosis Detektion Kit II* (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg) wurde FITC gekoppeltes Annexin V für die Detektion von Phosphatidylserin verwendet. Dieses wurde in einem Verhältnis von 5 μl einer FITC gekoppelten Annexin V Lösung in 50 μl Annexin V *binding buffer* (vergl. Tab. 57) auf $5,0 \times 10^5$ Milzzellen (WSC)/Well einer MTP96 pipettiert. Die Zellen wurden in dieser Lösung resuspendiert und 35 min in ein abgedunkeltes Eisbad gestellt. Danach wurden sie abzentrifugiert und mit 100 μl FACS Puffer pro Probe gewaschen. In einem zweiten Markierungsschritt wurden dann PE-gekoppelte Antikörper gegen Oberflächenproteine eingesetzt, die charakteristisch für verschiedene Leukozytenpopulationen in der Milz waren. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte dann mit einer PJ-Gegenfärbung der vitalen Zellen (vergl. 2.5.1.1).

2.5.2 Die direkte Markierung von intrazellulären Zytokinen

Für die intrazelluläre Markierung von Zytokinen wurden die auf der Membranoberfläche markierten Zellen nach dem letzten Waschschrift mit einer 2 %-igen Formaldehydlösung 10 min bei Raumtemperatur (RT) in der Dunkelheit fixiert (vergl. 2.5.1). Die Fixierung tötete die Zellen ab und vernetzte die Zelloberflächen. Auf diese Weise wurde die Zellmorphologie stabilisiert. Die Zellen wurden dann erneut abzentrifugiert und in FACS-Puffer gewaschen.

Für eine intrazelluläre Markierung wurden die fixierten Zellen mit in Saponinlösung (vergl. Tab. 27) gelöst, gegen intrazelluläre Zytokine gerichteten, monoklonalen Antikörpern über 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Saponin ist ein Detergens, welches die Zellmembran der fixierten Zellen reversibel perforiert und somit die Detektion von Zytokinen in der Zelle ermöglicht (Sander et al., 1991). An diese Antikörper waren die Fluoreszenzfarbstoffe direkt kovalent gebunden. Danach wurden die extrazellulär und intrazellulär markierten Zellen mit 100 µl einfach konzentriertem Saponinpuffer / Well (MTP96) gewaschen und mit 200 µl FACS-Puffer in die Messröhrchen (Costar) überführt (Sander et al., 1991; Prussin und Metcalfe, 1995).

2.5.3 Indirekte Markierung von membranständigen Antigenen durch nicht gekoppelte Antikörper

Für die Analyse von Hybridomüberstände oder gereinigten, nicht gekoppelten Antikörpern (aus der Ratte generiert) wurden die Milzzellen von RAG-1 Mäusen eingesetzt. Die Zellen wurden wie unter 2.4.1 beschrieben isoliert und für eine Markierung durch eine Erythrozytenlyse vorbereitet. Auf die Blockade der Fc-Rezeptoren wurde verzichtet, da die Antikörper im einfach FACS-Blockpuffers durch den für die Detektion eingesetzten, gegen Ratten-Immunglobuline gerichteten Sekundärantikörper ebenfalls erkannt worden wären und damit ein falsch positives Signal erzeugt hätten. Die Milzzellen (WSC) wurden nur in FACS-Puffer resuspendiert, ca. $5,0 \times 10^5$ WSC wurden in 50 µl in die Wells einer MTP96 ausplattiert und abzentrifugiert (4 °C, 5 min, 250 x g). In einem ersten Markierungsschritt wurden die Milzzellen in 100 µl Hybridomüberstand oder einer Verdünnung des gereinigten Antikörpers resuspendiert und ca. 45 min in ein Eisbad gestellt. Danach wurden die WSC abzentrifugiert und mit 100 µl FACS-Puffer gewaschen. Zur Detektion des zellgebundenen, nichtmarkierten Antikörpers wurde ein FITC markierter, gegen Ratten-Immunglobuline gerichteter Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt (vergl. 2.14). Die WSC wurden wiederum 45 min in ein abgedunkeltes Eisbad gestellt. Danach wurden sie erneut abzentrifugiert und mit 100 µl FACS-Puffer gewaschen. Mit 200 µl FACS-Puffer

wurden die markierten WSC dann in die Messröhrchen (Costar) überführt und vital mit einer PJ-Gegenfärbung im Durchflusszytometer analysiert.

Als Kontrollen wurden je nach dem individuellen Experiment eingesetzt: a) der Sekundärantikörper allein, um die Spezifität der Bindung des Sekundärantikörpers zu testen (Shapiro et al., 2003) ; b) wahlweise ein FITC oder PE gekoppelter und käuflich erworbener Antikörper gegen das gleiche Antigen. Diese Antikörper wurde als positives Signal für die Ausrichtung der markierten Populationen in der Dot-Plot-Darstellung verwendet (Kompensation der Zellpopulationen, Shapiro et al., 2003). Um die Spezifität der positiven Signale zu überprüfen, wurden spezielle Isotypkontrollen in gleicher Konzentration eingesetzt (FITC / PE gekoppelte mAk, Klon R4-22 und PE gekoppelter mAk, Klon R35-95; vergl. 2.11).

2.5.4 Messung und Analyse der Durchflusszytometrie-Daten

Die Messung der markierten Zellen erfolgte mit einem FACSCalibur Durchflusszytometer und CellQuestPro Software (beides von Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA). 50.000 bis 60.000 Messereignisse wurden pro Messung gespeichert. Die Analyse der Messdaten erfolgte mit Hilfe der Software Summit V 3.1 (Cytomation, Fort Collins, USA).

Um die Spezifität der einzelnen Markierungen zu überprüfen, wurden unterschiedliche Kontrollen der Messungen durchgeführt. Diese Daten wurden in der Arbeit nicht explizit dargestellt. Bei der direkten und indirekten Markierung von Epitopen auf der Zellmembran wurden Isotypkontrollen eingesetzt, um die Spezifität der markierenden Antikörper zu überprüfen (vergl. 2.5.3). Sie wurden in der gleichen Konzentration wie der markierende Antikörper eingesetzt und waren mit dem gleichen Fluoreszenzfarbstoff, mit Biotin oder nicht gekoppelt.

Vor allem bei der direkten Markierung von intrazellulären Zytokinen wurde die Spezifität der Antikörperbindung über eine Cold Block Analyse getestet. Milzzellen (WSC) von RAG-1 Mäusen oder WT Mäusen wurden über 6 h mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA, 10 ng/ml) und Ionomycin (500 ng/ml) aktiviert. PMA aktiviert unspezifisch die Phosphokinase C bei Lymphozyten und Ionomycin induziert einen Ca^{2+} -Influx in die Zellen. Auf diese Weise bewirken diese Stimuli eine Erreger-unabhängige Produktion von Zytokinen bei Milzlymphozyten. Die Exozytose der Zytokine wurde dann mit Hilfe von Brefeldin A (10 $\mu\text{g/ml}$) für 4 h inhibiert (Picker et al., 1995)

Die Zellen wurden dann mit dem zytokinspezifischen, Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper in optimaler Konzentration inkubiert (Positivkontrolle). Zur Kontrolle der Spezifität dieser Markierung wurde eine zweite Probe dieser Zellen vor der Markierung mit demselben, nicht gekoppelten Antikörper im Überschuss inkubiert (Blockade der Epitope). In einem zweiten Schritt wurden diese Zellen dann mit dem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper in für die Markierung optimaler Konzentration inkubiert. Hierbei konnte der Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Antikörper nicht mehr an sein Epitop binden, da alle Epitope durch nicht gekoppelten Antikörper abgesättigt waren. Somit handelte es sich bei den trotzdem gemessenen Fluoreszenzsignalen um unspezifische Interaktionen zwischen den Zellen und dem markierten Antikörper.

