universität innsbruck
Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

# Modulation und Migration der Langerhans Zellen in vitro und in vivo

**Ortner, Ulrike**

**1994**

V. TNF-alpha Zytotoxizitätsassay

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

# V. TNF-alpha Zytotoxizitätsassay

## 1.)Einleitung:

Mehrere Untersuchungen [91, 92, 120] weisen in die Richtung, daß TNF-α das verantwortliche Zytokin für die Migration sein könnte. Meine bisherigen Untersuchungen im Organkulturmodell konnten diese Aussage aber nicht bestätigen. Deshalb strebte ich eine Kontrollmöglichkeit an. Ich versuchte den vermuteten TNF-α in den Überständen meiner Organkultur nachzuweisen. Dazu habe ich vorerst etliche Überstände aus meinen Organkulturen am d1, d2 und d3 steril abgesammelt, aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Zur Messung des TNF-α Gehaltes der Überstände bediente ich mich eines sensitiven Standard-Zytotoxizitätstests mit L929-Zellen [146], der jedoch in diesem Labor noch nicht etabliert war. Aus diesem Grund folgt nun eine genauere Beschreibung dieses Zytotoxizitätsassays, der über 3 oder über 5 Tage (ohne Aktinomycin) angesetzt werden kann. Nachdem die 3-Tage-Technik einerseits die Schnellere, andererseits auch die Sensitivere ist, habe ich nur diese verwendet.

## 2.)Material und Methode:

**Material:** Kulturmedium R 10 ( siehe Kap. I )

Aktinomycin D (Sigma):

-Verdünnung in PBS zu 20µg/ml (ev. bessere Auflösung bei 37°C)
Einfrieren in 5ml-Portionen bei -20°C

-Nach auftauen, Verdünnung mit Kulturmedium
zu 2µg/ml (diese Lösung hält ca. 14 Tage im Kühlschrank bei 4°C)

Kristallviolett (Sigma): 0,5%-ig verdünnt in Aqua dest.

5%-iges Formaldehyd

33%-ige Essigsäure (Sigma)

L929-Zellen ( Tumorfibroblasten der Maus )

muriner rec. TNF-α (Dr.Gr.Adolf, Bender & Co Ges.mbH Wien)

muriner rec. Anti-TNF-α (Innogenetics, Bender & Co Ges.mbH Wien)

**Methode:**

Tag 1: Ausplattieren der L929-Zellen

- Nach Aufzucht der eingefrorenen L929-Zellen in Gewebekulturpetrischalen werden diese für den Zytokinassay ausgeplatet. In einer 96-well-Flachboden-Mikrotiterplatte werden 50µl/well L929-Zellen blasenfrei ( Pipette nur bis zum Anschlag entleeren ) in einer Konzentration von 4,5 x $10^5$ Zellen/ml ausgesät.
- Unmittelbar nach dem Aussäen der L929-Zellen muß die 96-well-Mikrotiterplatte ca. 30 Sekunden mit einem Schüttler heftig geschüttelt werden, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu erreichen. Anschließend erfolgt eine 24-stündige Inkubation bei 37°C und 5% $CO_2$.

Tag 2: Zugabe der Überstände

- Nach 20-24 Stunden ist ein gleichmäßiger Rasen von L929-Zellen am Boden der Gewebekulturplatte angewachsen. Nun können die Standardverdünnungen sowie die zu messenden Überstände dazupipettiert werden, wobei immer Tripletts angelegt werden sollten. Die Standardreihe besteht aus 5 Tripletts mit einer bekannten, in meinem Fall jeweils um eine Zehnerpotenz (50U; 5U; 0,5U/ml usw.) abnehmenden Konzentration von TNF-α in einem Volumen von 50µl/well.
  Auch die Überstände werden in Tripletts zu 50µl/well ausplattiert, wobei diese, wenn hohe Konzentrationen von TNF-α erwartet werden, eventuell noch in Zehnerpotenzen verdünnt werden können.
- Um den Toxizitätseffekt des TNF-α, der zu einem Absterben der L929-Zellen führt, zu verstärken, werden nun 50µl/well Aktinomycin D, welches in einer Konzentration von 2-3ng/ml verdünnt wurde, dazupipettiert. Die Konzentration des Aktinomycin D hängt von der Empfindlichkeit der L929-Zellen gegenüber TNF-α ab und kann entsprechend variiert werden.
- Bei einem Gesamtvolumen von 150µl/well wird der Ansatz nun 16-20 Stunden bei 37°C und 5% $CO_2$ inkubiert.

Tag 3: Färbung und Messung des Assays

- Nach 16-20 Stunden Inkubation wird der Inhalt jedes wells vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt, wobei diese nicht den Zellrasen am Boden des wells zerkratzen darf. Hiermit werden die, durch TNF-α abgestorbenen und somit im Medium schwimmenden Zellen abgesaugt, während ein, von der Menge des TNF–α indirekt abhängiger, viabler Zellrasen bestehen bleibt.
- Die festhaftenden L929-Zellen müssen jetzt fixiert werden. Dazu wird 50µl/well 5%-iges Formaldehyd zugegeben, welches 10 min einwirken muß.
- Das Formaldehyd wird durch einmaliges kräftiges Ausschütten entfernt. Vorsichtig wird die Platte nun unter fließendem Wasser gewaschen, wobei die Platte annähernd parallel zum Wasserstrahl gehalten werden soll, damit kein direkt auftreffender Wasserstrahl den Zellrasen beschädigen kann.

