universität innsbruck
Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Modulation und Migration der Langerhans Zellen in vitro und in vivo

Ortner, Ulrike

1994

II. Material und Methoden

urn:nbn:at:at-ubi:2-12523

II.Material und Methoden

1. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden in erster Linie Inzuchtmäuse vom Stamm Balb/c verwendet. Im immunologischen Labor der Hautklinik Innsbruck werden die meisten Experimente mit diesem Stamm durchgeführt, sodaß ein reiches Repertoire an Erfahrungen, Daten und geeigneten Reagenzien vorhanden ist. Hier in diesen Experimenten wurden sehr oft weibliche, 2-6 Monate alte Balb/c Mäuse verwendet. Diese haben den Vorteil einer großen Anzahl und gleichmäßigen Verteilung von LZ, sowie eines sehr geringen Anteils an dendritischen epidermalen T-Zellen unter den Epidermalzellen, und somit sind sie für Studien an den Langerhanszellen besonders gut geeignet. Die Tiere entstammen der hauseigenen Inzucht,die unter Aufsicht von Dr. Franz Koch nach Bewilligung angelegt wurde. Weiters wurden noch zusätzlich C3H-Mäuse sowie C3H/HEJ/Cr-IBR (LPS-resistente Mäuse) verwendet, welche von Charles River Wiga, Sulzfeld, Deutschland zugekauft wurden.

2. Kulturmedium

In den meisten Versuchen wurde als Kulturmedium „R10“ verwendet,
d.h.RPMI 1640 (Seromed Biochrom,Berlin)

+10% fötales Kälberserum (FCS, Gibco Laboraties, Paisley, GB), hitzeinaktiviert (56°C/30min)
+5µM 2-Mercaptoethanol (Sigma Chemical Co., St. Louis. MO)
+20µg Gentamycin (JRH, Bioscience)
+200 mM L-Glutamin (Sebac, Stuben, A)

Weiters wurde ein serumfreies Medium, „Aim V“ (Gibco/ BRL, Gaithersburg, MD), verwendet. Dieses wurde lediglich versehen mit

+200mM L-Glutamin
+5µM 2-Mercaptoethanol
+20µg Gentamycin

3. Die Organkultur

a) Versuchsanordnung

Die Kultivierung der dorsalen Ohrhälften wurde ausschließlich in Gewebekulturplatten mit 24 Vertiefungen („well") (Costar Nr.3524, Cambridge, MA) vorgenommen. Aus früheren Versuchen ist bekannt, daß in diesen Platten das Verhältnis Volumen des Mediums/Ohroberfläche am Günstigsten ist (Zitat aus Dissertation M. Heine). Pro „well" habe ich 1,5ml Kulturmedium verwendet. Diese Menge entstand als Kompromiß aus einerseits möglichst viel Medium aufgrund des Verbrauchs durch das Organ und andererseits möglichst wenig Medium, um die Menge der zugefügten Zytokine relativ gering zu halten.
Üblicherweise wurden die Ohrhälften dann auf das Medium aufgelegt, bei 37°Cund 5% CO_2 inkubiert, und nach 1-3 Tagen zu "sheets" (siehe unten) weiterverarbeitet. Das inzwischen stark verfärbte Medium wurde abgesammelt, gepoolt, zentrifugiert und die ins Medium ausgewanderten Zellen nach Zugabe von Trypanblau (Seromed Biochrom KG, Berlin), welches eine Unterscheidung zwischen toten und viablen Zellen ermöglicht, im Hämozytometer gezählt. Zur weiteren Beurteilung wurden die Zellen großteils noch zu Zytopräparaten weiterverarbeitet und später gefärbt.
Durch eine Modifikation des Systems meinerseits kamen noch ein paar interessante Aspekte hinzu. In dem eben beschriebenen „klassischen System" ist es nicht möglich, die täglich ausgewanderten Zellen genauer zu beurteilen. Außerdem war mir aufgefallen, daß das Medium innerhalb weniger Stunden schon seine Farbe stark veränderte, also verbraucht zu werden schien. Deshalb begann ich, die gleichen Ohrhälften jeden Tag auf neues Medium zu transferieren. So hatte ich nun die Möglichkeit, die Anzahl der täglich ausgewanderten Zellen über einen längeren Zeitraum zu erheben und deren Funktionszustand und Reifungszustand zu untersuchen. Ergebnisse siehe später!

