

Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Untersuchungen zur Interleukin-12 Produktion und zur Migrationsfähigkeit von humanen dendritischen Zellen

Ratzinger, Gudrun

1996

II. Material und Methodik

[urn:nbn:at:at-ubi:2-12547](https://nbn-resolving.org/urn:nbn:at:at-ubi:2-12547)

II. MATERIAL UND METHODIK

Ich möchte dieses Kapitel entsprechend meiner Fragestellung in drei Teilen erörtern:

1. Präparation von dendritischen Zellen aus humanem Blut
2. Einfluß von verschiedenen Stimulantien auf die Hochregulation der Interleukin-12-Produktion durch dendritische Zellen.
3. Nachweis der Migration von humanen dendritischen Zellen in der Maus.

1. Präparation von dendritischen Zellen aus humanem Blut

A. Material

Laborutensilien

- * sterile Pipetten (25 ml, 10 ml, 5 ml) (Gold Well, Becton Dickinson, NJ, USA)
- * sterile Pipetten (2 ml, 1 ml) (Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA)
- * Petri-Schalen (100 mm x 15 mm) (Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA)
- * Polypropylen-Zentrifugenröhrchen (15 ml) (Costar, Cambridge, MA, USA)
- * Polystyrol-Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml) (Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA)
- * Gewebekulturplatten (6-well, 12-well, 96-well) (Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA)
- * Gewebekulturplatten (24-well, 48-well) (Costar, Cambridge, MA, USA)
- * Pasteurpipetten aus Glas, Länge 230 mm (Brand, Best. Nr.747720)
- * sterile Werkbank (Danlaf, Dänemark)
- * Brutschrank für Zell- und Gewebekultur (Heraeus Cytoperm)
- * Omnifuge (Heraeus Sepatech)
- * Megafuge (Heraeus Sepatech)
- * Hämocytometer (Reichert, Brightline, 0,1 mm Tiefe, NJ, USA)
- * Phasenkontrastmikroskop (Nikon)
- * Lichtmikroskop (Reichert Biovar)
- * Wasserbad (julabo SW-20C)
- * "sample mixer" (Dynal) Spezialgerät zum schonenden Mischen von Zellen und Dynabeads während der Inkubationszeit.

Kulturmedium

In allen Experimenten wurde für die Zellkultur das Kulturmedium RPMI 1640 verwendet (Seromed Biochrom, Berlin). Diesem Medium wurde 10 % hitzeinaktiviertes (56 °C, 30 min) fetales Kälberserum (FCS, Gibco, Paisley, Scotland), 50 µM 2-Mercaptoethanol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 20 µg/ml Gentamicin (JRH Bioscience) sowie 200mM L-Glutamin (Sebak, Stuben, A) zugesetzt. Dieses Nährmedium wird im folgenden mit der Abkürzung "R10" bezeichnet.

PBS (Phosphate buffered saline)

Dulbeccos PBS (Biological Industries, Kibbutz Haemek Israel, Nr. 02-023-1A, ohne Ca²⁺, Mg²⁺, Israel).

PBS wurde außerdem mit Zusätzen verwendet:

+ PBS-Heparin

500 ml PBS + 500 µl Heparin (Heparin "Novo", 5000 IE/ml, Novo Nordisk A/S, 2880 Bagsvaerd, Dänemark)

Heparin hemmt die Blutgerinnung in vitro und in vivo. Hauptwirkung ist die Hemmung des aktivierten Faktors X und die Thrombinhemmung.

+ PBS-EDTA

500ml PBS + 1ml 0,5 M EDTA

+ PBS-BSA

100ml PBS + 3,5 ml BSA (Rinderserumalbumin von Biomex, Cohn Fraction V, pH 5,2, Nr. H-94412, Mannheim, D)

Humanes Blut

Zur Gewinnung humaner PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) verwendete ich Zellkonzentrate, die von der Blutbank der Innsbrucker Klinik zur Verfügung gestellt wurden.

Lymphoprep

Lymphoprep ist eine sterile und Pyrogen-freie Lösung zur Isolation von Populationen reiner PBMCs. Sie beinhaltet:

Sodium Metrizoate 9,6 %

Polysaccharide 5,6 %

Physikalisch-chemische Charakteristika:

Dichte: $1,077 \pm 0.001$ g/ml

Osmolalität: 280 ± 15 mOsm

Prinzip:

Die bekannteste Technik zur Separation von Leukozyten ist die Mischung des Blutes mit einer Substanz, die zu einer Aggregation der Erythrozyten führt, und somit deren Sedimentationsrate erhöht. Die Sedimentation der Leukozyten wird nur geringfügig beeinträchtigt. Sie können vom oberen Teil des Röhrchens abgenommen werden, wenn sich die Erythrozyten nach Zentrifugation am Boden gesammelt haben.

