universität innsbruck
Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Universitäts- und Landesbibliothek Tirol

Entwicklung und Reifung der dendritischen Zelle aus Vorläufern im peripheren humanen Blut

Ebner, Susanne

1998

3. Material und Methoden

urn:nbn:at:at-ubi:2-12572

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Kulturmedien

„R10“ beinhaltet 10% hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FCS, Biological Industries, Kibbuz Beit Haemek, Israel), 50 µM 2-Mercaptoethanol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 20 µg/ml Gentamycin (Bio Whittaker, Walkersville, MD) sowie 200 mM L-Glutamin (Sebak, Stuben, A) in RPMI-1640 (PAA Laboratories GmbH, Linz, A).

"Autologes Medium" beinhaltet 1% autologes Plasma, 50 µM 2-Mercaptoethanol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 20 µg/ml Gentamycin (Bio Whittaker, Walkersville, MD) sowie 200 mM L-Glutamin (Sebak, Stuben, A) in RPMI-1640 (PAA Laboratories GmbH, Linz, A).

„H10“ beinhaltet 10% hitzeinaktiviertes humanes Serum aus einem Pool von fünf Personen, 50 µM 2-Mercaptoethanol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 20 µg/ml Gentamycin (Bio Whittaker, Walkersville, MD) sowie 200 mM L-Glutamin (Sebak, Stuben, A) in RPMI-1640 (PAA Laboratories GmbH, Linz, A).

3.1.2 Zytokine und Anti-Zytokine

GM-CSF (Leukomax "Sandoz", Novartis, Wien, A, spezifische Aktivität 1,1 x 10^6 U/mg).
IL-1α (Hoffmann-La- Roche, Nutley, NJ, spezifische Aktivität 2 x 10^8 U/mg
IL-1β (Genzyme, Cambridge, MA, spezifische Aktivität 5 x 10^8 U/mg)
IL- 2 (Novartis, Wien, A, spezifische Aktivität 1 x 10^7 U/mg)
IL- 4 Rekombinantes humanes IL-4, Immunex Corporation, Seattle, WA, spezifische Aktivität 5 x 10^7 U/mg; rekombinantes IL-4, Genzyme, Boston, MA, spezifische Aktivität 1 x 10^7/ml; rekombinantes humanes IL-4, Novartis, Wien, A; dieses Zytokin wurde uns freundlicherweise von Dr. Ekke Liehl (Novartis Forschungsinstitut, Wien) zur Verfügung gestellt. Die spezifische Aktivität war nicht bekannt und dieses IL-4 wurde in der Kultur in einer Endkonzentration von 50 - 100 ng/ml eingesetzt.

IL-4 produzierende Zellen (Il-4-62): Diese Zellen wurden uns freundlicherweise von Dr. A. Lanzavecchia (Basel Institute of Immunology, Basel, CH) zur Verfügung gestellt. Der Supernatant dieser Zellen wurde in der Kultur zu 5% v/v eingesetzt.

IL- 6 (Genzyme, Boston, MA, spezifische Aktivität 1 x 10^7 U/mg)

IL-10 (DNAX, Palo Alto, CA, spezifische Aktivität 1x 10^7 U/mg). Dieses Enzym wurde freundlicherweise von Dr.A. O´Garra zur Verfügung gestellt.

IL-13 (Pharmingen, San Diego, CA, spezifische Aktivität 1 x 10^6 U/mg)

IL-15 (Genzyme, Cambridge, MA, spezifische Aktivität 1 x 10^7 U/mg)

TNF-α wurde uns freundlicherweise von Dr. G.R. Adolf (Bender, Vienna, A) zur Verfügung gestellt (spezifische Aktivität 6 x 10^7 U/mg).

CD40 Ligand wurde uns freundlicherweise von Dr. P. Lane (Hoffmann-La Roche, Basel, CH) zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um ein chimeres Fusionsprotein zwischen der Maus CD8 α-Kette und dem humanen CD40 Liganden (CD40-L).

Neutralisierende anti-TNF-α Antikörper wurden von den Hybridomzellen (SDW 18.1.1 ATCC, HB 92 98) produziert (Tracey et. al., 1988). Der Supernatant wurde 10% v/v eingesetzt.