b) Praktische Durchführung

1. Zuerst werden die Mäuse mit Hilfe von CO_2 getötet und die Ohren dann mit einer gebogenen Schere an der Basis abgeschnitten.
2. Zwei Petrischalen werden mit 70%igem Alkohol gefüllt, in eine dritte Petrischale wird ein steriler Tupfer gelegt. Die Ohren werden durch die beiden Petrischalen mit Alkohol gezogen, um sie zu desinfizieren und anschließend auf dem sterilen Tupfer zum Trocknen aufgelegt.
3. Nach ca 15 min Trockenzeit können nun die beiden Ohrhälften auseinandergezogen werden (Diese Trockenzeit wurde stark variiert; siehe später). Das Ohr wird mit der Knorpelseite (der ventralen Seite) nach unten auf steriler Unterlage aufgelegt. Nun setzt man am Besten mit einer geraden sterilen Pinzette am Schnittrand an und zieht mit einer gebogenen Pinzette die dorsale Ohrhälfte in einem Stück ab.
4. Mit der dermalen Seite nach unten werden die dorsalen Ohrhälften jetzt auf die schon vorbereiteten 1,5ml Medium in der 24-well Gewebekulturplatte aufgelegt, möglichst ohne daß die epidermale Seite naß wird. Prinzipiell können auch die ventralen, also Knorpelseiten aufgelegt werden, jedoch ist die Anzahl der ausgewanderten dendritischen Zellen deutlich niederer und die weitere Präparation aufwendiger. Aus diesem Grund wurde auf die ventralen Knorpelseiten verzichtet.
   Diese Schritte werden in der Sterilbank durchgeführt.
5. Nun kann die Kultur in den Brutschrank gestellt werden und je nach Bedarf 1-3d bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert werden.

c) Ernten der ausgewanderten Zellpopulation

Die auf dem Medium aufschwimmenden Ohrhälften werden mit einer Pinzette vorsichtig abgehoben und zur Herstellung von „sheets“ auf Amoniumthiocyanatlösung aufgelegt (siehe Herstellung von epidermalen und dermalen „sheets“). Das Medium wird aufpipettiert und der Inhalt von je 6 wells in einem Polypropylenröhrchen gesammelt. Jedes well wird mit etwas R10 nachgespült, um möglichst alle Zellen zu erwischen. Die Suspension wird nun mit 1500 Upm (263g) bei 4°C für 8 min zentrifugiert, der Überstand bis auf das “pellet” abgesaugt und in 300µl R10 resuspendiert. Im Hämocytometer kann nun die Zählung der ausgewanderten

Zellen erfolgen, wobei es hier, bei diesen niederen Zellzahlen, notwendig ist, alle 9 Felder im Hämozytometer auszuzählen, um eine bessere Genauigkeit zu erreichen.

4. Herstellung von Zytozentrifugenpräparaten und ihre Färbung

Die Zellsuspension wurde soweit in R 10 verdünnt, daß 200µl ungefähr 30.000-40.000 Zellen enthalten (1,5-2,0 x 10^5 Zellen/ml). Je 200µl werden in einem kleinen Trichter in der Zytozentrifuge (Cytospin 2, Shandon) für 6 min bei 4500Upm auf einen Objektträger zentrifugiert.

Die Präparate müssen ca. 30 min lufttrocknen und können dann bei -20°C eingefroren werden oder zur weiteren Verarbeitung 5 min mit Azeton fixiert werden.

Im Folgenden können die Präparate mit Immunfluoreszenz- oder Peroxidasetechnik gefärbt werden.

