

2 Material und Methoden

2.1 Zelllinien

Als Modelltumor wurde das B16F0-Melanom der C57BL/6-Maus eingesetzt. Die Zellen stammten von der American Type Culture Collection (ATCC, #CRL-6322). Die Kultivierung erfolgte in RPMI 1640 mit 10% FBS ohne Zusatz von Antibiotika. Wegen ihrer hohen Zellteilungsrate (eine Teilung in 20-24 h) wurden die Zellen zweimal wöchentlich passagiert. Für die Passage wurden die Zellen mit 20 mM EDTA in PBS (pH 7,4) abgelöst und in frischem Medium in einer Verdünnung von 1:25 bis 1:100 ausplattiert. Einige Versuche zur MHC-Expression nach Hyperthermie wurden mit Zellen des murinen T-Zell-Lymphoms RMA durchgeführt. Die Zellen wurden von Prof. Dr. Walden von der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité zur Verfügung gestellt. RMA-Zellen teilen sich ebenfalls alle 20-24 h und wurden daher zweimal wöchentlich passagiert. Zur Passage wurden die in Suspension wachsenden RMA gut aufgeschüttelt und in frische Kulturflaschen in einer Verdünnung von 1:25 bis 1:100 ausplattiert. Die Kultur erfolgte in DMEM mit 5 % FBS und 90 nM β -Mercaptoethanol.

Nur Zellen mit einer Kulturdauer von weniger als 3 Monaten (entspricht etwa 20 Passagen) wurden für Versuche verwendet. Zur Lagerung wurden Zellen einer niedrigen Passagenummer (Passagen 2-6) in Einfriermedium aufgenommen und in vielen Aliquots langsam eingefroren. Die Lagerung erfolgt in flüssigem Stickstoff. Die Zellkulturen wurden alle 6 Monate auf die Kontamination mit Mycoplasmen überprüft.

Zellkulturmedien:	RPMI 1640 + L-Glutamin, PAA # E15-840 DMEM + 0,11 g/l NaPyruvat + Pyidoxin, Gibco # 41966-029
Einfriermedium:	Cell Culture Freezing Medium mit FBS und 10 % DMSO; Gibco, # 25050
Mycoplasma Detection Kit:	ELISA zum Nachweis von <i>M. argini</i> , <i>M. hyorhinitis</i> , <i>M. l. aidlawii</i> und <i>M. orale</i> ; Boehringer Mannheim, # 1 296 744

2.2 Mäuse

Die Versuche wurden mit weiblichen C57BL/6-Mäusen durchgeführt. Die Mäuse wurden im Alter von 6-8 Wochen beim Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV, Berlin) oder bei Harlan-Winkelmann (Borchen) gekauft und in der Tierexperimentellen Einrichtung des Virchow-Klinikums gehalten. Sie erhielten Wasser und Trockenfutter *ad libitum*. Vor Beginn des Versuches wurden sie eine Woche in der Tierhaltung eingewöhnt. Nach Abschluß eines Versuches wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und der Analyse zugeführt.

2.3 Tierexperimentelle Methoden

2.3.1 Narkose und Sedierung von Mäusen

Zur Narkose wurde 0,3 mg/ml Ketamin und 1,3 mg/ml Xylazin in steriler isotoner NaCl verwendet. Von dieser Lösung wurden 200 µl intraperitoneal injiziert (entspricht bei einem durchschnittlichen Körpergewicht von 20-25 g 75-93 µg Ketamin und 10-13 µg Rompun pro Gramm Körpergewicht). Die Narkose trat nach etwa 5 min ein und dauerte 30-60 min.

Zur Sedierung der Tiere wurde 250 µg/ml Midazolam in steriler isotoner NaCl verwendet. Von dieser Lösung wurden 200 µl intraperitoneal injiziert (entspricht 2-2,5 µg Midazolam pro Gramm Körpergewicht). Die Sedierung trat nach etwa 5 min ein und dauerte 60-90 min.

Ketamin: Ketamin 50 mg/ml, Curamed Zulassungsnr. 14999.00.00

Xylazin: Rompun 2 %, Bayer, Registrierungsnr. R1061

Midazolam: Dormicum 1 mg/ml, Roche Zulassungsnr. 41118.00.00

2.3.2 Tumortransplantation in Mäuse

Zur Tumortransplantation wurde eine große Zahl von B16F0 Zellen der 4. Passage in Aliquots eingefroren. Die Zellen wurden eine Woche vor Injektion aufgetaut und in Kultur genommen. Zur Injektion wurden Zellen verwendet, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden (etwa 50-75 % konfluent). Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 20 mM EDTA in PBS (pH 7,4) abgelöst. 10^5 Zellen in 50 µl PBS wurden mittels einer 27 G-Kanüle subkutan in die hintere rechte Extremität von C57BL/6-Mäusen

injiziert. Dies entspricht beim B16 Melanom dem doppelten der minimalen tumorigenen Dosis (Ostrand-Rosenberg and Kruisbeek 2000). Die Injektion erfolgte unter Narkose in den Unterschenkel. Zur Identifizierung der Tiere dienten Ohrmarkierungen. Die Tiere wurden in der Reihenfolge der Tumorinjektion markiert. Ab dem 10. Tag nach Injektion wurde der Tumordurchmesser mit Hilfe einer Schieblehre gemessen.

2.3.3 Regionale Hyperthermie von Mäusen

Die Hyperthermie-Behandlung der Tumore begann bei einem durchschnittlichen Tumordurchmesser von 10 mm. Die Einteilung der Tiere in die Therapie-Gruppen erfolgte randomisiert. Alle Tiere eines Versuches wurden am gleichen Tag behandelt. Die Applikation der regionalen Hyperthermie erfolgte im temperierten 0,9 % (isotonen) NaCl-Bad (autoklavierte Lösung). Die Mäuse wurden in einem 50 ml Falcon-Röhrchen, welches mit Luftlöchern versehen worden war, so fixiert, daß das tumortragende Bein in das temperierte Wasser ragte (Abbildung 14, Abschnitt 3.2.1). Die Hyperthermie-Dauer betrug 30 min.

2.3.4 Immunisierung von Mäusen

B16F0-Zellen in exponentieller Wachstumsphase wurden mit 20 mM EDTA in PBS (pH 7,4) geerntet und in PBS Zellen wurden geerntet und in PBS mit Proteinase-Inhibitoren und 1 % SDS aufgenommen. Die Zellen wurden auf Eis gekühlt und zweimal 20 sec sonifiziert. Verbleibende größere Partikel wurden abzentrifugiert, der Überstand wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert. Der Gesamtproteingehalt des Zelysats wurde mit der der Bicinchonsäuremethode (bicinchonic acid = BCA) bestimmt. Bei alkalischem pH reduzieren Proteine Cu^{2+} zu Cu^{+} , welches mit Bicinchonsäure einen violetten Komplex bildet. Die Menge des Cu^{+} -Bicinchonsäure-Komplexes wurde photometrisch bei 570 nm bestimmt. Zur Kalibration wurde eine serielle Verdünnung von Rinderserum-Albumin (BSA) verwendet. Die Reaktion wurde mit gebrauchsfertigen Lösungen der Firma Pierce durchgeführt. Der lineare Meßbereich liegt zwischen 0,2 und 1,4 mg/ml Protein. Ein Aliquot dieses Zelllysats wurde mit dem gleichen Volumen komplettem Freundschem Adjuvans gemischt und mindestens 30 min auf dem Vortex geschüttelt. Maximal 60 μl dieser Lösung mit 200 μg Gesamtprotein wurde intraperitoneal injiziert.

