

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien & Verbrauchsmaterial

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von Sigma (Seelze, D), Merck (Darmstadt, D), Roth (Karlsruhe, D) oder Invitrogen (Karlsruhe, D) bezogen. Zum Ansetzen der Lösungen wurde deionisiertes Wasser benutzt. Plastik-Verbrauchsmaterialien wurden soweit nicht anders angegeben von den Firmen Braun (Melsungen, D), Greiner (Solingen, D), Eppendorf (Hamburg, D), Roth (Karlsruhe, D), Costar (Bodenheim, D), Becton Dickinson (BD) (Heidelberg, D), BD Falcon (Heidelberg, D), Schleicher&Schüll (Dassel, D), Fluka (Taufkirchen, D) oder TPP AG (Transadingen, CH) bezogen.

2.1.1 Peptide und biologisches Material

Soweit nicht an anderer Stelle erwähnt, wurden folgende biologische Materialien und folgende Peptide verwendet.

Tabelle 1: Biologisches Material

Name	Herkunft
Rekombinantes Interleukin 2	Roche (Basel, CH)
Rekombinates MIP3 α /CCL20	R&D Systems (Minneapolis, USA), PreproTech (Rocky Hill, USA), Biosource (Camarillo, USA)
Rekombinates MIP1 β /CCL4	R&D Systems (Minneapolis, USA), PreproTech (Rocky Hill, USA), Biosource (Camarillo, USA)
MBP Ac1-11 (<i>myelin basic protein</i>)	Research Genetics (Huntsville, USA)
PLP139-151 (<i>proteo lipid protein</i>)	Research Genetics (Huntsville, USA)
OVA323-339 (<i>ovalbumin peptide</i>)	Research Genetics (Huntsville, USA)
Rekombinantes VCAM-1 (<i>vascular adhesion molekule 1</i>)	R&D Systems (Minneapolis, USA)

Rekombinates E-Selektin	R&D Systems (Minneapolis, USA)
<i>Pertussis</i> Toxin	List Biological Laboratories (Campbell, USA)
FKS (Fötales Kälber Serum)	Invitrogen (Karlsruhe, D)
CCL19-Fc	J.G. Cyster (UCSF, San Francisco, USA) (108)
CFA (<i>complete freund's adjuvant</i>)	Sigma (Seelze, D)
<i>Mycobacterium Tuberculosis</i> H37Ra	Difco (Detroit, USA)
Kollagenase Typ VIII	Sigma (Seelze, D)
Ketaminhydrochlorid (Exalgon 1000)	Merial (Hallbergmoos, D)
Xylazinhydrochlorid (Rompun)	Bayer AG (Leverkusen, D)
Penicillin-Streptomycin	Cambrex Bio Science (Verviers, B)
nicht essentielle Aminosäuren (NEA)	Invitrogen (Karlsruhe, D)
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma (Seelze, D)

2.1.2 Puffer, Medien und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, wurden folgende Puffer, Medien und Lösungen verwendet.

Tabelle 2: Puffer, Medien und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
Phosphat gepufferte Saline (PBS)	137mM NaCl; 2,7mM KCl; 4,3mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,4mM KHPO ₄ , pH 7,4
RPMI 1640-Medium	Invitrogen (Karlsruhe, D) mit 10% FKS + 2mM L-Glutamin; 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin; 1mM NEA; 0,05mM β-Mercaptoethanol
DMEM-Medium	Invitrogen (Karlsruhe, D) mit 5% FKS + 2mM L-Glutamin; 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin; 1mM NEA; 0,05mM β-Mercaptoethanol
MACS Puffer	PBS, 0,5mM EDTA (Ethylendiamin-tetraessigsäure), 0,5% BSA
Erythrozyten Lysis Puffer (RBCL)	10mM Tris/HCL; 0,165M NH ₄ Cl
TE-Puffer	10mM Tris/HCl; 1mM EDTA; pH 8,0
DEPC-Wasser (Diethylpyrocarbonat)	0,01% (v/v) DEPC
TAE-Puffer	40mM Tris-Acetat; 1mM EDTA; pH 8,0
Saponin Puffer	PBS + 0.5% (w/v) Saponin (Calbiochem) + 5% FKS
Ficoll	Amersham (Uppsala, S)
Percoll	Amersham (Uppsala, S)

2.1.4 Versuchstiere

Alle verwendeten Mausstämme wurden unter konventionellen Bedingungen, $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, Wasser und Futter *ad libitum*, bis zu sechs Tiere in einem Mikroisolator Käfig, künstlicher 24 h Tag-Nacht-Zyklus, in den Tierställen des Max-Delbrück-Centrums, Berlin (MDC) gehalten. Die Versuchstiere wurden, soweit nicht anders angegeben, im Alter von 8-15 Wochen analysiert. Alle Tierexperimente wurden in Übereinstimmung mit den deutschen Tierschutzrichtlinien durchgeführt.

Tabelle 3: Versuchstiere

Stamm	Herkunft
BALB/c	Charles River (Sulzfeld, D)
C57BL/6	Charles River (Sulzfeld, D)
SJL/J	Harlan Winkelmann (Borchen, D) Taconic Farms (Rey, DK)
B10.PL	eigene Zucht
DO11.10	eigene Zucht (109) (transgen für OVA spezifischen TCR)
TG4	eigene Zucht (110) (transgen für MBP spezifischen TCR)
CCR6 EGFP-KI	eigene Zucht (111)
OT-II	aus der Zucht der AG Blankenstein (MDC) (112) (transgen für OVA spezifischen TCR)
OT-II (RAG1 ^{-/-})	aus der Zucht der AG Blankenstein (MDC) (113)

2.1.5 Monoklonale Antikörper

Es wurden die in Tabelle 4 aufgeführten monoklonalen Antikörper, gekoppelt an APC (Allophycocyanin), Fitc (Fluoresceinisothiocyanat), PE (Phycoerythrin), APC-Cy7, PE-Cy7, PerCP-Cy5.5 oder Biotin verwendet. Fitc-, PE-, APC-, APC-Cy7, PE-Cy7-konjugierte Streptavidine, sekundäre Antikörper und Isotop-Kontrollen wurden über BD Pharmingen (San Diego, USA), Caltag (Burlingame, USA), Coulter (Fullerton, USA), Immuno Tools (Friesoythe, D) oder R&D Systems (Minneapolis, USA) bezogen.

Tabelle 4: Monoklonale Antikörper

Spezifität	<i>Klon</i>	Hersteller
<u>Anti-Maus Antikörper</u>		
α CD3	145-2C11	MDC / BD Pharmingen
α CD4	GK 1.5	MDC / BD Pharmingen
α CD4	RM 4-5	BD Pharmingen
α CD4	H129.19	BD Pharmingen
α CD5	53-7.3	BD Pharmingen
α CD8 α	53-6.7	BD Pharmingen
α CD11a	2D7	BD Pharmingen
α CD11b	M1/70	MDC / BD Pharmingen
α CD11c	N418	MDC / BD Pharmingen
α CD16/32 (FcR gamma block)	2.4G2	BD Pharmingen
α CD24	M1/69	BD Pharmingen
α CD25	7D4	BD Pharmingen
α CD25	PC61	MDC / BD Pharmingen
α CD28	37.51	BD Pharmingen
α CD44	IM7	MDC / BD Pharmingen
α CD45R (B220)	RA3-6B2	BD Pharmingen
α CD45RB	16A	Caltag
α CD49d	R1-2	BD Pharmingen
α CD49d	9C10	BD Pharmingen
α CD54	3E2	BD Pharmingen
α CD62L	MEL-14	Caltag
α CD69	H1.2F3	Caltag
α CD83	Michel17	eBioscience
α CD90.2 (Thy1.2)	30-H12	MDC / BD Pharmingen
α CD103	M290	BD Pharmingen
α CD122	TM- β 1	BD Pharmingen
α CD134 (OX-40)	Ox86	BD Pharmingen
α CD152 (CTLA-4)	UC10-4F10-11	MDC / BD Pharmingen
α CD195 (CCR5)	C34-3448	BD Pharmingen
α CD196 (CCR6)	140706	R&D Systems / BD Pharmingen
α CD278 (ICOS)	7E.17G9	BD Pharmingen
α GITR	polyklonal	R&D Systems
α TCR	H57-597	BD Pharmingen
α TCR DO11.10	KJ1.26	Caltag

α Ki67	B56	BD Pharmingen
α Foxp3	FJK-16s	eBioscience
α BrdU	B44	BD Pharmingen
α IgL-kappa	187.1	MDC / BD Pharmingen

Anti-Mensch Antikörper

α CD3	UCHT1	MDC / BD Pharmingen
α CD4	RPA-T4	BD Pharmingen
α CD8	RPA-T8	BD Pharmingen
α CD19	LT19	Miltenyi Biotech
α CD25	M-A251	BD Pharmingen
α CD29	MAR4	BD Pharmingen
α CD45RA	HI100	BD Pharmingen
α CD45RO	UCHL1	BD Pharmingen
α CD49a	SR84	BD Pharmingen
α CD49b	12F1-H6	BD Pharmingen
α CD49c	C3II.1	BD Pharmingen
α CD49d	9F10	BD Pharmingen
α CD49d	BU49	Immuno Tools
α CD49e	IIA1	BD Pharmingen
α CD49f	GoH3	BD Pharmingen
α CD62L	114/15	Miltenyi Biotech
α CD103	Ber-ACT8	BD Pharmingen
α CD162 (PSGL-1)	KPL-1	BD Pharmingen
α CD195 (CCR5)	2D7	BD Pharmingen
α CD196 (CCR6)	11A9	BD Pharmingen
α CD197 (CCR7)	3D12	BD Pharmingen
α β 7 Integrin	FIB504	BD Pharmingen
α CCR4	1G1	BD Pharmingen
α CLA	Heca452	BD Pharmingen
α Foxp3	PCH101	eBioscience

2.1.6 Synthetische Oligonukleotide

Die in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide (siehe Tabelle 5) wurden von Invitrogen (Karlsruhe, D) bezogen. In manchen Fällen erfolgte zunächst nach der initialen Lösung in

H₂O eine Eintrocknung per Vakuumzentrifuge zur Entfernung von kontaminierenden Restinhaltsstoffen. Die Lagerung der Oligonukleotide erfolgte in RNase freiem DEPC-H₂O bei -20°C oder -80°C.

Tabelle 5: Synthetische Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' → 3')	Spezifität
HPRT fwd	5' -TGACACTGGCAAAACAATGCA-3'	HPRT* <i>mus musculus/homo sapiens</i>
HPRT rev	5' -GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT-3'	~
Foxp3 fwd	5' -ACCACCTTCTGCTGCCACTG-3'	Foxp3 <i>mus musculus</i>
Foxp3 rev	5' -TGCTGTCTTTCCTGGGTGTACC-3'	~
Foxp3 fwd	5' -AGAAGCAGCGGACACTCAATG-3'	FOXP3 <i>homo sapiens</i>
Foxp3 rev	5' -GACTCAGGTTGTGGCGGATG-3'	~
CCR2 fwd	5' -TCGCTGTAGGAATGAGAAGAAG-3'	Chemokin Rezeptor CCR2 <i>mus musculus</i>
CCR2 rev	5' -CTGGAAGGTGGTCAAGAAGAG-3'	~
CXCR3 fwd	5' -ACTGCTCTGCGTGTACTG-3'	Chemokin Rezeptor CXCR3 <i>mus musculus</i>
CXCR3 rev	5' -CCACTACCACTAGCCTCATAG-3'	~
Nrp1 fwd	5' -CTCTCCACAAGGTTTCATCAG-3'	Neuropilin1 <i>mus musculus</i>
Nrp1 rev	5' -TCGTCGTCACACTCATCC-3'	~
CD49d fwd	5' -GCACGCTGTTTGGCTACTC-3'	α4 Integrin (CD49d) <i>mus musculus</i>
CD49d rev	5' -GATTGACCACTGAGGCATTAGAG-3'	~
CD49d fwd	5' -TCGCCAACGCTTCAGTGATC-3'	α4 Integrin (CD49d) <i>homo sapiens</i>
CD49d rev	5' -TTCCACAAGGTTCTCCATTAGGG-3'	~
IL10 fwd	5' -TGGCATGAGGATCAGCAGGG-3'	Interleukin 10 <i>mus musculus</i>
IL10 rev	5' -GGCAGTCCGAGCTCTAGG-3'	~
IDO fwd	5' -TGAAGACCACCACATAGATGAAG-3'	Indolamine 2,3-dioxygenase <i>mus musculus</i>
IDO rev	5' -CCGTTCTCAATCAGCACAGG-3'	~
T7 poly dT	5' -GGCCAGTGAATTGTAATACGACTC ACTATAGGGAGGCGGT ₂₄ -3'	T7 Promotor poly Thymidin für Gene Array Analyse

*Hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl-transferase

2.1.7 Geräte

Soweit nicht anders angegeben, wurden folgende Geräte verwendet.

Tabelle 6: Geräte

Gerät	Hersteller
FACSCalibur	BD Bioscience (San Jose, USA)

FACSCanto	BD Bioscience (San Jose, USA)
FACS Vantage/DIVA-Sorter	BD Bioscience (San Jose, USA)
MoFlo-Sorter	Dako Cytomation (Carpinteria, USA)
I-Cycler	Biorad (Hercules, USA)
Harvester	Tomtec (New Heaven, USA)
β-Scintillations Zähler	Wallac (Turku, FIN)
Automacs	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, D)

2.1.8 Software

Folgende Software wurde während der Arbeit benutzt.

Tabelle 7: Software

Software	Hersteller
Microsoft Office	Microsoft (Redmont, USA)
Sigma Plot	SPSS (Chicago, USA)
Flowjo	Treestar (San Carlos, USA)
CellQuest pro	BD Bioscience (San Jose, USA)
BD FacsDiva	BD Bioscience (San Jose, USA)
Beacon Designer 2.0	Premier Biosoft (Palo Alto, USA)
iCycler Software	Biorad (Hercules, USA)
Genespring	Silicon Genetics (Redwood, USA)
Microarray Suite	Affymetrix (Santa Clara, USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Agarose Gelelektrophorese

Die zu analysierende DNA wurde zunächst mit einer entsprechenden Menge 10x Ladepuffer (Orange G, Sigma) versetzt und anschließend auf 0,8-1,2%igen Agarosegelen mit ca. 0,5µg Ethidium-Bromid (Sigma) pro ml Gellösung elektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1x TAE. Nach der Elektrophorese wurde die DNA unter UV-Licht (254nm) visualisiert und mit einem Foto dokumentiert.

2.2.2 Präparation von Zellsuspensionen

Vor der Zellpräparation wurden die Tiere mit Ether betäubt und durch Genickbruch getötet. Nach der Tötung wurden die Tiere in 75%igem Ethanol gebadet. Die Zellpräparation und Organentnahme erfolgte unter einer Sterilbank.

2.2.2.1 Präparation von murinen Milzzellen

Nach der Präparation der Milz, wurde diese über einem Sieb zerkleinert und mit 10ml RPMI/10% FKS gespült. Größere Partikel wurden nach dem Sedimentieren für 5-10min bei RT mit Hilfe einer Pasteurpipette entfernt. Die Zellsuspension wurde dann bei 1200rpm/4°C für 10min zentrifugiert (Heraeus Minifuge). Anschließend erfolgte die Erythrozytenlyse für 5min bei RT durch Zugabe von 1ml RBCL-Lösung. Nach dem Abstoppen der hypotonischen Lyse durch Zugabe von 10ml RPMI/10% FKS wurde die Zellsuspension über einen 70µm Filter filtriert, um verbleibende Verunreinigungen zu entfernen. Nach einer weiteren Zentrifugation für 10min bei 1200rpm/4°C (Heraeus Minifuge) wurde das Sediment in 10ml MACS-Puffer resuspendiert. 10µl der Zellsuspension wurden zur Zellzahlbestimmung auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen.

2.2.2.2 Präparation von murinen Thymuszellen

Nach der Präparation des Thymus, wurde dieser über einem Sieb zerkleinert und mit 10ml RPMI/10% FKS gespült. Nach Zentrifugation für 10min bei 1200rpm/4°C (Heraeus Minifuge) erfolgte gegebenenfalls eine hypotonische Lyse der Erythrozyten für 5min bei RT durch Zugabe von 1ml RBCL-Lösung. Nach dem Abstoppen der Lyse durch Zugabe von 10ml RPMI/10% FKS wurde die Zellsuspension über einen 70µm Filter filtriert. Anschließend erfolgte eine weitere Zentrifugation für 10min bei 1200rpm/4°C (Heraeus Minifuge). Nach der Resuspension in 10ml MACS-Puffer wurde ein Aliquot von 10µl zur Zellzahlermittlung auf einer Neubauer-Zählkammer gegeben.

2.2.2.3 Präparation von murinen Lymphknotenzellen

Nach der Präparation der inguinalen und axialen Lymphknoten (*Lymphonodus axillaris lateralis*, *Lymphonodus axillaris profundus*, *Lymphonodus inguinalis*), wurden diese über

einem Sieb zerkleinert und mit 10ml RPMI/10% FKS gespült. Nach Zentrifugation für 10min bei 1200rpm/4°C (Heraeus Minifuge) wurde die Zellsuspension nach Resuspension in MACS-Puffer über einen 30µm Filter (Miltenyi Biotech) filtriert und ein Aliquot von 10µl zur Zellzahlermittlung auf einer Neubauer-Zählkammer gegeben.

2.2.2.4 Präparation von murinen PBMC

Murines peripheres Blut wurde nach dem Narkotisieren der Maus im Ether durch Punktion der Augenvene oder der Schwanzvene gewonnen. So wurden ca. 0,2-0,5ml Blut pro Maus erhalten und zur Vermeidung der Koagulinierung in ein Reaktionsgefäß mit PBS 0,5mM EDTA gegeben. Nach Zentrifugation bei 3000rpm (Eppendorf Minifuge) erfolgte eine hypotonische Lyse der Erythrocyten für 5min bei RT durch Zugabe von 1ml RBCL-Lösung. Nach dem Abstoppen der Lyse durch Zugabe von etwa 1ml RPMI/10% FKS und anschließender Zentrifugation bei 3000rpm (Eppendorf Minifuge) wurde die Zellsuspension in MACS-Puffer resuspendiert. Zur Zellzahlermittlung wurde ein Aliquot von 10µl auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben.

2.2.2.5 Präparation von murinen Zellen aus Peyerschen Plaques

Nach Präparation der Peyerschen Plaques am Dünndarm, wurden diese über einem Sieb zerkleinert und mit 10ml RPMI/10% FKS gespült. Die Zellsuspension wurde dann bei 1200rpm/4°C für 10min zentrifugiert (Heraeus Minifuge). Das Sediment wurde in 10ml MACS-Puffer resuspendiert und anschließend über einen 30µm Filter (Miltenyi Biotech) filtriert, um verbleibende Verunreinigungen zu entfernen. 10µl der Zellsuspension wurden zur Zellzahlbestimmung auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen.

2.2.2.6 Präparation von Tumor-Infiltraten

Nach der Präparation der soliden J558L oder B16 (siehe 2.2.15 und 2.2.16) Tumore, wurden diese in kleine Stücke geschnitten und über einem 70µM Sieb zerkleinert. Anschließend wurde mit 10ml RPMI/10% FKS gespült. Die Zellsuspension wurde dann bei 1200rpm/4°C für 10min zentrifugiert (Heraeus Minifuge). Nach Resuspension des Sedimentes in MACS Puffer, wurde die Zellsuspension über einen 30µm Filter (Miltenyi Biotech) filtriert, um verbleibende Verunreinigungen zu entfernen. 10µl der Zellsuspension wurden zur Zellzahlbestimmung auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen.

2.2.2.7 Präparation von ZNS-Infiltraten

ZNS infiltrierende Zellen wurden aus SJL/J Mäusen gewonnen. Die Tiere wurden zunächst über eine intraperitoneale Injektion von Ketamin (50mg/KG Körpergewicht) und Xylazin (10mg/Kg Körpergewicht) betäubt. Anschließend erfolgte eine intrakardiöse Perfusion über die linke Herzkammer mit 30ml eiskaltem PBS. Das ZNS wurde präpariert und über einem Sieb zerquetscht und mit RPMI/10% FKS gespült. Anschließend erfolgte ein Verdau mit 0,5mg/ml Kollagenase Typ VIII bei 37°C für 20min. Nach dem Waschen wurde die Zellsuspension in einer 30% Percoll Lösung resuspendiert. Diese wurde dann über eine 60% Percoll Lösung gegeben und bei 1600rpm für 20min ohne Bremse zentrifugiert. ZNS infiltrierende mononukleäre Zellen wurden nach dem Entfernen der oberen Myelinschicht von der 30%/60% Percoll Interphase entnommen. Anschließend wurden die Zellen erneut mit RPMI/10% FKS gewaschen und in MACS Puffer zur Weiterverwendung resuspendiert. 10µl der Zellsuspension wurden zur Zellzahlbestimmung auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen.

2.2.2.8 Präparation von humanen PBMC

Heparinisiertes humanes Blut wurde von gesunden, freiwilligen Donoren gewonnen. Anschließend erfolgte die Isolation von mononukleären Zellen über eine Ficoll Gradientenzentrifugation. 15ml Ficoll wurden mit 35ml heparinisiertem humanem Blut, zu gleichen Teilen verdünnt mit RPMI/10% FKS, überschichtet. Nach Zentrifugation für 25min bei 2000rpm (Heraeus Minifuge) bei Raumtemperatur ohne Bremse, wurden die Zellen an der Interphase entnommen. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit RPMI/10% FKS wurden die Zellen in MACS Puffer zur Weiterverwendung resuspendiert. 10µl der Zellsuspension wurden zur Zellzahlbestimmung auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen.

2.2.3 Antikörperfärbung

2.2.3.1 Oberflächen Färbung

Im Verlauf der Arbeit wurden mittels Antikörper Oberflächen-Färbungen von Lymphozyten durchgeführt, um sie anschließend durchflusszytometrisch (FACS, *fluorescence activated cell sorting*) zu charakterisieren oder über Fluoreszenz-aktivierte-Zellsortierung zu sortieren (siehe 2.2.4).

Die nach 2.2.2 gereinigten Lymphozyten wurden mit der entsprechenden Antikörperlösung (siehe Tabelle 4) in einem Volumen von 50µl für 15min bei 4°C unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurden die gefärbten Zellen mit MACS Puffer gewaschen und für 10min bei 1200rpm/4°C zentrifugiert (Heraeus Minifuge). Die sedimentierten Zellen wurden in MACS Puffer resuspendiert (300µl) und zur FACS Analyse eingesetzt. Bei der Verwendung von biotinylierten Antikörpern, ungekoppelten Antikörpern oder Fusionsproteinen erfolgte nach der ersten Antikörperfärbung eine sekundäre oder gegebenenfalls eine tertiäre Färbung mit Streptavidin gekoppelten Fluorochromen oder Fluorochrom gekoppelten Isotyp spezifischen Antikörpern. Anschließend wurden die sekundär gefärbten Zellen wiederum mit MACS Puffer gewaschen und für weitere 10min bei 1200rpm/4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde in 300µl MACS Puffer aufgenommen und zur FACS Analyse eingesetzt.

2.2.3.2 Intrazelluläre Färbung

Zur Analyse von nicht an der Zelloberfläche ausgeprägten Proteinen wurden im Verlauf der Arbeit auch intrazelluläre Antikörperfärbungen durchgeführt. In diesem Falle wurden die Zellen nach der Oberflächenfärbung mit 2% Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Zellen in PBS gewaschen und in 0,5% Saponin Lösung resuspendiert. Saponin vermittelt eine Porenbildung an der Zelloberfläche und ermöglicht so eine Bindung von Antikörpern an intrazelluläre Moleküle. Nach einer Inkubation von 20min bei 4°C unter Lichtausschluss wurden die Zellen erneut zentrifugiert und mit den intrazellulären Antikörpern in Saponinlösung für 30-60min bei 4°C unter Lichtausschluss inkubiert. Nach zweimaligen Waschen mit 0,5% Saponin Lösung wurden die Zellen in 300µl MACS Puffer resuspendiert und zur FACS Analyse herangezogen.

2.2.4 Fluoreszenz-aktivierte-Zellsortierung/Durchflusszytometrie

2.2.4.1 Allgemeines Prinzip

Die Verwendung eines Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierers (FACSVantage/DIVA; MoFlo) ermöglicht es, zuvor mit fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gefärbte Zellpopulationen nach verschiedenen Parametern (Lichtstreuung und Fluoreszenz) aufzutrennen und zu sortieren. Die Zellsuspensionen werden über ein Piezoelement in Tropfen zerlegt und in einer Messeinheit mit Licht hoher Intensität bestrahlt. Der Lichtstrahl wird durch Zellen in der

Suspension gestreut, Maß und Richtung der Lichtstreuung liefern die Information über Größe (gemessen über Vorwärtsstreulicht, FSC) und Granularität (gemessen am Rechtwinkelstreulicht, SSC). Weiterhin werden die an Antikörper gekoppelten Fluorochrome zur Fluoreszenz angeregt. Farbe und Intensität der Fluoreszenz liefern dann weitere Information über die zu untersuchende Zellpopulation. Im Falle von FACS Sortierungen, können Zellen so nach verschiedenen Parametern separiert und über elektrostatische Aufladung in ein Gefäß abgelenkt werden.