Färbeprotokoll:

1. Um das Abfließen der Antikörper und Waschlösungen weitgehend zu verhindern, müssen die Zellen mit einem speziellen Fettstift (PAP-Pen, Daigo Sangyo Co., Japan) umrandet werden.
2. Inkubation mit dem ersten Antikörper (siehe Tab.II.1):
   50µl Antikörperlösung werden auf den Objektträger aufpipettiert, und alle Präparate in der feuchten Kammer bei 37°C 30 min lang inkubiert.
3. Waschen mit PBS/BSA (phosphate buffered saline/bovine serum albumin 1%). Dazu wird der Puffer von der eine Seite mit einer Pasteurpipette langsam aufgeträufelt und anschließend von der anderen Seite wieder abgesaugt. Dieser Vorgang wird 6-10-mal wiederholt.
4. Inkubation mit dem zweiten Antikörper (siehe Tab.II.2):
   Es wurden weitgehend biotinylierte Ak verwendet, welche zu 50µl auf den Objektträger aufgetragen werden, und diese anschließend wieder 30 min bei 37°C inkubiert werden.
   Peroxidase:
   In diesem Schritt kann gleichzeitig die endogene Peroxidase geblockt werden. Zu 800µl PBS/BSA gibt man 100µl 2-molare ßD-Glucoselösung und 100µl Glucose-Oxidase mit einer Konzentration von 15 U/ml.
   Mit dieser Pufferlösung wird der Sekundärantikörper 1:200 verdünnt. Sollte das Abblocken der endogenen Peroxidase nicht erwünscht oder notwendig sein, verdünnt man den

Sekundärantikörper einfach mit PBS/BSA im Verhältnis 1:200.

Immunfluoreszenz:

Sekundärantikörper 1:200 verdünnt mit PBS/BSA.

5. Waschen mit PBS/BSA.
6. Inkubation mit dem dritten Antikörper/Immunreagenz:

   Wiederum 30min bei 37°C inkubieren:.

   Peroxidase:

   Peroxidasekonjugat (Streptavidin horseadish peroxidase complex von Amersham Int. plc, Amersham, UK) 1:100 mit PBS/BSA verdünnt.

   Immunfluoreszenz:

   Fluoreszenzkonjugat (Streptavidin-Fluorescein von Amersham Int. plc, Amersham, UK) 1:300 mit PBS/BSA verdünnt.
7. Waschen mit PBS/BSA
8. Immunfluoreszenz:

   Hiermit ist die Färbung beendet und die Objektträger werden nur noch mit Einbettmedium (mounting medium for fluorescence, Vectashield, Vector, Burlingame, CA; vertrieben von Scandic, Wien) eingedeckt.

   Peroxidase:

   Hier muß das Peroxidasekonjugat erst durch die Diaminobenzidin-Reaktion visualisiert werden:
9. Hierfür werden 10 mg Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (Polysciences, Inc, Warrington, PA) in 20 ml Tris-HCL-Puffer mit pH 7,6 aufgelöst und filtriert.
10. Unmittelbar vor der Inkubation werden 5µl 30%-iges Perhydrol (Merck, Darmstadt) dazugegeben.
11. Inkubation der Präparate für 10 min mit 50µl Diaminobenzidinlösung.
12. Waschen mit Tris-HCL-Puffer, pH 7,6
13. Gegenfärben der Kerne mit Hämatoxylinlösung (nach Böhmer, Gatt, Ibk):

    Übergießen der, in eine Küvette gestellten, Objektträger mit Hämatoxylin. Nach 15-20 sec beenden der Reaktion durch Waschen mit lauwarmen, fließendem Wasser.
14. Eindecken der Präparate mit PBS/Glycerin 1:9 gemischt.

