

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. MATERIAL

2.1.1. Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma
AB-Serum, human	PAN Biotech
Acrylamid-Fertiglösung	Roth
Amphotericin B	Biochrom
APS	Sigma
BSA, 30%ige Lösung	Sigma
DTT	Sigma
EDTA	Sigma
FCS	Biochrom
Ficoll-Hypaque	Amersham Biosciences
Formaldehyd	Sigma
Gentamycin	Biochrom
Glycin	Biorad
HEPES	Invitrogen
Magermilch	Reformhaus
Methanol	Fluka
Natriumazid	Sigma
PBS	Biochrom
Percoll	Amersham Biosciences
PFA	Sigma
PonceauS	Sigma
Saponin	Sigma
SDS	Invitrogen
Szintillationsflüssigkeit, Hionic-Fluor	Perkin-Elmer
TEMED	Fluka

TMB-Tabletten	Sigma
Tris	Biorad
Trypanblau	Biochrom
Tween 20	Sigma
Wasserstoffperoxid	Sigma

2.1.2. Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
ELISA-Platten, Immunomodule	Nunc
FACS-Röhrchen, 12 x 75 mm	BD Falcon
Filterpapier für Zellharvester	ICN Biomedicals
Micro-Schraubröhrchen, 1,5 ml	Sarstedt
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	BD Falcon
Szintillationsröhrchen	Perkin-Elmer
Zellkulturplatte, 24 Vertiefungen	Nunc
Zellkulturplatte, 6 Vertiefungen	Nunc
Zellkulturplatte, 96 Vertiefungen, Flachboden	Nunc
Zellkulturplatte, 96 Vertiefungen, Rundboden	Nunc
Zellkulturplatte, 96 Vertiefungen, Spitzboden	Greiner
Zentrifugenröhrchen, konisch, 15 ml	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen, konisch, 50 ml	Sarstedt

2.1.3. Verwendete Puffer und Zellkulturmedien

DTT-Lösung

150 mg/l DTT in PBS

EDTA-Puffer I

1 mM EDTA

0,5 % BSA in PBS

EDTA-Puffer II (Isolierung von IELs)

7,5 mM EDTA
25 mM HEPES
5% FCS
0,5 % BSA in PBS

FACS-Fix

4% Formaldehyd in PBS

FACS-Puffer

5 % FCS
0,02% Natriumazid in PBS

Laufpuffer SDS-PAGE

192 mM Glycin
25 mM Tris
0,1 % (w/v) SDS

Lymphozytenmedium I

RPMI 1640
+ 5% FCS
+ 2 mM L-Glutamin
+ 100 U/ml Penicillin
+ 100 µg/ml Streptomycin

Lymphozytenmedium II

RPMI 1640
+ 10% FCS
+ 2 mM L-Glutamin
+ 25 mM HEPES
+ 2,5 µg/ml Amphotericin B
+ 50 µg/ml Gentamycin
+ 100 U/ml Penicillin
+ 100 µg/ml Streptomycin
+ 50 µM 2-Mercaptoethanol

1x PBS

137 mM NaCl
2,7 mM KCl
1,5 mM KH₂PO₄
8 mM Na₂HPO₄ in H₂O

Percoll-Lösung

90%ige Percoll-Lösung:
45 ml Percoll
5 ml 10x PBS

70%ige Percoll-Lösung:
17,5 ml 90 %ige Percoll-Lösung
5 ml 1x PBS

Western-Blotpuffer

192 mM Glycin

25 mM Tris

20 % Methanol

0,4 % (w/v) SDS

2.1.4. Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Brutschränke	Heraeus
Durchflusszytometer, FACSCalibur [®]	BD Biosciences
Elektrophorese-Apparatur, MiniProteanII [®]	Biorad
Elektrophorese-Power-Supply, Power Pac 300	Biorad
ELISA-Reader	Tecan Spectra
Flüssigszintillationszähler, Tri-Carb [®] 2000CA	Perkin-Elmer
Magnetrührer	Janke & Kunkel
Megafuge 1.0 R	Heraeus
Mikroskope	Zeiss Axioplan Zeiss Axiovert 35
Multikanalpipette	Costar
Multipipette	Eppendorf
Pipetten, Research, 20 μ l, 200 μ l, 1000 μ l	Eppendorf
Pipettierhilfe, PipetusAkku	Hirschmann Laborgeräte
Röntgenfilm-Entwickler, Curix 60	Agfa
Röntgenfilmkassette, Kodak, Lenex, X-Omatic	Kodak
Sicherheitswerkbank	Heraeus
Thermomixer	Eppendorf
Tischzentrifuge, 5417R	Eppendorf
Tischzentrifuge, Biofuge 13	Heraeus
Trockenschrank, Typ 810	Memmert
Vortex	Heidolph
Warmluftschüttler	B. Braun

Wasserbad	Köttermann
Zellharvester, Titerekt	Flow Laboratories

2.2. METHODEN

2.2.1. Zellbiologische Methoden

Alle Zellkulturarbeiten wurden mit sterilen Lösungen und Geräten in der *Laminar-Flow*-Werkbank durchgeführt. Rhesusaffen- oder humane Zellen wurden soweit nicht anders angegeben, in RPMI 1640 supplementiert mit 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (alle Gibco BRL, Invitrogen, Karlsruhe), 50 µM 2-Mercaptoethanol (Sigma, Taufkirchen) und 10% FCS (Biochrom, Berlin) kultiviert. Das FCS wurde vor Gebrauch zur Inaktivierung der Komplementproteine für 30 min bei 56°C inkubiert. Alle verwendeten Reagenzien und Stimuli wurden vor Gebrauch mit Hilfe des Limulus Amebocyte Lysate (LAL)-Assays (Charles River Endosafe, Charleston, SC, USA) auf mögliche Endotoxinkontaminationen getestet und ausschließlich als negativ befundene Substanzen verwendet.

2.2.1.1. Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung humaner mononukleärer Zellen (PBMCs) aus peripherem Blut wurden Leukozytenkonzentrate (*buffy coats*) von gesunden Spendern verwendet, die vom DRK Blutspendedienst Berlin bezogen wurden. Heparinisiertes oder Zitratblut von Rhesusaffen wurde von adulten Tieren vom Deutschen Primatenzentrum, Göttingen gewonnen. Alle Tiere wurden regelmäßig serologisch kontrolliert und waren seronegativ bezüglich SIV, Typ D Retroviren und STLV-I. Alle Eingriffe an den Tieren entsprachen den Bestimmungen des Deutschen Primatenzentrums.