Eine Variante dieser Analyse war die Absättigung der Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper mit dem entsprechenden Zytokin, bevor eine Markierung des Antigens in der Zelle erfolgte. Auch hier wären im Durchflusszytometer gemessene Signale unspezifisch (Prussin und Metcalfe, 1995).

2.5.4.1 Eingrenzen der Leukozytenpopulation aufgrund ihrer Größe und Granularität

Die Einzelzellsuspensionen der Milz und der Leber wurden nach der Messung im Durchflusszytometer als Messereignisse mit unterschiedlicher Größe und Granularität dargestellt. Die Abbildung 7A zeigt eine typische, zweidimensionale Dot-Plot Darstellung des *forward scatter* (FSC, Merkmal für die Zellgröße, x-Achse) und des *side scatter* (SSC, Merkmal für die Granularität der Zellen, y-Achse) einer durchflusszytometrischen Analyse von RAG-1 Milzzellen nach der Erythrozytenlyse.

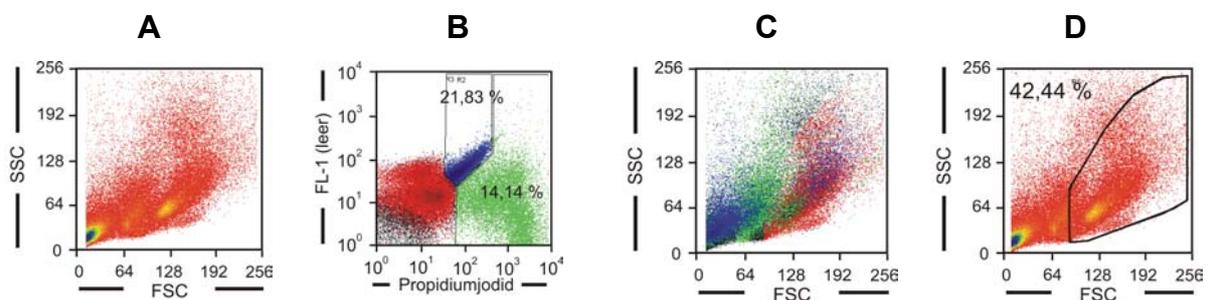
Tote und degenerierte Zellen sowie Zelltrümmer erzeugen bei einer Analyse verstärkt unspezifische Hintergrundsignale. Durch eine Propidiumjodid (PJ) Färbung und durch Ausschluss der [PJ(+)] Messereignisse bei weiteren Analysen werden diese falsch positiven Signale und damit Fehlinterpretationen weitestgehend verhindert (Sasaki et al., 1987).

In der zweidimensionalen Dot-Plot Darstellung Abbildung 7B wurde eine PJ-Färbung (x-Achse) gegen einen nicht belegten Fluoreszenzkanal (y-Achse, FL-1) dargestellt. Die [PJ(+)] Messereignisse wurden hier grün dargestellt. Die blau gefärbten Messereignisse stellten eine autofluoreszente Population dar. Die rot dargestellten Messereignisse repräsentierten die Messereignisse, die [PJ(-)] waren. Diese Messereignisse waren für die weitere Analyse von besonderem Interesse, da diese die vitalen Lymphozyten der Milz repräsentierten.

Ein *backgating* zurück in eine zweidimensionale Dot-Plot Darstellung des *forward scatters* (x-Achse) und des *side scatters* (y-Achse) zeigte die Positionierung dieser vitalen Lymphozyten aufgrund ihrer Größe und Granularität (Abb. 3C). Auffallend war hierbei, dass sich die interessante, rot eingefärbte, [PJ(-)] Zellpopulation in einem relativ eingegrenzten Bereich in der rechten Hälfte der Abbildung 7C konzentrierte. Diese Messereignisse zeigten zum einen die Größe, die man bei intakten Zellen erwartete und zum anderen waren sie mit PJ nicht anfärbbar, also vital. Daher wurden speziell diese Messereignisse bei hier dargestellten Analysen als Leukozyten eingegrenzt und untersucht (Abb. 7D).

Die blau eingefärbte Population der autofluoreszenten Messereignisse der Abbildung 7B wurde in einer Population im linken unteren Bereich und im Bereich der rot eingefärbten, vitalen Leukozyten in der Abbildung 7C wiedergefunden. Die Population des linken unteren Bereiches repräsentierte Messereignisse, die für intakte Zellen zu klein waren. Ein Größenvergleich zeigte, dass diese Messereignisse noch kleiner als Erythrozyten waren (Daten nicht dargestellt). Diese Messereignisse wurden bei weiteren statistischen Analysen nicht berücksichtigt. Die Messereignisse im Bereich der rot eingefärbten vitalen Leukozyten waren groß genug für intakte Zellen und waren granulär. Eine nähere Analyse mit dem anti F4/80 Antikörper zeigte, dass diese Population dieses Oberflächenmolekül exprimierte (Daten nicht dargestellt). Diese Messereignisse wurden als MΦ (Austyn und Gordon, 1981) bei weiteren Analysen in der Regel ebenfalls mit betrachtet und analysiert (vergl. Abb. 7D).

Abb. 15 Eingrenzen der Leukozytenpopulation



Milzzellen von RAG-1 Mäusen wurden aus dem Organ mittels Ausstreichmethode isoliert. Nach einer Erythrozytenlyse wurden diese Zellen mit Propidiumjodid gefärbt und dann lebend im Durchflusszytometer analysiert. Die Zellpopulationen der Milz wurden aufgrund ihrer Granularität und Größe aufgetrennt (A und D) und wurden aufgrund ihrer Sensitivität gegenüber Propidiumjodid (PJ) betrachtet (B). Die unterschiedlich PJ-sensitiven Zellpopulationen wurden nach ihrer Größe und Granularität aufgetrennt noch einmal unter C dargestellt (C).

2.6 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Sandwich-Methode)

Eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Zytokinen in Kulturüberständen stellt der ELISA dar. Zur Verwendung kamen hier ausschließlich mehrschichtige (*sandwich*) ELISA-Systeme. Über Nacht wurde der erste, in einer Natriumhydrogencarbonat (Merck, Darmstadt) -Lösung (vergl. Tab. 28) verdünnte Antikörper (7,5 µg/ml) bei 4 °C an den Boden einer MTP96 (Maxisorp F16; Nunc, Wiesbaden) gebunden. Im Überschuss vorhandener und nicht gebundener Antikörper wurde durch zweimaliges Waschen mit Waschpuffer (vergl. Tab. 29; 100 µl/Well) entfernt. Nach Absättigung des Plattenbodens mit einer 10 % FKS enthaltenden Blockierungslösung (vergl. Tab. 30, Inkubation über zwei Stunden bei Raumtemperatur mit 100 µl/Well) und zwei weiteren Waschschritten wurde das zu untersuchende Material (hier: Zellkulturüberstände und rekombinante Proteine als Standardreihe) in einem Volumen von 100 µl in die Wells eingebracht. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen wurde die Verdünnung des biotinylierten Detektionsantikörpers (2 µg/ml, Verdünnung in PBS 10% FCS) aufgetragen und eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach drei Waschschrritten wurden 50 µl einer Streptavidin-gekoppelten Peroxidase Lösung (Amersham Pharmacia Biotechn., Freiburg) in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. Nach einer vierminütigen Inkubation wurde erneut dreimal gewaschen und die Substratlösung (100 µl/Well) wurde hinzugegeben. Als Substrat wurde 3, 3', 5, 5' Tetramethylbenzidin (TMB, Sigma-Aldrich) verwendet. Die Farbreaktion erschien stets innerhalb der ersten 10 bis 15 Minuten und konnte dann mit 100 µl/Well einer 2 N Schwefelsäurelösung gestoppt werden. Die Messung erfolgte mit Hilfe eines ELISA Lesegerätes (SpektraFluor) und der Software Easywin basic (beides Tecan, Frankfurt am Main) bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm.