Tab.II.1

Name	ATCC	Ig-Klasse	CD	Antigen-Spezifität	Ref.
B21/2	TIB 229	Ratte G2b		I-$A^{b,d}$	[10, 71]
NLDC-145		Ratte G2a		DC	
2A1		Ratte G2a		Intrazelluläre Organellen in reifen DZ u. B-Zellen	[54, 56]
10.216	TIB 93	Maus G2b		I-$A^{k,r,f,g}$	[112]
MK-D6	HB 3	Maus G2a		I-A^{d}	
14-4-4S	HB 32	Maus G2a		I-$E^{d,k}$	[113]
M342		Hamster-Ig		Intrazelluläre Organellen in reifen DZ u. B-Zellen	[9]
F4/80	HB 198	Ratte G2b		Makrophagen	[114, 115]
RB6-8C5		Ratte G2b		Granulozyten	
HO-13.4	TIB 99	Maus M	CDw90	Thy-1.2	
B5/5		Ratte G2b	CDw90	Thy-1.2	[116]
GK 1.5	TIB 207	Ratte G2b	CD 4	Helfer T-Zellen	
KJ16		Ratte G2a		TCR α,β	[112]
BE29G1		Ratte G2b	CD54	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1/ICAM-1	[117]
Anti-SN		Kaninchen-Ig		Sekretoneurin	
Serum 101		Kaninchen-Ig	CD1a	anti-murine-CD1a	

Legende: ATCC: American Typ Culture Collection, Rockville, MD
CD: cluster of differentiation
Ref.: Referenzen
TCR: T Zell Rezeptor

Tab.II.2

Je nach verwendeten Primärantikörper kamen folgende Sekundärantikörper zur Anwendung:
1. Schaf-anti-Maus IgG, biotinyliert, Spezies-spezifisch, ganzer Antikörper
2. Schaf-anti-Ratte IgG, biotinyliert, Spezies-spezifisch, ganzer Ak.
3. Esel-anti-Kaninchen IgG, biotinyliert, spezies-spezifisch, ganzer Ak,(alle von Amersham int., plc, Amersham UK)

5. Herstellung von epidermalen und dermalen „sheets" und ihre Färbung

Aus verschiedensten Gründen wird die Ohrhaut für die Präparation von murinen Langerhanszellen bevorzugt:

- Die Ohrhaut ist nur sehr spärlich behaart, was für die spätere Betrachtung im Mikroskop von großem Vorteil ist.
- Die Herstellung der Häutchenpräparaten („sheets") ist relativ einfach, da sich nach richtiger Vorbereitung die Epidermis von der Dermis gut abziehen läßt.
- Die Anzahl der LZ ist hier besonders hoch und sehr gleichmäßig, sodaß eine Veränderung in der Zelldichte recht leicht gesehen und numerisch ausgewertet werden kann.

Herstellung der „sheets":

- Die dorsalen Ohrhälften werden aus der Kultur entnommen oder frisch getrennt, wie oben beschrieben, und auf einer 0,5 molaren Amoniumthiocyanat in Phosphatpuffer mit der dermalen Seite nach unten aufgelegt.

  Rezept: 0,1M $Na_2HPO_4 . 2H_2O$ = 8,9g/500ml Aqua dest.

  0,1M KH_2PO_4 = 6,8g/500ml Aqua dest.

  (beides von Merck, Darmstadt, Deutschland)

  Na_2HPO_4 wird in 500ml Aqua dest. gelöst und davon der pH-Wert gemessen. Dann wird so lange KH_2PO_4, welches auch in 500ml Aqua dest. gelöst wurde, dazugegeben, bis der

pH-Wert der Gesamtlösung 6,8 ergibt. Dies ergibt dann einen 0,1 molaren Na-K-Phosphatpuffer mit pH-wert von 6,8. In diesen Puffer wird Ammoniumthiocyanat (Merck, Darmstadt, Deutschland) 0,5 molar Lösung gelöst (=3,8g Ammmoniumthiocyanat auf 100ml Phosphatpuffer).
So werden die Ohrhälften 20min bei 37°C inkubiert. Diese Zeit muß bei der Herstellung von "sheets", die aus Ohrhäften von im serumfreien AIM V-Medium inkubierten Kulturen stammen, auf 5-10 min gesenkt werden, sonst ist keine erfolgreiche Trennung von Epidermis und Dermis mehr möglich. Durch die Serumfreiheit kann die Amoniumthiocyanatlösung ihre Wirksamkeit stärker entfalten (mögliche Abpufferung durch die Proteine).

- Nun werden die Ohrhälften herausgehoben, auf einem Tropfen PBS ausgebreitet und mit 2 feinen Pinzetten die Epidermis von der Dermis getrennt. Das große Epidermisstück wird in kleine (ungefähr 3x3 mm) „sheets" geschnitten. Die dermalen Ohrhälften belasse ich zur besseren Unterscheidbarkeit ganz. Erst unmittelbar vor dem Färbevorgang werden auch die dermalen Ohrhälften zu 3x3mm großen „sheets zugeschnitten.
  Zur Fixation werden die „sheets" für 20min bei Raumtemperatur in Azeton gegeben.
- Waschvorgang: 1x in reinem PBS, 2x in PBS/BSA
  Jetzt können die „sheets" in Alufolie verpackt und bei -20°C eingefroren oder gleich weiter gefärbt werden.

Färbeprotokoll:

1. Am schnellsten erfolgt die Färbung mit dem sogenannten „sheet-shifter" (der von dem ehemaligen Kollegen Dr. Peter Stöger erfunden wurde), welcher es ermöglicht, die kleinen „sheets" recht schnell und vor allem ohne Beschädigung von einem well der 96-well-Platte in das Nächste zu transferieren.
2. Inkubation mit dem 1. Antikörper (siehe Tab.II.1):
   50µl von einem supernatant (unverdünnter Kulturüberstand von antikörperproduzierenden Hybridomen) oder einem gereinigten Antikörper in ensprechender Verdünnung. Die Inkubation erfolgt ca. 16 Stunden über Nacht im Kühlschrank bei 4°C oder 90 min bei 37°C.
3. 3 x 20 min waschen mit PBS/BSA.

4. Inkubation mit dem 2. Antikörper (siehe Tab.II.2)
   90 min mit biotinyliertem Ak 1:200 verdünnt bei 37°C inkubieren.
5. 3 x 20 min waschen mit PBS/BSA.
6. Inkubation mit dem 3. Antikörper/Immunreagenz:
   Fluoreszenz:
   90 min Inkubation mit Streptavidin-FITC 1:300 verdünnt mit PBS/BSA bei 37°C inkubieren bzw mit Streptavidin Texas Red (beide von Amersham Int.,plc Amersham, UK) 1:50 verdünnt.
   Peroxidase:
   90 min Inkubation mit Streptavidin-Peroxidase-Konjugat 1:100 verdünnt mit PBS/BSA bei 37°C.
7. 3 x 20 min waschen mit PBS/BSA.
8. Die Fluoreszenzfärbung ist hiermit abgeschlossen. Die „sheets" werden nun mit der dermalen Seite nach oben (Kontrolle unter dem Stereomikroskop (Reichert, Austria) in „mounting medium for fluorescence" (Vectashield) auf dem Objektträger eingebettet.
9. Bei der Peroxidasefärbung muß der Peroxidasekonjugat erst visualisiert werden: Dazu werden 10mg Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid in 20ml Tris-HCL-Puffer (pH 7,6) aufgelöst; erst unmittelbar vor der Inkubation müssen 5µl 30%-iges Perhydrol (H_2O_2) dazugegeben werden. Mit dieser Lösung werden die „sheets" noch ca 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend
10. 3 x 20 min mit Tris-HCl-Puffer, pH 7,6, gewaschen.
11. Jetzt können auch diese „sheets" mit der dermalen Seite nach oben (Stereomikroskopkontrolle) in PBS-Glycerin, 1:9 gemischt, auf einem Objektträger eingebettet werden.

6. Mikroskopische Auswertmethoden:

- **Phasenkontrastmikroskopie:**

Der Verlauf der Organkultur wurde mit einem Nikon Invert- Mikroskop Diaphot-TMD beobachtet.

