universität innsbruck
Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Regulation der Migration von murinen kutanen dendritischen Zellen durch bakteriell und Kontaktallergeninduzierte Zytokine

Stoitzner, Patrizia

1997

B. Material und Methoden

urn:nbn:at:at-ubi:2-12558

B. Material und Methoden

1 Materialien, Cytokine, Antikörper, Geräte:

1.1 Materialien:

2,2´-Azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS)	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA
Ammoniumthiocyanat	Merck, Darmstadt, BRD
BALB/c-Mäuse	Charles River Germany, Sulzfeld, BRD
Bovines Serum Albumin (BSA)	Biomex, Mannheim, BRD
C57BL/6-Mäuse	Charles River Germany, Sulzfeld, BRD
Cacodylat-Natriumsalz	Fluka, Buchs, Schweiz
3,3´-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB)	Polysciences INC, Warrington, PA, USA
Dispase II	Boehringer-Mannheim, Mannheim, BRD
DNase from bovine pankreas (grade II, 5 mg/ml)	Boehringer-Mannheim, Mannheim, BRD
Dinatriumcarbonat (Na_2CO_3)	Merck, Darmstadt, BRD
Dinatriumdihydrogenphosphat ($Na_2H_2PO_4 \times 2H_2O$)	Merck, Darmstadt, BRD
Ethanol	Fluka, Buchs, Schweiz
Fetales Kälberserum	Biological Industries, Beth Harmek, Israel
Gentamycin (20 mg/ml)	Amimed AG, Allschwil, CH
Gewebekultur-Petrischalen	Falcon, Oxnard, CA, USA
Gewebekultur-24-well-Platten	Costar, Cambridge, MA, USA
Gewebekultur-96-well-Platten	Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA
200 mM L-Glutamin	Life Tech. Ltd., Paisley, Scotland
25%iges Glutaraldehyd	Gröpl, Plano, Wien, Austria
HANK´s Salzlösung	Seromed, Biochrom KG, Berlin, BRD
1 M HEPES Puffer	Seromed, Biochrom KG, Berlin, BRD
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt, BRD
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, BRD
Komplement (Low Tox-M Rabbit Complement)	Sera-lab, Crawley Down, Sussex, England
0,05 mM 2-Mercaptoethanol	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA
Mikrotiterplatten (Nunc-Immuno Platten, MaxiSorp F96)	Nunc Bulletin, Roskilde, Dänemark
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	Merck, Darmstadt, BRD
Osmiumtetroxid	Merck, Darmstadt, BRD
Paraformaldehyd	Polysciences INC, Warrington, PA, USA

PBS (Phosphat-Buffered-Saline)	Biological Industries, Beth Hamerk, Israel
Poly-L-Lysin	Sigma, St. Louis, MO, USA
Polypropylen-Zentrifugenröhrchen (15 ml)	Costar, Cambridge, MA, USA
Ratten-Gammaglobulin	Jackson Immuno Research Lab., PA, USA
RPMI 1640	Biological Industries, Beth Hamerk, Israel
Szintillationsflüssigkeit (Optiszint-High-Safe)	Pharmacia, Wien, Austria
H^3-Thymidin (spez. Aktivität 2447, 9 GBq/mmol = 6,7 Ci/mmol)	New England Nuclear, Boston, MA, USA
Tris-HCl	Serva, Heidelberg, Deutschland
Tween 20	Serva, Heidelberg, Deutschland
Trypanblau	Seromed, Biochrom KG, Berlin, BRD
2,5%-iges Trypsin	Sera-lab, Crawley Down, Sussex, England
Vectashield Mounting Medium for Fluorescence	Vector Laboratories, Burrington, CA, USA
Wasserstoffperoxid	Sigma, St. Louis, MO, USA
Zitronensäure-1-hydrat	Merck, Darmstadt, BRD

1.2 Zytokine

1.2.1 Zytokine für die Organkultur:

rekombinanter muriner TNFα ($1,2\times10^7$ U/mg)	Dr. G.R. Adolf, Ernst Boehringer Institut für Arzneimittelforschung, Wien, Austria
rekombinantes murines IL-1β ($\geq1\times10^7$ U/mg)	Genzyme, Cambridge, MA, USA
rekombinantes murines IL-1β ($>1\times10^7$ U/mg)	Biomol, Hamburg, Deutschland
rekombinantes murines IL-1β ($>5\times10^8$ U/mg)	Pharamacia, Wien, Austria
rekombinanter muriner GM-CSF ($1,9\times10^7$ U/mg)	Dr. E. Liehl, Novartis, Wien, Austria
rekombinantes murines IL-4 ($\sim1\times10^7$ U/mg)	Genzyme, Cambridge, MA, USA
rekombinantes murines MIP-1α (2×10^5 U/mg)	R&D-Systems, Abingdon, UK

