

Praktikumsbericht zum Praktikum am
Bernhardt-Nocht-Institut für
Tropenmedizin in Hamburg
Von
Dominik Mole

1. Einleitung

In der Zeit vom 13.08.2007 bis 07.09.2007 absolvierte ich mein vierwöchiges Forschungspraktikum am Bernhardt-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg, das ich für meine Leistungen und mein Engagement im Bereiche der dritten Auswahlrunde der Internationalen Biologieolympiade durch den Förderverein der Biologieolympiade e.V. und den Verband Biologie, Biowissenschaften und Biomedizin in Deutschland e.V. erhalten habe. In dieser Zeit arbeitete ich in der Arbeitsgruppe Kortzen, die sich mit der Onchozerkose, einer Infektion mit dem Fadenwurm *Onchocerca volvulus*, beschäftigt. Gearbeitet wird mit dem *Litomosoides sigmodontis* Mausmodell. Hauptsächlich betreut wurde ich durch die Doktorandin Wiebke Hartmann, die sich mit der Rolle der Granzyme A und B bei der Immunsuppression während einer Helmintheninfektion beschäftigt.



Ich selbst beschäftigte mich zunächst mit kleineren Projekten, um mich an die Laborarbeit zu gewöhnen und einige Erfahrung bei dem Umgang mit den Arbeitsgeräten, Chemikalien, Antigenen und vor allem den Zellen zu gewinnen. Hierzu gehören das Anfertigen und Färben immunhistologischer Schnitte, Wurmlängen- und Geschlechtsbestimmung, die Aufarbeitung von Milzzellen, die Wurm-Antigen-Herstellung, sowie verschiedener Proliferationstest, wie z.B.

dem Pulsen und die Arbeit mit dem Durchflusszytometers –FACS. Meine Hauptaufgabe bestand anfänglich darin, das Vorkommen verschiedener Zellmarker- CD25, CD62L, CD69 und MHCII- bei CD4⁺- und CD8⁺-Zellen während einer Zeitspanne von 4h, 24h, 48h und 72h zu untersuchen. Hierbei war eindeutig festzustellen, dass CD25 im Verlauf der 72h kontinuierlich hochreguliert wird, CD62L wird zunächst in den ersten 4h herunterreguliert; wird nach 72h Stimulation jedoch von mehr Zellen exprimiert als zuvor, CD69 hingegen wird innerhalb von 48h von immer mehr Zellen exprimiert, danach jedoch wieder herunterreguliert. Der MHCII-Komplex wird immer weiter herunterreguliert. Anfangs wurden die Untersuchungen mit zwei Granzym A&B ko Mäusen durchgeführt. Dabei viel auf, dass eine Maus obwohl sie CD4⁺ -Zellen aufwies, nur 0,08 %- 3,24% ihrer Zellen MHCII- Komplexe exprimierte. Daraufhin wurden weitere Untersuchungen bezüglich des Auftretens dieser Beobachtungen gemacht, jedoch ohne Ergebnis.

2. Projektinformationen

Die Onchozerkose ist eine durch Parasiten hervorgerufene Erkrankung, die vor allem in Afrika und den tropischen Gebieten Lateinamerikas vorkommt. Ausgelöst wird sie durch den Fadenwurm *Onchocerca volvulus*, dessen adulten Formen sich zumeist in Form mehrerer Weibchen in subkutanen Knoten -Onchozerkome - befinden. Ein adulter Wurm wird zwischen 20 und 50 cm lang und hat einen Durchmesser von etwa 0,4mm. Das Hauptproblem der Onchozerkose sind jedoch nicht die Knoten, sondern die von den Weibchen in das umliegende Gewebe abgegebenen Mikrofilarien. Diese L1-Larven sind vorwiegend im Bindegewebe der Haut und den kleinen Lymphgefäßen anzutreffen. Gelangt eine Larve in die Augen, so kann es zu Hornhauttrübungen, sklerosierender Keratitis und somit zu Erblindung führen. Da die Onchozerkose in der Nähe von Gewässern vorkommt, nennt man sie auch Flussblindheit. Der Grund für das gehäufte Auftreten in der Nähe fließender Gewässer ist der Überträger- die Simulie, eine Kriebelmücke, deren eigene Entwicklung an diese Gewässer gebunden ist. Die Mücke nimmt die L1-Larven aus der Haut des Menschen durch einen Biss auf. Die L1-Larven entwickeln sich in der ihr zu L3-Larven, wandern aus dem Bauchraum in den Speichelapparat der Mücke und werden beim nächsten Biss wiederum übertragen, häuten sich zum adulten Wurm und geben wiederum Mikrofilarien ab. Bis jetzt besteht die Behandlung in der Gabe des Medikamentes Ivermectin, welches jedoch nur die Mikrofilarien angreift und keinerlei Auswirkungen auf die adulten Würmer hat. Um ein neues Medikament entwickeln zu

können, muss zunächst herausgefunden werden, warum die adulten Würmer jahrelang im menschlichen Organismus überleben kann ohne durch das Immunsystem angegriffen zu werden. Da aus ethischen Gründen eine Forschung am Menschen selbst undenkbar ist, wurde ein Mausmodell mit Hilfe des verwandten Nematoden *Litomosoides sigmodontis* entwickelt. *Litomosoides sigmodontis* besitzt als natürlichen Endwirt die Baumwollratte *Sigmodon hispidus* und wird mit Hilfe von tropischen Rattenmilben auf Balb/c Mäuse übertragen. Sinn dieses Modells ist, dass man durch verschiedene genetischen Knockouts oder den Einsatz verschiedener Medikamente die Infektion der Mäuse weiter unterdrückt und den dahinter stehenden Mechanismus aufklären kann. Um dies realisieren zu können, muss der Ablauf einer Infektion und das Auftreten bestimmter Immunzellen geklärt werden. Man unterscheidet die Zellen anhand ihrer Oberflächenmarker, den so genannten *cluster of differentiation*- CD. Bei den CD-Molekülen handelt es sich meist um membrangebundene Glykoproteine, die verschiedene Funktionen haben. In den Versuchen wurden CD4, CD8, CD25, CD62L und CD69 betrachtet. CD4 ist ein monomorphes Glykoprotein, welches als Monomer an der Oberfläche von reifen $\alpha\beta$ -T-Zell-Antigenrezeptor-positiven Lymphozyten, Blutmonozyten und einigen Thymozyten exprimiert werden. Es ist über seinen zytoplasmatischen Teil in die Signaltransduktion der erweiterten T-Zell-Rezeptorkomplexes eingebunden und bindet MHC-Klasse-II-Moleküle. Es wird vermutet, dass diese Bindung die Interaktion von T-Zellen und Antigen-Präsentierenden Zellen stabilisiert. Bei der Erzeugung von CD4-T-Lymphozyten im Thymus werden die Lymphozyten auf Selbstverträglichkeit geprüft, in dem sie mit MHCII-Molekülen in Verbindung treten. Sind keine MHCII-Moleküle vorhanden können keine CD4-Zellen hergestellt werden. Auch CD8 ist ein monomorphes Glykoprotein, bindet jedoch an den Hauptgewebeverträglichkeitskomplex der Klasse 1-MHCI. Diese Bindung induziert eine Signaltransduktion über die Tyrosinkinase Lck. Die meisten T-Zellen exprimieren dabei entweder CD4 oder CD8 als Korezeptor des T-Zell-Antigenrezeptors und können somit unterscheiden, mit welchem MHC-kodierten Protein ein Antigen präsentiert wird, was zu einer ersten Unterscheidung verschiedener Erreger führt. CD25 ist ein Rezeptor für das Interleukin 2, welches einen autokrinen Wachstumsfaktor für T-Lymphozyten darstellt und bei der Proliferation und Differenzierung von anderen hämatopoetischen Zellen behilflich ist. CD62L ist ein Transmembranprotein, das dafür sorgt, dass naive Lymphozyten in lymphatischem Gewebe angehäuft werden und myeloide Zellen an Orten chronischer Entzündung rekrutiert werden. Die Funktion des Oberflächenmarkers CD69 ist noch nicht bekannt. Es ist lediglich

bekannt, dass CD69 ein frühes Aktivations-Antigen darstellt, also am Anfang einer Infektion hochreguliert wird. Nachgewiesen werden diese Oberflächenmarker durch eine spezifische Bindung mit einem Antikörper. Hierbei ist der Antikörper mit einem Fluoreszenzmarker versehen, der durch Bestrahlung mit Licht fluoresziert. Diese Eigenschaft nützt die Durchflusszytometrie (s.3.10).

3. Material und Methoden

3.1 Entparaffinieren, fixieren und färben immunhistologischer Schnitte mit Hilfe des Link-Label-Systems

Um bestimmte Zellen bzw. Moleküle (z.B. Granzyme) in von infizierten Personen entnommenen Knoten nachweisen zu können und ihre Aufenthaltsorte im Knoten zu detektieren, müssen zunächst immunhistologische Schnitte angefertigt werden. Hierzu werden die Knoten möglichst schnell nach Entnahme in Paraffin fixiert und eingefroren. Die gefrorenen Paraffinblöcke werden bei Bedarf in 3 µm dicke Scheiben geschnitten, welche wiederum im 40°C warmen Wasserbad aufgefangen und auf Objektträger aufgetragen werden. Um eine Färbung durchführen zu können müssen die Schnitte zunächst fixiert und entparaffiniert werden. Dazu werden die Objektträger 4-mal für mindestens 5 Minuten in Rotihistol getaucht, bevor sie in einer absteigenden Alkoholreihe mit 3-mal 100% Ethanol, 2-mal 96%, einmal 80% und wiederum 2-mal 70% vollständig entparaffiniert werden. Das Gewebe wird durch 5-minütige Inkubation in Aqua dest. rehydriert und durch 5 Minuten in einem TRIS-Puffer mit dem pH-Wert 9,0 vor einer Zellschädigung durch das hypotone Aqua dest. geschützt. Der endgültige Nachweis von Zellen bzw. bestimmten Molekülen erfolgt über den Nachweis von spezifischen Antikörpern, die an charakteristische Epitope der Zellen bzw. an die Moleküle direkt binden. Die Epitope werden durch 6-minütiges Erhitzen der Objektträger im Dampfdrucktopf demaskiert, wobei die Objektträger langsam abgekühlt werden müssen, um eine eventuelle Blasenbildung des Gewebes zu verhindern. Nach einem 5-minütigen Aufenthalt in TBS wird der primäre Antikörper, der an das gesuchte Epitop bindet, in einer Verdünnung von 0,2 % aufgelöst in 0,1% BSA und einem Volumen von ca. 100µm/Probe auf die Schnitte aufgetragen und bei 4°C über Nacht gelagert. Am nächsten Morgen werden die überschüssigen Antikörper 5 Minuten lang in PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung) abgewaschen und mit biotinyliertem Immunglobulin (Link) versetzt. Nach erneuter Waschung in PBS werden die Schnitte mit einem Enzym-Markierten Streptavidin (Label) inkubiert. Das Streptavidin

bindet mit hoher Affinität an die Epitop-gebundenen Immunglobuline und bildet ein Antikörper-Enzym-Komplex. Gibt man nun ein chromogenes Substrat, wie z.B. Fast Red®, hinzu, so wird dieses umgesetzt und der komplex kann durch die Farbentwicklung detektiert werden. Die Farbentwicklung wird ständig unter dem Lichtmikroskop überprüft, um eine Überfärbung zu verhindern. Nach ausreichender Färbung werden die Schnitte wiederum 5 Minuten in TBS inkubiert. Zum Schutz des gefärbten Schnittes wird nun mit Hilfe von Aquatex® ein Deckgläschen auf dem Objektträger fixiert.

3.2 Wurmlängenbestimmungen

Bei der Wurmlängebestimmung werden die aus infizierten Mäusen entnommenen Würmer möglichst ohne Inkubation in Medium, um eine weitere Entwicklung der Würmer zu verhindern, unter dem Mikroskop gemessen. Hierzu werden sie kurz vorher in heißes Ethanol getaucht, wodurch sie erstarren und sich der Länge nach strecken und anschließend bei kleineren Exemplaren unter dem Mikroskop oder bei größeren Exemplaren mit dem Lineal gemessen und anhand ihrer Schwanzform bezüglich ihres Geschlechts bestimmt.

3.3 Antigen-Herstellung

Bevor mit der eigentlichen Antigen-Herstellung begonnen werden kann, muss die Zentrifuge auf 4°C vorgekühlt werden. Nun entfernt Würmer aus 3-4 Monaten zuvor infizierten Mäusen und nimmt diese mit einer Pinzette auf. Die Würmer werden in den Glasstutzen eines zuvor gekühlten Mörsers überführt und durch auf- und abwärts Bewegungen des Stempels zermörsert. Nachdem durch Abspülen des Stempels mit PBS sicher gestellt ist, dass sich so viel Wurmeiweiß wie möglich in dem Glasstutzen befindet, wird das Wurmlysat in ein Eppendorfgefäß überführt und schnellstmöglich bei 80.000 g/14.000 rpm und 4°C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, steril filtriert und in ein neues Eppi überführt, wobei 50µl der Lösung für die Proteinbestimmung in eine zusätzliches Eppi überführt werden. Der Rest wird zunächst bei -20°C gelagert und nach der Proteinbestimmung und Einstellung auf 100µg/ml bei -70°C eingefroren.

3.4 Proteinbestimmung mit Advanced Protein Assay Reagent (APAR)

Das zu bestimmende Protein wird in den Verdünnungen 1:50, 1:100, 1:500 und 1:1000, jeweils verdünnt mit Advanced Protein Assay Reagent, mit einem Volumen von 300µl in je 2-3 (je nach Genauigkeitsgrad Doppel- oder Dreifachbestimmung) Wells einer 96-

Well F Platte pipettiert. Zudem wird als Nullwert das APAR in drei Wells pipettiert. Die Messung und Auswertung erfolgt am ELISA-Reader und muss innerhalb von 10 min durchgeführt werden. Die Messung erfolgt bei 570 nm. Die Antigenkonzentration wird mit der Formel

$OD (570 \text{ nm}) \times 37,5 \times \text{Verdünnung} = \text{Konzentration in } \mu\text{g/ml}$
ausgerechnet.

3.5 Aufarbeitung von immunologischen Milzzellen

Die aus der Maus entfernte Milz wird zusammen mit ausreichend PBS in eine Petrischale mit 10 cm Durchmesser gegeben und mit dem Stempel einer sterilen 10 ml Spritze homogenisiert. Das Homogenat wird anschließend mit einer Plastik-Pasteur-Pipette über einen Cell Strainer in einen 50er Falcon-Tube überführt und die Petrischale, sowie die Pipette mit PBS nachgespült. Die Zellen werden bei 1300 rpm und 4°C für 8 min herunter zentrifugiert, die Überstände dekantiert oder mit einer Pasteur-Pipette und einer Saugpumpe abgesaugt und das Pellet gelockert. Die ungewünschten Erythrocyten werden mit Hilfe eines ACK-Lyse-Puffers (Ammonium-Chlorid-Lyse Puffer) lysiert. Hierzu werden die Zellen für 3 min mit dem Puffer inkubiert und die Lyse danach mit 25 ml 1x PBS abgestoppt. Die Zellen werden nun 3x gewaschen, also mit den selben Einstellungen wie zuvor, herunterzentrifugiert, dekantiert, aufgelockert, in 10 ml 1x PBS resuspendiert, von „Flusen“ mit einer Pasteur-Pipette befreit und erneuert zentrifugiert. Nachdem die Zellen gewaschen wurden, werden sie in 1 ml Medium aufgenommen und ihre Zellzahl bestimmt.

3.6 Zellzahlbestimmung mit einer Neubauer-Zählkammer

Aus der zuvor hergestellten Zellsuspension (s.3.5) werden 10 µl entnommen und im Verhältnis 1:100 mit TrypanBlau, einem Derivat des Azofarbstoffes (künstlicher Farbstoff mit min. einer -N=N-Bindung) Benzopurpurin, verdünnt. Die verdünnte Zellsuspension wird nun in eine Neubauerzählkammer gegeben und es werden die Lymphozyten in 4 Großquadrate gezählt. Um die Zellkonzentration zu erhalten, setzt man die Anzahl der Zellen in diesen 4 Quadraten in diese Formel ein:

$\text{Zellzahl} \times \text{Kammerfaktor} \times \text{Verdünnung} / 4 \times 1000 = \text{Zellzahl /ml}$

3.7 Zellzahleinstellung

Die zuvor ermittelte Zellzahl wird nun auf eine für den Versuch günstige Zellzahl eingestellt. Hierzu benutzt man die Formel:

(Zellzahl ist / Zellzahl soll x Volumen) – Volumen

3.8 Proliferationstests

Der Proliferationstest dient dazu herauszufinden, wie stark sich eine Zellpopulation vermehrt. Hierzu werden je Individuum und Stimulus 3x 100µl Zellsuspension mit 2×10^6 Zellen/ml in verschiedene Wells einer 96-Well-Platte gegeben und mit 50 µl Medium und 50 µl Stimulus gemischt. Zusätzlich werden als Negativkontrolle pro Individuum 3 Wells mit Zellsuspension und 100µl Medium gefüllt. Es folgt nun eine 72-stündige Inkubation bei 37°C und 5% CO₂. Nach der Inkubation wird jedem Well 25µl 3H-Thymidin zugesetzt, die Platte erneut 18-24 h inkubiert, der Überstand mit dem nicht eingebauten Thymidin entfernt und die Restaktivität des eingebauten Thymidins gemessen.

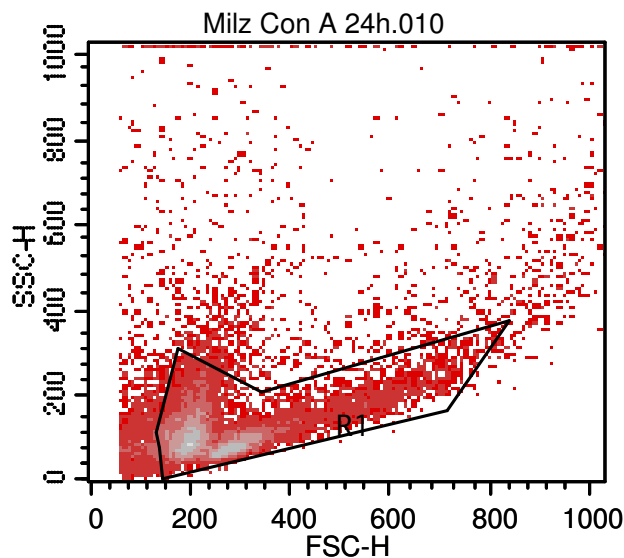
3.9 Vorbereitung zur Phänotypisierung von Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie

Die zuvor aufbereiteten Milzzellen (s. 3.5) werden im Volumen von 100µl in eine 96-Well-Platte gegeben. Neben den Proben für die verschiedenen Stimulationen werden weitere Proben für die Einfach- und Mehrfachproben in die Platte gegeben. Zu den Stimulationsproben wird das Stimulans gegeben und die Platte für die vorgesehene Inkubationszeit (z.B. 4h, 24h, 48h und 72h) in den Brutschrank gelegt. Nach Ende der Inkubationszeit wird die Platte bei 4°C, 1300 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Die Zellsuspension wird nun mit 2% FCS (fetales Kälberserum) in PBS gewaschen und wiederum zentrifugiert. Die Zugabe von 10 µl Fc-Block pro Probe führt nach 10 Minuten Einwirkzeit unter Lichtausschluss zu einer Bindung der unspezifischen Antikörper und verhindert eine Verfälschung der Messergebnisse. Anschließend gibt man unter Lichtausschluss 30µl Antikörper zu den Zellsuspensionen, wartet 30 Minuten und wäscht die Suspensionen einmal mit 120µl 2%FCS in PBS und einmal mit 180µl. Nach erneuter Zentrifugation wird 180 µl 2% Paraformaldehyd in FACS-Puffer hinzugefügt und die Zellsuspensionen in FACS-Tubes abgefüllt. Die fertigen Tubes werden nun bis zur Messung im Gefrierschrank gelagert.

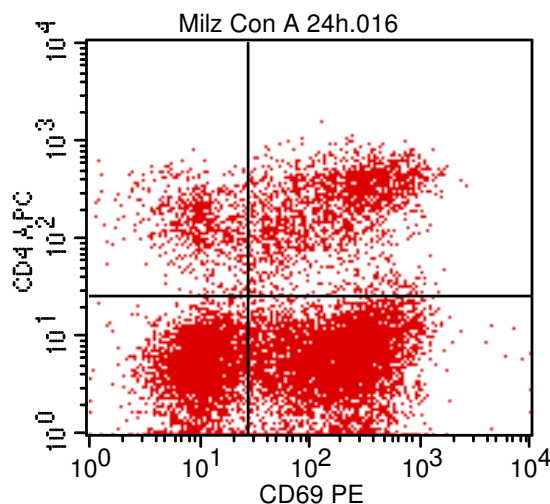
3.10 Phänotypisierung von Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie wird durch Bestrahlung mit einem Laser zunächst sowohl Granularität als auch die Größe einer Zelle bestimmt. Betrachtet man diese beiden Eigenschaften einer Zelle gemeinsam, kann man die Zellen relativ leicht in Lymphozyten, Monocyten und Neutrophilen unterteilen. Als nächstes kann das

Durchflusszytometer durch Messung verschiedener Fluoreszenzen viele Merkmale von Zellen erkennen. Möglich ist dies durch Antikörper, die an spezielle Oberflächenmarker binden und eine fluoreszierende Gruppe tragen. Diese Gruppe emittiert Licht einer bestimmten Wellenlänge, wenn sie durch eine andere Lichtquelle bestrahlt wird. Dargestellt werden die Zellen in einem so genannten Dot-Plot. Der erste Dot-Plot zeigt das Verhältnis der Größe (FSC-H – *Forward Scatter*) und der Granularität (SSC – *Side Scatter*).



In diesem Feld wählt man die gewünschten Zellen aus, in diesem Fall die Lymphozyten, die sich im nicht aktivierten Zustand sowohl durch geringe Größe, als auch geringe Granularität auszeichnen, also links unten zu finden sind. Da dieser Dot-Plot Zellen darstellt, die 24 h lang mit Concavalin A stimuliert wurden, haben einige an Größe zugenommen und bilden einen kleinen Schweif. Die hier ausgewählten Zellen werden im Folgenden auf ihre Eigenschaften bezüglich der Fluoreszenz untersucht.



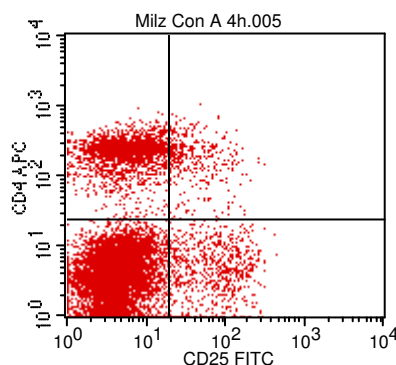
Das Beispiel zeigt den Vergleich zwischen einem CD4-Antikörper, der mit dem Fluoreszenzmarker APC, Allophycocyanin, markiert ist und dem CD69-Antikörper, der eine PE-Markierung (Phycoerythrin-Markierung) erhalten hat. Bevor die wirkliche Messung stattfindet, werden zunächst Einstellproben bezüglich den einzelnen Markern vorgenommen. Bei diesen werden die Fluoreszenzen so eingestellt, dass möglichst viele Zellen dargestellt werden ohne die Daten durch Beeinflussung der nebeneinander liegenden Fluoreszenzen zu verändern. Nachdem die Zellsuspensionen gemessen wurden, werden diese in einem gesonderten Programm ausgewertet. Hierbei wird überprüft, wie viele Zellen welche Merkmale tragen, um die Zellen differenzieren zu können und so auf den Immunstatus zurück schließen zu können.

4. Versuchsergebnisse

CD25

Bei der Messung der CD25-Exprimierung war festzustellen, dass der Oberflächenmarker bei den Zellen der verschiedenen Individuen im Laufe der Stimulation kontinuierlich höhere Werte erreicht. Zu sehen ist dies einmal an Hand der roten Punkte im DotPlot selbst. Hierbei stellt jeder Punkt eine Zelle dar. Je höher ihr Fluoreszenzwert ist, desto weiter rechts bzw. desto höher, je nach Fluoreszenz- entweder die Fluoreszenz des CD25-Fluoreszenzmarkers oder die des CD4-Fluoreszenzmarkers- befindet sich der Punkt. Alle Zellen rechts der senkrechten Linie besitzen auf ihrer Oberfläche CD25, alle oberhalb der horizontalen Linie CD4. Des Weiteren sieht man an Hand der prozentualen Angaben rechts neben dem DotPlot wie viele Zellen sich in diesen Quadranten befinden (UL= links oben; UR= rechts oben; LL= links unten; LR= unten rechts)

DotPlot CD25 nach 4h Stimulation mit ConA



Sample ID: gzm B ko Con A M2 4i

Patient ID: Dominik 1 Milzzellen

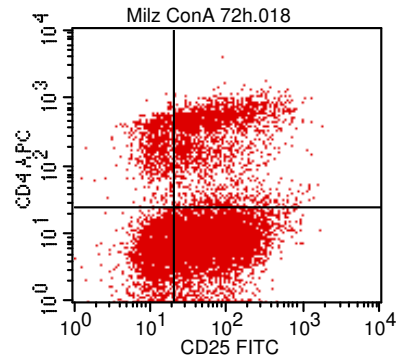
Gate: G1

Gated Events: 10550

Total Events: 12600

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean
UL	2193	20.79	17.40	6.84
UR	355	3.36	2.82	51.85
LL	7301	69.20	57.94	4.74
LR	701	6.64	5.56	88.84

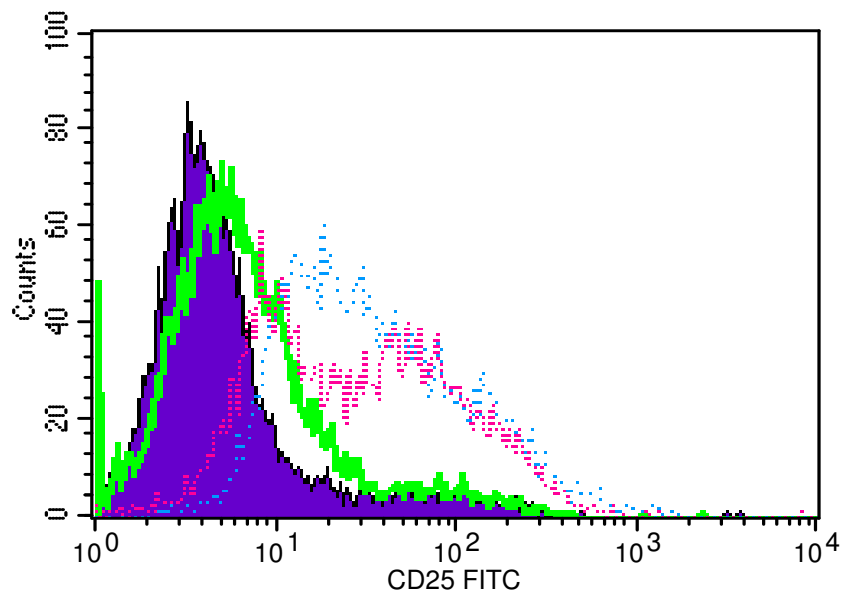
DotPlot CD25 nach 72h Stimulation mit ConA



Sample ID: gzm B ko Con A M2 72l
 Patient ID: Dominik 1 Milzzellen
 Gate: G1
 Gated Events: 11703
 Total Events: 17599

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean
UL	801	6.84	4.55	12.48
UR	2232	19.07	12.68	123.81
LL	2717	23.22	15.44	12.34
LR	5953	50.87	33.83	89.80

Histogramm CD25

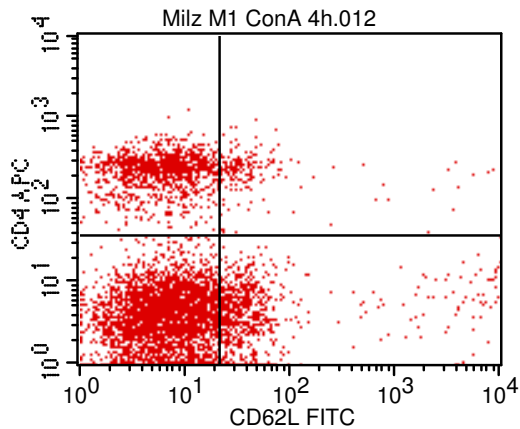


Key	Name	Parameter	Gate
■	Milz Medium 4h.002	FL1-H	G1
—	Milz Con A 4h.004	FL1-H	G1
⋯	Milz Con A 24h.009	FL1-H	G1
⋯	Milz ConA 72h.017	FL1-H	G1

CD62L

CD62L wird im Laufe der ersten 24h einer Infektion herunterreguliert, erreicht nach 72h jedoch ein Exprimierungsniveau, das über dem Ausgangswert liegt.

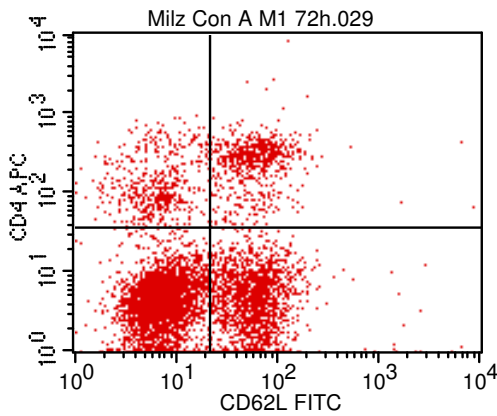
DotPlot CD62L nach 4h Stimulation mit ConA



Sample ID: gzm B ko Maus 1 Con A
 Patient ID: Dominik 1 Milzzellen
 Gate: G1
 Gated Events: 11443
 Total Events: 13274

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean
UL	2362	20.64	17.79	6.73
UR	369	3.22	2.78	263.80
LL	7144	62.43	53.82	7.52
LR	1568	13.70	11.81	409.86

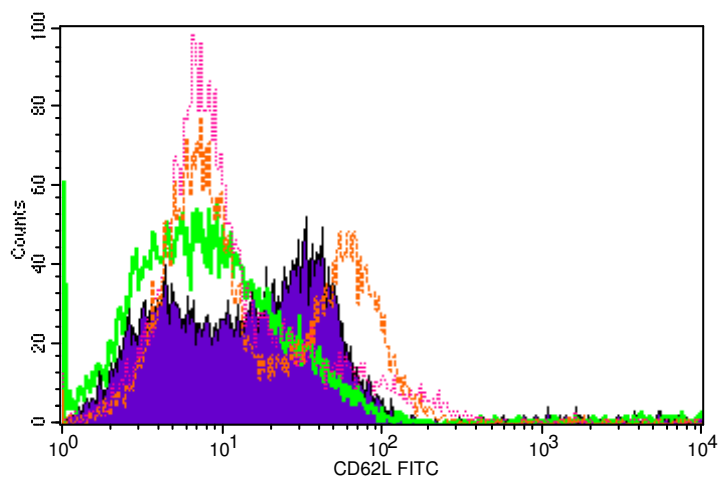
DotPlot CD62L nach 72h Stimulation mit ConA



Sample ID: gzm B ko Con A M1 72l
 Patient ID: Dominik 1 Milzzellen
 Gate: G1
 Gated Events: 12549
 Total Events: 20311

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean
UL	997	7.94	4.91	7.46
UR	1369	10.91	6.74	96.24
LL	6692	53.33	32.95	7.84
LR	3491	27.82	17.19	82.60

Histogramm CD62L

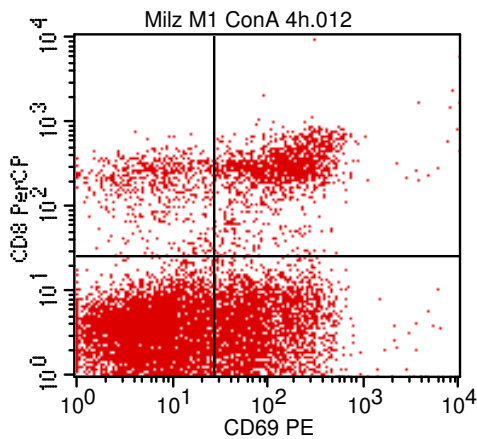


Key	Name	Parameter	Gate
■	Milz M1 Medium.010	FL1-H	G1
■	Milz M1 ConA 4h.012	FL1-H	G1
⋯	Milz Con A 24h.016	FL1-H	G1
---	Milz Con A M1 72h.029	FL1-H	G1

CD62L

Im Gegensatz zu CD62L erreicht CD69 seine maximale Expressierung nach 24h und wird anschließend herunterreguliert.

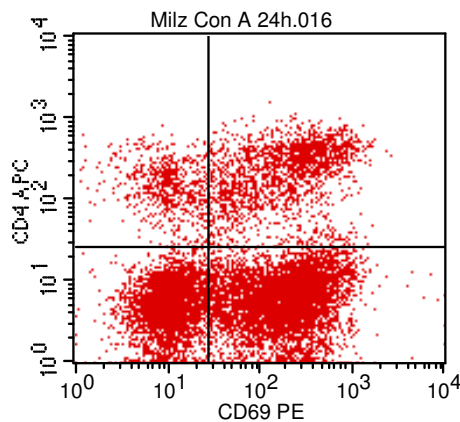
DotPlot CD69 nach 4h Stimulation mit ConA



Sample ID: gzm B ko Maus 1 Con A
 Patient ID: Dominik 1 Milzzellen
 Gate: G1
 Gated Events: 11443
 Total Events: 13274

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean
UL	598	5.23	4.51	9.30
UR	1460	12.76	11.00	248.05
LL	6184	54.04	46.59	8.28
LR	3201	27.97	24.11	137.46

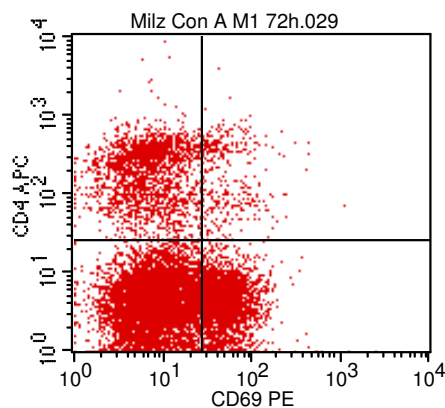
DotPlot CD69 nach 24h Stimulation mit ConA



Sample ID: gzm B ko ConA Maus 1
 Patient ID: Dominik 1 Milzzellen
 Gate: G1
 Gated Events: 12505
 Total Events: 16331

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean
UL	691	5.53	4.23	12.11
UR	1970	15.75	12.06	299.21
LL	4031	32.24	24.68	11.44
LR	5813	46.49	35.59	254.91

DotPlot nach 72h Stimulation mit ConA



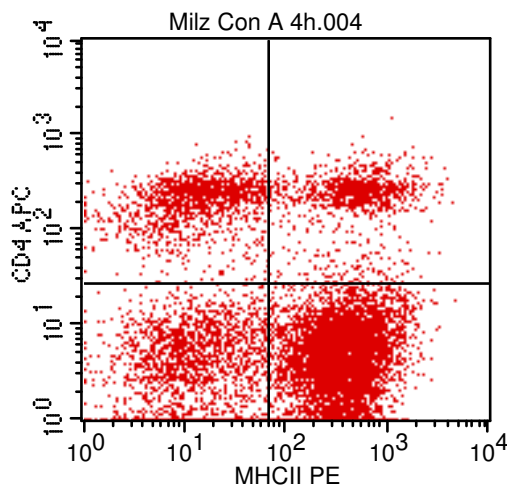
Sample ID: gzm B ko Con A M1 72h
 Patient ID: Dominik 1 Milzzellen
 Gate: G1
 Gated Events: 12549
 Total Events: 20311

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean
UL	2115	16.85	10.41	8.47
UR	349	2.78	1.72	67.25
LL	7488	59.67	36.87	9.70
LR	2597	20.69	12.79	59.41

MHCII

Bei der Messung des Hauptgewebeverträglichkeitskomplexes 2 –MHCII- trat das erste Mal eine signifikante Differenz zwischen den zwei untersuchten Individuen auf, der uns dazu veranlasste eine zusätzliche Durchflusszytometrie mit 4 Mäusen durchzuführen. Im Laufe der Stimulation exprimieren immer mehr Zellen beider Individuen MHCII-Komplexe. Die Zellen des zweiten Individuums weisen jedoch zu maximal 2,31% MHCII-Komplexe auf, während bis zu 68,86% der Zellen der ersten Maus MHCII exprimieren. Bei der zweiten Färbung wurde lediglich in einer 4-fach Einstellprobe keine MHCII-Komplexe nachgewiesen.

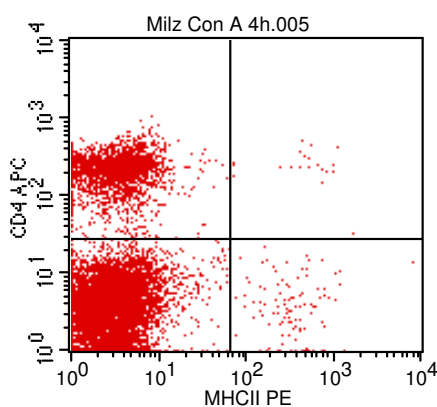
DotPlot MHCII Maus 1 nach 4h Stimulation



Sample ID: gzm B ko Con A M1 4f
Patient ID: Dominik 1 Milzzellen
Gate: G1
Gated Events: 10828
Total Events: 12615

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean
UL	1455	13.44	11.53	18.07
UR	1061	9.80	8.41	631.65
LL	1915	17.69	15.18	17.50
LR	6397	59.08	50.71	422.32

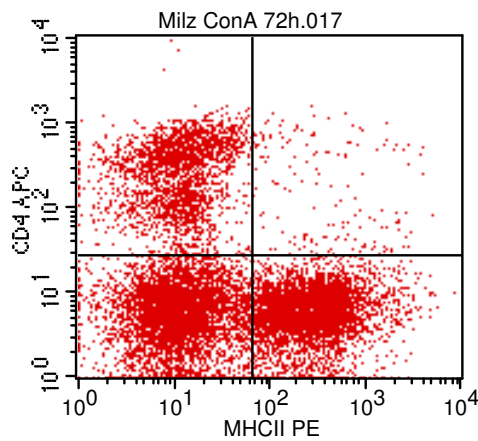
DotPlot MHCII Maus 2 nach 4h Stimulation



Sample ID: gzm B ko Con A M2 4f
Patient ID: Dominik 1 Milzzellen
Gate: G1
Gated Events: 10550
Total Events: 12600

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean
UL	2515	23.84	19.96	4.13
UR	20	0.19	0.16	576.03
LL	7910	74.98	62.78	3.70
LR	105	1.00	0.83	454.49

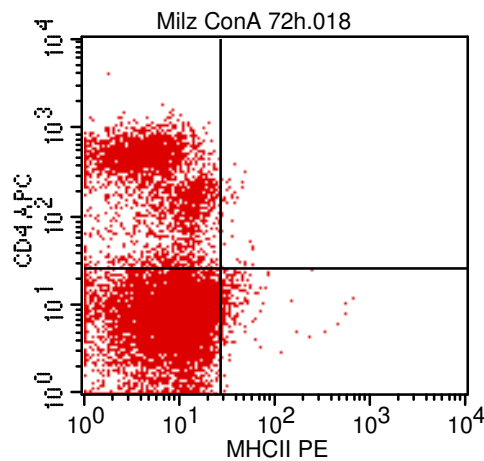
DotPlot MHCII Maus 1 nach 72h Stimulation



Sample ID: gzm B ko Con A M1 72l
 Patient ID: Dominik 1 Milzzellen
 Gate: G1
 Gated Events: 12104
 Total Events: 18415

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean
UL	2467	20.38	13.40	14.43
UR	161	1.33	0.87	760.32
LL	4903	40.51	26.63	16.02
LR	4573	37.78	24.83	393.85

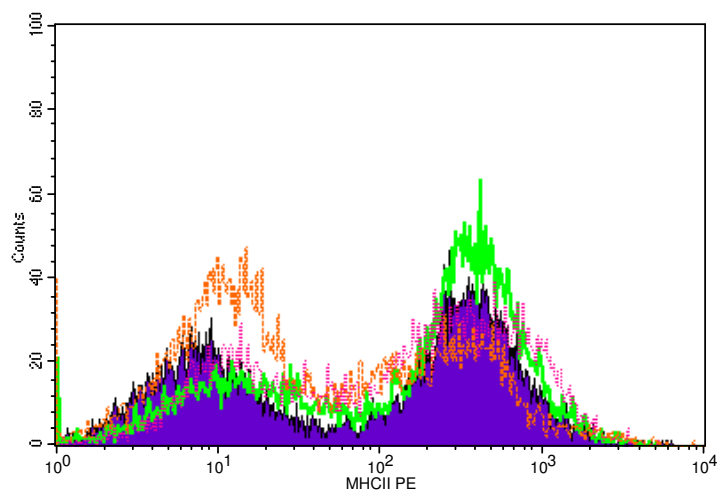
DotPlot MHCII Maus 2 nach 72h Stimulation



Sample ID: gzm B ko Con A M2 72l
 Patient ID: Dominik 1 Milzzellen
 Gate: G1
 Gated Events: 11703
 Total Events: 17599

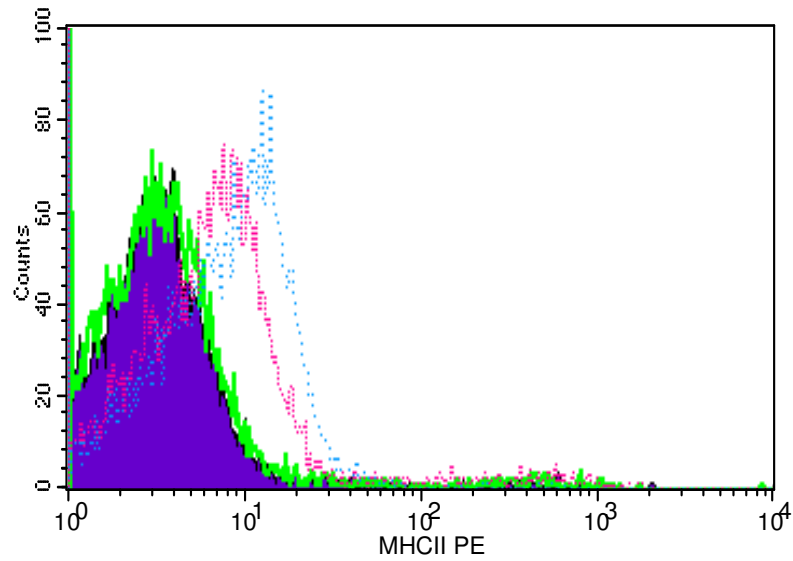
Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean
UL	2972	25.40	16.89	7.18
UR	30	0.26	0.17	45.24
LL	8518	72.78	48.40	9.99
LR	183	1.56	1.04	52.08

Histogramm MHCII Maus 1



Key	Name	Parameter	Gate
■	Milz Medium 4h.002	FL2-H	G1
■	Milz Con A 4h.004	FL2-H	G1
■	Milz Con A 24h.009	FL2-H	G1
■	Milz ConA 72h.017	FL2-H	G1

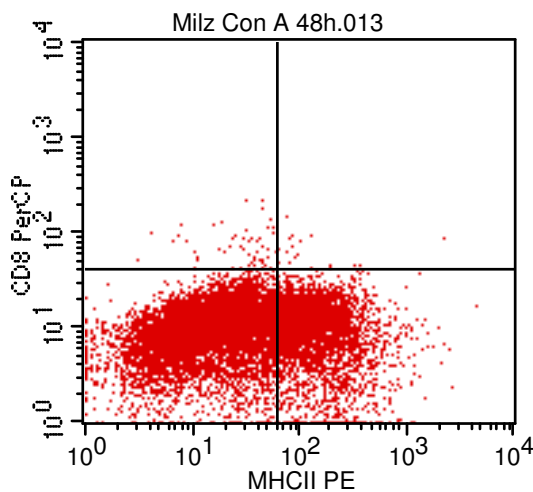
Histogramm MHCII Maus 2



Key	Name	Parameter	Gate
■	Milz Medium 4h.003	FL2-H	G1
—	Milz Con A 4h.005	FL2-H	G1
⋯	Milz Con A 24h.010	FL2-H	G1
⋯	Milz ConA 72h.018	FL2-H	G1

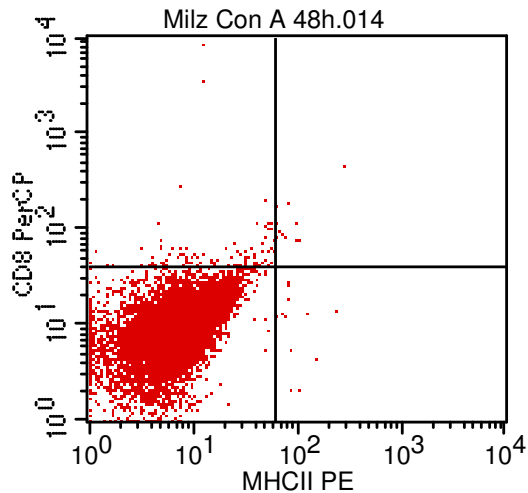
Die Daten der 48h Stimulation waren verfälscht und wurden aus diesen Gründen im Zusammenhang mit der Untersuchung des MHCII-Komplexes erneut durchgeführt.

Verfälschte 48h-Werte



Sample ID: gzm B ko Con A M1 48h
 Patient ID: Dominik 1 Milzzellen
 Gate: G1
 Gated Events: 13324
 Total Events: 18442

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean
UL	64	0.48	0.35	33.44
UR	17	0.13	0.09	274.08
LL	9761	73.26	52.93	19.02
LR	3482	26.13	18.88	192.74



Sample ID: gzm B ko Con A M2 48h
 Patient ID: Dominik 1 Milzzellen
 Gate: G1
 Gated Events: 12591
 Total Events: 17584

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean
UL	114	0.91	0.65	23.67
UR	8	0.06	0.05	108.52
LL	12458	98.94	70.85	9.10
LR	11	0.09	0.06	105.58

5. Diskussion

Die aufgetretenen Versuchsergebnisse sind nur sehr schwer zu interpretieren. Auch nach Rücksprache mit der Arbeitsgruppenleiterin konnte keine Ursache für das Fehlen von MHCII-Komplexen und CD4⁺-Zellen gefunden werden. Die Annahme, dass bei der Aufarbeitung der stimulierten Zellen für die Durchflusszytometrie Fehler gemacht wurden ist nicht zu bestätigen. Die Antikörper wurden vor den 4h-Stimulationsfärbungen in größerem Volumen angemischt, so dass alle Färbungen mit Antikörpern aus einem Behältnis durchgeführt wurden. Des Weiteren kann eine unsachgemäße Durchführung der Färbungen ausgeschlossen werden, da die 4h-Stimulationsfärbung durch die Doktorandin Wiebke Hartmann durchgeführt, die zweite durch sie beaufsichtigt wurde. Auch die Messungen selbst wurden vollständig durch Wiebke Hartmann durchgeführt. Da bei den Weiteren Untersuchungen lediglich eine Einstellprobe keine MHCII-Komplexe exprimiert wurden und überwiegend CD4⁻Zellen vorhanden waren, kann die Beobachtung des vorhergehenden Versuches nicht weiter verifiziert werden. Das nur in einer Einstellprobe die MHCII-Komplexe fehlten ist höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass es bei der ersten Zentrifugation der Platte zu einer Vermischung der Zellsuspensionen gekommen sein könnte.

Die verfälschten 48h-Werte der ersten Untersuchung sind wahrscheinlich auf Probleme mit dem Paraformaldehyd zurückzuführen.

Nach der zweiten Untersuchung die 48h-Werte konnten dann auch die Auftretenszeiten der einzelnen Zellmarker genauer festgestellt werden. CD25 wird zunächst nur von wenigen Zellen exprimiert. Nach einer Stimulation exprimieren nun immer mehr Zellen CD25, was seinen Höhepunkt nach 48h erreicht. Danach wird die

Exprimierung wieder zurückgefahren. Das Erscheinen von CD69 auf den Zelloberflächen verhält sich zum CD25 ähnlich, jedoch erreicht CD69 sein Maximum nach 24h. Im Gegensatz zu diesen beiden Oberflächenmarkern wird CD62L ohne Stimulation wesentlich stärker exprimiert. Im Laufe der ersten 48h nimmt die Exprimierungsstärke des CD62L ab. Danach wird wieder vermehrt CD62L exprimiert. Die Anzahl der Zellen mit MHCII-Komplex auf ihrer Zelloberfläche nimmt hingegen im Laufe der Stimulation stetig ab.

