

3. Material und Methoden

3.1. MATERIAL

3.1.1. Geräte

- FACS-Analyser : Becton Dickinson™ FACScan®
- ÄKTA™ prime with HiTrap™ amersham pharmacia biotec

3.1.2. Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Puffer

Tabelle 1: Chemikalien, Verbrauchsmaterialien

Amersham	ECL™ Western Blotting Detection Reagents
Adefo, Nürnberg	Zahnfilm Entwickler Konzentrat Fixierer Konzentrat
Merck, Darmstadt	β-Mercaptoethanol
MILLIPORE	Immobilon™ Transfer Membranes
PAA Laboratories GmbH, Österreich	Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline (PBS) RPMI 1640
PerkinElmer	DELFLIA® Enhancement Solution
Riedel-de Haën®	Ethanol
SIGMA	KODAK BioMax XAILMR F

PBS 5-fach: 1,14 g di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat (Merck, Darmstadt)

0,34 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (Merck, Darmstadt)

8,78 g NaCl (Natriumchlorid, Apotheke Universität des Saarlandes)

PBS-Tween: 200 ml 5-fach PBS

500 ml H₂O

500 µl Tween

Coomassie: 1 g Coomassie (SERVA blue R tablets)

450 ml Methanol

450 ml H₂O

100 ml Essigsäure (Merck, Darmstadt)

Coomassie-Entfärber: 300 ml Ethanol

100 ml Essigsäure

600 ml H₂O

Puffer :

- LAEMMLI 10-fach: 144 g Glycin (Merck, Darmstadt)
30,34 g TRIS-base (Trishydroxymethylaminomethan; Roth)
10 g SDS (Dodezylsulfat Natriumsalz; Merck, Darmstadt)
ad 1 L H₂O
- TRANSFER-PUFFER Western Blot 10-fach: 3 g TRIS-base
14,4g Glycin
- LADEPUFFER Gelelektrophorese (reduzierend): ROTH Roti® Load 1 (5-fach)
- Stock-Lösung für Puffer der IgM-Purification (1M):

89 g di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat
69 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat
500 ml H₂O
Ph= 7,5
- Binding buffer (A1): 20 ml Stock-Lösung
250 ml Ammoniumsulfat (Merck, Darmstadt)
730 ml H₂O
- Elution buffer 1: 10 ml Stock-Lösung

490 ml H₂O

- Elution buffer 2: 10 ml Stock-Lösung
150 ml Isopropanol (HEDINGER)
340 ml H₂O

3.1.3. Zellen

Die CHO-Zelllinie wurde in einem Inkubator in wasserdampfgesättigter Atmosphäre unter 5% iger CO₂-Begasung bei 37° C gehalten. Als Nährmedium diente RPMI 1640 mit einem Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (FCS, Gibco, Karlsruhe). Diesem wurden Glutamin (2 Mm; Gibco, Karlsruhe), HT-SUPPLEMENT (10 ml; Gibco, Karlsruhe), Puromycin (10 µg/ml) hinzugefügt. Der Austausch des Nährmediums erfolgte in Abhängigkeit von Wachstumsverhalten der Zellen. Je nach Bedarf und Zellzahl erfolgte die Kultivierung in 260 ml- oder in zellspintauglichen (Tecnamara, Fernwald) 800 ml Kulturflaschen (Nunc, Wiesbaden).

3.2. Methoden

3.2.1. Midi-Plasmid-Prep (Quiagen)

Zunächst wurden 3 ml LB-Medium mit einer Bakterienkultur angeimpft, in der das gewünschte Plasmid enthalten ist. Das Medium wurde dann 8 Stunden bei 37°C unter starkem Schütteln inkubiert. Dem LB-Medium wird vorher ein entsprechendes Antibiotikum zugesetzt. Die Lösung wurde dann bei 4°C für 20 min zentrifugiert (4000 rpm). Die Resuspension des Bakterienpellets erfolgte dann in 4 ml Puffer P1. Das Pellet wurde anschliessend mit 4 ml Puffer P2 vorsichtig gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden weitere 4 ml P3 Puffer zugegeben, heftig geschüttelt und die Lösung für 15 min auf Eis gestellt. Um das Plasmid erstmals von Zellbestandteilen zu trennen, wurde die Lösung zentrifugiert (4000 rpm bei 4°C für 30 min) und wieder auf Eis gestellt. Um die Plasmid-DNA nun zu isolieren, wurde die Probe durch einen Papierfilter über eine vom

Hersteller mitgelieferte Säule laufen gelassen. Diese wurde vorher mit 4 ml QBT-Puffer vorbereitet. Die Plasmid-DNA war nun in einer Glasfiebermatrix in der Säule gebunden. Jetzt erfolgte zweimaliges Waschen mit QC-Puffer, dann wurde die Säule auf ein neues Röhrchen gestellt und unter Zugabe von 5 ml QF-Puffer die DNA aus der Säule eluiert. Auf diese gewonnene DNA-Probe wurden 3,5 ml Isopropanol gegeben, die Probe anschließend zentrifugiert (13000 rpm, 4°C, 30 min), dieses Pellet wieder gewaschen mit 2 ml 70%igem Ethanol, zentrifugiert (13000 rpm, 4°C, 5 min), das gewaschene Plasmid-Pellet in 100 µl H₂O resuspendiert.

Die Konzentration der DNA ließ sich nun mittels photometrischer Messung bestimmen. Alle Schritte wurden nach Angaben und mit den Puffern des Herstellers durchgeführt.

3.2.2. Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion wurde erstmals von Saiki beschrieben (Saiki et al., 1985). PCR-Untersuchungen wurden nach bekannten Standardprotokollen durchgeführt. Eine Etablierung der jeweiligen Reaktion erfolgte dabei durch Variieren von Zyklenzahl und Annealingtemperatur. Der Prototyp des Ablaufes der PCR-Reaktion war dabei wie folgt:

1. 95 °C/2 min (Denaturierung)
2. 94 °C/1 min (Denaturierung)
3. 55-70 °C/1 min (Annealing; Temperatur abhängig vom GC-Gehalt der Primer)
4. 72 °C/1 min (Elongation)
5. zurück zu Schritt 2 und Wiederholung des Ablaufes für 30-40 Zyklen
6. Schritt: 8 min bei 72 °C (Finale Elongation)
7. 4°C/∞

3.2.3. Sequenzierung

3.2.3.1. Sequenzreaktion

Die Sequenzierung der klonierten Sequenzen erfolgte nach der Didesoxynukleotidmethode, die erstmals von Sanger (Sanger et al., 1977) beschrieben wurde. Alle Sequenzreaktionen wurden mit dem Sequitherm Excel Long-Read LC-Kit nach Herstellerangaben vorgenommen: Zur Durchführung der Sequenzreaktion wurden zunächst 2 µl der vier verschiedenen ddNTPs (G, A, T, C) auf Reaktionsgefäße verteilt. Ein Mastermix aus 1 µg Template, 2 pmol Primer, 5 µl 5xPuffer BA, 2.5 µl 10xPuffer BB und 1 µl Polymerase wurde mit bidestilliertem Wasser auf 17 µl aufgefüllt. Jeweils 4 µl dieses Mixes wurden zu den verschiedenen Stopnukleotiden gegeben, mit einem Tropfen Paraffin überschichtet und in einem Thermocycler folgende Sequenzreaktion durchgeführt:

1. 94 °C/2 min (Denaturierung)
2. 94 °C/1 min (Denaturierung)
3. 55-70 °C/1 min (Annealing; Temperatur abhängig von GC-Gehalt des Primers)
4. 70 °C/1 min (Elongation)
5. Schleife von 4 an 2; 30 Zyklen
6. 4 °C/∞

Jede Reaktion wurde mit 3 µl Stoppuffer gestoppt und das Reaktionsgemisch nach einer erneuten Denaturierung (70°C/5 min) auf ein Elektrophoresegel aufgetragen.