(Lymphoprep, Nycomed Pharmas AS, 5012 Majorstua, Oslo, Norway)

Dynabeads

Dynabeads sind uniforme, magnetisierbare Polystyrenkörperchen, die mit primären (A, B) bzw. sekundären (C) monoklonalen Antikörpern beschichtet sind. Die murinen IgM Antikörper bzw. die Schaf-Anti-Maus-IgG sind direkt an die Dynabead-Oberfläche adsorbiert. Ich verwendete in meinen Experimenten drei Arten von Dynabeads:

- A. Dynabeads M-450 Pan-B (CD19), die spezifisch für das CD19 Membranantigen der B-Zellen sind.
- B. Dynabeads M-450 Pan-T (CD2), die spezifisch für das CD2 Membranantigen sind, das auf T-Zellen und NK-Zellen (natural killer) exprimiert wird.
- C. Dynabeads M-450 Schaf-Anti-Maus IgG; Schaf-Anti-Maus-IgG sind kovalent an die Oberfläche der Dynabeads gebunden. Diese sekundären Antikörper binden sowohl schwere als auch leichte Ketten von Maus-IgG und leichte Ketten von Maus-IgM.

Dynabeads werden zur immunomagnetischen Zellisolation verwendet. Dies ist eine schnelle und verlässliche Methode zur positiven oder negativen Selektion von Zellen. Während einer kurzen Inkubationszeit kommt es zur Bindung der Dynabeads an die jeweiligen Zielzellen, die dann durch Anwendung eines Magneten isoliert werden. Die Dynabeads beeinträchtigen die Viabilität der Zellen nicht.

(Dynabeads, Deutsche Dynal GmbH, Hamburg, D)

GM-CSF

GM-CSF (granulocyte/monocyte colony stimulating factor) ist für die Reifung dendritischer Zellen in vitro von besonderer Bedeutung. Er wurde in einer Konzentration von 800 U/ml R10 verwendet (spezifische Aktivität von $1,1 \cdot 10^7$ U/mg) (Leukomax "Sandoz", Sandoz GmbH, Wien, A)

IL-4

IL-4 ist ein Zytokin, das neben vielen anderen Funktionen die Fähigkeit hat, die Entwicklung von Monozyten/Makrophagen in der Kultur zu inhibieren (178). In der Kombination mit GM-CSF kommt es zur Ausbildung von großen Aggregaten proliferierender dendritischer Zellen (179). IL-4 wurde in einer Konzentration von 500 U/ml R10, (spez. Aktivität $5 \cdot 10^7$ U/mg), (Immunex) bzw. 500 ng/ml (spez. Aktivität nicht bekannt) (Sandoz) verwendet.

(* Rekombinantes IL-4, Immunex Corporation, Seattle, WA)

* Rekombinantes humanes IL-4, Sandoz GmbH, Wien, A; dieses Zytokin wurde uns freundlicherweise von Dr. Ekke Wiehl (Forschungsinstitut Sandoz, Wien) zur Verfügung gestellt)

Humanes Gammaglobulin

Humanes IgG wurde zur Beschichtung von Petri-Schalen verwendet. IgG am Boden dieser Schalen führt zur Anheftung und Stimulierung von Monozyten/Makrophagen.

Verwendete Konzentration: 0,01 g/ml PBS, 10 ml/Schale

Inkubationszeit: 1 h bei Raumtemperatur

(IgG, Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, USA)

Antikörper

CD2-Antikörper: Diese murinen IgG2a Antikörper werden im Rahmen der indirekten Depletion verwendet (siehe unten). Sie werden von Zellen des Klonen OKT 11 produziert. Zellen dieses Klonen werden in R10 kultiviert und geben diese Antikörper in das Medium ab. Die Überstände (Supernatanten) werden unverdünnt als Antikörperquelle verwendet. (Herkunft der Hybridomzellen: American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA).