1.2.2 Standards für Elisa:

rekombinanter muriner GM-CSF (10 μg/ml)	Pharmingen San Diego, CA, USA
rekombinanter muriner TNFα (50 μg/ml)	Pharmingen San Diego, CA, USA
rekombinantes murines IL-1β (5 μg/ml)	Endogen, Cambridge, MA, USA

1.3 Antikörper:

1.3.1 Antikörper für die Organkultur:

polyklonaler anti Maus-TNFα	Biosource Int., CA, USA
monoklonaler anti Maus-TNFα (V1q)	Dr. B. Echtenacher, Regensburg, BRD (54)
mono- und polyklonaler anti Maus-IL-1β	Genzyme, Cambridge, MA, USA
monoklonaler anti Maus-IL-1β	R&D-Systems, Abingdon, UK
monoklonaler anti Maus-IL-1α	R&D-Systems, Abingdon, UK
monoklonaler anti Maus-IL-10	Endogen, Woburn, MA, USA

1.3.2 Antikörper für Elisa:

Capture-Antikörper:

monoklonaler anti Maus GM-CSF	Pharmingen San Diego, CA, USA
monoklonaler anti Maus/Ratte TNFα	Pharmingen San Diego, CA, USA
polyklonaler anti Maus IL-1β	Endogen, Cambridge, MA, USA

Detektor-Antikörper:

monoklonaler anti Maus GM-CSF, biotinyliert	Pharmingen San Diego, CA, USA
monoklonaler anti Maus TNFα, biotinyliert	Pharmingen San Diego, CA, USA
polyklonaler anti Maus IL-1β, biotinyliert	Endogen, Cambridge, MA, USA

Peroxidasekonjugat:

Avidin-Peroxidase-Komplex	Sigma, St. Louis, MO, USA

1.3.3 Antikörper für die Färbungen von *sheets* und Zytozentrifugationen:

Primärantikörper:

Tab. 4: Auflistung der verwendeten Primärantikörper

Name	Klon	ATCC	Ag-Spezifität	Ig-Klasse	Quelle
B21.2	B21.2	TIB 229	MHC Klasse II $I\text{-}A^{b,d}$	Ratte IgG2b	R. M. Steinman[1]
2G9-FITC	2G9	-	$I\text{-}A^{d}$, $I\text{-}E^{d}$	Ratte IgG2a	Pharmingen[2]
-	-	TIB 120	$I\text{-}A^{b,d,q}$ $I\text{-}E^{d,k}$	Ratte IgG2b	ATCC[3]
In-1	In-1	-	Invariante Kette	Ratte IgG2b	N. Koch[4] (55)
2A1	2A1	-	Intrazelluläre Organellen in reifen DC und B-Zellen	Ratte IgG2a	R. M. Steinman[1] (53)
MAC-1	-	-	Chlamydien-Zellwand-Protein	Ratte IgG2a	EACC[5]
LO-DNP11	-	-	DNP-Gruppe	Ratte IgG2b	Univ. Brüssel[6]
RB6-8C5	-	-	Granulozyten	Ratte IgG2b	R.M. Steinman[1]

[1] The Rockefeller University, New York, USA

[2] San Diego, CA, USA

[3] American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA

[4] Universität Bonn, BRD

[5] European Collection of Animal Cell Cultures, Salisbury, UK

[6] Université de Louvain, Bruxelles, B

Sekundärantikörper:

Schaf anti-Ratte Ig, biotinyliert, Spezies-spezifisch	Amersham Life Science, Amersham, UK
Schaf anti-Maus Ig, biotinyliert, Spezies-spezifisch	Amersham Life Science, Amersham, UK

Fluoreszenzkonjugate:

Streptavidin-FITC	Amersham Life Science, Amersham, UK
Streptavidin-Texas Red	Amersham Life Science, Amersham, UK

Peroxidasekonjugat:

Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Komplex	Amersham Life Science, Amersham, UK

