

## 2 MATERIAL UND METHODEN

Einzelheiten zu den nicht näher beschriebenen Standardmethoden sowie Zusammensetzung gängiger Puffer und Lösungen finden sich in *Current Protocols in Immunology* [67]. Des Weiteren wird auf die Datenblätter der im Text genannten Hersteller verwiesen. Chemikalien und Reagenzien wurden, wenn nicht anders angegeben, kommerziell bezogen.

### Untersuchungsmaterial

*Buffy-Coat*-Konserven von gesunden Spendern (spezialstabilisiertes Blutspendematériau nach Entzug eines Großteils des Plasmas und des Erythrozytenkonzentrats) des Blutspendedienst Krankenhaus Moabit, Berlin, und der Blutbank Charité, Humboldt-Universität Berlin.

Humane Haut von Mammareduktionen gesunder Personen, Charité, Humboldt-Universität Berlin.

Humane Tonsillen aus dem Rudolph Virchow-Klinikum, Charité, Humboldt-Universität Berlin, und aus dem St. Gertrauden-Krankenhaus.

### 2.1 Laboreigene Fusionsproteine und Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten löslichen Fusionsproteine zum Nachweis von ICOS-L und monoklonalen Antikörper (mAk) gegen ICOS wurden in unserem Labor generiert und standen zu Beginn dieser Arbeit bereits zur Verfügung. mAk gegen ICOS-L wurden während dieser Arbeit in unserem Labor von H.W. Mages und A. Hutloff hergestellt und ersetzen die Fusionsproteine. Das Prinzip der Generierung der Reagenzien soll kurz erläutert werden.

### 2.1.1 Generierung von löslichen ICOS-Fusionsproteinen

Die Generierung von löslichen ICOS-Fusionsproteinen wurde von H.W. Mages und A. Hutloff in unserem Labor durchgeführt.

Zur Herstellung des chimären Fusionsproteins murin ICOS-human Ig, im Folgenden als mu ICOS-hu Ig, wurde die extrazelluläre Domäne von ICOS nach Standardtechniken in den Drosophila Expressionsvektor pRmHa-3 [68] kloniert. Das Plasmid wurde in Schneider SL-3 Zellen [69] transfiziert. Positive Klone wurden in Insektenmedium Sf-900 (Gibco-BRL) gezogen. Mu ICOS-hu Ig [56] wurde durch Affinitätschromatographie an Protein G isoliert. Das human ICOS-Kaninchen Ig, im Folgenden als hu ICOS-Kaninchen Ig, wurde auf die gleiche Art generiert [65].

### 2.1.2 Generierung von ICOS-L spezifischen monoklonalen Antikörpern

Die Generierung von mAk wurde von H.W. Mages und A. Hutloff in unserem Labor durchgeführt. MAk gegen human ICOS-L wurden durch Immunisierung von BALB/c Mäusen mit einem löslichen Fusionsprotein, hu ICOS-L-Kaninchen Ig, generiert. Milzzellen aus der Maus wurden mit Myelomzellen P3X63Ag8.653 (ATCC) fusioniert und die Überstände der resultierenden Hybridome wurden mit Hilfe der Durchflußzytometrie auf einer ICOS-L exprimierenden Transfektante analysiert. Nach Subklonierung wurden 23 verschiedene Maus anti-hu ICOS-L mAk erhalten. Der mAk HIL-131 und der HIL-93 wurden für diese Arbeit verwendet.

Der Antikörper gegen ICOS, in dieser Arbeit wurde der mAk F44 verwendet, wurde durch Immunisierung von BALB/c Mäusen mit PMA/Ionomycin aktivierten T-Zellen gewonnen. Anschließend wurden Milzzellen der immunisierten Mäuse mit Myelomzellen P3X63Ag8.653 (ATCC) fusioniert und der Klon 8F4 subkloniert [63].

## 2.2 Zellbiologische Methoden

Die Zellkultur erfolgte in Begasungsbrutschränken bei 37°C, 5,2% CO<sub>2</sub>. Die Kultur erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in RPMI 1640 (Biochrom, Berlin, Deutschland), ergänzt mit 10% (v/v) FCS (Biochrom), 50 U/ml Penicillin (PAA, Cölbe, Deutschland) und 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom). Dieses Standardmedium wird im folgenden als R10F<sup>+</sup> bezeichnet.

### 2.2.1 Gewinnung peripherer mononukleärer Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation

Die Gewinnung von *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMC) aus *Buffy-Coat*-Konserven gesunder Spender erfolgte durch Dichte-Gradient-Zentrifugation über Ficoll-Trennlösung. Da die Dichte von Ficoll mit 1,077 g/ml identisch ist wie die von Lymphozyten und Monozyten, werden diese durch Zentrifugation in der Interphase angereichert und dort als weißer Ring sichtbar.

Die Blutkonserven wurden in einer ersten Zentrifugation bei 400×g ohne Ficoll-Lösung in einem 50 ml Röhrchen von einem großen Teil der Erythrozyten befreit, die pelletieren. Die Leukozyten enthaltende Interphase wurde abgenommen, in PBS verdünnt und auf Ficoll (Lymphoprep, Biochrom) überschichtet und erneut zentrifugiert. Die Zellen aus der Interphase wurden mehrfach durch Zentrifugation gewaschen. Die Ausbeute pro *Buffy-Coat* lag in der Regel bei  $6-8 \times 10^8$  PBMC. Ausgehend von dieser Zellsuspension wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen sortiert. Für die Sortierung von CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> bzw. CD45R0<sup>+</sup> T-Zellen konnte optional eine erste Anreicherung von T-Zellen aus PBMC durch die Depletion eines Großteils von B-Zellen und Monozyten durch Adhärenz an Nylonwolle erreicht werden [70]. Die so erhaltenen Nylonwolle-gereinigten T-Zellen waren zu 80% CD3<sup>+</sup>.

