

## **Universitäts- und Landesbibliothek Tirol**

### **Epidermale Langerhanszellen als Initiatorzellen für antimikrobielle Immunantworten**

**Zanella, Monica**

**1995**

3. Material und Methoden

[urn:nbn:at:at-ubi:2-12560](https://nbn-resolving.org/urn:nbn:at:at-ubi:2-12560)

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Material**

#### **3.1.1 Versuchstiere.**

An der Universitätsklinik für Dermatologie und Venerologie in Innsbruck wurden und werden die meisten Experimente an Langerhanszellen und dendritischen Zellen mit den Inzuchtmäusen des Stammes BALB/c und C57BL/6 durchgeführt. So führte auch ich meine Experimente mit diesen Mausstämmen durch. Anhand jahrelanger Versuche mit diesen Stämmen sind Erfahrungen, Daten und geeignete Reagenzien vorhanden, weshalb gewisse Vorversuche nicht mehr durchzuführen notwendig waren.

In meinen Experimenten wurden meist weibliche, 2-6 Monate alte BALB/c bzw. C57BL/6 Mäuse verwendet. Die Vorteile in der Verwendung dieser Mäuse liegt darin, daß sie eine große Anzahl und gleichmäßige Verteilung von Langerhanszellen, und daß die BALB/c Mäuse einen sehr geringen Anteil an dendritischen epidermalen T Zellen innerhalb der Epidermalzellen aufweisen. Somit sind diese Mausstämme für Studien an den LC besonders gut geeignet. Die Tiere entstammen der hauseigenen Zucht, die unter Aufsicht von Dr. Franz Koch angelgt wurde. Für das intraperitoneale Spritzen von Antikörpern und Zytokinen liegen die Tierversuchsbewilligung des Bundesministerium vor (GZ 66.009/368-I/A/2/92, GZ 66.011/70-Pr/4/94 und GZ 66.011/38-Pr/4/95).

#### **3.1.2 Material für die Organkultur**

↻ Utensilien und Geräte:

- \* CO<sub>2</sub>-Gas
- \* 1 gebogene Schere; 1 gerade sterile Pinzette; 1 gebogene sterile Pinzette
- \* 5 Petrischalen (100 x 15 mm, Falcon Nr. 3003, Oxnard, CA)
- \* 24-well Gewebekulturplatten (Costar Nr. 3524, Cambridge, MA)
- \* 15 ml Polypropylen-Zentrifugenröhrchen ( Costar Nr. 3318, Cambridge, MA)
- \* sterile Pasteurpipetten ( Brand Nr. 7477 15, Wertheim, D )
- \* 5 ml sterile Pipetten (Becton Dickinson, Nr. 9705, NJ, USA)
- 10 ml sterile Pipetten (Becton Dickonson, Nr. 9710, NJ, USA)
- 25 ml sterile Pipetten ( Becton Dickinson, Nr. 7525, NJ, USA)
- \* sterile Werkbank

- \* Brutschrank für Zell- und Gewebekultur von HERAEUS, B5061 EK/CO<sub>2</sub>, B5061 EK/O<sub>2</sub>
- \* Ominfuge 2.0 RS von HERAEUS SEPATECH
- \* Hämocytometer (Reichert, Brightline, 0.1 mm Tiefe, NJ, USA)

☞ Lösungen und Kulturmedien:

\* 10 x PBS:

1 M NaCl  
 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O  
 mit pH: 7,3-7,4

\* PBS/BSA:

100 ml 1 x PBS oder Dulbecco's PBS (Biological Industries, Nr. 02-023-1A, w/o Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Israel)  
 3,5 ml BSA (Rinderalbuminserum von Biomex, Cohn Fraction V, pH 5,2, Nr. H-94412, Mannheim, D)

\* 70%-iger Alkohol

\* Kulturmedium "R10":

10 500 ml RPMI (w/o L-Glutamin, Seromed Biochrom Nr. 01-104-1A, Berlin, D)  
 10% fötales Kälberserum (FCS, Biological Industries, Nr. 04-001-1A, Israel oder Gibco Laboratories, Paisley, GB), hitzeinaktiviert (56°C, 30 min)  
 5 µM 2-Mercaptoethanol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)  
 20 µg Gentamycin (JRH, Bioscience)  
 200 mM L-Glutamin (Sebac, Stuben, A)

