

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Chemikalien

Die Laborchemikalien wurden in pro analysi Qualität von den folgenden Firmen bezogen: Boehringer, Gibco BRL, Merck, Sigma, Roth und Clontech. Soweit nicht anders vermerkt, erfolgte die Herstellung der Lösungen, Puffer und Medien nach Sambrook et al. (1989).

#### 2.1.2. Geräte

| <b>Artikel</b>  | <b>Bezugsquelle</b>                   |
|---|---------------------------------------|
| DNA Engine Opticon 2 Light Cycler                               | MJ Research, Biozym, Oldendorf        |
| Durchflusszytometer und Software Epics XL-MCL, System II        | Beckman Coulter, Krefeld              |
| ELISA-Reader EIX800   | Bio-Tek Instruments, Winooski (USA)   |
| Fluoreszenzmikroskop „Axiovert 200“                             | Zeiss, Oberkochen                     |
| Glaswaren   | Schott Roth, Karlsruhe                |
| Inkubator für Zellkultur, CO <sub>2</sub> -begast „Luminex 100“ | Heraeus, München<br>Nivelles, Belgium |
| Mikroliter-Pipetten   | Eppendorf, Hamburg                    |
| MPC-L Magnet  | Dynal Biotech /Invitrogen, Karlsruhe  |
| Phasenkontrastmikroskop Standard 25                             | Zeiss, Oberkochen                     |
| pH-Meßgerät   | WTW, Weilheim                         |
| Schüttelinkubatoren „2Certomat“                                 | Braun Biotech, Melsungen              |
| Sicherheitswerkbank Klasse II                                   | Heraeus, Hanau                        |
| Sterilwerkbank  | SterilGARD, Sanford (USA)             |
| Stickstoff-Kühlagereinrichtung Messer                           | Cryotherm, Kirchen/Sieg               |
| Thermocycler UNO  | Biometra, Göttingen                   |
| Thermomixer Comfort   | Eppendorf, Hamburg                    |
| Vortex Reax 2000  | Heidolph, Schwabach                   |
| UV-Mikrophotometer „GeneQuant Pro“                              | Pharmacia, Erlangen                   |
| Waage   | Sartorius, Goettingen                 |
| Wasserbad klein   | Julabo Labortechnik, Seelbach         |

**Artikel**

Wasserbad groß Julabo

Zentrifugen

**Bezugsquelle**

Julabo Labortechnik, Seelbach

Eppendorf, Hamburg; Sorvall, Bad Homberg

**2.1.3. Verbrauchsmaterialien**

**Artikel**

Einmalpipetten

Kanülen

Objektträger

Pipettenspitzen

Röhrchen, steril, Zellkultur

Skalpelle

Spritzen, 5 ml/10 ml/20 ml

Sterilfilter

Tiefkühlgefäße/Kryoröhrchen

Zellkultur-Multiwell-Platten

Zellkulturflaschen und -schalen

Zellsiebe

Zentrifugengefäße 1,5 ml/2 ml

**Bezugsquelle**

Costar, New York (USA)

BD, Heidelberg

„Superfrost“ Nunc, Wiesbaden

Gilson, Bad Camberg

Falcon/BD, Le Pont de Claix (France)

Feather/PFM, Köln

Braun, Melsungen

Millipore, Bedford (USA)

Nunc, Wiesbaden

BD, Heidelberg

Nunc, Wiesbaden

Falcon/BD, Heidelberg

Eppendorf, Hamburg

**2.1.4. Medien und Reagenzien für Zellkultur**

**Artikel**

Pan Mouse IgG Kit

Ficoll

PBS

FCS

RPMI -1640 Medium

Trypanblau

**Bezugsquelle**

Dynal Biotech /Invitrogen, Karlsruhe

Amersham Pharmacia, Buckinghamshire  
(UK)

Gibco, Karlsruhe

Gibco, Karlsruhe

Gibco, Karlsruhe

Sigma, St. Louis (USA)

### 2.1.5. Reagenzien für Immunhistologie, Immunfluoreszenz und FACS

| <b>Antikörper</b>               | <b>Herkunft</b>                      | <b>Bezugsquelle</b>                      |
|---------------------------------|--------------------------------------|--|
| Annexin-V                       | Kaninchen polyklonal IgG             | Abcam, Cambridge (UK)                    |
| CD4                             | Maus monoklonal IgG                  | Dynal Biotech /Invitrogen, Karlsruhe     |
| CD4                             | Maus monoklonal IgG                  | DakoCytomation, Glostrup (Dänemark)      |
| CD8                             | Maus monoklonal IgG                  | Dynal Biotech /Invitrogen, Karlsruhe     |
| CD8                             | Maus monoklonal IgG                  | Abcam, Cambridge (UK)                    |
| CD25                            | Maus monoklonal IgG                  | DakoCytomation, Glostrup (Dänemark)      |
| CD56                            | Maus monoklonal IgG                  | DakoCytomation, Glostrup (Dänemark)      |
| CTLA-4 (CD152)                  | Maus monoklonal IgG                  | BD Pharmingen, Heidelberg                |
| IFN- $\gamma$                   | Maus monoklonal IgG                  | BD Pharmingen, Heidelberg                |
| IL-2                            | Maus monoklonal IgG                  | R&D Systems, Minneapolis (USA)           |
| IL-10                           | Maus monoklonal IgG                  | R&D Systems, Minneapolis (USA)           |
| IL-18                           | Maus monoklonal IgG                  | Biomol, Rockland, Hamburg                |
| FOXP3                           | Maus monoklonal IgG                  | Abcam, Cambridge (UK)                    |
| HLA ABC                         | Maus monoklonal IgG                  | DakoCytomation, Glostrup (Dänemark)      |
| MHC class II                    | Maus monoklonal IgG                  | DakoCytomation, Glostrup (Dänemark)      |
| p33ING1b                        | Maus monoklonal IgG                  | Santa Cruz biotechnology, CA (USA)       |
| p33ING1b                        | Maus monoklonal IgG<br>biotinyliert  | Santa Cruz biotechnology, CA (USA)       |
| p29ING4                         | Ziege polyklonal IgG                 | Biomol, Rockland, Hamburg                |
| p29ING4                         | Ziege polyklonal IgG<br>biotinyliert | Biomol, Rockland, Hamburg                |
| p53                             | Maus monoklonal IgG                  | DakoCytomation, Glostrup (Denmark)       |
| Isotypekontrol für<br>Annexin-V | Maus IgG1                            | Abcam, Cambridge (UK)                    |
| TNF- $\alpha$                   | Maus monoklonal IgG                  | BD Biosciences Pharmingen,<br>Heidelberg |
| TNF- $\alpha$ R1                | Maus monoklonal IgG                  | R&D Systems, Minneapolis (USA)           |

**Weitere Artikel**

Avidin Lösung  
 Biotin Lösung  
 Biotin Lösung  
 FITC-konjugiertes F(ab')<sub>2</sub> Fragment, Esel  
 anti-Ziege IgG (H+L)  
 HRP-konjugiertes F(ab')<sub>2</sub> Fragment, Esel  
 anti-Ziege IgG (H+L)  
 FITC-konjugiertes F(ab')<sub>2</sub> Fragment Esel  
 anti-Mause IgG (H+L)  
 Cy3-konjugiertes F(ab')<sub>2</sub> Fragment Esel anti-  
 Mause IgG (H+L)  
 HRP-konjugiertes F(ab')<sub>2</sub> Fragment Esel  
 anti-Mause IgG (H+L)  
 AP-konjugiertes F(ab')<sub>2</sub> Fragment Esel anti-  
 Mause IgG (H+L)  
 HRP-konjugiertes F(ab')<sub>2</sub> Fragment, Esel  
 anti-Kaninchen IgG (H+L)  
 ChemMate *Antibody Diluent*  
 DAPI  
 DAB (3,3'-Diaminobenzidin)  
 En Vision K1395 Doppelfärbblock  
 Glycergel  
 Hämalaun  
 Fast Red  
 HistoDAB-Cobalt-Chloride  
 Nova Red  
 Mounting Medium  
 Normal Mouse Serum  
 Streptavidin Lösung  
 TUNEL-Assay

**Bezugsquelle**

Chemicon, Temecula (USA)  
 DakoCytomation, Glostrup (Dänemark)  
 Vector Laboratories, Burlingame (USA)  
 Jackson ImmunoResearch, West Grove  
 (USA)  
 Jackson ImmunoResearch, West Grove  
 (USA)  
 Jackson ImmunoResearch, West Grove  
 (USA)  
 Jackson ImmunoResearch, West Grove  
 (USA)  
 Jackson ImmunoResearch, West Grove  
 (USA)  
 Jackson ImmunoResearch, West Grove  
 (USA)  
 Jackson ImmunoResearch, West Grove  
 (USA)  
 DakoCytomation, Glostrup (Dänemark)  
 DakoCytomation, Glostrup (Dänemark)  
 Biogenex, San Ramon (USA)  
 DakoCytomation, Glostrup (Dänemark)  
 DakoCytomation, Glostrup (Dänemark)  
 Merck, Darmstadt  
 DakoCytomation, Glostrup (Dänemark)  
 Linaris, Werheim  
 Linaris, Werheim  
 Biogenex, San Ramon (USA)  
 DakoCytomation, Glostrup (Dänemark)  
 Vector Laboratories, Burlingame (USA)  
 Chemicon, Temecula (USA)

**2.1.6. Reagenzien für ELISPOT**

| <b>Artikel</b>                          | <b>Bezugsquelle</b>                   |
|---|---------------------------------------|
| AEC 3-amino-9-ethyl-carbozol,           | Sigma, St.Louis (USA)                 |
| BSA                                     | BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg |
| DMF (N,N-dimethylformamid)              | Sigma, St.Louis (USA)                 |
| Human IFN- $\gamma$ Elispot Kit         | BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg |
| Human IL-10 Elispot Kit                 | BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg |
| PHA                                     | Gibco, Karlsruhe                      |
| Streptavidin-HRP, Meerretich Peroxidase | BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg |
| Tween                                   | Gibco, Karlsruhe                      |

**2.1.7. Synthetische p33ING1b und p29ING4 Peptide**

54 Peptide von wt p33ING1b und 48 Peptide von wt p29ING4 (volle Länge) wurden als 15-mer bei 5 Aminosäuren überlappende Peptide synthetisiert (Proimmune, London, UK) und in 6 Pools für p33ING1b bzw. 5 Pools für p29ING4 geteilt.

**Tabelle 2.1. Sequenz des p33ING1b Proteins**

| <b>Peptidnummer</b> | <b>Sequenz</b>   | <b>Aminosäuren</b> |
|---------------------|------------------|--------------------|
| 1                   | MLSPANGEQLHLVNY  | 1-58               |
| 2                   | NGEQLHLVNYVEDYL  |                    |
| 3                   | HLVNYVEDYLDSIES  |                    |
| 4                   | VEDYLDSIESLPFDL  |                    |
| 5                   | DSIESLPFDLQRNVS  |                    |
| 6                   | LPFDLQRNVSLMREI  |                    |
| 7                   | QRNVSLMREIDAKYQ  |                    |
| 8                   | LMREIDAKYQEILKE  |                    |
| 9                   | DAKYQEILKELDECY  |                    |
| 10                  | EILKELDECYERFSR  |                    |
| 11                  | LDECYERFSRETDGA  | 59-108             |
| 12                  | ERFSRETDGAQKRRM  |                    |
| 13                  | ETDGAQKRRMLHCVQ  |                    |
| 14                  | QKRRMLHCVQRALIR  |                    |
| 15                  | LHCVQRALIRSQELG  |                    |
| 16                  | RALIRSQELGDEKIQ  |                    |
| 17                  | SQELGDEKIQIVSQM  |                    |
| 18                  | DEKIQIVSQMVOLVE  |                    |
| 19                  | IVSQMVOLVEENRTRQ |                    |
| 20                  | VELVENRTRQVDSHV  |                    |

MATERIAL UND METHODEN

|    |                  |         |
|----|------------------|---------|
| 21 | NRTRQVDSHVELFEA  | 109-158 |
| 22 | VDSHVELFEAQQELG  |         |
| 23 | ELFEAQQELGDTAGN  |         |
| 24 | QQELGDTAGNSGKAG  |         |
| 25 | DTAGNSGKAGADRPK  |         |
| 26 | SGKAGADRPKGEAAA  |         |
| 27 | ADRPKGEAAAQADKP  |         |
| 28 | GEAAAQADKPNKRS   |         |
| 29 | QADKPNKRSRRQRN   |         |
| 30 | NSKRSRRQRNNENRE  |         |
| 31 | RRQRNNENRENASSN  | 159-208 |
| 32 | NENRENASSNHDHDD  |         |
| 33 | NASSNHDHDDGASGT  |         |
| 34 | HDHDDGASGTPKEKK  |         |
| 35 | GASGTPKEKKAKTSK  |         |
| 36 | PKEKKAKTSKSKKRS  |         |
| 37 | AKTSKSKKRSKAKAE  |         |
| 38 | KKRSKAKAEREASP   |         |
| 39 | KAKAEREASPADLPI  |         |
| 40 | REASPADLPIDPNEP  |         |
| 41 | ADLPIDPNEPTYCLC  | 209-268 |
| 42 | DPNEPTYCLCNQVSY  |         |
| 43 | TYCLCNQVSYGEMIG  |         |
| 44 | NQVSYGEMIGCDNDE  |         |
| 45 | GEMIGCDNDECPIEW  |         |
| 46 | CDNDECPIEWFHFSC  |         |
| 47 | CPIEWFHFSCVGLNH  |         |
| 48 | FHFSCVGLNHKPKGK  |         |
| 49 | VGLNHKPKGKWCYCPK |         |
| 50 | KPKGKWCYCPKCRGEN |         |
| 51 | WCYCPKCRGENEKTMD | 269-273 |
| 52 | CRGENEKTMDKALEK  |         |
| 53 | EKTMDKALEKSKKER  |         |
| 54 | DKALEKSKKERAYNR  |         |

Tabelle 2.2. Sequenz des p29ING4 Proteins

| Peptidnummer   | Sequenz  | Aminosäuren |
|--|--|-------------|
| 1<br>2<br>3<br>4<br>5<br>6<br>7<br>8<br>9<br>10          | MAAGMYLEHYLDSIE<br>YLEHYLDSIENLPFE<br>LDSIENLPFELQRNF<br>NLPFELQRNFQLMRD<br>LQRNFQLMRDLQRT<br>QLMRDLQRTEDLKA<br>LDQRTEDLKAIDKL<br>EDLKAIDKLATEYM<br>EIDKLATEYMSSARS<br>ATEYMSSARSLSEE        | 1-58        |
| 11<br>12<br>13<br>14<br>15<br>16<br>17<br>18<br>19<br>20 | SSARSLSSEKLALL<br>LSSEKLALLKQIQE<br>KLALLKQIQEAYGKC<br>KQIQEAYGKCKEFGD<br>AYGKCKEFGDDKVQL<br>KEFGDDKVQLAMQTY<br>DKVQLAMQTYEMVDK<br>AMQTYEMVDKHIRRL<br>EMVDKHIRRLDLDLA<br>HIRRLDLDLARFEAD     | 59-108      |
| 21<br>22<br>23<br>24<br>25<br>26<br>27<br>28<br>29<br>30 | DTDLDLARFEADLKEKQ<br>RFEADLKEKQIESSD<br>LKEKQIESSDYDSSS<br>IESSDYDSSSSKGKK<br>YDSSSSKGKKKGRTQ<br>SKGKKKGRTQKEKKA<br>KGRTQKEKKAARARS<br>KEKKAARARSKGKNS<br>ARARSKGKNSDEEAP<br>KGKNSDEEAPKTAQK | 109-158     |
| 31<br>32<br>33<br>34<br>35<br>36<br>37<br>38<br>39<br>40 | DEEAPKTAQKKLKL<br>KTAQKKLKLVRTSPE<br>KLKLVRTSPEYGMPS<br>RTSPEYGMPSVTFGS<br>YGMPSVTFGSVHPSD<br>VTFGSVHPSDVLDM<br>VHPSDVLDMVPDPNE<br>VLDMVPDPNEPTYCL<br>VDPNEPTYCLCHQVS<br>PTYCLCHQVSYGEMI     | 159-208     |
| 41<br>42<br>43<br>44<br>45<br>46<br>47<br>48             | CHQVSYGEMIGCDNP<br>YGEMIGCDNPDCSIE<br>GCDNPDCSIEWFHFA<br>DCSIEWFHFAVGLT<br>WFHFAVGLTTKPRG<br>CVGLTTKPRGKWFPC<br>TKPRGKWFPCPRCSQE<br>GKWFPCPRCSQERKKK   | 209-248     |

### 2.1.8. Reagenzien für PCR

| Artikel                     | Bezugsquelle                         |
|-----------------------------|--------------------------------------|
| Agarose                     | Amresco, Goettingen                  |
| Blue-Orange 6x Loading Dye  | Promega, Mannheim                    |
| 100bp DNA-Ladder            | Promega, Mannheim                    |
| DNA Master SYBR Green I mix | Applied Biosystems, Darmstadt        |
| Ethidiumbromid              | Promega, Mannheim                    |
| iScript cDNA Synthesis Kit  | Bio-Rad Laboratories, Hercules (USA) |
| RNeasy Mini Kit             | Qiagen, Hilden                       |

| Primer        | Sequenz                                      | Bezugsquelle              |
|---------------|--|---------------------------|
| CD8           | forward 5'-CAC GGT GAA GAG GTG GAA CA-3'     | MWG Biotech,<br>Ebersberg |
|               | reverse 5'-GCT TGC ATC CCG AAA CAC A-3'      |                           |
| CD56          | forward 5'-GTG TGG TTA CAG GCG AGG AT-3'     |                           |
|               | reverse 5'-GAT GAC ATC TGG GCC TTT GT-3'     |                           |
| CD4           | forward 5'-CTG AGT GAC TCG GGA CAG GTC-3'    |                           |
|               | reverse 5'-GGG CAG AAC CTT GAT GTT GG-3'     |                           |
| CD25          | forward 5'-AAG TCC AAT GCA GCC AGT GG-3'     |                           |
|               | reverse 5'-TCC CTG CAG TGA CCT GGA AG-3'     |                           |
| CTLA4         | forward 5'-ATC GCC AGC TTT GTG TGT GA-3'     |                           |
|               | reverse 5'- GAC CTC AGT GGC TTT GCC TG -3'   |                           |
| Foxp3         | forward 5'-GAG AAG CTG AGT GCC ATG CA-3'     |                           |
|               | reverse 5'-GGT CAG TGC CAT TTT CCC AG-3'     |                           |
| IL-10         | forward 5'-CTA CGG CGC TGT CAT CGA TT-3'     |                           |
|               | reverse 5'-CAC GGC CTT GCT CTT GTT TT-3'     |                           |
| IFN- $\gamma$ | forward 5'-GAG TGG CAC CAA TGA TGC TG-3'     |                           |
|               | reverse 5'-GGT TTC TGG GTC ACA GAC AGG-3'    |                           |
| PD-1          | forward 5'-CCC AAG GCG CAG ATC AA-3'         |                           |
|               | reverse 5'-GCA CTT CTG CCC TTC TCT CTG T-3'  |                           |
| PD-L1         | forward 5'-AATTGTTGGCTTTCAC TTT-3'           |                           |
|               | reverse 5'-AGCGTCTTT TTCATACTTCA-3'          |                           |
| PD-L2         | forward 5'-GTA CAT AAT AGA GCA TGG CAG CA-3' |                           |
|               | reverse 5'-CCA CCT TTT GCA AAC TGG CTG T-3'  |                           |
| p53           | forward 5'-TGT GAC TTC GAG ATG CCC AG -3'    |                           |
|               | reverse 5'-GGT GAA CCT GCT CTC TCG CT-3'     |                           |
| ING1          | forward 5'-ATG TTG AGT CCT GCC AAC GGG GA-3' |                           |
|               | reverse 5'-CTC TTG GTA TTT CGC GTC GAT-3'    |                           |
| ING4          | forward 5'-CCA GGT CTC CTA TGG AGA GAT GA-3' |                           |
|               | reverse 5'-CCC GAG GCT TGG TTG TCA-3'        |                           |
| GAPDH         | forward 5`-CCA GCC GAG CCA CAT CGC TC- 3`    |                           |
|               | reverse 5`-ATG AGC CCC AGC CTT CTC CAT- 3`   |                           |



| <b>Primer</b> | <b>Sequenz</b>                 | <b>Bezugsquelle</b> |
|---------------|--------------------------------|---------------------|
| HLA-A         |                                |                     |
| HLA-B         |                                |                     |
| HLA-C         |                                |                     |
| HLA-DRA       | Primer QuantiTect Primer Assay | Qiagen, Hilden      |
| HLA-DRB1      |                                |                     |
| HLA-DRB3      |                                |                     |
| HLA-DRB4      |                                |                     |
| HLA-DRB5      |                                |                     |
| GAPDH         |                                |                     |

### **2.1.9. Sonstiges Material**

|                        |                               |
|------------------------|-------------------------------|
| Immunoassay Test Kit   | MP Biomedicals, Orangenburg   |
| Human Cytokine 25-Plex | Biosource, Nivelles (Belgien) |

### 2.2. Methoden

#### 2.2.1. Gewebeproben

##### 2.2.1.1. Herkunft, Aufarbeitung und Lagerung der Gewebeproben und Patienteninformationen

Die Gewebeproben wurden in der Zeit von November 2004 bis November 2006 bei Tumornephrektomien entnommen und freundlicherweise mit dem Einverständnis der Patienten der urologischen Abteilung der Universitätsklinik Würzburg (Direktor Prof. Dr. H. Riedmiller) für diese Studie zur Verfügung gestellt. Mitarbeiter des Pathologischen Instituts des Klinikums diagnostizierten für alle Tumorgewebeproben das Vorliegen eines Nierenzellkarzinoms vom klarzelligen Typ. Aus datenschutzrechtlichen Gründen wurden die Namen der Patienten durch laufende Nummern ersetzt und nach der Robson Klassifikation von 1969 (Stadium I, n=27, 61,4%; Stadium II n=2, 4,5%; Stadium III n=8, 18,2%; Stadium IV n=7, 15,9%) bzw. nach *Grading* klassifiziert.

Von jedem Patienten wurde eine Probe des Nierenzellkarzinoms und des Normalparenchyms der tumortragenden Niere für Untersuchungen nach folgendem Schema asserviert: für die molekularbiologische Analyse und immunhistologische Untersuchung wurden die Präparate bis zur Verarbeitung in Gefrier Röhrchen und Tissue Tek Röhrchen bei -170°C in flüssigem Stickstoff gelagert; für die RNA Extraktion wurden Gewebeproben mit ca 1,7 ml RNA Stabilisator bei 4°C über Nacht gelagert und später bei -170°C in flüssigem Stickstoff eingefroren; für die Tumorzellanalyse wurden Tumorzellsuspensionen mittels Kollagenasebehandlung und eines Zellsiebes hergestellt und kryokonserviert.

##### 2.2.1.2. Isolierung von Serum und mononukleären Zellen aus dem Patientenblut

15 ml Lymphozyten-Isolierungsmedium wurden in ein 50 ml Falcon Röhrchen vorgelegt. 10 ml EDTA behandeltes Vollblut wurden mit 10 ml PBS gemischt. Dieses wurde vorsichtig mit einer Kanüle auf das Isolierungsmedium gegeben. Eine Durchmischung der Schichten war zu vermeiden. Anschließend schloss sich eine Zentrifugation bei 400g 10 min bei Raumtemperatur an. Der Rotor musste nach diesen 10 min ohne Bremse auslaufen, um eine Verwirbelung der Grenzschicht zu verhindern. Danach wurden mit einer Pasteurpipette das

Serum und die mononukleären Zellen, die sich als scharfe gelblich gefärbte Bande über dem Ficollkissen erkennen ließen, separat entnommen. Die Zellen wurden in frischen 50 ml Falcon-Röhrchen aufgenommen und mit RPMI Medium gewaschen. Es schloss sich eine weitere Zentrifugation von 10 min bei 400g an. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert, die Zellzahl bestimmt und der Waschschrift wiederholt. Schliesslich wurden die Zellen in Einfriermedium aufgenommen und bei -80 °C eingefroren.

### **2.2.2. Zellkultur**

#### **2.2.2.1. Zellzahlbestimmung**

Zur Bestimmung der Anzahl geernteter Zellen wurden die trypsinierten Zellen in 5 ml PBS oder Medium aufgenommen. Daraus wurde ein Aliquot von 10 µl entnommen und 90 µl Trypanblau dazu gegeben. 10 µl dieses Gemischs wurden auf eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und im Mikroskop 16 Felder ausgezählt. Die Gesamtzahl der geernteten Zellen errechnete sich mittels der Gleichung:  $Z$  (Anzahl der gezählten Zellen)  $\times 10^4$  (Neubauer-Zählkammerfaktor)  $\times 50$  (Verdünnungsfaktor).

#### **2.2.2.2. Kryokonservierung**

Vitale Zellen können in flüssigem Stickstoff bei -170°C aufbewahrt werden. Die Zellen wurden mit Einfriermedium (Kulturmedium mit 5% DMSO, Dimethylsulfoxid) eingefroren. DMSO verhindert die zu einer Zerstörung führende Ausbildung von Eiskristallen in den Zellen. Da DMSO allerdings auch zytotoxisch wirkt, müssten die Zellen möglichst schnell eingefroren, bzw. aufgetaut werden. Die Zellen wurden trypsiniert und 10 min lang bei 400g sedimentiert. Anschließend wurden sie in Einfriermedium aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Zum schnellen Einfrieren mit gleichmäßiger Temperaturabsenkung wurden mit Isopropanol gefüllte Einfrierboxen verwendet. Sie sind so konstruiert, dass sie bei einer Lagerung von -80°C 1°C pro Minute abkühlen. Nach 12 bis 24 Stunden bei -80°C wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

#### **2.2.2.3. Auftauevorgang**

Das aufzutauende Kryoröhrchen wurde aus dem Stickstoff entnommen und sofort in ein 37°C

Wasserbad überführt. Sobald sich die Zellen von der inneren Wand des *Kryotubes* ablösen (1 - 1,5 min), wurden sie in ein steriles 50 ml-Falconröhrchen mit 40 ml kalten Medium überführt. Nach einer 5 minütigen Zentrifugation bei 400g wurde das Medium abgenommen, das Zellpellet in 6 ml angewärmtes Mediums resuspendiert und in eine T25-Kulturschale überführt.

### **2.2.2.4. Cytospins**

Die Zellsuspension wurde nach dem Auftauen oder Trypsinieren im Vollmedium gewaschen, 10 min bei 311g abzentrifugiert und mittels einer Neubauerkammer auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^5$  Zellen pro ml eingestellt. In jede Cytospinskammer wurden 50  $\mu$ l Zellsuspension gegeben und 1 min lang zentrifugiert. Die Objektträger wurden unter dem Mikroskop kontrolliert und trockneten 2 Stunden lang bei Raumtemperatur.

### **2.2.2.5. Negativ-Isolierung von CD4+ bzw. CD8+T-Zellen mittels Dynabeads**

Dynabeads sind uniforme, superparamagnetische monodisperse, polymere Polystyren-Beads mit einem Durchmesser von 4,5  $\mu$ m. Beads können zur Isolierung beliebiger Zellpopulationen mittels Negativ- bzw. Positiv-Isolierung verwendet werden. Bei der angewandten Negativ-Isolierung wurde durch Entfernen der ungewünschten CD4- bzw. CD8- positiven T-Zellen eine mononukleäre Zellsuspension gewonnen. Die Prozedur wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Dafür wurden die anti-humanen CD4- bzw. CD8- Antikörper (in der Proportion 1  $\mu$ g Antikörper zu  $10^6$  Zellen) zur Zellsuspension gegeben. In einem zweiten Schritt wurde die Dynabeads hinzugegeben und banden an die antikörpergebundenen Zellen. Die Bead-umhüllten Zellen wurden mittels eines Magneten separiert und verworfen. Die gewonnene Zellsuspension wurde im ELISPOT angesetzt.

## **2.2.3. Immunfluoreszenz und Immunhistologie**

### **2.2.3.1. Indirekte Immunfluoreszenz**

Die Cytospins und Gewebeschnitte aus dem Gefrierschrank bei  $-20^\circ\text{C}$  wurden in vorgekühltem Aceton 10 min fixiert. Als nächstes wurden sie für 30 min luftgetrocknet,

beschriftet und dreimal je 5 min in Tris-NaCl-Puffer (pH 7,4) gespült. Anschließend wurde 100 µl für 15 min lang verdünntes Antikörper-Diluent auf die Objektträger aufgetragen. Danach wurden die Zellen mit den unkonjugierten Primäantikörpern markiert.

Als Antikörperkombinationen wurden CD4/TNFR I, CD8/TNFR I, CD4/TNFR II, CD8/TNFR II, IL-2, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , CD4/CD25, CD8/CD28, p33ING1/MHC Klasse I, p29ING4/MHC Klasse I, p33ING1/MHC Klasse II, p29ING1/MHC Klasse II verwendet. Nach der Inkubation der Objektträger mit 100 µl Primäantikörper (über Nacht bei 4°C) wurden diese dreimal je 5 min gewaschen. Die weiteren Schritte fanden im Dunklen statt. Dabei wurden 100 µl Cy3 oder FITC-konjugierter Sekundäantikörper, 1:200 verdünnt, für 30 min bei Raumtemperatur aufgetragen. Nach dem Waschen wurde Maus-Serum, 1:20 verdünnt, in Tris-Puffer für 60 min bei Raumtemperatur auf die Objektträger aufgetragen. Daraufhin wurde nach dem Waschen, der Cy3 oder ein FITC-konjugierte zweite Primäantikörper 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger gewaschen und mit Fluoreszenz-Eindeckmittel eingedeckt. Die nachfolgende Auswertung fand an einem Fluoreszenzmikroskop statt.

Die Färbung wurde in sechs individuellen Magnetfeldern bei 400 facher Vergrößerung in einem *Vier-Skalen-System* analysiert. Eine intensive Färbung in mehr als 50% der Zellen wurde mit +++ bezeichnet, Färbungen bei geringeren Zell-Verhältnissen (10-50%) mit ++; schwach oder leicht braun/rote Membran- oder Zytoplasmafärbungen in wenigen Zellen (< 10%) wurden als + aufgeführt, nicht gefärbte wurden schließlich mit 0 gekennzeichnet.

### **2.2.3.2. Immunhistologische Einzelfärbung**

Um die zellulären Proteine p33ING1b, p29ING4 und p53 sichtbar zu machen, wurde eine Einzelfärbemethode durchgeführt. Dazu wurde eine repräsentative Biopsie einer Tumorprobe mit umgebendem Nierenparenchym verwendet. Das Prinzip bestand darin, dass ein spezifischer aber unkonjugierter Primär-Antikörper (AK) an das Gewebe bindet, welcher in einem nächsten Schritt von einem HRP-konjugierten Sekundäantikörper gebunden und sichtbar gemacht wird.

Im ersten Schritt wurden die Gefrierschnitte 10 min in Aceton fixiert und anschließend weitere 10 min luftgetrocknet. Nach Waschen des Gewebes in Tris-NaCl-Puffer wurde der unkonjugierte Primär-AK zugefügt und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer oder 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein erneuter Waschschrift mit Tris-NaCl-

Puffer und anschließend die Applikation des HRP-konjugierten Sekundärantikörpers, welcher für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Dieser Antikörperkomplex wurde nun mit einem Chromogen, Liquid DAB (Diaminobenzidin), der sich auf dem Gewebe in einem „bräunlichen“ Farbton darstellt, sichtbar gemacht. Es folgte ein erneuter Waschschriff mit Tris-NaCl-Puffer. Abschließend wurde eine Gegenfärbung mit Hämalaun durchgeführt und der Gewebeschnitt mit Glycerol eingedeckt.

### **2.2.3.3. Immunhistologische Doppelfärbung**

CD4/CD25, CD4/CTLA-4 und CD4/Foxp3 Koexpression, bzw. die simultane Markierung von CD4 positiven und CD8 positiven infiltrierenden Lymphozyten wurde mittels Gebrauchs einer sequentiellen HRP/AP-, bzw. HRP/HRP-immunenzymatischen Doppelfärbung analysiert. Serielle Kryostat Gewebeabschnitte (5µm) und Cytospins wurden 10 min in Aceton fixiert, dann getrocknet und anschließend mit 0,3% Peroxidase 5 min geblockt. Die Zellen, bzw. die Gewebeschnitte wurden mit dem Primärantikörper oder Kontrollantikörper (über Nacht bei 4°C) inkubiert und nach einem Waschschriff mit HRP-konjugiertem Sekundärantikörper 20 min bei 37 °C inkubiert. Hernach erfolgte der Substratumsatz von DAB (Diaminobenzidin) oder Nova Red für max. 10 min. Die gebundenen Antikörper wurden während des ersten Färbeschritts unter Verwendung von En Vision K1395 Doppelfärbeblock nach Herstellerangaben geblockt. Die Objektträger wurden sodann mit dem zweiten Primärantikörper (über Nacht bei 4°C) inkubiert; nach einem Waschschriff folgte die Inkubation mit dem AP-konjugierten oder HRP-konjugierten Sekundärantikörper 20 min bei 37 °C und anschließend der Substratumsatz von Fast Red für max. 30 min, bzw. von Co-DAB für max. 10 min. Die Gegenfärbung wurde hernach mit Hämalaun für 1 min durchgeführt. Alle Inkubationen erfolgten in einer feuchten Kammer. Die Objektträger wurden mit Glycergel eingedeckt und unter einem Nikon Eclipse TE 300 Mikroskop analysiert.

### **2.2.4. ELISPOT**

Die Lymphozyten eines jeden Patienten wurden auf ihre Produktion an IFN- $\gamma$  (typisches Zytokin für eine Th1-Antwort) hin überprüft. Dazu wurden 54 Peptide von wt p33ING1b und 48 Peptide von wt p29ING4 (volle Länge) als 15-mer mit überlappenden 5 Aminosäuren synthetisiert und in 6 pools für p33ING1b und 5 Pools für p29ING4 geteilt. 96-Well Platten

wurden verwendet. Sie wurden zuerst über Nacht bei 4°C mit 100 µl/Well eines humanen IFN-γ Elispot Capture Antikörpers (gelöst bis auf Endkonzentration von 5 µg/ml in PBS) bzw. eines humanen IL-10 Elispot Capture Antikörpers mit gleicher Verdünnung inkubiert. Danach wurde der Überstand verworfen und 3x mit PBS (200 µl/Well) gewaschen. Die Platten wurden anschließend mit 200 µl/Well Blocking-Solution 1 Stunde bei Raumtemperatur geblockt und die entsprechenden Komponenten nach dem in Tabelle 2.3. aufgeführten Muster hinzugefügt, wobei PHA als stimulierende Substanz und somit Positivkontrolle und MNZ mit RPMI als Negativkontrolle verwendet wurden. Die ersten 2 Tage wurde komplett unter sterilen Bedingungen gearbeitet.

**Tabelle 2.3. Schema der IFN-γ Elispotanalyse jedes Patienten.**

| <b>Schema der Analyse</b>       |                                 |
|---------------------------------|---------------------------------|
| <b>p33ING1b Peptide</b>         | <b>p29ING4 Peptide</b>          |
| Negativkontrolle (MNZ mit RPMI) | Negativkontrolle (MNZ mit RPMI) |
| Positivkontrolle (MNZ mit PHA)  | Positivkontrolle (MNZ mit PHA)  |
| MNZ mit Peptidpool 1            | MNZ mit Peptidpool 1            |
| MNZ mit Peptidpool 2            | MNZ mit Peptidpool 2            |
| MNZ mit Peptidpool 3            | MNZ mit Peptidpool 3            |
| MNZ mit Peptidpool 5            | MNZ mit Peptidpool 5            |
| MNZ mit Peptidpool 4            | MNZ mit Peptidpool 4            |
| MNZ mit Peptidpool 6            | Blank (RPMI)                    |
| Blank (RPMI)                    |                                 |

MNZ, Mononukleäre Zellen

**Tabelle 2.4. Stimulatoren in IFN-γ Elispotanalyse jedes Patienten**

| <b>Bezeichnung<br/>der ELISPOT Analyse</b>               | <b>Stimulatoren</b>  |  |
|--|--|--|
|  | <b>ING1b Peptidpools</b>   | <b>ING4 Peptidpools</b>  |
| Stimulation mit Peptidpools<br>voller Länge des Proteins | Peptidpool 1 <i>aa 1-58</i><br>Peptidpool 2 <i>aa 59-108</i><br>Peptidpool 3 <i>aa 109-158</i><br>Peptidpool 4 <i>aa 159-208</i><br>Peptidpool 5 <i>aa 209-268</i><br>Peptidpool 6 <i>aa 269-273</i> | Peptidpool 1 <i>aa 1-58</i><br>Peptidpool 2 <i>aa 59-108</i><br>Peptidpool 3 <i>aa 109-158</i><br>Peptidpool 4 <i>aa 159-208</i><br>Peptidpool 5 <i>aa 209-248</i> |
| Stimulation mit einzelnen<br>Peptidpools                 | Peptidpool 3 <i>aa 109-158</i><br>Peptidpool 6 <i>aa 269-273</i>   | Peptidpool 3 <i>aa 109-158</i><br>Peptidpool 5 <i>aa 209-248</i>   |

|   |   |  |
|---|---|--|
| Stimulation mit einzelnen Peptidpools nach CD4+ oder CD8+ Depletion | Peptidpool 3 <i>aa 109-158</i><br>Peptidpool 6 <i>aa 269-273</i>  | Peptidpool 3 <i>aa 109-158</i><br>Peptidpool 5 <i>aa 209-248</i>   |
| Stimulation mit einzelnen Sequenzen                                 | <i>aa 109-118</i><br><i>aa 119-128</i><br><i>aa 129-138</i><br><i>aa 139-148</i><br><i>aa 149-158</i><br><i>aa 259-268</i><br><i>aa 269-273</i> | <i>aa 109-118</i><br><i>aa 119-128</i><br><i>aa 129-138</i><br><i>aa 139-148</i><br><i>aa 209-218</i><br><i>aa 219-228</i><br><i>aa 229-238</i><br><i>aa 239-248</i> |

Die Zellzahl der MNZ pro Well betrug  $5 \times 10^5$  Zellen. Die Menge an humanem p33ING1 (6 Pools) und p29ING4 (5 Pools) Peptiden betrug 10  $\mu$ l/well (Konzentration 1 mg/ml). Anschließend wurde PHA in einem Volumen von 5  $\mu$ l/well in einer Konzentration von 1 mg/ml hinzugegeben. Für die Messung von IFN- $\gamma$  wurden die Zellen 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gelagert, im Falle von IL-10 dauerte die Inkubation 48 Stunden. Anschließend wurden die Platten mit PBS und PBS-Tween (200  $\mu$ l/Well) dreimal gewaschen und der sekundäre biotinylierte anti-human IFN- $\gamma$  bzw. IL-10 Elispot Detektionsantikörper (gelöst bis auf 2  $\mu$ g/ml in PBS-Tween-1%BSA) bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween (200  $\mu$ l/Well) wurde Streptavidin-HRP (Stock-Konzentration 0,5 mg/ml 1:2000 verdünnt) hinzugegeben, die Platten 1 Stunde inkubiert und danach 3x mit PBS-Tween (200  $\mu$ l/Well) gewaschen. Schließlich wurden 400  $\mu$ l AEC und 100 ml DMF plus 12 ml AEC Puffer addiert und über einen 0,45  $\mu$ m Filter filtriert, danach wurde 6  $\mu$ l 30%-iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hinzugefügt; 200  $\mu$ l/Well einer frisch angesetzter Substratlösung wurde in die Wells verteilt, die Platten mit Alufolie abgedeckt und nach 20 bis 40 min die Entwicklung gestoppt. Der Überstand wurde verworfen, unter fließendem Wasser gründlich gewaschen, bei Raumtemperatur trocknen gelagert und abschließend im Elispot Reader (ELISA Spot Image Analyzer, Fa. CTL, Cleveland, Ohio, USA) ausgewertet.

### 2.2.5. Luminex

Die Untersuchung der Zytokinkonzentrationen wurde im LUMINEX anhand „Cytokine 8-Plex“ und „Cytokine 25-Plex“ Biosource Kits durchgeführt. Sowohl in den aus den präoperativen und postoperativen Blutproben von 73 Patienten mit einem Nierenzellkarzinom und 10 gesunden Probanden gewonnenen Seren als auch in den IFN- $\gamma$  ELISPOT Überständen



wurden folgende Zytokine bestimmt: IL-2 und sein Rezeptor IL-2R, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-13, IL-15, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  R I und TNF- $\alpha$  R II.