- **Fluoreszenzmikroskopie:**

Fast alle Beobachtungen wurden an einem kombinierten Fluoreszenzmikroskop mit Auflichtfluoreszenz (Orthoplan II, Leitz, Wetzlar, Deutschland) gemacht. Die Ermittlung der LZ-Anzahl/mm² erfolgte durch das randomisierte Auszählen von mindestens 9 Gesichtsfeldern je sheet mittels eines im Okular integrierten Zählfeldes. Dieses Zählfeld wurde mit einem Objektmikrometer kalibriert.
Die Auszählung der epidermalen „sheets" gestaltete sich einfach, da die Verteilung der DC in Balb/c-Mäusen relativ regelmäßig ist, und somit auch eine Abnahme der Zellzahl unschwer zu erkennen ist und sich leicht exemplarisch und photografisch (siehe Abbildung 1 a-d) dokumentieren läßt. Die Auswertung der dermalen „sheets" ist wesentlich diffiziler,

1. wegen der größeren Dicke der Dermis, welche aber sehr ungleichmäßig ist, und
2. wegen der ungleichmäßigen Verteilung der DC in derselbigen. Nur durch starkes Fokussieren gelangen ein Großteil der DC zur Ansicht. Dadurch konnten sie aber nicht ausgezählt werden und wurden daher nur deskriptiv ausgewertet.

Die Fluoreszenzpräparate eines Versuchsansatzes wurden alle mit der gleichen Belichtungszeit (2 min), teilweise aber mit verschiedenen Vergrößerungen photographiert. Durch gleiche Vergrößerungen und gleiche Belichtungszeiten ist eine objektive Vergleichsmöglichkeit der Färbeintensität möglich.

- **Durchlichtmikroskopie:**

Die meisten Zytozentrifugenpräparate wurden mit der Immunperoxidase Technik gefärbt und mit Durchlichtmikroskopie (Leitz-Orthoplan II, Leitz, Wetzlar, Germany) begutachtet. Sie gaben vor allem Auskunft über den prozentuellen Anteil der positiv gefärbten DC und boten somit eine Kontrollmöglichkeit der im Hämozytometer ausgezählten Daten.

7. Methoden zur Bestimmung der funktionellen Kapazität

a) Messung der Fähigkeit zur Stimulation ruhender T-Lymphozyten:

Prinzip und Methodik der Oxidativen Mitogenese (OXMI)

Prinzip:

Als Standardsystem zur Bestimmung der funktionellen Kapazität wird in der Regel die MLR (mixed leukocyte reaktion) verwendet. Dabei handelt es sich jedoch um ein allogenes System, welches einige Tage beansprucht und dann eine oligoklonale Proliferation induziert.
Eine alternative Methode stellt die OXMI dar [34]. Hierbei werden syngene T-Zellen durch die Anwesenheit von Antigenpräsentierenden Zellen zur polyklonalen Proliferation stimuliert. Diese Proliferation ist direkt abhängig von der Funktionstüchtigkeit und der Anzahl der APZ, wodurch die OXMI als Standarduntersuchung zur Bestimmung der immunstimmulatorischen Kapazität der APZ verwendet werden kann. Die T-Zellen sind vom selben Mausstamm wie die APZ. Durch Veränderung ihrer Oberfläche mittels Perjodierung werden die T-Zellen aber empfänglich für Stimuli von syngenen APZ. Der Vorteil dieser Methode liegt in der polyklonalen Proliferation einerseits und in der wesentlich kürzeren Dauer des Assays andererseits, wobei auch weniger APZ pro Ansatz gebraucht werden.