### 3.1.3 Material für die Herstellung von Zytozentrifugenpräparate:

- \* Kulturmedium "R10" (siehe 3.1.2)
- \* Trypanblau 0,5% (Seromed Biochrom, Berlin, D)
- \* Objektträger mit Mattstreifen, unbekanntet, (76 x 26 mm, Elka Nr. 2406/1, Menzel-Gläser)
- \* Cytospin-Filterplättchen (Shandon Nr. 59910022, Pittsburgh, PA)
- \* Cytospin-Zentrifuge: Cytospin 2 von Shandon
- \* Durchlichtmikroskop von Reichert (Biovar)

### 3.1.4 Material für die Herstellung der epidermalen Sheets.

- \* 2 feine, gebogene Pinzetten
- \* 1 Skalpellhalter und Skalpellmesser Nr. 10
- \* 1 Glaspetrischale
- \* 3 Petrischalen (Falcon Nr. 1029, Oxnard, CA)
- \* 0,5 m Amoniumthiocyanat-Phosphatpufferlösung:

0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O (Merck, Darmstadt, D.) = 8,9g/500ml a.d.

0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck, Darmstadt, D.)

= 6,8g/500ml a.d.

pH-Wert der Gesamtlösung: 6,8 darin zu lösen:

0,5 M  $\text{NH}_4\text{SCN}$ 

=3,8g/100ml Phosphatpuffer

\* 1 x PBS (siehe 3.1.2)

\* PBS/BSA (siehe 3.1.2)

\* Azeton

### 3.1.5 Material für die Färbung von Zytozentrifugenpräparate bzw. von epidermalen Sheets

\* Primärantikörper:

Tabelle 3.1.5 : Übersicht der verwendeten primären Antikörper und Reagenzien.

Name	ATCC	Ig-Klasse	Antigenspezifität	Quelle, Ref.
B21/2	TIB 229	rat G2b	I-A <sup>b,d</sup>	R.M. Steinman <sup>1</sup>
LO-DNP-16		rat G2a	LO-DNP	
14-4-4S	HB 32	mouse G2a	I-E <sup>d,k</sup>	ATCC <sup>2</sup>
2A1		rat G2a	intrazelluläre Organellen in reifen dendritische Zellen u. B-Zellen	R.M. Steinman (133)
10.216	TIB 93	mouse G2b	I-A <sup>k,r,f,g</sup>	R.M. Steinman
RB6-8C5		rat G2b	Granulozyten	R.M. Steinman
25-9-3S	HB 38	mouse	I-A <sup>b</sup>	ATCC
1G10		rat G2b	CD80/B/-1	Pharmingen <sup>3</sup>
GL1		rat G2a	CD86/B7-2	Pharmingen
mCD40L/mCD8 $\alpha$ Fusionsprotein			CD40	P.Lane <sup>4</sup> (134)
MR1		hamster IgG	CD40-L (gp39)	Pharmingen

Legende: <sup>1</sup> The Rockefeller University, New York, NY; <sup>2</sup> American Type Culture Collection, Rockville, MD; <sup>3</sup> San Diego, CA; <sup>4</sup>Basel Institut für Immunologie, Basel, CH.

\* Sekundärantikörper:

- Schaf-anti-Maus IgG, biotinyliert, Spezies-spezifisch, (Amersham Int.plc, Amersham, UK)
- Schaf-anti-Ratte IgG, biotinyliert, Spezies-spezifisch, (Amersham Int.plc, Amersham, UK)

\* für Zytozentrifugenpräparate:

- 1 Fettstift (Pap-Pen, Daigo Sangyo Co., Japan)

\* für epidermale Sheets:

-1 "Sheet-shifter", von Dr. Peter Stöger erfunden (Vorrichtung zum Übertragen von mehreren Sheets gleichzeitig)

-96-well-Gewebekulturplatten (Falcon Nr. 3072, Becton Dickinson, NJ, USA)

\* PBS/BSA (siehe 3.1.2)

\* für Immunfluoreszenzfärbung:

-Fluoreszenzkonjugat (Streptavidin-Fluorescein von Amersham Int.plc, Amersham, UK)

-Einbettmedium (mounting medium for fluorescence, Vectashield, Vector, Burlingame, CA; vertrieben von Scandic, Wien, A)

\* für Peroxidase-Färbung:

-Peroxidasekonjugat (Streptavidin horseradish peroxidase complex von Amersham Int.plc, Amersham, UK)

-3,3'- Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (Polysciences, Inc, Warrington, PA)

-30%-iges Perhydrol (Merck, Darmstadt, D)

-0,05 M Tris-HCl, pH 7,6

-Hämatoxylinlösung (Böhmer, Gatt, Ibk)

-Einbettmedium : PBS/Glycerin 1:9

### **3.1.6 Material für die Trennung von Epidermis und Dermis durch Dispase und Trypsin**

Material für Dispasetrennung

\* 2 feine, gebogene Pinzetten

\* 5 Petrischalen (100 x 15 mm, Falcon Nr. 3003, Oxnard, CA)

\* RPMI ohne Serum (Seromed Biochrom, Nr. 01-104-1A, Berlin, D)

\* Dispase:

1,2 U/ml sterile Dispase Typ II, neutrale Protease von Bacillus polymyxa, (Stammlösung zu 2,4U/ml, Boehringer Mannheim Kat. Nr. 295825, D.)

