

Untersuchungen zur Funktion Dendritischer Zellen *in vivo*

Quantitative und qualitative Analyse der
Interaktion Dendritischer Zellen mit T-
Lymphozyten

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctorum rerum naturalium
der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Michael Angelo Cannarile
aus Mainz

München, 14. Februar 2005

Erstgutachter:	Prof. Dr. E. Weiß
Zweitgutachter:	PD. Dr. C. Falk
Betreuer der Arbeit:	Prof. Dr. T. Brocker
(Sondergutachter)	
Tag der mündlichen Prüfung:	06. Juni 2005

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse flossen in folgende Publikationen ein:

Kurts C, Cannarile M, Klebba I, Brocker T (2001) Dendritic cells are sufficient to cross-present self-antigens to CD8 T cells *in vivo*; **J Immunol. 166:1439-42**

Cannarile MA, Decanis N, Joost P.M. van Meerwijk and Thomas Brocker (2004) The role of dendritic cells in selection of classical and non-classical CD8⁺ T cells *in vivo*; **J Immunol. 173:4799-4805**

Cannarile MA and Brocker T (2004) Direct *in vivo* evaluation of CTL priming and tolerance induction by Dendritic Cells; ***Manuskript in Vorbereitung***

INHALTSVERZEICHNIS

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	8
ZUSAMMENFASSUNG	11
1 EINLEITUNG	12
1.1 TCR- und MHC-Moleküle, die zentralen Moleküle zur Antigenerkennung und -Präsentation	14
1.1.1 Der T-Zell-Rezeptor	14
1.1.2 MHC-Moleküle	14
1.2 Die Effektorzellen des zellvermittelten adaptiven Immunsystems	16
1.2.1 T-Lymphozyten	16
1.2.1.1 CD4- und CD8-positive Zellen	16
1.2.1.2 Entwicklung von T-Lymphozyten	17
1.2.1.2.1 Positive und Negative Selektion	18
1.2.1.2.1.1 Quantitatives / Aviditäts Modell	19
1.3 Die Rolle von antigenpräsentierenden Zellen (APC) bei der erworbenen Immunität	19
1.3.1 Makrophagen	20
1.3.2 B-Zellen	20
1.3.3 Dendritische Zellen	21
1.3.3.1 DC-Subpopulationen	23
1.3.3.1.1 Plasmazytoide DC	23
1.3.3.1.2 Langerhans Zellen	24
1.3.3.1.3 Dermale DC / Interstitielle DC	24
1.3.3.1.4 CD8 ⁺ CD4 ⁻ DC und CD4 ⁺ DC	24
1.3.3.1.5 CD8 ⁺ DC	24
1.3.2 Antigenpräsentation	25
1.3.2.1 MHC-II-Präsentation	26
1.3.2.2 MHC-I-Präsentation	27
1.3.2.3 Kreuzpräsentation	28
1.3.2.3.1 Immunität und Toleranz durch Kreuzpräsentation	30
1.3.3 APC im Thymus	32
1.4 Ziel der Arbeit	34
2 MATERIAL UND METHODEN	36
2.1 Material	36
2.1.1 Chemikalien	36
2.1.2 Geräte	36
2.1.3 Pufferlösungen und Medien	36
2.1.4 Verbrauchsmaterialien	38

2.1.5 Antikörper	38
2.1.6 Peptide und Oligonukleotide	40
2.1.7 Virale Vektoren	40
2.1.8 Mausstämme	41
2.1.8.1 $\beta 2m^{-/-}$ (MHC-I ^{-/-})	41
2.1.8.2 CD11c-MHCI	41
2.1.8.3 C57BL/6 (MHC-I ⁺)	41
2.1.8.4 OT-1	41
2.2 Methoden	42
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	42
2.2.1.1 Agarose-Gelelektrophorese	42
2.2.1.2 Bestimmung der DNA-Konzentration	42
2.2.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	43
2.2.1.4 Isolierung genomischer DNA aus Gewebebiopsien	44
2.2.2 Zell- und immunbiologische Methoden	44
2.2.2.1 Lymphozytenanreicherung aus peripherem Blut	44
2.2.2.2 Organentnahme und Herstellung einer Einzelzellsuspension	45
2.2.2.2.1 Lymphknoten und Milz	45
2.2.2.2.2 Thymus	46
2.2.2.2.3 Erythrozytenlyse	47
2.2.2.3 Durchflusszytometrie (FACS Analyse)	47
2.2.2.4 Färbung von Lymphozyten mit fluorochrommarkierten Antikörpern	48
2.2.2.5 Nachweis Antigen spezifischer T-Zellen mittels Tetrameren	48
2.2.2.6 Bestimmung der Zellzahl	48
2.2.2.7 Anreicherung von CD8-T-Zellen	49
2.2.2.8 Adoptiver Zelltransfer	50
2.2.2.9 Intravenöse Injektion in Mäuse	51
2.2.2.10 Immunisierung mit Peptid und Lipopolysaccharid	52
2.2.2.11 Immunisierung mit Peptid in komplettem Freundschem Adjuvans	52
2.2.2.12 Immunisierung mit rekombinanten Viren (Herpes Simplex Viren Typ 1, HSV-OVA, HSV-GFP oder Vaccinia Viren, MVA-OVA, MVA)	53
2.2.2.13 Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i>	53
2.2.2.14 Markierung von Zellen mit Carboxyfluorescein-Diacetate-Succinimidylester (CFSE)	54
2.2.2.15 <i>In vivo</i> -Zytotoxizitätstest	54
2.2.2.16 Nachweis von Apoptose	55
2.2.2.17 Intrazelluläre Zytokinfärbungen in T-Zellen <i>ex vivo</i>	56
2.2.2.18 Herstellung von Knochenmarkchimären	57
2.2.2.19 Histologie	57
2.2.2.20 Statistik	58
3 ERGEBNISSE	60
3.1. Einfluss von Dendritischen Zellen auf die Selektion von CD8-T-Zellen <i>in vivo</i>	60
3.1.2 Genotypische Charakterisierung des CD11c-MHCI-Mausstamms	60
3.1.3 Phänotypische Charakterisierung des CD11c-MHCI-Mausstamms	61
3.1.3.1 Analyse der MHC-Klasse I-Expression auf peripheren Leukozyten	61

3.1.3.2 Analyse der MHC-Klasse I-Expression auf Thymuszellen	64
3.1.3.3 Histologische Analyse von Thymuszellen	66
3.2 Einfluss Dendritischer Zellen im Thymus auf das CD8-T-Zell- Repertoire	68
3.2.1 Analyse des CD11c- $\beta 2m$ Transgens auf die Frequenz CD8-T-Zellen im Thymus und in der Peripherie	68
3.2.2 Beteiligung von Epithelzellen des Thymus bei der positiven Selektion von CD8-T-Zellen	71
3.2.3 Positive Selektion von klassischen sowie nicht-klassischen CD8-T-Zellen durch DC im Thymus	73
3.2.4 Einfluss von DC auf die negative Selektion von CD8-T-Zellen	75
3.3 Die Rolle von Dendritischen Zellen bei CD8-T-Zell Antworten <i>in vivo</i>	79
3.3.1 Induktion von CD8-T-Zell-Immunität durch DC nach Immunisierung mit inflammatorischem Adjuvans und Antigen	80
3.3.1.1 Antigen spezifische CD8-T-Zell-Expansion im peripheren Blut	80
3.3.1.2 CD8-T-Zell-Expansion in CD11c-MHCI-Mäusen ist Antigen spezifisch und nicht durch Homeostase bedingt	83
3.3.1.3 Produktion des Effektorzytokins IFN γ durch OT-1-Zellen nach Antigen spezifischer Aktivierung	85
3.3.1.4 DC sind ausreichend zur Induktion funktioneller zytotoxischer T-Lymphozyten	86
3.3.1.5 Die Aktivierung naiver CD8-T-Zellen durch DC resultiert in verminderter OT-1-Zellteilungsrate	89
3.3.1.6 Verminderte Induktion von Apoptose bei DC-vermittelter CD8-Immunität	91
3.3.2 Die Rolle von DC bei der Induktion von CD8-Immunität nach Vakzinierung	93
3.3.2.1 CD8-T-Zell-Aktivierung nach Immunisierung mit unterschiedlichen viralen Vakzinen	93
3.3.2.2 Induktion funktioneller CTL nach Immunisierung mit HSV-OVA oder MVA-OVA	95
3.3.3 Einfluss Dendritischer Zellen auf die Toleranzinduktion <i>in vivo</i>	97
4 DISKUSSION	100
4.1 Einfluss von Dendritischen Zellen auf die Selektion von CD8-T-Zellen <i>in vivo</i>	100
4.1.1 Phänotypische Charakterisierung des CD11c-MHCI-Mausstamms	100
4.1.2 Einfluss Dendritischer Zellen im Thymus auf das CD8-T-Zell- Repertoire	102
4.2 Die Rolle von Dendritischen Zellen bei CD8-T-Zell-Antworten <i>in vivo</i>	107
4.2.1 Induktion von CD8-T-Zell-Immunität durch DC nach Immunisierung mit inflammatorischem Adjuvans und Antigen	107
4.2.2 Die Rolle von DC bei der Induktion von CD8-Immunität nach Vakzinierung	113
4.2.3 Einfluss Dendritischer Zellen auf die Toleranzinduktion <i>in vivo</i>	115
5 AUSBLICK	118
6 LITERATURVERZEICHNIS	120
7 LEBENS LAUF	132
8 DANKSAGUNG	136

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

Einheiten wurden mit dem international gebräuchlichen SI-System abgekürzt. Für Aminosäuren und Nukleotide wurde der Einbuchstabenkode verwendet. Für die Abkürzung gebräuchlicher Wörter wurde gemäß Duden verfahren.

AICD	Antigen-induzierter Zelltod (<i>antigen induced cell death</i>)
AIRE	Auto-Immun-Regulator Protein
APC	Antigenpräsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>) oder Allophycocyanin
BCR	B-Zell-Rezeptor (<i>B cell receptor</i>)
°C	Grad Celsius
CD	Oberflächenantigen (<i>cluster of differentiation</i>)
CFA	Komplettes Freundsches Adjuvans (<i>complete Freund's adjuvans</i>)
CFU	Kolonie bildende Einheiten (<i>colony forming units</i>)
cTECS	Epithelzellen im Thymuscortex (<i>cortical thymic epithelial cells</i>)
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt (<i>cytotoxic T lymphocyte</i>)
Cy-5	Cyanin-5
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
ds	doppelsträngig
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fc, FcR	Fragment kristallin (<i>Fragment crystallizable</i>), Fc-Rezeptor
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsorter (<i>fluorescence activated cell sorter</i>)
FBS	Fötales Kälberserum (<i>foetal bovine serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
H ₂ O _{bid}	zweifach destilliertes Wasser
HLA	humaner Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>human leukocyte antigen</i>)
HIV	Humanes Immundefekt-Virus (<i>human immunodeficiency virus</i>)
HSV	Herpes Simplex Virus

iCFA	Inkomplettes Freund'sches Adjuvans (<i>incomplete Freund's adjuvans</i>)
I.E.	infektiöse Einheiten
IL	Interleukin
i.p., i.v.	intraperitoneal, intravenös
INF	Interferon
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis-Virus
LPS	Lipopolysaccharid
mAb	monoklonaler Antikörper (<i>monoclonal antibody</i>)
mTECS	Epithelzellen in der Thymusmedulla (<i>medullary thymic epithelial cells</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MVA	modifiziertes Vaccinia Virus Ankara
OD	Optische Dichte
OVA	Hühner-Ovalbumin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline solution</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-a Protein
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
rLM-OVA	rekombinante Ovalbumin exprimierende <i>Listeria monocytogenes</i>
RT	Raumtemperatur
SA	Streptavidin
s.k.	subkutan
TAP	Transportkomplex (<i>transporter associated with antigen processing</i>)
TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>T cell receptor</i>)
T _H	T-Helferzelle
TLR	Toll-ähnliche Rezeptoren (<i>Toll-like receptors</i>)
TNF	Tumornekrosefaktor
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
wt	Wildtyp

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
w/w	Masse pro Masse
ZNS	Zentralnervensystem

ZUSAMMENFASSUNG

Dendritische Zellen (engl.: *dendritic cells*, DC) gelten seit ihrer Entdeckung als eine der wichtigsten Zelltypen des Immunsystems. Dies gilt sowohl für die Erzeugung von Immunität als auch von Toleranz, insbesondere in Bezug auf T-Zell-vermittelte Immunreaktionen (Banchereau *et al.* 1998). Im Zuge dessen wird in DC enorme Hoffnung bezüglich des Verständnisses von Autoimmunerkrankungen sowie Erkrankungen wie z.B. Krebs gesetzt, bei der DC schon seit einigen Jahren zur Immuntherapie verwendet werden (Banchereau *et al.* 2001). Die Analysen von DC beinhalteten jedoch bisher immer die Isolation von DC *ex vivo* oder deren Kultivierung *in vitro*. Diese experimentellen Versuchsschritte zeigten einen tiefgreifenden Einfluss auf den Phänotyp von DC und somit auch auf deren immunstimulatorischen Eigenschaften (Pierre *et al.* 1997; Gallucci *et al.* 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde durch die Entwicklung eines transgenen Maussystems erstmals der generelle Einfluss von DC auf CD8-T-Zellen *in vivo* detailliert analysiert. Dies konnte direkt an der Qualität der CD8-T-Zellantworten auf bestimmte Immunstimuli abgelesen werden, ohne die DC isolieren oder anderweitig manipulieren zu müssen. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Bedeutung von DC im Thymus bei der Selektion sich entwickelnder CD8-T-Zellen analysiert, da es in Bezug auf die Bedeutung von DC sowohl bei der positiven als auch bei der negativen Selektion widersprüchliche Meinungen gibt. Es konnte gezeigt werden, dass DC im Thymus nicht zur positiven Selektion von CD8-T-Zellen befähigt sind, sondern dass hierbei den Epithelzellen des Thymus eine entscheidende Bedeutung zukommt. Durch Zelltransferversuche konnte weiterhin gezeigt werden, dass DC zur Eliminierung autoreaktiver CD8-T-Zellen, und somit zur Induktion zentraler Toleranz, durch negative Selektion im Thymus ausreichen. Im zweiten Teil der Arbeit wurde das Vermögen von DC sowie die Qualität der durch sie induzierten CD8-T-Zell-Immunantworten untersucht. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass DC ausreichend sind, um eine vollständige und funktionelle Immunantwort durch CD8-T-Effektorzellen *in vivo* zu induzieren. Bei der Aktivierung von CD8-T-Zellen nur durch DC, konnten beim Vergleich mit Wildtyp-Mäusen jedoch auch qualitative sowie quantitative Unterschiede festgestellt werden, die eine mögliche Bedeutung weiterer Zellen bei der „Feinregulation“ CD8-basierter T-Zellantworten wahrscheinlich machen. Im Gegensatz hierzu konnten keine Unterschiede bei CD8-T-Zellreaktion nach Induktion von Toleranz erkannt werden. DC konnten in diesem Fall eindeutig als der hauptverantwortliche Zelltyp zur Erzeugung peripherer Toleranz *in vivo* identifiziert werden.

1 EINLEITUNG

Das Immunsystem ist eine körpereigene Funktionseinheit, die den Organismus gegen infektiöse Erreger, Parasiten sowie körperfremde pathogene Substanzen, aber auch gegen entartete körpereigene Zellen schützt. Die gemeinsame und koordinierte Reaktion so genannter Immunzellen und bestimmter immunologisch aktiver Moleküle bilden das Immunsystem. Die Wirkungsweise lässt sich in die zwei grundlegende Bereiche Immunität und Toleranz unterteilen. Um eine Schutzfunktion zu gewährleisten, müssen pathogene körperfremde Antigene (lösliche und zelluläre Substanzen, die eine immunologische Reaktion hervorrufen können) eindeutig von antigenen Strukturen des eigenen Organismus unterschieden werden. Während der Kontakt des Immunsystems mit körpereigenen Substanzen zur immunologischen Reaktionsunfähigkeit führt (→ Immuntoleranz), ruft ein Kontakt mit körperfremden Substanzen eine Aktivierung des Immunsystems hervor, die zur Eliminierung der Antigene führt (→ Immunität). Liegt eine Störung dieser beiden Mechanismen vor, kommt es zur so genannten Autoimmunität. Hierbei erkennt das Immunsystem körpereigene Antigene fehlerhaft als körperfremd, was zum Verlust von Immuntoleranz und somit zu Zell- und Gewebsschädigungen führt. Auch Allergien entstehen durch eine Fehlfunktion des Immunsystems. Hierbei rufen nicht-pathogene körperfremde Antigene fälschlicherweise Immunreaktionen vor, die normalerweise zur Eliminierung pathogener Fremdstoffe auftreten.

Das Immunsystem der Vertebraten, insbesondere das der Säugetiere, lässt sich funktionell in zwei unterschiedliche Bereiche einteilen: das angeborene und das erworbene (adaptive) Immunsystem. Ersteres dient der sofortigen Antwort auf eindringende Pathogene durch relativ unspezifische zelluläre und biochemische Abwehrreaktionen und besitzt ein limitiertes Set an präexistierenden Rezeptoren. Die Bestandteile dieses Immunsystems sind die Epithelien der Schleimhäute sowie der Haut, die einen physischen Schutzwall gegen eindringende Pathogene bilden. Weitere Bestandteile sind antimikrobielle Substanzen, die Proteine des Komplementsystems im Blut, und vor allem phagozytierende Zellen wie Neutrophile und Makrophagen, sowie die so genannten natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen).

Das adaptive Immunsystem zeichnet sich dadurch aus, dass es im Gegensatz zum angeborenen eine hohe Spezifität gegen ein Antigen entwickelt, wobei sich darüber hinaus bei jedem erneuten Aufeinandertreffen mit demselben Antigen die Affinität der spezifischen Antigenrezeptoren weiter erhöht. Diese Spezifität befähigt dazu, auch sehr ähnliche Pathogene bzw. Moleküle unterscheiden zu können. Ein weiteres Charakteristikum der adaptiven Immunität ist die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, welches dem

Organismus ermöglicht, bei einem wiederholten Aufeinandertreffen mit dem Pathogen schneller und effizienter zu reagieren. Die Effektormechanismen des adaptiven Immunsystems stehen jedoch nicht unmittelbar bereit, sondern müssen induziert werden und wirken erst einige Tage nach Beginn einer Infektion.

Innerhalb des adaptiven Immunsystems werden zwei unterschiedliche Typen der Immunantwort unterschieden. Für die zellulären Antworten sind T-Lymphozyten (T-Zellen) verantwortlich, während für die so genannte humorale Antwort die Antikörper produzierenden B-Lymphozyten (B-Zellen) verantwortlich sind. T- und B-Zellen tragen auf ihrer Zelloberfläche Antigen spezifische Rezeptoren (T-Zell-Rezeptor, engl.: *T cell receptor*, TCR; B-Zell-Rezeptor, engl.: *B cell receptor*, BCR), mit denen sie Antigene erkennen. Der BCR ist ein membranständiges Antikörpermolekül, der Antigen-Rezeptor sowie Effektormolekül ist. Nach Antigenerkennung durch den BCR und gleichzeitiger Aktivierung, differenziert und proliferiert die B-Zelle in den B-Zell-Regionen der sekundären lymphatischen Organe zu antikörperproduzierenden Plasmazellen. Die löslichen Antikörper sind befähigt, die Antigene in der Peripherie spezifisch zu binden, welche zuvor ihre Bildung ausgelöst haben. Antikörper dienen z.B. zur Neutralisierung von bakteriellen Toxinen, zur Oponierung von Pathogenen, um sie Phagozyten kenntlich zu machen oder zur Aktivierung des Komplementsystem, welches antikörpervermittelt auf dem Pathogen aktiviert wird und dieses eliminiert. Um B-Zellen zu aktivieren ist größtenteils ein zusätzliches Signal von T-Zellen notwendig. Im Fall von Antigenen, bei denen es sich nicht um Proteine handelt (Polysaccharide, Glykolipide und Nukleinsäuren), ist auch eine T-Zell-unabhängige Aktivierung möglich.

Der TCR hingegen ist ein membrangebundener aus mindestens sieben Untereinheiten bestehender Molekülkomplex. Die Antigenerkennung erfolgt ausschließlich durch Präsentation prozessierter Antigenpeptide auf Proteinen des Haupt-histokompatibilitätskomplexes (engl.: *major histocompatibility complex*, MHC). Diese Peptidstücke werden den T-Zellen von so genannten antigenpräsentierenden Zellen (engl.: *antigen presenting cells*, APC) präsentiert. Die Effektormechanismen zur Eliminierung der antigentragenden Pathogene der zellulären und humoralen Immunantwort unterscheiden sich grundlegend. Nach Aktivierung in den T-Zellbereichen der sekundären lymphatischen Organe, expandieren die T-Zellen und patrouillieren anschließend durch den Organismus auf der Suche nach ihrem spezifischen Antigen, durch das sie zuvor aktiviert wurden.

Im Gegensatz zur limitierten Antigenerkennung durch das angeborene Immunsystem wird beim adaptiven Immunsystem eine wesentlich höhere Rezeptordiversität durch die somatische Rekombination verschiedener, nicht-homologer, vererbter Gensegmente erhalten. So wird

beispielsweise das TCR-Repertoire auf 10^{12} - 10^{15} und das BCR-Repertoire auf $>10^{11}$ unterschiedliche Varianten geschätzt.

Da in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Dendritischen Zellen auf CD8-T-Zellen untersucht wurde, soll im folgenden hauptsächlich auf diese beiden Zelltypen eingegangen werden.

1.1 TCR- und MHC-Moleküle, die zentralen Moleküle zur Antigenerkennung und -Präsentation

1.1.1 Der T-Zell-Rezeptor

Der TCR ist ein Heterodimer aus zwei durch eine Disulfidbrücke verbundene, membranständige Glykoproteinketten. 95 % der T-Zellen exprimieren eine α - und β -Kette, 5 % eine γ und δ -Kette. Die Effektivität des Immunsystems wird durch die Fähigkeit erreicht, nahezu alle vorkommenden Antigene mit spezifischen Rezeptoren erkennen zu können. Hierzu bestehen die einzelnen Polypeptidketten, ähnlich den Antikörpern, aus einem variablen (V-Domäne), und einem konstanten Teil (C-Domäne, engl.: *crystallizable*). Die Vielfältigkeit im variablen Teil wird durch den Prozess der somatischen Rekombination während der T-Zellentwicklung erreicht. Hierbei werden verschiedene für den TCR-Komplex verantwortlichen Gensegmente (V-, D-, und J-Segmente) durch einen Umlagerungsprozess immer wieder neu kombiniert. Zusätzliche Diversität wird durch den ungerichteten Einbau von N-Nukleotiden während der Genumlagerung erreicht, wobei insgesamt zirka $>10^{12}$ unterschiedliche TCR-Varianten entstehen können. Zur Stabilisierung in der Zellmembran sowie zur Signaltransduktion ist der TCR zusätzlich mit den CD3-Heterodimeren ($\gamma\epsilon$ oder $\delta\epsilon$) und dem ζ -Ketten-Homodimer assoziiert.

1.1.2 MHC-Moleküle

Zur Antigenpräsentation und somit zur Aktivierung zellulärer, adaptiver Immunantworten sind spezielle Proteine, die von Genen des Haupthistokompatibilitätskomplexes kodiert werden, notwendig. Die beiden Hauptproteine, die unmittelbar mit der Antigenpräsentation assoziiert sind, sind die MHC-Klasse I und II Moleküle. MHC-I-Moleküle präsentieren antigene Peptide CD8-T-Zellen und MHC-II-Moleküle CD4-T-Zellen (Zinkernagel *et al.* 1974). Die Gesamtheit der hochpolymorphen MHC-Gene, die sich beim Menschen auf

Chromosom 6 befinden, werden HLA-System (engl.: *human leucocyte antigen system*) genannt. In der Maus befinden sie sich auf Chromosom 17 und werden als H-2 bezeichnet. Für MHC-I-Moleküle kodieren in Mensch und Maus insgesamt drei Gene (*HLA-A, -B, -C; H-2K, D, L*), für MHC-II im Menschen die Gene *HLA-DP, -DQ, -DR*, in der Maus *H-2 I-A* und *H-2 I-E*. MHC-I- und MHC-II Gene kodieren für zwei Gruppen strukturell unterschiedlicher Proteine. Der außergewöhnliche Polymorphismus wird durch die unterschiedlichen Allele für einzelne MHC-Loci erreicht. Bei Maus-Inzuchtstämmen hat der gesamte Haplotyp (der von jedem Elternteil stammende haploide Teil der vererbten Allele eines Genlokus) jedes Individuums das gleiche Allel. So tragen beispielsweise die Individuen des C57BL/6-Stammes auf allen H-2 Regionen das Allel b (*H-2^b*). Strukturell bestehen MHC-I-Moleküle aus einer schweren α -Kette und dem nicht kovalent gebundenen, nicht polymorphen Polypeptid β_2 -Mikroglobulin, welches nicht im MHC kodiert wird. Nur die α -Kette des Heterodimers ist membranständig und besteht aus einem zytoplasmatischen, transmembranen und extrazellulären Bereich. Der extrazelluläre Teil der α -Kette bildet insgesamt drei Domänen, wobei die Domänen $\alpha 1$ und $\alpha 2$ durch eine spezielle Einstülpung die Peptid-Bindungstasche bilden und Peptide einer Länge von 8-11 Aminosäuren binden. Hier befindet sich auch der polymorphe Teil des Moleküls, um möglichst alle in der Natur auftretenden Antigene binden zu können. Die $\alpha 3$ Domäne und das an sie bindende β_2 -Mikroglobulin bilden immunglobulinähnliche Strukturen aus. MHC-I-Moleküle werden von allen kernhaltigen Zellen des Organismus exprimiert und sind somit in der Lage, Antigene CD8-T-Zellen zu präsentieren.

Neben den beschriebenen so genannten klassischen MHC-I-Molekülen (auch MHC-Ia) werden auch nicht-klassische MHC-I- (oder MHC-Ib) Moleküle exprimiert. Die MHC-Ib-Genloci befinden sich größtenteils im MHC, es sind aber auch MHC-Ib-Moleküle bekannt, deren Loci nicht im MHC liegen. Strukturell ähneln MHC-Ib- den MHC-Ia-Molekülen. Auch sie bilden eine mit β_2m assoziierende α -Kette aus, die zusammen auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Im Unterschied zu den klassischen MHC-I-Molekülen sind nicht-klassische MHC-Moleküle weit weniger polymorph und werden auch in wesentlich geringerer Menge auf der Zelloberfläche exprimiert. Für viele MHC-Ib-Moleküle konnte eine Funktion im Zusammenhang mit Antigenpräsentation gezeigt werden. Am besten untersucht ist hier das H-2M3 Molekül, welches Peptide mit N-formylierten Aminoenden CD8-Zellen präsentiert (Lindahl *et al.* 1997). Dies prädestiniert das H-2M3-Molekül zur Präsentation bakterieller Peptide, da alle Prokaryonten ihre Proteinsynthese mit N-Formyl-Methionin beginnen. Folgende MHC-Ib-Genloci sind bisher identifiziert: *H-2M, Q* und *T* in der Maus und *HLA-E, -F, -G, -H, -I* und *-J* im Menschen. Bekanntestes nicht im MHC kodiertes MHC-Ib-Molekül in der Maus und bei Menschen ist das CD1-Oberflächenmolekül (Shawar *et al.* 1994).

MHC-II-Moleküle sind den MHC-I-Molekülen strukturell verwandt, bestehen aber aus zwei membranständigen Ketten (α und β) mit jeweils zytoplasmatischem-, transmembranem- und extrazellulärem Bereich. Letzterer bildet zwei Domänen, wobei jeweils die sich gegenüberliegenden, polymorphen α 1- und β 1-Domänen die Peptidbindungstasche formen, in der Peptide bis 30 Aminosäuren und vereinzelt auch länger binden und CD4-T-Zellen präsentiert werden. Auch bei den MHC-II-Molekülen kann zwischen klassischen und nicht-klassischen Molekülen unterschieden werden. Die bekanntesten nicht-klassischen MHC-II-Moleküle sind die HLA-DM- und HLA-DO-Moleküle, die katalytische Funktionen bei der Peptidbeladung von MHC-Molekülen haben.

1.2 Die Effektorzellen des zellvermittelten adaptiven Immunsystems

1.2.1 T-Lymphozyten

Thymusabhängige Lymphozyten (T-Lymphozyten) entstehen aus Vorläuferzellen im Knochenmark und reifen charakteristisch für diese Zellpopulation im Thymus. Von dort patrouillieren sie ausdifferenziert als naive CD4- oder CD8-T-Zellen durch Blut, Lymphe, interstitielle Körperflüssigkeiten und die thymusabhängigen Bereiche der sekundären lymphatischen Organe. Treffen sie auf ihr Antigen, können sie bei gleichzeitigen aktivierenden Signalen zu Effektorzellen differenzieren.

1.2.1.1 CD4- und CD8-positive Zellen

CD4-T-Zellen exprimieren als charakteristisches Oberflächenmolekül den CD4-Korezeptor, CD8-T-Zellen den CD8-Korezeptor. In beiden Fällen handelt es sich um Glykoproteine, die für die Bindung der jeweiligen TCR an MHC-Moleküle verantwortlich sind. Der CD4-Korezeptor liegt als Monomer vor und besteht aus vier immunglobulinähnlichen Domänen bei denen die ersten beiden Domänen an der Bindung von MHC-II-Molekülen beteiligt sind.

Der CD8-Korezeptor ist ein Heterodimer aus α - und β -Kette, die durch eine Disulfidbrücke kovalent verbunden sind und ausschließlich mit MHC-I-Molekülen interagieren. Beide Korezeptoren binden, im Gegensatz zum TCR, an die konstanten Teile der MHC-Moleküle (CD4 an die β 2-Domäne von MHC-II, CD8 an die α 3-Domäne von MHC-I).

CD8-positive Zellen differenzieren nach ihrer Aktivierung zu zytotoxischen T-Lymphozyten, die in der Lage sind, Zielzellen - virusinfizierte oder entartete körpereigene Zellen - direkt abzutöten. Sie sind auch verantwortlich für die Abstoßung von Transplantaten bei unterschiedlichem MHC-Allotyp.

Die Aufgabe der CD4-T-Zellen ist die Unterstützung des zellvermittelten sowie des humoralen Teils der adaptiven Immunantwort. Je nach Zusammensetzung des Zytokinmilieus bei der CD4-Aktivierung, differenzieren sie zu Helferzellen des Typ1 (T_H1) oder des Typ2 (T_H2). T_H1 -Zellen entwickeln sich in Gegenwart von IL-12 und $IFN\gamma$. Sie produzieren selbst $IFN-\gamma$ und aktivieren mononukleäre Phagozyten gegen intrazelluläre Mikroben. T_H2 -Zellen entwickeln sich in Gegenwart von IL-4. Sie produzieren IL-4 und IL-5 und sind dadurch wichtig für die Produktion von IgE.

1.2.1.2 Entwicklung von T-Lymphozyten

Die Vorläuferzellen der T-Lymphozyten aus dem Knochenmark wandern in den Thymus (Boyd *et al.* 1991; Anderson *et al.* 1996) und durchlaufen dort während ihrer Entwicklung drei Stadien, die sich am deutlichsten anhand der Expression ihrer Korezeptormoleküle definieren lassen. Im ersten Stadium exprimieren die Lymphozyten weder CD4 noch CD8 und werden als doppelt negative (DN) T-Lymphozyten bezeichnet. In dieser ersten Phase beginnt das Genrearrangement und die Expression der TCR- β -Kette, des so genannten präTCR (von Boehmer *et al.* 1997). Wurde eine funktionelle β -Kette exprimiert, geht die T-Zellentwicklung in ihre zweite Phase über. Jetzt exprimieren alle Thymozyten sowohl CD4- als auch CD8-Korezeptormoleküle, sowie geringe Mengen der funktionellen β -Kette (doppelt positive (DP) $CD4^+CD8^+TCR\beta^{lo}$). In dieser Phase werden die Gene der α -Kette rearrangiert und die α -Kette exprimiert. Diese DP $CD4^+CD8^+TCR\alpha\beta^{lo}$ -Lymphozyten exprimieren erstmals den heterodimeren $\alpha\beta$ -TCR in geringer Menge und regulieren dessen Expression während der weiteren Reifung zunehmend herauf (DP $CD4^+CD8^+TCR\alpha\beta^{hi}$). Während dieser Phase werden die T-Lymphozyten sensibel für einen zweistufigen Selektionsprozess, der die Funktionalität und die Reaktivität des TCR gegenüber MHC-Molekülen überprüft. Nach diesen Selektionsprozessen (die im Anschluss näher dargestellt werden), in der dritten Entwicklungsphase, differenzieren diejenigen DP-Lymphozyten, die einen mit MHC-II-Molekülen reagierenden TCR exprimieren, zu einfach positiven $CD4^+TCR\alpha\beta^{hi}$ -Lymphozyten (engl.: *single positive*, SP). DP-Lymphozyten, deren TCR mit MHC-I-Molekülen reagiert, differenzieren zu SP $CD8^+TCR\alpha\beta^{hi}$ -Lymphozyten. In diesem Stadium ist die Thymusentwicklung der T-Lymphozyten abgeschlossen und sie verlassen den Thymus als

naive CD8- bzw. CD4-T-Zellen. Den beschriebenen Entwicklungsstadien lassen sich auch bestimmte Aufenthaltsbereiche im Thymus zuordnen. Im Laufe ihrer Entwicklungsstadien wandern die Thymozyten vom Rand des Thymus immer weiter ins Innere des Organs. Die CD8/CD4 doppelt negativen Vorläuferzellen (DN-Thymozyten) befinden sich zuerst im äußersten Rand des Thymuscortex, dem subkapsikulären Bereich. Von dort besiedeln die CD8/CD4 doppelt positiven DP-Thymozyten hauptsächlich den Cortex und den sich weiter im Inneren des Organs befindlichen Übergangsbereich zur Medulla. Die gereiften CD8 bzw. CD4 einfach positiven Thymozyten (engl.: *single positive thymocytes*, SP-Thymozyten) befinden sich in der Medulla und verlassen dort den Thymus über Lymphgefäße und Venolen in die Peripherie.

1.2.1.2.1 Positive und Negative Selektion

Im Laufe der T-Zell Entwicklung von DP- zu SP-T-Zellen unterliegen Thymozyten zwei unterschiedlichen Selektionsprozessen, der positiven und negativen Selektion. Während der positiven Selektion wird der TCR jeder T-Zelle auf seine Funktionalität geprüft. T-Zellen müssen in der Lage sein, über ihren TCR Antigen zu erkennen, welches ihnen über MHC-Moleküle präsentiert wird. Um die generelle Fähigkeit des TCR Peptide im MHC-Verbund zu testen, wird den DP-Thymozyten Peptid auf MHC-Molekülen präsentiert. Kann der TCR nicht an den Peptid-MHC-Komplex binden, wird die T-Zelle eliminiert. Ist der Lymphozyt in der Lage, mit dem MHC-Komplex zu interagieren, muss sichergestellt werden, dass er durch die ungerichtete Rekombination der α - und β -Kettengene keinen TCR exprimiert, der eine Reaktivität gegenüber Autoantigenen aufweist. Die T-Zellen mit autoreaktiven TCR werden eliminiert, da sie in der Peripherie potenziell körpereigene Zellen und Gewebe angreifen können. Durch den Vorgang der negativen Selektion wird so genannte zentrale Toleranz erzielt, da alle autoreaktiven T-Zellen zentral im Thymus eliminiert werden (Übersichtsartikel (Sebzda *et al.* 1999)). Durch die beiden Selektionsprozesse sterben ca. 75% aller Prä-TCR-exprimierenden T-Zellen. Der Prozess der negativen Selektion ist jedoch nicht 100%ig effektiv, da in gesunden Individuen autoreaktive T-Lymphozyten in der Peripherie gefunden wurden (Liblau *et al.* 1991). Diese T-Zellen entgehen der negativen Selektion, da nicht alle organspezifischen peripheren Antigene im Thymus präsentiert werden (Übersichtsartikel (Walker *et al.* 2002)). Die peripheren autoreaktiven T-Zellen werden, wie die autoreaktiven Thymozyten, eliminiert und somit periphere Toleranz erzeugt. Die Eliminierung von Thymozyten, wie von peripheren T-Zellen, geschieht hauptsächlich durch klonale Deletion, wird aber auch durch Induktion von Anergie oder Suppression durch regulatorische T-Zellen

erreicht (Mamalaki *et al.* 1996; Lanoue *et al.* 1997; Annacker *et al.* 2001; Palmer 2003; Venanzi *et al.* 2004).

1.2.1.2.1.1 Quantitatives / Aviditäts Modell

Der genaue Mechanismus der positiven und negativen Selektion im Thymus ist bis heute nicht vollständig geklärt. Am wahrscheinlichsten erscheint ein Modell, bei dem die Intensität der Interaktion des TCR mit ein und demselben Antigen die unterschiedlichen Selektionsprozesse bewirkt. Interagiert der TCR des Thymozyten mit einer geringen Bindungsfestigkeit (Avidität), resultiert hieraus positive Selektion, reagiert er hingegen mit einer sehr hohen Avidität gegen das präsentierte Selbst-Peptid, wird der Thymozyt negativ selektioniert (Sprent *et al.* 1988; Ashton-Rickardt *et al.* 1994b; Williams *et al.* 1997). Des Weiteren ist die Konzentration der präsentierten Peptide für die Selektion ausschlaggebend, da auch die Konzentration an T-Zell-Rezeptoren mit zunehmender Entwicklung eines Thymozyten zunimmt. Ist die Konzentration eines Peptids gering, reagieren weniger TCR auf dem Thymozyten. Bei niedriger Konzentration werden die T-Zellen, die mit diesem Antigen spezifisch interagieren, positiv selektioniert. Wird das gleiche Peptid aber in hoher Konzentration präsentiert, bewirkt die große Anzahl an Wechselwirkungen auf einem Thymozyten dessen negative Selektion (Ashton-Rickardt *et al.* 1994a; Sebzda *et al.* 1994; Cook *et al.* 1997; Fukui *et al.* 1997).

1.3 Die Rolle von antigenpräsentierenden Zellen (APC) bei der erworbenen Immunität

Bei antigenpräsentierenden Zellen handelt es sich um Zellpopulationen, die Lymphozyten körpereigene sowie Fremdartigene nach proteolytischem Abbau über MHC-Klasse I- oder II präsentieren. Zusätzlich versorgen sie die Lymphozyten mit Signalen, die deren Proliferation und Differenzierung zu Effektorzellen induzieren. Dieser Vorgang wird als Kostimulation bezeichnet und durch spezielle Oberflächenproteine erreicht. Hauptsächlich wird die zur Aktivierung von T-Zellen notwendige Kostimulation neben der Antigenpräsentation durch Expression des B7-Moleküls ermöglicht. Dieses Molekül liegt in zwei strukturell sehr ähnlichen Formen als B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) vor, welche an die CD28- und CTLA-4-Ko-Rezeptor auf T-Zellen binden. APC, die zur Kostimulation naiver Lymphozyten befähigt

sind, werden auch als „professionelle APC“ bezeichnet, zu denen Dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen gehören.

1.3.1 Makrophagen

Makrophagen stellen ein wichtiges Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität dar. Makrophagen sind Zellen des mononukleären phagozytären Systems und entwickeln sich im Knochenmark aus CD34⁺-Stammzellen zu Monoblasten. Im Übergang zu den noch nicht vollständig differenzierten Monozyten verlassen sie das Knochenmark und gelangen über den Blutstrom in fast jeden Teil des Organismus, wo sie endgültig ausdifferenzieren. Je nach endgültigem Aufenthaltsort werden Makrophagen unterschiedlich bezeichnet: Makrophagen in der Lunge heissen Alveolarmakrophagen, im Bindegewebe Histiozyten, in der Leber Kupffersche Sternzellen und im ZNS Mikroglia. Durch Phagozytose und Eliminierung großer infektiöser Partikel wie Bakterien oder Parasiten sowie durch ihre Zytokinproduktion zur Regulation anderer Effektorzellen, stellen sie einen grundlegenden Bestandteil der angeborenen Immunität dar und spannen darüber hinaus den Bogen zum erworbenen Immunsystem. Die nach Phagozytose und Eliminierung von Pathogenen entstandenen antigenen Peptidfragmente werden auf MHC-Molekülen präsentiert (Steinman *et al.* 1973; Debrick *et al.* 1991; Kovacsovics-Bankowski *et al.* 1993). Makrophagen sind in der Lage naive CD8-T-Zellen zu aktivieren, jedoch weniger effizient als andere APC (Steinman *et al.* 1973).

1.3.2 B-Zellen

Neben der Antikörperproduktion als Hauptfunktion besitzen B-Zellen auch die Fähigkeit, Antigene zu internalisieren und sie T-Zellen zu präsentieren (Ke *et al.* 1996). Durch ihren hochaffinen Immunglobulin (Ig)-Rezeptor werden Antikörper-gebundene exogene Antigene durch rezeptorvermittelte Endozytose internalisiert, prozessiert und hauptsächlich auf MHC-II Molekülen präsentiert. B-Zellen entwickeln sich in der fötalen Leber und im adulten Knochenmark über distinkte einzelne Entwicklungsstufen: ausgehend von der multipotenten Knochenmarkzelle über die Pro-B-, Prä-B-I-Zelle und drei unterscheidbare Prä-B-II-Zellstadien bis zum ausdifferenzierten B-Lymphozyten. Die reifen naiven B-Zellen zirkulieren durch Blut, Gewebe, Lymphe und Knochenmark. Treffen sie mit ihrem BCR auf

ihr spezifisches Antigen, differenzieren sie in den sekundären lymphatischen Organen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen.

1.3.3 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DC) befinden sich in lymphoiden Organen, in fast allen Geweben und Epithelien, und repräsentieren dort ca. 1-2% aller Zellen (Banchereau *et al.* 1998; Banchereau *et al.* 2000). Sie erhielten ihren Namen durch die charakteristischen langen, verzweigten zytoplasmatischen Fortsätze. DC entwickeln sich aus CD34⁺-Vorläuferzellen im Knochenmark und wandern von dort in die Peripherie (Banchereau *et al.* 1998). In diesem unreifen Stadium besitzen DC eine hohe Kapazität zur Antigeninternalisierung und exprimieren nur eine geringe Menge an MHC- sowie kostimulatorischen Oberflächenmolekülen. Sie patrouillieren durch das Blut, periphere Gewebe, die Lymphe sowie die peripheren lymphatischen Organe, um dort körperfremde wie auch körpereigene Antigene aufzunehmen.

Mikrobielle Pathogene bzw. Antigene dringen zumeist über die Haut, den Gastrointestinaltrakt oder über den respiratorischen Trakt in den Organismus ein. Diese Antigene gelangen durch DC in die drainierenden Lymphknoten, während Pathogene, die den Organismus über den Blutstrom erreichen, von DC in der Milz aufgenommen werden. Nach der Aufnahme von pathogenem Antigen durchläuft die DC einen fundamentalen Entwicklungsprozess (Thery *et al.* 2001). Die Fähigkeit zu weiterer Internalisierung von extrazellulären Partikeln verringert sich, die Expression von MHC-Klasse I- und II wird verstärkt und die Wanderungsfähigkeit nimmt stark zu. Während im unreifen Entwicklungsstadium verstärkt Oberflächenrezeptoren für inflammatorische Chemokine wie z.B. CCR1, CCR2, CCR5 und CCR6 exprimiert werden, um die DC zu Entzündungsorten im Organismus zu leiten, werden auch diese nach Antigenaufnahme vermindert exprimiert. Dies ermöglicht den DC, entzündliche Gewebe zu verlassen, um in den sekundären lymphatischen Organen naive T-Lymphozyten zu aktivieren. Um dorthin zu gelangen wird die Expression konstitutiv exprimierter Oberflächenrezeptoren wie z.B. CCR4, CCR7 und CXCR4 gesteigert. Dies ermöglicht die Orientierung durch die Bindung mit den entsprechenden Liganden wie SDF-1 (Stromazellfaktor-1, engl.: *stroma cell derived factor-1*, oder auch CXCL12), SLC (sekundäres Lymphgewebe Zytokin, engl.: *secondary lymphoid tissue chemokine* oder auch CCL21) auf lymphatischen Endothelzellen (Banchereau *et al.* 1998; Sallusto *et al.* 1998; Hartgers *et al.* 2000). Die Durchwanderung der postkapillären Venolen mit hohem Endothel (HEVs, engl.: *high endothelial venules*), um in lymphatisches Gewebe

1 EINLEITUNG

einzuwandern, wird auch durch bestimmte Adhäsionsmoleküle wie z.B. DC-SIGN erreicht. Am Ende des Reifungsprozesses wird durch Expression des CCR7-Liganden ELC (Eppstein-Barr Virus induziertes Molekül 1 Ligand Chemokin, engl.: *Eppstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine* oder auch CCL19) das Einwandern in die T-Zell-Zonen im Lymphknoten ermöglicht (Baekkevold *et al.* 2001).

Neben der Fähigkeit membrangebundene kostimulatorische Moleküle zu exprimieren, besitzen DC auch die Möglichkeit zur Produktion löslicher Kostimulatoren. Nach Aktivierung von DC konnte gezeigt werden, dass durch sie eine Reihe löslicher Zytokine, wie z.B. IL-1 (Stephens *et al.* 2003), IL-6 (Stephens *et al.* 2003; Brzoza *et al.* 2004), IL-10 (Brzoza *et al.* 2004) und IL-12 (Maldonado-Lopez *et al.* 1999; Hochrein *et al.* 2001), produziert werden. Bei einem Teil dieser Zytokine konnte bereits ein kostimulatorischer Einfluss auf T-Zellen nachgewiesen werden (Schmidt *et al.* 1999; Hernandez *et al.* 2002). Besonders gut untersucht ist der Einfluss der IL-12-Sekretion durch DC auf CD8-T-Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass eine funktionale CTL-Aktivierung nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von IL-12 stattfinden konnte (Curtsinger *et al.* 1999; Schmidt *et al.* 1999; Schmidt *et al.* 2002). Somit wird IL-12 auch als dritter notwendiger Bestandteil, neben der Antigenerkennung und der Kostimulation über B7-Moleküle, zur Induktion von CD8-T-Zell-Immunität bezeichnet (Curtsinger *et al.* 2003).

Tabelle 1: Übersicht der wichtigsten APC und deren Eigenschaften

APC	MHC-Klasse II- Expression	Expression kostimulatorischer Moleküle	Aufnahme von exogenem Antigen
B-Zellen	konstitutiv, erhöhtbar durch IFN γ	induzierbar durch T-Zell Interaktion (CD40-CD40L), Kreuzvernetzung des Antigen-Rezeptors	durch Antigen spezifischen Rezeptor (BCR)
Makrophagen	niedrig, induzierbar durch IFN γ	induzierbar durch LPS, IFN γ , CD40-CD40L-Interaktion	Phagozytose/ Endozytose
Dendritische Zellen	konstitutiv, erhöhtbar durch IFN γ	konstitutiv, vermehrt nach Reifung, induzierbar durch IFN γ , CD40-CD40L- Interaktion	Phagozytose/ Endozytose

1.3.3.1 DC-Subpopulationen

Die Identifizierung und Untersuchung von DC wurde erst möglich durch das Auffinden eines DC-spezifischen Markers. Dieses bis heute charakteristische Merkmal aller bekannten DC ist das heterodimere Leukozytenintegrin CD11c. Dieses Molekül gehört zu einer Familie von Adhäsionsmolekülen, die aus einer großen α -Kette (CD11) und einer nicht-kovalent gebundenen β -Kette (CD18) bestehen. Sie werden auch als β_2 -Integrine (M_r : 95 kDa) klassifiziert, und anhand der α -Kette in CD11a- (M_r :180 kDa), CD11b- (M_r : 165 kDa) und CD11c- (M_r : 145 kDa) Integrine unterteilt. Vor allem CD11b und CD11c sind klassische Monozyten-Marker. Aufgrund der unterschiedlichen Monozyten-Differenzierung, lassen sich DC von Makrophagen anhand ihrer verschiedenen β_2 -Integrin-Expressionsmustern abgrenzen. Dendritische Zellen stellen keinen einheitlichen Zelltypus dar, sondern lassen sich einzelnen Subpopulationen zuordnen. Während bis vor wenigen Jahren generell nur zwischen DC myeloiden und lymphoiden Ursprungs unterschieden wurde (Wu *et al.* 1996), zeigte sich in der näheren Vergangenheit, dass diese grobe Einteilung nicht weiter vertretbar ist. Im Folgenden werden die bis dato bekannten murinen Subpopulationen näher beschrieben.

1.3.3.1.1 Plasmazytoide DC

Plasmazytoide DC (pDC) sind in der Lage große Mengen an $IFN\alpha/\beta$ zu produzieren. Dies geschieht hauptsächlich durch Ligandenbindung an die Toll-ähnlichen Rezeptoren (engl.: *Toll-like receptors*, TLR) auf der Zelloberfläche. Diese Rezeptoren gehören zu einer Familie von membrangebundenen Proteinen. Alle bisher bekannten zehn TLR dienen der Erkennung unterschiedlicher mikrobieller Moleküle, die eine Aktivierung von Effektormechanismen gegen diese Pathogene durch Zellen der angeborenen Immunität zur Folge hat. Weiterhin scheinen pDC eine wichtige Rolle bei der Erkennung von Viren im Organismus zu spielen. Die genaue Funktion der $IFN\alpha/\beta$ -Ausschüttung ist bisher nicht genau geklärt, aber es gibt Hinweise auf einen Einfluss auf Virusreplikation und auf die Aktivierung anderer DC-Subpopulationen (Asselin-Paturel *et al.* 2001; Kadowaki *et al.* 2001; Nakano *et al.* 2001; Diebold *et al.* 2003; Le Bon *et al.* 2003).

1.3.3.1.2 Langerhans Zellen

Dieser Zelltyp befindet sich im Epithel der Haut und dient dem Aufspüren von Pathogenen, die über die Haut in den Organismus gelangen (Romani *et al.* 2003). Sind solche Antigene aufgenommen, tritt der bereits beschriebene Reifungsprozess ein, in dessen Verlauf die Langerhans Zellen von ihrem ursprünglichen Ort zu den drainierenden Lymphknoten wandern, um dort naiven T-Zellen die Antigene zu präsentieren (Mayerova *et al.* 2004), und sie gegebenenfalls zu aktivieren (engl. „*priming*“). Charakteristisch für diese Subpopulation sind bestimmte intrazelluläre Vesikel, die so genannten Birbeck-Partikel.

1.3.3.1.3 Dermale DC / Interstitielle DC

Diese DC-Subpopulation unterscheidet sich von den Langerhans Zellen durch das Fehlen der Birbeck-Partikel und durch eine signifikant niedrigere Expression des zur Mannose-Rezeptor-Familie gehörenden Moleküls DEC205 (CD205) (Henri *et al.* 2001). Für diese Population wurde von verschiedenen Gruppen die Beteiligung bei der Antigenpräsentation für CD4-T-Zellen und für die T_H1-vermittelten Immunantwort nach *Herpes Simplex Virus* Typ 2 (HSV-2) Infektion sowie nach intradermaler Injektion von *Leishmania major* gezeigt (Filippi *et al.* 2003; Itano *et al.* 2003; Von Stebut *et al.* 2003; Zhao *et al.* 2003).

1.3.3.1.4 CD8⁻CD4⁻DC und CD4⁺DC

Diese beiden Subpopulationen im Blut sind die bisher am wenigsten untersucht worden. Es gibt Berichte, dass CD8-negative DC-Populationen IFN γ -Produzenten (Hochrein *et al.* 2001) bzw. Initiatoren einer T_H2-dominierten Immunantwort sind. (Pulendran *et al.* 1999). Der hauptsächliche Aufenthaltsort unter nicht-infektiösen Bedingungen ist die Marginalzone der Milz. Nach Aktivierung mit LPS wurde gezeigt, dass sie in die T-Zell-Zonen einwandern können (De Smedt *et al.* 1996).