Zur Herstellung des hochauflösenden Polyacrylamidgels wurde der Sequagel-XR-Kit entsprechend den Angaben des Herstellers für ein 0,25 mm dickes Gel verwendet und mit jeweils 1 µl der verschiedenen Reaktionsansätze beladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 1500 V/50 W in TBE-Laufpuffer über 8-10 Stunden in einem automatischen Sequenzierapparat (LICOR DNA 4000L). Die Auswertung des Polyacrylamidgels wurde unter Verwendung der LICOR-Software durchgeführt.

3.2.3.2. Bearbeitung der Sequenzen

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Softwareprogramm DNASIS (Pharmacia Biotechnologie) bearbeitet. Der Sequenzabgleich erfolgte über BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) an den Sequenzdatenbanken des NCBI (National Center for Biotechnology Information; Bethesda; USA).

3.2.4. Transiente Proteinexpression mit HEK 293-EBNA-Zellen

Das transiente Expressionssystem ermöglicht eine schnelle Herstellung kleiner Mengen an rekombinantem Protein. Dabei wird zur Transfektion eine optimierte Calciumphosphat-Präzipitationsmethode verwendet (Chen and Okayama, 1987; Wigler et al. 1977; Meissner et al., 2001).

Für das optimierte Expressionssystem müssen der pEAK-8-Vektor HEK293 von EBNA-Zellen verwendet werden, da die Expression von EBNA1 (Invitrogen) zur intrazellulären Replikation von oriP-basierenden Plasmiden führt (Yates et al., 1985). Die Suspensionszelllinie wächst unter serumfreien Bedingungen in Rührflaschen („spinner flasks“) mit dem speziellen Medium EX-CELL VPro (SAFC Biosciences) und 6 mM L-Glutamin.

Zur transienten Transfektion wird ein Mediumwechsel auf DMEM/F12 Medium (Life Technologies) durchgeführt, welches ergänzt wird mit 29 mM Natriumbikarbonat, 10mM HEPES, 2,5 mg/l humanes Transferrin, 2,5 mg/l Insulin, 0,1 mM Diethanolamin, 0,1 mM L-Prolin und 1% FCS. Der Transfektionsansatz besteht pro Milliliter Medium aus 2,5 µg DNA, 50 µl 250 mM CaCl₂ und 50 µl HEPES-Phosphat-Puffer (1,4 mM Phosphat in 50 mM HEPES und 280 mM NaCl), sowie 5x10⁵ Zellen, und kann beliebig nach Bedarf, Flaschengröße oder verfügbarer DNA-Menge dimensioniert werden. Zu Kontrolle der Transfektionseffizienz wird EGFP-Plasmid (ca. 2,5% der Gesamt-DNA-Menge) kotransfiziert. Die DNA wird im entsprechenden Volumen der CaCl₂-Lösung aufgenommen. Anschließend wird das gleiche Volumen HEPES-Phosphat-Puffer hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von exakt 1 Minute bei Raumtemperatur wird der Mix schnell zur Zellsuspension gegeben. Das Einhalten der Minute ist ein wichtiger Faktor für die Größe der sich bildenden DNA-Calciumphosphatpräzipitate. Etwa 12-16 Stunden später wurde ein kompletter Mediumwechsel vorgenommen. Die Zellaggregate wurden vorsichtig bei 400

Umdrehungen/Minute zentrifugiert und erneut im selben Volumen EX-CELL VPro Medium aufgenommen, um eine Antikörperexpression unter serumfreien Bedingungen zu ermöglichen. Ausserdem wurde durch diesen Mediumwechsel das Auflösen der Präzipitate erleichtert, da diese sonst bei zu langer Verweilzeit im Ansatz zu Zellschäden führen. Nach einer entsprechenden Expressionszeit (abhängig vom exprimierten Protein 4-10 Tage) kann der Überstand mit enthaltenem Protein (IgM-Penta- bzw. Hexamer) gewonnen werden.