Die Messung der einzelnen Proben und der Standardkurve erfolgte in Doppelbestimmung. Die Auswertung wurde mit der Software Microsoft EXCEL '97-2003 (Microsoft, Santa Rosa, Californien, USA) durchgeführt. Die Detektionsgrenzen lagen in der Regel bei dem IFN- γ ELISA im Durchschnitt bei 80 pg/ml und bei dem IL-12 ELISA bei 40 pg/ml.

Zytokin	Klon	Kopplung	Donorspezies	Subtyp	Endkonzentration	Bezugsquelle
IFN- γ	AN 18	Biotin	Ratte	IgG	7,5 μ g/ml	RKI
IFN- γ	R4-6A2	n. gekop.	Ratte	IgG 1	2,0 μ g/ml	RKI
IFN- γ	Protein				(2500–19,53) pg/ml	Boehringer
IL-12	C17.8	Biotin	Ratte	IgG 2a	7,5 μ g/ml	Pharmingen
IL-12	C 15.6	n. gekop.	Ratte	IgG 1	2,0 μ g/ml	Pharmingen
IL-12	Protein				(2000-15,63) pg/ml	Pharmingen

2.7 Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion nach RNA-Extraktion aus Milzzellen

RAG-1 und syngene WT Mäuse wurden wie unter 2.3 beschrieben infiziert, Kontrolltiere wurden nicht infiziert. Nach 5 h und 19 h p.i. wurden Tiere getötet und von jedem Tier separat wurden die Milzzellen wie unter 2.4.1 beschrieben als Einzelzellsuspension aufgearbeitet.

Analog der von Chomczynski und Sacchi beschriebenen Methode wurden $1,0 \times 10^7$ WSC mit 1,0 ml Trizol (Invitrogen, Karlsruhe) überschichtet und mit einer Pipette vorsichtig homogenisiert (Chomczynski und Sacchi, 1987). Diese Suspension wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 0,2 ml Chloroform (Sigma-Aldrich) versetzt. Chloroform hat eine höhere Dichte als Wasser und sammelt sich in der unteren Phase im Reaktionsgefäß. Die Proben wurden gut durchmischt, wobei sich hydrophobe Zellbestandteile wie Lipide und Proteine in der Chloroformphase sammelten. Eine dreiminütige Inkubation bei Raumtemperatur (RT) unterstützte diesen Effekt, dann wurden die Probenansätze bei 4 °C über 15 min mit 12.000 x g abzentrifugiert. In der wässrigen Phase war die Gesamt-RNA der WSC suspendiert. Diese Phase wurde von der Chloroformphase vorsichtig abgehoben und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden die Probenansätze mit je 500 μ l Isopropanol (Merck, Darmstadt) versetzt, gut durchmischt und 10 min bei RT inkubiert. Die präzipitierte Gesamt-RNA wurde mittels Zentrifugation (4 °C, 10 min, 12.000 x g) pelettiert und mit 1,0 ml einer eisgekühlten, 75 %-igen (v/v) Ethanollösung (Merck, Darmstadt) zweimal gewaschen (Zentrifugation je Waschschrift: 4 °C, 5 min, 7.500 x g). Das Pellet des letzten Waschschriftes wurde an der Luft vollständig getrocknet (2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht im Kühlschrank). Das Pellet wurde dann in 25 μ l, Ribonuklease (RNase)-freiem, Wasser über 10 min bei 60 °C gelöst. Für die Kontrolle der RNA Konzentration wurden 5 μ l dieser Suspension in 95 μ l Wasser gelöst

(Verdünnungsfaktor 1:20) und die Konzentration dieser Lösung wurde bei 260 nm im Photometer (DU 640 Spektralphotometer, Beckmann Coulter, USA) bestimmt.

Berechnung der mRNA Konzentration
--

Absorption (260 nm) x (Verdünnungsfaktor) x 40 = mRNA Konzentration [$\mu\text{g/ml}$],

Die mRNA-Lösung wurde mit RNase-freiem Wasser auf eine Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt und entweder bei -70 °C eingelagert oder sofort weiterverarbeitet.

Im nächsten Schritt wurden 1 μg bis 5 μg RNA mit Hilfe einer reversen Transkriptase (vergl. Tab. 66) in cDNA umgeschrieben. Hierzu wurden Desoxy-Thymin-Oligonukleotide (*Random-Primer*) mit der isolierten mRNA (polyadenylierte Ribonukleinsäure) inkubiert. Diese Oligomere binden an die mRNA und bilden die Bindungsstellen für die reverse Transkriptase. Diese synthetisiert mit Hilfe der zugesetzten Nukleotide den komplementären Doppelstrang zu den mRNA Einzelsträngen. Um die Random-Primer optimal an die mRNA binden zu lassen, wurden 1 μg bis 5 μg mRNA und 0,5 μg Random-Primer (Promega, Mannheim) in einem Gesamtvolumen von 10 μl RNase-freiem Wasser gelöst und über 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Danach wurden die Proben sofort auf Eis gestellt. Das Umschreiben der mRNA-Einzelstränge in komplementäre DNA-Doppelstränge (cDNA) erfolgte durch Zugabe von 200 Einheiten (E) Reverse Transkriptase (murine-monkey leukemia-virus Reverse Transkriptase, RNA H minus Punkt-Mutation) 5 μl fünffach Reaktionspuffer, 5 μl Nukleotidmix (alle Bestandteile von Promega) in jeden Reaktionsansatz. Dieser Reaktionsansatz wurde mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 25 μl eingestellt. Die Inkubation erfolgte im Thermocycler (Gene Thermocycler, Techne, Burkhardtsdorf) mit dem folgendem Temperaturprotokoll: 25 °C, 10 min; 40 °C, 50 min; 70 °C, 10 min; 4 °C, kein Zeitlimit.

Die aus der Transkription resultierende cDNA wurde entweder bei -70 °C zwischengelagert oder sofort in der Polymerase-Kettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction*, PCR) eingesetzt.

In der PCR wurde ein Genabschnitt, der für das zu analysierende Gen spezifisch durch die Bindung von einem Primerpaar (TIB-Molbiol, Berlin) identifiziert wurde, durch eine

thermophile DNA-Polymerase (TAQ Polymerase, Promega) amplifiziert. Die Amplifikation bestand aus folgenden Reaktionsschritten:

- a) die doppelsträngige cDNA wurde aufgeschmolzen; hierbei wurden die Wasserstoffbrückenbindungen der beiden DNA-Einzelstränge durch Inkubation bei ca. 95 °C getrennt.
- b) durch Absenkung der Temperatur auf ca. 65 °C wurde es den Primern ermöglicht, an die komplementären DNA-Einzelstränge zu binden.
- c) eine Erhöhung der Temperatur auf ca. 72 °C leitete die Elongationsphase ein. Die TAQ-Polymerase band an die Primer-DNA Strangabschnitte und synthetisierte mit Hilfe von zugesetzten Nukleotiden (dNTP Nukleotidmix, Promega) den komplementären Doppelstrang.

Die Schritte a) bis c) wurden als ein Zyklus bezeichnet. Nach jedem Zyklus verdoppelte sich theoretisch die spezifisch synthetisierte cDNA.