1.3.3.1.5 CD8⁺DC

Die CD8⁺DC ist die am besten untersuchte DC-Population. CD8⁺DEC205⁺DC befinden sich in den T-Zell-Zonen der sekundären lymphatischen Organe (De Smedt *et al.* 1996), aber auch im Thymus. In der Peripherie sind diese DC die Hauptproduzenten des T-Zell stimulierenden

Zytokins IL-12 (Steinman *et al.* 1997; Curtsinger *et al.* 2003). Bei dieser Population ist ein Mechanismus der Antigenpräsentation gut beschrieben, bei dem exogenes Antigen zur Aktivierung naiver CD8-T-Zellen prozessiert wird. Diese Art der Präsentation wird Kreuzpräsentation (engl.: *cross-presentation*) genannt und kann sowohl zur Aktivierung von Effektor-CD8-Zellen (Kreuzimmunität, engl.: *cross-priming*) (den Haan *et al.* 2000) als auch zur Toleranzinduktion (engl.: *cross-tolerance*) führen (Belz *et al.* 2002; Scheinecker *et al.* 2002).

Tabelle 2: Übersicht muriner DC Subpopulationen

DC-Typ	Oberflächenmarker						Vorkommen
	<i>CD11c</i>	<i>CD8</i>	<i>CD4</i>	<i>CD205</i>	<i>CD11b</i>	<i>CD45RA</i>	
CD8⁺DC	+	+	-	+	-	-	Blut, Thymus
CD4⁺DC	+	-	+	-	+	-	Blut
CD8⁻CD4⁺ DC	+	-	-	-	+	-	Blut
Langerhans Zellen	+	- bzw. niedrig	-	hoch	+	-	Epithel der Haut
Dermale DC, Interstitielle DC	+	-	-	+	±	-	Haut, Gewebe
Plasmazytoide DC	niedrig	±	±	-	-	+	Blut, Gewebe

(aus (Heath *et al.* 2004), verändert)

1.3.2 Antigenpräsentation

Da DC als die potentesten APC gelten, wird hier, falls nicht anders erwähnt, nur auf Eigenschaften von DC eingegangen.

Der Mechanismus der Antigenpräsentation lässt sich in drei wesentliche Abschnitte unterteilen; die Aufnahme von Antigen, dessen Prozessierung und schließlich die eigentliche Präsentation auf MHC-Molekülen.

Die Aufnahme externer Partikel, direkt in Form löslicher Moleküle oder Peptide, in Form größerer Komplexe, wie z.B. Zelltrümmer nekrotischer Zellen, ganzer apoptotischer Zellen oder in Form von Oberflächenmolekülen anderer Phagozyten, oder ganzer Mikroorganismen geschieht durch Endozytose (Sallusto *et al.* 1994; Sallusto *et al.* 1995), Phagozytose (Inaba *et al.* 1993; Moll *et al.* 1993), sowie Pinozytose (Sallusto *et al.* 1995). Die rezeptorinduzierte Endozytose und Phagozytose erlaubt die Aufnahme makromolekularer Teile bis hin zu ganzen Parasiten über die Plasmamembran. Unreife DC exprimieren zur Endozytose z.B.

verschiedene Fc-Rezeptoren (FcR) für Immunglobuline (Fc γ RI, Fc γ RII und Fc γ RIII (Esposito-Farese *et al.* 1995; Fanger *et al.* 1996). Im Gegensatz zur Maus exprimieren humane DC hauptsächlich Fc γ RII und Fc α R (Geissmann *et al.* 2001). Zusätzlich werden die Komplementrezeptoren CR3 und CR4 (Reis e Sousa *et al.* 1993) sowie so genannte „Fress-Rezeptoren (engl.: *scavenger receptors*, SR) exprimiert, deren Liganden hauptsächlich Lipoproteine bakterieller Herkunft sind, die aber auch zur Bindung und Internalisierung apoptotischer Zellen dienen (Platt *et al.* 1998; Nakamura *et al.* 2001). Des Weiteren sind DC in der Lage, Hitzeschockproteine von Tumorzellen oder abgestorbenen Zellen zu binden ((Arnold-Schild *et al.* 1999; Castellino *et al.* 2000; Basu *et al.* 2001) und Übersichtsartikel (Srivastava 2002)). Mono- und Oligosaccharide können durch C-Typ-Lektine wie z.B. den Makrophagen-Mannose-Rezeptor (MMR) (Sallusto *et al.* 1995; Nakamura *et al.* 2001) oder DEC 205 (Jiang *et al.* 1995) gebunden werden.

Makropinozytose, die eine Art Endozytose gelöster Moleküle durch Membraneinstülpungen darstellt, erfolgt rezeptorunabhängig und in unreifen DC konstitutiv (Sallusto *et al.* 1995). Dies erlaubt ihnen, die konstante, schnelle und unspezifische „Überwachung“ des sie unmittelbar umgebenden Fluids. Die Fähigkeit der Internalisierung von Antigen sowie die Wanderungsfähigkeit von DC wird andererseits von Pathogenen ausgenutzt. So nutzen verschiedene Viren wie z.B. das Masernvirus oder das *Simian Virus 40* (SV40) DC direkt, um vom Infektionsort der Schleimhäute in die drainierenden Lymphknoten zu gelangen (Werling *et al.* 1999; Marie *et al.* 2001). So nutzt andererseits das HIV das DC-Oberflächenmolekül DC-SIGN, welches der T-Zell-DC Interaktion und zum Verlassen der Blutgefäße dient, zur Bindung und Infektion von T-Zellen (Geijtenbeek *et al.* 2000).

1.3.2.1 MHC-II-Präsentation

Befindet sich das aufgenommene Antigen im Zellinneren der DC, muss es zur Präsentation auf MHC-II- (für CD4-T-Zellen) oder MHC-I-Molekülen (für CD8-T-Zellen) aufbereitet werden. Dies geschieht je nach Präsentation auf zwei verschiedene Arten. Exogene Antigene werden nach Internalisierung in Endosomen und Lysosomen enzymatisch durch Proteasen (hauptsächlich Kathepsine) für die Präsentation auf MHC-II-Molekülen degradiert. Die polymorphen α - und β -Untereinheiten der MHC-II-Moleküle werden im Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert. Je drei der $\alpha\beta$ -MHC-II-Dimere assoziieren mit einem Trimer der Invarianten Kette (engl.: *invariant chain*, Ii) (Cresswell 1996). Die invariante Kette stabilisiert die $\alpha\beta$ -Untereinheiten und verhindert, dass ungewollt Peptide im Peptidbindungsspalt binden. Dieser Komplex wird vom ER über den Golgi-Apparat in

Vesikeln zu den Endosomen/Lysosomen transportiert, in denen sich die degradierten antigenen Peptide befinden. Nach dem Verschmelzen beider Vesikel, wird durch die angesäuerte, proteasehaltige Umgebung Ii stufenweise degradiert. Zuerst wird die Ii gespalten, so dass nur ein 24 Aminosäure langes Peptidfragment (CLIP, engl.: *class II-associated invariant chain peptide*) im Bindungsspalt der MHC-Klasse II-Bindungstasche zurückbleibt. Um die degradierten Antigen-Peptide gegen CLIP auszutauschen, werden den MHC-II-Molekülen ähnliche Proteine (HLA-DM im Menschen, H-2M in der Maus) benötigt, die ebenfalls im MHC kodiert sind, jedoch nicht polymorph sind und auch nicht mit Ii assoziieren können. In B-Zellen ist ein weiteres Molekül, HLA-DO (Mensch) bzw. H-2O (Maus), am Austausch von CLIP gegen Antigen beteiligt, welches in Makrophagen und DC nicht vorkommt (Kropshofer *et al.* 1999). Durch die Bindung von Peptid wird der gesamte Komplex stabilisiert, so dass er lange genug auf der Zelloberfläche exprimiert werden kann, damit CD4-T-Zellen mit ihrem TCR und den nicht-polymorphen Regionen des MHC-II-Komplex bindenden CD4-Korezeptors erkannt werden können. Da die Zelle bei dem Prozess der MHC-Beladung nicht zwischen Peptiden körpereigener und körperfremder Herkunft unterscheiden kann, werden auf diese Weise alle möglichen Peptide auf der Zelloberfläche präsentiert.

1.3.2.2 MHC-I-Präsentation

Alle kernhaltigen Zellen sind in der Lage, endogene Peptide auf MHC-Klasse I-Molekülen zu präsentieren, da sie MHC-I konstitutiv exprimieren. Dies ist notwendig, da nach einer Virusinfektion diese Zellen durch das Immunsystem eliminiert werden müssen, um eine weitere Verbreitung des Virus zu verhindern. Auch präsentieren entartete Zellen tumorspezifische Antigene auf MHC-I-Molekülen und können so vom Immunsystem beseitigt werden. Hauptverantwortlich für diese Effektormechanismen sind MHC-I-restringierte CD8-T-Zellen. Endogene im Zytosol der Zelle auftretende Antigene werden entweder direkt durch Pathogene synthetisiert (z.B. durch Viren) oder entstammen Mikroben (z.B. *Listeria monocytogenes*), die nach ihrer Phagozytose den Phagosomen ins Zytosol entweichen können. Die nun zytosolischen Antigene werden proteolytisch in großen Multi-Protein-Komplexen, den Proteasomen, fragmentiert. Hierzu werden die zytosolischen Proteine zuerst durch Ubiquitinierung entfaltet und anschließend im Proteasom in Peptidstücke gespalten, die bereits die exakte Länge für die Peptidbindungstasche von MHC-I-Molekülen haben (Hendil *et al.* 2004). Die Proteasomsynthese selbst kann durch das inflammatorische Zytokin $\text{INF}\gamma$ gesteigert werden, was einem erhöhten Bedarf an

Antigenprozessierung und -Präsentation Rechnung trägt. Um MHC-I-Moleküle, die im Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert werden, mit den entstandenen Peptidfragmenten zu beladen, müssen die Peptide vom Zytosol ins ER transloziert werden. Dies geschieht durch ein heterodimeres Protein, das sich in der Membran des ER befindet. Dieses ATP-abhängige Transportmolekül TAP (engl.: *transporter associated with antigen processing*) transloziert vorzugsweise Peptidfragmente ins ER, die direkt durch das Proteasom entstanden sind. Des Weiteren ist TAP auf der Lumenseite des ER über ein Linkerprotein (Tapasin) an neusynthetisierte MHC-I-Moleküle nicht-kovalent gebunden. Wie die Proteasomsynthese wird auch die Synthese von TAP durch IFN γ gesteigert. Das Beladen der MHC-I-Moleküle erfolgt durch den Austausch von Tapasin gegen das durch TAP transportierte Antigen. Der somit entstandene Komplex aus α -Kette, β 2-Mikroglobulin und Peptid ist dadurch so stabilisiert, dass er das ER verlassen und über den Golgi-Komplex in Vesikeln an die Zelloberfläche transportiert werden kann. Fehlt eine dieser drei Bestandteile, ist der Transport des Molekülkomplexes aus dem ER gestört und er kann, wenn überhaupt, nur sehr kurz auf der Zelloberfläche präsentiert werden (Übersichtsartikel (Abele *et al.* 2004)).

1.3.2.3 Kreuzpräsentation

Neben diesem direkten Weg der Antigenprozessierung zur MHC-I-Präsentation wird noch ein weiterer Mechanismus diskutiert. Dieser trägt der Problematik Rechnung, wie die Präsentation von exogenem Antigen durch Zellen, die keine kostimulatorischen Fähigkeiten besitzen, zur Aktivierung Antigen spezifischer CD8-T-Zellen führt. Eine Erklärung für dieses Phänomen lieferten erstmals Ergebnisse von M. Bevan, die zeigten, dass auch exogene Antigene auf MHC-Klasse I präsentiert werden können (Bevan 1976). APC können virusinfizierte Zellen phagozytieren und im Anschluss Virusantigene über die eigenen MHC-I-Moleküle CD8-T-Zellen kreuzpräsentieren. Werden nach Aufnahme und Prozessierung exogene Antigene über MHC-I-Moleküle präsentiert und gleichzeitig kostimulatorische Signale durch die APC vermittelt, können naive zytotoxische CD8-T-Zellen aktiviert werden. Dieser Vorgang wird Kreuzimmunität genannt, während die Kreuzpräsentation ohne kostimulatorische Signale (z.B. von körpereigenen Peptiden) als Kreuztolerisierung bezeichnet wird und keine Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen (engl.: *cytotoxic T lymphocytes*, CTL) zur Folge hat. Die Aufnahme von Antigenen zur Kreuzpräsentation geschieht durch die gleichen Mechanismen wie bei der Präsentation auf MHC-Klasse II. Nach Internalisierung in Phagosomen, müssen die Antigene zur proteolytischen Spaltung durch

Proteasomen in das Zytosol gelangen. Der Mechanismus und die Bedingungen, die für die Kreuzpräsentation der Antigene ausschlaggebend sind, sind zur Zeit noch nicht vollständig geklärt. Es gibt Arbeiten, die zeigen, dass die Kopplung von Antigenen an Chaperone ausschlaggebend für die Bindung an Oberflächenrezeptoren (wie z.B. CD91) von APC und deren rezeptorinduzierte Endozytose sind (Srivastava 2002; MacAry *et al.* 2004). Andere Arbeiten wiesen jedoch auch die Aufnahme exogener Antigene ohne Chaperon-Beteiligung nach (Norbury *et al.* 2004; Wolkers *et al.* 2004).

Nach Antigenaufnahme fusionieren die exogene Antigene enthaltenen Phagosomen mit Vesikeln, die sich vom ER abspalten (Ackerman *et al.* 2003; Guermonprez *et al.* 2003; Houde *et al.* 2003). Diese ER-Vesikel enthalten die neusynthetisierten MHC-I-Moleküle und zusätzlich die zur Beladung notwendigen Bestandteile wie z.B. TAP und Tapasin. Aus diesen fusionierten Vesikeln werden die Antigene wahrscheinlich über einen multimolekularen Kanal (Sec 61-Komplex) ins Zytosol transportiert (Wiertz *et al.* 1996; Romisch 1999). Es werden aber auch andere Proteinkanäle wie z.B. TAP in Verbindung mit der Translokation gebracht (van Endert 1996; Matlack *et al.* 1998; Johnson *et al.* 1999; Jarosch *et al.* 2002). Im Zytosol werden die Antigene von Proteasomen degradiert und gelangen, analog zum Mechanismus der Präsentation endogener Antigene, über TAP wieder zurück in das Vesikel-Hybrid, wo sie an MHC-I-Moleküle binden und an die Zelloberfläche transportiert werden. Es gibt aber auch Anzeichen, dass zur Kreuzpräsentation eine Translokation von Antigen auch ohne Beteiligung von TAP möglich ist (Schoenberger *et al.* 1998b; Norbury *et al.* 2004).

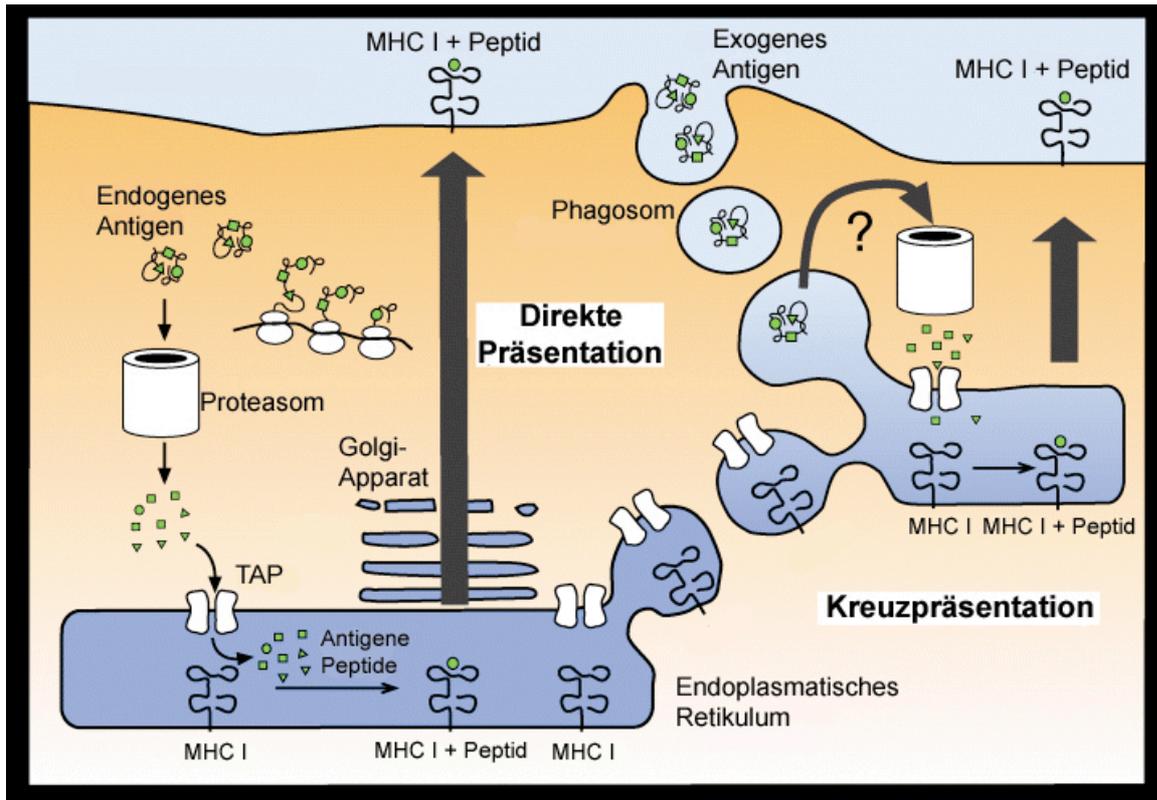


Abbildung 1: Übersicht MHC-I-Präsentation (modifiziert nach (Heath *et al.* 2004))

Das Phänomen der Kreuzpräsentation kann nicht bei allen APC in gleicher Weise beobachtet werden. Für Makrophagen konnte Kreuzpräsentation nachgewiesen werden (Bellone *et al.* 1997), jedoch bisher keine Kreuzimmunität, welche für DC charakteristisch scheint (Albert *et al.* 1998; Ronchetti *et al.* 1999; Kurts *et al.* 2001). Für B-Zellen konnte hingegen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation gezeigt werden (Schoenberger *et al.* 1998a; Heit *et al.* 2004).

Innerhalb der DC Subpopulation gibt es aber unterschiedlich effektive „Kreuzpräsentierer“. Die Untersuchungen zur Beteiligung der unterschiedlichen Subpopulation sind Gegenstand der aktuellen Forschung. Es zeichnet sich ab, dass die CD8⁺DC die Population ist, die sich hauptsächlich für die Kreuzpräsentation verantwortlich zeigt. Dies geschieht nicht nur durch die direkte Aufnahme von exogenem Antigen, sondern auch durch eine Art Antigenaustausch zwischen CD8⁺DC und anderen DC-Familienmitgliedern. (Übersichtsartikel (Heath *et al.* 2004)).

1.3.2.3.1 Immunität und Toleranz durch Kreuzpräsentation

Zwei mögliche Effekte der Antigenpräsentation sind die Aktivierung von Effektorzellen gegen Fremdanigen und die Toleranzinduktion bei der Präsentation von körpereigenem

Antigen. Wie zuvor beschrieben, wird die DC-vermittelte Induktion von Effektorzellen durch Präsentation von Fremdanigen und der Vermittlung zusätzlicher kostimulatorischer Signale erreicht, die durch die reifungsinduzierte Aktivierung von DC exprimiert werden (Caux *et al.* 1994; Inaba *et al.* 1994). Die DC-Aktivierung wird durch Rezeptoren (z.B. Toll-ähnliche-Rezeptoren, TNF-Rezeptoren) gegen bestimmte Substanzen mikrobieller (z.B. LPS) bzw. viraler Herkunft erreicht (Bender *et al.* 1996; De Smedt *et al.* 1996; Romani *et al.* 1996; Akbari *et al.* 1999; Sparwasser *et al.* 2000). Neben Zellen des adaptiven Immunsystems werden durch aktivierte, zytokinproduzierende DC (Reis e Sousa *et al.* 1997; Dalod *et al.* 2002) auch Zellen des angeborenen Immunsystems beeinflusst (Fernandez *et al.* 1999; Fujii *et al.* 2002). Dies erklärt aber nicht die Kreuzimmunität gegen entartete Tumorzellen, bei denen kein inflammatorisches Signal vorhanden ist. Eine Erklärung gibt ein erstmals durch P. Matzinger beschriebenes „Gefahren-Model“ (Matzinger 1994), das davon ausgeht, dass die Aktivierung von DC bzw. APC, durch spezielle sezernierte Faktoren (engl.: *danger signals*) beschädigter Zellen geschieht. Diese können sowohl von virus- und bakteriell-infizierten Zellen, aber auch von entarteten Tumorzellen stammen.

Da DC ihr Milieu konstant durch Aufnahme von Antigenen überwachen, nehmen sie neben möglichen pathogenen Antigenen auch körpereigene Antigene auf (z.B. durch Phagozytose altersbedingt abgestorbener Zellen oder bestimmter Hitzeschockproteine, die beim Zelltod entstehen), die auch auf MHC-II- und / oder auf MHC-I-Molekülen präsentiert werden (Rocha *et al.* 1991; Scheinecker *et al.* 2002). Da die im Thymus größtenteils vorgenommene Eliminierung autoreaktiver T-Zellen (zentrale Toleranzinduktion) nicht 100%ig vollständig ist (Schild *et al.* 1990; Morgan *et al.* 1998; Sandberg *et al.* 2000), befinden sich in der Peripherie des Organismus T-Zellen, deren TCR körpereigene Peptide auf MHC-Molekülen erkennen und somit auch potenziell zu Effektorzellen gegen Körperzellen aktiviert werden können. Diese autoreaktiven T-Zellen entkommen der negativen Selektion im Thymus, da nicht alle Autoantigene der Peripherie im Thymus präsentiert werden können. Es kommt trotzdem relativ selten zu Autoimmunreaktion, da die Zirkulation naiver T-Zellen im Organismus hauptsächlich auf das Blut und die sekundären lymphatischen Organe beschränkt ist (Mackay 1993).

So kommt es äußerst selten zu einem Kontakt von autoreaktiven T-Zellen und somatischen Autoantigenen. Geschieht dies doch, werden Autoimmunreaktionen durch die so genannte periphere Toleranzinduktion (Jones *et al.* 1990; Rocha *et al.* 1991) verhindert, bei der DC vermutlich eine wichtige Rolle spielen. Fehlen nach der Aufnahme und Präsentation von Antigen durch DC die pathogenen bzw. „Gefahren“-Signale, werden keine kostimulatorischen Moleküle exprimiert und die DC werden tolerogen. Treffen autoreaktive T-Zellen auf ihr Antigen, das von tolerogenen DC präsentiert wird, wird entweder Anergie erzeugt, oder die T-Zellen durch Apoptose deletiert (Steinman *et al.* 2003). Bei der Erzeugung von Anergie

erkennen T-Zellen ihr TCR-spezifisches Peptid, aber aufgrund mangelnder Kostimulation durch die APC entwickeln sie sich nicht zu Effektorzellen. Durch diese Mechanismen wird verhindert, dass potenziell autoreaktive T-Zellen körpereigene Zellen und Gewebe angreifen.

1.3.3 APC im Thymus

Die Entwicklung und Selektion von Lymphozyten im Thymus ist abhängig von deren Fähigkeit, mit Peptid/MHC-Komplexen zu interagieren. Aus diesem Grund sind APC, die diese Peptide den Thymozyten präsentieren, von entscheidender Bedeutung bei der Generierung eines funktionellen T-Zell-Repertoires. Die APC im Thymus können in zwei Gruppen unterteilt werden: APC hämatopetischen Ursprungs wie DC, Makrophagen und B-Zellen, sowie Zellen nicht-hämatopetischen Ursprungs wie die epithelialen Stromazellen des Thymus. Letztere stellen mengenmäßig den Großteil der APC im Thymus dar und können in Epithelzellen im Thymuscortex (engl.: *cortical thymic epithelial cells*, cTECS) und in der Thymusmedulla (mTECS) unterteilt werden. Welche der im Thymus vorhandenen APC für welchen Selektionsprozess verantwortlich sind, ist zur Zeit noch nicht vollständig geklärt. Die meisten Arbeiten auf diesem Gebiet favorisieren Epithelzellen des Thymus für die Prozesse der positiven Selektion (Übersichtsartikel (Wekerle *et al.* 1980; von Boehmer 1990; Matzinger 1993; Fink *et al.* 1995). Neuere Arbeiten postulieren eine nicht-essentielle Funktion der Epithelzellen bei der positiven Selektion. Die APC hämatopetischen Ursprungs werden als die eigentlich notwendigen Zellen zur positiven Selektion angesehen, während der Thymus und dessen Stromazellen als Organ lediglich ein abgeschlossenes Milieu zur T-Zell-Entwicklung darstellt (Zinkernagel *et al.* 1980; Bonomo *et al.* 1993; Zerrahn *et al.* 1999; Zinkernagel *et al.* 1999; Martinic *et al.* 2003). Unter den APC hämatopetischen Ursprungs gelten die CD8⁺DC in der Medulla des Thymus als die APC, die für die positive Selektion von T-Lymphozyten verantwortlich sein könnten (Zerrahn *et al.* 1999; Shizuru *et al.* 2000; Yasutomo *et al.* 2000). Auch für MHC-Klasse Ib-restringierte T-Zellen wird vermutet, dass APC hämatopetischen Ursprungs für deren positive Selektion verantwortlich sind (Coles *et al.* 2000; Sullivan *et al.* 2002; Urdahl *et al.* 2002).

Bezüglich der negativen Selektion wurde gezeigt, dass sowohl Epithelzellen (Hoffmann *et al.* 1992; Klein *et al.* 2001) als auch hämatopetische APC (Anderson *et al.* 1996; Brocker *et al.* 1997b; van Meerwijk *et al.* 1997) bei der Eliminierung autoreaktiver T-Zellen beteiligt sind. Da verschiedene Arbeiten zeigten, dass CD8⁺DC in der Peripherie für Toleranzerzeugung verantwortlich sind (Banchereau *et al.* 1998; Hawiger *et al.* 2001; Bonifaz *et al.* 2002), wird

die Erzeugung zentraler Toleranz im Thymus durch negative Selektion auch für diese sich dort befindliche DC-Subpopulation diskutiert. Somit wäre diese CD8⁺DC-Subpopulation generell für die Toleranzerzeugung zentral im Thymus sowie in der Pheripherie verantwortlich (Übersichtsartikel (Moser 2003)). Andere Arbeiten favorisieren die Epithelzellen des Thymus für den Prozess der negativen Selektion, seitdem gezeigt wurde, dass von ihnen gewebspezifische Autoantigene exprimiert werden (Naquet *et al.* 1999; Kishimoto *et al.* 2000; Derbinski *et al.* 2001). Ausschlaggebend hierfür war des Weiteren die Identifikation des Transkriptionsfaktors AIRE (Auto-Immun-Regulator), der an der Expression peripherer Autoantigene im Thymus beteiligt ist (Bjorses *et al.* 2000; Pitkanen *et al.* 2000; Kumar *et al.* 2001). Diverse Arbeiten identifizierten AIRE-Expression hauptsächlich in mTECS und schlossen hieraus, dass Epithelzellen für die negative Selektion verantwortlich sind (Zuklys *et al.* 2000; Derbinski *et al.* 2001). Die Expression peripherer Autoantigene wurde auch für DC und Makrophagen im Thymus gezeigt (Throsby *et al.* 1998; Pugliese *et al.* 2001).

Der Mechanismus der negativen Selektion ist hauptsächlich die klonale Deletion (Palmer 2003). Aber auch die Induktion von Anergie (Mamalaki *et al.* 1996) spielt eine Rolle. Bei der Erzeugung von Anergie erkennen T-Zellen ihr TCR-spezifisches Peptid, aber aufgrund mangelnder Kostimulation durch die APC, entwickeln sie sich nicht zu Effektorzellen. Des Weiteren wird der Einfluss regulatorischer T-Zellen diskutiert (Annacker *et al.* 2001).

Insgesamt kann zum jetzigen Zeitpunkt der Forschung weder der positiven noch der negativen Selektion eindeutig ein bestimmter APC-Typ im Thymus zugeordnet werden.

1.4 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war, die Bedeutung Dendritischer Zellen auf CD8-T-Zellen in einem transgenem Maussystem aufzuklären, das eine direkte *in vivo*-Analyse des DC-Einflusses zuließ.

Hierzu sollte die MHC-Klasse I-Expression in MHC-I^{-/-}-Mäusen selektiv auf DC erreicht werden. Dafür wurde in $\beta 2m^{-/-}$ -Mäusen, in denen keine MHC-I-Expression detektiert werden kann, unter der Kontrolle des DC-spezifischen CD11c-Promotors $\beta 2m$ selektiv in DC exprimiert (Kurts *et al.* 2001). Dies sollte in den transgenen CD11c-MHCI-Mäusen nur auf DC zu einer funktionellen MHC-I-Expression führen, die eine Analyse der Bedeutung von DC auf MHC-I-restringierten CD8-T-Zellen ermöglichen sollte.

Zum Einen sollte im Rahmen dieser Arbeit die selektive MHC-I-Expression auf DC überprüft werden. Zum Anderen sollten folgende Einzelfragestellungen im Detail untersucht werden:

Einfluss von DC im Thymus auf die Selektion von CD8-T-Zellen

Die bisher widersprüchlichen Meinungen zum Einfluss von Zellen hämatopetischen Ursprungs im Thymus und Thymusepithelzellen auf die Selektionsprozesse von T-Zellen (siehe 1.3.3) sollten durch Analyse der Selektionsprozesse in CD11c-MHCI-Mäusen näher untersucht werden. Durch die fehlende MHC-I-Expression auf Epithelzellen des Thymus einerseits und der selektiven Expression auf DC im Thymus andererseits, ist es möglich den Einfluss von DC und Epithelzellen im Thymus direkt am sich entwickelnden CD8-T-Zell-Repertoire abzulesen.

Bedeutung und Potenzial von DC bei der Induktion von CD8-T-Zellimmunität

Eine mögliche Aktivierung naiver T-Zellen wurde bereits *in vitro* (Inaba *et al.* 1985; Ellis *et al.* 1991) als auch *in vivo* [(Inaba *et al.* 1990; Sornasse *et al.* 1992; Levin *et al.* 1993) gezeigt. Durch die bisherigen Arbeiten auf diesem Gebiet gelten DC als die potentesten Zelltypen der professionellen antigenpräsentierenden Zellen zur Aktivierung naiver T-Zellen und werden bereits als Vakzine zur Erzeugung tumorspezifischer Immunität in klinischen Versuchen eingesetzt (Banchereau *et al.* 2001). Neben dem Nachweis einer möglichen T-Zell-Aktivierung, gibt es jedoch nur wenige *in vivo*-Untersuchungen zur Qualität der durch DC induzierten CD8-Antwort. Durch unterschiedliche Immunisierungen von CD11c-MHCI-

sowie Wild-Typ-C57BL/6-Mäusen sollte anhand der CD8-T-Zellantworten durch Vergleich der beiden Mausstämme direkt auf das Potenzial von DC *in vivo* geschlossen werden.

Fähigkeit von DC zur Erzeugung peripherer Toleranz

Neben der Fähigkeit zur Erzeugung von T-Zellimmunität wird auch vermutet, dass DC zur Erzeugung peripherer Toleranz befähigt sind, und somit autoreaktive T-Zellen, die der negativen Selektion im Thymus entkommen, eliminieren (Steinman *et al.* 2003). Auch hier wurde bisher die Qualität der Toleranzinduktion *in vivo* nur von sehr wenigen Arbeitsgruppen untersucht. Durch die Erzeugung Toleranz induzierender Bedingungen, sollte die Fähigkeit von DC erörtert werden, bei CD8-T-Zellen *in vivo* periphere Toleranz zu erzeugen. Aufschluss über die Qualität der Toleranzinduktion sollte wiederum durch Vergleich der CD8-T-Zellreaktionen in CD11c-MHCI- und C57BL/6-Mäusen erreicht werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle Lösungen, Medien und Puffer wurden mit zweifach destilliertem Wasser angesetzt. Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt) und Roth (Karlsruhe) im jeweils höchsten Reinheitsgrad bezogen. Die Herkunft speziell benötigter Reagenzien ist in der entsprechenden Methodenbeschreibung angegeben.

2.1.2 Geräte

Brutschrank (Heraeus Hera cell, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland), Chemikalienwaage (Kern, Albstadt), Feinwaage (Adventurer, Ohaus Corp., Pine Brooks, NJ, USA), Magnetrührer (Ika Labortechnik, Staufen, Deutschland), pH-Meter (Inolab, Weilheim, Deutschland), Pipetten (Gilson, Middleton, WI, USA), Pipettierhilfe (Integra Biosciences, Baar, Schweiz), Spannungsquelle (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA), Sterilbank (Heraeus), Tischzentrifuge (Centrifuge 5415 D, Eppendorf, Hamburg, Deutschland), Vakuumpumpe (KNF Neuberger, Munzingen, Deutschland), Vortex-Genie2 (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA), Wasserbad (Grant Instruments Ltd., Barrington Cambridge, England), Zentrifuge (Rotixa RP, Hettich, Tuttlingen, Deutschland).

Alle übrigen verwendeten Geräte sind in den jeweiligen Methodenbeschreibungen erwähnt.

2.1.3 Pufferlösungen und Medien

ACK-Puffer	8,29 g NH_4Cl
	1 g KHCO_3
	37,2 mg Na_2EDTA
	H_2O ad 1 l
	pH 7,2-7,4 mit 1 N HCl einstellen und durch
	0,2 μm Filter sterilfiltrieren

PBS	150 mM NaCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 2 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4 mit 5 N NaOH einstellen
PBS-FBS	PBS 2% FBS (v/v)
FACS-Puffer	0,01% NaN ₃ (v/v) 2% FBS (v/v) PBS
FACS-Puffer zur Annexin V-Färbung	0,01% NaN ₃ (v/v) 2% FBS (v/v) 2 mM CaCl ₂
PBS	
50× TAE-Puffer	242 g Tris 57,1 ml 100% Essigsäure (Eisessig) 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
BSU-Auftragspuffer	21 g Harnstoff 25 g Saccharose 0,1 M EDTA 1 Spatelspitze Bromphenolblau H ₂ O ad 50 ml
Zellkulturmedium	Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Gibco, Gaithersburg, MD, USA) 10% FBS (inaktiviert, v/v) 500 mM β-Mercaptoethanol 1% Penizillin/Streptavidin (v/v)
Medium für Gewebe	Zellkulturmedium 0,5 mg/ml DNase I (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland)

1 mg/ml Collagenase D (Roche Diagnostics GmbH)

Restimulationsmedium

Zellkulturmedium

1 mM Ionomycin

20 ng/ml PMA

10 mg/ml Brefeldin A

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Einmal Injektionskanülen 0,45 × 12 mm	Terumo Medical Corporation, Tokyo, Japan
Einmal Injektionskanülen 0,70 × 30 mm	Braun, Melsungen, Deutschland
Einmalspritzen	Braun
Plastik-Petrischalen	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,2 ml	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsröhrchen 5 ml (FACS)	BD Falcon, Lincon Park, NJ, USA
Reaktionsgefäße 15 ml und 50 ml	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Sterilfilter 0,22 µm Millex®-GP	Millipore, Bedford, MA, USA

2.1.5 Antikörper

Die verwendeten Antikörper waren zur durchflusszytometrischen Detektion an einen der folgenden Fluoreszenzfarbstoffe konjugiert:

FITC (Fluoresceinisothiozyanat)

PE (Phycoerythrin)

APC (Allophycozyanin)

PerCP (Peridin-Chlorophyll-Protein)

Biotin (Biotin-gekoppelte Antikörper wurden mittels eines Streptavidin-Konjugats nachgewiesen)

Tabelle 3: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie

Epitop (Anti-Maus-)	Konjugat	Klon	Bezugsquelle
H-2K ^b	FITC APC Bio	AF6-88.5	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
H-2K ^b / H-2D ^b	Bio APC	28-8-6	BD Pharmingen
I-A ^b	FITC	AF6-120.1	BD Pharmingen
CD4	PE PerCp APC	H129.19 und RM4-5	BD Pharmingen
CD8	PE FITC PerCP	53-6.7	BD Pharmingen
CD8	APC	5H10	Caltag, San Francisco, CA, USA
CD11b	FITC Bio	M1/70	BD Pharmingen
CD11c	FITC PE APC Bio	HL3	BD Pharmingen
CD19	FITC PE	1D3	BD Pharmingen
CD43 / Leukosialin	PE Bio	S7	BD Pharmingen
CD44	PE	IM7.8.1	Caltag
CD45	PE FITC	30-F11	BD Pharmingen
CD45.1	Bio	A20	BD Pharmingen
CD69	PE	H1.2F3	BD Pharmingen
IFN γ	FITC	XMG1.2	BD Pharmingen
V α 2 TCR	PE Bio	B20.1	BD Pharmingen
V β 5.1, 5.2 TCR	FITC PE	MR9-4	BD Pharmingen

	Bio		
V β 6 TCR	FITC	RR4-7	BD Pharmingen
V β 8.1, 8.2 TCR	FITC	MR5-2	BD Pharmingen
V β 11 TCR	FITC	RR3-15	BD Pharmingen

APC-konjugiertes Streptavidin (SA) wurde von der Firma Caltag (San Francisco, CA, USA) bezogen.

PerCP- und Cy-5-konjugiertes Streptavidin wurde von der Firma BD Pharmingen (San Diego, CA, USA) bezogen.

UEA-1-FITC wurde von der Firma Vector Labs., Inc, (Burlingame, CA, USA) bezogen.

Die Tetramere H-2K^b/OVA₂₅₇₋₂₆₄-m β 2m-SA-PE und H2M3-m β 2m-SA-PE wurden in der Arbeitsgruppe von D.H. Busch (TU München, Deutschland) hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Zur intrazellulären Färbung von Zytokinen wurde der Cytotfix/Cytoperm Kit, zur Analyse apoptotischer Zellen der Apoptosis Detektion Kit, sowie Annexin V-FITC der Firma BD Pharmingen, San Diego, CA, USA verwendet.

2.1.6 Peptide und Oligonukleotide

Das Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ aus Hühner-Ovalbumin mit der Aminosäuresequenz Ser-Ile-Ile-Asn-Phe-Glu-Lys-Leu (SIINFEKL) wurde von der Firma Neosystems (Strasburg, Frankreich) synthetisiert und bezogen.

Die folgenden Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) hergestellt:

#25: 5'-CTCCAAGTTGCTCAGAGC-3'

#19: 5'-CCATGGTGATAACAAGGGAC-3'.

2.1.7 Virale Vektoren

Alle rekombinanten Virusvektoren wurden unter S2-Bedingungen produziert.

Die replikationsdefekten, rekombinanten HSV-1-Vektoren HSV-OVA und HSV-GFP wurden im Labor von P. Marconi (Universität Ferrara, Italien) konstruiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Lauterbach *et al.* 2004).

Die Vaccinia-Viren MVA sowie die rekombinanten Vacciniaviren MVA-OVA wurden freundlicherweise von G. Sutter (GSF, Neuherberg) zur Verfügung gestellt.

2.1.8 Mausstämme

Alle Mäuse wurden in den Tierställen des Max-Planck-Instituts für Immunbiologie in Freiburg und später in den Tierställen des Instituts für Immunologie in München gehalten.

Folgende Mausstämme wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

2.1.8.1 $\beta 2m^{-/-}$ (MHC-I^{-/-})

In dem auf C57BL/6-Hintergrund generierten Mausstamm wurde selektiv $\beta 2$ -Mikroglobulin deletiert. Dies führt in $\beta 2m^{-/-}$ „knock out“-Mäusen zu einer fehlenden MHC-Klasse I-Expression, da der Molekülkomplex nur stabil mit $\beta 2m$ auf der Zelloberfläche exprimiert werden kann (Koller *et al.* 1989).

2.1.8.2 CD11c-MHCI

Dieser transgene Mausstamm wurde im genetischen $\beta 2m^{-/-}$ -Hintergrund generiert. $\beta 2$ -Mikroglobulin wurde unter der Kontrolle des DC spezifischen Promotors CD11c exprimiert (Kurts *et al.* 2001). Dies führt zur funktionellen H-2K^b-Expression selektiv auf Dendritischen Zellen, während MHC-Klasse I auf allen anderen Zellen aufgrund des fehlenden $\beta 2$ -Mikroglobulins nicht exprimiert wird.

2.1.8.3 C57BL/6 (MHC-I⁺)

Der MHC-Haplotyp dieses als Wildtyp-Kontrolle dienenden Mausstamms ist H-2K^b.

2.1.8.4 OT-1

Dieser Mausstamm ist transgen für einen T-Zell-Rezeptor, der das Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ im Kontext von MHC-Klasse I H-2K^b erkennt (Hogquist *et al.* 1994). Der TCR kann

spezifisch mit den mAb anti-Maus V α 2 und V β 5.1, 5.2 TCR nachgewiesen werden. 90 % aller T-Zellen in diesen Mäusen tragen den transgenen Rezeptor, da durch das Transgen die Umlagerung weiterer T-Zell-Rezeptorgene verhindert wird.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook 1989) diente der Auftrennung, Isolierung und Identifizierung von DNA-Fragmenten. In Abhängigkeit der erwarteten Größe der Fragmente wurden Horizontalgele verwendet, die 0,7% bis 2% [w/v] Agarose in TAE-Puffer enthielten. Der flüssigen Agaroselösung wurden zur späteren Analyse der DNA-Banden mit UV-Licht (312 nm, Intas, Göttingen, Deutschland) 7 μ l pro 150 ml Gelvolumen einer 0,1%igen [w/v] Ethidiumbromidlösung zugesetzt. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 1/5 ihres Volumens mit Auftragspuffer vermischt. Als Längenstandard wurde die 100 bp DNA-Leiter (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80 V in einer Elektrophoresekammer (Werkstatt, Institut für Immunologie, München, Deutschland) mit 1 \times TAE als Laufpuffer. Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit einem Geldokumentationssystem (Intas, Göttingen, Deutschland) fotografiert.

2.2.1.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von DNA wurde photometrisch (UV-Spektrophotometer Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen H₂O in Quarzküvetten bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht eine OD₂₆₀-Einheit 50 μ g dsDNA pro ml. Die Reinheit der DNA ergab sich aus dem Quotienten der Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm. DNA-Lösungen mit einem geringen Proteinanteil zeigen dabei Quotienten von 1,8-2,0.

2.2.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) (Mullis *et al.* 1986) wurden spezifische DNA-Sequenzen amplifiziert, um das Transgen in CD11c-MHCI-Mäusen nachzuweisen. Durch die Verwendung zweier spezifisch bindender Oligonukleotid-Primer, die die zu amplifizierende Sequenz flankieren, lassen sich spezifische DNA-Bereiche enzymatisch vervielfältigen. Durch mehrere aufeinanderfolgende temperaturabhängige Denaturierungs-, Primeranlagerungs- und Polymerisationsschritte kommt es zu einer exponentiellen Zunahme des gewünschten Fragments, dessen Enden durch die Primer festgelegt sind. Die DNA-Polymerisation erfolgt durch eine hitzstabile DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Chien *et al.* 1976).

PCR-Reaktionsbedingungen

1-100 ng Plasmid-DNA
 1,25 μ l Primer #1 (10 pmol/ μ l)
 1,25 μ l Primer #2 (10 pmol/ μ l)
 1 μ l MgCl₂ (50 mM)*
 2,5 μ l 10 \times NH₄-Puffer*
 2 μ l dNTP-Mix (10 mM)#
 0,25 μ l Panscript DNA Polymerase (5 U/ μ l)*
 ad 20 μ l H₂O_{bid}

* Pan Biotech GmbH, Aidenbach

Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA

Die Schmelztemperatur (T_M) (Wallace *et al.* 1979) und die Anlagerungstemperatur (T_A) wurden mittels folgender Formel berechnet:

$$T_M = [(G+C) \times 4^\circ\text{C}] + [(A+T) \times 2^\circ\text{C}]$$

$$T_A = T_M - 5^\circ\text{C}$$

Zur Amplifikation der gewünschten DNA-Fragmente im T3-Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland) wurden in der Regel folgende Reaktionsbedingungen gewählt:

30 Zyklen	}	2 min 95°C 30 s 95°C 30 s T_A (Primer-abhängig) 2 min 72°C 10 min 72°C
-----------	---	--

2.2.1.4 Isolierung genomischer DNA aus Gewebebiopsien

Die Gewebeprobe, hier Schwanzspitzen, wurden mit einem sterilen Skalpell in 1-2 mm große Stücke geschnitten. Das Anfangsstück wurde dabei verworfen, um Kontaminationen mit Blutspuren anderer Mäuse zu vermeiden. Die Gewebeprobe wurde zusammen mit 100 μ l sterilem H₂O in ein Reaktionsgefäß gegeben. Der Ansatz wurde bei 95°C für 10 min inkubiert, um endogene Peptidasen zu zerstören und anschließend kurz zentrifugiert. Danach wurden 2 μ l Proteinase K (2mg/ml) zugefügt und mit dem Ansatz vermischt. Während einer etwa zwölfstündigen Inkubation bei 54°C wurde das Schwanzstück verdaut. Bevor die freigesetzte genomische DNA verwendet werden konnte, musste die Proteinase K durch eine zehnmünütige Inkubation bei 95°C inaktiviert werden. Anschließend konnte ein Aliquot der DNA direkt in einem PCR-Ansatz verwendet werden.

2.2.2 Zell- und immunbiologische Methoden

2.2.2.1 Lymphozytenanreicherung aus peripherem Blut

Für die Blutabnahme wurde die Maus zur Weitung der Blutgefäße (Vasodilatation) und somit zur Förderung der Durchblutung unter einer Infrarotlampe erwärmt. Durch einen Schnitt in die untere Schwanzvene wurden der Maus einige Tropfen (ca. 100 bis 200 μ l) Blut entnommen und sofort mit ca. 50 μ l Heparin-Natrium (25000 I.E./5 ml, Ratiopharm, Ulm, Deutschland) vermischt, um die Blutgerinnung zu verhindern. Nach Zugabe von 2 ml FACS-Puffer (RT) wurde mit 1 ml Lymphozytenseparationsmedium (PAA Laboratories, Linz, Österreich) (RT) unterschichtet und 30 min bei 1500 UpM und 20°C zentrifugiert. Während der Zentrifugation passieren Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten und tote Zellen das Separationsmedium, wohingegen Lymphozyten aufgrund ihrer geringen Dichte auf dem Medium schwimmen. Dieser sich in der Interphase befindende Lymphozytenring wurde mit einer Pasteurpipette in ein neues 5 ml Reaktionsgefäß mit 3 ml kaltem FACS-Puffer überführt und 5 min bei 1200 UpM und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend bis auf ca. 100 μ l abgesaugt.

2.2.2.2 Organentnahme und Herstellung einer Einzelzellsuspension

2.2.2.2.1 Lymphknoten und Milz

Zur Organentnahme wurde die Maus mittels zervikaler Dislokation getötet, äußerlich mit 70%igem Ethanol desinfiziert und auf einem Sezierbrett fixiert.

Die Lage der Lymphknoten kann Abbildung 2 entnommen werden. Sie wurden mit feinen Pinzetten entnommen und in FACS-Puffer auf Eis bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die Milz befindet sich in der linken mittleren Bauchhälfte und ist ein längliches, dunkelrotes Organ. Sie kann mit einer feinen Schere herausgelöst und in FACS-Puffer auf Eis gelagert werden. Bei allen Organentnahmen sollte darauf geachtet werden, das Fett zu entfernen, da dies bei der späteren Verarbeitung zu viele Zellen bindet.

Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurden die Organe in einer Petrischale (Ø 5cm) mit etwas FACS-Puffer zwischen zwei Gazestückchen (Franz Eckert GmbH, Waldkirch, Deutschland, Porengröße 100 μm) mit dem Stempel einer Injektionspritze zerrieben. Die Zellsuspension wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 1200 UpM und 4°C für 5 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen je nach weiterer Verwendung im gewünschten Puffer oder Medium suspendiert. Die aus der Milz gewonnene Zellsuspension wurde anschließend einer Erythrozytenlyse unterzogen.

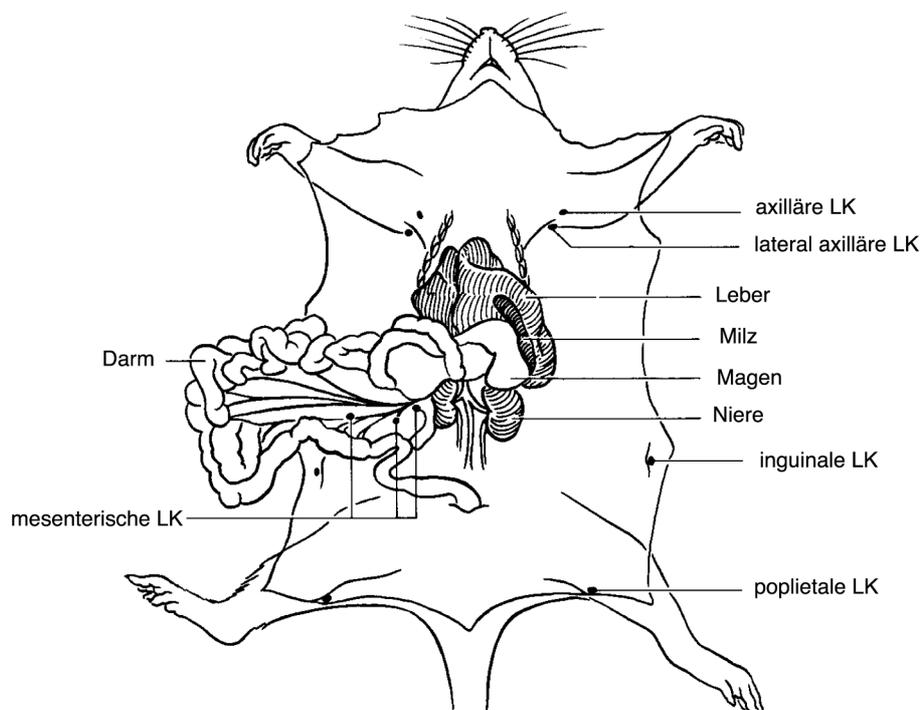


Abbildung 2: Lage der wichtigsten Organe der Maus (Quelle: (Reeves 2001), verändert). LK= Lymphknoten

2.2.2.2.2 Thymus

Der Thymus liegt im oberen Thoraxbereich, genau über dem Herzen und ist ein aus mehreren Thymuslappen bestehendes milchig gefärbtes Organ. Zur Präparation muß der Brustkorb durch zwei seitliche Schnitte quer durch die Rippen geöffnet werden. Zuvor wurde die Maus mit Hilfe von CO₂ getötet und äußerlich durch 70%iges Ethanol desinfiziert. Bei der Präparation des Thymus mittels feiner Pinzetten ist darauf zu achten, dass keine umliegenden Blutgefäße verletzt werden, da sonst die einzelnen Thymuslappen nicht mehr präzise herausgetrennt werden können. Die einzelnen Thymuslappen wurden zunächst in Zellkulturmedium auf Eis gelagert.

Da bei der für Lymphknoten und Milz beschriebenen Vorgehensweise die Stromazellen der Organe nicht mit in die Suspension überführt werden, wurde zur Präparation der Thymuszellen inklusive der Stromazellen 400 µl Medium für Gewebe direkt in den Thymus injiziert, dieser anschließend grob mit einem Skalpell zerkleinert und für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ in 2 ml Medium für Gewebeverdau inkubiert. Um die Aktivität der im Medium enthaltenen Enzyme nach der Inkubation zu inhibieren, wurde zu den Proben je 25 µl 0,5 M EDTA gegeben und für weitere 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen suspendiert, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 1200 UpM und 4°C für 5 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen, je nach weiterer Verwendung, im gewünschten Puffer oder Medium suspendiert.