Material für Trypsintrennung:

\* 2 feine gebogene Pinzetten

\* 7 Petrischalen (100 x 15 mm, Falcon Nr. 3003, Oxnard, CA)

\* HANK's-Lösung ohne Ca<sup>2+</sup>

\* Trypsin bei Raumtemperatur

### **3.1.7 Material für das intraperitoneale Spritzen**

\* sterile 5 ml Spritze (Norm Ject, Din 13098-A-5-LN von HSW)

\* sterile Nadeln (Microlance, Nr.18, 0,5 x 25, Becton Dickinson, NJ, USA)

\* Zytokine und anti-Zytokine:

- rekombinanter, muriner Tumor-Nekrose-Faktor-alpha, TNF- $\alpha$  (Bender Nr. 4296-17, spezifische Aktivität:  $1,2 \times 10^7$  units/mg, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. R. G. Adolf, Fa. Bender, Wien, A)
- rekombinantes, murines Interleukin-1 $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  (Nr. 1921-01, spezifische Aktivität:  $3,5 \times 10^5$  units/mg, MA, USA und Nr. 1921-01, spezifische Aktivität:  $1 \times 10^7$  units/mg, Genzyme, Cambridge, MA, USA)
- rekombinantes, murines GM-CSF, spezifische Aktivität:  $2,4 \times 10^7$  units/mg, (Sandoz Nr. 930617, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. E. Lichl, Sandoz Forschungsinstitut, Wien, A)
- monoklonaler Antikörper Hamster anti-Maus-IL-1 $\beta$  (Genzyme Nr. 1997-01)
- muriner Antikörper gegen murines TNF- $\alpha$  (135), Ratte IgG2a, freundlicherweise von Dr. B. Echternacher zur Verfügung gestellt.
- muriner Antikörper LO-DNP 16 gegen DNP, Ratte IgG2a,

### 3.1.8 Material für Antikörperreinigung nach E-Z-SEP (Pharmacia Biotech Inc.)

\* Inhalt des E-Z-SEP-Kit:

- separation reagent 1
- buffer solution 2
- separation reagent 3

\* Biofuge 22 R, Heraeus Sepatech

\* pH-Meter (CG, 801)

\* 50 ml und 15 ml Polypropylenröhrchen, Falcon

\* PBS (siehe 3.1.2)

\* Spectrophotometer 150-20, Hitachi

\* Quarzküvetten (zu 1ml)

### 3.1.9 Material für Viabilitätsstudien

\* ausgewanderte, meist 2 Tage alte epidermale Langerhanszellen

\* 24-well Gewebekulturplatten, (Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA)

\* Kulturmedium R10 (siehe 3.1.2)

\* 15 ml Polypropylen-Zentrifugenröhrchen (Costar, Nr. 3318, MA, USA)

\* 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße

\* Brutschrank

\* Omnifuge 2.0 RS, Heraeus Sepatech,

\* Hämocytometer (Reichert, 0,1 mm Tiefe)

### 3.1.10 Material für die monoklonale Antikörper-Herstellung

- \* 15 ml Polypropylen-Zentrifugenröhrchen (Costar NR. 3318, MA, USA)
- \* Kulturmedium R10 (siehe 3.1.2)
- \* Kulturmedium R2:
  - 500 ml RPMI (w/o L-Glutamin, Seromed Biochrom Nr. 01-104-1A, Berlin,D)
  - 2 % fötales Kälberserum (FCS, Politakis Nr. 04-001-1A oder Gibco Laboratories, Paisley, GB), hitzeinaktiviert (56°C, 30 min)
  - 5 µM 2-Mercaptoethanol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)
  - 20 µg Gentamycin (JRH, Bioscience)
  - 200 mM L-Glutamin (Sebac, Stuben, A.)
- \* beschichtete Petrischalen für die Gewebekultur (Falcon Nr. 3003)
- \* Wasserbad zu 37 °C
- \* Omnifuge 2.0 RS. Heraeus Sepatech
- \* Behälter mit Eis

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Die Organkultur.

