

Charakterisierung der Expression und Modulation des HVEM-BTLA-Ligand-Rezeptor-Systems

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaft (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich der Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Sylvia Worbs
aus Frankfurt/a.M.

Februar 2009

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Immunologische Abwehrmechanismen am Robert Koch-Institut, Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. R. A. KroczeK angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Richard A. KroczeK

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am 12.06.2009

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	6
1 Einleitung	7
1.1 Regulatorische Moleküle in der Immunantwort.....	7
1.2 HVEM und BTLA - Verbindung zwischen zwei Rezeptorfamilien	8
1.2.1 HVEM - Mitglied der TNF/TNFR-Superfamilie	8
1.2.2 BTLA - Mitglied der Ig-Superfamilie	11
1.3 Die Bedeutung von HVEM, BTLA, LIGHT und CD160 in der Immunantwort	13
1.4 Aufgabenstellung.....	14
2 Material und Methoden	17
2.1 Verwendete Geräte, Chemikalien und Materialien	17
2.1.1 Geräte	17
2.1.2 Chemikalien und Materialien	17
2.2 Verwendete Tiere	18
2.3 Puffer und Zellkulturmedien	19
2.4 Molekularbiologische Methoden.....	20
2.4.1 Isolierung von RNA	20
2.4.1.1 RNA-Isolierung aus Gewebe.....	20
2.4.1.2 RNA-Isolierung aus der Zellsuspension.....	20
2.4.2 Klonierung von HVEM und BTLA.....	20
2.4.2.1 Verwendete Primer	20
2.4.2.2 Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	21
2.4.3 Transformation von <i>E. coli</i> durch Hitzeschock.....	22
2.4.4 Plasmidpräparation	22
2.4.5 <i>Real-Time</i> -Quantitative PCR mit TaqMan-Sonde.....	22
2.5 Biochemische Methoden	22
2.5.1 SDS-PAGE	22
2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	23
2.6 Zellbiologische Methoden	23
2.6.1 Kultivierung von Zelllinien	23

2.6.2	Produktion von mBTLA-huIgG1 in SL3	24
2.6.2.1	Transfektion von SL3.....	24
2.6.2.2	Detektion von mBTLA-huIgG1 im Überstand mittels ELISA	25
2.6.2.3	Reinigung von mBTLA-huIgG1 aus Zellkulturüberstand.....	26
2.6.3	Expression von HVEM in Zelllinien	26
2.6.3.1	Transfektion von RBL-1, Y3-Ag 1.2.3 und L-Zellen	26
2.6.3.2	Transfektion von EL-4	27
2.6.3.3	Screening der Transfektanten.....	27
2.6.4	Isolierung muriner Zellen aus Milz, Lymphknoten, Lunge und Blut	28
2.6.5	Anreicherung muriner T-Zellen mittels Nylonwolle	29
2.6.6	Magnetische Zellsortierung (MACS) von murinen Splenozyten	29
2.6.7	<i>In vitro</i> -Aktivierung von T-Zellen	30
2.6.8	Modulationsassay von BTLA <i>in vitro</i>	30
2.6.8.1	Verwendung von Matrix-Metalloproteaseinhibitoren	31
2.7	Generierung monoklonaler Antikörper gegen HVEM.....	31
2.7.1	Immunisierung der HVEM-defizienten Mäuse.....	31
2.7.2	Fusion mit Polyethylenglykol und Selektion.....	32
2.7.3	Screening der Hybridomüberstände in der Durchflusszytometrie.....	32
2.7.3.1	Verwendung von Zelllinien: HVEM-Transfektante vs. wt Zelllinie	33
2.7.3.2	Verwendung von primären Zellen: wt vs. HVEM-defiziente Splenozyten..	33
2.7.3.3	Blockadetest 1: Inhibition der mHVEM-huIgG1-Bindung	33
2.7.3.4	Blockadetest 2: Inhibition der mBTLA-huIgG1-Bindung.....	33
2.7.4	Kultivierung und Subklonierung ausgewählter Hybridome	34
2.7.5	Reinigung der Antikörper aus Zellkulturüberstand	34
2.7.6	Isotypbestimmung mittels ELISA.....	34
2.7.7	Epitop- und Affinitätstest.....	35
2.8	Durchflusszytometrie	35
2.8.1	Verwendete Antikörper und Fluorochrome	35
2.8.2	Färbung von Zelloberflächenproteinen.....	37
2.8.3	Färbung von intrazellulären Proteinen.....	38
2.9	Immunhistochemie (IHC)	39
2.9.1	Kryokonservierung und Anfertigung von Kryoschnitten	39
2.9.2	Fixierung.....	39
2.9.3	Blockierung der endogenen Peroxidase.....	39

2.9.4 Peroxidaseprotokoll.....	40
2.10 Tierexperimentelle Methoden.....	41
2.10.1 Adoptiver Transfer ohne Immunisierung	41
2.10.2 Adoptiver Transfer mit anschließender Immunisierung.....	41
3 Ergebnisse	43
3.1 Generierung von Nachweisreagenzien für HVEM.....	43
3.1.1 Generierung von BTLA-Fusionsprotein.....	43
3.1.2 Generierung von HVEM-exprimierenden Zelllinien	44
3.1.3 Generierung von monoklonalen Antikörpern gegen murines HVEM.....	46
3.1.4 Charakterisierung der gereinigten monoklonalen Antikörper.....	51
3.1.4.1 Bindungseigenschaften der monoklonalen Antikörper	51
3.1.4.2 Färbereigenschaften in Durchflusszytometrie und Immunhistochemie	53
3.2 Expressionsanalyse von HVEM und BTLA.....	54
3.2.1 Histologische Untersuchung der HVEM-Expression.....	55
3.2.1.1 Entgegengesetzte Expression von HVEM und BTLA im Gewebe.....	58
3.2.2 Entgegengesetzte Expression von HVEM und BTLA auf Zellebene	59
3.3 Reziproke Modulation von HVEM und BTLA.....	63
3.3.1 Modulation der HVEM/BTLA-Expression in genetisch veränderten Mäusen	63
3.3.2 Modulation der HVEM/BTLA-Expression durch Überexpression <i>in vitro</i>	67
3.3.3 Modulation der HVEM/BTLA-Expression durch eine veränderte Umgebung.....	68
3.3.3.1 Adoptiver Transfer in HVEM-defiziente/BTLA-transgene Mäuse.....	68
3.3.3.2 Adoptiver Transfer in BTLA-defiziente Mäuse	70
3.3.4 Entgegengesetzte Expression von HVEM und BTLA im Verlauf der Aktivierung von T-Zellen	72
3.3.4.1 Die HVEM/BTLA-Regulation während einer T-Zell-Aktivierung ist unabhängig vom korrespondierenden Interaktionspartner	74
3.4 HVEM-induzierte Modulation von BTLA	75
3.4.1 Mechanismus der Modulation	76
3.4.1.1 Keine Regulation auf RNA-Ebene	77
3.4.1.2 Mögliche Regulation auf Proteinebene	78
4 Diskussion.....	81
4.1 Expression von HVEM.....	81
4.2 Reziproke Modulation von HVEM und BTLA.....	82
4.3 HVEM-abhängige Herunterregulation von BTLA mit ungeklärtem Mechanismus ...	87

4.4	Bedeutung der HVEM/BTLA- Modulation für das Immunsystem	88
5	Zusammenfassung/Summary.....	93
5.1	Zusammenfassung.....	93
5.2	Summary	94
6	Literaturverzeichnis.....	95
7	Abkürzungsverzeichnis	105
8	Danksagung	107
9	Anhang	108
	Lebenslauf.....	108
	Publikationen.....	109
	Bescheinigung	110

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Übersicht der Bindungspartner von HVEM, LIGHT, BTLA und CD160.	10
Abb. 2:	Modell des trimolekularen Komplexes.	11
Abb. 3:	Identifizierung der lebenden primären Zellen.	38
Abb. 4:	Auftrennung des mBTLA-huIgG1 in der SDS-PAGE.	44
Abb. 5:	HVEM-Expression von transfizierten Zelllinien.	45
Abb. 6:	Identifikation von HVEM-spezifischen monoklonalen Antikörpern.	47
Abb. 7:	Schematische Darstellung des Prinzips der Testung von anti-HVEM mAk auf Blockade.	48
Abb. 8:	Blockadetest 1 der anti-HVEM mAk.	49
Abb. 9:	Blockadetest 2 der anti-HVEM mAk.	50
Abb. 10:	Charakterisierung der Bindungsstellen der gereinigten anti-HVEM mAk.	52
Abb. 11:	Bindungsverhalten der gereinigten anti-HVEM mAk bei 4 °C und 37 °C.	53
Abb. 12:	Detektion von HVEM durch mHV-5-DIG und mHV-1411-DIG auf Splenozyten.	54
Abb. 13:	mHV-1411 in der Immunhistochemie.	54
Abb. 14:	Detektion von HVEM in verschiedenen Geweben in der Histologie.	57
Abb. 15:	Vergleich der HVEM- und BTLA-Expression in der Histologie.	58
Abb. 16:	Expression von HVEM auf CD45 ⁻ -Zellen der Lunge und Erythrozyten.	60
Abb. 17:	Identifizierung der Zellpopulationen in Splenozyten.	60
Abb. 18:	Charakterisierung der HVEM- und BTLA-Expression auf T-Zellen, B-Zellen und Dendritischen Zellen.	61
Abb. 19:	Expression von HVEM auf NK-Zellen und Granulozyten.	62
Abb. 20:	BTLA-Expression auf T-Zellen und B-Zellen von BTLA-transgenen Mäusen. ...	63
Abb. 21:	Anteil der T-Zell-Populationen in der Milz genetisch veränderter Mäuse im Vergleich zu wt Mäusen.	64
Abb. 22:	Veränderte HVEM- und BTLA-Expression in genetisch veränderten Mäusen im Vergleich zum wt.	66
Abb. 23:	Reduktion der HVEM- bzw. BTLA-Expression in Zelllinien, die das Partnermolekül überexprimieren.	67
Abb. 24:	Anpassung der HVEM- und BTLA-Expression in einer Umgebung mit verändertem HVEM- bzw. BTLA-Niveau.	70

Abb. 25:	Anpassung der HVEM- und BTLA-Expression in einer Umgebung mit fehlender BTLA-Expression.	71
Abb. 26:	Regulation der HVEM- und BTLA-Expression im Verlauf der T-Zell-Aktivierung <i>in vitro</i>	72
Abb. 27:	Regulation der HVEM- und BTLA-Expression im Verlauf der T-Zell-Aktivierung <i>in vivo</i>	73
Abb. 28:	Vom Bindungspartner unabhängige Regulation der HVEM- und BTLA-Expression im Verlauf der T-Zell-Aktivierung <i>in vitro</i>	75
Abb. 29:	Reduktion der BTLA-Expression durch Interaktion mit HVEM.	76
Abb. 30:	TaqMan-PCR zur Quantifizierung der BTLA-Expression nach Interaktion mit HVEM.	77
Abb. 31:	Keine detektierbare Internalisierung von BTLA nach Interaktion mit HVEM.	78
Abb. 32:	Kein Einfluss der Metalloproteaseinhibitoren GM6001 und MMPI IV auf die BTLA-Herunterregulation nach HVEM-Interaktion.	80

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Verwendete Geräte.	17
Tab. 2:	Eingesetzte HVEM- und BTLA-spezifische Primer und Sonden.	21
Tab. 3:	Verwendete Zelllinien und zugehörige Zellkulturmedien.	24
Tab. 4:	Transfektionsbedingungen zur Generierung stabiler Transfektanten.	27
Tab. 5:	Übersicht der verwendeten Antikörper.	36
Tab. 6:	Übersicht der Fluorochrome.	37
Tab. 7:	Übersicht der generierten HVEM-Transfektanten.	45
Tab. 8:	Ergebnisse der Fusionen HVEM 1 und 2.	50

1 Einleitung

1.1 Regulatorische Moleküle in der Immunantwort

Im Immunsystem werden Autoantigen und fremde bzw. pathogene Antigene von Antigen-Präsentierenden Zellen (APZ) aufgenommen, prozessiert und den T-Zellen präsentiert. Infolge eines eingedrungenen Erregers werden naive T-Zellen, die im Ruhezustand im Körper zirkulieren, aktiviert. Sie expandieren und differenzieren zu verschiedenartigen Effektor-T-Zellen, wie T-Helfer-Zellen, cytotoxische T-Zellen und regulatorische T-Zellen (T_{reg}-Zellen). Die Lebensdauer dieser Zellen wird durch Apoptose begrenzt. Die Bildung eines Gedächtnisses wird durch das Überleben einiger Antigen-erfahrener Zellen ermöglicht. Die Aktivierung naiver Lymphozyten erfolgt durch Signale, die zum einen über die Antigenrezeptoren, wie den T-Zell-Rezeptor (TZR) oder B-Zell-Rezeptor (BZR) vermittelt werden. Hinzu kommen verschiedene Signale durch aktivierende oder dämpfende Oberflächenrezeptoren (positive und negative Kostimulatoren). Diese kostimulatorischen Rezeptoren beeinflussen die Stärke, Qualität und die Dauer der Aktivierung. Für das Immunsystem ist die Regulierung des Aktivierungszustands der Zellen sowohl für die effektive Bekämpfung von Pathogenen als auch für die Entwicklung von Toleranz gegenüber nicht-pathogenen Antigenen von essentieller Bedeutung. Im ersten Fall überwiegt die Aktivierung im zweiten Fall wird das System gedämpft. Die Störung dieser Regulation führt zur Entstehung von Allergien und Autoimmunität.

Viele der Kostimulatorischen Moleküle stammen entweder aus der Tumornekrosefaktor/Tumornekrosefaktorrezeptor-Superfamilie (TNF/TNFR-SF) oder aus der Immunglobulinsuperfamilie (IgSF). Besonders Liganden sowie ihre Rezeptoren aus der TNF/TNFR-Superfamilie, wie z.B. LIGHT, LT- α und LT β R, sind an vielen Stellen beteiligt und beeinflussen die Immunantwort sowie den Aufbau lymphatischer Organe indem sie Einfluss auf die Zelldifferenzierung, Zellaktivierung und das Überleben von Zellen nehmen (Banks *et al.*, 1995; Futterer *et al.*, 1998; Gommerman und Browning, 2003). Auch die Mitglieder der IgSF spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Immunantwort, indem sie das Signal des Antigenrezeptors verstärken oder dämpfen. Einige wichtige Kostimulatoren und ihre Liganden stammen hierbei aus der CD28- und B7-Familie, Unterklassen der IgSF (Collins *et al.*, 2005). Gut charakterisierte Beispiele für positive Kostimulatoren der CD28-Familie sind CD28 und ICOS (Aruffo und Seed, 1987; Hutloff *et al.*, 1999) und ihre Liganden aus der B7-Familie CD80 und CD86 bzw. ICOS-L (Levine *et al.*, 1995; Yoshinaga *et al.*, 1999;

Mages *et al.*, 2000). Zu den negativen Kostimulatoren der CD28-Familie gehören unter anderen CTLA-4, das mit CD28 um die Bindung von CD80 und CD86 konkurriert (Sansom, 2000), und PD-1, dessen Liganden PD-L1 und PD-L2 ebenfalls aus der B7-Familie stammen (Freeman *et al.*, 2000; Latchman *et al.*, 2001). Ein kürzlich beschriebenes Molekül, das ebenfalls zu den negativen Kostimulatoren der IgSF gezählt wird, ist **B and T Lymphocyte Attenuator** (BTLA). Der Ligand von BTLA ist **Herpes Virus Entry Mediator** (HVEM) (Sedy *et al.*, 2005; Gonzalez *et al.*, 2005). HVEM wird der TNFR-Familie zugeordnet. Jedoch gehören die Liganden der anderen Mitglieder der CD28-Familie der B7-Familie an, wodurch BTLA eine Sonderstellung einnimmt.

1.2 HVEM und BTLA - Verbindung zwischen zwei Rezeptorfamilien

Die Bindung von HVEM an seinen Rezeptor BTLA ist die erste beschriebene Interaktion zweier Moleküle aus der TNFR-Familie und der IgSF (Sedy *et al.*, 2005; Gonzalez *et al.*, 2005).

Inzwischen wurden weitere Interaktion zwischen Molekülen der IgSF und anderer Familien beschrieben. So interagiert HVEM noch mit CD160, ein Mitglied der IgSF (Cai *et al.*, 2008). Auch B7-H3 (**B7-Homolog 3**), ein Mitglied der B7-Familie, besitzt mit TLT-2 (**TREM-like Transcript 2**) einen Rezeptor, der nicht in die IgSF gehört (Hashiguchi *et al.*, 2008).

1.2.1 HVEM - Mitglied der TNF/TNFR-Superfamilie

Ursprünglich wurde HVEM (TNFRSF14, Tr2, ATAR, Hve-A) als zellulärer Rezeptor für **Herpes Simplex Virus-1** (HSV-1) beschrieben (Montgomery *et al.*, 1996; Hsu *et al.*, 1997). Der Eintritt von HSV-1 wird durch die Bindung des HSV-1 Glycoproteins **D** (gD) an HVEM vermittelt.

HVEM der Maus (murines HVEM = mHVEM) ist ein 276 Aminosäuren großes Transmembranprotein der Klasse I, dessen Gen auf Chromosom vier lokalisiert ist (NCBI *Mouse genome resources*). Das humane HVEM (huHVEM) ist um sieben Aminosäuren größer als mHVEM. Im humanen Genom ist HVEM auf Chromosom eins lokalisiert (NCBI *Human genome resources*).

Mitglieder der TNFR-Familie besitzen im allgemeinen eine bis vier extrazelluläre Cysteinreiche Domänen (CRDs), die für die Bindung der TNF-Liganden von Bedeutung sind (Bodmer *et al.*, 2002). In der Anzahl der CRDs unterscheidet sich murines HVEM und

humanes HVEM, so besitzt mHVEM drei und huHVEM vier extrazelluläre CRDs (Hsu *et al.*, 1997; Montgomery *et al.*, 1996).

Die TNFR-Familie wird in drei Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe enthält im zytoplasmatischen Teil eine sogenannte Todesdomäne. Diese Rezeptoren, wie z.B. Fas (CD95) oder TNFRI, induzieren Apoptose, indem sie Caspase-Kaskaden aktivieren, die schließlich zum programmierten Zelltod führen (Locksley *et al.*, 2001; Aggarwal, 2003). Die zweite Gruppe, zu der auch HVEM gehört, sowie andere Kostimulatorische TNFR-Moleküle CD40, 4-1BB und Ox40, besitzen intrazellulär konservierte Bindungsstellen für sogenannte **TNF-Rezeptor-assoziierte Faktoren (TRAFs)**. Diese Bindungsstellen werden als *TRAF-interacting motifs* (TIMs) bezeichnet. Die Aktivierung dieser Rezeptoren führt zur Anschaltung verschiedener Signaltransduktionswege, wie **Nukleärer Faktor κ B (NF- κ B)**, p38 und **Jun N-terminale Kinase (JNK)** (Locksley *et al.*, 2001; Aggarwal, 2003). Die Bindung von TRAFs an HVEM führt einerseits zur Aktivierung von Signalwegen, die letztendlich in der nukleären Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B münden. Andererseits werden auch die JNK und das **Aktivator-Protein 1 (AP1)** aktiviert, die damit assoziierten Signalwege führen zur Zellaktivierung, Zelldifferenzierung und zum Überleben der Zellen (Hsu *et al.*, 1997; Marsters *et al.*, 1997; Dempsey *et al.*, 2003). Rezeptoren der dritten Gruppe transduzieren dagegen keine Signale, da sie intrazellulär keine funktionellen signalgebenden Domänen oder Motive besitzen. Stattdessen konkurrieren sie mit den signaltransduzierenden Rezeptoren der anderen beiden Gruppen um die entsprechenden Liganden. Ihre Funktion besteht darin, die Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden zu hemmen, die ansonsten durch die Bindung der Liganden an signalgebende Rezeptoren ausgelöst werden würden (Dempsey *et al.*, 2003). Ein Beispiel für Rezeptoren der dritten Gruppe ist der **Death Decoy Rezeptor 3 (DcR3, TR6)**, dessen Ligand LIGHT (*Lymphotoxin-like, exhibits inducible expression, and competes with HSV glycoprotein D for HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes*; TNFSF14; CD258) ist (Yu *et al.*, 1999). LIGHT bindet allerdings auch noch an HVEM und den **Lymphotoxin- β -Rezeptor (LT β R)** (Mauri *et al.*, 1998; Zhai *et al.*, 1998). HVEM interagiert jedoch neben BTLA und LIGHT noch mit anderen Molekülen. So sind **Lymphotoxin- α (LT α)**, ein zweiter Ligand aus der TNF-Familie, und CD160, das wie BTLA aus der IgSF stammt und ebenfalls als Rezeptor für HVEM fungiert, weitere Interaktionspartner für HVEM. Daraus ergibt sich eine sehr komplexe Situation von Interaktionsmöglichkeiten (Abb. 1). Hinzu kommt, dass HVEM konstitutiv auf T-Zellen und anderen Leukozyten exprimiert wird, aber auch die anderen Moleküle werden im Ruhezustand und nach Zellaktivierung auf T-Zellen und vielen Leukozyten zur gleichen Zeit

exprimiert (Kwon *et al.*, 1997; Mauri *et al.*, 1998; Han *et al.*, 2004). So besteht die Möglichkeit von multiplen Rezeptor-Ligand-Interaktionen in *cis* (auf der gleichen Zelle) oder *trans* (von verschiedenen Zellen).

Zur Bindung zwischen den TNF-Liganden und ihren TNF-Rezeptoren liegen beide in trimerisierter Form vor (Bodmer *et al.*, 2002). HVEM trimerisiert für die Bindung von LIGHT und LT- α . Wie die Kristallisation des HVEM-BTLA-Komplexes zeigte, liegen jedoch sowohl HVEM als auch BTLA als Monomere in diesem Komplex vor (Compaan *et al.*, 2005).

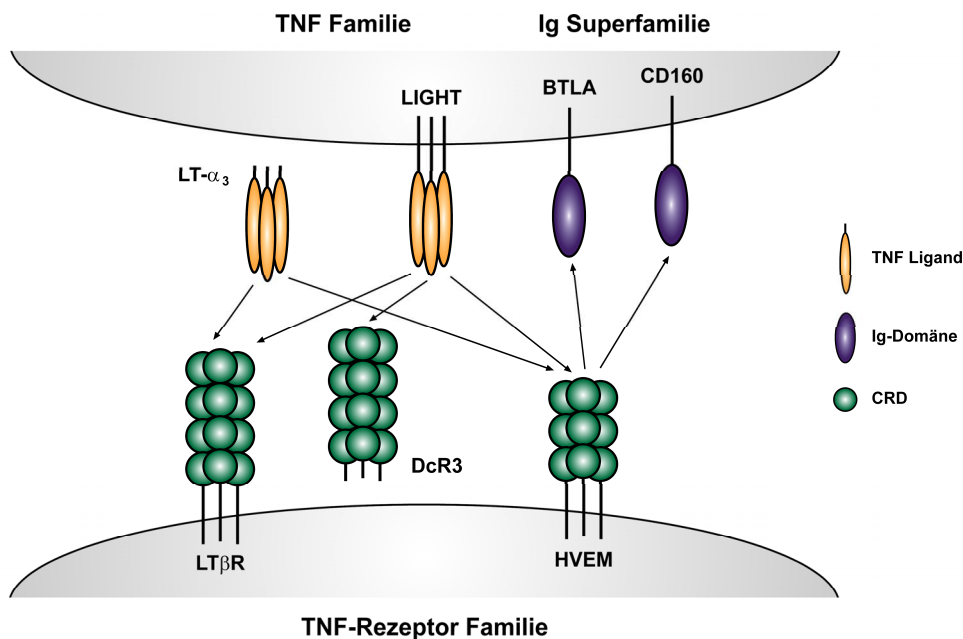


Abb. 1: Übersicht der Bindungspartner von HVEM, LIGHT, BTLA und CD160.

Schematische Darstellung der Interaktionsmöglichkeiten in Anlehnung an (Watts, 2005; Gavrieli und Murphy, 2006). Mitglieder der TNFR-Familie: LT β R, DcR3 und HVEM; Mitglieder der TNF Familie: LIGHT und LT- α ; Mitglieder der IgSF: BTLA und CD160. HVEM bindet sowohl an BTLA als auch CD160. Die Liganden für HVEM sind LIGHT und LT- α . LIGHT ist zusätzlich noch Ligand für DcR3 und LT β R. LT- α bindet noch an LT β R. CRD = Cystein-reiche-Domäne.

Strukturelle Untersuchungen der verschiedenen Interaktionen von HVEM mit BTLA, CD160, gD bzw. LIGHT zeigten, dass für die Bindung dieser vier Moleküle die CRDs der Ektodomäne von HVEM eine wichtige Rolle spielen. So binden sowohl BTLA als auch CD160 an die N-terminale CRD1 von HVEM (Compaan *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2008; Sedy *et al.*, 2005). An der Bindung von HSV-1 gD ist CRD1 und CRD2 von HVEM beteiligt. (Whitbeck *et al.*, 2001). BTLA und gD binden zwar an unterschiedliche Stellen von HVEM, dennoch überschneiden sich diese Bindungsstellen (Cheung *et al.*, 2005). Es wird vermutet, dass gD BTLA imitiert (Compaan *et al.*, 2005; Cheung *et al.*, 2005). Dagegen binden LIGHT und LT- α an CRD2 und CRD3 von HVEM, wobei LIGHT größtenteils mit CRD3 interagiert

(Sarrias *et al.*, 2000). BTLA und LIGHT interagieren also nicht mit der gleichen CRD von HVEM, folglich wäre es möglich, dass BTLA und LIGHT/LT- α simultan mit HVEM wechselwirken und so einen trimolekularen Komplex bilden (Abb. 2). Da die Bindungsstudien zum Teil mit löslichen Proteinen durchgeführt wurden, ist es noch unklar, ob sich ein solcher Komplex auch *in vivo* mit membrangebundenen Proteinen ausbildet (Cheung *et al.*, 2005; Compaan *et al.*, 2005; Gonzalez *et al.*, 2005).

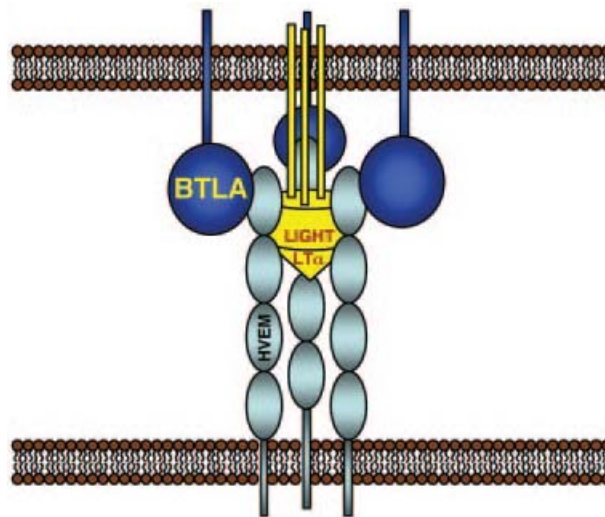


Abb. 2: Modell des trimolekularen Komplexes.

Dargestellt ist ein theoretisches Modell des HVEM, BTLA und LIGHT/LT- α Komplexes (Gonzalez *et al.*, 2005).

1.2.2 BTLA - Mitglied der Ig-Superfamilie

Wie bereits in Kapitel 1.2 erwähnt, gehört BTLA (CD272) zu der IgSF und wird zu den kostimulatorischen Oberflächenmolekülen gezählt. Ursprünglich wurde BTLA bei der Suche nach T_H-1 spezifischen Genen, d.h. Gene, die für die Differenzierung der CD4⁺-T-Zellen in T-Helferzellen Typ 1 (T_H-1) charakteristisch sind, entdeckt (Watanabe *et al.*, 2003). Später wurde in einer unabhängigen Studie gezeigt, dass BTLA während der positiven Selektion von Thymozyten stark induziert wird (Han *et al.*, 2004). Obwohl BTLA ursprünglich aus T-Zellen isoliert wurde, wird es konstitutiv auch auf B-Zellen, Dendritischen Zellen und anderen Leukozyten exprimiert. Strukturell betrachtet ist BTLA ein Transmembranglycoprotein Typ I, das in der Maus (murines BTLA = mBTLA) 306 Aminosäuren umfasst, humanes BTLA (hBTLA) besteht aus 288 Aminosäuren. In der Maus ist das Gen für BTLA auf Chromosom 16, beim Menschen auf Chromosom 3 lokalisiert (NCBI *Mouse* bzw. *Human genome resources*).

Die IgSF wird in 4 Hauptgruppen unterteilt, die Variable Gruppe (V), Konstante Gruppe 1 (C1), Konstante Gruppe 2 (C2) und Intermediäre Gruppe (I) (Bork *et al.*, 1994; Harpaz und Chothia, 1994). BTLA wurde zunächst in die CD28-Familie eingeordnet, zu der neben CD28 auch ICOS (*Inducible Costimulator*), PD-1 (*Programmed Death 1*) und CTLA-4 (*Cytotoxic T Lymphocyte Antigen*) gehören (Watanabe *et al.*, 2003; Greenwald *et al.*, 2005). Die Mitglieder dieser Familie, wie auch BTLA, besitzen extrazellulär eine einzige IgV-Domäne (Carreno und Collins, 2002) und gehören somit in Gruppe V. Die Kristallstruktur der Ektodomäne von BTLA zeigte, dass in dem zweiten β -Faltblatt von BTLA der C''-Strang, der bei Molekülen aus der Gruppe V vorhanden ist, fehlt. Infolgedessen wird BTLA eher in Gruppe I der IgSF eingeordnet (Nelson *et al.*, 2008). BTLA ist weder im Mausgenom noch im humanem Genom auf dem gleichen Chromosom wie die anderen Molekülen der CD28-Familie lokalisiert (murin: Chromosom 1, human: Chromosom 2). Strukturell gesehen unterscheidet sich BTLA von den Mitgliedern der CD28-Familie. Funktionell betrachtet weist BTLA jedoch Ähnlichkeiten zu dieser Familie auf. So besitzt BTLA, ähnlich den negativ kostimulatorischen Moleküle CTLA-4 und PD-1, konservierte inhibitorische Motive (ITIM und ITSM) in der intrazellulären Domäne (Watanabe *et al.*, 2003) über die Phosphatasen rekrutiert werden können, die an der negativen Modulation von Antigen-Rezeptor-Signalwegen beteiligt sind. Die Phosphorylierung dieser Motive bei BTLA führt zur Rekrutierung der Protein-Tyrosin-Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 (Gavrieli *et al.*, 2003). Der genaue Verlauf der Signaltransduktionskaskade ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Es wurde gezeigt, dass BTLA mit CD3 ζ interagiert und die Tyrosin-Phosphorylierung des TZR ζ Komplexes während der T-Zell-Aktivierung, ähnlich zu PD-1 und CTLA-4, inhibiert (Wu *et al.*, 2007). PD-1 und CTLA-4 üben ihre negative Wirkung auf den T-Zell-Rezeptor-Signalweg durch die Inhibition der TZR-vermittelten Phosphorylierung von ZAP70/CD3 ζ aus (Sheppard *et al.*, 2004; Guntermann und Alexander, 2002). Auch der Akt-Signalweg wird sowohl durch CTLA-4 als auch PD-1 inhibiert. Die Suppression der Akt-Aktivierung erfolgt durch CTLA-4 über die Rekrutierung der Typ II Serin/Threonin Phosphatase PP2A, wohingegen PD-1 die Aktivierung der Phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3K) verhindert und somit die Phosphorylierung von Akt (Parry *et al.*, 2005). Neben den inhibitorischen Motiven enthält BTLA auch eine potentielle Grb-2-Bindungsstelle (Gavrieli *et al.*, 2003), wie sie auch bei CD28, einem positiven Kostimulator zu finden ist. Die Grb-2-Bindungsstelle von CD28 ist an der Aktivierung des PI3K-Signalwegs beteiligt, wodurch die IL-2-Produktion und letztendlich die Zellproliferation induziert wird sowie Signale für das Überleben der Zelle bereitgestellt werden. *In vitro* konnte die Assoziation von Grb-2 mit der entsprechenden

Bindungsstelle von BTLA gezeigt, aber noch nicht *in vivo* bestätigt werden (Gavrieli und Murphy, 2006).

1.3 Die Bedeutung von HVEM, BTLA, LIGHT und CD160 in der Immunantwort

Das BTLA-HVEM-LIGHT-CD160 System bietet verschiedene Möglichkeiten der Regulation. So wird durch die Interaktion von LIGHT mit HVEM ein positives Signal in die HVEM-exprimierende Zelle gesetzt. Zum einen wurde gezeigt, dass lösliches LIGHT die T-Zell-Proliferation verstärkt. Eine Wechselwirkung von LIGHT mit LT β R konnte hier ausgeschlossen werden, da dieser nicht auf T-Zellen exprimiert wird (Tamada *et al.*, 2000). Zum anderen führt die Überexpression von LIGHT auf T-Zellen in transgenen Mäusen zu erhöhter, klonaler T-Zell-Expansion und damit zur Vergrößerung der lymphatischen Organe, Inflammation und Autoimmunität (Wang *et al.*, 2001b; Wang *et al.*, 2001a). Die LIGHT-defizienten Mäuse zeigen dagegen Defizite in der Proliferation und im Überleben der T-Zellen, insbesondere der CD8⁺-T-Zellen (Tamada *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003). Diese Beobachtungen bezüglich LIGHT in den genetisch veränderten Mäusen lassen sich nur schwer interpretieren, da hier nicht zwischen Signalen durch die LIGHT-HVEM-Interaktion und der LIGHT-LT β R-Interaktion unterschieden werden kann. Zudem wird auch die Möglichkeit diskutiert, dass eine Signaltransduktion über LIGHT erfolgt (Shi *et al.*, 2002; Wan *et al.*, 2002). Im Gegensatz zum positiven kostimulatorischen Signal, das durch LIGHT über HVEM in die T-Zelle transduziert wird, kann die Bindung von HVEM an BTLA auf T-Zellen die Aktivierung dieser Zellen negativ regulieren. Es wurde *in vitro* gezeigt, dass die Bindung von HVEM zur Phosphorylierung von BTLA und so zur Assoziation der Protein-Tyrosin-Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 führt (Sedy *et al.*, 2005), wodurch wahrscheinlich, wie bereits in Kapitel 1.2.2 erwähnt, die negative Wirkung von BTLA vermittelt wird. Die leicht erhöhte Proliferation von BTLA-defizienten Lymphozyten nach Aktivierung über den TZR, sowie eine diskret erhöhte Anfälligkeit der BTLA-defizienten Mäuse für die Peptid-induzierte experimentelle allergische Enzephalomyelitis (EAE), als auch eine länger anhaltende allergische Atemwegsinfektion deuten auf eine Rolle von BTLA als negativer Regulator der T-Zell-Aktivierung hin (Watanabe *et al.*, 2003; Sedy *et al.*, 2005; Deppong *et al.*, 2006). Ähnliche Ergebnisse wurden mit den HVEM-defizienten Mäusen bei Peptid-induzierter EAE, bei Concanavalin A-vermittelter T-Zell-abhängiger Autoimmunhepatitis und bei durch adoptiven Transfer von naiven T-Zellen induzierter Colitis erhalten. Diese Daten stützen die These, dass BTLA ein negativer Regulator ist (Wang *et al.*, 2005; Steinberg *et al.*,

2008). Allerdings zeigen weder BTLA- noch HVEM-defiziente Mäuse Anzeichen spontaner Autoimmunität. Andere *in vivo* Modelle lieferten Hinweise auf eine weitere, möglicherweise positive Funktion von BTLA. So verzögerte sich in BTLA-defizienten Mäusen bei Herztransplantationsexperimenten in Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen (schwache Allostimulation oder starke Allostimulation) die Abstoßung des Transplantats (Tao *et al.*, 2005). Im Modell der akuten „Graft-versus-Host-Disease“ konnte gezeigt werden, dass BTLA eine Bedeutung für das Überleben von T-Zellen hat (Hurchla *et al.*, 2007)

Die Quervernetzung von BTLA *in vitro* mit anti-BTLA monoklonalen Antikörpern zeigte sowohl inhibierende als auch positive Effekte auf die T-Zell-Aktivierung (Krieg *et al.*, 2005). Dies deutet auf eine nicht rein negative Funktion von BTLA hin. Das Konzept einer negativen Regulation wurde allerdings in der Literatur noch nicht revidiert. Die Klärung der Wirkung von BTLA wurde komplexer durch die kürzlich gezeigte Interaktion von HVEM mit CD160. Die Bindung von HVEM an CD160 transduziert ein negatives Signal über CD160 in die Zelle (Cai *et al.*, 2008). Zudem wurde eine Isoform von humanem CD160 beschrieben, die positive Signale in NK-Zellen transduziert (Giustiniani *et al.*, 2009).

1.4 Aufgabenstellung

In der Literatur wird die Bindung von HVEM an BTLA als negative Regulation der T-Zell-Aktivierung beschrieben, obwohl einige Publikationen darauf hinweisen, dass BTLA nicht ausschließlich als negativer Regulator wirkt. Die Analyse der HVEM-BTLA-Funktion wird durch Beteiligung anderer Bindungspartner von HVEM erschwert. Aufgrund verschiedener Interaktionspartner und der konstitutiven Expression von HVEM und BTLA auf Leukozyten entsteht *in vivo* eine komplexe Situation von Interaktionsmöglichkeiten und daraus resultierender Einflüsse auf die Immunantwort. Aus diesem Grund ist eine detaillierte Kenntnis der Expressionsmuster der Moleküle von Bedeutung. In dieser Arbeit sollte die Funktion von HVEM und BTLA weiter präzisiert werden. Zu diesem Zweck wurden die folgenden Aufgabenstellungen definiert:

1. Bereitstellung von Reagenzien zur Detektion von HVEM sowohl in der Immunhistochemie als auch auf Einzelzellebene in der Durchflusszytometrie und für funktionelle Untersuchungen von HVEM. Zu diesem Zweck sollten zum einen ein BTLA-Fusionsprotein und zum anderen monoklonale Antikörper gegen HVEM generiert werden. Für funktionelle Studien sollten mAk generiert werden, die die Bindung von BTLA an HVEM verhindern.

2. Detaillierte Expressionsanalyse von HVEM auf Proteinebene in verschiedenen Geweben und auf Einzellebene.
3. Vergleich der HVEM- und BTLA-Expression mittels der Immunhistochemie in verschiedenen lymphatischen und peripheren Geweben sowie mittels Durchflusszytometrie auf T-Zellen, B-Zellen und Dendritischen Zellen. Untersuchung der gegenseitigen Beeinflussung der Expression.
4. Untersuchung der Auswirkungen der HVEM-BTLA-Interaktion auf das Expressionsniveau des entsprechenden Interaktionspartners.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Geräte, Chemikalien und Materialien

2.1.1 Geräte

Die folgenden Geräte wurden neben der Grundausstattung wie Zentrifugen während der Doktorarbeit verwendet (Tab. 1).

Gerätebezeichnung	Hersteller
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologie, Palo Alto, USAs
Binokulares Mikroskop, Stemi 2000-C	Carl Zeiss, Jena
Durchflusszytometer, FACSCalibur	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Durchflusszytometer, LSRII	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
ELISA Reader (Mikrotiterplattenphotometer)	Dynatech Laboratories, Chantilly, VA, USA
ELISA-Washer	Tecan, Crailsheim
Gelelektrophorese	Mini-Protean BioRad, München
Gene Amp 2720 Thermal Cycler	Applied Biosystems Inc.
Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer (jetzt Applied Biosystems Inc.)
Kryostat, 2800	Frigocut N Reichert-Jung, Wien
Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
Mx3000P® QPCR System	Stratagene (Agilent Technologies Division)
Nanodrop ND-1000 Spektrometer	NanoDrop Technologies, Wilmington, USA

Tab. 1: Verwendete Geräte

2.1.2 Chemikalien und Materialien

Verwendete Chemikalien waren von der Qualität p.A. und wurden von den folgenden Firmen bezogen: Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Merck Chemicals (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Steriles Plastikeinwegmaterial wurde von den Firmen Greiner GmbH (Frickhausen), Nunc (Roskilde, Dänemark) oder Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

2.2 Verwendete Tiere

C57BL/6 wt und BALB/c:

Die Tiere wurden vom Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin bezogen

B6.BTLA KO:

Defizienz für BTLA. Exon 1 des *btlA* Gens und ein Teil des proximalen Promotors wurden durch Flox-Neomycin-Selektionscassette ersetzt. Die Tiere wurden für 10 Generationen auf C57BL/6 rückgekreuzt.

Herkunft: Dr. D. Graf *Institute of Immunology, Biomedical Sciences Research Center Al. Fleming*, Griechenland (unveröffentlicht)

B6.BTLA tg #130:

Überexpression von BTLA auf T-Zellen. Das *btlA* Gen wurde in das humane CD2-Minigen kloniert und in Pronuclei von superovulierten CBB10F1 Mäusen injiziert (Greaves *et al.*, 1989; Zhumabekov *et al.*, 1995). Positive Mäuse wurden mit PCR identifiziert. Die Tiere wurden für 10 Generationen auf C57BL/6 rückgekreuzt.

Herkunft: Dr. D. Graf (unveröffentlicht)

B6.HVEM KO:

Defizienz für HVEM (Wang *et al.*, 2005). Die Tiere wurden für 10 Generationen auf C57BL/6 rückgekreuzt.

Herkunft: Prof. Dr. K. Pfeffer, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland

B6.PL.OT-II:

Expimieren transgenen T-Zell-Rezeptor für Ovalbuminpeptid (OVA₃₂₃₋₃₃₉; OVA-TZR-transgen; (Barnden *et al.*, 1998). Tiere wurden für mindestens 10 Generationen auf C57BL/6 rückgekreuzt. Zusätzliche Kreuzung mit B6.PL-Mäusen (Jackson), um den genetischen Marker CD90.1 (Thy1.1) einzubringen. Dies erlaubte die Nachverfolgung adoptiv transferierter Zellen in den Rezipienten.

In allen Experimenten wurden wt Kontrollmäuse ähnlichen Alters verwendet.

Alle Tiere stammten aus einer SPF-Zucht (*specific pathogen free*) des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) und wurden kurzzeitig in einem konventionellen Tierstall des

Robert Koch-Institutes gehalten. Gewöhnlich waren die Mäuse 8–12 Wochen alt. Alle Experimente wurden nach den staatlichen Richtlinien für Tierversuche durchgeführt und waren durch die lokale Ethikkommission genehmigt.

2.3 Puffer und Zellkulturmedien

Angabe der Puffer, die in verschiedenen Methoden verwendet wurden, sowie der Zellkulturmedien. Spezielle Puffer und Lösungen werden bei der jeweiligen Methode aufgeführt.

Puffer:

PBS	136,89 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 1,47 mM KH ₂ PO ₄ , 8,05 mM Na ₂ HPO ₄ , ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺
FACS-PBS	PBS + 2,5 % FCS + 0,1 % NaN ₃
10×Fc-Block	1 mg/ml anti-CD16/CD32 (Klon 2.4G2), 0,5 mg/ml Ratten IgG (Nordic, Tilburg) in PBS
1x Saponin	FACS-PBS + 0,5 % Saponin
MACS-PBS	PBS + 2 mM EDTA + 0,5 % BSA (Fraktion V, Endotoxingehalt <1 EU/mg, PAA Laboratories GmbH, Cölbe)

Zellkulturmedien:

basierend auf RPMI 1640 (Biochrom AG, Berlin) unter Angabe der Zusätze:

R10F⁻/β-ME	10 % fötales Kälberserum (FCS, Biochrom), 50 μM β-Mercaptoethanol, 2 mM Glutamin
R10F⁺/β-ME	R10F ⁻ /β-ME + 100 μg/ml Penicillin/ Streptomycin (Invitrogen)
R10F⁺/β-ME/AS/Pyr	R10F ⁺ /β-ME + 1 mM nicht-essentielle Aminosäuren (Invitrogen) und 1 mM Natrium-Pyruvat (Invitrogen)
R20F⁺/β-ME/50	20 % FCS, 50 μM β-Mercaptoethanol, 50 U/ml IL-6 (Biosource, Camarillo, CA, USA), 100 μg/ml Penicillin/ Streptomycin
R10F⁺/β-ME/5	10 % FCS, 50 μM β-Mercaptoethanol, 5 U/ml IL-6 (Biosource, Camarillo, CA, USA), 100 μg/ml Penicillin/ Streptomycin
Selektionsmedium	20 % FCS (Hybridom-getestet), 50 μM β-Mercaptoethanol, 50 U/ml IL-6 (Biosource, Camarillo, CA, USA), 1×AH (Sigma-Aldrich)

basierend auf DMEM (Biochrom AG, Berlin) unter Angabe der Zusätze:

D10F⁺/β-ME 4,5 g/ml Glukose, 10 % fötales Kälberserum (FCS, Biochrom),
100 µg/ml Penicillin/Streptomycin (Invitrogen), 2mM Glutamin,
50 µM β-Mercaptoethanol

Insektenzellmedium basierend auf HighClone SFX-Insect (Biochrom AG, Berlin) unter Angabe der Zusätze:

SFX⁺ 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin (Invitrogen), 2 mM Glutamin
SFX⁺/FCS SFX⁺ + 3 % FCS

Das FCS wurde vor Verwendung hitzeinaktiviert (45 min 56 °C).

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Isolierung von RNA

2.4.1.1 RNA-Isolierung aus Gewebe

Die Isolierung von RNA aus Organen der Maus erfolgte nach Zerkleinern der Organe in Guanidinium-Hydrochlorid über einen Caesiumchloridgradienten und anschließender Na-Acetat/Ethanol-fällung der RNA (Glisin *et al.*, 1974; Chirgwin *et al.*, 1979).

2.4.1.2 RNA-Isolierung aus der Zellsuspension

Die Isolierung von RNA aus bis zu 10×10^6 primären Zellen erfolgte unter Verwendung des *High Pure RNA Isolation Kit* von Roche nach den Angaben des Herstellers. Die Integrität der RNA wurde am Agilent 2100 Bioanalyser bestimmt. Verwendete Reagenzien stammten aus dem RNA 6000 Nano oder Pico Kit (Agilent Technologies). Ausgewertet wurde mit der Software 2100 Expert (Agilent Technologies).

2.4.2 Klonierung von HVEM und BTLA

2.4.2.1 Verwendete Primer

Klonierung der gesamten kodierenden Sequenz von mHVEM (AF515707; nt 1-858) in BCMGSneo (Karasuyama *et al.*, 1989) und pcDNA3-YFP (von B. Dorner, Robert Koch-Institut). Beide Vektoren enthalten ein Gen für die Antibiotikumresistenz gegen Geneticin (G418, Invitrogen, (Colbere-Garapin *et al.*, 1981). Für den Vektor pcDNA3-YFP wurde

HVEM ohne Stop-Codon in den Vektor kloniert, um ein Fusionsprotein mit dem gelbfluoreszierenden Protein (YFP; (Daubner *et al.*, 1987) zu erhalten. Zur Klonierung von HVEM in BCMGS_{neo} wurden die Primer mHVEM_up und lp eingesetzt. Die Klonierung für pcDNA3-YFP erfolgte über die Primer mHVEM_up und lpY.

Klonierung der extrazellulären Domäne von BTLA (nt 1-495) in pRmHa3-MT-huIgG1 (Wallny, 1997). Der Vektor besitzt einen Metallothionein-Promotor und kodiert für die Hinge-Region sowie die C_H2- und C_H3-Domäne des humanen IgG1. Durch diesen Fc-Anteil von huIgG1 sollte das Fusionsprotein über die Ausbildung von Disulfidbrücken als Dimer in den SL3 Zellen exprimiert werden. Die Klonierungen erfolgten nach Standardmethoden.

Eine Übersicht der verwendeten Primer und Sonden mit Sequenzen ist in Tab. 2 aufgeführt.

Primer-bezeichnung	Primersequenz (5' → 3')	Restriktions-schnittstelle	Verwendung
mHVEM_up	CgATgCTCgAgCACCATGGAACCTCTCCAGGA	<i>Xho</i> I	Klonierung
mHVEM_lp	ACTCTAgCggCCgCAATTTgTTCAgTTggAggCT	<i>Not</i> I	Klonierung
mHVEM_lpY	ACTCTATC TAG A TTggAggCTgTCTCCTCC	<i>Xba</i> I	Klonierung
BTLIg_up	ATTATgAgCTCACC ATg AAg ACA gTg CC	<i>Sac</i> I	Klonierung
BTLIg_lp2	ATTATggA TCC ggC ATT ggT ggC ATC Tgg	<i>Bam</i> HI	Klonierung
TM_mHVEM_for	ggAgCCAggCCCCTACAg		TaqMan
TM_mHVEM_rev	TgCgCTgCAgCAAgTTCA		TaqMan
TM_mHVEM_pro	6FAM-CTTCaggCTggTgCCTTgTgTCTTCCTT-TMR		TaqMan

Tab. 2: Eingesetzte HVEM- und BTLA-spezifische Primer und Sonden.

Die Nukleotide der Restriktionsschnittstelle sind in der Sequenz grau unterlegt. Die komplementäre Sequenz zur kodierenden Sequenz von HVEM und BTLA ist fett dargestellt. Die Sequenz des Stop-Codons ist unterstrichen.

2.4.2.2 Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Reverse Transkription wurde mit 1 µg C57BL/6 Thymus-RNA (Kapitel 2.4.1.1) unter Verwendung des *Reverse Transcription System* von Promega nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurden Oligo(dT)₁₅-Primer verwendet. Die cDNA-Reaktion wurde 1 h bei 42 °C inkubiert. Die PCR wurde wie folgt durchgeführt:

PCR-Ansatz: 200 µM jedes dNTPs; 1× Phusion HF Puffer (Finnzymes);
200 nM Primer 1; 200 nM Primer 2; 0,02 U/µl Phusion High Fidelity DNA-Polymerase (Finnzymes)

PCR-Programm: Schritt 1: 98 °C 30 s
Zyklus (40 ×): 98 °C 10 s; 61 °C 20 s; 72 °C 30 s
Schritt 2: 72 °C 7 min
Schritt 3: 4 °C ∞

2.4.3 Transformation von *E. coli* durch Hitzeschock

Die Transformation von *E. coli* XL-1 blue durch Hitzeschock erfolgte nach Standardmethoden (Hanahan *et al.*, 1991). Zur Selektion und für die Kultivierung der transformierten *E. coli* wurde LB/Amp-Medium (1 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl, 100 µg/ml Ampicillin) und LB/Amp-Agar-Platten (LB + 1,5 % Agar) verwendet.

2.4.4 Plasmidpräparation

Die Plasmidpräparation in kleinem und großen Maßstab erfolgte mit dem QIAprep[®] Spin Miniprep Kit und Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers.

2.4.5 Real-Time-Quantitative PCR mit TaqMan-Sonde

Die Real-Time-Quantitative PCR mit TaqMan-Sonde (TaqMan-PCR) wurde unter Verwendung reverstranskribierter RNA (Kapitel 2.4.2.2) wie folgt durchgeführt:

Ansatz (20 µl): 1× Absolute[™] Blue QPCR Low Rox Mix (Thermo Fischer Scientific Inc);
300 nM TM_mHVEM_for Primer; 300 nM TM_mHVEM_rev Primer;
150 nM TM_mHVEM_pro Sonde; 2 µl cDNA

PCR-Programm: Schritt 1 95 °C 15 min
Zyklus (40 ×) 95 °C 15 s; 60 °C 60 s
Schritt 2 4 °C ∞

Die TaqMan-PCR wurde in Doppelbestimmungen durchgeführt, die Auswertung erfolgte mit der Stratagene MXPro Software. Anhand des mitgeführten Standards wurde eine Standardkurve berechnet und daraus die Kopienzahlen der Proben abgeleitet.

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 SDS-PAGE

Die Expression und biochemische Eigenschaften von mBTLA-huIgG1 wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese untersucht (Laemmli, 1970). Die Elektrophorese erfolgte in Mini Protean II-Kammern (BioRad). Es wurde 10 µg mBTLA-huIgG1 mit Protein-Probenpuffer versetzt. Für nicht-reduzierende Bedingungen enthielt der Protein-Probenpuffer kein DTT. Um mBTLA-huIgG1 zu reduzieren wurde dem Puffer 200 mM DTT zugesetzt. Die Proben wurden 5 min bei 95 °C erhitzt, zentrifugiert (1 min 12000 g) und anschließend bei 30 min 60 V und ca. 1 h 130 V aufgetrennt.

Die Proteine wurden durch Coomassie gefärbt. Die Acrylamid-Gele wurden für ca. 30 min in Färbelösung geschwenkt, durch Entfärbelösung wurde überschüssiger Farbstoff entfernt.

Verwendete Reagenzien:

Sammelgel: 4 % Polyacrylamid (BioRad), 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,1 % SDS

Trenngel: 12 % 12 % Polyacrylamid, 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8, 0,1 % SDS

Proteinstandard: *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Fermentas).

3× Protein-Probenpuffer: 150 mM Tris-HCl, pH 6,8, 200 mM DTT, 6 % SDS, 15,3 % Bromphenolblau, 30 % (v/v) Glycerin

Laufpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS

Färbelösung: 0,25 % Coomassie Brilliant Blue R-250, 40 % Methanol, 10 % Essigsäure

Entfärbelösung: 40 % Methanol, 10 % Essigsäure

2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinbestimmung nach Bradford

Zur schnellen Bestimmung der Proteinmenge wurde die Färbung nach Bradford verwendet (Bradford, 1976). Die Bradford-Stammlösung (BioRad Protein Assay) wurde 1:5 in Wasser verdünnt. 10 µl dieser Bradford-Arbeitslösung und 50 µl der zu testenden Proteinlösung wurden in einer 96er-Rundbodenplatte gemischt. Auf diese Weise konnten die proteinreichsten Fraktionen bestimmt werden.

Proteinbestimmung durch Messung der Absorption bei 280 nm

Die genaue Proteinkonzentration wurde mit einem Nanodrop ND-1000 Spektrometer bestimmt. Es wurde die Absorption bei 280 nm und 260 nm gemessen. Die Proteinkonzentration von IgG und mBTLA-huIgG1 berechneten sich nach folgender Formel:

[1 OD₂₈₀ = 0,8 mg/ml IgG]; [1 OD₂₈₀ = 1 mg/ml mbtla-huIgG1] (Goding, 1996)

2.6 Zellbiologische Methoden

2.6.1 Kultivierung von Zelllinien

Die Kultivierung von Zelllinien und Hybridomen erfolgte im Begasungsbrutschrank in gesättigter Wasserdampf-atmosphäre bei 37 °C unter 5 % CO₂. Die Kultivierung der Insektenzellen SL3 erfolgte bei 27 °C unter Normalatmosphäre. In Tab. 3 findet sich eine Aufstellung der verwendeten Zelllinien und dem Kulturmedium (Kapitel 2.3). Für die Kultivierung wurden Zellkulturflaschen (Greiner) und Zellkulturplatten (6, 24 oder 96 Vertiefungen, hier im Folgenden als „Well“ bezeichnet; Nunc) verwendet. Die Zellzahl wurde

nach Färbung mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zur Sicherung wurden Zellen eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur späteren Abgrenzung von den transfizierten Zelllinien wurden die in Tab. 3 aufgeführten untransfizierten Zelllinien als wildtyp Zelllinien (wt) bezeichnet.

Zelllinie	Medium	Quelle	Referenz	Organismus
SL3	SFX/FCS		Schneider, 1972	<i>Drosophila melanogaster</i>
RBL-1	R10F ⁺ /β-ME/AS/Pyr	ATCC (CRL-1378)	Kulczycki, Jr. <i>et al.</i> , 1974	<i>rattus norvegicus</i>
Y3-Ag 1.2.3	R10F ⁺ /β-ME/AS/Pyr	ATCC (CRL-1631)	Bazin <i>et al.</i> , 1972	<i>rattus norvegicus</i>
EL-4	D10F ⁺ /β-ME	ATCC (TIB-39)	Gorer, 1950	<i>mus musculus</i>
L-Zellen	R10F ⁺ /β-ME	J. Banchem	Rissoan <i>et al.</i> , 1996	<i>mus musculus</i>
P3x63Ag8.653	R10F ⁺ /β-ME	ATCC (TIB-9)	Horibata und Harris, 1970	<i>mus musculus</i>

Tab. 3: Verwendete Zelllinien und zugehörige Zellkulturmedien.

2.6.2 Produktion von mBTLA-huIgG1 in SL3

2.6.2.1 Transfektion von SL3

Die Transfektion der SL3 Zellen wurde in Anlehnung an in der Literatur beschriebenen Methoden durchgeführt (Cherbas *et al.*, 1994).

Einen Tag vor der Transfektion wurden die SL3 Zellen auf eine 24-Well Platte ausgesät, jeweils 1 ml mit folgenden Zelldichten:

3×10^5 ; 4×10^5 ; 5×10^5 ; 6×10^5 ; 7×10^5 Zellen/ml

Für die Transfektion wurde die Vertiefung mit 80 % Konfluenz der Zellen ausgewählt. Die Transfektion erfolgte mit Cellfectin (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers. Es wurden folgende Plasmide in den angegebenen Mengen kotransfiziert:

pRmHa3-MT-mBTLA-huIgG1 (2 µg) und 140 ng phshs.PURO (Selektionsplasmid mit Antibiotikumresistenz für Puromycin, von M. McKeown, Salk Institute).

Die Zellen wurden mit dem Transfektionsmix (Plasmide und Cellfectin in SFX⁺-Medium) 24 h bei 27 °C inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von SFX⁺-Medium und FCS (Endkonzentration 3 %). Parallel wurden wt SL3 Zellen auf 96-Well Platten als *Feeder*-Zellen für die transfizierten SL3 ausgesät (4×10^4 Zellen/Well/100 µl). 24 h später wurden die transfizierten SL3 Zellen vereinzelt. Die Zellen wurden in SFX⁺/FCS + 6 µg/ml Puromycin, Dichlorid (zur Selektion, Calbiochem) so verdünnt, dass statistisch die folgenden Zellzahlen in 100 µl auf die 96-Well Platten mit den *Feeder*-Zellen verteilt wurden:

2 Platten mit 6000 Zellen/Well; 4 Platten mit 1200 Zellen/Well, 8 Platten mit 120 Zellen/Well, 2 Platten mit 40 Zellen/Well.

Alle sieben Tage wurden 100 µl ohne Zellen aus den Wells mit 100 µl frischen SFX⁺/FCS + 10 µg/ml Puromycin ausgetauscht. Nach drei bis vier Wochen, wenn die Zellen ca. ¼ der Wells bedeckten, wurden die Zellen auf 2 Wells aufgeteilt (Original-Well und Replikat). Die Replikate wurden mit 1 mM CuSO₄ induziert (MT-Promotor). Nach vier Tagen werden die Überstände der induzierten Zellen mittels ELISA (Kapitel 2.6.2.2). Klone, die zwischen 3 und 30 µg/ml Fusionsprotein produzierten, wurden selektiert, weiter kultiviert (ausgehend vom Original-Well) und eingefroren. Der stärkste Produzent wurde hochgezogen um mBTLA-huIgG1 aus dem Überstand zu reinigen. Hierfür wurde SFX⁺-Medium mit 1 % FCS (gereinigt über Protein G Sepharose Chromatographie) und 5 µg/ml Puromycin verwendet.

2.6.2.2 Detektion von mBTLA-huIgG1 im Überstand mittels ELISA

Der Fusionsproteingehalt wurde mittels Sandwich-ELISA ermittelt. Die verwendeten Antikörper wurden zuvor titriert. Alle Waschschritte erfolgten mit einem ELISA-Washer.

96er-Mikrotiterplatten (MaxiSorb, Nunc) wurden mit 5 µg/ml Ziege-anti-huIgG (50 µl/Well; TAGO Immunologicals) in PBS über Nacht bei 4 °C beschichtet. Nach dreimaligem Waschen wurden freie Bindungsstellen durch Inkubation mit Blocklösung abgesättigt (200 µl/well, 1 h, RT). Nach zweimaligem Waschen erfolgte die Inkubation (2 h, RT) mit den verdünnten Proben und der Standardverdünnungsreihe. Anschließend wurde siebenmal gewaschen und mit biotinyliertem Ziegen-anti-huIgs (Verdünnung in PBS, 5 % FCS, 1 h, RT, TAGO Immunologicals) inkubiert. Danach wurde achtmal gewaschen und gebundenes Biotin durch Streptavidin-Meerrettichperoxidase (HRP, *horseradish peroxidase*) detektiert (Verdünnung in PBS, 5 % FCS, 30 min, RT, Dianova). Die Farbreaktion erfolgte durch Zugabe von 100 µl/Well TMB-Lösung. Die Farbreaktion wurde nach 3–10 min durch Zugabe von 100 µl/Well 1 M Schwefelsäure gestoppt. Die Platten wurden in einem Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge 630 nm) vermessen und die Daten mit dem Programm Revelation (Life Science) ausgewertet.

Waschpuffer: PBS, 0,1 % TWEEN 20 (Sigma)

Blocklösung: PBS, 3 % BSA (Fraktion V, Serva, Heidelberg)

Proben: induzierte Zellkulturüberstände, 1:800 verdünnt in SFX⁺/FCS + 6 µg/ml Puromycin

Standard: huIgG (Serum, Sigma), 80–0,078 ng/ml (1:1 serielle Verdünnung in SFX/FCS + 6 µg/ml Puromycin)

TMB-Lösung: 1 Tablette 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (Sigma-Aldrich) gelöst in 10 ml Substratpuffer (0,1 M Na₂HPO₄, 0,05 M Zitronensäure, pH 5) + 0,006 % H₂O₂

2.6.2.3 Reinigung von mBTLA-huIgG1 aus Zellkulturüberstand

Drei Liter der transfizierten SL3 Zellen wurden bei einer Zelldichte von ca. 2×10^6 Zellen/ml zur mBTLA-huIgG1-Produktion mit 1 mM CuSO₄ induziert. Nach 5–7 Tagen wurde der Überstand durch zweimalige Zentrifugation (15 min, 1000 g und 15 min, 14000 g) geerntet. Anschließend wurde der Überstand zuerst durch einen Seitz-K 300-Filter, 140 cm vorfiltriert, danach wurde er durch einen Seitz EKS Tiefenfilter, 140 cm (Seitz Filterwerke, Bad-Kreuznach) filtriert. Die Reinigung von mBTLA-huIgG1 erfolgte über eine mit GammaBind Plus Sepharose (10 ml, Amersham Life Science) gefüllte Chromatographiesäule (Econo-Pac, BioRad). Die Säule wurde mit 10 Säulenvolumen (SV = Volumen der GammaBind Plus Sepharose) PBS equilibriert. Danach wurde der Zellkulturüberstand über die Säule gegeben und mit 20 SV PBS gewaschen. Das Fusionsprotein wurde mit Elutionspuffer (100 mM Glycin, pH 2,7) eluiert und aufgefangen. Das Eluat wurde durch Zugabe von 1 M Tris pH 9,0 neutralisiert. Anschließend wurde das Eluat dreimal gegen PBS über ca. 30 h dialysiert (Dialyseschlauch, Molekulargewichtsausschluss 12 kDa, Sigma-Aldrich) und steril filtriert (0,22 µm Sartorius). Die Proteinkonzentration wurde mittels Nanodrop bestimmt (Kapitel 2.5.2). Die Regeneration der Säule erfolgte durch Spülen mit 10 SV Elutionspuffer und 20 SV PBS.

2.6.3 Expression von HVEM in Zelllinien

2.6.3.1 Transfektion von RBL-1, Y3-Ag 1.2.3 und L-Zellen

Zur Transfektion wurden RBL-1, Y3-Ag 1.2.3 (Y3-Ag) und L-Zellen mit 40 µg Plasmid-DNA durch Elektroporation transfiziert. Die Zellen wurden in 1 ml (RBL-1, Y3-Ag) bzw. 0,9 ml Zellkulturmedium resuspendiert, 40 µg Plasmid-DNA hinzugefügt und nach einer 10-minütigen Inkubation erfolgte die Elektroporation (GenePulser, BioRad, München) in einer 0,4 cm Elektroporationsküvette (BioRad). Nach der Transfektion wurden die Zellen in 10 ml Zellkulturmedium aufgenommen und 24 h kultiviert. Danach wurde dem Zellkulturmedium zur Selektion stabiler Transfektanten G418 (Gibco/Invitrogen) zugegeben. Die Zellen wurden in einer 96er-Flachbodenplatten ausgesät (RBL-1 und Y3-Ag: 5×10^4 /Well; L-Zellen: 1×10^4 /Well und $0,5 \times 10^4$ /Well). Nach ca. zwei Wochen erfolgte die Testung der Expression von HVEM auf der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie

(Kapitel 2.6.3.3). In Tab. 4 ist eine Übersicht der Transfektions- und Elektroporationsbedingungen und Angaben zu Medien und Selektionsbedingungen dargestellt.

Zelllinie	verwendetes Plasmid	eingesetzte Zellzahl	Zellkultur-medium	Elektroporationsbedingungen	eingesetzte Menge G418
RBL-1	BCMGS _{neo} -mHVEM	10×10^6	R10F ⁺ /β-ME/AS/Pyr	1300 V, 25 μF	0,75 mg/ml
	pcDNA3-mHVEM-YFP	10×10^6	R10F ⁺ /β-ME/AS/Pyr	1300 V, 25 μF	0,75 mg/ml
Y3-Ag	BCMGS _{neo} -mHVEM	10×10^6	R10F ⁺ /β-ME/AS/Pyr	1600 V, 25 μF	0,75 mg/ml
	pcDNA3-mHVEM-YFP	10×10^6	R10F ⁺ /β-ME/AS/Pyr	1600 V, 25 μF	0,75 mg/ml
L-Zellen	BCMGS _{neo} -mHVEM	2×10^6	R10F ⁺ /β-ME	1300 V, 25 μF	0,5 mg/ml
	pcDNA3-mHVEM-YFP	2×10^6	R10F ⁺ /β-ME	1300 V, 25 μF	0,5 mg/ml

Tab. 4: Transfektionsbedingungen zur Generierung stabiler Transfektanten.

2.6.3.2 Transfektion von EL-4

Zur Transfektion von EL-4 Zellen wurden 10×10^6 Zellen in 800 μl Puffer 42 (65 mM Na₂HPO₄, 24 mM NaH₂PO₄, 5 mM KCl, 24 mM Na-Succinat, 20 mM HEPES, pH 7,2) resuspendiert und mit 40 μg BCMGS_{neo}-mHVEM oder pcDNA3-mHVEM-YFP durch Elektroporation (450 V 500 μF) in einer 0,4 cm Elektroporationsküvette (BioRad) transfiziert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (380 g, RT, 5 min) und in 10 ml D10F⁺/β-ME resuspendiert und für 24 h kultiviert. Die Selektion stabiler Transfektanten erfolgte durch Zugabe von 0,8 mg/ml G418. Die Zellen wurden in einer 96er-Flachbodenplatten ausgesät ($2,5 \times 10^4$ /Well). Nach ca. zwei Wochen erfolgte die Testung der Expression von HVEM auf der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie (Kapitel 2.6.3.3).

2.6.3.3 Screening der Transfektanten

Für die Testung auf HVEM-Expression auf der Zelloberfläche wurden 100 μl Zellsuspension von den Transfektanten in eine 96er-Rundbodenplatte (Nunc) pipettiert und zentrifugiert. Die Zellen wurden mit 5 μg/ml mBTLA-huIgG1 in FACS-PBS für 25 min auf Eis inkubiert. Die Detektion des Fusionsproteins erfolgte mit anti-huIgG Fcy spez.-Cy5 (auf Eis, 15 min). Die Analyse erfolgte am FACSCalibur; zum Ausschluss toter Zellen von der Analyse wurde Propidiumiodid (PI) verwendet (Kapitel 2.8)

2.6.4 Isolierung muriner Zellen aus Milz, Lymphknoten, Lunge und Blut

Zur Entnahme von Organen wurden die Mäuse durch Genickbruch getötet. Einzelne Milzen wurden, nach vorangehender Zerkleinerung der Organe, durch ein 70 µm Nylon-Zell-Sieb (BD Falcon, Bedford USA) in PBS gedrückt. Für 2–8 Milzen wurde ein 212 µm Metallsieb verwendet. Danach wurde die Zellsuspension zentrifugiert (380 g, 8 min, 4 °C). Die Splenozyten wurden noch einer Lyse der Erythrozyten unterzogen. Das Zellpellet wurde in 5 ml ACK-Puffer (0,15 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM Na₂EDTA, pH 7,2–7,4) resuspendiert und 1 min bei RT geschwenkt. Die Lyse wurde durch Zugabe von PBS gestoppt. Die Zellen wurden zentrifugiert und je nach weiterer Verwendung in MACS-PBS, FACS-PBS oder R10F⁺/β-ME/AS/Pyr resuspendiert (Kapitel 2.6.6; 2.8; 2.6.5).

Lymphknoten wurden auf Eis, nach vorangehender Zerkleinerung der Organe, durch ein 70 µm Nylon-Zell-Sieb in 2 ml MACS-PBS und DNaseI (20 µg/ml) gedrückt. Die Lymphknotenzellen wurden zentrifugiert (380 g, 8 min, 4 °C), in 500 µl FACS-PBS resuspendiert, nochmals durch ein 70 µm Sieb gegeben, das mit 1 ml FACS-PBS gespült wurde und gezählt.

Die Lunge wurde mit 10 ml PBS über die rechte Herzkammer perfundiert. Vor dem Verdau mit Collagenase D (500 µg/ml, Roche) und DNaseI (20 µg/ml, Roche) wurde die Lunge fein zerkleinert. Der Verdau erfolgte in RPMI 1640 Medium mit 2 % Fötalem Rinderserum (FSC, Biochrom AG, Berlin) für 25 min bei 37 °C. Der Verdau wurde beendet durch Zugabe von EDTA (10 mM) für weitere 5 min bei 37 °C. Die Zellen wurden durch ein 70 µm Nylon-Zell-Sieb in PBS filtriert. Nach der Lyse von Erythrozyten mit ACK-Puffer für 1 min bei RT und anschließendem Waschen mit PBS, wurden die Lungenzellen in FACS-PBS resuspendiert und gezählt.

Zur Zellzählung wurde das Zellzählgerät Guava[®] PCA (Guava Technologies) genutzt. Die Messung der mit Viacount Reagenz (2,5 µg/ml LDS-751, 1 µg/ml Propidiumiodid, 5 mM EDTA, 0,05 % NaN₃, in PBS, pH 7,2) verdünnten Zellen erfolgte nach 5 min. Zur Ermittlung der Anzahl lebender, nukleärer Zellen wurde die ViaCount Software (Guava Technologies) verwendet.

Blut wurde retroorbital von narkotisierten Mäusen entnommen und sofort mit Heparin (Roche) vermischt. Für die HVEM-Färbung auf Erythrozyten wurde das Blut 1:100 in 1× Fc-Block verdünnt (Kapitel 2.8.2).

2.6.5 Anreicherung muriner T-Zellen mittels Nylonwolle

Zur Anreicherung von T-Zellen aus Splenozyten wurden Nylonwoll-Säulen verwendet (Eisen *et al.*, 1972). Die Nylonwolle (PolySciences Nylon wool fibre) wurde in 0,1 M HCl vorgewaschen, gründlich mit Wasser gespült und anschließend getrocknet. 3 g trockene Nylonwolle wurde mit Bürsten aufgelockert und in eine 50 ml Plastikspritze (BD, Bedford USA) gestopft. Je nach Bedarf wurden die Säulen vor der Verwendung autoklaviert. An die Spritze wurde ein 2-Wege Sperrhahn angebracht. Vor dem Auftragen der Zellen wurde die Nylonwoll-Säule mit PBS und mit vorgewärmtem R10F⁺/β-ME/AS/Pyr equilibriert. Bis zu 600×10^6 Splenozyten wurden in 10 ml R10F⁺/β-ME /AS/Pyr auf eine Säule gegeben und die Tropfgeschwindigkeit wurde auf 1 Tropfen/Sekunde eingestellt. Danach wurden weitere 6 ml R10F⁺/β-ME/AS/Pyr über die Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule verschlossen, mit 4 ml R10F⁺/β-ME/AS/Pyr überschichtet und 45 min im Zellkultur-Brutschrank inkubiert. Für die Elution mit 90 ml R10F⁺/β-ME/AS/Pyr, 37 °C wurde eine stumpfe 21G Kanüle (Braun) an die Säule angebracht.

2.6.6 Magnetische Zellsortierung (MACS) von murinen Splenozyten

Die MACS-Technik (*Magnetic Activated Cell Sort*) ermöglicht es, Zellen aufgrund ihrer Oberflächenmarker zu sortieren. Dabei werden die Zellen über spezifische Antikörper gegen Oberflächenantigene mit superparamagnetischen Partikeln (*Beads*, Ø ca 100 nm) markiert. Die Separation der Zellen erfolgt dann über magnetisierbare LS-Säulen (MidiMACS®, Miltenyi Biotec) in einem Magneten (Miltenyi *et al.*, 1990). Die Zellen, die mAk mit *Beads* gebunden haben, verbleiben auf der Säule, die anderen befinden sich im Durchfluss. Die Elution erfolgte außerhalb des Magneten.

T-Zellen wurden aus Splenozyten entweder von wt, HVEM-defizienten, BTLA-defizienten oder BTLA-transgenen Mäusen durch Depletion der CD11b⁻, CD11c⁻, NK1.1⁻ und B220⁻ positiven Zellen über biotinylierte mAk und anschließende Inkubation mit anti-Biotin MicroBeads (Miltenyi Biotech) sortiert. Um naive CD4⁺-T-Zellen zu erhalten, wurden die T-Zellen zunächst über eine Nylonwoll-Säule angereichert (Kapitel 2.6.5). Zusätzlich zu der Depletion für Gesamt-T-Zellen wurden noch CD8⁺-Zellen depletiert, über eine zweite magnetische Zellsortierung wurden die CD62L^{high} CD4⁺ T-Zellen mittels anti-CD62L-Beads positiv sortiert.

B-Zellen wurden aus wt Splenozyten durch Depletion von CD11c⁻, NK1.1⁻, Ly6G⁻ und Thyl⁻ positiven Zellen sortiert.

Für die Depletion von Zellen wurden 100×10^6 Zellen/ml mit den entsprechenden biotinylierten mAk für 15 min in der optimalen Verdünnung in MACS-PBS auf Eis inkubiert. Für die T-Zell-Sortierung wurde kein Fc-Block verwendet, jedoch bei der Sortierung von B-Zellen wurde die Inkubation mit den biotinylierten mAk in $1 \times$ Fc-Block durchgeführt, da B-Zellen mAk unspezifisch binden, und dies verhindert werden sollte. Die Zellen wurden dann über die LS-Säule im Magneten, auf die zur Verlangsamung der Tropfgeschwindigkeit eine 22 G-Kanüle (Braun) aufgesteckt war, getrennt. Die gewünschten Zellen befanden sich im Durchfluss.

Für die Sortierung der naiven CD62L^{high}-Zellen wurden die Zellen (200×10^6 Zellen/ml) in MACS-PBS mit $1 \times$ Fc-Block mit limitierender Konzentration von anti-CD62L-*Beads* (Miltenyi Biotec) für 15 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden dann über die LS-Säule im Magneten (ohne Kanüle) getrennt. Die Äquilibration, der Probenauftrag und die Elution erfolgten nach Angaben des Herstellers (Miltenyi Biotec).

Die Reinheit der sortierten Population wurden am LSRII überprüft. Sie lag in der Regel über 97 % bei T-Zellen und für B-Zellen bei ca. 90 %.

2.6.7 *In vitro*-Aktivierung von T-Zellen

Auf speziell beschichteten *High-Protein-Binding* 96-Well Platten (Costar) wurden verschiedene Konzentrationen anti-CD3 mAk (145-2C11, 31–1000 ng/ml) in Gegenwart einer konstanten Menge anti-CD28 mAk (37.51, 4 µg/ml) in PBS über Nacht immobilisiert. Die Kultivierung der MACS-sortierten Gesamt-T-Zellen bzw. naiven CD4⁺-T-Zellen (10^5 Zellen/Well in 200 µl R10F⁺/β-ME/AS/Pyr, Kapitel 2.6.6) auf diesen Platten für 18–72 h bei 37 °C führte zur Aktivierung der T-Zellen. Die Analyse der Aktivierung und HVEM- bzw. BTLA-Expression zu verschiedenen Zeitpunkten (s. Kapitel 3.3.4) erfolgte am LSRII. Es wurden entsprechende mAk zur Färbung von Aktivierungsmarkern, HVEM, BTLA, CD4 und CD8 verwendet (Kapitel 2.8.1 und 2.8.2).

2.6.8 Modulationsassay von BTLA *in vitro*

Auf speziell beschichteten *High-Protein-Binding* 96-Well Platten (Costar) wurde mHVEM-huIgG1 (4 µg/ml) oder ein humanes Ig-Kontrollprotein (Isotyp, Endobulin, Baxter, Heidelberg, 4 µg/ml) in PBS über Nacht immobilisiert. Magnetisch-sortierte B-Zellen ($2,5 \times 10^5$ Zellen/Well in 200 µl) wurden für 5 h, 10 h und 21 h auf diesen Platten in R10F⁺/β-ME/AS/Pyr kultiviert. Die BTLA-Expression wurde am LSRII analysiert. Hierfür wurden die Zellen entweder mit anti-BTLA mAk oder mit mHVEM-huIgG1 (20 µg/ml) und Ziege-anti-huIgG Fcγ-Cy5 (Dianova) für 20 min auf Eis in FACS-PBS mit $1 \times$ Fc-Block gefärbt

(Kapitel 2.8). Für die Real-Time-Quantitative PCR wurden aus jeweils 10×10^6 B-Zellen RNA isoliert (Kapitel 2.4.1.2 und 2.4.5). Zur Überprüfung auf BTLA-Internalisierung wurde nach der Oberflächenfärbung von BTLA eine intrazelluläre Färbung von BTLA durchgeführt (s. Kapitel 2.8.2 und 2.8.3).

2.6.8.1 Verwendung von Matrix-Metalloproteaseinhibitoren

Splenozyten ($2,5 \times 10^6$ Zellen/ml) wurden mit $30 \mu\text{M}$ bzw. $100 \mu\text{M}$ der Matrix-Metalloproteaseinhibitoren GM6001 oder MMPI IV (beide von Calbiochem) und einer Medium-Kontrolle für 10 min bei RT vorinkubiert, anschließend wurden die Splenozyten ($2,5 \times 10^5$ Zellen/well in $200 \mu\text{l}$) mit den Matrix-Metalloproteaseinhibitoren oder der Medium-Kontrolle auf *High-Protein-Binding* 96-Well Platten (Costar) mit immobilisiertem mHVEM-huIgG1 bzw. Isotyp (Kapitel 2.6.8) für 5 h bei 37°C in $\text{R10F}^+/\beta\text{-ME}/\text{AS}/\text{Pyr}$ kultiviert. Es wurde dann die BTLA-Expression nach Färbung mit anti-BTLA mAk am LSRII gemessen. Als Positivkontrolle für die Inhibitoren wurden Splenozyten wie oben beschrieben behandelt, allerdings wurden die Zellen auf 96-Well Rundbodenplatten mit oder ohne PMA-Stimulation (250 ng/ml) in Medium kultiviert. Es wurde dann die Expression von ICOS-L analysiert (Kapitel 2.8.2).

2.7 Generierung monoklonaler Antikörper gegen HVEM

Die Herstellung der mAk gegen mHVEM erfolgte in Anlehnung an die Beschreibungen von Harlow, Lane und Goding (Harlow und Lane, 1988; Goding, 1996).

2.7.1 Immunisierung der HVEM-defizienten Mäuse

Es wurden zwei Immunisierungsstrategien verfolgt:

1. Eine HVEM-defiziente Maus wurde mit 20×10^6 bestrahlten ($1 \times 3000 \text{ rad}$) EL-4 BCMGS_{neo}-HVEM Klon 22 sowie 23×10^7 *B. pertussis* in $100 \mu\text{l}$ PBS intraperitoneal immunisiert. Es folgte eine weitere Immunisierung nach 4 Wochen. Nach weiteren 4 Wochen wurde die Maus nochmals an den 3 Tagen vor der Fusion immunisiert (Fusion HVEM 1).
2. Eine HVEM-defiziente Maus wurde mit $50 \mu\text{g}$ mHVEM-huIgG1 in $100 \mu\text{l}$ PBS mit 50 % vollständigem Freund's Adjuvans (CFA) intraperitoneal immunisiert. Es folgte eine weitere Immunisierung mit $50 \mu\text{g}$ mHVEM-huIgG1 in $100 \mu\text{l}$ PBS mit 50 % unvollständigem Freund's Adjuvans (IFA) intraperitoneal nach 8 Wochen. Nach

weiteren 4 Wochen wurde die Maus an den 3 Tagen vor der Fusion mit jeweils 50 µg mHVEM-huIgG1 in 100 µl PBS immunisiert (Fusion HVEM 2).

2.7.2 Fusion mit Polyethylenglykol und Selektion

Am Tag der Fusion wurde der immunisierten Maus die Milz steril entnommen. Aus vier 8–10 Wochen alten BALB/c Mäusen wurden Thymozyten präpariert (Durchdrücken durch 212 µm Metallsieb in PBS, gewaschen), in 20 ml R10F⁻/β-ME resuspendiert, durch 70 µm Nylon-Zell-Sieb (BD Falcon, Bedford USA) filtriert und bis zur weiteren Verwendung bei 37 °C gelagert. Die Milz wurde in PBS mit dem Stempel einer 5 ml Spritze durch ein 212 µm Metallsieb gedrückt, die Zellen gesammelt und zentrifugiert. Die Splenozyten wurden durch ein 70 µm Sieb gegeben, erneut zentrifugiert und anschließend erfolgte die Lyse der Erythrozyten durch Erythrozyten-Lysepuffer (185 mM NH₄Cl, 17 mM Tris-HCl, pH 7,2). Danach wurden die Splenozyten erneut durch ein 70 µm Sieb gegeben, zentrifugiert und dann in 20 ml R10F⁻/β-ME resuspendiert.

Die Myelomzellen P3x63Ag8.653 wurden parallel zweimal mit R10F⁻/β-ME gewaschen und anschließend in 30 ml R10F⁻/β-ME resuspendiert.

Für die Fusion wurden 100×10⁶ Splenozyten mit 50×10⁶ Myelomzellen gemischt und pelletiert. Das Pellet wurde gelockert und vorsichtig in 1 ml PEG 1500 (Roche) resuspendiert. Danach wurde für weitere 1–2 min geschüttelt und langsam mit 4 ml RPMI 1640 innerhalb von 4 min verdünnt. Dann wurden weitere 10 ml RPMI 1640 zugegeben, für 5 min bei 37 °C inkubiert und anschließend zentrifugiert (500 g, 5 min, RT, ohne Bremse). Die Zellen wurden in R10F⁻/β-ME resuspendiert und bei 37 °C im Wasserbad gelagert. Für die Kultur wurden die Hybridomzellen mit 100×10⁶ Thymozyten als *Feeder*-Zellen gemischt und in Selektionsmedium mit AH-Selektion (Aminopterin-Hypoxanthin) aufgenommen. Davon wurden 2 × 10⁴ Splenozyten/200 µl/Well auf 96er-Flachbodenplatten verteilt und im Brutschrank inkubiert. Nach 7 Tagen wurden 100 µl Medium ohne Zellen abgenommen und durch 150 µl neues Selektionsmedium ersetzt.

2.7.3 Screening der Hybridomüberstände in der Durchflusszytometrie

Etwa 10 Tage nach der Fusion waren die Hybridome zu Kolonien herangewachsen, die makroskopisch zu sehen waren. Es wurden von Hybridomen, die ca. ¼ des Wells bedeckten 150 µl Überstand abgenommen und in der Durchflusszytometer auf anti-HVEM mAk getestet.

2.7.3.1 Verwendung von Zelllinien: HVEM-Transfektante vs. wt Zelllinie

Es wurde die Erkennung von HVEM durch die mAk getestet. Dazu wurden $0,2 \times 10^6$ Zellen L-Zellen wt + L-Zellen BCMGS_{neo}-HVEM Klon 25 in 96-Well-Rundbodenplatte (Nunc) mit 50 µl Hybridomüberstand für 30 min auf Eis inkubiert, mit FACS-PBS gewaschen und mit Ziege-anti-msIgG Fcγ-spez.-Cy5 (nicht-präadsorbiert, Dianova) für 20 min auf Eis gefärbt und gewaschen. Die Analyse erfolgte am FACSCalibur.

2.7.3.2 Verwendung von primären Zellen: wt vs. HVEM-defiziente Splenozyten

Durch die Verwendung von wt Splenozyten im Vergleich zu HVEM-defizienten Splenozyten wurde die Spezifität der mAk getestet. Jeweils $0,5 \times 10^6$ Splenozyten wurden in 96-Well-Rundbodenplatte (Nunc) mit je 50 µl Hybridomüberstand für 30 min auf Eis inkubiert, mit FACS-PBS gewaschen und mit Ziege-anti-msIgG Fcγ-Fragment-spez.-Cy5 (nicht-präadsorbiert, Dianova) für 20 min auf Eis gefärbt und gewaschen. Die Analyse erfolgte am FACSCalibur.

2.7.3.3 Blockadetest 1: Inhibition der mHVEM-huIgG1-Bindung

Zur Testung der blockierenden Wirkung der anti-HVEM mAk wurden 50 µl Hybridomüberstand mit mHVEM-huIgG1 (20 µg/ml) für 20 min auf Eis vorinkubiert. Anschließend wurden mit diesem Gemisch L-Zellen wt + L-Zellen BCMGS_{neo}-BTLA Klon 1 auf Eis für 25 min inkubiert und gewaschen. Die Detektion der Bindung von mHVEM-huIgG1 an BTLA erfolgte mit Ziege-anti-huIgG Fcγ-Fragment-spez.-FITC (Färbung 20 min auf Eis). Im Fall von nicht-blockierenden anti-HVEM mAk wurde die Bindung der mAk an mHVEM-huIgG1 durch Färbung mit Ziege-anti-msIgG Fcγ-Fragment-spez.-Cy5 für 20 min auf Eis detektiert. Die Analyse erfolgte im FACSCalibur. Dieser Test wurde auch mit den gereinigten anti-HVEM mAk durchgeführt. Die mAk wurden mit mHVEM-huIgG1 (20 µg/ml) im dreifachen Überschuss vorinkubiert.

2.7.3.4 Blockadetest 2: Inhibition der mBTLA-huIgG1-Bindung

Zur Testung der blockierenden Wirkung der anti-HVEM mAk wurden $0,2 \times 10^6$ Zellen L-Zellen BCMGS_{neo}-HVEM Klon 25 mit 50 µl Hybridomüberstand für 30 min inkubiert, gewaschen mit FACS-PBS und mit mBTLA-huIgG1 (5 µg/ml) für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Ziege-anti-huIgG Fcγ-Fragment-spez.-Cy5 20 min auf Eis gefärbt und so die Bindung von mBTLA-huIgG1 überprüft. Die Analyse erfolgte im FACSCalibur. Dieser Test wurde ebenfalls mit den gereinigten anti-HVEM mAk

durchgeführt. Für die Inkubation der gereinigten mAk mit der HVEM-Transfektante wurden die mAk mit einer Konzentration von 20 µg/ml eingesetzt.

2.7.4 Kultivierung und Subklonierung ausgewählter Hybridome

Hybridome, deren Antikörper das Antigen spezifisch erkannten und blockierende Eigenschaften aufwiesen, wurden weiter kultiviert und mittels limitierender Verdünnung subkloniert, um sicherzustellen, dass die mAk von nur einem Klon stammten. Dafür wurden die Zellen in R20F⁺/ME/50 so verdünnt, dass statistisch in jedes Well 30 Zellen gelangten. Von dieser Ausgangsverdünnung wurden vier weitere 1:3 Verdünnungen hergestellt und ebenfalls in 96-Well-Flachbodenplatten verteilt. Nach einer Woche wurde für die Analyse die Platte ausgewählt, auf der in weniger als 20 Wells Zellen gewachsen waren. Die Subklone wurden auf Antigen-Erkennung in der Durchflusszytometrie untersucht (Kapitel 2.7.3.1 und 2.7.3.2). Die Produktion von Immunglobulin durch die Hybridome wurde mittels intrazellulärer Färbung (Kapitel 2.8.3) bestimmt. In einigen Fällen waren bis zur Klonalität des Hybridoms mehrere Subklonierungen notwendig. Nach der Subklonierung wurden die Hybridome in R10F⁺/β-ME/5 kultiviert. Für die Reinigung der mAk wurden die Hybridome in R10F⁺/β-ME/5 mit ProteinG-gereinigtem FSC bis zu einem Volumen von drei Litern in Rollerflaschen kultiviert.

2.7.5 Reinigung der Antikörper aus Zellkulturüberstand

Ausgewachsene Hybridomkulturen (Kapitel 2.7.4) wurden zweimal zentrifugiert (15 min, 1000 g und 15 min, 14000 g) und anschließend wurde der Überstand durch einen 0,2 µm Filter (Steritop, Millipore, Bedford, USA) gegeben. Die Reinigung erfolgte über GammaBind Plus Sepharose (Amersham Life Science) wie in Kapitel 2.6.2.3 bereits beschrieben.

2.7.6 Isotypbestimmung mittels ELISA

96er-Mikrotiterplatten (MaxiSorb, Nunc) wurden mit 7,5 µg/ml Ziege- anti-msIg (50 µl/Well, Southern Biotech Association) in PBS über Nacht bei 4 °C beschichtet. Nach dreimaligem Waschen wurden freie Bindungsstellen durch Inkubation mit Blocklösung abgesättigt (200 µl/well, 1 h, RT). Nach viermaligem Waschen erfolgte die Inkubation (1 h, RT) mit den Proben und Positivkontrollen. Anschließend wurde sechsmal gewaschen und mit HRP-gekoppelten Antikörpern gegen murines IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b oder IgG3 (Verdünnung in Blocklösung, SBA) für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde sechsmal gewaschen. Die Farbreaktion erfolgte durch Zugabe von 100 µl/Well TMB-Lösung. Die Farbreaktion wurde nach 3–10 min durch Zugabe von 100 µl/Well 1 M Schwefelsäure gestoppt. Die Platten

wurden in einem Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm (Referenzwellenlänge 630 nm) vermessen und die Daten mit dem Programm Revelation (Life Science) ausgewertet.

Waschpuffer: PBS, 0,1 % TWEEN 20 (Sigma)

Blocklösung: PBS, 1 % BSA (Fraktion V, Serva, Heidelberg)

Proben: unverdünnte, 1:3 und 1:6 verdünnte Hybridomüberstände oder 0,1–0,15 µg/ml gereinigter mAk (Verdünnung in Blocklösung),

Positivkontrollen: je 0,1 µg/ml IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b oder IgG3

TMB-Lösung: 1 Tablette 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (Sigma-Aldrich) gelöst in 10 ml Substratpuffer (0,1 M Na₂HPO₄, 0,05 M Zitronensäure, pH 5) + 0,006 % H₂O₂

2.7.7 Epitop- und Affinitätstest

Für den Epitoptest wurden $0,5 \times 10^6$ Splenozyten in 50 µl 1× Fc-Block mit 200 µg/ml der einzelnen ungekoppelten anti-HVEM mAk für 5 min vorinkubiert. Dann erfolgte die Zugabe des DIG-gekoppelten anti-HVEM mAk (in optimaler Verdünnung) und anti-CD3-FITC, Inkubation für 20 min auf Eis, waschen mit FACS-PBS und Färbung mit anti-DIG-A647 für 20 min auf Eis. Zur Kontrolle wurden die verschiedenen anti-HVEM mAk auch ohne Inkubation mit einem ungekoppelten mAk mitgeführt, sowie eine Inkubation des gleichen ungekoppelten mAk, der dann auch für die Färbung verwendet wurde (Positivkontrolle für Blockade). Die Analyse wurde am LSRII durchgeführt.

Für den Affinitätstest wurden 10^6 wt L-Zellen + Zellen L-Zellen BCMGS_{neo}-HVEM Klon 25 für 20 min mit den DIG-gekoppelten anti-HVEM mAk inkubiert und zweimal gewaschen. ½ des Ansatzes wurde für 15 min auf Eis inkubiert, die andere Hälfte wurde bei 37 °C inkubiert. Danach wurde zweimal mit kaltem FACS-PBS gewaschen und mit anti-DIG-A647 gefärbt. Anschließend wurden die Zellen mit 2 % Formaldehyd fixiert und am LSRII analysiert.

2.8 Durchflusszytometrie

Die anti-HVEM mAk und andere laboreigene Antikörper wurden nach Standardmethoden an Haptene (Digoxigenin, Biotin) oder Fluorochrome gekoppelt (Brinkley, 1992; Oi *et al.*, 1982; Goding, 1996).

2.8.1 Verwendete Antikörper und Fluorochrome

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper (u. a. Durchflusszytometrie, magnetische Zellsortierung, Immunhistochemie) sind in Tab. 5 aufgeführt. Die Fluorochrome, mit denen Antikörper gekoppelt waren, sind in Tab. 6 aufgelistet.

Antigenspezifität	Klonbezeichnung	Quelle	Referenz
CD3	KT3	Hybridom	Tomonari, 1988
CD3	145-2C11	PharMingen	Leo <i>et al.</i> , 1987
CD4	GK1.5	Hybridom	Dialynas <i>et al.</i> , 1983
CD8	53-6.72	Hybridom	Ledbetter <i>et al.</i> , 1980
CD11b	5C6	Hybridom	Rosen und Gordon, 1987
CD11c	N418	Hybridom	Metlay <i>et al.</i> , 1990
CD19	1D3	Hybridom	Krop <i>et al.</i> , 1996
CD25	2E4	Hybridom	Ortega <i>et al.</i> , 1984
CD28	37.51	Hybridom	Gross <i>et al.</i> , 1992
CD45	M1/9.3	Hybridom	Gilligan <i>et al.</i> , 1988
CD45R (B220)	RA3-6B2	Hybridom	Coffman, 1982
CD49b	DX5	eBioscience	Arase <i>et al.</i> , 2001
CD62L	MEL-14	Hybridom	Gallatin <i>et al.</i> , 1983
CD69	H1.2F3	eBioscience	Yokoyama <i>et al.</i> , 1988
CD90 (Thy-1)	G7	Hybridom	Logdberg <i>et al.</i> , 1985
CD90.1 (Thy-1.1)	OX-7	Hybridom	Lorber <i>et al.</i> , 1983
F4/80	F4/80	Hybridom	Austyn und Gordon, 1981
Ly-6G/C (Gr1)	RB6-8C5	Hybridom	Fleming <i>et al.</i> , 1993
MHC-II	M5/114.15.2	Hybridom	Bhattacharya <i>et al.</i> , 1981
NK 1.1	PK136	PharMingen	Koo und Peppard, 1984
V α 2-TCR	B20.1	eBioscience	Gregoire <i>et al.</i> , 1991
V β 5-TCR	MR9-4	BD Biosciences	Kanagawa <i>et al.</i> , 1991
TER-119	TER-119	eBioscience	Kina <i>et al.</i> , 2000
ICOS-L	MIL-5733	Hybridom	eigener Antikörper
BTLA	mBT-1622.6	Hybridom	S. Gurka, RKI
HVEM	mHV-5	Hybridom	diese Arbeit
HVEM	mHV-130	Hybridom	diese Arbeit
HVEM	mHV-487.264.33	Hybridom	diese Arbeit
HVEM	mHV-1416.438	Hybridom	diese Arbeit
HVEM	mHV-1411	Hybridom	diese Arbeit
HVEM	mHV-1466	Hybridom	diese Arbeit
HVEM	mHV-1509	Hybridom	diese Arbeit
HVEM	mHV-1980.211	Hybridom	diese Arbeit

Tab. 5: Übersicht der verwendeten Antikörper.

Es sind die gereinigten anti-HVEM mAk aufgeführt. Die fett markierten Klone wurden für die IHC und Durchflusszytometrie eingesetzt. Die Angabe „Hybridom“ steht für laboreigene Hybridome, aus deren Kulturüberstand die Antikörper gereinigt wurden.

Fluorochrom	Anregungs- maximum (nm)	Wellenlänge des Lasers (nm)	Emissions- maximum (nm)	BP Filter (LSRII)	BP Filter (FACSCalibur)
FITC, CFSE	495	488	525	530/30	530/30
PE	498	488	575	585/42	585/42
PerCP	488	488	675	685/40	
PE-Cy5.5	496	488	695/655	685/40	
PE-Cy7	496	488	767	780/60	
A647/Cy5/APC	647/649/650	633	665/667/660	670/14	661/16
A700	702	633	723	720/30	
APC-Cy7	625–650	633	767	780/60	
Pac B, DAPI	405/358	405	451	440/40	
Cas Y, Pac O, DAPI	400/358	405 nm	558	562/40	
PI	488	488	620		LP \geq 670

Tab. 6: Übersicht der Fluorochrome.

Angabe der Wellenlänge des Lasers zur Anregung der Fluorochrome sowie die zur Detektion im Durchflusszytometer (LSRII und FACSCalibur, BD) verwendeten Filter. Abk.: BP: Bandpassfilter, LP: Langpassfilter. Anregungs- und Emissionsmaxima wurden zusammengestellt mit Daten von BD Biosciences, Zeiss und Molecular Probes

2.8.2 Färbung von Zelloberflächenproteinen

Die Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit die Proteinexpression sowohl auf der Zelloberfläche als auch intrazellulär auf Einzelzellebene zu analysieren (Radbruch, 2000). Für die Färbung wurden $0,3\text{--}4 \times 10^6$ Zellen in einer 96er-Rundbodenplatte (Nunc) eingesetzt. Um unspezifische Antikörperbindungen an Fc-Rezeptoren zu minimieren, wurden die Zellen vor der Antikörperinkubation 5 min auf Eis mit $1 \times$ Fc-Block ($100 \mu\text{g/ml}$ anti-CD16/CD32 (Klon 2.4G2), $50 \mu\text{g/ml}$ Ratten IgG (Nordic)) inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit in FACS-PBS verdünnten Antikörpern für 20 min auf Eis. Es wurden sowohl direkt an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelte als auch Biotin- und Digoxigenin (DIG)-gekoppelte mAk verwendet. Die Biotin-gekoppelten bzw. DIG-gekoppelten Primärantikörper wurden mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppeltem Streptavidin bzw. anti-DIG Antikörper angefärbt (5 min bzw. 20 min auf Eis). Die Antikörper, die für die Oberflächenfärbung verwendeten wurden, sind in Tab. 5 aufgeführt. Die Antikörper wurden entweder aus Kulturüberständen von laboreigenen Hybridomen gereinigt (wie in Kapitel 2.7.5 beschrieben) und an Fluoreszenzfarbstoffe oder Haptene gekoppelt, oder von kommerziellen Herstellern bezogen. Sämtliche Antikörper wurden vor ihrer Verwendung titriert, um optimale Färbeergebnisse zu erhalten.

Für die Färbung von HVEM auf Erythrozyten wurde 1 µl Blut (Kapitel 2.6.4) in 1× Fc-Block 1:100 verdünnt, davon wurden 50 µl für die Färbung mit anti-HVEM mAk, anti-CD45 und anti-TER-119 mAk (Erythrozyten: CD45⁻TER-119⁺) verwendet.

Da tote Zellen unspezifisch Antikörper binden können, wurde den Proben zur Identifizierung der toten Zellen kurz vor der Messung im Durchflusszytometer die DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffe Propidiumiodid (0,33 µg/ml; PI; für FACSCalibur) oder 4', 6-Diamidino-2-Phenylindol (0,33 µg/ml, DAPI; Roche) zugesetzt. Die intakte Zellmembran lebender Zellen verhindert das Eindringen dieser Farbstoffe. Die PI⁻- oder DAPI⁻-Zellen (tot) wurden in der Auswertung der Daten ausgeschlossen.

Die Analyse erfolgte am LSRII-Durchflusszytometer unter Verwendung der Software BD FACSDiva oder am FACSCalibur mit der Aufnahme-Software CellQuest Pro (Geräte und Software von BD Biosciences). Zur Auswertung der Daten wurde die Software FlowJo (Tree Star Inc.) verwendet. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Histogramm oder *Dot Plot*. In Experimenten mit primären Zellen wurde eine geeignete Eingrenzung der Zellen im Vorwärts- und Seitwärtsscatter, der Ausschluss der Dubletten in der Höhe und Fläche der Vorwärts- und Seitwärtsscatter und der Ausschluss der toten Zellen über PI bzw. DAPI vorgenommen (Abb. 3). Dieses Vorgehen war für alle Experimente gleich und wird in späteren Abbildungen nicht mehr gezeigt. In Experimenten mit Zelllinien wurde nach der geeigneten Eingrenzung der Zellen im Vorwärts- und Seitwärtsscatter nur noch der Ausschluss der toten Zellen über PI bzw. DAPI vorgenommen.

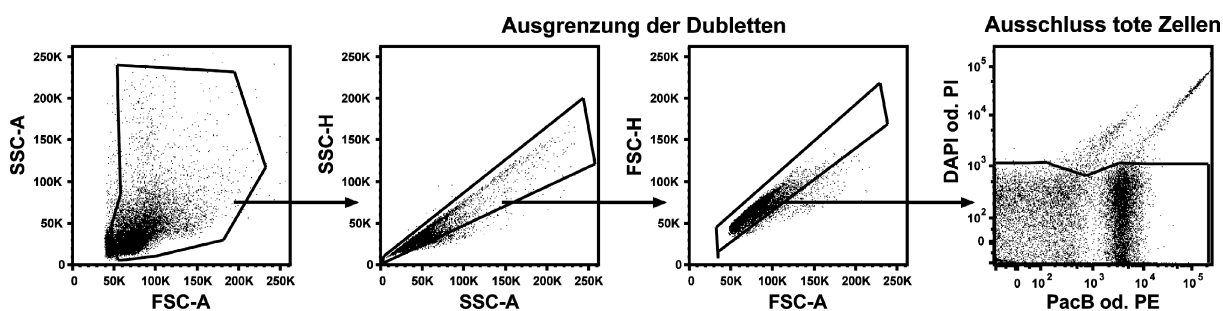


Abb. 3: Identifizierung der lebenden primären Zellen.

Im Durchflusszytometer gemessene Zellen wurden im Vorwärts- und Seitwärtsscatter eingegrenzt, anschließend erfolgte die Ausgrenzung der Dubletten in der Höhe und Fläche der Seitwärts- und Vorwärtsscatter und der Ausschluss der toten Zellen über Eingrenzung der lebenden Zellen (DAPI bzw. PI).

2.8.3 Färbung von intrazellulären Proteinen

Intrazelluläre Proteine können durch die intrazelluläre Durchflusszytometrie analysiert werden (Sander *et al.*, 1991).

Für die intrazelluläre Färbung von Proteinen wurden Zellen mit PBS gewaschen und mit 2 % Formaldehyd in PBS fixiert (20 min, RT). Danach wurden die Zellen in FACS-PBS

gewaschen und bis zur Färbung in FACS-PBS bei 4 °C gelagert. Alle folgenden Waschschrte und Antikörperinkubationen erfolgten mit 1× Saponin (0,5 % Saponin in FACS-PBS).

Um die Quantität der mAk-Produktion von Hybridomen festzustellen, wurden ca. $0,5 \times 10^6$ Hybridomzellen fixiert und Immunglobulin G intrazellulär mit Ziege-anti-mIgG Fcγ-Fragment spez.-Cy5 nachgewiesen. Die Färbung erfolgte bei RT für 25 min (Kapitel 2.7.4).

Zur Untersuchung der Internalisierung von BTLA, wurde von 10^6 B-Zellen nach der Kultivierung mit immobilisiertem mHVEM-huIgG1 oder Isotyp (Kapitel 2.6.8) zunächst BTLA auf der Zelloberfläche mit mBT-1622.6-PE gefärbt, anschließend wurden die Zellen fixiert und BTLA intrazellulär mit mBT-1622.6-Cy5 gefärbt (mAk s. Tab. 5 Kapitel 2.8.1).

2.9 Immunhistochemie (IHC)

2.9.1 Kryokonservierung und Anfertigung von Kryoschnitten

Zur Kryokonservierung wurden die Gewebe direkt nach der Entnahme in 0,9 % NaCl in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70 °C.

Vor dem Anfertigen der Kryoschnitte wurde das Gewebe im Kryostat auf -18 °C „erwärmt“. Es wurden 8 µm Kryoschnitte angefertigt, die auf silanisierte Objektträger aufgezogen und über Nacht bei RT getrocknet wurden.

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

2.9.2 Fixierung

Für die Färbung von Oberflächenantigenen erfolgte die Fixierung nach der Herstellung von 8 µm Kryoschnitten in Azeton. Dabei kommt es zur Proteinpräzipitation, bei der die Primär- und Sekundärstruktur erhalten bleibt, aber die Tertiärstruktur zerstört wird. Die Schnitte wurden vor Beginn der Färbeprozedur mit einem Fettstift umrandet, um das Ineinanderlaufen von Antikörper-Lösungen benachbarter Schnitte zu verhindern.

2.9.3 Blockierung der endogenen Peroxidase

Da die Detektion von gebundenen Antikörpern über HRP (*horseradish peroxidase*) erfolgte, musste die endogene Peroxidase (u.a. in Granulozyten, Mastzellen und Erythrozyten) vor Beginn der Färbung blockiert werden, um falsch-positive Ergebnisse zu verhindern. Die

Inaktivierung erfolgte durch Inkubation der Gewebeschnitte 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

2.9.4 Peroxidaseprotokoll

Alle folgenden Inkubationen erfolgten in einer Feucht-Kammer. Zwischen den Antikörper-Inkubationen wurde jeweils dreimal 5 min in einer Küvette mit Waschpuffer und einmal kurz mit PBS gewaschen. Vor der Inkubation mit Antikörpern wurden durch NEN-Blocklösung unspezifische Bindungsstellen auf den Gewebeschnitten abgesättigt. Die Inkubation mit den FITC- bzw. Digoxigenin-gekoppelten Primärantikörpern erfolgte in NEN-Blocklösung über Nacht bei 4 °C.

Die Detektion der Primärantikörper erfolgte über die entsprechenden HRP-Konjugate Schaf-anti-FITC-HRP bzw. Schaf-anti-Digoxigenin-HRP (Roche). Alle Sekundär-Antikörper wurden in NEN-Blocklösung verdünnt und die Inkubation erfolgte bei RT für 1–2 h. Gebundene HRP wurde durch Umsetzung des Farbstoffes 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) in ein rotbraunes Farbprodukt sichtbar gemacht. Die Inkubation mit AEC-Arbeitslösung erfolgte für ca. 5 min. Die Kerne wurden durch Färben in Mayers Hämalaun (5 min) und anschließendem Bläuen in Leitungswasser (5 min) gegengefärbt. Die Objektträger wurden mit Kaisers Glyceringelatine (Merck, Darmstadt) eingedeckt und mit einem Deckglas abgeschlossen.

Waschpuffer PBS + 0,05 % Tween 20

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

AEC-Arbeitslösung 250 µl AEC-Stammlösung, 4,75 ml 50 mM Natrium-Azetatpuffer pH 5,0; 2,5 µl 30 % H₂O₂; filtrieren (0,2 µm)

AEC-Stammlösung 1 Tablette AEC (Sigma-Aldrich) in 2,5 ml DMF (N,Ndimethylformamid) gelöst

Mayers Hämalaun 3,1 mM Hämatoxin, 1 mM NaIO₃, 105 mM Kalialaun; rühren; Zugabe von: 302 mM Chloralhydrat, 4,7 mM Zitronensäure

2.10 Tierexperimentelle Methoden

2.10.1 Adoptiver Transfer ohne Immunisierung

Es wurden Splenozyten von wt Mäusen isoliert (Kapitel 2.6.4). Vor dem Transfer wurden die Zellen mit CFSE (5- und 6-Carboxyfluorescein diacetat succinimidyl ester, Molecular Probes) markiert, um sie in der späteren Analyse von den Splenozyten der Rezipientenmäuse unterscheiden zu können. Jeweils 50×10^6 Zellen wurden in 1 ml CFSE-Inkubationspuffer (PBS + 0,1 % BSA) und 5 μ M CFSE für 10 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde einmal mit CFSE-Inkubationspuffer und zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden am Guava[®]PCA gezählt und auf eine Zelldichte von 100×10^6 Zellen/ml in PBS eingestellt. Jeweils 20×10^6 Splenozyten in 200 μ l PBS wurden je Rezipient intravenös transferiert. Als Rezipienten wurden wt, HVEM- und BTLA-defiziente sowie BTLA-transgene Mäuse verwendet. An Tag 1, 4 und 14 wurde die HVEM- und BTLA-Expression der transferierten und endogenen Splenozyten analysiert, jeweils 6 Tiere pro Gruppe pro Zeitpunkt. Der adoptive Transfer in BTLA-defiziente Mäuse wurde nur Tag 1 analysiert, da hier Inkompatibilitätsprobleme zwischen den Donor- und Rezipientenmäusen bestanden.

2.10.2 Adoptiver Transfer mit anschließender Immunisierung

Für Antigen-spezifische Transferexperimente wurden Splenozyten von OVA-TZR-transgenen OT-II Mäusen isoliert. Die OT-II Zellen wurden auf naive, CD62L^{high} Zellen mittels magnetischer Zellsortierung (MACS) sortiert. Die Frequenz der T-Zellen mit dem transgenen TZR α 2/TZR β 5-Rezeptor wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Jeweils $2,5 \times 10^6$ CD4⁺Thy-1.1⁺TZR α 2⁺TZR β 5⁺ Zellen wurden intravenös in die Rezipiententiere injiziert. Es erfolgte der Transfer von OT-II Zellen in wt Rezipienten.

Zur Immunisierung der Mäuse wurde 24 h nach dem Transfer 50 μ g Alum-präzipitiertes OVA und 5×10^7 Hitze-inaktivierte *Bordetella pertussis* (Chiron Behring) als Adjuvans subkutan in die Fußsohle injiziert. Die drainierenden Lymphknoten sind die poplitealen.

3 Ergebnisse

3.1 Generierung von Nachweisreagenzien für HVEM

Zur Charakterisierung der Expression von HVEM der Maus (mHVEM) in der Immunhistochemie (IHC) und der Durchflusszytometrie wurden Nachweisreagenzien benötigt. Aus diesem Grund sollte ein BTLA-Fusionsprotein sowie monoklonale Antikörper (mAk) gegen mHVEM generiert werden, idealerweise auch blockierende mAk für funktionelle Studien. Das BTLA-Fusionsprotein sollte zur Identifizierung der Transfektanten, die HVEM auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, dienen. Außerdem sollte es für die spätere Testung der Blockadewirkung der mAk gegen HVEM eingesetzt werden (Kapitel 3.1.2 und 3.1.3).

3.1.1 Generierung von BTLA-Fusionsprotein

Zunächst wurde ein Fusionsprotein bestehend aus der extrazellulären Domäne von BTLA der Maus (mBTLA) und dem Fc-Anteil des humanen IgG1 kloniert (s. Kapitel 2.4.2) und in der *Drosophila* Zelllinie SL3 produziert. Zur ersten Charakterisierung und Überprüfung der Expression des Fusionsproteins wurde mBTLA-huIgG1 in der SDS-PAGE aufgetrennt. Um festzustellen, ob das BTLA-Fusionsprotein, wie erwartet, als ein über Disulfidbrücken im Fc-Anteil verbundenes Dimer in den SL3 Zellen exprimiert wird, wurde es unter nicht-reduzierenden und reduzierenden Bedingungen im Gel aufgetrennt. Das berechnete Molekulargewicht, basierend auf der Aminosäuresequenz, des Monomers beträgt 45 kDa das des Dimers 90 kDa (extrazelluläre Domäne von BTLA:19 kDa, Fc-Anteil: 26 kDa). Unter nicht-reduzierenden Bedingungen waren neben der Hauptbande noch zwei weitere Banden zu erkennen, die unter reduzierenden Bedingungen nicht vorhanden waren. Scheinbar wurde die Tertiär- und Sekundärstruktur des Proteins unter nicht-reduzierenden Bedingungen nicht vollständig aufgebrochen (Abb. 4). Die Bestimmung des Molekulargewichts von mBTLA-huIgG1 mittels Proteinstandard ergab unter nicht-reduzierenden Bedingungen eine Größe des Dimers von ca. 130 kDa (Hauptbande), unter reduzierenden Bedingungen von ca. 50 kDa des Monomers (Abb. 4). Die Diskrepanz des Molekulargewichts des Dimers (130 kDa, nicht-reduziert) und des Monomers (50 kDa, reduziert) ist wahrscheinlich auf die nicht vollständige Denaturierung des Proteins zurückzuführen, wodurch sich das Laufverhalten im Gel ändert. Die Abweichung des Molekulargewichts des Monomers (50 kDa) vom theoretisch ermittelten

Molekulargewicht (45 kDa) kann durch die Glykosylierung des mBTLA-huIgG1 in den SL3 Zellen erklärt werden. Eine Degradation des Fusionsproteins lag nicht vor.

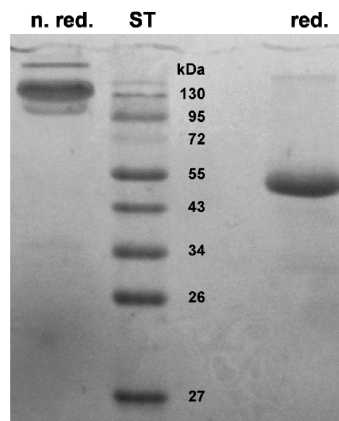


Abb. 4: Auftrennung des mBTLA-huIgG1 in der SDS-PAGE.

Dargestellt ist die Auftrennung des mBTLA-huIgG1 unter nicht-reduzierenden (n. red) und reduzierenden Bedingungen (red., Reduktion durch DTT) in einem 12 %igem Gel. Es wurde jeweils 10 µg Fusionsprotein aufgetragen. Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde ein Proteinstandard (ST) mitgeführt. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie angefärbt.

3.1.2 Generierung von HVEM-exprimierenden Zelllinien

Zur Generierung der mAk gegen mHVEM sowie für das Screening der Hybridomüberstände auf mAk gegen mHVEM sollten HVEM-exprimierende Zelllinien generiert werden. Da nicht vorherzusagen war, welche Zelllinie sich mit welchem HVEM-kodierenden Plasmid transfizieren lassen würde, wurden verschiedene Transfektionen mit verschiedenen Zelllinien und Vektoren parallel durchgeführt. Außerdem wurde für das Screening der Hybridomüberstände eine andere als für die Immunisierung verwendete Zelllinie benötigt, um mAk auszuschließen, die nur die Zelllinie erkennen jedoch nicht HVEM auf der Zelloberfläche.

HVEM wurde, ausgehend von Thymus-RNA, in die Expressionsvektoren BCMGS_{neo} und pcDNA3-YFP kloniert (Kapitel 2.4.2). Anschließend wurden verschiedene Zelllinien mit diesen Expressionsvektoren transfiziert (Kapitel. 2.6.3; Tab. 7). Der Vektor pcDNA3-mHVEM-YFP kodierte für ein Fusionsprotein aus mHVEM und dem gelbfluoreszierenden Protein (YFP). Transfizierte RBL-1-Zellen, wurden durchflusszytometrisch auf YFP-Expression geprüft, die HVEM-Expression wurde durch Färbung der Zellen mit mBTLA-huIgG1 (Sekundärreagenz: anti-huIgG Fcγ-Fragment-Cy5) nachgewiesen (Kapitel 2.6.3.3). Es konnte eine Korrelation zwischen dem YFP-Signal der Zellen und dem Signal hervorgerufen durch die Bindung des BTLA-Fusionsproteins an diese Zellen festgestellt werden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass mBTLA-huIgG1 an HVEM bindet (Abb. 5 A). Aufgrund dessen wurde das BTLA-Fusionsprotein zum Screening der Transfektanten auf

HVEM-Expression auf der Zelloberfläche eingesetzt. Die durchgeführten Transfektionen, die Anzahl der getesteten Klone der verschiedenen Transfektionen sowie die daraus erhaltenen HVEM-exprimierenden Klone sind in Tab. 7 aufgeführt.

Zelllinie	Vektor	getestete Klone	HVEM-exprimierende Klone
RBL-1	BCMGS _{neo} -mHVEM	60	41
	pcDNA3-mHVEM-YFP	296	4
EL-4	BCMGS _{neo} -mHVEM	43	17
	pcDNA3-mHVEM-YFP	296	3
L-Zellen	BCMGS _{neo} -mHVEM	114	3
	pcDNA3-mHVEM-YFP	349	0
Y-3Ag	BCMGS _{neo} -mHVEM	0	0
	pcDNA3-mHVEM-YFP	0	0

Tab. 7: Übersicht der generierten HVEM-Transfektanten.

Mit pcDNA3-mHVEM-YFP konnten nur RBL-1 und EL-4 erfolgreich transfiziert werden. Mit BCMGS_{neo}-mHVEM konnten neben den RBL-1 und EL-4 auch die L-Zellen transfiziert werden. Die Transfektion der Y-3Ag ergab keine Klone.

Von den HVEM-exprimierenden Klonen wurden diejenigen ausgewählt, die eine homogene und starke Expression von mHVEM auf der Zelloberfläche aufwiesen (Abb. 5 B).

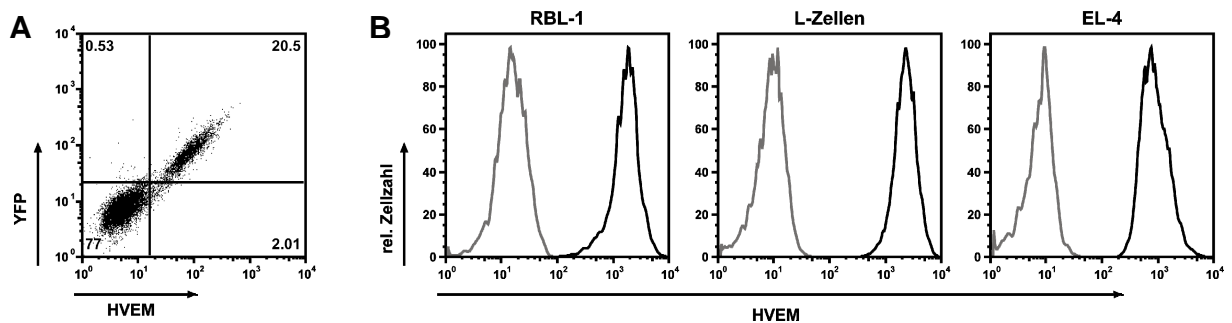


Abb. 5: HVEM-Expression von transfizierten Zelllinien.

Durchflusszytometrische Analyse von Zelllinien (Kapitel 2.6.3.3). (A) Bindungsspezifität von mBTLA-huIgG1. RBL-1, transfiziert mit pcDNA3-mHVEM-YFP, wurden mit mBTLA-huIgG1 (5 µg/ml) inkubiert und durch den Sekundär-Antikörper (Ak) anti-huIgG-Fcγ-Fragment spez.-Cy5 detektiert. Die Korrelation des YFP-Signals mit dem Signal durch die mBTLA-huIgG1-Bindung und dem Sekundär-Ak, zeigte, dass mBTLA-huIgG1 HVEM spezifisch erkennt. (B) Detektion der HVEM-Expression transfizierter RBL-1, L-Zellen und EL-4. Zellen wurden mit mBTLA-huIgG1 (5 µg/ml) inkubiert und anschließend mit Sekundär-Ak gefärbt (schwarze Kurven). Für die Hintergrundfärbung wurden die Zellen mit anti-huIgG Fcγ-Fragment spez.-Cy5 gefärbt (graue Kurven). Die schwarzen Kurven zeigen die homogene HVEM-Expression der ausgewählten HVEM-Transfektanten.

3.1.3 Generierung von monoklonalen Antikörpern gegen murines HVEM

Ziel war es mAk zu generieren, die eine gute und spezifische Färbung in der Durchflusszytometrie und in der Immunhistochemie (IHC) zeigen und/oder die Bindung von BTLA an HVEM verhindern.

Die in dieser Arbeit verwendeten mAk gegen mHVEM wurden in zwei Fusionen mit unterschiedlichen Immunisierungen generiert. Zum einen wurde eine HVEM-defiziente Maus mit einer EL-4 HVEM-Transfektante mit hoher mHVEM-Expression auf der Zelloberfläche (Kapitel 3.1.2), in Gegenwart von Freund's Adjuvans immunisiert (Fusion HVEM 1). Zum anderen erfolgte die Immunisierung mittels eines HVEM-Fusionsproteins (mHVEM-huIgG1 von S. Gurka, RKI) in Gegenwart von hitzeinaktivierten *Bordetella pertussis* als Adjuvans. Die detaillierte Beschreibung der Immunisierungen und der Fusionen sind in Kapitel 2.7.1 und 2.7.2 aufgeführt.

Das Screening der Hybridome erfolgte nach den im Folgenden beschriebenen Kriterien. Zuerst wurden die, in den Hybridomüberständen enthaltenen, mAk mittels einer L-Zellen HVEM-Transfektante und der entsprechenden wt Zelllinie getestet, um die Hybridome zu selektionieren die einen möglichst großen Unterschied zwischen dem Signal der wt Zelllinie und der HVEM-Transfektante ergeben. Aus Fusion 1 erfüllten vier mAk (mHV-487, -1416, -1818 und -1980), aus Fusion 2 erfüllten über 400 mAk dieses Kriterium (u.a. mHV-5, -130, -1411, -1466 und -1509). Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Färbung von wt L-Zellen und der L-Zellen HVEM-Transfektante mit den Hybridomüberständen und dem Sekundärantikörper unterschied sich um den Faktor 10 bis 110 (Abb. 6 A). Hierbei fiel auf, dass die wt L-Zellen schon eine basale HVEM-Expression aufwiesen, da im Vergleich zu der Hintergrundfärbung durch den Sekundärantikörper eine deutliche Färbung von HVEM durch die Hybridomüberstände auf den wt Zellen zu beobachten war (Abb. 6 A). Im nächsten Screening-Schritt wurden die Hybridomüberstände auf Splenozyten von C57BL/6 wt Mäusen (wt) und HVEM-defizienten Mäusen getestet. Aus der Literatur war bekannt, dass HVEM auf nahezu allen Lymphozyten exprimiert wird (Wang *et al.*, 2005). Es wurden in diesem Screening die Hybridome als positiv gewertet, deren Überstände eine Färbung der Splenozyten von wt Mäusen, aber keine Färbung der Splenozyten von HVEM-defizienten Mäusen zeigten und deren mittlere Fluoreszenzintensität gemessen auf den wt Splenozyten mindestens um den Faktor zwei höher war als die MFI der Hintergrundfärbung auf den HVEM-defizienten Splenozyten (Abb. 6 B). Wie in Abb. 6 B zu sehen, zeigten sowohl die vier mAk aus Fusion 1 als auch die oben genannten mAk aus Fusion 2 eine gute Färbung von

HVEM auf wt Splenozyten und keine Färbung der HVEM-defizienten Splenozyten. Aus Fusion 2 zeigten noch ca. 100 weitere mAk dieses Färbeverhalten (s. Tab. 8).

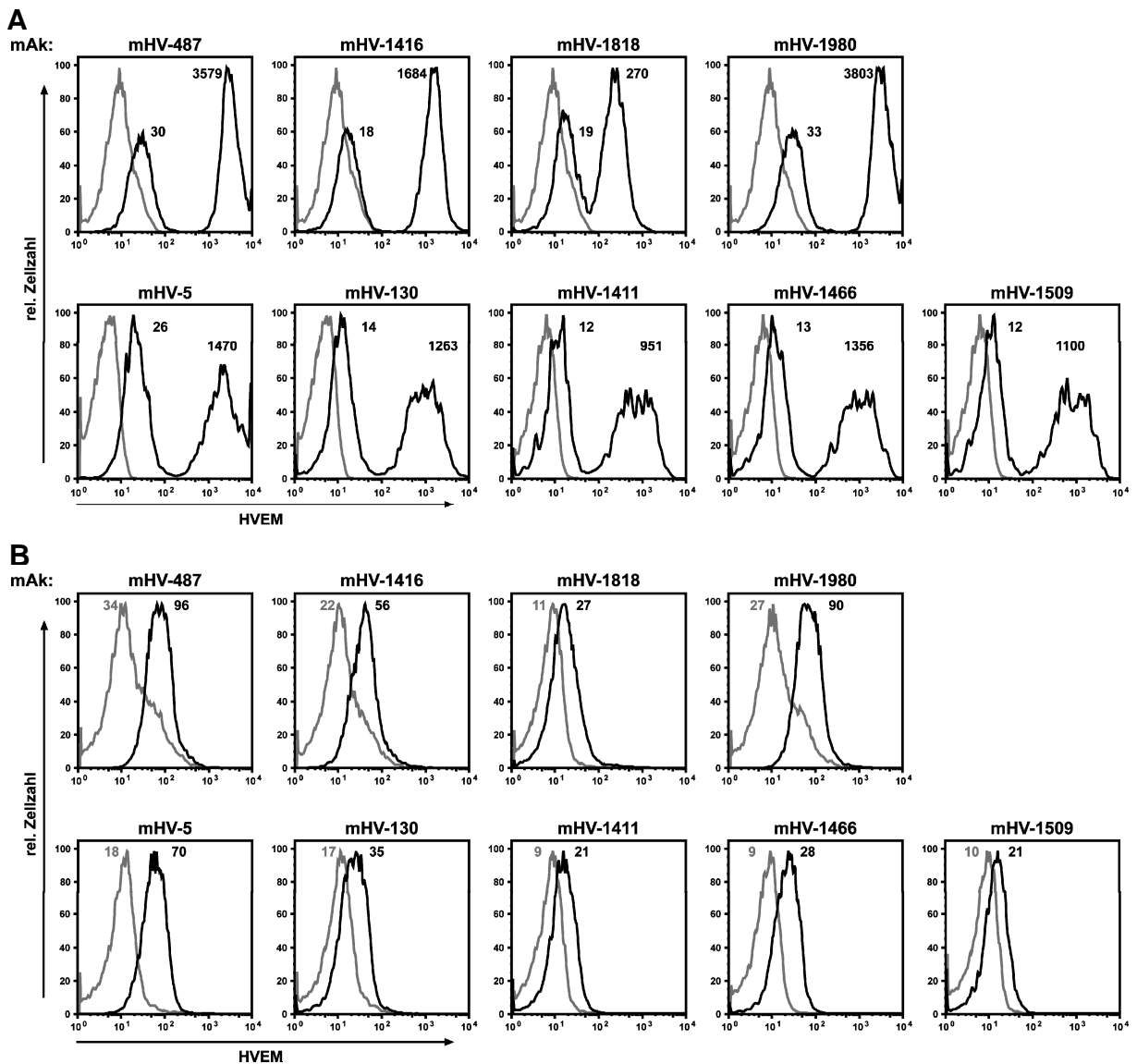


Abb. 6: Identifikation von HVEM-spezifischen monoklonalen Antikörpern.

Durchflusszytometrische Analyse der Hybridomüberstände. (A) Testung der Hybridomüberstände der Fusionen auf einem Gemisch der wt Linie und der L-Zellen HVEM-Transfektante unter Verwendung von anti-mIgG Fc γ -Fragment spez.-Cy5 als Sekundärantikörper (schwarze Kurve). mAk, welche die HVEM-Transfektante hell färbten und ein deutlich schwächeres Signal mit der wt Linie ergaben, wurden als spezifisch eingestuft. Die Signalstärke wurde über die MFI quantifiziert (in den Histogrammen angegeben). Repräsentative Darstellung angegebener mAk. (B) Spezifität der mAk wurde durch Färbung von primären Zellen überprüft. Antikörper, deren Färbung der Splenozyten von wt Mäusen (schwarze Kurve) einen deutlichen Unterschied zur Hintergrundfärbung der Splenozyten von HVEM-defizienten Mäusen (graue Kurve) zeigte, wurden als spezifisch eingestuft. Die Signalstärke der Färbung wurde über die MFI quantifiziert (angegeben in den Histogrammen in entsprechenden Farben). Als Sekundär-Antikörper wurde Anti-mIgG Fc γ -Fragment spez.-Cy5 eingesetzt. Repräsentative Darstellung angegebener mAk.

Zur Testung der Blockadewirkung der mAk gegen HVEM wurden zwei Versuchsansätze durchgeführt (Abb. 7).

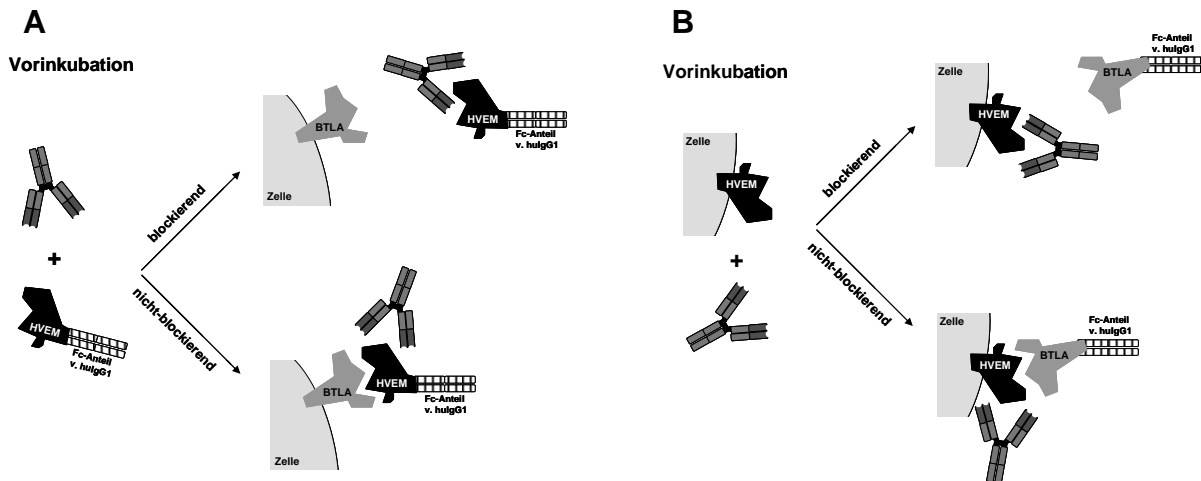


Abb. 7: Schematische Darstellung des Prinzips der Testung von anti-HVEM mAk auf Blockade.

(A) Blockadetest 1: Vorinkubation der anti-HVEM mAk (Hybridomüberstände) mit mHVEM-huIgG1. Inkubation der BTLA-exprimierenden Zelllinie (beides von S. Gurka) mit diesem Gemisch. Analyse, ob eine Bindung von mHVEM-huIgG1 an BTLA noch möglich ist. Im Fall von blockierenden mAk ist eine Bindung an BTLA nicht möglich. Bei nicht-blockierenden mAk kann mHVEM-huIgG1 in Gegenwart des mAk an BTLA binden. (B) Blockadetest 2: Inkubation der HVEM-exprimierenden Zelllinie mit den anti-HVEM mAk (Hybridomüberstände). Analyse, ob eine Bindung von mBTLA-huIgG1 an HVEM noch möglich ist. Im Fall von blockierenden mAk ist eine Bindung an HVEM nicht möglich. Bei nicht-blockierenden mAk kann mBTLA-huIgG1 in Gegenwart des mAk an HVEM binden.

Im ersten Blockadetest (Kapitel 2.7.3.3; Abb. 7 A) wurde in der Durchflusszytometrie überprüft, ob die Bindung des mHVEM-Fusionsprotein (mHVEM-huIgG1 von S. Gurka, RKI) nach der Inkubation mit den Hybridomüberständen an BTLA auf der Zelloberfläche (BTLA-Transfektante von S. Gurka, RKI) noch möglich ist (Abb. 8). Die Detektion des HVEM-Fusionsproteins erfolgte mit einem Sekundär-Antikörper (anti-huIgG Fc γ -Fragment-FITC). Im Fall einer vorhandenen Bindung des HVEM-Fusionsproteins wurde die Bindung der anti-HVEM mAk überprüft (Detektion durch anti-muIgG Fc γ -Fragment-Cy5). Fünf Antikörper aus Fusion HVEM 2 verhinderten die Bindung des HVEM-Fusionsproteins an die BTLA-Transfektante (u.a. mHV-130, -1411, -1466; Abb. 8 B). Kein mAk aus Fusion HVEM 1 verhinderte in diesem Test die Bindung von mHVEM-huIgG1 an BTLA (mHV-487, -1416, -1980; Abb. 8 C). Es konnte ein Signal durch das HVEM-Fusionsprotein und ein damit korrelierendes Signal durch die anti-HVEM mAk, aufgrund ihrer Bindung an mHVEM-huIgG1, detektiert werden. Andere mAk aus Fusion HVEM 2 zeigten das gleiche Verhalten wie die mAk aus Fusion HVEM 1 (u.a. mHV-5; Abb. 8 C) oder erkannten das Fusionsprotein nicht (nicht gezeigt), da sie möglicherweise Epitope erkannten, die im nativen Zustand des Fusionsproteins nicht zugänglich oder vorhanden waren.

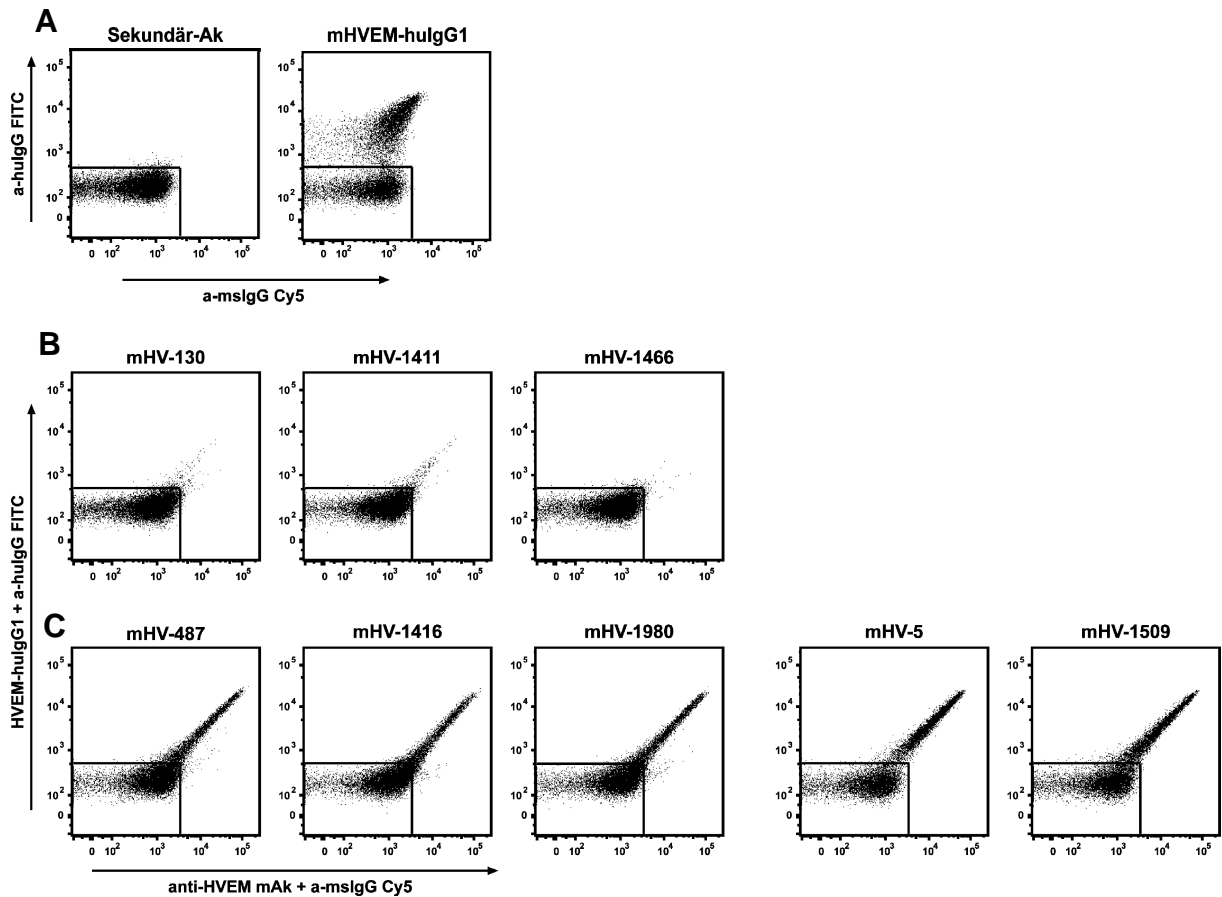


Abb. 8: Blockadetest 1 der anti-HVEM mAk.

Verwendung von wt L-Zellen gemischt mit L-Zellen BTLA-Transfektante (von S. Gurka, RKI; Kapitel 2.7.3.3). (A) Färbung der Zellen mit mHVEM-huIgG1 (von S. Gurka, RKI; 20 µg/ml) mit den Sekundärreagenzien anti-huIgG Fcγ-Fragment spez.-FITC und anti-mIgG Fcγ-Fragment spez.-Cy5 (rechts). Die Hintergrundfärbung der Sekundärreagenzien ist links dargestellt. (B+C) Überprüfung der Bindung von mHVEM-huIgG1 an BTLA auf der Zelloberfläche nach Vorinkubation mit anti-HVEM mAk. Das HVEM-Fusionsprotein (20 µg/ml) wurde mit den Hybridomüberständen für 15 min auf Eis vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Fusionsprotein-mAk-Gemisch inkubiert und gebundenes mHVEM-huIgG1 mit dem Sekundär-Antikörper anti-huIgG Fcγ-Fragment spez.-FITC detektiert. Im Fall von nicht-blockierenden mAk wurde der mAk mit anti-mIgG Fcγ-Fragment spez.-Cy5 nachgewiesen. (B) blockierende anti-HVEM mAk, (C) nicht-blockierende mAk

Im zweiten Blockadetest (Kapitel 2.7.3.4; Abb. 7 B) wurde in der Durchflusszytometrie untersucht, ob die Vorinkubation der anti-HVEM mAk mit der HVEM-Transfektante die Bindung des BTLA-Fusionsproteins (mBTLA-huIgG1) an HVEM auf der Zelloberfläche verhindert. Die Detektion des BTLA-Fusionsproteins erfolgte mit einem Sekundär-Antikörper (anti-huIgG Fcγ-Fragment-Cy5). Aus Fusion HVEM 2 waren neben den fünf mAk, die im Blockadetest 1 die Bindung des HVEM-Fusionsproteins an BTLA verhinderten, noch andere mAk in der Lage, die Bindung des BTLA-Fusionsproteins an die HVEM-exprimierenden Zellen zu unterbinden. Es gab demnach mAk, die im Blockadetest 1 keine blockierende Wirkung zeigten, aber im Blockadetest 2 blockierten. Der mAk mHV-5 war ein Beispiel für

einen solchen mAk (Abb. 8 C und Abb. 9). Die mAk aus Fusion HVEM 1 zeigten auch in diesem Blockadetest keine blockierende Wirkung (Abb. 9), obwohl durch Anfärben der mAk gezeigt werden konnte, dass eine Bindung der mAk an HVEM erfolgt war (nicht gezeigt). Auch aus Fusion HVEM 2 gab es mAk, die weder im ersten noch zweiten Blockadetest blockierend wirkten (nicht gezeigt).

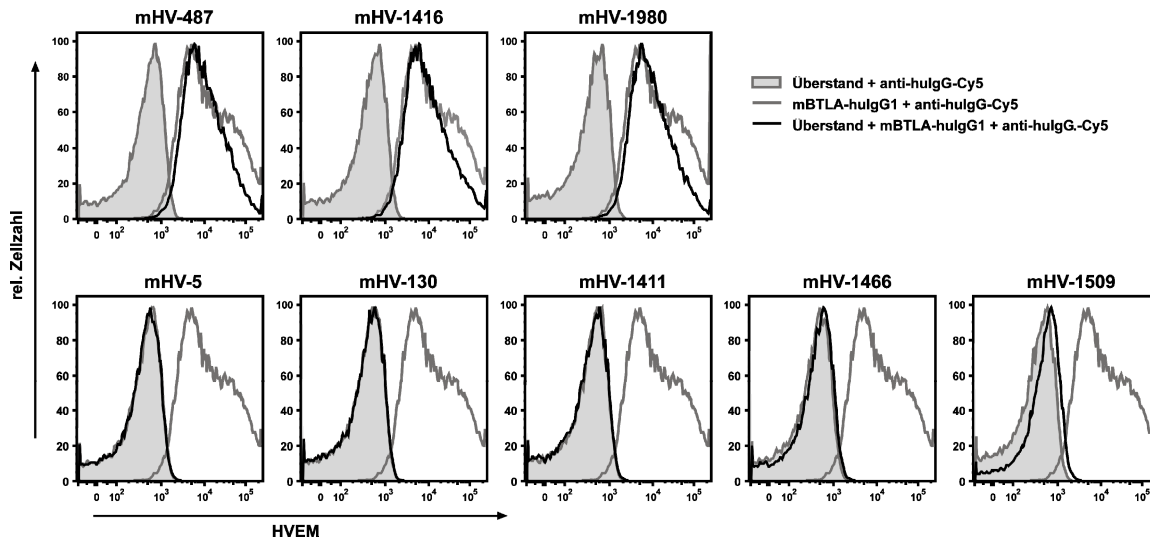


Abb. 9: Blockadetest 2 der anti-HVEM mAk.

Durchflusszytometrische Analyse der mBTLA-huIgG1 Bindung an HVEM auf der Zelloberfläche in Gegenwart von anti-HVEM mAk (Kapitel 2.7.3.4). Die L-Zellen HVEM-Transfektante wurde mit den Hybridomüberständen vorinkubiert. Die anschließende Färbung mit mBTLA-huIgG1 (5 µg/ml) und dem Sekundär-Antikörper anti-huIgG Fcγ-Fragment spez.-Cy5 zeigte, ob eine Bindung von mBTLA-huIgG1 an HVEM noch möglich war (schwarze Kurve). Die graue Kurve zeigt die Färbung des BTLA-Fusionsproteins und anti-huIgG Fcγ-Fragment spez.-Cy5 in Abwesenheit eines anti-HVEM mAk. Die Hintergrundfärbung durch anti-huIgG Fcγ-Fragment spez.-Cy5 zeigt die gefüllte Kurve. Die nicht-blockierenden anti-HVEM mAk sind in der oberen Reihe, die blockierenden mAk sind in der unteren Reihe dargestellt.

Aus den beiden Fusionen konnten sowohl nicht-blockierende als auch blockierende anti-mHVEM mAk gewonnen werden. In Tab. 8 sind die Anzahl der untersuchten Hybridome und die Ergebnisse aus den verschiedenen Screening-Verfahren zusammengefasst.

Fusion	Anzahl untersuchter Hybridome	Anzahl positiver Hybridome im Screening durch			
		L-Zellen	primäre Zellen (wt vs. HVEM ko)	Blockadetest 1	Blockadetest 2
HVEM 1	~ 2800	4	4	0	0
HVEM 2	~ 2000	~ 400	110	5	> 20

Tab. 8: Ergebnisse der Fusionen HVEM 1 und 2

Insgesamt wurden etwas mehr als 100 Hybridome selektiert. Durch intrazelluläre Färbung von Immunglobulin G und M wurde die Quantität der Antikörperproduktion dieser

Hybridome und ihre Klonalität festgestellt (Kapitel 2.8.3). Es wurden Antikörper aus den Überständen von Hybridomen gereinigt, die eine gute Färbung von HVEM und eine geringe Hintergrundfärbung von HVEM-negativen Zellen zeigten. Außerdem wurde bei der Auswahl die nicht-blockierende bzw. blockierende Wirkung auf die Bindung von HVEM an BTLA berücksichtigt. Ein weiteres Kriterium war die Quantität der Antikörperproduktion der Hybridome. Zur Sicherstellung, dass es sich um einen einzelnen Klon handelt, wurden ausgewählte Hybridome noch subkloniert (Kapitel 2.7.4). Folgende anti-mHVEM mAk wurden gereinigt: mHV-487.264.33, -1416.438, -1980.211, die in beiden Blockadetests nicht-blockierend waren, mHV-5 und mHV-1509, die nur im Blockadetest 2 blockierten und mHV-130, mHV-1411 und mHV-1466 die in beiden Blockadetests blockierend wirkten (Abb. 8 und Abb. 9)

3.1.4 Charakterisierung der gereinigten monoklonalen Antikörper

Die oben genannten anti-mHVEM mAk wurden über Protein G-Säulen gereinigt und ihr Isotyp in einem ELISA bestimmt (Kapitel 2.7.6). Sowohl die nicht-blockierenden als auch die blockierenden mAk waren vom Isotyp IgG1.

Nach der Reinigung der mAk wurden diese erneut in den beiden Blockadetests eingesetzt. Für die Blockade der HVEM-Fusionsprotein-Bindung wurden die mAk in einer Konzentration von 60 µg/ml eingesetzt. Die Blockade der BTLA-Fusionprotein Bindung wurde mit 20 µg/ml der mAk durchgeführt (Kapitel 2.7.3.3 und 2.7.3.4). Das Ergebnis aus dem Screening konnte reproduziert werden (nicht gezeigt, vgl. Abb. 8 und Abb. 9). Für die spätere Verwendung der Antikörper zum Nachweis von HVEM auf primären Zellen und in der IHC wurden die gereinigten mAk an Fluorochrome bzw. Haptene gekoppelt und titriert, um eine optimale Färbung zu erhalten.

3.1.4.1 Bindungseigenschaften der monoklonalen Antikörper

Proteine bieten verschiedene Epitope für die Antikörpererkennung. Durch die Immunisierung der HVEM-defizienten Mäuse mit einer Zelllinie, die HVEM exprimiert oder mit einem HVEM-Fusionsprotein ist es möglich, dass Antikörper generiert wurden, die unterschiedliche Epitope von HVEM erkennen. Ob die gereinigten anti-HVEM mAk das gleiche oder ein räumlich benachbartes Epitop erkennen, wurde mittels der gegenseitigen Blockade der mAk in ihrer Färbung von HVEM in der Durchflusszytometrie analysiert (Kapitel 2.7.7). Die unabhängige Bindung eines blockierenden und eines nicht-blockierenden mAk an HVEM würde den Vorteil bieten, dass einerseits die Interaktion von BTLA mit HVEM verhindert werden könnte und gleichzeitig die Expression von HVEM auf der Zelloberfläche

nachgewiesen werden könnte. Es stellte sich jedoch heraus, dass sich alle gereinigten Antikörper gegenseitig in ihrer Bindung an HVEM stören. Sogar nicht-blockierende und blockierende mAk stören sich gegenseitig, gezeigt am Beispiel von mHV-487.264.33 und mHV-1411 (Abb. 10). Zellen, die mit mHV-487.264.33 vorinkubiert wurden, konnten nicht mehr mit mHV-1411 angefärbt werden und umgekehrt.

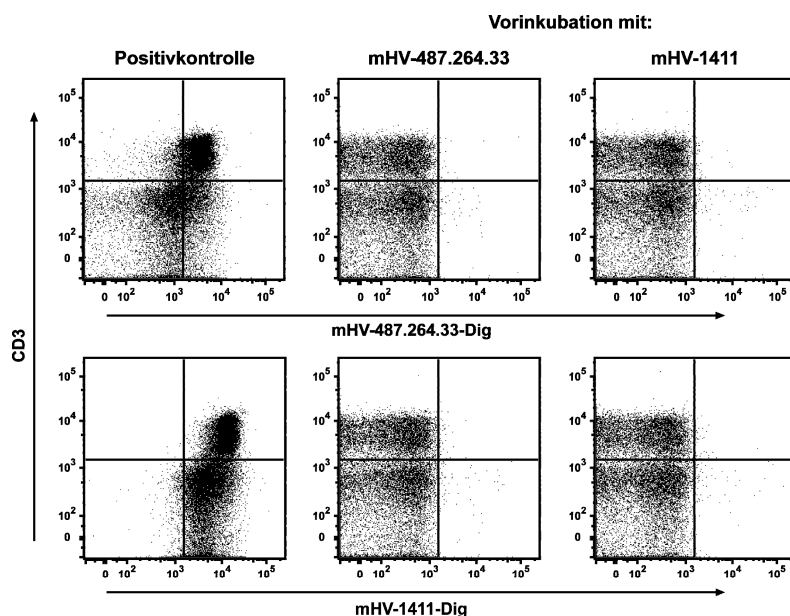


Abb. 10: Charakterisierung der Bindungsstellen der gereinigten anti-HVEM mAk.

Durch 5 min Vorinkubation der Splenozyten mit dem angegebenen ungekoppelten anti-HVEM mAk (mHV-487.264.33 bzw. mHV-1411 jeweils 200 µg/ml) und der anschließenden Färbung mit den angegebenen DIG-gekoppelten anti-HVEM mAk und anti-DIG-A647 wurde die unabhängige Bindung des DIG-gekoppelten mAk an HVEM im Durchflusszytometer überprüft. Es konnte keine Färbung detektiert werden, d.h. keine unabhängige Bindung der mAk an HVEM. (Kapitel 2.7.7). Die Positivkontrolle zeigt die Färbung von HVEM durch den angegebenen DIG-gekoppelten anti-HVEM mAk (mHV-487.264.33-DIG bzw. mHV-1411-DIG) und anti-DIG-A647. CD3 wurde bei allen Proben gegengefärbt.

Da die mAk unterschiedliche Eigenschaften bezüglich ihrer Wirkung auf die HVEM-BTLA-Bindung haben, lässt sich vermuten, dass sie zwar unterschiedliche Epitope erkennen, sich aber in sterischer Weise gegenseitig beeinträchtigen. Eine alternative Erklärung wäre, dass die mAk das gleiche Epitop erkennen, jedoch nicht-blockierend sind, da sie eine geringere Affinität besitzen, dies konnte jedoch durch den folgenden Test ausgeschlossen werden.

In diesem Test wurde zur weiteren Charakterisierung der anti-HVEM mAk die Dissoziation der mAk bei 4 °C und 37 °C untersucht (Kapitel 2.7.7). Insbesondere für den Einsatz der anti-HVEM mAk in funktionellen Studien *in vitro* und *in vivo* war eine Bindung bei 37 °C von Bedeutung. Nach der Inkubation bei 4 °C bzw. 37 °C ließen sich bei den sechs verschiedenen mAk kaum Unterschiede in der Fluoreszenzintensität feststellen (Abb. 11).

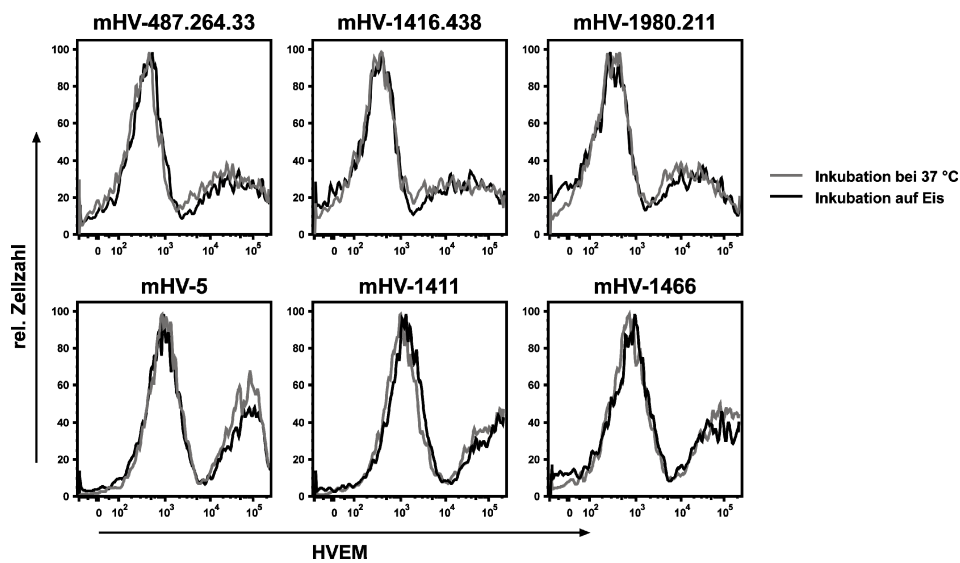


Abb. 11: Bindungsverhalten der gereinigten anti-HVEM mAk bei 4 °C und 37 °C.

Wt L-Zellen gemischt mit L-Zellen HVEM-Transfektante wurden mit den angegebenen anti-HVEM mAk für 20 min auf Eis gefärbt, zweimal gewaschen, für 15 min entweder auf Eis oder bei 37 °C inkubiert, zweimal gewaschen, mit anti-DIG-A647 gefärbt und anschließend mit 2 % Formaldehyd fixiert (Kapitel 2.7.7). Die Histogramme stellen die noch vorhandene Färbung der anti-HVEM mAk nach Inkubation auf Eis (schwarze Kurve) oder bei 37 °C (graue Kurve) dar. Die Analyse erfolgte im Durchflusszytometer.

Bezüglich ihrer Bindungsstelle und ihrer Dissoziation konnten bei den gereinigten mAk somit keine unterschiedlichen Eigenschaften festgestellt werden.

3.1.4.2 Färbereigenschaften in Durchflusszytometrie und Immunhistochemie

Ein direkter Vergleich der Färbung von Splenozyten von wt Mäusen mit den gereinigten und gekoppelten anti-HVEM mAk zeigte, dass das Signal der beiden mAk mHV-5 und mHV-1411 sich deutlich von dem Signal der Isotypkontrolle unterschied (Abb. 12). Die Signalstärke der Hintergrundfärbung durch die Isotypkontrolle entsprach dabei der Signalstärke durch die Färbung der anti-HVEM mAk auf Milzzellen von HVEM-defizienten Mäusen (nicht gezeigt). Diese beiden mAk mHV-5 und mHV-1411 wurden für die späteren Untersuchungen der HVEM-Expression in der Durchflusszytometrie verwendet (Kapitel 3.2.2 und 3.3).

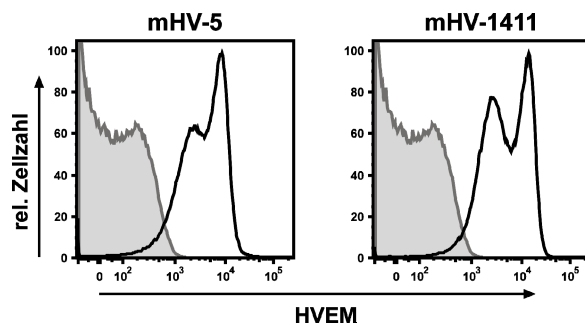


Abb. 12: Detektion von HVEM durch mHV-5-DIG und mHV-1411-DIG auf Splenozyten.

Dargestellt ist der Vergleich der Färbung von wt Splenozyten mit mHV-5-DIG (links, schwarze Kurve) bzw. mHV-1411-DIG (rechts, schwarze Kurve) und anti-DIG-A647 mit der Hintergrundfärbung durch die (gefüllte Kurve). Das Signal der Hintergrundfärbung des Isotyps entsprach dem Signal der Hintergrundfärbung der anti-HVEM mAk von HVEM-defizienten Splenozyten (nicht gezeigt). Die Analyse erfolgte im Durchflusszytometer.

Um die Eignung der mAk für die IHC zu ermitteln, wurden Gewebeschnitte der Milz von wt und HVEM-defizienten Mäusen angefertigt und mit den gereinigten, Digoxigenin (DIG)-gekoppelten mAk angefärbt (Kapitel 2.9.4). Von allen getesteten mAk zeigte mHV-1411 die beste Färbung. Der Gewebeschnitt der HVEM-defizienten Milz wurde im Gegensatz zu der wt Milz nicht gefärbt (Abb. 13 A und B). Auch Gewebeschnitte von anderen Organen aus HVEM-defizienten Mäusen wurden mit mHV-1411 nicht angefärbt (nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde mHV-1411 für die spätere histologische Analyse der HVEM-Expression verwendet (Kapitel 3.2.1).

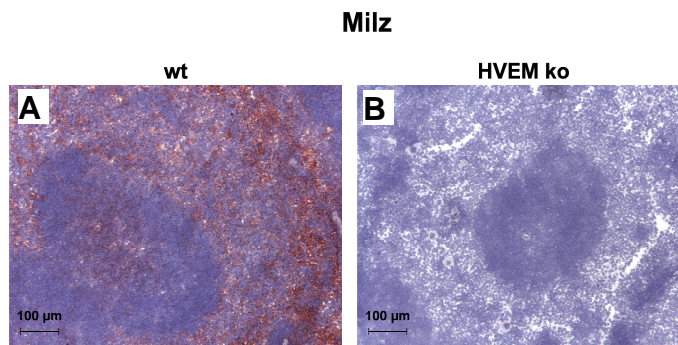


Abb. 13: mHV-1411 in der Immunhistochemie.

Milzen wurden von wt und HVEM-defizienten Mäusen entnommen und in 0,9 % (w/V) NaCl-Lösung eingefroren. Gewebeschnitte wurden mit anti-HVEM mAk (mHV-1411-DIG) inkubiert. Die Detektion erfolgte durch anti-Digoxigenin-POD und AEC (Kapitel 2.xx). Kernfärbung durch Mayer's Hämalaun (blau). (A) spezifische Färbung (rot) von HVEM in der wt Milz durch mHV-1411-DIG, (B) keine Färbung der HVEM-defizienten Milz durch mHV-1411-DIG.

3.2 Expressionsanalyse von HVEM und BTLA

Bisher wurde die Expression von mHVEM in der Literatur detailliert nur auf RNA-Ebene geklärt. Auf Proteinebene wurde nur die Expression von mHVEM auf Lymphozyten im Blut

und auf Zellen aus Lymphknoten gezeigt (Wang *et al.*, 2005). Die Kenntnis des Expressionsmusters von HVEM trägt zum besseren Verständnis der Funktion des HVEM-BTLA-Rezeptor-Ligand-Paares bei, da so Interaktionsmöglichkeiten von HVEM und BTLA dargelegt werden können.

3.2.1 Histologische Untersuchung der HVEM-Expression

Durch die histologische Analyse der HVEM-Expression in verschiedenen Geweben der Maus wurde eine erste Übersicht der HVEM-Expression gewonnen.

Im Thymus als Beispiel für ein primäres lymphatisches Organ zeigte HVEM eine breite Expression sowohl im Cortex als auch in der Medulla, dem Ort der reifen T-Zellen, ähnlich der CD3-Expression, aber auch der Expression des Makrophagenmarkers F4/80 (Abb. 14 A). Dies legt eine HVEM-Expression unter anderem auf reifen und unreifen T-Zellen sowie Makrophagen nahe. In den sekundären lymphatischen Organen wie Milz und Lymphknoten wurde HVEM in zwei Niveaus exprimiert, wobei die Expression in der T-Zell-Zone und der umgebenden roten Pulpa stärker war als in der B-Zell-Zone, wie ein Vergleich mit den drei Kontrollfärbungen (CD3, B220 und F4/80) zur Lokalisation der Signale zeigte (Abb. 14 B und C).

Die Analyse erstreckte sich nicht nur auf lymphatische Organe sondern auch auf periphere Organe wie Herz, Leber, Niere, Lunge und Darm. In den Gewebeschnitten des Herzens konnte ebenfalls eine Expression von HVEM nachgewiesen werden (Abb. 14 D). In diesem Organ befanden sich keine T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen. HVEM wurde zum einen in den Kapillaren, zum anderen auch breit verteilt im gesamten Gewebe gefärbt. Die Färbung in den Kapillaren könnte von Erythrozyten und/oder von Thrombozyten stammen. Die weite Verteilung der HVEM-Expression rührte möglicherweise von den Epithelzellen her. Auch im Gewebeschnitt der Niere könnte die Färbung von HVEM in den Glomeruli von Erythrozyten und/oder Thrombozyten stammen. Aber auch Makrophagen in der Niere scheinen HVEM zu exprimieren, wie der Vergleich mit der F4/80-Färbung zeigte (Abb. 14 E). Die Färbung innerhalb der Kapillaren konnte auch in der Leber beobachtet werden. Zusätzlich ist HVEM aber auch in den Sinusoiden exprimiert (Abb. 14 F).

In Lunge und Dünndarm ist HVEM deutlich stärker exprimiert als in allen anderen peripheren Organen (Abb. 14 G und H). In der Lunge waren die Alveolen, Gefäße und Pneumozyten positiv durch die HVEM-Färbung. Die Expression von HVEM auf T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen in der Lunge konnte nicht gezeigt werden, da HVEM sehr stark in der Lunge exprimiert wurde und diese Zellen hier nur vereinzelt zu finden waren (Färbung von CD3,

B220 und F4/80; Abb. 14 G), sodass eine Zuordnung der Färbung nicht mehr möglich war. Das Bronchialepithel der Lunge war weitestgehend negativ (Abb. 14 G). Im Dünndarm wurde die HVEM-Expression in Gebieten, in denen sich T-Zellen, B-Zellen aber auch Makrophagen befinden, nachgewiesen. Auch scheint das Stroma und Epithel HVEM zu exprimieren. Die umgebenden Muskel und Nervenzellen zeigten keine HVEM-Expression. Durch diese umfassende histologische Untersuchung verschiedener Organ konnte gezeigt werden, dass die mHVEM-Expression sehr breit verteilt ist, nicht nur in lymphatischen, sondern auch in peripheren Organen, mit einer prominenten Expression in Lunge und Darm.

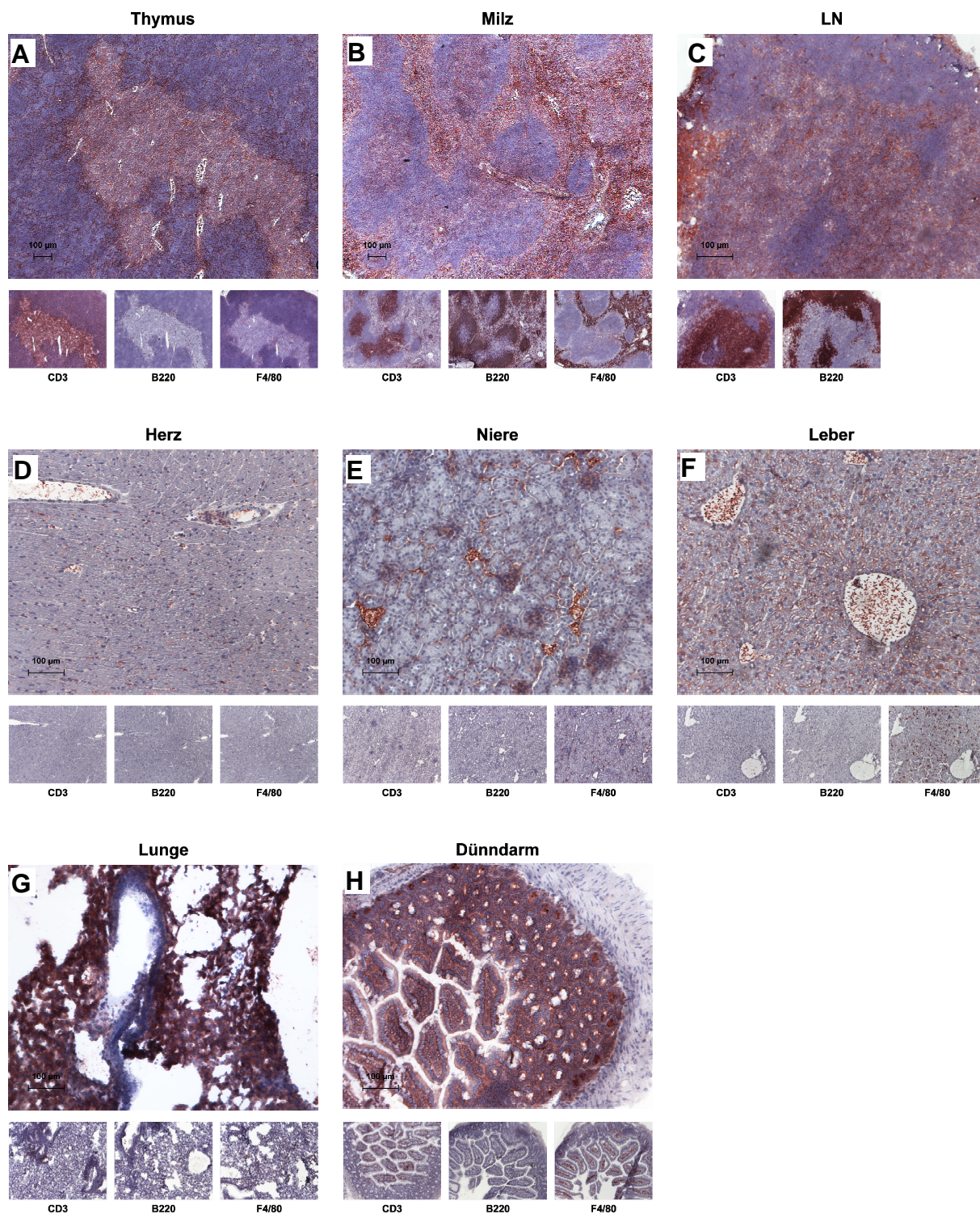


Abb. 14: Detektion von HVEM in verschiedenen Geweben in der Histologie.

Die verschiedenen Organe wurden von wt Mäusen entnommen und in 0,9 % (w/V) NaCl-Lösung eingefroren. Die Gewebeschnitte der angegebenen lymphatischen Organe (A)–(C) und der peripheren Organe (D)–(H) wurden mit mHV-1411-DIG inkubiert. Die Farbentwicklung erfolgte durch anti-Digoxigenin-POD und AEC (Kapitel 2.9.4). Für die grobe Lokalisation/Zuordnung der HVEM-Expression wurden die Gewebeschnitte der Organe mit anti-CD3-FITC, anti-B220-FITC oder F4/80-FITC inkubiert. Die Detektion erfolgte durch anti-FITC-POD. Kernfärbung durch Mayers Hämalaun (blau). Die großen Bilder zeigen die Expression von HVEM (rote Färbung) in den verschiedenen Gewebeschnitten (LN = Lymphknoten). Die Färbungen von CD3, B220 und F4/80 (rot) sind in den entsprechend bezeichneten kleinen Bildern darunter zu sehen. Der Maßstab ist abgebildet.

3.2.1.1 Entgegengesetzte Expression von HVEM und BTLA im Gewebe

Nicht nur die Expression von HVEM in verschiedenen Geweben sollte analysiert werden, sondern auch das Expressionsmuster des Bindungspartners BTLA, um so eventuell Überschneidungen der Expression bzw. Interaktionsmöglichkeiten zu zeigen. Aus der Literatur (Watanabe *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2004) und Ergebnissen in unserem Labor war bekannt, dass die BTLA-Expression auf lymphatische Organe bzw. Zellen beschränkt ist. In dieser Arbeit wurde mittels der IHC die Expression von HVEM und BTLA in Gewebeschnitten eines lymphatischen und eines peripheren Organs miteinander verglichen. Hierfür wurden Gewebeschnitte der Milz und des Darms von Mäusen mit mHV-1411 bzw. einem anti-BTLA mAk (mBT-1622.6; von S. Gurka, RKI) gefärbt. In der Milz wurde sowohl HVEM als auch BTLA exprimiert (Abb. 15 A und B). Die genauere Betrachtung der Milz zeigte die in Kapitel 3.2.1 beschriebene starke Expression von HVEM in der T-Zell-Zone und der umgebenden roten Pulpa und der schwächeren Expression in der B-Zell-Zone (Abb. 15 A). Entgegengesetzt dazu ergab die Färbung mit mBT-1622.6 eine stärkere Expression von BTLA in der B-Zell-Zone. In der T-Zell-Zone wurde BTLA schwächer exprimiert und nur vereinzelte Zellen waren in der roten Pulpa positiv (Abb. 15 B).

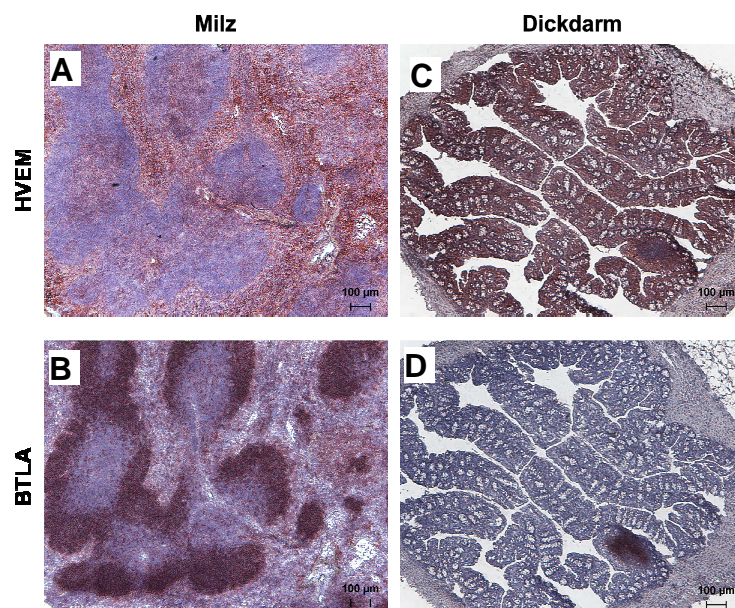


Abb. 15: Vergleich der HVEM- und BTLA-Expression in der Histologie.

Milz und Darm wurden von wt Mäusen entnommen und in 0,9 % (w/V) NaCl-Lösung eingefroren. In den Gewebeschnitten von Milz und Dickdarm wurde die Expression von HVEM mittels mHV-1411-DIG bzw. von BTLA mittels mBT-1622.6-DIG detektiert. Die Farbentwicklung (rote Färbung) erfolgte durch anti-Digoxigenin-POD und AEC (Kapitel 2.9.4). Kernfärbung durch Mayers Hämalaun (blau). Es ist die HVEM-Expression (A) und die BTLA-Expression (B) in der Milz sowie die HVEM-Expression (C) und die BTLA-Expression (D) im Dickdarm dargestellt. Die Expression ist anhand der roten Färbung der Zellen zu sehen. Der Maßstab ist abgebildet.

Die Analyse anderer lymphatischer Organe (Lymphknoten, Thymus) ergab ein ähnliches entgegengesetztes Expressionsmuster von HVEM und BTLA wie in der Milz beschrieben.

Wohingegen im Dickdarm überwiegend HVEM und kaum BTLA exprimiert wurde (Abb. 15 C und D). Die BTLA-Expression beschränkte sich hier auf einen Bereich, in dem sich T- und B-Zellen befanden. Auch andere Organe, wie z. B die Lunge, in der HVEM sehr stark exprimiert wurde, zeigten keine BTLA-Expression, außer auf eingewanderten lymphatischen Zellen (Daten nicht gezeigt).

3.2.2 Entgegengesetzte Expression von HVEM und BTLA auf Zellebene

Aufgrund der, in der IHC gezeigten, breiten Expression von HVEM in lymphatischen und peripheren Geweben (insbesondere Lunge) auf verschiedenen Zelltypen (Kapitel 3.2.1) wurde in der Durchflusszytometrie die HVEM-Expression von Erythrozyten, CD45-negativen Zellen der Lunge und Leukozyten der Milz untersucht (Kapitel 2.6.4). Im Fall der Leukozyten wurden zudem die Zellpopulationen und ihr HVEM-Expressionsniveau genauer bestimmt. Desweiteren wurde hier ein direkter Vergleich der HVEM- und BTLA-Expression auf den Zellpopulationen angestellt, da sich in der IHC bereits eine gegensätzliche Expression von HVEM und BTLA in lymphatischen Geweben abzeichnete (Abb. 15 A und B).

Die Analyse von CD45⁻-Zellen der Lunge und Erythrozyten aus Blut von Mäusen ergab, dass diese Zellen HVEM exprimieren (Abb. 16 A und B). Die Erythrozyten wurden durch die Gegenfärbung mit TER119, einem Erythrozytenmarker identifiziert (Kapitel 2.8.2). Die Oberflächenexpression von HVEM auf Erythrozyten, die sich in der IHC in den Kapillaren der Organe schon andeutete, wurde auf diese Weise in der Durchflusszytometrie bestätigt.

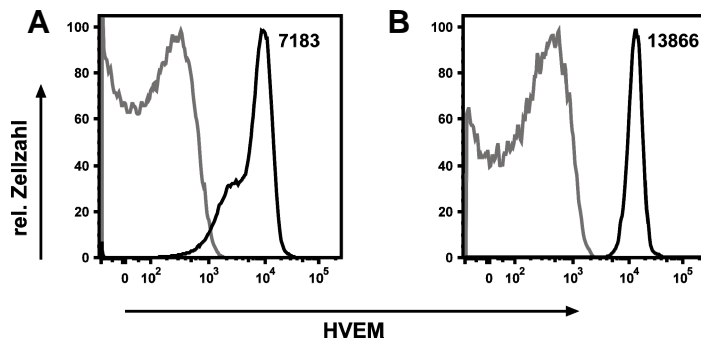


Abb. 16: Expression von HVEM auf CD45⁻-Zellen der Lunge und Erythrozyten.

(A) Zellen aus der Lunge von wt Mäusen wurden durch einen Collagenase-Verdau isoliert (Kapitel 2.6.4), mit anti-HVEM (mHV-1411-DIG) bzw. Isotyp und anti-CD45 mAk gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Es ist die repräsentative Färbung von HVEM (schwarze Kurve) auf den CD45⁻-Zellen dargestellt. Die MFI der HVEM-Färbung ist zur Quantifizierung der Signalstärke angegeben. Die graue Kurve zeigt die Hintergrundfärbung durch den Isotyp. (B) Es wurde Blut von wt und HVEM-defizienten Mäusen entnommen, mit anti-HVEM (mHV-1411-DIG), TER119 und anti-CD45 gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert (Kapitel 2.6.4). Dargestellt ist eine repräsentative Färbung von HVEM auf den CD45⁻ TER119⁺-Zellen (Erythrozyten) von wt Mäusen (schwarze Kurve) und die Hintergrundfärbung auf Erythrozyten von HVEM-defizienten Mäusen (graue Kurve). Die MFI der HVEM-Färbung ist zur Quantifizierung der Signalstärke angegeben.

Für die Analyse der Leukozyten wurden Splenozyten mit Oberflächenmarkern zur Identifikation von T-Zellen, B-Zellen, CD8⁺- und CD11b⁺- Dendritischen Zellen gefärbt. Die T-Zellen wurden noch in die beiden Subpopulationen CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen aufgetrennt (Abb. 17 A und B).

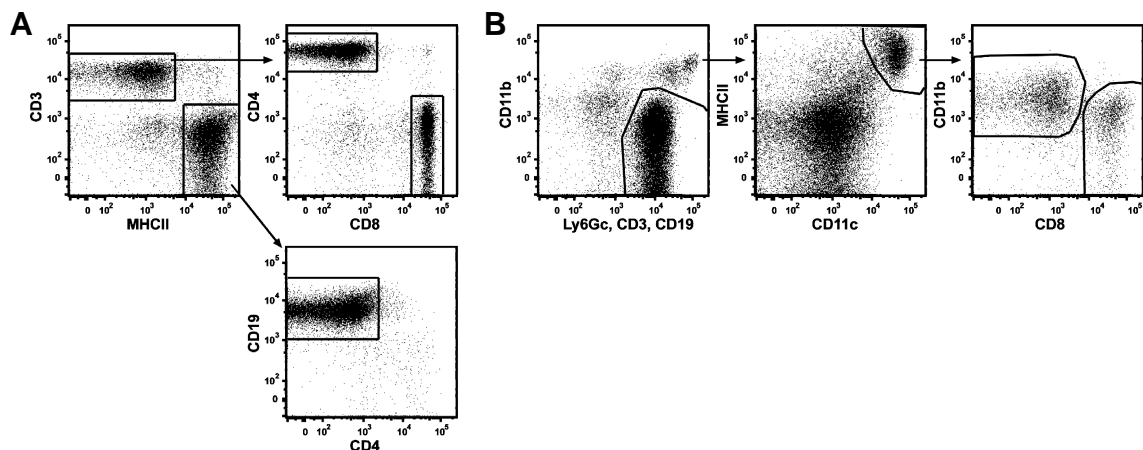


Abb. 17: Identifizierung der Zellpopulationen in Splenozyten.

Die isolierten Splenozyten von wt Mäusen (Kapitel 2.6.4) wurden im Durchflusszytometer analysiert und ausgehend von DAPI⁻-Zellen anhand der Färbung mit mAk gegen CD3, MHCII, CD19, CD11c, CD4, CD8, CD11b und Ly6Gc in die verschiedenen Zellpopulationen unterteilt. (A) Einteilung in T Zellen (CD3⁺MHCII⁻) und B-Zellen (MHCII⁺CD19⁺). Die T-Zellen wurden weiter in CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen aufgetrennt. (B) Für die Dendritischen Zellen wurden zunächst die Ly6Gc⁺CD3⁺CD19⁺-Zellen ausgenommen. Anschließend wurden die CD11c⁺-Dendritischen Zellen (Ly6Gc⁻CD3⁻CD19⁻) in die CD8⁺- und CD11b⁺-Dendritischen Zellen unterteilt. Gezeigt sind repräsentative Färbungen.

Die Expressionsniveaus von HVEM und BTLA auf diesen Zellpopulationen wurde anhand der mittleren Fluoreszenzintensität der spezifischen mAk gegen HVEM und BTLA bestimmt. Der Vergleich von T-Zellen mit B-Zellen ergab, dass die Oberflächenexpression von HVEM auf den T-Zellen (MFI 17400) um das fünffache höher ist als auf den B-Zellen (MFI 3400; Abb. 18 A). BTLA dagegen wurde auf den B-Zellen (MFI 23500) knapp siebenmal stärker exprimiert als auf den T-Zellen (MFI 3600; Abb. 18 D). Auch auf den CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellsubpopulationen wurde HVEM und BTLA differentiell exprimiert. So war die HVEM-Expression auf den CD8⁺-T-Zellen doppelt so hoch wie auf den CD4⁺-T-Zellen, dagegen zeigten die CD4⁺-T-Zellen eine 1,7-mal höhere BTLA-Expression als die CD8⁺-T-Zellen (Abb. 18 B und E). Die CD8⁺-Dendritischen Zellen exprimierten sowohl HVEM als auch BTLA stärker als die CD11b⁺-Dendritischen Zellen (Abb. 18 C und F).

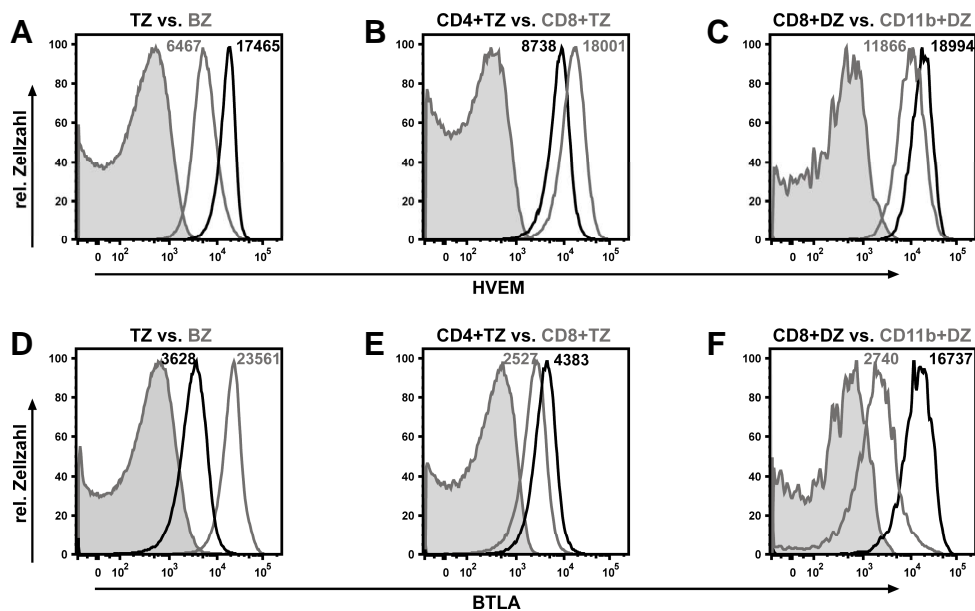


Abb. 18: Charakterisierung der HVEM- und BTLA-Expression auf T-Zellen, B-Zellen und Dendritischen Zellen.

Splenozyten von wt Mäusen wurden isoliert (Kapitel 2.6.4), mit mHV-1411-DIG bzw. mHV-5-DIG, mBT-1622.6-DIG und anti-DIG-A647 oder Isotyp gefärbt. Die Identifizierung der einzelnen Zellpopulationen und ihre Unterteilung erfolgte wie in Abb. 17 beschrieben. Die gefüllten Kurven stellen die Hintergrundfärbung des Isotyps dar. (A)-(C) HVEM-Expression, (D)-(F) BTLA-Expression. Gegenüberstellung der HVEM-Expression auf (A) T-Zellen (schwarze Kurve) vs. B-Zellen (graue Kurve), (B) CD4⁺- (schwarze Kurve) vs. CD8⁺-T-Zellen (graue Kurve), (C) CD8⁺- (schwarze Kurve) vs. CD11b⁺-Dendritischen Zellen (graue Kurve). Gegenüberstellung der BTLA-Expression auf (D) T-Zellen (schwarze Kurve) vs. B-Zellen (graue Kurve), (E) CD4⁺- (schwarze Kurve) vs. CD8⁺-T-Zellen (graue Kurve), (F) CD8⁺- (schwarze Kurve) vs. CD11b⁺-Dendritischen Zellen (graue Kurve). Die MFI der HVEM- bzw. BTLA-Färbung der verschiedenen Zellpopulationen ist in der entsprechenden Farbe angegeben. Dargestellt sind repräsentative Färbungen.

Die Unterschiede in den Expressionsniveaus waren im Fall von HVEM nicht immer so deutlich ausgeprägt wie bei BTLA, allerdings kann dies unter Umständen an der Qualität des

verwendeten Antikörpers liegen. So zeigen nicht alle mAk eine gleich gute Unterscheidung von verschiedenen Expressionsniveaus.

Auch NK-, NKT-Zellen und Granulozyten exprimierten HVEM (Abb. 19). HVEM zeigte somit auch auf Leukozyten eine breite Expression. BTLA dagegen war kaum detektierbar auf NK-Zellen und überhaupt nicht auf Granulozyten exprimiert (nicht gezeigt). Hinsichtlich der Expressionsniveaus konnte einerseits festgestellt werden, dass sowohl HVEM als auch BTLA in zwei unterschiedlichen Niveaus und andererseits HVEM und BTLA auf einem Zelltyp entgegengesetzt exprimiert wurden, d.h. Zellen mit einem hohen Niveau von HVEM exprimierten BTLA auf einem geringeren Niveau und umgekehrt. Die einzige Ausnahme bildeten die zwei Subpopulationen der Dendritischen Zellen. Aufgrund der konstitutiven Expression auf den gleichen aber auch unterschiedlichen Zellen bieten sich viele Interaktionsmöglichkeiten. So können zum Beispiel T-Zellen mit T-Zellen oder T-Zellen mit antigenpräsentierenden Zellen (B-Zellen, Dendritische Zellen) über die BTLA-HVEM-Bindung interagieren.

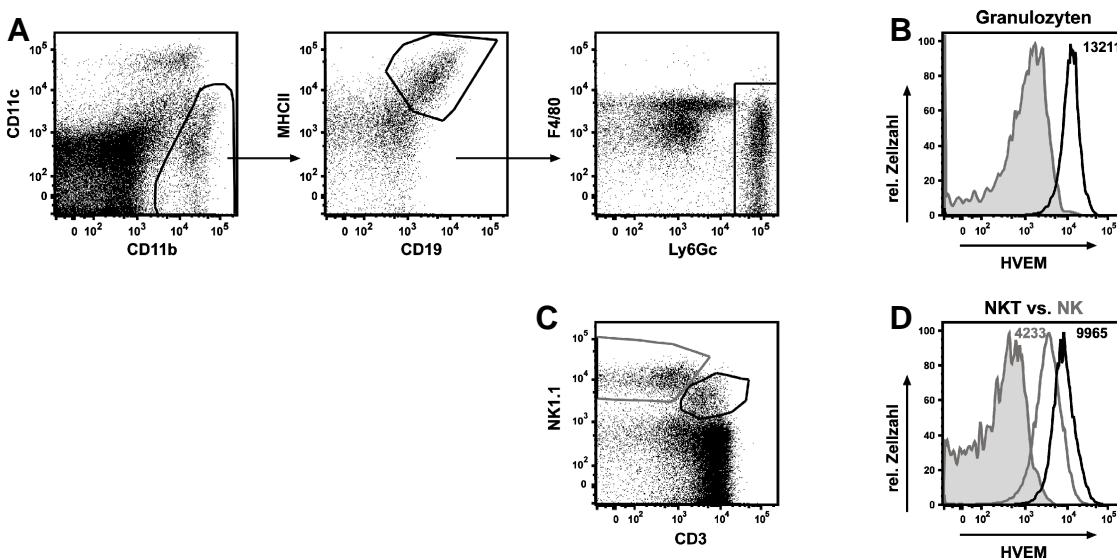


Abb. 19: Expression von HVEM auf NK-Zellen und Granulozyten.

Die Splenozyten von wt Mäusen wurden isoliert (Kapitel 2.6.4), mit mHV-1411-DIG und anti-DIG-A647 bzw. Isotyp gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Zur Identifikation der NK-Zellen, NKT-Zellen und Granulozyten, nach Ausschluss der toten Zellen, wurden mAk gegen CD3, MHCII, CD19, CD11c, CD11b, F4/80 und Ly6Gc mitgeführt. (A) Einteilung der Granulozyten erfolgte über Eingrenzung der $CD11b^+$ Zellen und unter Ausschluss der $CD19^+$ Zellen. Anschließend wurden die Granulozyten durch Eingrenzung der $Ly6Gc^+$ Zellen definiert (Granulozyten: $CD11b^+MHCII^{med}CD19^-Ly6Gc^+$). (B) HVEM-Expression auf Granulozyten im Vergleich zur Isotypkontrolle (gefüllte Kurve). (C) Eingrenzung der NK-Zellen und NKT-Zellen nach Ausschluss der $CD19^+$ Zellen. (D) Gegenüberstellung der HVEM-Expression auf NKT-Zellen (schwarze Kurve) vs. NK-Zellen (graue Kurve). Die MFI der HVEM-Färbung der verschiedenen Zellpopulationen ist in der entsprechenden Farbe angegeben. Dargestellt sind repräsentative Färbungen

3.3 Reziproke Modulation von HVEM und BTLA

3.3.1 Modulation der HVEM/BTLA-Expression in genetisch veränderten Mäusen

Bei der Analyse der Expressionsverteilung und -stärke von HVEM und BTLA auf Proteinebene fiel auf, dass Zellen, die HVEM stark exprimieren, weniger BTLA exprimieren. Es stellte sich die Frage, ob HVEM und BTLA sich in ihrer Expression gegenseitig beeinflussen. Um dieser Frage nachzugehen wurden Splenozyten von HVEM-defizienten, BTLA-defizienten oder BTLA-transgenen Mäusen (Kapitel 2.2) in der Durchflusszytometrie untersucht. Die BTLA-transgenen Mäuse überexprimieren BTLA nur auf den T-Zellen (Faktor 10; Abb. 20 A), sowohl den CD4⁺- als auch den CD8⁺-T-Zellen (nicht gezeigt). Die restlichen lymphatischen Zellen wie B-Zellen sind unverändert (Abb. 20 B).

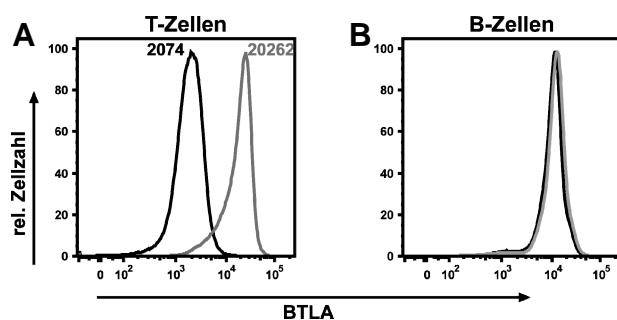


Abb. 20: BTLA-Expression auf T-Zellen und B-Zellen von BTLA-transgenen Mäusen.

Durchflusszytometrische Analyse der BTLA-Expression von BTLA-transgenen Mäusen (graue Kurven) im Vergleich zu wt Mäusen (schwarze Kurven) auf (A) T-Zellen, die Signalstärke der BTLA-Färbung wurde über die MFI quantifiziert (im Histogramm angegeben). (B) B-Zellen. Die Identifizierung und Unterteilung in T- und B-Zellen erfolgte wie in Abb. 17 beschrieben.

Zunächst wurde die Zusammensetzung der Leukozytenpopulationen der genetisch veränderten Mäuse untersucht, um sicherzustellen, dass die genetisch veränderten Mäuse keine gravierenden Unterschiede zu wt Mäusen aufweisen und alle Leukozytenpopulationen vertreten sind. Die T-Zell-Subpopulationen und die B-Zellen wurden wieder anhand spezifischer Marker identifiziert (Abb. 21 A). Es wurde dann der prozentuale Anteil der Zellpopulationen bezogen auf lebende Splenozyten der genetisch veränderten Mäuse im Vergleich zu wt Mäusen dargestellt (Abb. 21). In den HVEM-defizienten Mäusen war, wie in der Literatur bereits beschrieben (Wang *et al.*, 2005), der Anteil an B-Zellen und T-Zellen im Vergleich zum wt nicht verändert (nicht gezeigt). Auch die BTLA-defizienten Mäuse zeigten keine Unterschiede in ihrem Anteil an B-Zellen und T-Zellen (nicht gezeigt). Allerdings zeigten sich in den T-Zell-Subpopulationen Unterschiede (Abb. 21 B). Sowohl in den HVEM-

als auch in den BTLA-defizienten Mäusen war der Anteil der $CD4^+$ -T-Zellen von ca. 57 % auf ca. 66 % erhöht. Im Gegenzug war der Anteil der $CD8^+$ -T-Zellen in den HVEM- und BTLA-defizienten Mäusen im Vergleich zum wt von ca. 40 % auf 30 % verringert (Abb. 21 B). In den BTLA-transgenen Mäusen zeigten sich keine nennenswerten Unterschiede der B-Zellen im Vergleich zu den wt Mäusen (nicht gezeigt). Der Anteil der T-Zellen war allerdings in den BTLA-transgenen Mäusen deutlich verändert. So waren es in den BTLA-transgenen Mäusen nur noch 22 % T-Zellen im Vergleich zu den wt Mäusen mit ~ 37 % T-Zellen (Abb. 21 C). Diese Reduktion der T-Zellen ging einher sowohl mit einem reduzierten Anteil der $CD4^+$ -T-Zellen an den T-Zellen von 55 % auf 45 % als auch einer Reduktion der $CD8^+$ -T-Zellen von 35 % auf 30 % der T-Zellen (Abb. 21 C). Dagegen war der Anteil der doppelt-negativen T-Zellen ($CD4^- CD8^-$) von ca. 10 % in den wt Mäusen auf ca. 25 % in den BTLA-transgenen Mäusen erhöht. Insgesamt schien sich die Abwesenheit von HVEM bzw. BTLA auf die Zellpopulationen insbesondere die T-Zellen weniger auszuwirken als die Überexpression von BTLA auf den T-Zellen, die eine deutliche Reduktion der T-Zell-Subpopulationen und somit der gesamten T-Zellen zur Folge hatte.

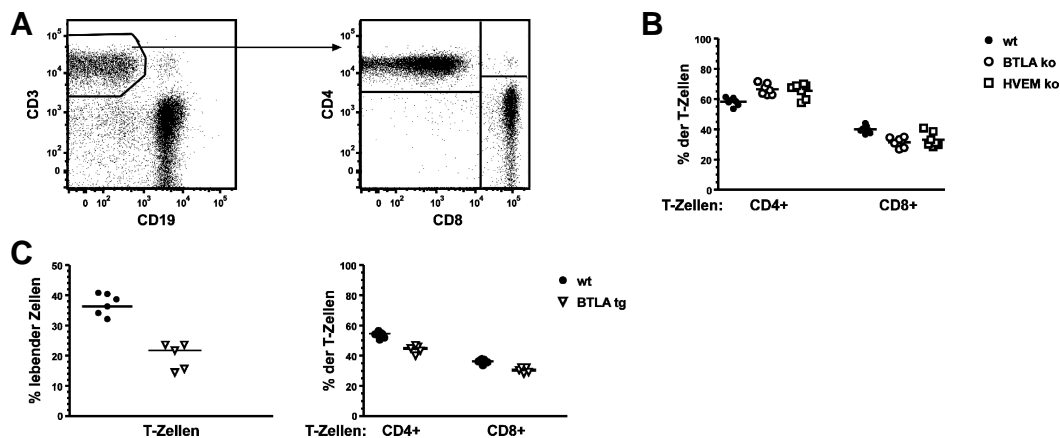


Abb. 21: Anteil der T-Zell-Populationen in der Milz genetisch veränderter Mäuse im Vergleich zu wt Mäusen.

Es wurden Splenozyten von wt, BTLA-defizienten, HVEM-defizienten und BTLA-transgenen Mäusen isoliert (Kapitel 2.6.4) und im Durchflusszytometer analysiert. (A) Eingrenzung der $CD3^+$ T-Zellen nach Ausschluss der toten Splenozyten und Unterteilung in die $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zell-Subpopulationen, (B) prozentualer Anteil der $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen an $CD3^+$ -T-Zellen von wt (gefüllte Kreise), BTLA-defizienten (offene Kreise, BTLA ko) und HVEM-defizienten Mäusen (offene Quadrate, HVEM ko) mit jeweils 7 Tieren pro Gruppe, repräsentativ für 2 Experimente; (C) prozentualer Anteil der T-Zellen an lebenden Zellen (links) und prozentualer Anteil der $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen an $CD3^+$ -T-Zellen (rechts) von wt (gefüllte Kreise) und BTLA-transgenen Mäusen (offene Dreiecke, BTLA tg) mit jeweils 5-6 Tieren pro Gruppe. Ein Symbol repräsentiert ein Tier.

Der eigentlichen Frage, ob HVEM und BTLA sich gegenseitig in ihrer Expression beeinflussen, wurde dann im Folgenden. In der Einzelanalyse der Splenozyten von mehreren genetisch veränderten Mäusen wurden die Populationen der CD4⁺-T-Zellen und CD8⁺-T-Zellen, sowie der B-Zellen analysiert. Die HVEM-defizienten Mäuse zeigten eine erhöhte Expression von BTLA sowohl auf CD4⁺-T-Zellen als auch auf B-Zellen gegenüber den wt Mäusen (Abb. 22 A und B). Im Mittel war bei den CD4⁺-T-Zellen der MFI von 2640 (wt) auf 3100 (HVEM ko) angestiegen. Bei den B-Zellen nahm der MFI im Mittel von 10720 auf 12250 zu. Bei den CD8⁺-T-Zellen konnte kaum ein Unterschied zwischen wt und HVEM-defizienten Mäusen festgestellt werden (Abb. 22 A). Entsprechend zeigte die Untersuchung der BTLA-defizienten Mäuse eine deutliche Erhöhung der HVEM-Expression auf CD4⁺-T-Zellen (durchschnittliche = Ø MFI: 12210 → 21340), CD8⁺-T-Zellen (Ø MFI: 12860 → 19380) und B-Zellen (Ø MFI: 5480 → 6460) im Vergleich zu den wt Mäusen (Abb. 22 C und D). Die Unterschiede in den Expressionsniveaus von BTLA bzw. HVEM in den HVEM- bzw. BTLA-defizienten Mäusen waren oft weniger als Faktor 2, konnten aber in mehreren Experimenten mit jeweils bis zu sechs Mäusen pro Gruppe bestätigt werden. In den BTLA-transgenen Mäusen, die BTLA nur auf T-Zellen überexprimieren, konnten auf den T-Zellen im Vergleich zu den BTLA-defizienten Mäusen entgegengesetzte Phänomene beobachtet werden. Sowohl die CD4⁺-T-Zellen als auch die CD8⁺-T-Zellen exprimierten erheblich weniger HVEM als die wt Zellen (Abb. 22 E). Die HVEM-Expression auf den T-Zell-Subpopulationen belief sich in den BTLA-transgenen Mäusen nur noch auf etwas mehr als ein Drittel der Expression auf wt Zellen. Bei den B-Zellen der BTLA-transgenen Mäusen, deren BTLA-Expression unverändert war, konnte auch keine Änderung der Expression von HVEM beobachtet werden (Abb. 22 F). Insgesamt betrachtet führte die Abwesenheit von HVEM zur verstärkten Expression von BTLA und umgekehrt hatte die BTLA-Defizienz eine Steigerung der HVEM-Expression zur Folge.

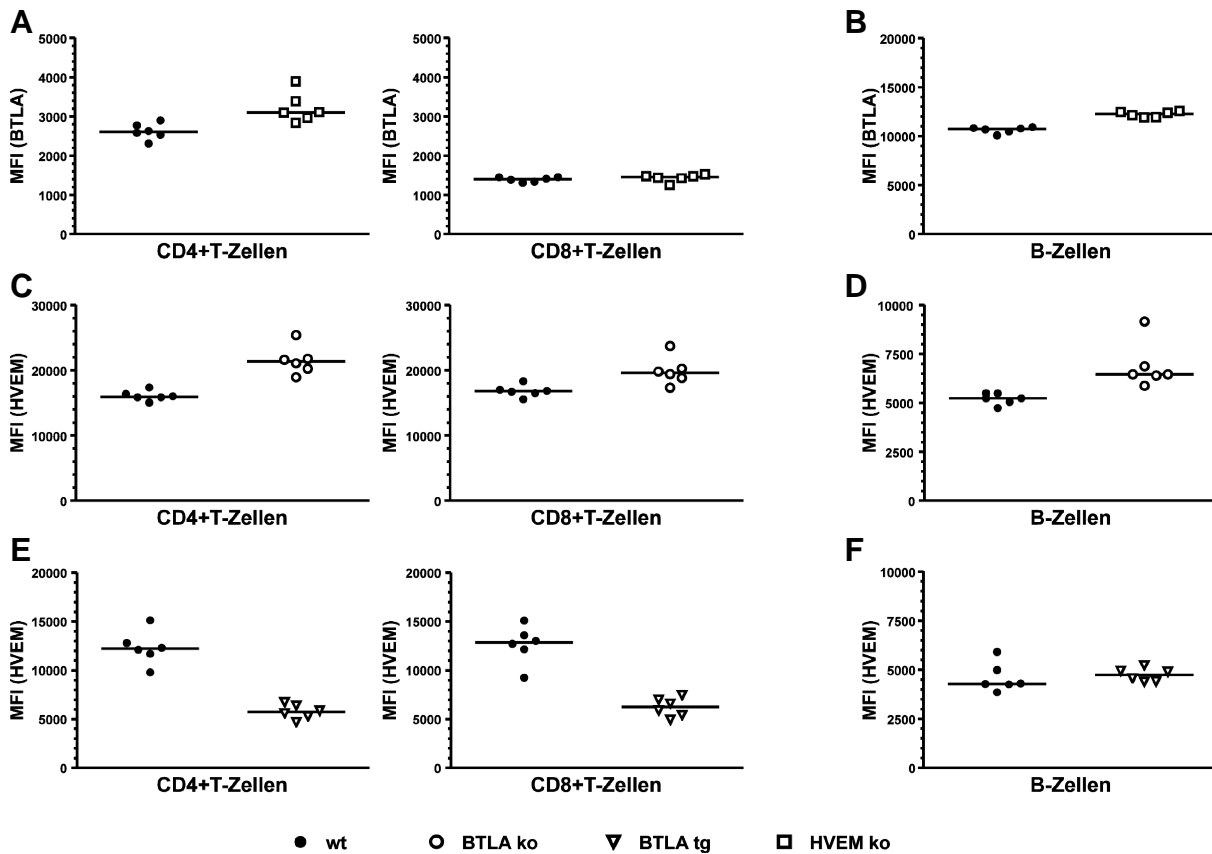


Abb. 22: Veränderte HVEM- und BTLA-Expression in genetisch veränderten Mäusen im Vergleich zum wt.

Splenozyten von wt, BTLA-defizienten, HVEM-defizienten und BTLA-transgenen Mäusen wurden isoliert (Kapitel 2.6.4), mit mHV-1411-DIG und anti-DIG-A647 bzw. mBT-1622.6-PE gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Es wurden jeweils 6 Einzeltiere analysiert. Nach der Unterteilung in CD4⁺-, CD8⁺-T-Zellen und B-Zellen (vgl. Abb. 17) wurde die MFI der HVEM- bzw. BTLA-Färbung der einzelnen Zellpopulationen jedes Tieres dargestellt. Auftragung der MFI von BTLA auf (A) CD4⁺-, CD8⁺-T-Zellen, (B) B-Zellen von wt (gefüllte Kreise) und HVEM-defizienten Mäusen (offene Quadrate). Auftragung der MFI von HVEM auf (C) CD4⁺-, CD8⁺-T-Zellen, (D) und B-Zellen von wt (gefüllte Kreise) und BTLA-defizienten Mäusen (offene Kreise). Auftragung der MFI von HVEM auf (E) CD4⁺-, CD8⁺-T-Zellen, (F) B-Zellen von wt (gefüllte Kreise) und BTLA-transgenen Mäusen (offene Dreiecke). Die MFI der Tiere jeder Gruppe wurden gemittelt, dargestellt ist der Median (= Ø MFI). Repräsentatives Experiment von zwei.

In Übereinstimmung damit war die Konsequenz der Überexpression von BTLA auf T-Zellen, dass die Expression von HVEM auf T-Zellen vermindert wurde. HVEM und BTLA modulierten sich gegenseitig in ihrer Expression. Die Modulation schien in den BTLA-transgenen Mäusen innerhalb eines Zelltyps zu erfolgen, da nur die veränderten T-Zellen eine verringerte HVEM-Expression zeigten.

3.3.2 Modulation der HVEM/BTLA-Expression durch Überexpression *in vitro*

In den genetisch veränderten Mäusen konnte zum einen gezeigt werden, dass die Abwesenheit des einen Moleküls zur Hochregulation des anderen Moleküls und die Überexpression von BTLA zur Reduktion von HVEM führte. Die gegenseitige Modulation von HVEM und BTLA sollte in einem unabhängigen System überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden Zelllinien, die BTLA bzw. HVEM mit einem bestimmten Niveau exprimieren, mit einem Plasmid transfiziert, das für HVEM oder BTLA kodiert. Im ersten Fall wurden EL-4 mit BCMGS_{neo}-HVEM transfiziert. Die so erzielte Überexpression von HVEM führte zur Reduktion der BTLA-Expression auf den transfizierten Zellen (MFI 3498) im Vergleich zur wt Zelllinie (MFI 7962; Abb. 23 A). Im zweiten Fall wurden L-Zellen mit BCMGS_{neo}-BTLA transfiziert. Auch diese Überexpression von BTLA hatte wie bei den BTLA-transgenen Mäusen eine Herunterregulation von HVEM auf der Transfektante (MFI 3171) im Vergleich zur wt Zelllinie (MFI 4629; Abb. 23 B) zur Folge.

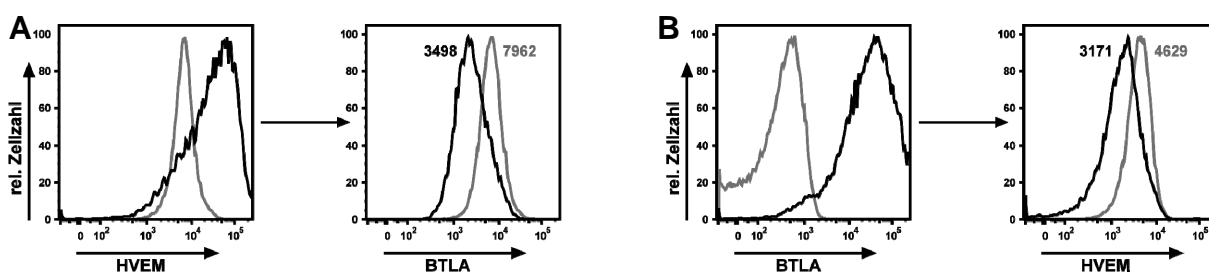


Abb. 23: Reduktion der HVEM- bzw. BTLA-Expression in Zelllinien, die das Partnermolekül überexprimieren.

Transfizierte Zelllinien und wt Zelllinien (Kapitel 2.6.3) wurden mit mHV-1411-DIG bzw. mBT-1622.6-DIG und anti-DIG-A647 gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. (A) EL-4 transfiziert mit BCMGS_{neo}-HVEM. Gezeigt ist die daraus resultierende erhöhte Expression von HVEM (links, schwarze Kurve) und die Herunterregulation von BTLA auf dieser Transfektante (rechts, schwarze Kurve) im Vergleich zur untransfizierten Zelllinie (graue Kurve). (B) L-Zellen transfiziert mit BCMGS_{neo}-BTLA. Gezeigt ist die daraus resultierende erhöhte Expression von BTLA (links, schwarze Kurve) und die Herunterregulation von HVEM auf dieser Transfektante (rechts, schwarze Kurve) im Vergleich zur untransfizierten Zelllinie (graue Kurve). Zur Beurteilung der jeweiligen Herunterregulation ist die MFI der BTLA- bzw. HVEM-Färbung in den entsprechenden Farben angegeben.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Überexpression von HVEM als auch von BTLA zur verminderten Expression des Partnermoleküls führte, wie es für die Überexpression von BTLA in den BTLA-transgenen Mäusen gezeigt wurde. Somit konnte die gegenseitige Abhängigkeit von HVEM und BTLA in ihrer Expression in einem unabhängigen System zu den genetisch veränderten Mäusen gezeigt werden. Es konnte jedoch nicht geklärt werden, ob

die Zellen das Expressionsniveau aufgrund von Zell-Zell-Kontakt oder Zell-intrinsisch regulieren.

3.3.3 Modulation der HVEM/BTLA-Expression durch eine veränderte Umgebung

Bisher wurden Modelle untersucht, in denen die Zellen auf DNA-Ebene verändert waren. In den HVEM- und BTLA-defizienten sowie den BTLA-transgenen Mäusen fehlte jeweils eines der Moleküle bzw. BTLA wurde überexprimiert. Auch die transfizierten Zelllinien wurden auf DNA-Ebene verändert. Im Fall der genetisch veränderten Mäuse durchliefen die Zellen ihre gesamte Entwicklung mit dieser Veränderung. Es konnte so nicht geklärt werden, ob die Veränderung des Expressionsniveau von HVEM bzw. BTLA durch die genetische Veränderung der Mäuse, d.h. Zell-intrinsisch, hervorgerufen oder durch die Interaktion mit anderen Zellen modifiziert wurde. Ziel der Untersuchung war es festzustellen, ob unveränderte Zellen von wt Mäusen, die ein bestimmtes Ausgangsniveau der HVEM- bzw. BTLA-Expression auf der Zelloberfläche besitzen, sich an eine veränderte Umgebung, in der z.B. HVEM fehlt, ihre Expressionsstärke von BTLA anpassen. Um dies zu untersuchen, wurden im folgenden Splenozyten von wt Mäusen mit CFSE markiert, um sie später in der Analyse von endogenen Zellen der Rezipientenmäuse unterscheiden zu können, in wt, HVEM-defiziente, BTLA-defiziente oder BTLA-transgene Mäuse adoptiv transferiert (Kapitel 2.10.1).

3.3.3.1 Adoptiver Transfer in HVEM-defiziente/BTLA-transgene Mäuse

Nach dem adoptiven Transfer der CFSE-markierten Splenozyten in wt und HVEM-defiziente bzw. BTLA-transgene Mäuse wurden zu verschiedenen Zeitpunkten die Milzen der Rezipienten entnommen und Splenozyten präpariert. Es wurde an Tag 1, 4 und 14 die Expressionsstärke von HVEM und BTLA auf den transferierten und den endogenen Zellen in der Durchflusszytometrie analysiert. Die transferierten Splenozyten wurden anhand ihrer CFSE-Markierung identifiziert und mittels spezifischer Marker in CD4⁺-, CD8⁺-T-Zellen und B-Zellen unterteilt. Da die Ergebnisse für CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen gleich waren, sind hier nur die Ergebnisse der CD4⁺-T-Zellen dargestellt. An Tag 1 nach dem Transfer von wt Splenozyten in HVEM-defiziente und BTLA-transgene Mäuse wurde keine Veränderung der HVEM- bzw. BTLA-Expression beobachtet (nicht gezeigt). Auch an Tag 4 konnte keine signifikante Veränderung der BTLA-Expression durch den Transfer der Zellen in HVEM-defiziente Mäuse festgestellt werden. Man konnte hier aber schon Tendenzen einer Erhöhung der Expression von BTLA erkennen (Abb. 24 A). Diese ließ sich deutlicher an Tag 14

erkennen. Dort war die BTLA-Expression auf den transferierten CD4⁺-T-Zellen nach dem Transfer in HVEM-defiziente Mäuse höher als in wt Mäuse (Abb. 24 A). Dies entsprach dem Unterschied den die endogenen Zellen der HVEM-defizienten Mäuse zu den endogenen Zellen der wt Mäuse zeigten, wie der Vergleich mit den endogenen CD4⁺-T-Zellen der Rezipienten zeigte (Abb. 24 A). Die verstärkte BTLA-Expression konnte auch auf B-Zellen beobachtet werden (nicht gezeigt). Der Transfer in BTLA-transgene Mäuse bewirkte ebenfalls eine erhöhte Expression von BTLA auf den transferierten CD4⁺-T-Zellen an Tag 14 (Abb. 24 A). Das Expressionsniveau war allerdings nicht so hoch wie bei den endogenen T-Zellen, da die transferierten T-Zellen nicht genetisch verändert waren (Vgl. Abb. 24 A). Die B-Zellen zeigten auch hier keine Unterschiede in der BTLA-Expression nach dem Transfer in BTLA-transgene Mäuse im Vergleich zum Transfer in wt Mäuse. Dies entsprach der Beobachtung, dass auch die endogenen B-Zellen keine Unterschiede in der BTLA-Expression zwischen wt und BTLA-transgenen Mäusen zeigten (Kapitel 3.3.1).

Durch den Transfer konnte auch in der HVEM-Expression eine Anpassung an die Umgebung festgestellt werden. So führte der Transfer in HVEM-defiziente Rezipienten auf CD4⁺-T-Zellen an Tag 4 noch zu keiner Veränderung der HVEM-Expression, auf den B-Zellen konnte zu diesem Zeitpunkt schon eine Reduktion der Expression um ein Drittel im Vergleich zum Transfer in wt Mäuse beobachtet werden (Abb. 24 A und B). An Tag 14 konnte HVEM weder auf den transferierten T-Zellen noch auf den transferierten B-Zellen detektiert werden (Abb. 24 A und B), entsprechend den endogenen Zellen der HVEM-defizienten Mäuse (Vgl. Abb. 24 B).

Durch den Transfer der wt Splenozyten in BTLA-transgene Mäuse wurde das HVEM-Niveau der transferierten T-Zellen schon an Tag 4 auf die Hälfte gesenkt, verglichen mit dem Transfer in wt Mäuse, ähnlich dem Expressionsniveau der endogenen T-Zellen der BTLA-transgenen Mäuse (Abb. 24 A). Die reduzierte HVEM-Expression wurde auch an Tag 14 beobachtet (Abb. 24 A). Die transferierten B-Zellen zeigten in den BTLA-transgenen Rezipienten keine Veränderung der HVEM-Expression, so wie die endogenen B-Zellen der BTLA-transgenen Rezipienten auch nicht ihre HVEM-Expression änderten (Abb. 24 B, Kapitel 3.3.1). Dies ließ darauf schließen, dass die Anpassung hier scheinbar auf einer T-Zell-T-Zell-Interaktion beruht.

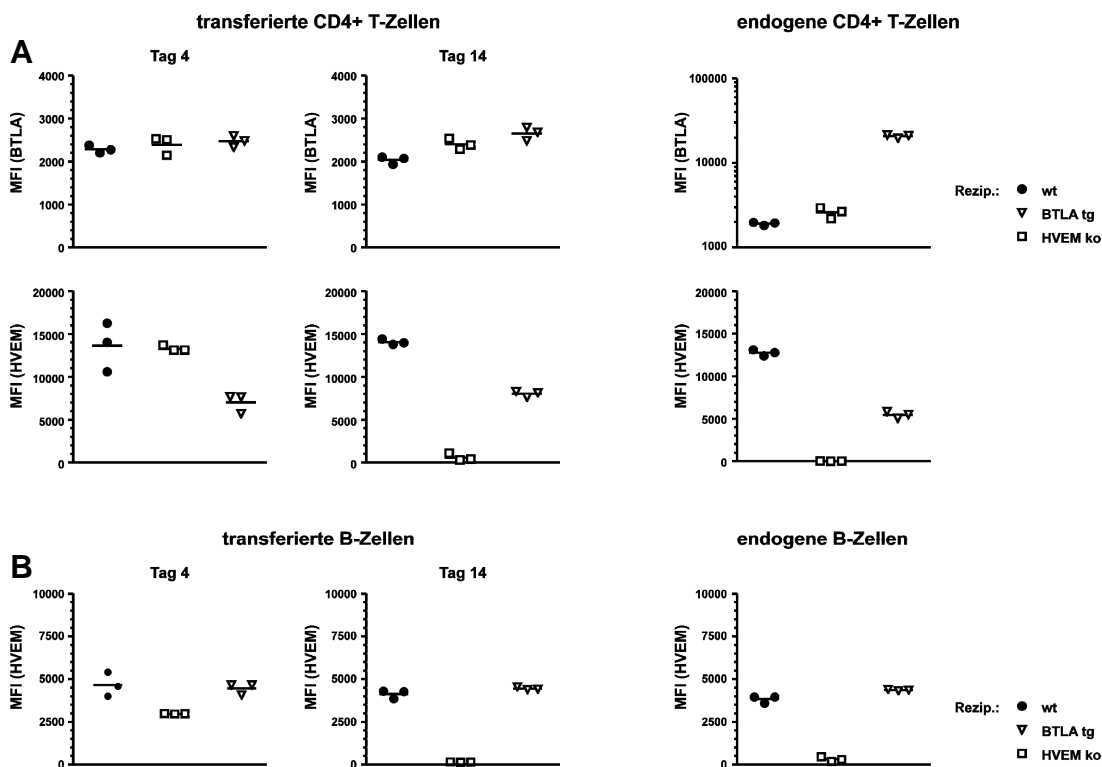


Abb. 24: Anpassung der HVEM- und BTLA-Expression in einer Umgebung mit verändertem HVEM- bzw. BTLA-Niveau.

Adoptiver Transfer von CFSE-markierten wt Splenozyten in wt, HVEM-defiziente und BTLA-transgene Mäuse (Kapitel 2.10.1). Je Maus (Rezipient) wurden 20×10^6 Zellen i.v. transferiert. Nach 4 und 14 Tagen Präparation der Splenozyten, Färbung mit mHV-1411-DIG, mBT-1622.6-PE und anti-DIG-A647 sowie verschiedene Marker zur Identifizierung der $CD4^+$ -T-Zellen und B-Zellen (Vgl. Abb. 17) und Analyse im Durchflusszytometer. Die transferierten Zellen wurden anhand der CFSE-Markierung von den endogenen Zellen der Rezipienten unterschieden. Dargestellt ist die MFI von BTLA und HVEM der transferierten und der endogenen Zellen aus den wt (gefüllte Kreise), HVEM-defizienten (offene Quadrate) und BTLA-transgenen Rezipienten (offene Dreiecke). Jedes Symbol repräsentiert ein Tier, jeweils drei Tiere pro Gruppe. (A) BTLA- und HVEM-Expression auf den transferierten und endogenen $CD4^+$ -T-Zellen. (B) HVEM-Expression auf den transferierten und endogenen B-Zellen.

3.3.3.2 Adoptiver Transfer in BTLA-defiziente Mäuse

Wie in Kapitel 3.3.3.1 wurde auch nach dem adoptiven Transfer der CFSE-markierten Splenozyten in BTLA-defiziente Mäuse die Expressionsstärke von HVEM und BTLA auf den transferierten und den endogenen Zellen in der Durchflusszytometrie analysiert. Allerdings konnte hier nur ein früher Zeitpunkt (Tag 1 nach dem Transfer) untersucht werden, da die Zellen der Donormäuse, aufgrund der nicht weit genug fortgeschrittenen Rückkreuzung der BTLA-defizienten Rezipientenmäuse, in diesen Mäusen abgestoßen wurden. Der Transfer in BTLA-defiziente Rezipienten im Vergleich zu wt Rezipienten führte schon an Tag 1 zu einer leichten Verminderung der BTLA-Expression sowohl auf B-Zellen als auch auf $CD4^+$ -T-Zellen und zu einer erhöhten Expression von HVEM auf $CD4^+$ -T-Zellen und B-Zellen

(Abb. 25). Auch hier passten sich die Zellen ihrer Umgebung an (Vgl. Abb. 25). Möglicherweise führt der Transfer von wt Splenozyten in BTLA-defiziente Mäuse auch hier später zu einer vollständigen Herunterregulation der BTLA-Expression auf den transferierten Zellen. Dies muss jedoch noch untersucht werden.

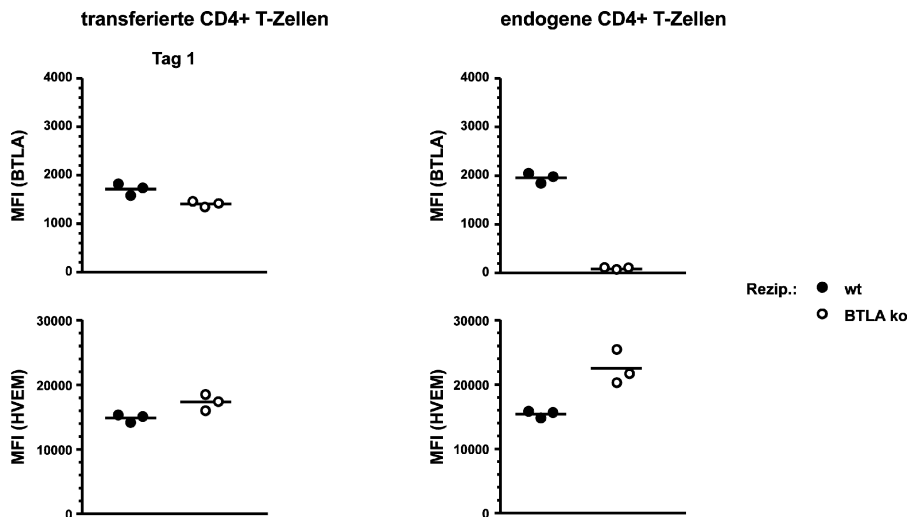


Abb. 25: Anpassung der HVEM- und BTLA-Expression in einer Umgebung mit fehlender BTLA-Expression.

Adoptiver Transfer von CFSE-markierten wt Splenozyten in wt oder BTLA-defiziente Mäuse. Durchführung wie in Abb. 24 beschrieben, mit einer Ausnahme: die Präparation der Splenozyten erfolgte hier einen Tag nach dem Transfer. Dargestellt ist die MFI von BTLA und HVEM der transferierten und der endogenen Zellen aus wt (gefüllte Kreise) und BTLA-defizienten Rezipienten (offene Kreise). Jedes Symbol repräsentiert ein Tier, jeweils drei Tiere pro Gruppe.

Insgesamt betrachtet, konnte gezeigt werden, dass die transferierten wt Splenozyten auf das veränderte Expressionsniveau von HVEM- bzw. BTLA in ihrer Umgebung reagierten. So führte die Abwesenheit von HVEM in der Umgebung zur Hochregulation von BTLA auf den transferierten Zellen. Aber auch die hohe Expression von BTLA auf den T-Zellen der BTLA-transgenen Rezipienten hatte eine verstärkte Expression von BTLA auf den transferierten T-Zellen zur Folge, die sogar höher war als bei dem Transfer der Zellen in HVEM-defiziente Mäuse. Die Zellen reagierten wahrscheinlich zum einen auf das verringerte HVEM-Niveau in den BTLA-transgenen Rezipienten, versuchten aber auch gleichzeitig sich an das sehr hohe BTLA-Niveau auf den T-Zellen der Umgebung anzupassen. Auch die HVEM-Expression auf den transferierten Zellen wurde wahrscheinlich durch die erhöhte Expression von BTLA in den HVEM-defizienten Rezipienten verringert, so dass die HVEM-Expression vollständig herunterreguliert wurde. In den BTLA-transgenen Rezipienten wurde HVEM nur auf transferierten T-Zellen herunterreguliert, aber nicht vollständig, wie es in den HVEM-defizienten Mäusen der Fall war. Die ausschließliche Anpassung nur auf den T-Zellen in den

BTLA-transgenen Mäusen lässt darauf schließen, dass die Regulation möglicherweise durch T-Zell-T-Zell-Interaktion erfolgte.

3.3.4 Entgegengesetzte Expression von HVEM und BTLA im Verlauf der Aktivierung von T-Zellen

Da HVEM und BTLA in der Regulation der Immunantwort beteiligt sind, sollte in dieser Arbeit die Expression von HVEM und BTLA nicht nur im Ruhezustand der Zellen sondern auch während der Aktivierung von T-Zellen untersucht werden. Sortierte naive $CD4^+$ -T-Zellen wurden *in vitro* über den T-Zell-Rezeptor (TZR) mit immobilisiertem anti-CD3 mAk und einem kostimulatorischen Signal, vermittelt über immobilisierten anti-CD28 mAk, aktiviert (Kapitel 2.6.7). Die Expression von HVEM und BTLA wurde im Zeitverlauf der Aktivierung der $CD4^+$ -T-Zellen im Durchflusszytometer verfolgt. Die T-Zellen im Ruhezustand (0 h) exprimierten, wie bereits gezeigt, HVEM auf einem hohen Niveau und wenig BTLA (Abb. 26 A). Nach Aktivierung (30 h) wurde die Expression von HVEM verringert. Im Gegensatz dazu wurde BTLA deutlich verstärkt exprimiert.

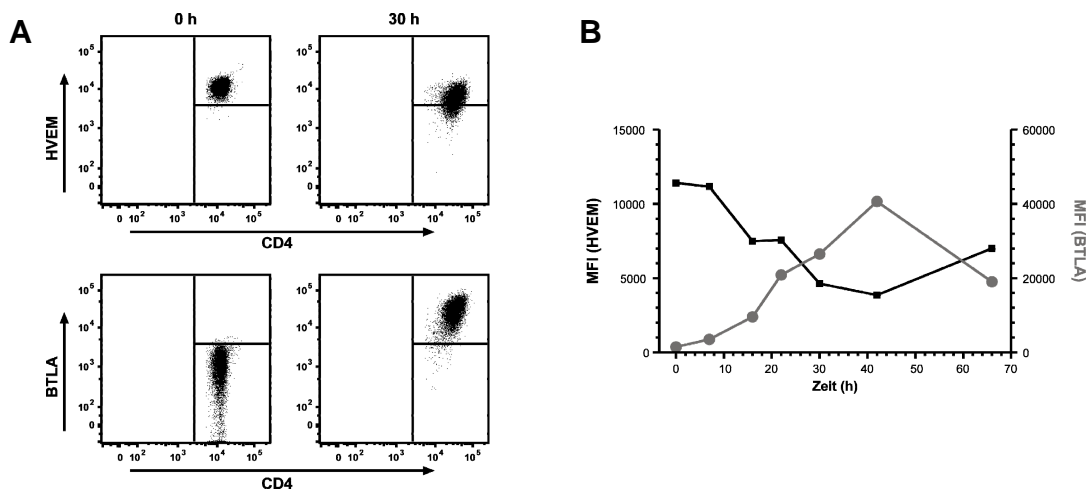


Abb. 26: Regulation der HVEM- und BTLA-Expression im Verlauf der T-Zell-Aktivierung *in vitro*.

Sortierte naive $CD4^+$ -T-Zellen von wt Mäusen wurden für die angegebene Zeit in Zellkulturplatten mit immobilisiertem anti-CD3 mAk und immobilisiertem anti-CD28 mAk bei 37 °C aktiviert (Kapitel 2.6.7). Anschließend wurden die Zellen mit mHV-1411-DIG und anti-DIG-A647 bzw. mBT-1622.6-PE gefärbt. (A) Expression von HVEM und BTLA zum Zeitpunkt 0 und 30 h (B) Auftragung der MFI der Färbung von HVEM (schwarze Kurve) und BTLA (graue Kurve) über die Zeit (in Stunden).

Die Kinetik der HVEM- und BTLA-Expression während der Aktivierung zeigte, dass HVEM und BTLA im Verlauf der Aktivierung von $CD4^+$ -T-Zellen über die gesamte Zeit entgegengesetzt reguliert wurden. So wurde HVEM bis zu einem Expressionsminimum bei 40 h herunterreguliert. Danach nahm HVEM auf den T-Zellen wieder zu (Abb. 26 B). BTLA dagegen wurde im Laufe der T-Zell-Aktivierung hochreguliert. Das Maximum der Expression

lag hier ebenfalls bei 40 h (Abb. 26 B). Bis 70 h konnte dann eine Abnahme von BTLA beobachtet werden. Die gleichen Ergebnisse wurden auch mit $CD8^+$ -T-Zellen erhalten (nicht gezeigt).

Die entgegengesetzte Regulation von HVEM und BTLA konnte auch *in vivo* beobachtet werden. In diesem Experiment wurden $CD4^+$ -T-Zellen mit einem transgenen T-Zell-Rezeptor spezifisch für OVA₃₂₃₋₃₃₉ aus OT-II Mäusen (OVA-TZR-transgene T-Zellen) in wt Mäuse adoptiv transferiert und 24 h später mit OVA-Alum in Anwesenheit von *B. pertussis* immunisiert (Kapitel 2.10.2). Die transferierten T-Zellen konnten über den genetischen Marker CD90.1 von den endogenen T-Zellen der Rezipientenmäuse unterschieden werden (Abb. 27 A). Die Splenozyten wurden zu verschiedenen Zeitpunkten präpariert und in der Durchflusszytometrie analysiert. Es wurde die Expression von HVEM und BTLA auf den OVA-TZR-transgenen $CD4^+$ -T-Zellen im Verlauf ihrer Aktivierung bestimmt (Abb. 27 B). Ähnlich der *in vitro* Aktivierung nahm auch *in vivo* die Expression von HVEM mit der Zeit ab, allerdings mit einer anderen Kinetik. Das Minimum lag hier an Tag 3 (Abb. 27 B). BTLA wurde im Verlauf der Aktivierung auf der Zelloberfläche hochreguliert und erreichte das Maximum an Tag 2 und damit etwas früher als *in vitro* (Abb. 27 B). Auch *in vivo* konnten die Ergebnisse für $CD8^+$ -T-Zellen (OT-I OVA-TZR-transgene T-Zellen) bestätigt werden (nicht gezeigt). Sowohl die *in vitro* als auch die *in vivo* Aktivierung der T-Zellen zeigten somit die entgegengesetzte Regulation von HVEM und BTLA.

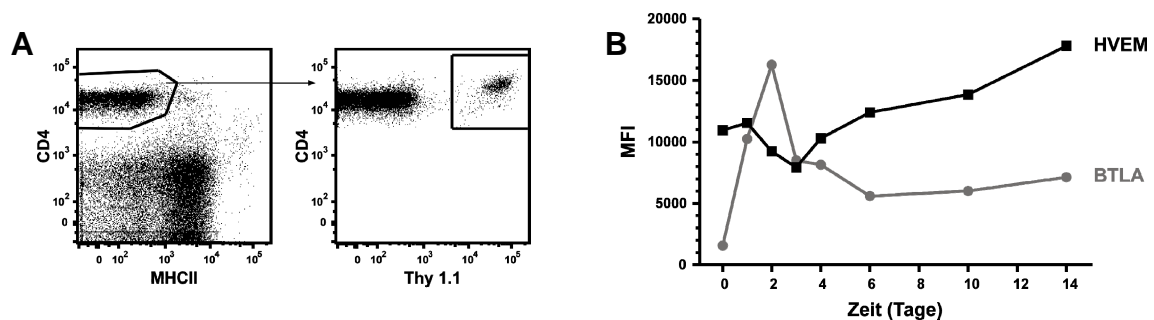


Abb. 27: Regulation der HVEM- und BTLA-Expression im Verlauf der T-Zell-Aktivierung *in vivo*.

Adoptiver Transfer von $CD62L^+$ -sortierten OT-II Zellen. Je Maus wurden $2,5 \times 10^6$ OVA-TZR-transgene T-Zellen transferiert. 24 h nach dem Transfer erfolgte die subkutane Immunisierung mit 25 μ g OVA-Alum und $2,5 \times 10^7$ *B. pertussis* je Pfote. Aus den poplitealen Lymphknoten wurden Zellen isoliert (Kapitel 2.10.2), mit mHV-1411-DIG, mBT-1622.6-DIG und anti-DIG-A647, sowie mAk gegen CD4, Thy1.1 und MHCII zur Identifizierung der OVA-TZR-transgenen T-Zellen gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. (A) Eingrenzung der $CD4^+MHCII^+Thy1.1^+$ OVA-TZR-transgenen T-Zellen nach Ausschluss der toten Zellen (B) Expression von HVEM und BTLA auf den OVA-TZR-transgenen T-Zellen, Auftragung der MFI der Färbung von HVEM (schwarze Kurve) und BTLA (graue Kurve) über die Zeit (in Tagen).

3.3.4.1 Die HVEM/BTLA-Regulation während einer T-Zell-Aktivierung ist unabhängig vom korrespondierenden Interaktionspartner

Auf ruhenden Zellen wurde die gegensätzliche Expression von HVEM und BTLA und die reziproke Regulation dieser Expression gezeigt (Kapitel 3.2 und 3.3.1). Die entgegengesetzte Expression konnte auch während der T-Zell-Aktivierung gezeigt werden (Kapitel 3.3.4). Dass diese Regulation während der T-Zell-Aktivierung allerdings unabhängig von der Expression des Partnermoleküls war, konnte durch die Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen von wt, HVEM-defizienten, BTLA-defizienten und BTLA-transgenen Mäusen mit verschiedenen Konzentrationen anti-CD3 mAk und anti-CD28 mAk *in vitro* gezeigt werden (Kapitel 2.6.7). Die Analysen erfolgten zu zwei Zeitpunkten (18 h und 66 h). Da die Ergebnisse beider Zeitpunkte ähnlich waren, wird hier repräsentativ der 18 h-Zeitpunkt gezeigt. In der Aktivierung der T-Zellen konnten anhand der Proliferation sowie der Expression von Aktivierungsmarkern, wie CD25 und CD69, keine Unterschiede zwischen den T-Zellen von genetisch veränderten und wt Mäusen festgestellt werden (nicht gezeigt). Betrachtet man die HVEM-Expression auf T-Zellen von wt und BTLA-defizienten Mäusen mit steigender Aktivierungsstärke (steigende anti-CD3-Konzentrationen), so konnte beobachtet werden, dass die Herunterregulation von HVEM auf den T-Zellen beider Mäuse parallel verlief (Abb. 28 A). Der Unterschied bestand nur darin, dass BTLA-defiziente Mäuse ein höheres Ausgangsniveau von HVEM besitzen (s. Kapitel 3.3.1). Dieser Expressionsunterschied wurde im Verlauf der Aktivierung beibehalten (Abb. 28 A). Dagegen wurde BTLA mit zunehmender Aktivierungsstärke auf wt T-Zellen hochreguliert (Abb. 28 B). Aber auch die HVEM-defizienten CD4⁺-T-Zellen, die, wie bereits gezeigt, mehr BTLA exprimierten als wt T-Zellen, zeigten diese Hochregulation von BTLA mit zunehmender Aktivierung. Wie der parallele Verlauf der Kurven zeigt, wurde der anfängliche Expressionsunterschied von BTLA während der Aktivierung beibehalten (Abb. 28 B). Der Vergleich der BTLA-transgenen mit wt T-Zellen zeigte sowohl für HVEM als auch BTLA eine zum wt vergleichbare Regulation im Verlauf der Aktivierung (Abb. 28 C). So wurde HVEM trotz der geringeren Expression auf den CD4⁺-T-Zellen der BTLA-transgenen Mäuse (Kapitel 3.3.1) noch eine Herunterregulation beobachtet, die parallel zu der auf den wt T-Zellen verlief (Abb. 28 C). Sogar BTLA wurde von den BTLA-transgenen CD4⁺-T-Zellen, die BTLA schon auf einem sehr hohen Niveau exprimierten, mit steigender Aktivierung noch hochreguliert, wie es bei den wt T-Zellen auf einem geringeren Expressionsniveau der Fall ist (Abb. 28 C). Es konnte hier gezeigt werden, dass die Herunterregulation von HVEM bzw. die Hochregulation von BTLA, die im Verlauf einer Aktivierung von T-Zellen stattfindet, abhängig von der Stärke der

Aktivierung war, aber nicht durch das Partnermolekül beeinflusst wurde. HVEM und BTLA bestimmen nur gegenseitig ihr Expressionsniveau auf einer Zelle. Die Regulation während der Aktivierung ist jedoch unabhängig von der vorhandenen Menge an HVEM bzw. BTLA, und scheint eher Teil des „T-Zell-Aktivierungsprogramms“ zu sein.

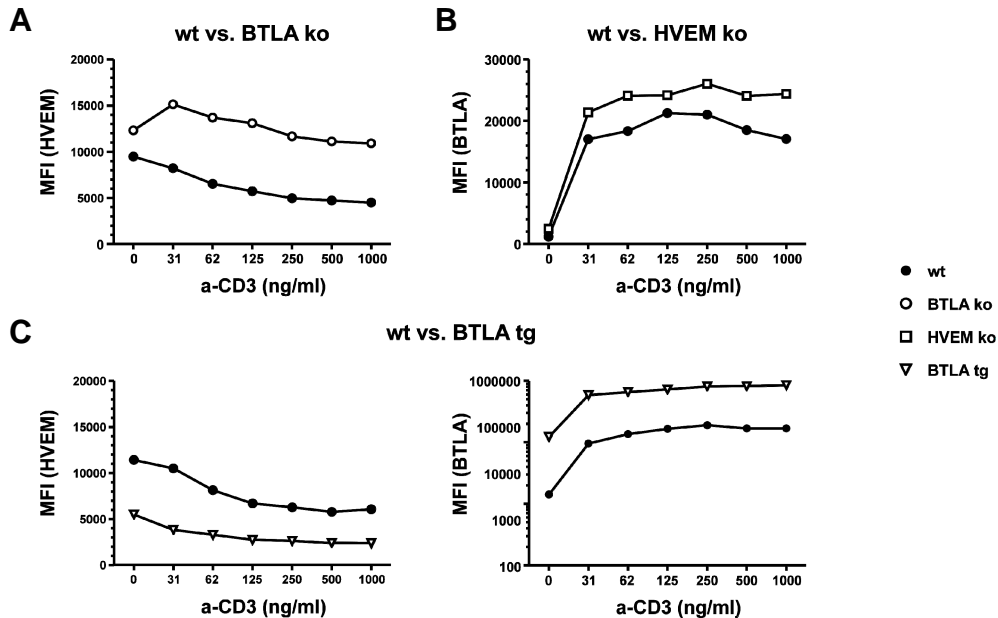


Abb. 28: Vom Bindungspartner unabhängige Regulation der HVEM- und BTLA-Expression im Verlauf der T-Zell-Aktivierung *in vitro*.

Sortierte $CD4^+$ -T-Zellen von wt, HVEM-defizienten, BTLA-defizienten und BTLA-transgenen Mäusen wurden in Zellkulturplatten mit den angegebenen Konzentrationen von immobilisiertem anti-CD3 mAk und einer konstanten Konzentration immobilisiertem anti-CD28 mAk bei 37 °C aktiviert (Kapitel 2.6.7). Färbung mit mHV-1411-DIG und anti-DIG-A647 bzw. mBT-1622.6-PE sowie anti-CD4 mAk zur Identifizierung der $CD4^+$ -T-Zellen. (A) Expression von HVEM auf $CD4^+$ -T-Zellen von wt (gefüllte Kreise) und BTLA-defizienten Mäusen (offene Kreise), (B) Expression von BTLA auf $CD4^+$ -T-Zellen von wt (gefüllte Kreise) und HVEM-defizienten Mäusen (offene Quadrate), (C) Expression von HVEM und BTLA auf $CD4^+$ -T-Zellen von wt (gefüllte Kreise) und BTLA-transgenen Mäusen (offene Dreiecke). Es ist jeweils die MFI der Färbung von HVEM bzw. BTLA über die Konzentration von anti-CD3 mAk (in ng/ml) aufgetragen.

3.4 HVEM-induzierte Modulation von BTLA

Nachdem gezeigt worden war, dass sich die HVEM- und BTLA-Expression reziprok beeinflussten und Zellen sich an eine Umgebung mit veränderter Expression von HVEM und BTLA anpassen können, sollte die direkte Beteiligung der Bindung des Liganden HVEM an BTLA und der daraus resultierenden Herunterregulation von BTLA untersucht werden. Hierfür wurde das HVEM-Fusionsprotein bzw. ein Kontrollprotein (Isotyp) auf Zellkulturplatten immobilisiert und anschließend sortierte B-Zellen auf diesen Platten für 5, 10 und 21 h kultiviert (Kapitel 2.6.8). Es wurden B-Zellen verwendet, da diese BTLA in einem höheren Niveau exprimieren und sich so eine Herunterregulation von BTLA besser in

der Durchflusszytometrie verfolgen ließ. Der Kontakt der B-Zellen mit HVEM-Fusionsprotein hatte zur Folge, dass die BTLA-Expression auf den B-Zellen bereits nach 5 h herunterreguliert wurde. Sie entsprach nur noch ca. $\frac{1}{4}$ der BTLA-Expression, die durch die Inkubation mit dem Isotyp detektiert wurde (Abb. 29 A). Dies konnte auch bei 10 und 21 h beobachtet werden (nicht gezeigt). Die Expression von BTLA wurde mittels mBT-1622 in der Durchflusszytometrie nachgewiesen. Zusätzlich wurde die BTLA-Expression noch durch Färben mit dem HVEM-Fusionsprotein überprüft, um ausschließen zu können, dass der mAk durch das HVEM-Fusionsprotein nicht mehr an BTLA binden konnte. Die Ergebnisse, die mit dem mAk erhalten wurden, konnten mit dem HVEM-Fusionsprotein bestätigt werden (Abb. 29 B). Die Bindung des mAk war folglich unabhängig von der Bindung des HVEM-Fusionsproteins. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Herunterregulation von BTLA durch die Interaktion mit HVEM erfolgte.

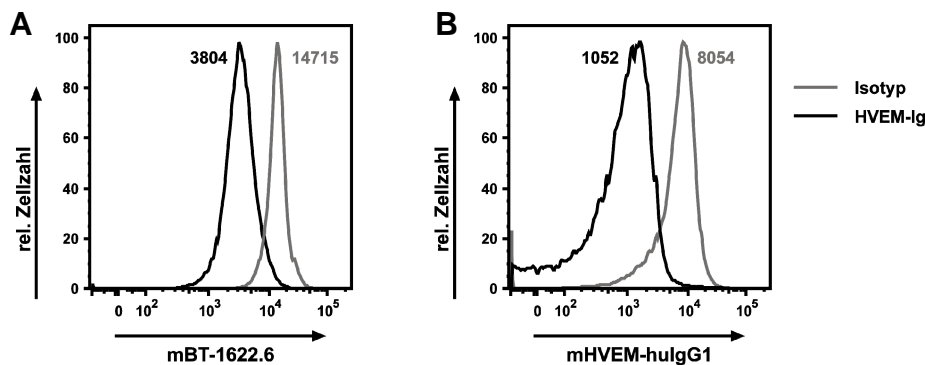


Abb. 29: Reduktion der BTLA-Expression durch Interaktion mit HVEM.

Sortierte B-Zellen von wt Mäusen wurden für 5 h in Zellkulturplatten mit immobilisiertem mHVEM-huIgG1 oder Kontrollprotein (Isotyp) bei 37 °C in Medium inkubiert (Kapitel 2.6.8), anschließend wurde die BTLA-Expression im Durchflusszytometer analysiert. (A) BTLA-Expression detektiert durch mBT-1622.6-PE nach Inkubation mit immobilisiertem mHVEM-huIgG1 (schwarze Kurve) oder immobilisiertem Isotyp (graue Kurve), (B) BTLA-Expression detektiert durch mHVEM-huIgG1 (Sekundär-Antikörper: anti-huIgG Fc γ -Fragment spez.-Cy5) nach Inkubation mit immobilisiertem mHVEM-huIgG1 (schwarze Kurve) oder immobilisiertem Isotyp (graue Kurve).

3.4.1 Mechanismus der Modulation

Die Regulation von BTLA nach der Interaktion mit HVEM konnte entweder auf RNA-Ebene oder auf Proteinebene erfolgen. Eine mögliche Änderung der BTLA-mRNA wurde mittels quantitativer PCR analysiert. Auf Proteinebene wurden zwei Möglichkeiten der Reduktion von BTLA auf der Zelloberfläche untersucht. Eine Möglichkeit war die Internalisierung von BTLA nach Kontakt mit HVEM. Die Internalisierung nach Kontakt mit dem Interaktionspartner wurde schon für andere Moleküle, z. B. CD154, beschrieben (Yellin *et al.*, 1994). Das proteolytische Abschneiden des Moleküls bot eine weitere Möglichkeit, wie

Moleküle von der Zelloberfläche entfernt werden. Für ICOSL und LIGHT wurde gezeigt, dass dafür Matrix-Metalloproteasen von Bedeutung sind (Logue *et al.*, 2006; Morel *et al.*, 2000).

3.4.1.1 Keine Regulation auf RNA-Ebene

Zur Klärung ob die Herunterregulation von BTLA eine Folge der Reduktion von BTLA-mRNA war, wurde die RNA von B-Zellen nach Inkubation mit HVEM-Fusionsprotein bzw. Isotyp präpariert und mittels TaqMan-PCR die BTLA-mRNA quantifiziert (Kapitel 2.4.5). Diese Analyse ergab zum Zeitpunkt 5 h eine Abnahme der RNA durch Inkubation mit HVEM-Fusionsprotein im Vergleich zum Isotyp um den Faktor 4 (Abb. 30). Allerdings war die Anzahl der Kopien des Isotyps zum Zeitpunkt 5 h um den Faktor 2 höher als zu den anderen Zeitpunkten. Zu den anderen Zeitpunkten konnten keine Unterschiede beobachtet werden. Auf Grund dessen kann davon ausgegangen werden, dass die Herunterregulation von BTLA infolge der Interaktion mit HVEM wahrscheinlich nicht auf RNA-Ebene stattfand, zudem die BTLA-Expression auf Proteinebene zu allen Zeitpunkten nach Interaktion mit HVEM vermindert war (Kapitel 3.4). Dies sollte jedoch in einem zweiten Experiment überprüft werden.

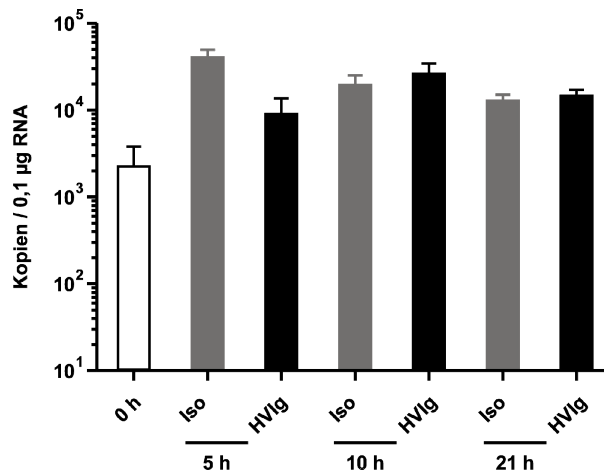


Abb. 30: TaqMan-PCR zur Quantifizierung der BTLA-Expression nach Interaktion mit HVEM.

Sortierte B-Zellen von wt Mäusen wurden für 5, 10 und 21 h in Zellkulturplatten mit immobilisiertem mHVEM-huIgG1 oder Kontrollprotein (Isotyp) bei 37 °C in Medium inkubiert (Kapitel 2.6.8). Anschließende Präparation der RNA aus jeweils ca. 10×10^6 B-Zellen (Kapitel 2.4.1.2). Die Proben wurden in der TaqMan-PCR in Duplikaten analysiert (Kapitel 2.4.5). Dargestellt ist die gemittelte Anzahl mit Standardabweichung (Fehlerbalken) der Kopien der BTLA-mRNA bezogen auf 0,1 µg Gesamt-RNA zu den angegebenen Zeitpunkten, ohne Inkubation (0 h ungefüllter Balken) oder nach Inkubation mit immobilisiertem mHVEM-huIgG1 (schwarze Balken) bzw. immobilisiertem Isotyp (graue Balken).

3.4.1.2 Mögliche Regulation auf Proteinebene

Die Internalisierung von BTLA nach Kontakt mit HVEM sollte durch die Färbung von BTLA auf der Zelloberfläche und der anschließenden intrazellulären Färbung von BTLA gezeigt werden (Kapitel 2.8.3). Zur Diskrimination der Oberflächenfärbung und der intrazellulären Färbung wurde der gleiche anti-BTLA mAk, gekoppelt an unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe, verwendet (Kapitel 2.8.3). Auf der Zelloberfläche war auch nach Fixierung der Zellen die verringerte BTLA-Expression zu erkennen (Abb. 31 A). Intrazellulär konnte keine Erhöhung von BTLA festgestellt werden. Das Signal von BTLA war nach der Inkubation mit dem Isotyp sogar stärker als nach der Inkubation mit HVEM-Fusionsprotein (Abb. 31 B, Vgl. MFI). Entweder wurde BTLA nicht internalisiert oder aber gleich in der Zelle degradiert bzw. so verändert, dass es nicht länger von dem mAk BTLA erkannt wurde.

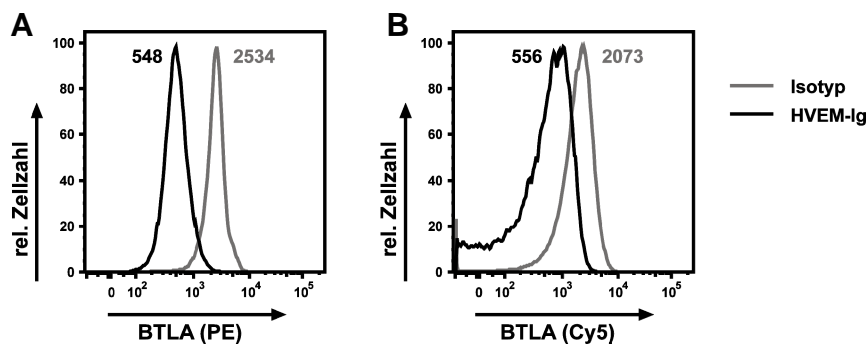


Abb. 31: Keine detektierbare Internalisierung von BTLA nach Interaktion mit HVEM.

Durchflusszytometrische Analyse der BTLA-Expression auf der Zelloberfläche und intrazellulär. Sortierte B-Zellen wurden wie in Abb. 29 beschrieben behandelt. Nach der Inkubation wurde BTLA auf der Zelloberfläche mit mBT-1622.6-PE gefärbt. Anschließende Fixierung der Zellen mit 2 % Formaldehyd und intrazelluläre Färbung von BTLA mit mBT-1622.6-Cy5 in Anwesenheit von Saponin. Darstellung der BTLA-Expression nach Inkubation mit immobilisiertem mHVEM-huIgG1 (schwarze Kurven) bzw. mit immobilisiertem Isotyp (graue Kurven) (A) auf der Zelloberfläche (Färbung durch mBT1622.6-PE) und (B) intrazellulär (Färbung durch mBT-1622.6-Cy5). Zur Quantifizierung der Signalstärke ist die zugehörigen MFI der BTLA-Färbungen in den entsprechenden Farben angegeben.

Die proteolytische Abspaltung von BTLA durch Matrix-Metalloproteasen wurde durch den Einsatz von Metalloproteaseinhibitoren GM6001 und MMPI IV untersucht (Kapitel 2.6.8.1). Als Positivkontrolle für die Wirksamkeit der Metalloproteaseinhibitoren wurde das ICOSL-Modell verwendet, in dem die Herunterregulation von ICOSL auf B-Zellen nach Stimulation mit PMA mit Hilfe von GM6001 verhindert wurde (Logue *et al.*, 2006). Es wurden Splenozyten für 5 h mit immobilisiertem HVEM-Fusionsprotein oder einem Kontrollprotein (Isotyp) in Anwesenheit oder Abwesenheit der Matrix-Metalloproteaseinhibitoren GM6001 und MMPI IV inkubiert. Für die Positivkontrolle wurden die Zellen mit PMA stimuliert oder unbehandelt in An- bzw. Abwesenheit der Inhibitoren kultiviert. Die Expression von BTLA

bzw. ICOSL auf den B-Zellen wurde in der Durchflusszytometrie untersucht (Kapitel 2.8.2). Durch die Zugabe von 30 bzw. 100 μ M GM6001 konnte die Herunterregulation von ICOSL durch die Aktivierung mit PMA teilweise inhibiert werden (Abb. 32 A). Die Zugabe von MMPI IV hatte keine Auswirkungen auf die Herunterregulation von ICOSL (Abb. 32 A). Die Verringerung der BTLA-Expression nach Kontakt mit HVEM-Fusionsprotein konnte weder durch den Metalloproteaseinhibitor GM6001 noch MMPI IV verhindert werden (Abb. 32 B). Die BTLA-Expression war nach Kontakt der Zellen mit HVEM-Fusionsprotein in An- oder Abwesenheit der Inhibitoren in gleichem Maß verringert im Vergleich zu der BTLA-Expression nach Kontakt mit dem Isotyp. Es konnte somit nicht geklärt werden auf welche Weise BTLA nach Kontakt mit HVEM von der Zelloberfläche verschwindet. Nur die Herunterregulation durch eine Verminderung der RNA konnte durch die quantitative PCR ausgeschlossen werden. Die Internalisierung oder das Abschneiden durch Proteasen von BTLA konnte nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, da im Fall der Internalisierung noch die Möglichkeit besteht, dass BTLA so verändert oder degradiert wurde, dass es durch den mAk nicht mehr erkannt wurde. Da die Metalloproteaseinhibitoren zwar ein breites Spektrum an Matrix-Metalloproteasen inhibieren, aber nicht alle, ist es nicht auszuschließen, dass BTLA doch von einer Protease abgeschnitten wird.

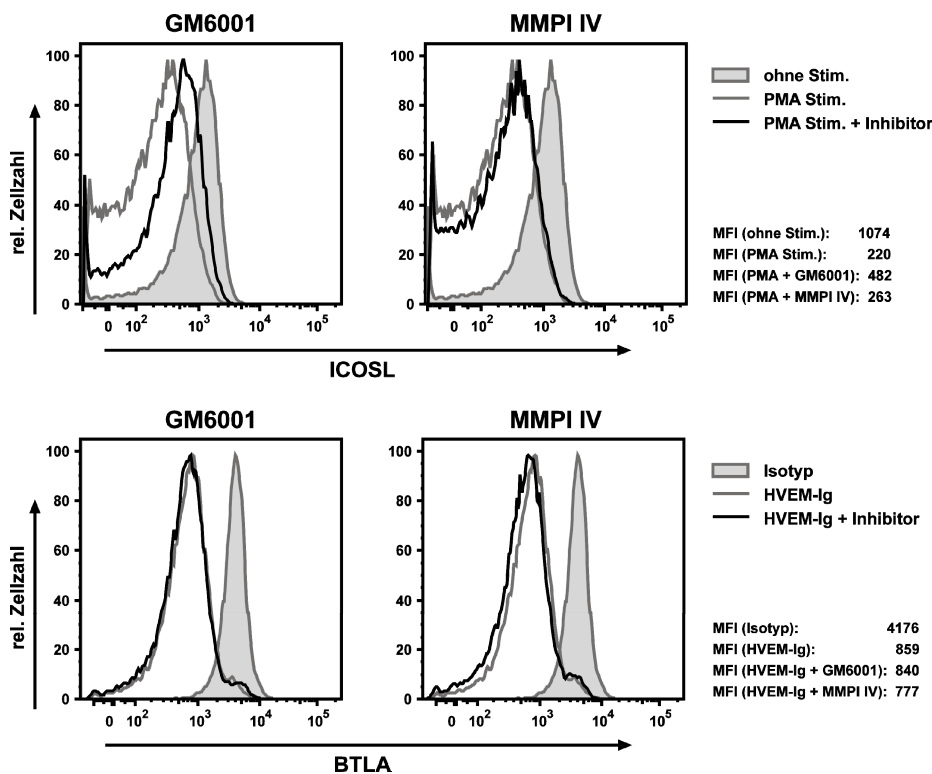


Abb. 32: Kein Einfluss der Metalloproteaseinhibitoren GM6001 und MMPI IV auf die BTLA-Herunterregulation nach HVEM-Interaktion.

Durchflusszytometrische Analyse der CD19⁺-B-Zell-Population in wt Splenozyten auf BTLA- und ICOS-L-Expression (Positivkontrolle) in An- oder Abwesenheit von Metalloproteaseinhibitoren, nach einer Inkubationszeit von 5 h (Kapitel 2.6.8.1). (A) ICOS-L-Expression auf B-Zellen ohne Stimulation (gefüllte Kurve), mit Stimulation durch 250 ng/ml PMA in Abwesenheit eines Inhibitors (graue Kurve, PMA-Stim.), mit PMA-Stimulation in Anwesenheit von 100 μ M GM6001 (linkes Histogramm, schwarze Kurve) oder in Anwesenheit von 100 μ M MMPI IV (rechtes Histogramm, schwarze Kurve); (B) BTLA-Expression auf B-Zellen nach Inkubation mit immobilisiertem Isotyp (gefüllte Kurve), mit immobilisiertem mHVEM-huIgG1 (HVEM-Ig) in Abwesenheit eines Inhibitors (graue Kurve), mit immobilisiertem mHVEM-huIgG1 in Anwesenheit von 100 μ M GM6001 (linkes Histogramm, schwarze Kurve) oder in Anwesenheit von 100 μ M MMPI IV (rechtes Histogramm, schwarze Kurve). Zur Quantifizierung der Signalstärke der Färbungen sind die zugehörigen MFIs neben den Histogrammen dargestellt

4 Diskussion

4.1 Expression von HVEM

Zur ersten Expressionsanalyse von HVEM wurden die selbst-generierten mAk gegen HVEM in der Immunhistochemie (IHC) eingesetzt, um viele verschiedene Gewebe parallel zu analysieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals die breite Verteilung der HVEM-Expression auf Proteinebene sowohl in lymphatischen als auch peripheren Geweben immunhistochemisch nachgewiesen. Neben der starken Expression von HVEM in der Milz fiel besonders die prominente HVEM-Expression in Lunge und Darm auf (Abb. 14). Auf RNA-Ebene, nicht jedoch auf Proteinebene, wurde bereits vor über 10 Jahren die Expression von HVEM in verschiedenen Organen in der Literatur gezeigt (Kwon *et al.*, 1997; Marsters *et al.*, 1997; Hsu *et al.*, 1997). Auch da fielen neben der Milz schon Lunge und Darm auf. Lunge und Darm nehmen im Körper eine besondere Stellung ein, da der Körper hier mit vielen Umweltantigenen, die zum einen harmlos sind, zum anderen aber auch gefährlich sein können, in Kontakt kommt. Möglicherweise spielt HVEM gerade dort eine zentrale Rolle, um die Aktivierung von Zellen, trotz ständigen Antigenkontakts zu unterdrücken. Diese Theorie wird gestützt durch eine Publikation aus dem Jahr 2008, die zeigt, dass HVEM eine Rolle in der Unterdrückung von Inflammationen im Darm spielt. Es wurde gezeigt, dass hierfür nicht die Leukozyten im Darm, sondern andere nicht näher definierte Zellen, verantwortlich sind. Zudem wurde die Expression von HVEM auf Intestinal-Epithelzellen nachgewiesen (Steinberg *et al.*, 2008).

In der IHC zeigte sich auch, dass sowohl Epithelzellen als auch Endothelzellen HVEM exprimieren. Die Expression von HVEM auf Endothelzellen wurde in der Literatur für humane Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC) beschrieben (Chang *et al.*, 2005).

Die HVEM-Expression in den lymphatischen Organen, die hier mittels IHC beobachtet wurde, zeigte die Expression von HVEM auf Leukozyten, aber auch auf weiteren nicht näher charakterisierten Zellen. In der Durchflusszytometrie wurde zum einen die Expression von HVEM auf nicht-Leukozyten (CD45⁻-Zellen) der Lunge und bestätigt, zum anderen wurden die HVEM-exprimierenden Leukozytenpopulationen näher charakterisiert. So konnte die HVEM-Expression auf T-Zellen, B-Zellen, Dendritischen Zellen, Granulozyten sowie NK- und NKT-Zellen gezeigt werden (Abb. 19). Bei der Analyse zeigte sich, dass diese Zellen HVEM in zwei verschiedenen Expressionsniveaus aufweisen. So zeigten T-Zellen eine deutlich höhere HVEM-Expression als B-Zellen. Auch die CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen, sowie

die Subpopulationen der Dendritischen Zellen unterschieden sich in ihrem Expressionsniveau. So exprimierten, sowohl bei den T-Zell-Subpopulationen als auch bei Subpopulationen der Dendritischen Zellen, die CD8⁺-Zellen HVEM stärker. Während meiner Doktorarbeit wurden Arbeiten veröffentlicht, die die Expression von HVEM auf allen Leukozyten sowie Unterschiede in den Expressionsniveaus zeigten (Wang *et al.*, 2005; De Trez *et al.*, 2008), allerdings wurde hier nur die höhere HVEM-Expression der gesamten T-Zell-Population im Vergleich zu den B-Zellen und die Unterschiede der CD8⁺- zu den CD4⁺-Dendritischen Zellen beschrieben. In Übereinstimmung mit den hier erzielten Daten wurde in diesen beiden Publikationen gezeigt, dass die T-Zellen HVEM stärker exprimieren als die B-Zellen und dass innerhalb der Dendritischen Zellpopulation die CD8⁺-Dendritischen Zellen ein höheres HVEM-Expressionsniveau aufweisen als die CD4⁺-Dendritischen Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression auf CD11b⁺-Dendritischen Zellen, die die CD4⁺-Dendritischen Zellen beinhalten (~ 70 % der CD11b⁺), gezeigt. Die Expressionsniveaus von HVEM auf den NK-Zellpopulationen und den Granulozyten wurden in der Literatur nicht im Einzelnen erfasst. Erstmals wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von HVEM auf Erythrozyten gezeigt (Abb. 16). Erythrozyten exprimieren vor allem Zelladhäsionsmoleküle die der Familie der Integrine aber auch der IgSF, wie z.B. ICAM-4, CD47 und LFA-3, angehören (Cartron und Elion, 2008). Zelladhäsionsmoleküle spielen eine wichtige Rolle im Zell-Zell-Kontakt, wodurch die Erkennung von Zielstrukturen (Rezeptor-Ligand-Bindung) bzw. generell die Kommunikation zwischen Zellen begünstigt wird (Springer, 1990; Aricescu und Jones, 2007). So verhindert z.B. CD47 auf den Erythrozyten durch die Interaktion mit SIRP- α auf Makrophagen die Beseitigung der Erythrozyten durch die Makrophagen (Oldenborg *et al.*, 2000; Barros *et al.*, 2009). Durch die Bindung von Integrinen können Erythrozyten auch mit Leukozyten und anderen Zellen interagieren. Möglicherweise spielt auch HVEM hier eine Rolle.

4.2 Reziproke Modulation von HVEM und BTLA

Mittels der IHC konnte bereits durch die Untersuchung von Gewebeschnitten der Milz und des Darmes beobachtet werden, dass HVEM und BTLA entgegengesetzt exprimiert wurden (Abb. 15). So zeigten Areale in der Milz zum Beispiel das T-Zell-Areal eine starke Expression von HVEM, wohingegen BTLA in diesem Bereich eher schwach exprimiert war. In der B-Zell-Zone verhielt sich HVEM- und BTLA-Expression umgekehrt zu der Expression in der T-Zell-Zone, in der Weise, dass eine hohe BTLA- und eine schwache HVEM-Expression zu erkennen war. Im Darm konnte keine BTLA-Expression nachgewiesen werden,

jedoch eine sehr prominente HVEM-Expression (Kapitel 3.2.1.1). In der Literatur und in unserem Labor (von S. Gurka) wurde gezeigt, dass die BTLA-Expression auf lymphatische Gewebe beschränkt ist (Watanabe *et al.*, 2003). Eine BTLA-Expression kann in peripheren Organen, wie z.B. Lunge, nur auf eingewanderten Lymphozyten, aufgrund einer Infektion oder Inflammation, detektiert werden. Aufgrund der Restriktion von BTLA auf lymphatische Gewebe bzw. auf Leukozyten wurde die Expression von HVEM und BTLA in der Durchflusszytometrie auf verschiedenen Zellpopulationen der Leukozyten verglichen. Die erste Beobachtung war, dass sowohl HVEM, wie bereits erwähnt, als auch BTLA in zwei Expressionsniveaus vorkommen. Beide werden entweder stark oder schwach exprimiert. Des Weiteren zeigte sich, dass ein Zelltyp, der HVEM auf einem hohen Niveau exprimiert, z.B. T-Zellen, BTLA auf einem niedrigen Niveau exprimiert. B-Zellen dagegen exprimieren HVEM nur schwach, dafür aber BTLA auch einem hohen Niveau. Die einzige bisher gezeigte Ausnahme bilden die Subpopulationen der Dendritischen Zellen, die auf den CD8⁺-Dendritischen Zellen sowohl HVEM als auch BTLA auf einem hohen Niveau exprimieren wohingegen die CD11⁺-Dendritischen Zellen beide Moleküle in ihrem niedrigen Niveau exprimieren (Kapitel 3.2.2). Diese Beobachtungen stimmen mit den in der Literatur gezeigten unterschiedlichen Expression von BTLA auf T-Zellen (CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen), B-Zellen und den Subpopulationen der Dendritischen Zellen überein (Han *et al.*, 2004). Die HVEM-Expression auf T-Zellen, B-Zellen und den Subpopulationen der Dendritischen Zellen wurde ebenfalls beschrieben, allerdings wurde nie ein direkter Vergleich der Expressionen von HVEM und BTLA, wie in dieser Arbeit, angestellt. Diese beobachtete, entgegengesetzte Expression von HVEM und BTLA auf dem gleichen Zelltyp, legte die Vermutung nahe, dass sich die beiden Moleküle in ihrer Expression gegenseitig beeinflussen. Aus diesem Grund wurden im Folgenden weitere Experimente durchgeführt, um diese Vermutung zu validieren. Für andere Mitglieder der TNF/TNFR-Superfamilie waren schon einige Beispiele für eine reziproke Regulation des Liganden und seines Rezeptors bekannt. So wurde für HVEM und LIGHT eine reziproke Expression auf aktivierten T-Zellen beschrieben (Morel *et al.*, 2000). Auch CD70 und sein Rezeptor CD27 wurden auf aktivierten T-Zellen und NK-Zellen gegensätzlich exprimiert, jedoch gab es hier keine Zellen die sowohl für CD70 als auch CD27 positiv waren, d.h. die Zellen exprimierten CD27, wenn sie jedoch anfangen CD70 zu exprimieren, konnte CD27 nicht mehr detektiert werden (Orengo *et al.*, 1997).

In einem ersten Ansatz sollte gezeigt werden, wie sich die Abwesenheit eines Moleküls bzw. die Überexpression eines Moleküls sich auf die Expression des Partnermoleküls auswirkt. Dies wurde in dieser Arbeit zum einen durch genetisch veränderte Mäuse, zum anderen durch

die Generierung von Transfektanten untersucht. Es zeigte sich, dass die Abwesenheit von BTLA zu einer verstärkten Expression von HVEM auf den T-Zellen ($CD4^+$ und $CD8^+$) und B-Zellen führte. Die Abwesenheit von HVEM wiederum führte zur erhöhten Expression von BTLA auf T-Zellen und B-Zellen (Abb. 22). Dagegen hatte die Überexpression von HVEM in der Zelllinie eine reduzierte BTLA-Expression zur Folge. Entsprechend führte die Überexpression von BTLA in den BTLA-transgenen Mäusen, aber auch in der Zelllinie durch Transfektion, zur verminderten Expression von HVEM. Die BTLA-transgenen Mäuse zeigten diese verminderte HVEM-Expression jedoch nur auf den T-Zellen ($CD4^+$ und $CD8^+$). Zur Generierung dieser Mäuse wurde das *btlA* Gen in das humane CD2-Minigen kloniert, das 3'-flankierende T-Zell-spezifische DNaseI-hypersensitive Stellen besitzt, wodurch BTLA ausschließlich auf T-Zellen überexprimiert wird (Greaves *et al.*, 1989). Da die HVEM-Expression nur auf diesen Zellen verändert wurde, kann dies entweder auf die genetische Veränderung dieser Mäuse oder durch den Kontakt von T-Zellen mit T-Zellen hervorgerufen worden sein. Auch bei den HVEM- bzw. BTLA-defizienten Mäusen ist unklar, ob die Hochregulation von BTLA bzw. HVEM durch die genetische Veränderung, also Zellintrinsisch, oder durch die Interaktion mit anderen defizienten Zellen erfolgte. Die Transfektion der Zelllinien konnte diesbezüglich auch keine Hinweise liefern, da auch hier ein Zell-Zell-Kontakt nicht ausgeschlossen werden konnte. Sedy *et al.* zeigten zu einem früheren Zeitpunkt eine erhöhte HVEM-Expression in BTLA-defizienten Mäusen mittels eines BTLA-Fusionsproteins, und stellten die Vermutung an, dass HVEM durch die Interaktion mit BTLA reguliert wird. Dieser Vermutung wurde jedoch nicht weiter nachgegangen (Sedy *et al.*, 2005). Um die Frage der gegenseitigen Regulation in dieser Arbeit weiter zu untersuchen, wurden wt Splenozyten in wt Mäuse sowie in genetisch veränderte Mäuse (HVEM-, BTLA-defizient und BTLA-transgen) transferiert. Durch den Transfer von wt Zellen wurde ausgeschlossen, dass eine mögliche Veränderung der HVEM- bzw. BTLA-Expression auf einen Zellintrinsischen Effekt aufgrund der genetischen Veränderung zurückzuführen ist. Der Transfer der wt Zellen zeigte, dass die Expression von HVEM und BTLA durch die umgebenden Zellen verändert wurde, und zwar so, dass sie der Umgebung angepasst wurde. So konnte in HVEM-defizienten Mäusen eine erhöhte Expression von BTLA sowohl auf den transferierten T-Zellen als auch auf den B-Zellen beobachtet werden. Dies spricht für die Theorie, dass BTLA durch die Interaktion mit HVEM reguliert wird. Aber auch die HVEM-Expression der transferierten Zellen wurde verändert. Nach 14 Tagen konnte keine HVEM-Expression auf den transferierten Zellen (T- und B-Zellen) detektiert werden (Abb. 24). Die Erhöhung der BTLA-Expression in der Umgebung durch den Transfer in BTLA-transgene

Mäuse hatte eine Reduktion der HVEM-Expression zur Folge, allerdings ausschließlich auf den transferierten T-Zellen, ähnlich wie es in den Rezipienten selbst zu beobachten war. Für die vollständige Herunterregulation von HVEM auf den transferierten Zellen in den HVEM-defizienten Mäusen und die Herunterregulation von HVEM ausschließlich auf den transferierten T-Zellen in den BTLA-transgenen Mäusen konnte keine eindeutige Erklärung gegeben werden. Im Folgenden sollen mögliche Ursachen für die beobachteten Phänomene diskutiert werden. In den HVEM-defizienten Mäusen war die Expression von BTLA auf allen Zellen erhöht. Möglicherweise führte der vermehrte Kontakt der transferierten Zellen mit einem erhöhten BTLA-Niveau zu dieser dramatischen Herunterregulation von HVEM. Allerdings ist die BTLA-Expression in BTLA-transgenen Mäusen zumindest auf den T-Zellen deutlich höher (Abb. 25) und in diesen Mäusen wurde HVEM nicht vollständig herunterreguliert. Möglicherweise spielt es jedoch eine Rolle, ob alle Zellen der Umgebung kein HVEM, dafür etwas mehr BTLA exprimieren, oder die Zellen besitzen noch andere Möglichkeiten oder Faktoren, um sich an ihre Umgebung anzupassen. Möglich wäre auch, dass die Zelle über ihr BTLA „registriert“, dass kein HVEM vorhanden ist und sich dementsprechend anpasst. Die Interaktion mit LIGHT kann hier wahrscheinlich ausgeschlossen werden, da LIGHT erst nach Aktivierung von Zellen exprimiert wird. Die Anpassung der HVEM-Expression nur auf den transferierten T-Zellen in den BTLA-transgenen Mäusen, scheint für eine T-Zell-T-Zell-Interaktion zu sprechen, da z.B. die transferierten B-Zellen unverändert blieben. Dabei stellt sich jedoch die Frage, ob die B-Zellen räumlich nicht die Möglichkeit hatten mit den transgenen T-Zellen zu interagieren, oder die Zeit zu kurz war, bevor sie ihren Weg in die B-Zell-Zone der Milz gefunden hatten, um ihr HVEM-Expressionsniveau anzupassen. Eventuell wurde das HVEM-Niveau durch den vermehrten Kontakt mit B-Zellen auch wieder an die Umgebung in der B-Zell-Zone angepasst. Obwohl nicht alle Fragen beantwortet werden konnten, konnte durch die HVEM- bzw. BTLA-Defizienz und der daraus resultierenden Erhöhung der Expression des Interaktionspartners dennoch gezeigt werden, dass die HVEM- und BTLA-Expression durch die Interaktion mit dem Partnermolekül auf anderen Zellen reguliert wird. Auch der adoptive Transfer in BTLA-transgene Mäuse zeigte deutlich, dass HVEM durch den Kontakt mit BTLA reguliert wird.

Da HVEM und BTLA nicht nur im Ruhezustand von Zellen, sondern auch nach Aktivierung exprimiert werden, wurde zum einen die Regulation der HVEM- und BTLA-Expression während der Aktivierung untersucht. Zum anderen wurde überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen der HVEM- und BTLA-Expression während der Aktivierung besteht, wie es im

Ruhezustand der Zellen der Fall ist. In der Literatur wurde zumindest *in vitro* gezeigt, dass im Verlauf der Aktivierung HVEM herunterreguliert wird und die BTLA-Expression zunimmt (Han *et al.*, 2004; Sedy *et al.*, 2005). Im Fall der Expression von HVEM und LIGHT wurde in der Literatur bereits eine reziproke Expression auf aktivierten T-Zellen beschrieben. In dieser Publikation wurde durch die Verwendung eines neutralisierenden anti-LIGHT mAk oder eines HVEM-Fusionsproteins gezeigt, dass die Herunterregulation von HVEM während der T-Zell-Aktivierung durch die Zunahme der Expression von LIGHT bedingt wird (Morel *et al.*, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde in Übereinstimmung mit der Literatur gezeigt, dass die Regulation von HVEM und BTLA auf T-Zellen während der Aktivierung *in vitro* entgegengesetzt verläuft (Abb. 26). Es wurde außerdem gezeigt, dass die Hochregulation von BTLA und die Herunterregulation von HVEM auch auf T-Zellen, die in einem adaptiven Transferexperiment *in vivo* aktiviert wurden, zu beobachten ist (Abb. 27). Im Gegensatz zu der Publikation von Morel *et al.* konnte für die entgegengesetzte Regulation von HVEM und BTLA keine gegenseitige Abhängigkeit beobachtet werden, da die Herunterregulation von HVEM auf aktivierten T-Zellen sowohl von BTLA-defizienten als auch BTLA-transgenen Mäusen stattfand. Im Vergleich zu den wt T-Zellen war nur das Ausgangsniveau der HVEM-Expression verändert, entsprechend den zuvor gezeigten Daten der genetisch veränderten Mäuse. Dieser Unterschied blieb während der Aktivierung erhalten (Abb. 28). Auch die Hochregulation von BTLA konnte sowohl auf T-Zellen von HVEM-defizienten Mäusen als auch BTLA-transgenen Mäusen beobachtet werden. Auch hier blieb der Unterschied in den Expressionsniveaus der genetisch veränderten Mäuse zu den wt Mäusen erhalten (Abb. 28). Hierdurch konnte eine wichtige Aussage getroffen werden. So beeinflussen sich HVEM und BTLA während der T-Zell-Aktivierung hinsichtlich ihrer Regulation nicht gegenseitig, jedoch im Ruhezustand zeigen sie eine gegenseitige Abhängigkeit in der Regulation ihrer Expression.

Es ist durchaus denkbar, dass die Regulation von HVEM und BTLA ein Teil des T-Zell-Aktivierungsprogramms ist. In der Publikation von Morel *et al.* wurde der Einfluss von LIGHT, das während der Aktivierung von T-Zellen exprimiert wird, auf die HVEM-Expression im Verlauf der Aktivierung diskutiert (Morel *et al.*, 2000). Jedoch ist auch in dieser Publikation nicht auszuschließen, dass die Regulation von HVEM, Teil des T-Zell-Aktivierungsprogramms ist, da hier die Interaktion von LIGHT mit HVEM durch das HVEM-Fusionsprotein blockiert wurde. Zu dieser Zeit war noch nicht bekannt, dass HVEM auch an BTLA bindet und dadurch die T-Zell-Aktivierung verhindert. Demzufolge könnte das HVEM-Fusionsprotein die T-Zell-Aktivierung verhindert haben und somit auch die

Herunterregulation von HVEM, da nicht gezeigt wurde, dass die T-Zellen trotz des HVEM-Fusionsproteins noch aktiviert wurden. Die Verwendung des blockierenden anti-LIGHT mAk ist möglicherweise ein Hinweis für die Abhängigkeit der HVEM-Expression von LIGHT. Der mAk könnte jedoch auch für ein fehlendes positives Signal von LIGHT über HVEM verantwortlich sein. In LIGHT-transgenen Mäusen wurde zudem gezeigt, dass die Überexpression von LIGHT auf T-Zellen keinen Einfluss auf die HVEM-Expression hatte (Shaikh *et al.*, 2001). Die Frage, ob HVEM während der T-Zell-Aktivierung durch LIGHT reguliert wird, kann nur über die die Aktivierung von T-Zellen von LIGHT-defizienten Mäusen und der Analyse der HVEM-Expression geklärt werden.

4.3 HVEM-abhängige Herunterregulation von BTLA mit ungeklärtem Mechanismus

Die Inkubation von BTLA-exprimierenden B-Zellen mit immobilisiertem HVEM-Fusionsprotein zeigte die Beteiligung des Liganden an der Herunterregulation von BTLA (Kapitel 3.4; Abb. 29). Des Weiteren sollte der Mechanismus der Herunterregulation von BTLA nach der Interaktion mit HVEM gezeigt werden. In der Literatur wurde für CD70/CD27 eine Regulation der Expression auf RNA-Ebene beschrieben. Für weitere Mitglieder der TNF/TNFR-Superfamilie wurde gezeigt, dass die Moleküle durch Internalisierung oder proteolytische Abspaltung von der Zelloberfläche verschwinden (Dello und Rovida, 2002). Die Herunterregulation von CD40L durch Interaktion mit CD40 scheint einerseits über die proteolytische Abspaltung der Ektodomäne von CD40L zu erfolgen (Graf *et al.*, 1995), andererseits spielt scheinbar auch die Internalisierung von CD40L eine Rolle (Yellin *et al.*, 1994). Im Fall von ICOS-Ligand (ICOS-L), einem Mitglied der B7-Familie, wurde gezeigt, dass die Herunterregulation nach Aktivierung mit PMA bzw. nach Kontakt mit aktivierten ICOS-tragenden T-Zellen unter der Beteiligung einer membrangebundenen Matrix-Metalloprotease erfolgt (Logue *et al.*, 2006). Auch die Regulation von LIGHT und CD62L erfolgte unter Beteiligung einer Matrix-Metalloprotease (Morel *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit konnte mittels quantitativer *real-time* PCR gezeigt werden, dass im Fall von BTLA die Regulation durch die Interaktion mit HVEM vermutlich nicht auf RNA-Ebene erfolgte (Abb. 30). Dieses Experiment sollte jedoch zur Verifizierung wiederholt werden. Auf Proteinebene wurde sowohl die Internalisierung durch eine intrazelluläre Färbung von BTLA als auch die proteolytische Abspaltung von BTLA durch eine Matrix-Metalloprotease überprüft. Es konnte keine Internalisierung von BTLA nach Kontakt mit HVEM nachgewiesen werden. Es wäre jedoch möglich, dass BTLA infolge der

Internalisierung durch lysosomale Proteasen degradiert wurde oder zumindest so verändert wurde, dass es durch den anti-BTLA mAk nicht länger erkannt wurde (Carpenter und Cohen, 1976). Eine Möglichkeit die Internalisierung als Mechanismus für die Herunterregulation von BTLA tatsächlich auszuschließen, wäre der Einsatz von Cytochalasin B (Stoffwechselprodukt von Pilzen) oder Latrunculin B (Toxin gebildet von Schwämmen), die an Actinfilamente binden und auf diese Weise die Actin-Polymerisation und -Elongation verhindern, infolgedessen das Zytoskelett der Zelle blockiert und Endozytose nicht möglich ist (Yellin *et al.*, 1994). Der Einsatz dieser beiden Substanzen sollte die Herunterregulation von BTLA nach HVEM-Bindung nicht beeinflussen, falls BTLA nicht internalisiert wird.

Die proteolytische Abspaltung von BTLA wurde durch die Verwendung zweier verschiedener Matrix-Metalloproteaseinhibitoren GM6001 und MMPI IV untersucht. Diese beiden Inhibitoren wurden zum einen gewählt, da sie ein breites Spektrum der Matrix-Metalloproteasen inhibieren. GM6001 wurde außerdem in der Literatur als Inhibitor für die Herunterregulation von ICOS-L beschrieben (Logue *et al.*, 2006). Beide Inhibitoren verhinderten nicht die Herunterregulation von BTLA infolge der HVEM-Interaktion. Dies kann mehrere Gründe haben. Entweder ist das Abspalten der Ektodomäne von BTLA nicht der Grund für die Herunterregulation, oder die Abspaltung erfolgt durch eine Matrix-Metalloprotease, die trotz der breiten Wirkung der Inhibitoren nicht inhibiert wurde. Möglicherweise erfolgte die Abspaltung der Ektodomäne auch durch eine Metalloprotease, die nicht der Familie der Matrix-Metalloproteasen angehört. In der Literatur wurden weitere Metalloproteasen beschrieben, die für das Abschneiden von Proteinen auf der Zelloberfläche verantwortlich sind und nicht zu den Matrix-Metalloproteasen zählen. So z.B. ist für die proteolytische Abspaltung der Ektodomäne von TNF α -R I und CD30 die Metalloprotease ADAM17/TACE (*a disintegrin and metalloprotease/TNF- α converting enzyme*) verantwortlich (Dri *et al.*, 2000; Hansen *et al.*, 2004). Es konnte somit nicht geklärt werden, ob BTLA nach Kontakt mit HVEM durch Internalisierung oder Proteolyse von der Zelloberfläche verschwindet. Hierfür sind noch weitere Experimente nötig. Eventuell bietet der Einsatz von EDTA die Möglichkeit, die Metalloproteasen durch die Chelatkomplexbildung mit dem Zinkion generell zu inhibieren.

4.4 Bedeutung der HVEM/BTLA- Modulation für das Immunsystem

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine breite Verteilung der HVEM-Expression auf Leukozyten als auch auf nicht-Leukozyten in lymphatischen und peripheren Geweben,

insbesondere Lunge und Darm gezeigt. Auch BTLA wird konstitutiv auf einer Vielzahl von Leukozyten exprimiert. Diese breite und insbesondere die konstitutive Expression stellt eine Besonderheit des HVEM-BTLA-Systems dar. In anderen Ligand-Rezeptor-Paaren ist häufig nur ein Molekül konstitutiv auf hohem Niveau exprimiert, wie z.B. CD28 (Gross *et al.*, 1992), dessen Liganden CD80/CD86 im Verlauf der Aktivierung exprimiert bzw. hochreguliert werden. Darüber hinaus wurde die reziproke Abhängigkeit bzw. Modulation der HVEM- und BTLA-Expression im Ruhezustand der Zellen gezeigt. Es scheint sich im Ruhezustand der Zelle eine Balance zwischen HVEM und BTLA auszubilden, wie es mit dem Transfer von wt Zellen in genetisch veränderte Mäuse gezeigt wurde (Abb. 22). In der Literatur wurde beschrieben, dass naive T-Zellen eigentlich nicht inaktiv sind, sondern sich durch die schwache Erkennung von Selbstantigenen in Zusammenhang mit MHC-Molekülen in einem sensitivierten Status befinden (Stefanova *et al.*, 2002). Möglicherweise trägt die Balance der HVEM- und BTLA-Expression und ihre ständige Wechselwirkung dazu bei, dass die Zellen in diesem Zustand der „Anaktivierung“ bleiben, da über BTLA negative Signale in die Zelle transduziert werden können. Die Aktivierung der Zellen führt dann zur Veränderung des Gleichgewichts zwischen HVEM und BTLA, hinzukommt die Expression von LIGHT und CD160 auf aktivierten T-Zellen und NK-Zellen, sodass sich für HVEM neue Interaktionsmöglichkeiten bieten. Durch die Bindung von LIGHT wurde gezeigt, dass HVEM ein positives Signal in die T-Zelle überträgt (Tamada *et al.*, 2000). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch LIGHT durch die Interaktion mit HVEM ein Signal in die Zelle transduziert. Dass LIGHT dazu in der Lage ist, wurde in der Literatur bereits gezeigt, so übermittelte LIGHT durch die Bindung von DcR3 ein positives Signal in die Zelle (Wan *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2002). Erst kürzlich wurde in der Literatur beschrieben, dass die Bindung von HVEM an CD160, ähnlich der Bindung an BTLA, ein negatives Signal in die T-Zelle transduziert (Cai *et al.*, 2008), wodurch die Komplexität der Interaktionsmöglichkeiten zunimmt. CD160 wird auf aktivierten CD8⁺-T-Zellen, NKT-Zellen und NK-Zellen exprimiert (Maeda *et al.*, 2005; Tsujimura *et al.*, 2006). Auf NK- und NKT-Zellen wird konstitutiv auch HVEM exprimiert, dagegen ist BTLA auf NK-Zellen kaum detektierbar. Eventuell bietet CD160 hier eine Möglichkeit zur Regulation der NK-Zell-Aktivierung (Giustiniani *et al.*, 2009). Jedoch muss die Expression nach Aktivierung noch analysiert werden.

BTLA und HVEM werden wie in dieser Arbeit und in der Literatur beschrieben auch auf Antigenpräsentierenden Zellen wie B-Zellen und Dendritische Zellen exprimiert. Die Funktion von BTLA und HVEM auf diesen Zellen ist bisher kaum untersucht worden, daher

ist die Rolle dieses Interaktionssystems BTLA-HVEM-LIGHT-CD160 insbesondere für nicht-T-Zellen noch nicht geklärt. In dieser Arbeit wurde lediglich die HVEM-abhängige Herunterregulation von BTLA auf unstimulierten B-Zellen gezeigt. Auch konnte gezeigt werden, dass B-Zellen in Folge einer Stimulation mit PMA/Ionomycin ihre BTLA-Expression verringern und HVEM dagegen stärker exprimieren (Daten nicht gezeigt). Auch hier wurde eine entgegengesetzte Regulation von HVEM und BTLA beobachtet. Zudem verhalten sich die B-Zellen entgegengesetzt zu den T-Zellen, die nach Aktivierung ihre BTLA-Expression hochregulieren und HVEM auf der Zelloberfläche reduzieren.

Die Bedeutung der Modulation von HVEM und BTLA wurde zumindest für die Regulation der T-Zell-Aktivierung in unserer Arbeitsgruppe durch S. Gurka gezeigt. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der BTLA-Expression auf T-Zellen und der negativen Wirkung von HVEM über BTLA. In umgekehrter Weise konnte gezeigt werden, dass die inhibitorische Wirkung durch die Menge von HVEM beeinflusst wird. Dies konnte *in vivo* durch einen adoptiven Transfer von OVA-TZR transgenen T-Zellen in wt, heterozygote und homozygote HVEM-defiziente Mäusen bestätigt werden.

Ein weiterer Diskussionspunkt ist der immunologisch unauffällige Phänotyp der HVEM- und BTLA-defizienten Mäuse, trotz der massiven konstitutiven Expression von HVEM und BTLA in wt Mäusen. Es zeigt sich kein spontanes Auftreten von Autoimmunität in den BTLA- bzw. HVEM-defizienten Mäusen. Es konnte lediglich eine diskret erhöhte Anfälligkeit der BTLA-defizienten Mäuse für die Peptid-induzierte experimentelle allergische Enzephalomyelitis (EAE), als auch eine länger anhaltende allergische Atemwegsinflammation beobachtet werden (Watanabe *et al.*, 2003; Sedy *et al.*, 2005; Deppong *et al.*, 2006). Die HVEM-defizienten Mäuse zeigen auch nur geringe Effekte bei Peptid-induzierter EAE oder Concanavalin A vermittelter T-Zell-abhängiger Autoimmunhepatitis (Wang *et al.*, 2005). Am auffälligsten war die erhöhte Sensitivität der HVEM-defizienten Mäuse gegenüber einer Zell-Transfer-induzierten Colitis (Steinberg *et al.*, 2008). HVEM scheint im Darm von Bedeutung zu sein, da LIGHT-transgene Mäuse autoreaktiv sind und besonders Inflammationen im Darm entwickeln. Im Darm wird HVEM, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, stark exprimiert. Durch die konstitutive Expression von LIGHT auf T-Zellen, das normalerweise erst nach Aktivierung exprimiert wird, werden permanent positive Signale in die Zellen transduziert und so die Aktivierung der T-Zellen verstärkt (Shaikh *et al.*, 2001).

BTLA und HVEM scheinen jedoch nicht ausschließlich in der Aktivierung von Zellen eine Rolle zu spielen, so wurde BTLA bei der positiven Selektion im Thymus gefunden (Han *et al.*, 2004). Es wurde auch eine Beteiligung an der Homöostase von Dendritischen Zellen

(De Trez *et al.*, 2008) und CD8⁺-T-Zellen (Krieg *et al.*, 2007) gezeigt. Grundsätzlich bietet die in der vorliegenden Arbeit gezeigte breite Expression von BTLA und insbesondere HVEM, das auf diversen Zelltypen exprimiert wird, sowie die gegenseitige Modulation die Möglichkeit viele verschiedene Zellen zu regulieren und auf die Homöostase von Zellen einzuwirken.

Um das BTLA-HVEM-LIGHT-CD160-Interaktionssystem zu verstehen und mögliche Schlüsse zu dessen Bedeutung zu ziehen, ist es notwendig, die Kinetik der Expression der einzelnen Moleküle parallel während einer Immunantwort nicht nur auf den T-Zellen sondern auch anderen Zellpopulationen zu analysieren. Hierfür werden entsprechende Reagenzien benötigt, unter anderem sind Antikörper gegen LIGHT und CD160 sowie entsprechende Testsysteme für diese Antikörper notwendig, die derzeit nur bedingt zur Verfügung stehen.

Welche Bedeutung die konstitutive Expression von HVEM und BTLA, wie z.B. die hohe BTLA-Expression auf B-Zellen und die hohe Expression beider Moleküle auf CD8⁺ Dendritischen Zellen hat, ist letztendlich noch unklar. Die auffallende Expression von HVEM in Lunge und Darm sowie erste Untersuchungen im Colitismodell bieten jedoch einen Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen.

Durch die in dieser Arbeit generierten blockierenden anti-HVEM mAk könnten auch funktionelle Untersuchungen angestellt werden, in dem man *in vitro* und eventuell auch *in vivo* die Interaktion von BTLA und HVEM verhindert. Allerdings müssten die mAk noch auf ihre Blockade der CD160- bzw. LIGHT-Bindung getestet werden, um sicherzustellen, dass man nur die BTLA-HVEM-Interaktion oder bewusst alle drei Interaktionen verhindert, sofern das möglich ist. Grundsätzlich bieten sich für solche Untersuchungen eher blockierende anti-BTLA mAk an.

