

**Aus dem Institut für Immunologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Direktor: Prof. Dr. T. Brocker**

# **Antigenabhängige und -unabhängige Proliferation von CD4- und CD8-T-Zellen**

## **Progressive oder programmierte Differenzierung?**

**Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München**



**vorgelegt von  
Hannah Rabenstein**

**aus Augsburg**

**2012**

**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Betreuer: Prof. Dr. Thomas Brocker  
Zweitgutachter/in: Prof. Dr. Gerhild Wildner  
Dekan: Herr Prof. Dr. med. Dr.h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 21.03.2013



# INHALTSVERZEICHNIS

---

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>4</b>
<b>3.1</b>	<b>Die Rolle der T-Lymphozyten im Immunsystem.....</b>	<b>4</b>
<b>3.2</b>	<b>Antigenprozessierung und -präsentation .....</b>	<b>5</b>
3.2.1	Antigen präsentierende Zellen (APCs).....	5
3.2.2	Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC).....	6
3.2.3	Prozessierung endogener Proteine .....	7
3.2.4	Prozessierung exogener Proteine .....	7
3.2.5	Kreuzpräsentation exogener Proteine.....	8
<b>3.3</b>	<b>Entwicklung von T-Zellen .....</b>	<b>9</b>
<b>3.4</b>	<b>Phasen der T-Zell-Immunantwort .....</b>	<b>10</b>
3.4.1	Aktivierung von T-Zellen .....	10
3.4.1.1	Signal 1 - TCR-pMHC-Interaktion.....	10
3.4.1.2	Signal 2 - Costimulation.....	11
3.4.1.3	Signal 3 - Zytokine.....	11
3.4.2	Expansions- und Effektorphase .....	12
3.4.3	Kontraktionsphase .....	12
3.4.4	Bildung von Gedächtniszellen.....	13
<b>3.5</b>	<b>T-Zell-Subsets.....</b>	<b>14</b>
3.5.1	CD4-T-Zell-Subsets .....	14
3.5.2	CD8-T-Zell-Subsets .....	15
<b>3.6</b>	<b>Die Bedeutung der Dauer des Antigenstimulus .....</b>	<b>16</b>
3.6.1	<i>In-vitro</i> -Studien .....	16
3.6.1.1	CD4-T-Zellen.....	16
3.6.1.2	CD8-T-Zellen.....	17
3.6.2	<i>In-vivo</i> -Studien.....	18
3.6.2.1	Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i> .....	18
3.6.2.2	Aktivierung mit Virus-ähnlichen Partikel (VLPs).....	19
3.6.2.3	Blockierung des pMHC mit Antikörpern.....	19
3.6.2.4	Doxycyclin-regulierbare Antigenpräsentation.....	20
<b>3.7</b>	<b>Ziel der Arbeit.....</b>	<b>20</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>22</b>
<b>4.1</b>	<b>Material.....</b>	<b>22</b>
4.1.1	Chemikalien .....	22

# INHALTSVERZEICHNIS

---

4.1.2	Pufferlösungen und Medien.....	23
4.1.3	Verbrauchsmaterialien .....	24
4.1.4	Antikörper .....	25
4.1.5	Oligonukleotide.....	26
4.1.6	Geräte .....	27
4.1.7	Software .....	27
<b>4.2</b>	<b>Mauslinien.....</b>	<b>28</b>
4.2.1	Wildtypmäuse.....	28
4.2.1.1	B10.BR (B10.BR- <i>H2<sup>k</sup></i> <i>H2-T18<sup>a</sup></i> /SgSn) .....	28
4.2.1.2	B6 (C57BL/6J) .....	28
4.2.2	TCR-transgene Mäuse .....	28
4.2.2.1	AND.....	28
4.2.2.2	OT-I.....	29
4.2.2.3	Ursprung der kongenen Marker .....	29
4.2.3	Doppelt-transgene Mäuse mit Dox-regulierbarer Antigenexpression .....	29
4.2.3.1	li-rtTA x TIM (TIM).....	29
4.2.3.2	li-rTA x TSO (TSO) .....	31
4.2.4	Transgene Mäuse mit konstitutiver Antigenexpression .....	31
4.2.4.1	li-MCC (x CD11c-DTR).....	31
4.2.4.2	Act-mOVA (x CD11c-DTR).....	31
<b>4.3</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>32</b>
4.3.1	Molekularbiologische Methoden .....	32
4.3.1.1	Isolierung genomischer DNA aus Gewebeproben.....	32
4.3.1.2	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	32
4.3.1.3	Agarose-Gelelektrophorese .....	33
4.3.1.4	Isolierung von Total-RNA aus primären Zellen.....	33
4.3.1.5	Transkriptomanalyse (Microarray) .....	34
4.3.2	Zell- und immunbiologische Methoden .....	34
4.3.2.1	Generierung von Knochenmarkchimären .....	34
4.3.2.2	Organentnahme und Herstellung einer Einzelzellsuspension .....	35
4.3.2.3	Durchflusszytometrie .....	36
4.3.2.4	Magnetische Zellseparation (MACS) .....	37
4.3.2.5	Durchflusszytometrische Zellsortierung .....	38
4.3.2.6	Markierung mit CFSE.....	39
4.3.2.7	Adoptiver Zelltransfer .....	39
4.3.2.8	<i>In-vitro</i> -Stimulation von T-Zellen mit $\alpha$ -CD3- und $\alpha$ -CD28mAB .....	40
4.3.2.9	Restimulation von T-Zellen <i>ex vivo</i> .....	41