Zur Etablierung des Nachweises von T-Zell-Rezeptor Exzisionszirkeln wurden Mäuse subkutan in die rechte hintere Extremität mit 50 µg Ovalbumin in komplettem Freundschem Adjuvans immunisiert.

Proteinase-Inhibitor-Cocktail:	Roche, # 1 697 498
BCA-Proteinassay-Reagenzien:	Pierce, #23226
BSA für Standardreihe:	2 mg/ml in 0,9 % NaCl, Pierce #23209
komplettes Freundsches Adjuvans:	Sigma, # F-5881
Ovalbumin:	Grad VI, Sigma, # A-2512

2.3.5 Intravenöse Injektion von Leukozyten

Die zu injizierenden Leukozyten wurden in sterilem PBS aufgenommen. Die Mäuse wurden in Messingröhren so fixiert, daß ihr Schwanz zugänglich war. Der Schwanz wurde mit Nitrolingual-Spray eingesprüht und ca. 30 sec mit Rotlicht bestrahlt, um die Durchblutung der lateralen Schwanzvenen zu verstärken. 2×10^7 Zellen in 50 µl PBS wurden in die Schwanzvene injiziert.

Nitrolingual Spray N: G.Pohl-Boskamp, Registrierungsnr. 48058

2.3.6 Venöse Blutabnahme

Venöses Blut wurde aus der lateralen Schwanzvene oder der *Vena cava* der Mäuse entnommen. Zur Blutentnahme aus der Schwanzvene wurden die Tiere 2-5 min mit Rotlicht bestrahlt und in einer Metallhalterung fixiert. Die Schwanzvene wurde mit einem Skalpell geritzt und das Blut wurde in einem Eppendorf-Gefäß mit 10 µl Heparin aufgefangen. Die Blutentnahme aus der *Vena cava* erfolgte invasiv unter Narkose. Die *Vena cava* wurde nach Öffnung des Abdomens mit einer heparinisierten 27 G-Kanüle punktiert. Die Tiere wurden nachfolgend durch zervikale Dislokation getötet.

Heparin: 5000 U/ml, Biochrom, # L 6510

2.4 Gewinnung von Leukozyten aus murinen lymphatischen Geweben

2.4.1 Isolierung von Leukozyten aus Blut und lymphatischen Organen

Nach der Blutentnahme wurden die Erythrozyten mit 1,55 M Ammoniumchlorid in Kaliumhydrogencarbonat-Puffer (Erythrozyten-Lysepuffer) lysiert. 100 µl Blut wurden mit 3 ml Lysepuffer gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert und zweimal mit PBS oder Medium (je nach weiterer Verwendung) gewaschen.

Die efferenten und nicht-efferenten Lymphknoten in der Nähe des Tumors, sowie die Milz wurden entnommen (Abbildung 5). Die lymphatischen Organe wurden in PBS aufgenommen und über Stahlnetze (Milzen, Netze von Sigma) oder Nylonnetze (Lymphknoten, Thymus, Knochenmark, Netze von Falcon) gerieben. Die vereinzelt Milzzellen wurden anschließend auf steriles isotones Dichtegradientenmedium (Lympholyte®, Cedarlane) geschichtet und bei Raumtemperatur 20 min bei 1000 g zentrifugiert. Die Mononukleären Zellen (Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen, sowie Dendritische Zellen), die die sich in der Interphasengrenze sammelten, wurden abgenommen und 2x in PBS oder Medium gewaschen (800 g). Die vereinzelt Zellen aus anderen lymphatischen Organen wurden wegen des geringen Anteils an Erythrozyten und Granulozyten nicht über Lympholyte getrennt, sondern 2x in PBS oder Medium gewaschen. Die Zahl der gewonnenen Zellen wurde am Hämatozytometer (CellDyn 3500 der Firma Abbott) oder mittels einer Neubauer-Kammer bestimmt.

Erythrozyten-Lysepuffer: 1,55 M NH₄Cl
 100 mM KHCO₃
 10 mM EDTA

Lympholyte-M: Dichtegradientenmedium für murine Lymphozyten, Dichte
 1,0875 g/ml, pH 6,9; Cedarlane, USA, # CL-5035

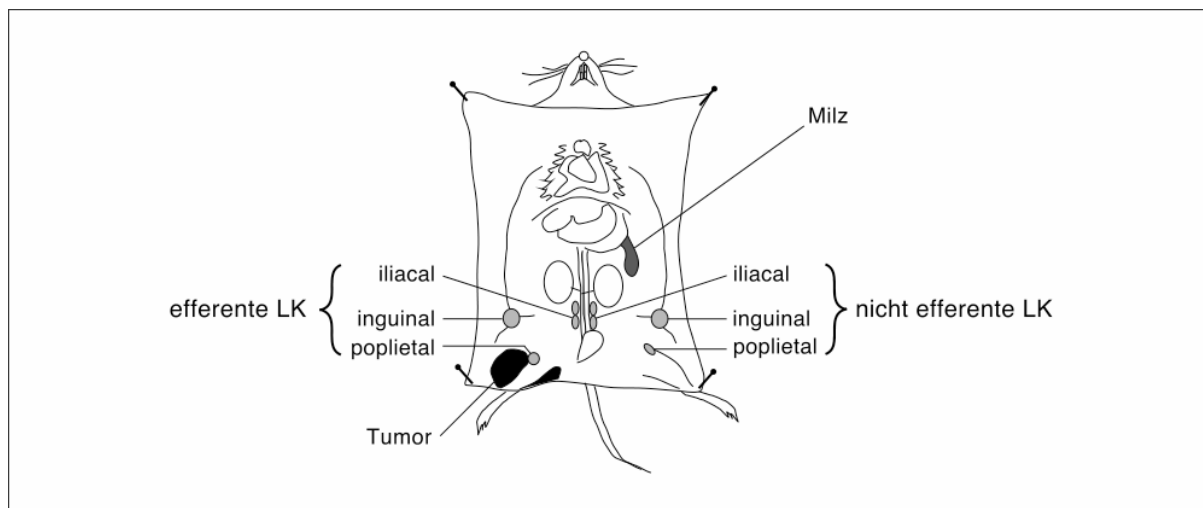


Abbildung 5: Lokalisation des Tumors und der Lymphknoten, Dargestellt sind das Abdomen und der Thorax einer Maus, der Darm ist entfernt.

2.4.2 Isolierung von Dendritischen Zellen aus Vorläuferzellen des Knochenmarks

Dendritische Zellen wurden aus Vorläuferzellen des Knochenmarks von C57BL/6-Mäusen gewonnen. Femur und Tibia beider Hinterbeine einer Maus wurden nach zervikaler Disikation entnommen, von Muskelgewebe befreit und in 70 % Ethanol für 5 min sterilisiert. Anschließend wurden die Knochen unmittelbar neben den Gelenken abgeschnitten, so daß das Knochenmark zugänglich war. Mittels einer 20 G-Kanüle wurde eiskaltes steriles PBS durch den Knochen gespült (Abbildung 6). Die Spülflüssigkeit mit dem darin enthaltenen Knochenmark wurde in einem sterilen Röhrchen aufgefangen. Die Knochenmarkszellen wurden durch Aufschwemmen mit einer sterilen Transferpipette vereinzelt, zweimal in PBS gewaschen und anschließend in Medium aufgenommen. Nach Zugabe von 1500 u/ml GM-CSF wurden die Zellen ohne IL-4 kultiviert, um unreife Dendritische Zellen mit einer hohen Phagozytose-Aktivität zu erhalten. Nach 5-7 Tagen Kultur, wenn etwa 50-70 % der Zellen die typische Morphologie Dendritischer Zellen aufwiesen, wurden die nicht-adhärenenten Zellen geerntet.

Medium: RPMI 1640 mit 5 % FBS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 50 µM β-Mercaptoethanol

GM-CSF: rekombinant, murin; R&D Systems, # 415-ML

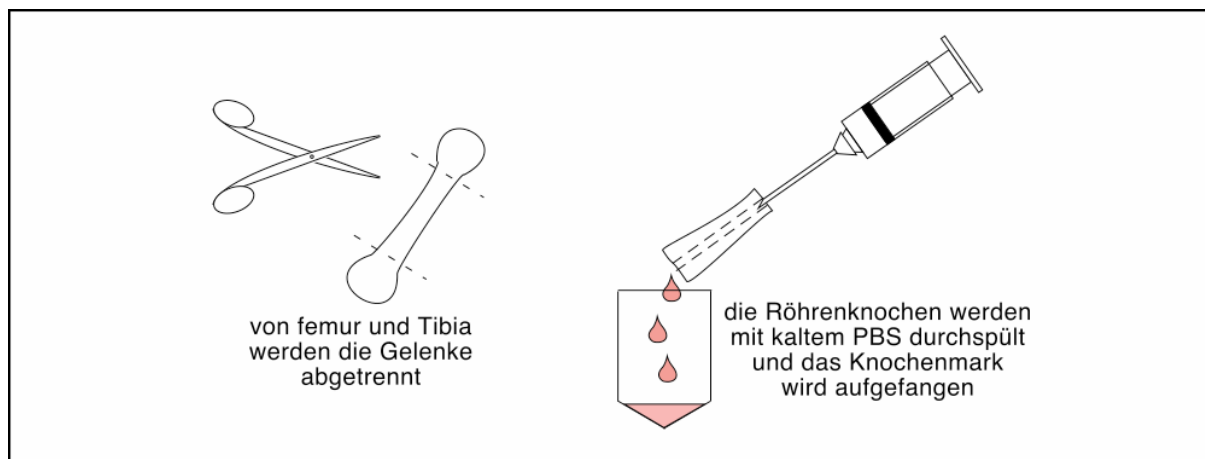


Abbildung 6: Gewinnung murinen Knochenmarks

2.5 Funktionelle Analyse von murinen Leukozyten ex vivo

2.5.1 Phagozytose von hyperthermierten B16F0-Zellen durch Dendritische Zellen

Dendritische Zellen wurden bei 37°C 10 min mit 5 µg/ml DiO markiert. DiO ist ein Membranfarbstoff, der nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm bei 530 nm emittiert, und somit im FACS-Calibur meßbar ist. B16F0-Zellen wurden einen Tag vor Hyperthermie mit dem Membranfarbstoff DiI (Anregung bei 488 nm, Emission bei 585 nm) markiert. Nach Hyperthermie der B16F0-Zellen wurden sie mit Dendritischen Zellen für 24 Stunden kokultiviert. Nach dieser Zeit wurden alle Zellen geerntet und im FACS die Zahl der doppelt positiven Zellen bestimmt. Als Referenz wurden UV-bestrahlte B16F0-Zellen verwendet. Am Konfokalmikroskop wurde exemplarisch überprüft, ob es sich bei den doppelt positiven Ereignissen um Zellaggregate oder um einzelne Zellen handelte.

DiO, DiI: Vybrant Multicolor Cell Labelling Kit; Molecular Probes, #V22889

2.5.2 Phagozytoseaktivität der Monozyten des peripheren Bluts und der Lymphknoten

Die Phagozytoseaktivität von Monozyten des peripheren Bluts und der regionalen Lymphknoten wurde mit fluoreszenzmarkiertem Dextran analysiert. Als Antigen wurde Dextran mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 10 kD verwendet. Für jede zu untersuchende Probe in 2 Röhren je 25 µl eisgekühltes Blut oder Zellsuspension mit je 5 µl Dextran (Endkonzentration 400 µg/ml) gemischt. Ein Ansatz blieb gekühlt, der zweite Ansatz wurde in einem Wasserbad 2 h bei 37°C inkubiert. Unmittelbar nach der Inkubation wurden

die Zellen wieder in das Eisbad transferiert und zweimal mit kaltem Puffer gewaschen. Nach Fixierung der Leukozyten wurden die Probe durchflußzytometrisch analysiert.

Dextran: Molekulargewicht 10 kD, anionisch, markiert mit Alexa Fluor 488;
Molecular Probes # D-22910

2.5.3 Messung der Zell-Proliferation durch die Markierung mit CFSE

Isolierte Leukozyten wurden mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, um nach intravenöser Injektion ihre Migration und Proliferation verfolgen zu können. Das farblose CFDA-SE (Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester) ist hydrophob und kann die Membran von Zellen durchqueren. In der Zelle werden durch Esterasen die beiden Acetatreste abgespalten und es entsteht das grün fluoreszierende CFSE (Carboxyfluorescein-Succinimidylester). CFSE bindet unter Abspaltung der Succinimidylgruppe an Lysin- und Argininreste cytoplasmatischer Proteine. Die Carboxyfluorescein-markierten Proteine werden bei der Teilung einer Zelle zu gleichen Teilen an ihre Tochterzellen weitergegeben. Die Zahl der Zellteilungen läßt sich daher anhand der Fluoreszenzintensität einer Zelle bestimmen. Zugleich ermöglicht die Methode eine Differenzierung der Zellen mit Hilfe fluoreszenzmakierter Antikörper. Zu beachten ist, daß bis zu 48 Stunden nach Markierung die Fluoreszenz auch bei sich nicht teilenden Zellen nachläßt, da Proteine mit kurzer Halbwertszeit abgebaut werden und sekretorische Proteine abgegeben werden. Daher müsse immer sich nicht teilende Zellen als Kontrolle eingesetzt werden. Die Aufnahme sekretorischer Proteine durch andere Zellen kann zu einer schwachen Zunahme von deren Fluoreszenzintensität führen.

Die CFSE-Markierung wurde in PBS durchgeführt. Zu $1-5 \times 10^7$ Zellen/ml wurde $4 \mu\text{l/ml}$ CFDA-SE (Endkonzentration $4 \mu\text{g/ml}$) gegeben und durch Schwenken schnell mit der Zellsuspension vermischt. Die Zellen wurden 10 min bei 37°C inkubiert und mindestens zweimal in PBS gewaschen. Die Färbung der Zellen wurde im FACS überprüft.

CFDA-SE: 5(6)-CFDA, SE; Molecular Probes, # C-1157

2.5.4 Messung der Zell-Proliferation mittels T-Zell-Rezeptor Excisionszirkeln

Der Nachweis der TRECs wurde in Kooperation mit Dr. C.Schmidt von der Klinik für Hämatologie und Onkologie der Charité durchgeführt. Das Prinzip des Nachweises ist in Abbildung 4 in Abschnitt 1.5.1 dargestellt. Die Leukozyten der zu untersuchenden

lymphatischen Organe wurden isoliert und die Zahl der Zellen wurde mittels einer Neubauer-Kammer bestimmt. Der Anteil CD 3-positive Zellen wurde durchflußzytometrisch bestimmt. Die genomische DNA der Zellen wurde isoliert und ihre Konzentration photometrisch bestimmt. Zur Quantifizierung der PCR wurde eine Verdünnungsreihe eines Plasmids mit dem δ Rec- ϕ J α signal joint (TREC) und einem Fragment des RAG 2-Gens verwendet (10^7 bis 10^1 Kopien des Plasmids). Die quantitative PCR wurde auf dem LightCycler von Roche durchgeführt.

2.6 Hyperthermie kultivierter Zellen

B16F0-Zellen wurden in Kulturflaschen kultiviert, bis sie etwa zu 50 % konfluent waren. Die Flaschenhalse wurden mit Kondomen und Parafilm abgedichtet um das Eindringen von Wasser zu verhindern. Die Flaschen wurden in ein temperiertes Wasserbad gelegt und mit Gewichten beschwert, so daß sie sich vollständig unter Wasser befanden. Zur Kontrolle der Temperatur in den Zellkulturen wurde eine mit Medium versehene Referenzflasche mit einer geeichten P100-Temperatursonde verwendet. Die Hyperthermie-Zeit wurde ab dem Erreichen der erwünschten Temperatur gemessen.

2.7 Induktion der MHC-Expression bei B16F0

Um zu überprüfen, ob B16F0-Zellen auf der Membran MHC I-Komplexe ohne Peptide exprimieren, wurden die Zellen über Nacht bei 26°C kultiviert und es wurden MHC I-stabilisierende Peptide zugegeben (Tabelle 1). Die verwendeten Peptide können eine T-Zell-vermittelte Tumorrejektion des B16-Melanoms induzieren (Bloom, Perry-Lalley et al. 1997; Dyall, Bowne et al. 1998; Overwijk, Tsung et al. 1998). Das Peptid KVPRNQDWL des murinen GP 100 bindet an murines H-2Kb (Overwijk, Tsung et al. 1998). Von den 9 Aminosäuren des Peptids entsprechen 5 Aminosäuren dem Bindungsmotiv von H-2D^b (Rammensee, Bachmann et al. 1999). Das Peptid TAYRYHLL des murinen TRP 1 entspricht in 4 Aminosäuren dem Bindungsmotiv von H-2K^b (Rammensee, Bachmann et al. 1999), während bei dem Peptid SVYDFVWL des murinen TRP 2 nur die Ankerpositionen dem Bindungsmotiv des H-2K^b entsprechen (Rammensee, Bachmann et al. 1999). Alle Peptide wurden mit einer freien Säure am C-Terminus synthetisiert. Die Synthese erfolgte durch die Firma „Peptide Speciality Laboratories GmbH“ in Heidelberg. Die MHC I-Expression wurde mittels monoklonaler Antikörper (Tabelle 2) durchflußzytometrisch überprüft.

Tabelle 1: Melanom-assoziierte Peptide

Peptid	Protein	MHC I	publiziert
fett : Ankerpositionen, unterstrichen: zusätzliche Anker, kursiv: bevorzugte Aminosäuren (Rammensee, Bachmann et al. 1999)			
KVPRN <u>Q</u> DWL	GP 100 (human)	H-2D ^b	(Overwijk, Tsung et al. 1998)
TAY <u>R</u> YHLL	TRP 1 (Tyrosinase related protein 1, murin)	H-2K ^b	(Dyall, Bowne et al. 1998)
SVYDF <u>F</u> VWL	TRP 2 (Tyrosinase related protein 2, murin)	H-2K ^b	(Bloom, Perry-Lalley et al. 1997)

Um bei den MHC nicht exprimierenden B16-Zellen die MHC I-Expression zu induzieren, wurden die Zellen 16-24 h mit 1 ng/ml IFN γ kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Medium gewaschen und in den nachfolgenden Versuchen eingesetzt. Die MHC I-Expression wurde mittels monoklonaler Antikörper (Tabelle 2) durchflußzytometrisch überprüft.

IFN γ : rekombinant, murin; R&D Systems, # 485-MI

2.8 Nachweis der Proteinexpression von Zellen und Geweben

2.8.1 Immunfärbung für die Durchflußzytometrie

Die Zellen wurden in PBA aufgenommen. Zum Nachweis von Oberflächenantigenen wurden die primären Antikörper in PBA in zweifacher Endkonzentration verdünnt. Gleiche Volumina Zellen und Antikörper wurden gemischt und für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in PBA gewaschen. Bei unmarkierten Primärantikörpern wurde anschließend eine Markierung mit sekundärem Antikörper entsprechend durchgeführt.

PBA: PBS + 0,5 % Bovines Serumalbumin (BSA)

Tabelle 2: in der Durchflußzytometrie verwendete Antikörper

Antigen	Klon	Markierung	Hersteller	Nachweis von
H-2D ^b	KH 95	Biotin	PharMingen	MHC I
H-2K ^b	AF6-88.5	PE	PharMingen	MHC I
H-2A ^b	AF6-120.1	FITC	PharMingen	MHC II
Qa-1 ^b	6A8.6F10.1A 6	Biotin	PharMingen	nicht-klassisches MHC I
CD45	30-F11	Biotin	PharMingen	alle Leukozyten
CD3ε	A45-2C11	FITC	PharMingen	T-Zellen
	CT-CD3	Tricolor	Caltag	
CD4	H129.19	Biotin	PharMingen	T-Helfer-Zellen
CD8		PE	PharMingen	zytotoxische T-Zellen
CD11c	HL3	PE	PharMingen	Dendritische Zellen
CD45	30-F11	Biotin	PharMingen	alle Leukozyten
CD69	H1.2F3	FITC	PharMingen	früher Aktivierungsmarker bei T- und B-Zellen
	H1.2F3	PE	Caltag	
CD80			PharMingen	Costimulation (B7.1)
CD86	GL1	FITC	PharMingen	Costimulation (B7.2)
B220/ CD45R		PE	PharMingen	B-Zellen
F 4/80	CI:A3-1	FITC, Biotin	Caltag	Antigenpräsentierende Zellen (Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen)

2.8.2 Durchflußzytometrie (fluorescence activated cell scanning = FACS)

Die Messung der markierten Zellen erfolgte am FACS-Calibur mit zwei Lasern der Firma Becton-Dickinson. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden mit den in Tabelle 3 aufgelisteten Kombinationen aus Laser und Filtern angeregt und gemessen. Die Geräteeinstellung wurde den verwendeten Farbstoffen und der Autofluoreszenz der Zellen angepaßt. Die Auswertung erfolgte mittels des Programms CellQuest.

Tabelle 3: Kombinationen aus Laser und Filtern beim FACS-Calibur

Kanal	Laser (Anregung)	Filter (Emission)	geeignete Farbstoffe*
1	488 nm	530±30 nm Band Pass	FITC, DiO, CFSE
2	488 nm	585±42 nm Band Pass	PE, DiI, PJ**
3	488 nm	680 nm Long Pass	PerCP, Tricolor, CyChrome (PE-Cy5 Tandem), PJ** DiD eingeschränkt (schwache Anregung)
4	633 nm	661±16 nm Band Pass	Allophycocyanin, DiD

* Abkürzungen: CFSE= Carboxyfluorescein Succinylester , FITC= Fluoresceinisothiocyanat, PE= Phycoerythrin, PerCP = Peridinin Chlorophyll-a , PJ = Propidiumjodid

** der Farbstoff Propidiumjodid (PJ) emittiert in Kanal 2 und 3

2.8.3 Immunfluoreszenznachweis von Proteinen bei kultivierten Zellen

B16F0-Zellen wurden auf gelantinierten Deckgläschen kultiviert. Zu diesem Zweck wurden runde Deckgläschen mit 10 mm Durchmesser zur Reinigung in A. dest mit etwas EDTA aufgekocht und anschließend in kochendem A. dest gewaschen. Die Deckgläschen wurden in 0,5 % steriler Gelatine 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Gelatine wurde mit 2 % Glutaraldehyd in PBS fixiert (steril, 30 min bei Raumtemperatur). Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden die Deckgläschen zur Dekontamination über Nacht bei Raumtemperatur in PBS mit Penicillin und Streptomycin gelagert und dann in den Kühlschrank gestellt.

Die B16F0-Zellen wurden in 24 well-Zellkulturplatten auf den Deckgläschen kultiviert und hyperthermiert. 3 h nach Hyperthermie wurden die Zellen 10 min in 100 % Ethanol bei – 20°C fixiert. Nach kurzem Waschen in PBS wurde der Primärantikörper zugegeben und die Deckgläschen wurden 30 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS erfolgte ebenso die Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper. Anschließend wurden die Objektträger wieder gewaschen und mit Glyceringelatine auf einem Objektträger eingedeckt.

Tabelle 4: Primär- und Sekundärantikörper im Immunfluoreszenznachweis

Primärantikörper	Klon	Hersteller	Sekundärantikörper	Hersteller
anti HSP 72/ HSP 73 reaktiv mit murinem und humanem HSP 72 und HSP 73	N27F3-4	Stressgen	Ziege-anti-Maus-FITC, Gereinigte polyklonale Antikörper	Sigma
anti GP 96 reaktiv mit murinem und humanem GP 96 (GRP 94)	9G10	Stressgen	Ziege-anti-Ratte-Biotin Gereinigte polyklonale Antikörper	Jackson Immuno Research
			SAv-Texas Red	Jackson Immuno Research

Kaisers Glyceringelantine: Merck, # 1.09242.0100

25 % Glutaraldehyd: Serva, # 23114

2.8.4 Herstellung von Zellysaten für Western Blots

Zellen wurden geerntet und in PBS mit Proteinase-Inhibitoren und 1 % SDS aufgenommen. Die Zellen wurden auf Eis gekühlt und zweimal 20 sec sonifiziert. Verbleibende größere Partikel wurden abzentrifugiert, der Überstand wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert. Der Proteingehalt der Proteinlösung wurde mit der Bicinchon säuremethode (bicinchonic acid = BCA) bestimmt. Bei alkalischem pH reduzieren Proteine Cu^{2+} zu Cu^{+} , welches mit Bicinchon säure einen violetten Komplex bildet. Die Menge des Cu^{+} -Bicinchon säure-Komplexes wurde photometrisch bei 570 nm bestimmt. Zur Kalibration wurde eine serielle Verdünnung von Rinderserum-Albumin (BSA) verwendet. Die Reaktion wurde mit gebrauchsfertigen Lösungen der Firma Pierce durchgeführt. Der lineare Meßbereich liegt zwischen 0,2 und 1,4 mg/ml Protein.

Proteinase-Inhibitor-Cocktail: Roche, # 1 697 498

BCA-Proteinassay-Reagenzien: Pierce, #23226

BSA für Standardreihe: 2 mg/ml in 0,9 % NaCl, Pierce #23209

2.8.5 Einengung von Zellkulturüberständen zum Nachweis freigesetzter Proteine

Zum Nachweis von Proteinen, die nach Hyperthermie freigesetzt wurden, wurden Zellen in Medium ohne fetales Rinderserum hyperthermiert. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen und zentrifugiert, um abgelöste Zellen zu entfernen. Anschließend wurden 2 ml der zellfreien Überstände mittels Centricon-Röhrchen auf 35 µl eingengt. Alle Proteine mit einem Molekulargewicht größer 10 kD wurden bei der Zentrifugation der Röhrchen von einer Membran zurückgehalten und blieben im Konzentrat.

Centricon YM-10: Zentrifugationsröhrchen mit Cellulose-Membran, Ausschlußgröße 10 kD; Millipore, # 4205

2.8.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse der Proteinexpression wurden Proteine aus B16F0-Zellen mittels Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) nach Laemmli aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte in 0,75-1,5 mm dicken 7,5 % Polyacrylamidgelen mit 3 % Sammelgelen. Die Gelgröße war 80x55 mm.

Die Proteinlösungen wurden mit 1/3 Volumen 4-fach konzentriertem Laemmli-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt. Das Probenvolumen betrug maximal 25 µl mit maximal 25 µg Protein pro Tasche. Die Elektrophorese erfolgte bei 30 mA bis der Farbmarker Bromphenolblau das Gelende erreicht hatte.

Acrylamid/Bisacrylamid: 30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid; Roth #30291

Temed: Biorad, # 161-0801

Laemmli Probenpuffer: 62,5 mM Tris/HCl
10 % Glycerin
5 % β-Mercaptoethanol
3 % SDS
ca. 0,01 mg/ml Bromphenolblau

Trenngel-Puffer: 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8

Sammelgel-Puffer: 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8

Laufpuffer: 0,3 % Tris
1,44 % Glycin
0,1 % SDS

2.8.7 Coomassie-Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Das Polyacrylamidgel wurde nach der Elektrophorese für 1-2 h in Coomassie-Färbelösung geschüttelt. Anschließend wurde das Gel so lange in 20 % Essigsäure entfärbt, bis die Proteinbanden vor der Hintergrundfärbung klar sichtbar waren. Mehrfacher Wechsel der Essigsäure beschleunigten diesen Vorgang.