- Durch einmaliges kräftiges Ausschütten wird das restliche Wasser entfernt und die Zellen können jetzt gefärbt werden.
  Dies erfolgt durch Auspipettieren von 25µl/well 0,5%-iger, filtrierter (um Farbklumpen zu vermeiden) Kristallviolettlösung, welche ca. 15-20 min einwirken muß.
- Anschließend wird die Platte unter fließendem Wasser gewaschen (vorzugsweise mit Handschuhen, da Kristallviolett hartnäckig die Haut färbt und gesundheitsschädlich ist), wobei wieder darauf geachtet werden sollte, daß kein direkter Wasserstrahl den Zellrasen schädigt.
- Einige Minuten sollte die Platte nun verkehrt zum Trocknen aufgelegt werden.
- Vor der Messung der nun gefärbten, überlebenden Zellen in einem Photometer sollten noch 50µl/well 33%-ige Essigsäure auspipettiert werden. Zwar ist auch eine Trockenmessung möglich, doch führt die Zugabe von Essigsäure zu einer gleichmäßigen Verteilung der Färbung, deren Intensität ja nur an einem Punkt/well gemessen wird. Die Gleichmäßigkeit der Färbung kann noch durch ein Mischen des Inhalts jedes wells mit Hilfe einer Multipipette verbessert werden.
- Nun erfolgt die Messung der Farbintensität bzw. der optischen Dichte (OD) in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 540 nm. Die OD ist umso geringer, je mehr TNF-α in der zu messenden Lösung war. Je mehr TNF-α/well vorhanden ist, desto mehr L929-Zellen gehen zugrunde und werden abgesaugt. Somit sind umso weniger Zellen viabel und am Boden haftend und können gemessen werden.
  Da in diesem Labor eine Messung bei einer Wellenlänge von 540 nm nicht möglich war, wurde mir freundlicherweise die Benützung des Photometers am Institut für medizinische Biochemie in der Fritz-Pregl Str. gestattet.

## 3.)Fragestellung:

1. Ist TNF-α in nachweisbaren Mengen in den Überständen meiner Organkultur vorhanden?
2. In meinem Organkultursystem wird TNF-α zugefügt. Nachdem dessen Haltbarkeit als eher gering eingeschätzt wird, stellte sich die Frage, ob TNF-a im klassischen System am 3.Tag überhaupt noch vorhanden ist?
3. Nachdem die unterschiedlichsten Probleme mit den verschiedenen Antikörpern gegen TNF-α aufgetreten sind, wollte ich hiermit die abblockende Wirksamkeit des anti-TNF-α einerseits, sowie dessen Nicht-Toxizität auf Zellen andererseits nochmals verifizieren.

# 4.)Versuche/Ergebnisse:

## 4.1 TNF-α Nachweis in Organkulturüberständen

In mehreren Zytotoxizitätsassays habe ich die, aus den unterschiedlichen Organkulturen gesammelten Überstände auf ihren Gehalt an TNF–α ausgetestet. Ich habe hier einen Test, exemplarisch für alle durchgeführten Assays, zur Demonstration des Ergebnisses angeführt (siehe Tab.V.1).
Daraus läßt sich erkennen, daß in keinem der Überstände TNF-α nachweisbar war. Lediglich ein Überstand von einem ungewöhnlich späten Zeitpunkt wies eine geringe Menge von TNF-α auf. Sollte sich TNF-α in geringen Mengen in den Überständen befinden, so liegen diese unter der Grenze der Nachweisbarkeit. Diese liegt bei wenigen pg/ml.

## 4.2 Wie lange ist zugefügter TNF-α in der Organkultur nachweisbar

Vor allem im klassischen System wird TNF-α in der Kultur zugesetzt und sollte in der Lage sein, seine Wirkung über 3 Tage hinweg zu entfalten. Nachdem auch ein schneller Verbrauch oder Zerfall des TNF-α ursächlich für die Nichtwirksamkeit des Zytokins auf die Migration sein könnte, habe ich auch Überstände aus der klassischen Tag 0 - Tag 3-Organkultur abgesammelt und mit diesem Bioassay den TNF-a-Gehalt nach 3 Tagen gemessen.
Dabei zeigte sich, daß zwar die Menge des TNF-α sehr stark abgenommen hat (um ca. das 1000-fache aus einer ursprünglichen Dosierung von 500-1000 U/ml), daß TNF-α aber auch nach 3 Tagen noch eindeutig nachweisbar und meßbar war (siehe Tab.V.1).