Neutralisierende anti-IL-10 Antikörper wurden von den Hybridomzellen (HB10487, HB11676, HB 11677 ATCC, Dr. A. O´Garra) produziert. Der Supernatant wurden zu 10% v/v eingesetzt.

Humanes Gammaglobulin (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, USA)

Monomeres 7s-IgG (Biochemie GmbH., Wien, A), Endobulin, humanes Immunglobulin zur intravenösen Anwendung (Immuno AG, Wien, A)

3.1.3 Antikörper

Tab.4: primäre Antikörper, die für Flowzytometrie, Immunhistochemie und Zellanreicherung verwendet wurden. Bei Antikörpern ohne explizite Speziesbezeichnung handelt es sich um monoklonale Antikörper aus der Maus.

Antigen	Name/Quelle	Isotyp
Nichtreaktive Kontrollen		
	Pharmingen (g)	IgG1
	DAKO (e)	IgG2a
	DAKO	IgG2b
	Pharmingen	IgM
	Pharmingen	Rat IgG2b
	AFCR-MAC 6 bis 10	Rat IgM
Monozyten		
CD14 [3C10]	TIB 228, ATCC (a)	IgG2b
CD68	EBM11, DAKO	IgG1
Dendritische Zellen		
CD83	HB-15a, T.F. Tedder, (f)	IgG2b
B-Zellen		
CD19	4G7, Becton Dickinson (b)	IgG1
CD20	MEM-97, V. Horejsi, Praha	IgG1
NK-Zellen		
CD56	MY31, Becton Dickinson	IgG1
T-Zellen		
CD2	OKT-11, ATCC	IgG2a
CD3	UCHT1, DAKO	IgG1
CD4	Leu3a+b, Becton Dickinson	IgG1
CD8	Leu2b, Becton Dickinson	IgG2a
MHC		
HLA-A,B,C	W6/32, ATCC	IgG2a
HLA-DR (FITC)	L243, Becton Dickinson	IgG2a
HLA-DR (PE)	L243, Becton Dickinson	IgG2a
HLA-DR/DQ	9.3F10/HB180, ATCC	IgG2a
Adhäsions- und Kostimulatorische Moleküle		
CD80, B7-1	L307.4, Becton Dickinson	IgG1
CD86, B7-2	IT2.2, Pharmingen	IgG2b
CD44v9	VFF16, P. Herrlich (k)	IgG2b
Aktivation		
CD45RA	4G10, R.M. Steinman (d)	IgG2a
CD45RO	UCHL-2, DAKO	IgG2a
CD95 (fas/APO-1)	DX2, Pharmingen	IgG1
Rezeptoren		
CD87/Urokinase-Plasminogen-Aktivator- Rezeptor	VIM-5, W. Knapp (h)	IgM

Antigen	Name/Quelle	Isotyp
CD115/M-CSF-Rezeptor	3-4A4-E4, Oncogene Science (i)	Rat IgG2b
CD116/GM-CSF-Rezeptor, α Kette	2B7-17-A und 3G7-14-15, N.A. Nicola, Melbourne, Aus	IgG2a
CDw120a	Utr-1,TNF-R, Typ 1, 80 kD, M. Brockhaus, Basel	IgG1
CDw120b	Htr-9, TNF-R, Typ 2, 75 kD, M. Brockhaus, Basel	IgG1
CD w121a	6B5, IL-1-R, Typ 1, 80 kD, Pharmingen	IgG2a
Diverses		
CD1a	OKT6, ATCC	IgG1
CD31 (PECAM-1)	JC/70A, DAKO	IgG1
CD34	MY10, Becton Dickinson	IgG1
CLA (cutaneous lymphocyte antigen)	HECA-452, Pharmingen	Rat IgM
CD15s (Sialyl-Lewis-x)	CSLEX, Pharmingen	IgM
Erythrocyten, Erythroblasten	VIE-G4, O. Majdic/W. Knapp, Wien	IgM
E-Cadherin	HECD-1/Takara (j)	IgG1

(a) ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD; (b) Becton Dickinson, Mountain View, CA; (c) Ortho, Raritan, NJ; (d) The Rockefeller University, New York, NY; (e) Roskilde, Denmark; (f) Duke University; Durham NC; (g) San Diego, CA; (h) Vienna, A; (i) Cambridge, MA; (j) Otsu, Japan; (k) Deutsches Krebsforschungszentrum; Heidelberg, D