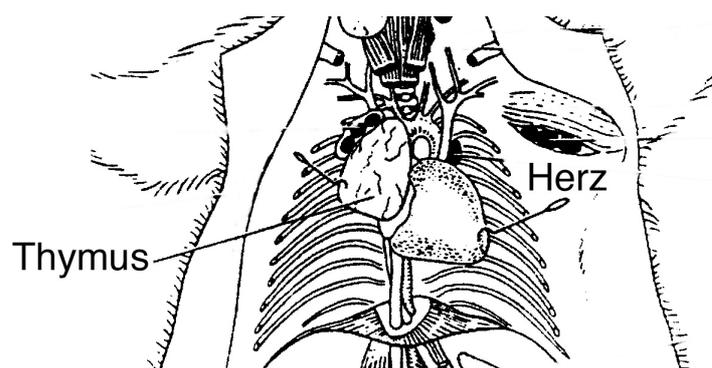


Abbildung 3: Lage des Thymus in der Maus (Quelle: „Current Protocols in Immunology“, 2003, Supplement 14, John Wiley & Sons Inc., verändert)

2.2.2.2.3 Erythrozytenlyse

Um die Erythrozyten aus einer Milz-Zellsuspension zu entfernen, wurde diese in 4 ml ACK Puffer suspendiert und 5 min bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Da Erythrozyten eine Natrium-Kalium-Pumpe fehlt, können diese die einströmenden Ionen nicht mehr aus der Zelle befördern. Um den osmotischen Druck auszugleichen, strömt Wasser in die Zellen und bringt diese zum Platzen. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension mit 10 ml FACS Puffer verdünnt und bei 1200 UpM und 4°C für 5 min zentrifugiert und anschließend der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde in Puffer oder Medium resuspendiert und auf Eis gelagert.

2.2.2.3 Durchflusszytometrie (FACS Analyse)

Mit einem FACS-Gerät (*fluorescence activated cell sorter*, FACS) kann die relative Größe, Granularität oder interne Komplexität und die relative Fluoreszenzintensität einer Zelle gemessen werden. Zellen werden dazu in einem Flüssigkeitsstrom durch einen fokussierten Laserstrahl geleitet, wobei beim einzelnen Passieren einer Zelle Licht gestreut wird. Das Vorwärtsstreulicht (*forward angle light scatter*, FSC) ist das Maß für die Zellgröße und das Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC) das Maß für die Granularität einer Zelle. Granulozyten und Makrophagen enthalten mehr Granula als Lymphozyten und weisen daher ein höheres SSC-Signal auf. Tote Zellen haben normalerweise mehr Granula als lebende Lymphozyten, sind aber deutlich kleiner. Die Fluorochrome, mit denen die Zellen gegebenenfalls markiert wurden, absorbieren Licht einer spezifischen Wellenlänge und emittieren Licht einer höheren Wellenlänge. Das emittierte Licht wird durch so genannte *Photomultiplier* in elektronische Signale konvertiert und gibt somit Auskunft über die Anzahl fluoreszierender Zellen sowie deren Fluoreszenzintensität. Bei der Analyse der aufgenommenen Zellen kann die interessierende Zellpopulation durch Eingrenzen der entsprechenden Region genau betrachtet werden. Gängige Darstellungsweisen sind das Histogramm, bei dem nur eine Streugröße oder Fluoreszenz dargestellt wird, oder das „Punktwolkendiagramm“ (engl.: *dot plot*), bei dem zwei Streugrößen bzw. Fluoreszenzen gegeneinander dargestellt werden.

Die Messungen erfolgten mit einem FACSCalibur™-Durchflusszytometer (Becton, Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, USA) mit zwei Lasern, die Licht unterschiedlicher Wellenlänge emittieren (488 und 633 nm). Die Datenaufnahme und -analyse erfolgte mit CellQuest Software, Version 3.4 (Becton, Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, USA).

2.2.2.4 Färbung von Lymphozyten mit fluorochrommarkierten Antikörpern

Zu 50-100 μl Zellsuspension wurde das gleiche Volumen in kaltem FACS Puffer entsprechend vorverdünnter Antikörper gegeben, gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Falls notwendig, wurde nun eine Färbung mit einem sekundären Antikörper oder Reagens wie z.B. Streptavidin durchgeführt. Nach dem letzten Waschschrift verblieben ca. 200 μl in dem Reaktionsgefäß. Die Zellen wurden mit 1-2% Paraformaldehyd (PFA) fixiert und bis zur durchflusszytometrischen Analyse bei 4°C aufbewahrt.

2.2.2.5 Nachweis Antigen spezifischer T-Zellen mittels Tetrameren

Endogene, polyklonale T-Zellpopulationen, die als Immunantwort auf eine Immunisierung expandieren, besitzen ein diverses TCR-Repertoire. Um Epitop-spezifische T-Zellen zu detektieren, kann der spezielle Ligand des jeweiligen TCR, der MHC-Peptid (Epitop)-Komplex eingesetzt werden. Wird dieser Komplex an ein Fluorochrom konjugiert, sind die Antigen spezifischen T-Zellen nach Bindung der löslichen MHC-Komplexe *ex vivo* durchflusszytometrisch quantifizierbar und isolierbar. Durch zusätzliche Multimerisierung dieser Komplexe zu beispielsweise Tetrameren wird ihre Avidität zusätzlich erhöht.

Die in dieser Arbeit verwendeten MHC-I-Peptid-Tetramere H-2K^b/OVA₂₅₇₋₂₆₄-m β 2m-SA-PE und H2M3-m β 2m-SA-PE waren beide über Streptavidin (SA) an das Fluorochrom Phycoerythrin (PE) gekoppelt und wurden freundlicherweise von D.H. Busch (TU München) zur Verfügung gestellt. Zur Färbung endogener, Antigen spezifischer CD8-T-Zellpopulationen mittels Tetrameren wurde wie unter 2.2.2.4 beschrieben vorgegangen. Bei weiteren Antikörper-basierten Färbungen musste jedoch darauf geachtet werden, dass keiner der einzusetzenden Antikörper auf dem Klon 53-6.7 (BD Pharmingen) basiert, da dieser Antikörper mit den MHC-I-Molekülen des Tetramers unspezifisch interagiert.

2.2.2.6 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe eines Zellzählgerätes Coulter Z2 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA) bestimmt. Die Methode dieses Gerätes basiert auf der messbaren Veränderung des elektrischen Widerstandes, die von einer Zelle ausgelöst wird, die in einem Elektrolyt suspendiert ist und eine Kapillaröffnung zwischen zwei Elektroden passiert. Die Höhe des ausgelösten elektrischen Impuls ist dabei proportional zu dem Volumen der Zellen, wohingegen die Anzahl der Impulse die Zahl der aufgenommenen Zellen wiedergibt. Durch Zugabe von Zap-O-Globin (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA) werden nur lebende Zellen gezählt.

2.2.2.7 Anreicherung von CD8-T-Zellen

Zur Anreicherung von CD8-T-Zellen aus einer Lymphknoten- und Milz-Zellsuspension wurde der MCD8C-1000-Kit der Firma R&D Systems, Minneapolis, MN, USA, verwendet. Die Anreicherung geschah durch negative Selektion über Antikörper und speziell beschichtete Matrixsäulen. Das Prinzip der Anreicherung beruht auf der Inkubation einer Zellsuspension mit einem Antikörper-Mix. Die an Glaspartikel gebundenen Antikörper binden spezifisch an nicht zu selektierende Zellen wie Monozyten, B-Zellen und CD4-positive T-Zellen. Der Zell-Antikörpermix wurde über eine Säulenmatrix geleitet, in der die Zellen mit gebundenen Antikörper über die assoziierten Glaspartikel zurückgehalten wurden. Da der eingesetzte Antikörpermix keine anti-CD8-Antikörper enthält, werden die CD8-T-Zellen in der Säulenmatrix nicht zurückgehalten und befinden sich im Eluat. Hierbei wird eine Reinheit von ca. 90% erreicht. Zur Anreicherung wurden 2×10^8 Zellen mit einem Milliliter Antikörpermix gemischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubation wurde die Matrixsäule mit 10 ml im Kit enthaltenen Waschpuffer equilibriert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit 10 ml Waschpuffer gewaschen und bei 1200 UpM, 5 min bei 4°C sedimentiert. Die Zellen wurden anschließend in 2 ml Waschpuffer aufgenommen, auf die Säulen gegeben und 10 Minuten bei RT inkubiert. Nachdem sich die Zellen in der Säule suspendiert haben und die Antikörper-gebundenen Zellen an die Matrix gebunden haben, wurden die CD8-T-Zellen mit insgesamt 10 ml Waschpuffer eluiert, bei 1200 UpM für 5 min bei 4°C sedimentiert und anschließend in einem gewünschten Volumen resuspendiert. Mit einem Aliquot wurde die Zellzahl und der Reinheitsgrad der eluierten Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (siehe Abbildung 4).

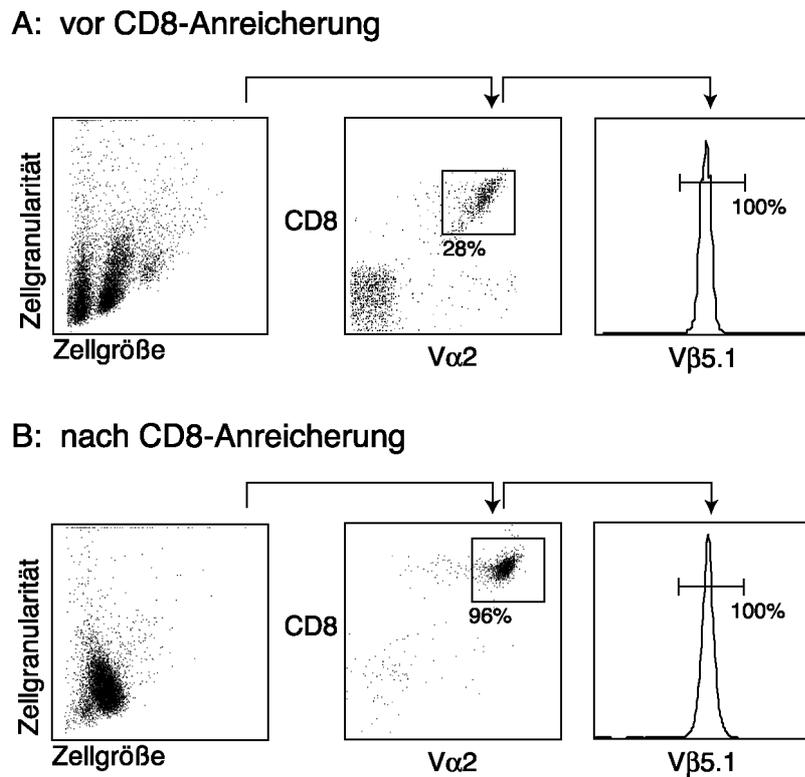


Abbildung 4: Vergleich der Effektivität der CD8-T-Zellen Anreicherung. Zur Anreicherung von CD8-T-Zellen wurden in diesem Beispiel eine OT-1 Milz- und Lymphknoteneinzelsuspensionen verwendet. Vor der Anreicherung mittels R&D CD8-Anreicherungs-Kit beträgt der Anteil CD8⁺-Zellen nach durchflusszytometrischer Analyse mit anti-CD8- sowie anti-V α 2- und anti-V β 5.1-Antikörper im Durchschnitt 28% aller Zellen (A). Nach Anreicherung konnte im Beispiel eine Reinheit von CD8⁺-Zellen von 96% erreicht werden (B).

2.2.2.8 Adoptiver Zelltransfer

Diese Methode ermöglicht es, das Verhalten Antigen spezifischer T-Zellen direkt *in vivo* zu verfolgen. Eine Population von T-Zellen, die spezifisch für ein antigenes Peptid ist, ist in der Regel zu klein (< eine pro 100.000 Zellen), um in einem nicht immunisierten Tier detektiert werden zu können. Zum Teil kann eine solche Detektion mit Hilfe von Tetrameren durchgeführt werden, die aber nicht gegen jede T-Zell-Population zur Verfügung stehen. Auch in immunisierten Tieren sind die Frequenzen gering (ca. eine pro 10.000 Zellen) (Tse *et al.* 1980). T-Lymphozyten in transgenen Tieren reagieren jedoch nicht auf Stimulation mit dem antigenen Peptid, für das sie spezifisch sind, da sich wahrscheinlich zu viele T-Zellen mit der gleichen Spezifität gegenseitig blockieren (Kearney *et al.* 1994).

Durch Transfer von T-Zellen in syngene Empfängertiere kann dieses Problem umgangen werden. Hierdurch entsteht im Rezipienten eine Peptid/MHC-spezifische T-Zell-Population, die groß genug ist, um z.B. mittels Durchflusszytometrie detektiert werden zu können, aber klein genug, um normales Verhalten zu zeigen, wenn sie *in vivo* auf das Antigen trifft (Pape *et al.* 1997).

Hierzu wurden Einzelzellsuspensionen von Milz und Lymphknoten aus OT-1-Mäusen hergestellt. Die Erythrozyten in der Milz-Zellsuspension wurden mittels ACK-Puffer lysiert. Anschließend wurden die OT-1-T-Zellen mittels CD8-T-Zell-Anreicherungssäulen (R&D-Systems) durch negative Selektion isoliert. Um den prozentualen Anteil der transgenen T-Zellen zu bestimmen, wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Es wurden jeweils 5×10^6 OT-1-Zellen pro Maus intravenös transferiert. Direkt vor der Injektion wurden die Zellen durch ein Nylonnetz (Reichert Chemie Technik, Porengröße $51 \mu\text{m}$) filtriert, um eine Verklumpung zu vermeiden. Es wurden nur Zellen in syngene, gleichgeschlechtliche Mäuse transferiert.

2.2.2.9 Intravenöse Injektion in Mäuse

Zur i.v.-Injektion von Zellen oder i.v.-Immunisierung wurden die Mäuse unter einer Infrarotlampe erwärmt, um eine Vasodilatation zu erreichen. Dies erleichtert das Erkennen der lateralen Venen auf dem Mausschwanz. In diese Venen wurden die zu transferierenden Zellen oder das immunogene Agens mittels einer Injektionsspritze verabreicht. Um ein längeres Nachbluten durch die herbeigefügte Vasodilatation zu verhindern, wird die Injektionsstelle einige Minuten abgedrückt, bis die Blutgerinnung eingetreten ist.

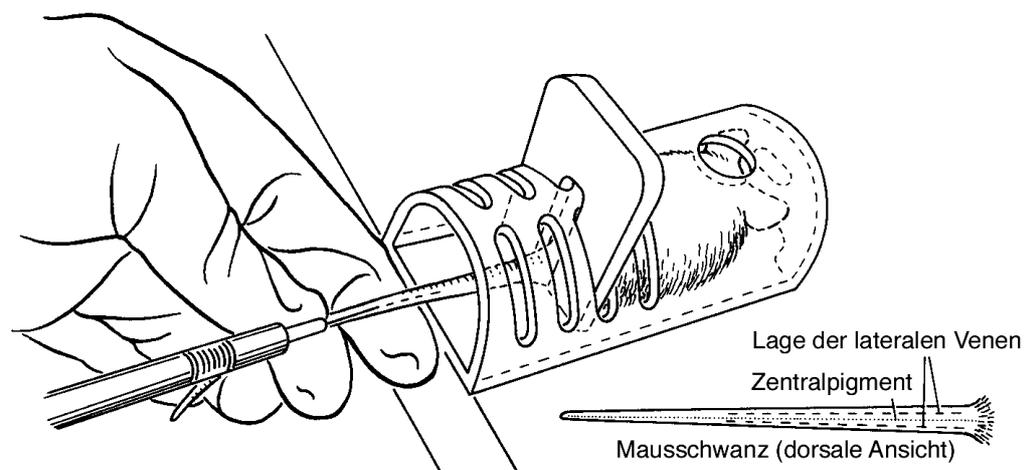


Abbildung 5: Intravenöse Injektion bei der Maus (Quelle: „Current Protocols in Immunology“, 2003, Supplement 14, John Wiley & Sons Inc., verändert)

2.2.2.10 Immunisierung mit Peptid und Lipopolysaccharid

Lipopolysaccharid (LPS) ist ein Bestandteil Gram-negativer Bakterien und besteht aus einem extrazellulären Zuckeranteil und einem Lipidstück zur Verankerung in der Bakterienmembran. Bei Vermehrung oder Tod Gram-negativer Bakterien wird LPS freigesetzt (Freundenberg *et al.* 1991). Hierdurch werden Granulozyten, Endothelzellen, Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen stimuliert, welche die typischen Endotoxineffekte bis hin zum septischen Schock induzieren. In dieser Arbeit wurde LPS, (Sigma, St. Louis, MO, USA) als inflammatorisches Agens zusammen mit Peptid intravenös verabreicht. Hierzu wurden pro Maus 50 μg LPS und 10 μg Peptid (gelöst in PBS) gemischt und i.v. injiziert.

2.2.2.11 Immunisierung mit Peptid in komplettem Freund'schem Adjuvans

Komplettes Freund'sches Adjuvans (engl.: *complete Freund's adjuvans*, CFA; Sigma, St. Louis, MO, USA) ist ein öliges Adjuvans, das im Tierexperiment als Zusatz zum Antigen dessen Immunisierungseffekt steigert. Es enthält abgetötete Mykobakterien oder deren Zellwandbestandteile.

Das Antigen wurde in PBS gelöst (2 mg/ml) und mit einem Volumen CFA gründlich vermischt, so dass sich eine konsistente Emulsion bildete. Pro Immunisierung wurden jeweils 100 μl der Emulsion an drei Stellen am Rücken der Maus subkutan injiziert. Dies entspricht einer Menge von 300 μg Antigen pro Maus und Immunisierung. Die Mäuse wurden vor der Injektion mit einem Inhalationsanästhetikum (Isofluran-Baxter, Baxter, Lessines, Belgien) betäubt.

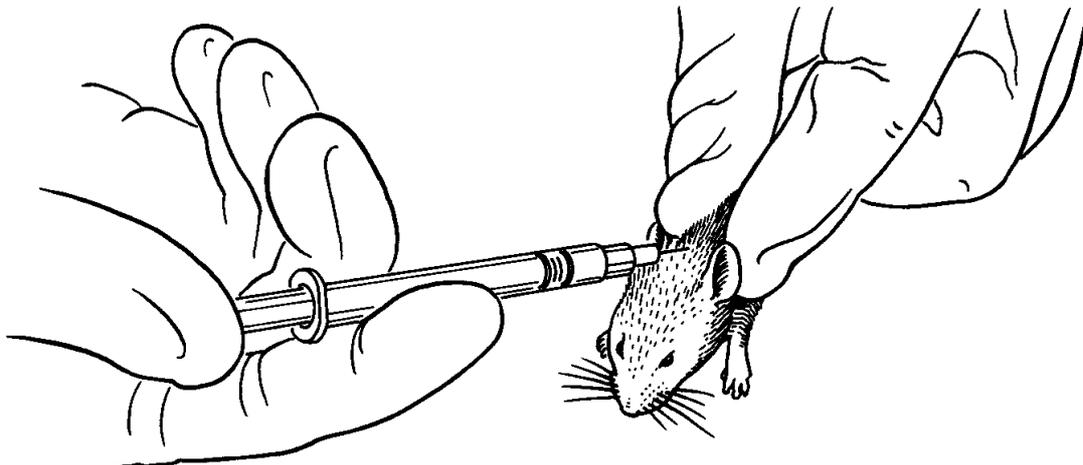


Abbildung 6: Subkutane Injektion bei der Maus (Quelle: „Current Protocols in Immunology“, 2003, Supplement 14, John Wiley & Sons Inc., verändert)

2.2.2.12 Immunisierung mit rekombinanten Viren (Herpes Simplex Viren Typ 1, HSV-OVA, HSV-GFP oder Vaccinia Viren, MVA-OVA, MVA)

Die zur Immunisierung verwendeten Viren wurden auf Eis aufgetaut und mit PBS bis zur gewünschten Konzentration verdünnt. Anschließend wurde die Suspension gut gemischt, für 5 s in ein Ultraschall-Wasserbad (Ultrason E, Greiner, Frickenhausen, Deutschland) gestellt und bis zur Injektion auf Eis gelagert. Zur intraperitonealen Immunisierung wurden jeweils 200 μ l in die Bauchhöhle injiziert.

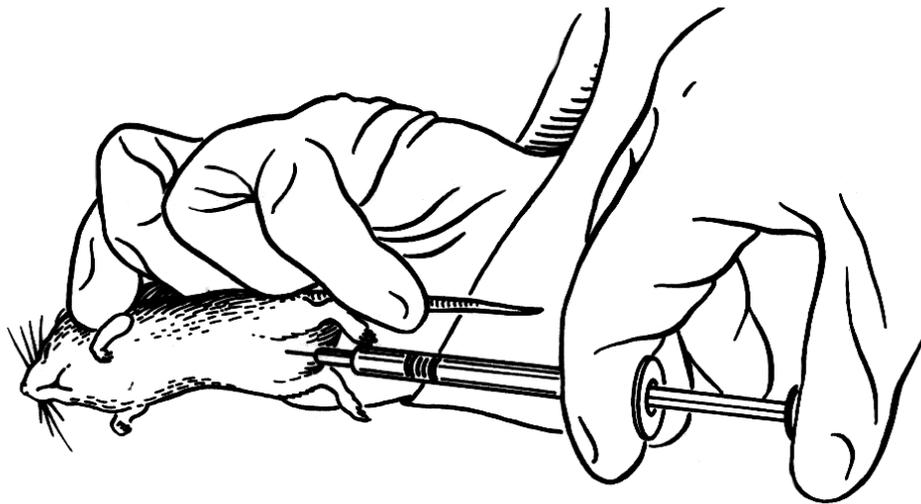


Abbildung 7: Intraperitoneale Injektion bei der Maus (Quelle: „Current Protocols in Immunology“, 2003, Supplement 14, John Wiley & Sons Inc., verändert)

2.2.2.13 Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Die Infektion von Mäusen mit dem intrazellulären Bakterium *Listeria monocytogenes* wurde am Institut für Mikrobiologie und Hygiene der TU-München im Labor von D.H. Busch durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Bakterienstamm verwendet, der rekombinantes Ovalbumin (OVA) sezernierte (rLM-OVA, (Pope *et al.* 2001)). Infiziert wurden die Mäuse jeweils mit 2000 CFU rLM-OVA durch die Schwanzvene. An Tag 6 nach Infektion wurden die Milzen der Mäuse mit Hilfe von Tetrameren auf MHC-Klasse Ia- und

Ib-restringierte CD8-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. H-2K^b/OVA₂₅₇₋₂₆₄-mβ2m-SA-PE diente zur Quantifizierung von Ia-restringierter OT-1-T-Zellen, H2M3-mβ2m-SA-PE zur Quantifizierung von Ib-restringierter CD8-T-Zellen, die spezifisch das *Listeria monocytogenes* Antigen f-MIGWII erkennen.

2.2.2.14 Markierung von Zellen mit Carboxyfluorescein-Diacetate-Succinimidylester (CFSE)

Zur CFSE-Markierung von Zellen wurden Einzelzellsuspensionen aus soliden Organen hergestellt und eventuell vorhandene Erythrozyten mittels ACK-Puffer entfernt. Die Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen, um Reste von FBS aus der Lösung zu entfernen, da sie die Färbung mit CFSE inhibieren würde. Anschließend wurden die Zellen mit 5 μM CFSE pro 1-50×10⁶ Zellen 10 Minuten bei 37°C abgedunkelt inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe eines Volumens FBS gestoppt, die Zellen zweimal mit PBS-FBS gewaschen und zur späteren Injektion in PBS suspendiert.

2.2.2.15 *In vivo*-Zytotoxizitätstest

Dieser Test erlaubt die Messung der zytotoxischen Effektorfunktion von CD8-T-Zellen *in vivo* (Coles *et al.* 2002) Dazu wurden Einzelzellsuspensionen von Milz und Lymphknoten präpariert und die Erythrozyten lysiert. Die Zellen wurden mit PBS-FBS, in Zellkulturmedium aufgenommen und in zwei Populationen aufgeteilt (Abbildung 8, 1). Eine Hälfte wurde mit Peptid beladen, indem dem Zellkulturmedium das Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ (20 μg/ml) zugefügt wurde. Die Zellen wurden bei 37°C für eine Stunde inkubiert und anschließend mit einer hohen Konzentration Carboxyfluorescein-Diacetate-Succinimidylester (CFSE, 1,7 μM) angefärbt (CFSE^{hoch} Zellen). Die andere Hälfte blieb unbeladen und wurde mit einer niedrigen Konzentration CFSE (0,2 μM) angefärbt (CFSE^{niedrig} Zellen). Die CFSE-Färbung wurde wie unter 2.2.2.14 beschrieben durchgeführt (Abbildung 8, 2). Vor der Injektion wurden die Zellen beider Populationen im Verhältnis 1:1 vermischt, und jeder Maus 20×10⁶ Zellen intravenös injiziert (Abbildung 8, 3). Die Zellen wurden in syngene Mäuse transferiert, die einige Tage bis Wochen (je nach Experiment) zuvor gegen OVA₂₅₇₋₂₆₄ immunisiert worden waren. Die Mäuse wurden nach 5-15 Stunden getötet, um ihre Milzen zu isolieren. Die Milzzellen wurden ohne weitere Färbung mittels Durchflusszytometrie analysiert, und jede Population durch ihre unterschiedliche CFSE-Fluoreszenzintensität

detektiert (Abbildung 8, 4). Anhand des Verhältnisses $CFSE^{niedrig}$ zu $CFSE^{hoch}$ -Zellen wurde die spezifische Lyse mit folgender Formeln berechnet:

Verhältnis beider Populationen zueinander:

$$r = (\text{Prozentsatz } CFSE^{niedrig} / \text{Prozentsatz } CFSE^{hoch})$$

Prozentsatz der spezifischen Lyse (PSL):

$$PSL = [1 - (r \text{ von nicht immunisierter Maus} / r \text{ von immunisierter Maus}) \times 100]$$

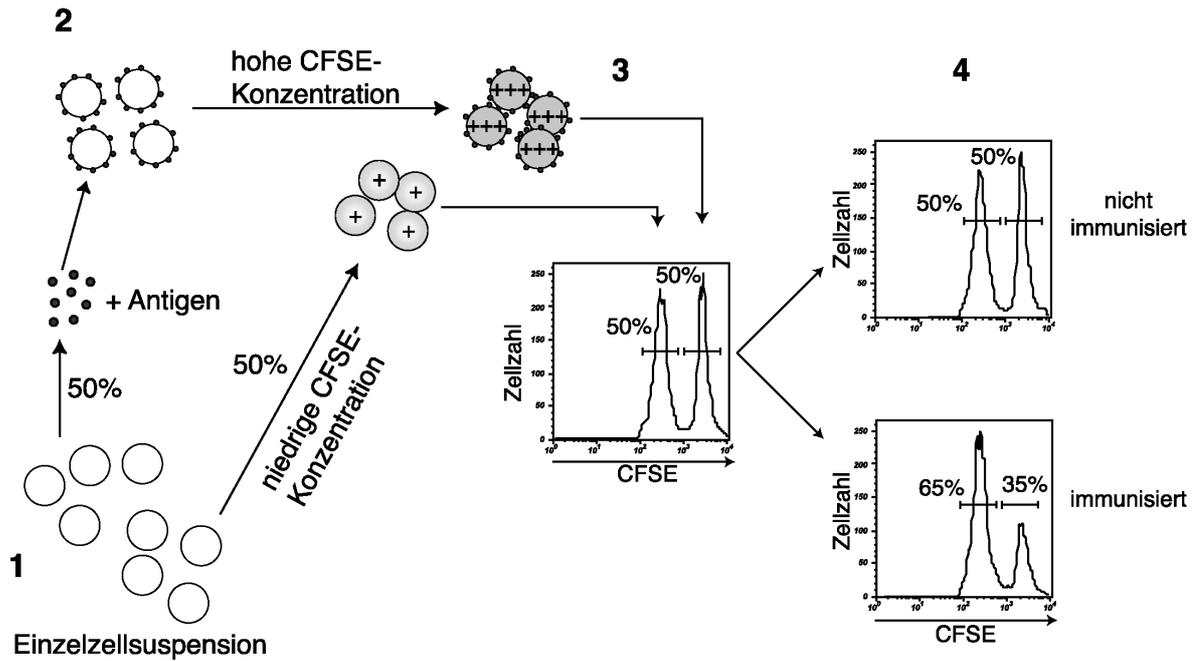


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs zur Durchführung des *in vivo*-Zytotoxizitätstest wie unter 2.2.2.15 beschrieben.

2.2.2.16 Nachweis von Apoptose

Der Tod einer Zelle kann durch Apoptose oder Nekrose erfolgen. Im Gegensatz zur Nekrose, bei der die Zellinhalte frei werden und im Gewebe eine inflammatorische Antwort induzieren, wird dies durch den Vorgang der Apoptose vermieden. Er besteht aus charakteristischen morphologischen Veränderungen, in deren Verlauf die Zelle und ihr Kern schrumpfen, die DNA in typische Fragmente, die so genannte DNA-„Leiter“ zerlegt wird, und die Zelle dann in „apoptotische Körperchen“ zerfällt, ohne dass jedoch Zellinhalte freigesetzt werden. Eines der ersten Anzeichen von Apoptose ist, dass im Zuge der Veränderung der Plasmamembran Phosphatidylserin von der inneren auf die äußere Seite transloziert und so für Annexin V zugänglich wird. Annexin V ist ein Ca^{2+} abhängiges Phospholipid-Bindeprotein mit hoher

Affinität für Phosphatidylserin und bindet an Zellen mit exponiertem Phosphatidylserin. Propidiumiodid (PI) ist ein fluoreszierender Farbstoff, der an die DNA bindet. Er kann die Plasmamembran von lebendigen Zellen oder solchen, die sich in der ersten Phase der Apoptose befinden, nicht durchdringen. Zellen, die sich jedoch in späteren Phasen der Apoptose befinden oder schon tot sind, haben die Integrität ihrer Plasmamembran verloren und sind durchlässig für PI. Mit Hilfe einer Färbung mit Annexin V und PI können also lebendige Zellen (Annexin V⁻, PI⁻) von proapoptotischen Zellen (Annexin V⁺, PI⁻) und Zellen im Endstadium der Apoptose unterschieden werden (Annexin V⁺, PI⁺).

Die Apoptose-Induktion wurde durch FACS-Analyse mit Annexin V (Pharmingen) und Propidiumiodid kontrolliert.

Annexin V wird in speziellem FACS-Puffer (PBS + 2 % FCS, 0,01 % NaN₃ (Gibco), + 2 mM CaCl₂) vorverdünnt. Die Färbung erfolgt analog zu der oben beschriebenen Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern. Im Gegensatz dazu ist für PI keine gesonderte Färbung notwendig, es kann kurz vor Analyse zur Probe hinzugegeben werden (Endkonzentration 0,8 mg/ml).

2.2.2.17 Intrazelluläre Zytokinfärbungen in T-Zellen *ex vivo*

Um Zytokinproduktion von T-Zellen nachzuweisen, müssen diese nach der Isolierung *in vitro* restimuliert werden. Hierbei werden jedoch keine naiven T-Zellen aktiviert, sondern voraktivierte Zellen zur Zytokinproduktion angeregt. Brefeldin A (Intracellular staining Kit, BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) inhibiert die Zytokinsekretion und führt so zu einer Anhäufung der Zytokine in der Zelle. Für eine intrazelluläre Färbung müssen die Zellwände der Zellen permeabilisiert werden, damit die Antikörper für die intrazelluläre Zytokinfärbung in die Zelle eindringen können. Damit die Zellen nach Permeabilisierung der Zellwand nicht auslaufen und absterben, wurden die Zellen mittels Paraformaldehyd fixiert.

Eine Einzellsuspension einer Milz aus einer immunisierten Maus wurde in Zellmedium mit 10⁻⁶ M Peptid in Gegenwart von 1 µl Brefeldin A/ml für 5 h bei 37°C und 5% CO₂ in einer 24-Lochplatte inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, einmal mit FACS-Puffer gewaschen und die Oberflächenmarker mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern in 5 ml Reaktionsröhrchen gefärbt (siehe 2.2.2.4). Die Zellen wurden anschließend mit 250 µl Cytoperm Lösung/Röhrchen (Intracellular staining Kit, BD Pharmingen) für 20 min bei 4 °C fixiert. Um die Zellmembran für den intrazellulären Antikörper permeabel zu machen, wurden die Zellen einmal mit 1 ml Perm/Wash Puffer (Intracellular staining Kit, BD Pharmingen) gewaschen. Die Zellen wurden anschließend mit den Fluorochrom-konjugierten

intrazellulären Antikörpern für 30 min bei 4°C im Dunkeln in 96-Lochplatten gefärbt. Die intrazellulären Antikörper wurden in Perm/Wash Puffer vorverdünnt, um die Permeabilität der Zellmembran aufrecht zu halten. Die Zellen wurden noch 3 mal in 250 μ l Perm/Wash Puffer gewaschen (3 min, 300 g, 4°C), mit 1-2% PFA fixiert und bis zur FACS-Analyse bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

2.2.2.18 Herstellung von Knochenmarkchimären

Zur Herstellung von Knochenmarkchimären wurden die Knochenmarkempfängertiere mit 1000 rad einer Cäsium-137-Quelle (Model G.C. 40; Type B (4); Atomic Energy of Canada Limited, Ontario, Kanada) bestrahlt, um alle teilungsfähigen Zellen im Knochenmark der Tiere abzutöten. 8-12 Stunden nach der letalen Bestrahlung wurden die Knochenmarkzellen der Tiere mittels adoptiv transferierter und ins Knochenmark einwandernden Donorknochenmarkzellen rekonstituiert. Die Donorzellen wurden aus Femur und Tibia beider Beine der Donormäuse gewonnen. Um Zugang zum Knochenmark zu erlangen, wurden die Enden der Knochen mit einer Schere entfernt. Anschließend wurde das Knochenmark mittels einer Injektionskanüle und Zellkulturmedium aus den Knochen in ein Reaktionsgefäß gespült. Die Zellen wurden für 5 min bei 1200 UpM und 4°C abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Vor der intravenösen Injektion von 3×10^6 Zellen in die bestrahlten Empfängermäuse wurden die Zellen in Medium resuspendiert und gefiltert. Um eine mögliche bakterielle Infektion während der ersten drei Wochen der Rekonstitution des hämatopoetischen Systems zu vermeiden, wurde dem Trinkwasser das Antibiotikum Neomycin zugegeben (1,17g/l Trinkwasser).

2.2.2.19 Histologie

Direkt nach Entnahme wurden die Lymphknoten oder die Milz in Tissue Tek® (Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet und durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff schockgefroren. An einem Kryotom (Jung Frigocut 2800E, Leica, Bensheim, Deutschland) wurden etwa 5 μ m dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden bei -20 °C für 20 min in Azeton fixiert, anschließend getrocknet und bei -20 °C aufbewahrt. Vor der Färbung wurden die Objektträger auf Raumtemperatur aufgewärmt und die Schnitte für 15 min in PBS 0,25 % BSA 0,01 % NaN_3 rehydriert. Unspezifische Färbungen können durch vorherige Inkubation mit PBS 0,25 % BSA, 0,01 % NaN_3 und 10 % normalem Mausserum für 15 min minimiert

werden. Hierbei werden die Fc-Rezeptoren auf Zellen im Schnitt, die später mit den Färbeantikörpern reagieren könnten, durch ungefärbte Antikörper aus dem Mausserum abgesättigt. Gefärbt wurde für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Zwischen den Färbeschritten und nach dem letzten Färbeschritt wurden die Schnitte mit PBS 0,25 % BSA, 0,01 % NaN_3 gewaschen und anschließend mit Fluoromount G (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, USA) eingebettet.

Die Schnitte auf den Objektträgern wurden an einem Fluoreszenzmikroskop (DMXA-RF8, Leica, Bensheim, Deutschland) analysiert, mittels einer Kamera (Sensys CCD, von Photometrics, Tucson, AZ, USA) fotografiert und mit dem Programm Q-Fish, (Leica, Bensheim, Deutschland) analysiert.

2.2.2.20 Statistik

Mittelwerte, Standardabweichungen und P-Werte (Student'scher *t*-Test) wurden mit dem Programm Microsoft® Excel 2001 berechnet.

3 ERGEBNISSE

3.1. Einfluss von Dendritischen Zellen auf die Selektion von CD8-T-Zellen *in vivo*

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von Dendritischen Zellen auf die Selektion von CD8-T-Zellen im Thymus *in vivo* untersucht werden. Hierzu wurden transgene Mäuse verwendet, die MHC-Klasse I (MHC-I)-Moleküle selektiv auf DC exprimieren.

Da die Herstellung dieses transgenen Mausstamms nicht im Rahmen dieser Arbeit geschah, soll im Folgenden vereinfacht beschrieben werden, wie die selektive Expression von MHC-I-Molekülen auf DC erreicht wurde. Murine cDNA, die für β 2-Mikroglobulin (β 2m) kodiert, wurde durch Klonierung unter die Kontrolle des DC-spezifischen CD11c-Promotors gestellt (Brockner *et al.* 1997b). Mit Hilfe dieses Plasmids wurden transgene Mäuse hergestellt (CD11c-MHCI), die im Zuge dieser Dissertation erstmals charakterisiert und analysiert wurden.

3.1.2 Genotypische Charakterisierung des CD11c-MHCI-Mausstamms

Da die CD11c-MHCI-Mäuse mit den β 2m defizienten (engl.: *knock-out*) Mäusen zurückgekreuzt wurden, mussten die heterozygoten Nachkommen auf das Transgen überprüft werden. Die Transgen positiven Mäuse konnten anhand eines spezifischen 200 bp großen Amplifikats identifiziert werden. Bei Transgen negativen Mäusen sowie bei der Negativkontrolle konnte nur ein unspezifischer Hintergrund detektiert werden, der durch die enthaltenen Oligonukleotide sowie genomische DNA zustande kam (Abbildung 9).

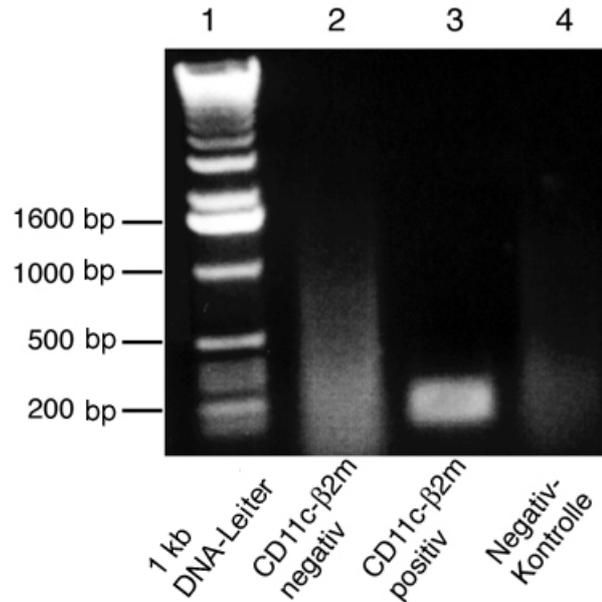


Abbildung 9: Genotypisierung von heterozygoten CD11c-MHCI-Mäusen. Nach Präparation von genomischer DNA aus Schwanzbiopsien, wurden transgene Tiere durch ein 200 bp-PCR-Amplifikat (Spur 3), transgen negative Tiere durch das Fehlen einer spezifischen Bande (Spur 2) identifiziert. In Spur 1 wurde eine 1 kb DNA-Leiter aufgetragen, in Spur 4 die Negativkontrolle, die anstatt DNA Wasser enthielt.

3.1.3 Phänotypische Charakterisierung des CD11c-MHCI-Mausstamms

3.1.3.1 Analyse der MHC-Klasse I-Expression auf peripheren Leukozyten

Zur phänotypischen Charakterisierung wurden Milz- und Lymphknotenzellen von CD11c-MHCI-Mäusen mit Zellen des Wildtypkontrollstamms C57BL/6 bzw. Zellen des $\beta 2m$ -defizienten MHC-I^{-/-}-Stamms verglichen.

Die generelle Identifizierung von DC mittels Durchflusszytometer ist in Abbildung 10 am Beispiel einer CD11c-MHCI-Maus dargestellt. Innerhalb der Milz-Zellsuspension wurden zuerst große und granulöse Zellen zur näheren Analyse ausgewählt (Abbildung 10, links). Nach diesem so genannten „gaten“ konnten DC anhand ihrer CD11c-Expression identifiziert werden, wobei durch die gleichzeitige Verwendung eines anti-Klasse I-Antikörpers auch die MHC-I-Expression der DC überprüft werden konnte (Abbildung 10, rechts).

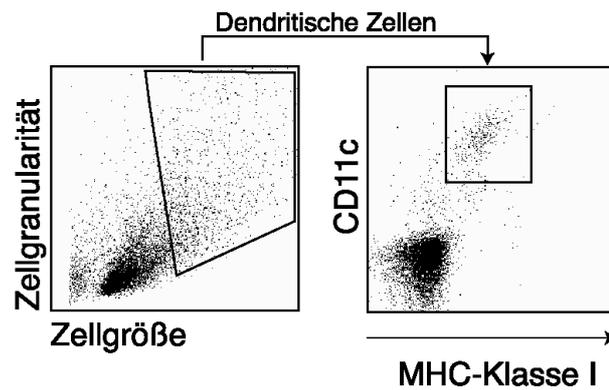


Abbildung 10: Darstellung der durchflusszytometrischen Identifikation von DC innerhalb einer Milz-Zellsuspension. Dies geschah durch Analyse der Zellgröße, Zellgranularität sowie durch den Einsatz Fluorochrom-gekoppelter Antikörper.

Zur phänotypischen Analyse der MHC-Expression wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt und die MHC-Klasse I- (H-2K^b)- und II- (H-2I-A^b)-Expression auf DC durchflusszytometrisch überprüft. Wie bereits beschrieben, wurden hierzu große und granulöse Zellen innerhalb der Einzelzellsuspension näher analysiert.

Anschließend wurde diese Zellpopulation anhand ihrer CD11c- und CD11b-Expression in fünf weitere Subpopulationen unterteilt (Abbildung 11 A). In allen fünf Subpopulationen der jeweiligen Mausstämmen wurden keine unterschiedlichen MHC-II-Expressionsmuster festgestellt (Abbildung 11 B). Darüber hinaus exprimierte keine der untersuchten MHC I^{-/-}-Zellpopulationen MHC-Klasse I K^b (Abbildung 11 C).

CD11c⁺CD11b⁻DC (Abbildung 11, A, Population 1) exprimierten große Mengen MHC-Klasse II (Abbildung 11, B, Histogramm 1). Beim Vergleich der MHC-Klasse I-Expression zeigten sich identische H-2 K^b-Expressionsmuster auf diesen DC (früher als DC lymphoiden Ursprungs bezeichnet) der CD11c-MHCI- sowie C57BL/6-Mäuse (Abbildung 11, C, Histogramm 1). Die CD11c⁻CD11b⁺-Zellen (Abbildung 11, A, Population 2) wurden als myeloide DC bezeichnet. Auch bei diesem Zelltyp konnte kein Unterschied in der H-2 K^b-Expression zwischen CD11c-MHCI-Mäusen und der Wildtypkontrolle (C57BL/6) detektiert werden (Abbildung 11 C, Histogramm 2). MHC-Klasse II war auf diesem Zelltyp in allen drei Mausstämmen identisch hoch exprimiert (Abbildung 11 B, Histogramm 2).

Eine dritte große Population (Abbildung 11 A) konnte anfangs grob durch CD11b⁺- sowie geringe CD11c-Expression charakterisiert werden. Diese Zellen ließen sich detaillierter anhand ihrer CD11c-Expression in drei einzelne Subpopulationen unterteilen (Abbildung 11 A 3, 4, 5). Beim Vergleich der MHC-Klasse I-Expression konnte hier eine identische Expression in CD11c-MHCI- und MHC-I^{-/-}-Mäusen nachgewiesen werden. In C57BL/6-

Mäusen wurde im Vergleich eine signifikant höhere Expression festgestellt (Abbildung 11 C, Histogramm 5). Mit zunehmender CD11c-Expression wurde in den CD11c-MHCI-Mäusen auch eine leichte Erhöhung der MHC-Klasse I-Expression gegenüber den $\beta 2m^{-/-}$ -Mäusen erkennbar, die jedoch deutlich unter dem Expressionslevel der C57BL/6-Mäuse blieb (Abbildung 11 C, Histogramme 4 und 3). Die Analyse der drei Subpopulationen auf MHC-Klasse II-Expression zeigte wiederum keine Unterschiede zwischen den einzelnen Maustämmen, aber eine deutlich niedrigere I-A^b-Expression verglichen mit den Populationen 1 und 2 (Abbildung 11 B).

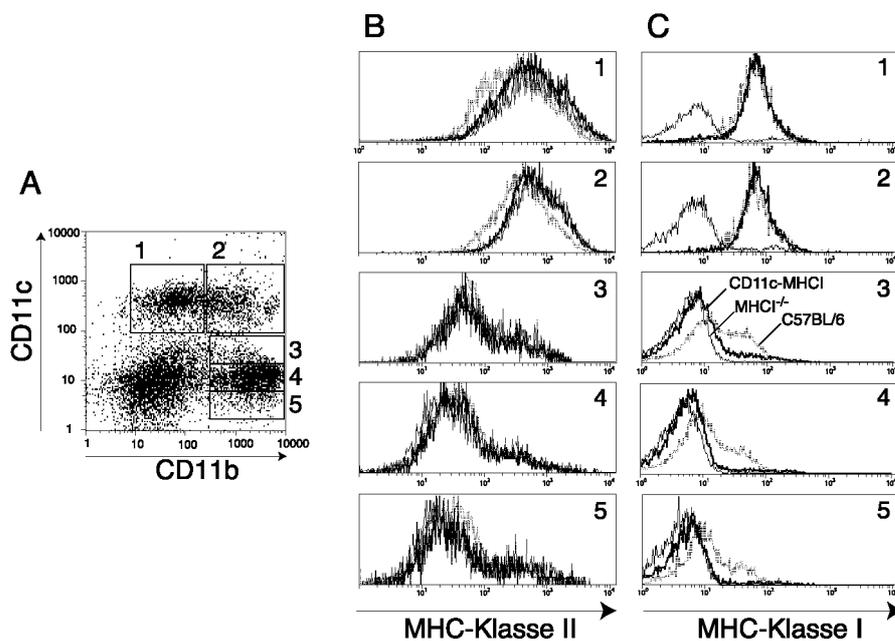


Abbildung 11: Auswirkungen des CD11c- $\beta 2m$ Transgens auf die MHC-I-Expression von DC. Einzelzellsuspensionen aus Collagenase behandelten Milzen von C57BL/6-, CD11c-MHCI- sowie MHC-I^{-/-}-Mäusen wurden durchflusszytometrisch mittels fluoreszierender Antikörper analysiert. Die gezeigten Daten beziehen sich gemäß DC-Phänotyp auf Zellen mit relativ hohen FSC und SSC (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden anhand von CD11c- sowie CD11b-Anfärbungen fünf verschiedene Zellpopulationen identifiziert (A). Diese einzelnen Populationen wurden mittels eines anti-MHC-Klasse II I-A^b- (B) oder eines anti-MHC-Klasse I K^b-Antikörpers (C) auf MHC-Expression überprüft.

Zusätzlich zu DC und Makrophagen wurde auch die dritte große Zellpopulation innerhalb der APC, die B-Zellen, in der Peripherie analysiert. Hierzu wurde eine Einzelzellsuspension aus Milz- oder Lymphknotenzellen hergestellt. B-Zellen wurden mittels anti-CD19-Antikörper identifiziert und die MHC-Klasse I-Expression durch Verwendung eines anti-H-2 K^b-Antikörpers in C57BL/6-, CD11c-MHCI- und $\beta 2m^{-/-}$ -Mäusen überprüft (Abbildung 12). Im Gegensatz zu DC und Makrophagen haben B-Zellen eine geringere Größe und weisen ebenfalls eine geringere Granularität auf. Im Durchflusszytometer wurde dementsprechend

auf Zellen geringer Zellgröße und Granularität „gated“ (Daten nicht gezeigt). In C57BL/6-Mäusen (MHC^{I+}) waren > 92% aller B- (CD19⁺) sowie nicht-B-Zellen (CD19⁻) in Lymphknoten (Abbildung 12, A) und Milz (Abbildung 12, B) MHC-Klasse I positiv. In CD11c-MHCI⁻ und auch $\beta 2m^{-/-}$ -Mäusen konnte auf CD19⁺ Zellen und auf CD19⁻-Zellen keine MHC-Klasse I-Moleküle detektiert werden. Insgesamt wurde in beiden Organen ein MHC-Klasse I-Hintergrund von < 1% gemessen.

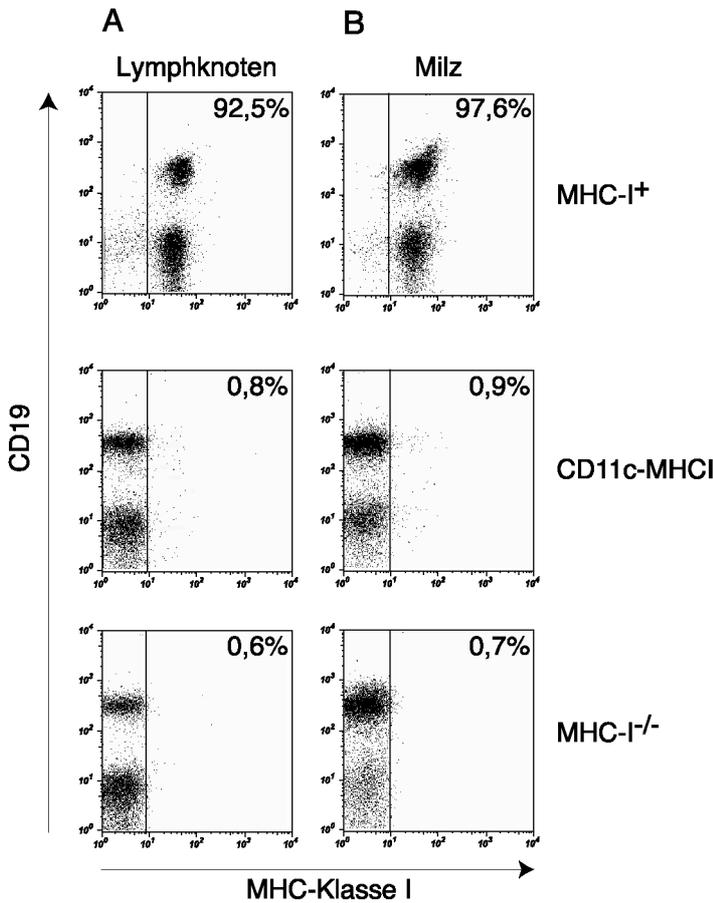


Abbildung 12: MHC-Klasse I-Expression auf B-Zellen Einzelzellsuspensionen aus Lymphknoten (A) und Milzen (B) von C57BL/6-, CD11c-MHCI⁻ sowie MHC-I^{-/-}-Mäusen wurden durchflusszytometrisch mittels fluoreszierender Antikörper analysiert. Untersucht wurden Zellen geringer Größe und Granularität (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden die MHC-Klasse I-Expression auf B-Zellen mittels eines anti-H-2 K^b- und anti-CD19-Antikörpers überprüft. Die Prozentzahlen repräsentieren den Anteil der MHC-Klasse I⁺ Zellen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die $\beta 2m$ -Rekonstitution in $\beta 2m^{-/-}$ -Mäusen unter der Kontrolle des CD11c- $\beta 2m$ Transgens, zu einer wildtyp-ähnlichen Expression von MHC-I-Molekülen auf den diversen DC Subpopulationen, aber nicht auf Makrophagen und B-Zellen führte.

3.1.3.2 Analyse der MHC-Klasse I-Expression auf Thymuszellen

Da der Einfluss von DC auf die Selektion von CD8-T-Zellen überprüft werden sollte, wurde im Folgenden die MHC-Klasse I-Expression im Thymus der drei Mausstämmen verglichen.