1. Die Ohren der Mäuse werden mit einer gebogenen Schere an der Basis abgeschnitten und auf einen sterilen Tupfer gelegt, der zuvor mit etwas PBS befeuchtet wurde. (Abliegezeit - die Zeit bis zur weiteren Verarbeitung- kann variieren; siehe unter Punkt: 4.1.2)
2. Es werden je zwei Petrischalen mit 70%-igem Alkohol, zwei Petrischalen mit PBS/BSA und eine Petrischale mit einem sterilen Tupfer unter der Sterilbank vorbereitet. Die Ohren werden durch den Alkohol gezogen und mit Hilfe der gebogenen Pinzette streicht man das Ohr besonders am Ansatz gut und bestimmt ab, damit eventuelle Bakterien oder Pilze nicht in die Organkultur gelangen. Danach werden die Ohren durch PBS/BSA gezogen, dadurch werden überschüssige Alkoholreste abgewaschen und die Ohren wieder in ihre physiologische Umgebung gebracht. Letztendlich werden sie auf dem sterilen Tupfer zum Trocknen gelegt.
3. Die Trockenzeit beträgt ca. 15-20 Minuten, d.h. die Ohren sollten am besten nicht ganz austrocknen! Die Ohren werden mit der ventralen Seite nach unten gelegt. Mit der geraden sterilen Pinzette setzt man am Schnitttrand an und zieht mit der gebogenen Pinzette die dorsale Ohrhälfte ab.
4. Die dorsalen Ohrhälften (d.h diejenigen Hälften ohne den anhaftenden Knorpel) werden nun mit der dermalen Seite nach unten auf je 1,5 ml Medium in der 24-well Gewebekulturplatte aufgelegt,

wobei darauf zu achten ist, daß die epidermale Seite nicht naß wird. Die Ohrhälften sollten also möglichst obenauf schwimmen.

5. Die Organkultur wird nun bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert (siehe Abb.: 3.2.1). Die Inkubationszeit wird je nach Versuchsansatz geändert (siehe unter Punkt: 4.1.1)
6. Nach der Inkubation werden die aufschwimmenden Ohrhälften mit einer Pinzette vorsichtig abgenommen, auf eine Ammoniumthiocyanatlösung aufgelegt und weiter zu Sheets verarbeitet (siehe unter Punkt: 3.2.4).
7. Das Medium wird mit einer 1 ml Kolbenhubpipette abgenommen und der Inhalt von je 6 wells wird in einem 15 ml Polypropylenröhrchen gesammelt (gepoolt). Jedes well wird mit 200 µl R10 nachgespült, um alle ausgewanderten Zellen zu sammeln.
8. Die Zellsuspension wird nun in der Omnifuge 2.0 RS (Heraeur Sepatech) mit 1500 Upm (263g) bei 4°C für 8 min zentrifugiert, der Überstand vorsichtig bis auf das Pellet abgesaugt. Das Pellet wird in 200-300 µl R10 resuspendiert. Dieses Volumen wird wegen der nachfolgenden Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe einer graduierten 1 ml Pipette exakt gemessen.