Die Fraktionierung peripheren Bluts erfolgte mittels Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation. Humanes und Rhesusaffenblut wurden vor dem Auftragen auf den Ficoll-Hypaque-Dichtegradienten in einem Verhältnis von 1:2 mit PBS verdünnt. Das Ficoll-Hypaque wurde vorsichtig mit dem Blut-PBS-

Gemisch überschichtet und 20 min bei 830 g und RT ohne Bremse zentrifugiert. Die PBMCs reichern sich nach der Zentrifugation aufgrund ihrer spezifischen Dichte in der Interphase zwischen Ficoll und Plasma an, während die Erythrozyten, sowie die meisten Granulozyten das Ficoll durchdringen und ein Sediment bilden. Die in der Interphase enthaltenen PBMCs wurden abpipettiert, in PBS gewaschen und anschließend 10 min bei 625 g und 4°C zentrifugiert. Ähnliche Waschschriffe wurden zweimal wiederholt, die Zentrifugation erfolgte 10 min bei 375 g und 4°C. Die Anzahl der Zellen wurde unter einem Lichtmikroskop mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde mit Trypanblau verdünnt und in die Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die Gesamtzellzahl wurde nach folgender Formel berechnet:

$$n \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Volumen der Zellsuspension} \times 1 \times 10^4$$

n = Mittelwert der gezählten Zellen aus 4 Großquadraten

2.2.1.2. Isolierung von Monozyten und Differenzierung zu DCs

Die Isolierung von Monozyten aus PBMCs erfolgte über eine positive Selektion von CD14⁺-Zellen mittels Mikromagnetpartikel-gekoppelter anti-CD14-Antikörper (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach). Dazu wurden die PBMCs in EDTA-Puffer I in einer Konzentration von 1x10⁸ Zellen/ml resuspendiert und mit 50 µl Mikromagnetpartikel-gekoppeltem anti-CD14-Antikörper/1x10⁸ Zellen versetzt. Nach 15 min Inkubation bei 4°C wurden die Zellen mit EDTA-Puffer I gewaschen. Die Separation der CD14⁺ Zellen erfolgte über eine MS-Trennsäule (Miltenyi Biotech). Die Säule wurde zunächst im Magnetfeld mit 500 µl EDTA-Puffer I durchgespült. Dann wurden 1x10⁸ Zellen/Säule gegeben und anschließend die Säule dreimal mit 500 µl EDTA-Puffer I durchgespült. Die in der Säule verbliebenen CD14⁺ Zellen wurden nach Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld mit 500 µl EDTA-Puffer I eluiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Medium gewaschen und dazwischen 10 min bei 375 g und 4°C zentrifugiert. Rhesusaffen-Monozyten wurden in RPMI 1640 supplementiert mit 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 50 µM 2-Mercaptoethanol und 5% humanem AB Serum (PAN Biotech, Aidenbach), in einer Dichte von 1,5 -

2×10^6 Zellen/3 ml in Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen für 6 Tage bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Humane Monozyten wurden unter den oben beschriebenen Bedingungen in einer Dichte von 3×10^6 Zellen/3 ml in Zellkulturmedium, welches 10 % FCS anstatt humanem AB Serums enthielt, inkubiert. Die Differenzierung der dendritischen Zellen aus Monozyten erfolgte wie beschrieben (80) in Gegenwart von 1000 U/ml rhGM-CSF (Leukine \square , Berlex Laboratories, Richmond, CA, USA) und 100 U/ml rhIL-4 (R&D Systems, Wiesbaden). Sowohl Rhesusaffen- als auch humane Zellen erhielten an den Tagen 2, 4 und 6 erneut GM-CSF und IL-4 in derselben Dosis wie oben beschrieben in 200 μl frischem Medium/Vertiefung. Nach 6 Tagen standen zunächst unreife DCs zur Verfügung die durch Zugabe unterschiedlicher Stimuli differenziert wurden (Abbildung 5).

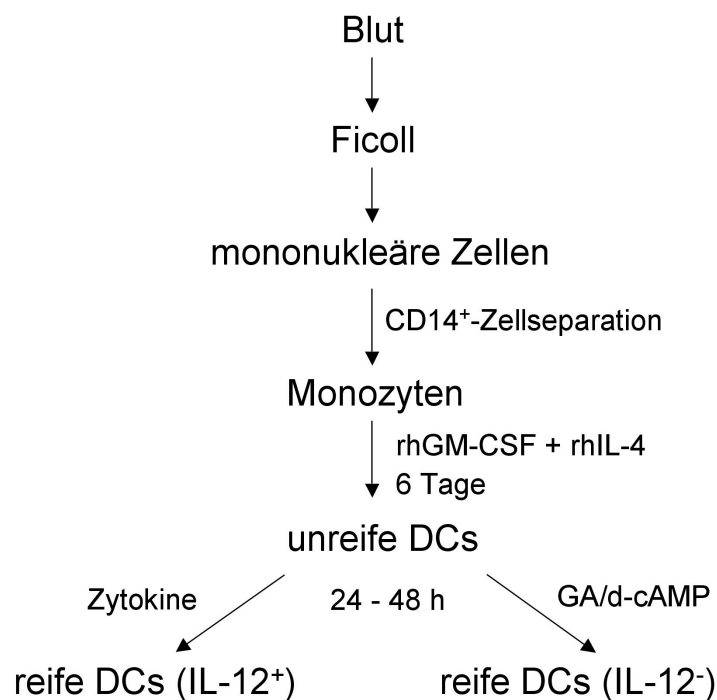


Abbildung 5: Gewinnung unreifer und reifer DCs aus monozytären Vorläuferzellen aus peripherem Blut von Menschen und Rhesusaffen.

2.2.1.3. Stimulierung von DCs

Unreife humane und Rhesusaffen-DCs wurden am Tag 6 nach Isolierung der Monozyten geerntet und je nach verfügbarer Zellzahl in Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen in einer Dichte von 5×10^5 Zellen/Vertiefung in 1 ml Gesamtvolumen

oder in Rundbodenplatten mit 96 Vertiefungen in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/Vertiefung in 200 μ l Gesamtvolumen ausgesät. Die unreifen DCs wurden für 24 - 48 h mit folgenden Stimuli inkubiert:

- Zytokine (10 ng/ml rhIL-6, 10 ng/ml rhIL-1 α , 10 ng/ml rhTNF- α) (alle R&D) und 1 μ M Prostaglandin E₂ (Sigma)
- 1 μ g/ml und 10 μ g/ml Cholera toxin (Calbiochem/Merck, Darmstadt)
- 10 μ M und 100 μ M Forskolin (Sigma)
- 10 μ g/ml Glatirameracetat (GA, Copaxone \square , Aventis Pharma, Frankfurt)
- 1 mM dibutyryl-cAMP (d-cAMP, Sigma)
- GA in Kombination mit d-cAMP
- CD40-Ligand-Multimer (20x konzentrierter Zellkulturüberstand CD40L-transfizierter 293T-Zellen, freundlicherweise von Prof. Dr. K. Überla, Ruhr Universität Bochum, zur Verfügung gestellt).