#### 2.2.1.1 Gewinnung von hitzeinaktiviertem humanen Plasma

Humanes Plasma wurde standardmäßig für die Generierung von dendritischen Zellen aus Monozyten benötigt. Hierfür wurde nach Dichtegradientenzentrifugation der Blutkonserven über Ficoll das sich über der Interphase befindliche Plasma abgenommen und für 40 min bei 56°C hitzeinaktiviert. Durch anschließende Zentrifugation bei 1000×g wurde das Plasma weitgehend von Partikeln befreit.

### 2.2.2 Gewinnung mononukleärer Zellen aus der Tonsille durch Dichtegradientenzentrifugation

Die Gewinnung von mononukleären Zellen aus der Tonsille erfolgte durch Dichte-Gradient-Zentrifugation über Ficoll-Trennlösung.

Die Tonsillen wurde auf Eis in R10F<sup>+</sup>, versetzt mit 5 g/ml Gentamycin (Biochrom), bis zur Verarbeitung gekühlt. Anschließend wurde die Tonsille mit 4°C kalten PBS, versetzt mit 5 µg/ml Gentamycin und 250 ng/ml Amphotericin B (Biochrom) (PBS+G/A), überschichtet und von Fett, Muskel- und Bindegewebe befreit. Das lymphatische Gewebe wurde aus der Tonsille herausgeschabt und mit 4°C kalten PBS+G/A mit Hilfe des stumpfen Endes eines Spritzenstoffs in einer Petrischale durch ein erstes Sieb mit 500 µm Porenweite gequetscht. Die Zellsuspension wurde mit 4°C kalten PBS+G/A von dem Sieb gewaschen in einer neuen Petrischale durch ein zweites Sieb mit 200 µm Porenweite gedrückt und das Sieb wiederum mit 4°C PBS+ G/A gewaschen. Je nach Größe der Tonsille wurde die Zellsuspension in 70-140 ml 4°C kalten PBS+G/A aufgenommen und 2 bzw. 4 Röhrchen mit je 15 ml Ficoll überschichtet. Die Zentrifugation erfolgte bei 1800xg, 20°C, 10 min, ohne Bremse. Anschließend wurde die Interphase mit den mononukleären Zellen abgenommen und mit 4°C kalten PBS+G/A gewaschen. Ein zweiter Waschschrift erfolgte anschließend in 4°C kalten PBS+G. Die Zentrifugation erfolgte bei 500xg, 4°C, 10 min. Anschließend wurden die mononukleären Zellen in 4°C kalten PBS+G aufgenommen und die Zellzahl in TÜRKS-Lösung (Merck) bestimmt. Die Ausbeute pro Tonsille lag in der Regel bei  $0,5-1 \times 10^9$  mononukleären Zellen. Für die Sortierung CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> T-Zellen konnte eine erste Anreicherung von T-Zellen aus mononukleären Zellen durch die Depletion eines Großteils der B-Zellen durch Adhärenz an Nylonwolle erreicht werden [70]. Die so erhaltenen Nylonwolle-gereinigten T-Zellen waren zu 90% CD3<sup>+</sup>.

### 2.2.3 Aufreinigung von Zellen durch MACS (Magnetic Activated Cell Sort)

Die magnetische Sortierung von Zellen ermöglicht die quantitative Ausbeute hochreiner Zellpopulationen aus verschiedenen Geweben (hier: humanes peripheres Blut und Haut von Mammareduktionen). Die Zellen werden dabei entweder negativ sortiert, d. h. alle nicht gewünschten Zellen werden aus dem Zellgemisch (hier aus PBMC) depletiert, oder die gewünschten Zellen werden positiv direkt aus dem Zellgemisch sortiert (hier aus einer epidermalen Einzelzellsuspension). In beiden Fällen werden die Zellen mit einem für den Zelltyp spezifischen

mAk markiert. Entweder ist der spezifische mAk direkt an superferromagnetische Partikel (*microbeads*) gebunden, oder der spezifische mAk wird von einem 2. Antikörper erkannt. Dieser 2. Antikörper ist an *microbeads* gebunden und erkennt den Fc-Anteil des 1. Antikörpers. Die Kopplung der *microbeads* an die Zelle geschieht so indirekt.

Die an *microbeads* gebundene Zellen können in einem magnetischen Feld über eine Säule getrennt werden. Die methodischen Einzelheiten sind aus den Angaben des Herstellers ersichtlich (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland).

#### 2.2.4 Magnetische Sortierung von T-Zellen

T-Zellen wurden ausgehend von vorangereicherten Nylonwolle-gereinigten T-Zellen aus dem peripheren Blut gesunder Spender oder von Nylonwolle-gereinigten T-Zellen aus der Tonsille durch magnetische Zellseparation [71] gewonnen.