# INHALTSVERZEICHNIS

---

<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>42</b>
<b>5.1</b>	<b>Methodischer Ansatz und Einführung der transgenen Maus TSO</b> .....	<b>42</b>
5.1.1	Grundexperiment: Adoptiver Transfer und induzierbare Antigenexpression .....	42
5.1.1.1	Charakterisierung der TCR-transgenen T-Zellen vor dem adoptiven Transfer .....	44
5.1.1.2	Proliferation von AND-T-Zellen nach adoptivem Transfer in TIM-Mäuse .....	45
5.1.2	TSO: Dox-induzierbare Expression eines MHC I-restringierten Antigens <i>in vivo</i> .....	47
5.1.2.1	Hintergrundexpression des TSO-Antigens.....	49
5.1.2.2	Generierung von Knochenmarkchimären .....	50
5.1.2.3	Regulierbare Antigenexpression in Knochenmarkchimären.....	51
<b>5.2</b>	<b>Antigenabhängigkeit von T-Zellen nach transientem TCR-Stimulus</b> .....	<b>54</b>
5.2.1	Antigenabhängige Proliferation von CD4- und CD8-T-Zellen.....	54
5.2.1.1	Dox-regulierte Antigenpräsentation in Knochenmarkchimären.....	54
5.2.1.2	Depletion von dendritischen Zellen durch Diphtherietoxin (DT) <i>in vivo</i> .....	55
5.2.2	Antigenunabhängige Proliferation von CD8-T-Zellen.....	58
5.2.2.1	<i>In-vitro</i> -Aktivierung von T-Zellen mit $\alpha$ -CD3/-CD28-Antikörpern .....	58
5.2.2.2	Adoptiver Transfer <i>in vitro</i> aktivierter TCR-transgener T-Zellen.....	60
5.2.2.3	Adoptiver Transfer <i>in vitro</i> aktivierter polyklonaler T-Zellen .....	63
5.2.2.4	Vergleichende Analyse TCR-transgener und polyklonaler T-Zellen.....	65
5.2.2.5	Vergleichende Analyse des Transkriptoms: Microarray.....	67
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>74</b>
<b>6.1</b>	<b>Die Bedeutung des Antigenstimulus für CD4- und CD8-T-Zellen</b> .....	<b>75</b>
6.1.1	CD8-T-Zellen sind nach Dox-induzierter Antigenpräsentation bedingt antigenabhängig .....	75
6.1.2	Antigenunabhängige Proliferation von CD8-T-Zellen ist induzierbar .....	77
6.1.3	CD4-T-Zellen sind strikt antigenabhängig .....	78
<b>6.2</b>	<b>Die Regulation von T-Zell-Immunantworten durch den Antigenstimulus</b> .....	<b>81</b>
6.2.1	Die Genexpression ist nach transientem TCR-Stimulus verschieden reguliert .....	81
6.2.2	T-Zellen sind durch progressive oder programmierte Differenzierung reguliert.....	84
<b>6.3</b>	<b>Ausblick</b> .....	<b>85</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>87</b>
<b>8</b>	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>97</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

### ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APC	Antigen präsentierende Zelle (antigen presenting cell)
CD	Oberflächenantigen (cluster of differentiation)
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidylester
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt (cytotoxic T lymphocyte)
DC	dendritische Zelle (dendritic cell)
DN	doppelt-negativer Thymozyt (double negative)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
DP	doppelt-positiver Thymozyt (double positive)
DT	Diphtherietoxin
DTR	Diphtherietoxinrezeptor
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zell-Sortierer (fluorescence activated cell sorter)
FBS	Fötale bovines Serum
HLA	humaner Haupthistokompatibilitätskomplex (human leukocyte antigen)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
mAb	monoklonaler Antikörper (monoclonal antibody)
MACS®	magnetische Zellseparation (magnetic cell separation, Miltenyi)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
MHC-I/II	MHC-Klasse-I/MHC-Klasse-II
OVA	Hühner-Ovalbumin
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-acetat
qPCR	quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RT	Raumtemperatur bzw. Reverse Transkriptase