Für einen PCR Ansatz wurden pipettiert: 0,5 µl TAQ-DNA-Polymerase, 5 µl PCR Puffer und 5 µl MgCl₂-Puffer (vergl. Tab. 67), 1 µl dNTP-Mix (10 mM für jedes Nukleotid, alle Bestandteile von Promega) 125 pmol für jeden Primer (vergl. Tab. 4, Tip-Molbiol, Berlin). Der PCR-Reaktionsansatz wurde auf ein Gesamtvolumen von 50 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt.

Tab.: 4 Primersequenzen		
Zytokin	Konzentration	Oligonukleotid
IL-2-Sense	100 nM	5`-cct gag cag gat gga gaa tta ca-3`
IL-2-Antisense	100 nM	5`-gtc aga gcc ctt tag ttt tac aac -3`
IL-15-Sense	100 nM	5`-cct aca gga ggc caa gaa ga-3`
IL-15-Antisense	100 nM	5`-cat cta tcc agt tgg cct ctg ttt-3`
HPRT-Sense	100 nM	5`-gtt gga tac agg cca gac ttt gtt g-3`
HPRT-Antisense	100 nM	5`-gag ggt agg ctg gcc tat agg ct-3`
(HPRT: Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase)		

Reaktion	Temperatur	Zeit
Aufschmelzen	95 °C	1 min
33 Zyklen		
Aufschmelzen	93 °C	0,5 min
Primer-Anlagerung	65 °C	1 min
Elongation	72 °C	1 min
Terminierung	72 °C	5 min
Programmende	4 °C	kein Zeitlimit

Die amplifizierten cDNA-Fragmente wurden in einem Ethidiumbromid-haltigem, 1,5 %-igen Agarosegel (Peqlab Biotechnologies, Erlangen) nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Proben wurden mit einem sechsfach konzentrierten Probenpuffer (Blue Orange Loading Dye, Promega) versetzt und bei 100 V über 30 min in einer horizontalen Gelkammer (Carl Roth, Karlsruhe) aufgetrennt. Nach dem Gellauf wurden die einzelnen Fragmente durch UV-Licht sichtbar gemacht und mittels Digitalkamera dokumentiert. Die Größe der Fragmente wurde anhand eines 100 Bp-DNA-Marker (Promega) ermittelt. Die Auswertung der digitalen Fotos erfolgt durch die Bio 1D++ Software (Vilber Lourmat, Frankreich). Für die bessere Visualisierung wurden die digitalen Fotografien invers dargestellt.

2.8 Produktion von IL-2-haltigem Zellkulturüberstand

Rekombinantes, murines IL-2 wurde über eine mit dem IL-2-Gen transfizierte Zelllinie dargestellt. Es handelt sich hierbei um die Immunglobulin-negative Myelom Zelllinie X63Ag8 653 (vergl. Tab. 2). Zusammen mit dem IL-2-Gen ist für die positive Selektion der transfizierten Zellen ein Resistenzgen einkloniert worden. Da die Transfektion potentiell labil ist, muss vor der Produktionsphase des IL-2 Proteins eine Selektion über Geneticin-haltiges Kulturmedium durchgeführt werden. Geneticin (Invitrogen) ist ein Aminoglykosid-Anibiotikum analog Gentamicin (vergl. 2.4.3). Es wird für die Selektion von Säugetierzellen, Pflanzenzellen und Hefen eingesetzt. Indem es an die ribosomale 80 S Untereinheit der Zelle bindet, greift es in deren Proteinbiosynthese ein.

2.8.1 Selektion

$1,0 \times 10^5$ Zellen wurden in R10-Medium ausgesät und mit 1 mg/ml Geneticin versetzt. Diese wurden dann zwischen 12 und 14 Tagen im Brutschrank unter täglicher, mikroskopischer Kontrolle gehalten. Hierbei starben die nicht transfizierten Zellen ab, da sie keine Resistenz gegen Geneticin aufwiesen.

2.8.2 Produktion des IL-2 Überstandes

Die verbleibenden Zellen wurden mit HBSS 1% FKS einmal gewaschen. Für die Produktion von IL-2-haltigem Überstand musste das Geneticin vollständig entfernt werden. Danach wurden 1×10^6 Zellen in R10 Medium ohne Geneticin-Zusatz aufgenommen. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank über ca. 24 h. Der Überstand wurde dann mittels *low protein binding* Filter filtriert, aliquotiert und bei -70°C eingefroren. Für jede Charge wurde der IL-2 Titer mit Hilfe der IL-2 abhängigen CTLL-1 Zelllinien und mittels MTT Nachweis ausgetestet (vergl. 2.8.3).

2.8.3 Bestimmung der biologischen Aktivität von IL-2-haltigen Überständen mittels MTT-Assay

Die Zelllinie CTLL-1 ist eine murine T-Zelllinie, die nur in Abhängigkeit von IL-2 in Zellkultur überleben und wachsen kann. Diese Eigenschaft macht sie zu einem Sensor für biologisch aktives IL-2 in konditionierten Kulturüberständen. In eine MTP96 wurden 100 μl des zu testenden Überstandes bzw. eine Verdünnung des Überstandes einpipettiert. Dann wurden 100 μl R10 Medium mit 1×10^3 CTLL-1 ausplattiert. Der Ansatz wurde über 72 h im Brutschrank inkubiert.

Der Nachweis für die Vitalität der Zellen erfolgte durch Zugabe von 10 μl einer MTT-Lösung (vergl. Tab. 55) in den letzten 5 h der Inkubationszeit. MTT (3 (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromid oder „Thiazol Blau“, Sigma-Aldrich) ist eine wasserlösliche Substanz, die im gelösten Zustand eine gelbliche Färbung hervorruft. Durch Reduktion der mitochondrialen Dehydrogenase der lebendigen Zellen wurden wasserunlösliche, purpurne Formazankristalle gebildet, die durch Zugabe von 50 μl einer 20 %-igen SDS-Lösung (vergl. Tab. 56) wieder aufgelöst wurden. Die Aktivität dieser Dehydrogenase und damit die Vitalität der Zelle war somit direkt proportional zu der bläulichen Färbung der Lösung. Diese Färbung wurde mit einem ELISA Reader (SpectraFluor) bei einer Wellenlänge von 570 nm und der Easywin basic Software (beides Tecan) vermessen. Tote Zellen störten diese Messung nicht (Mosmann, 1983; Kiderlen und Kaye, 1990).

2.9 Inhibition der mikrobiell stimulierten IFN- γ Produktion von RAG-1 Milzzellen in vitro mittels Antikörper

2.9.1 Aufreinigung der Antikörper

Die Antikörper für die Inhibitionsversuche wurden mittels Centrikon-30 Röhren (Amicon, Beverly, USA) umgepuffert und damit von eventuell störenden Azidkonzentrationen befreit. Die Antikörper mit einer durchschnittlichen Molekülmasse von 150 kDa wurden durch ein Molekularsieb zentrifugiert, das nur für Moleküle mit einer Masse bis ca. 30 kDa durchlässig war. Die Zentrifugation erfolgte in einer Zentrifuge, Typ Hermle ZK 400, mittels SS34 Festwinkel-Rotor (Sorval) bei 4 °C, 30 min und 4000 x g. Die aufkonzentrierten Antikörper blieben in einem kleinen Flüssigkeitsvolumen, dem Retentionsvolumen, gelöst zurück. Diese Flüssigkeitsmenge wurde mittels umgekehrter Zentrifugation bei 4 °C, 2 min und 1000 x g in ein Probenröhrchen überführt, mit sterilem PBS verdünnt (maximal bis zu dem eingesetzten Volumen) und für weitere Analysen bei 4 °C steril gelagert. Die Antikörperkonzentrationen wurden nach erfolgter Umpufferung mittels Proteinbestimmung im Vergleich mit einem Immunglobulinstandard (vergl. 2.10.6) ermittelt.