3.2.5. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

(Laemmli, 1970; Maniatis et al. 1989)

Die SDS-Gelelektrophorese dient der Analyse von Proteinmischungen und ermöglicht schnelle Molekulargewicht-Bestimmungen. Nach der Calciumphosphattransfektion wurde die Proteinproduktion mittels Gelelektrophorese überprüft.

Die Beweglichkeit eines Proteins im Acrylamidgel ist abhängig von seiner Gesamtladung, sowie seiner Grösse. Proteine können sich daher trotz unterschiedlicher Molekülgrösse mit derselben Geschwindigkeit im elektrischen Feld bewegen, wenn ihre Grössenunterschiede durch die Ladungen wieder ausgeglichen werden. Bei der SDS-Gelelektrophorese werden die Proteine in Gegenwart eines Überschusses an SDS elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine binden das negativ geladene SDS, es entstehen negativ geladene SDS-Protein-Komplexe, die im elektrischen Feld zur Anode wandern. Gleichzeitig werden die Proteine durch SDS denaturiert und die Protein-Protein-Wechselwirkungen (Quartärstruktur) unterbunden. Die Aufspaltung in Proteinuntereinheiten erfolgt zum Teil schon vor dem Gellauf durch β -Mercaptoethanol, welches die Disulfidbrücken reduziert. Eine poröse Polyacrylamidmatrix trennt die Proteine nach ihrem Molekulargewicht auf. Je nach Eigenschaften der Proteine gibt es unterschiedliche Zusammensetzungen der einzelnen Gele. Zur Darstellung eines IgM-Monomers mit einem Molekulargewicht von ca. 160 kDa eignen sich am besten 10% Gele, die zur Trennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 30-120 kD dienen, da sich dann die schwere Kette bei ca. 65 kDa und die leichte Kette bei ca. 22 kDa zeigt.

Die Gelelektrophorese wurde diskontinuierlich durchgeführt, d.h. dass die Proteine durch zwei Gele unterschiedlicher Porösität und mit unterschiedlichem pH-Wert des verwendeten Puffers wandern.

Zusammensetzung der Gele:

- TRENNGEL 10%: 2,0 ml H₂O
1,7 ml 30% Acrylamid
1,3ml TRIS-Puffer (Ph= 8,8)
0,05 ml 10% SDS
0,05 ml 10% APS
0,002 ml TEMED

- SAMMELGEL : 0,68 ml H₂O
0,17 ml 30 % Acrylamid
0,13 ml TRIS-Puffer (Ph=6,8)
0,01 ml 10% SDS
0,01 ml 10% APS
0,001 ml TEMED

Das Trenngel wurde zwischen zwei mit 70% Ethanol gereinigte Glasplatten (BIO-RAD 10,1x 7,3 cm² und 10,1x 8,2 cm²) eingegossen, eingespannt in einem Giessrahmen, an dessen Boden sich eine Schaumstoffdichtung befindet. Das Gel wurde bis ca. 2 cm unter den Rand gegossen und dann mit H₂O überschichtet, damit sich keine Blasen im Gel bilden konnten. Nach ungefähr einer halben Stunde war das Gel polymerisiert. Das Wasser wurde abgeschüttet und das Sammelgel darauf gegossen. In das Sammelgel wurde ein Kamm eingesetzt, wodurch Taschen entstanden sind. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm wieder entfernt und das Gel zwischen den Glasplatten senkrecht in die Elektrophoresekammer (BIO-RAD Mini-PROTEAN® 3 Elektrophoresis Cell) eingesetzt, in die Kammer wurde dann der Laufpuffer (LAEMMLI-Puffer) gegeben. Zu den Proteinproben wurde vorher reduzierender Ladepuffer gegeben, zu 20 µl Probe 5 µl 5-fach Puffer. Um die Proteine vollständig zu denaturieren, wurden die Proben nun 5 min bei 95°C erhitzt. Die Proteinproben wurden schließlich mit einer Pipette in die Geltaschen gefüllt. Die Proben liefen bei 20 mA in das grobporige Sammelgel ein, in dem sie konzentriert wurden, dann in das feinporige Trenngel gegeben, in dem die Auftrennung erfolgt. Die elektrophoretische Auftrennung dauerte ca. 2-3 Stunden. Als mitlaufendes Markerprotein wurde der Marker BenchMark™ Prestained Protein Ladder (invitrogen™) verwendet. Dieser Marker besitzt eine farbige Bande bei 65,8 kDa.

Die Membran wurde nun entweder über Western Blot entwickelt oder die Banden in Coomassie unspezifisch angefärbt.

3.2.6. Western Blot

(Towbin et al., Burnette 1981)

Bei dieser Methode wurden die in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Membran übertragen. Die Membran bindet die Proteine über hydrophobe Wechselwirkungen (Nitrocellulose), wodurch die Proteine auf der Membran zwar immobilisiert sind, jedoch ihre funktionelle Aktivität erhalten bleibt, so dass sie durch spezifische Antikörper immunologisch identifiziert werden können.

Nach der Gelelektrophorese wurde das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel luftblasenfrei auf eine in Blot-Puffer getränkte Nitrozellulosemembran (MILLIPORE) gelegt. Bedeckt wurden diese dann von beiden Seiten mit je drei Whatman 3MM Chromatographie Filtern (WHATMAN INTERNATIONAL LTD., MAIDSTONE, ENGLAND), die davor zuerst in Methanol und dann in Blot-Puffer getränkt wurden und dann in eine Blotkammer (Trans-Blot SD® Semi-Dry Transfer Cell, BIO-RAD, München) gelegt wurden. Der elektrische Transfer erfolgte für 45 min bei 21 V.

Die Membran wurde dann über Nacht in 1% Magermilch/PBS (5g Magermilch gelöst in 50 ml PBS) bei 4°C inkubiert.

Die Membran wurde dann gewaschen, zweimal 5 min mit PBS-T, einmal 5 min mit PBS. Anschliessend folgte die Entwicklung über verschiedene Sekundärantikörper. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte mit PBS.

Tabelle 2: Antikörper zur Darstellung von IgM und IgG im Western Blot

Antikörper	Verdünnung	Inkubationszeit	Hersteller
Goat-anti-human IgM (μ -chain specific) FITC Conjugate	1:1000	60 min	SIGMA, St.Louis, USA
Biotin-SP-conjugated Mouse-anti-goat IgG (H+L)	AffiniPure 1:1000	45 min	Jackson Immuno Research West Grove,

				PA, USA
Anti-mouse IgG (H+L)-HRP (=horseradish peroxidase) Conjugate	1:3000	45 min		BIO-RAD, München
Biotin-SP-conjugated AffiniPure Mouse-anti-human IgG Fcy-Fragment specific	1:1000	45 min		Jackson Immuno Research West Grove, PA, USA

Zwischen den einzelnen Färbeschritten wurde die Membran wieder gewaschen 2x 5 min mit PBS-T, 1x 5 min mit PBS.

In der Dunkelkammer wurde auf die Membran 2 ml Entwickler (ECL Kit, 1 ml Detection Reagent 1+ 1 ml Detection Reagent 2) gegeben, 1 min inkubiert. Der erste Film wurde 3 min in der Kassette entwickelt, dann 3-5 min in Entwickler gelegt, danach fixiert, der zweite Film 10 min entwickelt.

3.2.7. IgM-Purification (amersham pharmacia biotech)

Die Aufreinigung der Antikörper erfolgte mit Hilfe der ÄKTA™ prime with HiTrap™ (amersham) und nach Anleitung des Herstellers. Alle Puffer und die Antikörperprobe wurden Vakuum filtriert durch einen 0,45 µm Filter (MILLIPORE, Filtering Flasks and filter holders).

Die Maschine wurde nach dem Einschalten und Selbsttest erst mit H₂O und dann mit 20% Ethanol (entgast) gespült. Schlauch 8 der Maschine wurde mit 10 ml Binding Puffer gespült, anschliessend in die 50 ml der zu aufreinigenden Antikörperprobe (bestehend aus 12,5 ml Ammoniumsulfat, 1 ml Stock-Lösung, 36,5 ml Überstand des über Calciumphosphattransfection produzierten IgM) gestellt. Der Schlauch wurde dann mit 10 ml Probe gespült. Dann wurde an der Maschine das Programm IgM Purification eingestellt, das Volumen 50 ml eingegeben und das Programm gestartet. Dieses Programm ist in der Maschine gespeichert und enthält ein Anwendungsschema zur Aufreinigung von monoklonalen IgM-Antikörpern, welches im Folgenden beschrieben ist. Die Maschine spülte das System mit 35 ml Binding Puffer, equilibrierte mit 10 ml Binding Puffer, dann lief die Probe über eine Säule vom Hersteller mitgelieferte IgM-Säule (HiTrap IgM Purification HP, 1

ml), in der die Antikörper über ein thiophiles Absorptionsmedium mit 2-mercaptopyridin verbunden mit Sepharose™ High Performance gebunden wurden (Porath, 1988). Die Proteine binden in der Säule über hydrophile-hydrophobe Interaktionen an einer Agarosematrix. Es wurden noch mal mit 10 ml Binding Buffer gewaschen, danach wurden 35 ml Elution Buffer 1 eingewaschen, und es erfolgte die erste Elution der Antikörper in 10 Eppendorffgefäße zu je 1 ml. Die zweite Elution erfolgte nach gleichem Schema nur mit Elution Buffer 2. Der Schlauch wurde dann noch mal mit 15 ml Binding Buffer gespült und die Säule reäquilibriert mit 5 ml Binding Buffer. Ein Schreiber zeichnete den Vorgang auf, und man kann anhand der Elutionspeaks abschätzen, ob eine ausreichende Menge Antikörper aufgereinigt wurde.

3.2.8. Zytotoxizitäts-Assay

Diese Methode wurde durchgeführt mit Hilfe von CHO-Zellen, die das CD33 Antigen auf der Zelloberfläche stabil exprimieren. Diese Zelllinie wurde im onkologischen Labor generiert und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Ziel des Zytotoxizitäts-Assay ist es, einen CD33 Antigen-Antikörper-Komplex zu bilden, der durch Aktivierung des Komplementsystems eine Zellyse auslöst.

Nach zweimaligem Waschen der CHO-Zellen (zentrifugieren bei 1500 rpm, 5 min, RT) wurden die Zellen dann mit 0,5ml 2Mm Europiumchlorid gelabelt. Die Elektroporation fand in einer Küvette (EQUIBIO) bei 600 V, 100µF, 1ms statt. Anschließend wurden die Zellen vier Mal mit kaltem RPMI-Medium gewaschen, in Medium aufgenommen und für 15 min bei 37°C gelagert. Nach einem weiteren Waschvorgang wurden die 50 µl der Zellsuspension unter einem Mikroskop in einer Neubauerkammer gezählt und mit Hilfe von RPMI-Medium auf 1×10^5 Zellen/ml eingestellt. Von freiwilligen gesunden Probanden wurde Blut abgenommen, 1mM CaCl₂ dazugegeben, dieses zentrifugiert (3000 rpm, 10 min, RT) und das Serum mit dem darin enthaltenen Komplementsystem abpipettiert.

Jeder Messwert wurde in einer 96-well-Platte dreifach bestimmt. Dazu wurden 100µl der Antikörperlösung mit einer Konzentration von 150µg/ml (mit Hilfe von RPMI-Medium verdünnt) als Startkonzentration benutzt und in einer Verdünnungsreihe dann die Konzentration jeweils halbiert. Ebenso wurden 50µl der vorbereiteten Zellsuspension in jede Kammer gegeben, sowie 50 µl des Serums (dieses nicht in die Kammern der Spontan- und Maximallyse). Die Spontanlyse der Zellen wurde ohne Antikörperzugabe, die Maximallyse durch Zugabe von 0,5% Triton-X bestimmt.