2.2.1.4. GM-CSF-Neutralisationsassay

Humane DCs wurden aus Monozyten mit rhGM-CSF und rhIL-4 nach dem Standardprotokoll differenziert (siehe 2.2.1.2). Zur Untersuchung des Neutralisierungspotentials der anti-GM-CSF-Antikörper rhGM-CSF-behandelter Rhesusaffen, wurden die Monozytenkulturen mit dem Plasma eines Tieres nach der zweiten rhGM-CSF-Behandlung oder eines unbehandelten Rhesusaffen in einer Verdünnung von 1:20 versetzt. An den Tagen 2, 4 und 6 erhielten die Zellen erneut GM-CSF und IL-4 sowie das jeweilige verdünnte Plasma in 200 μ l frischem Medium. Nach 7 Tagen wurde die Größe, Granularität und CD14-Expression der Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

2.2.1.5. Isolierung von T-Zellen

Rhesusaffen und humane T-Zellen wurden aus PBMCs oder CD14-depletierten Zellen über eine Selektion von HLA-DR negativen Zellen mit Hilfe Mikromagnetpartikel-gekoppelter Antikörper separiert (137, 138). Dazu wurden 1×10^8 PBMCs/ml mit FITC-konjugiertem monoklonalen Antikörper gegen humanes

HLA-DR (1:50 Verdünnung, BD Pharmingen) für 15 min bei 4°C in EDTA-Puffer I inkubiert. Die Zellen wurden dreimal mit EDTA-Puffer I gewaschen, gefolgt von einer Inkubation mit einem anti-FITC-Antikörper, der an Mikromagnetpartikel gekoppelt ist (Miltenyi Biotech) für 15 min bei 4°C. Die HLA-DR negativen Zellen wurden über eine MS-Trennsäule (Miltenyi Biotech) von den HLA-DR positiven Zellen getrennt und anschließend dreimal mit Medium gewaschen. Die isolierten Zellen wurden als T-Lymphozyten in allogenen oder autologen gemischten Leukozytenreaktionen verwendet. Die Reinheit der T-Lymphozytenpräparation wurde routinemäßig durch eine durchflusszytometrische Analyse mit Hilfe PE-konjugierter mAbs gegen CD3, CD14, CD20 überprüft und betrug $\geq 90\%$ bezogen auf CD3 als T-Lymphozytenmarker.

2.2.1.6. Isolierung naiver CD4⁺-T-Zellen

Die Isolierung naiver CD4⁺-T-Zellen erfolgte aus Nabelschnurblut, welches freundlicherweise von der Abteilung für Geburtshilfe und Gynäkologie des St. Joseph-Krankenhauses in Berlin-Tempelhof zur Verfügung gestellt wurde. Frisch isolierte PBMCs wurden in EDTA-Puffer I in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/80 μ l resuspendiert und mit 20 μ l Mikromagnetpartikel-gekoppeltem anti-CD4-Antikörper/ 1×10^7 Zellen (Miltenyi Biotech) für 15 min bei 4°C versetzt. Nach einmaligem Waschen mit EDTA-Puffer I und anschließender Zentrifugation für 10 min bei 375 g und 4°C wurde die Zellsuspension zur Separierung CD4-markierter Zellen auf eine magnetische MS-Säule gegeben (Miltenyi Biotech). Der Phänotyp der isolierten Zellen wurde mit Hilfe PE- oder FITC-konjugierter mAbs gegen CD3, CD4, CD14, CD20 durchflusszytometrisch analysiert. Die Reinheit der Zellpräparationen lag bei $\geq 95\%$ bezogen auf CD4.

2.2.1.7. Endozytoseassay

Um die Kapazität GA/d-cAMP- oder zytokinbehandelter Rhesusaffen-DCs im Bezug auf die Aufnahme von Antigenen über Endozytose zu vergleichen, wurden fluorochrommarkierte Tracer (Dextran-FITC und Transferrin-FITC) verwendet (137). Dextran wird über Makropinozytose durch die DCs aufgenommen,

Transferrin wird rezeptorvermittelt endozytiert (143). Rhesusaffen-DCs wurden für 48 h mit GA/d-cAMP, Zytokinen oder Medium inkubiert und dann in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß in einer Zellzahl von $3 \times 10^4/50 \mu\text{l}$ transferiert. Die Zellen wurden für 30 min auf Eis äquilibriert und anschließend bei 37°C oder bei 4°C in der Gegenwart von 10 $\mu\text{g/ml}$ Dextran-FITC oder 20 $\mu\text{g/ml}$ Transferrin-FITC (beide Molecular Probes, Invitrogen) für weitere 30 min inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen, die ohne fluorochrommarkierte Tracer inkubiert wurden. Um die simultane Reifung und Antigenaufnahme zu simulieren, wurden unreife Rhesusaffen-DCs für 30 min mit den oben aufgeführten Stimuli behandelt und gleichzeitig mit den fluorochrommarkierten Tracern inkubiert. Anschließend wurden die Zellen viermal mit eiskaltem Medium gewaschen, mit 10% Formalin/PBS fixiert und durchflusszytometrisch analysiert.

2.2.1.8. Antigen-spezifischer Proliferationsassay

Im Proliferationsassay wird der Grad der Aktivierung immunkompetenter Zellen über das Ausmaß der Proliferation bestimmt. Die proliferative Kapazität der Zellen wird durch Zugabe radioaktivmarkierten Thymidins bestimmt. Der Thymidineinbau liefert ein quantitatives Maß für die DNA-Syntheserate, die direkt proportional zur Zellteilungsrate ist. Zur Bestimmung der antigen-spezifischen T-Zellproliferation im peripheren Blut von Rhesusaffen wurden die PBMCs in 3-fach-Ansätzen in Rundbodenzellkulturplatten mit 96 Vertiefungen in einer Zellzahl von 1×10^5 Zellen/Vertiefung in 200 μl Gesamtvolumen ausgesät. Als Antigen wurde 100 $\mu\text{g/ml}$ KLH (Calbiochem) verwendet. Nach 48 h wurden 100 μl Überstand/Vertiefung für die Bestimmung sezernierter Zytokine entnommen und bei -80°C eingefroren. Nach 5 Tagen wurde tritiummarkiertes Thymidin (1 $\mu\text{Ci/Vertiefung}$, Perkin-Elmer, Boston, USA) zugegeben und nach weiteren 16 h Inkubation die T-Zellproliferation in einem Flüssigszintillationszähler (Tri-Carb®2000CA, Perkin-Elmer) gemessen. Als Positivkontrolle wurden identische Kulturen mit 5 ng/ml *Staphylococcus* Enterotoxin B (SEB, Toxin Technology Inc., Sarasota, FL, USA) und 5 $\mu\text{g/ml}$ Concanavalin A (Sigma) angesetzt, bei denen wegen der unterschiedlichen Kinetik der Proliferation diese bereits nach 3 Tagen

bestimmt wurde. Ansätze mit Zellen im Medium dienten jeweils als Negativkontrolle.

2.2.1.9. Allogene gemischte Leukozytenreaktion

Die gemischte Leukozytenreaktion (mixed leukocyte reaction, MLR) liefert eine Aussage über die Fähigkeit unterschiedlich stimulierter DCs, T-Lymphozyten antigenunspezifisch zu aktivieren und zur Proliferation anzuregen. In einer allogenen MLR werden T-Lymphozyten eines Spenders (Isolierung siehe 2.2.1.5) mit DCs eines anderen Spenders oder mit Rhesusaffen-DCs (xenogene MLR) kokultiviert (138, 144, 145). Nach 48 h Inkubation mit Zytokinen oder GA/d-cAMP wurden die DCs geerntet, die Zellzahlen bestimmt und die Zellen in absteigenden Zahlenverhältnis mit 2×10^5 allogenen T-Lymphozyten in 3-fach-Ansätzen in einer Flachbodenzellkulturplatte mit 96 Vertiefungen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Ansätze mit T-Zellen ohne Zugabe von DCs dienten als Kontrolle der spontanen T-Zellproliferation. Nach 5 Tagen wurde tritiummarkiertes Thymidin (1 µCi/Vertiefung) zu den DC-T-Zellkokulturen gegeben und die Inkorporation, die proportional zu der T-Zellproliferation ist, wurde nach weiteren 16 h Inkubation in einem Flüssigszintillationszähler gemessen.

2.2.1.10. ELISPOT-Assay

Der ELISPOT-Assay erlaubt den Nachweis und die Quantifizierung zytokinsezenerender Zellen in einer Einzelzellsuspension. Zum Nachweis IFN- γ produzierender Zellen in PBMCs oder mukosalen Leukozyten von Rhesusaffen wurden kommerziell erhältliche ELISPOT-Assays (U-Cytech, Utrecht, Niederlande) eingesetzt. Transparente Polystyrene-Flachbodenzellkulturplatten mit 96 Vertiefungen wurden mit 100 µl der Coating-Antikörperverdünnung in PBS pro Vertiefung über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten unter sterilen Bedingungen mit dem Waschpuffer (PBS/0,05% Tween 20) 10 Mal gewaschen und mit 200 µl Assay-Puffer (PBS/1% BSA)/Vertiefung für 1 h bei 37°C geblockt. Die Platten wurden ausgeschlagen und 2×10^5 Zellen/Vertiefung in 3-fach-Ansätzen in die Platten pipettiert. Für antigenspezifische Stimulation der

Zellen SIV-infizierter Rhesusaffen wurde ein SIVp26-Peptidpool (5 µg/ml, ARP714.1-22, freundlicherweise von Dr. Christiane Stahl-Hennig, DPZ, Göttingen zur Verfügung gestellt) verwendet. Zellen im Medium ohne Stimuluszugabe dienten als Negativkontrolle. Als Positivkontrolle wurden 5×10^4 Zellen/Vertiefung mit 5 ng/ml SEB (Toxin Technology Inc.) und zur Kontrolle die identische Anzahl von Zellen im Medium ohne Stimuluszugabe angesetzt. Nach mindestens 24 h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Überstände der Platten dekantiert und die Zellen durch Zugabe von 200 µl destilliertes Wasser/Vertiefung auf Eis lysiert. Anschließend wurden die Platten 10 Mal gewaschen und 100 µl der Detektor-Antikörperverdünnung in Assay-Puffer/Vertiefung hinzugefügt. Nach einer Inkubation für 1 h bei 37°C wurden die Platten 6 Mal gewaschen, mit 50 µl GABA-Verdünnung in Assay-Puffer/Vertiefung beschickt und 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Platten erneut 6 Mal gewaschen und mit 30 µl/Vertiefung einer 1:1 Mischung von Aktivator I und II für 15-30 min bei RT unter Lichtausschluss bis zur Entwicklung sichtbarer Spots in den Vertiefungen der Positivkontrollen inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von destilliertem Wasser gestoppt, die Platte luftgetrocknet und die Anzahl der Spots unter einem Lichtmikroskop bestimmt. Die Anzahl der Spots in den Vertiefungen der Positivkontrollen wurde auf 2×10^5 Zellen extrapoliert.

2.2.1.11. Stimulierung von T-Zellen durch antigenbeladene DCs

DCs wurden aus Monozyten KLH-immunisierter Rhesusaffen oder BCG (*Bacille Calmette-Guerin*)-immunisierter gesunder, humaner Spender gewonnen. Die DCs wurden mit GA/d-cAMP oder Zytokinen in der Gegenwart von 10 µg/ml KLH bzw. 5 µg/ml PPD (*purified protein derivative*, Proteinantigen von *Mycobacterium tuberculosis*) für 48 h stimuliert. GA/d-cAMP oder zytokinbehandelte DCs ohne Antigenzugabe dienten als Kontrolle. Anschließend wurden die DCs in absteigendem Zahlenverhältnis mit 2×10^5 autologen T-Lymphozyten in 3-fach-Ansätzen in einer Flachbodenzellkulturplatte mit 96 Vertiefungen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. T-Lymphozyten alleine (2×10^5 /Vertiefung) dienten als Kontrollen für spontane Proliferation. Am Tag 5 der DC-T-Zellkokulturen wurden

Zellkulturüberstände für die Bestimmung sezernierter Zytokine entnommen und anschließend tritiummarkiertes Thymidin (1 $\mu\text{Ci}/\text{Vertiefung}$) zugegeben. Nach 16 h Inkubation wurde die T-Zellproliferation in einem Flüssigszintillationszähler gemessen.

2.2.1.12. Priming und Polarisierung naiver T-Zellen

Naive CD4^+ -T-Zellen wurden wie unter 2.2.1.6 beschrieben isoliert. 4×10^4 GA/d-cAMP- oder zytokinaktivierter Rhesusaffen-DCs wurden mit 1×10^6 naiven CD4^+ -T-Zellen in 2 ml Gesamtvolumen in einer Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen kultiviert. Am Tag 5 der Kokultur wurden 50 U/ml rhIL-2 (Proleukin[□], Chiron, München) hinzugefügt und die Zellen für weitere 9 Tage expandiert. Nach insgesamt 14 Tagen wurden die Zellen geerntet, einmal mit Medium gewaschen und mit 10 ng/ml PMA und 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ionomycin (beide Sigma) für 6 h restimuliert. Nach 1 h wurde 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Brefeldin A (Sigma) hinzugegeben, welches die intrazellulären Transportmechanismen inhibiert und somit dazu führt, dass Zytokine nicht sezerniert werden und sich im Golgi-Apparat anreichern. Die IFN- γ -Produktion aktivierter CD69^+ T-Lymphozyten wurde dann intrazellulär auf Einzelzellebene durchflusszytometrisch analysiert.

2.2.1.13. Gewinnung KLH-spezifischer T-Zelllinien

KLH-spezifische T-Zelllinien wurden wie in früheren Studien beschrieben gewonnen (146). PBMCs KLH-immunisierter Rhesusaffen wurden in Flachbodenzellkulturplatten mit 96 Vertiefungen in einer Dichte von 5×10^5 Zellen/Vertiefung in 200 μl Gesamtvolumen in Gegenwart von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ KLH bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Am Tag 5 wurden 50 U/ml rhIL-2 (Proleukin[□], Chiron) hinzugefügt und die T-Zellen bis Tag 20 in IL-2-haltigem Medium expandiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet, gezählt und 1×10^6 Zellen/Vertiefung in einer Rundbodenzellkulturplatte mit 96 Vertiefungen platziert. Die Zellen wurden mit 10 ng/ml PMA und 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ionomycin (beide Sigma) für 6 h restimuliert, wobei 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Brefeldin A (Sigma) nach 1 h hinzugegeben wurde. Anschließend wurde die IFN- γ , TNF- α , IL-4- und

IL-10-Produktion der CD3⁺CD8⁻ T-Lymphozyten auf intrazellulärer Ebene durchflusszytometrisch analysiert.

2.2.1.14. Behandlung von Rhesusaffen mit GM-CSF oder G-CSF

Reinjektionsexperimente mit *ex vivo* gewonnenen Rhesusaffen-DCs erfordern eine relativ große Anzahl von Zellen ($> 5 \times 10^5$). Rhesusaffen wurden zur Mobilisierung von Monozyten mit rhGM-CSF (Leukomax[□], Novartis Pharma, Nürnberg) oder rhG-CSF (Neupogen[□], Amgen, München) behandelt. Die Tiere erhielten über 9 Tage subkutane Injektionen mit einer täglichen Dosis von 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht des jeweiligen Zytokins in einem Volumen von 1 ml. Am neunten Tag der Behandlung wurde den Tieren ca. 50 ml Blut entnommen und daraus Monozyten isoliert (siehe 2.2.1.2).

2.2.1.15. Reinjektion fluorochrommarkierter oder antigenbeladener DCs

Um die Migration GA/d-cAMP-stimulierter Rhesusaffen-DCs nach Reinjektion *in vivo* zu untersuchen wurden die Zellen mit 5-Chloromethylfluoreszeindiacetat (CMFDA, CellTracker[□] Green) oder 5(6)-(((4-Chlormethyl)benzoyl)amino)tetramethylrhodamin (CMTMR, CellTracker[□] Orange, beide Molecular Probes, Invitrogen), Fluoreszenzfarbstoffen, die sich in die Zellmembran lebender Zellen einlagern, markiert (147). Rhesusaffen-DCs wurden für 24 h mit GA/d-cAMP oder Zytokinen stimuliert und anschließend nach Herstellerangaben mit CMFDA oder CMTMR gefärbt. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und gezählt. Ein Aliquot der fluorochrommarkierten DCs wurde bis zum Zeitpunkt der Entnahme der regionären drainierenden Lymphknoten (36 h) *in vitro* weiter inkubiert und anschließend zur Kontrolle der Fluoreszenzfarbstofffärbung und des Reifegrades der DCs durchflusszytometrisch analysiert. Hierzu wurden die zuvor CMFDA-markierten DCs mit einem PE-gekoppelten anti-CD83-Antikörper und die CMTMR-markierten DCs mit einem FITC-gekoppelten anti-CD86-Antikörper gefärbt.

Der Transport der Zellen in das Deutsche Primaten Zentrum nach Göttingen erfolgte auf Eis in PBS. Dort wurden die Zellen einmal zentrifugiert, in 1 ml PBS

resuspendiert und in eine 1-ml-Spritze transferiert. Die fluorochrommarkierten DCs wurden subkutan oder intradermal an drei unterschiedlichen Stellen (Gesamtvolumen 1 ml) in ca. 1 bis 2 cm Entfernung von tastbaren axillären oder inguinalen Lymphknoten injiziert. 36 h nach Injektion der Zellen wurden die drainierenden Lymphknoten in der Nähe der Injektionsstelle chirurgisch entfernt, in OCT-Medium (TissueTek[□], Invitrogen) eingebettet, schockgefroren und bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

Um antigenspezifische Immunantworten *in vivo* zu untersuchen, wurden Rhesusaffen-DCs mit GA/d-cAMP oder Zytokinen für 24 h aktiviert und simultan mit 10 µg/ml KLH als Proteinantigen beladen. Um nicht endozytiertes KLH sowie die Stimuli zu entfernen wurden die Zellen anschließend mit PBS gewaschen. Die antigenbeladenen DCs wurden wie oben beschrieben in das DPZ nach Göttingen transportiert und dort den Spendertieren intradermal injiziert. Um mögliche Booster-Effekte zu evaluieren wurde die Behandlung mit KLH-beladenen DCs bis zu dreimal wiederholt.

2.2.1.16. Immunhistochemische Färbung von Lymphknoten

Um die CMFDA- oder CMTMR-gefärbten DCs in den Rhesusaffen-Lymphknoten nachzuweisen, wurden die schockgefrorenen Lymphknoten mit Hilfe eines Kryostats in 8-10 µm Sektionen geschnitten. Die Schnitte wurden in 95%igem Alkohol für 30 bis 60 Sekunden fixiert, in Fluoromount G (Southern Biotech, Birmingham, Alabama, USA) eingebettet und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Um die Lokalisation der CMFDA-gefärbten DCs in den Lymphknoten besser zu visualisieren, wurden einige Schnitte mit Hilfe der Immunhistochemie evaluiert. Hierfür wurden die Kryostatschnitte mit 2% Paraformaldehyd für 10 min bei RT fixiert und anschließend mit primärem Antikörper gegen Fluoreszein (Molecular Probes, Invitrogen) nach Herstellerangaben inkubiert. Die Bindung der Antikörper wurde mit Hilfe der Alkalische-Phosphatase-anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP)-Methode sichtbar gemacht, wobei Neu-Fuchsin (Sigma) als Chromogen verwendet wurde. Die Schnitte wurden auf das Vorhandensein Fluoreszein-positiver Zellen untersucht, mit Hämalaun gegengefärbt und

eingebettet. Einige Schnitte wurden zur Demaskierung von Antigenen unter Druck in 0,01 M Natriumcitrat-Lösung (pH 6) für 1 min gekocht und anschließend mit primären Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD83 oder CD1a (beide BD Biosciences) über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Kaninchen-anti-Maus-IgG, DAKO, Hamburg) fand für 30 min bei RT statt, gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation bei RT mit dem APAAP-Komplex (DAKO). Um die immunhistologische Färbung zu verstärken wurde die Inkubation mit dem sekundären Antikörper und dem APAAP-Komplex für 10 min bei RT wiederholt. Anschließend wurden die CD83- bzw. CD1a-positiven Zellen mit Fast Blue (Sigma) als Chromogen visualisiert.

2.2.1.17. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit, Oberflächenmoleküle oder intrazelluläre Strukturen darzustellen und quantitativ auf Einzelzellebene zu erfassen. Dabei werden die zu untersuchenden Zellen mit fluorochromgekoppelten Antikörpern gegen Oberflächen- oder intrazelluläre Strukturen markiert und in einem Flüssigkeitsstrom einzeln durch einen fokussierten Laserstrahl (Argon, $\lambda=488$ nm oder He-Ne, $\lambda=633$ nm) geleitet. Zelleigenschaften wie Form, Größe, intrazelluläre Granula und Membranbeschaffenheit induzieren eine Lichtstreuung, die von je einer Linse in Verlaufsrichtung des Laserstrahls (Vorwärtsstreulicht) und einer rechtwinklig dazu angeordneten (Seitwärtsstreulicht) gesammelt und photometrisch erfasst wird. Das Vorwärtsstreulicht wird durch die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht durch die Granularität bestimmt. Die zu analysierende Zellpopulation kann anhand der morphologischen Eigenschaften näher eingegrenzt und auf spezifische Fluoreszenzeigenschaften untersucht werden.

Der Laserstrahl regt den an den Antikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff zur Emission von Lichtquanten definierter Wellenlängen an, die durch eine Linse gesammelt werden. Das gesammelte Licht wird durch Filter nach Wellenlängenbereichen getrennt und zu unterschiedlichen Detektoren gelenkt. Für jeden unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff wird ein spezifisches Signal erzeugt, und so können die Signale verschiedener Fluorochrome bei der Mehrfarbenanalyse

getrennt akquiriert und quantitativ ausgewertet werden. Die Intensität der gemessenen Fluoreszenz ist dabei proportional zur Anzahl pro Zelle gebundener Antikörper und damit zur Anzahl untersuchter Oberflächen- oder intrazellulärer Strukturen.

Durchflusszytometrische Analyse von Oberflächenmarkern

Vor der durchflusszytometrischen Färbung wurden die Zellen zunächst mit FACS-Puffer gewaschen und anschließend bei 4°C für 30 min unter Lichtausschluss mit den entsprechenden fluorochrommarkierten Antikörpern in einem Volumen von 100 μ l in einer Spitzbodenplatte mit 96 Vertiefungen in FACS-Puffer inkubiert. Die Bestimmung der unspezifischen Färbung der Zellen erfolgte über einen unspezifisch bindenden Antikörper gleichen Isotyps (Isotypkontrolle). Nach dreimaligem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Zellen mit FACS-Fix für 30 min bei 4°C fixiert und anschließend auf einem FACSCalibur[®] Durchflusszytometer unter Verwendung der CELLQuestPro[®] Software (Beckton Dickinson, Heidelberg) analysiert.

Fluoreszenzmarkierung intrazellulärer Strukturen

Zur Markierung intrazellulärer Strukturen ist es notwendig, die Zellmembran für den Durchtritt der Antikörper zu permeabilisieren. Um die Zellintegrität während des Permeabilisierungsvorgangs zu erhalten, wurden die Zellen zunächst mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS für 30 min fixiert. Danach wurden die Zellen einmal mit FACS-Puffer gewaschen und zweimal mit 0,5 % Saponinlösung (Sigma) permeabilisiert. Die Inkubation mit dem fluorochrommarkierten Antikörper erfolgte für 1 h bei RT in 0,5 % Saponinlösung unter Lichtausschluss. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 0,5 % Saponinlösung gewaschen und mit 4% Formalinlösung für 30 min bei 4°C fixiert. Die Analyse erfolgte auf einem FACSCalibur[®] Durchflusszytometer unter Verwendung der CELLQuestPro[®] Software (Beckton Dickinson).

Bei der Bestimmung intrazellulärer Zytokine wurden die Zellen mit 10 μ g/ml Brefeldin A (Sigma) für 5 h vorinkubiert.

2. Material und Methoden

Folgende direkt markierte Antikörper, wurden für durchflusszytometrische Färbungen eingesetzt:

Antigen	Fluorochrom	Klon	Isotyp (Maus)	Verdünnung	Firma
CD3	PE/APC	SP34	IgG ₃	1:50	BD Pharmingen
CD4	FITC/PE	M-T477	IgG _{2a}	1:20	BD Pharmingen
CD8	FITC/PE/APC	SK1	IgG ₁	1:50	BD Biosciences
CD11b	FITC	VIM12	IgG ₁	1:20	Caltag
CD11c	PE	S-HCL-3	IgG _{2b}	1:50	BD Pharmingen
CD14	FITC	TüK4	IgG _{2a}	1:20	Caltag
CD14	PE	M \square P9	IgG _{2b}	1:50	BD Biosciences
CD16	FITC	3G8	IgG ₁	1:10	Caltag
CD20	PE	L27	IgG ₁	1:20	BD Biosciences
CD25	PE	2A3	IgG ₁	1:50	BD Biosciences
CD32	FITC	FLI8.26	IgG _{2b}	1:10	BD Pharmingen
CD40	PE	MAb89	IgG ₁	1:50	Immunotech
CD64	FITC	10.jun	IgG ₁	1:20	Biozol
CD69	PE-Cy5	CH/4	IgG _{2a}	1:20	Caltag
CD80	PE	L307.4	IgG ₁	1:50	BD Biosciences
CD83	PE	HB15e	IgG ₁	1:50	Caltag
CD86	PE	2331	IgG ₁	1:50	BD Pharmingen
CCR-7	PE	150503	IgG _{2a}	1:20	R&D
Foxp-3	PE	PCH101	IgG _{2a} *	1:10	eBiosciences
HLA-DR	FITC/PE	L243	IgG _{2a}	1:100	BD Biosciences
IFN- \square	PE	4S.B3	IgG ₁	1:50	BD Pharmingen
IL-10	PE	JES3-9D7	IgG ₁	1:50	BD Pharmingen
IL-4	PE	8D4-8	IgG ₁	1:50	BD Pharmingen
TNF- \square	PE	MAb11	IgG ₁	1:50	BD Pharmingen
Simultest \square	FITC	X40	IgG ₁	1:50	BD Biosciences
Isotypkontrolle	PE	X39	IgG _{2a}		
Isotypkontrolle	FITC	MOPC-21	IgG ₁	1:20	Caltag
	PE	5.205	IgG _{2a}		
	Tri-Color \square	5.205	IgG _{2a}		
Isotypkontrolle	APC	27-35	IgG _{2b}	1:50	BD Pharmingen
Isotypkontrolle	PE	R35-95	IgG _{2a} *	1:10	BD Pharmingen

*Ratte

2.2.1.18. Bestimmung der Zytokinproduktion

Die Sekretion von IL-12p40, IL-12p70, IL-10, IL-23 und CCL3 wurde in DC-Zellkulturüberständen nach Inkubation mit GA/d-cAMP und Zytokinen oder nach anschließender Restimulierung mit CD40-Liganden-Multimeren bestimmt. Die Produktion von IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10, IL-17 und TNF- α wurde in den Zellkulturüberständen der DC-Kokulturen mit autologen und allogenen T-Zellen oder in Zellkulturüberständen stimulierter PBMCs quantifiziert. Zellfreie Überstände der entsprechenden Kulturen wurden nach der Entnahme bis zur Analyse bei -80°C aufbewahrt. Zur Anwendung kamen kommerziell erhältliche Sandwich-ELISA-Kits (IL-12p40, IL-12p70, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10, TNF- α alle U-Cytech, Utrecht, Niederlande; CCL3, Antigenix America, Huntington, NY, USA; IL-23 und IL-17, eBioscience, San Diego, CA, USA).