Hierzu wurden Einzelzellsuspensionen aus präparierten Thymi hergestellt. Die unterschiedlichen Zelltypen des Thymus wurden anschließend durchflusszytometrisch auf ihre H-2 K^b-Expression untersucht. Zuerst wurden CD45⁺-Zellen mit einem relativ kleinen FSC/SSC analysiert (Daten nicht gezeigt). Diese Zellen repräsentieren hauptsächlich Thymozyten (Abbildung 13, CD45⁺). Die CD45⁺-Zellen aus CD11c-MHCI- sowie MHC I^{-/-}-Mäusen waren MHC-Klasse I negativ. Im Gegensatz hierzu konnte eine heterogene MHC-I-Expression auf C57BL/6-Mäusen detektiert werden. Die wenigen CD45⁻-Zellen im Thymus derselben Zellfraktion waren Stromazellen (Abbildungen 13, CD45⁻). Auch bei diesem Zelltyp wurde keine MHC-Klasse I-Expression bei CD11c-MHCI- und MHC-I^{-/-}-Mäusen festgestellt. In C57BL/6-Mäusen konnte nur eine geringe MHC-I-Expression nachgewiesen werden. Eine kleinere Zellfraktion der CD45⁻ C57BL/6-Mäusen zeigte aber eine hohes Maß an MHC-Klasse I-Expression (Abbildung 13, CD45⁻). Neben der Analyse der relativ kleinen Thymozyten wurden auch Zellen mit größerem FSC/SSC analysiert. In dieser Zellfraktion befanden sich unter anderen DC. Beim Vergleich der MHC-I-Expression auf CD11c⁺-Zellen konnte, wie zuvor in der Peripherie (Abbildung 11), eine identische Menge an MHC-I-Molekülen auf Zellen aus CD11c-MHCI- wie auch C57BL/6-Mäusen detektiert werden. Auf Zellen des MHC-I^{-/-}-Mausstamms konnte auch hier keine MHC-I-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 13, CD11c⁺). Die CD11c⁺-Zellen dieser Fraktion konnten anhand ihrer zusätzlich hohen Expression von MHC-Klasse II-Molekülen eindeutig als DC identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Eine kleine Fraktion (≈5%) CD11c⁺-Zellen in CD11c-MHCI-Mäusen zeigte keine MHC-Klasse I-Expression. Dieses Phänomen korreliert mit anderen transgenen Mausstämmen, in denen unterschiedliche Gene unter dem CD11c-Promotor exprimiert wurden (Brocker 1997; Brocker *et al.* 1997b; Nopora *et al.* 2002). Es zeigte sich, dass die Expression des Transgens mit der Expression von CD11c eng korreliert. Durch zunehmende Differenzierung der DC, bei der auch CD11c vermehrt exprimiert wird, konnte auch eine zunehmende Expression des Transgens beobachtet werden (Brocker *et al.* 1997a). Die CD11c⁻-Zellfraktion im Thymus, hauptsächlich Makrophagen (Daten nicht gezeigt), exprimierte kein MHC-Klasse I in CD11c-MHCI- und MHC-I^{-/-}-Mäusen im Gegensatz zu C57BL/6-Mäusen (Abbildung 13, CD11c⁻). Weiterhin wurden B-Zellen im Thymus auf MHC-Klasse I-Expression untersucht. Auch hier exprimierte der überwiegende Teil der CD19⁺-Thymuszellen aus CD11c-MHCI-Mäusen kein MHC-I. Lediglich eine kleine Fraktion CD19-positiver Zellen, die etwa 5-15% ausmachte, waren H-2 K^{b+} (Abbildung 13, CD19), die jedoch in Bezug auf die CD8-T-Zell-Selektion vernachlässigbar waren.

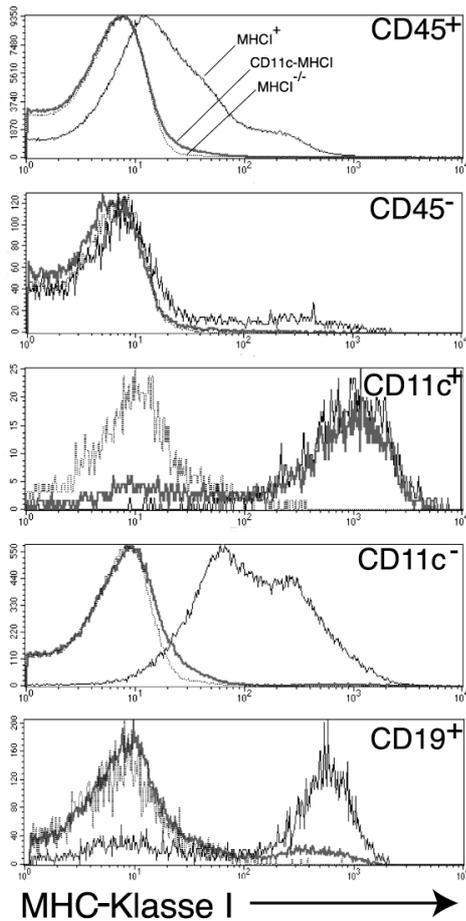


Abbildung 13: Transgene CD11c- $\beta 2m$ -Expression in MHC-I^{-/-}-Mäusen führt zur selektiven MHC-Klasse I-Expression auf DC im Thymus. Einzelzellsuspensionen aus frisch präparierten Thymi von MHC-I^{-/-} (C57BL/6, schwarze Linie), MHC-I^{-/-} (gepunktete, schwarze Linie) und CD11c-MHCI-Mäusen (graue Linie) wurden durchflusszytometrisch auf MHC-Klasse I-Expression mit Hilfe eines anti-H-2 K^bD^b spezifischen Antikörpers untersucht. Thymuszellen geringer Größe wurden in Lymphozyten (CD45⁺) und Stromazellen (CD45⁻) unterteilt. DC im Thymus wurden als große, CD11c⁺-Zellen (CD11c⁺) identifiziert und mit CD11c⁻ CD11b⁺ Makrophagen (CD11c⁻) auf MHC-I-Expression verglichen (Daten nicht gezeigt). B-Zellen des Thymus befanden sich sowohl in der kleinen als auch in der größeren Zellpopulation und wurden anhand CD19 (CD19⁺)-Expression identifiziert.

Wie zuvor in der Peripherie, konnte auch im Thymus gezeigt werden, dass in den transgenen CD11c-MHCI-Mäusen eine Expression von Klasse I Molekülen selektiv auf DC zu detektieren war. Die Höhe der MHC-I-Expression auf DC unterscheidet sich nicht von der MHC-I-Expression auf DC aus C57BL/6-Mäusen.

3.1.3.3 Histologische Analyse von Thymuszellen

Um auch histologisch das MHC-I-Expressionsmuster im Thymus von CD11c-MHCI-Mäusen zu untersuchen, wurden Thymusschnitte von C57BL/6-, CD11c-MHCI- und MHC-I^{-/-}-Mäusen angefertigt und durch Immunfluoreszenz analysiert (Abbildung 14). Wie erwartet, zeigte sich im Thymus von C57BL/6-Mäusen (Abbildung 14 A) eine uniforme MHC-I-Expression im Cortex und der Medulla. In der Medulla exprimierten sowohl die Epithelzellen des Thymus wie auch CD11c⁺DC MHC-Klasse I-Moleküle. Im Gegensatz hierzu exprimierten CD11c-MHCI-Mäuse ausschließlich CD11c⁺ DC H-2 K^b (Abbildung 14 B). In

MHC-I^{-/-}-Mäusen konnte im Thymus histologisch kein MHC-Klasse I nachgewiesen werden (Abbildung 14, C). Dies konnte auch mit einem anderen MHC-Klasse I spezifischen anti-H-2 K^bD^b-Antikörper bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Die Lokalisation der CD11c⁺ DC in allen drei Thymi entsprach der in der Literatur beschriebenen Anordnung in der Medulla und deren Übergang zum Cortex (Abbildung 14) (Barclay *et al.* 1981; Fairchild *et al.* 1990; Brocker *et al.* 1997b). Eine Analyse der MHC-I exprimierenden DC in CD11c-MHCI- und MHC-I^{-/-}-Mäusen bei höherer Vergrößerung zeigte bei ersteren eine nicht immer gleichmäßige CD11c-Anfärbung der DC-Zelloberfläche (Abbildung 14, D, siehe Pfeil). Dies führte bei einigen DC zu einer H-2 K^b-Anfärbung ohne gleichzeitige CD11c-Färbung (Abbildung 14, D). Diese ungleichmäßige Verteilung auf der Zelloberfläche konnte bereits für andere Mitglieder der CD11-Familie gezeigt werden (Pyszniak *et al.* 1994). Die dieses Phänomen betreffenden Zellen konnten aber in der höheren Vergrößerung sowie durch die unter 3.1.3.2 beschriebene Analyse klar als DC identifiziert werden.

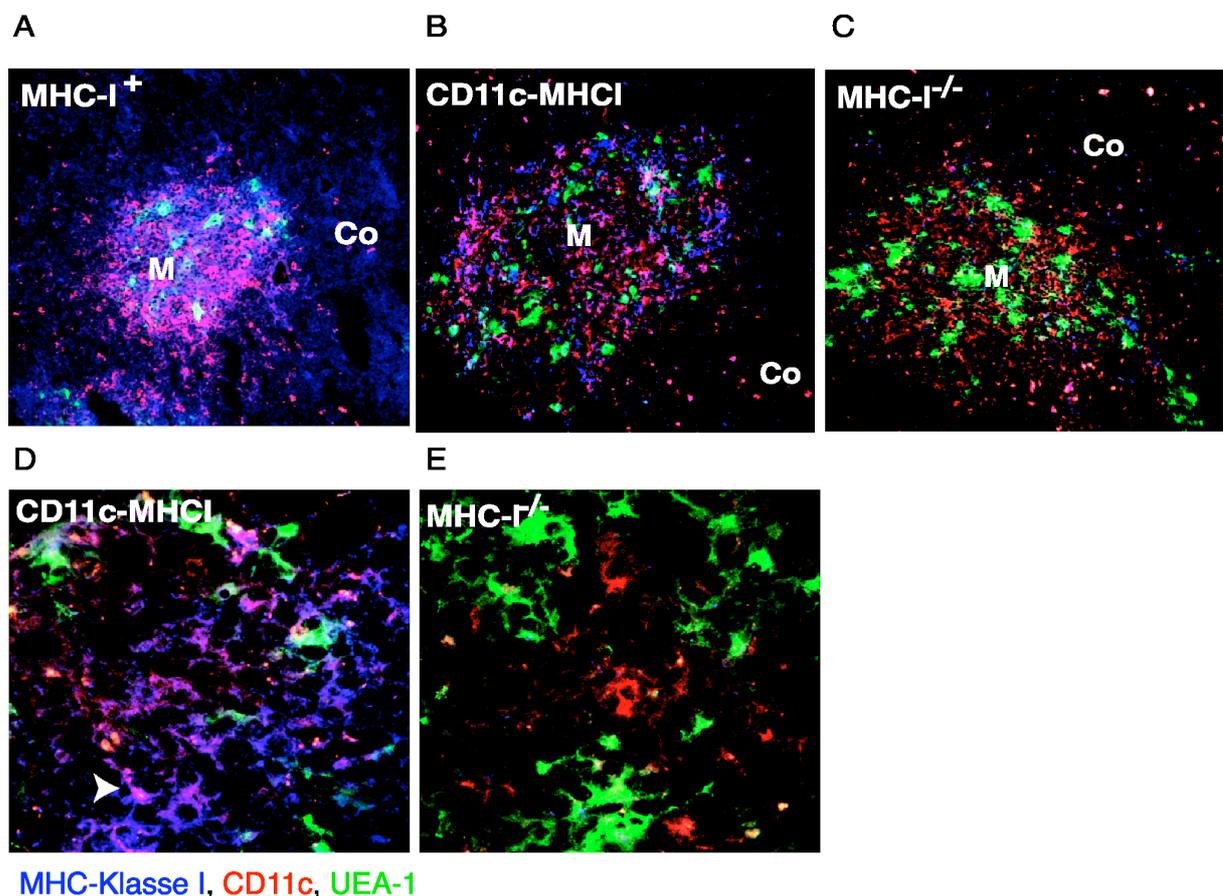


Abbildung 14: Histologische Identifizierung von MHC-Klasse I exprimierenden Zellen im Thymus von CD11c-MHCI-Mäusen. Gewebeschnitte von Thymi aus MHC-I⁺-(C57BL/6) (A), CD11c-MHCI- (B), sowie MHC-I^{-/-}-Mäusen (C) wurden nach Immunofluoreszenz-Anfärbung auf MHC-Klasse I-Expression untersucht. Zum spezifischen Anfärben von Epithelzellen der Medulla wurde das Reagenz UEA-1-FITC (grün), für DC ein anti-CD11c-PE- (rot) und für MHC-Klasse I ein anti-H-2 K^b-APC-Antikörper (blau) verwendet. Bei MHC-I-Expression auf Epithelzellen kam es daher zu einer Farbüberlagerung von Grün und Blau, bei MHC-I-Expression auf DC dementsprechend von Rot und Blau. D zeigt eine höhere Vergrößerungen eines CD11c-MHCI-Thymus, E die höhere Vergrößerung eines MHC-I^{-/-}-Thymus. Der Pfeil in (D) markiert eine Dendritische

Zelle mit unregelmäßiger Verteilung von CD11c-Molekülen auf der Zelloberfläche. Die Aufnahmen wurden mit 12-facher (A-C) sowie mit 97-facher Vergrößerung (D, E) aufgenommen.

Wie bei der durchflusszytometrischen Untersuchung zeigte auch die Analyse von Gewebeschnitten des Thymus die Expression von MHC-Klasse I in CD11c-MHCI-Mäusen nur auf DC. Durch die histologische Untersuchung konnte, im Gegensatz zur durchflusszytometrischen Analyse, die ungleichmäßige CD11c-Expression auf DC erkannt werden.

3.2 Einfluss Dendritischer Zellen im Thymus auf das CD8-T-Zell-Repertoire

3.2.1 Analyse des CD11c- $\beta 2m$ Transgens auf die Frequenz CD8-T-Zellen im Thymus und in der Peripherie

Vorherige Studien (Zijlstra *et al.* 1990) zeigten, dass MHC-I^{-/-}-Mäuse trotz des fehlenden $\beta 2$ -Mikroglobulin ein gewisses CD8⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺ T-Zell-Repertoire besaßen. Es zeigte sich, dass die Expression weniger $\beta 2m$ -freier MHC-I-Moleküle auf Thymus-Epithelzellen ausreichte, um die beschriebene CD8-T-Zell-Population auf diese instabilen MHC-I-schweren Ketten positiv zu selektionieren (Glas *et al.* 1994). Wenn DC die positive Selektion von CD8-T-Zellen, wie von Shizuru *et al.* (Shizuru *et al.* 2000), Yasutomo *et al.* (Yasutomo *et al.* 2000) und Zerrahn *et al.* (Zerrahn *et al.* 1999) postuliert, induzieren würden, dann müsste in CD11c-MHCI-Mäusen eine normale CD8-T-Zellpopulation in der Peripherie erwartet werden. Um dies zu überprüfen, wurden durchflusszytometrisch Thymus- und Lymphknoten-Zellsuspensionen analysiert und quantifiziert (Abbildung 15 A, B).

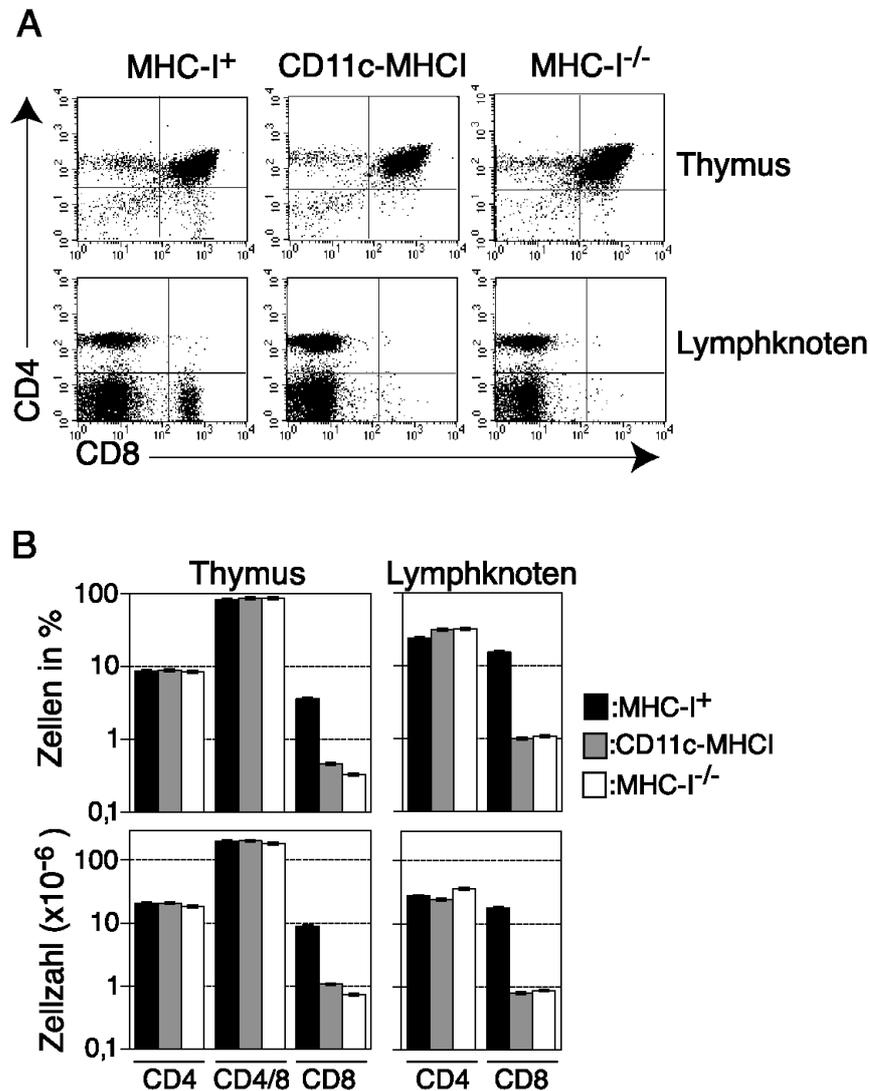


Abbildung 15: Einfluss des CD11c- $\beta 2m$ Transgens auf die T-Zell-Frequenz in Thymus und in der Peripherie. Einzelzellsuspensionen (A) von Thymuszellen (obere Reihe), sowie Lymphknotenzellen (untere Reihe), wurden mit anti-CD4-PerCP- und anti-CD8-APC-fluoreszierenden Antikörpern angefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die gesetzten Quadranten dienen zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der CD4⁺, CD4⁺CD8⁺ sowie CD8⁺-Thymozyten (obere Reihe) bzw. zur CD4⁺- und CD8⁺-Analyse von Lymphozyten (untere Reihe). Das Verhältnis von CD4- zu CD8-Lymphozyten (untere Reihe) betrug in MHC-I⁺-Mäusen 1,6, in CD11c-MHCI-Mäusen 31,4 und in MHC-I^{-/-}-Mäusen 29,1. (B) Die prozentuale Verteilung sowie die absoluten Zellzahlen von CD8- und CD4-Zellen aus (A) wurden aus Gruppengrößen n=5 (MHC-I⁺, CD11c-MHCI) bzw. n=4 (MHC-I^{-/-}) errechnet. Die unterschiedlichen Werte der CD8⁺-Thymozyten in CD11c-MHCI- und MHC-I^{-/-}-Mäusen waren statistisch nicht signifikant (Student'scher *t*-Test p=0,13 (Zellen in %) und p=0,28 (absolute Zellzahlen)). Die Resultate wurden in mindestens drei unabhängigen Experimenten bestätigt.

In C57BL/6-Mäusen wurde ein prozentualer CD8-T-Zell-Anteil von 3,6% im Thymus (Abbildung 15 A, B) und 15,2% in Lymphknoten nachgewiesen (Abbildung 15 A, B). Im Gegensatz hierzu fehlten in CD11c-MHCI-Mäusen mit 0,46% CD8⁺-Thymozyten sowie mit 0,99% CD8⁺-Lymphozyten im gleichen Umfang wie in MHC-I^{-/-}-Mäusen mit 0,33% CD8⁺-Thymozyten und 1,07% peripheren CD8⁺-Lymphozyten (Abbildung 15 A, B). Die totale

Zellzahl der CD8⁺-Thymozyten in CD11c-MHCI-Tieren (Abbildung 15 B, $1,07 \pm 0,45 \times 10^6$) war gegenüber der Zahl in MHC-I^{-/-}-Mäusen statistisch nicht erhöht ($0,74 \pm 0,41 \times 10^6$) (Abbildung 15 B, Student's *t*-Test: $p=0,29$). Die gemessenen Zellzahlen waren in diesen Tieren ca. 8-fach niedriger verglichen mit C57BL/6-Mäusen ($8,9 \pm 1,4 \times 10^6$) (Abbildung 15 B). Diese Unterschiede konnten auch in den peripheren Lymphknoten gemessen werden. Das Verhältnis von CD4⁻ zu CD8⁺-Zellen in CD11c-MHCI-Mäusen betrug 31,4 und war vergleichbar mit dem in MHC-I^{-/-}-Mäusen (CD4/CD8=29,1), während sich diese beiden Werte von dem CD4/CD8-Verhältnis in C57BL/6-Mäusen (CD4/CD8=1,6) unterschieden (Abbildung 15 B). Im Gegensatz hierzu waren Prozentsätze und absolute Zellzahlen von CD4⁺- sowie CD4⁺CD8⁺-Zellen im Thymus und von CD4⁺-Zellen in der Peripherie gleich (Abbildung 15 A, B).

Zusammengefasst ließ sich die anfangs aufgestellte Hypothese zum Einfluss von DC auf die Selektion von CD8-T-Zellen mit diesen Daten nicht bestätigen, da in CD11c-MHCI-Mäusen die Expression von MHC-Klasse I ausschließlich auf DC keine „normale“ Anzahl an CD8⁺-Zellen in dem Thymus und der Peripherie zur Folge hatte.

Um detailliertere Informationen über die einzelnen CD8-T-Zell-Population in den drei unterschiedlichen Mausstämmen zu erhalten, wurden durchflusszytometrische Analysen der $\alpha\beta$ -TCRs bei CD8- und als zusätzliche Kontrolle bei CD4-T-Zellen durchgeführt.

Bei der Analyse der CD4⁺-Zellen konnten weder Unterschiede bei prozentualen Anteilen (Abbildung 16 A) noch bei absoluten Zellzahlen (Daten nicht gezeigt) der CD4-Subpopulationen mit TCR-V β 5, -V β 6, -V β 8 oder -V β 11 in den drei Mausstämmen detektiert werden. In den CD8⁺TCR-V β 6, -V β 8 oder -V β 11 T-Zellen konnte zwischen CD11c-MHCI- und MHC-I^{-/-}-Tieren kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abbildung 16 A). Der Anteil CD8⁺TCR-V β 5⁺-Zellen war jedoch in CD11c-MHCI-Mäusen doppelt so hoch wie in MHC-I^{-/-}-Mäusen (Abbildung 16 A, Student'scher T Test $p=0,001$). Obgleich dieser prozentualen Differenz, unterschieden sich die absoluten Zellzahlen bei allen untersuchten „V β -Repertoires“ zwischen diesen beiden Stämmen nicht (Abbildung 16, B). Aufgrund der bisherigen Ergebnisse ist daher nicht auszuschließen, dass MHC-I⁺-DC die Zusammensetzung des T-Zell-Repertoires im Thymus entscheidend beeinflussen können.

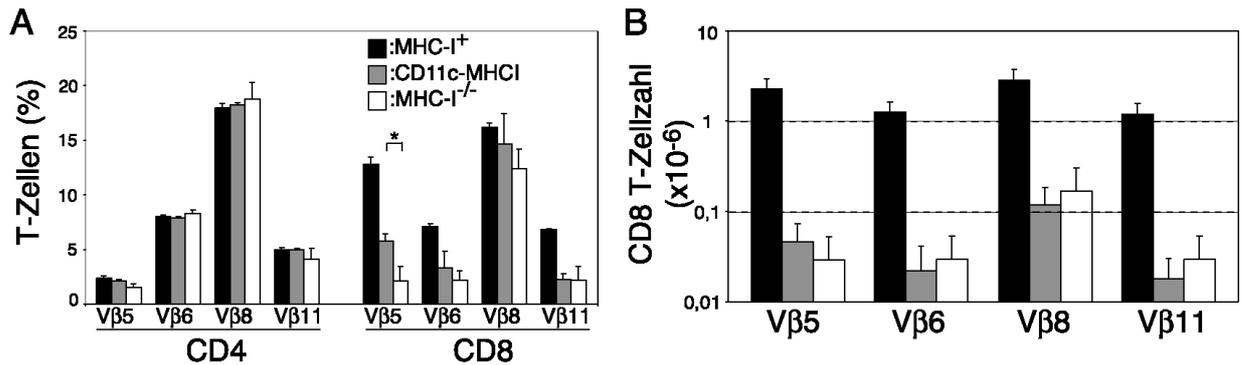


Abbildung 16: Auswirkung der MHC-Klasse I-Expression selektiv auf DC auf die Zusammensetzung der CD8-T-Zellpopulation. Lymphknoten zellen der verschiedenen Mausstämmen wurden mit anti-CD4-PerCP- und anti-CD8-APC- sowie mit entweder anti-TCRVβ5.1/5.2-FITC-, anti-TCRVβ6-FITC-, anti-TCRVβ8.1/8.2-FITC- oder anti-TCRVβ11-FITC-fluoreszierenden Antikörpern inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Ergebnisse werden dargestellt als Prozent von CD4⁺Vβ⁺- oder CD8⁺Vβ⁺-Lymphozyten (A) und als absolute Zellzahlen von CD8⁺Vβ⁺-Zellen (B). Die absoluten Zellzahlen von CD4⁺Vβ⁺-Zellen waren nahezu identisch in allen untersuchten Mausstämmen (Daten nicht gezeigt). Die gezeigten Werte wurden aus Gruppengrößen n=5 errechnet und dargestellt als Mittelwerte (± Standardabweichung). Die durch einen * gekennzeichneten Werte zeigen eine statistische Signifikanz, berechnet nach Student'schem *t*-Test p=0,001.

3.2.2 Beteiligung von Epithelzellen des Thymus bei der positiven Selektion von CD8-T-Zellen

Um den ausschließlichen Einfluss von DC auf die CD8-T-Zellselektion im Thymus (in CD11c-MHCI-Mäusen) im Vergleich mit allen im Thymus vorkommenden Knochenmarkzellen (in C57BL/6-Mäusen) bei gleichzeitigem Ausschluss der Thymusepithelzellen untersuchen zu können, wurden Knochenmarkchimären generiert. Hierzu dienten MHC-I^{-/-}-Mäuse als Rezipienten für Knochenmarktransplantate aus C57BL/6-, CD11c-MHCI- und, als Kontrolle, aus MHC-I^{-/-}-Mäusen. Da die nicht-klassischen Ib-Moleküle, wie auch die klassischen Ia-Moleküle, β2-Mikroglobulin zur stabilen Expression benötigen, und die Chimären im genetischen β2m „knock out“-Hintergrund (MHC-I^{-/-}) generiert wurden, exprimierten die Thymusepithelzellen in diesen Tieren weder MHC-Klasse Ia- noch Ib-Moleküle.

In den so generierten MHC-I⁺-Mäusen (C57BL/6=Knochenmarkdonoren) und in MHC-I^{-/-}-Knochenmarkrezipienten, (MHC-I⁺>MHC-I^{-/-})-Mäusen, exprimierten nur die in den Thymus einwandernden Knochenmarkzellen MHC-Klasse I, in den CD11c-MHCI>MHC-I^{-/-}-Chimären nur DC und in den MHC-I⁺>MHC-I^{-/-} keine Zellen MHC-Klasse I.

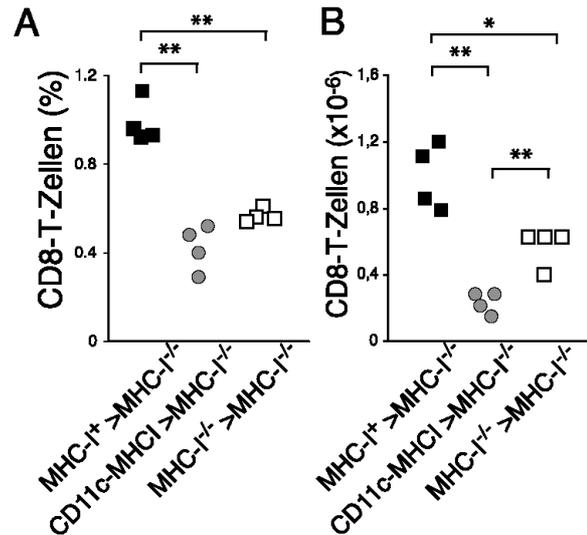


Abbildung 17: Durchflusszytometrische Analyse von CD8-Zellzahlen in bestrahlten Knochenmarkchimären. Milzzellen von MHC-I⁺ (C57BL/6-Donor) > MHC-I^{-/-} (Rezipient), CD11c-MHCI>MHC-I^{-/-}- sowie MHC-I^{-/-}>MHC-I^{-/-}-Knochenmarkchimären wurden mittels anti-CD8-Antikörper auf das Vorkommen peripherer CD8-T-Zellen analysiert. Dargestellt ist das prozentuale Vorkommen (A) sowie die absoluten CD8-Zellzahlen (B) einzelner Individuen in den drei unterschiedlichen Chimären. Die mit * markierten Werte bezeichnen statistische Signifikanzen nach Student'scher *t*-Test ($p < 0,005$ {**}, $p < 0,05$ {*}).

Die Analyse der CD8-T-Zellen in den peripheren Geweben dieser Chimären zeigte ähnliche Resultate wie die Analyse in den Nicht-Chimären (Abbildung 15). Der Anteil an CD8-T-Zellen in den Lymphknoten aus CD11c-MHCI>MHC-I^{-/-}-Chimären unterschied sich nicht von dem in MHC-I^{-/-}>MHC-I^{-/-}-Mäusen (Abbildung 17 A, Student'scher *t*-Test $p > 0,06$). Verglichen jedoch mit den MHC-I⁺>MHC-I^{-/-}-Chimären, in denen alle aus dem Knochenmark in den Thymus eingewanderten Zellen MHC-I exprimieren, zeigten sowohl CD11c-MHCI>MHC-I^{-/-} als auch MHC-I^{-/-}>MHC-I^{-/-}-Chimären einen niedrigeren Prozentsatz und eine niedrigere CD8-Zellzahl (Abbildung 17 A, B, Student'scher *t*-Test $p < 0,005$ sowie $p < 0,05$). Die Gesamtzellzahl der Milz betrug in MHC-I⁺>MHC-I^{-/-}-Chimären: $74 \pm 5 \times 10^6$, in CD11c-MHCI>MHC-I^{-/-}-Chimären: $43 \pm 16 \times 10^6$ und in MHC-I^{-/-}>MHC-I^{-/-}-Chimären: $62 \pm 29 \times 10^6$. Das Ergebnis der positiven Selektion im Thymus durch aus dem Knochenmark eingewanderte Zellen in MHC-I⁺>MHC-I^{-/-}-Chimären war ca. 20-30-fach niedriger verglichen mit der positiven Selektion in normalen Mäusen, in denen auch die Epithelzellen des Thymus MHC-I exprimierten (Abbildung 15, B). Eine signifikant niedrigere Anzahl totaler CD8-T-Zellen wurde in den Lymphknoten von CD11c-MHCI>MHC-I^{-/-}-Chimären verglichen mit MHC-I^{-/-}>MHC-I^{-/-}-Mäusen gefunden (Abbildung 17, B, Student'scher *t*-Test $p < 0,05$).

Diese Daten zeigten, dass zur positiven Selektion von CD8-T-Zellen im Thymus APC hämatopetischen Ursprungs alleine nicht ausreichend waren.

3.2.3 Positive Selektion von klassischen sowie nicht-klassischen CD8-T-Zellen durch DC im Thymus

Die in dieser Arbeit bisher beschriebenen Analysen lassen eine positive Selektion durch MHC-I⁺-DC im Thymus, wie von einigen anderen Arbeitsgruppen zum Teil vermutet, für wenig wahrscheinlich erscheinen. Das Fehlen funktioneller, zytotoxischer T-Zellen konnte jedoch durch die bisherigen phänotypischen Analysen nicht ausgeschlossen werden. Daher wurden im folgenden funktionelle Tests nach unterschiedlichen Immunisierungen durchgeführt. Urdahl *et al.* (2002) zeigten, dass positive Selektion von nicht-klassischen MHC-Ib-restringierten CD8-T-Zellen ausschließlich durch Zellen hämatopoetischen Ursprungs im Thymus stattfindet. Die Rolle von DC in diesem Kontext, sollte im Folgenden mit den bereits erwähnten Maus-Chimären überprüft werden.

Hierzu wurden die drei unterschiedlichen Chimären mit einem rekombinanten Ovalbumin (OVA) sezernierenden Stamm des intrazellulären Bakteriums *Listeria monocytogenes* (rLM-OVA, Pope *et al.*, 2001) infiziert. Die Vorteile der Infektion mit rLM-OVA waren das durch diese Bakterien produzierte, rekombinante OVA-Epitop für MHC-Ia-restringierte CD8-T-Zellen, die *Listeria monocytogenes*-spezifische Expression des H2-M3-Epitops für MHC-Ib-restringierte CD8-T-Zellen sowie das Fehlen bekannter *Listeria monocytogenes*-Epitope in C57BL/6-Mäusen.

An Tag sechs nach Infektion, wurden rLM-OVA spezifische MHC-Klasse Ib sowie MHC-Klasse Ia restringierte CD8-T-Zellen durchflusszytometrisch mit Hilfe von Tetrameren analysiert. Mit den zur Verfügung stehenden Tetrameren konnten MHC-Ib restringierte CD8-T-Zellen gegen das *Listeria monocytogenes*-spezifische Peptid f-MIGWII, das durch nicht-klassische H2-M3 MHC-I-Moleküle präsentiert wird, nachgewiesen werden (Lenz *et al.* 1996). Weiterhin war es möglich MHC-Ia (H-2K^b) restringierte CTL gegen das prozessierte OVA-Peptid SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄) (Rotzschke *et al.* 1991) zu detektieren.

Während der Hintergrund der H2-M3-f-MIGWII-Tetramer⁺CD8-T-Zellen in den Milzen der nicht infizierten Mäuse bei ungefähr 0,05% lag (Daten nicht gezeigt), stieg dieser nach Infektion in Wildtyp-C57BL/6-Mäusen sowie in MHC-I⁺>MHC-I⁻-Chimären auf das sechs- bzw. fünffache an (Abbildung 18 A).

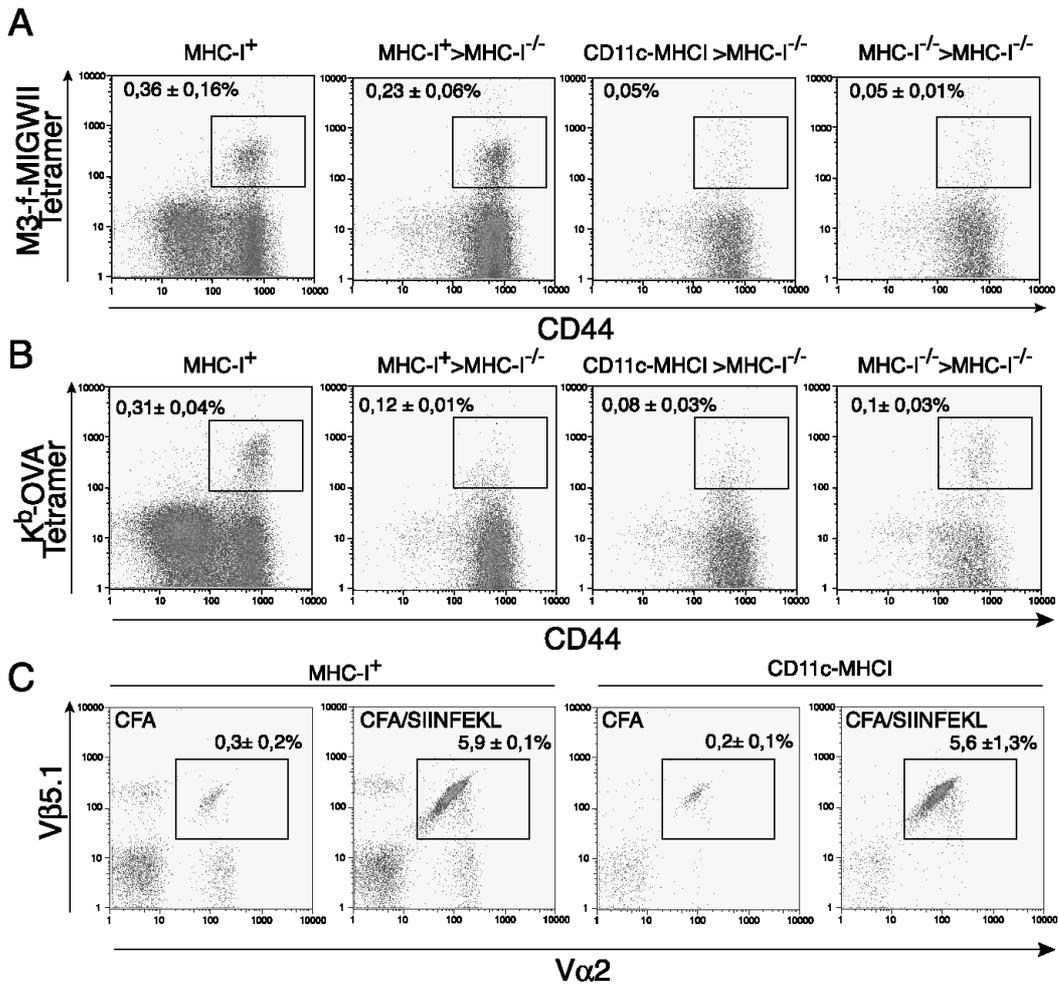


Abbildung 18: DC beeinflusste positive Selektion von klassischen sowie nicht-klassischen CD8-T-Zellen. Wildtyp-MHC-I⁺ (C57BL/6)-Kontrollmäuse sowie die 3.2.2 beschriebenen Knochenmarkschimären wurden mit 2000 CFU OVA-sezierenden *L. monocytogenes* (rLM-OVA) intravenös infiziert und sechs Tage später zur Analyse euthanasiert. Einzelzell suspensionen aus der Milz wurden mit fluoreszierenden Antikörpern gegen CD8 (Daten nicht gezeigt) und den T-Zell-Aktivierungsmarker CD44 sowie mit H2-M3-f-MIGWII MHC-Tetrameren gegen nicht-klassische MHC-Moleküle angefärbt (A). Die Zahlen verdeutlichen die prozentualen Anteile CD8⁺CD44⁺Tetramer⁺-Zellen im Verhältnis zur Gesamtheit der Milzzellen. In (B) wurde dieselbe Analyse wie in (A) durchgeführt und zusätzlich K^b-OVA-Tetramere gegen klassische MHC-Moleküle eingesetzt. (C) Analyse von adoptiv transferierten OT-1-Zellen fünf Tage nach subkutaner Immunisierung mit CFA/PBS- (CFA) oder 300 µg OVA₂₅₇₋₂₆₄ in CFA-Emulsion (CFA/OVA₂₅₇₋₂₆₄). Analyse der OT-1-Zellen im peripheren Blut erfolgte durchflusszytometrisch durch anti-CD8-, anti-Vα2- sowie anti-Vβ5.1/5.2-Antikörper. Die Zahlen geben Durchschnittswerte (± Standardabweichung) von n=5 Mäusen pro Gruppe an. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von wenigstens drei mit vergleichbaren Ergebnissen.

In den übrigen Chimären (CD11c-MHCI>MHC-I^{-/-}, MHC-I^{-/-}>MHC-I^{-/-}) führte die rLM-OVA-Infektion zu keiner Erhöhung von H2-M3-f-MIGWII-Tetramer⁺CD8-T-Zellen (Abbildung 18 A). Analog zeigten nur Wildtyp-C57BL/6-Mäuse eine signifikante sechs- bis zehnfache Erhöhung MHC-Ia restringierter CD8-T-Zellen nach rLM-OVA-Infektion (Abbildung 18 B). Im Gegensatz hierzu waren in allen Chimären die Tetramer⁺-Zellpopulationen sehr klein (Abbildung 14 B). Da in MHC-I^{-/-}>MHC-I^{-/-}-Chimären MHC-I⁺ antigenpräsentierende Zellen fehlten, wurde hier keine Expansion spezifischer CD8-T-Zellen erwartet. Das Fehlen von

Tetramer⁺CD8-T-Zellen in CD11c-MHCI>MHC-I^{-/-}-Chimären konnte hierdurch aber nicht erklärt werden, da in der Peripherie dieser Tiere MHC-I⁺DC vorhanden sind (Kurts *et al.* 2001). Eine mögliche Erklärung hierfür könnten nicht funktionelle MHC-I⁺DC in der Peripherie sein. Um die Funktionalität dieser peripheren MHC-I⁺DC in CD11c-MHCI-Mäusen hinsichtlich Antigenpräsentation zu überprüfen, wurde nachfolgendes Experiment durchgeführt.

TCR-transgene, OVA₂₅₇₋₂₆₄-spezifische OT-1-T-Zellen wurden in C57BL/6- sowie in CD11c-MHCI-Mäuse transferiert und anschließend mit OVA₂₅₇₋₂₆₄ sowie komplettem Freundeschem Adjuvans immunisiert. Anhand einer möglichen Expansion der transferierten CD8-T-Zellen konnte so die Funktionalität der DC in CD11c-MHCI-Mäusen *in vivo* überprüft werden (Abbildung 18 C). Während in den Kontrollimmunisierungen (nur CFA) keine Antigen spezifische OT-1-Expansion in beiden Mausstämmen gemessen werden konnte, ließ sich in den CFA/OVA₂₅₇₋₂₆₄-immunisierten C57BL/6- sowie in den CD11c-MHCI-Mäusen eine identische Expansion der OT-1-Zellen um ungefähr das 20-fache gegenüber den Kontrollgruppen beobachten (Abbildung 18 C). Übereinstimmend mit anderen Daten (Kurts *et al.* 2001) konnte hiermit eine nicht funktionale β 2m-Expression in CD11c-MHCI-Mäusen ausgeschlossen werden.

Aus diesen Daten konnte abgeleitet werden, dass DC weder nachweisbare H2-M3- noch H-2K^b-restringierte CD8-T-Zellpopulationen positiv selektionieren können.

3.2.4 Einfluss von DC auf die negative Selektion von CD8-T-Zellen

Die Analyse β 2m-defizienter Mäuse zeigte nur eine reduzierte Anzahl von CD8-T-Zellen (Abbildung 15, 16, (Zijlstra *et al.* 1990)), jedoch konnte deren Funktion in anderen Berichten definiert werden. CD8-T-Zellen aus β 2m^{-/-}-Mäusen waren „spezifisch“ für alle MHC-I⁺ Zellen und konnten diese lysieren (Glas *et al.* 1994). Das transgene CD11c-MHCI Maussystem erlaubte die Analyse, ob durch Expression von MHC-I auf DC in MHC-I^{-/-}-Mäusen bei sich entwickelnden β 2m^{-/-} CD8-T-Zellen gegenüber MHC-I-Molekülen Toleranz induziert wird. Ein weiterer Zelltyp, der für die Abstoßung allogener Transplantate aufgrund unterschiedlicher MHC-Klasse I-Moleküle verantwortlich ist, sind die NK-Zellen (Bix *et al.* 1991). Diese Zellen erkennen und eliminieren auch Zellen, die z.B. aufgrund einer Mutation, keine MHC-Klasse I-Moleküle mehr exprimieren (Hoglund *et al.* 1991; Liao *et al.* 1991). Durch das Fehlen von MHC-I-Molekülen auf Zellen in MHC-I^{-/-}-Mäusen sind NK-Zellen in diesen Mäusen nicht auf fehlende, sondern auf vorhandene MHC-I-Moleküle sensibilisiert. Dies führt zu einer Tolerisierung von MHC-I^{-/-}-Zellen und einer Eliminierung von MHC-I-

exprimierenden Zellen in $\beta 2m^{-/-}$ -Mäusen (Bix *et al.* 1991; Hoglund *et al.* 1991; Liao *et al.* 1991).

Um den direkten Einfluss von MHC-I⁺DC auf die MHC-I-reaktive CD8-T-Zellpopulation zu analysieren, wurde ein *in vivo*-Zytotoxizitätstest durchgeführt. Durch dieses Testsystem kann unmittelbar *in vivo* die Zytotoxizität von Effektorzellen gegenüber transferierten Zielzellen gemessen werden.

In dem herkömmlichen Standardtest werden aktivierte CD8-T-Zellen mit radioaktiven Chrom-markierten Zielzellen *in vitro* inkubiert. Bei der Lyse der markierten Zielzellen wird messbare Radioaktivität frei. Der Vorteil des hier verwendeten Zytotoxizitätstests, liegt darin, dass es sich um ein *in vivo* Messsystem mit sehr hoher Sensitivität handelt und darüberhinaus unter wesentlich physiologischeren Bedingungen abläuft als der herkömmliche Chrom-Freisetzungstest.

In vorliegendem Fall wurden MHC-Klasse I exprimierende Zielzellen mit einer hohen Konzentration CFSE markiert (CFSE⁺⁺⁺). Gleichzeitig wurde die gleiche Anzahl MHC-I^{-/-}-Zellen, die mit einer geringen Konzentration CFSE (CFSE⁺) markiert wurden, in Empfängertiere der drei unterschiedlichen Mausstämme transferiert (siehe 2.2.2.15). 24 h nach Transfer konnten diese Zellen durchflusszytometrisch anhand ihrer unterschiedlich hohen CFSE-Fluoreszenz analysiert werden. Bei einer Abstoßung der MHC-I⁺-Zellen beispielsweise, würde dies durch eine geringere Anzahl CFSE⁺⁺⁺-Zellen im Vergleich zu CFSE⁺-Zellen (MHC-I^{-/-}) offenbar (Abbildung 19). Da das Zielzellen-Verhältnis vor Transfer in die einzelnen Mausstämmen auf 50% MHC-I^{-/-} und 50% MHC-I⁺-Zellen (1:1) eingestellt wurde, konnte die selektive Lyse einer der beiden transferierten Zellpopulationen wie unter 2.2.2.15 beschrieben nachgewiesen werden.

Abbildung 19 zeigt die detektierbaren MHC-I^{-/-} sowie MHC-I⁺-Zellen nach Transfer in C57BL/6-, MHC-I^{-/-} und CD11c-MHCI-Mäuse. Wie bereits zuvor beschrieben (Bix *et al.* 1991; Hoglund *et al.* 1991; Liao *et al.* 1991) konnte in C57BL/6-Rezipienten eine spezifische Lyse von MHC-I^{-/-}-Zielzellen detektiert werden, während MHC-I⁺-Zielzellen nicht lysiert wurden (Abbildung 19, A). Im Gegensatz hierzu wurde in MHC-I^{-/-}-Rezipienten die Lyse von MHC-I⁺-Zellen und keine Abstoßung der transferierten MHC-I^{-/-}-Zellen beobachtet (Abbildung 19, A). In CD11c-MHCI-Rezipienten wurden weder MHC-I^{-/-} noch MHC-I⁺-Donorzellen abgestoßen (Abbildung 19, A). Dies resultierte in einem MHC-I^{-/-} / MHC-I⁺-Verhältnis von $1,08 \pm 0,03$, im Gegensatz zu $0,42 \pm 0,02$ in MHC-I⁺-C57BL/6-Rezipienten und $1,67 \pm 0,15$ in MHC-I^{-/-}-Rezipienten (Abbildung 19, B).

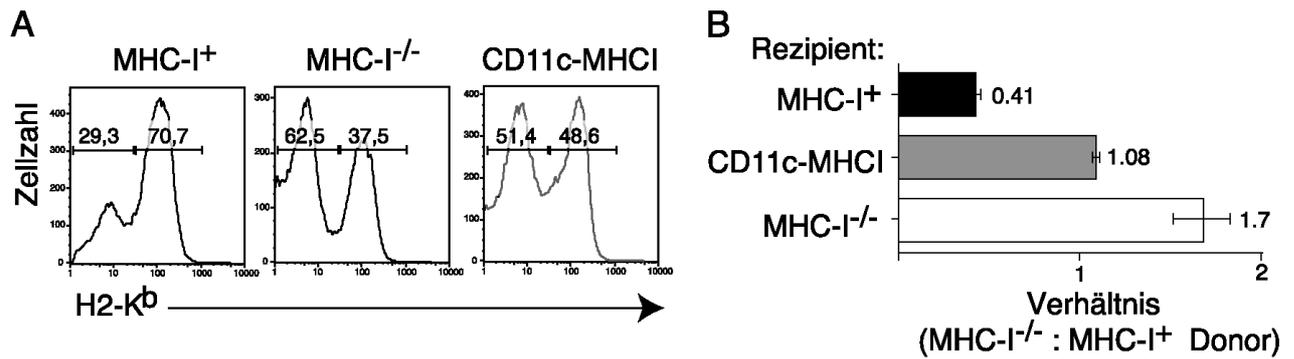


Abbildung 19: Tolerisierung von MHC-I⁺/MHC-I^{-/-}-Transplantaten. Zur Überprüfung der *in vivo*-Zytotoxizität in den angegebenen Mausstämmen wurden unterschiedlich markierte CFSE Milzzellen aus C57BL/6- (MHC-I⁺) und MHC-I^{-/-}-Donoren im Verhältnis 1:1 intravenös in C57BL/6- (MHC-I⁺) CD11c-MHCI^{-/-} sowie MHC-I^{-/-}-Empfängertiere transferiert. 24 h später wurden die CFSE gefärbten Zellen aus den Milzen der Empfänger (Daten nicht gezeigt) auf ihre H-2K^b-Expression durchflusszytometrisch analysiert. (A) Die Zahlen über den markierten Regionen zeigen die relativen Prozentsätze der MHC-I^{-/-}- (linke Seite) gegenüber der MHC-I⁺-Population (rechte Seite) von CFSE positiven Zellen. (B) Diese Prozentsätze wurden zueinander in Verhältnis gesetzt. Ergebnisse zeigen die Daten von n=5 Mäusen pro Gruppe.

In dem hier beschriebenen Test wäre theoretisch eine lytische Aktivität zwischen der transferierten MHC-I^{-/-}-MHC-I⁺-Zellpopulation möglich. Dies hätte eine gegenseitige, Rezipienten-unabhängige Abstoßung von MHC-I⁺-Zellen durch MHC-I^{-/-} CTL sowie von MHC-I^{-/-}-Zellen durch MHC-I⁺ NK-Zellen zur Folge. Obwohl dies anhand des MHC-I^{-/-} / MHC-I⁺-Verhältnisses von 1 in CD11c-MHCI-Mäusen unwahrscheinlich erschien, wurde der oben beschriebene Versuch leicht modifiziert wiederholt, um auch das Überleben der einzeln transferierten Zielzellen in den drei Empfängerstämmen analysieren zu können. Hierzu wurden MHC-I⁺- sowie MHC-I^{-/-}-Zellen einzeln in C57BL/6-, CD11c-MHCI- und MHC-I^{-/-}-Mäuse transferiert und ihr Überleben über mehrere Wochen im peripheren Blut verfolgt (Abbildung 20).