Tab.: 6 Tabelle der gereinigten Antikörper

Klon	Target	Donorspezies	Subtyp	Konzentration
TM- β 1	CD122	Ratte	IgG 2b, κ	0,80 mg/ml
JES 5 16E3	IL-10	Ratte	IgG 2b	0,50 mg/ml
M5/114	MHC II (I-A ^{bdq} -I-E ^{dk})	Ratte	IgG 2b, κ	1,70 mg/ml
24G2	CD16/32	Ratte	IgG 2b, κ	3,40 mg/ml
C15.6	IL-12	Ratte	IgG 1	0,80 mg/ml
MP6-XT3	TNF- α	Ratte	IgG 1, κ	1,00 mg/ml
Rabbit NS	unbekannt	Kaninchen	polyklonal	0,50 mg/ml
AB7213	IL-15	Kaninchen	polyklonal	0,30 mg/ml
Jes 6 1A12	IL-2	Ratte	IgG 2a, κ	1,80 mg/ml

2.9.2 Stimulation von RAG-1 Milzzellkulturen mit Hitze-inaktivierten Listerien

Die Milzzellen wurden, wie unter 2.4.1 beschrieben, aus dem Organ präpariert und gezählt. $1,0 \times 10^6$ WSC wurden in 1 ml WSC-Medium in einer 24-Well-Mikrotiterplatte (MTP24) ausplattiert. Die Zellen wurden dann mit 12 μg azidfreiem, monoklonalem Antikörper (vergl. 2.9.1, Tab 6) versetzt und 10 min in ein Eisbad gestellt. Dann wurden die Milzzellen mit HKL in einem Verhältnis von HKL/WSC = 10:1 versetzt. Je nach Anforderungen des Experimentes wurden bis zu 50 ng/ml IL-15 (Peprotech) zu den Ansätzen hinzupipettiert. Nach einer 19-stündigen Inkubation im Brutschrank wurden die Zellkulturüberstände gesammelt und bei $-70\text{ }^\circ\text{C}$ bis zu einer weiteren Analyse eingefroren. Die Zellen wurden mit 1 ml Brefeldin A-haltigem WSC Medium überschichtet und weitere 4 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Milzzellen gesammelt. Nicht adhärente Zellen wurden mit dem Medium abgespült, in 15 ml Röhrchen überführt und in einem Eisbad gehalten. Adhärente Zellen wurden mit kaltem PBS überschichtet und 20 min auf Eis inkubiert, um ein Ablösen dieser Zellen von der Plastikoberfläche der Zellkulturschalen zu erleichtern. Dann wurden sie vorsichtig mit einem Zellschaber abgelöst. Die beiden Fraktionen wurden dann gepoolt und zusammen abzentrifugiert ($4\text{ }^\circ\text{C}$, 10 min, $250 \times g$). Die gesammelten Zellen wurden dann wie unter 2.4.4 beschrieben für die durchflusszytometrische Analyse vorbereitet und die Markierung sowie die intrazelluläre Zytokinanalyse erfolgte wie unter 2.5.1 und 2.5.2 beschrieben.

2.9.3 Stimulation von RAG-1 Milzzellkulturen mit vitalen Listerien

Die Milzzellen wurden wie unter 2.4.1 beschrieben aus dem Organ präpariert und gezählt. $1,0 \times 10^6$ WSC wurden in 1 ml WSC-Medium in eine MTP24 ausplattiert. Die Zellen wurden dann mit 12 μg azidfreiem, monoklonalem Antikörper (vergl. 2.9.1 Tab. 6) versetzt und 10 min in einem Eisbad inkubiert. Die Zellsuspension wurde dann mit VL in einem Verhältnis von VL:WSC = 3:1 versetzt und 6 h im Brutschrank inkubiert.

Es ist anzumerken, dass in dem WSC-Medium zu diesem Zeitpunkt kein Antibiotikum vorhanden war, damit die Stimulation von vitalen Bakterien ausgehen konnte.

Nach Ablauf der Stimulationsphase wurde der Kulturüberstand vorsichtig abpipettiert, sterilfiltriert und bis zu einer weiteren Analyse bei $-70\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Die Zellen wurden mit Gentamicin- und BFA-haltigem WSC-Medium überschichtet und weitere 4 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die nicht adhärennten Milzzellen durch Abspülen gesammelt und

abzentrifugiert (4 °C, 10 min, 250 x g). Der Überstand wurde verworfen. Die adhärenen Zellen wurden mit 1 ml kaltem PBS überschichtet und 20 min auf Eis gestellt, um ein Ablösen der Zellen zu beschleunigen. Danach wurden sie mit einem Zellschaber vorsichtig abgelöst. Die Zellfraktionen wurden vereint und abzentrifugiert (4 °C, 5 min, 250 x g). Die Zellen wurden dann in die Wells einer MTP96 mit 100 µl kaltem PBS/Well ausplattiert. Dort wurde eine Erythrozytenlyse und FC-Rezeptorblock (vergl. 2.4.4) durchgeführt. Die Zellen wurden danach wie unter 2.5.1 und 2.5.2 beschrieben mit Antikörpern markiert.

2.10 Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen

2.10.1 Zellkulturmedien und Mediumzusätze

Tab.: 7 R10-Medium	
Bestandteile	Konzentration
RPMI 1640	
Natriumpyruvat	1 mM
Streptomycin	100 µg/ml
Penicillin	100 E/ml
FKS, BioW	10 %
<p><u>FKS, BioW</u> bezeichnet Fötale Kälberserum der Firma BioWhittaker, das bei 56 °C über mindestens 30 min in einem Wasserbad Hitze-inaktiviert wurde, um im Serum vorhandene Komplementkomponenten zu inaktivieren.</p>	
<p><u>RPMI 1640</u> bezeichnet die mit L-Glutamin versetzte Mediumgrundlage RPMI 1640. Diese Mediumgrundlage wird im Hause steril in größeren Mengen hergestellt.</p>	

Tab.: 8 Einfriermedium	
Bestandteile	Konzentration
Bestandteile Einfriermedium I	
RPMI 1640	
Natriumpyruvat	1 mM
Streptomycin	100 µg/ml
Penicillin	100 E/ml
FKS, BioW	40 %
Bestandteile Einfriermedium II	
RPMI 1640	
Natriumpyruvat	1 mM
Streptomycin	100 µg/ml
Penicillin	100 E/ml
DMSO	20 %

Tab.: 9 R10 Medium mit HEPES	
Bestandteile	Konzentration
RPMI 1640	
Natriumpyruvat	1 mM
Streptomycin / Penicillin	100 µg/ml /100 E/ml
HEPES (1M)	25 mM
FKS, IgG frei	10 %
<p><u>FKS, IgG frei</u> bezeichnet mittels Protein G Säulenchromatographie aufgereinigtes, bei 56 °C über mindestens 30 min Hitze-inaktiviertes, Fötale Kälberserum der Firma Biochrome</p>	

Tab.: 10 WSC-Medium	
Bestandteile	Konzentration
RPMI 1640	
Natriumpyruvat	1 mM
2-Mercaptoethanol (50 mM)	50 µM
FKS, IgG frei	10 %
HEPES (1M)	25 mM
<p>Je nach Anforderungen des Experimentes wurde das WSC-Medium mit Gentamicin (15 µg/ml) und / oder Brefeldin A (10 µg/ml) versetzt.</p>	

Tab.: 11 Brefeldin A Stammlösung

Bestandteile	Konzentration
Brefeldin A	5,0 mg/ml gelöst in 1ml DMSO
50 µl Aliquots wurden bei –70 °C eingelagert und bei Bedarf aufgetaut.	