1.4 Geräte:

sterile Werkbank (Danlaf 1206)	Uniequip, Martinsried, BRD
CO_2-Auto-Zero (Brutschrank)	Heraeus Instruments, Uniequip, Martinsried, BRD
Cytospin 2 (Zytozentrifuge)	Shandon, Firma Sanitas, Wien, Austria
Flüssigszintillationszähler	Wallac 1410, Pharmacia, Wien, Austria
Fluoreszenzmikroskop Olympus BX 60	Olympus Optical Co, Ltd., Japan
Hämatocytometer	Double Neubauer, 0,1 mm, Reichert Bright-line, New Jersey, USA
MS 1 Minishaker	IKA, Firma Gatt, Wien, Austria
Omnifuge 2.0 RS	Heraeus Sepatech, Firma Gatt, Wien, Austria
PHD-Cell-Harvester	Cambridge Technology INC., MA, USA
Rasterelektronenmikroskop	DSM 982 Gemini Zeiss, Oberkochen, BRD
Spectrareader (Photometer)	SLT-Labinstruments, Grödig, Austria
Durchlichtmikroskop	Reichert, Fa. Leitz, Wien, Austria

2 Lösungen:

2.1 Medium für die Organkultur:

Kulturmedium (R10-Medium)

RPMI 1640	500 ml
Fetales Kälberserum (FCS) hitzeinaktiviert (56°C, 30 min.)	55 ml
L-Glutamin (Endkonzentration 200 µM)	5 ml
2-Mercaptoethanol (Endkonzentration 0,05 µM)	0,5 ml
Gentamycin (Endkonzentration 20 µg/ml)	0,5 ml

R10-Hepes-Medium

RPMI 1640	500 ml
HEPES	3,5 ml

2.2 Lösungen für die Kultur epidermaler Zellsuspensionen:

Trypsinisierung

Dorsale Ohrhälfte (Trypsin Endkonzentration 0,42%):

2,5%-iges Trypsin	1,5 ml
HANK´s	9 ml

Ventrale Ohrhälfte (Trypsin Endkonzentration 1,89%):

2,5%-iges Trypsin	4,5 ml
HANK´s	6 ml

Cytotoxmedium

RPMI 1640	481,9 ml
HEPES	2,5 ml
dBSA (35%-ige Stammlösung)	5,6 ml

pH-Wert auf 7,3 einstellen

Komplementlösung

Low Tox Komplementlösung	1 Aliquot
A. dest.	1 ml

1 Aliquot in 1 ml A. dest. lösen

DNase (Endkonzentration)	0,5 ml
Cytotoxmedium	8,5 ml

Sterilfiltrieren

Das Komplement liegt in einer Endverdünnung von 1:10 vor.

2.3 Lösungen zur Herstellung von epidermalen *sheets*:

0,1 M Phosphatpuffer

$Na_2HPO_4 \times 2H_2O$	8,9 g
KH_2PO_4	6,8 g
A. dest.	500 ml

pH-Wert auf 6,8 mit 1N HCl einstellen

0,5 M Ammoniumthiocyanat

NH_4SCN	7,6 g
0,1 M Phosphatpuffer	200 ml

PBS/BSA-Lösung

Bovines Serum Albumin (BSA, 35%-ige Stammlösung)	3,5 ml
Phosphat-Buffered-Saline (PBS)	100 ml

2.4 Lösungen für die Färbung epidermaler und dermaler *sheets* und der Zytozentrifugationen:

PBS/BSA-Lösung

wie unter 2.3

0,05 M Tris-HCl-Puffer

basischer Tris-Puffer	56 ml
saurer Tris-Puffer	194 ml

0,5 M Puffer auf pH 7,6 einstellen und anschließend 1:10 verdünnen

Diaminobenzidinlösung

Diaminobenzidintetrahydrochlorid	10 mg
Tris-HCl-Puffer	20 ml

kurz vor Reaktion:

30%-iges Perhydrol (Endkonzentration 7,5%)	5 µl

2.5 Lösungen für Elisa:

2.5.1 Lösungen für GM-CSF- und TNFα-Elisa:

Beschichtungspuffer

Na_2CO_3	320 mg

$NaHCO_3$	590 mg
A. dest.	200 ml

pH-Wert auf 9,6 einstellen

Assaypuffer (Phosphatpuffer, PBS)

NaCl	80 g
Na_2HPO_4	11,6 g
KH_2PO_4	2 g
KCl	2 g
A. dest.	10 l

pH-Wert auf 7,4 einstellen

PBS / 10% FCS

Fetales Kälberserum (FCS)	10 ml
Phosphatpuffer (PBS)	90 ml

Waschpuffer

Phosphatpuffer wie unter 2.5.1;