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

SP	einfach-positiver Thymozyt (single positive)
pMHC	Molekülkomplex aus MHC, beladen mit Peptid
TCR	T-Zell-Rezeptor (T cell receptor)
TIM	TetO-Ii-MCC (Transgen, Tet-regulierbare Invariante Kette mit MCC <sub>93-103</sub> )
Treg	regulatorische T-Zelle
TSO	TetO-ssOVA (Transgen, Tet-regulierte Signal-Sequenz mit OVA <sub>257-264</sub> )
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)

Für die Abkürzungen gebräuchlicher Wörter deutscher Sprache wird gemäß Duden verfahren.

### 1 ABSTRACT

T-cell-mediated immune responses are of central importance for the elimination of pathogens. Contact with specific antigen activates T cells to proliferate and differentiate. To date, the effect of the duration of antigenic stimulus for CD4 and CD8 T cells has rarely been considered side-by-side. In the present study, the antigen dependency of CD4 and CD8 T cells following transient TCR stimulation was studied in three different experimental systems. In the first system, T-cell receptor transgenic AND and OT-I T cells were tracked following adoptive transfer into transgenic recipient animals that expressed the cognate antigen transiently after administration of doxycycline. In a second methodological approach, the T cells were transferred together with antigen-presenting DTR-positive dendritic cells into wild type animals. In this case, transient antigen presentation was achieved by depletion of dendritic cells using diphtheria toxin 24 h after dendritic cell transfer. In the third system, a transient TCR stimulus was generated by 48-hour *in vitro* activation of T cells with antibodies against CD3 and CD28, followed by adoptive transfer of these cells into wild type mice.

For CD4-positive TCR-transgenic AND T cells, antigen-dependent proliferation and differentiation to effector cells was found in all three systems. For CD8-positive TCR-transgenic OT-I T cells, antigen dependence was observed after transient, doxycycline-induced antigen presentation. However, *in vitro* activation of OT-I T cells led to antigen-independent proliferation and differentiation to interferon- $\gamma$ -producing effector cells. These results after *in vitro* activation were also confirmed for polyclonal CD4 and CD8 T cells. A comparative analysis of the transcriptome of the T cells showed that the gene expression pattern of AND T cells after a transient TCR stimulus was more similar to that of naive T cells than to that of continuously stimulated T cells. In contrast, the gene expression pattern of OT-I T cells after a brief stimulus was more similar to that of continuously stimulated T cells. Among the genes expressed in both briefly and continuously stimulated OT-I T cells, and also in continuously stimulated AND T cells, were *Tbx21* (T-bet) and *Mapk6* (ERK3), suggesting that these proteins may be involved in the regulation of antigen-independent differentiation of OT-I T cells.

## 2 ZUSAMMENFASSUNG

T-Zell-vermittelte Immunantworten sind von zentraler Bedeutung für die Eliminierung von Krankheitserregern. Durch Kontakt mit dem spezifischen Antigen werden T-Zellen zu Proliferation und Differenzierung aktiviert. Die Rolle der Dauer des Antigenstimulus wurde bislang für CD4- und CD8-T-Zellen kaum in direktem Vergleich betrachtet. In der vorliegenden Arbeit wurden Antigenabhängigkeit und Programmierbarkeit von CD4- und CD8-T-Zellen nach einem transienten Stimulus des T-Zell-Rezeptors (TCR) in drei verschiedenen experimentellen Systemen parallel untersucht. TCR-transgene AND- und OT-I-T-Zellen wurden adoptiv in transgene Empfänger-Tiere transferiert, die nach Gabe von Doxycyclin das jeweilige spezifische Antigen transient exprimierten. In einem weiteren methodischen Ansatz wurden die T-Zellen zusammen mit Antigen präsentierenden DTR-positiven dendritischen Zellen in Wildtyp-Tiere transferiert. Transiente Antigenpräsentation wurde hier durch Depletion der dendritischen Zellen mittels Diphtherietoxin 24 h nach Transfer der dendritischen Zellen erreicht. In einem dritten experimentellen System wurde durch 48-stündige *In-vitro*-Aktivierung der T-Zellen mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 und anschließendem adoptiven Transfer in Wildtyp-Mäuse ein transienter TCR-Stimulus generiert.