Coomassie-Färbelösung: 50 % Methanol
 10 % Acetat
 0,025% Coomassie Brilliant Blue R250, Sigma # B-0149

2.8.8 Silbernitrat-Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Das Polyacrylamidgel wurde nach der Elektrophorese für 30 min in Fixierer inkubiert. Anschließend wurde das Gel 30 min in Sensibilisierungslösung geschüttelt. Nach dreimaligem Waschen in A. dest wurden die Proteine 20 min mit Silbernitratlösung markiert. Das an Proteine gebundene Silbernitrat wurde nach zweimaligem Waschen der Gele mittels Entwicklerlösung nachgewiesen (etwa 2-5 min Färbung). Die Farbreaktion wurde durch 30 min Inkubation in Stopplösung beendet. Das Gel wurde in Konservierungslösung für mindestens 30 min geschüttelt und eingeschweißt.

Fixierer: 40 % Ethanol
 + 10 % Essigsäure
 in A. dest

Sensibilisierungslösung: 30 % Ethanol
 + 0,5 ml/ 100 ml Glutaraldehyd (25 %)
 + 4 ml/ 100 ml Natriumthiosulfat (5 %)
 + 6,8 % Natriumacetat
 in A. dest

Silbernitratlösung: 0,25 % Silbernitrat
 + 40 µl/ 100 ml Formaldehyd (37 %)
 in A. dest

Entwicklerlösung: 2,5 % Natriumcarbonat
 + 20 µl/ 100 ml Formaldehyd (37 %)
 in A. dest

Stopplösung: 1,46 % EDTA in A. dest

Konservierungslösung: 30 Ethanol
+ 0,04 % Glycerol
in A. dest

2.8.9 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membran

Nach der Elektrophorese wurde das ungefärbte Gel einige Minuten in Blotpuffer äquilibriert. Währenddessen wurde ein mit Blotpuffer getränktes „Sandwich“ wie folgt aufgebaut: ein Kunststoffschwamm, drei Lagen Whatman® 3MM Filterpapier, das äquilibrierte Gel, eine Nitrozellulose-Membran (Amersham), drei Lagen Whatman® 3MM Filterpapier und ein Kunststoffschwamm. Der Transfer erfolgte in einer Mini-Trans-Blot-Apparatur (Bio-Rad) für 2 h bei 400 mA.

Nitrocellulose-Membran: Hybond-C extra; Amersham, # RPN 303 E
Blotpuffer: 25 mM Tris/HCl, pH 8,3
192 mM Glycin
10 % Methanol

2.8.10 Ponceau-Färbung von Proteinen auf Nitrozellulose-Membran

Um den Erfolg des Proteintransfers zu überprüfen und um bei nicht vorgefärbten Molekulargewichtsmarkern die Banden zu markieren, wurde die Membran 1-5 min mit Ponceau S angefärbt. Durch kurzes Waschen in TBS mit 0,5 % Tween 20 wurde der Hintergrund entfärbt. Der Farbstoff wurde anschließend durch Waschen der Membran in TBS mit 0,5 % Tween 20 entfernt.

Ponceau Färbelösung: 0,05 % Ponceau-S, Sigma, # P-3504
1% Acetat

2.8.11 Immunfärbung von Proteinen auf Nitrozellulose-Membran

Die auf Nitrozellulose transferierten Proteine dienten dem Nachweis tumorspezifischer Antikörper. Der Nachweis der Antikörper erfolgte durch Peroxidase-gekoppelte Sekundäntikörper und ein luminogenes Substrat. Die Umsetzung des Substrats durch Peroxidase führt an der Stelle des gebundenen Antikörpers zu einer Lichtemission, die mit Hilfe eines aufgelegten Röntgenfilms nachgewiesen wurde. Um unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran zu verhindern, wurden die proteinfreien Stellen der Membran

zunächst mindestens 1 h mit Blotto blockiert. Alle Reaktionen wurden in Schalen auf Horizontalschüttlern oder in verschweißten Tüten auf Überkopfschüttlern durchgeführt. Nach dem Blockieren erfolgte die Inkubation mit den in Blotto verdünnten Primärantikörpern oder Mausseren. Überschüssiger Primärantikörper wurde durch dreimal 5 Minuten Waschen der Membran in TBS mit 0,05 % Tween-20 entfernt. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte durch Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper, die ebenfalls in Blotto verdünnt wurden. Bei semiquantitativen Blots zur Beurteilung der Expressionsstärke wurde stets auf derselben Membran eine parallele Detektion von Aktin mit einem Antiserum durchgeführt. Die Antikörper-Inkubationen wurden in der folgenden Reihenfolge durchgeführt:

- 1° Antikörper: gegen gewünschtes Antigen
- 2° Antikörper: anti-Aktin (Antiserum aus Kaninchen)
- 3° Antikörper: gegen 1° Antikörper, HRP-konjugiert
- 4° Antikörper: Schwein gegen Kaninchen, HRP-konjugiert

Nach der letzten Antikörper-Inkubation wurde die Membran erneut gewaschen und anschließend durch Auflegen eines Filterpapiers getrocknet und mit ECL™-Substrat (Pierce) überschichtet. Nach 2 Minuten wurde das überschüssige Substrat abgeschüttelt und der Blot wurde in einer Filmkassette fixiert. Die Exposition des Röntgenfilms erfolgte je nach Intensität der Lichtemission zwischen 30 Sekunden und 60 Minuten.

Tabelle 5: im Western Blot verwendete Primärantikörper

Antigen	Klon	Hersteller	Bemerkungen
Aktin	Polyklonales Serum, Kaninchen	Sigma	reaktiv mit murinem und humanem Aktin
HSP 72/ HSP 73	N27F3-4	Stressgen	reaktiv mit murinem und humanem HSP 72 und HSP 73
GP 96	9G10	Stressgen	reaktiv mit murinem und humanem GP 96 (GRP 94)
Tyrosinase	Polyklonales Serum, Ziege	Research Diagnostics, NJ, USA	reaktiv mit muriner Tyrosinase
GP 100	HMB-45	Dako	reaktiv mit murinem und humanem GP 100 (Pmel 17, GP 87)

Tabelle 6: im Western Blot verwendete Sekundärantikörper

Spezies des Primärantikörpers	Sekundärantikörper	Hersteller
Kaninchen	polyklonal, affinitätsgereinigt Schwein gegen Kaninchen HRP-konjugiert	Dako, # P 0270
Maus	polyklonal, affinitätsgereinigt Kaninchen gegen Maus HRP-konjugiert	Dako, # P 0260
Ratte	polyklonal, affinitätsgereinigt Kaninchen gegen Ratte HRP-konjugiert	Dako, # P0450
Ziege	polyklonal, affinitätsgereinigt Esel gegen Ziege HRP-konjugiert	Jackson Immuno Research # 705-035-147

TBS-T: 0,1 % Tween 20 in TBS

Blotto: 5 % Magermilch in TBS-T

ECL: Amersham, # RPN 2106

2.8.12 Mehrfache Verwendung von Western Blots

Um in einem Western Blot mehrere Proteine nachweisen zu können, wurden nach der Filmentwicklung die gebundenen Antikörper abgelöst. Die Membranen wurden 30 min bei 55°C in Stripping-Puffer inkubiert und anschließend 3 x 10 min in TBS-T gewaschen. Nach erneutem Blockieren der Membranen konnte diese dann wieder eingesetzt werden.