Dieser Ansatz wurde 3-4 Stunden bei 37° C gelagert, dann wurden 10 µl Überstand aus jedem well abgenommen und in eine 96well-Nunc-Fluoroplatte (MAXI-Sorp) gegeben und mit je 100µl Enhancerlösung (DELFLIA) vermischt. Wenn eine Lyse der Zellen stattfindet, wird EuCl₃ in den Überstand abgegeben, welches dann mit Hilfe eines automatischen Fluoreszenzreaders (Firma Wallac) über das Europium-Programm messbar ist.

Die prozentuale Lyse wird nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{Lyse} = \frac{\text{Messwert (Mittelwert der drei Werte)} - \text{MIN-Lyse}}{\text{MAX-Lyse} - \text{MIN-Lyse}}$$

3.2.9. Immunfluoreszenz und Durchflusszytometrie (FACScan®)

Die Immunfluoreszenz besitzt gegenüber der Immunzytochemie den Vorteil, dass vitale Zellen getestet werden. Ferner erlaubt sie die Objektivierung und Quantifizierung der Testergebnisse mittels Durchflusszytometrie.

Die Durchführung der Immunfluoreszenztests und ihre durchflusszytometrische Auswertung erfolgte unter leichten Modifikationen nach den Angaben von PARKS et al., 1986. Zur Analyse der im FACScan®- Durchflusszytometer gewonnenen Daten wurde die Software des Herstellers angewendet (Becton Dickinson, Heidelberg).

Die zur Zellmarkierung verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe lassen sich durch einen Argonlaser bei 488 nm anregen. Die spezifischen Emissionssignale werden mittels Photodetektoren und ihnen vorgeschalteten Filtern gemessen, wobei diese nur den für jeden Farbstoff charakteristischen Anteil des Emissionsspektrums passieren lassen. Dieser Bereich liegt bei Phycoerythrin (PE) bei 585 nm. Das aufgefangene Signal erhielt eine über vier Dekaden reichende logarithmische Verstärkung.

Mit PBS gewaschene CD33-Antigen CHO-Zellen werden auf Eppendorfgefäße verteilt, zentrifugiert bei 1200 rpm, 4° C, 5 min. Auf das Pellet werden dann 100µl der Primärantikörper (IgM und IgG) gegeben und auf Eis gestellt. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde erfolgte die Zugabe der Sekundärantikörper (in der Tabelle aufgelistet), zwischen den einzelnen Färbeschritten wurde einmal mit PBS gewaschen. Die Zellmarkierungen wurden in FACScan® -Teströhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg) umgefüllt und durchflusszytometrisch ausgewertet.

Zur Darstellung der CHO-ZELLEN wurden 10µl eines direkt PE-markierten CD 33 LeuTM - M9 (Becton Dickinson, Heidelberg) auf die Zellen gegeben und durchflusszytometrisch ausgewertet.

Tabelle 3: Antikörper zur Darstellung von IgM und IgG im FACS-scan

Antikörper	Verdünnung	Inkubationszeit	Hersteller
Goat-anti-human IgM (µ-chain specific) FITC Conjugate	1:100	60 min	SIGMA, St.Louis, USA
Biotin-SP-conjugated AffiniPure Mouse- anti-goat IgG (H+L)	1:200	45 min	Jackson Immuno Research West Grove, PA, USA
Biotin-SP-conjugated AffiniPure Mouse- anti-human IgG Fcy- Fragment specific	1:100	45 min	Jackson Immuno Research West Grove, PA, USA
AffiniPure Rabbit- anti-human IgM, Fc5µ Fragment Specific	1:100	60 min	Jackson Immuno Research West Grove, PA, USA
Biotin-SP-conjugated AffiniPure Goat-anti- rabbit IgG Fc Fragment specific	1:200	45 min	Jackson Immuno Research West Grove, PA, USA
Biotin-SP-conjugated AffiniPure F(ab') ₂ Fragment specific	1:100	45 min	Jackson Immuno Research West Grove, PA, USA
R-Phycoerythrin (PE)-conjugated Streptavidin	1:200	45 min	Jackson Immuno Research West Grove, PA, USA