Diplomarbeit

Isolierung von Antikörpern gegen Zelloberflächenantigene mit Hilfe des Fluoreszenz-aktivierten-Zell-Sortierers

Klaus L. Meyer

Institut für Genetik der Universität zu Köln 1987

# Inhaltsverzeichnis

Innuity ( CI Z		<b>C</b>
1	Abbirgungen	Seite 5
1	Abkulzungen	5
2	Einleitung	7
2.1	B-Zelldifferenzierung und Oberflächenantigene	7
2.2	Ziel der vorliegenden Arbeit:	9
	Ausarbeiten einer Methode zur Selektion von	
	monoklonalen Antikörpern gegen Zelloberflächen-	
	antigene mit dem FACS 440	
3	Material und Methoden	10
3.1	Tiere	10
3.2	Zellkultur	10
3.2.1	Kulturbedingungen	10
3.2.2	Zellpräparation und Reinigung	10
3.2.3	Erythrozytenlyse	11
3.2.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen	11
3.3	Lymphozytenstimulation	11
3.3.1	LPS-Stimulation	11
3.3.2	ConA-Stimulation	12
3.3.3	DexS-Stimulation	12
3.4	Verwendete monoklonale Antikörper und Seren	12
3.4.1	Monoklonale Antikörper	12
3.4.2	Antiseren	13
3.4.3	Adsorption von Antiseren	13
3.5	Herstellung monoklonaler Antikörper	14
	gegen Maus-Lymphozyten	
3.5.1	Immunisation	14
3.5.2	Zellfusion	15
3.5.2.1	Fusion frisch präparierter Zellen	15
3.5.2.2	Fusion von eingefrorenen Zellen	15
3.5.3	Klonierung	16
3.5.3.1	Verdünnungsklonierung	16
3.5.3.2	Klonierung mit dem FACS 440	16
3.5.4	Testen der Ig-Produktion und Ig-Isotypbestimmung	16
3.5.5	Gewinnung von Kulturüberständen	17
3.6	Herstellung von Konjugaten	17
3.6.1	Biotinylierung	17
3.6.2	Kopplung von Streptavidin an C-Phycocyanin	17
3.6.3	Adsorption von Phycobiliproteinen	17

	an Kunststoffpartikel	
3.7	Identifizierung von anti-Maus-Ig-Antikörpern	18
	mit einem ELISA-Test	
3.8	FACS 440	18
3.8.1	Grundausstattung und Anwendung	18
3.8.2	FACS 440 Modifikationen	19
3.8.2.1	Peltier-Zell-Kühlung	19
3.8.2.2	Einzel-Zell-Ablenkung	19
3.8.2.3	Schnell-Analyse-Halterung	19
3.8.2.4	5Parameter zum Ausschluß toter Zellen	20
3.8.2.5	Eichung der logarithmischen Verstärker	20
3.8.3	Quantifizierung von Oberflächenantigenen	20
3.9	FACS 440 Hybridom-Kulturüberstand-Analyse	21
3.9.1	Verwendete Zellen und Zellinien	21
3.9.2	Aufbau des Testsystems	22
3.9.3	Färbung	23
3.9.4	Empfindlichkeit	24
3.9.5	5-Parameteranalyse	24
3.9.6	Schnell-Analyse	25
3.10	Zytoplasmatische Immunfluoreszenz	26
3.11	Kombinierte Oberflächen- und Zytoplasmafärbung	26
4	Ergebnisse	27
4.1	Verwendung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe	27
4.2	Vergleich der Ein- und Zweipunktanregung	29
4.3	Fehler der Kompensationsschaltung	30
4.4	FACS 440 Modifikationen	32
4.4.1	Peltier-Zell-Kühlung	32
4.4.2	Einzel-Zell-Ablenkung	34
4.4.3	Schnell-Analyse-Halterung	35
4.4.4	Eichung der logarithmischen Verstärker	35
4.5	Quantifizierung von Oberflächenantigenen	39
4.6	Zellfusion von frischen und eingefrorenen Zellen	42
4.7	Klonierung mit dem FACS 440	43
4.8	Empfindlichkeit	45
4.9	Schnell-Analyse	46
4.10	Effizienz der Schnell-Analyse	46
4.11	Anti-Maus-Ig Antikörper	47
4.12	Anti-LPS-Antikörper	47
4.13	Anti-Zell-Antikörper	48

5	Diskussion	55
5.1	Anwendung von FITC, PE und Fluoreszenzkompensation	55
5.2	Darstellung mit dem logarithmischen Verstärker	55
	und Quantifizierung von Oberflächenantigenen	
5.3	Zellfusion und Klonierung	56
5.4	Das Testsystem	57
5.5	Anti-Zell-Antikörper	58
6	Zusammenfassung	65
7	Literaturverzeichnis	66

# 1 Abkürzungen

Ag	Antigen
AH	Azaserin-Hypoxantin: Selektionsmedium
Ak	Antikörper
Av	Avidin
aMIg	anti-Maus-Ig
BM	Knochenmark
BSA	Rinderserumalbumin
ConA	Concanavalin A
CPC	C-Phycocyanin
DAC	Digital-Analog-Konverter
DexS	Dextransulfat
DMSO	Dimethylsulfoxid
D`PBS	Dulbecco`s PBS
DTT	Dithiothreitol
ELISA	Enzym vermittelter immunosorbent Assay
F <sub>1</sub>	erste Filialgeneration
FACS	Fluoreszenz aktivierter Zellsortierer
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GaRIg	Ziege-anti-Ratten-Ig
GaMIg	Ziege-anti-Maus-Ig
Ig	Immunglobulin
-M,-G	Immunglobulinklassen
-k,-L	leichte Ig-Ketten
LPS	Lipopolysaccharid
mAk	monoklonaler Antikörper
MIg	Maus-Ig
mLN	mesentere Lymphknoten
MW	Molekulargewicht
PBP	Phycobiliproteine
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PE	R-Phycoerytrin
PEG	Polyethylenglykol
PJ	Propidiumjodid
pLN	periphere Lymphknoten
PP	Peyer`s Patches
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute: Zellkulturmedium
RT	Raumtemperatur
SaRIg	Schaf-anti-Ratten-Ig

SPDP	N-succinimidyl-3-(2-Pyridyldithio)propionat
StrAv	Streptavidin
TBS	Trisgepufferte Saline
TR	Texas Red
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiocyanat

## 2 Einleitung

## 2.1 B-Zelldifferenzierung und Oberflächenantigene

Das Immunsystem der Vertebraten ist in der Lage, mehr als 10<sup>6</sup> verschiedene Antikörper nahezu unbegrenzte (Immunglobuline) herzustellen und eine Anzahl strukturell unterschiedlicher Elemente (Antigene) zu erkennen. Antikörper findet man auf der Oberfläche von B-Zellen, wo sie als Oberflächen-Immunglobulin (sIg) bezeichnet werden. Die B-Zellen entstehen im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen (J.F.A.P. Miller et al. 1969 und S. Strober, 1975). B-Zellen durchlaufen während ihrer Reifung - von der Stammzelle zur antikörpersezernierenden Plasmazelle bzw. Gedächtniszelle verschiedene zur Entwicklungsstadien.

Die Entwicklung zur B-Zelle beginnt mit der Rekombination der Ig-Gene, wobei im pro-pre-B-Zellstadium eines von mehreren "Diversity"-(D)-Genen mit einem von mehreren "Joining"-(J)-Genen verbunden werden. Im folgenden Stadium, der pre-B-Zelle, wird bereits eine vollständige schwere-(H)-Kette produziert. Vorher wurde eines von vielen Genen für variable-(V)-Regionen mit dem DJ-Gen verbunden. Während der weiteren B-Zell-Differenzierung wird zuerst die Immunglobulin-(Ig)-Klasse IgM (unreife B-Zelle) und dann IgM+IgD (reife B-Zelle) ausgeprägt (vergl. Abb. 1). Weitere Klassen erscheinen nach einer Neukombination der Variablen-Region mit anderen Konstanten-Regionen.

Wo sich die Plasmazellen finden, hängt von der Art der Aktivierung der B-Zelle ab. Plasmazellen leben in ihrer aktiven Sekretionsphase ca. drei bis vier Tage. MacLennan et al. (1986) und F. Ho et al. (1986) zeigten, daß IgG-positive Plasmazellen im Knochenmark existieren, deren Lebensdauer mehr als zehn Tage beträgt (Abb. 1).

Während dieser Stadien tragen die B-Zellen außerdem noch andere Oberflächenproteine, von denen manche nur während bestimmter Phasen ausgeprägt werden. Diese Oberflächenproteine kann man als "Marker" ausnutzen und mit dagegen gerichteten Antikörpern B-Zellen dieser Entwicklungsstadien isolieren. So könnte man hoffen, Antikörper gegen Zellen zu erhalten, die zu Gedächtniszellen werden oder die einen Klassenwechsel durchführen werden, bevor diese Differenzierungsschritte abgelaufen sind. Man könnte dann die frühen Stadien dieser Differenzierungsschritte molekular- und zellbiologisch leichter und an normalen Zellen untersuchen.

Eine schematische Darstellung der B-Zell-Entwicklung von der Stammzelle bis zur Plasmazelle zeigt Abb. 1. Dabei wurden eine Reihe von in der Literatur beschriebener Oberflächenmarkern, die den B-Zell-Differenzierungsweg begleiten oder verschiedene B-Zell-Subpopulationen kennzeichnen, berücksichtigt. Eine detailliertere Aufstellung der Oberflächenmarker ist unter 5.5 gegeben.

# Schematische Darstellung der B-Zell-Entwicklung

					An	tigen	IgM + †	
	Stamm	DJ pro-pre-B	H pre-B	HL	HL/HL reif	HLs	3 Wochen BM	IgG PC/BM
Thy-1	+	-	-	-	-			
B220	-	+	+	+	+	-	$\gamma$	
AA4	-	+	+	40%	-	-	(IgG)	
GF1	-	+	50%	60%	-	-		
J11-d	-	+	+	+	(+)	(+)	$\bigcirc$	
MEL-14	-	-	(+)	-	-	-	3 Tage + †	
ThB	-	-	+	+	+	+	Milz	
MALA-1	-	-	-	-	(+/-)	+(LPS)		
BLA-1	-	-	(+)	(+)	(+)	+(LPS)		
BLA-2	-	-	(+)	(+)	(+)	+(LPS)		
Lyb-2	-	-	(+/-)	+	+	-		
RA3-2C2	-	-	+	+	+	+		
NIM-R2	-	-	(+)	+	+	(+)		
NIM-R3	-	-	-	(+)	(+)	(+)		
Ly-1	-	-	(+)	(+)	(+)	-		
Ia	-	-	-	+	+	-		
sIgM	-	-	-	+	+	-		
sIgD	-	-	-	-	+	-		
PC.1	-	-	-	-	-	+		
D3D3	-	-	-	-	-	+		

**Abb. 1:** Die hier aufgelisteten Oberflächenmarker zeigen B-Zell-Entwicklung und B-Zell-Subpopulationen in verschiedenen Stadien. Eine Liste der Oberflächenmarker mit Eigenschaften und Referenzen ist unter 5.5 angegeben.

DJ: "Diversity"- und "Joining"-Gene der schweren Ketten verbunden, H: schwere Kette,

L: leichte Kette, PC: Plasmazelle, BM: Knochenmark, (+): Subpopulation.

# 2.2 Ziel der vorliegenden Arbeit:

# Ausarbeiten einer Methode zur Selektion von monoklonalen Antikörpern gegen Zelloberflächenantigene mit dem FACS 440

Ziel meiner Arbeit war, monoklonale Antikörper (mAk) gegen Oberflächenmarker von B-Zellen zu isolieren, durch Zellfusion mit Milzzellen immunisierter Ratten. Die Identifizierung solcher monoklonalen Antikörper sollte, durch Messung gefärbter Zellen aus einem Lymphozytengemisch, mit einem Durchflußzytometer erfolgen.

Ein Vorteil eines Durchflußzytometer-Tests ist, daß mehrere Parameter gleichzeitig analysiert werden können. Es können so B- und T-Zellen unterschieden und mit der Färbung durch Hybridom-Kulturüberstände auf einen Zelltyp festgelegt werden. Zwei Streulichtparameter ermöglichen es, Makrophagen und Granulozyten von der Analyse auszuschließen. Ein weiterer Fluoreszenzparameter dient zum Ausschluß toter Zellen. Die Analyse hat außerdem den prinzipiellen Vorteil, nur solche mAk's zu entdecken, die für Fluoreszenzfärbungen eingesetzt werden können. Da B-zellspezifische mAk's aber selten sind, ergibt sich das Problem, eine große Anzahl von Hybridom-Kulturüberständen, bzw. Proben, durchflußzytometrisch zu vergleichen.

# 3 Material und Methoden

## 3.1 Tiere

Aus der institutseigenen Mauskolonie verwendete ich Tiere der F1-Generation von (Balb/c x C57Bl6).

Mit freundlicher Genehmigung der chirugischen Universitätsklinik Köln konnte ich die dort gezüchteten WISTAR-Ratten verwenden.

# 3.2 Zellkultur

# 3.2.1 Kulturbedingungen

Zellinien wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>, in RPMI-1640-Medium (RPMI 1640, Gibco, Karlsruhe) gehalten, mit 10% FCS (Boehringer, Mannheim), Penicillin (100IE/ml), Streptomycin (0.1mg/ml), 1% Glutamin 200mM und Mercaptoethanol (5\*10<sup>-5</sup>/ml, alles Flow, Bonn).

Zur Lymphozytenstimulation wurde Medium verwendet, das zusätzlich zum normalen RPMI-Medium noch Gentamycin (0.1mg/ml, Flow, Bonn) enthielt. LPS oder andere Mitogene wurden erst unmittelbar vor Verwendung dazugegeben (siehe 3.3).

Die Zellen wurden jeden zweiten Tag gefüttert und bei einer Konzentration von ca.  $5x10^4$ /ml bis  $1x10^6$ /ml gehalten. Die Titerbestimmungen erfolgten mit einer Neubauer-Zählkammer. Tote Zellen wurden mit einer 1% igen Trypanblau-PBS-Lösung gefärbt.

Bei Hefeinfektionen wurde dem Medium  $50\mu g/ml$  Nystatin (Cyanamid GmbH, Wolfratshausen) zugesetzt, bei Pilzbefall erfolgte eine Behandlung mit  $2.5\mu g/ml$  Amphotericin B Deoxychlolat (Fungizone, Flow, Bonn).

# 3.2.2 Zellpräparation und Reinigung

Nach steriler Präparation der lymphatischen Organe wurden diese mit einer Pinzette geöffnet und zur Vereinzelung der Zellen durch ein Edelstahlsieb gedrückt. Präparierbesteck und Sieb wurden vor Gebrauch mit Medium gespült.

Die Zellen wurden in 20ml RPMI-Medium suspendiert, 5` stehen gelassen (grobe Zelltrümmerund Gewebeklumpen setzen sich ab) und der Überstand mit einzelnen Zellen weiter verwendet. Danach erfolgte zweimaliges Waschen in 20ml RPMI-Medium jeweils 10` bei 4°C mit 170xg. Zur Beseitigung der restlichen Zelltrümmer und toter Zellen wurden die Zellen über eine Baumwollsäule gegeben. Diese bestand aus einer 2ml Spritze, die zur Hälfte mit autoklavierter Watte gefüllt war.

Bei Zellsuspensionen mit mehr als 10% toter Zellen oder bei einer Hefeinfektion wurden diese mit

Hilfe eines Ficoll-Kissens gereinigt (R. Mohr & U. Krawinkel 1976).

20ml der Ficoll-Lösung wurden, mit einer Pasteurpipette, mit 5ml Zellsuspension überschichtet (langsam am Rande herunter laufen lassen) und 10` bei RT mit 1000xg (ohne Bremse) zentrifugiert. Sowohl tote Zellen als auch Hefe hatten sich danach am Boden abgesetzt, während sich die lebenden Zellen zwischen Ficoll und dem Kulturüberstand befanden.

Zur Klonierung oder zur Stimulation schlecht wachsender Zellen wurde dem RPMI-Medium peritoneale Makrophagen zugesetzt.

# 3.2.3 Erythrozytenlyse

Erythrozyten wurden mit einem TRIS-Ammoniumcloridpuffer lysiert (W. Boyle 1968). Lysiert wurde 5` mit  $5*10^{6}$ /ml bei RT. Anschließend wurden die Zellen zweimal gewaschen.

# 3.2.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen (10<sup>8</sup>/ml) wurden in sterilem FCS mit 10% DMSO (Merk, Darmstadt) bei -70°C in speziellen Einfrierröhrchen (Nunc, Dänemark) eingefroren. Zur längeren Aufbewahrung wurden die Zellen in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt. Aufgetaut wurden die Zellen durch eine möglichst rasche Temperaturerhöhung in einem Wasserbad (37°). Nach dem Öffnen der Einfrierröhrchen wurde der Rand mit einem Bunsenbrenner sterilisiert. Die Zellsuspension wurde anschließend in 10ml vorgewärmtes RPMI-Medium pipettiert.

# 3.3 Lymphozytenstimulation

# 3.3.1 LPS-Stimulation

Die Milzzellen einer Maus (Präparation und Reinigung siehe 3.2.2) wurden in eine 600ml-Flasche (Nunc, Dänemark) mit 100ml Medium gegeben (Konzentration ca.  $1*10^{6}$ /ml). Zusätzlich enthielt das Medium 40µg LPS pro ml, welches der Thymus unabhängigen B-Zell-Stimulation dient (J.F. Kearney & A.R. Lawton 1975). Das LPS (100mg aus E.coli 055:B5, DIFCO, Detroit, Michigan) wurde in 50ml PBS gelöst (=2mg/ml). Von diesem Ansatz wurden 2ml in 100ml Medium gegeben. Je nach Dauer der Stimulation wurde das Medium erneuert. Die LPS-Blasten wurden vom zweiten bis fünften Tag geerntet.

# 3.3.2 ConA-Stimulation

Zur T-Zell-Stimulation wurde ConA (Pharmacia, Uppsala, Schweden) in einer Konzentration von  $5\mu$ g/ml eingesetzt. Stimulierte T-Zellen produzieren Wachstums- und Differenzierungsfaktoren. Nach drei Tagen wurde geerntet.

# 3.3.3 DexS-Stimulation

Zur Thymus abhängigen B-Zell-Stimulation wurden  $50\mu g/ml$  DexS (Pharmacia, Uppsala, Schweden) mit 10% EL4-Überstand eingesetzt (W. Müller et al. 1985), den mir W. Müller zur Verfügung stellte. Geerntet wurde nach drei Tagen.

# 3.4 Verwendete monoklonale Antikörper und Seren

# 3.4.1 Monoklonale Antikörper

Zur indirekten Immunfluoreszenz wurden mir Kulturüberstände monoklonaler Ak von W. Müller zur Verfügung gestellt (14.8, Bet-1, H106-77.3, R17.217.13). Aus Ascites-Flüssigkeit gereinigte mAk`s erhielt ich von A.Radbruch (MAR18.5, B1-8, Ac38, A39-40, As79, S24/63). Außerdem benutzte ich noch den Ak anti-Thy1.2-FITC (Becton Dickinson, Mountain View, Kalifornien). Die folgende Aufstellung zeigt eine Liste der verwendeten mAk`s.

	Bezeichnung	Spezifität	Klasse
Ratte	14.8	l anti-Maus-B220	IgG2b, gamma
	Bet-1	l anti-Maus-IgM	IgG1
	H106-77.3	anti-Maus-IgG2a	IgM
	R17.217.13	anti-Transferrin-Rezeptor	IgG2a
	anti-Thy1.2	anti-Maus-T-Zell-FITC	l IgG2b
Maus	MAR 18.5	anti-Ratte-k	IgG2a

Verwendet wurden:

Aus den Mausantikörpern B1-8 (IgM), Ac38 (IgG1), A39-40 (IgG2a), As79 (IgG2b) und S24/63 (IgG3) stellte ich eine MIg-Mischung her zu je 0.2mg/ml mit einer Endkonzentration von 1mg/ml.