Für CD4-positive TCR-transgene AND-T-Zellen wurde in allen drei Systemen Antigenabhängigkeit von Proliferation und Differenzierung zu Effektorzellen gefunden. Für CD8-positive TCR-transgene OT-I-T-Zellen war nach Doxycyclin-induzierter, transienter Antigenpräsentation ebenfalls bedingte Antigenabhängigkeit zu beobachten. *In-vitro*-Aktivierung führte dagegen bei OT-I-T-Zellen zu antigenunabhängiger Proliferation und Differenzierung zu Interferon- $\gamma$  produzierenden Effektorzellen. Die Ergebnisse nach *In-vitro*-Aktivierung konnten zudem für polyklonale CD4- und CD8-T-Zellen bestätigt werden. Durch eine vergleichende Analyse des Transkriptom wurde gezeigt, dass das Genexpressionsmuster von AND-T-Zellen nach einem transienten TCR-Stimulus stärker mit dem von naiven als mit dem von kontinuierlich stimulierten T-Zellen vergleichbar war, wohingegen die Gene von OT-I-T-Zellen nach einem kurzen Stimulus ähnlich wie nach persistentem Stimulus exprimiert wurden. Unter den Genen, die sowohl in transient und persistent stimulierten OT-I-T-Zellen als auch in persistent stimulierten AND-T-Zellen mindestens dreimal stärker als in der Kontrolle exprimiert wurden, waren

## ZUSAMMENFASSUNG

---

beispielsweise *Tbx21* (T-bet) und *Mapk6* (ERK3), die an der Regulation der antigen-unabhängigen Differenzierung von OT-I-T-Zellen beteiligt sein können.

### 3 EINLEITUNG

#### 3.1 Die Rolle der T-Lymphozyten im Immunsystem

Um den Körper ausreichend gegen alle potenziellen Krankheitserreger schützen zu können, hat sich in Säugetieren neben dem phylogenetisch älteren, angeborenen Immunsystem, welches gegen häufig vorkommende Merkmale von Pathogenen gerichtet ist, das spezifischere erworbene (adaptive) Immunsystem entwickelt. Beide Teile sind eng miteinander verwoben. Die wichtigsten Zellen der antigenspezifischen, adaptiven Immunität sind neben den Antikörper produzierenden B-Lymphozyten (B-Zellen) die T-Lymphozyten (T-Zellen). Nach Aktivierung proliferieren sie und differenzieren zu Effektor- und Gedächtniszellen und sorgen so nicht nur für die akute Bekämpfung des Pathogens, sondern auch für einen effizienten Schutz bei einer erneuten Infektion mit dem gleichen Krankheitserreger. Grundsätzlich werden zwei Typen von T-Zellen unterschieden. CD8-positive (CD8<sup>+</sup>- bzw. CD8-) T-Zellen tragen CD8 als Corezeptor auf ihrer Zelloberfläche und erkennen das spezifische Antigen, wenn es auf MHC-I-Molekülen von anderen Zellen präsentiert wird. Nach Antigenkontakt im Rahmen einer Entzündung oder Infektion differenzieren sie zu cytotoxischen T-Zellen (CTL) und bilden antivirale Zytokine wie Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) sowie cytotoxische Effektorproteine wie Perforin und Granzyme, um virus-infizierte Zellen oder Tumorzellen direkt abzutöten. Aufgrund dieser sehr exekutiven Funktion werden sie auch als Killer-T-Zellen bezeichnet. CD4-positive (CD4<sup>+</sup>- bzw. CD4-) T-Zellen exprimieren dagegen CD4 als Corezeptor und erkennen das spezifische Antigen im Kontext mit MHC-II-Molekülen. Ihre Hauptfunktion besteht in der Aktivierung und Regulation anderer Zellen und ist daher sehr viel facettenreicher als die von CD8-T-Zellen. Neben der klassischen T-Helferzelle existieren noch eine Reihe weiterer Untergruppen, die sich aufgrund ihrer verschiedenen Funktionen unterteilen lassen. Die wichtigsten sind folliculäre Helfer-Zellen (T<sub>FH</sub>), die bei der Aktivierung von B-Zellen eine Rolle spielen, regulatorische T-Zellen (T<sub>reg</sub>), die T-Zell-Antworten supprimieren und für die Immun-toleranz äußerst wichtig sind, sowie T<sub>H</sub>17-Zellen, die andere Zelltypen wie Neutrophile durch Sekretion von IL-17 rekrutieren können.

### 3.2 Antigenprozessierung und -präsentation

#### 3.2.1 Antigen präsentierende Zellen (APCs)

T-Zellen werden durch die spezifische Interaktion mit einer Antigen präsentierenden Zelle (APC) über die Bindung ihres T-Zell-Rezeptors (TCR) an das spezifische Antigen aktiviert. Zusätzlich ist aber auch noch ein costimulatorisches Signal über eine spezifische Rezeptor-Ligand-Interaktion wie beispielsweise CD28-CD80/CD86 für die Aktivierung nötig. Darüber hinaus spielen Zytokine eine Rolle, die von APCs und anderen Zellen sezerniert werden (Curtsinger and Mescher, 2010).