CD20: Auch diese murinen IgG1-Antikörper werden im Verlauf der indirekten Depletion benötigt. Die Verdünnung beträgt 1 : 100. (Klon MEM-97, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Vaclav Horejsi, Institut für Immunologie, Prag)

Monozyten-konditioniertes Medium (MCM)

Herstellung:

1. Beschichtung von Petri-Schalen mit IgG; 1 h Inkubation bei Raumtemperatur;
2. 3-maliges Waschen mit PBS;

3. Zugabe von 50 Millionen PBMC (peripher blood mononuclear cells) (Gewinnung siehe unten) in 10 ml R10/Petri-Schale;
4. Inkubation für 1 h bei 37°C. In dieser Zeit binden Monozyten/Makrophagen an das IgG am Schalenboden;
5. Nach Inkubation 3-maliges Waschen mit PBS. Dadurch wird die nicht-adhärenente Fraktion der PBMCs entfernt; der größte Teil des Bodens ist jetzt mit adhärenenten, ausgebreiteten Monozyten/Makrophagen ("Spiegeleier-förmig.") bedeckt.
6. Zugabe von 10 ml R10/Petri-Schale. Inkubation für 24 h bei 37°C. In dieser Zeit geben die adhärenenten Zellen Faktoren in das Medium ab, die für die Ausreifung dendritischer Zellen in vitro von besonderer Bedeutung sind;
7. Abnahme der Überstände, Abzentrifugation (1200 U, 8min, 4 °C), um restliche Zellen zu entfernen;
8. Verwendung von MCM siehe unten;

B. Methoden

1. Gewinnung der PBMCs

1. Vermengung von auf 37 °C erwärmtem PBS-Heparin mit humanem Blut (Zellkonzentrat) im Verhältnis 2 : 1 (Verwendung von 50ml-Polystyrol-Röhrchen: 20 ml PBS-Heparin, 10 ml Blut).
2. Unterschichtung mit jeweils 10 ml Lymphoprep.
3. Zentrifugation: 20 min, 20 °C, 1000 Umdrehungen/min (U)
4. Abnahme von ca. 20 ml Serum. Dadurch wird der Großteil der Thrombozyten entfernt.
5. Zentrifugation: 30 min, 20°C, 1500 U
6. Abnahme der PBMCs (peripheral blood mononuclear cells), die sich in der Mitte des Röhrchens als "buffy coat" gesammelt haben.
7. 3-maliges Waschen mit PBS-EDTA (1000 U, 4 °C, 8 min).
8. Ermittlung der Zellzahl und der Viabilität mit Hilfe des Hämozytometers und Trypanblau als Vitalfärbung.

2. Depletion der Lymphozyten

Zur Entfernung der T- und B-Lymphozyten stehen zwei Methoden zur Verfügung:

- * Immunomagnetische Depletion (direkt/indirekt) mit Hilfe von Dynabeads
- * Depletion durch Ausnützung der Adhärenzeigenschaften von Monozyten/Makrophagen, Verwerfen der nicht-adhärenen Fraktion

2a. Immunomagnetische direkte Depletion der Lymphozyten

1. Dynabeads M-450 Pan B (CD19) und Dynabeads M-450 Pan T (CD2) werden in einem Verhältnis von jeweils 1ml beads auf 400 Millionen PBMCs verwendet. Das Verhältnis Beads : Lymphozyten beträgt somit 1 : 1. Die beads werden mit PBS-BSA aus ihrem Lösungsmedium herausgewaschen. Dazu verwendet man einen Magneten, der die Magnetkörperchen an den Röhrchenrand zieht und so von der Flüssigkeit trennt.
2. Vermischung der PBMCs mit den Dynabeads. Es werden 15 ml-Polypropylen-Röhrchen verwendet, die jeweils 3 ml PBS-BSA, 150 Millionen PBMCs und die entsprechende Menge beads enthalten sollen.
3. 20 Minuten Inkubationszeit im "sample mixer" bei 4 °C.
4. Durch Verwendung eines Magneten können die Dynabeads mit den an sie gebundenen B- und T-Zellen am Röhrchenrand fixiert werden. Die Flüssigkeit mit den übrigen Zellen wird vorsichtig abgenommen.
5. 3-maliges Waschen mit PBS-BSA; Ermittlung der Zellzahl.
6. Wiederholung der Schritte 2 - 5, um die Zahl der verbleibenden B- und T-Zellen weiter zu verringern.

2b. Immunomagnetische indirekte Depletion der Lymphozyten

1. CD20-Antikörper wird mit 200 µl PBS 1 : 100 verdünnt und mit 2 ml OKT 11-Supernatans vermischt.
2. PBMCs werden in diesem Gemisch resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Die Antikörper binden spezifisch an die zugehörigen Oberflächenmembranproteine der T- und B-Zellen.
3. 3-maliges Waschen mit PBS-EDTA (1000 U, 4 °C, 8 min), um nicht-gebundene Antikörper zu entfernen.

4. Dynabeads M-450 Schaf-Anti-Maus IgG werden in einem Verhältnis von 1 ml auf 200 Millionen Zellen verwendet, das entspricht einem Verhältnis von je zwei beads/Lymphozyt. Diese sekundären Antikörper binden an die Primärantikörper an der Oberfläche der T- und B-Zellen und machen sie dadurch zur immunomagnetischen Isolation bereit.
5. Weiteres Procedere siehe direkte Depletion Schritte 3 - 6.

2c. Depletion der Lymphozyten aufgrund ihrer Unfähigkeit zu adhären

1. Petri-Schalen werden mit humanem Gammaglobulin beschichtet und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.
2. 3-maliges Waschen mit PBS
3. Zugabe von 50 Millionen PBMCs in 10 ml R10; dieser Ansatz wird 1 h bei 37 °C inkubiert.
4. Die Monozyten/Makrophagen binden an das humane Gammaglobulin und werden dadurch zur adhärenen Fraktion. B- und T-Lymphozyten sowie auch andere Zellen bleiben im Überstand und werden gemeinsam mit dem Medium abgesaugt.
5. 3-maliges Waschen mit PBS, um die nicht-adhärenente Fraktion vollständig zu entfernen.
6. Zugabe von 10 ml R10/Schale; Inkubation bei 37 °C für 24 h
7. Abnahme des Überstandes, Verwendung als MCM.
Zugabe von 10ml R10/Schale, wobei ab jetzt dem Medium 500 U/ml IL-4 und 800 U/ml GM-CSF zugesetzt werden (Tag 0). Am Tag 2 werden 5ml R10/IL-4/GM-CSF/Schale ergänzt. Durch die Zytokinsubstitution kommt es zur Ablösung der adhärenen Zellen.
8. Am Tag 3 werden die Zellsuspensionen abgenommen und abzentrifugiert (1000 U, 4 °C, 8 Minuten). Die Zellen werden in 6-well-Platten weiterkultiviert (1 Million Zellen, 4 ml R10, 500 U/ml IL-4 und 800 U/ml GM-CSF kommen in eine Vertiefung).

3. Kultur der lymphozyten-freien PBMCs

3a. Vorbereitungskultur oder "priming culture"

Die von B- und T-Lymphozyten gereinigten PBMCs werden in R10, dem GM-CSF und IL-4 zugesetzt wird, im Brutschrank bei 37 °C inkubiert (Verwendung von 6-well-Platten: 4 ml Medium, 500 U/ml IL-4, 800 U/ml GM-CSF und 2 Millionen

Zellen kommen in eine Vertiefung) (Tag 0). An geraden Tagen werden 1,5 ml Medium/well abgenommen und 2 ml R10, 1000 U/ml IL-4 und 1600 U/ml GM-CSF substituiert. Dieser Vorgangsweise liegt die (experimentell nicht überprüfte) Annahme zugrunde, daß die Zytokine während der jeweils zweitägigen Kulturperiode völlig verbraucht wurden, und daß 0,5 ml Medium verdunstet sind. Durch Zugabe von 2 ml frischem Medium mit der doppelten Zytokinkonzentration werden somit die Ausgangskonzentrationen und das Ausgangsvolumen wieder hergestellt.

3b. Reifungskultur oder "differentiation culture"

Am Tag 7 werden 1,5 ml Medium/well abgenommen. Die Zellsuspensionen werden in neue 6-well-Platten transferiert und mit 25 % MCM substituiert. Außerdem wird in jede Vertiefung 1 ml R10/1000 U/ml IL-4/1600 U/ml GM-CSF zugegeben.

Morphologie beobachten.

Am Tag 10 werden die Zellen gesammelt, gezählt, phänotypisch und morphologisch analysiert und anschließend für die eigentlichen Experimente verwendet.

4. Zellfärbung für die Durchflußzytometrie

Material

- * 96-well-Platte mit Spitzboden (Costar, Cambridge, MO, USA)
- * PBS-BSA
- * Primärantikörper:

Anti-CD83-Antikörper: CD 83 ist ein Membranprotein, das nur auf reifen dendritischen Zellen exprimiert wird (177).

Der Nachweis von CD83 mit Hilfe des spezifischen murinen IgG2b-Antikörpers eignet sich deshalb zur Differenzierung reifer von unreifen Zellen. Die Anwendung erfolgt in der Verdünnung 1 : 1000.