## 3.4.2 Antiseren

Die verwendeten Antiseren waren hauptsächlich Ziegen-Antiseren, FITC-gekoppelt und ungekoppelt von Southern Biotechnology Associates (SBA), Birmingham, Alabama. Die ungekoppelten biotinylierte ich (siehe 3.6.1) und verwendete sie als anti-MIg-Mischung (1mg/ml). Diese anti-MIg-Mischung setzte sich zusammen aus anti-IgM (0.4mg/ml), anti-IgG (0.4mg/ml) und anti-k (0.2mg/ml). Da das anti-IgG mit der leichten  $\lambda$ -Kette kreuzreagierte, erübrigte sich der Einsatz eines anti-Ig-Serums.

Außerdem erhielt ich von W. Müller affinitätsgereinigte, FITC-gekoppelte Schafseren.

	Bezeichnung	Spezifität	gekoppelt
Ziege:	GaRIg	anti-Ratten-Ig	FITC
	GaMIgM	anti-Maus-IgM	Biotin
	GaMIgG	anti-Maus-IgG	Biotin
	GaMk	anti-Maus-k	Biotin
	GaMIgM	anti-Maus-IgM	TRITC
	GaMIgG	anti-Maus-IgG	TRITC
	GaRIg	anti-Ratten-Ig	Phosphatase
Schaf:	SaRIgM	anti-Ratten-IgM	FITC
	SaRIgG	anti-Ratten-IgG	FITC

Aufstellung der verwendeten Antiseren:

Das GaRIg-FITC reagierte kreuz mit Maus-Ig, so daß eine Adsorption (siehe 3.4.3) auf den Zielzellen notwendig wurde.

#### 3.4.3 Adsorption von Antiseren

Die Kreuzreaktion von GaRIg-FITC mit Maus-Ig machte eine Adsorption notwendig. Adsorbiert wurde auf den jeweiligen Zielzellen wie z.B. Milzzellen und LPS-Blasten.

Dazu wurden ca.  $5*10^7$  Zellen gereinigt (siehe 3.2.2), mit PBS (+ 1% BSA, + 0.01% NaN<sub>3</sub>) gewaschen, abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Auf das Zellpellet wurden  $100\mu$ l Antikörper-Stammlösung (1mg/ml) gegeben, mit den Zellen vermischt und 2h auf Eis inkubiert. Zwischendurch wurde die Suspension aufgeschüttelt. Danach wurde mit 170xg 10` zentrifugiert und der adsorbierte Überstand abgenommen. Anschließend wurde die Antikörperlösung in PBS mit 1% BSA und 0.01%NaN<sub>3</sub> auf ca.  $100\mu$ g/ml verdünnt, aliquotiert und bei -70°C gelagert.

#### 3.5 Herstellung monoklonaler Antikörper gegen Maus-Lymphozyten

Ratten wurden mit Maus-Lymphozyten immunisiert. Durch Fusion von Myelomzellen mit den immunisierten Rattenmilzzellen erhält man Hybridome, deren Kulturüberstände die gesuchten Antikörper enthalten (G. Köhler & C. Milstein, 1975 und G. Galfre et al. 1977). Immunisiert wurden die Ratten zum einen mit einem Gemisch aus Milz-, Lymphknoten- und Peyer`s Patch-Zellen und zum andern mit einem Gemisch aus Milzzellen und aktivierten B-Zellen (LPS-Blasten). Vier Wochen nach der Erstimmunisation erfolgte eine zweite Immunisation und vier Tage danach die Fusion. Dies entspricht dem Immunisierungsschema von J.A. Ledbetter & L.A. Herzenberg (1979).

## 3.5.1 Immunisation

WISTAR-Ratten wurden mit verschiedenen Maus-Zellgemischen mehrfach immunisiert (siehe Immunisationsschema). Die Ratten wurden mit frischem Äther betäubt und die gereinigten Maus-Zellen (siehe 3.2.2) in einem Volumen von 0.5-1ml in Medium interperitoenal injiziert. Die verschiedenen Zelltypen wurden im Verhältnis von 1:1 bzw. 1:1:1:1 eingesetzt.

Fusions-	Immunisa	ution
Nr.	Zelltyp	Schema
	LPS-Blasten	Tag 1: 1.7*10 <sup>7</sup>
1	+	Tag 28: 3.5*10 <sup>7</sup>
	Milz	Tag 32: Fusion
	LPS-Blasten	Tag 1: $2*10^7$
2	+	Tag 28: $4*10^7$
	Milz	Tag 32: Fusion
	mLN, pLN	Tag 1: 6*10 <sup>7</sup>
3	PP +	Tag 28: $7*10^7$
	Milz	Tag 32: Milzzellen eingefro

Immunisationsschema:

mLN: mesenteriale Lymphknoten, pLN: periphere Lymphknoten PP: Peyer`s Patches

# 3.5.2 Zellfusion

# 3.5.2.1 Fusion frisch präparierter Zellen

Als Fusionspartner für die Ratten-Milzzellen diente die Myelomzellinie X63Ag8.653 (J.F. Kearney et al. 1979). Die 653-Zellen wurden im Verhältnis von 2:1 bis 3:1 mit Ratten-Milzzellen fusioniert. Die Hybridisierung der immunisierten Ratten-Milzzellen erfolgte mit Polyethylen-glykol (PEG 4000, Roth KG, Karlsruhe), die Selektion der Hybridome mit Azaserin-Hypoxantin-Medium (AH-Medium) (S.K.H. Foung et al. 1982).

Das AH-Medium stellte ich aus normalem RPMI-1640-Medium (siehe 3.2.1) durch Zugabe von  $100\mu$ M Hypoxanthin (Sigma, München) und 1g/ml Azaserin (Sigma, München) her. Zur Herstellung des PEG-Mediums gab ich 20g PEG 4000 in eine 100ml Glasflasche. Nach dem Autoklavieren ließ ich sie auf 80°C abkühlen und gab 28ml auf mindestens 37°C erwärmtes PBS mit 15% DMSO zu.

Vor jeder Fusion wurde das AH-Medium getestet, indem ich die X63Ag8.653 Zellinie und eine Hybridom-Zellinie (H106-77.3) in dem AH-Medium wachsen ließ. Die 653-Zellen mußten innerhalb von drei Tagen sterben, die H106-77.3 Zellen überleben.

Die Reinigung der Rattenmilzzellen (siehe 3.2.2) erfolgte in RPMI-Medium. Die Milz einer Ratte ergab ca.  $1.6*10^8$  kernhaltige Zellen, wovon ca.  $5*10^7$  bis  $1*10^8$  zur Fusion eingesetzt wurden.

Zur eigentlichen Fusion wurden die Milzzellen und die 653-Zellen gewaschen (10` bei 4°C mit 170xg) und in 50ml kaltem D`PBS gemischt, abzentrifugiert und das D`PBS vollständig abgenommen. Danach wurde das Pellet vom Boden gelöst und die 1\*10<sup>8</sup> Zellen vorsichtig mit 1ml auf 37°C erwärmtem PEG-Medium gemischt. Innerhalb der nächsten 10` wurden 20ml D`PBS tropfenweise unter ständigem leichten Schütteln zugegeben. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (10` bei 4°C mit 100xg) und das Pellet bei einer Konzentration von 1\*10<sup>6</sup>Zellen/ml in 100ml AH-Medium in einer 200ml Kulturflasche (Greiner, Nürtingen) bei 37°C inkubiert.

Am folgenden Tag wurden jeweils 5\*10<sup>6</sup> Ratten-Milzzellen in einer 96-Lochplatte (Costar, Cambridge, U.S.A.), mit 1\*10<sup>5</sup> peritonealen Maus-Makrophagen pro ml ausplattiert. Nach 10 - 14 Tagen wurden angewachsene Kolonien in normales RPMI-Medium transferiert.

# 3.5.2.2 Fusion von eingefrorenen Zellen

Nach der Präparation der Rattenmilz wurden die gereinigten Zellen (siehe 3.2.2) sofort eingefroren. Das Einfrieren und Auftauen erfolgte wie unter 3.2.4 beschrieben. Nach dem Auftauen wurden die Zellen zweimal mit 20ml kaltem D`PBS gewaschen (10` bei 4°C mit 100xg), die 653-Zellen dazugegeben und wie unter 3.5.2.1 beschrieben, fusioniert und selektioniert.

# 3.5.3 Klonierung

# 3.5.3.1 Verdünnungsklonierung

Hybridome wurden durch "begrenzende Verdünnung" (limiting dilution) in eine 96-Lochplatte (Costar, Cambridge, U.S.A.) kloniert. Dazu wurden die Zellen so verdünnt, daß nicht mehr als 35 Kolonien pro Platte anwuchsen. Aufgrund der Poissonverteilung kann dann mit 90% Sicherheit davon ausgegangen werden, daß jede Zellkolonie ein Klon ist (A. Radbruch 1980). Dem Klonierungsmedium waren noch 5\*10<sup>4</sup> Makrophagen/ml zugesetzt.

# 3.5.3.2 Klonierung mit dem FACS 440

Neugewonnene Hybridome besitzen nach der Fusion den Chromosomensatz beider Fusionspartner. Häufig verlieren Hybridomzellen aber einzelne Chromosomen durch ungleiche Zellteilung (C. Milstein, 1980). In der Kultur nehmen also Ak-sezernierende Zellen langsam ab. Durch Klonierung können die noch produzierenden Zellen isoliert werden. Dazu setzte ich parallel Verdünnungs- und FACS-Klonierung ein. Sobald in einer Kultur weniger als 15% positive Zellen enthalten waren, wurde sie kloniert.

Bei der Klonierung mit dem FACS wurden lebende Zellen in Mikrotiterkulturgefäße (96-Lochplatten) abgelenkt, indem ein Tor auf die Mitte der Vorwärtslichtstreuung außerhalb der PJpositiven (toten) Zellen gesetzt wurde. Das PJ (2 $\mu$ l, 1mg/ml, Sigma, München) wurde unmittelbar vor der Klonierung dazugegeben. Die 96-Lochplatten waren mit RPMI-Medium und Makrophagen (5\*10<sup>4</sup>/ml) vorbereitet. Die Justierung des FACS 440 erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie bei einer Sortierung (W. Weichel, 1983 / 1985). Die Zuverlässigkeit der Ablenkung wurde überprüft, indem theoretisch 30 Zellen auf einen Objektträger abgelenkt und unter dem Mikroskop ausgezählt wurde, wieviele davon tatsächlich abgelenkt worden waren.

Um zu testen, ob der FACS 440 zu einer Klonierung geeignet ist, habe ich diese Klonierung mit einer Verdünnungsklonierung verglichen. Dazu benutzte ich die EL4- und 267.7-Zellen (siehe 3.9.1) in unterschiedlicher Anzahl und Konzentration.

# 3.5.4 Testen der Ig-Produktion und Ig-Isotypbestimmung

Zur Bestimmung der Ig-Klasse und des in der Kultur vorhandenen Anteils an Ig-produzierenden Zellen, wurden Zellen positiver Kolonien zytoplasmatisch mit SaRIgM-FITC, SaRIgG-FITC und MAR18.5 gefärbt (siehe 3.10). Da der Ak MAR18.5 ungekoppelt war, mußte er mit GaMIgG-TRITC sichtbar gemacht werden. Danach wurden die Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop (Orthoplan, Leitz, Wetzlar) ausgewertet.

# 3.5.5 Gewinnung von Kulturüberständen

Zur Gewinnung der Kulturüberstände wurde bei einer dicht gewachsenen Kultur (ca. 1\*10<sup>6</sup>/ml) das Medium entfernt und die Zellen mit frischem Medium für einen Tag inkubiert. Der Überstand wurde abgeerntet und zur Beseitigung von Zellen und Präzipitaten 15` mit 380xg zentrifugiert. Nach Zugabe von NaN<sub>3</sub> (0.1%) wurde der Kulturüberstand in Aliquots a` 0.5ml bei -70°C eingefroren.

# 3.6 Herstellung von Konjugaten

# 3.6.1 Biotinylierung

Antikörper, die ich für Färbezwecke benutzen wollte, habe ich mit Biotin gekoppelt. Dazu wurden 1mg gereinigte Antikörper (1mg/ml in 0.1M NaHCO<sub>3</sub>) mit  $120\mu$ l Biotin-succinimide-ester in DMSO (1mg/ml, Biosearch, San Rafael, U.S.A.) versetzt und 4h bei RT gerührt. Danach wurde dreimal a` 12h gegen 11 PBS mit 0.01% Azid dialysiert und eine Konzentration von 1mg/ml mit PBS eingestellt.

# 3.6.2 Kopplung von Streptavidin an C-Phycocyanin

C-Phycocyanin (CPC, MW = 72000) gehört zu den Phycobiliproteinen (PBP). Es wurde mir von W. Weichel zur Verfügung gestellt. Das Streptavidin (StrAv) bezog ich von Sigma, München. Die Kopplung von PBP an StrAv mit SPDP wurde nach Carlsson et al. (1978) und W.Weichel (1983) durchgeführt.

Die Konjugation der Proteine erfolgte im Verhältnis CPC:StrAv von 2:1 Mol (16nM CPC + 8nM StrAv, 20h bei RT). Die Konjugat-Reinigung erfolgte über eine Sephacryl S-300 Säule mit PBS/NaN<sub>3</sub> im Fraktionssammler.

# 3.6.3 Adsorption von Phycobiliproteinen an Kunststoffpartikel

Verschiedene Phycobiliproteine wurden an Kunststoffpartikel (Polysciences, St. Goar) aus Polysteren mit einem Durchmesser von  $9.28\mu$ m adsorbiert. Dazu wurden 0.5ml der Kunststoffpartikel-Lösung (2.5%ig) mit 1.5mg/ml PBP über Nacht bei RT inkubiert. Danach wurde die Lösung 1/2` in einer Eppendorfzentrifuge (Netheler und Hinz GmbH, Hamburg) abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und für spätere Adsorptionen aufgehoben. Anschließend wurden die gefärbten Partikel solange in PBS/NaN<sub>3</sub> gewaschen bis der Überstand keine erkennbaren Farbrückstände mehr zeigte.

#### 3.7 Identifizierung von anti-Maus-Ig-Antikörpern mit einem ELISA-Test

96-Lochplatten (Greiner, Nürtingen, Rundboden) wurden mit  $20\mu$ l pro Loch einer  $10\mu$ g/ml Maus-Ig-Mischung in PBS/NaN<sub>3</sub> (siehe 3.4.1) beschichtet. Nach dem Absättigen mit einer 1% BSA/PBS Lösung wurden  $50\mu$ l Kulturüberstand pro Loch auf der 96-Lochplatte verteilt und mit  $20\mu$ l GaRIg-Phosphatase ( $1\mu$ g/ml, SBA, Birmingham, Alabama) entwickelt. Die Indikatorreaktion wurde mit 4-Nitrophenolphosphat (0.4mg/ml, Merck, Darmstadt) in Substratpuffer (Boehringer, Mannheim) durchgeführt und am ELISA-Photometer (Dynatech Deutschland GmbH, Denkendorf) gemessen. Das gleiche Verfahren wurde auch zur Identifikation eines anti-LPS-Ak angewandt, allerdings mit  $10\mu$ g/ml LPS/PBS und  $50\mu$ l pro Loch beschichtet.

#### **3.8 FACS 440**

#### 3.8.1 Grundausstattung und Anwendung

Das Prinzip des Fluoreszenz-aktivierten-Zellsortierers ist von L.A. Herzenberg et al. (1976) ausführlich beschrieben worden. Das von mir benutzte Gerät (FACS 440, Becton Dickinson, Mountain View, Kalifornien) ist ein Vier-Parameter Durchflußzytometer. Es besitzt einen integrierten Computer und zwei Bildschirme zur Darstellung der Signale und Daten. Die Daten können in Form von Histogrammen oder als Zwei-Parameter-Punktdiagramme dargestellt werden. Die Datensicherung erfolgte auf einem Rainbow Computer (Digital Equipment Corp., München), auf Diskette und der Ausdruck auf einem EPSON FX-80 (EPSON Corp. Nagano, Japan). Die dafür notwendige Software schrieben W.Weichel (1983) und B. Raftery.

Bei den Histogrammen werden die Signale, pro Parameter, je nach Intensität auf 250 Kanäle verteilt, gespeichert, addiert und auf dem Bildschirm dargestellt. Zur Punktdarstellung werden zwei Parameter gegeneinander aufgetragen und deren jeweiliger Wert auf einem Bildschirm dargestellt, so daß eine Population als Punktwolke sichtbar wird.

Die generellen technischen Eigenschaften der FACS-Maschinen sind von B. Liesegang et al. (1978) und W. Weichel (1983 / 1985) ausführlich beschrieben worden. Daher möchte ich nur auf die Besonderheiten des von mir verwandten FACS 440 eingehen.

Die vier Parameter setzen sich aus zwei linearen und aus zwei wahlweise linear / logarithmisch umschaltbaren Parametern zusammen. Als erster linearer Parameter (1.-Kanal) wurde grundsätzlich das Vorwärtsstreulicht gewählt, das als Maß der Größe einer Zelle dient und die Messung durch die anderen Photovervielfacher (PMT) auslöst. Der zweite lineare Parameter (4.-Kanal) kann als PJ-Parameter, zum Ausschluß toter Zellen oder als 90°-Streulicht-Parameter verwendet werden. Diese beiden Parameter benutzte ich zum Setzen einer zweidimensionalen Sperre (Tor), die nur lebende und der richtigen Streulichtverteilung entsprechende Zellen zur weiteren Analyse zulassen. Die beiden anderen Parameter benutzte ich als logarithmische Parameter zur Darstellung der Rot- und Grün-Fluoreszenz (Rot- und Grün-Kanal).

Angeregt wurde die Fluoreszenz mit einem Argon-Ionen-Laser (Modell 2010, Spectra-Physics,

Darmstadt) bei 488nm und einem Farbstoff-Laser (Spectra-Physics, Darmstadt) bei 560-620nm (einstellbar). Der Farbstoff-Laser wurde mit Rhodamin 504 (2mMol/l in Ethylenglykol, Radiant Dyes Chemie, Wermelskirchen) betrieben und mit einem zweiten Argon-Ionen-Laser angeregt. Eine Kompensation kann am FACS 440 vorgenommen werden, wenn zwei Fluoreszenzen sich spektral überschneiden. Dies tritt bei einer Analyse mit nur einem Laser (488nm, Einpunktanregung) und den beiden Fluoreszenzfarbstoffen PE und FITC auf. Bei der Kompensation wird auf elektronischem Wege von einem Fluoreszenzsignal eine relative Menge abgezogen und die Differenzlichtmenge als kompensiertes Signal bezeichnet.

Bei einer Fluoreszenzanregung mit zwei Lasern (Zweipunktanregung) wurde der Farbstofflaser ca.  $150\mu$ m oberhalb des 488nm-Lasers justiert und die Signale nach einer Verzögerungszeit von 15-30s gemessen.

## 3.8.2 FACS 440 Modifikationen

## 3.8.2.1 Peltier-Zell-Kühlung

Zur trockenen Zellkühlung wurde ein Peltier-Zell-Kühlgerät entwickelt. Das Gerät sollte Zellen in Eppendorf-Röhrchen (Netheler und Hinz GmbH, Hamburg) aufnehmen, eine Temperatur von ca. 4°C ermöglichen und an jeder FACS-Maschine angebracht werden können.

## 3.8.2.2 Einzel-Zell-Ablenkung

Der FACS 440 ist so konzipiert, daß er nur Zellen in Schritten a` 1000 abzulenken oder ohne Begrenzung zu sortieren vermag. Ein Zusatzgerät von Becton Dickinson (BD) machte es möglich, einen einzelnen Ablenkimpuls zu geben und somit eine einzelne Zelle abzulenken. Da es oft wünschenswert ist, eine variable Anzahl von Zellen (zwischen 1 und 1000) abzulenken, z.B. bei der FACS-Justierung und -Klonierung, wurden entsprechende Änderungen durch eine Zusatzschaltung vorgenommen. Diese Zusatzschaltung wurde von C. Göttlinger und mir entworfen und in das BD-Zusatzgerät eingebaut.

## 3.8.2.3 Schnell-Analyse-Halterung

Da ich nach einer Fusion stets eine große Anzahl Kulturüberstände testen mußte, ergab sich die Notwendigkeit, kleine Volumina der Test-Zellsuspension in möglichst kurzer Zeit zur Düse zu befördern. Von der Instituts-Feinmechanikerwerkstatt ließ ich eine Plexiglashalterung für Eppendorf-Röhrchen mit einer O-Ringdichtung anfertigen. Zur Durchleitung von Druckluft und Zellsuspension brachte ich 0.6mm Kanülen an, die in die Plexiglashalterung eingeklebt wurden.