Phosphatpuffer mit Tween 20

Tween 20	500 µl
Phosphatpuffer	1 l

Substratlösung

Zitronensäure-1-hydrat	1,76 g
$Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$	2,24 g
ABTS	0,19 g

pH-Wert auf 4,3 - 4,6 einstellen

2.5.2 Lösungen für den IL-1β-Elisa:

Beschichtungspuffer

Phosphatpuffer mit pH 7,4 wie unter 2.5.1

Assaypuffer (Phosphatpuffer mit 3% BSA, PBS /3% BSA)

NaCl	2,92 g
Na_2HPO_4	0,36 g
BSA	3 g
Tween 20	50 µl
A. dest.	100 ml

pH-Wert auf 7,2 - 7,4 einstellen

Waschpuffer

Phosphatpuffer wie unter 2.5.1;

Phosphatpuffer mit Tween 20 wie unter 2.5.1

Substratlösung

wie unter 2.5.1

2.6 Lösungen für die Rasterelektronenmikroskopie:

0,1 M Cacodylatpuffer

Cacodylat	21,4 g
A.dest.	1000 ml

pH-Wert auf 7,4 mit 0,1 M HCl einstellen

Karnovsky´s Paraformaldehyd-Glutaraldehyd-Fixativ (FG)

Paraformaldehyd	2 g
A. bidest.	25 ml
auf 60-70°C erhitzen, rühren	
1N NaOH	2-4 Tropfen (bis Lösung klar wird)
abkühlen unter fließendem Wasser	
25%-iges Glutaraldehyd	10 ml
0,2 M Na-Cacodylatpuffer	25 ml
$CaCl_2$	25 mg

mit 0,1 M Na-Cacodylatpuffer auf 100 ml auffüllen

pH 7,4 überprüfen

1,5%-iges Osmiumtetroxid

1,5%-ige Lösung in A. dest. herstellen

Alkoholreihe

50%-iger Ethanol

75%-iger Ethanol

95%-iger Ethanol

100%-iger Ethanol

3 Methoden:

3.1 Organkultur:

Im Modell nach Larsen (9) wurde Ohrhaut von Mäusen verwendet, um die Wanderung von Langerhanszellen zu beobachten.
Die Mäuse wurden *lege artis* mit CO_2 getötet oder mit Äther betäubt und die Ohren an der Basis abgeschnitten. Nach einer Abliegezeit von 26-28 Stunden bei +4°C wurden die Ohren in 70%-igem Ethanol desinfiziert und unter der sterilen Werkbank 20 Minuten lang getrocknet. Anschließend wurden die dorsalen Ohrhälften (die Seiten ohne Knorpel) mit Pinzetten von der ventralen Seite abgezogen und mit der dermalen Seite nach unten auf das vorbereitete Medium in 24-*well*-Platten aufgelegt (eine Ohrhälfte pro *well*). Bei einem experimentellen Ansatz wurden 6 Ohrhälften eingesetzt. Aufgrund der Oberflächenspannung schwammen die Ohren auf dem Medium auf. Die Organkultur wurde bei 37°C und 5% CO_2 für ca. 48 Stunden im Brutschrank inkubiert.
Nach der Inkubation wurden die Ohren mit einer Pinzette entfernt und entweder zu *sheets* weiterverarbeitet oder verworfen. Das Medium von 6 *wells* mit je 1,5 ml (entspricht einer Reihe) wurde in einem beschichteten 15 ml-Polypropylen-Röhrchen gesammelt und bei 1500 rpm/ 463g und +4°C 8 Minuten lang abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 100-200 µl abgesaugt, das Pellet im restlichen Volumen resuspendiert und das Volumen mit einer Kolbenhubpipette exakt bestimmt.

3.2 Bestimmung der Zellzahl:

Die Ermittlung der Wanderungsrate der Langerhanszellen erfolgte durch Zählung der im Verlauf der Kultivierung ins Medium ausgewanderten Zellen.
Aus der oben gewonnenen Zellsuspension wurden 40 µl in ein Eppendorf-Gefäß überführt und mit 10 µl Trypanblau gut vermischt. Von dieser Lösung wurden 10 µl in eine Zählkammer (Hämocytometer) pipettiert und anschließend die Zellen gezählt, wobei die Gesamtzellzahl, die Zahl der dendritischen Zellen (an den *veils* gut erkennbar) und die Zahl der toten Zellen in jeweils fünf Feldern bestimmt wurde.

Berechnung der Zellzahl:

$$\frac{\text{ermittelte Zellzahl/5 Felder} \times \text{Volumen der Zellsuspension} \times 2500\,^{*}}{\text{Anzahl der Ohrhälften}} = \text{Zellzahl pro Ohrhälfte}$$

* spezifischer Umrechnungsfaktor des Hämocytometers

3.3 Herstellung angereicherter Populationen epidermaler Langerhanszellen:

3.3.1 Herstellung der Zellsuspension:

Um eine ausreichende Menge an epidermalen Zellen zu erhalten, wurden pro Ansatz 30-40 BALB/c-Mäuse verwendet. Die Mäuseohren wurden mit 70%-igem Ethanol desinfiziert und 20 Minuten unter der sterilen Werkbank getrocknet. Nach Trennung der Ohren in dorsale und ventrale Hälften wurden sie getrennt auf Trypsinlösung aufgelegt und 30 bzw. 60 Minuten bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.
In der Zwischenzeit wurde eine Gewebekulturschale mit 30 ml R10-Medium und einem Stahlnetz vorbereitet. Die Epidermis, die sich nach der Inkubation auf Trypsin leicht von der Dermis ablöste, wurde auf das Stahlnetz im R10-Medium aufgelegt. Anschließend wurde das Stahlnetz im Medium drei Minuten lang auf- und abbewegt („geklopft"), ohne Luftblasen im Medium zu bilden. Dadurch gelangten die durch das Trypsin aus dem Zellverband gelösten Zellen in das Medium.
Die resultierende Zellsuspension in der Gewebekultur-Platte wurde durch ein Nylonnetz (Maschenweite 39 µm) in ein Polypropylen-Röhrchen pipettiert und bei 1200 rpm/ 296 g 8 Minuten bei +4°C abzentrifugiert. Bei der anschließenden Zählung sollte eine Zellzahl von 100-130 Millionen epidermaler Zellen mit einer eher niedrigen Zellviabilität von 70-90% erreicht werden.

3.3.2 Depletion eines Großteils der Keratinozyten:

Mit Hilfe des Komplementsystems und eines Antiköpers, der neben T-Zellen auch an Keratinozyten binden kann, kann der Hauptteil der Keratinozyten in der epidermalen Zellsuspension lysiert werden.
Die Inkubation mit 3 ml des Antikörpers Thy-1 (TIB 99) und 10 ml sterilfiltrierter

Komplementlösung erfolgte bei 37°C auf einem Schüttler im Wasserbad. Dieser Vorgang wurde mit PBS gestoppt und die Zellen anschließend abzentrifugiert (1200 rpm/ 296 g, 8 min., +4°C). Um Reste des Komplementsystems zu beseitigen, wurden die Zellen ein zweites Mal in PBS resuspendiert und wiederum wie oben abzentrifugiert.

3.3.3 „Trypsin-Trick“:

Dieser Schritt dient der Entfernung der durch das Komplement abgetöteten Zellen. Das Zellpellet wurde in 0,5 ml DNase (Endkonzentration), 0,5 ml Trypsin (Endkonzentration) und 9 ml PBS gelöst und wiederum bei 37°C für 10 Minuten geschüttelt. Nach Abstoppen der Reaktion mit R10 erfolgte der letzte Zentrifugationsschritt bei 1000 rpm/ 206 g für 8 Minuten bei 4°C.
Bei der folgenden Zählung der Zellsuspension sollte eine Zellzahl zwischen 20-30 Millionen mit einer Anreicherung von mindestens 10% Langerhanszellen und einer hohen Zellviabilität von 80-90% erreicht werden (7, 56).

3.3.4 Kultur der epidermalen Zellsuspension:

Die Kultivierung der epidermalen Zellen erfolgte entweder ohne Depletion der Keratinozyten, die das notwendige GM-CSF für die Reifung der Langerhans-Zellen produzieren, oder mit Depletion und GM-CSF-Zusatz (200 U/ml). Je 10 Millionen Zellen wurden in 10-12 ml R10-Medium pro Gewebekultur-Platte (10 cm Durchmesser) über 72 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert.

3.4 Herstellung epidermaler und dermaler *sheets*:

Für *in situ*-Färbungen kann die Haut in Epidermis und Dermis getrennt und in kleine *sheets* (Häutchenpräparate) geschnitten werden. Es gibt mehrere Möglichkeiten, die beiden Hautschichten voneinander zu trennen. Für Färbungen wird allgemein die Ammonumthiocyanat-Methode von Juhlin und Shelley (57) verwendet.
Die dorsalen Ohrhälften aus der Organkultur oder von frisch abgeschnittenen Mäuseohren wurden für 20 Minuten bei 37°C auf eine 0,5 M Ammoniumthiocyanat-Lösung aufgelegt. Die Ohrhälften sollten aufschwimmen. Nach dieser Inkubation wurden sie auf einem Tropfen PBS ausgebreitet und die Epidermis von der Dermis

abgezogen. Mit einem Skalpell wurden *sheets* von einer Größe von 3×3 mm geschnitten. Nach einer 20-minütigen Fixierung in Aceton wurden die Hautstückchen zweimal in PBS und zweimal in PBS/BSA gewaschen und anschließend bei –20°C eingefroren oder gleich gefärbt.

3.5 Färbungen epidermaler *sheets*:

Die Färbung der *sheets* wurde in einem *„Sheetshifter"* (nach Dr. P. Stöger, Innsbruck) in einer 96-*well*-Platte durchgeführt. Mit dieser Vorrichtung lassen sich mehrere *sheets* gleichzeitig von *well* zu *well* transferieren.

3.5.1 Immunfluoreszenzfärbung:

Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht bei +4°C. Anschließend wurden die *sheets* dreimal je 20 Minuten in PBS/BSA gewaschen. Die folgenden Färbeschritte wurden mit einem Sekundärantikörper (anti Ratte biotinyliert oder anti Maus biotinyliert, 1:100 verdünnt in PBS/BSA), gefolgt von Streptavidin-FITC (1:100) im Falle einer Einfachfärbung oder Streptavidin-Texas-Red (1:200) bei einer Doppelfärbung bei 37°C für 90 Minuten durchgeführt. Zwischen den einzelnen Färbeschritten wurden die *sheets* jeweils 3×20 Minuten in PBS/BSA gewaschen.
Bei einer Doppelfärbung wurden die *sheets* zur Absättigung der freien Bindungsstellen des anti Ratte-Ak mit Ratten-Gammaglobulin (100 μg/ml) inkubiert. Die Gegenfärbung erfolgte ohne einen weiteren Waschschritt mit einem FITC-gekoppelten Antikörper, meist ein anti-Klasse II-Ak (2G9-FITC, 1:50, (58)).
Anschließend an den letzten Waschschritt wurden die *sheets* in *Vectashield Mounting Medium for Fluorescence* eingebettet. Dieses Medium enthält Zusätze, welche das Ausbleichen der Fluoreszenz verzögern.

3.5.2 Peroxidase-Färbung:

Diese Einfachfärbung erfolgte nach dem gleichen Schema wie unter 7.1 beschrieben, jedoch wurde zur Visualisierung ein Streptavidin-Peroxidase-Komplex (1:100 verdünnt) verwendet. Die Peroxidase reagiert mit ihrem Substrat (Diaminobenzidinlösung mit 7,5% Waserstoffperoxid) und es kommt während einer Inkubation von

10 Minuten bei Raumtemperatur zu einer Braunfärbung des Präparats. Nach einem letzten Waschschritt von 3×20 Minuten in einem 0,05 M Tris/HCl-Puffer wurden die *sheets* in einem PBS/Glycerin-Gemisch (1:9) eingebettet.

3.6 Herstellung von Zytozentrifugenpräparaten:

Um Zellsuspensionen färben zu können, wird die Technik der Zytozentrifugation angewandt. Dabei werden Zellen in einer speziellen Zentrifuge (Cytospin 2) auf Objektträger zentrifugiert und können anschließend gefärbt werden.
In meinen Experimenten wurden 2-3×10^4 Zellen in einem Volumen von 200 µl Medium resuspendiert und in die vorgesehenen Zytozentrifugentrichter pipettiert. Bei 450 rpm wurden die Zellen 6 Minuten lang auf einen Objektträger zentrifugiert. Diese sogenannten „Zytos" wurden anschließend mindestens 30 Minuten lang an der Luft getrocknet und dann entweder bei –20°C eingefroren oder gleich für die Färbung verwendet.

3.7 Färbungen von Zytozentrifugationen:

Vor der Verwendung wurden die Objektträger mit den Zellen (eingefrorene „Zytos" mußten mindestens eine Stunde lang getrocknet werden) 5 Minuten lang in Aceton fixiert und anschließend 10 Minuten getrocknet. Die Zellen wurden mit einem Fettstift umrandet, um ein Abfließen der Antikörper- und Waschlösungen zu verhindern.
Die Färbeschritte erfolgten in der gleichen Reihenfolge wie bei der Färbung der *sheets* (B 7.1 und B 7.2), aber die Inkubationszeiten betrugen nur 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei 37°C. Zwischen den einzelnen Färbeschritten wurden die Zellen durch Auftropfen von PBS/BSA-Lösung mit einer Pasteurpipette und gleichzeitigem Absaugen der Waschlösung auf der anderen Seite 6-10 mal gewaschen. Das Eindecken der Präparate wurde je nach Färbemethode wie oben durchgeführt.