3.2 Methoden

3.2.1 Reifungsstimulantien

3.2.1.1 MCM (Monozyten-konditioniertes Medium)

Herstellung:

1. Beschichten von Petri-Schalen 100mm x 15mm (Falcon 1029, Becton Dickinson, NJ, USA) mit IgG (100µg/ml in PBS); 1 h Inkubation bei Raumtemperatur;
2. 3-maliges Waschen mit PBS; (die beschichteten Platten wurden meist frisch verwendet, sind allerdings einen Tag auf 4°C haltbar)
3. Zugabe von 50 Millionen PBMC in 10 ml Kulturmedium/Petri-Schale;
4. 1 h Inkubation bei 37°C.
5. 3-maliges Waschen mit PBS. Am Boden der Petri-Schale hat sich ein Monolayer aus Monozyten/Makrophagen gebildet.
6. Zugabe von 10ml Kulturmedium/Petri-Schale. Inkubation für 24 h bei 37°C.
7. Abnahme der Überstände, Abzentrifugation (269 g, 8 min, 4°C) der restlichen Zellen, Aufbewahrung des MCM auf –20°C.
8. Einsatz in der Kultur zu 33% v/v.

3.2.1.2 Bakterielle Stimulanzien:

SACS:

Staphylococcal aureus, COWAN I Stamm (Calbiochem, La Jolla, CA, Endverdünnung: 1:10000

BCG:

Bacillus Calmette-Guérin, Stamm von Mycobacterium bovis (Organon Technika, Chicago, IL). 5 x 10^8 BCG Organismen wurden gewaschen, und in 1 ml Kulturmedium resuspendiert. BCG wurde freundlicherweise von Dr. Martin Thurnher zur Verfügung gestellt.

LPS:

Lipopolysacharid, (Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO, Endkonzentration: 100 ng/ml)

3.2.2 Gewinnung der dendritischen Zellen aus Buffy-coats oder Vollblut

Buffy coats wurden von der Blutbank der Innsbrucker Klinik zur Verfügung gestellt. Vollblut im Ausmaß von 100 – 200 ml wurde von freiwilligen Spendern entnommen. PBMCs wurden mit Hilfe eines Dichtegradienten mit Lymphoprep (1,077 g/ml; Nycomed Pharma, Oslo, N) gewonnen. Zur Entfernung der T-, B-Lymphozyten und NK-Zellen standen unten angeführte Methoden zur Verfügung. Für detaillierte Beschreibungen der verwendeten Methoden siehe Romani, et al. 1997.

(1) Immunomagnetische Depletion (direkt/indirekt) mit Hilfe von Dynabeads (Dynabeads, Deutsche Dynal GmbH, Hamburg, D)

(2) Rosettieren mit Test-neuraminidase (Behringwerke AG, Marburg, Deutschland)-behandelten Schaferythrozyten (Bundesanstalt für Tierseuchenbekämpfung, Mödling, A)

(3) Depletion durch Ausnützung der Adhärenzeigenschaften von Monozyten/Makrophagen, Verwerfen oder anderweitige Verwendung der nicht adhärenten Fraktion

3.2.2.1 Immunomagnetische direkte Depletion der Lymphozyten

1. Dynabeads M-450 Pan B (CD19) und Dynabeads M-450 Pan T (CD2) wurden in einem Verhältnis von 1 : 1 : 1 verwendet, das entspricht einem Verhältnis von je einem CD19- und CD2 -bead pro Leukozyt.
2. Vermischung der PBMCs mit den Dynabeads. (150 x 10^6 Zellen in 3 ml pro 15 ml Röhrchen)
3. 20 Minuten Inkubationszeit im "Dynal sample mixer" bei 4°C.
4. Durch Verwendung eines Magneten können die Dynabeads mit den an sie gebundenen B- und T-Zellen und NK-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 und NK-Zellen weiter zu verringern.