Die Luminex-Platten wurden vorbereitet, indem jedes Well mit 180  $\mu$ l Waschpuffer gefüllt wurde, um den Filterboden zu befeuchten. Anschließend wurde ein Vakuum angelegt und der Waschpuffer abgesaugt. Die Vorbereitung der Standards wurde nach folgendem Schema durchgeführt: für die Herstellung von Standard 1 wurde die Standardstocklösung mit Assay Diluent in einem 15-ml Falcon Röhrchen gelöst und 10 min bei RT inkubiert. Für die Herstellung weiterer Standards wurden in die Wells für 2, 3, 4, 5, 6, 7 und Blank 8 - 300 $\mu$ l Assay Diluent vorgelegt und von 1 zu 2, von 2 zu 3, usw., 150  $\mu$ l der Standardlösung überführt. Dabei entstand eine Standardreihe mit einem Verdünnungsfaktor von 3. In jedes Well wurden 25  $\mu$ l mit Antikörper beschichteten Beads gegeben, geschüttelt und 2 Mal, wie oben beschrieben, gewaschen. Danach wurden 50  $\mu$ l Inkubations-Puffer, 50  $\mu$ l Assay Diluent und 50  $\mu$ l der zu analysierenden Probe in die Proben-Wells, bzw. 100  $\mu$ l Assay Diluent in die Blank-Wells, und 100  $\mu$ l des Standards 1 bis 7 in die Standard-Wells gegeben. Es erfolgte die Inkubation in Dunkelheit für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Nach zweimaligem Waschen wurden 100  $\mu$ l verdünnter, biotinylierter Antikörper (2 x biotinylierter Antikörper-Caps + 8 ml Biotin Diluent) pro well dazugegeben und 1 Stunde in Dunkelheit bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Die Streptavidinverdünnung wurde vorbereitet, indem man 1 ml Streptavidin zu 9 ml Streptavidin RPE Diluent in ein lichtgeschütztes Röhrchen pipettierte. Nach zweimaligem Waschen wurden 100  $\mu$ l Streptavidin Gemisch pro well hinzugegeben und 30 min in Dunkelheit bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen, unter Zugabe von 100  $\mu$ l Waschpuffer, wurden die Platten in das Lesegerät „Luminex 100“ (Gurce Nivelles, Belgium) eingelegt und gemessen.

### **2.2.6. Genexpressionsanalyse**

#### **2.2.6.1. RNA Extraktion**

Die RNA wurde mit Hilfe des RNA Extraktions Kits (Qiagen, Hilden, Germany) aus homogenisiertem Tumorgewebe extrahiert, in DEPC-75%-iger Ethanollösung gewaschen und anschließend bei -70°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Die Menge der RNA wurde bestimmt, indem die Absorption bei 260nm gemessen wurde. Die Ratio 260:280 wurde

innerhalb des 1,8-2,0 Bereiches festgelegt; eine Kontamination der RNA mit Proteinen konnte damit verhindert werden.

### **2.2.6.2. Herstellung der cDNA (*reverse* Transkription)**

Die komplementäre DNA (cDNA) wurde mittels des iScript™cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, München) hergestellt: zu jeweils 45 µl Lösung mit 3 µg jeder RNA im nukleasefreien dest. H<sub>2</sub>O, wurden 12 µl des 5x iScript Reaction Mix und 3 µl der iScript Reversen Transcriptase hinzugegeben. Das ergab ein Volumen von 60 µl je Probe. Im iCycler (Bio-Rad, München) erfolgte die reverse Transkription der mRNA zu cDNA nach folgendem Transkriptionsprotokoll: 5 min bei 25°C, 30 min bei 42°C und 5 min bei 85°C. Nach Abschluß der Reaktion wurde die Temperatur auf 4°C gehalten. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

### **2.2.6.3. Real Time PCR**

Mittels der PCR sollte die in den Nierenzellkarzinomproben exprimierte mRNA von p33ING1b, p29ING4, p53, CD4, CD8, CD25, CD56, IL10, IFN- $\gamma$ , Foxp3 und CTLA4 analysiert werden. Für HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRA, HLA-DRB1, HLA-DRB3, HLA-DRB4, HLA-DRB5 wurde der QuantiTect Primer Assay angewandt. Die RNA wurde wie oben beschrieben extrahiert. cDNA wurde unter Anwendung von 3 µg hitzedenaturierter RNA präpariert. Die Primer wurden unter Anwendung der Primer Express Software für Primerdesign erstellt, um kurze Amplifikate von 100-200 Basenpaaren der vorgegebenen cDNA zu produzieren. Die quantitative Real Time PCR wurde unter Anwendung von 11,5 µl LightCycler-DNA Master SYBR Green I mix (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) mit 2 µl cDNA (50 ng/µl), 0,3 µM Forward Primer und 0,3 µM Reverse Primer zu einem Gesamtreaktionsvolumen von 23 µl durchgeführt. Der PCR-Zyklus bestand aus fünfzehnminütiger Initialdenaturation bei 95°C, gefolgt von 40 Zyklen fünfzehnsekündiger Denaturationen bei 95°C, einem dreißigsekündigen *Annealing* bei 55-61°C und einer dreisekündigen Extension bei 72°C. Genspezifische Produkte wurden kontinuierlich mit Hilfe des ABI Prism 7700-Sequenzdetektors (Applied Biosystems, Foster City) gemessen und die relative Quantität kalkuliert. Alle Muster wurden in Duplikaten ausgeführt. Eine Quantifizierung während der Datenanalyse erfolgte durch den Farbstoff SYBR Green. Die für die einzelnen Genprodukte gemessenen Amplifikationskurven wurden graphisch dargestellt und in Relation zur Kurve des Kontrollgens ausgewertet. Um die Zielvorlage mengenmäßig

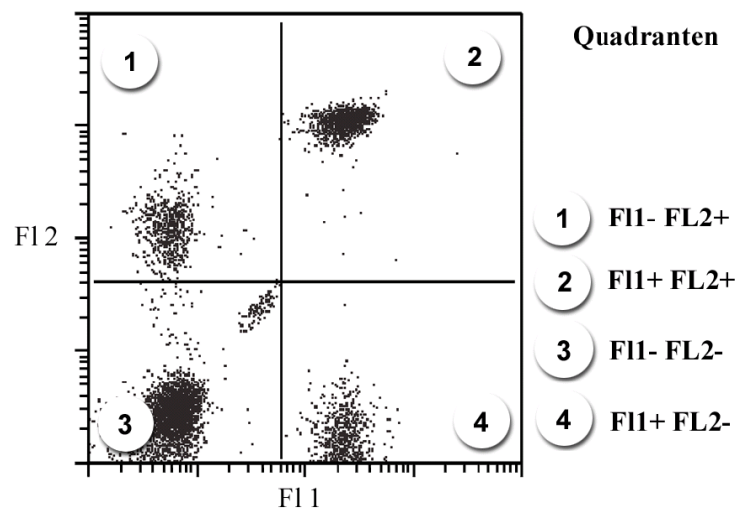
zu bestimmen, wurde der durchschnittliche CT-Wert (Schwellenzyklus), also die Anzahl der Zyklen, innerhalb derer die Fluoreszenz des Reporters eine fixierte Schwelle oberhalb der Basiswerte erreicht, bemessen. Dann wurde die Differenz ( $\Delta CT$ ) zwischen den durchschnittlichen CT-Werten der Muster in den vorgegebenen Wells und denen des *housekeeping* Gens, GAPDH und dann die Differenz ( $\Delta\Delta CT$ ) zwischen den durchschnittlichen  $\Delta CT$ -Werten der Muster für jedes Zielgen und der  $\Delta CT$ -Wert des Kontrollmusters für dieses Zielgen errechnet. Dieser relative Quantifizierungswert, die Menge, wird als  $2^{-\Delta\Delta CT}$  ausgedrückt.

### 2.2.6.4. Agarosegelelektrophorese

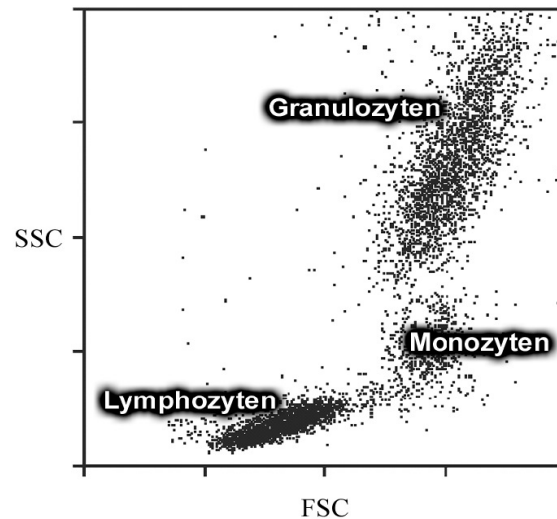
Die Analyse von PCR-Fragmenten erfolgte in einem 2,0%igen (w/v) Agarosegel in einer Horizontalelektrophorese. Je nach Gelgröße und gewünschter Agarosekonzentration wurde die notwendige Menge des Agarosepulvers in einem Erlenmeyerkolben gewogen und das entsprechende Volumen an 1x TBE-Puffer hinzugefügt. Um die Agarose in Lösung zu bringen, musste der Gelansatz in der Mikrowelle mehrmals aufgekocht werden. Zu der heißen Gellösung wurde eine Ethidiumbromidlösung bis auf eine Konzentration von 0,5 mg/ml im Gel zugefügt. Die gewünschte Gelform wurde an den offenen Seiten mit Klebeband verschlossen und je nach gewünschter Trennstrecke ein oder zwei Taschenformer in der Gelform plaziert. Mit einer Wasserwaage wurde die Form ausgerichtet. Die etwas erkaltete Agaroselösung wurde in die vorbereitete Gelform gegossen. Das angefertigte Agarosegel wurde in die Elektrophoreseapparatur gelegt. Diese wurde so mit 1x TBE-Puffer gefüllt, bis das Gel komplett bedeckt war. Die zu applizierenden Proben wurden mit 5x Gelbeladungspuffer versetzt, so dass daraus eine einfache Pufferkonzentration resultierte. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurde die Probe gemixt und in die geformten Taschen des Gels gefüllt. Das aufgetragene Probenvolumen lag bei etwa 13  $\mu$ l. Zur Bestimmung der Länge der Fragmente wurde ein Längenstandard verwendet. Während der Elektrophorese war anhand der Farbstoffe Bromphenolblau des Gelbeladungspuffers die zurückgelegte Strecke zu beobachten. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 90 V für 4 - 5 Stunden durchgeführt.

### 2.2.7. Durchflusszytometrie (*Fluorescence activated cell sorting, FACS*)

Dieses Verfahren dient der Analyse von Einzelzellsuspensionen nach ihrer Markierung mit spezifischen Farbstoffen unter Nutzung von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Die in der Lösung befindlichen, mit Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörpern markierten Zellen werden hierfür im System über eine Kapillare einzeln in einem feinen Flüssigkeitsstrahl an einem Laserfenster als Lichtquelle vorbeigeleitet. Die Lichtstreuung in Vorwärtsrichtung (FSC, *forward light scatter*) gilt als Maß für die Zellgröße. Das im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl abgelenkte Seitwärtsstreulicht (SSC, *side scatter*) wird vor allem durch die intrazellulären Bestandteile beeinflusst. Die Fluoreszenz der Zellen ist Ausdruck ihrer Interaktion mit den spezifischen Antikörpern. Während der Passage wird jede einzelne Zelle angeregt, analysiert, und die Messdaten werden zur statistischen Aufarbeitung im Computer gespeichert. Die grafisch orientierte Datenanalyse bietet verschiedene Formen der visuellen Präsentation der Ergebnisse. Es besteht die Möglichkeit, durch die Festlegung bekannter Grenzwerte der Streulichteigenschaften nur die Zellen herauszufiltern (FSC/SSC), die einer bestimmten Zellpopulation zugeordnet werden können (z. B. Lymphozyten).



**Abbildung 2.1. Beispiel für ein "Zwei-Parameter Dot-plot".** Die Fluoreszenzintensität (FL)-1 wird auf der x-Achse und die Fluoreszenzintensität für FL-2 auf der y-Achse aufgetragen. Gezeigt wird der Schnittpunkt beider Kanäle als Punkt. Die gekreuzten Linien markieren Grenzen für die Unterteilung negativ (Eigenfluoreszenz) und positiv.



**Abbildung 2.2. Beispiel für ein “Zwei-Parameter Dot-plot”.** Dargestellt sind Leukozyten des peripheren Blutes. Der Parameter Zellgröße (FSC) jeder gemessenen Zelle wird auf der x-Achse und der Parameter Lichtstreuung (SSC) auf der y-Achse aufgetragen. Gezeigt wird der Schnittpunkt beider Kanäle als Punkt.

Die extrazelluläre Antikörperfärbung wurde nach folgendem Protokoll ausgeführt. Die Zellen wurden nach dem Auftauen mit dem PBS gewaschen. Alle Waschschrte mit anschließender Zentrifugation wurden zwei Mal ausgeführt. Ig Fc Rezeptoren wurden blockiert, indem die Zellen (bis zu  $10^6$  Zellen in 100  $\mu$ l PBS) mit 5  $\mu$ g IgG1 bei 4°C 20 min inkubiert wurden. Für die Blockierung zellulären Biotins wurde Avidin-Lösung 10 min zu den Zellen zugegeben und anschließend gewaschen. Es folgte eine 10-minütige Inkubation mit Biotin-Lösung und zwei Waschschrte. Danach wurden biotinylierte anti-ING1b und anti-ING4 für 1 Stunde bei Raumtemperatur zugegeben. Zellen wurden in PBS gewaschen und 15 min in Dunkelheit mit Streptavidin-PE (10  $\mu$ l pro  $10^6$  Zellen) inkubiert. Nach dem Waschen wurden sie in 100  $\mu$ l PBS aufgenommen und mit 10  $\mu$ l CD3-ECD 10 min in Dunkelheit inkubiert. Als Negativkontrolle diente die Färbung mit biotinyliertem IgG1.

### 2.2.8. Statistische Analysen

Signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen NZK-Patientengruppen wurden mit dem Fisher’s Exact Test durchgeführt; signifikante Altersunterschiede bei der NZK-Diagnose wurden mit dem nicht verbundenen Zweistichprobentest vorgenommen, wobei die Computersoftware GraphPad InStat angewandt wurde. Das Signifikanzniveau wurde bei 5% festgesetzt, d.h. ein Ergebnis war signifikant wenn der p-Wert kleiner als 0,05 war.