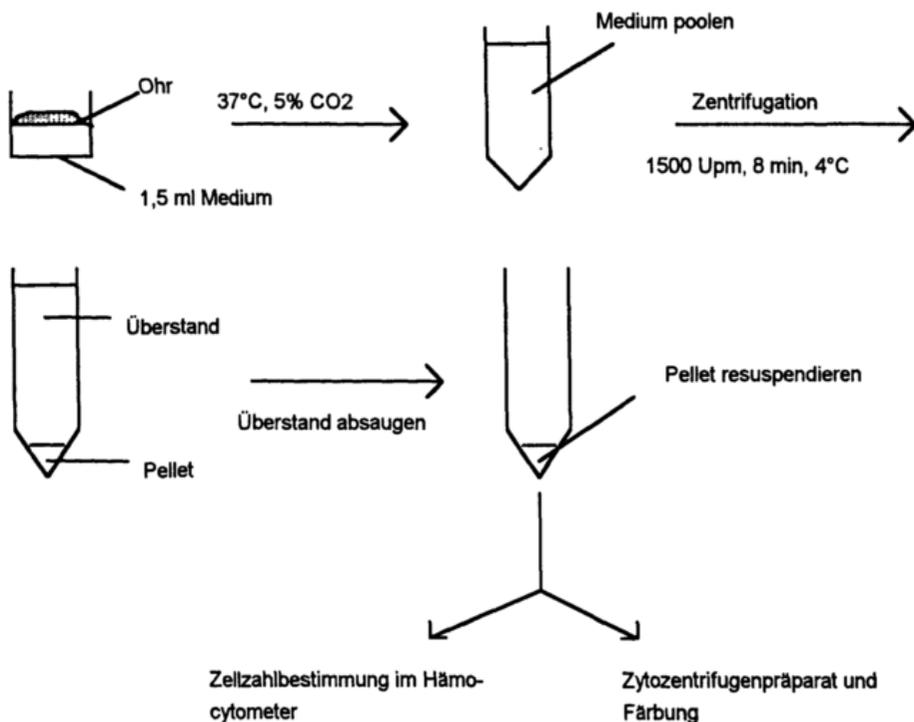


Abb.3.2.1: Modell der Organkultur

### 3.2.2. Zellzahlbestimmung der ausgewanderten Zellen.

1. Für die Zellzahlbestimmung werden 40 µl Zellsuspension in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß gegeben, mit 10 µl Trypanblau versetzt und durch mehrmaliges aufziehen gut gemischt.
2. Davon werden 10 µl in das Häemocytometer gegeben und unter dem Mikroskop ausgezählt. Bei niederen Zellzahlen ist es ratsam alle 5 Felder zu zählen.

### 3. Berechnung der Zellzahl:

Die Zellzahlen in dieser Arbeit werden immer pro Ohrhälfte angegeben, so wird es notwendig sein, die gezählte Zellzahl auf jene pro Ohrhälfte zurückzurechnen. Für die Berechnung hier nun ein Beispiel: gezählte Zellzahl 65 in 5 Feldern; 6 Ohrhälften; Endvolumen: 400 µl

$$\frac{65 \times 0,4 \text{ (Volumen)} \times 12500 \text{ (*)}}{5 \text{ (Felder)} \times 6 \text{ (Ohrhälften)}} = 10833 \text{ Zellen/Ohrhälfte}$$

(\*)spezifischer Umrechnungsfaktor des Hämocytometers

### 3.2.3 Herstellung von Zytozentrifugenpräparate

1. Die Zellsuspension wird soweit in R10 verdünnt, daß 200 µl ca. 30 000-40 000 Zellen enthalten (1,5-2,0 x 10<sup>5</sup> Zellen/ml).
2. Die Zytozentrifugentrichter werden mit je einem beschrifteten Objektträger und einem Filter vorbereitet und in die Cytospin 2, Shandon, Zytozentrifuge gesetzt. Pro Trichter werden werden 200 µl Zellsuspension pipettiert und bei 450 Upm für 6 Minuten auf dem Objektträger zentrifugiert.
3. Die Präparate werden mindestens für 30 Minuten an der Luft getrocknet und können dann bei -20°C eingefroren werden oder gleich zur Weiterverarbeitung 5 Minuten lang in Azeton fixiert werden.
4. Nach dem Auftauen müssen die Präparate mindestens wieder 30-60 Minuten getrocknet und dann 5 Minuten in Azeton fixiert werden.

### 2.2.4 Herstellung von epidermalen Sheets : Amoniumthiocyanat-Methode.

Als Sheets werden Häutchenpräparate von separierter Epidermis oder Dermis bezeichnet.

Ammoniumthiocyanat-Methode (nach Juhlin und Shelley (136)):

1. Die dorsalen Ohrhälften werden vorsichtig aus der Kultur genommen oder frisch getrennt, und auf eine 0,5 molare Amoniumthiocyanat-Phosphatpufferlösung mit der dermalen Seite nach unten gelegt.
2. Die Inkubation erfolgt bei 37°C für mindestens 20 Minuten.
3. Nach der Inkubation werden die Ohrhälften entnommen und auf einem Tropfen PBS ausgebreitet. Mit 2 feinen Pinzetten wird die Epidermis von der Dermis getrennt. Die Epidermis wird in kleine Stückchen (Sheets) mit einem Skalpell geschnitten, danach kann auch die Dermis zu Sheets verarbeitet werden.
4. Die Sheets werden 20 Minuten bei Raumtemperatur in Azeton (Glaspetrischale!) fixiert.

5. Anschließend werden die Sheets 2 x in PBS und 2 x in PBS/BSA gewaschen, in Alufolie verpackt und bei -20°C eingefroren oder gleich gefärbt.