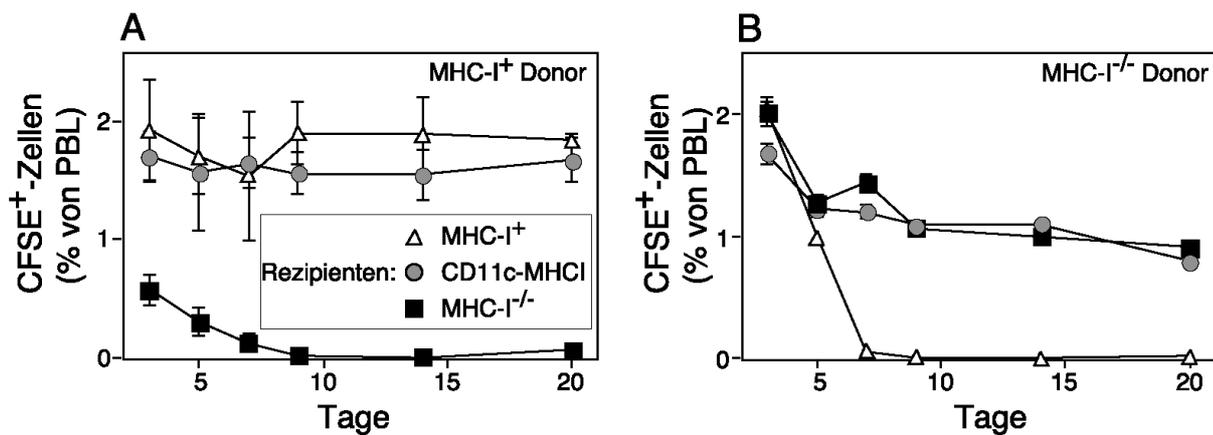


Abbildung 20: Überleben von MHC-I⁺/MHC-I^{-/-}-Zelltransplantaten. Um die Tolerisierung der zwei verschiedenen Zielzellpopulationen über längere Zeit verfolgen zu können, wurden CFSE markierte MHC-I⁺- (A) oder MHC-I^{-/-}-Zellen (B) i.v. in die drei angegebenen Mausstämme transferiert. An Tag 3, 5, 7, 9, 14 und 20 wurde durchflusszytometrisch der Gehalt an CFSE⁺-Zellen im peripheren Blut gemessen. Gezeigt sind die Prozentsätze der CFSE⁺-Zellen von totalen peripheren Blutlymphozyten an den unterschiedlichen Tagen als Mittelwerte \pm SD (Standardabweichung) für eine Gruppengröße von n=3.

C57BL/6 (MHC-I⁺)-Empfängertiere tolerisierten syngene MHC-I⁺-Donorzellen drei Wochen (Abbildung 20 A) und länger (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz hierzu wurden MHC-I^{-/-}-Donorzellen schon zwei Tage nach Transfer in MHC-I^{-/-}-Empfängertiere abgestoßen und konnten nach Tag neun nicht mehr nachgewiesen werden (Abbildung 20, A). CD11c-MHCI-Mäuse akzeptierten MHC-I⁺-Donorzellen ähnlich wie C57BL/6-Mäuse. Um ein eventuell unterschiedliches Verhalten einzelner Subpopulation innerhalb der transferierten MHC-I⁺-Zellen zu untersuchen, wurden zusätzlich CD4⁺-, CD8⁺- sowie B220⁺-Subpopulationen einzeln untersucht. Auch hierbei ergab sich ein gleiches Bild wie bei C57BL/6-Mäusen (Daten nicht gezeigt). Die Expression von MHC-Klasse I auf DC war offensichtlich ausreichend, um bei CD8-T-Zellen, die in MHC-I^{-/-}-Mäusen für die Abstoßung des MHC-I^{-/-}-Donorzellen verantwortlich waren, Toleranz zu induzieren.

Während C57BL/6-Empfänger die MHC-I^{-/-}-Donorzellen innerhalb von sieben bis neun Tagen vollständig durch NK-Zellen abstießen, akzeptierten die MHC-I^{-/-}-, wie auch die CD11c-MHCI-Mäuse das Transplantat (Abbildung 20, B). Übereinstimmend mit den Ergebnissen aus Abbildung 20 A konnte daher gezeigt werden, dass DC vermutlich keinen Einfluss auf die Spezifität von NK-Zellen haben, die verantwortlich für die Abstoßung von MHC-I^{-/-}-Zellen sind.

3.3 Die Rolle von Dendritischen Zellen bei CD8-T-Zell Antworten *in vivo*

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Dendritische Zellen nicht nur mögliche, sondern auch ausreichende Initiatoren einer CD8-T-Zell Immunantwort sind. Andere Studien ließen bereits vermuten, dass DC eine der wichtigsten Zelltypen bei der Induktion von CD8-Effektorzellen sind. Der außerordentliche Einfluss von DC wird auch für die Toleranzinduktion diskutiert. Durch unterschiedliche Immunisierungen, sowie Immunisierungsrouten sollte im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden, ob DC in CD11c-MHCI-Mäusen, in denen sie die einzigen MHC-I⁺-APC sind, ausreichend für die Induktion einer MHC-I-restringierten Immunantwort sind. Auch sollte der direkte Vergleich mit C57BL/6 –Mäusen, in denen alle potenziellen APC an der CD8-T-Zell-Aktivierung beteiligt sind, direkten Aufschluss über das Potenzial von DC geben.

Für die Experimente wurde stets nach dem in Abbildung 21 dargestellten Grundprinzip vorgegangen. Für den CD8-Zelltransfer wurden zunächst OT-1-T-Zellen aus der Milz und den Lymphknoten transgener OT-1-Mäuse isoliert. 5×10^6 dieser gereinigten OT-1-T-Zellen wurden einen Tag vor Immunisierung durch adoptiven Transfer in CD11c-MHCI- sowie in C57BL/6-Mäuse überführt. Einen Tag nach CD8-T-Zell-Transfer erfolgte die Immunisierung. Anschließend sollte zunächst in regelmäßigen Abständen die Antigen spezifische CD8-T-Zell Expansion im peripheren Blut mittels fluoreszenz-markierter Antikörper gemessen werden. Neben der Analyse der OT-1-Expansionskinetik sollten unter anderem Messungen zur intrazellulären Zytokinproduktion sowie weitere Untersuchungen zur Zytotoxizität der transferierten OT-1-Zellen in Milz und Lymphknoten vorgenommen werden (Abbildung 21, A).

Die durchflusszytometrische Analyse der OT-1-Zellen nach Transfer (Abbildung 21, B), geschah zunächst durch Identifizierung der Lymphozytenpopulation innerhalb der präparierten Gesamtzellen anhand der Zellgröße und Granularität. Anschließend wurde der in dieser Population enthaltene Prozentsatz an CD8-T-Zellen mittels anti-CD8-Antikörper bestimmt. Innerhalb der CD8-T-Zellpopulation wurden OT-1-Zellen anhand ihres TCR durch anti-V α 2- und anti-V β 5.1- Antikörper identifiziert. Durch den Einsatz von Antikörpern gegen Aktivierungsmarker (z.B. anti-CD44) konnte darüber hinaus der Aktivierungszustand der OT-1-Zellen bestimmt werden.

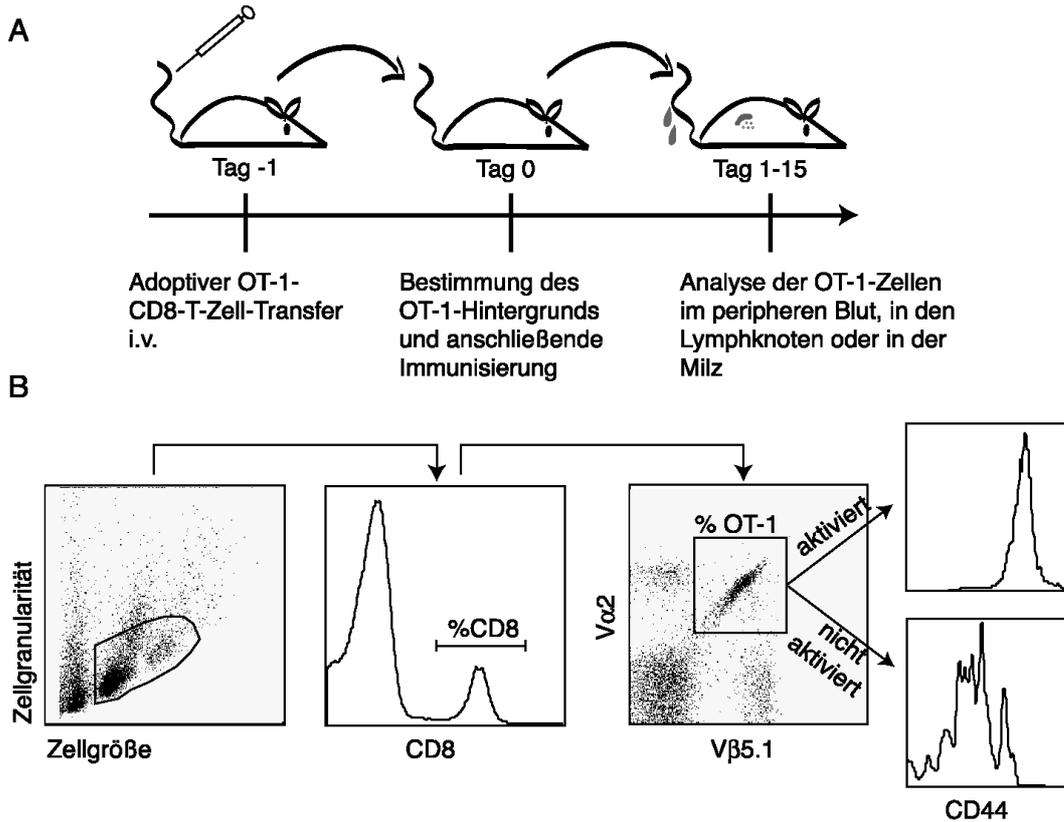


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Versuchsabläufe zur Bestimmung des Einflusses von DC auf CD8-T-Zell-basierte Immunantworten (A) sowie die durchflusszytometrische Analyse von OT-1-T-Zellen (B).

3.3.1 Induktion von CD8-T-Zell-Immunität durch DC nach Immunisierung mit inflammatorischem Adjuvans und Antigen

3.3.1.1 Antigen spezifische CD8-T-Zell-Expansion im peripheren Blut

Um CD8-T-Zell-Antworten in CD11c-MHCI-Mäusen spezifisch quantifizieren zu können, mussten wie zuvor beschrieben, CD8-T-Zellen in die transgenen Tiere sowie in die C57BL/6-Kontrollmäuse transferiert werden. Anschließend wurden beide Empfängerstämme mit einer Mischung kompletten Freundschem Adjuvans mit 300 μ g des OT-1 spezifischen antigenen Peptids OVA₂₅₇₋₂₆₄ subkutan immunisiert. Vor Immunisierung wurde der prozentuale Anteil der transferierten OT-1-Zellen im peripheren Blut mittels Fluoreszenz-markierter OT-1-TCR spezifischer anti-V α 2-, -V β 5- sowie anti-CD8-Antikörper bestimmt. An den Tagen 3, 5, 7, 9 und 14 nach Immunisierung wurde die Expansion der OT-1-Zellen im Blut durchflusszytometrisch detektiert (Abbildung 22 A).

Um zusätzlich zur subkutanen Immunisierung auch einen Vergleich der OT-1-Expansionskinetik im peripheren Blut nach systemischer, also intravenöser Immunisierung mittels Adjuvans und OVA₂₅₇₋₂₆₄ zu erhalten, wurden hierzu die beiden unterschiedlichen Empfängerstämme nach OT-1-Transfer intravenös mit 50 μg Lipopolysaccharid (LPS) und 10 μg OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid immunisiert (Abbildung 22 B). Wie zuvor wurde vor Immunisierung der OT-1-Hintergrund und anschließend die OT-1-Expansion an den Tagen 1, 3, 5, 7, 9 und 14 bestimmt.

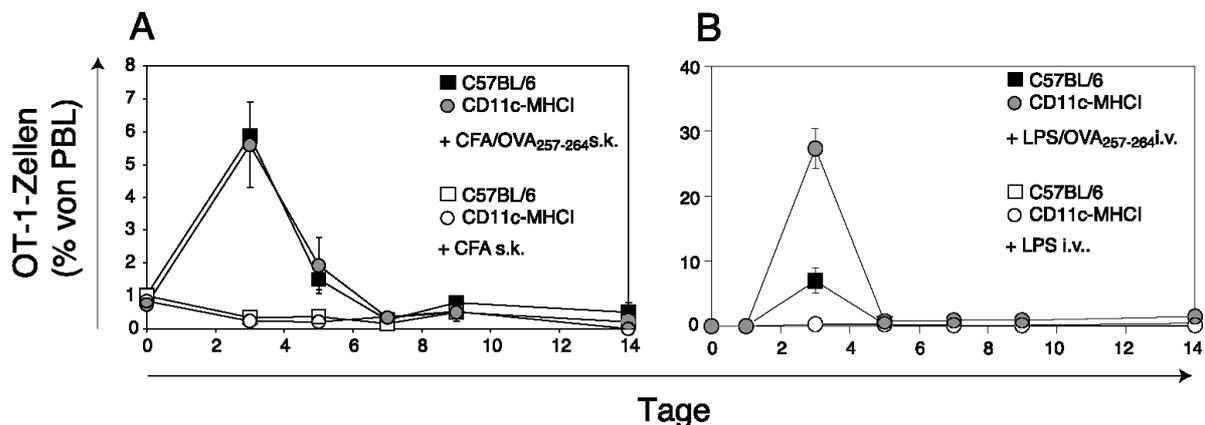


Abbildung 22: DC induzierte OT-1-T-Zell-Expansion im peripheren Blut. In C57BL/6- (Quadrate) sowie CD11c-MHCI-Mäusen (Kreise) wurden an Tag -1 jeweils 5×10^6 gereinigte OT-1-T-Zellen adoptiv transferiert. An Tag 0 wurden die einzelnen Mäuse mit $300 \mu\text{g}$ OVA₂₅₇₋₂₆₄ in CFA (gefüllte Symbole) s.k. immunisiert oder als Kontrolle mit CFA alleine (ungefüllte Symbole) (A). Eine weitere Versuchsgruppe wurde jeweils mit $10 \mu\text{g}$ OVA₂₅₇₋₂₆₄ und $50 \mu\text{g}$ LPS (gefüllte Symbole) oder mit LPS allein (ungefüllte Symbole) i.v. immunisiert (B). Die Expansionskinetik der transferierten OT-1-Zellen wurde durch Bestimmung des prozentualen Anteils der OT-1-Zellen im peripheren Blut an den aufgeführten Tagen erstellt. Dies geschah durchflusszytometrisch anti-TCR V α 2-, V β 5.1- sowie anti-CD8-Antikörpern. Die Gruppengröße betrug mindestens $n=3$ für die OVA₂₅₇₋₂₆₄-Immunisierungen und mindestens $n=2$ für die Kontrollgruppen ohne OVA₂₅₇₋₂₆₄. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

Die OT-1-Expansionskinetik in der CFA/OVA₂₅₇₋₂₆₄ s.k. immunisierten Gruppe zeigte keinen Unterschied zwischen transgenen CD11c-MHCI- und C57BL/6-Mäusen (Abbildung 22 A). Dies deutet darauf hin, dass DC als alleinige APC völlig ausreichend sind, um naive CD8-Zellen optimal zur Antigen spezifischen, klonalen Expansion zu aktivieren. Nach Immunisierung nahm die prozentuale OT-1-Population kontinuierlich bis zu einem Expansionsmaximum an Tag 3 zu und ging danach wieder bis auf den Hintergrundwert an Tag 7 zurück (Abbildung 22 A).

Die OT-1-Expansionskinetik nach LPS/OVA₂₅₇₋₂₆₄-Immunisierung war in beiden Empfängerstämmen dagegen sehr unterschiedlich (Abbildung 22 B). Es konnte ein Expansionsmaximum an Tag 3 festgestellt werden, jedoch war die spezifische OT-1-

Expansion in CD11c-MHCI-Mäusen an diesem Tag etwa dreifach höher wie in C57BL/6-Mäusen. Während am Maximum die OT-1-Frequenz in C57BL/6-Mäusen $7,4 \pm 1,1\%$ der peripheren Blutlymphozyten betrug, konnten in CD11c-MHCI-Mäusen $22,3 \pm 1,3\%$ OT-1-Zellen nachgewiesen werden. Nach LPS/OVA₂₅₇₋₂₆₄-Immunisierung konnte eine schnellere Kontraktion der OT-1-Zellpopulation nach Erreichen des Maximums verglichen mit den CFA/OVA₂₅₇₋₂₆₄ immunisierten Mäusen beobachtet werden. Die Basislinie wurde hier schon an Tag 5 nach Immunisierung erreicht, wobei sich die transferierten Zellen in beiden Mausstämmen wieder gleich verhielten (Abbildung 22 B). In beiden Versuchen wurde parallel der Aktivierungszustand der transferierten OT-1-Zellen mittels Fluoreszenz markierter anti-CD44 Antikörper überprüft. Vor Immunisierung zeigten alle OT-1-Zellen einen nicht aktivierten Phänotyp, während nach Immunisierung alle transferierten CD8-Zellen bis zum Ende der Messungen CD44 heraufreguliert hatten (Daten nicht gezeigt). In den Kontrollgruppen, die nur mit CFA bzw. LPS ohne OVA₂₅₇₋₂₆₄ immunisiert wurden, konnte weder eine Expansion noch eine Aktivierung gemessen werden (Abbildung 22 A, B, Daten nicht gezeigt).

Die im peripheren Blut erhaltenen Resultate konnten auch bei Analyse der Lymphknoten und Milz bestätigt werden. Mäuse der beiden beschriebenen Stämmen wurden wie zuvor immunisiert und die OT-1-Expansion in den peripheren lymphatischen Organen an Tag 3 nach Immunisierung gemäß des Expansionsmaximums im peripheren Blut überprüft (Abbildung 23). Nach subkutaner CFA/OVA₂₅₇₋₂₆₄ Immunisierung konnten auch hier keine signifikanten Unterschiede in der OT-1-Expansion von CD11c-MHCI- verglichen mit C57BL/6-Mäusen gemessen werden (Abbildung 23 A). Bedingt durch die subkutane Immunisierung konnten in den drainierenden Lymphknoten (C57BL/6: $2,2 \pm 0,4\%$, CD11c-MHCI: $1,8 \pm 0,4\%$) mehr OT-1-Zellen als in der Milz (C57BL/6: $0,6 \pm 0,1\%$, CD11c-MHCI: $0,4 \pm 0,2\%$) nachgewiesen werden. Nach intravenöser LPS/OVA₂₅₇₋₂₆₄ Immunisierung konnte, wie im peripheren Blut (Abbildung 22), eine signifikant erhöhte OT-1-Expansion in den Lymphknoten und der Milz der CD11c-MHCI- ($10,4 \pm 1,3\%$ und $7 \pm 0,3\%$) verglichen mit C57BL/6-Mäusen ($5,1 \pm 0,4\%$ und $2,7 \pm 0,3\%$) detektiert werden (Abbildung 23 B). In den Kontrollgruppen, die nur mit CFA s.k. bzw. LPS i.v. immunisiert wurden, konnte weder in den Lymphknoten noch in der Milz eine Expansion von OT-1-Zellen gemessen werden (Daten nicht gezeigt).

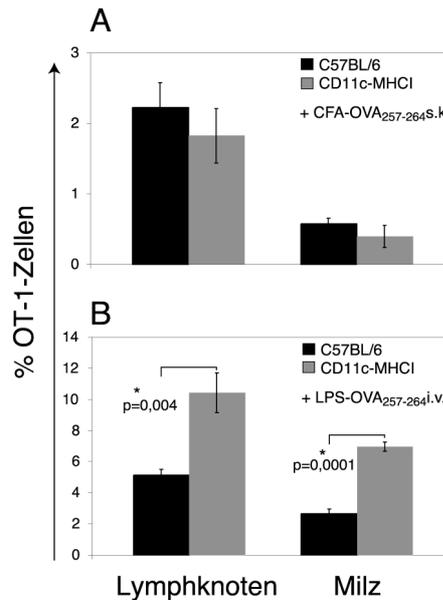


Abbildung 23: DC induzierte OT-1-T-Zell-Expansion in sekundären lymphatischen Organen. In C57BL/6- (schwarze Balken) sowie CD11c-MHCI-Mäusen (graue Balken) wurden an Tag -1 jeweils 5×10^6 gereinigte OT-1-T-Zellen adoptiv transferiert. An Tag 0 wurden die Mäuse mit $300 \mu\text{g}$ OVA₂₅₇₋₂₆₄ in CFA (A) s.k. immunisiert. Eine weitere Versuchsgruppe wurde mit $10 \mu\text{g}$ OVA₂₅₇₋₂₆₄ und $50 \mu\text{g}$ LPS (B) i.v. immunisiert. An Tag 3 nach Immunisierung wurde durchflusszytometrisch der prozentuale Anteil der OT-1-Zellen in den Lymphknoten und der Milz bestimmt. Die mit * gekennzeichneten Werte markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Empfängerstämmen, berechnet nach Student'schem *t*-Test. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD.

Insgesamt konnte beobachtet werden, dass MHC-I⁺DC ausreichend sind, um naive OT-1-Zellen vollständig zu aktivieren und damit deren Expansion zu induzieren. Es wurde jedoch auch gezeigt, dass wahrscheinlich bei unterschiedlichen Immunisierungsrouten oder Adjuvantien anderen MHC-I⁺-Zellen eine Bedeutung bei der Modulation der CD8-Aktivierung zukommt.

3.3.1.2 CD8-T-Zell-Expansion in CD11c-MHCI-Mäusen ist Antigen spezifisch und nicht durch Homeostase bedingt

Wie im ersten Teil dieser Arbeit bereits beschrieben, besitzt der transgene CD11c-MHCI Mausstamm kein endogenes CD8-T-Zell Kompartiment. Für andere T-Zell-defiziente Mausstämmen wurde gezeigt, dass bei adoptivem Transfer T-Zellen in diesen Mäusen spontan expandieren, um das „leere“ T-Zell Kompartiment aufzufüllen. Dies geschieht Antigen unabhängig, kann aber auch nach Antigen spezifischer Primäraktivierung durch eine Art Entkopplung der Expansionsregulation beobachtet werden. Die T-Zellen expandieren aber nur soweit bis das Kompartiment aufgefüllt ist, ihre Populationsgröße bleibt dann konstant.

3 ERGEBNISSE

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass der Ko-Transfer einer großen Zahl polyklonaler CD8-T-Zellen zusätzlich zu monoklonalen, transgenen T-Zellen, die homeostatische Expansion unterdrückte, da von extern ein ausreichend großes T-Zell Kompartiment künstlich zugeführt wurde (Rocha *et al.* 1989; Ernst *et al.* 1999; Dummer *et al.* 2001). Um ausschließen zu können, dass die beobachtete OT-1-Expansion in den CD8-T-Zell-defizienten CD11c-MHCI-Mäusen durch homeostatische Regulation beeinflusst war, wurden die Experimente erneut durchgeführt, wobei den CD11c-MHCI transgenen Mäusen zusätzlich zu den monoklonalen OT-1-Zellen, wie in der Literatur beschrieben (Rocha *et al.* 1989; Ernst *et al.* 1999; Dummer *et al.* 2001), 12×10^6 gereinigte polyklonale C57BL/6-CD8-T-Zellen injiziert wurden (Abbildung 24).

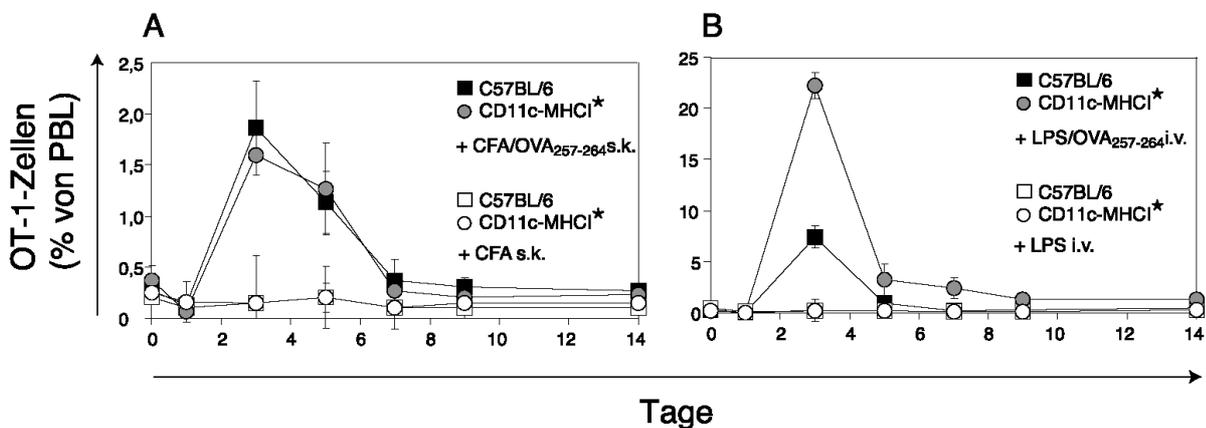


Abbildung 24: Antigen spezifische OT-1-T-Zell-Expansion in CD11c-MHCI-Mäusen. C57BL/6- (Quadrate) sowie CD11c-MHCI-Mäusen (Kreise) wurden an Tag -1 jeweils 5×10^6 gereinigte OT-1-T-Zellen adoptiv transferiert, wobei CD11c-MHCI-Mäusen zusätzlich 12×10^6 syngene C57BL/6-CD8-T-Zellen injiziert wurden. An Tag 0 wurden die Mäuse mit $300 \mu\text{g}$ OVA₂₅₇₋₂₆₄ in CFA (gefüllte Symbole) s.k. immunisiert oder als Kontrolle mit CFA alleine (ungefüllte Symbole) (A). Eine weitere Versuchsgruppe wurde mit $10 \mu\text{g}$ OVA₂₅₇₋₂₆₄ und $50 \mu\text{g}$ LPS (gefüllte Symbole) oder mit LPS alleine (ungefüllte Symbole) i.v. immunisiert (B). Die Expansionskinetik der transferierten OT-1-Zellen wurde durch Bestimmung des prozentualen Anteils der OT-1-Zellen im peripheren Blut an den aufgeführten Tagen erstellt. Die Gruppengröße betrug mindestens $n=3$ für die OVA₂₅₇₋₂₆₄-Immunisierungen und mindestens $n=2$ für die Kontrollgruppen ohne OVA₂₅₇₋₂₆₄. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

In beiden Empfängerstämmen zeigten die OT-1-Zellen nach CFA/OVA₂₅₇₋₂₆₄ s.k.- bzw. LPS/OVA₂₅₇₋₂₆₄ i.v.-Immunisierung die gleiche Expansionskinetik wie in den Experimenten ohne den zusätzlichen polyklonalen CD8-T-Zell-Transfer in CD11c-MHCI-Mäusen (Abbildung 24). Wie zuvor in der CFA/OVA₂₅₇₋₂₆₄ immunisierten Gruppe, verhielten sich auch jetzt die transferierten OT-1-Zellen in CD11c-MHCI- und C57BL/6-Mäusen gleich (Abbildung 24 A). Auch in der LPS/OVA₂₅₇₋₂₆₄ i.v. immunisierten Gruppe verhielten sich die OT-1-Zellen in beiden Stämmen analog (Abbildung 24 B). Dementsprechend war in CD11c-MHCI-Mäusen der Anteil an OT-1-Zellen an Tag 3 wieder dreifach höher wie in C57BL/6-

Mäusen (Abbildung 24 B). Diese beiden Experimente zeigten, dass neben der generellen OT-1-Expansion in CD11c-MHCI-Mäusen zum Anderen auch die erhöhte Expansion nach LPS/OVA₂₅₇₋₂₆₄ Immunisierung nicht homeostatisch bedingt war, sondern eine DC- und Antigen spezifische Reaktion.

3.3.1.3 Produktion des Effektorzytokins IFN γ durch OT-1-Zellen nach Antigen spezifischer Aktivierung

Da Expansion und Induktion von Aktivierungsmarkern nicht ausreichend sind, um auf eine funktionelle Induktion von Effektor-CD8-T-Zellen zu schließen, wurde die intrazelluläre Produktion des Effektorzytokins IFN γ nach OT-1-Aktivierung überprüft. Hierzu wurden die beiden Empfängerstämme nach OT-1-Transfer wieder mit CFA/OVA₂₅₇₋₂₆₄ s.k. bzw. LPS/OVA₂₅₇₋₂₆₄ i.v. immunisiert. An Tag 3 nach Immunisierung wurden die Milz und die Lymphknoten der Tiere präpariert. Die präparierten Zellen wurden 5 h *in vitro* mit OVA₂₅₇₋₂₆₄ stimuliert und anschließend der Prozentsatz IFN γ produzierender OT-1-Zellen mittels OT-1 spezifischer sowie eines anti-IFN γ Antikörpers durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 25). In der CFA/OVA₂₅₇₋₂₆₄ immunisierten Gruppe produzierten OT-1-Zellen in CD11c-MHCI-Mäusen und in C57BL/6-Wild-Typ-Kontrollen gleiche Mengen an IFN γ (Abbildung 25 A). In CD11c-MHCI-Mäusen produzierten 32 \pm 2% der OT-1-Zellen IFN γ , während bei C57BL/6-Mäusen 22 \pm 6% IFN γ positive OT-1-Zellen nachweisbar waren. Die Zytokinproduktion in den transgenen Mäusen verglichen mit C57BL/6-Mäusen war statistisch nicht signifikant (Student'scher *t*-Test $p=0,07$). Analog zu der Expansion in LPS/OVA₂₅₇₋₂₆₄ immunisierten Mäusen, war die IFN γ -Produktion der OT-1-Zellen in CD11c-MHCI-Mäusen (11 \pm 1%) auch hier signifikant um ca. das dreifache gegenüber C57BL/6-Mäusen (3 \pm 1%) erhöht (Abbildung 25 B). In den Kontrollgruppen, die nur mit CFA oder LPS immunisiert waren, zeigten keine der OT-1-Zellen eine nachweisbare IFN γ -Produktion (Daten nicht gezeigt).

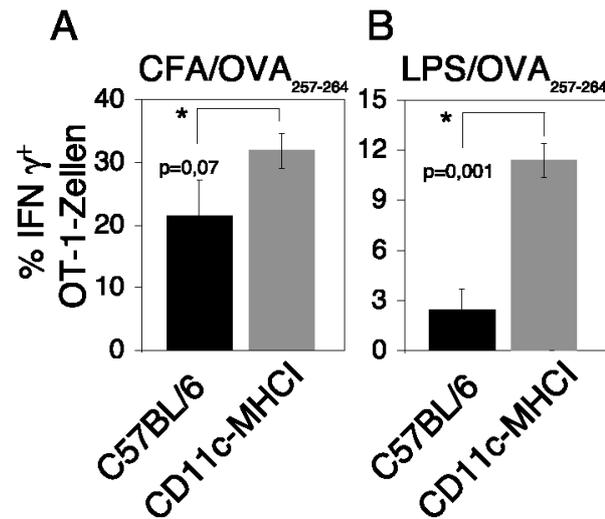


Abbildung 25: IFN γ -Produktion von OT-1-Zellen nach inflammatorischer Immunisierung mit OVA₂₅₇₋₂₆₄. In C57BL/6- (schwarze Balken) sowie CD11c-MHCI-Mäuse (graue Balken) wurden wie bereits in Abbildung 22 beschrieben behandelt. Die intrazelluläre IFN γ -Produktion der transferierten OT-1-Zellen wurde an Tag 3 durch Präparation von Milz-Einzelzellsuspensionen und *in vitro* Restimulation bestimmt. Dies geschah durchflusszytometrisch durch OT-1-spezifische Antikörper sowie durch anti-IFN γ -Antikörper. Die mit * gekennzeichneten Werte repräsentieren statistische Signifikanzen zwischen C57BL/6- und CD11c-MHCI-Mäusen, berechnet nach dem Student'schen *t*-Test (A). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

3.3.1.4 DC sind ausreichend zur Induktion funktioneller zytotoxischer T-Lymphozyten

Um neben Expansion und intrazellulärer Effektorzytokinproduktion auch die Induktion funktioneller zytotoxischer T-Lymphozyten durch DC zu überprüfen, wurde ein *in vivo*-Zytotoxizitätstest durchgeführt. Nach OT-1-Transfer und Immunisierung der Empfängerstämme mit CFA/OVA₂₅₇₋₂₆₄ s.k. bzw. mit LPS/OVA₂₅₇₋₂₆₄ i.v. wurden den einzelnen Tieren an Tag 15 nach Immunisierung 20×10^6 syngene C57BL/6-Milzzellen intravenös verabreicht. Die Hälfte dieser Zellen wurden zuvor *in vitro* mit OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid beladen, die andere Hälfte der transferierten Zellen war unbeladen. Die Peptid beladenen Milzzellen wurden zur anschließenden eindeutigen Identifizierung mit einer hohen, die nicht beladenen Zellen mit einer niedrigeren CFSE-Konzentration markiert.

6 h nach Transfer der unterschiedlich stark CFSE-markierten C57BL/6-Zellen in die immunisierten Mäuse wurde mittels FACS-Analyse das Überleben der CFSE-markierten Zellen überprüft. Aus dem prozentualen Verhältnis zwischen nicht eliminierten Zellen (= geringe CFSE-Konzentration) und Antigen spezifisch eliminierten Zielzellen (= hohe CFSE-Konzentration) wurde die spezifische Lyse der Zielzellen durch aktivierte OT-1-Zellen errechnet (Abbildung 26).

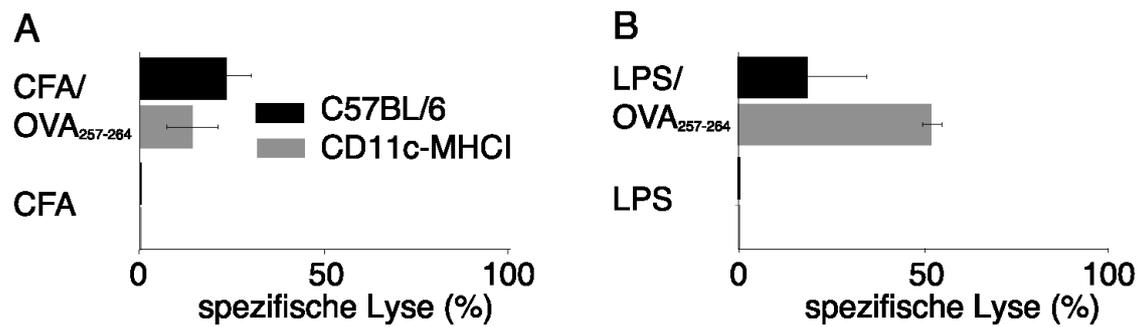


Abbildung 26: Induktion funktioneller CTL nach inflammatorischer Immunisierung mit OVA₂₅₇₋₂₆₄. Nach OT-1-Transfer und CFA/OVA₂₅₇₋₂₆₄ (A) bzw. LPS/OVA₂₅₇₋₂₆₄-Immunisierung (B) (siehe 3.3.1.1) wurde an Tag 15 nach Immunisierung ein *in vivo*-Zytotoxizitätstest durchgeführt. Hierzu wurden Peptid beladene syngene C57BL/6-Milzzellen mit hochkonzentriertem CFSE (CFSE⁺⁺⁺) und die gleiche Menge unbeladener Milzzellen mit niedrigkonzentriertem CFSE (CFSE⁺) markiert und zu gleichen Anteilen in die C57BL/6- oder CD11c-MHCI-Mäuse transferiert. 6 h nach Transfer wurden Milzzellen der Empfängertiere auf die selektive Eliminierung Peptid beladener-CFSE⁺⁺⁺-Zellen durch Bestimmung des CFSE⁺⁺⁺/CFSE⁺-Verhältnisses im Durchflusszytometer untersucht. Aus diesem Verhältnis wurde gemäß der Formel $[1 - (\text{Verhältnis unbeladener Zellen} / \text{Verhältnis beladener Zellen})] \times 100$ die spezifische OT-1 Lyse (in %) in C57BL/6- (schwarze Balken) und CD11c-MHCI-Mäusen (graue Balken) berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

Bei Vergleich der Lyse von Zielzellen in CD11c-MHCI- und C57BL/6-Mäusen in der CFA/OVA₂₅₇₋₂₆₄ immunisierten Gruppe zeigte sich eine äquivalente OT-1-Zytotoxizität in beiden Mausstämmen (Abbildung 26 A). Die spezifische Lyse in den transgenen Tieren betrug nach 6 h $14 \pm 7\%$ und in den Kontrollempfängern $23 \pm 7\%$. Die beobachtete Induktion funktioneller CTL in beiden Mausstämmen zeigte keinen signifikanten Unterschied (Student'scher *t*-Test $p=0,1$). Beim Vergleich der Zytotoxizität in den LPS/OVA₂₅₇₋₂₆₄ immunisierten Gruppen konnte jedoch eine signifikant ($p=0,01$) höhere spezifische Lyse in CD11c-MHCI-Mäusen gegenüber C57BL/6-Mäusen detektiert werden ($52 \pm 3\%$ in CD11c-MHCI gegenüber $19 \pm 16\%$ in C57BL/6) (Abbildung 26 B).

Auch hier wurde der Aktivierungszustand der OT-1-Zellen in den unterschiedlichen Mausstämmen nach den beiden Immunisierungsarten untersucht. Hierzu wurden Milz- und Lymphknotenzellen an Tag 3 nach Immunisierung isoliert und durchflusszytometrisch nach Antikörperfärbung analysiert.

Der Einsatz von anti-CD44- sowie anti-CD69-Antikörpern zeigte einen äquivalenten OT-1-Aktivierungsstatus in C57BL/6- und CD11c-MHCI-Mäusen nach CFA/OVA₂₅₇₋₂₆₄ s.k.- (Abbildung 27, A) oder LPS/OVA₂₅₇₋₂₆₄ i.v.-Immunisierung (Abbildung 27, B), in Lymphknoten und in der Milz. Bei Kontrollimmunisierung konnte weder in C57BL/6- noch in CD11c-MHCI-Mäusen eine Aktivierung der OT-1-Zellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

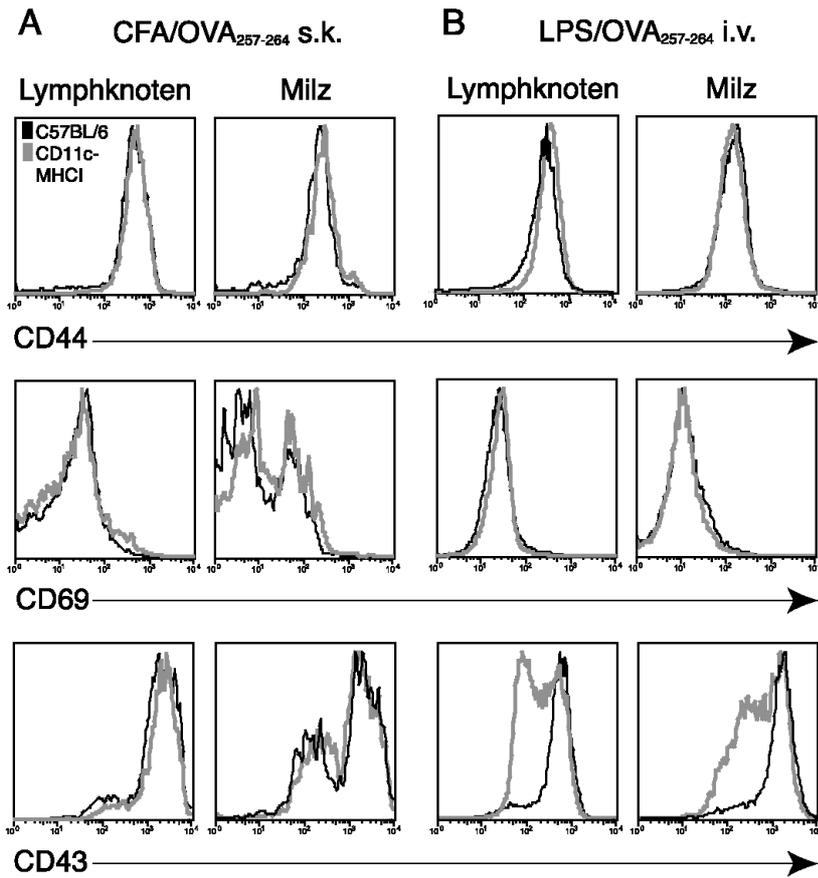


Abbildung 27: CD8-T-Zell-Aktivierungsstatus nach Aktivierung durch DC. Nach OT-1-Transfer und CFA/OVA₂₅₇₋₂₆₄ (A) bzw. LPS/OVA₂₅₇₋₂₆₄ Immunisierungen (B) (siehe 3.3.1.1) wurden 41 h nach Immunisierung OT-1-Zellen in Lymphknoten- sowie Milzzellen der beiden Empfängerstämme auf die Expression der Aktivierungsmarker CD44 (obere Reihe), CD69 (mittlere Reihe) sowie CD43 (untere Reihe) untersucht. Die Histogramme zeigen deren Expression auf OT-1-Zellen in C57BL/6- (schwarze Graphen) und CD11c-MHCI-Mäusen (graue Graphen) nach Immunisierungen mit Peptid (rechte Seite).

Ein Unterschied konnte nur bei der CD43-Expression von OT-1-Zellen in C57BL/6- und CD11c-MHCI-Mäusen festgestellt werden (Abbildung 27, untere Reihe). In CD11c-MHCI- verglichen mit C57BL/6-Mäusen, wurde nach LPS/OVA₂₅₇₋₂₆₄ i.v.-Aktivierung eine schwächere CD43-Expression festgestellt (Abbildung 27 B, untere Reihe), während nach CFA/OVA₂₅₇₋₂₆₄ s.k. Immunisierung die CD43-Expression identisch war (Abbildung 27 A, untere Reihe). Diese verzögerte Expression nach Aktivierung konnte sowohl in Lymphknoten als auch in der Milz beobachtet werden (Abbildung 27 B, untere Reihe). In den Kontrollen war nach LPS-Immunisierung in beiden Mausstämmen keine erhöhte CD43-Expression detektierbar (Daten nicht gezeigt).

3.3.1.5 Die Aktivierung naiver CD8-T-Zellen durch DC resultiert in verminderter OT-1-Zellteilungsrate

Um das Phänomen der starken OT-1-Expansion in LPS/OVA₂₅₇₋₂₆₄ immunisierten CD11c-MHCI-Mäusen genauer zu untersuchen, wurden die OT-1-Zellen vor dem Transfer in die Empfängertiere mit CFSE markiert. Anschließend wurde erneut mit CFA/OVA₂₅₇₋₂₆₄ oder LPS/OVA₂₅₇₋₂₆₄ immunisiert. Die Markierung der transferierten OT-1-Zellen mit CFSE ermöglichte die detaillierte Quantifizierung der OT-1-Expansion auf Zellteilungsebene. 41 h nach Immunisierung wurden die Milzzellen präpariert und die CFSE-Fluoreszenz der OT-1-Zellen mittels FACS-Analyse untersucht. Jede Teilung der OT-1-Zellen resultiert in einer Abnahme der CFSE-Konzentration in der Mutterzelle, da bei jeder Teilung 50% des fluoreszierenden Farbstoffs an die Tochterzelle weitergegeben wird. Diese Abnahme der Fluoreszenz pro Zellteilung äußert sich bei der FACS-Analyse in unterschiedlichen Messspitzen verminderter Fluoreszenz, so genannten „Peaks“. Die Analyse dieser „Peaks“ ermöglicht eine genaue quantitative Berechnung der Zellteilungsrate.

In der CFA/OVA₂₅₇₋₂₆₄ immunisierten Gruppe konnte anhand der „CFSE-Peaks“ der OT-1-Zellen in den beiden Empfängerstämmen eine verminderte Zellteilungsrate von OT-1-Zellen in CD11c-MHCI- gegenüber den OT-1-Zellen in C57BL/6-Mäusen detektiert werden (Abbildung 28 A, Mitte). Diese wurde zusätzlich durch die Berechnung der Prozentsätze der einzelnen OT-1⁺, CFSE⁺-Zellen pro Zellteilung bestätigt. In CD11c-MHCI-Mäusen zeigte sich auch hier eine statistisch signifikant verminderte Zellteilungsrate gegenüber C57BL/6-Mäusen (Abbildung 28 A, rechts). Die transferierten OT-1-Zellen teilten sich 41 h nach Immunisierung in den transgenen Mäusen im Durchschnitt 2,9-mal, in der Wildtyp-Kontrolle aber 5-mal (Abbildung 28 C). Obwohl die OT-1-Expansionskinetik nach CFA/OVA₂₅₇₋₂₆₄ Immunisierung in beiden Empfängerstämmen gleich war (Abbildung 22, A), konnte diese verminderte Zellteilung auch im Blut, sowie in der Milz 24 h und 72 h nach Immunisierung festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Bei den Kontrollimmunisierungen mit CFA und LPS wurden jeweils keine OT-1-Zellteilungen nach 41 h (Abbildung 28 A, B, links) sowie nach 24 h und 72 h (Daten nicht gezeigt) beobachtet.

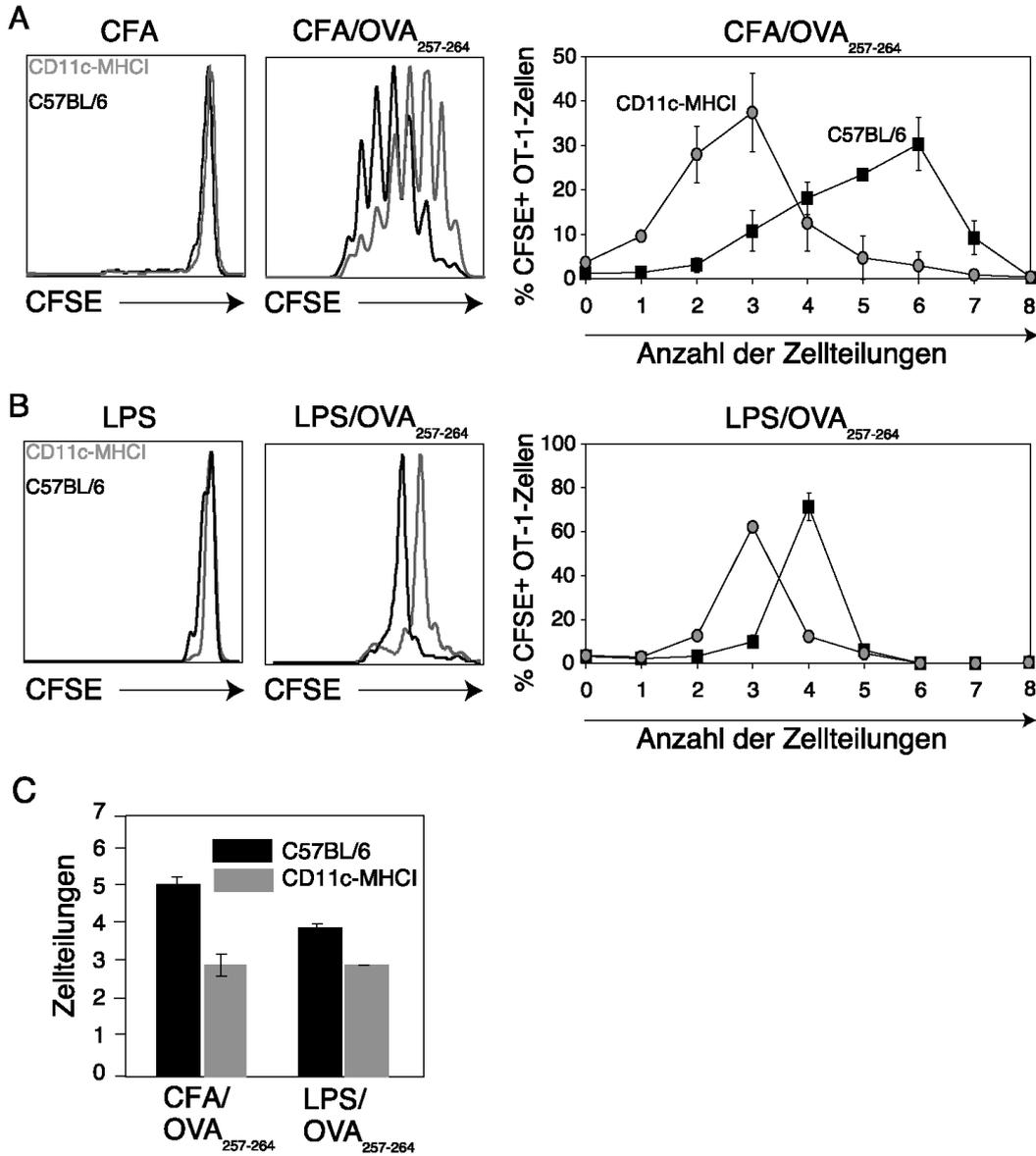


Abbildung 28: CD8-T-Zell-Aktivierung durch DC führte zu verlangsamter Zellteilungsrate. In C57BL/6- (schwarze Symbole) sowie CD11c-MHCI-Mäusen (graue Symbole) wurden an Tag -1 jeweils 5×10^6 gereinigte und CFSE-markierte OT-1-T-Zellen adoptiv transferiert. An Tag 0 wurden die Mäuse mit $300 \mu\text{g}$ OVA₂₅₇₋₂₆₄ in CFA oder als Kontrolle mit CFA allein s.k. immunisiert (A). Die zweite Versuchsgruppe wurde mit $10 \mu\text{g}$ OVA₂₅₇₋₂₆₄ und $50 \mu\text{g}$ LPS oder mit LPS alleine i.v. immunisiert (B). Die Analyse der OT-1-Zellen in den Milzzellen der Empfängertiere fand 41 h nach Immunisierung statt und zeigt die Anzahl der einzelnen Zellteilungen innerhalb der OT-1-Zellpopulation. Die Histogramme (linke Seite) zeigen die Gesamtzahl an Zellteilungen, die Graphen stellen die Prozentzahl der OT-1-Zellen pro Teilung nach inflammatorischer Immunisierung dar (rechte Seite). Die durchschnittliche Anzahl der Teilungen nach 41 h wurde von den Prozentsätzen der CFSE⁺-Zellen pro Zellteilung berechnet (C) (Mittelwerte \pm SD).

Bei LPS/OVA₂₅₇₋₂₆₄ Immunisierung wurde nach 41 h in Milzzellen auch eine signifikant verminderte OT-1-Zellteilung festgestellt (Abbildung 28 B, Mitte). Obwohl die Expansion der transferierten CD8-T-Zellen im peripheren Blut und in den sekundären lymphatischen Organen in CD11c-MHCI-Mäusen deutlich höher war als in C57BL/6-Mäusen, betrug die

durchschnittliche OT-1-Teilungsrate in den transgenen Empfängertieren 2,9, in den Wildtyp-Mäusen 3,7 (Abbildung 28 C). Diese konnte wie zuvor anhand der „OT-1-CFSE-Peaks“ (Abbildung 28 B, Mitte), wie auch nach Berechnung der einzelnen prozentualen Anteile der OT-1-Zellen pro Teilung dargestellt werden (Abbildung 28 B, rechts).

3.3.1.6 Verminderte Induktion von Apoptose bei DC-vermittelter CD8-Immunität

Eine Erklärung der verminderten Zellteilungsrate trotz gleicher Expansion nach CFA/OVA₂₅₇₋₂₆₄-Immunisierung in CD11c-MHCI-Mäusen könnte unter anderem durch eine Disfunktion der Apoptose-Regulation in CD8-T-Zellen nach Antigen spezifischer Aktivierung erklärbar sein (engl.: *antigen induced cell death*, AICD).

Zur Überprüfung der Apoptose-Induktion in OT-1-Zellen wurden daher CD11c-MHCI- und C57BL/6-Mäuse nach T-Zell-Transfer zunächst mit CFA/OVA₂₅₇₋₂₆₄ s.k. immunisiert. Nach 41 h wurden die OT-1-Zellen aus den drainierenden Lymphknoten sowie der Milz der Tiere auf Apoptose-Induktion untersucht. Hierzu wurden die Zellen wie unter 2.2.2.16 beschrieben, mit Annexin V sowie mit Propidiumjodid (PJ) angefärbt. Annexin V färbt spezifisch apoptotische Zellen, während Propidiumjodid nur spät apoptotische bzw. abgestorbene Zellen anfärbt. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch zuerst durch Identifizierung der Lymphozyten und OT-1-Zellen. Innerhalb der OT-1-Zellpopulation wurden anschließend apoptotische Annexin V⁺PJ⁻-Zellen (Abbildung 29, A, Population 1), sowie lebende, nicht-apoptotische Annexin V⁻PJ⁻-Zellen (Abbildung 29, A, Population 2) quantifiziert. In den Milzen der CFA/OVA₂₅₇₋₂₆₄ s.k. immunisierten CD11c-MHCI-Mäuse befand sich ein signifikant geringerer Prozentsatz OT-1⁺Annexin V⁺PJ⁻-Zellen verglichen mit C57BL/6-Mäusen (41,6±3% gegenüber 53,8±0,4%) (Abbildung 29 B, oben). Auch in den drainierenden Lymphknoten beider Mausstämmen wurde eine geringere Apoptoseinduktion in CD11c-MHCI-Mäusen nachgewiesen. In CD11c-MHCI-Mäusen wurden 26,5±2,2%-, während in C57BL/6-Mäusen 77,4±6,9% Annexin V⁺, PJ⁻-OT-1-Zellen detektiert wurden (Abbildung 29 B, oben). Dementsprechend wurde sowohl in der Milz als auch in den drainierenden Lymphknoten ein höherer Prozentsatz lebender (Annexin V⁻PJ⁻) OT-1-Zellen in CD11c-MHCI- (Milz: 34±5,3, Lymphknoten: 45,8±6,9; Abbildung 29 C, oben) verglichen mit C57BL/6-Mäusen (Milz: 21±2,5, Lymphknoten: 10±2,4; Abbildung 29 C, oben) gefunden.