Die komplexe Situation, die sich durch die verschiedenen Interaktionsmöglichkeiten und der daraus resultierenden unterschiedlichen Signale, sowie durch die teilweise konstitutive aber auch zeitlich bzw. aktivierungsabhängige Expression der einzelnen Moleküle in dem HVEM-BTLA-LIGHT-CD160-Interaktionssystem ergibt, erfordert noch weitere Untersuchungen, um dieses Netzwerk von Interaktionen und seine Funktion besser zu verstehen.

5 Zusammenfassung/Summary

5.1 Zusammenfassung

Für die Aufrechterhaltung der Balance des Immunsystems sind zahlreiche regulatorische Moleküle von Bedeutung, unter anderem BTLA und HVEM. Die Untersuchung der Expression und der Funktion dieses neuen Rezeptor-Liganden-Paares *in vitro* und *in vivo* war das Ziel dieser Arbeit.

Um profunde Analysen dieses BTLA-HVEM-Systems zu ermöglichen, wurden zunächst ein BTLA-Fusionsprotein, verschiedene HVEM-Transfektanten sowie eine Vielzahl von HVEM-spezifischen monoklonalen Antikörpern generiert, mit sowohl blockierender als auch nicht-blockierender Wirkung auf die BTLA-HVEM-Bindung. Diese Antikörper ermöglichten erstmals eine umfassende Analyse der Expression von HVEM auf Proteinebene in der Immunhistochemie und der Durchflusszytometrie. Eine prominente Expression von HVEM konnte in den lymphatischen Organen, jedoch insbesondere in den immunologisch relevanten peripheren Organen Lunge und Darm nachgewiesen werden. Die Untersuchung von HVEM und BTLA im Ruhezustand ergab, dass beide Moleküle konstitutiv entweder auf hohem oder niedrigem Niveau von allen untersuchten Populationen der Leukozyten exprimiert werden. Eine außergewöhnliche Beobachtung stellte die inverse Expression der beiden Moleküle dar. Durch die Verwendung transfizierter Zelllinien sowie genetisch veränderter Mäuse gelang es *in vitro* und *in vivo* die gegenseitige Abhängigkeit der HVEM- und BTLA-Expression eindeutig nachzuweisen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der Zell-Zell-Kontakt dabei von wesentlicher Bedeutung für die gegenseitige Modulation ist. Diese initialen Resultate stellen die Grundlage für die weiterführende detaillierte Klärung des Modulationsmechanismus dar. Auch im Verlauf der T-Zell-Aktivierung wird die Expression von HVEM und BTLA *in vitro* und *in vivo* entgegengesetzt reguliert. *In vitro* Versuche mit genetisch veränderten Mäusen zeigten, dass im Gegensatz zum Ruhezustand die Regulation im Verlauf der Aktivierung nur bedingt von der Interaktion beider Moleküle, sondern überwiegend durch das T-Zell-inhärente Aktivierungsprogramm, bestimmt wird.

Die konstitutive Expression und die gegenseitige Modulation von HVEM und BTLA bietet dem Immunsystem somit die Möglichkeit über verschiedenste Regulationswege flexibel auf äußere Einflüsse zu reagieren und die Immunantwort unter anderem über die dämpfende Wirkung von BTLA zu regulieren.

5.2 Summary

Several molecules like BTLA and HVEM play a prominent role in balancing the activation status of the immune system. The aim of the current work was to study the expression and function of this new receptor-ligand pair *in vitro* and *in vivo*.

As a prerequisite for a comprehensive analysis of the HVEM-BTLA system various tools, among them a BTLA-fusion protein, different HVEM-transfectants, and a collection of monoclonal antibodies, with either blocking or non-blocking effect on BTLA-HVEM interaction, were generated. For the first time, an extensive analysis of the HVEM expression on protein level using immunohistochemistry and flow cytometry was achieved with these antibodies. A strong expression of HVEM was found in lymphoid organs and especially in the lungs and gut, two immunologically relevant peripheral organs. Further examination of HVEM and BTLA in the resting state revealed a constitutive expression of both molecules on either high or low level on all leukocyte populations analyzed. Unexpectedly, these molecules were expressed in a reversed fashion in all instances.

The interdependence of HVEM and BTLA expression was demonstrated *in vitro* and *in vivo* by several experimental setups using transfected cell lines as well as genetically modified mice. It became evident in this context that cell-cell contact plays an essential role in the reciprocal modulation of HVEM and BTLA. These initial results provided the basis for further detailed analyses to clarify the mechanism of modulation.

The reverse regulation of HVEM and BTLA expression was also observed during T cell activation *in vitro* and *in vivo*. *In vitro* experiments using genetically modified mice revealed, that differing from the resting state, the regulation in the course of activation is not exclusively determined by the interaction of the two molecules, but is mainly influenced by the inherent T cell activation programme.

The constitutive expression and the interdependent modulation of HVEM and BTLA thus enable the immune system to react flexibly to environmental influences via a variety of regulatory pathways. This regulatory circle allows, among others, to modify the immune response through the suppressive action of BTLA.

6 Literaturverzeichnis

- Aggarwal, B.B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 745-756.
- Arase, H., Saito, T., Phillips, J.H., and Lanier, L.L. (2001). Cutting edge: the mouse NK cell-associated antigen recognized by DX5 monoclonal antibody is CD49b (alpha 2 integrin, very late antigen-2). *J. Immunol.* *167*, 1141-1144.
- Aricescu, A.R. and Jones, E.Y. (2007). Immunoglobulin superfamily cell adhesion molecules: zippers and signals. *Curr. Opin. Cell Biol.* *19*, 543-550.
- Aruffo, A. and Seed, B. (1987). Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *84*, 8573-8577.
- Austyn, J.M. and Gordon, S. (1981). F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur. J. Immunol.* *11*, 805-815.
- Banks, T.A., Rouse, B.T., Kerley, M.K., Blair, P.J., Godfrey, V.L., Kuklin, N.A., Bouley, D.M., Thomas, J., Kanangat, S., and Mucenski, M.L. (1995). Lymphotoxin-alpha-deficient mice. Effects on secondary lymphoid organ development and humoral immune responsiveness. *J. Immunol.* *155*, 1685-1693.
- Barnden, M.J., Allison, J., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (1998). Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol. Cell Biol.* *76*, 34-40.
- Barros, M.M., Yamamoto, M., Figueiredo, M.S., Cancado, R., Kimura, E.Y., Langhi, D.M., Jr., Chiatton, C.S., and Bordin, J.O. (2009). Expression levels of CD47, CD35, CD55, and CD59 on red blood cells and signal-regulatory protein-alpha, beta on monocytes from patients with warm autoimmune hemolytic anemia. *Transfusion* *49*, 154-160.
- Bazin, H., Deckers, C., Beckers, A., and Heremans, J.F. (1972). Transplantable immunoglobulin-secreting tumours in rats. I. General features of LOU-Ws1 strain rat immunocytomas and their monoclonal proteins. *Int. J. Cancer* *10*, 568-580.
- Bhattacharya, A., Dorf, M.E., and Springer, T.A. (1981). A shared alloantigenic determinant on Ia antigens encoded by the I-A and I-E subregions: evidence for I region gene duplication. *J. Immunol.* *127*, 2488-2495.
- Bodmer, J.L., Schneider, P., and Tschopp, J. (2002). The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem. Sci.* *27*, 19-26.
- Bork, P., Holm, L., and Sander, C. (1994). The immunoglobulin fold. Structural classification, sequence patterns and common core. *J. Mol. Biol.* *242*, 309-320.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* *72*, 248-254.

- Brinkley, M. (1992). A brief survey of methods for preparing protein conjugates with dyes, haptens, and cross-linking reagents. *Bioconjug. Chem.* *3*, 2-13.
- Cai, G., Anumanthan, A., Brown, J.A., Greenfield, E.A., Zhu, B., and Freeman, G.J. (2008). CD160 inhibits activation of human CD4⁺ T cells through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nat. Immunol.* *9*, 176-185.
- Carpenter, G. and Cohen, S. (1976). ¹²⁵I-labeled human epidermal growth factor. Binding, internalization, and degradation in human fibroblasts. *J. Cell Biol.* *71*, 159-171.
- Carreno, B.M. and Collins, M. (2002). The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* *20*, 29-53.
- Cartron, J.P. and Elion, J. (2008). Erythroid adhesion molecules in sickle cell disease: effect of hydroxyurea. *Transfus. Clin. Biol.* *15*, 39-50.
- Chang, Y.H., Hsieh, S.L., Chao, Y., Chou, Y.C., and Lin, W.W. (2005). Proinflammatory effects of LIGHT through HVEM and LTbetaR interactions in cultured human umbilical vein endothelial cells. *J. Biomed. Sci.* *12*, 363-375.
- Cherbas, L., Moss, R., and Cherbas, P. (1994). Transformation techniques for *Drosophila* cell lines. *Methods Cell Biol.* *44*, 161-179.
- Cheung, T.C., Humphreys, I.R., Potter, K.G., Norris, P.S., Shumway, H.M., Tran, B.R., Patterson, G., Jean-Jacques, R., Yoon, M., Spear, P.G., Murphy, K.M., Lurain, N.S., Benedict, C.A., and Ware, C.F. (2005). Evolutionarily divergent herpesviruses modulate T cell activation by targeting the herpesvirus entry mediator cosignaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *102*, 13218-13223.
- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J., and Rutter, W.J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* *18*, 5294-5299.
- Coffman, R.L. (1982). Surface antigen expression and immunoglobulin gene rearrangement during mouse pre-B cell development. *Immunol. Rev.* *69*, 5-23.
- Colbere-Garapin, F., Horodniceanu, F., Kourilsky, P., and Garapin, A.C. (1981). A new dominant hybrid selective marker for higher eukaryotic cells. *J. Mol. Biol.* *150*, 1-14.
- Collins, M., Ling, V., and Carreno, B.M. (2005). The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome Biol.* *6*, 223.
- Compaan, D.M., Gonzalez, L.C., Tom, I., Loyet, K.M., Eaton, D., and Hymowitz, S.G. (2005). Attenuating lymphocyte activity: The crystal structure of the btlA-hvem complex. *J. Biol. Chem.*
- Daubner, S.C., Astorga, A.M., Leisman, G.B., and Baldwin, T.O. (1987). Yellow light emission of *Vibrio fischeri* strain Y-1: purification and characterization of the energy-accepting yellow fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *84*, 8912-8916.

- De Trez,C., Schneider,K., Potter,K., Droin,N., Fulton,J., Norris,P.S., Ha,S.W., Fu,Y.X., Murphy,T., Murphy,K.M., Pfeffer,K., Benedict,C.A., and Ware,C.F. (2008). The inhibitory HVEM-BTLA pathway counter regulates lymphotoxin receptor signaling to achieve homeostasis of dendritic cells. *J. Immunol.* *180*, 238-248.
- Dello,S.P. and Rovida,E. (2002). Transmodulation of cell surface regulatory molecules via ectodomain shedding. *Biol. Chem.* *383*, 69-83.
- Dempsey,P.W., Doyle,S.E., He,J.Q., and Cheng,G. (2003). The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev.* *14*, 193-209.
- Deppong,C., Juehne,T.I., Hurchla,M., Friend,L.D., Shah,D.D., Rose,C.M., Bricker,T.L., Shornick,L.P., Crouch,E.C., Murphy,T.L., Holtzman,M.J., Murphy,K.M., and Green,J.M. (2006). Cutting edge: B and T lymphocyte attenuator and programmed death receptor-1 inhibitory receptors are required for termination of acute allergic airway inflammation. *J. Immunol.* *176*, 3909-3913.
- Dialynas,D.P., Quan,Z.S., Wall,K.A., Pierres,A., Quintans,J., Loken,M.R., Pierres,M., and Fitch,F.W. (1983). Characterization of the murine T cell surface molecule, designated L3T4, identified by monoclonal antibody GK1.5: similarity of L3T4 to the human Leu-3/T4 molecule. *J. Immunol.* *131*, 2445-2451.
- Dri,P., Gasparini,C., Menegazzi,R., Cramer,R., Alberi,L., Presani,G., Garbisa,S., and Patriarca,P. (2000). TNF-Induced shedding of TNF receptors in human polymorphonuclear leukocytes: role of the 55-kDa TNF receptor and involvement of a membrane-bound and non-matrix metalloproteinase. *J. Immunol.* *165*, 2165-2172.
- Eisen,S.A., Wedner,H.J., and Parker,C.W. (1972). Isolation of pure human peripheral blood T-lymphocytes using nylon wool columns. *Immunol. Commun.* *1*, 571-577.
- Fleming,T.J., Fleming,M.L., and Malek,T.R. (1993). Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *J. Immunol.* *151*, 2399-2408.
- Freeman,G.J., Long,A.J., Iwai,Y., Bourque,K., Chernova,T., Nishimura,H., Fitz,L.J., Malenkovich,N., Okazaki,T., Byrne,M.C., Horton,H.F., Fouser,L., Carter,L., Ling,V., Bowman,M.R., Carreno,B.M., Collins,M., Wood,C.R., and Honjo,T. (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med JID* - 2985109R *192*, 1027-1034.
- Futterer,A., Mink,K., Luz,A., Kosco-Vilbois,M.H., and Pfeffer,K. (1998). The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. *Immunity.* *9*, 59-70.
- Gallatin,W.M., Weissman,I.L., and Butcher,E.C. (1983). A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature* *304*, 30-34.
- Gavrieli,M. and Murphy,K.M. (2006). Association of Grb-2 and PI3K p85 with phosphotyrosine peptides derived from BTLA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *345*, 1440-1445.

- Gavrieli, M., Watanabe, N., Loftin, S.K., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2003). Characterization of phosphotyrosine binding motifs in the cytoplasmic domain of B and T lymphocyte attenuator required for association with protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *312*, 1236-1243.
- Gilligan, K.J., Littlefield, S., and Jarvis, A.P., Jr. (1988). Production of rat monoclonal antibody from rat x mouse hybridoma cell lines using microencapsulation technology. *In Vitro Cell Dev. Biol.* *24*, 35-41.
- Giustiniani, J., Bensussan, A., and Marie-Cardine, A. (2009). Identification and characterization of a transmembrane isoform of CD160 (CD160-TM), a unique activating receptor selectively expressed upon human NK cell activation. *J. Immunol.* *182*, 63-71.
- Glisin, V., Crkvenjakov, R., and Byus, C. (1974). Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. *Biochemistry* *13*, 2633-2637.
- Goding, J.W. (1996). *Monoclonal Antibodies: Principle and practice* (third edition). Academic Press.
- Gommerman, J.L. and Browning, J.L. (2003). Lymphotoxin/light, lymphoid microenvironments and autoimmune disease. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 642-655.
- Gonzalez, L.C., Loyet, K.M., Calamine-Fenaux, J., Chauhan, V., Wranik, B., Ouyang, W., and Eaton, D.L. (2005). A coreceptor interaction between the CD28 and TNF receptor family members B and T lymphocyte attenuator and herpesvirus entry mediator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *102*, 1116-1121.
- Gorer, P.A. (1950). Studies in antibody response of mice to tumour inoculation. *Br. J. Cancer* *4*, 372-379.
- Graf, D., Muller, S., Korthauer, U., van, K.C., Weise, C., and Kroczeck, R.A. (1995). A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation. *Eur. J. Immunol.* *25*, 1749-1754.
- Greaves, D.R., Wilson, F.D., Lang, G., and Kioussis, D. (1989). Human CD2 3'-flanking sequences confer high-level, T cell-specific, position-independent gene expression in transgenic mice. *Cell* *56*, 979-986.
- Greenwald, R.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2005). The B7 family revisited. *Annu. Rev. Immunol.* *23*, 515-548.
- Gregoire, C., Rebai, N., Schweisguth, F., Necker, A., Mazza, G., Auphan, N., Millward, A., Schmitt-Verhulst, A.M., and Malissen, B. (1991). Engineered secreted T-cell receptor alpha beta heterodimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *88*, 8077-8081.
- Gross, J.A., Callas, E., and Allison, J.P. (1992). Identification and distribution of the costimulatory receptor CD28 in the mouse. *J. Immunol.* *149*, 380-388.
- Guntermann, C. and Alexander, D.R. (2002). CTLA-4 suppresses proximal TCR signaling in resting human CD4(+) T cells by inhibiting ZAP-70 Tyr(319) phosphorylation: a potential role for tyrosine phosphatases. *J. Immunol.* *168*, 4420-4429.

- Han,P., Goularte,O.D., Rufner,K., Wilkinson,B., and Kaye,J. (2004). An inhibitory Ig superfamily protein expressed by lymphocytes and APCs is also an early marker of thymocyte positive selection. *J. Immunol.* *172*, 5931-5939.
- Hanahan,D., Jessee,J., and Bloom,F.R. (1991). Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol.* *204*, 63-113.
- Hansen,H.P., Recke,A., Reineke,U., Von,T.B., Borchmann,P., Von Strandmann,E.P., Lange,H., Lemke,H., and Engert,A. (2004). The ectodomain shedding of CD30 is specifically regulated by peptide motifs in its cysteine-rich domains 2 and 5. *FASEB J.* *18*, 893-895.
- Harlow,E. and Lane,D. (1988). *Antibodies (A laboratory manual)*. Medical.
- Harpaz,Y. and Chothia,C. (1994). Many of the immunoglobulin superfamily domains in cell adhesion molecules and surface receptors belong to a new structural set which is close to that containing variable domains. *J. Mol. Biol.* *238*, 528-539.
- Hashiguchi,M., Kobori,H., Ritprajak,P., Kamimura,Y., Kozono,H., and Azuma,M. (2008). Triggering receptor expressed on myeloid cell-like transcript 2 (TLT-2) is a counter-receptor for B7-H3 and enhances T cell responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *105*, 10495-10500.
- Horibata,K. and Harris,A.W. (1970). Mouse myelomas and lymphomas in culture. *Exp. Cell Res.* *60*, 61-77.
- Hsu,H., Solovyev,I., Colombero,A., Elliott,R., Kelley,M., and Boyle,W.J. (1997). ATAR, a novel tumor necrosis factor receptor family member, signals through TRAF2 and TRAF5. *J. Biol. Chem.* *272*, 13471-13474.
- Hurchla,M.A., Sedy,J.R., and Murphy,K.M. (2007). Unexpected Role of B and T Lymphocyte Attenuator in Sustaining Cell Survival during Chronic Allostimulation. *J. Immunol.* *178*, 6073-6082.
- Hutloff,A., Dittrich,A.M., Beier,K.C., Eljaschewitsch,B., Kraft,R., Anagnostopoulos,I., and Kroczek,R.A. (1999). ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature JID* - 0410462 *397*, 263-266.
- Kanagawa,O., Utsunomiya,Y., Bill,J., Palmer,E., Moore,M.W., and Carbone,F.R. (1991). Conformational difference of T cell antigen receptors revealed by monoclonal antibodies to mouse V beta 5 T cell receptor for antigen determinants. *J. Immunol.* *147*, 1307-1314.
- Karasuyama,H., Tohyama,N., and Tada,T. (1989). Autocrine growth and tumorigenicity of interleukin 2-dependent helper T cells transfected with IL-2 gene. *J. Exp. Med.* *169*, 13-25.
- Kina,T., Ikuta,K., Takayama,E., Wada,K., Majumdar,A.S., Weissman,I.L., and Katsura,Y. (2000). The monoclonal antibody TER-119 recognizes a molecule associated with glycoprotein A and specifically marks the late stages of murine erythroid lineage. *Br. J. Haematol.* *109*, 280-287.

- Koo,G.C. and Peppard,J.R. (1984). Establishment of monoclonal anti-Nk-1.1 antibody. *Hybridoma* 3, 301-303.
- Krieg,C., Boyman,O., Fu,Y.X., and Kaye,J. (2007). B and T lymphocyte attenuator regulates CD8+ T cell-intrinsic homeostasis and memory cell generation. *Nat. Immunol.* 8, 162-171.
- Krieg,C., Han,P., Stone,R., Goularte,O.D., and Kaye,J. (2005). Functional Analysis of B and T Lymphocyte Attenuator Engagement on CD4+ and CD8+ T Cells. *J. Immunol.* 175, 6420-6427.
- Krop,I., de Fougerolles,A.R., Hardy,R.R., Allison,M., Schlissel,M.S., and Fearon,D.T. (1996). Self-renewal of B-1 lymphocytes is dependent on CD19. *Eur. J. Immunol.* 26, 238-242.
- Kulczycki,A., Jr., Isersky,C., and Metzger,H. (1974). The interaction of IgE with rat basophilic leukemia cells. I. Evidence for specific binding of IgE. *J. Exp. Med.* 139, 600-616.
- Kwon,B.S., Tan,K.B., Ni,J., Oh,K.O., Lee,Z.H., Kim,K.K., Kim,Y.J., Wang,S., Gentz,R., Yu,G.L., Harrop,J., Lyn,S.D., Silverman,C., Porter,T.G., Truneh,A., and Young,P.R. (1997). A newly identified member of the tumor necrosis factor receptor superfamily with a wide tissue distribution and involvement in lymphocyte activation. *J. Biol. Chem.* 272, 14272-14276.
- Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Latchman,Y., Wood,C.R., Chernova,T., Chaudhary,D., Borde,M., Chernova,I., Iwai,Y., Long,A.J., Brown,J.A., Nunes,R., Greenfield,E.A., Bourque,K., Boussiotis,V.A., Carter,L.L., Carreno,B.M., Malenkovich,N., Nishimura,H., Okazaki,T., Honjo,T., Sharpe,A.H., and Freeman,G.J. (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol JID - 100941354* 2, 261-268.
- Ledbetter,J.A., Rouse,R.V., Micklem,H.S., and Herzenberg,L.A. (1980). T cell subsets defined by expression of Lyt-1,2,3 and Thy-1 antigens. Two-parameter immunofluorescence and cytotoxicity analysis with monoclonal antibodies modifies current views. *J. Exp. Med.* 152, 280-295.
- Leo,O., Foo,M., Henkart,P.A., Perez,P., Shinohara,N., Segal,D.M., and Bluestone,J.A. (1987). Role of accessory molecules in signal transduction of cytolytic T lymphocyte by anti-T cell receptor and anti-Ly-6.2C monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 139, 3556-3563.
- Levine,B.L., Ueda,Y., Craighead,N., Huang,M.L., and June,C.H. (1995). CD28 ligands CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) induce long-term autocrine growth of CD4+ T cells and induce similar patterns of cytokine secretion in vitro. *Int. Immunol.* 7, 891-904.
- Liu,J., Schmidt,C.S., Zhao,F., Okragly,A.J., Glasebrook,A., Fox,N., Galbreath,E., Zhang,Q., Song,H.Y., Na,S., and Yang,D.D. (2003). LIGHT-deficiency impairs CD8+ T cell expansion, but not effector function. *Int. Immunol.* 15, 861-870.

- Locksley,R.M., Killeen,N., and Lenardo,M.J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* *104*, 487-501.
- Logdberg,L., Gunter,K.C., and Shevach,E.M. (1985). Rapid production of monoclonal antibodies to T lymphocyte functional antigens. *J. Immunol. Methods* *79*, 239-249.
- Logue,E.C., Bakkour,S., Murphy,M.M., Nolla,H., and Sha,W.C. (2006). ICOS-induced B7h shedding on B cells is inhibited by TLR7/8 and TLR9. *J. Immunol.* *177*, 2356-2364.
- Lorber,M.I., Dawson,P.J., Loken,M.R., Ely,J.M., Fieldsteel,A.H., and Fitch,F.W. (1983). T-cell lineage of a Friend virus-induced lymphatic leukemia in athymic rats. *J. Natl. Cancer Inst.* *71*, 1271-1280.
- Maeda,M., Carpenito,C., Russell,R.C., Dasanjh,J., Veinotte,L.L., Ohta,H., Yamamura,T., Tan,R., and Takei,F. (2005). Murine CD160, Ig-like receptor on NK cells and NKT cells, recognizes classical and nonclassical MHC class I and regulates NK cell activation. *J. Immunol.* *175*, 4426-4432.
- Mages,H.W., Hutloff,A., Heuck,C., Buchner,K., Himmelbauer,H., Oliveri,F., and Kroczeck,R.A. (2000). Molecular cloning and characterization of murine ICOS and identification of B7h as ICOS ligand. *Eur J Immunol JID - 1273201* *30*, 1040-1047.
- Marsters,S.A., Ayres,T.M., Skubatch,M., Gray,C.L., Rothe,M., and Ashkenazi,A. (1997). Herpesvirus entry mediator, a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family, interacts with members of the TNFR-associated factor family and activates the transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J. Biol. Chem.* *272*, 14029-14032.
- Mauri,D.N., Ebner,R., Montgomery,R.I., Kochel,K.D., Cheung,T.C., Yu,G.L., Ruben,S., Murphy,M., Eisenberg,R.J., Cohen,G.H., Spear,P.G., and Ware,C.F. (1998). LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin alpha are ligands for herpesvirus entry mediator. *Immunity.* *8*, 21-30.
- Metlay,J.P., Witmer-Pack,M.D., Agger,R., Crowley,M.T., Lawless,D., and Steinman,R.M. (1990). The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* *171*, 1753-1771.
- Miltenyi,S., Muller,W., Weichel,W., and Radbruch,A. (1990). High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* *11*, 231-238.
- Montgomery,R.I., Warner,M.S., Lum,B.J., and Spear,P.G. (1996). Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* *87*, 427-436.
- Morel,Y., Schiano de Colella,J.M., Harrop,J., Deen,K.C., Holmes,S.D., Wattam,T.A., Khandekar,S.S., Truneh,A., Sweet,R.W., Gastaut,J.A., Olive,D., and Costello,R.T. (2000). Reciprocal expression of the TNF family receptor herpes virus entry mediator and its ligand LIGHT on activated T cells: LIGHT down-regulates its own receptor. *J. Immunol.* *165*, 4397-4404.
- Nelson,C.A., Fremont,M.D., Sedy,J.R., Norris,P.S., Ware,C.F., Murphy,K.M., and Fremont,D.H. (2008). Structural determinants of herpesvirus entry mediator recognition by murine B and T lymphocyte attenuator. *J. Immunol.* *180*, 940-947.

- Oi, V.T., Glazer, A.N., and Stryer, L. (1982). Fluorescent phycobiliprotein conjugates for analyses of cells and molecules. *J. Cell Biol.* *93*, 981-986.
- Oldenborg, P.A., Zheleznyak, A., Fang, Y.F., Lagenaur, C.F., Gresham, H.D., and Lindberg, F.P. (2000). Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science* *288*, 2051-2054.
- Orengo, A.M., Cantoni, C., Neglia, F., Biassoni, R., and Ferrini, S. (1997). Reciprocal expression of CD70 and of its receptor, CD27, in human long term-activated T and natural killer (NK) cells: inverse regulation by cytokines and role in induction of cytotoxicity. *Clin. Exp. Immunol.* *107*, 608-613.
- Ortega, G., Robb, R.J., Shevach, E.M., and Malek, T.R. (1984). The murine IL 2 receptor. I. Monoclonal antibodies that define distinct functional epitopes on activated T cells and react with activated B cells. *J. Immunol.* *133*, 1970-1975.
- Parry, R.V., Chemnitz, J.M., Frauwirth, K.A., Lanfranco, A.R., Braunstein, I., Kobayashi, S.V., Linsley, P.S., Thompson, C.B., and Riley, J.L. (2005). CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol. Cell Biol.* *25*, 9543-9553.
- Radbruch, A. (2000). *Flow Cytometry and Cell Sorting* (2nd Edition). Springer-Verlag.
- Rissoan, M.C., van, K.C., Chomarat, P., Galibert, L., Durand, I., Thivolet-Bejui, F., Miossec, P., and Banchereau, J. (1996). The functional CD40 antigen of fibroblasts may contribute to the proliferation of rheumatoid synovium. *Clin. Exp. Immunol.* *106*, 481-490.
- Rosen, H. and Gordon, S. (1987). Monoclonal antibody to the murine type 3 complement receptor inhibits adhesion of myelomonocytic cells in vitro and inflammatory cell recruitment in vivo. *J. Exp. Med.* *166*, 1685-1701.
- Sander, B., Andersson, J., and Andersson, U. (1991). Assessment of cytokines by immunofluorescence and the paraformaldehyde-saponin procedure. *Immunol. Rev.* *119*, 65-93.
- Sansom, D.M. (2000). CD28, CTLA-4 and their ligands: who does what and to whom? *Immunology* *101*, 169-177.
- Sarrias, M.R., Whitbeck, J.C., Rooney, I., Ware, C.F., Eisenberg, R.J., Cohen, G.H., and Lambris, J.D. (2000). The three HveA receptor ligands, gD, LT-alpha and LIGHT bind to distinct sites on HveA. *Mol. Immunol.* *37*, 665-673.
- Schneider, I. (1972). Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* *27*, 353-365.
- Sedy, J.R., Gavrieli, M., Potter, K.G., Hurchla, M.A., Lindsley, R.C., Hildner, K., Scheu, S., Pfeffer, K., Ware, C.F., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2005). B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nat. Immunol.* *6*, 90-98.
- Shaikh, R.B., Santee, S., Granger, S.W., Butrovich, K., Cheung, T., Kronenberg, M., Cheroutre, H., and Ware, C.F. (2001). Constitutive expression of LIGHT on T cells leads to lymphocyte activation, inflammation, and tissue destruction. *J. Immunol.* *167*, 6330-6337.

- Sheppard,K.A., Fitz,L.J., Lee,J.M., Benander,C., George,J.A., Wooters,J., Qiu,Y., Jussif,J.M., Carter,L.L., Wood,C.R., and Chaudhary,D. (2004). PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKCtheta. *FEBS Lett.* 574, 37-41.
- Shi,G., Luo,H., Wan,X., Salcedo,T.W., Zhang,J., and Wu,J. (2002). Mouse T cells receive costimulatory signals from LIGHT, a TNF family member. *Blood* 100, 3279-3286.
- Springer,T.A. (1990). Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346, 425-434.
- Stefanova,I., Dorfman,J.R., and Germain,R.N. (2002). Self-recognition promotes the foreign antigen sensitivity of naive T lymphocytes. *Nature* 420, 429-434.
- Steinberg,M.W., Turovskaya,O., Shaikh,R.B., Kim,G., McCole,D.F., Pfeffer,K., Murphy,K.M., Ware,C.F., and Kronenberg,M. (2008). A crucial role for HVEM and BTLA in preventing intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 205, 1463-1476.
- Tamada,K., Ni,J., Zhu,G., Fiscella,M., Teng,B., van Deursen,J.M., and Chen,L. (2002). Cutting edge: selective impairment of CD8+ T cell function in mice lacking the TNF superfamily member LIGHT. *J. Immunol.* 168, 4832-4835.
- Tamada,K., Shimozaki,K., Chapoval,A.I., Zhai,Y., Su,J., Chen,S.F., Hsieh,S.L., Nagata,S., Ni,J., and Chen,L. (2000). LIGHT, a TNF-like molecule, costimulates T cell proliferation and is required for dendritic cell-mediated allogeneic T cell response. *J. Immunol.* 164, 4105-4110.
- Tao,R., Wang,L., Han,R., Wang,T., Ye,Q., Honjo,T., Murphy,T.L., Murphy,K.M., and Hancock,W.W. (2005). Differential effects of B and T lymphocyte attenuator and programmed death-1 on acceptance of partially versus fully MHC-mismatched cardiac allografts. *J. Immunol.* 175, 5774-5782.
- Tomonari,K. (1988). A rat antibody against a structure functionally related to the mouse T-cell receptor/T3 complex. *Immunogenetics* 28, 455-458.
- Tsujimura,K., Obata,Y., Matsudaira,Y., Nishida,K., Akatsuka,Y., Ito,Y., hi-Okamura,A., Kuzushima,K., and Takahashi,T. (2006). Characterization of murine CD160+ CD8+ T lymphocytes. *Immunol. Lett.* 106, 48-56.
- Wallny,H.J. (1997). Production of soluble MHC class II molecules in *Drosophila melanogaster* Schneider cells. *Immunol. Methods Manual* 1, 51-59.
- Wan,X., Zhang,J., Luo,H., Shi,G., Kapnik,E., Kim,S., Kanakaraj,P., and Wu,J. (2002). A TNF family member LIGHT transduces costimulatory signals into human T cells. *J. Immunol.* 169, 6813-6821.
- Wang,J., Chun,T., Lo,J.C., Wu,Q., Wang,Y., Foster,A., Roca,K., Chen,M., Tamada,K., Chen,L., Wang,C.R., and Fu,Y.X. (2001a). The critical role of LIGHT, a TNF family member, in T cell development. *J. Immunol.* 167, 5099-5105.
- Wang,J., Lo,J.C., Foster,A., Yu,P., Chen,H.M., Wang,Y., Tamada,K., Chen,L., and Fu,Y.X. (2001b). The regulation of T cell homeostasis and autoimmunity by T cell-derived LIGHT. *J. Clin. Invest* 108, 1771-1780.

- Wang, Y., Subudhi, S.K., Anders, R.A., Lo, J., Sun, Y., Blink, S., Wang, Y., Wang, J., Liu, X., Mink, K., Degrandi, D., Pfeffer, K., and Fu, Y.X. (2005). The role of herpesvirus entry mediator as a negative regulator of T cell-mediated responses. *J. Clin. Invest* 115, 711-717.
- Watanabe, N., Gavrieli, M., Sedy, J.R., Yang, J., Fallarino, F., Loftin, S.K., Hurchla, M.A., Zimmerman, N., Sim, J., Zang, X., Murphy, T.L., Russell, J.H., Allison, J.P., and Murphy, K.M. (2003). BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nat. Immunol.* 4, 670-679.
- Watts, T.H. (2005). TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 23-68.
- Whitbeck, J.C., Connolly, S.A., Willis, S.H., Hou, W., Krummenacher, C., Ponce de, L.M., Lou, H., Baribaud, I., Eisenberg, R.J., and Cohen, G.H. (2001). Localization of the gD-binding region of the human herpes simplex virus receptor, HveA. *J. Virol.* 75, 171-180.
- Wu, T.H., Zhen, Y., Zeng, C., Yi, H.F., and Zhao, Y. (2007). B and T lymphocyte attenuator interacts with CD3zeta and inhibits tyrosine phosphorylation of TCRzeta complex during T-cell activation. *Immunol. Cell Biol.* 85, 590-595.
- Yellin, M.J., Sippel, K., Inghirami, G., Covey, L.R., Lee, J.J., Sinning, J., Clark, E.A., Chess, L., and Lederman, S. (1994). CD40 molecules induce down-modulation and endocytosis of T cell surface T cell-B cell activating molecule/CD40-L. Potential role in regulating helper effector function. *J. Immunol.* 152, 598-608.
- Yokoyama, W.M., Koning, F., Kehn, P.J., Pereira, G.M., Stingl, G., Coligan, J.E., and Shevach, E.M. (1988). Characterization of a cell surface-expressed disulfide-linked dimer involved in murine T cell activation. *J. Immunol.* 141, 369-376.
- Yoshinaga, S.K., Whoriskey, J.S., Khare, S.D., Sarmiento, U., Guo, J., Horan, T., Shih, G., Zhang, M., Coccia, M.A., Kohno, T., Tafuri-Bladt, A., Brankow, D., Campbell, P., Chang, D., Chiu, L., Dai, T., Duncan, G., Elliott, G.S., Hui, A., McCabe, S.M., Scully, S., Shahinian, A., Shaklee, C.L., Van, G., and MAk, T.W. (1999). T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature JID - 0410462* 402, 827-832.
- Yu, K.Y., Kwon, B., Ni, J., Zhai, Y., Ebner, R., and Kwon, B.S. (1999). A newly identified member of tumor necrosis factor receptor superfamily (TR6) suppresses LIGHT-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274, 13733-13736.
- Zhai, Y., Guo, R., Hsu, T.L., Yu, G.L., Ni, J., Kwon, B.S., Jiang, G.W., Lu, J., Tan, J., Ugustus, M., Carter, K., Rojas, L., Zhu, F., Lincoln, C., Endress, G., Xing, L., Wang, S., Oh, K.O., Gentz, R., Ruben, S., Lippman, M.E., Hsieh, S.L., and Yang, D. (1998). LIGHT, a novel ligand for lymphotoxin beta receptor and TR2/HVEM induces apoptosis and suppresses in vivo tumor formation via gene transfer. *J. Clin. Invest* 102, 1142-1151.
- Zhao, L.C., Edgar, J.B., and Dailey, M.O. (2001). Characterization of the rapid proteolytic shedding of murine L-selectin. *Dev. Immunol.* 8, 267-277.
- Zhumabekov, T., Corbella, P., Tolaini, M., and Kioussis, D. (1995). Improved version of a human CD2 minigene based vector for T cell-specific expression in transgenic mice. *J. Immunol. Methods* 185, 133-140.

7 Abkürzungsverzeichnis

A647 / 700	Alexa Fluor 647 / 700
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
Amp	Ampicillin
APC	Allophycocyanin
APZ	antigenpräsentierende Zelle
BSA	Rinder-Serumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
BTLA	<i>B and T lymphocyte attenuator</i>
BZ	B-Zelle(n)
Cas Y	<i>Cascade Yellow</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CFSE	5, 6-Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester
Cy	Cyanin
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNaseI	Desoxyribonuklease
DZ	Dendritische Zelle(n)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay</i>
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
hu	human
HVEM	<i>Herpes virus entry mediator</i>
ICH	Immunhistochemie
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ICOS	induzierbarer Kostimulator
ICOS-L	induzierbarer Kostimulator Ligand
Ig	Immunglobulin
ko	knock-out
LIGHT	<i>Lymphotoxin-like, exhibits inducible expression, and competes with HSV glycoprotein D for HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes</i>
LS-Säulen	Large-Sort-Säulen
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
mAk	monoklonaler Antikörper
mBTLA	BTLA der Maus

MFI	mittlere Fluoreszenzintensität (<i>mean fluorescence intensity</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MHC-I	MHC-Klasse-I
MHC-II	MHC-Klasse-II
mHVEM	HVEM der Maus
MMPI IV	Matrix-Metalloproteaseinhibitor IV
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
ms	Maus
NKT-Zelle	Natürliche Killer T-Zelle
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
Pac B / O	<i>Pacific Blue / Orange</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
PerCp	Peridinin Chlorophyll Protein
PI	Propidiumiodid
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
s.c.	subkutan
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N, N, N', N'-Tetraethylmethylethylendiamin
tg	transgen
T _H 1	T-Helferzelle Typ 1
T _H 2	T-Helferzelle Typ 2
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktorrezeptor
TZ	T-Zelle(n)
TZR	T-Zell-Rezeptor
U	<i>unit</i> , Einheit der Enzymaktivität
wt	Wildtyp
YFP	gelbfluoreszierendes Protein (<i>yellow fluorescent protein</i>)
β-ME	β-Mercaptoethanol

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Kroczek für die Überlassung dieses interessanten Themas und die zahlreichen Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Mutzel möchte ich danken, dass er sich freundlicherweise bereit erklärt hat, die Betreuung an der Freien Universität Berlin zu übernehmen.

Mein Dank gilt auch Dr. Hans-Werner Mages für die hervorragende Betreuung insbesondere in der Anfangsphase meiner Arbeit und seine stetige Diskussionsbereitschaft. Dr. Andreas Hutloff danke ich für die Einführung in die Durchflusszytometrie und seine hilfreichen Tipps nicht nur zum Thema der Durchflusszytometrie.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern möchte ich für die nette Arbeitsatmosphäre, die große Hilfsbereitschaft und die anregenden Diskussionen danken.

Ganz besonders danke ich Stephanie Gurka für ihre Unterstützung und die angenehme Zusammenarbeit.

Für die tatkräftige Unterstützung im Laboralltag bedanke ich mich bei Ewa Kowalczyk, Katja Ranke, Petra Jahn und Monika Jaensch, die mir so manche Experimente erleichtert haben.

Dr. Brigitte Dorner und Dr. Martin Dorner danke ich für ihre Geduld und ihr Verständnis.

Auch den Laboranten und Tierpflegern des Robert-Koch Instituts danke ich für ihre Unterstützung.

Dr. D. Graf (Institute of Immunology, Griechenland) und Prof. Dr. K. Pfeffer (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) danke ich für die Bereitstellung der genetisch veränderten Mäuse.

Zu guter Letzt gilt mein besonderer Dank meiner Familie, die mich zu jeder Zeit unterstützt hat und mir das Studium der Biochemie ermöglichte.

9 Anhang

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

Publikationen

Kongressbeiträge

Worbs S., Dorner M. B., Hutloff A., Mages H. W. and KroczeK R. A.; Generation of antibodies to murine B7-H3 and extensive expression analysis *in vivo*.

36th Annual Meeting of the German Society for Immunology, 21.–24. September 2005, Kiel (Poster)

Gurka S., **Worbs S.**, Hutloff A., Mages H. W. and KroczeK R. A.; Unusual pattern of T cell co-stimulation observed with murine BTLA.

16th European Congress of Immunology, 06.–09. September 2007, Paris (Poster)

Gurka S., **Worbs S.**, Hutloff A., Mages H. W. and KroczeK R. A.; Murine BTLA co-stimulation correlates with expression. *37th Annual Meeting of the German Society for Immunology*, 05.–08. September 2007, Heidelberg (Poster)

Bescheinigung

Gemäß § 7 Abs. 4 der Promotionsordnung vom 04.09.2007 des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie

Hierdurch versichere ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Charakterisierung der Expression und Modulation des HVEM-BTLA-Ligand-Rezeptor-Systems“ selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe.

Berlin, 25.02.2009

S. Worbs