### 3.2.5 Färbung der Zytozentrifugenpräparate und der epidermalen/dermalen Sheets.

#### a) Zytozentrifugenpräparate:

1. Die Zellen werden vor Beginn des Färbevorganges mit einem Fettstift umrandet, damit Antikörper und Waschlösungen nicht abfließen. Alle Antikörper und Waschlösungen werden vorsichtig mit einer Pasteurpipette auf die Zellen aufpipettiert und genauso vorsichtig wieder abgesaugt.
2. Inkubation mit 50 µl des primären Antikörpers (Tabelle 3.1.5) bei 37°C für 30 Minuten in einer feuchten Kammer.
3. Waschen mit PBS/BSA: die Pufferlösung wird mit einer Pasteurpipette von einer Seite langsam aufgeträufelt und von der anderen Seite abgesaugt. Der Vorgang wird 6-10-mal wiederholt.
4. Inkubation mit 50 µl des sekundären Antikörpers (siehe Punkt: 3.1.5), der zuvor in PBS/BSA 1 : 200 verdünnt worden ist, bei 37°C für 30 Minuten.
5. Waschen mit PBS/BSA.
6. Inkubation mit 50 µl des dritten Antikörper/Immunreagenz wiederum für 30 Minuten bei 37°C.

#### Peroxidase:

Peroxidasekonjugat wird 1 : 100 mit PBS/BSA verdünnt.

#### Immunfluoreszenz:

Fluoreszenzkonjugat wird 1 : 300 mit PBS/BSA verdünnt.

7. Waschen mit PBS/BSA

#### 8. Immunfluoreszenz:

Der Färbevorgang ist beendet und der Objektträger wird noch mit Einbettmedium eingedeckt.

#### Peroxidase:

Der Peroxidasekomplex wird durch die Diaminobenzidin-Reaktion visualisiert: 10 mg Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid werden in 20 ml Tris-HCl-Puffer mit pH 7,6 aufgelöst und kurz vor der Reaktion werden 5 µl 30%-iges Perhydrol dazugegeben. Inkubation der Präparate für 10 min mit 50 µl Diaminobenzidinlösung.

9. Waschen mit Tris-HCl-Puffer
10. Gegenfärben der Zellkerne mit Hämatoxylinlösung für 15-20 Sekunden und waschen mit lauwarmen, fließendem Wasser. Eindecken der Präparate mit PBS/Glycerin-Gemisch.

#### b) Sheets:

1. Bei der Färbung der Sheets wird ein Sheetshifter verwendet, der es ermöglicht die Sheets von einem well in ein anderes leicht und intakt zu überführen. Alle Inkubationen und Waschungen erfolgen in den Vertiefungen einer 96-well Platte.

2. Inkubation mit 50 µl des primären Antikörpers (Tabelle 3.1.5) für ca. 16 Stunden bzw. über Nacht bei 4 °C.
3. Waschen mit PBS/BSA: 3 x 20 Minuten .
4. Inkubation mit 50 µl des sekundären Antikörpers (siehe Punkt: 3.1.5), der zuvor in PBS/BSA 1 : 200 verdünnt worden ist, bei 37°C für 90 Minuten.
5. Waschen mit PBS/BSA: 3 x 20 Minuten.
6. Inkubation mit 50 µl des dritten Antikörper/Immunreagenz wiederum für 90 Minuten bei 37°C.

Peroxidase:

Streptavidin-Peroxidase-Konjugat wird 1 : 100 mit PBS/BSA verdünnt.

Immunfluoreszenz:

Fluoreszenzkonjugat wird 1 : 300 verdünnt.

7. Waschen mit PBS/BSA

8. Immunfluoreszenz:

Der Färbeprogang ist beendet und die Sheets werden mit der dermalen Seite nach oben unter einem Stereomikroskop (Reichert, Austria) auf einen Objektträger in Einbettmedium eingedeckt.

Peroxidase:

Der Peroxidasekomplex wird durch die Diaminobenzidin-Reaktion visualisiert: 10 mg Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid werden in 20 ml Tris-HCl-Puffer mit pH 7,6 aufgelöst und kurz vor der Reaktion werden 5 µl 30%-iges Perhydrol dazugegeben.

Inkubation der Präparate mit 50 µl Diaminobenzidinlösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur.

9. Waschen mit Tris-HCl-Puffer: 3 x 20 Minuten.

10. Die Sheets werden mit der dermalen Seite nach oben in ein PBS-Glycerin-Gemisch auf einem Objektträger eingebettet.

### **3.2.6 Trennung von Epidermis und Dermis nach der Dispase und Trypsinmethode**

Dispase-Methode (nach Kitano et al., (137):

1. Ohren 2 x in Alkohol, 2 x in PBS waschen, 60 Minuten trocknen lassen und wie unter Punkt 3.2.1 beschrieben halbieren.
2. Die dorsalen Ohrhälften auf je 1,5 ml RPMI ohne Serum mit Dispase Typ II zu einer Endkonzentration von 1,2 U/ml auflegen.
3. Inkubation bei 37°C für 30 Minuten.
4. Dermis von Epidermis mit 2 feinen Pinzetten lösen und 2 x in RPMI 1640 waschen.
5. Anschließend können Dermis und/oder Epidermis auf Medium aufgelegt werden und nach dem Organkultumodell weiter kultiviert werden.