Stripping-Puffer: 62,5 mM Tris, pH 6,7
+ 2% SDS
+ 100 mM β -Mercaptoethanol

Penicillin/Streptomycin: 100 U/ml Penicillin +100 μ g/ml Streptomycin in PBS

2.9 Nachweis der RNA-Expression bei Zellen und Geweben

2.9.1 Isolierung von Gesamt-RNA mit Trizol

Gewebe und Zellen, aus denen RNA extrahiert werden sollte, wurden ohne Puffer oder Medium in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Das gefrorene Material wurde in 1 ml Trizol pro 50 μ g Gewebe, bzw. 10^7 Zellen aufgenommen und

Probenpuffer:	10 µl deionisiertes Formamid 4 µl 37% Formaldehyd 3 µl 10x MOPS 1 µl Ethidiumbromid (500 µg/ml) ergibt 21 µl
Auftragspuffer:	70 % Glycerin 0,1 % Bromphenolblau 0,1 % Xylencyanol FF
Laufpuffer:	1x MOPS

2.9.3 Reverse Transkription von mRNA in cDNA

Aus der Gesamt-RNA wurde mittels Superscript Reverser Transkriptase und Random-Hexamer-Primern cDNA synthetisiert. Zu 1,5 µg Gesamt-RNA in 10 µl H₂O wurden 2 µl 10x Random-Hexamer-Primer gegeben und der Ansatz wurde 10 min bei 65°C denaturiert. Die RNA wurde sofort anschließend auf Eis gekühlt, um das erneute Ausbilden von Sekundärstrukturen zu verhindern. Anschließend wurden wie folgt zugegeben:

Erststrang Puffer	4 µl
DTT	2 µl
dNTPs	Endkonzentration 100 µM je dNTP (1 µl)
Superscript RT	200 U (1 µl)
	Endvolumen des Ansatzes 20 µl

Nach 10 min bei 25°C zur Bindung der Primer an die RNA wurde der Ansatz 1 h bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym 15 min bei 70°C denaturiert. Die cDNA wurde bei 4°C gelagert.

Superscript Reverse Transkriptase:	Gibco, # 18064-014, einschließlich 1°-Strang-Puffer und DTT
dNTPs:	Invitrogen, # TA10
10x Random-Hexamer-Primer:	Boehringer Mannheim, # 1277081

2.10 PCR von cDNA

Die PCR der cDNAs wurde mit Taq-Polymerase wie folgt angesetzt:

10x PCR Puffer	2,5 µl
50 mM MgCl ₂	0,75 µl
10 mM dNTPs (je 2,5 mM)	0,5 µl
10 µM Primer	je 0,625 µl
cDNA	0,25 µl des RT-Ansatzes
5 U/µl Taq Polymerase	0,125 µl
	ad 25 µl mit A. dest

Die für TAP 1 und TAP 2 verwendeten Primer sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Die PCR wurde wie folgt durchgeführt:

Denaturierung:	95°C	10 min
30 Zyklen:	Denaturierung	95°C 30 sec
	Primerbindung	57°C (tap 1), bzw. 62°C (tap 2) 30 sec
	Verlängerung	72°C 1 min
Ende:	72°C	7 min
	4°C	Lagerung

Taq-Polymerase, MgCl₂ und Puffer: Invitrogen, # 10342-012

dNTPs: Invitrogen, # TA10

2.10.1 Quantitative PCR von cDNA

Die in der quantitativen PCR für Tyrosinase und Pmel 17 verwendeten Primer sind in Tabelle 7 aufgelistet. Die Primer für Tyrosinase wurden so gewählt, daß das PCR-Produkt zwei bekannte Spleißstellen enthielt (Abbildung 7, Kelsall, Le Fur et al. 1997). In Melanozyten der Maus ist bei 12,5% der detektierbaren Tyrosinase mRNA das Exon 3 deletiert. Da diese Spleißvariante vermutlich nicht funktionell ist (Kelsall, Le Fur et al. 1997) und da unterschiedliche lange PCR-Produkte die Quantifizierung mittels SybrGreen unmöglich machen, wurde die Detektion dieser Variante durch die Lage der Primer ausgeschlossen.

Die quantitative PCR wurde wie folgt angesetzt:

cDNA	2 μ l
Primer	je 1 μ l
TitaniumTaq	0,2 μ l
10x Puffer	1 μ l
dNTPs	1 μ l (Endkonzentration je 250 μ M)
MgCl ₂	0,2 μ l (Endkonzentration 100 μ M)
BSA	1 μ l (Endkonzentration 1 μ g/ml)
SybrGreen	2 μ l
	ad 10 μ l mit A. dest

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen am Lightcycler durchgeführt:

Denaturierung:	94°C	1 min
30 Zyklen:	Denaturierung	94°C 1 sec
	Primerbindung	57°C 5 sec
	Verlängerung	72°C 12 sec

Die PCR wurde abgebrochen, wenn bei allen Proben ein Plateau erreicht war.

Tabelle 7: Primer

cDNA	Primer	Produkt	publiziert
Tyrosinase	F: ACA CAC TGG AAG GAT TTG CC R: CCT TCG CAG CCA TTG TTC AA	204 bp	—
Pmel 17	F: ACA GCC AGT GTA TCC ACA GG R: ACT TCC ATT GTG TGT GTG CC	220 bp	Tsukamoto, Hirata et al. 2000
Tap 1	F: TGA TAA GAA GAA CCG TCC GAG A R: GAC AAG AGC CGC TGC TAT TTG G	345 bp	Seliger, Wollscheid et al. 2001
Tap 2	F: CCT GGG ATA CGA AAA GGA GAC G R: TAT CTA GTC ATA CGG AGG GTG A	312 bp	Seliger, Wollscheid et al. 2001

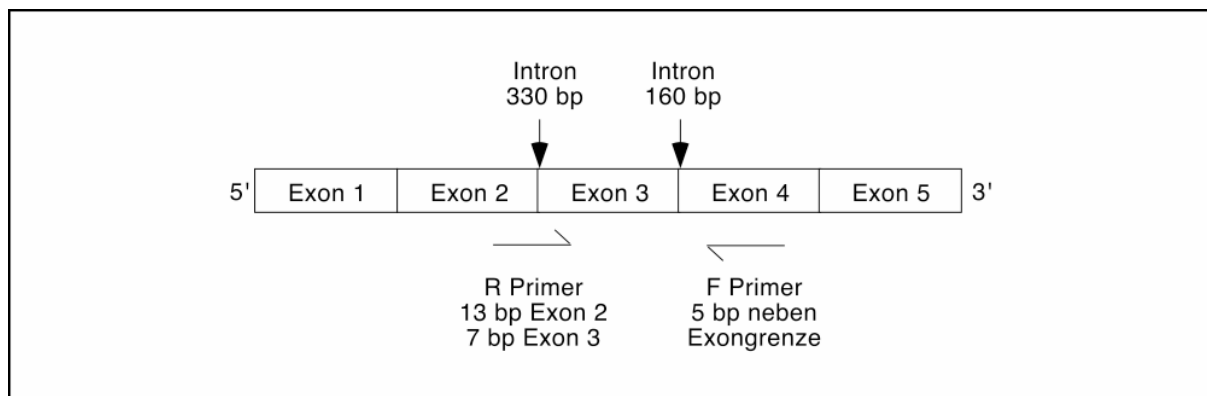


Abbildung 7: Primer für die quantitative PCR für Tyrosinase.