#### **3.8.2.4 5.-Parameter zum Ausschluß toter Zellen**

Von T. Nozaki (Stanford Universität, Kalifornien) erhielt ich einen Schaltplan zur Veränderung der FACS 440-Schwellenwert- und -Impuls-Kontroll-Karte (Karten Nr. 07-12027). Diese Modifikation ermöglicht einen Ausschluß sehr hoher Signale über einen oberen Schwellenwert. Der Signaleingang der Nozakischaltung wurde nicht fest auf einem Kanal (Vorverstärker-Ausgang), sondern variabel über eine abgeschirmte Leitung und Steckverbindung installiert, so daß die Modifikation wahlweise für jeden der vier Kanäle benutzt werden kann. Während des Tests der Nozakischaltung stellte sich heraus, daß die Schwelle zum Ausschließen der großen Impulse nicht korrekt einzustellen war. Daher mußte eine Schaltungsanpassung durchgeführt werden, wobei der Schwellenabgleich über einen 12k Widerstand auf Masse gelegt wurde.

#### 3.8.2.5 Eichung der logarithmischen Verstärker

Zur Eichung der logarithmischen Verstärker entwickelte ich einen Signalgenerator, der eine Reihe von jeweils sich verdoppelnden Signalen generiert. Dazu verwandte ich einen 12-Bit Digital-Analog-Konverter (AD667, Analog Divices, Norwood, U.S.A.), der zehn sich jeweils verdoppelnde Spannungen erzeugt. Die Grundschaltung stammte aus den Applikationen von Analog Divices und wurde nach Modifikation auf einer Leiterbahnenplatine aufgebaut und an den Verstärker angepaßt. Die Stromversorgung (+15V/+5V/-15V) wurde geräteintern entnommen.

#### 3.8.3 Quantifizierung von Oberflächenantigenen

Durch die Eichung wurde es möglich, die Bandbreite und das Verhalten des log.-Verstärkers zu bestimmen. Zur Quantifizierung der Fluoreszenz mußten Partikel mit definierter Fluoreszenz (Flow Cytometry Standard Corp., Research Triangle Park, North Carolina, U.S.A.), als Äquivalentkonzentration gemessen werden. Um die Eichkurve des Verstärkers an die Kurve der Äquivalentkonzentration anzugleichen muß eine Parallelverschiebung vorgenommen werden. Die durchschnittliche Zahl der gebundenen Ak (ØAk) pro Zelle ergibt sich aus dem Äquivalent der Fluoreszenzmoleküle (ESF) pro Zelle, dividiert durch die Kopplungsrate der Fluoreszenzmoleküle an gebundenen Ak (F:P).

Dabei ist nicht die Eigenfluoreszenz einer Zelle berücksichtigt. Diese kann aber durch Messung von Zellen ohne gebundenen Ak, die mit einem nichtbindenden fluoreszenzmarkierten Ak inkubiert werden und von völlig ungefärbten Zellen berücksichtigt werden. Diese Berechnung entspricht der von J.A. Ledbetter et al. (1980). Ein größeres Problem sind die wahrscheinlich unterschiedlichen Eigenschaften von Fluorescein auf Latex-Partikel und auf Zellen, wodurch die Kalibrierung mit den Eichpartikeln relativiert wird.

# 3.9 FACS 440 Hybridom-Kulturüberstand-Analyse

# 3.9.1 Verwendete Zellen und Zellinien

Zur Analyse der Hybridom-Kulturüberstände benutzte ich in erster Linie frisch präparierte Mauszellen der lymphatischen Organe und stimulierte Milzzellen. Die erste Analyse nach einer Fusion erfolgte mit dem gleichen Zellgemisch, das auch zur Immunisierung verwendet wurde. Die weiteren Analysen wurden mit den aus der ersten Analyse positiv gewerteten Kulturüberständen durchgeführt, die dann getrennt auf Zellen der einzelnen Organe, stimulierte Milzzellen und Zellinien getestet wurden. Zur Planung meiner Analysen benötigte ich die Zellausbeute der verschiedenen lymphatischen Organe. Da die männlichen Mäuse meist größere Lymphknoten als die weiblichen hatten, habe ich hauptsächlich männliche verwendet. Die folgende Aufstellung zeigt die Zellzahlen.

Zellausbeute, Durchschnitt von 10 Mäusen ca. 10 Wochen alt:

Organ (Anzahl)	 	Zellen pro Maus (männlich)
Peyer`s Patches (9)		$2*10^7$
periphere Lymphknoten (4)	I	5*10
mesentere Lymphknoten (3)		3*107
Knochenmark (2)	Ι	$1.6^{*}10^{7}$ (Femur)
Milz		$5*10^7$ (kernhaltige)
LPS-Blasten	I	5*10 <sup>7</sup> (Tag 2/Milz)

Bezeichnung	Eigenschaft
Lymphome:	
EL4 (T)	IL-produzierend (EL4-F15-16-Tk25) (L. Old et al. 1965)
BW5174 (T)	IL-produzierend (R.A. Goldsby et al. 1977)
18.81.1 (preB)	zytoplasmatisches $\mu$ (P.D. Burrows et al. (1981)
BCL1 (B)	Oberflächen-IgM,κ (S. Slavin & S. Strober 1978)
K46-Ag8 (B)	Oberflächen-IgG1,κ (G. Köhler et al. 1984)
Myelom:	
X63Ag8.653	produziert kein Ig (J.F. Kearney et al. 1979)
Y3-Ag1.2.3	produziert κ-Kette (G. Galfre et al. 1979)
Hybridome:	
PC140	sezern. + OberflIgM,κ (P. Thammana & M.D. Scharff,1983)
267.7	sezern. + OberflIgM,λ (White-Scharf & Imanishi-Kari,`82)
267.7d	sezerniertes + Oberflächen-IgD,λ (S. Klein et al. 1984)
102.1	l sezerniertes + Oberflächen-IgM+IgG1 (S. Klein, Köln)
102.13	sezerniertes + Oberflächen-IgM+IgG1 (S. Klein, Köln)
1-11.9	sezerniertes + Oberflächen-IgG3 (S. Klein, Köln)
B1-8	sezerniert IgM, $\lambda$ (M. Reth et al. 1978)
R <b>E</b> .15	sezerniertes + Oberflächen-IgE, κ (C. Esser, 1985)

Die folgende Aufstellung zeigt die verwendeten Zellinien.

IL: Lymphokine (Wachstums- und Differenzierungsfaktoren)

## 3.9.2 Aufbau des Testsystems

Das Testsystem wurde so angelegt, daß möglichst viele Hybridom-Kulturüberstände in kurzer Zeit darauf getestet werden konnten, ob sie Antikörper enthalten, die Oberflächenstrukturen der Testzellen binden. Eine ähnliche Methode wandten Mike Loken & A.M. Stall (1982) an. Allerdings benutzten sie nur einen Fluoreszenzparameter zur Entdeckung von Antikörpern gegen Zellen einer T-Zellinie. Ich benutzte den FACS zur Identifizierung von mAk's gegen spezifische B-Zell- und B-Zell-Subpopulations Antigene. Zur Sicherstellung einer sauberen Analyse ist es notwendig, tote von lebenden Zellen zu trennen, da tote Zellen unspezifisch Farbstoffe und fluoreszenzmarkierte Ak aufnehmen und so die Entdeckung von mAk's gegen seltene B-Zellen unmöglich machen. Die unter 3.2.2 beschriebene Ficoll-Zentrifugation ist nicht ausreichend, da Zellen auch noch während einer Färbung sterben können. Deshalb gab ich stets PJ hinzu, das von toten oder sterbenden Zellen aufgenommen wird, nicht aber von lebenden. Mit einem linearen Parameter schloß ich auf diese Weise tote Zellen von der weiteren Analyse aus. Einen zweiten

linearen Parameter benutzte ich ausschließlich als Vorwärtsstreulicht-parameter und setzte ein Tor auf lebende Lymphozyten, so daß nur diese zur weiteren Analyse zugelassen wurden. Zur Unterscheidung von B- und T-Zellen im Testgemisch verwendete ich eine biotinylierte anti-Maus-Ig-Mischung (siehe 3.4.2), die zu Beginn meiner Untersuchungen mit StrAv-TR (Bethesda Research Laboratories: BRL, 0.79mg/ml), später mit StrAv-CPC und StrAv-PE in einem zweiten Färbeschritt entwickelt wurde. Zur Kontrolle verwendete ich einen Ratten-Hybridom-Kulturüberstand (14.8, P.W. Kincade et al., 1981) der sämtliche Maus B-Zellen erkennt. Entwickelt wurden die Ratten-Hybridom-Kulturüberstände mit GaRIg-FITC (SBA).

Die Grundeinstellung des FACS 440 erfolgte stets mit fixierten Hühnererythrozyten, die der Optimierung der Trennschärfe von Grünfluoreszenz und Streulicht diente (W. Weichel et al. 1985). Mit einer Mischung CPC- bzw. PE-gekoppelter und ungekoppelter Kunststoffpartikel (siehe 3.6.3) wurde die Rot-Fluoreszenz eingestellt. Die entgültige Standardisierung der Maschine wurde mit gefärbten Milzzellen vorgenommen. Die Milzzellen wurden mit 14.8 und GaRIg-FITC (grün) gefärbt und mit GaMIg-Biotin und StrAv-CPC oder -PE (rot) und tote Zellen durch PJ (rot) gefärbt.

Dieses Gemisch enthält mit den T-Zellen für beide Farben eine Negativ- und mit den B-Zellen eine Positivkontrolle. Gleichzeitig wurde damit die Qualität der GaRIg-FITC und StrAv-PBP Konjugate getestet.

## 3.9.3 Färbung

Die Testzellen wurden in Aliquots von  $1*10^5$  auf einer 96-Lochplatte (Greiner, Nürtingen, Rundboden) pro Loch verteilt, gefärbt und gewaschen (s.u.).

1. Färbeschritt:	10µl GaMIg-Biotin (100µg/ml)
	+ 10µl Kulturüberstand der Rattenhybridome.
Inkubiert wurde die Z	ellsuspension 30` auf Eis. Danach
wurden die Zellen zwo	eimal mit je 200µl D`PBS/FCS/NaN <sub>3</sub>
gewaschen (10 <sup>\\</sup> mit 3	880xg bei 4°C).

2. Färbeschritt:  $5\mu$ l StrAv-PE ( $20\mu$ g/ml) +  $10\mu$ l GaRIg-FITC ( $100\mu$ g/ml). Nach 30` auf Eis wurden die Zellen in  $200\mu$ l D`PBS/FCS/NaN<sub>3</sub> suspendiert und bis zur Analyse auf Eis stehengelassen.

3. Färbeschritt (unmittelbar vor der Analyse):  $2\mu$ l PJ (1mg/ml).

Zur Kontrolle der Färbung wurden nach dem 2. Färbeschritt von der Positiv-(14.8)- und Negativkontrolle jeweils ca. 1\*10<sup>5</sup> Zellen in einer Zytozentrifuge auf einen Objektträger

zentrifugiert (5`, 420xg), in Fluoromount-G (SBA, Birmingham, Alabama) eingedeckt und unter dem Fluoreszenz-mikroskop ausgewertet.

Zur Analyse wurde jede Probe in ein Eppendorfröhrchen gegeben, auf ca. 0.5ml mit D`PBS/FCS/NaN<sub>3</sub> aufgefüllt und in die Schnell-Analyse-Halterung eingehakt.

## 3.9.4 Empfindlichkeit

Um festzustellen, wie gering der Anteil gefärbter Zellen bei den analysierten Zellen sein kann, um in diesem Testsystem erfaßt werden zukönnen, titrierte ich gefärbte Zellen in Populationen ungefärbter Zellen aus. Dazu verwendete ich gereinigte Milzzellen, gefärbt mit 14.8-Kulturüberstand und GaRIg-FITC. Diese Zellen mischte ich mit nur mit GaRIg-FITC gefärbten Milzzellen. Verdünnt wurde in 10er-Schritten, so daß Verdünnungen von 1:10, 1:100 und 1:1000 entstanden. Dabei ist zu beachten, daß 14.8 nur B-Zellen färbt und die unverdünnte Probe weniger als 50% 14.8-positive Zellen ergeben muß. Zur zahlenmäßigen Erfassung der Subpopulation wurden Zählfenster gesetzt, die sich an der unverdünnten (Positiv-) und der nicht gefärbten Probe (Negativkontrolle) orientierten.

#### **3.9.5 5-Parameteranalyse**

Makrophagen und Granulozyten besitzen ein von anderen Lymphozyten unterschiedliches 90°-Streulicht, so daß diese damit von einer Analyse ausgeschlossen werden können. Dies wird besonders wichtig bei Knochenmark- oder peritonealen Zellen, die einen hohen Anteil an Makrophagen und Granulozyten besitzen, da diese einen Farbstoff unspezifisch aufnehmen und eine Analyse erheblich stören können. Durch die Verwendung der Nozakischaltung (siehe 3.8.2.4) wurde ein linearer Parameter frei, der dann für das 90-Streulicht zur Verfügung stand. Die Nozakischaltung ("5.-Parameter") wurde zum Ausschluß PJ-positiver, toter Zellen im Rot-(PE)-Kanal verwendet. Die restlichen drei Parameter blieben unverändert wie unter 3.8.1 beschrieben. Bei einer Zweipunktanalyse (TR- oder CPC-Färbung) ist zu beachten, daß die PJ-positiven (toten) Zellen durch die Nozakischaltung nicht ausgeschlossen werden. Die Ursache, daß tote (PJpositive) Zellen bei der Zweipunktanregung nicht ausgeschlossen werden, kommt zustande durch die Zeitverzögerung die im Rot-Kanal bei einer Zweipunktanregung auftritt. Die Nozakischaltung kann nur arbeiten, wenn der FACS noch nicht durch ein Signal getriggert worden ist. Die 5-Parameteranalyse kann also nur bei einer Ein-Laser-Anregung durchgeführt werden mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff der auch bei 488nm angeregt werden kann, wie z.B. PE.

## **3.9.6** Schnell-Analyse

Das Prinzip der Schnell-Analyse ist die Musterbilderkennung eines zweidimensionalen Punktdiagramms auf dem Bildschirm. Die Abb. 2 zeigt ein Musterbild bei dem alle B-Zellen gefärbt sind.



**Abb. 2**: Beispiel einer zweidimensionalen Punktdarstellung mit GaMIg-Biotin/StrAv-PE in der Vertikalen und 14.8-Überstand/GaRIg-FITC in der Horizontalen auf einer Zellmischung aus den lymphatischen Organen. Dies entspricht der Positivkontrolle des Testsystems.

Mit der simultanen anti-Maus-Ig- und Kulturüberstand-Färbung wurde die Unterscheidung von durch Hybridom-Antikörper gefärbten und ungefärbten B- und T-Zellen in einer zweidimensionale Punktdarstellung auf dem Bildschirm möglich. Die folgende Darstellung (Abb. 3) zeigt einige mögliche Populationsverteilungen, die bei diesem Testsystem mit Milzzellen als Testzellen auf dem Bildschirm auftreten können. Solche Populationsmuster sind auf einen Blick zu erfassen und ermöglichen daher eine sehr schnelle Zuordnung der getesteten Kulturüberstände.



Abb. 3: Einige mögliche Färbemuster von Maus-Milzzellen

Zur Vermeidung von Verunreinigungen durch Zellen vorhergehender Proben wurden jeweils die ersten Zellen einer Probe verworfen und der Probenschlauch durch Zurückspülen gereinigt. Um Prozentwerte von positiven Hybridom-Überständen zu ermitteln, setzte ich zweidimensionale Zählfenster, bei denen ich mich an der Negativkontrolle orientierte.

# 3.10 Zytoplasmatische Immunfluoreszenz

Bei der zytoplasmatischen Immunfluoreszenz wurden ca.  $1*10^5$  Zellen auf einen Objektträger mit 95% igem Ethanol und 5% Essigsäure bei -20°C 20° fixiert und anschließend gefärbt (M. Goldmann 1968). Gefärbt wurde mit 5µl Antikörperlösung (0.1mg/ml) und anschließend in Fluoromount-G (SBA, Birmingham, Alabama) eingedeckt.

# 3.11 Kombinierte Oberflächen- und Zytoplasmafärbung

Zuerst wurden  $100\mu$ l einer Zellsuspension von ca.  $1*10^6$ /ml auf der Oberfläche gefärbt (entsprechend 3.9.3). Danach wurden die Zellen auf Objektträger zentrifugiert, fixiert und im Zytoplasma gegengefärbt (siehe 3.10).

#### 4 Ergebnisse

#### 4.1 Verwendung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe

Zur Justierung des FACS 440 habe ich nicht nur Hühnererytrozyten verwendet, sondern auch die von mir mit Fluoreszenzfarbstoffen adsorbierten 9.28 Latex-Partikel eingesetzt. Die Abb. 4 zeigt TR-, CPC- und PE-Partikel gemischt mit ungefärbten in einem Histogramm mit logarithmischer Scala. Phycobiliproteine (PBP) besitzen die höchste Lichtquantenausbeute wobei PE noch vor CPC liegt (V.T. Oi et al. 1982).



Abb. 4: Positive und negative TR-, CPC- und PE-Partikel (9.28)

R-Phycoerythrin (PE) hat drei Anregungsmaxima, bei 480nm, 545nm und das effizienteste bei 565nm. Das Emissionsmaximum liegt bei 578nm (V.T. Oi et al. 1982). Da die Herstellerangaben über Filter für den Sperrbereich oft fehlerhaft sind, habe ich verschiedene Filterkombinationen getestet, um möglichst effizient anregen und das emittierte Licht auffangen zu können. Die nur teilweise vorhandenen Filterkurven der Hersteller lieferten somit nur Anhaltspunkte für den Einsatz der jeweiligen Filter. Eine Gegenüberstellung der Filterkurven war auch wenig sinnvoll, da sie keine verläßlichen Aussagen über das Absperren des Laserlichtes machten. Gemessen wurde die Trennung in Kanälen der positiven und negativen Populationen (Kanaldifferenz der Mitte jeder Population). Verwendet wurde eine 1:1 Mischung aus PE-adsorbierten und ungefärbten Latex-Partikeln, die mit 20mW (vor der Düse gemessen) bei 565nm angeregt wurden. Die Laserleistung wurde mit einem Lexel-Laserleistungsmeter (Modell 504, Polytec, Waldbronn) gemessen.

Liste der gemessenen Filter:			
Bezeichnung	Wellenlänge/Bandbreite	Hersteller	
RG610/3mm (LP)	ab 610nm offen	Schott Wiesbaden	
OG590/3mm (LP)	l ab 590nm offen	Schott Wiesbaden	
IF 600 (LP)	l ab 600nm offen	Ditric Optics USA	
IF 580 (LP)	l ab 580nm offen	Ditric Optics USA	
DF575 (BP)	575nm / 25nm	Omega Optical USA	
IF 620 (SP)	bis 620nm offen	Ditric Optics USA	

IF: Interferenz, LP: Langpaß, BP: Bandpaß, SP: Kurzpaß

Liste der Filterkombinationen:		
Filterkombination	Trennung in Kanälen	
RG610	96 (entspricht 69)	
OG590	90 (entspricht 65)	
	(Verstärkung geändert)	
OG590	65	
OG590 + IF 600	64	
OG590 + IF 580	70	
OG590 + DF575	100	
OG590 + IF 620	70	
RG610 + Filter*	< 50	

\*: OG590, IF600, IF580, DF575, IF620

Während der Messung mußte die Verstärkung geändert werden, da bei einigen Filtern die Lichtdurchlässigkeit höher als erwartet war. Um die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können, ist der Filter OG590 zweimal mit unterschiedlicher Verstärkung gemessen worden. Eine gemessene Trennung von 90 Kanälen entspricht 65 bei der geänderten Verstärkung (Umrechnungsfaktor 1.38). Die Abb. 5 zeigt einige Filterkombinationen. Bei dem Filter RG610 (oben links) wurde die Verstärkereinstellung geändert. Die 96 Kanäle der Trennung entsprechen nur 69 Kanälen im Vergleich zu den übrigen Kurven. Das beste Ergebnis wurde mit der Kombination OG590/3mm + DF575 erreicht und ergab einen Unterschied von 100 Kanälen.



**Abb. 5:** Vergleich von Filterkombinationen auf ungefärbten und gefärbten PE-Partikeln. Die beste Trennung, oben rechts, wurde mit den Filtern OG590 + DF575 erreicht; im Gegensatz dazu, unten rechts, eine schlechte Trennung mit OG590 + IF600.

# 4.2 Vergleich der Ein- und Zweipunktanregung

Man kann PE und FITC bei 488nm mit einem Argon-Ionen-Laser (Einpunktanregung) und PE bei 565nm mit dem Farbstofflaser anregen, wobei die Anregung des FITC`s mit 488nm bestehen bleibt (Zweipunktanregung). Die Ein- und Zweilaseranregung habe ich miteinander verglichen. Erwartet habe ich, daß die PE-Anregung bei 565nm zumindest genauso gut ist (Anregungsmaximum vergl. 4.1) wie die bei 488nm, obwohl die Laserleistung des Farbstofflasers geringer ist als die des Argon-Ionen-Lasers. Außerdem sollte auf eine Kompensation bei der Zweipunktanregung verzichtet werden können, da FITC und PE in zwei verschiedenen Punkten angeregt wurden. Es wurden jeweils ungefärbte mit FITC- und PE-gefärbte Partikeln (4.4, Becton Dickinson, Mountin

View, Kalifornien) gemischt und in einer Simulation meines Testsystems, Fotos von den zweidimensionalen Punkt-Diagrammen aufgenommen. Diese Partikel waren im Vergleich zu den von mir gekoppelten weniger hell und stabiler (weil kovalent gebunden) und entsprachen besser gefärbten Zellen. Angeregt wurde FITC mit 1W bei 488nm (erster Punkt) und PE mit 50mW bei 565nm (zweiter Punkt). Bei der Einpunktanregung wurden beide Fluoreszenzfarbstoffe mit 488nm angeregt. Die Abb.6 zeigt links, die kompensierte Einpunktanregung und rechts die Zweipunktanregung. Bei der 488nm Anregung zeigte sich eine etwas bessere Trennung im Rot-Kanal (Abb. 6, links) als bei der 565nm Anregung des Farbstofflasers (Abb. 6, rechts). Die Abb. 6 (rechts) zeigt, daß bei der Zweipunktanregung FITC zwar nicht in den PE-Kanal übersprechen kann, aber immer noch PE in den FITC-Kanal, weil das PE auch von dem 488nm Licht angeregt wird. Eine Kompensation kann bei einer Zweipunktanregung nicht vorgenommen werden, da die Kompensationsschaltung das verzögerte zweite Signal nicht verarbeiten kann.



Einpunktanregung Zweipunktanregung Abb. 6: PE- und FITC-Partikel in Ein- und Zweipunktanregung Die doppelt positive Population rechts sind Dubletten.

## 4.3 Fehler der Kompensationsschaltung

Bei der Verwendung von nur einem Anregungslaser (488nm) und den Fluoreszenzfarbstoffen PE und FITC muß wegen des Übersprechens der Fluoreszenz in den jeweils anderen Farbkanal kompensiert werden. Zur Kompensation wird ein einstellbarer relativer Betrag vom Signal einer fluoreszenten Zelle oder eines Partikels abgezogen. Um festzustellen, wie gut die Kompensationsschaltung im FACS 440 arbeitet, habe ich PE-, FITC-Partikel und fluoreszenzmarkierte Milzzellen mit und ohne Kompensation aufgenommen.

Abb. 7a zeigt PE- und ungefärbte  $9.28\mu$  Partikel. Die kompensierte Aufnahme (7a, links) zeigt, daß die Population auseinandergezogen ist, verglichen mit der unkompensierten Population (7a,

rechts). Hierbei handelt es sich allerdings um ein extremes Beispiel, da diese Partikel heller gefärbt die sind als vergleichbare Zellen. Abb. 7a zeigt aber besonders deutlich, daß nicht gleichmäßig den Fehlbetraganteil abzieht. Kompensierte Kompensationsschaltung Populationen müßten in unveränderter Größe erhalten bleiben, wenn der dem Übersprechen entsprechende Lichtanteil korrekt abgezogen würde. In Abb. 7b sind weniger hell gefärbte PE-, FITC-Partikel (4.4, BD) und ungefärbte gemischt. Bei der kompensierten Aufnahme (7b, links) sieht man trotzdem ein Auseinanderziehen der positiven Populationen. Außerdem zeigt sich, daß das Übersprechen von FITC in den PE-Kanal größer ist als von PE in den FITC-Kanal. Da letztlich auf Zellen gemessen werden soll, habe ich Milzzellen mit anti-MIg-Biotin/StrAv-PE und 14.8/GaRIg-FITC gefärbt (Abb. 7c), was der Doppelt-Positivkontrolle meines Testsystems entspricht. Hierbei wird sichtbar, daß der Fehler der Kompensationsschaltung sich nicht unbedingt störend bemerkbar machen muß. Ein Grund für diesen Fehler ist das Rauschen der Photovervielfacher (Rot- und Grün-Kanal) das sich dem gemessenen Signal überlagert und mit verstärkt wird.



Abb. 7: Fehler der Kompensationsschaltung auf Partikeln und Milzzellen (siehe Text).

## 4.4 FACS 440 Modifikationen

Zur effizienten Durchführung meines Projektes nahm ich unter Mitwirkung von A. Radbruch und C. Göttlinger am FACS 440 eine Reihe von Modifikationen vor.

# 4.4.1 Peltier-Zell-Kühlung

Zellkühlung ist ein wichtiger technischer Parameter bei einer Analyse und Sortierung von immunfluoreszenzmarkierten Lymphozyten, da das Zusammenziehen (Patching) und Abwerfen (Capping) der Ak (S. DePetris & C.M. Raff 1972 und M.F. Greaves et al. 1973) damit verhindert wird und die Zellen bei niedrigen Temperaturen länger überleben. Die trockene elektrische

Kühlung von Aluminiumblöcken, in denen sich die Gefäße für Zellen befinden, umgeht die Probleme, die bei herkömmlichen Wasserkühlungen (Prudehomme D., 1978), auftreten (C. Göttlinger et al. 1986). Die Abb. 8 zeigt den Prototyp des Peltier-Zell-Kühlgerätes.



Abb. 8: Peltier-Zell-Kühlgerät; 1, Aufnahme für Proben-Röhrchen; 2, Öffnung für den nicht abgelenkten Haupstrahl; 3, Aluminium-block; 4, 6, Kunststoffisolierung; 5, Warmluft-"Spoiler";
7, Peltier-Module; 8, Kühlkörper; 9, Montageöffnungen (entnommen aus C. Göttlinger et al. 1986)

Das Gerät führt über zwei Peltier-Module (Cambion Model 801-2001-01, M. Peters, Halstenbek) die Wärme der Probe in dem Aluminiumblock über die Kühlkörper (SK 85, Fischer Elektronik, Lüdenscheid) an die Umgebungsluft ab. Die aufsteigende Warmluft wird dabei von einem "Spoiler" an der Sortiereinrichtung vorbei geleitet. Als Stromversorgung wurde ein Astec AC5221S Netzteil (Astec, Stuttgart) verwendet, welches konstant 5V Gleichspannung und maximal 10A liefert. Die Peltier-Module wurden in Serie geschaltet. Von einer Raumtemperatur von 23°C ausgehend, erreicht das Gerät nach 15` eine Proben-Temperatur von unter 5°C. In Abhänigkeit von der Raumtemperatur (18-24°C) ist die Proben-Temperatur stabil zwischen 2 und

6°C. Der Aluminiumblock wirkt dabei als Wärmepuffer. Eine noch bessere Temperaturkonstantz wäre mit einer elektronischen temperaturabhängigen Regelung der Stromzufuhr zu erreichen.

#### 4.4.2 Einzel-Zell-Ablenkung

Die Abb. 9 zeigt den Schaltplan der Zusatzschaltung, die die BD-Einzel-Zell-Ablenkung (Becton Dickinson-single cell deposition control, Karte 07-12066) so verändert, daß eine varible Anzahl abzulenkender Zellen von 0 bis 999 einzustellen ist. An der Verbindung IC 7A/1 - IC 7B/11 (BD) liegt das Sortierfreigabesignal. Diese Verbindung wurde aufgetrennt und an den Schalter SW1 (Abb. 9) gelegt. In Stellung "Einzel" bleibt die BD-Schaltung unverändert und in Stellung "Variabel" wird das Flipflop (1/2 HEF 4013 B, Valvo) der Zusatzschaltung gesetzt. Dadurch werden die Impulse der Oszillatorschaltung - mit dem NE 555 (Texas Instruments) - über NAND-Gatter (1/2 HEF 4011 B, Valvo) freigegeben und die Ablenkimpulse können ausgegeben werden. Die von IC 17A/6 (BD) kommenden Ablenkimpulse werden in dem Dezimalzähler (3 HEF 4017 B, Valvo) gezählt. Wenn die mit dem Kodierschalter (3 Dekaden dezimal, Cherry) vorgegebene Anzahl der abzulenkenden Zellen erreicht ist, wird das Flipflop über NAND-Gatter (1/3 HEF 4023 B, 1/4 HEF 4011 B, Valvo) zurückgesetzt und die Ablenkimpulse werden gespert.



**Abb. 9:** Schaltplan zur Erzeugung einer variablen Anzahl von Ablenkimpulsen in Verbindung mit der BD-Einzel-Zell-Ablenkung.

#### 4.4.3 Schnell-Analyse-Halterung

Die Abb. 10 zeigt die Schnell-Analyse-Halterung mit eingehaktem Eppendorf-Röhrchen.



Abb. 10: Schnell-Analyse-Halterung; 1, Probendurchführung; 2, Druckluftanschluß; 3, Aufnahme für Eppendorf-Röhrchen; 4, O-Ringdichtung; 5, Eppendorf-Röhrchen; 6, Klammer für Eppendorf-Röhrchen.

Die Halterung wurde so angebracht, daß ein verkürzter Weg der Zellen zum Analysepunkt erreicht wurde, also eine Zeitersparniss. Es können Proben mit kleinerem Volumen als  $100\mu$ l verwendet werden. Außerdem können die Proben mit nur einem Handgriff gewechselt werden.

#### 4.4.4 Eichung der logarithmischen Verstärker

Die Kontrolle der Schaltung zur Eichung der logarithmischen Verstärker wurde mit einem Oszilloskop durchgeführt. Wie bei einem digitalen Aufbau nicht anders zu erwarten, war jedes Eichsignal jeweils doppelt so groß wie das vorhergehende. Die Abb. 11 zeigt den Schaltplan der Eichschaltung mit dem Digital-Analog-Konverter (DAC) AD667 (Analog Divices, Norwood, U.S.A.). Getriggert wird die Schaltung durch FACS-eigene Triggersignale (calibrationtrigger). Sie geben den Takt für eine dezimal-Zählerstufe (HEF 4017 B, Valvo), den DAC und die retriggerbaren Monovibratoren (HEF 4528 B, Valvo). Die Signale der Zählerstufe versorgen dann den DAC. Die treppenförmigen, jeweils sich verdoppelnden Ausgangssignale des DAC`s werden über eine Impulsformerstufe (AD583, Analog Divices) in einzelne Impulse umgeformt. Diese Eichsignale werden in die Verstärker eingespeist.



Abb. 11: Schaltplan der Eichschaltung


**Abb. 12:** Blockschaltbild der Eichschaltung innerhalb des FACS 440. Die Eichsignale werden über die Kalibrierungs-Triggersignale (Karte 07-12051) vom Testpunkt-(TP)-11 aus getaktet und über zwei BNC-Schalter in die lin/log.-Verstärker eingespeist. Die Eichschaltung ist so angebracht, daß wahlweise die Testsignale oder die Eichsignale benutzt werden können. PMT: Photo-Vervielfacher-Röhre

Die Eichschaltung wurde so installiert, daß sie nach den PMT`s und Vorverstärkern ihre Eichsignale direkt in die lin/log.-Verstärker einspeist. Nach Einspeisen der Eichsignale in den log.-Verstärker zeigte das Histogramm der Eichsignale im Anfangs- und Endbereich des log.-Verstärkers keine gleichmäßigen Abstände (Abb. 13). An der mit Hilfe der Eichsignale generierten Kennlinie des log.-Verstärkers (Abb. 14) ist zu erkennen, daß die Verstärkung im Anfangs- und Endbereich steiler als im Mittelbereich ist. Der log.-Verstärker arbeitet also nicht über den gesamten darstellbaren Bereich optimal, sondern schiebt die im Anfangs- und Endbereich dargestellten Populationen etwas zusammen.

Die ungleichen Höhen und Breiten der einzelnen Spitzen (Abb. 13) kommen durch die Verteilung des jeweiligen Signals auf zwei Kanäle zustande. Der interne Rauschgenerator, der die geräteeigenen Testsignale erzeugt, liegt auf der gleichen Signalleitung und ist durch ein Potentiometer klein gestellt. Trotzdem führt dieses Rauschen zu einer Streuung der Eichsignale jeweils über zwei oder drei Kanäle. Für die Kennlinie hat das Streuen der Signale jedoch keine Bedeutung, da nur der Kanal der jeweiligen Spitze (der Mittelwert) gemessen wurde.



**Abb. 13:** Eichsignale der digitalen Eichschaltung. Der Abstand jeder Spitze entspricht der jeweils sich verdoppelnden Spannung der Eichsignale.



Abb. 14: Kennlinie des log.-Verstärkers

Das Meßsystem des FACS 440 zeigt einen weiteren Fehler. Abb. 15 zeigt drei Histogramme mit jeweils gleichen Populationen von Testsignalen, die sich nur durch eine Verschiebung des Offsets unterscheiden. In der Mitte ist die Kurve vollständig dargestellt, rechts ist sie zur Hälfte über den rechten Rand (Kanal 250) und links über den linken Rand (Null-Kanal) hinausgeschoben. Wie an Abb. 15 rechts zu erkennen ist, wird die linke Hälfte der Kurve bei der Verschiebung nach rechts richtig dargestellt. Anders verhält es sich jedoch bei der Verschiebung nach links. Die Kurve sollte am linken Rand, sofern sie korrekt abgeschnitten worden wäre, den gleichen Kurvenverlauf zeigen wie bei der rechten Hälfte der mittleren, vollständigen Darstellung, was jedoch nicht der Fall ist. Der log.-Verstärker ordnet zu viele Zellen in den Null-Kanal und definiert zu wenige in die ersten Kanäle und täuscht somit eine vollständige Population vor. Eine Spitze im Null-Kanal ist schon bei einer geringen Anzahl von Zellen (im Null-Kanal) höher als die eigentliche Population. Die höchste Spitze wird rechts neben den Histogrammen ebenso wie die Gesamtzahl angezeigt (peak chan., Total). Bei einer Gesamtzahl von 1\*10<sup>4</sup> und einigen hundert im Null-Kanal ist der Fehler so gering, daß die Aussage des Histogramms unverändert erhalten bleibt.



**Abb. 15:** Darstellung gleicher Testsignale mit verändertem Offset bei gleicher Verstärkereinstellung.

### 4.5 Quantifizierung von Oberflächenantigenen

Mit Hilfe der Partikel definierter Fluoreszenz (vergl. 3.8.3) war es möglich, die logarithmische Verstärkerkennlinie und die Fluoreszenzkurve der Eichpartikel einander anzugleichen. Dazu wurden die Mittelwerte der Partikel in Kanälen gemessen. Die Äquivalente der Fluoreszenzpartikel (ESF) sind vom Hersteller angegeben. Die folgende Tabelle zeigt die Meßergebnisse der Eichpartikel.

Eichpartikel	mittlerer   Kanal	ESF 
Ι	104	$  6.4*10^4$
II	125	$  1.8*10^5$
III	202	1.8*10 <sup>6</sup>

Die Abb. 16 zeigt die Fluoreszenzkurve mit der Steigung der Verstärkerkennlinie und den drei verschiedenen Eichpartikeln. Die Steigung der Verstärkerkennlinie entspricht der Steigung der Fluoreszenzkurve. Die Fluoreszenzeichpartikel sind mit einem Fehler von 10% angegeben.



**Abb. 16:** Fluoreszenzkurve mit drei verschieden fluoreszenten Eichpartikeln. Horizontal sind die relativen log. Kanäle aufgetragen und vertikal das Äquivalent der Fluoreszenzmoleküle. Die Steigung der Verstärkerkennlinie entspricht der Steigung der Fluoreszenzkurve. Die Fehlerbalken entsprechen den vom Hersteller angegebenen 10%.

J.A. Ledbetter et al. (1980) gibt für Milzzellen eine Antigendichte von 370000 Thy1.2/Zelle an. Dieser Wert wurde nach dem gleichen Verfahren ermittelt, das ich angewandt habe. Thy1-Moleküle sind allerdings in sehr unterschiedlicher Anzahl auf T-Zellen vorhanden. So gibt D.W. Mason & A.F. Williams (1980) für Ratten-T-Zellen Werte von 1.5\*10<sup>5</sup> bis 1\*10<sup>6</sup> Thy1-Moleküle pro Zelle an.

Ich habe 653- und EL4-Zellen mit einem meiner mAk's (BOF1.108/GaRIg-FITC, F:P=5.8) und außerdem die EL4-Zellen mit anti-Thy1.2 (BD, F:P=3.6) gefärbt. Gemessen habe ich die Mittelwerte der jeweiligen Population in Kanälen und aus der Fluoreszenzkurve (Abb. 16) die Äquivalente der Fluoreszenzmoleküle (ESF) ermittelt. Die Werte der ungefärbten Zellen können nach J.A. Ledbetter et al. (1980) von den gefärbten Zellen abgezogen werden. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

Zellen	Färbung	mittlerer Kanal	ESF/ Zelle	ØAk/ Zelle	Mittel- wert	korri- giert*
653	ungefärbt GaRIg-FITC** BoF1.108.71/GaRIgFITC BoF1.108.9 /GaRIg-FITC	47 60 84 79	$9.4*10^{3} \\ 1.72*10^{4} \\ 4.25*10^{4} \\ 3.54*10^{4}$	1600 3000 7300 6100	6700	5100
EL4	ungefärbt GaRIgFITC** BOF1.108.71/GaRIg-FITC BoF1.108.9 /GaRIg-FITC anti-Thy1.2-FITC	34 60 100 105 181	$\begin{array}{c} 4.3^*10^3 \\ 1.72^*10^4 \\ 7.4^*10^4 \\ 8.8^*10^4 \\ 1.04^*10^6 \end{array}$	700 3000 12800 15200 290000	14000 )	13300

ØAk/Zelle: durchschnittliche Zahl der gebundenen Ak pro Zelle

\*: Die Werte der ungefärbten Zellen wurden von den Mittelwerten aus der

BoF1.108.71/BoF1.108.9 Messung abgezogen.

\*\*: Negativkontrolle

Die EL4-Zellen haben also ca. 290000 Thy1.2 Moleküle pro Zelle auf ihrer Oberfläche und ca. 13000 Moleküle werden von BoF1.108 erkannt. Die 653-Zellen haben demnach ca. 5000 Moleküle pro Zelle gebunden. Da dieser Wert nur um etwa 2000 Moleküle größer ist als der Wert des Färbehintergrundes (3000), ist es nicht eindeutig, ob der BoF1.108 ein Antigen auf den 653-Zellen erkennt.

### 4.6 Zellfusion von frischen und eingefrorenen Zellen

Um die Zellfusion mit PEG auszuprobieren, fusionierte ich zuerst Maus-Milzzellen und nicht

immunisierte Ratten-Milzzellen mit 653-Zellen als Fusionspartner. Danach fusionierte ich Ratten-Milzzellen immunisierter Ratten mit den 653-Zellen. In der folgenden Tabelle sind die Fusionsergebnisse zusammengefaßt. Die Fusionsfrequenz (FF) errechnet sich aus der Anzahl angewachsener Kolonien (AK), dividiert durch die zur Fusion eingesetzten Milzzellen (EZ): FF = AK/EZ.

Fusionstabelle:

Nr.	Milzzellen präparierte	zur Fusion eingesetzt	653-Zellen eingesetzt	angewachsene Kolonien	Fusions Frequenz
0.1	5*10 <sup>7</sup>	5*10 <sup>7</sup>	1*10 <sup>8</sup>	477	1*10-5
0.2	$1.5^{*}10^{8}$	1*107	$2*10^{7}$	178	$1.8*10^{-5}$
1	$1.5^{*}10^{8}$	1*10 <sup>8</sup>	3*10 <sup>8</sup>	127	$1.3*10^{-6}$
2	$1.3*10^{8}$	1*10 <sup>8</sup>	$2*10^{8}$	101	$1*10^{-6}$
3	$1.7^{*}10^{8}$	8*10 <sup>7</sup>	$2.5*10^{8}$	331	$4.1*10^{-6}$
		(gefrorene)			

0.1: Maus-Probefusion, 0.2: Ratten-Probefusion

Bei der Fusion Nr. 3 wurden Ratten-Milzzellen verwendet, die eingefroren und wieder aufgetaut worden waren. Es zeigte sich, daß die Fusion von 653-Zellen mit diesen Zellen ein zumindest vergleichbares Ergebnis lieferte wie die Fusionen Nr. 1 und 2. Die besten Ergebnisse in bezug auf die Fusionsfrequenzen hatten die beiden Probefusionen (0.1, 0.2). Obwohl die Maus-Maus-Fusion (0.1) ein besseres Ergebnis erwarten ließ als die Ratte-Maus-Fusion (0.2), zeigte die Ratten-Probefusion (0.2) in diesem Vergleich die höchste Fusionsfrequenz mit 1.8\*10<sup>-5</sup>. Diese hohe Fusionsfrequenz kann in Beziehung stehen zu der geringen Anzahl von Zellen die dabei eingesetzt wurden.

### 4.7 Klonierung mit dem FACS 440

Einen entscheidenden Einfluß auf das Ergebnis einer Klonierung hat die Justierung des FACS 440. Die Justierung wurde über die Einstellung der Ablenkverzögerungszeit vorgenommen, indem 30 Zellen zur Ablenkung freigegeben wurden und unter dem Mikroskop die tatsächlich abgelenkten ausgezählt wurden. Für eine sehr gut eingestellte FACS-Maschine ergaben sich 27 abgelenkte bei 30 eingestellten Zellen.

Zum Testen der Technik der Klonierung mit dem FACS 440 im Vergleich zur Verdünnungsklonierung, benutzte ich die Zellinien 267.7 $\mu$  EL4 und BoF1.108. Die EL4-Zellen

wuchsen in serumfreiem Medium, die 267.7 $\mu$  und BoF1.108-Zellen in normalem RPMI-Medium mit 10% FCS. Die Klonierung erfolgte durch Ablenkung von einzelnen lebenden Zellen, indem ein Ablenktor über das Vorwärtsstreulicht und unterhalb der PJ-positiven (toten) Zellen gesetzt wurde. Abgelenkt wurde in Mikrotiterkulturgefäßen (96-Lochplatte) in RPMI-Medium mit 10% FCS und peritonealen Makrophagen. Außerdem klonierte ich die 267.7 $\mu$  und EL4-Zellen noch in RPMI-Medium ohne Makrophagen und die EL4-Zellen in serumfreiem Medium mit und ohne Makrophagen. Die folgende Tabelle faßt die Ergebnisse zusammen.

#### Verdünnungsklonierung

Zellen	MØ	Kulturlöcher	Zellen/Loch	Kolonie	en
$267.7\mu$	+	288	0.1	55	19%
-	+	288	0.3	115	40%
	+	96	1	75	78%
	+	96	3	96	100%
	-	768	0.1 - 3	0	-/-
EL4	+	288	0.1	29	10%
	+	288	0.3	61	21%
	+	96	1	63	66%
	+	96	3	96	100%
	-	288	0.1	16	6%
	-	288	0.3	40	14%
	-	96	1	27	28%
	-	96	3	71	74%
BoF1.108	+	288	0.4	68	24%

#### FACS-Klonierung\*

Zellen	MØ	Kulturlöcher	Zellen/Loch	Kolonie	en
267.7 <i>µ</i>	+	192	1	96	50%
	+	192	2	156	81%
	+	96	10	95	99%
	+	96	30	96	100%
	-	576	1 - 30	0	-/-
EL4	+	192	1	153	80%
	+	192	2	183	95%
	+	96	10	96	100%
	+	96	30	96	100%
	-	192	1	79	41%
	-	192	2	153	80%
	-	96	10	95	99%
	-	96	30	96	100%
serumfrei	+	192	1	160	83%
serumfrei	+	192	2	176	92%
serumfrei	+	96	10	96	100%
serumfrei	+	96	30	96	100%
serumfrei	-	576	1 - 30	0	_/_
BoF1.108	+	192	1	9	5%

MØ: Makrophagen, \*: Ablenkausbeute = 27 von 30 (recovery)

Daß der FACS 440 sich sehr gut zur Klonierung eignet, zeigt die EL4-Klonierung mit Makrophagen bei der eine Klonierungseffizienz von ca. 80% erzielt wurde, also 4 von 5 nominal abgelenkten Zellen hochgewachsen waren (verglichen mit der maximalen Erwartung von ca. 90%). Die Klonierungseffizienz der 267.7 $\mu$ -Zellen war mit 50% auch ein gutes Ergebnis, wenn man berücksichtigt, daß sie im Gegensatz zu den EL4-Zellen in Medium mit 10% FCS aufgewachsen waren. Für die besonders hohe Klonierungseffizienz (80%) der EL4-Zellen waren die idealen Bedingungen mit Makrophagen verantwortlich. Den positiven Einfluß der Makrophagen auf die Klonierungseffizienz zeigt die Klonierung der 267.7 $\mu$ -Zellen in RPMI-Medium mit und ohne Makrophagen und die Klonierung der EL4-Zellen in serumfreiem Medium mit und ohne Makrophagen. Die 267.7 $\mu$  Zellen wuchsen ohne Makrophagen überhaupt nicht und die EL4-Zellen hatten nur die halbe Klonierungseffizienz.

Das schlechte Ergebnis des Hybridoms BoF1.108 bei der FACS-Klonierung wurde durch eine unstabile Einstellung des FACS 440 an dem betreffenden Tag verursacht.

### 4.8 Empfindlichkeit

Um festzustellen, wie klein eine Subpopulation sein kann, die auf dem FACS-Bildschirm noch klar erkennbar ist, habe ich gefärbte (14.8) und ungefärbte Milzzellen in verschiedenen Verhältnissen gemischt und mit dem FACS analysiert (Abb. 17). Bei der Analyse wurde das Tor auf lebende Lymphocyten gesetzt.



**Abb. 17:** Mischungen aus gefärbten und ungefärbten Milzzellen. Die Mischung 1:1000 unterschied sich auf dem Bildschirm nicht von ungefärbten Milzzellen.

Subpopulationen die größer als 0.5% (Verdünnung 1:100) der gesamten Zellen sind, können auf dem Bildschirm noch sicher erkannt werden. Um die Größe der Subpopulationen abschätzen zu können, habe ich ein Zählfenster gesetzt, wie in Abb. 17 gezeigt. Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse mit jeweils 10000 analysierten Lymphozyten.

Mischung aus gefärbten (14.8) und ungefärbten Milzzellen:

Mischungs-	Zählfenster: "14.8 positive"
verhältnis	relativ zu allen Lymphozyten
unverdünnt	45%
1:10	4.5%
1:100	0.6%
1:1000	0.23%
ungefärbt	0.21%

Die Tabelle zeigt eine gute Linearität der Ergebnisse der Zählfenster und eine Korrelation zu der optischen und subjektiven Bildschirmauswertung. Wenn man bei der Mischung 1:100 von dem Zählfensterwert 0.6% den Färbehintergrund von 0.2% abzieht, erhält man mit 0.4% fast den theoretischen Wert von 0.45%. Es können also Subpopulationen von 0.5% gefärbter Zellen sicher erkannt werden.

## 4.9 Schnell-Analyse

Mit Hilfe der Schnell-Analyse konnte eine Probe in weniger als 30<sup>\*\*</sup> analysiert werden. Die Daten können dabei auch als "list-mode"-Daten (Rohdaten) zur genaueren Re-Analyse mit "Electric-Desk" (Programm von W. Moore, Stanford Universität, Kalifornien) gespeichert werden. Dieses Programm stand mir allerdings noch nicht zur Verfügung. Bei einer Schnell-Analyse habe ich bis zu 192 Proben pro Tag typisiert, die in zwei 96-Lochplatten gefärbt worden waren. Es wäre möglich gewesen, pro Tag mehrere hundert Proben zu analysieren.

## 4.10 Effizienz der Schnell-Analyse

Um zeigen zu können, daß die Schnell-Analyse brauchbare Resultate liefert, habe ich die Anzahl der Kolonien, die ich bei der Schnell-Analyse positiv bewertet habe, den tatsächlich erhaltenen mAk`s gegenüber gestellt. Dabei habe ich sämtliche Kulturüberstände, die auch nur ansatzweise Testzellen färbten, mitgezählt, um in weiteren Tests dann die stabil positiven mAk`s zu ermitteln. Die folgende Liste zeigt die Effizienz des ersten Tests.

Fusion Nummer	Test-Zell-   Mischung	getestete     Überstände	positive 1. Test	Überstände   anti-Zell-mAk`s
1	Milz + LPS-Bl.	127	18	1 (2) + 1 aLPS-mAk
2	Milz + LPS-Bl.	101	17	(1)
3	Milz + LN + PP	331	70*	2

LN: Lymphknoten; PP: Peyer`s Patches; \*: Kreuzreaktion, siehe Text

Von den Kulturüberständen der 3. Fusion mußten 70 Überstände noch einmal analysiert werden, da das beim ersten Test benutzte GaRIg-FITC mit dem Oberflächen-Ig der B-Zellen der Test-Zell-Mischung kreuzreagierte. Die in der Spalte anti-Zell-mAk`s in Klammern gesetzten Hybridome waren auch nach mehrmaligem Testen als positiv eingestuft worden, konnten aber nicht als produzierende Klone in Kultur gehalten werden. Bei der Reklonierung erhielt ich keine positiven Klone. Insgesamt wurden bei der ersten FACS-Analyse 85% der Kulturüberstände ausgeschlossen. Bei den weiteren Analysen blieben von den im ersten Test als positiv gewerteten mAk`s 11% weiterhin positiv.

#### 4.11 Anti-Maus-Ig Antikörper

Bevor ich eine FACS-Analyse durchführte, habe ich die Hybridomüberstände mit einem ELISA-Test auf anti-Maus-Ig (aMIg) Antikörper getestet, um solche Hybridome von der Schnell-Analyse auszuschließen. Dazu hatte ich ELISA-Platten mit einer Maus-Ig-Mischung (siehe 3.4.1) beschichtet, Hybridom-Kulturüberstände darauf inkubiert und mit GaRIg-Phosphatase entwickelt. Als Negativkontrolle verwendete ich RPMI-Medium und Überstand von Y3-Zellen. Als Positivkontrolle verwendete ich H106-(aIgG2a)- und Bet1-(aIgM)-Zellkulturüberstand. Der Y3-Kulturüberstand zeigte eine 4 bis 5 mal höhere Reaktion als das RPMI-Medium. Die Positivkontrollen lagen rund 15-fach über dem Wert des RPMI-Mediums. Ich fand keinen Überstand, der den Wert der Positivkontrolle erreichte. Einzelne Überstände, die ca. den 5-fachen Wert des RPMI-Mediums ergeben hatten, waren bei der Re-Analyse wieder negativ. Ich erhielt also von meinen Fusionen keinen anti-MIg Antikörper.

## 4.12 Anti-LPS-Antikörper

Die FACS 440 Analyse ergab zwei Ak, BoF1.40 und BoF1.108, die spezifisch alle LPS-Blasten färbten. Da LPS auf der Zelloberfläche von LPS-Blasten haftet und ich mit solchen Zellen immunisierte, konnte ich erwarten, daß sich anti-LPS-Ak unter meinen Hybridom-Kulturüberständen befänden, neben solchen, die B-Zell-Differenzierungsantigene erkennen. Zur genaueren Analyse führte ich einen ELISA-Test auf LPS beschichteten Platten durch. Als Negativkontrolle verwendete ich BSA und eine MIg-Mischung (siehe 3.4.1) und als Positivkontrolle ebenfalls die MIg-Mischung aber in Verbindung mit H106- und Bet1-Zellkulturüberstand. Der BoF1.108 zeigte bei keiner Beschichtung eine positive Reaktion. BoF1.40 dagegen zeigte eine 30- bis 40-fach über der Negativkontrolle liegende Reaktion. An LPS bindet also der BoF1.40, nicht aber BoF1.108.

### 4.13 Anti-Zell-Antikörper

Die nach dem ersten Test auf einem Zellgemisch als positiv gewerteten Hybridom-Kulturüberstände wurden auf Lymphozyten der einzelnen lymphoiden Organe und auf Zellinien getestet. Bei den FACS-Analysen wurde ein Tor auf lebende Lymphocyten gesetzt (vergl. 3.8.1). Als Ergebnis meiner Untersuchungen erhielt ich drei anti-Zell-Ak, BoF1.108, BoF3.198 und BoF3.220. Die Prozentwerte bei den FACS-Analysen sind durch Zählfenster ermittelt worden. Die Abbildungen 18 bis 20 zeigen eine Zusammenstellung dieser Analysen.



**Abb. 18:** Die vier Histogramme zeigen in logarithmischer Darstellung, wie die drei verschiedenen anti-Zell-Antikörper PC140-Hybridomzellen (siehe 3.9.1) färben. Zum Vergleich wurde eine Negativkontrolle (oben links) aufgenommen. Der BoF1.108 (unten links) färbt ca. 25%, der BoF3.198 (oben rechts) ca. 40% und der BoF3.220 (unten rechts) nur ca. 5% dieser Zellinie.



**Abb. 19:** Die linke Spalte zeigt die Zellinie 1-11.9 (vergl. 3.9.1), die rechte LPS-Blasten. Oben sind jeweils die Negativ-kontrollen abgebildet. In der Mitte ist jeweils eine Färbung mit BoF1.108 zu sehen, der 1-11.9 Zellen und LPS-Blasten zu 100% färbt. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die linke und rechte Spalte an verschiedenen Tagen mit unterschiedlicher Verstärkereinstellung aufgenommen wurde. Die BoF1.108 gefärbten 1-11.9 Zellen erscheinen daher heller als die LPS-Blasten. Unten ist jeweils der BoF3.198 mit ca. 30% auf 1-11.9 Zellen und mit ca. 14% auf LPS-Blasten dargestellt.



**Abb. 20:** Die Histogramme (links) zeigen den BoF1.108 auf aktivierten T-Zellen (ConA-Blasten) und in der mittleren Spalte auf EL4-Zellen. Rechts wird der BoF3.198 auf dem Myelom X63Ag8.653 dargestellt. Zum Vergleich ist in der oberen Reihe jeweils die negativ Kontrolle abgebildet. Der BoF1.108 färbt zu 100% ConA stimulierte T-Zellen (linke Spalte) und ebenso zu 100% EL4-Zellen (mittlere Spalte). Der BoF3.198 (rechte Spalte) dagegen zeigt ein heterogenes Färbemuster auf den 653-Zellen.

Die Einzelergebnisse der verschiedenen FACS-Analysen habe ich in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

Zielzellen		l getes	teter Antikörpe	r l
		1.108	3.198	3.220
Organ	Milz	ca. 3%	ca. 1%	< 1%
C	pLN	ca. 1.5%	ca. 1%	ca. 3%
	mLN	ca. 1%	l ca. 4%	< 1%
	PP	ca. 1%	< 1%	< 1%
	BM	ca. 4%	l ca. 2%	ca. 2%
Blasten	LPS	100%	l ca. 14%	_
	DexS	ca. 50%	l ca. 5%	_
	ConA	100%	-	-
Lymphome	EL4	100%	-	-
	BW5147	100%	I -	-
	18.81.1		+/-	-
	BCL1 in vivo		I -	-
	BCL1 in vitro	-	I -	-
	K46-Ag8	+/-	-	-
Myelom	X63Ag8.653	+/-	heterogen	-
Hybridome	PC140	l ca. 25%	ca. 40%	ca. 5%
	267.7d		I -	-
	102.1		ca. 15%	-
	102.13	100%	100%	-
	1-11.9	100%	l ca. 30%	_
	B1-8	100%	I -	_
	RCc.15	100%	l ca. 10%	_

Ergebnisse der FACS 440-Analysen:

mLN: mesenteriale Lymphknoten, pLN: periphere Lymphknoten PP: Peyers`s Patches, BM: Knochenmark, +/-: sehr schwach färbend. Die verwendeten Zellen und Zellinien sind im Abschnitt 3.9.1 beschrieben.

Die folgende Tabelle zeigt Ergebnisse der Oberflächen-(s)- und kombinierten Oberflächen-Zytoplasma-(c)-Färbung auf Objektträgern (vergl. 3.10, 3.11). Dabei wurden die lymphoiden Organe ausgewählt, die bei den FACS-Analysen die größten Subpopulationen zeigten.

BoF1.108	Ziel-	Färbung	Anteil	l davon	Zellgröße
	zellen	I	Ig+	s(1.108)+	große   kleine
	Milz	sIgM+	92/200	6/92	+   -
		sIgG+	4/1000	2/4	+   -
		cIgM+	10/10 <sup>5</sup>	10/10	+   -
		cIgG+	7/10 <sup>5</sup>	7/7	+   -
	BM	sIgM+	26/500	5/26	+   -
		∣ sIgG+	37/500	9/37	+   -
		l cIgM+	4/1000	4/4	+   -
		cIgG+	11/1000	11/11	+   -
BoF3.198	Ziel-	Färbung	Anteil	l davon	Zellgröße
	zellen	I	Ig+	s(3.198)+	große   kleine
	Milz	sIgM+	43/100	2/43	-   +
		∣sIgG+	2/200	-	-   +
		l cIgM+	25/10 <sup>5</sup>	-	+   -
		cIgG+	18/10 <sup>5</sup>	2/18	+   -
	mLN	sIgM+	26/200	8/26	-   +
		sIgG+	4/500	-	-   +
		l cIgM+	9/1000	1/9	+   -
		l cIgG+	6/1000	-	+   -
	LPS-	cIgM+	44/100	3/44	+   -
	Blaster	nl cIgG+	36/100	8/36	+   -
	(d7)	cIgG1+	6/200	2/6	+   -
		cIgG3+	13/100	1/13	+   -
BoF3.220	Ziel-	Färbung	Anteil	davon	Zellgröße
	zellen	Ig+	s(3.220)+	l große lklein	e I I
	pLN	sIgM+	93/1000	2/93	-   +
		sIgG+	4/1000	-	-   +
		l cIgM+	$124/10^{5}$	4/24	+   -
		cIgG+	52/10 <sup>5</sup>	1/52	+   -

Der BoF3.220 erkennt nur eine geringe Anzahl IgM+-Zellen der lymphatischen Organe. Von den getesteten Zellinien ist nur das Hybridom PC140 mit ca. 5% positiv (Abb. 18). Der BoF3.198, der auf Zellen der lymphatischen Organe ebenfalls nur selten vertreten ist, färbt die Zellen mehrerer Zellinien. Mit Hilfe der Zählfenster des FACS 440, ermittelte ich auf PC140-Zellen ca. 40% und auf LPS-Blasten ca. 14%, bei einem Färbehintergrund von 0.15%. Dabei möchte ich darauf hinweisen, daß das Setzen des Zählfensters bei Zellinien oder Blasten nicht so kritisch war wie bei den Zellen der lymphatischen Organe, da es sich hierbei um einheitliche Populationen handelte. Von den LPS-Blasten waren ca. 3% IgM+/3.198+ und 8% IgG+/3.198+ positiv (Objektträger). Das Färbemuster des BoF1.108 läßt erwarten, daß dieser mAk ein Antigen erkennt, das für aktivierte Bund T-Zellen kennzeichnend ist. Es könnte sich dabei um einen anti-Ia-Ak oder einen anti-Transferrin-Rezeptor-Ak handeln. Dagegen spricht, daß, wie aus der Liste der B-Zell-Oberflächenmarker (siehe 5.5) hervor geht, der anti-Ia-Ak M5/114 ConA-Blasten aber keine T-Zellen aus der Milz färbt. M5/114 färbt im Gegensatz zu BoF1.108 keine BW5147- oder EL4-Zellen (A. Bhattacharya et al. 1981). Nachdem die Zellen R17.217.13, die den anti-Transferrin-Rezeptor-Ak produzieren, in Kultur genommen worden waren, habe ich diesen Kulturüberstand mit BoF1.108 auf der pre-B-Zellinie 18.81.1 verglichen. Die Abb. 21 zeigt die Färbung der 18.81.1 Zellen zum einen mit dem BoF1.108 (linke, negative Kurve) und zum anderen mit dem anti-Transferrin-Rezeptor-Ak (rechte, positive Kurve).



**Abb. 21:** Übereinanderprojezierte Kurven der Färbung mit BoF1.108, links und mit dem anti-Transferrin-Rezeptor-Ak, rechts.

Die linke Kurve der Abb. 21, entspricht (deckungsgleich) der Negativkontrolle der 18.81.1 Zellen. Die 18.81.1 Zellen haben also einen Transferrin-Rezeptor, der von R17.217.13 erkannt wird. Da BoF1.108 diese Zellen nicht färbt, erkennt er also auch nicht den Transferrin-Rezeptor, zumindest nicht den der pre-B-Zellen. Der BoF1.108 erkennt also eine neuartige Determinante, die speziell auf aktivierten, proliferierenden B- und T-Zellen zu finden ist, nicht aber auf proliferierenden pre-B-Zellen. Um festzustellen, welche aktivierten B-Zellen BoF1.108 in der Maus erkennt, analysierte ich Milz- und Knochenmarkzellen mit einer Doppelfluoreszenzfärbung mit anti-IgM/BoF1.108 und mit anti-IgG/BoF1.108. Parallel zur FACS-Analyse habe ich die Zellen mit einer kombinierten Oberflächen- und Zytoplasmafärbung auf Objektträgern analysiert. Auf Milzzellen erkennt BoF1.108 etwa 7% der IgM<sup>+</sup>-Zellen und etwa die Hälfte der IgG<sup>+</sup>. Auf Knochenmarkzellen sind es etwa 20% der IgM<sup>+</sup>-Zellen und etwa 25% der IgG<sup>+</sup>.

#### 5 Diskussion

#### 5.1 Anwendung von FITC, PE und Fluoreszenzkompensation

Zur Realisierung einer zweidimensionalen Fluoreszenzanalyse gibt es verschiedene Lösungsmöglichkeiten. Eine Möglichkeit zeigte M.R. Loken et al. (1977), der mit einem Laser (488nm- und 514nm-Linie) zwei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe anregte. Dies hatte den Nachteil, daß von dem 514nm-Anregungslicht ein Teil im FITC-Kanal mit gemessen und auf elekrtonischem Wege abgezogen (kompensiert) werden mußte. Eine andere Möglichkeit ist durch eine Zweipunktanregung mit einem Argon-Ionen-Lasen (488nm) und einem Farbstofflaser gegeben (D.J. Arndt-Jovin 1980). Die Zweipunktanregung mit den Fluoreszenzfarbstoffen FITC und TR hat sich auch als vorteilhaft erwiesen (R.R. Hardy et al. 1982), da hierbei eine Kompensation nicht notwendig ist.

Unter den roten Fluoreszenzfarbstoffen hat PE eine der höchsten Lichtquantenausbeuten und kann gleichzeitig bei 488nm, 545nm und bei 565nm effizient angeregt werden (V.T. Oi et al. 1982). Dies macht den Einsatz von FITC und PE in Verbindung mit einer Ein- oder Zwei-Laser-Anregung möglich. Da die Fluoreszenzspektren von PE und FITC überlappen, ist eine Kompensation der gemessenen Werte bei einer zweidimensionalen Fluoreszenzanalyse erforderlich. Ein Nachteil der Kompensation ist, daß die positiven Populationen in Kompensationsrichtung breiter gestreut sind. Außerdem muß vor jeder Analyse die Kompensation jeweils mit PE- und FITC-Kontrollfärbungen eingestellt werden, da sonst ein zuverlässiges Ergebnis einer Analyse nicht gewährleistet ist.

Da bei einer Zweipunktanregung die Kompensation des FITC's überflüssig wird und PE sein Anregungsmaximum bei 565nm hat, habe ich eine Anregung mit dem 488nm Laser und dem Farbstofflaser versucht. Die Trennung im Rot-Kanal war fast gleich gut wie bei der Einlaseranregung. Da aber bei der Zweipunktanregung PE nicht nur von dem 565nm, sondern auch von dem 488nm Laserlicht angeregt wird, kam es zu einem Übersprechen des PE's in den Grün-Kanal. Das Übersprechen konnte nicht kompensiert werden, weil die Kompensationsschaltung keine zeitversetzten Signale verarbeiten kann. Die Zweipunktanregung hat sich somit, bei Verwendung von PE und FITC, als nicht vorteilhaft erwiesen.

# 5.2 Darstellung mit dem logarithmischen Verstärker und Quantifizierung von Oberflächenantigenen

Die Eichung der logarithmischen Verstärker ergab eine engere Darstellung der Eichsignale, sowohl zu Beginn als auch gegen Ende des Verstärkungsbereiches (vergl. Abb. 13). Dies wird auch an der, im Anfangs- und Endbereich, steileren Kennlinie des log.-Verstärkers (Abb. 14) deutlich. Diese Ungleichmäßigkeit wird eindeutig durch den log.-Verstärker verursacht, da die Eichsignale digital erzeugt wurden. Störend wirkt sich das unterschiedliche Verhalten des Meßsystems des FACS 440 am unteren (Null-Kanal) und oberen (Kanal 250) Ende des Verstärkerbereiches bei der

Histogrammdarstellung aus (vergl. Abb. 15). Bei Populationen, die die Grenzen der Skala überschreiten, wird am oberen Ende das Histogramm korrekt abgeschnitten, während am unteren Ende die Population im Histogramm kleiner dargestellt, dabei aber nicht abgeschnitten, sondern der Kurvenverlauf verändert wird. Dies ist ein echter Fehler des im FACS 440 verwandten Meßsystems. Es muß also während einer Analyse darauf geachtet werden, daß eine Population stets vollständig dargestellt wird und keine Zellen bzw. deren Signale in den Null-Kanal fallen. Da die negative Population, die immer in der Nähe des Null-Kanals liegt, z.B. durch Abfall der Laserleistung in den Null-Kanal hineinwandern kann und dabei nur scheinbar kleiner wird, könnte sie ein positives Analyseergebnis vortäuschen. Daher muß nach jeder Analyse eine Kontrolle mit Hühnererytrozyten vorgenommen werden. Die Eichsignale in Verbindung mit standardisierten Partikeln ermöglichen es, Analysen, die an unterschiedlichen Tagen erfolgten, miteinander zu vergleichen - unabhänig von der Verstärker- und Offseteinstellung. Für einen einfachen Vergleich reichen Partikel gleichbleibender Fluoreszenz. Vorteilhaft ist die routinemäßige Verwendung von Pratikeln mit definierter Fluoreszenz, da hiermit zusätzlich eine Quantifizierung der Oberflächenantigene erfolgen kann. Das ungleichmäßige Verhalten des log.-Verstärkers beeinflusste die Quantifizierung der Oberflächenantigenen nicht, weil die Eichkurve mit einbezogen wurde. Die Bestimmung der Anzahl von Oberflächenantigenen erfolgte nur der Größenordnung nach, da Fehlerquellen wie der interne Rauschgenerator, unspezifische Einstreuungen, Rauschen und Schwankungen des Lasers und des optoelektronischen Systems nicht ohne weiteres zu erfassen sind. Daher habe ich mich auf die Angabe der Größenordnung beschränkt. Nach C.G. Fathman et al. (1975) nimmt mit zunehmender Reifung der T-Zellen die Zahl der Thy1.2-Moleküle pro Zelle ab. D.W. Mason & A.F. Williams (1980) geben für Thy1.1positive-Rattenzellen einen Bereich von 150000 bis 1000000 Thy1-Molekülen pro Zelle an und J.A. Ledbetter et al. (1980) einen Mittelwert von 370000 Thy1.2-Molekülen für Maus-Milzzellen. Von mir wurde ein Wert von 290000 Thy1.2-Molekülen pro EL4-Zelle gemessen. Der BoF1.108 erkannte aber nur rund 13300 Oberflächenmoleküle auf EL4-Zellen. Demnach scheint das von BoF1.108 erkannte Antigen in nur geringer Anzahl vorhanden zu sein. Inwieweit die indirekte Färbung mit BoF1.108/GaRIg-FITC dieses Ergebnis beeinflußt, könnte nur ein Vergleich mit dem direkt gekoppelten Antikörper zeigen.

### 5.3 Zellfusion und Klonierung

Zellfusionen habe ich sowohl mit frischen als auch mit gefrorenen bzw. wieder aufgetauten Milzzellen durchgeführt. Die Überlegung dabei war, daß die Membran eingefrorener Zellen geschädigt und dadurch im Vergleich zur Fusion mit frischen proliferierenden Zellen die Fusionsfrequenz erhöht würde. Anhand meiner Ergebnisse kann gezeigt werden, daß eine Fusion, die mit eingefrorenen Zellen durchgeführt wurde, zumindest genauso gut funktioniert wie die vergleichbaren Fusionen mit frisch präparierten Ratten-Milzzellen (vergl. 4.6). Die Gesamtzahl der durchgeführten Fusionen ist noch zu gering, um eine endgültige Aussage zu machen. Der Vergleich der Fusionsdaten zeigt, daß die beiden Probefusionen, bei denen die geringste Anzahl an

Zellen zur Fusion eingesetzt wurden, die höchsten Fusionsfrequenzen erzielten. Demnach könnte die Anzahl der zur Fusion eingesetzen Zellen Einfluß auf die Fusionsfrequenz haben.

Die Ergebnisse der Klonierung mit Hilfe des FACS 440 zeigen, daß sich dieser grundsätzlich sehr gut zu einer Klonierung eignet. Nachteilig wirkt sich aus, daß die volle Leistungsfähigkeit des FACS 440 im Routinebetrieb nicht in jedem Fall gewährleistet ist.

Die Verdünnungsklonierung hat den Nachteil, daß statistische Fehler und Verdünnungsfehler auftreten und das Dubletten nicht ausgeschlossen werden können. Außerdem müssen ca. dreimal soviele 96-Lochplatten bearbeitet werden wie bei der FACS-Klonierung. Bei der FACS-Klonierung muß vor allem auf eine gute und stabiele Ablenkausbeute geachtet werden. Eine Ablenkausbeute von 27 abgelenkte bei 30 eingestellten Zellen ist sehr gut. Ich habe sie bei meinen FACS-Klonierungen, mit Ausnahme der BoF1.108-Klonierung, immer erreicht. Im Unterschied zur Verdünnungsklonierung muß ich noch darauf hinweisen, daß der FACS 440 eine Schaltung besitzt, die Dubletten erkennt und ausschließt, wenn sie aktiviert wurde. Außerdem hat der FACS den Vorteil, daß nur lebende und, wenn die Zellen gefärbt worden waren, der richtigen Fluoreszenz entsprechende Zellen abgelenkt werden. Die 80% ige Klonierungseffizienz der EL4-Zellen konnte durch die sehr gute Einstellung der Maschine und die Unempfindlichkeit der Zellen, erzielt werden, da die EL4-Zellen in serumfreiem Medium wuchsen und in Medium mit FCS und Makrophagen kloniert wurden. Die 50% ige Klonierungseffizienz der 267.7 Zellen ist ein Beispiel für, die Größenordnung, die bei einem sehr gut eingestellten FACS 440 zu erwarten ist, da die 267.7 Zellen unter normalen Kulturbedingungen in RPMI-Medium mit 10% FCS aufwuchsen.

## 5.4 Das Testsystem

Zur Analyse von oberflächengefärbten Zellen habe ich ein Testsystem mit dem FACS 440 aufgebaut. Die Benutzung der FACS-Maschine hat sich als vorteilhaft erwiesen, da hier mehrere Parameter gleichzeitig verwendet werden können, zwei davon als Fluoreszenzparameter für Zelldeterminanten (M.R. Loken et al. 1977). Vor allem können bei der Analyse von Zellen der lymphoiden Organe, Subpopulationen entdeckt werden, die sich durch eine Korrelation von zwei (oder mehr) Oberflächendeterminanten auszeichnen (R.R. Hardy et al. 1982), was eine Vereinfachung der Analyse von Subpopulationen darstellt. Durch die Musterbilderkennung (vergl. Abb. 3) wurde die Analyse von Subpopulationen sehr schnell möglich. Im Gegensatz zur FACS-Analyse kann mit einem Zell-ELISA nur ein Parameter analysiert werden. Da hierbei eine Oberflächendeterminante nur durch ihre Verteilung in der Gesamtpopulation zu bestimmen ist, können Subpopulationen nicht ausgemacht werden. Außerdem ist die Empfindlichkeit eines Zell-ELISA's wegen des hohen Färbehintergrundes gering (R. Mierau, pers. Mitteilung). Wie gut das Testsystem mit dem FACS 440 arbeitet zeigt sich an der Größe einer entdeckbaren Subpopulation und der Anzahl der analysierbaren Proben. In Abschnitt 4.8 habe ich gezeigt, daß auf dem Bildschirm eine Subpopulation von 0.5% entdeckt werden kann. Die durch die Zählfenster erhaltenen Werte können durch die Position des Tores (180°/PJ oder 180°/90°) von den tatsächlichen etwas abweichen, da durch das Tor eine Vorauswahl der zu analysierenden

Lymphotzyten getroffen wurde.

Zum Testsystem gehörte auch das Färben und Waschen der Zellen in 96-Lochplatten. Der Vorteil der 96-Lochplatten besteht darin, daß viele Proben, bzw. mehrere Platten, innerhalb kurzer Zeit bearbeitet werden können. Die sich anschließende Schnell-Analyse zeigte, daß mehrere hundert Analysen pro Tag möglich sind. Ein Nachteil der Schnell-Analyse ist möglicherweise, daß auf das Aufnehmen von Kurven oder Fotos verzichtet werden mußte, da sonst der zeitliche Aufwand selbst für nur 100 Proben zu groß werden würde. Inzwischen ist es jedoch möglich, diese Anzahl von Analysen durch "Electric-Desk" und "list-mode-Technik" durchzuführen, da hierbei die Rohdaten sofort abgespeichert werden.

Die Effizienz des Testsystems zeigt sich darin, daß von 35 im 1. Test als positiv eingestuften Hybridomen, 4 auch tatsächlich positiv waren. Um die Anzahl nicht erfasster positiver Hybridome so niedrig wie möglich zu halten, habe ich Kulturüberstände, die sich geringfügig aus der negativen Population abhoben, zuerst alle als positiv gewertet und erst ausgeschlossen, nachdem die nachfolgenden Analysen kein eindeutig positives Ergebnis zeigten. Im Vergleich zu der 4-Parameteranalyse hat die 5-Parameteranalyse den Vorteil, daß ein Parameter für 90-Streulichtverteilung genutzt werden kann, ohne auf den Ausschluß von toten Zellen mit PJ verzichten zu müssen. Der Anteil an toten Zellen beträgt bei Zellen aus lymphatischen Organen 3% bis 5%. Durch einen Ficoll-Gradienten könnte zwar die Anzahl toter Zellen verringert werden, nicht aber die Anzahl jener, die während einer Färbung, bzw. Analyse sterben. Voraussetzung für eine empfindliche Analyse (Subpopulation von 0.5-1%) ist der Ausschluß toter Zellen.

## 5.5 Anti-Zell-Antikörper

Als Ergebnis meiner Analysen erhielt ich drei anti-Zell-Antikörper, die jeweils ein unterschiedliches Färbemuster auf verschiedenen Zellen und Zellinien zeigten. Um eine Zuordnung zu bereits bekannten Oberflächenmarkern vornehmen zu können und damit eine Strategie für weiterführende Untersuchungen festzulegen, habe ich eine Zusammenstellung von B-Zell-Oberflächenmarkern angefertigt. Bei der Zusammenstellung wurden die B-Zell-Entwicklung, -Lokalisation und andere Zellen als B-Zellen mit berücksichtigt. Zum Vergleich habe ich eine Zusammenfassung meiner Analyseergebnisse, der sich anschließenden Liste der Oberflächenmarker, vorangestellt.

Der BoF3.220 färbt die geringste Anzahl an Zellen von den drei anti-Zell-mAk`s. Die höchste Frequenz an BoF3.220<sup>+</sup>-Zellen zeigt das Hybridom PC140 mit ca. 5%. Die geringsten Prozentzahlen (0.5-3%) hat der BoF3.220 auf den Zellen der lymphatischen Organe. Da ich nur einen geringen Prozentsatz an BoF3.220<sup>+</sup>/IgM<sup>+</sup> B-Zellen in den lymphoiden Organan gefunden habe, ist sicher, daß nur eine sehr kleine IgM<sup>+</sup>-Subpopulation von BoF3.220 erkannt wird. Eine Übereinstimmung mit einem in der Liste aufgeführten Ak`s besteht nicht.

Der BoF3.198 erkennt ein Differenzierungsantigen einer Subpopulation von IgM+-B-Zellen und

eine Subpopulation aktivierter B-Zellen (LPS-Blasten), die IgM oder IgG<sup>+</sup> sind. Aufgrund meiner bisherigen Untersuchungen ist eine weitere Aussage auch nach einem Vergleich mit anderen, bisher bekannten B-Zell-Oberflächenmarkern nicht möglich, da keiner der in der Tabelle aufgelisteten Marker ein ähnliches Färbemuster zeigt.

Der BoF1.108, dessen Zieldeterminante nur auf wenigen Zellen aus lymphatischen Organen vorhanden ist, erkennt alle mit LPS aktivierten B- und alle mit ConA aktivierten T-Zellen. Diese Determinante ist auch auf einigen, aber nicht allen Hybridomzellen vorhanden.

Im Gegensatz zu nicht proliferierenden Zellen expremieren proliferierende einen Rezeptor für Transferrin. Der BoF1.108 könnte ein solcher anti-Transferrin-Rezeptor-Ak sein, da er auch proliferierende Zellen erkennt. Der Vergleich von BoF1.108 mit dem mAk R17.217.13, der den Transferrin-Rezeptor erkennt, zeigt, daß der Transferrin-Rezeptor auf den 18.81.1-Zellen exprimiert wird, nicht aber der BoF1.108 (vergl. Abb. 21). Der BoF1.108 erkennt also keinen Transferrin-Rezeptor, zumindest nicht den, der auf den 18.81.1-Zellen expremiert wird.

Das Ia Antigen findet sich auf Makrophagen, T-Zellen und B-Zellen (M. Steinmetz et al. 1982) und wird von B- und T-Zellen bei Aktivierung verstärkt exprimiert. Der anti-Ia-Ak M5/114 erkennt zwar ConA aktivierte T-Zellen aber keine EL4-Zellen oder BW5147-Zellen (A. Bhattacharya et al. 1981). Da der BoF1.108 aber EL4- und BW5147-Zellen zu 100% färbt ist seine Zieldeterminante zumindest nicht das klassische Ia Molekül.

Das Färbemuster des BoF1.108 zeigt mit dem in der Liste aufgeführten MALA-1 Antigen insoweit eine Übereinstimmung, als das MALA-1 Antigen auch auf allen aktivierten Lymphozyten vorhanden ist. Da das MALA-1 Antigen aber zu 25% auf normalen Lymphknotenzellen vorkommt, im Gegensatz zu dem von BoF1.108 erkannten (ca. 1%), kann es nicht mit dem von BoF1.108 erkannten identisch sein. Alle anderen in der Liste aufgeführten Ak`s erkennen andere Oberflächenmoleküle, weil sie andere Zelltypen bzw. andere Subpopulationen erkennen als BoF1.108. Die Untersuchungen der Organ- und Ig-Spezifität ergaben für BoF1.108-positive Zellen einen geringen Anteil (3%) an sIgM- und einen noch geringeren (0.2%) an sIgG-positiven-Zellen in der Milz. Der Hypothese von Benner et al. (1981) folgend, daß aktivierte B-Zellen in das Knochenmark wandern, wo sie zu Plasmazellen differenzieren, habe ich Knochenmark-B-Zellen auf BoF1.108<sup>+</sup> untersuch und einen Anteil von 4% (2% IgG<sup>+</sup>) gefunden. Wenn ich dieses Ergebnis mit den Untersuchungen von I.M.C. MacLennan et al. (1986) und F. Ho et al. (1986) in Verbindung bringe, die zeigten, daß IgG-positive Plasmazellen im Knochenmark existieren, deren Lebensdauer mehr als zehn Tage beträgt, besteht die Möglichkeit, daß der BoF1.108 auch Gedächtniszellen anfärbt. Dies kann bisher nicht mit Sicherheit gesagt werden.

Das Aussortieren IgG-BoF1.108-positiver B-Zellen mit dem FACS und anschließendem Transfer in eine bestrahlte Maus könnte den Zusammenhang mit Gedächtniszellen zeigen.

		lPhänot	yp (Ig)		Lymp	hoide Org	gane (tot	al)			
l BoF	l pre-B	I M	G	I PC	BM	Milz	lpLN	PP	l mLN	T-	Eigenschaften
I	Zelle	Ι	I	Ι	Ι	I	Ī	I	I	lZellen	
				100%				I		10.5-1%	erkennt alle
1.108	-	7%	50%	LPS-	4%	3%	1.5%	1%	1%	100%	aktivierten
Ι	I	I	I	Blasten	1	Ι	Ι	Ι	Ι	IConA-H	Bl Lymphozyten l
				l3%IgM	[]						erkennt Sub-
3.198	-	5%	-	l8%IgG	1 2%	1%	1%	.5-1%	4%	-	lpopulati. akti- l
I	I	I	I	ILPS-BI	.1	I	Ι	Ι	Ι	Ι	lvierte B-Zellenl
											erkennt eine
13.220	-	1 2%	-	-	1 2%	.5-1%	3%	.5-1%	.5-1%	-	kleine B-Zell-
I	I	I	I	I	Ι	I	Ι	Ι	Ι	Ι	Subpopulation

Zusammenfassung der Analyseergebnisse

PC: Plasmazellen, BM: Knochenmark, pLN: periphere Lymphknoten, PP: Peyer`s Patches, mLN: mesenteriale Lymphknoten

_		2	ellen		B-Zel.	1-Phänot)	vp (Ig)		!	Lymph	oide On	rgane (	total)			andere		
Marker	M	Stamm p	10-	pre-B	Σ	Q+M	9	٨	PC	BM M	lilz	PLN P	- - -	<u>ں</u>	-	amatop.	Eigenschaften	Referenzen
(Ak)	[kd]		re-B								-			7	ellen	Zellen		
												+		-	+:%0		GC-Marker	R.A. Reichert et al. (1983)
PNA					schwach	schwach	+	+	schwach			bis 5	-	+	est  s	chwach	PNA pos. Zellen	E.C. Butcher et al. (1982)
					bis -	bis -						-   7	.0%	sc	hwach		sind sIg schwach	G. Kraal et al. (1982)
B220								 	1					MG	nige			Coffman & Weissman (1981)
(14.8)	220		+	+	+	+	+	+	5%:LPS	24-	40-	35-		<u>۲</u>	t-2-1	1	B-Zell-Marker	P.W. Kincade et al. (1981)
(RA3-3A1)								ш	lasten	30%	50% 4	45%		Ze	llen+			M. Sarmiento et al. (1982)
																	erkennt preB-,	R.L. Coffman &
(RA3-2C2)	50	1		+	. +	+	+	+	+	32%	45%	18%		+	•	,	alle B-Zellen	I.L. Weissman (1981)
									meist								und meisten PC	R.L. Coffman (1982)
														-			erkennt Homing-	W.M. Gallatin et al. (1983)
MEL-14	-08			wenige					1			+			-3%	1	Rezeptor der PLN,	S. Jalkanen et al. (1986)
_	90					_											inhibiert Bin-	P.J. Fink et al. (1985)
																	dung an PLN-PEV	
MALA-1					-				100%					SC	hwach		erkennt	
(YE3/19.1)	14-								LPS-	3%	4%	25%		<u>ں</u>	nA: +	1	aktivierte	F. Takei (1984)
	18							E	lasten					_	100%)		B- und I-Zellen	
																HIØ: +	erkennt B-Zell-	R.R. Hardy et al. (1984)
BLA-1				+	+/2	+/2	+		+	5%	17%	%		+	1	Erys:+	Subpopulation	
(53-10.1)									LPS-	(B)	(B)	(B)	·		<u> </u>	umor:+	während der	J.A. Ledbetter &
								<u> </u>	lasten								B-Zell-Reifung	L.A. Herzenberg (1979)
																+ :ØW	erkennt B-Zell-	R.R. Hardy et al. (1984)
BLA-2				+	+/2	+/2	1		+	5%	10% (	0.5%		+	,	Erys:+	Subpopulation	
(30-E2)									LPS-	(B)	(B)	(B)			_	umor:+	während der	J.A. Ledbetter &
								E	lasten								B-Zell-Reifung	L.A. Herzenberg (1979)
																	)ifferenzierungs-	J.P. McKearn &
AA4			+	100%	40%	•	1	,	'	20-	14%	5%			,	1	antigen, bereits	N. Rosenberg (1985)
-					1					26%		-		_	-	hymus5%	in fetaler Leber	J.P. McKearn et al. (1985)
				L													)ifferenzierungs-	J.P. McKearn &
GF1			+	50%	60%	1	1	1	1	%8	13%	8%			,	1	antigen, bereits	N. Rosenberg (1985)
					1									_	-	hymus4%	in fetaler Leber	J.P. McKearn et al. (1985)
	PC: P	lasmazel	len,	BM: Kno	chenmark	, PLN: pt	eripher	te Lymp	ohknoten.	, PP: P	'eyer`s Die De-	Patche	s, MØ:	Makro	phagen,	GC: ger	minale Zentren, B:	B-Zellen,
-	PEV: F	postkapı	lare	endothe.	liale ve	nolen, ri	NA: PEE	nutago	JIULITUL	:7/+ (	Die ro	pulatio	IL LEIT	t sıcn	•			

**B-Zell Oberflächenmarker** 

			Zeller		B-Zel	1-Phänot	typ (Ig			Lympt	noide (	Irgane	(total		ande	e	
Marker	Ĩ	Stamm	-old	pre-b	Σ	£ ₽		A		WA	11 IZ	PLN			F- hamat	<pre>p. Eigenschaften</pre>	Referenzen
(Ak)	[kd]		pre-B											Ze	llen Zell	u li	
																Marker für	J.P. McKearn &
D3D3			ı	ı	,	ı	ı	ı	+		<u></u>				•	sezernierende	N. Rosenberg (1985)
											_					Plasmazellen	
															Plasm	a-,	FW. Shen et al. (1982a)
PC.1	110-			ı	ı	ı			+		+				- Neur	)- PC-Marker	I.R. van Driel et al. (1985)
(Serum)	120											_			zytom	+	JS. Tung & E.A.Boyse (1980)
									25%					33	-54% Prono	rmo Marker für proli	- J. Lesley et al. (1984)
(R17.217	95	+							LPS-	2%	5%	2%		C0	.A-  bl.b	is ferierende Zelle	n W. Judd et al. (1980)
.13)								-	Blasten		_			B1a	sten Retic	ul+ Transferrinrezep	
														unr	eife Erys:	+ erkennt die	J. Bruce et al. (1981)
J11-d		ı	+	+	+		ł		-//+	80-	+	+	+		+ M01:	- meisten nicht	J.P. McKearn &
		meist								90%				rei	fe:- Thymu	s:+ aktivierten LC	N. Rosenberg (1985)
										1					PerC	3- Charakterisiert	K. Hayakawa et al. (1983& 85)
Ly-1	67-				+	+			1	(B)	1-2%	1		+	+ Zelle	1: eine B-Zell-Ent	-  L.L. Lanier et al. (1981)
	2									+bun	(B)	(B)	(B)	(B)	10-21	)%   wicklungslinie	K. Hayakawa et al. (1986)
																erkennt:AaAb/EaE	o R.N. Germain et al. (1982)
Ia	28+		ı	1	+	+						+			- Mg	<ul> <li>inhibiert I-Zell</li> </ul>	A. Bhattacharya et al. (1981)
(M5/114)	35													Con	4: +	Proliferation	
									+					IUL	eife	erkennt pre B-	Eckhardt & Herzenberg (1980)
ThB	16			+	+	+		<u> </u>	LPS-	15%	42-	17%			' 	und alle B-	R.L. Coffman (1982)
(49-h4)									Blasten		44%			rei	fe:-	Zellen	Matossian-Rogers et al.(1982)
									IgM:+							Fc Rezeptor	J. Ding-E Young et al. (1983)
FcR	47-		+	+	30%	+			IgG:-	+	+		<u> </u>		- : jdw	-   bindet IgG	J. Michl et al. (1983a,b)
(2.4G2)	90																C. Baum & J.P. McKearn (1984)
								~	+%57-0t							Differenzierungs	- A.Chayen & R.Parkhouse (1982)
NIM-R2		ł		+	+	+			.PS-Bla	64%	25%	6.5%	14%	sch	wach Erys:	+ Antigen, PNA: +	Marshall-Clarke et al. (1982)
								0	sten: -							Memory: schwach	
								<u>,                                     </u>	0-25%+							Differenzierungs	- A.Chayen & R.Parkhouse (1982)
NIM-R3		ł		ł	+	+			PS-Bla	33%	80 %	2.4%	1.4%		' 	Antigen,	
									sten: -			-				NIM-R2: -	
-	PC: P.	lasmaze	illen,	BM: Kn	ochenmar	k, PLN:	periph	ere Lyn	nphknoter	, PP:	Peyer	s Patc	hes, M	J: Makro	phagen, GC	germinale Zentren,	B: B-Zellen,
	PEV:	postkap	ilare	endoth	eliale V	enolen,	PNA: P	eanutac	alutinir	. PerC	: peri	toneal	e Zelle	en. LC:	-vmphozvter	,	
										-					···· / -···· / -··· / -		

B-Zell Oberflächenmarker

62

		Zei	len	B-Z	ell-Phän	otyp (1	(b)		Lymp	hoide	Organe	(total			andere		
Marker	Æ	Stamm pro	- pre	м -В	Q+W	5	A	PC	ВМ	Milz	PLN	РР	3	Ļ	amatop.	Eigenschaften	Referenzen
(Ak)	[kd]	Dre	-B										. 7	Zellen	Zellen		
														-	nyeloide	blockiert CTL-Fkt	D. Davigon et al. (1981)
LFA-1	95+			+	+				75%	93%				+	cilen:+	ähnliches Molekül	Sanchez-Madrid et al. (1983)
(M7/14)	180														CTL:+	wie von MAC-1 erk	K. Kürzinger et al. (1982)
Lgp100															lasma-	erkennt fast alle	Ledbetter & Herzenberg (1979)
(M7/83)	95-			+	+				40%	-27	+	+		+	sytom:+	LC, alloantigen	D. Davigon et al. (1981)
(30-C7)	100				_					80%					hymus:+	spezifisch	J.A. Ledbetter et al. (1979)
																kennzeichnet eine	FW. Shen et al. (1982a)
Lna-1				+	+			-/+	ı	+	30-			+	-:snmus:-	B- und I-Zell-	FW. Shen et al. (1982b)
(Serum)											40%					Subpopulation	
MAC-1															+:ØW	MØ-Marker	Sanchez-Madrid et al. (1983)
(M1/70.	95+				1				49-	-9 -	2%			ı	CTL:+	blockiert Komple-	<pre>I. Springer et al. (1978)</pre>
15)	180								50%	10%				-		mentrezeptor Typ3	K. Kürzinger et al. (1982)
								+							Erys: +	erkennt eine B-	
(1468)				30%	+			LPS-	2.8%	22%	1%			1	erC 55%	Zell-Subpopula-	J.T. Kung et al. (1982a)
_								Blasten	19% B		9% B	-			Thymus1%	tion (30-40%)	
								+							30% der	erkennt alle B-	
(14D10)			+	+	+			LPS-	30-	71%	42%			+	-yt-2-1-	Zellen und eine	J.T. Kung et al. (1982b)
								Blasten	39%						Tellen:+	I-Zell-Subpopul.	
									10%T							erkennt I-Helfer	D.P. Dialynas et al. (1983a)
L314	52								50%	20-				75-85%		blockiert Lympho-	D.P. Dialynas et al. (1983b)
(GK1.5)									Thy1 <sup>-</sup>	23%		-				kinfreisetzung	
Thy1.2															Thymus:	T-Zell- und	Ledbetter & Herzengerg (1979)
(53-2.1)	25-	+			1	1	ı	1	1-4%	30-	57-			+	97-100%	Stammzellmarker	J.A. Ledbetter et al. (1980)
(30-H12)	30									35%	78%						
								+								haupsächlich	Eckhardt & Herzenberg (1980)
Ly-6	33.5							LPS		35%				+	Thymus:	auf I-Zellen	Matossian-Rogers et al.(1982)
								Blasten							8%		
	C: PI	asmazellt	sn, BM:	Knochenii	ark, PLN	: perip	here L	ymphknote	sn, PP:	: Peyer	's Patc	ches, M	Ø: Mak	rophage	, GC: g	srminale Zentren, B	: B-Zellen,
	PEV: p	ostkapil:	ire end	otheliale	; Venolen	, PNA:	Peanut	agglutini	in, Per	C: per	itonea	le Zell	en, LC	: Lymph	zyten, l	CTL: Cytotoxische L	ymphozyten

Zellen <u>B-Zell-Phänotyp (Ig)</u> <u>Lymphoide Organe (total)</u> andere	uzen		no & Mosier (1982)	n et al. (1982a)	n et al. (1977)	t al. (1977)	et al. (1982)		it al. (1977)	et al. (1979)		it al. (1977)	10 et al. (1979)	10 & Moiser (1982)		io & Moiser (1982)		ao & Moiser (1982)	ngton et al. (1982)		n et al. (1982a)	id et al. (1982)	1 et al. (1981)	ת 1953 (1953) א ה	n et al. (1982a)	ss et al. (1985)	st al. (1985)	ell & Hurd (1976)	
	Refere		B. Subbara	FW. Shen	FW. Sher	B. Huber e	J.D. Kemp		A. Ahmed e	R.C. Howe		A. Ahmed e	B. Subbare	B. Subbare		B. Subbare		B. Subbare	F.W. Symir		FW. Sher	M.P. Schei	JS. Tunc	FW. Sher	FW. Sher	K.L. Holme	G. Kraal e	I. McConne	
	Eigenschaften		erkennt I-Zell-	Factor-Rezeptor		ersetzt I-Helfer-	Signale		inhibiert	Aktivierung		Differenzierungs-	antigen, erkennt	50-60% der B-Zell	inhibiert Ak	Antwort		erkennt fast	alle B-Zellen		unterdrückt PC	Generierung		anti FclgG-	Rezeptor,	entspricht 2.4G2	Komplement Faktor	3b Rezeptor	
andere	hämatop.	Zellen		1		Plasma-	cytom:+	(frühes)											ı		meisten:	+	+ :ØW	+ :ØW	Thymus:	3%		+ : [JW	
	Ļ	Zellen		ł			I			'			1			1			1			+			90-95%			0-1%	
tal)	3																											+	
ne (tol	Ч																											+	
e Orgai	PLN			30-	40%														+						. 55%			-6	14%
biohqm	Milz			50-	60%		20-	30%					20%			25-	30%		30-	45%		+			- 40-	65%		-92	34%
۲	BM			Š-	40%		0-4												+						-09	683			
	ЪС			1			1												-			+						ı	
(E	A						+			+																			
Zellen B-Zell-Phänotyp (Ig) Lymphoide Organe (total) andere	5						+			+																			
	Q+M			+			+			+			+			+			+			+			+			+	
	Σ			+						+			+			+			+			+			+			+	
	pre-B			-/+			ı			ı									+									-	
Zeller	pro-	pre-B																							·				
	Stamm																					+	<u>.</u>						
	MM	[kd]		40-	45		68			45									95-	105	200,	205,	220	<b> </b>	55-	60			
	Marker	(Ak)		Lvb-2			Lyb-3	(Serum)		Lyb-4	(Serum)		Lyb-5	(Serum)		Lyb-7	(Serum)		Lyb-8	(CY34)		Ly-5			۲-11			CR	

**B-Zell Oberflächenmarker** 

PEV: postkapilare endotheliale Venolen, PNA: Peanutagglutinin, PerC: peritoneale Zellen, LC: Lymphozyten

### 6 Zusammenfassung

Ratten eines Inzuchtstammes wurden mit Gemischen von Zellen lymphatischer Organe der Maus und aktivierten B-Zellen (LPS-Blasten) immunisiert. Zur Gewinnung von Hybridomen wurden frische und gefrorene Rattenmilzzellen mit dem Myelom X63Ag8.653 fusioniert. Die Ratten-Hybridom-Kultur-überstände wurden mit dem FACS 440 auf anti-Maus-Zell-Antikörper getestet. Zu diesem Zweck mußte eine Methode entwickelt werden, die es ermöglichte, eine große Anzahl an unterschiedlichen Kulturüberständen zu testen. Dazu wurden am FACS 440 technische Veränderungen vorgenommen die es ermöglichten,

- den logarithmischen Verstärker zu eichen,

- verschiedene Analysen miteinander zu vergleichen,

- Oberflächenantigene zu quantifizieren,

- 5-Parameter-Analysen durchzuführen und

- Proben sehr schnell zu analysieren.

Außerdem wurden verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe auf gegenseitige Störeinflüsse getestet.

Als Ergebnis meiner Analysen wurden vier Ratten-Hybridome isoliert, die einen anti-LPS-Antikörper (BoF1.40) und drei anti-Maus-Zell-Antikörper (BoF1.108, BoF3.198, BoF3.220) produzieren. Den drei anti-Zell-Antikörpern ist gemeinsam, daß sie Zellen der lymphatischen Organe in geringer Frequenz färben.

Diese Antikörper haben folgende Eigenschaften: Der Ak BoF3.220 erkennt eine kleine IgM<sup>+</sup>-B-Zell-Subpopulation und zu 5% eine einzelne Zellinie (PC140). Der BoF3.198 erkennt außer einigen Hybridomen, eine IgM<sup>+</sup> Subpopulation und eine Subpopulation aktivierter B-Zellen. Der BoF1.108 erkennt eine Determinante auf allen aktivierten B- und T-Zellen. Dabei ist ausgeschlossen, daß es sich um einen anti-Transferrin-Rezeptor-Antikörper handelt oder um einen anti-Ia-Antikörper, zumindest soweit es die von dem anti-Ia-Antikörper M5/114 erkannte Determinante betrifft.

#### 7 Literaturverzeichnis

Ahmed A., I. Scher, S.O. Sharrow, A.H. Smith, W.E. Paul, D.H. Sachs and K.W. SellB-lymphocyte heterogeneity: Development and characterization of an alloantiserum which distinguishes B-lymphocyte differentiation alloantigens.J. Exp. Med. 145, 101, (1977)

Arndt-Jovin D.J., B.G. Grimwade and T.M. Jovin A dual laser flow sorter utilizing a CW pumped dye laser Cytometry 1, **127** (1980)

Baum C. and J.P. McKearn Genetic and functional polymorphism of the Fc receptor on B cells. Basel Ann. Rep. **59**, (1984)

Benner, R., W. Hijmans and J. J. Haaijman The bone marrow: the major source of immunoglobulins, but still a neglected site of antibody formation. Clin. Exp. Immunol. **46**, 1, (1981)

Bhattacharya A., M.E. Dorf and T.A. SpringerA shared alloantigenic determinant on Ia antigens encoded by the I-A and I-E subregions: evidence for I region gene duplication.J. of Immunol. 127, 2488, (1981)

Bruce J., F.W. Symington, T.J. McKearn and J. Sprent A monoclonal antibody discriminating between subsets of T and B cells. J. of Immunol. **127**, 2496, (1981)

Boyle, W. An extension of the 51Cr-release assay for the astimation of mouse cytotoxins. Transplant **6**, 761, (1968)

Buckland R. M. Strong signals from streptavidin-biotin Nat. **320**, 557, (1986)

Burrow P.D., G.B. Beck and M.R. Wabl Expression of  $\mu$  and  $\lambda$  immunoglobulin heavy chains in different cells of a cloned mouse lymphoid line.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 564, (1981)

Butcher E.C., R.G. Scollay, I.L. Weissman Organ specificity of lymphocyte migration: Mediation by highly selective lymphocyte interaction with organ-specific determinants on high endothelial venules. Eur. J. Immunol. **10**, 556, (1980)

Butcher E.C., R.V. Rouse, R.L. Coffman, C.N. Nottenburg, R.R. Hardy and I.L. Weissman Surface phenotype of Peyer's Pach germinal center cells: implications for the role of germinal centers in B cell differentiation.

J. of Immunol. 129, 2698, (1982)

Chayen A. and R.M.E. Parkhouse B cell subpopulation in the mouse: analysis with monoclonal antibodies NIM-R2 and NIM-R3. Eur. J. Immunol. **12**, 725, (1982)

Carlsson J., H. Drevin und R. Axe'n Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. Biochem. J. **173**, 723, (1978)

Coffman R.L. Surface antigen expression and immunoglobulin gene rearrangement during mouse pre-B cell development. Imm. Rev. **69**, 5, (1982)

Coffman R.L. and I.L. Weissman B220: a B cell-specific member of the T200 glycoprotein family. Nature **289**, 681, (1981)

Coffman R.L. and I.L. Weissman A monoclonal antibody that recognizes B cells and B cell precursors in mice. J. Exp. Med. **153**, 269, (1981)

Davignon D., E. Martz, T. Reynolds, K. Kürzinger and T.A. Springer Lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1): A surface antigen distinct from Lyt-2,3 that participates in T lymphocyte-mediated killing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**, 4535, (1981)

De Petris S., M.C. Raff

Distribution of immunoglobulin on the surface of mouse lymphoid cells as determinantes by immunoferritin elektron microscopy. Antiboby-induced, temperature-dependent redistribution and its implications for membran structure.

Eur. J. Immunol., **2**, 523, (1972)

Dialynas D.P., D.B. Wilde, P. Marrack, A. Pierres, K.A. Wall, W. Havran, G. Otten, M.R. Loken, M. Pierres, J. Kappler & F.W. Fitch
Characterisation of the murine antigenic determinant, designated L3T4a, recognized by monoclonal antibody GK1.5: Expression of L3T4a by functional T cell clones appears to correlate primarily with class II MHC antigen-reactivity.
Immunol. Rev. 74, 29, (1983a)

Dialynas D.P., Z.S. Quan, K.A. Wall, A. Pierres, J. Quintas, M.R. Loken, M. Pierres and F.W.
Fitch
Characterisation of the murine T cell surface molecule, designated L3T4, identified by monoclonal antibody GK1.5: Similarity of L3T4 to the human LEU-3/T4 molecule.
J. of Immunol. 131, 2445, (1983b)

Ding-E Young J., J.C. Unkeless, T.M. Young, A. Mauro and Z.A. Cohn Role for mouse macrophage IgG Fc receptor as ligand-dependent ion channel. Nature **306**, 186, (1983)

Eckhardt L.A. and L.A. Herzenberg Monoclonal antibodies to ThB detect close linkage of Ly-6 and a gene regulating ThB expression. Immunogenetics **11**, 275, (1980)

Esser C.

Untersuchungen zur Frequenz von kleinen B-Lymphozyten, die auf der Oberfläche IgE oder IgG ausprägen. Diplomerbeit Köln (1985)

Diplomarbeit Köln (1985)

Fathman, C.G., M. Small, L.A. Herzenberg & I.L. Weissman Thymus cell maturationII. Differentiation of three "mature" subclasses in vivo.Cellular Immunol. 15, 109, (1975)

Fink P.J., W.M. Gallatin, R.A. Reichert, E.C. Butcher and I.L. Weissman Homing receptor-bearing thymocytes, an immunocompetent cortical subpopulation. Nature **313**, 233, (1985)

Foung S.K.H., D.T. Sasaki, F.C. Grumet and E.G. Engleman Production of functional human T-T hybridomas in selektion medium lacking aminopterin and thymidin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. **79**, 7484-7488 12/1982 Galfre G., S.C. Howe, C. Milstein, G.W. Butcher & J.C. Howard Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. Nature **266**, 550 (1977)

Galfre G., C. Milstein and B. Wright Rat x rat hybrid myelomas and a monoclonal anti-Fd portion of mouse IgG. Nature **277**, 131, (1979)

Gallatin, W.M., I.L. Weissman and E.C. Butcher A cell-surface molecule involed in organ-specific homing of lymphocytes. Nature **304**, 30, (1983)

Germain R.N., A. Bhattacharya, M.E. Dorf and T.A. SpringerA single monoclonal anti-Ia antibody inhibits antigen-specific T cell proliferation controlled by distinct Ir genes mapping in different H-2 I subregions.J. of Immunol. 128, 1409, (1982)

Goldmann, M. Fluorescent antibody methods. Academic Press, New York (1968)

Goldsby R.A., B.A. Osborne, E. Simpson & L.A. Herzenberg Hybrid cell lines with T-cell characterities. Nature **267**, 707 (1977)

Göttlinger C., K.L. Meyer, W. Weichel, W. Müller, B. Raftery and A. Radbruch Cell-cooling in flow cytometry by Peltier elements. Cytometry **7**, 295 (1986)

Greaves M.F., J.J.T. Owen & M.C. Raff Excerpta Medica, Amsterdam, 48-52, 1973

Hardy, R.R., K. Hayakawa, J. Haaijman & L.A. Herzenberg B-cell subpopulation identified by two-color fluorescence analysis. Nature **297**, 589 (1982)

Hardy, R.R., K. Hayakawa, D.R. Parks, L.A. Herzenberg, and L.A. Herzenberg Murine B cell differentiation lineages. J. Exp. Med. **159**, 1169, (1984) Hayakawa, K., R.R. Hardy, D.R. Parks and L.A. Herzenberg The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal, immunodefective, and autoimmune mice. J. Exp. Med. **157**, 2O2, (1983)

Hayakawa K., R.R. Hardy, L.A. Herzenberg and L.A. HerzenbergProgenitors for Ly-1 B cells are distinct from progenitors for other B cells.J. Exp. Med. 161, 1554, (1985)

Hayakawa K., R.R. Hardy, A.M. Stall, L.A. Herzenberg and L.A. Herzenberg Immunoglobulin-bearing B cells reconstitute and maintain the murine Ly-1 B cell lineage. Eur. J. of Immunol. **16**, 1313, (1986)

Herzenberg, L. A., R. G. Sweet und L. A. Herzenberg Fluorescence-activated cell sorting. Sci. Am. **234**, 108 (1976)

Ho F., J.E. Lortan, I.C.M. MacLennan and M. Khan Distinct short-lived and long-lived antibody producing cell populations. Eur. J. of Immunol. **16**, 1297, (1986)

Holmes K.L., R.G. Palfree, U. Hammerling and H.C. Morse Alleles of the Ly-17 alloantigen define polymorphisms of the murine IgG Fc receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 7706, (1985)

Howe R.C., A. Ahmed, T.J. Faldetta, J.E. Byrnes, K.M. Rogan, M.E. Dorf, B.A. Taylor and R.E. Humphreys Mapping of the Lyb-4 gene to different chromosomes in DBA/2J and C3H/HeJ mice. Immunogenetics **9**, 221, (1979)

Huber B., R.K. Gershon and H. Cantor Identification of a B-cell surface structure involved in antigen-dependent triggering: Absence of this structure on B cells from CBA/N mutant mice. J. Exp. Med. **145**, 10, (1977)

Jalkanen S., R.A. Reichert, W.M. Galatin, R.F. Bargatze, I.L. Weissman und E.C. Butcher Homing receptors and the control of lymphocyte migration Immunol. Rev. **91**, 39 (1986)

Judd W., C.A. Poodry and J.L. Strominger Novel surface antigen expressed on dividing cells but absent from nondividing cells. J. Exp. Med. **152**, 1430, (1980) Kearney J.F. & A.R. Lawton B lymphocyte differentiation induced by lipopolysaccharide. J. of Immunol. **115**, 671 (1975)

Kearnay J.F., A. Radbruch, B. Liesegang & K. RajewskyA new mouse myeloma cell line which has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody secreting cell lines.J. of Immunol. 123, 1548-1550 (1979)

Kemp J.D., J.W. Rohrer & B.T. Huber Lyb-3: A B cell surface antigen associated with triggering secretory differentiation. Immunol. Rev. **69**, 127, (1982)

Kincade P.W., G. Lee, T. Watanabe, L. Sun and M.P. Scheid Antigens displayed on murine B lymphocyte precursors. J. of Immunol. **127**, 2262, (1981)

Klein S., F. Sablitzky and A. Radbruch Deletion of IgH enhancer does not reduce immunoglobulin heavy chain production of a hybridoma IgD class switch variant. EMBO J. **3**, 2473 (1984)

Köhler G. & C. Milstein Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature **256**, 495-479 (1975)

Köhler G., J.P. McKearn & McCubrey Transformation of B cells of three different stages of differentiation with TNP specific Ig genes. Basel Ann. Rep. **48**, (1984)

Kraal G., I.L. Weissman & E.C. Butcher Germinal centre B cells: antigen specificity and changes in heavy chain class expression. Nature **298**, 377, (1982)

Kraal G., I. van Hoogstraten, J.P.A.M. Klerx & H. van Dijk The selective localisation of B lymphocytes in the speeln and the role of complement receptors. Eur. J. Immunol. **15**, 681, (1985)

Kung J.T., S.O. Sharrow, A. Ahmed, R. Habbersett, I. Scher and W.E. Paul B lymphocyte subpopulation defined by a rat monoclonal antibody, 14G8. J. of Immunol. **128**, 2049, (1982a)

Kung J.T., S.O. Sharrow, M.G. Mage and W.E. Paul
Detection of a common antigen on murine B cells and Lyt-2+ T cells by a rat monoclonal antibody, 14D10.
J. of Immunol. 129, 81, (1982b)

Kürzinger K., M.-K. Ho & T.A. Springer Structural homology of a macrophage differentiation antigen and an antigen involved in T-cellmediated killing. Nature **296**, 668, (1982)

Lanier L.L., N.L. Warner, J.A. Ledberger and L.A. Herzenberg Expression of Lyt-1 antigen on certain mutrine B cell lymphomas. J. Exp. Med. **153**, 998, (1981)

Ledbetter J.A. & L.A. Herzenberg Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens. Immunol. Rev. **47**, 63 (1979)

Ledbetter J.A., J.W. Goding, T.T. Tsu and L.A. Herzenberg A new mouse lymphoid alloantigen (Lgp100) recognized by a monoclonal rat antibody. Immunogenetics **8**, 347, (1979)

Ledbetter J.A., R.V. Rouse, H. Spedding Micklem and L.A. Herzenberg T cell subsets defined by expression of Lyt-1,2,3 and Thy-1 antigens. J. Exp. Med. **152**, 280, (1980)

Lesley J., R. Hyman, R. Schulte and J. Trotter Expression of transferrin receptor on murine hematopoietic progenitors. Cellular Immunology **83**, 14, (1984)

Liesegang B., A. Radbruch und K. Rajewsky Isolation of myeloma variants with predefined variant surface immunoglobulin by cell sorting. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **75**, 3901 (1978)

Loken M.R., D.R. Parks & L.A. Herzenberg Two-color immunofluorescence using a fluorescence activated cell sorter J. Histochem. Cytochem. **25**, 899 (1977)

Loken M. R. & A. M. Stall Flow cytometry an analytical and preparative tool in immunology. J. of Immuol. Meth., **50**, 85, (3/1982)
MacLennan I.C.M. & D. Gray Antigen-driven selection of virgin and memory B cells. Immunol. Rev. **91**, 61, (1986)

Marshall-Clarke S., A. Chayen and R.M.E. Parkhouse Monoclonal antibody NIM-R2 shows differential reactivity with virgin and memory B cells. Eur. J. Immunol. **12**, 733, (1982)

Mason D.W. and A.F. Williams The kinetics of antibody binding to membrane antigens in solution and at the cell surface. Biochem. J. **187**, 1, (1980)

Matossian-Rogers A., P. Rogers, J.A. Ledberger and L.A. Herzenberg Molecular weight determination of two genetically linked cell surface murine antigens: ThB and Ly-6. Immunogenetics **15**, 591, (1982)

McConnell I. & C.M. Hurd Receptors for Fc of IgG and complement (C3b) on immunoglobulin-bearing, antigen-binding and antibody-secreting cells. Immunology **30**, 825, (1976)

McKearn J.P., C. Baum and J.M. Davie Cell surface antigens expressed by subsets of pre-B cells and B cells. J. of Immunol. **132**, 332, (1984)

McKearn J.P., J. McCubrey and B. Fagg Enrichment of hematopoietic precursor cells and cloning of multipotential B-lymphocyte precursors Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 7414, (1985)

McKearn J.P. and N. Rosenberg Mapping cell surface antigens on mouse pre-B cell lines. Eur. J. of Immunol. **15**, 295, (1985)

Michl J., J.C. Unkeless, M.M. Pieczonka and S.C. Silverstein Modulation of Fc Receptors of mononuclear phagocytes by immobilized antigen-antibody complexes.

J. Exp. Med. 157, 1746, (1983a)

Michl J., M.M. Pieczonka, J.C. Unkeless, G.I. Bell and S.C. SilversteinFc Receptor Modulation in mononuclear phagocytes maintained on immobilized immune complexes occurs by diffusion of the receptor molecule.J. Exp. Med. 157, 2121, (1983b)

Miller J.F.A.P. and G.F. Mitchel Thymus and antigen reactive cells. Transplant. Rev. **1**, 3 (1969)

Milstein C. Monoclonal Antibodies Sci. Am. **243**, 56 (10/1980)

Mohr R. & U. Krawinkel Helper T-cell kinetics and investigation of antigen receptor expression on early and memory Thelper cells. Immunology **31**, 249 (1976)

Müller W., R. Kühn, W. Goldmann, H. Tesch, F.I. Smith, A. Radbruch and K. Rajewsky Signal requirements for growth and differentiation of activated murine B lymphocytes. J. of Immunol. **135**, 1213 (1985)

Oi V.T., A.N. Glaser, L. Stryer Fluorescent phycobiliprotein conjugates for analyses of cells and molecules. J. of Cell. Biol. **93**, 981 (1982)

Old L.J., E.A. Boyse and E. Stockert The G (Gross) leukemia antigen. Cancer Research **25**, 813 (1965)

Prudehomme D. Stain Technol., **53**, 300, 5/1978

Radbruch A. Isotypenvarianten in der Myelomzellinie P3X63 Dissertation Köln (1980)

Reichert R.A., W.M. Gallatin, I.L. Weissman and E.C. Butcher Germinal center B cells lack homing receptors necessary for normal lymphocyte recirculation J. Exp. Med. **157**, 813, (1983) Reth M., G.J. Hämmerling and K. RajewskyAnalysis of the repertoire of anti-NP antibodies in C56BL/6 mice by cell fusion1. characterisation of antibody families in the primary and hyperimmune response.Eur. J. Immunol. 8, 393 (1978)

Sanchez-Madrid F., P. Simon, S. Thompson and T.A. SpringerMapping of antigen and funktional epitopes on the a- and b-subunits of two related mouse glycoproteins involved in cell interactions, LFA-1 and MAC-1.J. Exp. Med. 158, 586, (1983)

Sarmiento M., M.R. Loken, I.S. Trowbridge, R.L. Coffman and F.W. Fitch High molecular weight lymphocyte surface proteins are structually related and are expressed on different cell populations at different times during lymphocyte maturation and differentiation. J. of Immunol. **128**, 1676, (1982)

Scheid M.P., K.S. Landreth, J.-W. Tung & P.W. Kincade Preferential but nonexclusive expression of macromolecular antigens on B-lineage cells. Immunol. Rev. **69**, 141, (1982)

Shen F.-W., M. Spanondis & E.A. Boyse Multiple alleles of the Lyb-2 locus. Immunogenetics **5**, 481, (1977)

Shen F.-W. and E.A. Boyse An alloantigen selective for B cells: Ly-17.1. Immunogenetics **11**, 315, (1980)

Shen F.-W., H. Yakura & J.-S. Tung Some compartments of B cell differentiation. Immunol. Rev. **69**, 69, (1982a)

Shen F.-W., G. Viamontes and E.A. Boyse A system of alloantigens that selectively identifies lymphnode lymphocytes. Immunogenetics **15**, 17, (1982b)

Slavin S. & S. Strober Spontaneous murine B-cell leukaemia. Nature **272**, 624 (1978) Springer T., G. Galfre`, D.S. Secher and C. Milstein
Monoclonal xenogeneic antibodies to murine cell surface antigens: identification of novel leukocyte differentiation antigens.
Eur. J. Immunol. 8, 539, (1978)

Steinmetz M., K. Minard, S. Horvath, J. McNicholas, J. Ferlinger, C. Wake, E. Long, B. Mach and L. Hood A molecular map of the immune response region from the major histocompatibility complex of the mouse.

Nature 300, 35, (1982)

Stevens, S.K., I.L. Weissman, and E.C. Butcher Differences in the migration of B and T lymphocytes: Organselective localisation in vivo and the role of lymphocyteendothelial cell recognition. J. Immun. **128**, 844, (1982)

Strober S.Immune functionCell surface characteristics and maturation of B cell subpopulations.Transplant. Rev., 24, 84, (1975)

Subbarao B., D.E. Moiser, A. Ahmed, J.J. Mond, I. Scher and W.E. PaulRole of a nonimmunoglobulin cell surface determinant in the activation of B lymphocytes by thymus-indedendent antigens.J. of Exp. Med. 149, 495, (1979)

Subbarao B. & D.E. Mosier Lyb antigens and their role in B lymphocyte activation Immunol. Rev. **69**, 81, (1982)

Symington F.W., B. Subbarao, D.E. Moiser and J. Sprent Lyb-8.2: A new B cell antigen defined and characterized with a monoclonal antibody. Immunogenetics **16**, 381, (1982)

Takei F.

MALA1: A surface antigen expressed on activated murine T and B lymphocytes. J. of Immunol. **133**, 345, (1984)

Thammana, P. & M.D. Scharff Immunoglobulin heavy chain class switch from IgM to IgG in a hybridoma. Eur. J. Immunol. **13**, 614, (1983) Tung J.-S. and E.A. Boyse Biochemical comparison of PC.1 from neuronal cells and from B cells. Immunogenetics **11**, 417, (1980)

Tung J.-S., M.P. Scheid, M.A. Pierotti, U. Hämmerling and E.A. Boyse Structural features and selective expression of three Ly-5+ cell-surface molecules. Immunogenetics **14**, 101, (1981)

van Driel I.R., A.F. Wilks, G.A. Pietersz and J.W. Goding Murin plasma cell membrane antigen PC-1: molecular cloning of cDNA and analysis of expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 8619, (1985)

Weichel W.

Isolierung einer somatischen H-2-Variante durch doppelfluoreszenz-gesteuerte Zellsortierung. Diplomarbeit, Köln, (1983)

Weichel W., B. Liesegang, K. Gehrke, C. Göttlinger, B. Holtkamp, A. Radbruch, T.K. Stackhaus und K. Rajewsky

Inexpensive upgrading of a FACS I and Isolation of rare somatic variants by double-fluorescenc sorting.

Cytometry **6**, (1985)

White-Scharf M.E. & T. Imanishi-Kari Eur. J. Immunol. **12**, 935 (1982) Ich danke Prof. Dr. Klaus Rajewsky, der mir die Möglichkeit gab, die hier vorliegende Diplamarbeit anzufertigen.

Ganz besonders möchte ich Dr. Andreas Radbruch für anregende Diskussionen, hilfreiche Denkanstöße und kooperative Zusammenarbeit danken, sowohl im biologischen als auch technischen Bereich.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern, die mir durch Diskussionen geholfen haben, besonders Christoph Göttlinger für seine Unterstüzung im technischen Bereich.

Ich versichere hiermit, daß ich die vorliegende Arbeit selbst angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Klaus L. Meyer