2.2.1.19. Isolierung mukosaler Leukozyten aus Biopaten oder Resektaten von Rhesusaffen

Mukosale Leukozyten wurden aus Magen-Biopaten oder nach Tötung der Tiere aus Magen-, Dünndarm- (Jejunum, Ileum), Colon- und Rektum-Resektaten gewonnen. Die Resektate wurden zunächst zur Entfernung der Mukusschicht in DTT-Lösung für 15 min bei 37°C und 120 rpm geschüttelt und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Die Gewebestücke wurden auf einer Korkplatte fixiert und die Mukosa von der Submukosaschicht mit einem Skalpell getrennt. Die Mukosa wurde in ca. 1x1 cm große Stücke geschnitten und in 100 ml Lymphozytenmedium II mit 24 U/ml Collagenase D, 100 μ g/ml DNase (beide Roche) und 100 μ g/ml Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (Sigma) in einem Erlenmeyer-Kolben über Nacht bei 37°C und 200 rpm geschüttelt und anschließend 60 min bei RT ohne Schütteln inkubiert. Die verdauten Gewebestücke wurden mit dem Kolben einer 10 ml-Spritze durch ein Stahlsieb gerieben und das Sieb mehrmals mit Lymphozytenmedium II gespült. Nach einem Zentrifugationsschritt für 10 min bei 625 g und RT wurden die Zellen in Lymphozytenmedium II resuspendiert und in einem Verhältnis von 4:1 mit einer 15%-igen Percoll-Lösung gemischt. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 625 g und RT. Das Zellpellet wurde im Lymphozytenmedium II resuspendiert und

für 10 min bei 375 g und RT zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 20 ml Lymphozytenmedium II resuspendiert und vorsichtig auf 15 ml Ficoll geschichtet. Es folgte eine Zentrifugation für 20 min bei 1200 g und RT. Die Interphase wurde vorsichtig abpipettiert, in Lymphozytenmedium II aufgenommen und für 10 min bei 375 g und 4°C zentrifugiert. Danach wurde das Zellpellet in Lymphozytenmedium II resuspendiert und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Die Biopate (6-18 pro Tier) wurden in PBS aus dem Deutschen Primatenzentrum in Göttingen transportiert und nach Erhalt einmal mit 20 ml Lymphozytenmedium II gewaschen. Zur Isolierung der IELs wurden die Biopate 30 min bei 37°C und 200 rpm in EDTA-Lösung II geschüttelt. Diese Prozedur wurde insgesamt dreimal wiederholt und die Überstände auf Eis gesammelt. Anschließend wurde die Zellsuspension 10 min bei 840 g und 4°C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde zweimal mit PBS gewaschen und dazwischen wie oben angegeben zentrifugiert.

Die nach der IEL-Isolierung verbliebenen Gewebestücke wurden nun für die Präparation der LPLs verwendet. In intialen Experimenten wurden unterschiedliche Methoden der LPL-Isolierung verglichen.

Methode I (nach (148))

Die Gewebestücke wurden in 20 ml Lymphozytenmedium I, welches mit 50 U/ml Collagenase D (Roche) versetzt wurde überführt und dreimal für 30 min bei 37°C und 100 rpm geschüttelt. Die Überstände wurden gesammelt und anschließend 10 min bei 840 g und 4°C zentrifugiert. Die Zellen wurden in PBS resuspendiert und zentrifugiert (siehe oben). Ähnliche Waschschrte wurden zweimal wiederholt und das Zellsediment anschließend in Lymphozytenmedium I resuspendiert.

Methode II (modifiziert nach (149))

Die Biopate wurden in einer Gewebekulturschale mit einem Skalpell zerkleinert, mit 20 ml Lymphozytenmedium II in ein 50 ml-Röhrchen überführt und 12 min bei 600 g und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 25 ml Lymphozytenmedium II, welches mit 17 U/ml Collagenase D, 25 U/ml DNase (beide Roche) und 100 µg/ml Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (Sigma) versetzt wurde, resuspendiert. Nach Inkubation über Nacht bei 4°C wurde die Zellsuspension für 2 h bei 37°C und 200

rpm geschüttelt und anschließend durch ein 70 μm -Nylonzellsieb filtriert. Die nicht vollständig verdauten Gewebestücke wurden mit dem Kolben einer 10 ml-Spritze durch das Nylonzellsieb gepresst und dieses mehrmals mit Lymphozytenmedium II gespült. Die Zellen wurden für 10 min bei 625 g und 4°C zentrifugiert und das Zellpellet in Lymphozytenmedium II resuspendiert. Ähnliche Waschschrte wurden zweimal wiederholt.

Methode III (modifiziert nach (150))

Die Biopsien wurden einzeln in eine Gewebekulturschale transferiert, mit einem Skalpell zerkleinert und mit 20 ml Lymphozytenmedium II in ein 50 ml-Röhrchen gespült. Es schloss sich ein enzymatischer Verdau der Gewebestücke mit 400 U/ml Collagenase D und 25 U/ml DNase (beide Roche) für 2 h bei 37°C und 200 rpm an, gefolgt von einer Filtration der Zellsuspension durch ein 70 μm -Nylonzellsieb. Die Zellen wurden für 10 min bei 625 g und 4°C zentrifugiert und das Zellpellet in Lymphozytenmedium II resuspendiert. Ähnliche Waschschrte wurden zweimal wiederholt.

Anschließend wurden die IELs oder LPLs in 6 ml Lymphozytenmedium II resuspendiert, mit 3 ml 90%-igem Percoll gemischt und auf 3 ml 70%-iges Percoll geschichtet. Nach einem Zentrifugationsschritt für 25 min bei 1200 g und RT, wurde die Interphase entnommen, in Lymphozytenmedium II gewaschen und für 10 min bei 375 g und 4°C zentrifugiert. Danach wurde das Zellpellet in Lymphozytenmedium II resuspendiert und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Bei einigen Experimenten wurden die mukosalen Leukozyten zwecks Expansion von T-Zellen mit IL-2 und IL-7 behandelt. Hierzu wurden 1×10^5 mukosale Leukozyten in 200 μl Lymphozytenmedium II in einer Rundbodenzellkulturplatte mit 96 Vertiefungen ausgesät und mit rhIL-2 (50 U/ml, Chiron) sowie rhIL-7 (10 ng/ml, R&D) versetzt. Die Zellen wurden für 14 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, wobei die Zytokine jeden zweiten Tag in den oben angegebenen Konzentrationen in 100 μl Lymphozytenmedium II hinzugefügt wurden.

2.2.2. Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1. Analyse der p38 MAP-Kinase-Aktivierung

Die Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase wurde in Zelllysaten humaner GA/d-cAMP- oder zytokinstimulierter DCs untersucht, da die Zellzahl von Rhesusaffen-DCs zur Herstellung konzentrierter proteinhaltiger Zelllysate nicht ausreichend war. Unreife humane DCs ($1,5 \times 10^6$ Zellen) wurden mit GA/d-cAMP, Zytokinen oder Medium ohne Stimuluszugabe für 15, 30 oder 60 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, in 100 µl Zelllysepuffer (CellyticM, Sigma), der mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren (Sigma) versetzt worden war, resuspendiert und 60 min auf Eis inkubiert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 14000 g, 4°C für 30 min entfernt und proteinhaltiger Überstand bis zur Analyse bei -80°C aufbewahrt.

2.2.2.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde in einer Mini-Protean II-Apparatur (Biorad, München) nach dem Prinzip der diskontinuierlichen Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Die Gelzusammensetzung wurde wie folgt gewählt:

	X %-iges Trenngel 15 ml	Y %-iges Sammelgel 6 ml
Wasser	11,25 - 0,5 x X ml	4,37- 0,2 x Y ml
0,5 M Tris-Glycin pH 6,8	-	1,5 ml
1,5 M Tris-Glycin pH 8,8	3,75 ml	-
Acrylamidlösung	0,5 x X ml	0,2 x Y ml
10 % SDS	150 µl	60 µl
10 % APS	100 µl	60 µl
TEMED	10 µl	10 µl

Als Sammelgel wurde ein 5%-iges und als Trenngel ein 10%-iges Polyacrylamid-Gel verwendet (Geldicke 1,5 mm). Der pH-Unterschied zwischen Sammel- und Trenngel betrug 2 pH-Einheiten. 10 µl der proteinhaltigen Zelllysate wurden mit 10 µl 2 x SDS Probenpuffer (Biorad) versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert und auf das

Gel aufgetragen. Als Größenmarker wurde ein High-Marker (Biorad) mit Banden bei 205, 116, 97, 66, 45 und 29 kDa verwendet. Als Positivkontrolle wurden Zelllysate anisomycinbehandelter und als Negativkontrolle Zelllysate nicht behandelter COS-Zellen mitgeführt. Es wurde eine Spannung von 100 V im Sammelgel und 180 V im Trenngel angelegt.

2.2.2.3. Western-Blotting und Detektion

Das SDS-Gel wurde nach Abtrennung des Sammelgels und anschließender Inkubation für 15 min in Blotpuffer auf zwei in Blotpuffer voräquilibrierte Blotpapiere gelegt. Darauf wurde luftblasenfrei eine Nitrocellulose (NC)-Membran (Biorad, Porengröße 0,45 μm) und zwei weitere Blotpapiere sowie ein Schwämmchen platziert und mit dem Gel zur Kathode (schwarze Seite) hin in das Blotsandwich gespannt. Das Blotting erfolgte 2 h im Blotpuffer unter Eiskühlung bei 100 V unter Rühren. Die auf die NC-Membran transferierten Proteine wurden zunächst mit PonceauS-Lösung (2 g/l) für 10 min angefärbt. Durch Waschen mit VE-Wasser wurde der überschüssige Farbstoff entfernt. Nach Einzeichnen der Markerbanden mit Kugelschreiber wurde die NC-Membran fotokopiert. Anschließend wurde der Blot mit PBS-T (0,05% Tween 20 in PBS) vollständig entfärbt und für 1 h in 5% Magermilch in PBS-T zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen inkubiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (anti-Phospho-p38 MAP-Kinase oder anti-p38-MAP-Kinase, beide 1:1000 in PBS-T, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen für je 5 min mit PBS-T wurde der Blot mit dem Sekundärantikörper (HRP-gekoppelter mAb, 1:2000 in PBS-T, Cell Signaling Technology) für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde die NC-Membran dreimal für je 5 min mit PBS-T gewaschen und anschließend mit LumiGlo-Lösung des ECL-Western-Blot-Detektionssystems (Cell Signaling Technology) für 1 min inkubiert. Die Detektion erfolgte durch Auflegen eines Röntgenfilms (Hyperfilm[®], Amersham Biosciences, Freiburg) auf die in Klarsichtfolie befindliche NC-Membran in einer Röntgenfilmkassette mit Verstärkerfolie. Die Entwicklung erfolgte maschinell (Curix 60, Agfa, Köln).

2.2.2.4. Nachweis von anti-GM-CSF-Antikörpern bei GM-CSF-behandelten Rhesusaffen

Molgramostim (Leucomax[®], enthält lyophilisiertes humanes GM-CSF, $M_w=14,4$ kD und humanes Serumalbumin, $M_w=66$ kD) wurde im sterilen destillierten Wasser gelöst. Die Zytokinlösung wurde mit 2x SDS Probenpuffer (Biorad) versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert und auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel (3,9%-iges Sammelgel und 15%-iges Trenngel) aufgetragen. Als Größenmarker wurde ein High-Marker (siehe 2.2.2.2) verwendet. Die Elektrophorese wurde für 1 h bei 60 V im Sammelgel und 3 h bei 80 V im Trenngel durchgeführt. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend auf eine NC-Membran bei 100 V für 1 h bei Eiskühlung transferiert. Die NC-Membran wurde mit PonceauS gefärbt (siehe 2.2.2.3), in Streifen geschnitten und mit PBS-T entfärbt. Die NC-Membranstreifen wurden zum Absättigen der unspezifischen Bindungsstellen mit 5% Magermilch in PBS-T für 1 h bei RT inkubiert. Die NC-Membranstreifen wurden anschließend mit 2 ml unterschiedlicher Rhesusaffen-Plasma-Verdünnungen in PBS-T für 45 min bei RT inkubiert und danach mehrmals mit PBS-T gewaschen. Peroxidase-konjugierte mAbs gerichtet gegen den Fc-Teil unterschiedlicher Rhesusaffen-Immunoglobulinklassen (IgG oder IgM, alle Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, Niederlande) wurden 1:1000 in PBS-T verdünnt und die NC-Membranstreifen in 2 ml dieser Verdünnungen für 30 min bei RT inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden die NC-Membranstreifen mit DAB-Lösung (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) für 3-5 min inkubiert und die überschüssige Lösung mit destilliertem Wasser entfernt.

2.2.3. Statistische Auswertungen

Statistische Berechnungen, wie Mittelwert, Standardabweichung und studentischer T-Test, wurden mit Hilfe der Statistikfunktionen von Microsoft Excel durchgeführt. Die den Berechnungen zugrunde liegenden Werte repräsentieren mindestens 3 unabhängige Experimente. Der studentische T-Test wurde bei mindestens 5 unabhängigen Experimenten durchgeführt. Dieser Test war stets zweiseitig und ergab beim Vergleich zweier Stichproben, die die gleiche Varianz

(homoskedastisch) aufwies, ein Signifikanzniveau, dessen Fehlerwahrscheinlichkeit in der jeweiligen Abbildung angegeben ist. Der Unterschied wurde als signifikant bewertet, wenn die berechnete Fehlerwahrscheinlichkeit $p < 0,05$ war.