2.10.2 Klonierung und Sequenzierung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden zur Kontrolle in mittels TOPO-TA-Klonierung in den Vektor pCR™ 2.1 kloniert und mittels Hitzeschock in chemokompetente *E.coli* Top 10F transformiert. Die *E.coli* wurden über Nacht auf LB-Platten mit Kanamycin und X-Gal bei 37°C inkubiert, mehrere weiße Klone wurden gepickt und über Nacht in LB-Flüssigmedium bei 37°C kultiviert. Die Plasmide wurden aufgereinigt und zur Kontrolle mit *EcoR I* 1 h bei 37°C verdaut. Der Verdau wurde im 2 % Agarose-Gel überprüft. Plasmide, die ein Insert der erwarteten Länge enthielten, wurden mittels des M13-Primers sequenziert.

Die Sequenzierung des klonierten PCR-Produkts wurde wie folgt angesetzt:

aufgereinigtes Plasmid	1 µg
M13 Sequenzierprimer	8 pmol
BigDye Terminator	4 µl
A. dest	ad 10 µl

Die Sequenzierreaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Denaturierung:	96°C	3 min
25 Zyklen:	96°C	35 sec
	56°C	15 sec
	60°C	2 min
Proben gekühlt:	4°C	bis zur weiteren Verarbeitung

Die Proben wurden anschließend mittels Sephadex G 50-spin columns aufgereinigt und im Vakuum eingedampft. Die Sequenzierung erfolgte am AbiPrism 377 Sequenzierer.

TOPO-TA Klonierungskit: enthält pCR™ 2.1-Vektor, E.coli TopF10, Primer M13 und alle erforderlichen Medien und Puffer. Die Klonierung erfolgte gemäß der Herstellerangaben.

Invitrogen, # 45-0641

LB-Flüssigmedium: 1 % Bactotrypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, pH 7,5
+ 25 µg/ml Kanamycin

LB-Platten: 1,5 % Agar in LB-Flüssigmedium
+ 1,6 µg X-Gal (auf Platte gestrichen)

EcoR I + *EcoR I*-Puffer: New England Biolabs, # R0101S und # B0101S

2.11 Histologie und Immunhistologie von Gewebeschnitten

2.11.1 Hämatoxylin/Eosin- und immunhistologische Färbung von Kryoschnitten

Die verwendeten Kryoschnitte hatten 8-10 µm Dicke. Sie wurden 10 min mit 100 % Aceton bei -20°C fixiert und danach getrocknet. Die Lagerung der Schnitte erfolgte bei -20°C. Die Hämatoxylin/Eosin (HE)-Färbung wurde mittels eines Kits von Shandon durchgeführt.

Die bei der immunhistologischen Färbung eingesetzten primären Antikörper waren biotinyliert oder wurden mit Hilfe biotinylierter Sekundärantikörper nachgewiesen. Als Detektionssystem in der wurde das ABC-System mit Alkalischer Phosphatase der Firma DAKO eingesetzt (ABC = Avidin-Biotin-Komplexe).

Nach dem Auftauen wurden die Schnitte 5 min in TBS rekonstituiert und je 15 min mit Biotin, Avidin und 10 % FBS in TBS blockiert. Zwischen den Blockadeschritten wurden die Schnitte 5 min in TBS gewaschen. Nach dem letzten Blockadeschritt entfiel der Waschschrift. Zwischen allen folgenden Inkubationsschritten wurden die Schnitte 3x5 min in TBS gewaschen. Die primären Antikörper wurden in TBS + 10 % FBS verdünnt, die sekundären Antikörper in TBS +4 % Mausserum +2 % Ziegenserum (die jeweils verwendete Verdünnung ist im Ergebnisteil angegeben). Die Antikörper-Inkubation erfolgte 1 h bei Raumtemperatur. Zur Bildung der Avidin-Biotin-Komplexe wurden 30 min vor Gebrauch Avidin und an biotinylierte Alkalische Phosphatase gemischt (je 1:100 in TBS) und bei Raumtemperatur inkubiert. Die Schnitte wurden 30 min mit den Avidin-Biotin-Komplexen

inkubiert. Zur Darstellung der gebundenen Antikörper wurde Neufuchsin-Substrat verwendet, welches durch Alkalische Phosphatase in einen in wäßriger Lösung nicht löslichen roten Farbstoff umgesetzt wird. Die Substratinkubation erfolgte 5-10 min. Zur Darstellung der Zellkerne wurden die Schnitte mit Meyers Hämalaun gegengefärbt. Die fertigen Schnitte wurden mit Kaisers Glyceringelantine eingebettet und bei 4°C gelagert.

Tabelle 8: In der Immunhistologie verwendete Antikörper

Antigen	Klon	Markierung	Hersteller	Bemerkungen
CD45	30-F11	Biotin	PharMingen	alle Leukozyten
CD3ε	17A2	ohne Markierung	PharMingen	T-Zellen
B220/ CD45R	RA3-6B2	ohne Markierung	PharMingen	B-Zellen
F 4/80	CI:A3-1	Biotin	Caltag	Antigenpräsentierende Zellen (Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen)
CD11c	HL3	Biotin	PharMingen	Dendritische Zellen
panendothel	MECA-32	Biotin	PharMingen	Endothel der Blutgefäße

Rapid-Chrome Staining Kit Shandon

Mausserum: Dako, # X 0910

Ziegenserum: Jackson Immuno Research, # 005-000-001

Avidin/Biotin Blockierung: Kit von Vector, # SP 2001

Vectastain ABC Kit: Vector, # AK-5000

Neufuchsinsubstrat:	Lösung A1	0,49 % Tris Base 0,15 % Tris HCl 0,87 % NaCl in A. dest Bedarf: 105 ml pro Färbeküvette
	Lösung A2	0,16 % Levamisol 0,2 M Propandiol in A. dest Bedarf: 37,5 ml pro Färbeküvette
	Lösung B	750 µl 4 % Natriumnitrit in A. dest 300 µl Neufuchsinlösung Bedarf: 1,05 ml pro Färbeküvette
	Neufuchsinlösung	5 % Neufuchsin in 2 M HCl
	Lösung C	8,3 % Naphtol-AS-Bi-Phosphat in DMSO Bedarf: 0,9 ml pro Färbeküvette
A1 und A2 mischen, B hinzugeben, dann C, pHmit HCl auf 8,8 einstellen, filtrieren und sofort verwenden		
Meyers Hämaun:	0,1 % Hämatoxilin 0,02 % Natriumjodat 5 % Kalialuan (Aluminiumkaliumsulfatdedecahydrat) 5 % Chlovalhydrat 0,1 % Citrat in A. dest	
Kaisers Glyceringelantine	Merck, # 1.09242.0100	