Methodik:

Die für die OXMI benötigten T-Zellen stammen aus den Milzen und mesenterialen Lymphknoten von Mäusen desselben Haplotyps wie die APZ. Aus den Milzen und Lymphknoten wird durch Zerteilen der Organe eine Zellsuspension hergestellt, durch hypotone Lyse von Erythrozyten befreit und vorsichtig auf eine mit Nylonwolle gestopfte Säule pipettiert. Durch die unterschiedliche Größe der Zellen wandern sie in unterschiedlichem Tempo durch das enge Maschenwerk. Die T-Zellen werden dabei von adhärenten Makrophagen, B-Zellen und dendritischen Zellen weitgehend befreit, und sind aufgrund ihrer Kleinheit die ersten Zellen, die am unteren Ende dieser Nylonwollsäule wieder herauskommen.
Entscheidend ist am Ende die Perjodierung der T-Zellen, welche zu einer Veränderung der

Oberflächenstruktur und damit zu einer "Entfremdung" der APZ führte. Damit wird eine Stimulation zur T-Zellproliferation in Anwesenheit experimentell zugeführter syngener APZ erst ermöglicht. Nach mehreren Waschungen werden die T-Zellen mit 0,5 % $NaIO_4$ Lösung in PBS 15 min bei 37°C inkubiert. Über einen diskontinuierlichen Percoll-Gradienten (45%-54%-63%) werden die Zellen noch in "gute" und "schlechtere" T-Zellen aufgetrennt [98]. Dabei sammeln sich tote Zellen in der Schicht zwischen Kulturmedium und 45% Percoll; restliche APZ und Lymphoblasten akkumulieren in der 45%-54% Zwischenschicht. Die weitgehend APZ-freien, kleinen runden, ruhenden T-Zellen finden sich in der 54%-63%-Interphase. Diese T-Zell-Population wurde für die Experimente hergenommen, denn die Reinheit der T-Zellen bestimmt die von experimentell zugeführten APZ-unabhängige Eigenproliferation, welche möglichst gering sein sollte und als Kontrolle mitbegutachtet werden muß.

Durchführung:

Die OXMI wird in einer 96-well Flachboden Mikrotiterplatte (Falcon, Nr. 3072) durchgeführt. Die APZ werden in einer Verdünnungsreihe von 3000, 1000, 300 und 100 Zellen/100µl/well in Triplikaten ausplattiert. Wegen der hohen immunstimmulatorischen Aktivität, welche ein typisches Merkmal der kultivierten LZ und DZ ist, kann die Verdünnungsreihe eventuell noch weiter auf 30 und 10 Zellen/100µl/well fortgesetzt werden. In einem weiteren Schritt werden 300.000 perjodierte T-Zellen in 100µl/well dazugegeben. In einem Endvolumen von 200µl/well wird der Ansatz nun genau 24 h bei 37°C inkubiert. Nach diesem Zeitraum werden pro well 50µl [^{3}H] Thymidin (Endkonzentration 148 kBq= 4µCi/ml; 247,9 G Bq= 6,7 Ci/mmol; New England Nuclear, Boston, MA) dazugegeben, welches in die proliferierenden T-Zellen eingebaut wird und so eine Messung der Proliferation ermöglicht.

Nach weiteren 16 Stunden bei 37°C wird der Prozeß gestoppt indem man die Platte bis zur späteren Weiterverarbeitung in den Kühlschrank stellt. In einem Zell-Erntegerät (PHD-Cell-Harvester, Cambridge Technology, Inc., MA) werden die Zellen geerntet und mit einem Filterpapier aufgefangen. Diese Filterpapierchen werden in Szintillationsflüssigkeit (Optiszint-High-Safe, Pharmacia) aufgelöst und somit kann die in die Zellen eingebaute Radioaktivität als proportionale Fluoreszenz in einem Flüssigszintillationszähler (Wallac 1410, Pharmacia, Wien) gemessen werden. Die angegebenen Werte stellen einen Mittelwert aus den Triplikaten dar (SD < 10 %), sie werden als „counts per minute" (cpm) angegeben.

b) Messung der Fähigkeit zum Prozessieren von Proteinen:

Prinzip und Methodik von antigen-spezifischen Proliferations-Assays

Prinzip:

Eine besondere Eigenschaft von frischen LC stellt die Fähigkeit zum Prozessieren von Antigenproteinen dar. Das Prozessieren des Antigens ist ein intrazellulärer Prozeß, bei dem das Antigen von den DC aufgenommen wird, durch intrazelluläre Enzyme in Peptide zerstückelt wird und im weiteren diese Peptide in den Bindungstaschen der MHC Klasse II Moleküle an der Oberfläche präsentiert werden [56, 118]. Ob und wie effizient diese MHC/Peptidkomplexe an ruhende T-Zellen präsentiert werden und sie zur Proliferation und Zytokinproduktion bringen, wird unter anderem mit den in Punkt 7.a beschriebenen Assays (MLR, OXMI) gemessen. Um nur die Prozessierfähigkeit zu bestimmen, könnte theoretisch ein direkter Ansatz gewählt werden, nämlich die Messung der spezifischen MHC/Peptidkomplexe auf der Zelloberfläche. Das ist aber praktisch nicht möglich. Es werden deshalb Klone oder Hybridome von T-Zellen herangezogen, die nur einen, genau definierten MHC/Peptidkomplex mit ihren T-Zell-Rezeptoren erkennen und darauf mit Proliferation und/oder Zytokinausschüttung reagieren [47, 49]. Im Gegensatz zu ruhenden T-Zellen stellen T-Zell-Klone und Hybridome bereits voraktivierte T-Zellen dar. Sie reagieren auf die Präsentation von spezifischen MHC/Peptidkomplexen auf der Oberfläche von unreifen DZ (z.B. frisch isolierte LZ) und reifen DZ (z.B. kultivierten LZ) in gleicher Weise. Diese Reaktion ist nur abhängig von der Menge der gebildeten („prozessierten") MHC/Peptidkomplexe.

In dieser Arbeit habe ich antigenspezifische T-Zell-Hybridome verwendet. Diese Zellen sind durch Fusion mit Tumorzellen immortalisiert. Ihre Proliferation ist deshalb unabhängig von der antigenspezifischen Stimulation durch APZ. Die Produktion und Sekretion des T-Zell-Wachstumsfaktors Interleukin 2 jedoch ist streng aktivierungsabhängig. Ich habe das gebildete Interleukin-2 in einem Bioassay mit der Il-2-abhängigen Proliferation einer Indikatorzellinie (zytotoxischer T-Zell-Klon, CTLL) gemessen.

Methodik:

Meine DC sind größtenteil aus der Organkultur entnommen. Unterschiedliche Antigene wie Ovalbumin, Myoglobin und Hen-Egg-Lysozyme wurden teilweise schon während der Kultur hinzugefügt, teilweise aber erst im Assay den DC angeboten. Dann wurden die APZ in einer

Verdünnungsreihe in Triplikaten auf einer 96-well Flachboden Mikrotiterplatte ausplattiert (höchste Dosis 3000 APZ/well) und mit je 50.000-100.000 Hybridomzellen/well versehen (siehe Tab.II.3). In einem Endvolumen von 200µl/well wird der Ansatz für 24 h bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit werden 100µl zellfreier Überstand auf eine neue 96-well-Platte übertragen. Diesem Überstand werden je 6.000 IL-2-abhängige CTLL Zellen/well zugegeben (Endvolumen 200 µl/well) und der Ansatz wieder für 36 h bei 37°C inkubiert. Für 4-6 h wird dann 50µl [^{3}H]-Thymidin zugegeben (Endkonzenztration 148 kBp= 4 µCi/ml; 247,9 G Bq= 6,7 Ci/mmol; New England Nuclear, Boston, MA). Die weitere Auswertung ist identisch mit der in 7.a beschriebenen.

Tab.II.3

Name des Hybridoms	**Spezifität**	**Peptidspezifität**	**Restriktion**	**Quelle**
11.3.7	Myoglobin	110-121	I-E^d	A.Livingstone
Hd-1.AC5	Hen egg Lysozyme	103-120	I-E^d	P.Jensen/ S.Katz
3DO-54.8	Ovalbumin	323-339	I-A^d	P.Marrack

Legende: Dr Alexandra Livingstone, Basel Institute for Immunology, Basel, Schweiz
Dr. Peter Jensen, Emory University, Atlanta, CA
Dr. Philippa Marrack, Howard Hughes Medical Institute, Denver, CO