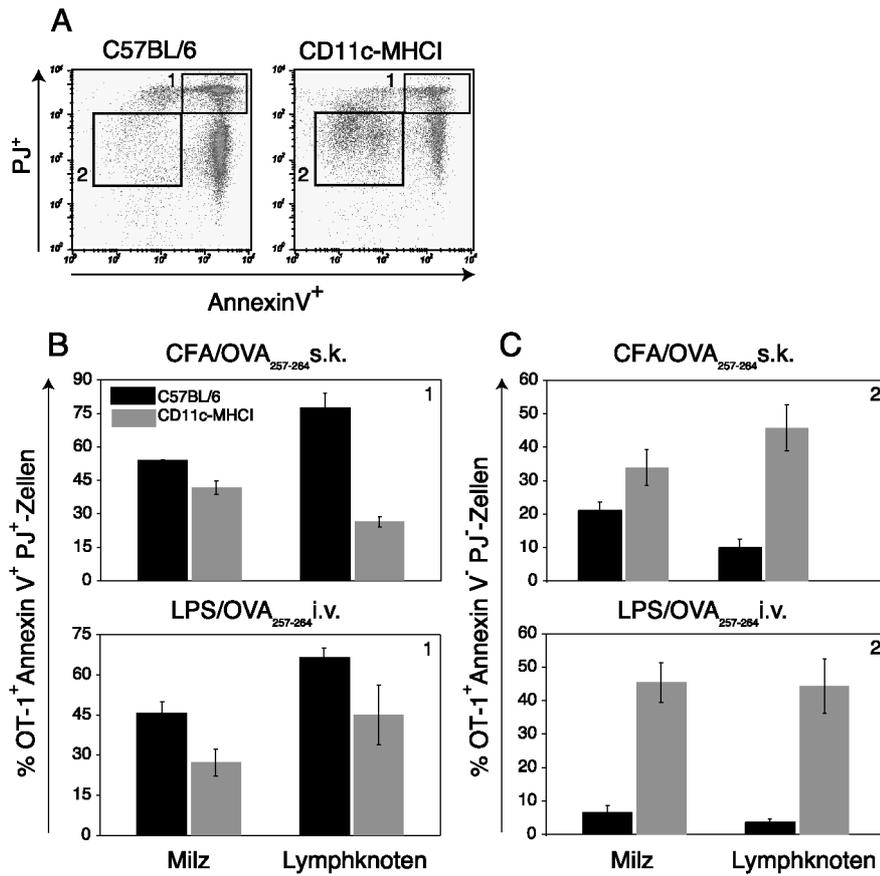


Abbildung 29: Aktivierung naiver CD8-T-Zellen durch DC allein resultierte in einer verminderten Apoptose von OT-1-Zellen. An Tag -1 wurden in C57BL/6- (schwarze Balken) sowie CD11c-MHCI-Mäuse (graue Balken) jeweils 5×10^6 gereinigte OT-1-Ly5.1-CD8-T-Zellen injiziert. An Tag 0 wurden die Mäuse wie unter 3.3.1.1 beschrieben mit CFA/OVA₂₅₇₋₂₆₄ s.k. sowie mit LPS/OVA₂₅₇₋₂₆₄ i.v. immunisiert. 41 h nach Immunisierung wurden zunächst die OT-1-Zellen in Milz und Lymphknoten durch Abfärbung mittels anti-CD8- und anti-Ly5.1-Antikörper identifiziert (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde die Apoptoserate von OT-1-Zellen durch Annexin V sowie Propidiumjodid durchflusszytometrisch analysiert (A). Hierzu wurde innerhalb der OT-1-Population der prozentuale Anteil abgestorbener Annexin V⁺ PJ⁺-Zellen (A, Population 1) nach Immunisierung mit CFA/OVA₂₅₇₋₂₆₄ s.k. bzw. LPS/OVA₂₅₇₋₂₆₄ i.v. (B), sowie der Anteil lebender Annexin V⁻ PJ⁻-Zellen (A, Population 2) nach den jeweiligen Immunisierungen (C) bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD (n=3).

Eine signifikant niedrigere Apoptoseinduktion in CD11c-MHCI-Mäusen wurde auch nach LPS/OVA₂₅₇₋₂₆₄ i.v. Immunisierung festgestellt. Hier war der Prozentsatz apoptotischer OT-1-Zellen in der Milz $27,3 \pm 4,9\%$ verglichen mit $45,6 \pm 4,3\%$ in C57BL/6-Mäusen (Abbildung 29 B, unten), in den Lymphknoten $44,9 \pm 11,1\%$ (CD11c-MHCI) und $66,4 \pm 3,6\%$ (C57BL/6) (Abbildung 29 B, unten). Der Anteil lebender OT-1-Zellen in den Milzen der transgenen Mäuse betrug $45,5 \pm 6,0\%$, in C57BL/6-Mäusen $6,6 \pm 1,9\%$ (Abbildung 29 C, unten), während in den Lymphknoten im Durchschnitt $44,3 \pm 8,1\%$ OT-1-Zellen der CD11c-MHCI-Mäuse gegenüber $4 \pm 1\%$ in C57BL/6-Mäusen Annexin V⁻ PJ⁻ waren (Abbildung 29, unten). Zusammenfassend wurde durch die Analyse der Apoptoseinduktion nach den beschriebenen Immunisierungen eine eindeutig geringere Zahl apoptotischer OT-1-Zellen in den transgenen

CD11c-MHCI- verglichen mit Wildtyp C57BL/6-Mäusen gefunden. Analog hierzu war in CD11c-MHCI-Mäusen die Anzahl lebender OT-1-Zellen gegenüber C57BL/6-Mäusen deutlich erhöht.

3.3.2 Die Rolle von DC bei der Induktion von CD8-Immunität nach Vakzinierung

3.3.2.1 CD8-T-Zell-Aktivierung nach Immunisierung mit unterschiedlichen viralen Vakzinen

Um nicht nur die CD8-T-Zell-vermittelte Immunität nach Immunisierung mit Adjuvans und Antigen zu analysieren, wurden auch zwei verschiedene rekombinante virale Vektoren getestet. Hierzu wurden für Ovalbumin kodierende, replikationsdefiziente Herpes-Simplex-Viren (HSV-OVA), sowie für Ovalbumin kodierende Vaccinia-Viren (MVA-OVA) eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde anstatt für OVA-, für GFP-(Grün-Fluoreszierendes-Protein) kodierende Herpes-Viren der gleichen Art eingesetzt (HSV-GFP), sowie unmodifizierte MVA-Viren. Beide Empfängerstämme wurden nach OT-1-Transfer mit je 2×10^6 infektiösen Einheiten (I.E.) dieser viralen Vektoren intraperitoneal (i.p.) immunisiert. Bei Vergleich der OT-1-Expansionskinetiken im peripheren Blut an den Tagen 0, 3, 5, 7, 9 und 14 wurde weder nach HSV-OVA-, noch nach MVA-OVA-Immunisierung bei CD11c-MHCI Empfängertieren ein Unterschied zu C57BL/6-Empfängertieren beobachtet (Abbildung 30).

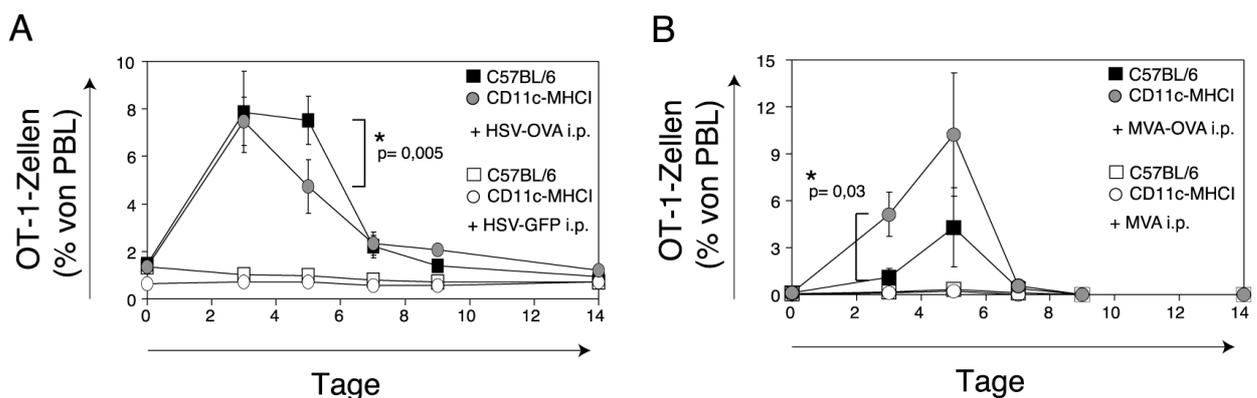


Abbildung 30: DC induzierte OT-1-T-Zell-Expansion nach viraler Immunisierung. In C57BL/6- (Quadrate) sowie CD11c-MHCI-Mäusen (Kreise) wurden an Tag -1 jeweils 5×10^6 gereinigte OT-1-T-Zellen adoptiv transferiert. An Tag 0 wurden die Mäuse mit jeweils 2×10^6 I.E. HSV-OVA (A, ausgefüllte Symbole) sowie als Kontrolle mit HSV-GFP (A, offene Symbole) immunisiert. Weiterhin wurde eine Gruppe mit jeweils 2×10^6 I.E. MVA-OVA (B, ausgefüllte Symbole) oder mit MVA als Kontrolle immunisiert. Die Expansionskinetik der transferierten OT-1-Zellen wurde durch Bestimmung des prozentualen Anteils der OT-1-Zellen im peripheren

3 ERGEBNISSE

Blut an den aufgeführten Tagen erstellt. Dies geschah durchflusszytometrisch anhand von OT-1-spezifischen anti-TCR V α 2-, anti-TCR V β 5.1- sowie anti-CD8-Antikörpern. Die Gruppengröße betrug mindestens n=3 für die OVA₂₅₇₋₂₆₄-exprimierenden viralen Vektoren und mindestens n=2 für die Kontrollgruppen.

Nach HSV-OVA-Immunisierung erreichte die OT-1-Expansion in beiden Mausstämmen an Tag 3 ihr Maximum. Der an Tag 5 in C57BL/6- gegenüber CD11c-MHCI-Mäusen höhere OT-1-Prozentsatz (Student'scher *t*-Test p=0,005, Abbildung 30 A), verdeutlicht eine später einsetzende Kontraktion der OT-1-Population in dem C57BL/6-Wildtypstamm. Ansonsten verliefen die beiden Expansionsraten gleich. Nach Immunisierung mit HSV-GFP konnte keine OT-1-Expansion beobachtet werden. Die OT-1-Expansion in MVA-OVA immunisierten Mäusen war maximal an Tag 5 nach Immunisierung und zeigte eine höhere Variabilität bei Individuen innerhalb der einzelnen Gruppen (Abbildung 30 B). Obwohl der höhere OT-1-Prozentsatz in CD11c-MHCI- gegenüber C57BL/6-Mäuse an Tag 3 während der Expansionsphase statistisch signifikant war (Student'scher *t*-Test p=0,03, Abbildung 30 B), zeigte sich am Maximum an Tag 5 kein signifikanter Unterschied zwischen den Mausstämmen. Bei Vergleich der Kinetik nach HSV-OVA-Immunisierung konnte hier auch ein schnellerer Rückgang der OT-1-Expansion im peripheren Blut nachgewiesen werden. Bereits zwei Tage nach dem Expansionsmaximum an Tag 5 ging die OT-1-Population auf das Niveau der Negativkontrolle zurück, die mit unmodifizierten MVA-Viren immunisiert wurde. Die OT-1-Zellen zeigten nach Immunisierung über den gesamten Nachweiszeitraum einen aktivierten, CD44-exprimierenden Phänotyp (Abbildung 31 B, D). In den Kontroll-Immunisierungen mit HSV-GFP und MVA konnte weder eine Expansion von transferierten OT-1-Zellen (Abbildung 31 A, B) noch eine CD44-Expression gemessen werden (Abbildung 31 A, B).

Insgesamt wurde nach viraler Vakzinierung eine äquivalente OT-1-Expansion sowie Aktivierung in CD11c-MHCI- sowie C57BL/6-Mäusen nachgewiesen.

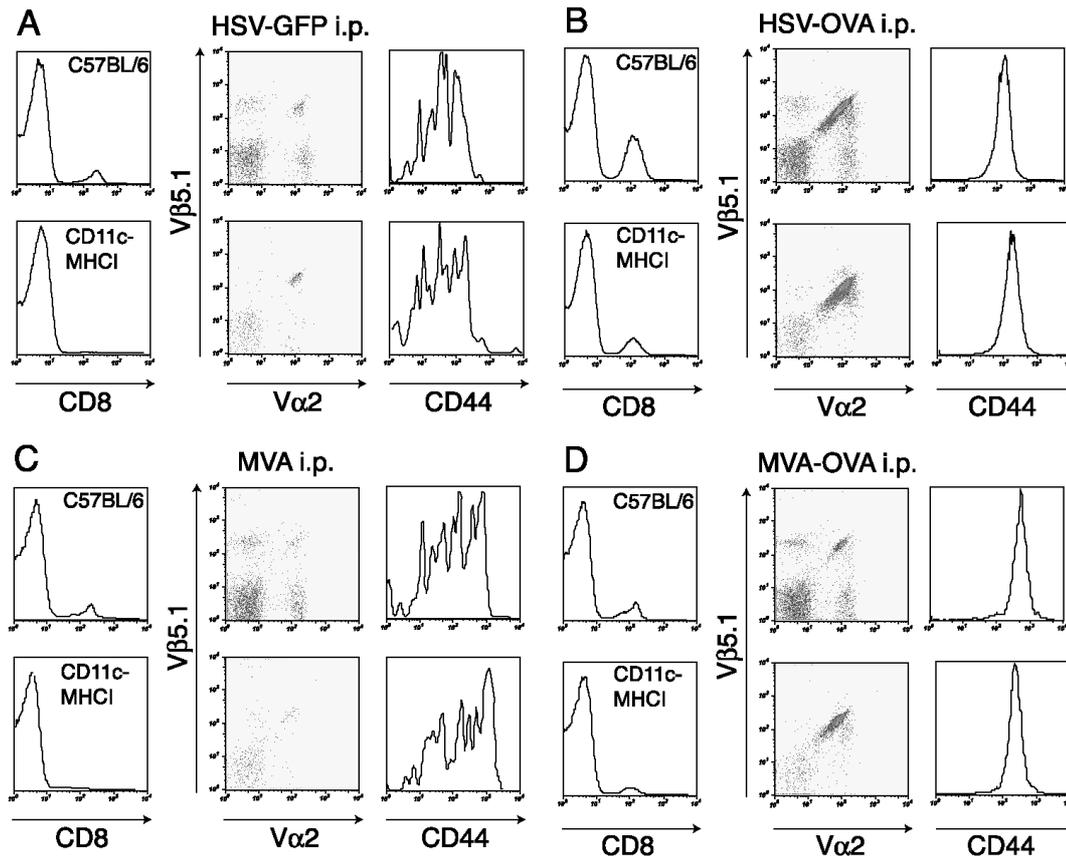


Abbildung 31: Aktivierung von OT-1-Zellen nach viraler Immunisierung. CD11c-MHCI- sowie C57BL/6-Mäuse wurden wie in unter 3.3.2.1 beschrieben mit HSV-GFP (A), HSV-OVA (B), mit MVA (C) oder MVA-OVA (D) immunisiert. Die Analyse des OT-1 Aktivierungsstatus erfolgte zuerst durch Identifizierung der OT-1-Zellen im peripheren Blut durch anti-CD8-, anti-V α 2- sowie anti-V β 5.1-Antikörper. Anschließend wurde die Aktivierung der OT-1-Zellen anhand der CD44-Expression überprüft. Die hier gezeigten Daten wurden jeweils am Expansionsmaximum nach Immunisierung (Tag 3 HSV-GFP, HSV-OVA; Tag 5 MVA, MVA-OVA) erhoben.

3.3.2.2 Induktion funktioneller CTL nach Immunisierung mit HSV-OVA oder MVA-OVA

Auch nach viraler Immunisierung wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Induktion funktioneller CTL durch einen *in vivo*-Zytotoxizitätstest überprüft. Der Test wurde zunächst an Tag 15 nach Immunisierung mit HSV-OVA oder MVA-OVA bzw. als Kontrolle mit HSV-GFP oder unmodifiziertem MVA durchgeführt. HSV-OVA-, HSV-GFP-immunisierte Mäuse wurden 12 h nach Transfer des Zellgemisches bestehend aus Peptid beladenen CFSE^{hoch}-/unbeladenen CFSE^{niedrig}-Milzzellen auf dessen spezifische Lyse untersucht.

Da Experimente innerhalb der Arbeitsgruppe zeigten, dass Immunisierungen mit MVA-Vakzinen wesentlich stärkere Immunantworten als z.B. mit HSV-basierenden Vakzinen

3 ERGEBNISSE

hervorrufen, wurde die Analyse einer möglichen Zielzell-Lyse bei den MVA-, MVA-OVA-immunisierten Gruppen schon 6 h nach Transfer der Zielzellen vorgenommen.

Obwohl es zwischen den beiden Mausstämmen keine signifikanten Unterschiede bei der Induktion funktioneller CTL gab (Abbildung 32 A, B), konnte nach MVA-OVA-Infektion ($70\pm 8\%$ in C57BL/6, $60\pm 20\%$ in CD11c-MHCI) (Abbildung 32 B) eine vergleichbar effektive, jedoch schneller einsetzende Lyse als nach HSV-OVA-Vakzinierung ($56\pm 18\%$ in C57BL/6, $70\pm 20\%$ in CD11c-MHCI) (Abbildung 32 B) nachgewiesen werden. In den Kontrollgruppen, die mit HSV-GFP oder MVA immunisiert wurden, wurde keine spezifische Lyse gemessen.

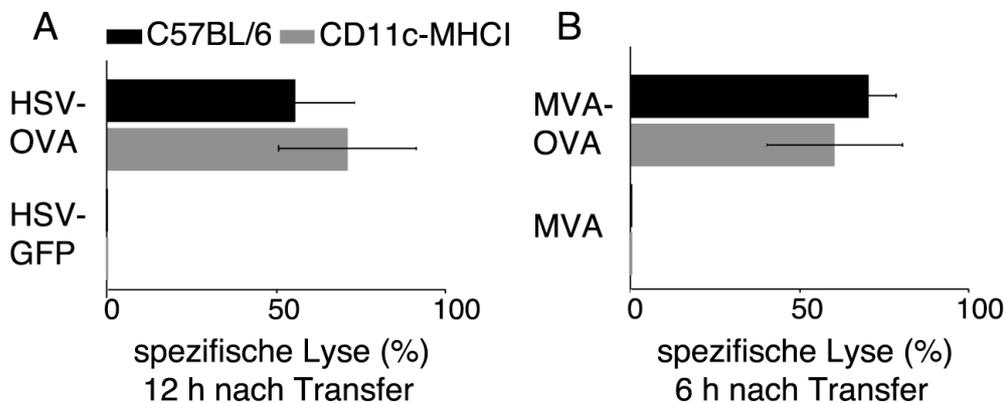


Abbildung 32: Induktion funktioneller CTL nach Immunisierung mit OVA-exprimierenden viralen Vektoren. Nach OT-1-Transfer und HSV-OVA-/HSV-GFP- (A) bzw. MVA-OVA/MVA-Immunsierung (B) (siehe 3.3.2.1) wurde an Tag 15 nach Immunisierung ein *in vivo*-Zytotoxizitätstest durchgeführt. Hierzu wurden Peptid beladene syngene C57BL/6-Milzzellen mit hochkonzentriertem CFSE (CFSE⁺⁺⁺) und die gleiche Menge unbeladener Milzzellen mit niedrigkonzentriertem CFSE (CFSE⁺) markiert und zu gleichen Anteilen in die C57BL/6- oder CD11c-MHCI-Mäuse transferiert. 12 h bzw. 6 h nach Transfer wurden Milzzellen der Empfängertieren auf die selektive Eliminierung peptidbeladener-CFSE⁺⁺⁺-Zellen durch Bestimmung des CFSE⁺⁺⁺/CFSE⁺-Verhältnisses im Durchflusszytometer untersucht. Aus diesem Verhältnis wurde die spezifische OT-1 Lyse (in %) in C57BL/6- (schwarze Balken) und CD11c-MHCI-Mäusen (graue Balken) berechnet (siehe 2.2.2.15). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD.

Nach Immunisierung mittels viraler Vakzine konnten das Antigen präsentierende Zellen, in Mäusen, in denen lediglich Dendritische Zellen zur Initiierung einer Immunantwort verantwortlich waren, in demselben Maße lysiert werden, wie in Mäusen in denen alle möglichen, an der Induktion von Immunantworten beteiligten Zellen funktionell waren.

3.3.3 Einfluss Dendritischer Zellen auf die Toleranzinduktion *in vivo*

Neben Induktion funktioneller CTL durch DC *in vivo*, sollte auch ihr Einfluss auf die Toleranzinduktion überprüft werden. Hierzu wurden die Experimente wie folgt verändert: Anstatt inflammatorischen Adjuvans oder viralen Vakzinen wurde diesmal unter Toleranz induzierenden Bedingungen nur PBS zusammen mit OVA₂₅₇₋₂₆₄ intravenös verabreicht. Unter diesen nicht inflammatorischen Bedingungen sollte dies zu einer Toleranzinduktion der vorher transferierten OT-1-Zellen führen (den Haan *et al.* 2000; Belz *et al.* 2002; Scheinecker *et al.* 2002; Curtsinger *et al.* 2003). Als Kontrolle wurde den Tieren nur PBS ohne OVA₂₅₇₋₂₆₄ i.v. verabreicht.

Anderen Berichten entsprechend zeigte sich auch hier eine Expansion der OT-1-Zellen im peripheren Blut nach PBS/OVA₂₅₇₋₂₆₄ i.v. Immunisierung (Abbildung 33 A). Die Verfolgung der OT-1-Zellen über 14 Tage zeigte, wie zuvor unter inflammatorischen Bedingungen, ein ähnliches OT-1-Expansionsverhalten. Das Maximum wurde an Tag 3 nach Immunisierung erreicht und fiel an Tag 5 wieder auf das Ausgangsniveau. Die OT-1-Expansion in CD11c-MHCI-Mäusen an Tag 3 unterschied sich nicht von der in C57BL/6-Mäusen (Student'scher *t*-Test $p=0,06$, Abbildung 33 A).

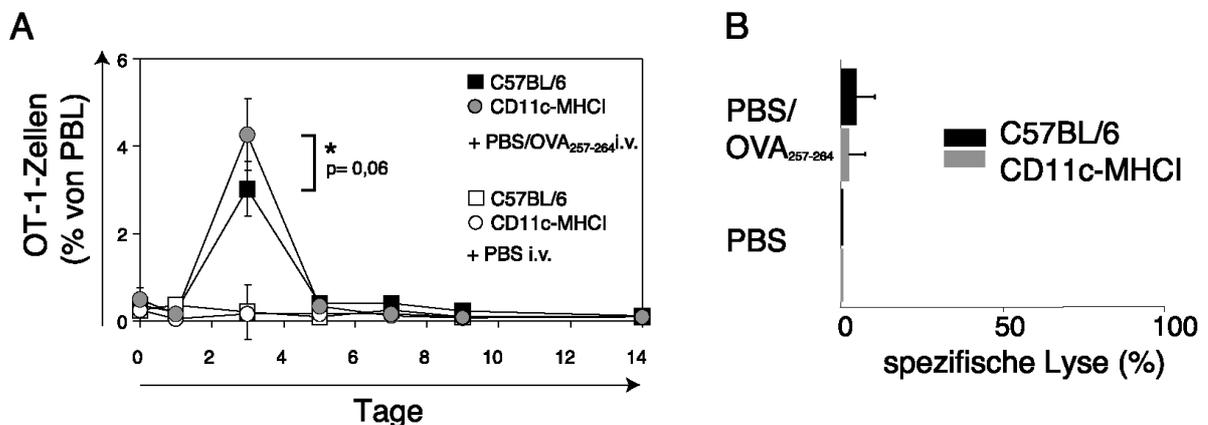


Abbildung 33: Toleranzinduktion durch DC. An Tag -1 erhielten C57BL/6-Mäuse (Quadrate und schwarze Balken) sowie CD11c-MHCI-Mäuse (Kreise und graue Balken) 5×10^6 gereinigte OT-1-T-Zellen und wurden an Tag 0 mit PBS+10 μg OVA₂₅₇₋₂₆₄ i.v. bzw. als Kontrolle nur mit PBS i.v. immunisiert. Die OT-1-Expansion im peripheren Blut (in %) wurde mittels spezifischer Antikörper durchflusszytometrisch an den angegebenen Tagen verfolgt (A). An Tag 15 nach Immunisierung wurde ein *in vivo*-Zytotoxizitätstest durchgeführt, und die spezifische Lyseaktivität der OT-1-Zellen 6 h nach Transfer der syngenen Zielzellen berechnet (B). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD; die mit * markierten Werte bezeichnen einen nicht signifikanten Unterschied zwischen den Mausstämmen berechnet nach Student'schem *t*-Test.

Auch unter diesen Bedingungen zeigten die OT-1-Zellen in beiden Mausstämmen nach der Immunisierung einen aktivierten Phänotyp, der sich in einer verstärkten Expression von CD44 ausdrückte (Abbildung 34).

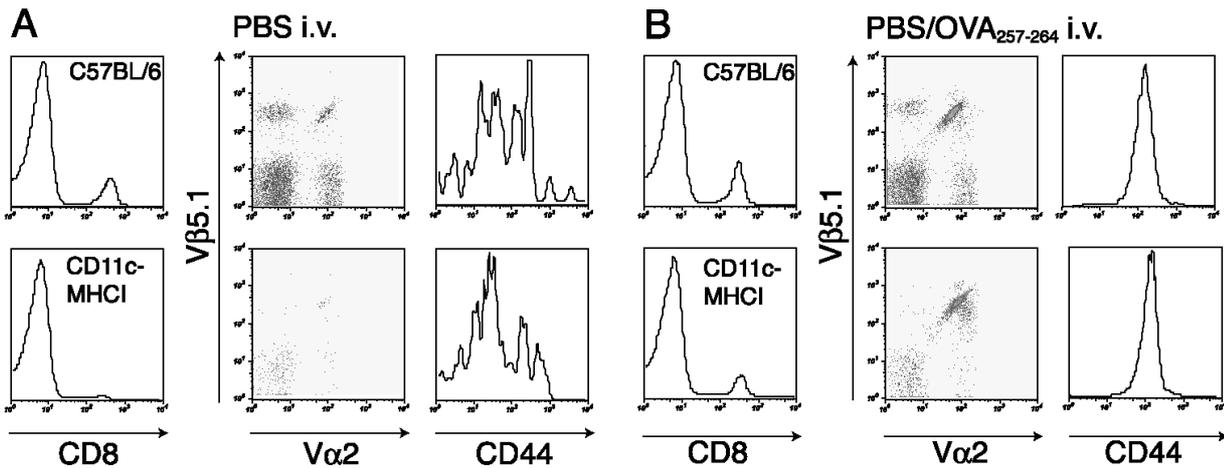


Abbildung 34: Aktivierung von OT-1-Zellen nach Immunisierung unter Toleranz induzierenden Bedingungen. CD11c-MHCI- sowie C57BL/6-Mäuse wurden wie unter 3.3.3 beschrieben mit PBS und $10 \mu\text{g}$ OVA₂₅₇₋₂₆₄ sowie als Kontrolle nur mit PBS i.v. (A) bzw. i.v. (B) immunisiert. Nach Identifizierung der OT-1-Zellen im peripheren Blut an Tag 3 nach Toleranz induzierender Immunisierung wurde die Aktivierung der OT-1-Zellen anhand ihrer CD44-Expression überprüft.

Um eine funktionelle Toleranzinduktion ausschließlich durch DC nachweisen zu können, wurde auch hier der *in vivo*-Zytotoxizitätstest angewendet. Dieser wurde an Tag 15 nach tolerogener Immunisierung durchgeführt, und die CFSE-markierten Zielzellen 6 h nach Transfer analysiert. Verglichen mit der Lyseaktivität der OT-1-Zellen unter inflammatorischen Bedingungen, wurde keine lytische Aktivität nachgewiesen (Abbildung 33 B). Eine spezifische Eliminierung der Peptid-beladenen Zielzellen konnte weder in CD11c-MHCI- noch in C57BL/6-Mäusen detektiert werden. Das Verhältnis Peptid beladener zu nicht beladenen Zielzellen betrug in beiden Mausstämmen $1,1 \pm 0,1$, während es in den Kontrollen (nur PBS immunisiert) $1,0 \pm 0$ in C57BL/6- und $1,1 \pm 0,1$ in CD11c-MHCI-Mäusen war (Daten nicht gezeigt). Diese Verhältnisse resultierten in einer spezifischen OT-1-Lyse von $3 \pm 5\%$ in den transgenen Tieren und $5 \pm 6\%$ in den Wild-Typ-Mäusen (Abbildung 33 B).

Auch unter Toleranz induzierenden Bedingungen wurden, wie zuvor nach Immunisierung mittels Adjuvans und Peptid, die Zellteilungsraten genauer quantifiziert. Dies geschah wie bereits unter 3.3.1.5 beschrieben, durch eine CFSE-Markierung der OT-1-Zellen vor dem Transfer in die Empfängermäuse. Nach anschließender Immunisierung unter Toleranz induzierenden Bedingungen wurden in diesem Fall keine Unterschiede bei den einzelnen Zellteilungen in beiden Tierstämmen erkannt. Nach 24 h (Abbildung 35 A, linke Seite) sowie 41 h (Abbildung 35 B, linke Seite) nach PBS/OVA₂₅₇₋₂₆₄ i.v. Immunisierung zeigten die OT-1-Zellteilungs-Peaks in CD11c-MHCI- sowie in C57BL/6-Mäusen exakt das gleiche Muster. Auch die errechneten prozentualen Anteile OT-1⁺CFSE⁺-Zellen pro Teilung stimmten zu beiden Zeitpunkten in den unterschiedlichen Maustämmen überein (Abbildung 35 A, B,

rechte Seite). Nach 41 h wurde zusätzlich der prozentuale Anteil OT-1-positiver Zellen in der Milz überprüft (C57BL/6: $2,8 \pm 0,5\%$; CD11c-MHCI: $3,5 \pm 0,2\%$) (Abbildung 35 C), und auch hier fand sich kein signifikanter Unterschied (Student'scher t -Test $p=0,06$).

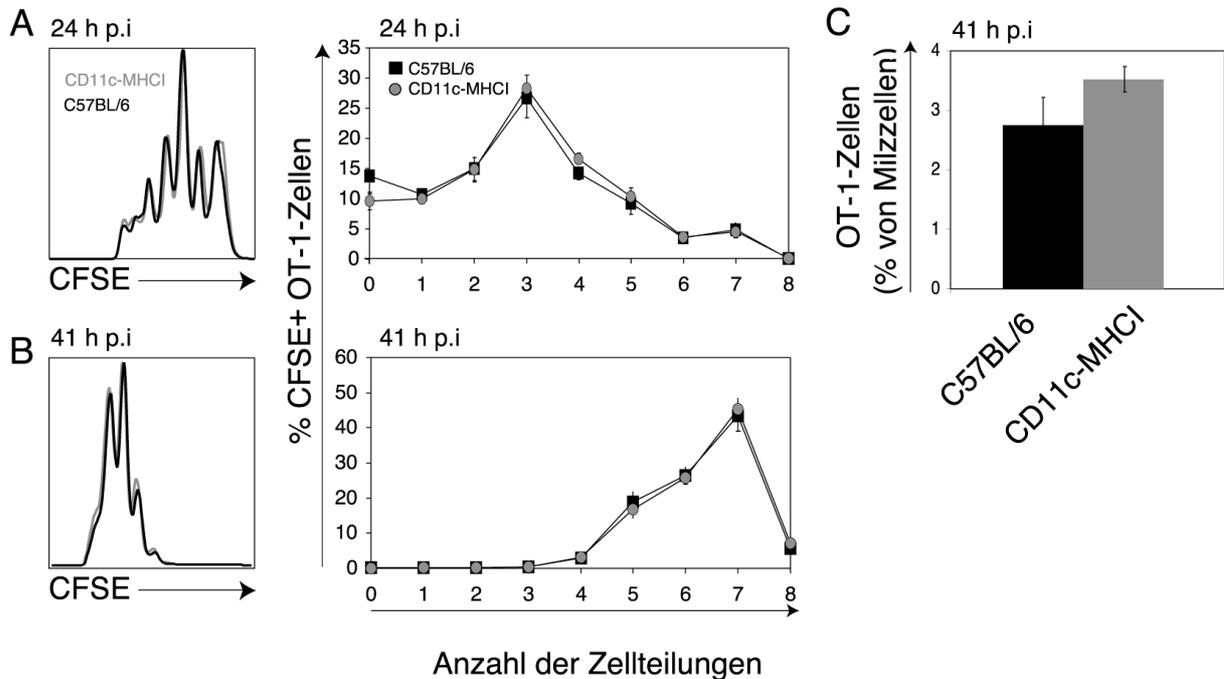


Abbildung 35: CD8-Zellteilungsdaten nach Toleranzinduktion durch DC. C57BL/6-Mäuse (schwarze Symbole) und CD11c-MHCI-Mäuse (graue Symbole) erhielten i.v. 5×10^6 CFSE-markierte OT-1-T-Zellen an Tag -1. An Tag 0 wurden die Mäuse mit PBS+10 μg OVA₂₅₇₋₂₆₄ i.v. (A, B, C) bzw. als Kontrolle nur mit PBS (Daten nicht gezeigt) immunisiert. 24 h (A) bzw. 41 h (B) nach Immunisierung wurde die Gesamtzahl an Zellteilungen (Histogramme, linke Seite) und die Prozentzahl der OT-1-Zellen pro Teilung (Graphen, rechte Seite) durchflusszytometrisch bestimmt. Weiterhin wurde der prozentuale OT-1-Anteil 41 h nach Immunisierung in den Milzen der Empfängertiere analysiert (C). In den Graphen und dem Balkendiagramm sind Mittelwerte \pm SD dargestellt.

Im Gegensatz zu den Immunisierungsversuchen mit antigenem Peptid und Adjuvans (siehe 3.3.1), wurde nach Verabreichung des Antigens unter Toleranz induzierenden Bedingungen kein unterschiedliches Verhalten der OT-1-Zellen in CD11c-MHCI- sowie C57BL/6-Mäusen festgestellt. Dies konnte sowohl für die Expansion der adoptiv transferierten OT-1-Zellen, die funktionelle Toleranzinduktion, sowie für die einzelnen Zellteilungsdaten gezeigt werden.

4 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von DC auf CD8-T-Zellen in einem transgenen Maussystem untersucht, indem die Expression von MHC-I-Molekülen nur auf DC limitiert wurde. Da der gesamte Lebenszyklus von CD8-T-Zellen von der Expression von MHC-I-Molekülen in ihrer Umgebung abhängig ist, sollte anhand dieses transgenen Systems direkt die Bedeutung von DC auf CD8-T-Zellen im lebenden Organismus ohne weitere *in vitro* Manipulationen der DC untersucht werden.

4.1 Einfluss von Dendritischen Zellen auf die Selektion von CD8-T-Zellen *in vivo*

4.1.1 Phänotypische Charakterisierung des CD11c-MHCI-Mausstamms

Im ersten Teil der Arbeit wurden die generierten transgenen Mäuse zunächst charakterisiert. Die selektive Expression von MHC-Klasse I-Molekülen auf DC konnte durch Rekonstitution von β 2-Mikroglobulin unter der Kontrolle des CD11c-Promotors in β 2m^{-/-}-Mäusen eindeutig nachgewiesen werden. *CD11c* kodiert für eine Untereinheit der β -Integrine und ist zur Zeit der einzig bekannte DC-Marker, der konstitutiv auf allen Subpopulationen exprimiert wird (siehe Tabelle 2). Eine geringe CD11c-Expression ausserhalb von DC konnte bisher nur auf lymphoiden Subpopulation, wie aktivierten intraepithelialen Lymphozyten sowie einer kleinen Population CD8⁺-Lymphknotenzellen detektiert werden (Huleatt *et al.* 1995). Bei der Analyse von Zelllysaten aus sekundären lymphatischen Organen aus CD11c-MHCI-Mäusen konnte jedoch keine signifikante MHC-I-Expression auf Lymphozyten detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Die selektive Expression von MHC-I auf DC konnte sowohl für DC im Thymus als auch in der Peripherie gezeigt werden (Abbildung 11, 13). Auf B-Zellen konnte weder in den Lymphknoten noch in der Milz von CD11c-MHCI-Tieren eine MHC-I-Expression gemessen werden (Abbildung 12).

Das Anfärben der sekundär-lymphatischen Zellen mit anti-CD11c- sowie anti-CD11b-Antikörpern erlaubte die Identifizierung von DC. Hierbei konnten, wie in der Literatur beschrieben, drei große DC-Populationen unterschieden werden. Es handelt sich hierbei um die CD11c⁺CD11b⁻, CD11c⁺CD11b⁺- sowie eine CD11c⁻CD11b⁺-Populationen. Bei ersteren (Abbildung 11, Population 1) handelt es sich um die vormals als DC lymphoiden Ursprungs

bezeichneten Zellen, da für sie auch eine CD8 sowie CD205-Expression beschrieben wurde (Vremec *et al.* 1997). Die CD11c⁺CD11b⁺-Population (Abbildung 11, Population 2) wurde hingegen vormals als DC myeloiden Ursprungs bezeichnet, da sie weder CD8 noch CD205 exprimieren (Maraskovsky *et al.* 1996; Vremec *et al.* 1997). In beiden Populationen war die MHC-I-Expression auf DC in C57BL/6- und CD11c-MHCI-Mäusen identisch. Wie bereits unter 1.3.3.1 erwähnt, kann diese Einteilung in DC lymphoiden und myeloiden Ursprungs aktuell nicht mehr aufrechterhalten werden, da für beide Subpopulation gemeinsame Vorläuferzellen gefunden wurden (Heath *et al.* 2004). Die Einteilung verschiedener DC-Subpopulationen anhand ihrer CD11c-, und CD11b-Expression, sowie der erwähnten CD8- und CD205-Expression ist aber immer noch möglich. Die dritte große Population der CD11c⁻CD11b⁺-Zellen konnte gemäß ihrer relativen CD11c-Expression in drei weitere Subpopulationen unterteilt werden (Abbildung 11, Populationen 3-5). Für diese CD11c⁻CD11b⁺-Zellen wurde bereits gezeigt, dass es sich hierbei um eine heterogene Population von myeloiden Zellen sowie sich differenzierenden Myeloblasten handelt (Maraskovsky *et al.* 1996). Deshalb kann spekuliert werden, dass das CD11c- $\beta 2m$ -Konstrukt zu einer $\beta 2m$ -Expression und somit zu funktionellen MHC-I-Molekülen auf einer sehr geringen Anzahl von Monozyten führt. Wahrscheinlicher erscheint es aber, dass sich Vorläuferzellen der CD11c⁺CD11b⁺-DC in der Population von CD11c⁻CD11b⁺-Zellen befinden, und diese somit CD11c noch nicht vollständig heraufreguliert hatten. Für diese Vermutung spricht die Analyse der Subpopulationen innerhalb der CD11c⁻CD11b⁺-Zellen, die anhand der relativen CD11c-Expression vorgenommen wurde (Abbildung 11, Populationen 3-5). Mit zunehmender CD11c-Expression von Population 5 nach Population 3, erkennt man bei den transgenen CD11c-MHCI-Mäusen auch eine zunehmende MHC-Klasse I-Expression. Dies legt den Schluss nahe, dass sich tatsächlich innerhalb dieser Population noch nicht ausdifferenzierte DC befanden, die mit zunehmender Differenzierung CD11c und somit auch die MHC-I-Moleküle verstärkt exprimierten.

Diese Vermutung wurde auch durch die histologische Analyse von DC im Thymus gestützt (Abbildung 14). Einerseits wurde bei allen drei untersuchten Mausstämmen die Verteilung der DC innerhalb des Thymus, wie in der Literatur beschrieben, in der Medulla und am Übergang von Cortex zu Medulla nachgewiesen (Abbildung 14) (Barclay *et al.* 1981; Fairchild *et al.* 1990; Brocker *et al.* 1997b). Andererseits zeigte sich bei der Analyse von CD11c-MHCI-Mäusen vereinzelt eine messbare MHC-I-Expression auf Zellen, auf denen zunächst keine CD11c-Anfärbung zu sehen war (Abbildung 14 B). Bei stärkerer Vergrößerung zeigte sich jedoch, dass die CD11c-Expression auf diesen Zellen vorhanden war, aber noch nicht in dem Maße, wie bei vollständig ausdifferenzierten DC (Abbildung 14 D). Auch bei der durchflusszytometrischen Untersuchung konnte im Thymus eine MHC-I-

Expression nur auf CD11c-positiven DC gezeigt werden (Abbildung 13). Lediglich auf etwa 5-15% der CD19⁺-Zellen im Thymus konnte eine MHC-I-Expression detektiert werden. Da diese Zellen aber auch B220 exprimierten, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei diesen Zellen um plasmazytoide DC handeln könnte (Bjorck 2001). Für Milz-pDC wurde jedoch gezeigt, dass diese kein CD19 exprimieren. Es könnte sich daher auch um eine sehr kleine Population von Thymuszellen handeln (0,09±0,2%), die nicht zu den DC gehört, aber trotzdem H-2K^b exprimiert. Vergleichende Studien zum Einfluss von B-Zellen auf die CD8-T-Zell-Selektion zeigten aber, dass B-Zellen im Thymus weder bei der positiven noch bei der negativen Selektion von CD8-T-Zellen eine Rolle spielen (Kleindienst *et al.* 2000). Daher wurde für die vorliegende Studie diese sehr kleine Population als vernachlässigbar in Bezug auf die CD8-T-Zell Selektion betrachtet.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass es durch das CD11c- β 2m-Transgen bei CD11c-MHCI-Mäusen zu einer selektiven MHC-I-Expression auf DC kam. Somit konnte der Einfluss von DC auf CD8-T-Zellen durch dieses System bestimmt werden.

4.1.2 Einfluss Dendritischer Zellen im Thymus auf das CD8-T-Zell-Repertoire

Im Falle der Selektion von T-Lymphozyten im Thymus konnte durch Analyse der CD8-Zellzahlen gezeigt werden, dass DC nicht zur positiven Selektion befähigt sind (Abbildung 15). Das Fehlen von CD8-T-Zellen in Thymus und in der Peripherie der transgenen CD11c-MHCI-Mäuse zeigte, dass Thymozyten, die einen MHC-I-restringierten funktionellen TCR exprimieren, nicht überleben. Diese Daten werden durch Berichte bestätigt die zeigen, dass Thymuszellen hämatopetischen Ursprungs, im Gegensatz zu Epithelzellen des Thymus (Anderson *et al.* 1994; Sebзда *et al.* 1999), nicht in der Lage sind MHC-Klasse Ia-restringierte CD8-T-Zellen positiv zu selektionieren. Dies wiederum wurde von anderen Gruppen vermutet (Longo *et al.* 1980; Longo *et al.* 1985; Bix *et al.* 1992; Bix *et al.* 1993; Zerrahn *et al.* 1999; Shizuru *et al.* 2000). Zinkernagel und Althage (Zinkernagel *et al.* 1999) berichteten, dass zur CD8-T-Zell-Selektion der Thymus und somit auch Thymus-Epithelzellen notwendig sind, aber lediglich als Ort der T-Zellentwicklung. Zum eigentlichen Prozess der Selektion und Expansion der CD8-T-Zellen seien in den Thymus eingewanderte MHC-I⁺-Zellen hämatopetischen Ursprungs verantwortlich. Der Selektionsprozess wurde jedoch nur indirekt über Immunantworten auf virale Antigene abgeleitet, ohne eine direkte Analyse der selektionierten CD8-T-Zellen durchzuführen (Zinkernagel *et al.* 1999). Es ist daher möglich, dass die beobachteten Phänomene auf eine Kreuzreaktivität der Antigene

zurückzuführen sind. Trotzdem verbleibt die Möglichkeit, dass bestimmte Signale von DC während der T-Zellentwicklung im Thymus Thymozyten für positive als auch für negative Selektionsprozesse in gewissem Maße sensitivieren, wodurch die Vermutung durch Zinkernagel zumindest teilweise bestätigt würde (Zinkernagel *et al.* 1999; Martinic *et al.* 2003). Würde ein solcher Mechanismus bestehen, wäre dieser DC-Einfluss im Thymus in unserem transgenem System nicht nachweisbar, da z.B. MHC-Klasse I⁺-Epithelzellen fehlen. Auch Zerrahn *et al.* vermuteten einen Einfluss von Makrophagen und vor allem DC bei der positiven Selektion von CD8-T-Zellen (Zerrahn *et al.* 1999). Nach Transfer von fötalen Leberzellen transgener 2C TCR-Mäuse in MHC-Klasse I-defiziente $\beta 2m^{-/-}$ oder $D^bK^{b/-}$ -Empfängertiere konnte eine positive Selektion von CD8-T-Zellen beobachtet werden (Zerrahn *et al.* 1999). Da eine positive Selektion durch MHC-I⁺CD8⁺2C-Zellen selbst nicht stattfinden konnte (Schonrich *et al.* 1993), kamen für Zerrahn *et al.* nur DC und Makrophagen für die Selektion der 2C CD8-T-Zellen in Frage (Zerrahn *et al.* 1999). Diese Studie zeigt aber auch, dass sich in MHC-I⁺ $D^bK^{b/-}$ -Empfängertieren weit mehr 2C CD8-T-Zellen entwickelten als in den ebenfalls MHC-I⁺ $\beta 2m^{-/-}$ -Mäusen. Dies lässt vermuten, dass die Selektion der 2C CD8⁺-T-Zellen möglicherweise durch eine Kreuzreaktivität des 2C TCR mit nicht-klassischen MHC-I-Molekülen hervorgerufen wurde und nicht durch Interaktion mit klassischen MHC-I-Molekülen auf APC hämatopetischen Ursprungs. Eine solche Kreuzreaktivität von 2C CD8⁺-T-Zellen mit nicht-klassischen MHC-I-Molekülen wurde durch Maurice *et al.* gezeigt (Maurice *et al.* 2001). Andererseits zeigten aber auch Versuche durch intra-thymischen Zelltransfer von Fibroblasten oder Epithelzellen (Hugo *et al.* 1992; Vukmanovic *et al.* 1992; Pawlowski *et al.* 1993), durch selektive MHC-I-Expression auf Epithelzellen mittels Adenoviren (Nakano *et al.* 1997) und transgener MHC-Klasse II- oder Klasse I-Expression auf Cortezellen (Capone *et al.* 2001), dass positive Selektion ohne die Notwendigkeit hämatopetischer APC stattfinden konnte.

Im Gegensatz zu den klassischen MHC restringierten CD8-T-Zellen, konnte eine effektive positive Selektion durch hämatopetische Zellen von nicht-klassischen H2-M3- und Qa-1-restringierten T-Zellen nachgewiesen werden (Sullivan *et al.* 2002; Urdahl *et al.* 2002). Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten (siehe 3.2.3) bestätigen, dass positive Selektion durch nicht-klassische MHC-I-Moleküle auf APC hämatopetischen Ursprungs induziert werden kann. In Abbildung 17 wurde gezeigt, dass erstens in den MHC-I⁺>MHC-I^{-/-}-Chimären mehr CD8-T-Zellen als in den übrigen Chimären detektierbar waren (Abbildung 17 A, B) und zweitens, dass es sich hierbei um H2-M3-restringierte zytotoxische T-Lymphozyten handelte (Abbildung 18 A). Die durch Tetramere nachgewiesene H2-M3-CTL-Population in den MHC-I⁺>MHC-I^{-/-}-Chimären war fast genauso groß wie die in der nicht-chimären Wildtyp-Maus. Diese Beobachtung bestätigte die Effizienz der positiven Selektion von nicht-

klassischen H2-M3-CD8-T-Zellen durch Zellen hämatopetischen Ursprungs (Urdahl *et al.* 2002). Jedoch zeigten die Ergebnisse aus den CD11c-MHCI>MHC-I^{-/-}-Chimären auch, dass DC für diesen Prozess der Selektion nicht in Frage kommen, da in diesen Chimären keine H2-M3-CD8-T-Zellen detektierbar waren (Abbildung 18 A). Auch konnte in diesen Versuchen durch den Einsatz von Tetrameren aus klassischen MHC-I-Molekülen gezeigt werden, dass H-2K^b-restringierte CTL weder in den MHC-I⁺>MHC-I^{-/-}- noch in den CD11c-MHCI>MHC-I^{-/-}-Chimären generiert werden konnten (Abbildung 18 B). Somit konnte auch nach einer *Listeria monozytogenes*-Infektion bestätigt werden, dass hämatopetische Zellen und im besonderen DC nicht zur positiven Selektion klassischer CD8-T-Zellen befähigt sind. Welche Zellen hierfür verantwortlich sind, konnte durch die vorliegenden Versuche nicht nachgewiesen werden. Der Einfluss von Makrophagen, die hauptsächlich der Beseitigung von nicht selektierten T-Zellen im Thymus dienen (Surh *et al.* 1994), ist in diesem Zusammenhang wenig wahrscheinlich. Auch für B-Zellen konnte keine positive Selektion von CD4-T-Zellen im Thymus gezeigt werden (Kleindienst *et al.* 2000). Möglicherweise ist die Selektion von T-Zellen nicht an einen bestimmten Zelltyp gebunden, sondern findet vielmehr durch das Zusammenwirken vieler MHC-Klasse I⁺-Zellen im Thymus statt. Ausschlaggebend für eine effektive positive Selektion könnte die Dichte an MHC-Klasse I-Molekülen im Thymus sein. Unterschreitet die MHC-Klasse I-Dichte auf Thymuszellen einen gewissen Schwellenwert, könnte dies negative Effekte auf die positive Selektion von CD8-T-Zellen haben. Um diese These zu untermauern, bedarf es jedoch weiterer Versuche, die im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurden.