## 4.3 Austestung von Anti-TNF-α im Zytotoxizitätsassay

Es hat sich wiederholt gezeigt, daß auch die Möglichkeit besteht, daß Anti-Zytokine nicht nur durch ihre Hemmung wirksam sein können, sondern daß ihre Konservierung z.B.in sauren Milieu durch Toxizität an den Zellen eine Hemmung des Migrationssystems vortäuschen kann.
Die Anti-TNF-α V1q und Vasalli hatte ich schon mit einer anderen Technik ausgetestet, den kommerziellen rekombinanten goat anti mouse TNF-α (Innogenetics, Bender, Wien) testete ich mit Hilfe dieses Zytotoxizitätsassays aus. Dafür inkubierte ich 0,5 ml TNF-α Medium

(500 U/ml) mit 0,5 ml Anti-TNF–α (5000 neutralisierende U/ml; ein 10-facher Überschuß) eine Stunde lang bei Raumtemperatur. Damit gab ich dem Anti-TNF–α die Möglichkeit, sämtliche TNF-α-Moleküle abzublocken. Anschließend gab ich je 50µl/well dieser Lösung zu den am Vortag auspipettierten L929-Zellen (siehe: Methode des Zytotoxizitätsassays). Weitere wells wurden mit 50µl einer reinen Anti-TNF-α-Lösung versehen. So konnte ich 2 Ergebnisse gleichzeitig erfassen (siehe Tab.VI.1)

- Ob ein 10-facher Exzeß sämtliche TNF-α-Moleküle abblocken kann,
- Ob der Anti-TNF-α per se eine toxische Wirkung entfaltet

Ergebnis:

1. Aus diesem Ansatz konnte man erkennen, daß ein 10-facher Überschuß des Antikörpers genügt, um den TNF-α bis an die Grenze der Nachweisbarkeit abzublocken
2. Die Zugabe des Antikörpers zum Medium führt zu keiner Abnahme der Zellzahl, woraus sich schließen läßt, daß dieser Anti-TNF-α nicht toxisch ist.

Tab.V.1:

| **Auszutestende Lösungen** | **Gehalt an TNF a in mU/ml** |
|---|---|
| Standardreihe | |
| Medium + 50 U/ml | 51.500 mU/ml |
| Medium + 5 U/ml | 3.500 mU/ml |
| Medium + 0,5 U/ml | 410 mU/ml |
| Medium + 0,05 U/ml | 67 mU/ml |
| Medium + 0,005 U/ml | 2 mU/ml |
| Medium R 10 | 0,3 mU/ml |
| Testlösungen | |
| Supernatant d0-d1 | 0,4 mU/ml |
| Supernatant d1-d2 | 0,2 mU/ml |
| Supernatant d2-d3 | 0,2 mU/ml |
| Supernatant d5-d6 | 0.3 mU/ml |
| Supernatant d10-d11 | 29 mU/ml |
| Supernatant d0-d3 | 0,7 mU/ml |
| Kultur mit 500 U/ml TNF-α d0-d3 | 260 mU/ml |
| Kultur mit 1000 U/ml TNF-α d0-d3 | 1.500 mU/ml |
| 500 U TNF-α/ml + 5000 U anti-TNF α /ml | 14 mU/ml |

Legende: Für die Sttandardreihe wurde rekombinanter TNF-a von Dr. G.R .Adolf (Bender Wien) mit einer spezifischen Aktivität von 2,6 x 10 7 U/mg verwendet. Man beachte, daß die Werte für die Kultursupernatanten den Wert für reines Kulturmedium R 10 nicht übersteigen. Der getestete Anti-TNF a Antikörper war ein polyklonales Ig von Innogenetics, Bender, Wien. Es ist die Konzentration in neutralisierenden Einheiten angegeben.

## 5.)Diskussion:

Diese Ergebnisse demonstrieren, daß TNF-α im Überstand zumindest mit diesem Assay erst nach 10 Tagen nachweisbar wird. Die Ursache dafür kann entweder darin liegen, daß TNF-α auch vorher schon vorhanden ist, in äußerst geringen Mengen wirksam ist, und erst nach langer Zeit (10 Tage) der Produktionsmechanismus so weit angetrieben wurde, sodaß TNF-α erst jetzt nachweisbar wird; oder aber, TNF-α ist zu Beginn der Kultur tatsächlich nicht vorhanden und stellt dann ein Zeichen für den allgemeinen Zellzerfalls und Zelltodes, der nach ca. 8 Tagen beginnt, dar.

Sollte diese Annahme den Tatsachen entsprechen, daß TNF-α erst aufgrund des Zellzerfalls im Überstand erscheint, könnte dies ursächlich bedingt sein durch einen intrazellulären oder membranständigen TNF-α. Dieser erfüllt seine Aufgabe als Migrations-(mit)-stimulus in loco und erscheint erst nach dem Zellzerfall im Überstand.

Diese Möglichkeit würde auch die Unbeeinflußbarkeit des Migrationssytems der DZ in der Kultur durch Zugabe der Anti-TNF-α Antikörper erklären.