6.Fazit/Rückblick

Mein Forschungspraktikum am Bernhardt-Nocht-Institut für Tropenmedizin hat mir sehr gut gefallen. Nicht nur die Mitglieder meiner Arbeitsgruppe, sondern die Mitarbeiter des Institutes insgesamt, waren unglaublich freundlich und hilfsbereit. Während meiner Arbeit im Labor konnte ich zu jeder Zeit sicher sein, dass mir jemand bei Problemen helfend zur Seite stand und mir auch alle Fragen beantwortet wurden. Als am Anfang feststand, dass ich aufgrund einer fehlenden Impfung die geplanten Versuche an humanem Blutserum nicht durchführen kann, machten sich die Mitarbeiterinnen meiner Arbeitsgruppe direkt auf die Suche nach einer neuen Beschäftigungsmöglichkeit für mich und waren auch gerne dazu bereit mit mir in verstärktem Maße zu arbeiten. Das insgesamt sehr freundliche Klima, die gute Integration in die Arbeitsgruppe und die hervorragende Betreuung durch Wiebke Hartmann erleichterten mir die ersten paar Tage und ich fand sehr schnell gefallen an der Laborarbeit. An meinem Wunschstudium der Medizin hat dieses Praktikum zwar nichts geändert, aber dazu geführt, dass ich nun meine medizinische Dissertation gerne am Bernhardt-Nocht-Institut erarbeiten möchte.

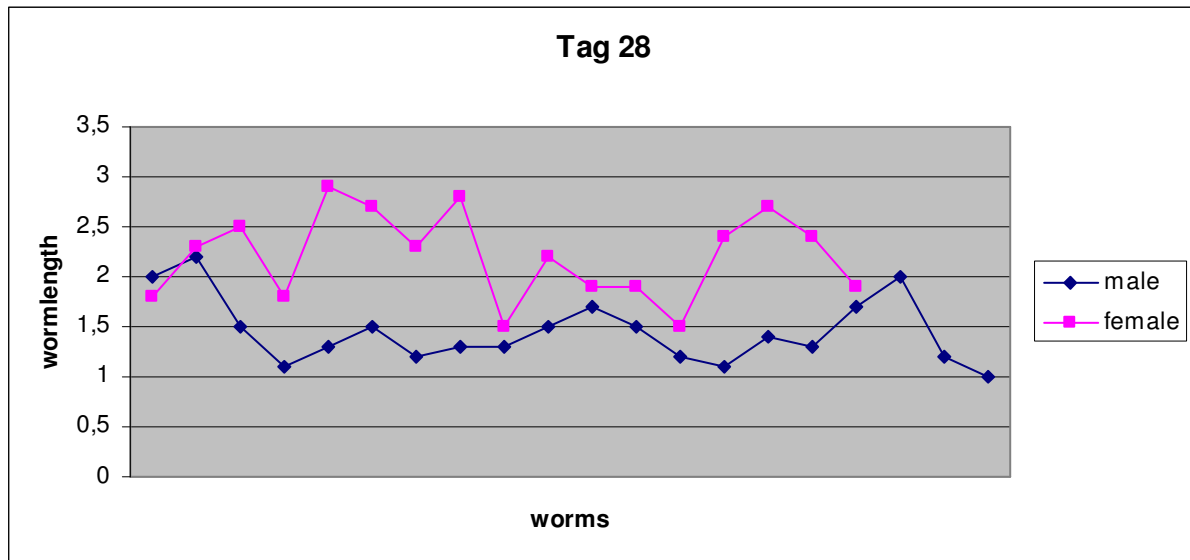
Abschließend möchte ich mich noch bei dem Verband Biologie, Biowissenschaften und Biomedizin in Deutschland e.V. für die Finanzierung des Praktikums, bei dem Förderverein der Biologieolympiade e.V. für die Vergabe des Praktikums, Frau Wiebke Hartmann für die überaus nette Betreuung im und außerhalb des Labors, Frau Dr. Barbara Ebert für die Betreuung vor und während des Praktikums, Frau Dr. Simone Korten für die Möglichkeit das Praktikum in ihrer Arbeitsgruppe durchführen zu können und die Betreuung während des Praktikums, Frau Vera Steisslinger und Marlis Badusche für die Betreuung während des Praktikums.

Anhang

Wurmlängenmessung

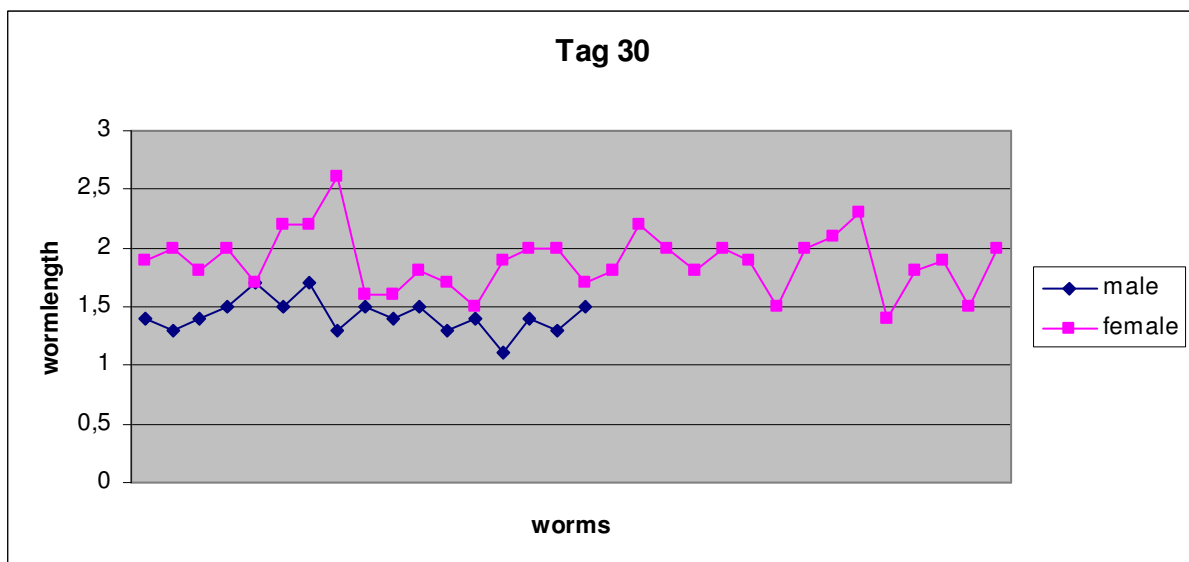
Tag 28

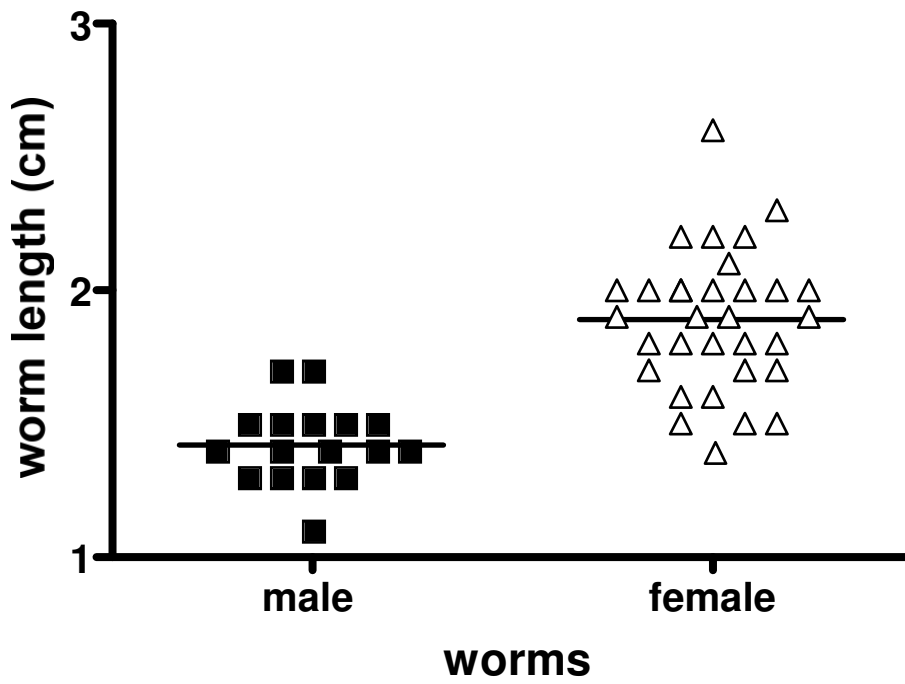
male	female
2	1,8
2,2	2,3
1,5	2,5
1,1	1,8
1,3	2,9
1,5	2,7
1,2	2,3
1,3	2,8
1,3	1,5
1,5	2,2
1,7	1,9
1,5	1,9
1,2	1,5
1,1	2,4
1,4	2,7
1,3	2,4
1,7	1,9
2	
1,2	
1	



Tag 30

male	female
1,4	1,9
1,3	2
1,4	1,8
1,5	2
1,7	1,7
1,5	2,2
1,7	2,2
1,3	2,6
1,5	1,6
1,4	1,6
1,5	1,8
1,3	1,7
1,4	1,5
1,1	1,9
1,4	2
1,3	2
1,5	1,7
	1,8
	2,2
	2
	1,8
	2
	1,9
	1,5
	2
	2,1
	2,3
	1,4
	1,8
	1,9
	1,5
	2

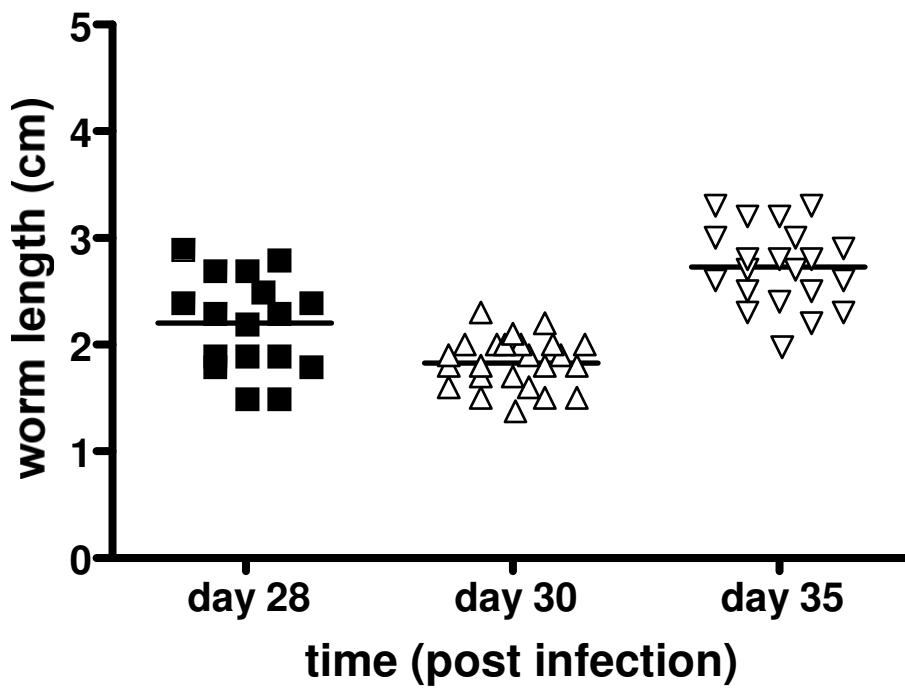
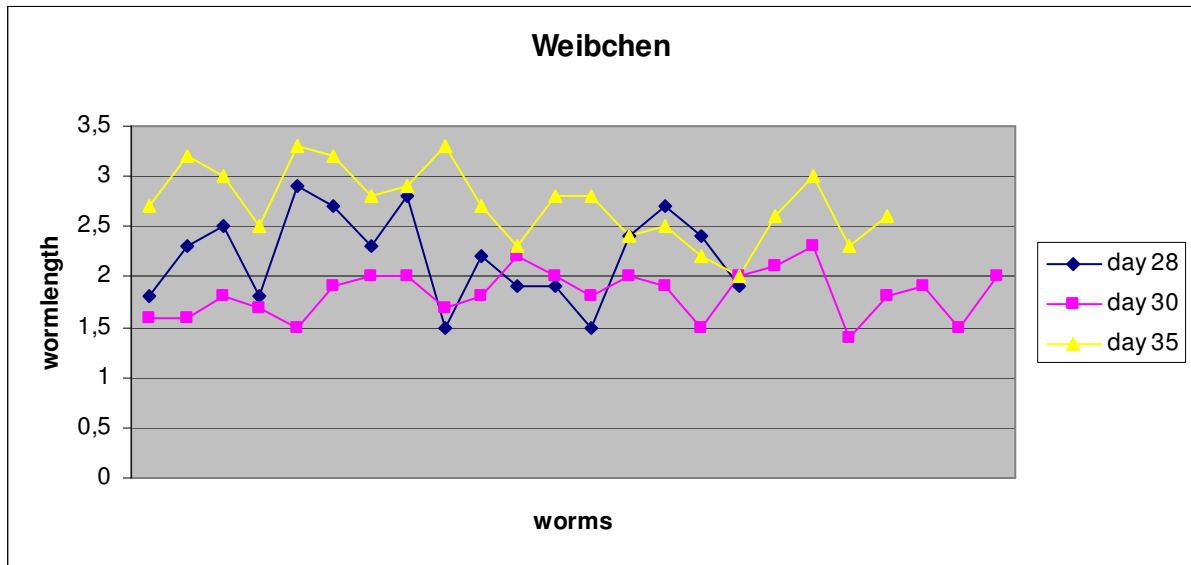




Tag 35

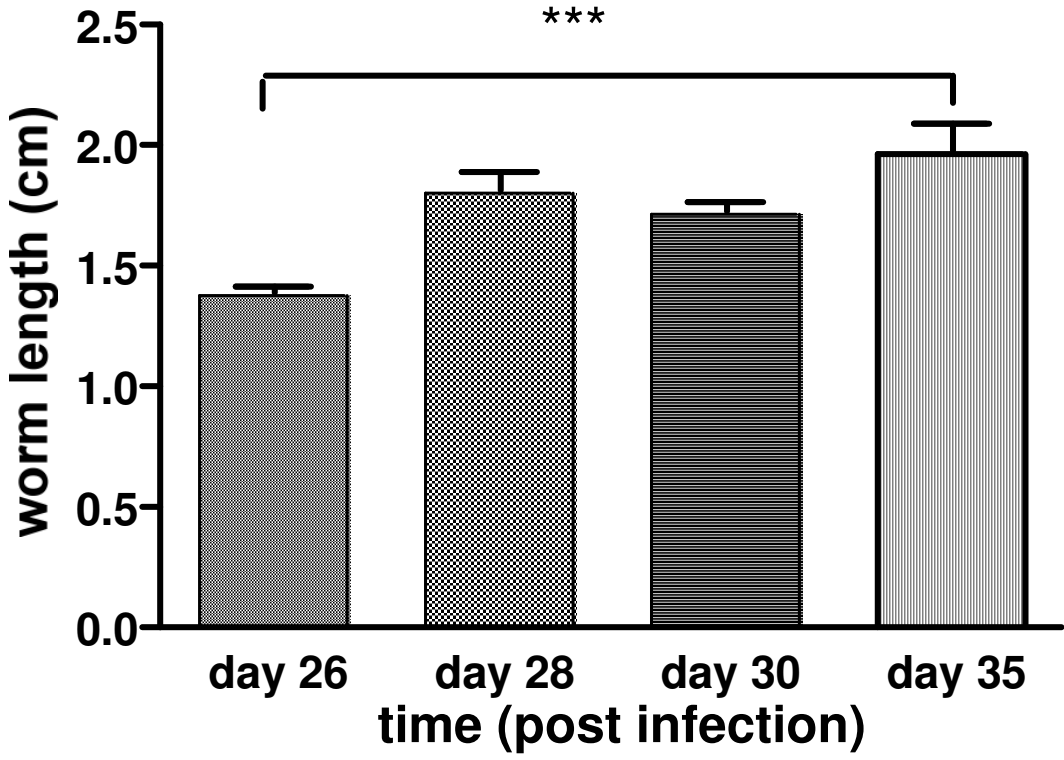
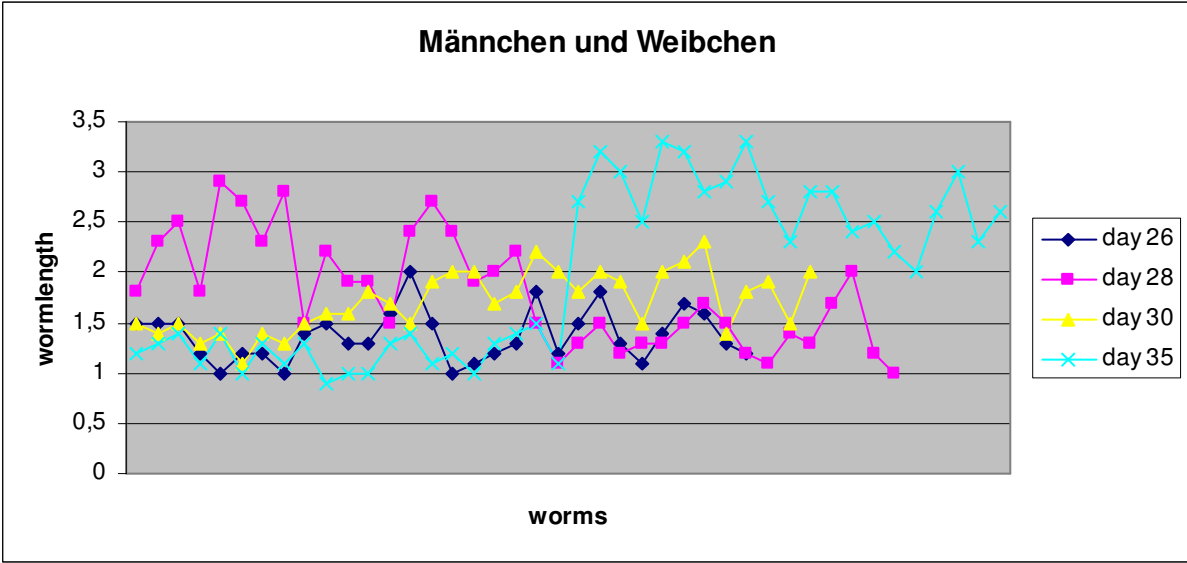
1,2	2,7
1,3	3,2
1,4	3
1,1	2,5
1,4	3,3
1	3,2
1,3	2,8
1,1	2,9
1,3	3,3
0,9	2,7
1	2,3
1	2,8
1,3	2,8
1,4	2,4
1,1	2,5
1,2	2,2
1	2
1,3	2,6
1,4	3
1,5	2,3
1,1	2,6

1,5	1,8	2,8
2,4	2	2,4
2,7	1,9	2,5
2,4	1,5	2,2
1,9	2	2
	2,1	2,6
	2,3	3
	1,4	2,3
	1,8	2,6
	1,9	
	1,5	
	2	



Vergleich aller Würmer Tag 26, 28, 30, 35

day 26	day 28	day 30	day 35
1,5	1,8	1,5	1,2
1,5	2,3	1,4	1,3
1,5	2,5	1,5	1,4
1,2	1,8	1,3	1,1
1	2,9	1,4	1,4
1,2	2,7	1,1	1
1,2	2,3	1,4	1,3
1	2,8	1,3	1,1
1,4	1,5	1,5	1,3
1,5	2,2	1,6	0,9
1,3	1,9	1,6	1
1,3	1,9	1,8	1
1,6	1,5	1,7	1,3
2	2,4	1,5	1,4
1,5	2,7	1,9	1,1
1	2,4	2	1,2
1,1	1,9	2	1
1,2	2	1,7	1,3
1,3	2,2	1,8	1,4
1,8	1,5	2,2	1,5
1,2	1,1	2	1,1
1,5	1,3	1,8	2,7
1,8	1,5	2	3,2
1,3	1,2	1,9	3
1,1	1,3	1,5	2,5
1,4	1,3	2	3,3
1,7	1,5	2,1	3,2
1,6	1,7	2,3	2,8
1,3	1,5	1,4	2,9
1,2	1,2	1,8	3,3
	1,1	1,9	2,7
	1,4	1,5	2,3
	1,3	2	2,8
	1,7		2,8
	2		2,4
	1,2		2,5
	1		2,2
			2
			2,6
			3
			2,3
			2,6

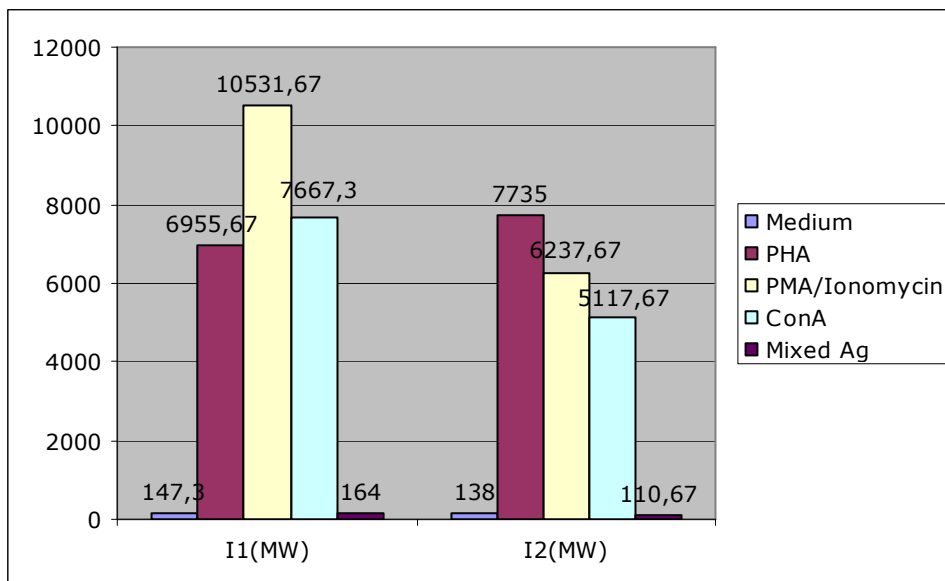


Proliferationstest

24h

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	24	16	18	42	40	18	74	54	52	8	16	6
B	24	242	118	70	120	44	26	92	44	44	20	24
C	50	112	198	70	88	58	64	38	34	28	16	24
D	124	200	118	150	5529	7816	7522	58	30	22	80	46
E	120	152	142	80	9722	8362	5121	68	64	126	224	142
F	48	90	48	54	108	54	182	90	100	128	106	98
G	7122	8018	7862	94	12972	11009	7614	40	34	22	24	50
H	5095	4905	5353	96	7333	6023	5357	48	24	16	14	14

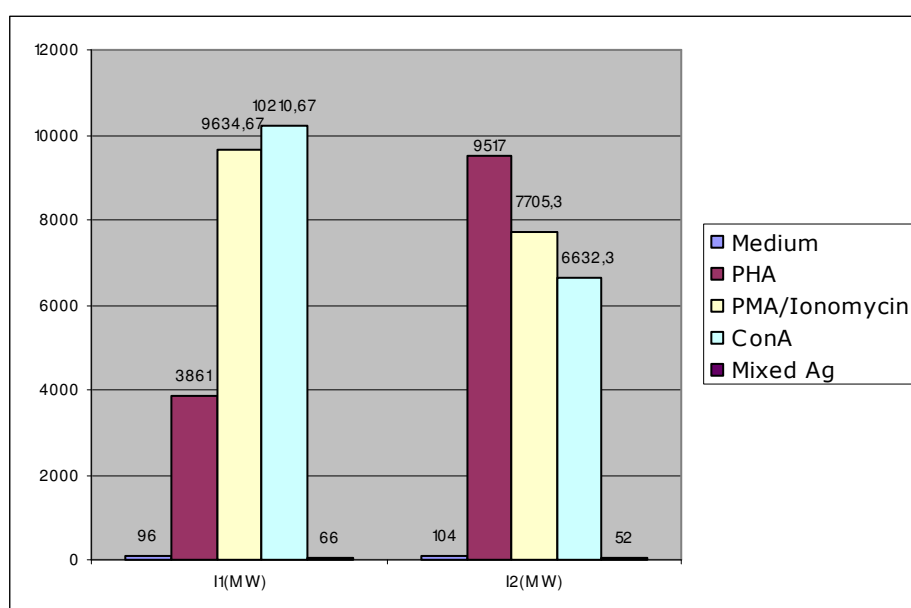
	I1(MW)	I2(MW)
Medium	147,3333333	138
PHA	6955,666667	7735
PMA/Ionomycin	10531,66667	6237,666667
ConA	7667,333333	5117,666667
Mixed Ag	164	110,6666667



48h

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	14	18	16	40	42	10	24	18	14	6	6	8
B	4	90	34	18	50	40	30	20	20	14	16	14
C	36	80	98	50	310	110	50	14	18	10	2	12
D	82	132	74	130	5884	4730	969	90	66	12	8	18
E	104	114	94	116	10632	9858	8061	138	32	66	60	72
F	46	264	256	40	80	210	238	38	34	64	42	50
G	11539	10003	9090	234	12459	8857	7588	26	26	18	12	20
H	9180	9705	1012	128	9364	7486	6266	128	34	10	12	14

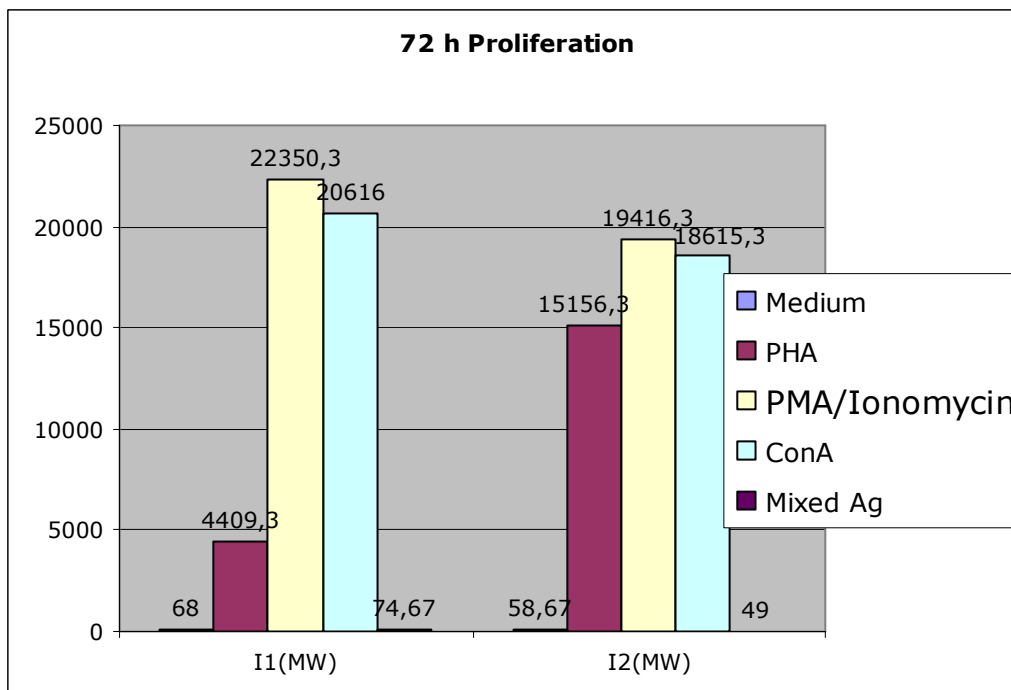
	I1(MW)	I2(MW)
Medium	96	104
PHA	3861	9517
PMA/Ionomycin	9634,66667	7705,333333
ConA	10210,66667	6632,333333
Mixed Ag	66	52



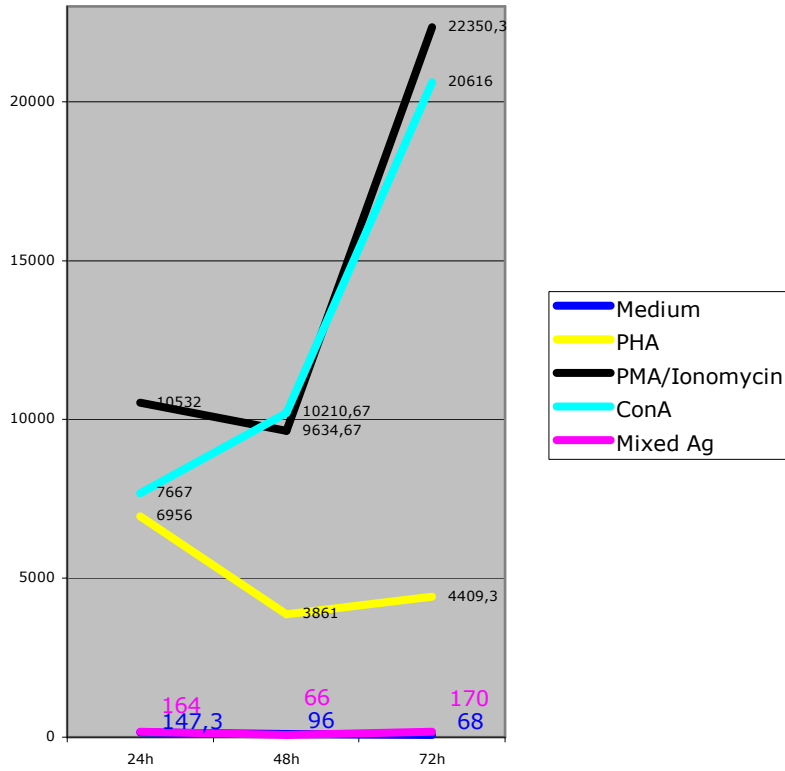
72h

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	16	16	14	16	14	6	26	32	20	6	6	20
B	18	172	60	42	34	32	14	34	24	8	10	6
C	32	42	108	88	86	88	78	28	16	6	12	16
D	60	86	58	1047	9330	843	3055	18	36	18	20	36
E	44	62	70	1033	14700	14298	16471	26	22	78	72	74
F	44	126	568	30	138	144	154	60	46	80	21	46
G	21122	20925	19801	172	23034	20704	23313	90	28	30	18	10
H	19502	18875	17469	102	19832	20727	17690	130	24	40	16	18

	I1(MW)	I2(MW)
Medium	68	58,66666667
PHA	4409,333333	15156,33333
PMA/Ionomycin	22350,33333	19416,33333
ConA	20616	18615,33333
Mixed Ag	74,66666667	49



Proliferation I1



Proliferation I2