3.8 Funktionelle Tests:

Die oxidative Mitogenese (OXMI) ist eine Methode, um die Fähigkeit von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) zur Stimulation von ruhenden T-Zellen zu messen. Dabei werden syngene T-Zellen, die durch Perjodierung eine veränderte Oberfläche besitzen, von APZ zur Proliferation stimuliert (59).
Die APZ wurden in eine 96-*well*-Platte pipettiert, beginnend mit einer *top dose* von 10.000 bzw. 3.000 pro *well* in Triplikaten in einer Verdünnungsreihe (1:3 Schritten) zu je 100 µl/*well*. Als nächstes wurden 300.000 perjodierte T-Zellen, die aus der Milz und den mesenterialen Lymphknoten isoliert wurden, in 100 µl Medium in jedes *well* zu den APZ gegeben. Die Inkubation der OXMI erfolgte bei 37°C über 24 Stunden. Anschließend wurden je 50 µl H^3-Thymidin (4 µCi=148 KBq/ml) in die einzelnen *wells* pipettiert und die Platte für weitere 16 Stunden im Brutschrank inkubiert. Bis zur Messung der im Laufe der T-Zell-Proliferation eingebauten radioaktiven Nukleotide wurde die Platte im Kühlschrank aufbewahrt.
Für die Radioaktivitäts-Messung mußten die Zellen zuerst mit einem Zell-Erntegerät auf Filterpapier aufgebracht werden. Nach der Trocknung der Filterplättchen wurden sie in einer Szintillationsflüssigkeit aufgelöst. Die in die Zellen aufgenommene Radioaktivität wurde mit Hilfe eines Flüssigszintillationszählers gemessen. Die ermittelten Werte wurden in *counts per minute (cpm)* als Mittelwert der Triplikate angegeben.

3.9 Elisa (Enzyme linked immunosorbent assay):

Diese Methode dient dem Nachweis von Proteinen in diversen Lösungen. Im Speziellen wurden hiermit Zytokine in den Kulturüberständen der Organkultur nachgewiesen.

3.9.1 Sandwich-Elisa für TNFα und GM-CSF:

Beschichtung der Miktrotiterplatten:
Pro *well* wurden 100 µl Ratte anti Maus-Zytokine (anti-TNFα: 2 µg/ml, anti-GM-CSF: 4 µg/ml) pipettiert, und die Platte wurde über Nacht bei +4°C inkubiert. Anschließend wurden die *wells* einmal mit PBS-Tween und einmal mit PBS gewaschen.

Blockschritt:

Um unspezifische Bindungen mit dem Plastik zu verhindern, wurden vor Durchführung des Elisas je 200 µl PBS/10%FCS in die *wells* pipettiert, und die Platte weitere 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die *wells* wurden wiederum mit PBS-Tween und PBS gespült.

Standard- und Probenzugabe:

Die Proben wurden in R10-Medium, die Standards in PBS/10%FCS entsprechend verdünnt und zu je 100 µl pro *well* pipettiert. Die Inkubation erfolgte wieder über Nacht bei +4°C. Die Platte wurde dreimal mit PBS-Tween und einmal mit PBS gewaschen.

Detektion:

Zur Detektion des zu quantifizierenden Zytokins wurden biotinylierte Antikörper gegen TNFα und GM-CSF in einer Konzentration von 2 µg/ml in PBS/10%FCS zu 100 µl/*well* auf die Elisa-Platte pipettiert. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die *wells* viermal mit PBS-Tween und einmal mit PBS gespült.

Visualisierung:

Zur Sichtbarmachung der Menge an gebundenem Zytokin wurden je 100 µl eines Avidin-Peroxidase-Konjugats in einer Konzentration von 2,5 µg/ml in PBS/10%FCS in die *wells* gegeben. Die Inkubation erfolgte über eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln. Der folgende Waschschritt wurde siebenmal mit PBS-Tween und einmal mit PBS durchgeführt. Die Farbreaktion erfolgte durch Zugabe von 100 µl der Substratlösung (ABTS mit 0,03% H_2O_2) im Dunkeln. Die Stärke der Färbung ist ein direktes Maß für die Menge an gebundenem Zytokin und wurde mit Hilfe eines Photometers 30, 60 und 80 Minuten nach der Substratzugabe bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Für die Auswertung wurden die Messungen nach 60 Minuten herangezogen, da nach dieser Zeit die Standardkurven optimal waren.