(Klon HB15, Dr. Thomas Tedder, Department of Immunology, School of Medicine, Duke University, Durham, NC, USA)

Isotyp: Als Negativkontrolle wird ein muriner IgG2b-Antikörper mit Spezifität für *Aspergillus niger* Glukose-Oxidase verwendet. (DAKO A/S, Glostrup, Dänemark)

- * Sekundärantikörper:
Biotinylierter Anti-Maus-Ig-Antikörper: Verdünnung 1 : 100 (code RPN 1001, Amersham, England)
- * Tertiärreagenz:
Streptavidin konjugiert an Fluorescein-Isothiocyanat (FITC): Verdünnung 1 : 100 (code RPN 1232, Amersham, England)
- * Megafuge (Heraeus, Sepatech)

Methode

1. Es werden jeweils zwischen 100 000 und 1 Million Zellen und 100 µl PBS-BSA in drei Vertiefungen der 96-well-Platte pipettiert.
2. Zentrifugation (1000 U, 4 °C, 4 min)
3. Zugabe der Primärantikörper in den vorgeschriebenen Verdünnungen (Verdünnung in jeweils 50-100 µl PBS-BSA). Der dritte Ansatz erfolgt immer nur mit 100 µl PBS-BSA.
4. 30 min Inkubation auf Eis
5. 3-maliges Waschen mit PBS-BSA (1000 U, 4 °C, 4 min)
6. Zugabe von Sekundärantikörper in 100 µl PBS-BSA
7. 30 min Inkubation auf Eis
8. 3-maliges Waschen mit PBS-BSA (1000 U, 4 °C, 4 min)
9. Zugabe des Tertiärreagenzes in 100 µl PBS-BSA
10. 30 min Inkubation auf Eis. Ab diesem Schritt müssen die Zellen vor Licht geschützt werden.
11. 3-maliges Waschen mit PBS (BSA könnte im Durchflußzytometer Verstopfungen verursachen).
12. Jeder Ansatz wird in 200 µl PBS resuspendiert.
13. Auswertung;

2. Stimulation von dendritischen Zellen zur Produktion von IL-12

A. Material

Ich verwendete zur Untersuchung der Stimulierbarkeit dendritischer Zellen sowohl reife (Kultivierung bis Tag 10, Zugabe von MCM) als auch unreife Zellen (Kultivierung bis Tag 7).

Verwendete Stimulantien

- * **SACS:** (fixierte Staphylokokken vom Stamm *Staphylococcus aureus*, COWAN I) (Pansorbin cells, Calbiochem-Novabiochem Corporation, La Jolla, CA). SACS wird als konventioneller Stimulus für IL-12-Produktion verwendet.
- * **Lipopolysaccharid:** Lipopolysaccharide werden aus der Zellwand gram-negativer Bakterien isoliert. Sie werden hauptsächlich in der experimentellen Immunologie zur Aktivierung von immunkompetenten Zellen verwendet (Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA). Verwendete Konzentration: 100 ng/ml
- * **G 28.5:** Diese murinen monoklonalen IgG1-Antikörper binden spezifisch an CD40-Oberflächenmembranproteine dendritischer Zellen. Die zur Verfügung stehende Konzentration des gereinigten Immunglobulins beträgt 500 mg/ml. (von: Dr. E. Clark, Seattle, WA, USA).
- * **Anti-CD40-Antikörper (MABO 89):** Dieser murine IgG1-Antikörper bindet spezifisch an das CD40-Molekül dendritischer Zellen. Die zur Verfügung stehende Konzentration beträgt 200 mg/ml. (Immunotech, Marseille, France).
- * **Anti-MHC-Klasse-II-Antikörper:** Murine IgG2a-Antikörper gegen MHC-Klasse-II-Moleküle werden sowohl vom Klon 9. 3F10/HB180 (Anti-HLA-DR und DQ) als auch vom Klon L243/HB 55 (Anti-HLA-DR) produziert. Die Überstände werden unverdünnt verwendet. (Herkunft der Hybridomzellen: American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA).
- * **Anti-MHC-Klasse-I-Antikörper:** Diese IgG2a-Antikörper werden vom Klon W6/32 (HB 95) gewonnen. Die Überstände werden wiederum unverdünnt verwendet. (Herkunft des Hybridoms: American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA)
- * **Kontrollantikörper:** Als Negativkontrolle wurden vom Klon OKT 6 produzierte IgG1-Antikörper gegen humane Thymozyten und Lymphozyten verwendet (anti-CD1a). Dieses Molekül ist auch auf den untersuchten humanen dendritischen Zellen exprimiert. Die Verwendung des Supernatanten erfolgte unverdünnt. (Herkunft des Hybridoms: American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA).
- * **Concanavalin A:** Dieses Lectin hat die Eigenschaft, durch polyvalente Bindungen zu Zellagglutination zu führen. Dadurch können beispielsweise dendritische Zellen und T-Zellen unspezifisch aneinandergelagert werden. Dabei kommt es zu einer starken, polyklonalen Aktivierung der T-Zellen. Es stellte sich die Frage, ob dendritische Zellen auf diese Weise zur IL-12-Produktion

stimuliert werden können. Es wurde in einer Konzentration von 1 µg/ml Medium verwendet. (Grad III, hoch gereinigt, Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA).