2.2.4.2 Sortierung von Zellen

Zur Sortierung von Zellen wurde ein FACSVantage/DIVA oder MoFlo Sortierer benutzt und von dem jeweiligen Techniker am DRFZ (Deutschem Rheumaforschungszentrum Berlin) oder IRCCS (Rom) betrieben. Die mit den entsprechenden Antikörpern gefärbten Zellen wurden direkt in ein Plastikgefäß, gefüllt mit PBS/0,5% BSA, sortiert. Zum Teil wurden die Zellen zuvor über MACS (Magentische Zellsortierung) auf zum Beispiel CD4+ T-Zellen angereichert (siehe 2.2.5). Zum Ausschluss von toten Zellen erfolgte die Zugabe von Propidiumiodid (Sigma). Nach Sortierung wurde die Reinheit der sortierten Zellen über eine durchflusszytometrische Reanalyse am FACSCalibur Instrument bestimmt. Soweit nicht anders angegeben, betrug die erhaltene Reinheit von FACS sortierten Zellpopulationen über 90%.

2.2.4.3 Durchflusszytometrische Analyse von Zellsuspensionen

Zur durchflusszytometrischen Analyse wurde ein FACSCalibur oder FACSCanto Instrument (BD) benutzt. Der FACSCalibur ermöglicht die durchflusszytometrische Analyse von Vorwärtsstreulicht, Rechtwinkelstreulicht und 4 weiteren Fluoreszenzparametern, abhängig von den verwendeten Fluorochromen gleichzeitig, wobei der FACSCanto die gleichzeitige Analyse von 2 weiteren Fluoreszenzparametern ermöglicht. Die, wie unter 2.2.3 beschrieben, mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gefärbten Zellen wurden in ca. 300µl MACS Puffer resuspendiert und im Durchflusszytometer analysiert. Unter Umständen erfolgte die Zugabe von Propidiumiodid, zum Ausschluss von toten Zellen. Zuvor wurde entsprechend der benutzten Fluorochromen, zur Kompensation der Spektralüberschneidung mit kolloidalen, einzeln gefärbten Partikeln (Beads) oder einzeln gefärbten Zellen, kompensiert. Die im FCS2.0 oder FCS3.0 bzw. FACSDIVA Standard aufgezeichneten Daten wurden dann anschließend mit Hilfe von Cellquest pro (BD), FACSDIVA (BD) oder Flowjo Software

(Tree Star) analysiert. Soweit nicht anders angegeben, wurden alle gezeigten durchflusszytometrischen Phäotypisierungen mindestens in drei unabhängigen Experimenten bestätigt.

2.2.5 Magnetische Zellsortierung

Die magnetische Zellsortierung basiert auf dem Prinzip der Sortierung von Zellen mittels an Antikörper konjugierte ferromagnetische, kolloidale Beads. Binden die eingesetzten Antikörper spezifisch an Moleküle der Zelloberfläche oder an Fluorochrom-gekoppelte Antikörper (welche an die Zelloberfläche gebunden sind), können die Zellen durch Anlegung eines Magnetfeldes von nicht Antikörper bindenden Zellen, aufgrund der ferromagnetischen Beads, separiert werden.

Im Laufe der Arbeit wurden Zellen über zwei verschiedene Techniken der Firma Miltenyi Biotech über MACS aufgereinigt. Zum Teil wurden manuelle Säulen (MS, LS, LD) und ein MiniMACS (Miltenyi) Magnet oder ein AutoMACS Instrument (Miltenyi) zur magnetischen Separation von Lymphozyten laut Herstellerangaben eingesetzt. Über MACS-Separationen wurden CD4+ T-Zellen, CD4+ CD25- T-Zellen, CD4+ CD25+ T-Zellen oder CD90.2- Zellen aufgereinigt. Zum Teil wurden Zellen vor der FACS-Sortierung (siehe 2.2.4) über MACS angereichert. Im Laufe der Arbeit wurden Steptavidin-Beads, Anti-Fitc-Beads, Anti-Phycoerythrin-Beads, Anti-Biotin-Beads und Anti-Ratte IgG-Beads nach Herstellerangaben eingesetzt (Miltenyi). Weiterhin wurden zum Teil ein CD4+ oder CD25+ CD4+ *T cell isolation kit* (Miltenyi) eingesetzt und nach Herstellerangaben verwendet. Nach den entsprechenden Aufreinigungsschritten erfolgte eine Kontrolle der Reinheit im Durchflusszytometer (FACSCalibur). Die Reinheit der über MACS getrennten Zellpopulationen betrug standardisiert 90-99%.

2.2.6 RNA Isolation

Gesamt RNA aus humanen oder murinen Zellen wurde anhand von Trizol (Invitrogen) laut Herstellerangaben isoliert. Für geringe Zellzahlen (<250,000 Zellen) wurde vor der Isopropanol Fällung 0,5µg linearisiertes Polyacrylamid (Sigma) zur besseren Visualisierung des Sediments eingesetzt. Bei der RNA Isolation für Genexpressionsexperimente erfolgte weiterhin eine Qualitätskontrolle der RNA über ein RNA-Formaldehyd Gel. Weiterhin wurde photometrisch die Konzentration bestimmt. Die RNA wurde in RNase freiem DEPC-Wasser aufgenommen und bei -20°C oder -80°C gelagert.

2.2.7 Copy DNA (cDNA) Präparation

Zur weiteren Verwendung in PCR (Polymerase Kettenreaktion) Analysen wurde die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben. Bei gewonnener RNA aus FACS oder MACS sortierten Zellen (siehe 2.2.4, 2.2.5) wurde diese bei einer Zellzahl von 50.000-250.000 Zellen in 10µl Wasser aufgenommen. Zur reversen Transkription wurden hier die gesamten 10µl RNA eingesetzt. Die Reaktion erfolgte mit Hilfe eines poly-dT (Thymidin) Primer und der reversen Transkriptase Superscript II (Invitrogen) laut Protokoll des Herstellers. Anschließend wurde verbleibende RNA laut Herstellerangaben durch eine Inkubation mit RNaseH (Invitrogen) eliminiert. Die reverse Transkription wurde durch eine RT- Reaktion kontrolliert; d.h. ein Reaktionsgefäß wurde parallel ohne Zugabe der reversen Transkriptase prozessiert. Vor der RT Reaktion mit der RNA erfolgte in manchen Fällen ein DNase Verdau zur Entfernung von verbliebener genomischer DNA. Der DNase Verdau erfolgte mittels DNase I (*Amplification grade*, Invitrogen) laut Herstellerangaben. Nach Inaktivierung der Enzyme wurde die cDNA bei -20°C oder -80°C vor der Weiterverwendung gelagert.

2.2.8 Realtime RT-PCR

Die Realtime RT-PCR wurde mittels *QuantiTect SYBR Green PCR kit* (Qiagen) in einem iCycler Instrument durchgeführt. Die spezifischen Oligonukleotide für das entsprechende Gen wurden zuvor mit der MolecularBeacon Software, ausgehend von der publizierten Sequenz der cDNA, ausgewählt (siehe 2.1.6). Nach der Optimierung der Bedingungen für jedes Oligonukleotid Pärchen erfolgte die Realtime PCR über 45-55 Zyklen bei einer in der Regel optimalen Hybridisierungs-Temperatur der Oligonukleotide zwischen 50-60°C. Der Reaktionsansatz wurde in 20µl Volumen durchgeführt und bestand aus 10µl *SYBR Green Master Mix* (Qiagen, Hilden, D), 0,5µl cDNA (siehe 2.2.7), 0,2µl *Calibration Dye* (Biorad) und 0,6µl Oligonukleotidmix [25µM]. Jeder Ansatz wurde in Duplikaten oder Triplikaten durchgeführt. Als Kontrollen dienten hier jeweils eine Reaktion ohne cDNA (*non template*) und eine Reaktion mit RT- Einsatz. Die Bestimmung des *threshold cycle* (Ct), d.h. die Bestimmung des ersten messbaren PCR-Produktes über Hintergrund und die weitere Analyse der Daten erfolgte mittels iCycler Analysis Software (Biorad). Normalisiert auf die Expression des *Housekeeping* Gens HPRT (*hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl-transferase*) wurden dann relative Unterschiede in der Genexpression in verschiedenen Zellpopulationen anhand der $\Delta\Delta Ct$ Methode ermittelt. Der ΔCt Wert wurde über die

Differenz zwischen dem Ct der Probe vom Zielgen und dem Ct vom *Housekeeping* Gen berechnet. Der $\Delta\Delta Ct$ Wert wurde dann über die Differenz von den ΔCt Werten der zu vergleichenden Proben berechnet. Der relative Expressionsunterschied (R) zwischen zwei Proben kann dann über die Formel $R = 2^{\Delta\Delta Ct}$ bestimmt werden. Nach erfolgter Reaktion wurden die PCR-Produkte zur Kontrolle elektrophoretisch in einem 1% Agarosegel (siehe 2.2.1) aufgetrennt und mit einem Foto dokumentiert.

2.2.9 Genexpressionsanalysen

Globale Genexpressionsanalysen wurden mit Hilfe der Affymetrix Technologie durchgeführt. Die Analyse der globalen Genexpression erfolgt hier über eine Hybridisierung von Biotin gekoppelter cRNA (*copy* RNA) an definierte einzelsträngige cDNA Sonden, welche an eine Matrix, den so genannten *Genechip* gebunden sind. Durch die Visualisierung mittels Streptavidin-gekoppelter Fluorochrome kann so die relative Häufigkeit von zahlreichen Transkripten gleichzeitig ermittelt und verglichen werden. Bei der Affymetrix Technologie bestehen die Sonden aus 16 bis 20 Nukleotid langen Fragmenten, welche überlappend einen Großteil des Transkriptes abdecken. Die gesamten Sonden eines Transkriptes wird als *Probeset* benannt, welches wiederum aus überlappenden *Probepairs* besteht, welche sich aus einer passenden Sonde und einer an einer Stelle veränderten *Mismatch* Sonde zusammensetzen. Über die *Mismatch* Sonde kann dann auch die Signifikanz und Spezifität einer Hybridisierung an ein *Probepair* bestimmt werden. Jedes *Probeset* besteht aus ca. 20 *Probepairs*, von denen wiederum ca. 15.000 Oligonukleotide auf der Matrix an einem bestimmten Ort auf dem Chip hybridisiert sind. Zum Einsatz kamen U74Av2 Maus Genechips, welche ca. 12.000 Transkripte abdecken. Die zur Hybridisierung benötigte biotinylierte cRNA wurde mit leichten Abweichungen nach dem Affymetrix Standard Protokoll erstellt. Ausgehend von 1µg gesamt RNA (siehe 2.2.6), erhalten aus ca. 10^6 MACS gereinigten CD4+ CD25- und CD4+ CD25+ Zellen (siehe 2.2.5) erfolgte zunächst eine reverse Transkription unter Zuhilfenahme eines T7 Promotor enthaltenden poly T Oligonukleotides (Tabelle 5) und Superscript II (Invitrogen). Anschließend erfolgte die Generierung doppelsträngiger cDNA mit Hilfe von DNA Polymerase I (Invitrogen) laut Herstellerangaben. Nach der Reinigung mittels Phenol-Chloroform Extraktion erfolgte dann die *in vitro* Transkription zur Generierung von Biotin-markierter cRNA mittels ENZO Kit (Affymetrix). Abweichend vom Affymetrix Protokoll wurde hier lediglich eine halbe ENZO Reaktion eingesetzt. Nach erfolgter Reaktion wurde die entstandene cRNA über *Rneasy* Säulen (Qiagen) gereinigt. Pro Reaktion wurden so ca. 10-15µg cRNA erhalten. Anschließend

wurde die cRNA noch über Phenol-Chloroform Extraktion gereinigt und später für 20min im Fragmentierungspuffer in 20-40 Nukleotid lange Fragmente zerstückelt. Die fragmentierte, biotinylierte cRNA wurde dann bei -80°C eingefroren. Die Hybridisierung und Färbung erfolgte nach Angaben des Herstellers in der MDC Gene Array Facility. Hier geschah auch das Scannen und die Generierung der initialen Dateien mittels Microarray Suite Software (Affymetrix). Die weitere Datenanalyse und Visualisierung erfolgte dann über Microarray Suite (Affymetrix) oder Genespring (Silicon Genetics).

2.2.10 Zellkultur

Die Kultivierung von *ex vivo* isolierten T-Zellen erfolgte soweit nicht anders beschrieben ausschließlich in RPMI (Invitrogen) bei 37°C in einer humiden Atmosphäre/5% CO_2 . Als Wachstumsfaktoren wurden je nach Experiment anti-CD3 Antikörper (145-2C11/Maus & T3D/Mensch) und rekombinantes Interleukin 2 verwendet.

2.2.10.1 Suppressions-Assay

Zum Nachweis der Funktionalität von CD25+ regulatorischen T-Zellpopulationen (Treg) wurde der Standard *in vitro* Suppressions-Assay mit leichten Abweichungen verwendet (114). Entscheidend hierfür ist die Fähigkeit von CD25+ Treg nach Aktivierung eine anti-CD3 stimulierte Effektor T-Zell Proliferation zu inhibieren. Über MACS oder FACS isolierte Treg Populationen und CD4+ CD25- Effektor T-Zellen (siehe 2.2.4 und 2.2.5) wurden zusammen mit bestrahlten (3000rad) antigenpräsentierenden Zellen (APC/B220+ oder CD90.2- murinen Zellen oder CD3- humanen Zellen) in 96-Loch V-Boden Platten (Costar) kultiviert und mit anti-CD3 stimuliert (abhängig vom Organismus oder Mausstamm 1-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). 1×10^4 CD4+ CD25- Effektor T-Zellen und titrierte Mengen an Treg wurden mit 2×10^4 APC in 100 μl Volumen pro Loch eingesetzt. In manchen Fällen wurden 20U/ml IL2 zugegeben. Nach ca. 72h Kultivierung erfolgte die Zugabe von 1 μCi $6\text{-}^3\text{H}$ Thymidin (Amersham Pharmacia, Freiburg, D) in 20 μl RPMI und eine weiter Kultivierung für 6-10h. Die Zellen wurden anschließend mit einem Harvester (Tomtec) gesammelt. Die Menge des in die DNA eingebauten $6\text{-}^3\text{H}$ Thymidins wurde mittels eines β -Scintillationszählers (Wallac) bestimmt und als cpm (*counts per minute*) dargestellt.

2.2.10.2 Migrations-Assay

In vitro Migrations-Assays wurden mit geringen Modifikationen wie zuvor beschrieben durchgeführt (115). Es wurden $0,5 \times 10^6$ CD4+ CD25- oder CD4+ CD25+ über MACS isolierte Zellen im entsprechendem Volumen (laut Herstellerangaben) in die obere Kammer des Transwell Systems ($0,3\mu\text{m}$ pore size, *Transwell tissue culture inserts* (Costar) oder $0,3\mu\text{m}$ pore size, *Cell Culture Inserts* mit *Cell Culture Insert Companion Plates* (BD Falcon)) gegeben, während die untere Kammer mit dem entsprechendem Volumen an serumfreiem RPMI mit 0,5% BSA (laut Herstellerangaben) und dem Chemokin CCL4 oder CCL20 in verschiedenen Konzentrationen gegeben wurde. Zellen und Medium wurden jeweils 0,5h vor dem Versuch auf 37°C in einer humiden Atmosphäre/5% CO_2 vorgewärmt. Der Migrations-Assay wurde für 3h bei 37°C in einer humiden Atmosphäre/5% CO_2 belassen. Nach 3h wurde dann eine gleiche Menge an kolloidalen Beads (Calibrite beads, BD Biosciences) zur unteren Kammer gegeben und ein gleiches Volumen der unteren Kammer wurde anschließend durchflusszytometrisch (FACSCalibur) analysiert.

Als Kontrolle diente jeweils ein Ansatz ohne Chemokin, um die spontane Migration zu bestimmen. Alle Experimente wurden jeweils in Doppelansätzen durchgeführt. Die relative Migration wurde über den chemotaktischen Index berechnet (Verhältnis der migrierten Zellen mit Chemokin zu den spontan migrierten Zellen ohne Chemokin)

2.2.10.4 Proliferations-Assay & T-Zell Restimulation

Proliferations-Assays mit ZNS-Infiltraten von SJL/J Mäusen wurden in 96-Loch U-Boden Platten durchgeführt. Es wurden 10^5 bestrahlte Milzzellen (3000rad) und 5×10^4 ZNS infiltrierende Zellen (siehe 2.2.2.8) pro Loch eingesetzt. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit $10\mu\text{g/ml}$ löslichem anti-CD3 (145-2C11). In manchen Fällen wurden $5\mu\text{g/ml}$ anti-GITR zugegeben, um die Suppression aufzuheben. Die Zellen wurden im Volumen von $100\mu\text{l}$ /Reaktionsansatz für 72h bei 37°C in einer humiden Atmosphäre/5% CO_2 inkubiert. Nach Zugabe von $1\mu\text{Ci}$ $6\text{-}^3\text{H}$ Thymidin (Amersham Pharmacia) in $20\mu\text{l}$ RPMI erfolgte eine Kultivierung für weitere 12h. Anschließend wurden die Zellen mit einem Harvester (Tomtec) gesammelt und der Einbau von $6\text{-}^3\text{H}$ Thymidin wurde mittels eines β -Scintillationszählers (Wallac) bestimmt und als cpm dargestellt..

Eine *in vitro* Restimulation von T-Zellen wurde in 96-Loch U-Boden Platten durchgeführt. 5×10^4 FACS sortierte T-Zellen (siehe 2.2.4.2) wurden für 4h bei 37°C in einer humiden Atmosphäre/5% CO_2 mit Platten-gebundenem anti-CD3 (145-2C11, $20\mu\text{g/ml}$) stimuliert.

Anschließend wurde die RNA aus den Zellen isoliert (siehe 2.2.6) und zur Realtime PCR zum Nachweis der Zytokin Expression eingesetzt (siehe 2.2.8).

2.2.10.5 Ko-Kultivierung von Treg und dendritischen Zellen

Eine Ko-Kultivierung von Treg und dendritischen Zellen zur Induktion vonIDO wurde mit geringen Modifikationen wie zuvor beschrieben durchgeführt (61).

Über MACS angereicherte CD11c+ DC aus der Milz ($0,5 \times 10^6$) wurden zusammen mit FACS isolierten CD25+ Treg Subpopulationen aus LN und Milz (1×10^5) in 96-Loch U-Boden Platten für 24h bei 37°C in einer humiden Atmosphäre/5% CO₂ inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen mehrfach mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die RNA Isolation der Zellen mittels Trizol (siehe 2.2.6) und spätere Präparation der cDNA (siehe 2.2.7), um eine Induktion vonIDO mittels Realtime RT-PCR nachweisen zu können.

2.2.11 BrdU Markierung und durchflusszytometrischer Nachweis

BrdU (*5-Bromo-2-Deoxyuridine*; Sigma) wurde im Trinkwasser in einer Konzentration von 0.8mg/ml gelöst und BALB/c Mäusen bis zu 14 Tagen verabreicht, wobei die BrdU Lösung mindestens alle 2 Tage frisch angesetzt und gewechselt wurde. Nach 7 oder 14 Tagen erfolgte die Isolation von Lymphknotenzellen (siehe 2.2.2.4). Zum Nachweis von eingebauten BrdU wurden die Zellen zunächst mit den entsprechenden Antikörpern an der Zelloberfläche gefärbt (siehe 2.2.3.1) und dann über Nacht in 1% Paraformaldehyd/PBS fixiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen für 30min bei 4°C in 0,5% Saponin permeabelisiert. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 30min bei Raumtemperatur in 0.15M NaCl, 4.2mM MgCl₂, 10mM HCl, pH 5 im Beisein von 2U DNase I (Invitrogen) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Färbung mit den anti-BrdU Antikörpern in 0,5% Saponin Puffer für 30min bei 4°C. Nach weiterem zweimaligem Waschen erfolgte dann die durchflusszytometrische Analyse (FACSCalibur).

2.2.12 CFDA-SE Markierung und adoptiver Transfer von T-Zellen

Lymphknoten- und Milzzellen wurden aus T-Zell Rezeptor transgenen TG4 oder DO11.10 Mäusen präpariert (siehe 2.2.2). Anschließend wurden CD4+ CCR6- T-Zellen über MACS isoliert (siehe 2.2.5), indem zunächst CD4+ T-Zellen mit Hilfe eines *CD4 T cell isolation kit* (Miltenyi Biotech) gewonnen wurden, welche anschließend für den Chemokinrezeptor CCR6

per MACS depletiert wurden. Anschließend wurden die T-Zellen mit $3\mu\text{M}$ CFDA-SE (*carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*; Molecular Probes, Eugene, USA) markiert. Hierfür wurden jeweils 2×10^7 Zellen in 2ml PBS/0,05% FKS/ $3\mu\text{M}$ CFDA für 8min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Färbereaktion wurde dann durch dreimaliges Waschen der Zellen mit RPMI/10% FKS gestoppt. Für den adoptiven Transfer wurden die kongenen Empfängermäuse (B10.PL oder BALB/c) mit 1×10^7 Zellen intravenös (i.v.) injiziert. Die Tiere erhielten anschließend am gleichen Tag eine subkutane Injektion mit dem entsprechenden Peptid (20 μg MBP Ac1-11 oder 100 μg OVA323-339), gelöst in komplettem Freund's Adjuvanz.

2.2.13 Induktion und Wertung von EAE in SJL/J Mäusen

Weibliche SJL/J Mäuse wurden im Alter von 10 Wochen subkutan mit 50 μg PLP139-151 Peptid in komplettem Freund's Adjuvanz mit 400 μg *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra) immunisiert. Einen Tag nach der Immunisierung erhielten die Mäuse eine intravenöse Injektion von 200ng *Pertussis* Toxin. Anschließend wurden die Mäuse täglich auf klinische Zeichen der Krankheit untersucht. Die Schwere der Krankheit wurde auf einer Skala von 1 bis 5 folgend gewertet: 0, keine klinischen Zeichen; 1, gelähmter Schwanz; 2, gelähmter Schwanz, behinderter Aufstehreflex und Paresis von einem Bein; 3, Paralyse der Hinterbeine; 4, Paralyse der Vorder- und Hinterbeine; 5, Moribund oder Tod. Eine Remission der Krankheit wurde definiert, wenn die klinischen Zeichen rückläufig erschienen. Wenn keine klinischen Zeichen in der Remissionsphase mehr zu erkennen waren wurde erneut die Wertung 0 erteilt.

2.2.14 Adhäsions-Assay

Es wurden 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ rekombinantes humanen E-Selectin-Ig (R&D Systems) oder rekombinantes humanes VCAM-1 (R&D Systems) an *Cel-line slides* (6x3 Loch), (ERIE Scientific Co., Portsmouth, USA) gebunden und mit 2% FKS geblockt. Anschließend wurden die FACS sortierten Zellen (siehe 2.2.4) im Bindungspuffer (PBS 1mM Ca^{2+} , 1mM Mg^{2+} , 5% FKS, pH 7.2) resuspendiert. 10.000 Zellen/Loch wurden pro Kondition auf die *Cel-line slides* gegeben und für 20min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 2h mit 2% Glutaraldehyd fixiert und nachfolgend mit PBS gewaschen. An die *Cel-line slides* gebundene Zellen wurden pro Loch mittels eines Mikroskopes ausgezählt. Der Ansatz pro Kondition erfolgte jeweils in Dreifachansätzen.

2.2.15 Tumorinduktion mit J558L Plasmazytom Zellen

2.2.15.1 J558L-Tumorzelllinie

Die J558L Plasmacytoma-Zelllinie (zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Blankenstein (116)) wurde in RPMI-Medium mit 10% FKS bei 37°C in einer 5% CO₂ Atmosphäre kultiviert.

2.2.15.2 Applikation von Tumorzellen

Die Applikation von J558L Zellen in BALB/c Mäusen erfolgte nach dem Protokoll von Ibe et al. mit geringen Abweichungen (117). Im Detail wurden die kultivierten Tumorzellen vor Inokulation zweimal in PBS gewaschen. Die Viabilität der Zellen lag bei über 95% und wurde anhand einer Trypanblau-Färbung (Invitrogen) ermittelt. Es wurden 2×10^6 J558L-Tumorzellen in 200µl PBS subkutan in die linke Kniefalte von BALB/c Mäusen injiziert.

2.2.16 Tumorinduktion mit B16 Melanom Zellen

2.2.16.1 B16-Tumorzelllinie

Die B16 Melanoma-Zelllinie (ATCC) wurde in DMEM-Medium mit 5% FKS bei 37°C in einer 10% CO₂ Atmosphäre kultiviert.

2.2.16.2 Applikation von Tumorzellen

Vor Inokulation der Tumorzellen wurden diese zweimal in PBS gewaschen. Die Viabilität der Zellen lag bei 95-98%; und wurde mit Hilfe einer Trypanblaufärbung ermittelt. Es wurden 2×10^6 B16 Tumorzellen in 200µl PBS subkutan in die linke Kniefalte von CCR6 EGFP-KI Mäusen injiziert.