CD4<sup>+</sup> T-Zellen des peripheren Bluts wurden durch die Depletion von CD8<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, MHCII<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> Zellen und Erythrozyten aus Nylonwolle-gereinigten T-Zellen isoliert. Für die Gewinnung von CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen des peripheren Bluts wurden zusätzlich CD45R0<sup>+</sup> T-Zellen, für die Gewinnung von CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> T-Zellen wurden zusätzlich CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen depletiert (negative Selektion).

Für die Gewinnung von CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> T-Zellen aus der Tonsille wurden CD8<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup> und CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen depletiert (negative Selektion).

Die Bindung spezifischer Antikörper an Differenzierungsantigene der zu depletierenden Zellen und die Bindung des gegen den 1. Antikörper gerichteten 2. Antikörpers erfolgte nach Herstellerangaben (Miltenyi Biotech) in MACS-Puffer (PBS + 1% BSA, Sigma, Taufkirchen, Deutschland). Die Depletion erfolgte über die Bindung eines mAk an ein für die zu depletierenden Zellen spezifisches Epitop. Die verwendeten Antikörper sind in Tab. II aufgeführt:

Tab. II Antikörper zur Sortierung von T-Zellen mit MACS

Spezifität	Klon	depletierter Zelltyp	eingesetzte Menge	Herkunft
CD45RA	4G11	B-Zellen, naive T-Zellen, Monozyten	10 µg/ml (peripheres Blut und Tonsille)	[72]
CD45R0	UCHL1	aktivierte und "memory" T-Zellen	10 µg/ml (peripheres Blut)	[73]
CD8	OKT8	CD8 <sup>+</sup> T-Zellen, Natürliche Killerzellen	10 µg/ml (peripheres Blut und Tonsille)	CRL 8014, ATCC
CD11b	OKM1	Monozyten, Natürliche Killerzellen, CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Subpopulation	10 µg/ml (peripheres Blut)	CRL 8026, ATCC
CD19	BU12	CD19 <sup>+</sup> B-Zellen	15 µg/ml (peripheres Blut) 10 µg/ml (Tonsille)	[74]
Glyc A	10F7MN	Erythrozyten	30 µg/ml (peripheres Blut)	HB-8162, ATCC
HLA-DR	L243	Monozyten, B-Zellen	30 µg/ml (peripheres Blut)	HB-55, ATCC
CD14	63D3	Monozyten	10 µg/ml (Tonsille)	HB-44

Die mit dem 1. Antikörper markierten zu depletierenden Zellen wurden mit einem an *microbeads* gebundenen 2. Antikörper gegen Maus-Immunglobulin nach Herstellerangaben inkubiert. Die nun magnetisch markierten Zellen wurden in MACS-Säulen mit dem Midi-MACS System (Miltenyi Biotech) separiert. Die nicht magnetisch markierten CD4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> oder CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> T-Zellen konnten aus der Säule mit MACS-Puffer eluiert werden. Die Reinheit der negativ isolierten T-Zellen lag bei 98% (CD4<sup>+</sup>) und 95% (CD<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup>). Die Reinheit wurde in der Durchflußzytometrie überprüft.

### 2.2.5 Präparation einer epidermalen Zell-Suspension und magnetische Isolierung von Langerhans-Zellen

Isolierte Langerhans-Zellen wurden freundlicherweise von Matthias Peiser (Charité, Humboldt-Universität Berlin) zur Verfügung gestellt. Für die Generierung einer epidermalen Zellsuspension wurden Teile humaner Brusthaut aus Mammareduktionen verwendet. Die Haut wurde mit Dispase I (0,5 mg/ml, Roche, Mannheim, Deutschland) für 18 h bei 4°C inkubiert. Epidermale Schichten wurden von der Dermis abgezogen und durch Inkubation in Trypsin-Lösung (0,25% Biochrom, Berlin) und DNase I (0,01%, RNase-frei, Roche) für 10 min bei 37°C zu einer Einzelzellsuspension dissoziiert. Langerhans-Zellen wurden von anderen epidermalen Zellen mit direkt an superparamagnetische *microbeads* gekoppelte Maus anti-human CD1a Antikörpern (IgG1, Klon HI149, Miltenyi Biotech) positiv selektiert. Die markierten Zellen wurden über LS-Säulen (Miltenyi Biotec) gegeben und CD1a<sup>+</sup> Langerhans-Zellen von der Säule isoliert. Nach Gabe der CD1a<sup>+</sup> Zellen über eine 2. MACS Säule wurde eine Reinheit von 93% CD1a und HLA-DR koexprimierenden Zellen erreicht. Die Reinheit wurde in der Durchflußzytometrie überprüft.

### 2.2.6 Generierung von dendritischen Zellen aus Monozyten

Die *in vitro* Generierung von dendritischen Zellen erfolgte aus CD14<sup>+</sup> Monozyten, die durch zwei Adhärenzschritte auf 100 mm Plastik-Petrischalen (Corning Costar, Wiesbaden, Deutschland) aus PBMC bei 37°C im Brutschrank isoliert wurden. Die erste Adhärenz erfolgte zunächst für 30 min mit einer Dichte von  $3 \times 10^6$  PBMC/ml in RPMI angereichert mit 1% humanem Plasma und Penicillin/Streptomycin, im Folgenden als R1F<sup>+</sup> bezeichnet. Nach 30 min wurden die nicht adhärenen Zellen vorsichtig mit 37°C warmem R1<sup>+</sup> von den Platten gewaschen. Die zweite Adhärenz erfolgte über Nacht erneut in R1<sup>+</sup>. Am Tag 1 wurden die Platten einmal mit 37°C warmem PBS gewaschen und die noch adhärenen Monozyten bis Tag 7 in 24 ml/Schale Differenzierungsmedium (R10F<sup>+</sup>, angereichert mit 800 U/ml GM-CSF (Novartis, Basel, Schweiz) und 1000 U/ml IL-4) kultiviert. Am Tag 4 wurden 6 ml Differenzierungsmedium von den Platten abgenommen und durch 12 ml frisches Medium, angereichert mit 1600 U/ml GM-CSF und 1000 U/ml IL-4, ersetzt. Am Tag 6 (Kulturbedingungen b, c, e, f, g, s.u.) oder am Tag 7 (Kulturbedingungen a, d, h, s.u.) wurden die unreifen in Suspension befindlichen dendritischen Zellen von den Platten abgenommen, zentrifugiert und in Reifungsmedium R10F<sup>+</sup>, angereichert mit

800 U/ml GM-CSF und 1000 U/ml IL-4, aufgenommen. Die Reifung erfolgte für weitere zwei Tage mit

- (a) einer Zytokin-Kombination 10 ng/ml IL-1 $\beta$ , 1000 U/ml IL-6 (beide Strathman Biotech, Hannover, Deutschland), 1  $\mu$ M PGE<sub>2</sub> (Calbiochem, Bad Soden, Deutschland), 10 ng/ml TNF- $\alpha$  (R&D systems) oder
- (b) 250 ng/ml LPS (Sigma) und 1  $\mu$ M PGE<sub>2</sub> oder
- (c) LPS (Sigma) plus 1000 U/ml IFN- $\gamma$  (Biosource, Solingen, Deutschland) oder
- (d) 20 ng/ml IL-10 (Pharmingen, Hamburg, Deutschland) oder
- (e) 12,5  $\mu$ g/ml Poly I:C (Sigma) oder
- (f) 10 ng/ml LPS oder
- (g) 1  $\mu$ M PGE<sub>2</sub> und 10 ng/ml TNF- $\alpha$  oder
- (h) 10<sup>4</sup> U/ml IFN- $\gamma$ .

Die am Tag 8 bzw. am Tag 9 reifen DC wurden intensiv mit R10F<sup>+</sup> gewaschen und für weitere Experimente verwendet. Stimulationen über CD40 oder ICOS-L wurden mit L-Zell-Transfektanten durchgeführt (s.u.).



### 2.2.7 Kokulturen von T-Zellen mit dendritischen Zellen

Zur funktionellen Untersuchung von Zell-Zell-Interaktionen über Oberflächenantigene auf T-Zellen und auf dendritischen Zellen wurden Kokulturen durchgeführt. Kokulturen von T-Zellen mit dendritischen Zellen wurden in R10F<sup>+</sup> angesetzt.

Für primäre Kokulturen wurden T-Zellen des peripheren Bluts oder aus der Tonsille eingesetzt. Als Stimulatoren in der primären Kokultur wurden entweder unreife dendritische Zellen am Tag 6, oder unterschiedlich stimulierte bzw. ausgereifte dendritische Zellen am Tag 8 oder am Tag 9 eingesetzt. Dendritische Zellen wurden vor Einsetzen in der Kokultur mit 3000 rad bestrahlt. In primären Kokulturen betrug das Verhältnis von dendritischen Zellen zu T-Zellen 1 : 10. In primären Kokulturen wurde 1 pg/ml eines Superantigen-Gemisches aus Staphylokokkus Enterotoxin A (SEA, Toxin Technology, Sarasota, FL, USA), Staphylokokkus Enterotoxin B (SEB, Toxin Technology), Toxic Shock Syndrome Toxin (TSST, Toxin Technology) oder 1 ng/ml SEB eingesetzt. Primäre Kokulturen wurden in 24-Loch Flachboden-Platten mit  $1 \times 10^6$  T-Zellen/ml und  $1 \times 10^5$  dendritischen Zellen/ml angesetzt. Die Konzentration der Blockadereagenzien betrug 50 µg/ml. Die Zellüberstände wurden nach 48 h abgenommen und auf Zytokingehalt mit dem ELISA-Assay analysiert.

Für Restimulationsexperimente betrug das Verhältnis von CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen zu dendritischen Zellen zunächst 5 : 2. Anschließend wurden die T-Zellen mit rekombinantem IL-2 (Peprotech, Offenbach, Deutschland) expandiert. In der Restimulation betrug das Verhältnis von T-Zellen zu dendritischen Zellen 15 : 1. Für Restimulationsexperimente wurde mit 1 ng/ml SEB stimuliert.

Für Restimulationsexperimente wurden naive CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen ( $5 \times 10^4$  Zellen/200 µl) in 96-well Flachboden-Mikrotiterplatten (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) mit bestrahlten (3000 rad) LPS (250 ng/ml) und PGE<sub>2</sub> (10 µM) gereiften dendritischen Zellen ( $2 \times 10^6$ /200 µl) kultiviert. Am Tag 5 wurden die Kulturen mit 10 U/ml rekombinantem IL-2 bis Tag 12 expandiert. Am Tag 12 wurden die expandierten T-Zellen extensiv gewaschen und die Anzahl lebender Zellen in Trypanblau-Lösung (PBS+5% (w/v) Trypanblau, Biochrom) in einer Neubaur-Zählkammer bestimmt. Die Restimulation erfolgte mit dendritischen Zellen desselben Spenders wie für die primäre Stimulation, wiederum in Anwesenheit von 1 ng/ml SEB. Die Restimulation erfolgte in 24-Loch Flachboden-Platten mit  $1,5 \times 10^6$  T-Zellen/ml und  $1 \times 10^5$  dendritischen Zellen/ml. Die Konzentration der Blockadereagenzien in der Expansionsphase und in der Restimulation betrug

50 µg/ml. Die Zellüberstände wurden nach 36 h abgenommen und auf Zytokingehalt im ELISA-Assay analysiert.