- * **Phytohämagglutinin:** Dieses Reagenz ist ebenfalls ein Lektin mit dem Concanavalin A vergleichbaren Eigenschaften. Es wurde in einer Konzentration von 1 µg/ml verwendet (Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA).

B. Methodik

Zugabe von Stimulantien

1. Abnahme der Zellsuspensionen, Abzentrifugation (1000 U, 4 °C, 8 min); Ermittlung der Zellzahl
2. Verwendung von 24-well-Platten; in jede Vertiefung kommen 1 Million Zellen in 1 ml Medium. Das Ausgangsmedium ist R10.
3. Stimulierung dendritischer Zellen durch Zugabe verschiedener Stimulantien:
 - * SACS: Verwendung 1 : 1000 und 1 : 10000
 - * G28. 5: Verwendung 10 mg/ml, 5 mg/ml, 1 mg/ml
 - * Anti-CD40 (MAB89): Verwendung: 20 mg/ml, 6 mg/ml, 4 mg/ml, 2 mg/ml, 0,4 mg/ml
 - * Concanavalin A: Verwendung: 1 µg/ml
 - * Phytohämagglutinin: Verwendung: 1 µg/ml
 - * Lipopolysaccharid: Verwendung: 100 ng/ml
 - * Die Supernatanten (OKT 6, HB 95, HB 55, 9. 3F10): Verwendung unverdünnt im Verhältnis 1 : 3
4. Nach Zugabe der Stimulantien werden die Zellsuspensionen 48 h bzw. 72 h bei 37 °C inkubiert. Bei positiver Stimulation kommt es zur Produktion von IL-12 durch die dendritischen Zellen. Die Zellsuspensionen werden nach Inkubation abgenommen und abzentrifugiert (1000 U, 4 °C, 8 min). Die Überstände werden mit Hilfe des ELISA auf die Anwesenheit von IL-12 untersucht.

Panning

Eine weitere Möglichkeit, dendritische Zellen mit stimulierenden Antikörpern in Kontakt zu bringen, ist die "Panning-Technik" (177). Da die Antikörper bei dieser Technik immobilisiert sind, sollte es zu einer stärkeren Vernetzung ("crosslinking") der Moleküle auf der Zelloberfläche kommen.

1. Bakteriologische Petri-Schalen (35x10) werden mit 40 µg/ml Antikörper in PBS beschichtet. Ich verwendete für diese Experimente sowohl den Anti-CD40-Antikörper G28. 5 als auch den Anti-CD40-Antikörper MABO 89. Um eine gute Abdeckung des Schalenbodens zu erreichen verwendet man 1,5 ml/Schale.
2. 1 h Inkubation bei Raumtemperatur
3. 5-maliges Waschen mit PBS
4. Zugabe von 2 Millionen dendritischen Zellen in 2 ml R10.
5. Inkubation bei 37 °C für 48 h bzw. 72 h.
6. Abnahme und Auswertung der Überstände

C. Nachweis des durch dendritische Zellen sezernierten IL-12 durch ELISA (Enzyme linked immuno sorbent assay)

Prinzip

Diese Methode bedient sich einer quantitativen Enzym-Immuno-Sandwich-Technik. Eine Mikrotiterplatte ist beschichtet mit einem monoklonalen Antikörper, der spezifisch für IL-12 ist. Der konkrete Antikörper erkennt nur das bioaktive IL-12 p70 Heterodimer, nicht aber die oft im Überschuß vorkommende p40 Kette. Standards und Proben werden in die Vertiefungen der Platte pipettiert; bei Vorhandensein von IL-12 kommt es zur Bindung an die immobilisierten Antikörper. Durch Abwaschen werden alle ungebundenen Substanzen entfernt. Danach wird ein zweiter für IL-12 spezifischer polyklonaler Antikörper zugegeben, an den ein Enzym gekoppelt ist. Nach dem Abwaschen der ungebundenen Substanzen wird eine Substratlösung zugegeben. Die Entwicklung der Farbreaktion ist proportional der IL-12-Bindung an den monoklonalen Antikörper.