Tab.: 12 Gentamicin Stammlösung

Bestandteile	Konzentration
Gentamicin	1,0 mg/ml gelöst in PBS + 10 % FCS, IgG frei
100 µl Aliquots wurden bei –70 °C eingelagert und bei Bedarf aufgetaut.	

Tab.: 13 Verdau-Medium

Bestandteile	Konzentration
RPMI 1640	
FCS, BioW	14,2% (v/v)
Dispase II	2 E / 50 ml
Collagenase IV	0,29 E / 50 ml
DNA`se I	0,001% (v/v)

Tab.: 14 Selektionsmedium für die IL-2 transfizierten X63Ag8 653 Zellen

Bestandteile	Konzentration
R10 Medium	
Geneticin G418 sulfat	1 mg/ml

Tab.: 15 Wachstumsmedium für CTLL-1 Zellen und für KY-1 Zellen

Bestandteile	Konzentration
R10 Medium	
IL-2 Erhaltungskulturüberstand	36,25 µg IL-2 / liter
2-Mercapatoethanol	50 µM

2.10.2 Puffer und Lösungen

Tab.: 16 PBS (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)	
Bestandteile	Konzentration
NaCl; MW: 58,44g/mol	137 mM
KCL; MW: 74,4 g/mol	27 mM
KH ₂ PO ₄ , MW: 136 g/mol	1,8 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, MW: 178,0 g/mol	8,0 mM
	gelöst in H ₂ O dest., pH: 7,2 (HCl)

Tab.: 17 PBS, 10% FKS IgGfrei	
Bestandteile	Konzentration
FKS, IgG frei	10 % (v/v)
	gelöst in PBS

Puffer für die Säulenchromatographie

Tab.: 18 Elutionspuffer	
Bestandteile	Konzentration
Glycin; MW: 75,01g/mol	0,1 M
	gelöst in H ₂ O dest., pH: 2,7 (HCl)

Tab.: 19 Neutralisationspuffer	
Bestandteile	Konzentration
Tris-Base; MW: 121,1 g/mol	2, 0 M
	gelöst in H ₂ O dest., pH 8,3 (HCl)

Tab.: 20 Natriumazid- Stammlösung	
Bestandteile	Konzentration
NaN ₃ , MW: 65,01 g/mol	10 % (w/v),
	gelöst in PBS

Tab.: 21 Lagerpuffer	
Bestandteile	Konzentration
Ethanol 98%	20 % (v/v)
NaN ₃ (10%-ige Stocklösung)	0,1 % (v/v)
	gelöst in PBS
Dieser Ethanol-haltige Puffer muss vor Gebrauch entgast werden.	

Puffer für die Durchflusszytometrie

Tab.: 22 Erythrozyten-Lysepuffer	
Bestandteile	Konzentration
Erythrozyten-Lysepuffer Lösung A:	
NH ₄ CL, MW: 53,49 g/mol	185 mM
	gelöst in H ₂ O dest., pH 7,8 (NaOH)
Erythrozyten-Lysepuffer Lösung B:	
Tris-Base; MW: 121,1 g/mol	17 mM
	gelöst in H ₂ O dest., pH 7.2 (HCL)

Tab.: 23 FACS-Puffer	
Bestandteile	Konzentration
FKS, IgG frei	2,5 %
NaN ₃ (10%-ige Stocklösung)	0,1 %
EDTA, MW:372,24g/mol	2 mM
	gelöst in PBS (pH: 7,0)

Tab.: 24 10-fach FACS-Blockpuffer:	
Bestandteile	Konzentration
αCD16 / αCD32 (Klon 24G2)	1,0 mg/ml
RAT IgG, 10 mg/ml in PBS	0,5 mg/ml
	gelöst in FACS-Puffer

Der 10 x FACS-Blockpuffer wird mit FACS-Puffer verdünnt und als 1 fach FACS Blockpuffer in einem Verhältnis 50µl / 0,5 x 10⁶ Zellen eingesetzt.

Tab.: 25 Propidiumjodid-Lösung:	
Bestandteile	Konzentration
Propidiumjodid	1 mg/ml
Verdünnung 1/1000 in FACS-Puffer	1 µg/ml
Konzentration pro Probe	(0,33 µg/ml) in FACS-Puffer

Tab.: 26 Fixierlösung:	
Bestandteile	Konzentration
Formaldehyd (34 %)	4 % (v/v)
	gelöst in PBS, pH 7,4

Tab.: 27 10-fach Saponinpuffer Stammlösung.	
Bestandteile	Konzentration
Saponin	5 % (w/v)
	gelöst in FACS-Puffer, Steril filtriert (0,22µm)

Für die intrazelluläre Markierung von Zytokinen wurden die Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper in 1 fach Saponinpuffer gelöst. Die 10 fach Saponinpuffer-Stammlösung wurde entsprechend mit FACS-Puffer verdünnt.

Puffer für den ELISA

Tab.: 28 Verdünnungspuffer für den Erstantikörper	
Bestandteile	Konzentration
NaHCO ₃ , MW: 84,01 g/mol	0,1 M
	gelöst in H ₂ O dest., pH 8,2 (HCL)

Tab.: 29 ELISA-Waschpuffer	
Bestandteile	Konzentration
Tween 20	0,05 %, gelöst in PBS

Tab.: 30 Blockpuffer	
Bestandteile	Konzentration
FKS, IgG frei	10 %, gelöst in PBS

Tab.: 31 Substratlösung	
Bestandteile	Konzentration
TMB (3, 3', 5, 5' Tetramethylbenzidin-Dihydrochlorid)	1 Tablette, gelöst in 10 ml Verdünnungspuffer
Perhydrol (H ₂ O ₂) 30%	3 µl
Lösung A	25,7 ml
Lösung B	24,3 ml
H ₂ O dest.	50 ml pH 5.0
Lösung A	(TMB- Tabletten)
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O ; 178,0 g/mol	0,2 M gelöst in H ₂ O dest.
Lösung B	(TMB-Tabletten)
Citronensäure monohydrat C ₆ H ₈ O ₇ x H ₂ O, MW: 210,14 g/mol	0,1 M gelöst in H ₂ O dest.

Tab.: 32 Stopplösung	
Bestandteile	Konzentration
H ₂ SO ₄ (25 %)	1 M oder 2 N gelöst in H ₂ O dest.

Puffer für die Dot-Blot Analyse

Tab.: 33 TBS (<i>Tris Buffered Saline</i>)-Lösung	
Bestandteile	Konzentration
NaCl, MW: 58,44 g/mol	0,5 M
Tris-Base, MW: 121,1 g/mol	0,01M
Glycin; MW: 75,01 g/mol	0,001 M
	gelöst in H ₂ O dest., pH: 8,0 (5N HCL)

Tab.: 34 Blockierungspuffer	
Bestandteile	Konzentration
Tween 20	0,3 % (v/v)
Trockenmilchpulver	5 % (w/v)
	gelöst in TBS

Tab.: 35 Waschpuffer	
Bestandteile	Konzentration
Tween 20	0,05 % (v/v), gelöst in TBS

Tab.: 36 Detektionsantikörperlösung	
Bestandteile	Konzentration
biotinylierter Schaf-anti-Ratte Antikörper, spezifisch für Ratten-Immunglobuline	Verdünnung 1:1000 in Waschpuffer

Tab.: 37 Streptavidin-Enzym-Lösung	
Bestandteile	Konzentration
Streptavidin Meerrettichperoxidase	gekoppelte. Verdünnung 1:1000 in Waschpuffer

Puffer und Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese und für den Western Blot

Tab.: 38 Acrylamid Stammlösung

Bestandteile	Konzentration
Acrylamid:	30 % (w/v)
N'N'-bis-Methylen-Acrylamid:	2,67% (w/v)
	gelöst in H ₂ O dest

Tab.: 39 Trenngelpuffer

Bestandteile	Konzentration
Tris-Base, MW: 121,1 g/mol	1,5 M
	gelöst in H ₂ O dest., pH 8,8 (HCl),

Tab.: 40 Sammelgelpuffer

Bestandteile	Konzentration
Tris-Base, MW:121,1 g/mol	0,5 M
	gelöst in H ₂ O dest., pH 6,8 (HCL)

Tab.: 41 Natriumdodecylsulfat-Lösung (SDS Lsg.)

Bestandteile	Konzentration
Natriumdodecylsulfat (SDS):	10 % (w/v)
	gelöst in H ₂ O dest.

Tab.: 42 Ammoniumpersulfat-Lösung (APS Lsg.)

Bestandteile	Konzentration
Ammoniumpersulfat (APS):	10 % (w/v)
	gelöst in H ₂ O dest

Tab.: 43 Trenngel (10%-ig) Lösung

Bestandteile	Konzentration
Acrylamid-Stocklsg	33,3 % (v/v)
Tris Puffer A	25,0 % (v/v)
H ₂ O dest	40,2 % (v/v)
SDS Lsg.	1,0 % (v/v)
APS Lsg	0,5 % (v/v)
TEMED	0,05 % (v/v)

Tab.: 44 Sammelgel (4%-ig) Lösung

Bestandteile	Konzentration
Acrylamid-Stocklsg	13,32 % (v/v)
Tris Puffer B	25,0 % (v/v)
H ₂ O dest.	60,18 % (v/v)
SDS Lsg.	1,0 % (v/v)
APS Lsg	0,5 % (v/v)
TEMED	0,1 % (v/v)

Tab.: 45 Probenpuffer (Bio-Rad)

Bestandteile	Konzentration
Tris Base; MW: 121,1 g/mol	0,01 M
EDTA MW: 372,24 g/mol	0,002 M
Glycerin	33,3 % (v/v)
SDS Lsg.	3 % (w/v)
NaN ₃ (10%-ige Stocklösung)	0,01 % (v/v)
Bromphenolblau	0,1 % (w/v)
	gelöst in H ₂ O dest., pH 6,8 (HCL)

Für die Einstellung der reduzierenden Bedingungen wird Dithiotreitol (DTT) zu den einzelnen Probenansätzen bis zu einer Endkonzentration von 10 mM hinzugefügt.

Tab.: 46 Laufpuffer (Bio-Rad)

Bestandteile	Konzentration
Tris-Base; MW: 121,14 g/mol	25 mM
Glycin; MW: 75,01g/mol	192 mM
SDS Lsg.	0,1% (w/v)
	gelöst in H ₂ O dest.

Tab.: 47 Transferpuffer

Bestandteile	Konzentration
Tris-Base, MW: 121,14 g/mol	20 mM
Glycin, MW: 75,01 g/mol	150 mM
Ethanol 96 %	20 % (v/v)
	gelöst in H ₂ O dest.

Tab.: 48 Coomassie Färbelösung

Bestandteile	Konzentration
Coomassie Brillant Blue (Bio-Rad)	0,12 % (w/v)
Essigsäure (konzentriert)	20 % (v/v)
Methanol	80 % (v/v)

Tab.: 49 Entfärbelösung

Bestandteile	Konzentration
Essigsäure (konzentriert)	10 % (v/v)
Methanol	40 % (v/v)
H ₂ O dest.	50 % (v/v)

Puffer und Enzyme für die PCR Reaktion

Tab.: 50 Reverse Transkription

Bestandteile	Konzentration
M-MLV Reverse Transkriptase,	200 U pro Probenansatz
RNAase H minus, Point Mutant	
DTT, MW: 154,2 g/mol	10 mM
KCL, MW: 74,4 g/mol	75 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O, MW: 203,30 g/mol	3 mM
Tris Base; MW: 121,1 g/mol	50 mM
	gelöst in H ₂ O dest., pH: 8,3 (HCl);

Dieser Puffer wurde zusammen mit dem Enzym für direkten Einsatz in der Analyse mitgeliefert

Tab.: 51 DNA Amplifikation (PCR-Reaktion)	
Bestandteile	Konzentration
DNA TAQ-Polymerase (5U/µl) in <i>Storage Buffer B</i>	0,5 µl pro Probe
Storage Buffer B	
KCL, MW: 74,4 g/mol	100 mM
EDTA	0,1 mM
DTT, MW: 154,2 g/mol	1 mM
Tween 20	0,5 %
Nonidet P-40	0,5 %
Glycerol	50%
Tris Base; MW: 121,1 g/mol	20 mM gelöst in H ₂ O dest., pH: 8,0 (HCL)
PCR Puffer	
KCL, MW: 74,4 g/mol	50 mM
Triton-X-100	0,1 %
Tris Base; MW: 121,1 g/mol	10 mM gelöst in H ₂ O dest., pH: 9,0 (HCL);
MgCl ₂ Puffer	
KCL, MW: 74,4 g/mol	50 mM
Triton-X-100	0,1 %
MgCl ₂ x 6 H ₂ O, MW: 203,30 g/mol	1,5 mM
Tris Base; MW: 121,1 g/mol	10 mM gelöst in H ₂ O dest., pH: 9,0 (HCL);

Diese Puffer wurden vom Hersteller zusammen mit dem Enzym für den direkten Einsatz in der Analyse mitgeliefert.

Agarose-Gelelektrophorese

Tab.: 52 TEA-Puffer	
Bestandteile	Konzentration
Tris Base; MW:121,1 g/mol	40 mM
EDTA, MW:372,24 g/mol	1 mM
	gelöst in H ₂ O dest., pH: 7,9 (Essigsäure); steril filtrieren 0,22 µm

Tab.: 53 Ethidiumbromidlösung:	
Bestandteile	Konzentration
Ethidiumbromid (1 mg/ml)	0,1 % (v/v) gelöst in TEA-Puffer

Tab.: 54 Agaroselösung	
Bestandteile	Konzentration
Ethidiumbromidlösung(s.o.)	0,4 % (v/v)
Agarose	1,5 % gelöst in TEA-Puffer

MTT Assay

Tab.: 55 Puffer für den MTT Analyse	
Bestandteile	Konzentration
3-(4,5-Dimethyldiazol-2-yl)-2,5 Diphenyltetrazoliumbromid; „Thiazylblau“ (MTT)	5 mg/ml (w/v)
	gelöst in PBS, steril filtrieren mittels 0,45 µm Filter; Lagerung bei 4 °C

Tab.: 56 Stopplösung	
Bestandteile	Konzentration
Natriumdodecylsulfat (SDS)	20 % (w/v)
	gelöst in H ₂ O dest, pH 4,7 (1M Na Acetat Lsg.)

Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit II

Tab.: 57 Annexin V Bindungspuffer	
Bestandteile	Konzentration
NaCl; MW: 58,44g/mol	140 mM
CaCl ₂	2,5 mM
HEPES	10 mM
	gelöst in H ₂ O dest, pH 7,4 (NaOH)

2.11 Antikörper

Tab.: 58 Isotypkontrollen

Antigen	Klon	gekoppelt	Donor	Subtyp	Bezugsquelle
Isotyp IgM	R4-22	FITC	Ratte	IgM, κ	BD Pharmingen
Isotyp IgM	R4-22	PE	Ratte	IgM, κ	BD Pharmingen
Isotyp IgM	R4-22	Biotin	Ratte	IgM, κ	BD Pharmingen
Isotyp IgG 1	R3-34	PE	Ratte	IgG 1	BD Pharmingen
Isotyp IgG 2a	R35-95	PE	Ratte	IgG 2a, κ	BD Pharmingen
Isotyp IgG 2a	R35-95	gereinigt	Ratte	IgG 2a, κ	BD Pharmingen
Isotyp IgG 2b	A95-1	FITC	Ratte	IgG 2b, κ	BD Pharmingen
Isotyp IgG 2b	D3/13F1	gereinigt	Ratte	IgG 2b	RKI, P21
Isotyp IgG 2b	D3/13F1	Biotin	Ratte	IgG 2b	RKI, P21
Isotyp IgG	G235-2356	PE	Arm. Hamster		BD Pharmingen
Isotyp IgG 1	2A11	Biotin	Maus	IgG 1	RKI, P21

Tab.: 59 Antikörper für die intrazelluläre Markierung von Zytokinen

Antigen	Klon	gekoppelt	Donor	Subtyp	Bezugsquelle
IFN- γ	AN18.17.24	FITC	Ratte	IgG 1	RKI, P21
IFN- γ	AN18.17.24	APC	Ratte	IgG 1	RKI, P21
IFN- γ	AN18.17.24	Cy5	Ratte	Rat IgG 1	RKI, P21
IFN- γ	AN18.17.24	PE	Ratte	IgG 1	RKI, P21
IL-2	Jes 6 1A12	gereinigt	Ratte	IgG 2a	vergl. Tab. 2
IL-2	Jes 6 5H5	PE	Ratte	IgG 2b	BD Pharmingen
TNF- α	MP6-XT22	APC	Ratte	IgG 1	BD Pharmingen
TNF- α	MP6-XT22	PE	Ratte	IgG 1	BD Pharmingen
TNF- α	MP6-XT3	gereinigt	Ratte	IgG-1, κ	eBioscience
TNF- α	G281-2626	gereinigt	Ratte	IgG 1	BD Pharmingen
IL 10	JES 5-16E3	PE	Ratte	IgG 2b	BD Pharmingen
IL 10	JES 5-16E3	gereinigt	Ratte	IgG 2b	vergl. Tab. 2
IL 12	C 15.6	APC	Ratte	IgG 1	BD Pharmingen
IL 12	C 15.6	gereinigt	Ratte	IgG 1	BD Pharmingen
IL-15	Ab7313	gereinigt	Kaninchen	Poly AK	Abcam
IL-1- α	ALF-161	PE	Arm. Hamster	IgG	BD Pharmingen

Tab.: 60 Konjugate

Antigen	Markierung	Protein	Bezugsquelle
Biotin	PE	Streptavidin	Dianova
Biotin	FITC	Streptavidin	Dianova
Biotin	FITC	Streptavidin	BD-Pharmingen
Biotin	PE	Streptavidin	BD-Pharmingen
Biotin	APC	Streptavidin	BD-Pharmingen
Biotin	POD	Streptavidin	Amersham Life Science
Phosphotidylserin	gereinigt	Annexin	BD Pharmingen
Phosphotidylserin	FITC	Annexin	BD Pharmingen

Tab.: 61 Monoklonale Antikörper für die Markierung von Membran-Oberflächenproteinen

Antigen	Klon	gekoppelt	Donor	Subtyp	Bezugsquelle
NK1.1 (CD161b/c)	PK136	PE	Maus	IgG 2a, κ	eBioscience
NK1.1 (CD161b/c)	PK139	gereinigt	Maus	IgG 2a, κ	ATCC, HB 191
NK1.1 (CD161b/c)	PK139	Biotin	Maus	IgG 2a, κ	eBioscience
IL-2 /IL15 Rez.β (CD122)	TM-β1	PE	Ratte	IgG 2b, κ	BD Pharmingen
IL-2 /IL15 Rez.β (CD122)	TM-β1	PE	Ratte	IgG 2b, κ	eBioscience
IL-2 /IL15 Rez.β (CD122)	TM-β1	Biotin	Ratte	IgG 2b, κ	eBioscience
IL-2 /IL15 Rez.β (CD122)	TM-β1	gereinigt	Ratte	IgG 2b, κ	eBioscience
IL-2 /IL15 Rez.β (CD122)	5H4	Biotin	Ratte	IgG 2a, κ	eBioscience
IL-2 Rez α (CD 25)	2E1	PE	Ratte	IgG	RKI, P21
MHC II (I-A ^{d/I} E ^d)	2G9	PE	Ratte	IgG 2a, κ	BD Pharmingen
MHC II (I-A ^{d/I} E ^d)	2G9	FITC	Ratte	IgG 2a, κ	BD Pharmingen
MHC II (I-A ^{bdq} -I-E ^{dk})	M5/114	PE	Ratte	IgG 2b, κ	RKI, P21
MHC II (I-A ^{bdq} -I-E ^{dk})	M5/114	FITC	Ratte	IgG 2b, κ	ATTC, TIP 120
MHC II (I-A ^{bdq} -I-E ^{dk})	M5/114	gereinigt.	Ratte	IgG 2b, κ	ATTC, TIP 120
Pan Granulozyten (GR-1)	RB6-8C5	FITC	Ratte	IgG 2b, κ	vergl. Tab. 2
Pan Granulozyten (GR-1)	RB6-8C5	FITC	Ratte	IgG 2b, κ	BD Pharmingen
Pan Granulozyten (GR-1)	RB6-8C5	gereinigt	Ratte	IgG 2b, κ	vergl. Tab. 2
CD3 (TCR)	17A2	FITC	Ratte	IgG 2b, κ	BD Pharmingen
CD4 (L3T4)	H129.19	PE	Ratte	IgG 2a, κ	BD Pharmingen
CD4	GK1.5	gereinigt	Ratte	IgG 2b, κ	ATTC, TIP 207
CD4	GK1.5	Biotin	Ratte	IgG 2b, κ	ATTC, TIP 207
CD4	GK1.5	FITC	Ratte	IgG 2b, κ	ATTC, TIP 207
CD8a (Ly 2)	53-6.7	FITC	Ratte	IgG 2a, κ	BD Pharmingen
CD8b	53-5.8	PE	Ratte	IgG 1, κ	BD Pharmingen
CD11b (MAC-1)	M1/70	FITC	Ratte	IgG 2b, κ	BD Pharmingen
CD19 (Pan-B-Zellen)	1D3	PE	Ratte	IgG 2a, κ	BD Pharmingen
CD16 / CD32	24G2	gereinigt	Ratte	IgG 2b, κ	vergl. Tab. 2
Annexin V	Protein	FITC			BD Pharmingen
IL-15	Ab7313	gereinigt	Kaninchen	Poly AK	Abcam
F4/80	Cl:A3-1	FITC	Ratte	IgG 2b, κ	SeroTec
F4/80	Cl:A3-1	Biotin	Ratte	IgG 2b, κ	vergl. Tab. 2
F4/80	Cl:A3-1	Biotin	Ratte	IgG 2b, κ	BD Pharmingen

Tab.: 62 Sekundärantikörper und Detektionsantikörper für Dot-Blot- und Western-Blot-Analysen

Antigen	Beschreibung	gekoppelt	Bezugsquelle
Ratte Ig	Schaf, ganzer Antikörper (RPN1002)	Biotin	Amersham Life Science
Ratte Ig (schwere und leichte Ig-Kette)	Ziege, ganzer Antikörper; (gegen Maus-FITC adsorbiert)		
Ratte IgM	Mensch- Rind- Pferdserum adsorbiert)		Dianova
	Ziege, F(ab) ₂ -Fragment, (gegen Mensch- Rind- Pferdserum adsorbiert)	PE	Dianova
Ratte Ig(schwere und leichte Ig-Kette)	Ziege, F(ab) ₂ -Fragment, (gegen Mensch- Rind- Pferd- und Kaninchenserum adsorbiert)	undPE	Dianova