Die Blockadereagenzien\*, die für primäre Kokulturen und für Restimulationskulturen eingesetzt wurden, sind in Tab. III zusammengefaßt.

Tab. III Blockadereagenzien

Klon	Isotyp	Spezifität	Herkunft	Menge
2A11 IgG1**	muIgG1	Isotyp (Kontr.)	[65]	50 µg/ml
mu CD3δ hu IgG	Chimäre human/murin	Isotyp	[56]	50 µg/ml
mu ICOS hu IgG	Chimäre human/murin	ICOS-L	[56]	50 µg/ml
hu CTLA-4-hu-IgG	Chimäre human/human	CD80/CD86	CRL-10762, ATCC	50 µg/ml
L243	IgG2a	HLA-DR	HB-55, ATCC	50 µg/ml
L307.1	IgG	CD80	Pharmingen	10 µg/ml
IT 2.2	IgG2b	CD86		10 µg/ml
HIL-131	IgG1	ICOS-L	[75]	50 µg/ml

(\*Alle Blockadereagenzien enthielten weniger als 0,6 pg/ml Endotoxin pro µg Protein. Die Bestimmung erfolgte über den LAL-Test, Charles River, Sulzfeld, Deutschland)

(\*\* gerichtet gegen ein synthetisches Peptid)

### 2.2.8 Generierung von ICOS, ICOS-L und CD40L Transfektanten

Human ICOS und ICOS-L wurden in das Expressionsplasmid BCMGS<sub>neo</sub> [69] kloniert. Anschließend wurden murine Ltk<sup>-</sup> Fibroblasten (L-Zellen, freundlicherweise von J. Banchereau zur Verfügung gestellt) mit human ICOS und die Pre-B-Zelllinie 300-19 [76] mit human ICOS-L durch Elektroporation transfiziert. Human ICOS L-Zell-Transfektanten wurden mit dem mAk F44 gegen human ICOS identifiziert und 300-19 Transfektanten mit mu ICOS-hu Ig mittels Durchflußzytometrie. Die Generierung der CD40L L-Zellen erfolgte auf die gleiche Art.

### 2.2.9 Stimulation von dendritischen Zellen mit Zelllinien

Zur Stimulation über ICOS-L oder CD40 wurden unreife Monozyten-generierte dendritische Zellen mit ICOS-transfizierten L-Zellen oder mit CD40L-transfizierten L-Zellen ab Tag 6 für 24 h kokultiviert. Als Kontrolle dienten Wildtyp (WT) L-Zellen. L-Zell-Transfektanten wurden in R10F<sup>+</sup> in großen Zellkulturflaschen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) adhären wachsend gezogen und passagiert, sobald der Flaschenboden zu 80% konfluent war. Die Passagen erfolgten durch Ablösen mit 0,1% Trypsin (Gibco BRL, Eggenstein) + 0,67 mM EDTA (Merck, Darmstadt, Deutschland) und anschließendem Ausverdünnen. Um zu verhindern, daß L-Zellen die Kokulturen mit dendritischen Zellen überwachsen, wurden die L-Zellen vor der Kokultur mit 9000 rad bestrahlt (Blutbestrahlungsgerät, Charité, Humboldt-Universität Berlin). Für Kokulturen wurden die Zellen wie folgt eingesetzt:

ICOS-transfizierten L-Zellen:	1 L-Zelle : 1 DC (Kontrollkultur mit WT L-Zellen ebenso)
CD40L-transfizierten L-Zellen:	1 L-Zelle : 4 DC (Kontrollkultur mit WT L-Zellen ebenso)

### 2.2.10 Stimulation von Zellen durch immobilisierte Antikörper

T-Zellen können über die Bindung von CD3 (assoziiert mit dem T-Zell-Rezeptor) und von kostimulatorischen Molekülen mit monoklonalen Antikörpern stimuliert werden.

Die Stimulation von CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup> T-Zellen erfolgte entweder über CD3 alleine oder CD3 in Kombination mit dem kostimulatorischen Molekül ICOS oder mit dem kostimulatorischen Molekül CD28. Die Antikörper wurden im sogenannten Sandwich-Verfahren auf 24-Loch Kunststoff-Mikrotiterplatten (Nunc) immobilisiert. Zuerst wurden die Platten mit einem Kaninchen anti-Maus-Antiserum (20 µg/ml, 50 µl/Loch) beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mindestens 3 h bei 37°C mit Antikörpern gegen CD3, CD3/CD28 oder CD3/ICOS. Als Kontrolle diente Beschichtung mit dem Isotyp 2A11. Die eingesetzten Konzentrationen sind in Tab. IV aufgeführt. Die Platten wurden erneut zweimal mit PBS gewaschen und die Zellen anschließend in einer Konzentration von  $1,5 \times 10^6$ /ml auf den Platten verteilt.

Tab. IV Immobilisierte Antikörper

<b>mAk</b>	<b>Spezifität</b>	<b>eingesetzte Konzentration</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Herkunft</b>
OKT3	CD3	2 ng/ml	mu IgG2a	CRL 8001
F44	hu ICOS	4 µg/ml	mu IgG1	[63]
hCD28-229	hu CD28	4 µg/ml	mu IgG2a	eigener Ak, nicht publiziert
2A11**	Isotyp IgG1	4 µg/ml	mu IgG1	[65]

(\*\* gerichtet gegen ein synthetisches Peptid)

### 2.3 Durchflußzytometrie

Antigene können auf der Oberfläche von Zellen durch Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörper nachgewiesen werden. Der Fluoreszenzfarbstoff wird durch einen Laser angeregt und die Emission mit einem wellenlängenspezifischen Detektor gemessen. Die fluoreszent markierten Zellen werden in einem Flüssigkeitsstrom vereinzelt und passieren nacheinander zwei Laserstrahlen, einen 488 nm Argonlaser und einen 635 nm Diodenlaser. Dabei werden die Fluorochrome zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt, zum anderen streuen die Zellen das auftreffende Licht. Das in geringem Winkel gestreute und mit der Größe der Zellen korrelierende Licht wird als Vorwärtsstreulicht (*foreward scatter*, FSC), das um 90° reflektierte und mit der Granularität der Zelloberfläche korrelierende Licht als Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) bezeichnet. Über die Anregung mit dem Argonlaser können das Streulicht und die Fluoreszenzen der Wellenlänge 530 nm (F11), 585 nm (F12) und 650 nm (F13), über die Anregung des Diodenlasers die Fluoreszenz der Wellenlänge 661 nm (F14) gemessen werden. Durch die Durchflußzytometrie ist bei einer großen Anzahl von Zellen eine schnelle, sechs Parameter umfassende Analyse möglich.

Die Färbung der Zellen erfolgte in PBS + 2,5% FCS (Biochrom) + 0,1% NaN<sub>3</sub> (FACS-PBS). Vor der Färbung der Zellen mit dem zu koppelnden Antikörper wurden die Zellen mit 2 mg/ml Endobulin in FACS-PBS inkubiert, um Fc-Rezeptoren auf der Zelloberfläche zu blockieren und unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Die Färbung der Zellen erfolgte in einem Volumen von 50 µl auf Rundboden-Mikrotiterplatten mit 10 µg/ml des jeweiligen Antikörpers in FACS-PBS. Die Detektion der Antigene erfolgte entweder über einen direkt an den Primär-Antikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein (FITC, F11), Phycoerythrin (PE, F12) oder Cyanin (Cy) 5 (F14), oder aber über einen Fluorescein-gekoppelten Sekundär-Antikörper gegen Maus-Immunglobulin (IgG) (Jackson Immuno Research Lab., West Grove, PA). Tote Zellen wurden mit 0,3 µg/ml Propidiumiodid (PI, Sigma) über die F1-3 diskriminiert, nekrotische Zellen sind nicht in der Lage PI auszuschleusen und färben sich deshalb rot. PI positive Zellen wurden von der Analyse ausgeschlossen. In Abhängigkeit der Frequenzen positiver Zellen wurden 10<sup>4</sup> bis 10<sup>5</sup> lebende, PI-negative Zellen analysiert.

FSC- und SSC-Signale wurden mit linearer, Fluoreszenz-Signale mit logarithmischer Verstärkung aufgenommen. Die Daten wurden mit dem Programm Cell Quest (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) analysiert. Die Daten wurden entweder als eindimensionale Histogramme, die nur ein Fluoreszenzsignal zeigen, oder als zweidimensionale Punktfeld-Graphen, bei denen jeder Punkt einer Zelle entspricht, dargestellt. Die Expressionsdichte des fluoreszent markierten Antigens

wurde durch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) quantifiziert. Es gibt für die Auswertung der durchflußzytometrischen Daten u. a. zwei Möglichkeiten:

1. Es wird der prozentuale Anteil positiver Zellen in einem Bereich angegeben.
2. Es wird die Expressionstärke des Antigens durch den MFI angegeben. Dies ist z. B. dann sinnvoll, wenn alle Zellen positiv sind, d. h. die gesamte analysierte Zellpopulation eine Verschiebung erfährt. Der MFI-Wert gibt die relative Fluoreszenz-Intensität der analysierten Zellen an. Das ist der Mittelwert über die Fluoreszenzstärke im untersuchten Bereich. Der MFI kann einen Wert von  $0-10^9$  annehmen.

Tab. V Anregungs- und Emissionswellenlängen der Fluoreszenzen

<b>Fluorochrom</b>	<b>Anregungsmaximum (nm)</b>	<b>Emissionsmaximum (nm)</b>	<b>Detektion</b>
FITC	488	525	FL-1
PE	488	575	FL-2
Cy5	633, 635	667	FL-4
Propidiumiodid (PI)	488	620	FL-2/FL-3

Die für die Durchflußzytometrie verwendeten Antikörper zur Färbung der Oberflächenantigene auf Zellen sind in Tab. VI zusammengefaßt. Alle Antikörper ohne Herstellerangaben wurden aus Hybridomüberständen (eigen Hybridome oder ATCC, Manassas, Virginia, USA) aufgereinigt und Fluorochrom- bzw. Biotin-gekoppelt.