Trypsin-Methode:

Diese Methode wird normalerweise zur Herstellung epidermaler Zellsuspensionen verwendet (88,138). Dennoch wurde sie hier mit der Dispase Methode verglichen.

1. Ohren 2 x in Alkohol, 2 x in PBS waschen, 60 Minuten trocknen lassen und wie unter Punkt 3.2.1 beschrieben halbieren.
2. Von den Ohren die dorsale Seite abziehen und auf 9 ml HANK's -Lösung aufschwimmen lassen, vorsichtig 1,5 ml Trypsin dazugeben.
3. 30-45 Minuten bei 37 °C, 5 %CO<sub>2</sub> inkubieren.
4. Vorsichtig die Epidermis von der Dermis trennen damit beide als Ganzes auf das vorbereitete R10 Medium auflegt werden können.

### 3.2.7 Intraperitonales Spritzen.

1. Je Versuchsansatz werden 3 weibliche Mäuse des Stammes BALB/c verwendet.
2. Je Maus werden 1,5 ml des entsprechenden Antikörpersupernatants bzw. des Zytokins intraperitoneal (i.p.) gespritzt: die Substanzen werden in einer sterilen 5 ml Einmalspritze mit steriler Kanüle (Microlance 3, Nr.18) aufgezogen und in die Maus i.p. injiziert. Gleichzeitig wird ein Ohr entnommen, das man zu epidermalen/dermalen Sheets weiterverarbeitet (Zeitpunkt 0, t<sub>0</sub>) (siehe Punkt 3.2.4).
3. 16 Stunden später werden die Mäuse mit CO<sub>2</sub> getötet und die Ohren wie unter Punkt 3.2.1 beschrieben abgeschnitten. Dieser Zeitraum zwischen spritzen und Tötung der Mäuse wird in der Folge als "Nachspritzzeit" bezeichnet.
4. Die Ohren werden nun weiter in Organkultur gezogen wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben nun aber mit folgenden Änderungen:
  - Nach der Nachspritzzeit wird eine Ohrhälfte zu epidermalen/dermalen Sheets weiterverarbeitet (t<sub>1</sub>). Die restlichen Ohrhälften werden für 24 Stunden bei 37°C, 5%CO<sub>2</sub> in Organkultur inkubiert.
  - Nach der Inkubation wird wieder eine Ohrhälfte zu epidermalen/dermalen Sheets weiterverarbeitet (t<sub>2</sub>). Dem Medium mit den ausgewanderten LC gibt man pro well 250 U/ml GM-CSF zu und inkubiert die Zellsuspension für weitere 24 Stunden bei 37°C, 5%CO<sub>2</sub>, damit die Langerhanszellen sich besser ausdifferenzieren und man sie beim Zählen aufgrund ihrer typisch "haarigen" Morphologie leichter von T-Zellen und Makrophagen unterscheiden kann.

### 3.2.8 Antikörperreinigung mit dem E-Z-Sep-Kit.

1. 2 x 25 ml Supernatant werden in je ein 50 ml Polypropylenröhrchen gegeben. Es werden je 25 ml Separation Reagent 1 dazugegeben.
2. Die Röhrchen werden gut verschlossen und 30 Minuten bei Raumtemperatur gemischt.
3. Anschließend Zentrifugation für 30 Minuten bei 2000g und 4°C.
4. Überstand dekantieren und Pellet in je 2 x 12,5 ml Buffer Solution 2 resuspendieren und 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen.

5. Weiters je 2 x 12,5 ml Separation Reagent 3 hinzufügen, 30 Minuten bei Raumtemperatur mischen und für 30 Minuten bei 2000 g und 4°C zentrifugieren.
6. Überstand dekantieren und das Pellet in 2,5 ml Puffer bzw. R2 resuspendieren
7. Die Antikörperkonzentration wurde sowohl mittels der optischen Dichte mit dem Photometer als auch über den Bradford-Enzym-Assay gemessen.
8. Ich habe den anti-TNF- $\alpha$  Antikörper nach dieser Methode gereinigt. Die Messung der optischen Dichte erfolgt nach Eichung des Photometers bei einer Wellenlänge von 280 nm in einer Quarzküvette; als Referenz dient PBS. Die optische Dichte betrug 0,037 OD. Da 1 OD bei 280 nm Wellenlänge ungefähr 0,75 mg/ml gereinigtem Antikörper entsprechen, ergab das eine Konzentration von 1,3 mg/ml anti-TNF- $\alpha$ .