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass DC für eine effektive negative Selektion ausreichend sind. Die Tatsache, dass MHC-I⁺-Zelltransplantate von CD11c-MHCI-Mäusen, im Gegensatz zu $\beta 2m^{-/-}$ -Mäusen, nicht abgestoßen wurden (siehe 3.2.4, Abbildung 19), verdeutlicht dies. Diese Eliminierung „autoreaktiver“ CD8-Zellen könnte durch klonale Deletion direkt durch DC erfolgt sein (Brocker *et al.* 1997b; Kleindienst *et al.* 2000). Der zugrunde liegende Mechanismus konnte in den durchgeführten Experimenten nicht gezeigt werden. Gegen eine klonale Deletion MHC-I-reaktiver T-Zellen spricht die Analyse des TCR-Repertoires in CD11c-MHCI-Mäusen (Abbildung 16). Obwohl bei der Analyse der β -Ketten der CD8-T-Zell-Rezeptoren eine prozentual erhöhte TCRV $\beta 5^+$ CD8⁺-T-Zellzahl gemessen wurde, konnte bei Vergleich mit dem T-Zellrepertoire in $\beta 2m^{-/-}$ -Mäusen kein Unterschied bei den absoluten Zellzahlen detektiert werden. Wären MHC-I-reaktive T-Zellen in CD11c-MHCI-Mäusen klonal deletiert, könnte dies bei der TCR-Analyse durch das Fehlen bestimmter CD8-T-Zell-Klone auffallen. Es ist jedoch nicht möglich, alle V α - und V β -Kombinationendes TCR-Repertoires zu testen. In dieser Arbeit wurde exemplarisch eine

Auswahl verschiedener TCR- β -Ketten-Antikörper zur Analyse verwendet, der Tatsache bewusst, dass klonale Deletion nicht nur Deletion bestimmter TCR- β -Familien, sondern potenziell jede T-Zelle mit zu hoher MHC-Klasse I-Affinität betrifft. Andererseits wurde in einem Modell in dem nur positive, aber keine negative Selektion stattfinden konnte, gezeigt, dass nur etwa 2 % aller positiv selektionierten T-Zellen durch klonale Deletion beseitigt wurden (Capone *et al.* 2001). Dieser Wert entspricht auch dem von Laufer *et al.* gefundenen Prozentsatz autoreaktiver CD4-T-Zellen (Laufer *et al.* 1996). Aufgrund dieser relativ geringen Frequenz besteht die Möglichkeit, dass eine mögliche klonale Depletion durch DC, mittels der durchgeführten Analysen nicht zahlenmäßig erfassbar gewesen sein müsste.

Aus diesem Grund wurden in der Arbeitsgruppe zusätzliche Versuchsreihen mit K14- $\beta 2m$ -Mäusen durchgeführt. In diesem Mausstamm erfolgt die $\beta 2m$ -Expression unter der Kontrolle des humanen K14-Promotors. Dies führt zu einer MHC-Klasse I-Expression auf Epithelzellen des Thymus (Capone *et al.* 2001). Die selektive MHC-I-Expression hat zur Folge, dass eine positive Selektion von CD8⁺-Thymozyten, aber keine negative Selektion stattfindet. Dies stellt sich in einer um das zwei- bis dreifach erhöhten CD8⁺-Thymozytenfrequenz in K14- $\beta 2m$ - verglichen mit Wildtyp-C57BL/6-Mäusen dar (Capone *et al.* 2001; Cannarile *et al.* 2004). Die Kreuzung der K14- $\beta 2m$ - mit CD11c-MHCI-Mäusen resultierte in einer ausreichend hohen Vorläuferfrequenz von endogenen CD8-T-Zellen, um Aufschluss über den Deletionsmechanismus zu erhalten.

Bei einem Vergleich der CD8⁺-Thymozyten von K14- $\beta 2m$ - und K14- $\beta 2m \times$ CD11c-MHCI-Mäusen, wurde eine deutlich niedrigere CD8⁺-Thymozytenfrequenz in K14- $\beta 2m \times$ CD11c-MHCI-Mäusen festgestellt, welche vergleichbar mit der in C57BL/6-Mäusen war (Cannarile *et al.* 2004). Aufgrund der im Thymus von K14- $\beta 2m \times$ CD11c-MHCI-Mäusen stattfindenden negativen Selektion durch MHC-I⁺DC, wurden autoreaktive CD8⁺-Thymozyten eliminiert und somit die Gesamt-CD8⁺-Thymozytenzahl reduziert. Dieses Ergebnis legt nahe, dass es bei der negativen Selektion von CD8-T-Zellen durch DC, zur Beseitigung autoreaktiver CD8-T-Zellen durch klonale Deletion kommt. Würde die Toleranzinduktion durch Anergisierung der autoreaktiven CD8⁺-Thymozyten erfolgen, hätte dies keine Reduktion der Zellzahl im Thymus zu Folge.

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass DC zur negativen Selektion und zur klonalen Deletion von CD8-T-Zellen ausreichend sind.

Durch Zelltransferversuche (siehe 3.2.4) von MHC-I⁺-Zellen in C57BL/6-, CD11c-MHCI- sowie $\beta 2m^{-/-}$ -Mäusen konnte neben der negativen Selektion durch DC auch ein Effekt von DC auf NK-Zellen erkannt werden. Während in MHC-I⁺-C57BL/6-Mäusen die transferierten MHC-I⁺-Zellen erwartungsgemäß durch NK-Zellen eliminiert wurden, wurden sie in CD11c-

MHCI-Mäusen nicht abgestoßen (Abbildung 19, 20). Die MHC-I⁺-DC in den transgenen Mäusen beeinflussten somit die „normale“ Funktionsentwicklung von NK-Zellen. Dieses Phänomen konnte bereits zuvor in transgenen Mäusen beobachtet werden, in denen die MHC-I-Expression nur auf T-, B- und NK-Zellen beschränkt war (Johansson *et al.* 1997).

Die Berichte, die vor allem mTECS für die Induktion von negativer Selektion verantwortlich machen, konnten in dem hier vorgestellten System nicht näher untersucht werden. Diese Vermutungen basieren auf der bereits erwähnten Expression des AIRE-Proteins, welches hauptsächlich auf mTECS exprimiert wird, sowie auf dem Nachweis peripherer Autoantigene durch diese Zellen (Derbinski *et al.* 2001). Durch die Entwicklung einer AIRE^{-/-}-Maus konnte nachgewiesen werden, dass es durch das Fehlen des AIRE-Proteins zu vielfältigen Autoimmunreaktionen in diesen Tieren kommt. Diese äußern sich durch Infiltration autoreaktiver T-Zellen in unterschiedlichste periphere Gewebetypen (Anderson *et al.* 2002; Ramsey *et al.* 2002). Auch konnte in einem Bericht durch Generierung von Knochenmarkchimären und durch Thymustransplantate mit diesen Mäusen gezeigt werden, dass es nur bei fehlender AIRE-Expression in Thymusstromazellen nicht hämatopoetischen Ursprungs zu den beobachteten Autoimmunreaktionen kam (Anderson *et al.* 2002). Dies würde gegen eine Beteiligung von DC bei der negativen Selektion sprechen. In anderen Studien konnte aber auch die Expression peripherer Autoantigene, die z.B. mit der Autoimmunerkrankung *Diabetes mellitus* assoziiert sind, wie Insulin und Glutaminsäure-Decarboxylase (engl.: *glutamic acid decarboxylase*, GAD) auch auf DC und Makrophagen exprimiert werden (Throsby *et al.* 1998; Pugliese *et al.* 2001). Insbesondere wird der Nachweis der AIRE-Expression auf unterschiedlichen Zelltypen im Thymus in den erwähnten Berichten kontrovers diskutiert (Pietropaolo *et al.* 2002; Pugliese *et al.* 2002).

Neben der in dieser Arbeit dargestellten DC-Kapazität zur negativen Selektion, wurden in der Arbeitsgruppe auch Experimente zur näheren Analyse des Thymusepithels durchgeführt (Cannarile *et al.* 2004). Hierbei wurde dessen Einfluss bei der negativen Selektion mittels der bereits erwähnten K14- β 2m \times CD11c-MHCI-Mäuse untersucht. Die hier vorgestellten Ergebnisse konnten durch diese Untersuchungen bestätigt werden. In CD11c-MHCI \times K14- β 2m-Mäusen, in denen DC und Thymusepithelzellen MHC-I-Moleküle exprimierten, wurden, wie in CD11c-MHCI-Mäusen, MHC-I⁺-Zelltransplantate toleriert, während diese in K14- β 2m-Mäusen, wie in β 2m^{-/-}-Mäusen, abgestoßen wurden. Die Epithelzellen in K14- β 2m-Mäusen waren demnach nicht in der Lage MHC-I-reaktive CD8-T-Zellen im Thymus zu eliminieren. Durch die zusätzliche MHC-I-Expression auf DC in CD11c-MHCI \times K14- β 2m-Mäusen, wurden diese autoreaktiven CD8⁺-Thymozyten negativ selektioniert, wodurch es zu einer Tolerisierung der transferierten MHC-I⁺-Zellen kam.

In diesem Zusammenhang könnte die Aufnahme peripherer Autoantigene von Epithelzellen durch DC und anschließender Kreuzpräsentation im Thymus eine Erklärung für die beschriebenen Beobachtungen sein. Somit wären Epithelzellen des Thymus lediglich zur Präsentation peripherer Autoantigene befähigt. Die eigentliche negative Selektion durch Kreuzpräsentation dieser Antigene und Deletion autoreaktiver CD8⁺-Thymozyten erfolgt durch die DC.

Insgesamt wurde im ersten Teil gezeigt, dass DC nicht, wie von einigen Gruppen vermutet, zur positiven Selektion von CD8-T-Zellen im Thymus befähigt sind (Longo *et al.* 1980; Longo *et al.* 1985; Bix *et al.* 1992; Bix *et al.* 1993; Zerrahn *et al.* 1999; Zinkernagel *et al.* 1999; Shizuru *et al.* 2000). Bekannt ist bereits, dass auch B-Zellen im Thymus nicht zur positiven Selektion befähigt sind (Kleindienst *et al.* 2000), und dass auch Makrophagen als äußerst unwahrscheinliche Kandidaten gelten (Surh *et al.* 1994). Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Notwendigkeit der Thymusepithelzellen zur positiven Selektion gezeigt werden, aber welcher Zelltyp, und ob überhaupt ein bestimmter Zelltyp für die positive Selektion von CD8-T-Zellen allein verantwortlich ist, muss in weiteren Versuchsreihen untersucht werden.

Im Gegensatz zur positiven Selektion reicht die Anwesenheit von DC im Thymus aus, um autoreaktive CD8-T-Zellen negativ zu selektionieren. Dies legt den Schluss nahe, das DC spezialisierte APC im Thymus darstellen, um den Organismus vor Autoimmunität zu schützen.

4.2 Die Rolle von Dendritischen Zellen bei CD8-T-Zell-Antworten *in vivo*

4.2.1 Induktion von CD8-T-Zell-Immunität durch DC nach Immunisierung mit inflammatorischem Adjuvans und Antigen

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Effektivität von DC in der Peripherie in Bezug auf die Induktion von CD8-T-Zell-Immunität oder Toleranz untersucht. Mangels geeigneter Systeme, gibt es bislang meist nur indirekte Anhaltspunkte über das immunstimulatorische Potenzial von DC. Letztere werden dabei aus dem Organismus isoliert oder für weitere Untersuchungen in Kultur genommen, bzw. werden *in vitro* generierte DC in einen Modellorganismus zurückgeführt, um somit eine Art „*in vivo*“-Analyse durchführen zu können. Es ist aber bekannt, dass diese Art der DC-Behandlung fundamentale Veränderungen bezüglich ihres Phänotyps und ihrer immunstimulatorischer Fähigkeiten bewirkt (Pierre *et al.* 1997; Gallucci

et al. 1999), so dass Ergebnisse aus diesen Modellen nicht sicher die tatsächliche *in vivo* Situation widerspiegeln. Jung *et al.* demonstrierten zum ersten Mal in einem Maussystem, die Bedeutung und Rolle von DC bei der Generierung von Immunantworten *in vivo* (Jung *et al.* 2002). Unter der Kontrolle des CD11c-Promotors und somit selektiv auf DC, wurde hier der Diphtherietoxin-Rezeptor (DTR) in Mäusen exprimiert. Durch intraperitoneale Injektion von Diphtherietoxin (DT) erfolgte die Apoptoseinduktion in DC, was zu einer Depletion *in vivo* führte. Nach anschließender Infektion mit *Listeria monocytogenes* oder *Plasmodium yoelii*, konnte keine funktionelle CTL-Immunantwort mehr gegen diese Erreger generiert werden. Jung *et al.* zeigten jedoch durch ihre *in vivo*-Depletion von DC nur indirekt deren Bedeutung nach Infektionen, da sie nur den Einfluss anderer APC untersuchten und dadurch auf die Bedeutung von DC rückschlossen. Weiterhin konnten in dem von Jung *et al.* benutzten System nur die Zellen depletiert werden, die CD11c in sehr hohem Maße exprimierten. Zellen mit einer geringen Dichte an CD11c auf der Zelloberfläche, wie z.B. noch nicht völlig ausdifferenzierte DC, wurden nicht durch Injektion von DT depletiert.

Das in dieser Arbeit beschriebene Maussystem ermöglichte, die direkten Auswirkungen von DC *in vivo* zu analysieren, ohne sie in irgendeiner Weise zu manipulieren.

Um Aufschluss über die Bedeutung von DC bei der Induktion von Immunität bzw. Toleranzinduktion zu erhalten, wurden *in vivo*-Immunantworten in den transgenen CD11c-MHCI-Mäusen mit denen in Wildtyp-C57BL/6-Mäusen verglichen. Da wie bereits im ersten Teil beschrieben, keine endogenen CD8-T-Zellen in den CD11c-MHCI-Mäusen vorhanden waren, wurden in beide Mausstämme transgene OT-1-Zellen transferiert, um eine Antigen spezifische CD8-T-Zellantwort visualisieren zu können (Pape *et al.* 1997).

Zuerst wurde die Bedeutung von DC unter entzündlichen Bedingungen untersucht. Hierzu wurden die Empfängertiere mit spezifischem Peptid und unterschiedlichen Adjuvantien immunisiert. Bei dieser Art der Immunisierung mit mikrobiellen Adjuvantien wie z.B. CFA oder LPS in Verbindung mit spezifischem Antigen wurde bereits gezeigt, dass dies eine starke klonale CD8-T-Zell-Expansion, Induktion funktionaler CTL sowie eine Generierung von Gedächtniszellen bewirkt (Rescigno *et al.* 2001; Rescigno 2002). Nach Immunisierung durch Peptid und CFA s.k. zeigten OT-1-Zellen, die nur durch DC aktiviert werden konnten, die gleiche Expansion wie OT-1-Zellen in den Wildtypmäusen (Abbildung 22 A). Überraschenderweise zeigten die OT-1-Zellen in den transgenen Mäusen, wenn sie mit LPS und Peptid i.v. immunisiert wurden, eine dreifach höhere Expansion verglichen mit C57BL/6-Wildtypmäusen (Abbildung 22 B). Die erhöhte OT-1-Proliferation in CD11c-MHCI-Mäusen ließ sich auch in sekundären lymphatischen Organen beobachten (Abbildung 23). Eine homeostatische Proliferation der OT-1-Zellen konnte aber in beiden Fällen ausgeschlossen werden. Generell wäre eine antigenunabhängige Proliferation der OT-1-Zellen in den

transgenen Mäusen möglich gewesen, da dies für andere T-Zell-defiziente Mäuse bereits gezeigt wurde (Miller *et al.* 1984; Bell *et al.* 1987; Rocha 1987). In diesen Mäusen proliferierten T-Zellen spontan nach Transfer, um das leere T-Zell-Kompartiment wieder aufzufüllen. In dem hier vorgestellten transgenen Maussystem konnte dieses Phänomen aus mehreren Gründen ausgeschlossen werden. Zum Einen zeigten die transferierten OT-1-Zellen nach ihrer Anreicherung und nach Transfer einen nicht aktivierten Phänotyp (Daten nicht gezeigt), und zum Anderen konnte zu keinem Zeitpunkt in den Kontrollgruppen, die ohne Peptid nur mit Adjuvans immunisiert wurden, eine antigenunabhängige Expansion festgestellt werden. Eine homeostatische Expansion der OT-1-Zellen hätte aber, wie für andere T-Zellen beschrieben, innerhalb der ersten 24 h nach Transfer erkennbar sein müssen (Maury *et al.* 2001; Suchin *et al.* 2001). Da von anderen Gruppen aber beschrieben wurde, dass sich eine homeostatische Expansion transgener T-Zellen in T-Zell defizienten Mäusen durch den Ko-Transfer von polyklonaler T-Zellen unterdrücken lässt (Rocha *et al.* 1989; Ernst *et al.* 1999; Dummer *et al.* 2001), wurden beide Experimente wiederholt. Hierbei wurden CD11c-MHCI-Mäusen zusätzlich zu OT-1-Zellen, polyklonale C57BL/6-CD8-T-Zellen verabreicht und so ein normales CD8-T-Zellkompartiment simuliert (Abbildung 24).

Durch dieses Kontrollexperiment wurde das Phänomen der erhöhten OT-1-Expansion in CD11c-MHCI-Mäusen nach LPS/OVA₂₅₇₋₂₆₄-Immunisierung bestätigt und eine homeostatische Expansion der OT-1-Zellen in CD11c-MHCI-Mäusen ausgeschlossen.

Die erhöhte Expansion der OT-1-Zellen nach LPS/OVA₂₅₇₋₂₆₄-Immunisierung resultierte auch in einem vierfach höheren Anteil an INF γ , das die transferierten CD8-Zellen nach Immunisierung in CD11c-MHCI- im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen produzierten (Abbildung 25 B). Die erhöhte INF γ -Produktion könnte durch die direktere Verfügbarkeit des Antigens und des Adjuvans durch die intravenöse im Gegensatz zu der subkutanen Applikation zustande kommen. Gegen diese Möglichkeit spricht jedoch, dass die OT-1-Expansion nach beiden Immunisierungsarten in C57BL/6-Mäusen vergleichbar war. Es ist daher wahrscheinlicher, dass der beobachtete Effekt der direkte Einfluss der unterschiedlichen Adjuvantien auf DC war. Während nach CFA-Immunisierung Gefahrensignale durch die hitzeinaktivierten mikrobiellen Bestandteile des Adjuvans (hauptsächlich *Mycobacterium tuberculosis*) über TLR 2 (Lim 2003) (lebende *Mycobacterium tuberculosis* über TLR2 und 4 (Means *et al.* 1999)) weitergegeben werden, erfolgt die Signalweiterleitung nach LPS-Immunisierung lediglich über TLR4 (Liu *et al.* 2002). Inwieweit dies auch eine unterschiedliche Aktivierung von DC und somit eventuell eine differenzielle CD8-T-Zellaktivierung zur Folge hat, muss zukünftig in weiteren Versuchsreihen genau untersucht werden.

Es wäre möglich, dass nach LPS-Immunisierung die Reifung der DC nicht vollständig abläuft und somit auch die Aktivierung von CD8-T-Zellen nicht wie in C57BL/6-Mäusen unvollständig ist. Dies könnte eine Art Migrationsdefekt zur Folge haben, der ein Auswandern aktivierter CTL in die peripheren Organe verhindern könnte. Somit käme es zu einer Akkumulation von CTL in den sekundären lymphatischen Organen. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, muss nach LPS/OVA₂₅₇₋₂₆₄-Immunisierung der Anteil aktivierter OT-1-Zellen in den peripheren Organen von CD11c-MHCI- und C57BL/6-Mäusen analysiert werden.

Neben der Expansion und Effektorzytokinproduktion war die Darstellung der Funktionalität der aktivierten CD8-T-Zellen durch den *in vivo*-Zytotoxizitätstest essenziell, da die erstgenannten Phänomene nicht zwangsläufig eine funktionelle CTL-Induktion implizieren (Curtsinger *et al.* 2003).

Nach CFA/OVA₂₅₇₋₂₆₄-Immunisierung konnte eine funktionelle CTL-Induktion gezeigt werden (Abbildung 26 A), die in beiden Maustämmen identisch war. Erwartungsgemäß war auch die lytische Aktivität der OT-1-Zellen in den LPS/OVA₂₅₇₋₂₆₄-immunisierten CD11c-MHCI-Mäusen höher als in C57BL/6-Mäusen (Abbildung 26 B).

Insgesamt kann also von einer wesentlich stärkeren Antigen spezifischen Aktivierung von CD8-Zellen durch DC nach LPS-Immunisierung ausgegangen werden. Nach CFA/OVA₂₅₇₋₂₆₄-Immunisierung verhielten sich OT-1-Zellen, die nur durch DC aktiviert worden sein konnten, nahezu identisch wie OT-1-Zellen, in denen alle APC an der Regulation von CD8-T-Zell-Antworten beteiligt sind. Bei der Analyse des Aktivierungsstatus der OT-1-Zellen wurde nur nach LPS/OVA₂₅₇₋₂₆₄-Immunisierung ein Unterschied in der CD43-Expression gemessen (Abbildung 27). Nach dieser Immunisierung zeigte sich bei OT-1-Zellen in CD11c-MHCI-Mäusen eine weniger starke Expression verglichen mit OT-1-Zellen in C57BL/6-Mäusen. Hierbei könnte es sich um eine aktivierungsbedingte verminderte Expression oder um eine weniger stark induzierte Expression dieses Moleküls handeln. CD43 (Leukosialin, Sialophorin) ist ein sehr großes auf Zellen hämatopetischen Ursprungs, also auch CD4- und CD8-T-Zellen exprimiertes Molekül. Es ragt mit seiner 45 nm großen extrazellulären Domäne weit über die Zelloberfläche heraus und bedeckt ca. 28% der T-Zelloberfläche (Ostberg *et al.* 1998). Es wurde gezeigt, dass CD43 bei der T-Zell-Aktivierung und speziell bei der Formation der immunologischen Synapse zwischen DC und T-Zelle eine wichtige Rolle spielt (Cullinan *et al.* 2002). Trotz der noch nicht vollständig geklärten Funktion von CD43 wurde von verschiedenen Gruppen gezeigt, dass es sich um einen negativen Regulator für T-Zellaktivierung handelt, da es in CD43-defizienten Mäusen zu einer Hyperproliferation von T-Zellen nach Aktivierung *in vitro* wie *in vivo* kam (Manjunath *et al.* 1995; Thurman *et al.* 1998; Onami *et al.* 2002; Ford *et al.* 2003). Die weniger starke CD43-Expression von OT-1-

Zellen in CD11c-MHCI- gegenüber C57BL/6-Mäusen könnte deshalb ein Grund für die beobachtete Hyperproliferation sein. Während in den meisten Arbeiten die Proliferation von T-Zellen an einem bestimmten Zeitpunkt gemessen wurde, konnte durch die hier durchgeführten Expansionskinetiken im peripheren Blut, im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen, eine nicht verzögerte Kontraktion der OT-1-Population in CD11c-MHC-I-Mäusen beobachtet werden (Abbildung 22, 24), so dass sich die Hyperproliferation nur am Expansionsmaximum messen ließ. Im Gegensatz hierzu wurde von Onami *et al.* beschrieben, dass in CD43^{-/-}-Mäusen gegenüber Wildtyp-Mäusen nach LCMV-Infektion auch während der Kontraktionsphase eine erhöhte CD8-T-Zellzahl nachweisbar war (Onami *et al.* 2002). Um Aufschluss über die Hyperproliferation nach LPS/OVA₂₅₇₋₂₆₄⁻-Immunisierung zu erhalten, wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst die einzelnen OT-1-Teilungen nach Immunisierungen näher untersucht (Abbildung 28). Hierbei wurde überraschenderweise in CD11c-MHCI-Mäusen eine Reduktion der OT-1-Teilungsrate nach CFA/OVA₂₅₇₋₂₆₄⁻ und nach LPS/OVA₂₅₇₋₂₆₄⁻-Immunisierung detektiert. Dies stand sowohl im Widerspruch mit der gleichen Expansion der OT-1-Zellen in beiden Empfängerstämmen nach CFA/OVA₂₅₇₋₂₆₄⁻-Immunisierung als auch mit der Hyperproliferation nach LPS/OVA₂₅₇₋₂₆₄⁻-Immunisierung. Als mögliche Erklärung für diese Ergebnisse wurde eine unterschiedliche Apoptoseinduktion nach Antigen spezifischer OT-1-Aktivierung in CD11c-MHCI-Mäusen in Betracht gezogen. Diese Möglichkeit wurde durch Anfärben der OT-1-Zellen mit Annexin V und Propidiumjodid überprüft (Maroto *et al.* 1999; Ozdemir *et al.* 2003; Lee *et al.* 2004). Die Analyse (Abbildung 29) zeigte tatsächlich eine reduzierte Apoptoserate von OT-1-Zellen in CD11c-MHCI-Mäusen nach CFA/OVA₂₅₇₋₂₆₄⁻ sowie LPS/OVA₂₅₇₋₂₆₄⁻-Immunisierung und dadurch auch eine erhöhte OT-1-Viabilität in CD11c-MHCI-Mäusen. Durch dieses Phänomen konnten zumindest die zunächst widersprüchlichen Daten nach CFA/OVA₂₅₇₋₂₆₄⁻-Immunisierung erklärt werden.

Wie bei reduzierter OT-1-Zellteilungsrate in CD11c-MHCI-Mäusen trotzdem der gleiche prozentuale Anteil expandierter CD8-T-Zellen gemessen werden kann, ist in Abbildung 36 schematisch dargestellt.

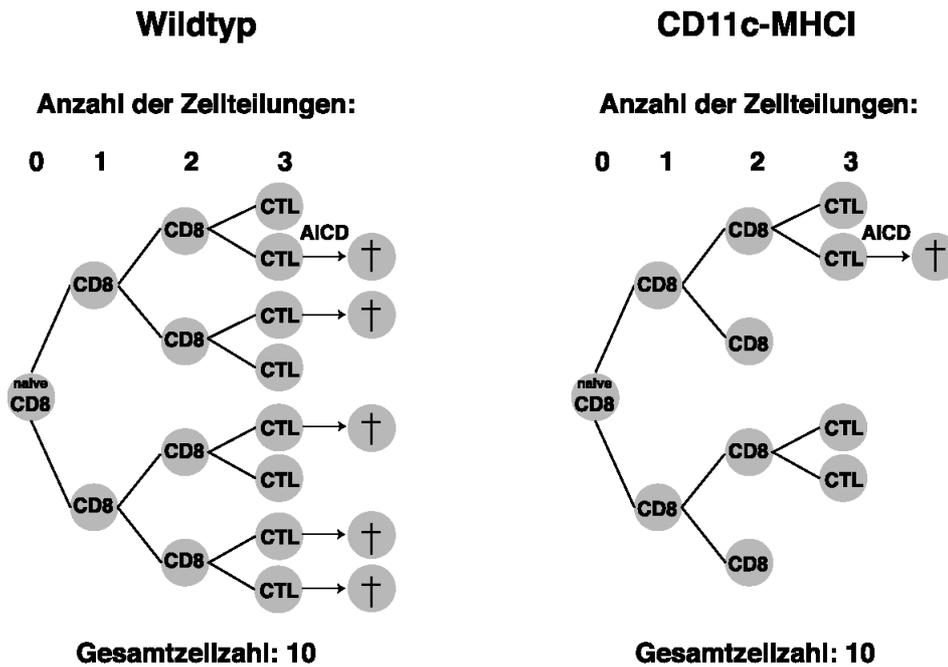


Abbildung 36: Schematische Darstellung der möglichen Zellteilungsrate und des Antigen-induzierten Zelltods (AICD) von CD8-T-Zellen in C57BL/6- und CD11c-MHCI-Mäusen

Der genaue Mechanismus der Apoptoseinduktion wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Es gibt aber Arbeiten, in denen gezeigt wurde, dass nach Verabreichung von LPS der Antigen-induzierte T-Zelltod verlangsamt stattfand (Vella *et al.* 1995). Auch wird im Zusammenhang mit CD43 eine mögliche Beeinflussung der Apoptoseinduktion in T-Zellen vermutet (Bazil *et al.* 1995; Cermak *et al.* 2002). Onami *et al.* postulieren einen Apoptosedefekt von CD8⁺-Effektorzellen in CD43^{-/-}-Mäusen. Der mögliche Mechanismus ist jedoch nicht bekannt. CD43-Defekte führen zu reduzierten Zytokinproduktionen wie z.B. Interleukin 2 (IL-2) (Allenspach *et al.* 2001; Delon *et al.* 2001), das einen Effekt auf die Apoptosesensitivität haben kann. Während einer normalen Aktivierung von T-Zellen bewirkt die konstant hohe IL-2-Konzentration eine Apoptosesensitivierung der T-Zellen. Eine hohe IL-2-Konzentration bewirkt eine Reduktion der FLIP- (engl.: *FLICE-inhibitory-protein*) Transkription, die wiederum bei hoher intrazellulärer Konzentration die Bindung von Caspase 8 an den FAS-Proteinkomplex verhindert. Insgesamt ist aber die Wirkungsweise von CD43 sowie die Beteiligung der bisher bekannten Apoptosemechanismen bei der Antigen-induzierten Apoptose noch nicht vollständig geklärt. Eine Bewertung der verringerten CD43-Expression auf OT-1-Zellen in CD11c-MHCI-Mäusen nach intravenöser LPS/OVA₂₅₇₋₂₆₄-Immunisierung auf die OT-1-Expansionsrate, muss in weitergehenden Versuchsreihen erfolgen.

Theoretisch könnte die gemessene, unterschiedlich hohe OT-1-Apoptoserate aber auch durch die unterschiedliche Teilungsrate zustande kommen. Um dies aufzuklären, wäre eine Analyse der OT-1-Apoptoserate während jeder einzelnen Zellteilung notwendig. Sollte wiederum eine unterschiedliche Apoptoserate von OT-1-Zellen in C57BL/6- und CD11c-MHCI-Mäusen nachgewiesen werden, käme es tatsächlich bei der CD8-T-Zellaktivierung ausschließlich durch DC zu einer differenziellen Apoptoseinduktion. Des Weiteren würden Analysen von Apoptose-assoziierten Molekülen wie z.B. die Expression von Fas und Fas-Ligand, Mitgliedern der TNF-Familie usw. möglicherweise einen Anhaltspunkt zur differenziellen Apoptoseregulation geben.

4.2.2 Die Rolle von DC bei der Induktion von CD8-Immunität nach Vakzinierung

Neben der Analyse immunstimulatorischer Fähigkeiten von DC nach Immunisierung mit entzündlichen Adjuvantien wurden auch Immunreaktionen nach Vakzinierung mit viralen Vektoren untersucht. DC werden, wie bereits für die immunstimulatorischen Eigenschaften allgemein, besonders nach viralen Infektionen als der wichtigste Zelltyp bei der Vermittlung antiviraler Immunreaktionen angesehen. DC sind in der Lage, endogene virale Antigene nach eigener Infektion auf MHC-I-Molekülen zu präsentieren oder virale Antigene anderer infizierter Zellen durch Kreuzpräsentation auf eigene MHC-I-Moleküle zu laden (Sigal *et al.* 1999). Die meisten Studien beschäftigen sich mit Analysen der bekannten DC-Subpopulationen nach viralen Infektionen. In diesem Zusammenhang wird vermutet, dass CD8⁺DC die Hauptrolle bei der Induktion antiviraler CD8-T-Zellantworten spielen (Belz *et al.* 2004).

Virusinfizierte Zellen nicht-hämatopetischen Ursprungs sind, im Gegensatz zu Zellen hämatopetischen Ursprungs, nicht in der Lage, naive CD8-T-Zellen zu aktivieren (Bronte *et al.* 1997; Sigal *et al.* 1999; Sigal *et al.* 2000). Shen *et al.* (Shen *et al.* 2002) und Basta *et al.* (Basta *et al.* 2002) zeigten nach Vaccinia Virus-Infektion, dass eine spezifische CD8⁺-Aktivierung teilweise direkt durch die infizierten Zellen, aber hauptsächlich durch Kreuzpräsentation viraler Antigene durch APC stattfindet.

In dieser Arbeit wurde anhand der CD11c-MHCI-Mäuse gezeigt, dass DC im Allgemeinen zur Induktion einer funktionellen antiviralen CD8⁺-Immunantwort nicht nur fähig, sondern auch ausreichend sind. Für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten HSV- bzw. Vaccinia Virus-basierten, rekombinanten Vakzine wurde bereits eine starke Induktion von CTL nach

Vakzinierung gezeigt. OVA kodierendes HSV (HSV-OVA) wurde kürzlich durch Lauterbach *et al.* (Lauterbach *et al.* 2004) beschrieben. Es wurde gezeigt, dass die systemische Applikation von HSV-OVA zur Impfung eines Organismus gegen Antigene nicht-viralen Ursprungs verwendet werden kann, da sie eine starke Antigen spezifische CTL-Immunantwort induzierte und vakzinierter Mäuse vor letalen Infektionsdosen mit *Listeria monocytogenes* schützte. Neben HSV wurde in dieser Arbeit auch mit einem rekombinanten, OVA-exprimierenden MVA-Virus vakziniert, da auch für dieses Virus nach i.p.-Infektion von Mäusen eine starke CTL-Antwort nach direkter Präsentation viraler Antigene durch APC gezeigt wurde (Basta *et al.* 2002; Norbury *et al.* 2002; Shen *et al.* 2002).

Die hier vorgestellten Ergebnisse nach viraler Vakzinierung tragen wesentlich zu aktuellen Fragestellungen nach der Bedeutung von DC bei viralen Infektionen bei. Es konnte mittels HSV- und MVA-Vakzinierung *in vivo* gezeigt werden, dass DC ausreichen, um eine komplette CTL-basierte Immunantwort nach viraler Vakzinierung zu induzieren (Abbildung 30, 31, 32). Im Gegensatz zu Lauterbach *et al.* (Lauterbach *et al.* 2004), der ein Expansionsmaximum Antigen spezifischer CD8-T-Zellen im peripheren Blut nach HSV-OVA-Vakzinierung an Tag 7 zeigte, wurde hier das Expansionsmaximum bereits an Tag 3 nach Vakzinierung beobachtet (Abbildung 30 A). Diese schnellere Expansion der CD8-T-Zellen ist durch den Einsatz transgener OT-1-Zellen zu erklären. Hierdurch wurde die Vorläuferfrequenz Antigen spezifischer CD8-T-Zellen erhöht. Der Hintergrund der transferierten OT-1-Zellen im peripheren Blut belief sich in den hier beschriebenen Experimenten auf $\leq 1\%$ (Abbildung 30 A), während bei Lauterbach *et al.* die endogene CD8-T-Zell-Expansion mittels Tetrameren analysiert werden konnten. Die Vorläuferfrequenz betrug hier ca. 0,05 % im peripheren Blut. Durch andere Gruppen wurde das Maximum der Antigenpräsentation an Tag 2 nach subkutaner HSV-Infektion gezeigt (Mueller *et al.* 2002; Belz *et al.* 2004). Insgesamt zeigen die bisher veröffentlichten Arbeiten, dass die Intensität und auch Kinetik einer Virus-spezifischen Immunantwort stark durch die Menge der infektiösen Viruspartikel, der Applikationsroute des Virus und durch den allgemeinen Versuchsaufbau variieren.

Im Gegensatz zu den OT-1-Expansionsmaxima nach CFA/OVA₂₅₇₋₂₆₄⁻, LPS/OVA₂₅₇₋₂₆₄⁻ Immunisierung und HSV-OVA-Vakzinierung, wurde nach MVA-OVA-Vakzinierung in beiden murinen Empfängerstämmen ein Maximum an Tag 5 gemessen (Abbildung 30 B). Zusätzlich wurde in den MVA-vakzinierter Mäusen eine wesentlich höhere Variabilität innerhalb der einzelnen Gruppen festgestellt. Insgesamt wurde aber eine vergleichbar hohe OT-1-Expansion wie in den HSV-OVA vakzinierter Mäusen festgestellt. Eine unterschiedlich starke Expansion von OT-1-Zellen in C57BL/6- und CD11c-MHCI-Mäusen konnte an Tag 5 nach HSV-OVA- und an Tag 3 nach MVA-OVA-Vakzinierung beobachtet werden

(Abbildung 30 A, B). Die insgesamt aber vergleichbaren Expansionskinetiken in beiden Empfängertieren, zeigten die ausreichende Aktivierung von OT-1-Zellen nur durch DC. Die beschriebenen marginalen Unterschiede lassen sich durch den Einsatz einer Vakzine im Gegensatz zu den genauer standardisierbaren Adjuvantien erklären. Nach der Analyse funktionaler OT-1-Zellen nach viraler Vakzinierung wurde die ausreichende Induktion von OT-1-CTL durch DC in CD11c-MHCI-Mäusen bestätigt (Abbildung 32 A, B). Dabei konnte die bereits in der Literatur beschriebene stärkere Zytotoxizität des MVA im Vergleich zu HSV bestätigt werden (Shen *et al.* 2002). Nach MVA-Vakzinierung musste 6 h nach Transfer der Zielzellen deren Lyse analysiert werden, um genaue Werte zur Berechnung der spezifische Lyse zu erhalten. Würde, wie im Falle von HSV-OVA (Abbildung 32 A), 12 h mit der Analyse gewartet, wäre die Lyse nach MVA-OVA Vakzinierung (Abbildung 32 B) so weit vorangeschritten, dass das Verhältnis der lysierten zu nicht-lysierten Zellen durchflusszytometrisch nicht mehr eindeutig bestimmbar wäre. Für MVA wurde bereits gezeigt, dass virale Antigene bereits 6 h nach Infektion präsentiert werden (Norbury *et al.* 2002), und dass im Gegensatz zu HSV, die direkte Präsentation gegenüber Kreuzpräsentation besonders nach i.p.- oder i.v.-Applikation eine dominierende Rolle spielt (Bronte *et al.* 1997; Shen *et al.* 2002). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass es durch die spezifischen MVA-Eigenschaften zu einer stärkeren Kostimulation und hierdurch zu einem stärkeren „priming“ CD8-positiver T-Zellen kam.

Die Überprüfung der Zellteilungsraten, wie nach Immunisierung mit Adjuvans sowie unter Toleranz induzierenden Bedingungen, würde näheren Aufschluss darüber geben, ob die Reduktion der Zellteilungsraten nur bei Einsatz von inflammatorischem Adjuvans oder auch bei Einsatz viraler Vakzinen zu beobachten ist. Dies ließe auf einen generellen DC-Effekt bezüglich der Zellteilungen bei Induktion von CD8-T-Zell-Immunität schließen.

4.2.3 Einfluss Dendritischer Zellen auf die Toleranzinduktion *in vivo*

Seit wenigen Jahren werden DC auch als potente Induktoren peripherer Toleranz vermutet (Kurts *et al.* 1997; Hawiger *et al.* 2001) (Steinman *et al.* 2003). Wilson *et al.* Zeigten, dass sich 50% der DC in Lymphknoten und alle DC in der Milz und im Thymus unter nicht-infektiösen Bedingungen im unreifen Zustand befinden (Wilson *et al.* 2003). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass unreife DC für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz verantwortlich sind. Es gibt auch viele andere Berichte, in denen der direkte Zusammenhang von DC und der Induktion von T-Zell-Toleranz vermutet wird (Kurts *et al.* 1997; Hawiger *et al.* 2001). Es konnte bereits zuvor in der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass DC direkt bei

der Präsentation von Autoantigenen *in vivo* beteiligt sind (Kurts *et al.* 2001). Mit den zusätzlichen Daten zur Toleranzinduktion, die in dieser Arbeit vorgestellt werden, konnte erstmals direkt gezeigt werden, dass die *in vivo* Applikation von exogenem Antigen unter Toleranz induzierenden Bedingungen in CD11c-MHCI-Mäusen zu funktioneller CD8-T-Zelltoleranz führt.

Lediglich ein Bericht von Probst *et al.* postulierte eine ähnliche Bedeutung von DC bei der Toleranzinduktion *in vivo* (Probst *et al.* 2003). Probst *et al.* untersuchten die Antigenpräsentation von unreifen und reifen DC im Zusammenhang mit Induktion von Immunität oder Toleranz. In diesem System beschreiben Probst *et al.* die vollständige Induktion von CTL-Immunität durch reife DC, sowie periphere Toleranz durch unreife DC. Hierzu sollten *in vivo* LCMV-Antigene als Fusionsprotein durch ein induzierbares Cre-Rekombinase-System unter der Kontrolle des CD11c-Promotors selektiv in DC exprimiert werden. Hauptkritikpunkt an dieser Arbeit ist aber, dass weder die generelle Expression des LCMV-Antigen-Fusionsprotein noch die Expression unterschiedlicher LCMV-Epitope bei Verwendung des CD11c-Promotors in DC gezeigt werden konnte. Ein Nachweis der spezifischen Antigenexpression in DC wäre essenziell gewesen, da es bekannt ist, dass bei der Verwendung dieses Expressionssystems nicht von einer spezifischen Expression eines Transgens ausgegangen werden kann. So konnte auch hier nach Transfer von Gp133-transgener T-Zellen in diese doppelt transgenen Mäusen eine Expansion und IFN γ -Produktion der Gp133-transgenen T-Zellen ohne Induktion des Transgens beobachtet werden (Probst H.C., persönliche Kommunikation). Somit muss auch in diesem Fall von einer unspezifischen Expression antigener LMCV-Epitope ausgegangen werden.

In der hier vorgestellten Arbeit mit selektiver MHC-I-Expression in DC konnte nach OT-1-T-Zelltransfer und intravenöser, Toleranz induzierender Verabreichung von OVA-Peptid, eine Expansion der OT-1-Zellen im peripheren Blut beobachtet werden. Die Antigen spezifische CD8-T-Zell-Expression unter Toleranz induzierenden Bedingungen wurde auch von anderen Gruppen beobachtet (den Haan *et al.* 2000; Belz *et al.* 2002; Scheinecker *et al.* 2002; Curtsinger *et al.* 2003). Die Expansionskinetik (Abbildung 33 A) und die Expression von Aktivierungsmarkern (Abbildung 34) war in beiden Empfängerstämmen identisch. Bei der Überprüfung der Zytotoxizität konnte in der Tat keine Lyse der transferierten Zielzellen durch OT-1-Zellen beobachtet werden (Abbildung 33 B). Auch die bei der inflammatorischen Immunisierung beobachteten Reduktion der OT-1-Teilungsfrequenz war unter Toleranz induzierenden Bedingungen nicht nachzuweisen (Abbildung 35). OT-1-Zellen in CD11c-MHCI- und C57BL/6-Mäusen zeigten exakt dieselbe Teilungsrate nach i.v.-Injektion von Peptid und PBS. Insgesamt konnte zur Toleranzinduktion *in vivo* ein ausreichendes Potenzial von DC durch die Experimente unter nicht-inflammatorischen Bedingungen nachgewiesen

werden. Da es in diesem Fall zu keinerlei Abweichung der CD8-T-Zellantwort zwischen Wildtyp-C57BL/6- und CD11c-MHCI-Mäusen kam, liegt es nahe, dass zur Toleranzinduktion ausschließlich DC verantwortlich sind, wie es zur Zeit von den meisten Gruppen auf diesem Gebiet vermutet wird (Steinman *et al.* 2003). Unter inflammatorischen Bedingungen konnte zwar auch eine ausreichende Induktion Antigen spezifischer CTL nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich hier auch, dass auch andere MHC-I⁺-Zellen bei der CD8-T-Zell-Immunität zur Feinregulation der Immunantwort eine Rolle spielen.

5 AUSBLICK

In der hier vorgestellten Arbeit konnte in einem *in vivo*-Modell ohne direkte Manipulation von DC, deren Bedeutung für die Selektion von CD8-T-Zellen sowie für die Induktion von CD8-T-Zell-Immunität und Toleranz nachgewiesen werden.

Weiterführende Studien innerhalb des CD11c-MHCI-Systems zur Bedeutung von DC in Bezug auf Selektion und Toleranzinduktion könnten grundlegende Erkenntnisse in der Transplantationsmedizin oder bei der Behandlung von Autoimmunkrankheiten wie z.B. *Diabetes mellitus* liefern. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass, wie von Zinkernagel und Althage postuliert, eine MHC inkompatible oder gar xenogene Thymustransplantation in Thymus-defiziente Patienten keinesfalls zur Generierung von funktionellen T-Zellen mit MHC-Restriktion des Empfängers führen kann (Zinkernagel *et al.* 1999). Im Falle der Autoimmunkrankheiten kann die Rolle von DC bei der Expression peripherer Autoantigene im Thymus bzw. die DC-Funktion in der Peripherie bei der Aufrechterhaltung peripherer Toleranz gegenüber autoreaktiven T-Zellen untersucht werden.

Die hier erhaltenen Daten über das Potenzial von DC zur CD8-T-Zellstimulation *in vivo* tragen darüber hinaus auch zur Diskussion über den Einsatz von DC als Vektoren in der Immuntherapie bei. Da die Impfung als größte Errungenschaft der Immuntherapie angesehen wird, erhofft man sich durch den Einsatz von DC auch eine mögliche Therapie gegen Tumore. DC werden bereits in klinischen Versuchsreihen am Menschen zur Induktion von Tumormunität eingesetzt. Durch das Beladen von DC *ex vivo* mit Tumorlysaten - spezifische Tumormarker wurden immer noch nicht identifiziert - erhofft man sich nach Reinfusion, die Induktion einer spezifischen Tumormunität (Banchereau *et al.* 2001). Die Ergebnisse dieser klinischen Vakzinierungsversuche sind bisher leider wenig erfolgreich. Die vereinzelt Fälle, in denen eine tumorspezifische CTL-Generierung nachgewiesen wurde, führten nicht zur vollständigen Eliminierung des Tumors. In den meisten Fällen konnte eine Anergisierung von T-Zellen und in einigen Fällen Autoimmunität beobachtet werden, da durch die Beladung der „künstlich gereiften“ DC mit Tumorlysaten auch Autoantigene über die DC präsentiert wurden (Ludewig *et al.* 2000; Gilboa 2001). Die hier erhaltenen Ergebnisse verdeutlichen, dass DC generell ausreichend sind, um eine funktionale CTL-Antwort zu generieren. Es wird aber auch deutlich, dass die Qualität der durch DC hervorgerufenen Immunantwort von einer Vielzahl von Einflüssen abhängt. In diesem Zusammenhang muss zur Effektivitätssteigerung der DC-Immuntherapie genau bekannt sein, unter welchen Bedingungen die DC eine optimale immunstimulatorische Wirkung entfaltet. Im vorliegenden System könnte dies durch eine genaue *in vivo*-Analyse der bei der Induktion von Immunität beteiligten Subtypen erfolgen. Auch könnte durch Vakzinierungsversuche mit

antigenbeladenen DC untersucht werden, ob bei den jeweils resultierenden Immunreaktionen maßgeblich die transferierten DC oder endogene DC beteiligt sind. Durch das CD11c-MHCI-Maßsystem wäre weiterhin festzustellen, welche Bedeutung endogene DC überhaupt bei Vakzinierungsversuchen mit antigenbeladenen DC haben.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Abele, R. and R. Tampe (2004). "The ABCs of immunology: structure and function of TAP, the transporter associated with antigen processing." *Physiology (Bethesda)* **19**: 216-24.
- Ackerman, A. L., C. Kyritsis, R. Tampe and P. Cresswell (2003). "Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(22): 12889-94.
- Akbari, O., N. Panjwani, S. Garcia, R. Tascon, D. Lowrie and B. Stockinger (1999). "DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity." *J Exp Med* **189**(1): 169-78.
- Albert, M. L., B. Sauter and N. Bhardwaj (1998). "Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs." *Nature* **392**(6671): 86-9.
- Allenspach, E. J., P. Cullinan, J. Tong, Q. Tang, A. G. Tesciuba, J. L. Cannon, *et al.* (2001). "ERM-dependent movement of CD43 defines a novel protein complex distal to the immunological synapse." *Immunity* **15**(5): 739-50.
- Anderson, G., N. C. Moore, J. J. Owen and E. J. Jenkinson (1996). "Cellular interactions in thymocyte development." *Annu Rev Immunol* **14**: 73-99.
- Anderson, G., J. J. Owen, N. C. Moore and E. J. Jenkinson (1994). "Thymic epithelial cells provide unique signals for positive selection of CD4+CD8+ thymocytes in vitro." *J Exp Med* **179**(6): 2027-31.
- Anderson, M. S., E. S. Venanzi, L. Klein, Z. Chen, S. P. Berzins, S. J. Turley, *et al.* (2002). "Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein." *Science* **298**(5597): 1395-401.
- Annacker, O., R. Pimenta-Araujo, O. Burlen-Defranoux and A. Bandeira (2001). "On the ontogeny and physiology of regulatory T cells." *Immunol Rev* **182**: 5-17.
- Arnold-Schild, D., D. Hanau, D. Spehner, C. Schmid, H. G. Rammensee, H. de la Salle, *et al.* (1999). "Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells." *J Immunol* **162**(7): 3757-60.
- Ashton-Rickardt, P. G., A. Bandeira, J. R. Delaney, L. Van Kaer, H. P. Pircher, R. M. Zinkernagel, *et al.* (1994a). "Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus." *Cell* **76**(4): 651-63.
- Ashton-Rickardt, P. G. and S. Tonegawa (1994b). "A differential-avidity model for T-cell selection." *Immunol Today* **15**(8): 362-6.
- Asselin-Paturel, C., A. Boonstra, M. Dalod, I. Durand, N. Yessaad, C. Dezutter-Dambuyant, *et al.* (2001). "Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology." *Nat Immunol* **2**(12): 1144-50.
- Baekkevold, E. S., T. Yamanaka, R. T. Palframan, H. S. Carlsen, F. P. Reinholt, U. H. von Andrian, *et al.* (2001). "The CCR7 ligand elc (CCL19) is transcytosed in high endothelial venules and mediates T cell recruitment." *J Exp Med* **193**(9): 1105-12.
- Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, *et al.* (2000). "Immunobiology of dendritic cells." *Annu Rev Immunol* **18**: 767-811.
- Banchereau, J., B. Schuler-Thurner, A. K. Palucka and G. Schuler (2001). "Dendritic cells as vectors for therapy." *Cell* **106**(3): 271-4.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." *Nature* **392**(6673): 245-52.
- Barclay, A. N. and G. Mayrhofer (1981). "Bone marrow origin of Ia-positive cells in the medulla rat thymus." *J Exp Med* **153**(6): 1666-71.
- Basta, S., W. Chen, J. R. Bennink and J. W. Yewdell (2002). "Inhibitory effects of cytomegalovirus proteins US2 and US11 point to contributions from direct priming and cross-priming in induction of vaccinia virus-specific CD8(+) T cells." *J Immunol* **168**(11): 5403-8.
- Basu, S., R. J. Binder, T. Ramalingam and P. K. Srivastava (2001). "CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin." *Immunity* **14**(3): 303-13.

- Bazil, V., J. Brandt, A. Tsukamoto and R. Hoffman (1995). "Apoptosis of human hematopoietic progenitor cells induced by crosslinking of surface CD43, the major sialoglycoprotein of leukocytes." *Blood* **86**(2): 502-11.
- Bell, E. B., S. M. Sparshott, M. T. Drayson and W. L. Ford (1987). "The stable and permanent expansion of functional T lymphocytes in athymic nude rats after a single injection of mature T cells." *J Immunol* **139**(5): 1379-84.
- Bellone, M., G. Iezzi, P. Rovere, G. Galati, A. Ronchetti, M. P. Protti, *et al.* (1997). "Processing of engulfed apoptotic bodies yields T cell epitopes." *J Immunol* **159**(11): 5391-9.
- Belz, G. T., G. M. Behrens, C. M. Smith, J. F. Miller, C. Jones, K. Lejon, *et al.* (2002). "The CD8alpha(+) dendritic cell is responsible for inducing peripheral self-tolerance to tissue-associated antigens." *J Exp Med* **196**(8): 1099-104.
- Belz, G. T., C. M. Smith, D. Eichner, K. Shortman, G. Karupiah, F. R. Carbone, *et al.* (2004). "Cutting edge: conventional CD8alpha(+) dendritic cells are generally involved in priming CTL immunity to viruses." *J Immunol* **172**(4): 1996-2000.
- Bender, A., M. Sapp, G. Schuler, R. M. Steinman and N. Bhardwaj (1996). "Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood." *J Immunol Methods* **196**(2): 121-35.
- Bevan, M. J. (1976). "Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay." *J Exp Med* **143**(5): 1283-8.
- Bix, M., M. Coles and D. Raulet (1993). "Positive selection of V beta 8+ CD4-8- thymocytes by class I molecules expressed by hematopoietic cells." *J Exp Med* **178**(3): 901-8.
- Bix, M., N. S. Liao, M. Zijlstra, J. Loring, R. Jaenisch and D. Raulet (1991). "Rejection of class I MHC-deficient haemopoietic cells by irradiated MHC-matched mice." *Nature* **349**(6307): 329-31.
- Bix, M. and D. Raulet (1992). "Inefficient positive selection of T cells directed by haematopoietic cells." *Nature* **359**(6393): 330-3.
- Bjorck, P. (2001). "Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-treated mice." *Blood* **98**(13): 3520-6.
- Bjorses, P., M. Halonen, J. J. Palvimo, M. Kolmer, J. Aaltonen, P. Ellonen, *et al.* (2000). "Mutations in the AIRE gene: effects on subcellular location and transactivation function of the autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy protein." *Am J Hum Genet* **66**(2): 378-92.
- Bonifaz, L., D. Bonnyay, K. Mahnke, M. Rivera, M. C. Nussenzweig and R. M. Steinman (2002). "Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance." *J Exp Med* **196**(12): 1627-38.
- Bonomo, A. and P. Matzinger (1993). "Thymus epithelium induces tissue-specific tolerance." *J Exp Med* **177**(4): 1153-64.
- Boyd, R. L. and P. Hugo (1991). "Towards an integrated view of thymopoiesis." *Immunol Today* **12**(2): 71-9.
- Brocker, T. (1997). "Survival of mature CD4-T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells." *J Exp Med* **186**(8): 1223-32.
- Brocker, T., M. Riedinger and K. Karjalainen (1997a). "Driving gene expression specifically in dendritic cells." *Adv Exp Med Biol* **417**: 55-7.
- Brocker, T., M. Riedinger and K. Karjalainen (1997b). "Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo." *J Exp Med* **185**(3): 541-50.
- Bronte, V., M. W. Carroll, T. J. Goletz, M. Wang, W. W. Overwijk, F. Marincola, *et al.* (1997). "Antigen expression by dendritic cells correlates with the therapeutic effectiveness of a model recombinant poxvirus tumor vaccine." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(7): 3183-8.
- Brzoza, K. L., A. B. Rockel and E. M. Hiltbold (2004). "Cytoplasmic entry of *Listeria monocytogenes* enhances dendritic cell maturation and T cell differentiation and function." *J Immunol* **173**(4): 2641-51.
- Cannarile, M. A., N. Decanis, J. P. van Meerwijk and T. Brocker (2004). "The role of dendritic cells in selection of classical and nonclassical CD8+ T cells in vivo." *J Immunol* **173**(8): 4799-805.