### 2.3.1 Durchflußzytometrische Untersuchungen von Kokulturen

Aus der Kokultur stammende T-Zellen und dendritische Zellen wurden durch vorsichtiges Pipettieren und PBS/EDTA voneinander getrennt und in der Durchflußzytometrie über die FSC/SSC Eigenschaften voneinander abgegrenzt. Für die Abgrenzung der T-Zellen von den dendritischen Zellen wurde der T-Zell-spezifische Marker CD3<sup>+</sup> mit dem Cy5-gekoppelten mAk OKT3 gegengefärbt und in der Auswertung zur Diskriminierung der Zellen verwendet.

### 2.3.2 Kalte Blockade

Um die Spezifität der Antikörperbindung an ein Antigen zu kontrollieren, kann die Färbung des Epitops mit dem fluoreszent markierten mAk durch Vorinkubation mit demselben nicht fluoreszent markierten mAk blockiert werden. Dabei wurden die Zellen 5 min vor der Inkubation mit dem fluoreszent markierten Antikörper einem 100-fachen Überschuß des unmarkierten mAks ausgesetzt.

Die Spezifität der ICOS-L Färbung mit dem mAk HIL-131-PE oder mit dem Fusionsprotein mu ICOS hu IgG-PE zu kontrollieren, wurden die Zellen mit 100 µg/ml nicht fluoreszent markierten mAk HIL-131 bzw. mu ICOS hu IgG vorinkubiert.

## 2.3.3 Fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper

Tab. VI Antikörper gegen humane Antigene

Spezifität	Kopplung	Klon	Isotyp	Herkunft
CD1a	Cy5	OKT 6	mu IgG1	CRL 8020
CD3	FITC	OKT 3	mu IgG2a	CRL 8001
CD3	PE	OKT 3	mu IgG2a	CRL 8001
CD4	FITC	91d6	mu IgG2a	[77]
CD4	PE	91d6	mu IgG2a	[77]
CD8	FITC	OKT 8	mu IgG2a	CRL 8014
CD8	PE	OKT 8	mu IgG2a	CRL 8014
CD11c	FITC	3.9	mu IgG1	Serotech
CD14	FITC	63D3	mu IgG1	HB-44
CD14	PE	63D3	mu IgG1	HB-44
CD16	FITC	B73.1	mu IgG1	[78]
CD19	FITC	BU12	mu IgG1	[74]
CD25	FITC	2A3A1H	mu IgG1	HB-8555
CD25	PE	2A3A1H	mu IgG1	HB-8555
CD40	FITC	G28-5	mu IgG1	HB-9110
CD40	PE	G28-5	mu IgG1	HB-9110
CD45RA	FITC	4G11	mu IgG2a	[72]
CD45RO	FITC	UCHL1	mu IgG2a	[73]
CD80	FITC	L307.4	mu IgG1	Pharmingen
CD80	PE	L307.4	mu IgG1	Pharmingen
CD83	FITC	HB15e	mu IgG1	Pharmingen
CD86	FITC	IT2.2	mu IgG2b	Pharmingen
HLA-DR	FITC	L243	mu IgG2a	HB-55
HLA-DR	Cy5	L243	mu IgG2a	HB-55
Glyc A	FITC	10F7MN	mu IgG1	HB-8162
BDCA-2	FITC	AC144	mu IgG1	Miltenyi
BDCA-4	Bio	AD5-17F6	mu IgG1	Miltenyi
ICOS	PE	F44	mu IgG1	[63]
ICOS-L	PE	HIL-93	mu IgG1	[79]
ICOS-L	-	HIL-131	mu IgG1	[75]
ICOS-L	PE	HIL-131	mu IgG1	[75]



## 2.4 Bestimmung von Zytokinen durch ELISA

Der ELISA (*enzyme linked immuno sorbant assay*) basiert auf einer spezifischen Antigenerkennung durch Antikörper. Beim hier verwendeten Sandwich-ELISA wird der 1. Antikörper auf einem Kunststoffträger, einer 96-Loch-Mikrotiterplatte, immobilisiert. Nach intensivem Waschen mit detergenzhaltigem PBS werden freie Bindungsstellen mit einem inerten Protein bei Raumtemperatur abgesättigt und die Platten erneut gewaschen. Anschließend werden die Proben und die Standardverdünnungsreihe des zu messenden Zytokins bei Raumtemperatur auf den Platten inkubiert. Der quantitative Nachweis von gebundenem Antigen bzw. Zytokin erfolgt in mehreren Schritten über eine Farbreaktion. Das Antigen wird nach erneutem Waschen durch einen biotinylierten 2. Antikörper und enzymgekoppeltes Streptavidin, hier Streptavidin-Alkalische Phosphatase, inkubiert. Das Enzym setzt ein farbloses Substrat, hier Teramethylbenzidin (TMB, Sigma), in ein farbiges Produkt um. Die Farbreaktion wird durch die Zugabe von Schwefelsäure ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) gestoppt und kann bei 405 nm photometrisch quantifiziert werden.

Zur enzymimmunologischen Bestimmung verschiedener Zytokine in den Überständen der Kokulturen wurden kommerziell erhältliche Antikörperpaare und Standards verwendet (s. Tab. VII).

Tab. VII Antikörperpaare für ELISA

	<b>1. Antikörper (Klon)</b>	<b>2. Antikörper (Klon)</b>
IL-2-ELISA (Pharmingen)	5344.111	B33-2-Bio
IL-4-ELISA (Biosource)	860A4B3	860F10H12-Bio
IL-5-ELISA (Pharmingen)	Ratte anti-human IL-5	Ratte anti-human IL-5-Bio
IL-6-ELISA (Biosource)	677B6A2	505E23C7-Bio
IL-10-ELISA	JES3-19F1 (ATCC)	JES3-12G8-Bio (Pharmingen)
IL-13-ELISA (Pharmingen)	anti-human IL-13	anti-human IL-13-Bio
IFN- $\gamma$ -ELISA	4SB3 [80]	7R2A4-Bio [81]
TNF- $\alpha$ -ELISA	68B3B3 (Biosource)	68B3C5-Bio (Biosource)

## Rekombinante Standards:

rIL-2 (Peprotech)	:	8 ng/ml - 7,8 pg/ml, 11 Verdünnungen
rIL-4 (Biosource)	:	2 ng/ml - 7,8 pg/ml, 9 Verdünnungen
rIL-5 (Pharmingen)	:	1 ng/ml - 7,8 pg/ml, 8 Verdünnungen
rIL-6 (Biosource)	:	2 ng/ml - 7,8 pg/ml, 9 Verdünnungen
rIL-10 (Biosource)	:	2 ng/ml - 7,8 pg/ml, 9 Verdünnungen
rIL-13 (Pharmingen)	:	2 ng/ml - 7,8 pg/ml, 9 Verdünnungen
rIFN- $\gamma$ (Biosource)	:	4 ng/ml - 7,8 pg/ml, 10 Verdünnungen
rTNF- $\alpha$ (Biosource)	:	4 ng/ml - 7,8 pg/ml, 10 Verdünnungen

Die Nachweisgrenzen der oben aufgeführten ELISA lagen zwischen 10 und 20 pg/ml Zytokin im Zellkulturüberstand.

96-Loch-Mikrotiterplatten (Greiner) wurden mit 50  $\mu$ l/Loch des 1. Antikörpers (0,5 - 5  $\mu$ g/ml) in PBS über Nacht überschichtet. Nach viermaligem Waschen mit 300  $\mu$ l/Loch mit 0,01% Tween 20 in PBS (PBST) wurde 30 min bei Raumtemperatur mit 200  $\mu$ l/Loch PBS/BSA blockiert. Verdünnungsreihen von Standards und Zellkulturüberständen wurden in Zellkulturmedium R10F<sup>+</sup> erstellt und 50  $\mu$ l in jedes Loch gegeben. Es erfolgte eine 120-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Dann wurde die 96-Loch-Platte viermal mit 300  $\mu$ l/Loch mit PBST gewaschen

und anschließend mit dem biotinylierten 2. Antikörper bei einer Konzentration von 0,1 - 2 µg/ml PBS/BSA für 60 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde viermal mit PBST 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 PBST/Loch wurde mit 50 µl/Loch 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)) bei RT inkubiert. Nach Entwicklung des Standards nach 10-30 min wurde die Reaktion mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt und bei 405 nm in einem Mikrotiterplattenphotometer (Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Revelation (Life Science).

## 2.5 Histologie

Histologische Anfärbungen humaner Haut wurden von K. Büchner im unserem Labor durchgeführt und freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die Gewebeproben wurden in 0,9% NaCl in Flüssig-N<sub>2</sub> eingefroren, 8 µm Gefrierschnitte der Haut angefertigt und in Azeton fixiert. Die Schnitte wurden mit dem ICOS-L spezifischen mAk HIL-93 und zum Vergleich mit dem Langerhans-Zell-spezifischen mAk OKT 6 angefärbt, anschließend mit einem biotinylierten Ziegenanti Maus Ak (Dianova, Hamburg) beschickt und mit Streptavidin-Merrettich-Peroxydase Streptavidin POD, Dianova) detektiert. 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC, Sigma) wurde als POD-Substrat verwendet. Kerne wurden mit Hematoxilin (Merck) gegengefärbt.

## 2.6 RNA Isolation und Northern Analyse

RNA-Präparationen und Northern Blot Analysen wurden von H.W. Mages im unserem Labor durchgeführt und freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Die Generierung der dendritischen Zellen erfolgte aus Monozyten. Unreife dendritische Zellen wurden bis Tag 7 in IL-4 und GM-CSF generiert, reife dendritische Zellen wurden ab Tag 7 mit einer Zytokin-Kombination (IL-1β, IL-6, PGE<sub>2</sub>, TNF-α) für 48 h stimuliert. Die Präparation erfolgte aus je 5×10<sup>6</sup> Zellen. Northern Analysen wurde mit 10 µg Gesamt-RNA durchgeführt wie beschrieben [82] mit den folgenden Modifikationen: Die Membran wurde mit 0,1 × SSC, 0,5% SDS für 10 min bei 65°C vorbehandelt und die Hybridisierung in 50% Formamid, 120 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,0, 250 mM NaCl,

---

7% SDS bei 42°C für 24 h durchgeführt. Als Sonde diente eine radioaktiv markierte ICOS-L cDNA, die mit  $2 \times 10^6$  cpm eingesetzt wurde. Für die Autoradiographie wurden X-OMAT AR Filme und ein BioMax Screen® (beide von Kodak, Stuttgart, Deutschland) verwendet.