Die Konzentration mittels Bradford-Enzym-Assay betrug 0,86 mg/ml. Ich nehme an das die Antikörperkonzentration zwischen beiden Werten liegt, also um die 1 mg/ml.

Die Antikörperkonzentration in einem Supernatant beträgt durchschnittlich 0,02-0,05 mg/ml. Also hatte ich mittels E-Z-Sep-Kit eine Aufkonzentrierung von mehr als 10-fache erreicht.

### 3.2.9 Langerhanszell-Viabilitätsstudien

1. Es werden mindestens 30 Ohren wie unter Kapitel 3.2.1 beschrieben in Organkultur kultiviert, nach 2 Tagen die ausgewanderten epidermalen Langerhanszellen gesammelt und deren Konzentration bestimmt (Punkt: 3.2.2).
2. Die Langerhanszellen werden dann zu verschiedenen Konzentrationen (10000, 30000 oder 60000 Zellen/1,5 ml) für 5 Tage bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> in einer 24 -well Gewebekulturplatte inkubiert, dabei werden je nach Versuchsansatz verschiedene Zytokine bzw. der CD40-Ligand dazugegeben.
3. Nach der Inkubation werden die dendritischen Zellen in Suspension mikroskopisch bewertet (morphologische Bewertung), und dann im Hämocytozometer die Zellzahl bestimmt.

### 3.2.10 Monoklonale Antikörperherstellung mit Hybridomzellen.

1. Es wird ein 15 ml Polypropylenröhrchen mit 12 ml angewärmten R10 vorbereitet, sowie das Wasserbad auf 37°C vorgewärmt.
2. Die gewünschten Hybridomzellen werden schnell aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und kurz auf Eis gelegt. Das Auftauen der Zellen muß sehr schnell gehen und sie dürfen auch nicht lange im Einfriermedium bleiben, da sie wegen des zugesetzten DMSO schnell sterben würden.
3. Deswegen hält man die Hybridomzellen kurz ins Wasserbad bis die ersten Zellen auftauen, dann transferiert man unter sterilen Bedingungen die Zellen in das angewärmte R10, indem man mit 500-1000 $\mu$ l R10 die Zellen umspült und so auftaut.
4. Zentrifugation der Zellsuspension im 15 ml Polypropylenröhrchen für 8 Minuten bei 1500 Rpm und 4 °C. Der Überstand wird abgesaugt und das Pellet in 12 ml R10 resuspendiert.

5. Die resuspendierten Hybridomzellen werden in einer Gewebekulturplatte bei 37°C, 5%CO<sub>2</sub> für 24 Stunden inkubiert.
6. Nach 24 Stunden Inkubation werden die Zellen mikroskopisch begutachtet, ob sie den Auftauvorgang gut überlebt haben. Auf jeden Fall werden nun die Zellen aufgeteilt (gesplittet) und zwar:
  - 2 ml Zellsuspension + 10 ml R10
  - 1 ml Zellsuspension + 11 ml R10
  - 0,5 ml Zellsuspension + 11,5 ml R10
  - und die restlichen 8,5 ml Zellsuspension + 3,5 ml R10 (als Kontrolle)
7. Inkubation bei 37°C, 5%CO<sub>2</sub> für 3 Tage. Die Zellen werden täglich betrachtet und wenn es nötig scheint, kann man sie auch früher oder später splitten. Dieser Vorgang des Teilens und Züchtens wird solange wiederholt bis die Zellen sich erholt haben und eine hohe Dichte erreichen.
8. Die eigentliche Antikörperherstellung erfolgt dann im R2 Medium, in welches man die Zellen dann transferiert und solange inkubiert bis 2/3 der Zellen tot aussehen. Zu diesem Zeitpunkt nimmt man an, daß die Antikörperkonzentration im Medium am höchsten ist .
9. Die Zellsuspension wird abgenommen, in 15 ml Ploypropylenröhrchen überführt und bei 1500 Rpm, 4°C, 8 Minuten zentrifugiert.
10. Der Überstand mit den Antikörpern wird nun vorsicctig abgenommen und mit einem 0,45µm Einmalfilter in eine Kulturflasche filtriert. Dieser Kulturüberstand wird bei 4°C gelagert.