3.9.2 Sandwich-Elisa für IL-1β:

Beschichtung der Mikrotiterplatten:

Die Inkubation mit dem *Capture*-Antikörper erfolgte wie unter 11.1.1, aber mit einer Antikörper-Konzentration von 4 μg/ml in PBS/3%BSA. Die *wells* wurden anschließend nicht gespült, sondern auf einem absorbierenden Material ausgeklopft.

Blockschritt:

Das Abblocken der unspezifischen Bindungen erfolgte mit PBS/3%BSA eine Stunde lang bei Raumtemperatur. Die Platte wurde zweimal mit PBS-Tween und einmal mit PBS gewaschen.

Detektion:

Der biotinylierte Antikörper gegen IL-1β wurde auf 2 μg/ml mit PBS/3%BSA verdünnt und zu je 50 μl in die *wells* pipettiert.

Standard- und Probenzugabe:

Die in PBS/3%BSA verdünnten Standards und die in R10-Medium verdünnten Proben wurden zu je 50 μl in die *wells* dazugegeben. Die Inkubation der Elisa-Platte erfolgte bei Raumtemperatur über zwei Stunden. Der Waschschritt wurde zweimal mit PBS-Tween und einmal mit PBS durchgeführt.

Visualisierung:

Der Avidin-Peroxidase-Komplex wurde auf eine Konzentration von 2,5 μg/ml mit PBS/3%BSA verdünnt, zu je 100 μl in die *wells* pipettiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach dem Waschen der Platte (zweimal in PBS-Tween und einmal in PBS) wurden je 100 μl der Substratlösung (gleich wie unter 13.1.4) in die *wells* gegeben. Die Farbentwicklung erfolgte im Dunkeln bei Raumtemperatur. Die Messung der Zytokinkonzentration wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm 30, 60 und 80 Minuten nach der Substratzugabe durchgeführt, wobei ebenfalls die Ergebnisse der Messungen nach 60 Minuten für die Auswertungen verwendet wurden.

3.10 Rasterelektronenmikroskopie (REM):

3.10.1 REM von epidermalen *sheets* und kompletter muriner Ohrhaut:

Die Dispase-Methode nach Kitano et al. (60) ermöglicht eine Trennung der Epidermis von der Dermis oberhalb der Basallamina ohne Zerstörung des Zellverbandes. Dabei wurden dorsale Ohrhälften 30 Minuten bei 37°C auf einer Dispaselösung mit 1,2 U/ml inkubiert. Die abgelösten Epidermisstücke wurden auf Medium aufschwimmend über 45 Stunden im Brutschank kultiviert, wobei zu bestimmten Zeitpunkten jeweils Proben entnommen wurden. Zusammen mit nach der gleichen Methode frisch präparierter Epidermis wurden die verschieden lang inkubierten Epidermisstückchen 4 bis 5 Stunden lang im Fixans (Karnovsky`s FG) fixiert und über Nacht in Cacodylatpuffer gelagert. Die Nachfixierung erfolgte über 1 bis 1,5 Stunden in 1,5%-igem Osmiumtetroxid. Nach einem kurzen Waschschritt in Puffer wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Aus dem 100%-igen Ethanol wurden die Proben sofort kritisch Punkt getrocknet und anschließend mit Gold-Palladium besputtert.
Nach der gleichen Methode wurde Ohrhaut nach 48-stündiger Kultur fixiert und präpariert.

3.10.2 REM der Zellkulturen:

Die Zellen aus der Organkultur oder der epidermalen Zellkultur wurden aus dem R10-Medium in PBS übergeführt. Je ein Tropfen der Zellsuspensionen wurde auf Glasplättchen, die 30 Minuten bei 37°C mit Poly-L-Lysin (1:10 verdünnt mit A. dest.) inkubiert worden waren, pipettiert und 20-30 Minuten bei 37°C inkubiert. Überschüssige Zellen und sonstige Verunreinigungen wurden mit PBS weggewaschen. Die mittels Poly-L-Lysin adhärierten Zellen wurden in warmem FG (um die Struktur der feinen zytoplasmatischen Ausläufer und Segel („*veils*") besser zu erhalten) für 20-30 Minuten fixiert und anschließend gut in Cacodylatpuffer gewaschen. Die Nachfixierung wurde wiederum mit Osmiumtetroxyd über eine Stunde durchgeführt. Nach einem weiteren Waschschritt wurden die Proben wieder in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und aus dem 100%-igen Ethanol heraus kritisch Punkt getrocknet und mit Gold-Palladium besputtert.