3.2.2.2 Immunomagnetische indirekte Depletion der Lymphozyten

1. PBMCs wurden 20 Minuten in einer 10% autologen Plasmalösung oder in einer 1% PBS-BSA-Lösung auf Eis inkubiert, um spätere unspezifische Bindungen zu verhindern.
2. 3-maliges Waschen mit PBS-EDTA
3. Monoklonale Antikörper gegen CD20, CD2 und CD3 wurden mit den PBMCs 30 Minuten auf Eis inkubiert.
4. 3-maliges Waschen mit PBS-EDTA um nicht-gebundene Antikörper zu entfernen.
5. Dynabeads M-450 Schaf-Anti-Maus IgG wurden im Verhältnis Beads : Leukozyten von 1 : 4 verwendet. Diese sekundären Antikörper binden an die Primärantikörper an der Oberfläche der T-, B- und NK-Zellen und machen sie dadurch zur immunomagnetischen Isolation bereit.
6. Weitere Prozedur siehe direkte Depletion Schritte 3 – 5.

3.2.2.3 Entfernen der T-Zellen und der NK-Zellen durch Rosettieren mit Neuraminidase behandelten Schaferythrozyten

1. Inkubation einer 5% Schaferythrozytenlösung (in RPMI) mit Neuraminidase (0,01 U/ml), 1h, 37°C im Wasserbad
2. Gewinnung der PBMCs über Lymphoprep
3. Inkubation der PBMCs mit Neuraminidase-behandelten Schaferythrozyten 1h auf Eis
4. Trennung der T-Zellrosetten und NK-Zellrosetten von Monozyten/Makrophagen und B-Zellen mit Hilfe von Lymphoprep
5. Monozyten/Makrophagen und B-Zellen wurden in 6-well-Platten (Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA) zu 2 x 10^6/well in 3ml Kulturmedium und Zytokine kultiviert (siehe Kapitel 3.2.3.1).

3.2.2.4 Depletion der Lymphozyten aufgrund ihrer Unfähigkeit zu adhärieren (Adhärenzmethode)

Die Vorteile der Adhärenzmethode sind eine einfache, schnelle Vorgansweise Die Zellen werden nicht durch „highly sophisticated methods" strapaziert und die Kostenersparnis im Vergleich zu anderen Methoden ist zu bedenken. Außerdem ist es ein oft wichtiger Faktor, vom gleichen Spender/Patienten MCM und reife dendritische Zellen zu gewinnen, obwohl man nur geringe Blutmengen zur Verfügung hat. Diese Vorgangsweise ist schematisch in Abb.4 dargestellt.

1. Herstellung von MCM. Siehe Kapitel 3.2.1.1.
2. Nach Abnahme des MCMs 2x-iges waschen der Petri-Schalen mit warmen PBS.
3. Auf die Petri-Schale mit dem Monolayer aus Monozyten/Makrophagen wurden 10 ml R10 oder autologes Medium mit 1000 U/ml IL-4 und 800 U/ml GM-CSF zugegeben (Tag 0). Am Tag 2 wurden 5 ml R10/IL-4/GM-CSF oder 5ml autologes Medium/ IL-4/GM-CSF ergänzt. Durch die Zytokinzugabe kommt es zur Ablösung der adhärenten Zellen.
4. Zwischen Tag 4 – 6 wurden die Zellsuspensionen abgenommen und abzentrifugiert (269 g, 4°C, 8 Minuten). Die Zellen wurden zu 1 x 10^6 in 6-well-Platten in Kulturmedium mit Zytokinen in der Regel 2 Tage weiterkultiviert.

3.2.3 Kultur der lymphozyten-freien PBMCs

3.2.3.1 Vorbereitungskultur oder "priming culture"

Lymphozyten-depletierte PBMCs wurden in 6-well-Platten (Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA) zu 2 x 10^6/well in 3ml Kulturmedium kultiviert. GM-CSF und IL-4 wurden in einer Endkonzentration von 800 U/ml und 1000 U/ml zugegeben. Die Kulturen wurden jeden zweiten Tag (Tag 2, 4, und 6) gefüttert, indem 1ml verbrauchtes Medium abgenommen und 1,5 ml neues Kulturmedium mit 1600 U/ml GM-CSF und 1000 U/ml IL-4 zugesetzt wurde. Am Tag 7 wurden nicht adhärente Zellen entweder geerntet und analysiert oder in Gegenwart oder Abwesenheit von Reifungsstimulantien weiterkultiviert.

3.2.3.2 Reifungskultur oder "differentiation culture"

Am Tag 7 wurden entweder 1,5 ml MCM mit 1000 U/ml IL-4 und 1600 U/ml GM-CSF oder 1,5 ml Kulturmedium mit 1000 U/ml IL-4 und 1600 U/ml GM-CSF und andere Reifungsstimulantien (z. B. TNF-α) zugesetzt. Am Tag 10 oder 11 wurden die Zellen gesammelt, gezählt und phänotypisch, morphologisch und funktionell analysiert.

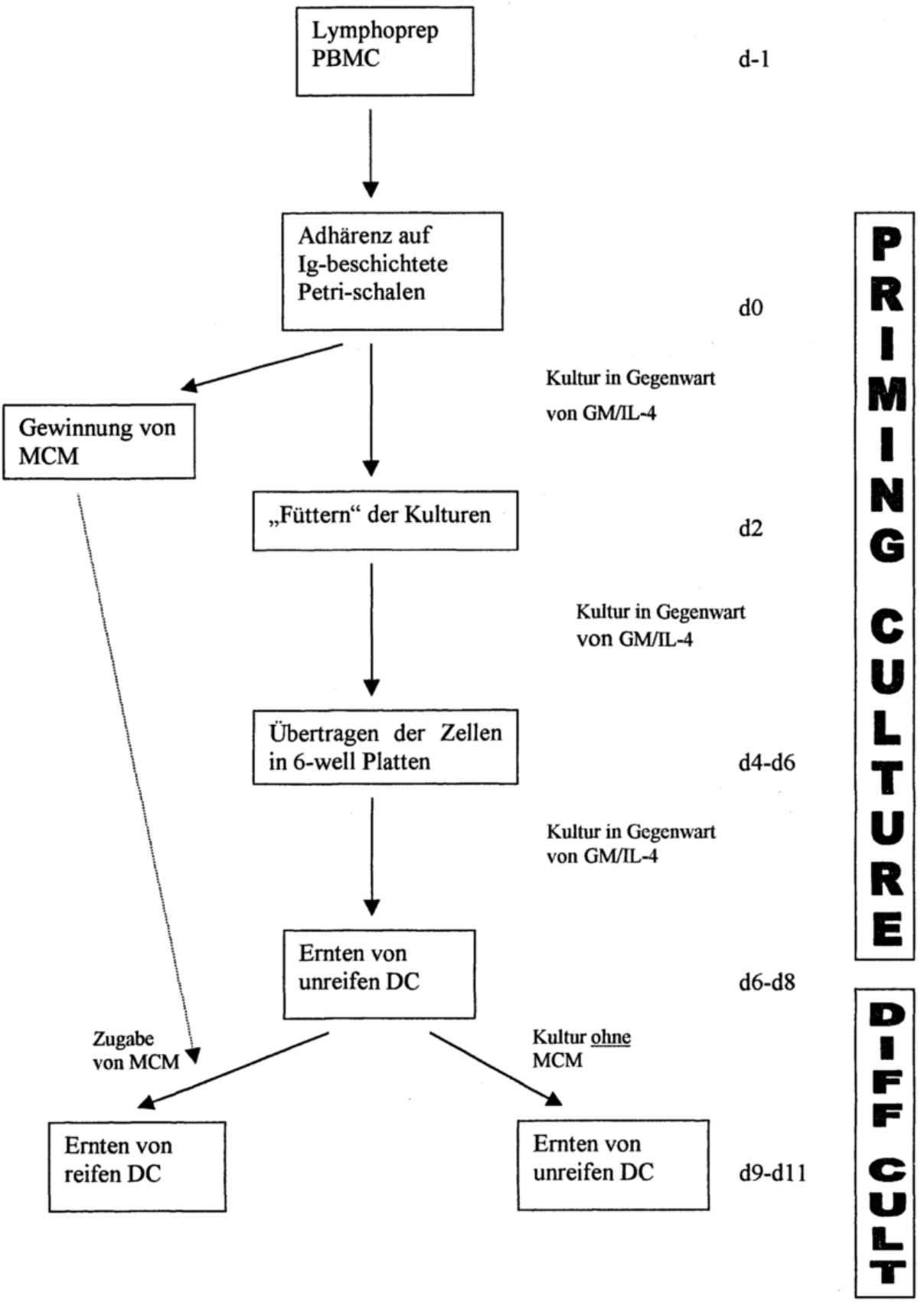

Abb.4: Flow-Diagramm der Adhärenzmethode. (Diff cult = Differentation culture, Reifungskultur)

3.2.4 Immunfluoreszenzfärbungen und Immunhistochemie

In Tabelle 4 sind die primären Antikörper, die für Flowzytometrie und Immunhistochemie verwendet wurden, aufgelistet. Als sekundäre Antikörper wurde bei der Dreistufenfärbung biotinyliertes Anti-Maus (Amersham, species-specific whole antibody, Codenr. 1001) oder Anti-Ratte Ig (Amersham, species-specific whole antibody, Codenr. 1002), gefolgt von FITC- oder PE- konjugiertem Streptavidin (Amersham International, Amersham, UK) verwendet. Bei der Zweistufenfärbung wurden als sekundäres Reagenz FITC- oder PE-konjugiertes Anti-Maus-Immunglobulin (Code No. F0313, DAKO, Roskilde, DK,) oder FITC-konjugiertes polyklonales Anti-Ratte-Immunglobulin (Catnr. 12114D, Pharmingen, San Diego, CA) verwendet. Diese Zellen wurden in der Regel unfixiert, unmittelbar nach der Färbeprozedur analysiert. Tote Zellen wurden aufgrund ihrer Eigenschaft mit Propidiumiodid im roten Fluoreszenzbereich sichtbar zu werden, ausselektioniert. Die FACS-Analysen wurden auf einem FACSscan-Gerät (Becton Dickinson, Mountain View, CA) durchgeführt. Zytozentrifugenpräparate wurden mit einer „Zytospin 2" Zentrifuge (Shandon, Pittsburgh, PA) gemacht. Die Präparate wurden für 5 Minuten mit Azeton bei Raumtemperatur fixiert und für 30 Minuten mit dem primären Antikörper inkubiert. Als sekundäre Reagenzien wurden biotinyliertes Schaf-Anti-Maus Ig (1:200; Amersham) und Texas Red-konjugiertes Streptavidin (1:50; Amersham) verwendet. Bei einer Doppelfärbung erfolgte als nächster Schritt eine Blockierung mit 100 µg/ml Maus-Gammaglobulin, um dann mit FITC-konjugiertem Anti-HLA-DR (Becton Dickinson) gegenzufärben. Die Objektträger wurden mit „Vectashield" (Vector Laboratories, Burlingame, CA) eingedeckt.

3.2.5 Allogene gemischte Leukozytenreaktion

Die dendritischen Zellen wurden mit 30 Gy von einer Cs-Quelle bestrahlt, um jegliche Proliferation der stimulierenden Zellen auszuschließen. Als Responders (antwortende Zellen) wurden allogene T-Zellen oder Nabelschnur-T-Zellen verwendet. Die aus dem Nabelschnurblut gewonnenen T-Zellen wurden verwendet, um eine reine primäre Immunantwort zu induzieren. Hierbei geht man davon aus, daß es sich bei diesen Zellen um naive, noch nie mit Antigen in Kontakt getretenen T-Lymphozyten handelt (Sallusto et al., 1994). T-Zellpopulationen aus dem peripheren Blut bestehen immer aus einem Gemisch von naiven und Memory-T-Zellen. Tripletts von dendritische Zellen und 150000 - 200000 allogene T-Zellen wurden in 96-well-Flachbodenmikrotiterplatten (Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA) inkubiert Die Proliferation der T-Zellen wurde von Tag 6 auf Tag 7 mit der Zugabe von 4 µCi-148 KBq/ml von [^{3}H]TdR (spezifische Aktivität 247,9 GBq/mmol = 6,7 Ci/mmol, New England Nuclear, Boston, MA) in Triplikaten bestimmt. Die Zellen wurden 12 – 16 h im Brutschrank inkubiert und anschließend geerntet (Romani, et al., 1989) und die inkorporierte Radioaktivität im Flüssig-Szintillationszähler gemessen.

3.2.6 Gewinnung von T-Zellen aus peripherem Blut und Nabelschnurblut

(1) Nabelschnurblut

1. Für die Nabelschnur-T-Zellen wurden Petri-Schalen (Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA) mit 50 µg/ml Goat-Anti-Mause Gammaglobulin (Jackson, Immuno Research Lab., West Grove, PA) inkubiert und 1 h bei RT inkubiert.
2. Die Schalen wurden 3 mal mit PBS gewaschen. Sie wurden meist frisch verwendet, sind allerdings einen Tag auf 4°C haltbar.
3. Die PBMC´s aus dem Nabelschnurblut wurden mittels Lymphoprep gewonnen (siehe Kapitel 3.2.2 und Kapitel 3.2.2.3) und mit einem Antikörpercocktail (MHC II, VIE – G4, CD19) 30 min auf Eis inkubiert.
4. 40 x 10^6 der im Antikörpercocktail inkubierten PBMCs, mit 10ml Medium auf die beschichteten Petri-Schalen geben, 30 min bei RT inkubieren.
5. Die nicht adhärenten Zellen (= T-Zellen) wurden gesammelt, abzentrifugiert (269g, 8 min., 4°C), gezählt und im Assay verwendet oder bei –80 °C in Einfriermedium (90% FCS und 10% Dimethylsulfoxid (Merk, Darmstadt, D)) aufbewahrt.

(2) T-Zellen aus peripherem Blut

1. Vorgangsweise wie in Kapitel 3.2.2.3, Punkte 1 bis 5
2. Die rosettierten T-Zellen im Pellet im Original Lymphoprep Röhrchen mit 25 ml RPMI resuspendieren und dann 25 ml 1,66% Ammoniumchlorid (Merck, Darmstadt, D) in PBS bei RT zugeben. In der Hand die Suspension mischen bis sie klar wird, d.h. bis die Erythrozyten lysiert sind.
3. Bei 200 g abzentrifugieren; dann nochmals 2x mit RPMI bei 460 g waschen
4. T-Zellen zählen, und bei –80 °C oder im flüssigem Stickstoff in Einfriermedium (90% FCS und 10% DMSO (Merck, Darmstadt, D)) aufbewahren

3.2.7 Stabilitätstest

Bei diesem Assay wurde die Stabilität der reifen dendritischen Zellen in Morphologie, Phänotyp und Funktion untersucht.

Die DCs wurden 3-mal gewaschen und 2,5 x 10^5/well in einer 12-well-Platte (Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA) im Kulturmedium *ohne* Zytokine ausgesät. Nach 48 Stunden wurde morphologisch (Phasenkontrastmikroskopie), phänotypisch (Durchflußzytometrie) und funktionell (T-Zellstimulationsassay) überprüft, ob die dendritischen Zellen noch ihren Habitus als reife DC behielten oder ob sie zu adhärenten Vorläuferzellen revertierten (Romani, 1996).

3.2.8 ELISA für TNFα, IL-1β und IL-12

Bei den ELISAs zum Nachweis von TNF-α (CLB, Amsterdam, Niederlande) und IL-1β (Medgenix, Fleurus, Belgien) handelte es sich um kommerzielle Kits. Sie wurden freundlicherweise vom Zentrallabor für innere Medizin (Dr. Manfred Herold) gemacht. Beim ELISA zum Nachweis von IL-12 (p75 Heterodimer-spezifisch) handelte es sich um einen Sandwichelisa (Krösbacher, in Vorb.), der freundlicherweise von Beate Krösbacher gemacht wurde. Die Reagenzien erhielten wir von Dr. D. Presky, Hoffman-La-Roche, Nutley, NJ (Wilkinson et al., 1996; Gately et al., 1995).

3.2.9 Nachweis von Nitrit

Der Nitritnachweis erfolgte, indem 50 µl Kulturüberstand und 100 µl Griess – Ilosvays Reagenz für Nitritbestimmung (Merck, Darmstadt, D) in eine 96-well-Flachbodenmikrotiterplatten pipettiert wurden. Es folgte 5 –10 min Inkubation bei RT und anschließend eine photometrische Messung bei 550 nm. Die µM Nitrit wurden anhand einer Standardgeraden/kurve errechnet.