Material:

- * IL-12-Mikrotiterplatte (890212): 96-well-Polystyrene-Mikrotiterplatte beschichtet mit murinen monoklonalen Anti-IL-12-Antikörpern
- * IL-12-Konjugat (890213): Polyklonaler Anti-IL-12-Antikörper gekoppelt an Peroxidase
- * IL-12-Standard (890214): 2,5 ng rekombinantes IL-12 in einer gepufferten Lösung auf Proteinbasis
- * Verdünnungsmittel RD1F (895041): Gepufferte Lösung auf Proteinbasis

- * Verdünnungsmittel RD5C zur Kalibrierung (895046): Gepufferte Lösung auf Proteinbasis (5-fach Konzentrat)
- * Waschlösung (895003): Gepufferte Lösung (25-fach Konzentrat)
- * Farbreagenz A (895000): Hydrogenperoxid
- * Farbreagenz B (895001): Tetramethylbenzidin (Chromogen)
- * Stopplösung (895032): 2N schwefelige Säure
- * Abdeckung für die Platte: 4 Klebestreifen

(Alle Reagenzien stammen von: R&D Systems, Minneapolis, USA). Eine vergleichende Testung dieses QuantikineTM wurde kürzlich beschrieben (181).

ansonsten

- Mikrotiterplatte zur Absorptionsmessung bei 450nm
- Pipetten (50 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)
- Destilliertes Wasser

Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien werden bei Raumtemperatur verwendet.

- * Waschlösung: 20 ml Konzentrat + 480 ml destilliertes Wasser
- * Verdünnungsmittel RD5C: 20 ml Konzentrat + 80 ml destilliertes Wasser
- * Substratlösung: Farbreagenzien A und B werden im Verhältnis 1 : 1 vermischt
- * IL-12 Standard: Zugabe von 5 ml Kalibrationslösung RD5C. Die neue Stammlösung hat eine Konzentration von 500 pg/ml. Diese Stammlösung wird zur Herstellung einer Verdünnungsreihe verwendet. Die Kalibratorlösung selbst dient als Nullstandard.

Vorgangsweise

1. 50 µl Verdünnungsmittel RD1F werden in jede Vertiefung pipettiert.
2. 200 µl IL-12 Standardlösung bzw. Probe werden zugegeben.
3. Inkubation für 2 h.
4. 3-maliges Waschen mit Hilfe der Waschlösung
5. 200 µl Konjugat werden zugegeben.
6. Inkubation für 2 h
7. 3-maliges Waschen mit Hilfe der Waschlösung
8. 200 µl Substratlösung werden zugegeben.
9. Inkubation für 20 min

10. 50 µl Stopplösung werden zugegeben. Innerhalb von 30 min soll die Absorptionsänderung bei 450 nm abgelesen werden. Im Vergleich mit der Standardkurve kann auf die IL-12-Konzentrationen in den Proben rückgeschlossen werden.

3. Nachweis der Migration von humanen dendritischen Zellen in der Maus

A. Material

Material und Methoden der Gewinnung dendritischer Zellen aus humanem Blut wurden im ersten Teil dieses Kapitels beschrieben.

Versuchstiere

Ich führte diese Experimente mit weiblichen, 2 - 6 Monate alten Inzuchtmäusen des Stammes BALB/c durch. Diese Tiere stammen aus der hauseigenen Zucht, die unter der Aufsicht von Dr. Franz Koch angelegt wurde. Für das intravenöse und subkutane Spritzen von Zellen liegt die Tierversuchsbewilligung des Bundesministeriums vor (GZ 66.009/368-I/A/2/92, GZ 66.011/70-Pr/4/94 und GZ 66.011/38-Pr/4/95).

Material zur Bearbeitung der Versuchstiere

- * Äther zur Betäubung der Mäuse
- * sterile 1 ml-Spritzen (Braun, Melsungen, D)
- * sterile Nadeln (Microlance 3, 27G 3/4, 0,4 x 19, Nr. 20, Becton Dickinson, Dublin, IR)
- * Alkohol zur Desinfektion
- * CO₂-Gas
- * 1 gebogene Schere, 1 gerade sterile Pinzette, 1 gebogene sterile Pinzette
- * Petri-Schalen (100 x 15 mm) (Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA)
- * sterile Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml) (Becton Dickinson, NJ, USA)
- * sterile Werkbank (Danlaf, Dänemark)

Material zur Bearbeitung der entnommenen Milzen bzw. Lymphknoten

Anfertigung von Zellsuspensionen aus Lymphknoten und Milz

- * R10
- * Ammoniumchlorid (NH₄Cl) 1,66 %
- * Filtersieb
- * Filter (39 µm Maschenweite) aus Nylongewebe für das graphische Gewerbe
- * Omnifuge (Heraeus Sepatech)
- * sterile Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml) (Becton Dickinson, NJ, USA)
- * Polypropylen-Zentrifugenröhrchen (15 ml) (Costar, Cambridge, MA, USA)
- * Polystyrol-Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml) (Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA)
- * Objektträger (Elka, No. 2400)
- * Deckgläser 21 mm x 26 mm (Menzel-Glaser)
- * Vaseline
- * Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX60)

Anfertigung von Gefrierschnitten aus murinen Milzen:

- * Kryostat FRIGOCUT 2800 (Reichert-Jung)
- * PBS
- * Objektträger (Elka, No. 2400)
- * Deckgläser 21mm x 26mm (Menzel-Glaser)
- * Vectashield Eindeckmedium (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA)
- * Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX60)

B. Methodik

a. Markierung der reifen dendritischen Zellen mit Hilfe PKH 26

PKH 26-GL ist ein rot-fluoreszierender, lipophiler Farbstoff. Es kommt zum Einbau von aliphatischen Molekülen in die Zellmembran. Das Färbemuster ist abhängig vom Zelltyp und der Zellmembran. Die Färbung ist keine Sättigungsreaktion, sondern eine Funktion von Farbstoffkonzentration und Zellkonzentration. Überfärbung führt zu Verlust der Membranintegrität und Einschränkung der Zellerholung. Ich verwendete diesen Farbstoff zur Markierung von reifen dendritischen Zellen.

Material

- * einheitliche Zellkultur in R10
- * R10
- * RPMI 1640 oder PBS
- * PKH-26
 - a. Farbstoff 1 Ampulle 0,5 ml
 - b. Verdünnungsflüssigkeit C 1 Ampulle 10 ml
(Sigma chemical company, St. Louis, MO, USA)
- * Hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FCS, Gibco, Paisley, Scotland)
- * Polypropylen-Zentrifugenröhrchen (15 ml) (Costar, Cambridge, MA, USA)
- * Omnifuge (Heraeus Sepatech)
- * sterile Werkbank
- * Hämozytometer (Reichert)
- * Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)

Methodik

Alle Schritte werden bei Raumtemperatur durchgeführt.

1. Zellsuspension wird einmal in RPMI 1640 gewaschen (1000 U, 4 °C, 8 min)
Die Gesamtzellzahl sollte ungefähr 20 Millionen betragen.
2. Herstellung von 1ml einer 4µm PKH-26-Lösung unter Verwendung des Verdünnungsmittels C.
3. Das abzentrifugierte Pellet wird bis auf 25 µl von seinem Überstand befreit. Durch leichtes Klopfen auf den Röhrchenboden kommt es zur Vermischung der Zellen mit dem Restmedium. Danach wird 1 ml der Verdünnungslösung C zugegeben.
4. Zugabe der Zellsuspension (1 ml) zu der vorbereiteten Farbstofflösung. Dieser Vorgang soll schnell passieren.
5. Inkubation für 2-5 min bei Raumtemperatur.
6. 2 ml fetales Kälberserum werden zugegeben. Dadurch kommt es zum Stoppen der Färbereaktion.
7. Inkubation für 1 min bei Raumtemperatur
8. Zugabe von 4 ml R10
9. Mindestens 3-maliges Waschen mit R10 (1000 U, 4 °C, 8 min)

Durch diese Färbung wird die Vitalität der Zellen nicht beeinträchtigt (Kontrolle im Hämozytometer).

b. Injektion der markierten Zellen in die Versuchstiere

1. Intravenöses Spritzen in die Schwanzvene
Markierte Zellen werden in PBS resuspendiert. Die Konzentration beträgt 1 Million Zellen auf 100 µl PBS
 2. Subkutanes Spritzen in die Fußpfote
Die Konzentration beträgt 1 Million markierte Zellen auf 30 µl PBS
- * Die Versuchstiere werden vor der Injektion mit Äther betäubt.
 - * Injektion
 - * 24 h Inkubationszeit

c. Evaluation der Zellwanderung

Entnahme von Lymphknoten und Milzen:

1. Anfertigung von 15 µm-Gefrierschnitten aus den Milzen von behandelten und unbehandelten Mäusen (Negativkontrolle). Die Schnitte werden auf Objektträger aufgebracht und mit Vectashield eingedeckt
2. Anfertigung von Zellsuspensionen mit Hilfe eines Filtersiebes und eines Nylonfilters. Im Falle der Milzzellsuspension wird noch eine Erythrolyse mit Ammoniumchlorid durchgeführt, um die Erythrozyten zu entfernen. Die Suspensionen werden abzentrifugiert und mit PBS gewaschen, bevor sie auf Objektträger aufgetragen und abgedeckt werden. Zur Fixierung der Suspension zwischen Objektträger und Deckglas verwendet man Vaseline. Die Zellsuspensionen wurden also noch im viablen Zustand beurteilt.

d. Beurteilung im Fluoreszenzmikroskop