- Capone, M., P. Romagnoli, F. Beermann, H. R. MacDonald and J. P. van Meerwijk (2001). "Dissociation of thymic positive and negative selection in transgenic mice expressing major histocompatibility complex class I molecules exclusively on thymic cortical epithelial cells." Blood **97**(5): 1336-42.
- Castellino, F., P. E. Boucher, K. Eichelberg, M. Mayhew, J. E. Rothman, A. N. Houghton, *et al.* (2000). "Receptor-mediated uptake of antigen/heat shock protein complexes results in major histocompatibility complex class I antigen presentation via two distinct processing pathways." J Exp Med **191**(11): 1957-64.
- Caux, C., C. Massacrier, B. Vanbervliet, B. Dubois, C. Van Kooten, I. Durand, *et al.* (1994). "Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking." J Exp Med **180**(4): 1263-72.
- Cermak, L., S. Simova, A. Pintzas, V. Horejsi and L. Andera (2002). "Molecular mechanisms involved in CD43-mediated apoptosis of TF-1 cells. Roles of transcription Daxx expression, and adhesion molecules." J Biol Chem **277**(10): 7955-61.
- Chien, A., D. B. Edgar and J. M. Trela (1976). "Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*." J Bacteriol **127**(3): 1550-7.
- Coles, M. C. and D. H. Raulet (2000). "NK1.1+ T cells in the liver arise in the thymus and are selected by interactions with class I molecules on CD4+CD8+ cells." J Immunol **164**(5): 2412-8.
- Coles, R. M., S. N. Mueller, W. R. Heath, F. R. Carbone and A. G. Brooks (2002). "Progression of armed CTL from draining lymph node to spleen shortly after localized infection with herpes simplex virus 1." J Immunol **168**(2): 834-8.
- Cook, J. R., E. M. Wormstall, T. Hornell, J. Russell, J. M. Connolly and T. H. Hansen (1997). "Quantitation of the cell surface level of Ld resulting in positive versus negative selection of the 2C transgenic T cell receptor in vivo." Immunity **7**(2): 233-41.
- Cresswell, P. (1996). "Invariant chain structure and MHC class II function." Cell **84**(4): 505-7.
- Cullinan, P., A. I. Sperling and J. K. Burkhardt (2002). "The distal pole complex: a novel membrane domain distal to the immunological synapse." Immunol Rev **189**: 111-22.
- Curtsinger, J. M., D. C. Lins and M. F. Mescher (2003). "Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function." J Exp Med **197**(9): 1141-51.
- Curtsinger, J. M., C. S. Schmidt, A. Mondino, D. C. Lins, R. M. Kedl, M. K. Jenkins, *et al.* (1999). "Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells." J Immunol **162**(6): 3256-62.
- Dalod, M., T. P. Salazar-Mather, L. Malmgaard, C. Lewis, C. Asselin-Paturel, F. Briere, *et al.* (2002). "Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo." J Exp Med **195**(4): 517-28.
- De Smedt, T., B. Pajak, E. Muraille, L. Lespagnard, E. Heinen, P. De Baetselier, *et al.* (1996). "Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo." J Exp Med **184**(4): 1413-24.
- Debrick, J. E., P. A. Campbell and U. D. Staerz (1991). "Macrophages as accessory cells for class I MHC-restricted immune responses." J Immunol **147**(9): 2846-51.
- Delon, J., K. Kaibuchi and R. N. Germain (2001). "Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin." Immunity **15**(5): 691-701.
- den Haan, J. M., S. M. Lehar and M. J. Bevan (2000). "CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo." J Exp Med **192**(12): 1685-96.
- Derbinski, J., A. Schulte, B. Kyewski and L. Klein (2001). "Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self." Nat Immunol **2**(11): 1032-9.
- Diebold, S. S., M. Montoya, H. Unger, L. Alexopoulou, P. Roy, L. E. Haswell, *et al.* (2003). "Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers." Nature **424**(6946): 324-8.
- Dummer, W., B. Ernst, E. LeRoy, D. Lee and C. Surh (2001). "Autologous regulation of naive T cell homeostasis within the T cell compartment." J Immunol **166**(4): 2460-8.
- Ellis, J., B. M. Chain, D. H. Davies, M. A. Ibrahim, D. R. Katz, P. M. Kaye, *et al.* (1991). "Antigen presentation by dendritic cells provides optimal stimulation for the production of interleukin (IL) 2, IL 4 and interferon-gamma by allogeneic T cells." Eur J Immunol **21**(11): 2803-9.

- Ernst, B., D. S. Lee, J. M. Chang, J. Sprent and C. D. Surh (1999). "The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery." *Immunity* **11**(2): 173-81.
- Esposito-Farese, M. E., C. Sautes, H. de la Salle, S. Latour, T. Bieber, C. de la Salle, *et al.* (1995). "Membrane and soluble Fc gamma RII/III modulate the antigen-presenting capacity of murine dendritic epidermal Langerhans cells for IgG-complexed antigens." *J Immunol* **155**(4): 1725-36.
- Fairchild, P. J. and J. M. Austyn (1990). "Thymic dendritic cells: phenotype and function." *Int Rev Immunol* **6**(2-3): 187-96.
- Fanger, N. A., K. Wardwell, L. Shen, T. F. Tedder and P. M. Guyre (1996). "Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells." *J Immunol* **157**(2): 541-8.
- Fernandez, N. C., A. Lozier, C. Flament, P. Ricciardi-Castagnoli, D. Bellet, M. Suter, *et al.* (1999). "Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo." *Nat Med* **5**(4): 405-11.
- Filippi, C., S. Hugues, J. Cazareth, V. Julia, N. Glaichenhaus and S. Ugolini (2003). "CD4+ T cell polarization in mice is modulated by strain-specific major histocompatibility complex-independent differences within dendritic cells." *J Exp Med* **198**(2): 201-9.
- Fink, P. J. and M. J. Bevan (1995). "Positive selection of thymocytes." *Adv Immunol* **59**: 99-133.
- Ford, M. L., T. M. Onami, A. I. Sperling, R. Ahmed and B. D. Evavold (2003). "CD43 modulates severity and onset of experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Immunol* **171**(12): 6527-33.
- Freudenberg, M. A., U. Meier-Dieter, T. Staehelin and C. Galanos (1991). "Analysis of LPS released from *Salmonella abortus equi* in human serum." *Microb Pathog* **10**(2): 93-104.
- Fujii, S., K. Shimizu, M. Kronenberg and R. M. Steinman (2002). "Prolonged IFN-gamma-producing NKT response induced with alpha-galactosylceramide-loaded DCs." *Nat Immunol* **3**(9): 867-74.
- Fukui, Y., T. Ishimoto, M. Utsuyama, T. Gytoku, T. Koga, K. Nakao, *et al.* (1997). "Positive and negative CD4+ thymocyte selection by a single MHC class II/peptide ligand affected by its expression level in the thymus." *Immunity* **6**(4): 401-10.
- Gallucci, S., M. Lolkema and P. Matzinger (1999). "Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells." *Nat Med* **5**(11): 1249-55.
- Geijtenbeek, T. B., D. S. Kwon, R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, J. Middel, *et al.* (2000). "DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells." *Cell* **100**(5): 587-97.
- Geissmann, F., P. Launay, B. Pasquier, Y. Lepelletier, M. Leborgne, A. Lehen, *et al.* (2001). "A subset of human dendritic cells expresses IgA Fc receptor (CD89), which mediates internalization and activation upon cross-linking by IgA complexes." *J Immunol* **166**(1): 346-52.
- Gilboa, E. (2001). "The risk of autoimmunity associated with tumor immunotherapy." *Nat Immunol* **2**(9): 789-92.
- Glas, R., C. Ohlen, P. Hoglund and K. Karre (1994). "The CD8+ T cell repertoire in beta 2-microglobulin-deficient mice is biased towards reactivity against self-major histocompatibility class I." *J Exp Med* **179**(2): 661-72.
- Guermonprez, P., L. Saveanu, M. Kleijmeer, J. Davoust, P. Van Endert and S. Amigorena (2003). "ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells." *Nature* **425**(6956): 397-402.
- Hartgers, F. C., C. G. Figdor and G. J. Adema (2000). "Towards a molecular understanding of dendritic cell immunobiology." *Immunol Today* **21**(11): 542-5.
- Hawiger, D., K. Inaba, Y. Dorsett, M. Guo, K. Mahnke, M. Rivera, *et al.* (2001). "Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo." *J Exp Med* **194**(6): 769-79.
- Heath, W. R., G. T. Belz, G. M. Behrens, C. M. Smith, S. P. Forehan, I. A. Parish, *et al.* (2004). "Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens." *Immunol Rev* **199**: 9-26.

- Heit, A., K. M. Huster, F. Schmitz, M. Schiemann, D. H. Busch and H. Wagner (2004). "CpG-DNA aided cross-priming by cross-presenting B cells." *J Immunol* **172**(3): 1501-7.
- Hendil, K. B. and R. Hartmann-Petersen (2004). "Proteasomes: a complex story." *Curr Protein Pept Sci* **5**(3): 135-51.
- Henri, S., D. Vremec, A. Kamath, J. Waithman, S. Williams, C. Benoist, *et al.* (2001). "The dendritic cell populations of mouse lymph nodes." *J Immunol* **167**(2): 741-8.
- Hernandez, J., S. Aung, K. Marquardt and L. A. Sherman (2002). "Uncoupling of proliferative potential and gain of effector function by CD8(+) T cells responding to self-antigens." *J Exp Med* **196**(3): 323-33.
- Hochrein, H., K. Shortman, D. Vremec, B. Scott, P. Hertzog and M. O'Keeffe (2001). "Differential production of IL-12, IFN-alpha, and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets." *J Immunol* **166**(9): 5448-55.
- Hoffmann, M. W., J. Allison and J. F. Miller (1992). "Tolerance induction by thymic medullary epithelium." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(7): 2526-30.
- Hoglund, P., C. Ohlen, E. Carbone, L. Franksson, H. G. Ljunggren, A. Latour, *et al.* (1991). "Recognition of beta 2-microglobulin-negative (beta 2m-) T-cell blasts by natural killer cells from normal but not from beta 2m- mice: nonresponsiveness controlled by beta 2m- bone marrow in chimeric mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(22): 10332-6.
- Hogquist, K. A., S. C. Jameson, W. R. Heath, J. L. Howard, M. J. Bevan and F. R. Carbone (1994). "T cell receptor antagonist peptides induce positive selection." *Cell* **76**(1): 17-27.
- Houde, M., S. Bertholet, E. Gagnon, S. Brunet, G. Goyette, A. Laplante, *et al.* (2003). "Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation." *Nature* **425**(6956): 402-6.
- Hugo, P., J. W. Kappler, D. I. Godfrey and P. C. Marrack (1992). "A cell line that can induce thymocyte positive selection." *Nature* **360**(6405): 679-82.
- Huleatt, J. W. and L. Lefrancois (1995). "Antigen-driven induction of CD11c on intestinal intraepithelial lymphocytes and CD8+ T cells in vivo." *J Immunol* **154**(11): 5684-93.
- Inaba, K., M. Inaba, M. Naito and R. M. Steinman (1993). "Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo." *J Exp Med* **178**(2): 479-88.
- Inaba, K., J. P. Metlay, M. T. Crowley and R. M. Steinman (1990). "Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ." *J Exp Med* **172**(2): 631-40.
- Inaba, K. and R. M. Steinman (1985). "Protein-specific helper T-lymphocyte formation initiated by dendritic cells." *Science* **229**(4712): 475-9.
- Inaba, K., M. Witmer-Pack, M. Inaba, K. S. Hathcock, H. Sakuta, M. Azuma, *et al.* (1994). "The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro." *J Exp Med* **180**(5): 1849-60.
- Itano, A. A., S. J. McSorley, R. L. Reinhardt, B. D. Ehst, E. Ingulli, A. Y. Rudensky, *et al.* (2003). "Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4-T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity." *Immunity* **19**(1): 47-57.
- Jarosch, E., R. Geiss-Friedlander, B. Meusser, J. Walter and T. Sommer (2002). "Protein dislocation from the endoplasmic reticulum--pulling out the suspect." *Traffic* **3**(8): 530-6.
- Jiang, W., W. J. Swiggard, C. Heufler, M. Peng, A. Mirza, R. M. Steinman, *et al.* (1995). "The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing." *Nature* **375**(6527): 151-5.
- Johansson, M. H., C. Bieberich, G. Jay, K. Karre and P. Hoglund (1997). "Natural killer cell tolerance in mice with mosaic expression of major histocompatibility complex class I transgene." *J Exp Med* **186**(3): 353-64.
- Johnson, A. E. and M. A. van Waes (1999). "The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane." *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**: 799-842.
- Jones, L. A., L. T. Chin, D. L. Longo and A. M. Kruisbeek (1990). "Peripheral clonal elimination of functional T cells." *Science* **250**(4988): 1726-9.
- Jung, S., D. Unutmaz, P. Wong, G. Sano, K. De los Santos, T. Sparwasser, *et al.* (2002). "In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens." *Immunity* **17**(2): 211-20.

- Kadowaki, N., S. Ho, S. Antonenko, R. W. Malefyt, R. A. Kastelein, F. Bazan, *et al.* (2001). "Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens." *J Exp Med* **194**(6): 863-9.
- Ke, Y. and J. A. Kapp (1996). "Exogenous antigens gain access to the major histocompatibility complex class I processing pathway in B cells by receptor-mediated uptake." *J Exp Med* **184**(3): 1179-84.
- Kearney, E. R., K. A. Pape, D. Y. Loh and M. K. Jenkins (1994). "Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo." *Immunity* **1**(4): 327-39.
- Kishimoto, H. and J. Sprent (2000). "The thymus and negative selection." *Immunol Res* **21**(2-3): 315-23.
- Klein, L., B. Roettinger and B. Kyewski (2001). "Sampling of complementing self-antigen pools by thymic stromal cells maximizes the scope of central T cell tolerance." *Eur J Immunol* **31**(8): 2476-86.
- Kleindienst, P., I. Chretien, T. Winkler and T. Brocker (2000). "Functional comparison of thymic B cells and dendritic cells in vivo." *Blood* **95**(8): 2610-6.
- Koller, B. H. and O. Smithies (1989). "Inactivating the beta 2-microglobulin locus in mouse embryonic stem cells by homologous recombination." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(22): 8932-5.
- Kovacsovics-Bankowski, M., K. Clark, B. Benacerraf and K. L. Rock (1993). "Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(11): 4942-6.
- Kropshofer, H., G. J. Hammerling and A. B. Vogt (1999). "The impact of the non-classical MHC proteins HLA-DM and HLA-DO on loading of MHC class II molecules." *Immunol Rev* **172**: 267-78.
- Kumar, P. G., M. Laloraya, C. Y. Wang, Q. G. Ruan, A. Davoodi-Semiromi, K. J. Kao, *et al.* (2001). "The autoimmune regulator (AIRE) is a DNA-binding protein." *J Biol Chem* **276**(44): 41357-64.
- Kurts, C., M. Cannarile, I. Klebba and T. Brocker (2001). "Dendritic cells are sufficient to cross-present self-antigens to CD8 T cells in vivo." *J Immunol* **166**(3): 1439-42.
- Kurts, C., H. Kosaka, F. R. Carbone, J. F. Miller and W. R. Heath (1997). "Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells." *J Exp Med* **186**(2): 239-45.
- Lanoue, A., C. Bona, H. von Boehmer and A. Sarukhan (1997). "Conditions that induce tolerance in mature CD4+ T cells." *J Exp Med* **185**(3): 405-14.
- Laufer, T. M., J. DeKoning, J. S. Markowitz, D. Lo and L. H. Glimcher (1996). "Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex." *Nature* **383**(6595): 81-5.
- Lauterbach, H., K. M. Kerksiek, D. H. Busch, E. Berto, A. Bozac, P. Mavromara, *et al.* (2004). "Protection from bacterial infection by a single vaccination with replication-deficient mutant herpes simplex virus type 1." *J Virol* **78**(8): 4020-8.
- Le Bon, A., N. Etchart, C. Rossmann, M. Ashton, S. Hou, D. Gewert, *et al.* (2003). "Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon." *Nat Immunol* **4**(10): 1009-15.
- Lee, Y. K., N. D. Bone, A. K. Strege, T. D. Shanafelt, D. F. Jelinek and N. E. Kay (2004). "VEGF receptor phosphorylation status and apoptosis is modulated by a green tea component, epigallocatechin-3-gallate (EGCG), in B-cell chronic lymphocytic leukemia." *Blood* **104**(3): 788-94.
- Lenz, L. L., B. Dere and M. J. Bevan (1996). "Identification of an H2-M3-restricted Listeria epitope: implications for antigen presentation by M3." *Immunity* **5**(1): 63-72.
- Levin, D., S. Constant, T. Pasqualini, R. Flavell and K. Bottomly (1993). "Role of dendritic cells in the priming of CD4+ T lymphocytes to peptide antigen in vivo." *J Immunol* **151**(12): 6742-50.
- Liao, N. S., M. Bix, M. Zijlstra, R. Jaenisch and D. Raulet (1991). "MHC class I deficiency: susceptibility to natural killer (NK) cells and impaired NK activity." *Science* **253**(5016): 199-202.
- Liblau, R., E. Tournier-Lasserre, J. Maciazek, G. Dumas, O. Siffert, G. Hashim, *et al.* (1991). "T cell response to myelin basic protein epitopes in multiple sclerosis patients and healthy subjects." *Eur J Immunol* **21**(6): 1391-5.

- Lim, S. K. (2003). "Freund adjuvant induces TLR2 but not TLR4 expression in the liver of mice." Int Immunopharmacol **3**(1): 115-8.
- Lindahl, K. F., D. E. Byers, V. M. Dabhi, R. Hovik, E. P. Jones, G. P. Smith, *et al.* (1997). "H2-M3, a full-service class Ib histocompatibility antigen." Annu Rev Immunol **15**: 851-79.
- Liu, S., D. J. Gallo, A. M. Green, D. L. Williams, X. Gong, R. A. Shapiro, *et al.* (2002). "Role of toll-like receptors in changes in gene expression and NF-kappa B activation in mouse hepatocytes stimulated with lipopolysaccharide." Infect Immun **70**(7): 3433-42.
- Longo, D. L., A. M. Kruisbeek, M. L. Davis and L. A. Matis (1985). "Bone marrow-derived thymic antigen-presenting cells determine self-recognition of Ia-restricted T lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(17): 5900-4.
- Longo, D. L. and R. H. Schwartz (1980). "T-cell specificity for H-2 and Ir gene phenotype correlates with the phenotype of thymic antigen-presenting cells." Nature **287**(5777): 44-6.
- Ludewig, B., A. F. Ochsenbein, B. Odermatt, D. Paulin, H. Hengartner and R. M. Zinkernagel (2000). "Immunotherapy with dendritic cells directed against tumor antigens shared with normal host cells results in severe autoimmune disease." J Exp Med **191**(5): 795-804.
- MacAry, P. A., B. Javid, R. A. Floto, K. G. Smith, W. Oehlmann, M. Singh, *et al.* (2004). "HSP70 peptide binding mutants separate antigen delivery from dendritic cell stimulation." Immunity **20**(1): 95-106.
- Mackay, C. R. (1993). "Homing of naive, memory and effector lymphocytes." Curr Opin Immunol **5**(3): 423-7.
- Maldonado-Lopez, R., T. De Smedt, P. Michel, J. Godfroid, B. Pajak, C. Heirman, *et al.* (1999). "CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo." J Exp Med **189**(3): 587-92.
- Mamalaki, C., M. Murdjeva, M. Tolaini, T. Norton, P. Chandler, A. Townsend, *et al.* (1996). "Tolerance in TCR/cognate antigen double-transgenic mice mediated by incomplete thymic deletion and peripheral receptor downregulation." Dev Immunol **4**(4): 299-315.
- Manjunath, N., M. Correa, M. Ardman and B. Ardman (1995). "Negative regulation of T-cell adhesion and activation by CD43." Nature **377**(6549): 535-8.
- Maraskovsky, E., K. Brasel, M. Teepe, E. R. Roux, S. D. Lyman, K. Shortman, *et al.* (1996). "Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified." J Exp Med **184**(5): 1953-62.
- Marie, J. C., J. Kehren, M. C. Trescol-Biemont, A. Evlashev, H. Valentin, T. Walzer, *et al.* (2001). "Mechanism of measles virus-induced suppression of inflammatory immune responses." Immunity **14**(1): 69-79.
- Maroto, R., X. Shen and R. Konig (1999). "Requirement for efficient interactions between CD4-and MHC class II molecules for survival of resting CD4+ T lymphocytes in vivo and for activation-induced cell death." J Immunol **162**(10): 5973-80.
- Martinic, M. M., T. Rulicke, A. Althage, B. Odermatt, M. Hochli, A. Lamarre, *et al.* (2003). "Efficient T cell repertoire selection in tetraparental chimeric mice independent of thymic epithelial MHC." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(4): 1861-6.
- Matlack, K. E., W. Mothes and T. A. Rapoport (1998). "Protein translocation: tunnel vision." Cell **92**(3): 381-90.
- Matzinger, P. (1993). "Why positive selection?" Immunol Rev **135**: 81-117.
- Matzinger, P. (1994). "Tolerance, danger, and the extended family." Annu Rev Immunol **12**: 991-1045.
- Maurice, M. M., D. S. Gould, J. Carroll, Y. Vugmeyster and H. L. Ploegh (2001). "Positive selection of an MHC class-I restricted TCR in the absence of classical MHC class I molecules." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(13): 7437-42.
- Maury, S., B. Salomon, D. Klatzmann and J. L. Cohen (2001). "Division rate and phenotypic differences discriminate alloreactive and nonalloreactive T cells transferred in lethally irradiated mice." Blood **98**(10): 3156-8.
- Mayerova, D., E. A. Parke, L. S. Bursch, O. A. Odumade and K. A. Hogquist (2004). "Langerhans cells activate naive self-antigen-specific CD8 T cells in the steady state." Immunity **21**(3): 391-400.

- Means, T. K., E. Lien, A. Yoshimura, S. Wang, D. T. Golenbock and M. J. Fenton (1999). "The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors." *J Immunol* **163**(12): 6748-55.
- Miller, R. A. and O. Stutman (1984). "T cell repopulation from functionally restricted splenic progenitors: 10,000-fold expansion documented by using limiting dilution analyses." *J Immunol* **133**(6): 2925-32.
- Moll, H., H. Fuchs, C. Blank and M. Rollinghoff (1993). "Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells." *Eur J Immunol* **23**(7): 1595-601.
- Morgan, D. J., H. T. Kruwel, S. Fleck, H. I. Levitsky, D. M. Pardoll and L. A. Sherman (1998). "Activation of low avidity CTL specific for a self epitope results in tumor rejection but not autoimmunity." *J Immunol* **160**(2): 643-51.
- Moser, M. (2003). "Dendritic cells in immunity and tolerance-do they display opposite functions?" *Immunity* **19**(1): 5-8.
- Mueller, S. N., C. M. Jones, C. M. Smith, W. R. Heath and F. R. Carbone (2002). "Rapid cytotoxic T lymphocyte activation occurs in the draining lymph nodes after cutaneous herpes simplex virus infection as a result of early antigen presentation and not the presence of virus." *J Exp Med* **195**(5): 651-6.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51**(Pt 1): 263-73.
- Nakamura, K., H. Funakoshi, K. Miyamoto, F. Tokunaga and T. Nakamura (2001). "Molecular cloning and functional characterization of a human scavenger receptor with C-type lectin (SRCL), a novel member of a scavenger receptor family." *Biochem Biophys Res Commun* **280**(4): 1028-35.
- Nakano, H., M. Yanagita and M. D. Gunn (2001). "CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells." *J Exp Med* **194**(8): 1171-8.
- Nakano, N., R. Rooke, C. Benoist and D. Mathis (1997). "Positive selection of T cells induced by viral delivery of neopeptides to the thymus." *Science* **275**(5300): 678-83.
- Naquet, P., M. Naspetti and R. Boyd (1999). "Development, organization and function of the thymic medulla in normal, immunodeficient or autoimmune mice." *Semin Immunol* **11**(1): 47-55.
- Nopora, A. and T. Brocker (2002). "Bcl-2 controls dendritic cell longevity in vivo." *J Immunol* **169**(6): 3006-14.
- Norbury, C. C., S. Basta, K. B. Donohue, D. C. Tschärke, M. F. Princiotta, P. Berglund, *et al.* (2004). "CD8+ T cell cross-priming via transfer of proteasome substrates." *Science* **304**(5675): 1318-21.
- Norbury, C. C., D. Malide, J. S. Gibbs, J. R. Bennink and J. W. Yewdell (2002). "Visualizing priming of virus-specific CD8+ T cells by infected dendritic cells in vivo." *Nat Immunol* **3**(3): 265-71.
- Onami, T. M., L. E. Harrington, M. A. Williams, M. Galvan, C. P. Larsen, T. C. Pearson, *et al.* (2002). "Dynamic regulation of T cell immunity by CD43." *J Immunol* **168**(12): 6022-31.
- Ostberg, J. R., R. K. Barth and J. G. Frelinger (1998). "The Roman god Janus: a paradigm for the function of CD43." *Immunol Today* **19**(12): 546-50.
- Ozdemir, O., Y. Ravindranath and S. Savasan (2003). "Cell-mediated cytotoxicity evaluation using monoclonal antibody staining for target or effector cells with annexinV/propidium iodide colabeling by fluorosphere-adjusted counts on three-color flow cytometry." *Cytometry* **56A**(1): 53-60.
- Palmer, E. (2003). "Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire." *Nat Rev Immunol* **3**(5): 383-91.
- Pape, K. A., E. R. Kearney, A. Khoruts, A. Mondino, R. Merica, Z. M. Chen, *et al.* (1997). "Use of adoptive transfer of T-cell-antigen-receptor-transgenic T cell for the study of T-cell activation in vivo." *Immunol Rev* **156**: 67-78.
- Pawlowski, T., J. D. Elliott, D. Y. Loh and U. D. Staerz (1993). "Positive selection of T lymphocytes on fibroblasts." *Nature* **364**(6438): 642-5.
- Pierre, P., S. J. Turley, E. Gatti, M. Hull, J. Meltzer, A. Mirza, *et al.* (1997). "Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells." *Nature* **388**(6644): 787-92.

- Pietro Paolo, M., N. Giannoukakis and M. Trucco (2002). "Cellular environment and freedom of gene expression." Nat Immunol **3**(4): 335; author reply 336.
- Pitkanen, J., V. Doucas, T. Sternsdorf, T. Nakajima, S. Aratani, K. Jensen, *et al.* (2000). "The autoimmune regulator protein has transcriptional transactivating properties and interacts with the common coactivator CREB-binding protein." J Biol Chem **275**(22): 16802-9.
- Platt, N., R. P. da Silva and S. Gordon (1998). "Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells." Trends Cell Biol **8**(9): 365-72.
- Pope, C., S. K. Kim, A. Marzo, D. Masopust, K. Williams, J. Jiang, *et al.* (2001). "Organ-specific regulation of the CD8 T cell response to *Listeria monocytogenes* infection." J Immunol **166**(5): 3402-9.
- Probst, H. C., J. Lagnel, G. Kollias and M. van den Broek (2003). "Inducible transgenic mice reveal resting dendritic cells as potent inducers of CD8+ T cell tolerance." Immunity **18**(5): 713-20.
- Pugliese, A., D. Brown, D. Garza, D. Murchison, M. Zeller, M. Redondo, *et al.* (2001). "Self-antigen-presenting cells expressing diabetes-associated autoantigens exist in both thymus and peripheral lymphoid organs." J Clin Invest **107**(5): 555-64.
- Pugliese, A. and J. Diez (2002). "Lymphoid organs contain diverse cells expressing self-molecules." Nat Immunol **3**(4): 335-6; author reply 336.
- Pulendran, B., J. L. Smith, G. Caspary, K. Brasel, D. Pettit, E. Maraskovsky, *et al.* (1999). "Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(3): 1036-41.
- Pyszniak, A. M., C. A. Welder and F. Takei (1994). "Cell surface distribution of high-avidity LFA-1 detected by soluble ICAM-1-coated microspheres." J Immunol **152**(11): 5241-9.
- Ramsey, C., O. Winqvist, L. Puhakka, M. Halonen, A. Moro, O. Kampe, *et al.* (2002). "Aire deficient mice develop multiple features of APECED phenotype and show altered immune response." Hum Mol Genet **11**(4): 397-409.
- Reeves, J. P. R., P. A. (2001). Care and Handling of Laboratory Animals. Current Protocols in Immunology. J. E. K. Coligan, A. M.; Margulies, D. H.; Shevach, E. M., Strober, W. Edison, John Wiley & Sons, Inc. **1**.
- Reis e Sousa, C., S. Hieny, T. Scharon-Kersten, D. Jankovic, H. Charest, R. N. Germain, *et al.* (1997). "In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas." J Exp Med **186**(11): 1819-29.
- Reis e Sousa, C., P. D. Stahl and J. M. Austyn (1993). "Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro." J Exp Med **178**(2): 509-19.
- Rescigno, M. (2002). "Dendritic cells and the complexity of microbial infection." Trends Microbiol **10**(9): 425-61.
- Rescigno, M. and P. Borrow (2001). "The host-pathogen interaction: new themes from dendritic cell biology." Cell **106**(3): 267-70.
- Rocha, B., N. Dautigny and P. Pereira (1989). "Peripheral T lymphocytes: expansion potential and homeostatic regulation of pool sizes and CD4/CD8 ratios in vivo." Eur J Immunol **19**(5): 905-11.
- Rocha, B. and H. von Boehmer (1991). "Peripheral selection of the T cell repertoire." Science **251**(4998): 1225-8.
- Rocha, B. B. (1987). "Population kinetics of precursors of IL 2-producing peripheral T lymphocytes: evidence for short life expectancy, continuous renewal, and post-thymic expansion." J Immunol **139**(2): 365-72.
- Romani, N., S. Holzmann, C. H. Tripp, F. Koch and P. Stoitzner (2003). "Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis." Apmis **111**(7-8): 725-40.
- Romani, N., D. Reider, M. Heuer, S. Ebner, E. Kampgen, B. Eibl, *et al.* (1996). "Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability." J Immunol Methods **196**(2): 137-51.
- Romisch, K. (1999). "Surfing the Sec61 channel: bidirectional protein translocation across the ER membrane." J Cell Sci **112** (Pt 23): 4185-91.
- Ronchetti, A., P. Rovere, G. Iezzi, G. Galati, S. Heltai, M. P. Protti, *et al.* (1999). "Immunogenicity of apoptotic cells in vivo: role of antigen load, antigen-presenting cells, and cytokines." J Immunol **163**(1): 130-6.

- Rotzschke, O., K. Falk, S. Stevanovic, G. Jung, P. Walden and H. G. Rammensee (1991). "Exact prediction of a natural T cell epitope." Eur J Immunol **21**(11): 2891-4.
- Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli and A. Lanzavecchia (1995). "Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products." J Exp Med **182**(2): 389-400.
- Sallusto, F. and A. Lanzavecchia (1994). "Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha." J Exp Med **179**(4): 1109-18.
- Sallusto, F., A. Lanzavecchia and C. R. Mackay (1998). "Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses." Immunol Today **19**(12): 568-74.
- Sambrook, J. F., E.F. und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sandberg, J. K., L. Franksson, J. Sundback, J. Michaelsson, M. Petersson, A. Achour, *et al.* (2000). "T cell tolerance based on avidity thresholds rather than complete deletion allows maintenance of maximal repertoire diversity." J Immunol **165**(1): 25-33.
- Scheinecker, C., R. McHugh, E. M. Shevach and R. N. Germain (2002). "Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node." J Exp Med **196**(8): 1079-90.
- Schild, H., O. Rotzschke, H. Kalbacher and H. G. Rammensee (1990). "Limit of T cell tolerance to self proteins by peptide presentation." Science **247**(4950): 1587-9.
- Schmidt, C. S. and M. F. Mescher (1999). "Adjuvant effect of IL-12: conversion of peptide antigen administration from tolerizing to immunizing for CD8+ T cells in vivo." J Immunol **163**(5): 2561-7.
- Schmidt, C. S. and M. F. Mescher (2002). "Peptide antigen priming of naive, but not memory, CD8 T cells requires a third signal that can be provided by IL-12." J Immunol **168**(11): 5521-9.
- Schoenberger, S. P., R. E. Toes, E. I. van der Voort, R. Offringa and C. J. Melief (1998a). "T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions." Nature **393**(6684): 480-3.
- Schoenberger, S. P., E. I. van der Voort, G. M. Krietemeijer, R. Offringa, C. J. Melief and R. E. Toes (1998b). "Cross-priming of CTL responses in vivo does not require antigenic peptides in the endoplasmic reticulum of immunizing cells." J Immunol **161**(8): 3808-12.
- Schonrich, G., G. Strauss, K. P. Muller, L. Dustin, D. Y. Loh, N. Auphan, *et al.* (1993). "Distinct requirements of positive and negative selection for selecting cell type and CD8 interaction." J Immunol **151**(8): 4098-105.
- Sebzda, E., S. Mariathasan, T. Ohteki, R. Jones, M. F. Bachmann and P. S. Ohashi (1999). "Selection of the T cell repertoire." Annu Rev Immunol **17**: 829-74.
- Sebzda, E., V. A. Wallace, J. Mayer, R. S. Yeung, T. W. Mak and P. S. Ohashi (1994). "Positive and negative thymocyte selection induced by different concentrations of a single peptide." Science **263**(5153): 1615-8.
- Shawar, S. M., J. M. Vyas, J. R. Rodgers and R. R. Rich (1994). "Antigen presentation by major histocompatibility complex class I-B molecules." Annu Rev Immunol **12**: 839-80.
- Shen, X., S. B. Wong, C. B. Buck, J. Zhang and R. F. Siliciano (2002). "Direct priming and cross-priming contribute differentially to the induction of CD8+ CTL following exposure to vaccinia virus via different routes." J Immunol **169**(8): 4222-9.
- Shizuru, J. A., I. L. Weissman, R. Kernoff, M. Masek and Y. C. Scheffold (2000). "Purified hematopoietic stem cell grafts induce tolerance to alloantigens and can mediate positive and negative T cell selection." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(17): 9555-60.
- Sigal, L. J., S. Crotty, R. Andino and K. L. Rock (1999). "Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen." Nature **398**(6722): 77-80.
- Sigal, L. J. and K. L. Rock (2000). "Bone marrow-derived antigen-presenting cells are required for the generation of cytotoxic T lymphocyte responses to viruses and use transporter associated with antigen presentation (TAP)-dependent and -independent pathways of antigen presentation." J Exp Med **192**(8): 1143-50.

- Sornasse, T., V. Flamand, G. De Becker, H. Bazin, F. Tielemans, K. Thielemans, *et al.* (1992). "Antigen-pulsed dendritic cells can efficiently induce an antibody response in vivo." J Exp Med **175**(1): 15-21.
- Sparwasser, T., R. M. Vabulas, B. Villmow, G. B. Lipford and H. Wagner (2000). "Bacterial CpG-DNA activates dendritic cells in vivo: T helper cell-independent cytotoxic T cell responses to soluble proteins." Eur J Immunol **30**(12): 3591-7.
- Sprent, J., D. Lo, E. K. Gao and Y. Ron (1988). "T cell selection in the thymus." Immunol Rev **101**: 173-90.
- Srivastava, P. (2002). "Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses." Annu Rev Immunol **20**: 395-425.
- Steinman, R. M. and Z. A. Cohn (1973). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution." J Exp Med **137**(5): 1142-62.
- Steinman, R. M., D. Hawiger and M. C. Nussenzweig (2003). "Tolerogenic dendritic cells." Annu Rev Immunol **21**: 685-711.
- Steinman, R. M., M. Pack and K. Inaba (1997). "Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs." Immunol Rev **156**: 25-37.
- Stephens, S. A., J. Brownlie, B. Charleston and C. J. Howard (2003). "Differences in cytokine synthesis by the sub-populations of dendritic cells from afferent lymph." Immunology **110**(1): 48-57.
- Suchin, E. J., P. B. Langmuir, E. Palmer, M. H. Sayegh, A. D. Wells and L. A. Turka (2001). "Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question." J Immunol **166**(2): 973-81.
- Sullivan, B. A., P. Kraj, D. A. Weber, L. Ignatowicz and P. E. Jensen (2002). "Positive selection of a Qa-1-restricted T cell receptor with specificity for insulin." Immunity **17**(1): 95-105.
- Surh, C. D. and J. Sprent (1994). "T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus." Nature **372**(6501): 100-3.
- Thery, C. and S. Amigorena (2001). "The cell biology of antigen presentation in dendritic cells." Curr Opin Immunol **13**(1): 45-51.
- Throsby, M., F. Homo-Delarche, D. Chevenne, R. Goya, M. Dardenne and J. M. Pleau (1998). "Pancreatic hormone expression in the murine thymus: localization in dendritic cells and macrophages." Endocrinology **139**(5): 2399-406.
- Thurman, E. C., J. Walker, S. Jayaraman, N. Manjunath, B. Ardman and J. M. Green (1998). "Regulation of in vitro and in vivo T cell activation by CD43." Int Immunol **10**(5): 691-701.
- Tse, H. Y., R. H. Schwartz and W. E. Paul (1980). "Cell-cell interactions in the T cell proliferative response. I. Analysis of the cell types involved and evidence for nonspecific T cell recruitment." J Immunol **125**(2): 491-500.
- Urdahl, K. B., J. C. Sun and M. J. Bevan (2002). "Positive selection of MHC class Ib-restricted CD8(+) T cells on hematopoietic cells." Nat Immunol **3**(8): 772-9.
- van Endert, P. M. (1996). "Peptide selection for presentation by HLA class I: a role for the human transporter associated with antigen processing?" Immunol Res **15**(4): 265-79.
- van Meerwijk, J. P., S. Marguerat, R. K. Lees, R. N. Germain, B. J. Fowlkes and H. R. MacDonald (1997). "Quantitative impact of thymic clonal deletion on the T cell repertoire." J Exp Med **185**(3): 377-83.
- Vella, A. T., J. E. McCormack, P. S. Linsley, J. W. Kappler and P. Marrack (1995). "Lipopolysaccharide interferes with the induction of peripheral T cell death." Immunity **2**(3): 261-70.
- Venanzi, E. S., C. Benoist and D. Mathis (2004). "Good riddance: Thymocyte clonal deletion prevents autoimmunity." Curr Opin Immunol **16**(2): 197-202.
- von Boehmer, H. (1990). "Developmental biology of T cells in T cell-receptor transgenic mice." Annu Rev Immunol **8**: 531-56.
- von Boehmer, H. and H. J. Fehling (1997). "Structure and function of the pre-T cell receptor." Annu Rev Immunol **15**: 433-52.
- Von Stebut, E., J. M. Ehrchen, Y. Belkaid, S. L. Kostka, K. Molle, J. Knop, *et al.* (2003). "Interleukin 1alpha promotes Th1 differentiation and inhibits disease progression in Leishmania major-susceptible BALB/c mice." J Exp Med **198**(2): 191-9.

- Vremec, D. and K. Shortman (1997). "Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes." *J Immunol* **159**(2): 565-73.
- Vukmanovic, S., A. G. Grandea, 3rd, S. J. Faas, B. B. Knowles and M. J. Bevan (1992). "Positive selection of T-lymphocytes induced by intrathymic injection of a thymic epithelial cell line." *Nature* **359**(6397): 729-32.
- Walker, L. S. and A. K. Abbas (2002). "The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery." *Nat Rev Immunol* **2**(1): 11-9.
- Wallace, R. B., J. Shaffer, R. F. Murphy, J. Bonner, T. Hirose and K. Itakura (1979). "Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch." *Nucleic Acids Res* **6**(11): 3543-57.
- Wekerle, H. and U. P. Ketelsen (1980). "Thymic nurse cells--Ia-bearing epithelium involved in T-lymphocyte differentiation?" *Nature* **283**(5745): 402-4.
- Werling, D., J. C. Hope, P. Chaplin, R. A. Collins, G. Taylor and C. J. Howard (1999). "Involvement of caveolae in the uptake of respiratory syncytial virus antigen by dendritic cells." *J Leukoc Biol* **66**(1): 50-8.
- Wiertz, E. J., D. Tortorella, M. Bogoyo, J. Yu, W. Mothes, T. R. Jones, *et al.* (1996). "Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction." *Nature* **384**(6608): 432-8.
- Williams, O., Y. Tanaka, R. Tarazona and D. Kioussis (1997). "The agonist-antagonist balance in positive selection." *Immunol Today* **18**(3): 121-6.
- Wilson, N. S., D. El-Sukkari, G. T. Belz, C. M. Smith, R. J. Steptoe, W. R. Heath, *et al.* (2003). "Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature." *Blood* **102**(6): 2187-94.
- Wolkers, M. C., N. Brouwenstijn, A. H. Bakker, M. Toebes and T. N. Schumacher (2004). "Antigen bias in T cell cross-priming." *Science* **304**(5675): 1314-7.
- Wu, L., C. L. Li and K. Shortman (1996). "Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny." *J Exp Med* **184**(3): 903-11.
- Yasutomo, K., B. Lucas and R. N. Germain (2000). "TCR signaling for initiation and completion of thymocyte positive selection has distinct requirements for ligand quality and presenting cell type." *J Immunol* **165**(6): 3015-22.
- Zerrahn, J., A. Volkmann, M. C. Coles, W. Held, F. A. Lemonnier and D. H. Raulet (1999). "Class I MHC molecules on hematopoietic cells can support intrathymic positive selection of T cell receptor transgenic T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(20): 11470-5.
- Zhao, X., E. Deak, K. Soderberg, M. Linehan, D. Spezzano, J. Zhu, *et al.* (2003). "Vaginal submucosal dendritic cells, but not Langerhans cells, induce protective Th1 responses to herpes simplex virus-2." *J Exp Med* **197**(2): 153-62.
- Zijlstra, M., M. Bix, N. E. Simister, J. M. Loring, D. H. Raulet and R. Jaenisch (1990). "Beta 2-microglobulin deficient mice lack CD4-8+ cytolytic T cells." *Nature* **344**(6268): 742-6.
- Zinkernagel, R. M. and A. Althage (1999). "On the role of thymic epithelium vs. bone marrow-derived cells in repertoire selection of T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(14): 8092-7.
- Zinkernagel, R. M., A. Althage, E. Waterfield, B. Kindred, R. M. Welsh, G. Callahan, *et al.* (1980). "Restriction specificities, alloreactivity, and allotolerance expressed by T cells from nude mice reconstituted with H-2-compatible or -incompatible thymus grafts." *J Exp Med* **151**(2): 376-99.
- Zinkernagel, R. M. and P. C. Doherty (1974). "Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system." *Nature* **248**(450): 701-2.
- Zuklys, S., G. Balciunaite, A. Agarwal, E. Fasler-Kan, E. Palmer and G. A. Hollander (2000). "Normal thymic architecture and negative selection are associated with Aire expression, the gene defective in the autoimmune-polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED)." *J Immunol* **165**(4): 1976-83.

7 LEBENSLAUF

MICHAEL ANGELO CANNARILE

LEONRODSTRASSE 34, 80636 MÜNCHEN

E-MAIL: mcannarile@web.de

TEL.: +49175 544 9097 / +4989 1237422

PERSÖNLICHE DATEN

Geburtstag: 25. Oktober 1971
Geburtsort: Mainz
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch / italienisch

SCHULISCHE AUSBILDUNG

1982 – 1991 Theresianum-Gymnasium, Mainz
Facharbeit im Leistungskurs Biologie, Titel: „Bestrahlung von Mikroorganismen mit UV-Licht“, 1. Platz im Regionalwettbewerb „jugend forscht“

1991 Allgemeine Hochschulreife (Leistungsfächer: Biologie, Englisch, Französisch)

BERUFSAUSBILDUNG

1991 - 1993 Ausbildung zum Bankkaufmann bei der Bayerischen Vereinsbank AG, Mainz / Frankfurt am Main

UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG

1993 – 1999 Studium der Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen
Hauptfach: Molekulare Genetik
Nebenfächer: Organische Chemie und Immunologie

09.1998 Diplomarbeit am Deutschen Primatenzentrum Göttingen
- 09.1999 Abt. Prof. G. Hunsmann, PD Dr. W. Lüke “Expression und Reinigung von bakteriell exprimiertem VP1, dem Hauptstrukturprotein des humanen Polyomavirus JCV und Charakterisierung der Nukleinsäure-Bindungseigenschaften”

- 11.1999 Beginn der Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Immunbiologie,
- 03.2000 Freiburg, Abt. Prof. T. Brocker
- seit 04.2000 Fortsetzung der Doktorarbeit am Institut für Immunologie, LMU München, Abt. Prof.
T. Brocker

VERÖFFENTLICHUNGEN

ARTIKEL

Kurts C, Cannarile M, Klebba I, Brocker T (2001) Dendritic cells are sufficient to cross-present self-antigens to CD8 T cells *in vivo*; **J Immunol. 166:1439-42**

Cannarile MA, Decanis N, Joost P.M. van Meerwijk and Thomas Brocker (2004) The role of dendritic cells in selection of classical and non-classical CD8⁺ T cells *in vivo*; **J Immunol. 173:4799-4805**

Cannarile MA and Brocker T (2004) Direct *in vivo* evaluation of CTL priming and tolerance induction by Dendritic Cells; *Manuskript in Vorbereitung*

ABSTRACTS

Cannarile MA and Brocker T (2002) Dendritic cells induce negative, but not positive selection of CD8 T cells and cannot educate NK cells *in vivo*, **Immunobiology 206: no. 1-3**

Cannarile MA and Brocker T (2003) Dendritic cell-cytotoxic T cell interactions *in vivo*: tolerance induction vs. Immunity, **Immunology letters 87: no 1-3**

Cannarile MA and Brocker T (2003) Dendritic cells are sufficient to induce CD8 T cell immunity and tolerance *in vivo*, **Immunobiology 208: no 1-3**

KONGRESSTEILNAHMEN

VORTRÄGE

15th European Immunology Congress of the European Federation of Immunological Societies (EFIS), Rhodos, Griechenland (06/2003), "Dendritic Cell-cytotoxic T cell interactions *in vivo*: tolerance induction vs. immunity"

12th International Congress of Immunology and 4th Annual Conference of the Federation of Clinical Immunology Societies (FOCIS), Montreal, Kanada (07/2004), "Direct *in vivo* evaluation of CTL priming and tolerance induction by Dendritic Cells"

7 LEBENS LAUF

POSTERPRÄSENTATIONEN

33th Annual Meeting of the German Society of Immunology, Marburg, Deutschland (09/2002), „Dendritic cells induce negative, but not positive selection of CD8 T cells and cannot educate NK cells *in vivo*“

34th Annual Meeting of the German Society of Immunology, Berlin, Deutschland (09/2003), „Dendritic cells are sufficient to induce CD8 T cell immunity and tolerance *in vivo*“

Boehringer Ingelheim Fonds International Titisee Conferences, Titisee, Deutschland (03/2004), „Direct *in vivo* evaluation of CTL priming and tolerance induction by Dendritic Cells“

PRAKTIKA

Laborpraktikum am Zentrum für Hygiene und Humangenetik, Abteilung Immungenetik, Prof. E. Günther, Georg-August-Universität, Göttingen, Deutschland (04-06/1997)

Laborpraktikum am The Babraham Institute, Department of Immunology, BSc PhD DSc CBiol FIBiol E. Munn, Cambridge, Großbritannien (11-12/1997)

Hilfswissenschaftlicher Mitarbeiter am Zentrum für Hygiene und Humangenetik, Abteilung Immungenetik, Prof. E. Günther, Georg-August-Universität, Göttingen, Deutschland (12.1997-01.1998)

SPRACHEN

Englisch, Französisch, Italienisch

8 DANKSAGUNG

Frau Prof. E. Weiß danke ich für die offizielle Betreuung dieser Arbeit, die am Fachbereich Medizin angefertigt wurde. Sie ermöglichte durch die Übernahme des Erstgutachtens dieser Arbeit die Prüfung an der biologischen Fakultät der Universität München.

Herrn Prof. T. Brocker möchte ich für die Aufnahme und Möglichkeit der Dissertation in seiner Arbeitsgruppe danken. Seine hervorragende wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung, sowie sein außergewöhnliches Interesse am Fortschreiten dieser Arbeit, ermöglichten zusätzlich die Veröffentlichung der angefertigten Daten in Fachzeitschriften, sowie die Diskussion mit anderen Wissenschaftlern auf nationalen wie internationalen Kongressen.

Meinen Mitarbeitern in der Arbeitsgruppe danke ich für die freundschaftliche Atmosphäre, ohne die ich meine Doktorandenzeit nicht so angenehm empfunden hätte. Die stetige Hilfsbereitschaft und der wissenschaftliche Austausch untereinander, lassen mich meine Doktorandenzeit stets in sehr angenehmer Erinnerung behalten. Besonderer Dank gebührt Henning Lauterbach für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Auch ohne die hervorragende Pflege meiner Versuchstiere durch Andrea Bol und Wolfgang Mertl wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Andrea Bol danke ich an dieser Stelle besonders für die ausgezeichnete Betreuung meiner Zuchten.

Für das angenehme Arbeitsklima danke ich auch allen übrigen Mitarbeitern am Institut, mit denen über die Jahre ein freundschaftliches Verhältnis entstanden ist.

Ursula Wolf, Gisela Mair sowie Andela Kozar waren bei administrativen Fragen stets eine zuverlässige und schnelle Hilfe.

Zusätzlich möchte ich meinem privaten Freundeskreis danken, der trotz z.T. „Fachfremdheit“ immer Interesse an meiner Arbeit bekundete und der für mein Wohlbefinden durch Zerstreuung „nicht-wissenschaftlicher-Art“ erheblich beitrug. Auch hier möchte ich besonders Tanja Maier sowie Claudia Mäck für das zeitaufwändige Korrekturlesen meiner Arbeit danken.

Letztendlich gebührt der größte Dank meinen Eltern, die mich stets in allen Entscheidungen unterstützen; ohne sie wäre mein Studium und auch diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen.