

## II Material und Methoden

### II.1 Geräte, Material und Chemikalien

#### II.1.1 Geräte

Durchlichtmikroskop	Leica, Wetzlar
Durchflusszytometer, FACSCalibur	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Durchflusszytometer, LSRII	BD Biosciences
ELISA-Reader (Mikrotiterplattenphotometer)	Dynatech Laboratories, Chantilly, VA, USA
ELISA Washer	Tecan, Crailsheim; Groedig, Österreich
Fluoreszenzmikroskop, DMR	Leitz, Wetzlar
Konfokales Mikroskop, LSM 510	Carl Zeiss, Jena
Laborzentrifuge	Heraeus, Hanau
MACS-Magneten + MACS-LS-Säulen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Vibrator, Leica VT1000S	Leitz, Wetzlar

#### II.1.2 Material und Chemikalien

Alle nicht näher aufgeführten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: AppliChem GmbH (Darmstadt), Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Merck AG (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Steriles Plastikeinwegmaterial wurde von den Firmen Greiner GmbH (Frickenhausen), Nunc (Roskilde, Dänemark) oder Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

#### II.2 Verwendete Tiere

BALB/c:	Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin
C57BL/6:	“
BALB/c ICOS-KO:	“
BALB/c DO11.10:	“
BALB/c DO11.10 ICOS-KO:	“

Alle Tiere stammten aus einer SPF-Zucht und wurden kurzzeitig in einem konventionellen Tierstall des Robert Koch-Institutes gehalten. Die Mäuse waren bei Verwendung 6 bis 12 Wochen alt.

### II.3 Puffer, Medien und Lösungen

Angegeben sind hier die Puffer und Medien, die in den verschiedenen Methoden verwendet wurden. Alle speziellen Puffer werden bei der jeweiligen Methode beschrieben.

PBS:	136,89 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 1,47 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 8,05 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7,3
FACS-PBS:	PBS + 2,5% fötales Kälberserum (FCS, Biochrom AG, Berlin) + 0,1 % NaN <sub>3</sub>
iFACS-PBS:	FACS-PBS + 0,5 % Saponin
MACS-PBS:	PBS + 2 mM EDTA + 0,5 % BSA
Erythrozyten-Lyse- Lösung:	185 mM NH <sub>4</sub> Cl, 17 mM Tris-HCl, pH 7,2
Trypsin/EDTA:	PBS, 0,1 % Trypsin (Invitrogen, Karlsruhe), 0,67 mM EDTA

#### II.3.1 Zellkulturmedien

*Für primäre murine Zellen:*

Zellkulturmedium RPMI 1640 (Biochrom AG) mit den Zusätzen:

10 % FCS (Biochrom AG)

2 mM Glutamin (Invitrogen, Gaithersburg, USA)

100 µg/ml Penicillin/ Streptomycin (Invitrogen)

1 mM Natrium-Pyruvat (Invitrogen)

1 mM nicht-essentielle Aminosäuren (Invitrogen)

50 µM β-Mercaptoethanol

Im Folgenden „R10F<sup>+</sup>“ genannt

*Für NIH 3T3 und BALB/3T12-3 Zellen:*

Zellkulturmedium DMEM (Biochrom AG)

4,5 g/l D-Glucose

2 mM L-Glutamin (Biochrom AG)

10 % Neugeborenen-Kälberserum (NCS, Biochrom AG)

100 µg/ml Penicillin/ Streptomycin (Gibco/Invitrogen)

Im Folgenden 3T3/12 Medium genannt.

*Für primäre Murine Embryonale Fibroblasten (MEF):*

Zellkulturmedium DMEM mit 4,5 g/l D-Glucose und

2 mM L-Glutamin (Biochrom AG)

10 % FCS (Biochrom AG)

100 µg/ml Penicillin/ Streptomycin (Invitrogen)

Fortan „MEF-DMEM“ genannt

### **II.4 Zellbiologische Methoden**

#### **II.4.1 Aufreinigung muriner Milzzellen**

Milzen wurden entnommen und mit dem Stempel einer 2 ml Spritze (Braun, Melsungen) durch ein 212 µm Metallsieb in PBS gedrückt. Danach wurde die Zellsuspension zentrifugiert (380×g, 8 min, 4°C). Für die Lyse der Erythrozyten wurde das Zellpellet in 5 ml Erythrozyten-Lyse Lösung resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Danach wurde einmal mit PBS gewaschen. Je nach Anwendung wurden die Splenozyten in MACS-PBS, FACS-PBS oder Zellkulturmedium aufgenommen und gezählt.

#### **II.4.2 Aufreinigung muriner Speicheldrüsenzellen**

Speicheldrüsen wurden entnommen, in PBS aufgenommen und assoziierte Lymphknoten unter dem Stereomikroskop sorgfältig entfernt. Die Speicheldrüsen wurden in 50 ml Röhrchen mit 5 ml RPMI 1640 überführt und es wurden 2% fötales Rinderserum (mit wenig Endotoxin, Biochrom), 500 µg/ml Kollagenase D (Roche, Mannheim) und 20 µg/ml DNase I (Roche) zugegeben. Danach wurden die Zellen in einem Schüttelwasserbad inkubiert (25 min, 37°C). Für weitere 5 min wurde 10 mM EDTA zugegeben. Dann wurden die Speicheldrüsenstücke durch ein Zellsieb (Falcon) mit einem Porendurchmesser von 70 µm gedrückt. Anschließend wurde mit MACS-PBS gewaschen und zentrifugiert (380×g, 8 min, 4°C). Dann wurden die Zellen in FACS-PBS aufgenommen und durchflusszytometrisch untersucht.

#### **II.4.3 Reinigung von Zellen durch MACS**

Die MACS-Technik ermöglicht es, Zellen aufgrund ihrer Oberflächenmarker zu sortieren. Dafür wurden heterogene Zellpopulationen mit an superparamagnetische Partikel (*beads*, Durchmesser ca. 100 nm) gekoppelten

Antikörpern inkubiert und die Zellen, die Antikörper gebunden haben, mit einem starken Magneten heraussortiert (Miltenyi *et al.*, 1990). Die Zellsuspension wurde entsprechend den Herstellerangaben (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) mit den antikörpergekoppelten magnetischen Partikeln inkubiert. Die Markierung von  $200 \times 10^6$  Zellen erfolgte in einem Endvolumen von 1000  $\mu$ l MACS-PBS mit 1x Fc-Block (Kap. II.5.1). Die Konzentration der *beads* wurde je nach Ziel der Sortierung variiert.

In den Tabellen sind alle verwendeten Antikörper-Konjugate und *bead*-Konzentrationen zusammengestellt. Es wurden auch biotinmarkierte Primärantikörper verwendet, die mit anti-Biotin-*beads* sortiert wurden. Nach dem Waschen wurden die Zellen über eine magnetisierbare Säule (LS-Säule, Miltenyi Biotec) innerhalb eines Magneten gegeben, sodass markierte Zellen in der Säule verblieben und unmarkierte Zellen im Durchlauf aufgefangen werden konnten. Nach drei Waschschritten (3x3 ml MACS-PBS) zur Entfernung unspezifisch gebundener Zellen wurde die Säule aus dem Magneten entfernt und die gebundenen Zellen mit 5 ml MACS-PBS eluiert. Die Reinheit der sortierten Populationen wurde in der Durchflusszytometrie überprüft.

<b>Sortierung</b>	<b>Antikörper-gekoppelte magnetische Partikel (<i>beads</i>)</b>	<b>Klon</b>	<b><i>Bead</i>-Konzentration</b>
Dendritische Zellen (Positiv-Sort)	anti-CD11c- <i>beads</i>	N418	1:10 (95 % Reinheit) oder 1:20 (Anreicherung 80 %)
CD4 T-Zellen (Positiv-Sort)	anti-CD4- <i>beads</i>	GK1.5	1:15
B-Zellen (Depletion)	anti-CD19-Biotin + anti-Biotin- <i>beads</i>	1D3	1:15
NK-Zellen (Depletion)	anti-CD49b-Biotin + anti-Biotin- <i>beads</i>	DX5	1:15
T-Zellen (Depletion)	anti-CD3-Biotin + anti-Biotin- <i>beads</i>	KT3	1:15

**Tab. 2: Übersicht der MACS-Sortierung**

### II.4.4 Gewinnung von Dendritischen Zellen aus der Milz

Die Reinigung von Dendritischen Zellen aus der Milz erfolgte durch einen Kollagenase-DNase-Verdau, einen Nycodenz-Gradienten (Shortman *et al.*, 1968, Mc Lellan *et al.*, 2002). Zehn Milzen wurden in ca. 1 bis 2 mm große Stücke zerschnitten und in ein 50 ml Röhrchen mit 10 ml RPMI 1640 überführt. Für den Verdau wurden 2% FCS (mit wenig Endotoxin, Biochrom), 500 µg/ml Kollagenase D (Roche, Mannheim) und 20 µg/ml DNase I (Roche) zugegeben. Der Verdau erfolgte in einem Schüttelwasserbad (25 min, 37°C). Für weitere 5 min wurde 10 mM EDTA zugegeben. Dann wurden die Milzstücke durch ein Zellsieb (Falcon) mit einem Durchmesser von 70 µm gedrückt. Anschließend wurde mit MACS-PBS gewaschen und zentrifugiert (380×g, 8 min, 4°C). Die Zellen wurden in 5 ml MACS-PBS resuspendiert und mit 20 ml Nycodenz-Lösung unterschichtet. Danach wurde zentrifugiert (764×g, 20 min, 4°C, keine Bremse). Nach Ausbildung des Gradienten wurden alle Zellen der Interphase abgenommen und mit 80 ml MACS-PBS gewaschen. Die weitere Anreicherung von CD11c-positiven Zellen erfolgte ggf. durch magnetische Sortierung mit anti-CD11c-*beads* (Kap. II.4.3).

Nycodenz-Lösung: 1,096 g/ml, hergestellt aus 2,5 ml MACS-PBS + 17,5 ml NycoPrep 1,077 g/ml (Axis-shield, Oslo, Norwegen)

### II.4.5 Isolierung embryonaler Fibroblasten der Maus

Die Embryonen von C57BL/6-Mäusen wurden am Tag 16 bis 17 nach Befruchtung entnommen, mit PBS gewaschen und Leber sowie Darm entfernt. Anschließend wurden sie zerkleinert, und zur Entfernung der Erythrozyten 3x bei 1×g mit PBS gewaschen, indem die Lösung einige Minuten bei RT stehen gelassen wurde. Nach Abnahme des Überstandes wurde die Zellsuspension in 60 ml PBS resuspendiert und mit ca. 30 ml Glasperlen (Durchmesser: 2 mm) und 0,625 % Trypsin (Invitrogen, Carlsbad, USA) für 30 min in einem Erlenmeyerkolben unter Rühren bei 37°C inkubiert. Danach wurde 6 µg/ml DNase I (Roche) zugegeben und für weitere 20 min inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Glasperlen 3x mit PBS gewaschen und zusammen mit dem Überstand für 10 min bei 450×g zentrifugiert. 2/3 des Überstands werden

verworfen, durch MEF-DMEM (Kap. II.3) ersetzt und resuspendiert. Dann lässt man grobe Zellklumpen absinken. Der Überstand wird in 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausplattiert. Das Zellpellet wird nochmals mit 50 ml MEF-DMEM resuspendiert, zentrifugiert (s.o.) und der Überstand ebenfalls auf die Flaschen verteilt. Anschließend wird das Gesamtvolumen pro Flasche auf 100 ml MEF-DMEM gebracht. Die Flaschen sollten sehr dicht mit Zellen besetzt sein, da nur ca. 10 % der Gesamtzellen adhärent werden. Nach 6 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, wenn mind. 10% der Zellen adhärent waren, andernfalls wurde der Mediumwechsel erst nach 20 h durchgeführt. Bei Konfluenz wurden die MEF 1:5 -1:8 verdünnt, erneut bis zur Konfluenz kultiviert und danach in flüssigem Stickstoff gelagert.

### II.4.6 Zelllinien

Tab. 2 gibt eine Übersicht verwendeter Zelllinien. NIH 3T3-ICOS-L-Transfektanten wurden durch Elektroporation von murinen NIH 3T3-Zellen (ATCC, Rockville, MD, USA #CRL1658) mit dem Expressionsplasmid BCMGS<sub>neo</sub> (Karasuyama *et al.*, 1989), welches das Gen ICOS-L kodiert, hergestellt.

Linie	Referenz
293 T(ATCC #CRL-11268)	Pear <i>et al.</i> , 1993
NIH 3T3 (ATCC # CRL1658)	Jainchill <i>et al.</i> , 1969
NIH 3T3 ICOS-L	H.W. Mages, Robert Koch-Institut, Berlin
BALB/3T12-3 Zellen (ATCC # CCL164)	Aronson <i>et al.</i> , 1968

Tab. 3: Übersicht verwendeter Zelllinien und Transfektanten

### II.4.7 Kultur und Kryokonservierung von permanenten Zelllinien

Die Kultivierung von Zelllinien erfolgte im Begasungsbrutschrank in gesättigter Wasserdampfatosphäre bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub>. Als Zellkulturmedium wurde RPMI 1640 oder DMEM mit verschiedenen Zusätzen verwendet (Kap. II.3.1). Das FCS und NCS wurde vor der Verwendung hitzeinaktiviert (45 min, 56°C). Für die Kultivierung wurden Zellkulturflaschen (Greiner) und Zellkulturplatten (mit 6, 24 oder 96 Vertiefungen; Nunc) verwendet. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer nach Färbung mit Trypanblau.

Die Passage der Zellen erfolgte jeweils bei ca. 95% Konfluenz der Kultur. Das Medium wurde vollständig entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen, für ca. 2 min mit Trypsin/EDTA von der Kulturflasche abgelöst, in Medium gewaschen (380×g, 8 min, 4°C), in neuem Medium resuspendiert und entsprechend verdünnt auf neue Schalen ausplattiert. Für die Kryokonservierung wurden die Zellen pelletiert (380×g, 8 min, 4°C) und dann in 900 µl Zellkulturmedium (eiskalt) resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde für 20 bis 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 900 µl 80% FCS/20% DMSO wurden die Zellen in ein Kryoröhrchen (Nunc) überführt. Nach 1 bis 3 Tagen Lagerung bei –70°C wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Zellen wurden in einem 37°C-Wasserbad aufgetaut, in kaltem Zellkulturmedium verdünnt und für 8 min bei 380×g pelletiert. Die Zellen wurden dann in der entsprechenden Menge Zellkulturmedium aufgenommen und kultiviert.

### II.4.8 Kultur primärer muriner DZ

$5 \times 10^5$ - $5 \times 10^6$  DZ/ml wurden in Zellkulturschalen mit R10F<sup>+</sup> Medium kultiviert. Für Stimulationsexperimente mit Zytokinen und pathogenspezifischen Stimuli wurden die Reagenzien in den in Tab. 3 aufgelisteten Konzentrationen für 6 bzw. 20 h zu der Kultur gegeben.

Reagenz	Endkonzentration	Quelle/Hersteller
GM-CSF	12,5 ng/ml	Peprtech, Rocky Hill, USA
IL-3	12,5 ng/ml	Peprtech
IL-4	15,0 ng/ml	Peprtech
IL-10	12,5 ng/ml	Peprtech
IL-12	15,0 ng/ml	R&D Systems, Minneapolis, USA
IFN- $\gamma$	15,0 ng/ml	R&D
LPS	10,0 µg/ml	Sigma
Poly I:C	50,0 µg/ml	Invivogen, San Diego, USA
TNF- $\alpha$	100,0 U/ml	Peprtech

Tab. 4: Reagenzien zur *in vitro* Stimulation von DZ

### II.4.9 ELISA

96-Loch-Mikrotiterplatten (Flachboden, Maxi-sorb)) wurden mit 50 µl/Loch des 1. Antikörpers (0,5 - 5 µg/ml) in PBS über Nacht überschichtet. Danach wurden freie Bindungsstellen durch Inkubation für 2 h mit 200 µl/Loch PBS mit 3% BSA (Serva, Heidelberg) bei Raumtemperatur abgesättigt. Die Platten wurden mit PBS und 0,05% Tween 20 (Sigma) gewaschen, dann wurden die Proben und Standardverdünnungen der Zytokine für 120 min bei Raumtemperatur auf den Platten inkubiert. Verdünnungsreihen von Standards und Zellkulturüberständen wurden in Zellkulturmedium erstellt und mit 50 µl/Loch aufgetragen.

Die Platten wurden 6x mit PBS/Tween 20 gewaschen und anschließend mit dem biotinylierten 2. Antikörper bei einer Konzentration von 0,1 – 2 µg/ml bei Raumtemperatur für 60 min inkubiert. Danach wurde viermal mit PBS/Tween gewaschen und 50 µl Streptavidin-Alkalische Phosphatase (1:1000, Dianova, Hamburg, Deutschland) in PBS/BSA für 30 min in jedes Loch gegeben. Nach sechsmaligem Waschen mit 300 µl PBS/Tween/Loch wurde mit 50 µl/Loch Tetramethylbenzidindihydrochlorid (TMB, Sigma) in Substratpuffer bei RT inkubiert. Nach Entwicklung des Standards wurde die Reaktion mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt und bei 450 nm in einem Mikrotiterplattenphotometer gemessen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Revelation (Dynatech, Sullyfield, USA).

PBS/BSA: PBS mit 1% BSA

PBS/Tween: PBS/BSA mit 0,1% Tween 20 (Sigma)

TMB in Substratpuffer: TMB, 0,1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 5,0), 0,05 M Zitronensäure, 0,006% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma)

Zytokin	Antikörper (1. / 2.) 2. Antikörper		Standard, Verdünnung [pg/ml] [pg/ml]
IL-2	JES6-1A12 <sup>*</sup>	JES6-5H4-Bio <sup>*</sup>	IL-2 <sup>a</sup> , 2000 -15,6
IL-4	11B11 <sup>*</sup>	BVD6-24G2-Bio <sup>*</sup>	IL-4 <sup>a</sup> , 2000 -15,6
IL-10	SXC2 <sup>a</sup>	SXC1-Bio <sup>b</sup>	IL-10 <sup>c</sup> , 4000 -15,6
IFN-γ	R4.6A2 <sup>*</sup>	AN18.17.24-Bio <sup>*</sup>	IFN-γ <sup>α</sup> , 2000 -15,6

<sup>\*</sup> ATCC, <sup>a</sup>Biosource, <sup>b</sup>eBioscience, <sup>c</sup>Peprtech

**Tab. 5: Übersicht verwendeter Antikörperpaare im ELISA**



### **II.4.10 Bioplex (Cytometric Bead Assay)**

Ein Maus-8-Plex A panel und ein Maus-10-Plex B panel (Bio-Rad, München) wurden mit einem „cytokine reagent kit“ (Bio-Rad) gemäß den Herstellerangaben kombiniert. Das System gleicht im Prinzip einem Sandwich-ELISA. Dabei werden Zytokin-spezifische monoklonale Antikörper kovalent an Polystyrenkugeln (Durchmesser 5,5 µm) gekoppelt. Alle Kugeln, die an einen jeweiligen zytokinspezifischen Antikörper gebunden sind, sind in einem bestimmten Mischungsverhältnis mit zwei Fluorophoren bestückt, die sich aufgrund ihrer Spektraleigenschaften unterscheiden. Dadurch lassen sich die Kugeln fluoreszenzzytometrisch unterscheiden und ihre Zytokinspezifität identifizieren. Diese Kugeln werden zu den Proben bzw. zu einer Standardverdünnung der Zytokine gegeben. Nach mehreren Waschschritten wird ein biotinylierter Detektionsantikörper mit Spezifität für ein unterschiedliches Epitop der jeweiligen Zytokine zugefügt. Nach einem weiteren Waschschriff gibt man Streptavidin-Phycoerythrin hinzu. Mittels eines speziellen Durchflusszytometers (Bio-Plex Protein Array System, Bio-Rad) wird das Zytokin dann durch Anregung der Beads (635 nm) klassifiziert und die Zytokinmenge durch die Anregung der PE-Moleküle (532 nm) definiert. Unbekannte Zytokinmengen werden mittels einer Standardkurve durch Bio-Plex Manager Software (Bio-Rad) berechnet. Auf diese Weise kann man bis zu 100 Zytokine gleichzeitig in einer Probe messen.

### **II.4.11 Kokultur von TZ mit DZ**

BALB/c DO11.10 Mäuse exprimieren einen transgenen T-Zell Rezeptor mit Spezifität für Ova-Peptid (Aminosäuren 323-339), das im Kontext mit MHC-II präsentiert wird (Jenkins *et al.*, 1991). Damit ist die Stimulation der TZ durch physiologische Signale (Peptid-MHC Komplex und Kostimulation) möglich. TZ wurden aus den Milzen von Mäusen wie im Abschnitt zur Aufreinigung muriner Lymphozyten beschrieben angereichert und dann durch einen CD4-Positiv-Sort magnetisch sortiert (MACS). DZ wurden aus Milzen von Mäusen wie beschrieben isoliert. Ggf. wurden CD3, CD19 und DX5 exprimierende Zellen noch vor der magnetischen Postivortierung mit CD11c-spezifischen Kügelchen depletiert. Die Reinheit der Zellpopulationen wurde durchflusszytometrisch untersucht (FACS).

Die DZ wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Ova-Peptid (Aminosäuren 323-339, synthetisiert von Peter Henklein, Charité, Berlin) in R10F<sup>+</sup> mit den entsprechenden Blockadereagenzien (40 µg/ml) resuspendiert. Anschließend wurden die TZ in dem gewünschten Endvolumen und Zellverhältnis zugegeben. Die Kokulturen wurden in einem Volumen von 1000 µl in 24-Loch-Zellkulturplatten angesetzt (in Dreifach-Ansätzen). Während der Kultur wurde ggf. frisches Medium (mit Blockadereagenzien, aber ohne Ova-Peptid) zugefügt und die Kultur ggf. auf eine 6-Loch-Platte expandiert. Der Kulturüberstand primärer Stimulationen wurde jeweils nach 48 h und der Überstand von sekundären Stimulationen nach 24 h abgenommen. Die Überstände wurden bei -70 °C gelagert.

Reagenz	Quelle
mulCOS-hulgG	Mages <i>et al.</i> , 2000
huCTLA-4-hulgG	ATCC #68629
anti-MHCII-mAk (M5/114.15.2)	Bhattacharya <i>et al.</i> , 1981
Isotypenkontrolle (1D10)	Eigener Antikörper

Tab. 6: Übersicht der in den Kokulturen verwendeten Blockadereagenzien

### II.5 Durchflusszytometrie (FACS)

#### II.5.1 Analyse der Zelloberfläche in der Durchflusszytometrie

In der Durchflusszytometrie kann auf Einzelzellebene die Proteinexpression auf der Zelloberfläche bzw. intrazellulär analysiert werden. Für die Färbung wurden  $0,3-1 \times 10^6$  Zellen/Vertiefung in 96-Loch-Mikrotiterplatten (Rundboden, Nunc) zentrifugiert. Zur Blockade unspezifischer Antikörperbindungen an Fc-Rezeptoren wurden die Zellen vor der Antikörperinkubation 5 min bei 4°C mit 1×Fc-Block inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit in FACS-PBS verdünnten Antikörpern für 20 min auf Eis. Für die direkte Markierung waren die Antikörper an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt. Alternativ erfolgte die indirekte Markierung mit biotinkoppelten Antikörpern und Streptavidin-Fluoreszenzfarbstoff (eBioecience) oder mittels Dioxygenin (DIG) gekoppelten Primärantikörpern und Fluorochrom gekoppeltem Schaf-anti-DIG

Sekundärantikörper (Roche Diagnostics). Alle für die Färbung verwendeten Antikörper sind in Tab. 7 aufgelistet. Die Antikörper stammen entweder aus laboreigenem Hybridomüberstand und wurden im Labor an Fluoreszenzfarbstoffe oder Haptene gekoppelt oder, wie angegeben, von Herstellern. Alle Antikörper wurden vor Verwendung titriert, um optimale Färbeergebnisse zu erhalten. Für Blockadezwecke wurden unmarkierte Antikörper eingesetzt. Um die Spezifität der Antikörperbindung an ein Antigen zu kontrollieren, kann die Färbung des Epitops mit dem fluoreszent markierten monoklonalen Antikörpers durch Vorinkubation mit demselben nicht fluoreszent markierten Antikörper blockiert werden. Dabei wurden die Zellen 5 min vor der Inkubation mit dem fluoreszent markierten Antikörper mit einem 100-fachen Überschuß des unmarkierten Antikörpers inkubiert.

<b>Antigen</b>	<b>Klon</b>	<b>Hersteller/Quelle</b>	<b>Referenz</b>
CD3	KT3	Hybridom	Tomonari <i>et al.</i> , 1988
CD4	GK1.5	Hybridom	Dialynas <i>et al.</i> , 1983
CD8	53-6.72	Hybridom	Ledbetter <i>et al.</i> , 1980
CD11c	N418	Hybridom	Metlay <i>et al.</i> , 1990
CD19	1D3	Hybridom	Krop <i>et al.</i> , 1996
CD40	FGK	Hybridom	Rolink <i>et al.</i> , 1996
CD45	M1/9.3.4.HL.2	Hybridom	Springer <i>et al.</i> , 1978
CD80	16-10A1	Hybridom	Razi-Wolf <i>et al.</i> , 1992
CD86	GL1	Hybridom	Hathcock <i>et al.</i> , 1993
CD49b	DX5	Hybridom	Hussel <i>et al.</i> , 1998
MHC-I	28-14-8	Becton Dickinson	Ozato <i>et al.</i> , 1980
MHC-II	M5/114.15.2	Hybridom	Bhattacharya <i>et al.</i> , 1981
ICOS	MIC280	Hybridom	Eigener Antikörper
ICOS-L	MIL666	Hybridom	Eigener Antikörper
ICOS-L	MIL957	Hybridom	Eigener Antikörper
ICOS-L	muICOS-hulgG	SL3-Zellen	Eigenes Fusionsprotein
PD-1	J43	eBioscience	Agata <i>et al.</i> , 1996
PD-L1	MIH5	eBioscience	Dong <i>et al.</i> , 1999
PD-L2	TY25	eBioscience	Latchman <i>et al.</i> , 2001

MCMV pp89	Croma101	Hybridom	Stipan Jonjic, Universität Rijeka, Kroatien, unveröffentlicht
mIgG-FITC	Maus IgG Fc-Fragment	Rockland Immunochem.	Lenac <i>et al.</i> , 2006
Anti-FLAG	M2	Sigma	Blizzard <i>et al.</i> , 1994
Anti-Maus Fc	Serum	Dianova	
Streptavidin (Fluorochrom-gekoppelt)		eBioscience	
Schaf anti-Dig	Serum	Roche	

**Tab. 7: Übersicht der FACS-Antikörper und Reagenzien**

Abk.: eBioscience, San Diego, USA; PharMingen, Becton Dickinson PharMingen, Heidelberg; Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, USA; Sigma, München; Dianova, Hamburg; Roche Diagnostics, Mannheim

Tote Zellen können unspezifisch Antikörper binden. Die Detektion toter Zellen erfolgte durch die in DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffe Propidiumjodid (PI) oder DAPI (4',6'-Diamidino-2-Phenylindol; beide Roche). Die Zellmembran lebender Zellen verhindert das Eindringen des Farbstoffes. PI<sup>+</sup> oder DAPI<sup>+</sup>, tote Zellen wurden auf diese Weise aus der Analyse ausgeschlossen.

Die Analyse erfolgte am LSRII unter Verwendung der Aufnahme-Software FACSDiVa oder am FACSCalibur mit der Aufnahme-Software CellQuest Pro (beide BD Biosciences). Für die Auswertung wurde FlowJo Version 6.3.3 (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA) verwendet. Die Auswertung erfolgte durch die Angabe des prozentualen Anteils positiver Zellen für ein bestimmtes Antigen oder über die geometrische mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), als Maß für die Expressionsstärke eines Antigens.

<b>A: LSRII Fluorochrom</b>	<b>Anregungs- maximum (nm)</b>	<b>Laser für Anregung</b>	<b>Emissions- maximum (nm)</b>	<b>Filter zur Detektion</b>
FITC	495	488	520	BP 530 ± 15
PE	496, 564	488	573	BP 585 ± 21
PerCP	488	488	675	BP 695 ± 20
Tandem PerCP-	488	488	710	BP 695 ± 20

<b>A: LSRII Fluorochrom</b>	<b>Anregungs- maximum (nm)</b>	<b>Laser für Anregung</b>	<b>Emissions- maximum (nm)</b>	<b>Filter zur Detektion</b>
Cy5.5				
Tandem PE-Cy5.5	496, 564	488	694	BP 695 ± 20
Tandem PE-Cy7	496, 564	488	(573), 767	BP 780 ± 30
Alexa 647	647	633	668	BP 660 ± 10
Cy5	649	633	670	BP 660 ± 10
APC	650	633	660	BP 660 ± 10
Tandem APC-Cy7	625-650	633	767	BP 780 ± 30
Cascade Yellow	400	405	552	BP 525 ± 25
Pacific Blue	405	405	455	BP 440 ± 20
DAPI	358	405	460	BP 440 ± 20 oder BP 525 ± 25

<b>B: FACSCalibur Fluorochrom</b>	<b>Anregungs- maximum (nm)</b>	<b>Laser für Anregung</b>	<b>Emissions- maximum (nm)</b>	<b>Filter zur Detektion (nm)</b>
FITC	495	488	520	BP 530 ± 15
PE	498, 565	488	573	BP 585 ± 21
PI	488	488	620	LP ≥ 670
Alexa 647	647	633	668	BP 661 ± 8
Cy5	649	633	670	BP 661 ± 8

**Tab. 8a und 8b: Fluoreszenzfarbstoffe für die Durchflusszytometrie** a: für LSRII, b: für FACSCalibur, Abk.: BP – Bandpassfilter, LP – Langpassfilter; Anregungs- und Emissionsmaxima zusammengestellt mit Daten von BD Biosciences, Zeiss und Molecular Probes.

FACS-Sheath: PBS + 0,5% NaN<sub>3</sub>  
 10×Fc-Block: 1 mg/ml anti-CD16/CD32 (Klon 2.4G2), 0,5 mg/ml Ratten IgG (beide Nordic, Tilburg)  
 PI-Stammlösung: 1 mg/ml Vorrat, Endkonzentration für FACS-Analyse: 0,33 µg/ml

DAPI-Stammlösung: 100  $\mu\text{M}$  Vorrat, Endkonzentration für FACS-Analyse:  
0,33  $\mu\text{M}$

### **II.5.2 Analyse intrazellulärer Antigene in der Durchflusszytometrie (iFACS)**

Intrazelluläre Proteine können durch die intrazelluläre Durchflusszytometrie (iFACS) analysiert werden. Dafür wurden die Zellen mit 2 % Formaldehyd in PBS (20 min, RT) fixiert. Zur Färbung intrazellulärer Antigene wurde iFACS-PBS verwendet, sodass alle Wasch- und Antikörperinkubationsschritte mit 0,5% Saponin (Sigma) durchgeführt wurden. Saponin erhöht die Durchlässigkeit der Zellmembran u. a. für Antikörper. Die Oberflächenfärbung zur Unterscheidung unterschiedlicher Zellpopulationen erfolgte entweder vor der Fixierung oder nach der intrazellulären Färbung.

## **II.6 Histologie**

### **II.6.1 Kryokonservierung/ Kryoschnitte**

Zur Kryokonservierung wurden die Gewebe direkt nach der Entnahme in 0,9% NaCl in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei  $-70^{\circ}\text{C}$ . Vor dem Anfertigen der Kryoschnitte wurde das Gewebe im Kryostat auf  $-18^{\circ}\text{C}$  „erwärmt“. Es wurden 8  $\mu\text{m}$  dicke Kryoschnitte angefertigt, die auf silanisierte Objektträger aufgezogen und über Nacht bei RT getrocknet wurden.

Beim Silanisieren wurden azetongereinigte Objektträger mit 2% Aminopropyltriethoxysilan (APES; Sigma-Aldrich) in Azeton für 5 min beschichtet, um zu vermeiden, dass Gewebeschnitte bzw. Zellen während der Färbung vom Objektträger gelöst werden.

### **II.6.2 Fixierung von Kryoschnitten**

Kryoschnitte wurden zur Färbung von Oberflächenantigenen in Azeton fixiert. Dabei kommt es zur Proteinpräzipitation, bei der die Primär- und Sekundärstruktur erhalten bleibt, aber die Tertiärstruktur zerstört wird.

### **II.6.3 Blocken endogener Peroxidase**

Wenn die Detektion von gebundenen Antikörpern über Meerrettich-Peroxidase (HRP) erfolgte, musste die endogene Peroxidase vor Beginn der Färbung

blockiert werden, um falsch-positive Ergebnisse zu verhindern. Endogene Peroxidase findet man vor allem in Granulozyten, Mastzellen und Erythrozyten. Die Inaktivierung erfolgte durch Inkubation der Objektträger mit Gewebeschnitten für 1 h bei 37°C mit Peroxidase-Block in einer Küvette. Danach wurde dreimal 5 min mit PBS gewaschen.

Peroxidase-Block: 1 mM Natriumazid, 10 mM Glukose, 1 U/ml  
Glukoseoxidase (Sigma-Aldrich) in PBS

### II.6.4 Detektion

Alle folgenden Inkubationen erfolgten in einer feuchten Kammer. Zwischen den Antikörper-Inkubationen wurde jeweils dreimal 5 min in einer Küvette mit Waschpuffer gewaschen. Danach wurden die Schnitte mit einem Fettstift umrandet, um das Ineinanderlaufen von Antikörper-Lösungen benachbarter Schnitte zu verhindern. Vor der Inkubation mit Antikörpern wurden durch NEN-Block-Lösung unspezifische Bindungsstellen auf den Schnitten abgesättigt. Die Inkubation mit den unkonjugierten oder an ein Hapten gekoppelten Primäantikörpern erfolgte in NEN-Block-Lösung über Nacht bei 4°C. Die Detektion erfolgte nach dem Peroxidase-Protokoll (s.u.).

NEN-Block-Lösung: PBS + 10% FCS + 0,5% NEN-Block (PerkinElmer  
Life And Analytical Sciences, Wellesley, MA, USA)

Waschpuffer: PBS + 0,05% Tween 20

Antigen	Klon	Quelle	Referenz
CD3	KT3	Hybridom	Tomonari <i>et al.</i> , 1988
CD4	GK1.5	Hybridom	Dialynas <i>et al.</i> , 1983
CD8	53-6.72	Hybridom	Ledbetter <i>et al.</i> , 1980
CD45R (B220)	RA3-6B2	Hybridom	Morse <i>et al.</i> , 1982

Tab. 9: Übersicht der in der Histologie verwendeten Antikörper

Detektionreagenz	Quelle
Schaf-anti-Digoxigenin-HRP	Roche
Schaf-anti-FITC-HRP	Roche

**Tab. 10: Übersicht der in der Histologie verwendeten Detektionsreagenzien**

### II.6.5 Peroxidase-Protokoll

An FITC bzw. Digoxigenin gekoppelte Primärantikörper wurden über die entsprechenden HRP-Konjugate anti-FITC-HRP bzw. anti-Digoxigenin-HRP detektiert. Alle Sekundär-Antikörper wurden in NEN-Block-Lösung verdünnt und die Inkubation erfolgte bei RT für 1 bis 2 h. Gebundene HRP wurde durch Umsetzung des Farbstoffes 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) in ein rotbraunes, unlösliches Farbprodukt sichtbar gemacht. Die Inkubation mit AEC-Arbeitslösung erfolgte für ca. 10 min. Die Kerne wurden durch Färben in Mayer's Hämalaun (5 min) und anschließendes Bläuen in Leitungswasser (5 min) gegengefärbt. Die Objektträger wurden mit Kaisers Glyceringelatine (Merck, Darmstadt) eingedeckt und mit einem Deckglas abgeschlossen.

AEC-Stammlösung: 1 Tablette AEC (Sigma-Aldrich) wird in 2,5 ml N,N-Dimethylformamid gelöst

AEC-Arbeitslösung: 250 µl AEC- Stammlösung, 4,75 ml 50 mM Natrium-Azetatpuffer pH 5,0; Zugabe von 2,5 µl 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; vor Gebrauch filtrieren (0,2 µm)

Mayer's Hämalaun: 3,1 mM Hämatoxin, 1 mM NaIO<sub>3</sub>, 105 mM Kalialaun; über Nacht rühren; Zugabe von: Chloralhydrat (302 mM), Zitronensäure (4,7 mM)

### II.7 Immunfluoreszenzmikroskopie

Zur Analyse der Zellen wurden diese nach dem Protokoll für die iFACS-Färbung behandelt (II.4.3). Am Ende wurden die Zellen in 10 µl Glycerol-PBS („Citifluor“, Agar Scientific, Stansted, GB) aufgenommen und bei 4°C gelagert. Zur Analyse im konfokalen Mikroskop wurden die Proben auf 8-Loch Objektträger



aufgetragen (Erie Scientific Company, Portsmouth, USA). Für die Aufnahmen im konfokalen Mikroskop wurden folgende Einstellungen verwendet:

Objektiv: C-Apochromat 63x/1.2 W corr.  
Strahlenverteiler: MBS: HFT UV/488/543/633  
DBS1: NFT 635 VIS  
DBS2: NFT 545  
DBS3: Plate  
Wellenlängen: 633 nm: 100%; 488 nm: 9%; 543 nm: 100%  
Filter: Ch1-1: LP 650, Ch2-2: BP 505-530, Ch3-3: BP 560-615  
Lochblende: Ch1-1: 143  $\mu\text{m}$ , Ch2-2: 140  $\mu\text{m}$ , Ch3-3: 137  $\mu\text{m}$

### **II.8 Virologie**

Generell wurden, wenn nicht anders angegeben, alle Arbeiten mit Viren auf Eis durchgeführt.

#### **II.8.1 Viren und Virusmutanten**

(Übersicht & Referenzen: Tab. 11) Das MCMV-Virus MW97.01, das zu dem MCMV Stamm Smith biologisch äquivalent ist und die Virusmutanten m138FSH und m138REV wurden von Herrn Prof. Dr. Hartmut Hengel, Institut für Virologie, Heinrich Heine Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Die von MCMV MW97.01 abgeleiteten Mutanten  $\Delta 6$ ,  $\Delta 7$ ,  $\Delta 8$  und  $\Delta 20$  stammen von Herrn Dr. Markus Wagner, Bavarian Nordic, München. MCMV-GFP Stamm Smith stammt von Frau Dr. Brigitte Dorner, Zentrum für Biologische Sicherheit 3, Robert Koch-Institut, Berlin.

Virus	Stock	Deletierter offener Leserahmen	Referenz
MCMV <i>Smith</i>	Speicheldrüse	-	Smith <i>et al.</i> , 1954
MCMV-GFP <i>Smith</i>	Speicheldrüse	-	Henry <i>et al.</i> , 2000
	Zellkultur		
MCMV MW97.01	Zellkultur	-	Wagner <i>et al.</i> , 1999
MCMV $\Delta$ 6	Zellkultur	m144-m158	Wagner, 2002 (nicht veröffentlicht)
MCMV $\Delta$ 7	Zellkultur	m159-170	
MCMV $\Delta$ 8	Zellkultur	m01-22	
MCMV $\Delta$ 20	Zellkultur	m128-139	
MCMV $\Delta$ m138FSH	Zellkultur	m138	Lenac <i>et al.</i> , 2006
MCMV m138REV	Zellkultur	keine Deletion, Revertante der m138 Deletionsmutante	

Tab. 11: Übersicht verwendeter Viren

### II.8.2 Herstellung von ungereinigten Virenstocks *in vivo*

Für die Herstellung eines Speicheldrüsenstocks wurden BALB/c-Mäuse i. p. mit  $10^4$  Pfu MCMV-GFP Stamm Smith infiziert. Am Tag 14 nach Infektion wurden die Speicheldrüsen der Tiere entnommen, zerkleinert und in 3 ml DMEM, 10 % FCS ohne Zusätze mit einem Douncer (Wheaton, USA) resuspendiert. Anschließend wurde zentrifugiert ( $950\times g$ , 10 min,  $4^\circ\text{C}$ ), der Überstand wurde aufbewahrt und das Pellet in 3 ml DMEM mit 10 % FCS resuspendiert. Dieses wurde dann mit dem Douncer weiter resuspendiert. Danach wurde erneut zentrifugiert und die gesammelten Überstände wurden durch ein Sieb (Durchmesser:  $70\ \mu\text{m}$ ) gegeben. Anschließend wurde 3x für 30 s gevortext und wieder abzentrifugiert. Der Überstand wurde dann in Aliquots bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### II.8.3 Herstellung und Aufreinigung von Virenstocks aus Zellkultur

BALB/3T12-3 Zellen (ATCC, #CCL164) wurden in  $175\ \text{cm}^2$  Zellkulturflaschen zu 80% Konfluenz expandiert und mit MCMV mit einer MOI von ca. 0,01-0,05 in

4 bis 5 ml 3T3/12 Medium infiziert. Danach wurden 20 ml Medium pro Flasche zugegeben. Bei maximalem zytophatischen Effekt der Infektion, d.h. wenn einzelne Plaques miteinander verschmolzen, wurde das Virus geerntet. Der Zellrasen wurde mit Plastikschaibern abgeschabt und mit dem Überstand in 500 ml Zentrifugenbecher (Beckmann, München) transferiert und zentrifugiert (6000×g, 20 min, 4°C). Der Überstand wurde in neue Zentrifugenbecher überführt und bei 4°C gelagert. Das Pellet wurde in 5 bis 7 ml Zellkulturmedium resuspendiert und mit einem Douncer zerkleinert und abzentrifugiert (17000×g, 20 min, 4°C). Der Überstand wurde mit dem Überstand der ersten Zentrifugation vereinigt und nochmals hochoberflächlich zentrifugiert (27000×g, 3 h, 4°C). Dann wurde der Überstand bis auf ca. 6 ml verworfen und das Pellet mit Überstand bedeckt über Nacht auf Eis gelagert. Anschließend wurde es im Douncer resuspendiert und in Polyallomer-Röhrchen (Beckmann) auf 15% Sucrose in Virus-Standard-Puffer geschichtet. In der Ultrazentrifuge wurde bei 131000×g, 4°C für 1,5 h zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in VSB-Puffer resuspendiert und in Aliquots bei -80°C gelagert.

### **II.8.4 Plaque-Assay zur Quantifizierung von produktivem MCMV**

In einer 48-Loch-Platte wurden MEF ausgesät und inkubiert bis sie ca. 90 % konfluent waren. Eine Verdünnungsreihe der zu untersuchenden Probe wurde in Triplikaten zu den Zellen gegeben (450 µl/Loch). Dann wurde 2x zentrifugiert, wobei die Platten zwischendurch um 180° gedreht wurden (300×g, 15 min, 4°C). Anschließend wurde für 2 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen wurden mit 200 bis 300 µl Methylzellulose-Medium überschichtet. Nach 4 bis 5 Tagen erfolgte die Auszählung der Virusplaques.

Methylzellulose-Medium:

Methylzellulose (2,5 w/v) in H<sub>2</sub>O („Methocel MC“, Sigma) mit den Zusätzen:

1x MEM (aus 10x MEM, Sigma), 5% FCS (Biochrom AG), 2 mM Glutamin (Invitrogen)

100 µg/ml Penicillin/ Streptomycin (Invitrogen), 2,75 g/l NaHCO<sub>3</sub>

### **II.8.5 *In vitro* Infektion von Zellen mit MCMV**

NIH 3T3-Zellen oder DZ wurden in 6-Loch-Zellkulturplatten infiziert. Die Infektion der Zellen erfolgte bei ca. 90% Konfluenz (ca.  $1 \times 10^6$  Zellen) mit Virusstocks definierter MOI. Dazu wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und das Virus in 300  $\mu$ l Medium/Loch hinzu gegeben. Anschließend wurde 2x zentrifugiert (300 $\times$ g, 15 min, 4°C), wobei die Platten nach der 1. Zentrifugation um 180° gedreht wurden. Nach 1 bis 2 h Inkubation wurde das Medium durch frisches ersetzt.

### **II.8.6 Infektion von Mäusen mit MCMV**

Alters- und gewichtsgleiche Mäuse wurden i. p. mit verschiedenen Dosen MCMV, gelöst in DMEM ohne Zusätze (Injektionsmedium), infiziert. Ein Volumen von max. 300  $\mu$ l wurde mittels einer Feindosierungsspritze (Braun Omnican) verabreicht.

Virus Standard Puffer (VSB): 50 mM Tris/HCl pH 7,8; 10 mM KCl;  
5 mM EDTA

D (+) Saccharose (Sucrose), RNase und DNase-frei (Roth, Karlsruhe)  
15 % (w/v) in VSB, steril

### **II.8.7 Isolation von MCMV aus Organen zur Titerbestimmung**

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion wurden die Organe entnommen, gewogen, zerkleinert und in 3 ml DMEM, 10 % FCS ohne Zusätze mit einem Douncer (Wheaton, USA) resuspendiert. Die Suspension wurde dann in Aliquots bei -20 °C gelagert. Vor der Titration im Plaque-Assay wurden die Aliquots nach dem Auftauen kurz gevortext und danach mit einer Tischzentrifuge kurz anzentrifugiert (12000 $\times$ g, 8 s, RT). Der Überstand wurde für die Titration verwendet.

## **II.9 Molekularbiologie**

### **II.9.1 Transfektion von Zelllinien**

Transiente Transfektionen von 3T3-Zellen wurden mittels PolyFect-Reagenz (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben für 24 h durchgeführt. Das Polyfect-

Reagenz besteht aus Molekülen einer definierten räumlichen Struktur mit geladenen, endständigen Aminosäureresten. Diese können mit dem negativ geladenen Phosphatrückgrat der DNA interagieren. Dadurch wird die DNA in eine kompakte Struktur überführt, welche an Zelloberflächen bindet und durch unspezifische Endozytose aufgenommen wird. Für die Koexpression von ICOS-L und viralen Genen auf unterschiedlichen Plasmiden wurde ein molares Verhältnis von 1:1 verwendet.

### **II.9.2 Plasmide**

Das Kontrollplasmid pIRES2-US2-EGFP stammt von M. Raftery, Humboldt Universität, Berlin.

Die Konstrukte pIRES2-m138-EGFP, pIRES2-m138-ICOS-L und pIRES2-m155-ICOS-L wurden von M. Budt, Robert Koch-Institut, Berlin wie folgt hergestellt: Das Konstrukt pIRES2-m138-EGFP wurde durch Ausschneiden der fcr-1/m138 WT Sequenz mittels BamHI und Sac I aus p7,5k-m138 (Atalay, 2002) und anschließender Insertion in Bgl II und Sac I Schnittstellen von pIRES-EGFP (Clontech, Mountain View, USA) hergestellt.

Für die Herstellung des Plasmids pIRES2-m138-ICOS-L wurde das US2-Gen und das EGFP-Gen des Plasmids pIRES2-US2-EGFP durch die kodierende Sequenz von m138/fcr-1 bzw. ICOS-L ersetzt.

Das Kontrollplasmid pIRES2-m155-ICOS-L wurde hergestellt, indem das Gen m138 im pIRES2-m138-ICOS-L durch die Sequenz des viralen Regulators m155 mit c-terminalem FLAG-tag ersetzt wurde.