Die klassische APC ist die Dendritische Zelle (DC). Sie wurde 1973 von Steinman und Cohn (Steinman and Cohn, 1973) zum ersten Mal beschrieben und aufgrund ihrer charakteristischen ungewöhnlichen Morphologie benannt. DCs exprimieren das  $\alpha$ -Integrin CD11c auf ihrer Zelloberfläche und lassen sich aufgrund anderer Oberflächenmarker sowie ihrer Lokalisation in mindestens sechs Subtypen unterscheiden. Sie haben eine zentrale Funktion bei der Initiierung von antigenspezifischer Immunität und Toleranz (Steinman et al., 2003). Durch Rezeptor-vermittelte Phagozytose oder unspezifische Makropinozytose nehmen sie Pathogene auf, prozessieren diese und präsentieren Fragmente den antigenspezifischen Zellen wie T- und B-Zellen. Auf diese Weise stellen sie eine wichtige Verbindung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem dar. Nachdem sie mikrobielle Bestandteile erkannt haben oder durch Entzündungs-Zytokine aktiviert worden sind, steigt die Anzahl an costimulatorische Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche stark an und sie migrieren in die sekundären lymphatischen Organe wie Milz und Lymphknoten. Sie kommen in nahezu allen Geweben vor, akkumulieren aber besonders in den Bereichen der lymphatischen Organe, wo naive T-Zellen aktiviert werden. Im Gegensatz zu Makrophagen und B-Zellen scheint die Antigenpräsentation die Hauptfunktion von DCs zu sein. Darüberhinaus initiieren sie im Thymus durch die Deletion autoreaktiver T-Zellen zentrale Toleranz. Da dennoch einige autoreaktive T-Zellen der negativen Selektion entkommen, gibt es einen weiteren Mechanismus der Toleranzinduktion, um Autoimmunität zu vermeiden, die periphere Toleranz. Hier haben DCs eine wichtige Rolle wie auch bei der Regulation von  $T_{regS}$ .

Auch B-Zellen präsentieren Antigen. Sie erkennen Antigene im Gegensatz zu T-Zellen nicht als Peptid-MHC-Komplex sondern in ihrer nativen Form, sind aber selbst auf ein

aktivierendes Signal von T-Zellen angewiesen. Nach Bindung des Antigens über ihren B-Zell-Rezeptor internalisieren sie diesen und nehmen so Antigene auf, die sie prozessieren und T-Zellen präsentieren. Zur Endozytose sind sie nur sehr begrenzt in der Lage. Makrophagen sind große, mononukleäre Phagozyten (Gordon and Taylor, 2005), die in verschiedenen Geweben verschiedene Funktionen haben. Aufgrund ihrer außergewöhnlichen Fähigkeit, in einem Schritt bis zu 50% ihrer Zelloberfläche durch Phagozytose zu internalisieren, wurden Makrophagen lange Zeit als Prototyp der APC betrachtet. Sie sind in der Lage, nahezu jede Form von Antigen zu internalisieren, Zell-assoziiert oder löslich, nicht-spezifisch oder über spezifische Rezeptoren wie Fc $\gamma$ -R oder Lectine. Neben Aufnahme und Abbau apoptotischer Zellen, präsentieren sie auch Peptide aufgenommener Mikroorganismen oder Viren nach deren Abbau. Im Vergleich zu DCs und B-Zellen exprimieren sie aber weniger MHC-II und costimulatorische Moleküle und sind daher bei der Aktivierung von T-Zellen weniger effizient. Ihre Hauptfunktion scheint daher weniger die Antigenpräsentation als die Beseitigung eindringender Mikroorganismen zu sein (Trombetta and Mellman, 2005).

Daneben sind auch einige Typen von Epithel- und Stromazellen in der Lage, Antigen zu präsentieren, was beispielsweise bei der Reifung von T-Zellen im Thymus und der Induktion zentraler Toleranz eine wichtige Rolle spielt (Kyewski and Klein, 2006).

### **3.2.2 Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)**

T-Zellen erkennen das spezifische Antigen immer im Kontext eines MHC-Moleküls auf der Zelloberfläche einer APC. MHC-Moleküle sind Glykoproteine, die von den hochpolymorphen MHC-Genen codiert werden. Die Gesamtheit dieser Gene wird bei der Maus als H-2- und beim Mensch als HLA-(Human Leucocyte Antigen-)Gene bezeichnet. Der extreme Polymorphismus ist für die Antigen-Erkennung von großer Bedeutung, da T-Zellen das spezifische Peptid nur dann erkennen, wenn es an eine bestimmte allelische Variante eines MHC-Moleküls gebunden ist. Dieses Phänomen wird als MHC-Restriktion bezeichnet. Strukturell bestehen MHC-I-Moleküle aus einer Membran-gebundenen  $\alpha$ -Kette, die aus drei Domänen besteht, und dem nicht-kovalent gebundenen  $\beta_2$ -Mikroglobulin. MHC-II-Moleküle bestehen aus einem nicht-kovalenten Komplex aus einer  $\alpha$ -Kette und einer  $\beta$ -Kette, die jeweils zwei Domänen besitzen. MHC-I-Moleküle werden auf nahezu allen kernhaltigen Zellen exprimiert und präsentieren Peptide, die von endogenen Proteinen stammen, die von der Zelle synthetisiert wurden. Auf diese Weise

wird das interne Proteom zugänglich für die Kontrolle durch CTLs. Zellen, die virale oder Tumor-Antigene exprimieren, können detektiert werden. MHC-II-Moleküle werden dagegen nur auf professionellen APCs exprimiert. Diese präsentieren vor allem exogene Antigene, die internalisiert und prozessiert wurden (Jensen, 2007).

### 3.2.3 Prozessierung endogener Proteine

Bevor ein Antigen von einer APC auf der Zelloberfläche als Peptid-MHC-Komplex (pMHC) präsentiert werden kann, muss es erst prozessiert, an ein MHC-Molekül gebunden und an die Zelloberfläche transportiert werden. Endogene Proteine werden durch Ubiquitin markiert und damit zum Abbau im Proteasom freigegeben, wenn sie entweder aus virus-infizierten Zellen stammen und als viral erkannt werden oder aber von mutierten Proteinen aus Tumorzellen stammen. Während einer Infektion kann die Funktion des Proteasoms durch den IFN- $\gamma$ -induzierten Einbau neuer Untereinheiten moduliert werden, so dass ein Immunoproteasom entsteht (Griffin et al., 1998). Die prozessierten Peptidfragmente werden durch TAP-Proteine aktiv ins Innere des Endoplasmatischen Retikulums (ER) transportiert, wo sie anschließend mit der  $\alpha$ -Kette des MHC-I-Moleküls und dem  $\beta_2$ -Mikroglobulin zu einem Komplex zusammengelagert werden. Über den Golgi-Apparat werden die Komplexe in Vesikeln zur Zelloberfläche transportiert, wo sie präsentiert werden (Jensen, 2007).

Neben der überwiegenden Präsentation von endogenen Proteinen auf MHC-I-Molekülen ist auch die Präsentation intrazellulärer Peptide auf MHC-II gezeigt worden, wie beispielsweise nach Induzierung von Autophagie (Dengjel et al., 2005).

### 3.2.4 Prozessierung exogener Proteine

Peptide aus Proteinen exogenen Ursprungs werden hauptsächlich auf MHC-II-Molekülen präsentiert. Durch verschiedene Mechanismen wie Phagozytose, Makropinocytose oder Rezeptor-vermittelte Endozytose wird ständig extrazelluläres Material wie beispielsweise an Antikörper gebundenes Antigen von APCs aufgenommen. Nach der Internalisierung in Endosomen kommt es durch die Verschmelzung mit dem Lysosom zur Entstehung des Endolysosoms. In diesem werden die Proteine durch Proteasen abgebaut. Im ER sind  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette des MHC-II-Moleküls zunächst mit der Invarianten Kette (Ii) assoziiert. Diese stabilisiert nicht nur den Komplex, sondern verhindert auch die

Bindung von endogenen Peptiden. Die Ii dirigiert zudem den Transport der MHC-II-Moleküle aus dem ER zu einem endosomalen Kompartiment mit saurem pH-Wert, wo die Beladung mit Peptid erfolgen kann. Durch Proteasen wie Cathepsin S wird die Ii in mehreren Schritten geschnitten und nur das CLIP-Fragment (class-II-associated invariant-chain peptide) bleibt noch am MHC-II-Molekül gebunden. In einem weiteren Schritt dissoziiert CLIP ab oder wird verdrängt, stattdessen werden antigene Peptide gebunden und der pMHC-Komplex wird auf der Zelloberfläche präsentiert (van Niel et al., 2008).

Die Halbwertszeit von MHC-II-Molekülen liegt in unreifen dendritischen Zellen bei ca. 10 h, während sie nach Reifung der dendritischen Zelle bei über 100 h liegt. MHC-II-Moleküle werden demnach in reifen dendritischen Zellen stabilisiert, während die Halbwertszeit von MHC-I-Molekülen nicht durch Reifung der dendritischen Zelle beeinflusst wird (Cella et al., 1997). Die Antigenpräsentation durch DCs wird durch Ubiquitinylierung reguliert (Shin et al., 2006; van Niel et al., 2006). Die  $\beta$ -Kette des MHC-II-Moleküls ist nach dem Abbau der Ii in unreifen DCs oligoubiquitinyliert, während in reifen DCs keine Ubiquitinylierung erfolgt und die Expression auf der Zelloberfläche dadurch stark erhöht ist. Eine kürzlich erschienene Studie zeigt, dass MHC-II auf B-Zellen konstitutiv ubiquitinyliert ist, aber dennoch auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Dieser Unterschied zwischen DCs und B-Zellen ist auf die unterschiedliche Länge der Ubiquitinylierung von vier bis sechs in unreifen DCs im Vergleich zu zwei bis drei in B-Zellen zurückzuführen. MHC-II-Moleküle mit kürzerer Ubiquitinylierung erreichen die Lysosomen nicht und werden daher nicht abgebaut, sondern an die Zelloberfläche transportiert (Ma et al., 2012).

### **3.2.5 Kreuzpräsentation exogener Proteine**

Neben der Präsentation auf MHC-II-Molekülen können exogene Proteine auch durch sogenannte Kreuzpräsentation in den oben beschriebenen MHC-I-Beladungsweg eingeschleust und auf diese Weise auf MHC-I-Molekülen präsentiert werden (Kurts et al., 2010). Dieser Mechanismus ist besonders bei der Eliminierung bestimmter Viren wichtig, die Zellen infizieren, die keine APCs sind. In diesem Fall muss extrazelluläres Antigen von APCs aufgenommen und auf MHC-I präsentiert werden, um CTLs zu aktivieren. Auch wenn ein Tumor nicht APCs sondern andere Zellen betrifft, muss extrazelluläres Antigen durch Kreuzpräsentation auf MHC-I präsentiert werden, damit die betrof-

fenen Zellen durch CTLs abgetötet werden können (Ma et al., 2011). Kreuzpräsentation ist beispielsweise auch bei der Aktivierung von CTLs im Zusammenhang mit einer Schutzimpfung mit Protein-Antigenen essentiell (Yewdell and Haeryfar, 2005). Selbst-Antigene werden auch kreuzpräsentiert, was in der Regel zu Deletion der autoreaktiven CTLs und damit zu Toleranzinduktion (cross-tolerance) führt (Kurts et al., 1997).

Es wurden verschiedene Mechanismen der Kreuzpräsentation gezeigt, darunter sowohl TAP-abhängige (cytosolic pathway) wie auch TAP-unabhängige (vacuolar pathway). Antigen wird beispielsweise TAP-abhängig vom Endosom ins Cytoplasma transferiert, wo es als Substrat für das Proteasom direkt in den MHC-I-Beladungsweg gelangt. Daneben ist unter anderem auch ein über Gap Junctions vermittelter direkter Transfer von Peptiden aus Virus-infizierten Zellen an APCs möglich (Amigorena and Savina, 2010; Jensen, 2007). Eine kürzlich erschienene Studie zeigt, dass die im Zusammenhang mit dem MHC-II-Beladungsweg beschriebene Ii (CD74) auch eine Rolle bei der Kreuzpräsentation auf MHC-I-Molekülen spielen kann. So vermittelte die Ii den Transport von MHC-I-Molekülen vom ER ins endolysosomale Kompartiment, wo sie mit exogenen Peptiden beladen wurden (Basha et al., 2012).

### 3.3 Entwicklung von T-Zellen

T- und B-Zellen stammen von einem gemeinsamen lymphatischen Vorläufer ab. T-Zell-Vorläufer entstehen im Knochenmark aus Stammzellen und wandern zur Reifung in den Thymus ein, der neben dem Knochenmark als zentrales lymphatisches Organ bezeichnet wird. Als Indikator für die verschiedenen Reifungsstadien der Thymozyten wird die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle verwendet. Im ersten Stadium exprimieren alle Zellen weder CD4 noch CD8 und werden daher als doppelt-negativ (DN) bezeichnet. Diese Zellen beginnen mit der Umlagerung der Gene, die für die  $\beta$ -Kette des TCR codieren. Ist die Umlagerung erfolgreich, wird der sogenannte prä-TCR exprimiert und die T-Zelle erhält ein Wachstumssignal über den Rezeptor. Daraufhin exprimieren alle Thymozyten sowohl CD4 als auch CD8 und sind demnach doppelt-positiv (DP). Im nächsten Umlagerungsschritt werden die Gene der TCR- $\alpha$ -Kette rearrangiert. Ist dieser Schritt erfolgreich, wird die  $\alpha$ -Kette synthetisiert und bildet zusammen mit der  $\beta$ -Kette einen funktionellen TCR. In dieser Phase wird in einem zweistufigen Selektions-Prozess die Bindung des TCR an MHC-Moleküle geprüft (Thymusselektion). Während der

abschließenden Reifung entstehen die einzel-positiven (SP) T-Zellen, die als Corezeptor entweder CD4 oder CD8 exprimieren. Bindet der TCR eines Thymozyten an MHC-II-Moleküle, entsteht eine CD4-positive T-Zelle, bindet er dagegen an MHC-I, entsteht eine CD8-positive T-Zelle. Nach Abschluss der Reifung verlassen die T-Zellen den Thymus. Bis zum ersten Kontakt mit dem spezifischen Antigen werden sie als naiv bezeichnet.

### 3.4 Phasen der T-Zell-Immunantwort

#### 3.4.1 Aktivierung von T-Zellen

Die Aktivierung von naiven T-Zellen (auch „Priming“ genannt) ist ein dynamischer Prozess wie Studien mit Real-time 2-Photonen-Mikroskopie von Bousso und Mempel gezeigt haben (Bousso and Robey, 2003; Mempel et al., 2004). Das Priming von CD8-T-Zellen lässt sich demnach in drei Phasen einteilen. Während der ersten Phase bewegt sich die T-Zelle schnell und es kommt zu kurzen Zellkontakten mit zahlreichen DCs. Diese Phase kann bis zu 8 h dauern und dient der Suche nach dem spezifischen Antigen. Präsentiert eine DC das passende Antigen, kommt es in Phase 2 zu einem stabilen T-Zell-DC-Kontakt, der über mehrere Stunden dauern kann und zur Aktivierung der T-Zelle führt. Die dritte Phase beginnt nach etwa 20 h und ähnelt Phase 1. Die T-Zelle bewegt sich wieder schnell, geht viele kurzzeitige Kontakte mit DCs ein und beginnt zu proliferieren. Für die Aktivierung sind neben dem Antigenstimulus (Signal 1) noch weitere Signale notwendig, die als Signal 2 und 3 bezeichnet werden.

##### 3.4.1.1 Signal 1 - TCR-pMHC-Interaktion

Signal 1 wird über die klassische Erkennung des spezifischen Antigens in Form des pMHC auf der APC durch den TCR der T-Zelle und Bildung einer immunologischen Synapse (Fooksman et al., 2010) vermittelt. Der TCR besteht aus einem Heterodimer aus zwei Polypeptidketten, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Über 90% der T-Zellen exprimieren eine  $\alpha$ - und eine  $\beta$ -Kette, die übrigen bestehen aus einer  $\gamma$ - und einer  $\delta$ -Kette, sollen hier aber nicht näher betrachtet werden. Der TCR bildet einen Rezeptor-Komplex mit dem nicht-variablen CD3-Komplex, der aus den Untereinheiten CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$  und TCR $\zeta$  besteht. Alle CD3-Untereinheiten enthalten in ihrem cytoplasmischen Teil Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs (ITAMs). Durch

die Bindung des TCR an den pMHC auf einer APC kommt es zu biochemischen Veränderungen im cytoplasmatischen Bereich des CD3-Komplexes, wie der für die Signalübertragung ins Innere der Zelle essentiellen Phosphorylierung der ITAMS durch die Src-Tyrosinkinasen LCK und FYN. Darüberhinaus spielen verschiedene andere Konformationsänderungen eine Rolle (van der Merwe and Dushek, 2011). LCK aktiviert ZAP-70 durch Phosphorylierung, das wiederum die Adaptorproteine LAT und SLP-76 phosphoryliert. Über drei verschiedene Signaltransduktionswege werden letztlich die Transkriptionsfaktoren NF $\kappa$ B, NFAT und AP-1 aktiviert. Diese induzieren die Transkription spezifischer Gene, was zu Proliferation und Differenzierung der T-Zelle führt.

### **3.4.1.2 Signal 2 - Costimulation**

Unter Signal 2 werden alle costimulatorischen Signale zusammengefasst, die auf einer Ligand-Rezeptor-Bindung beruhen. Eine klassische Form der Costimulation ist beispielsweise die Interaktion von CD80/86 (B7-1/2) auf DCs mit dem Rezeptor CD28 auf T-Zellen. Daneben existieren weitere costimulatorische Rezeptoren wie CD27, CD40, 41BB, ICOS und OX40 und ihre entsprechenden Liganden. Nicht alle costimulatorischen Signale wirken aktivierend auf die T-Zelle. So kann CD80/86 auch an CTLA-4 auf der T-Zelle binden und ein inhibitorisches Signal vermitteln. Signal 2 ist also viel mehr das Ergebnis aus verschiedenen positiven und negativen Signalen unterschiedlicher Rezeptoren als ein einzelnes Signal (Greenwald et al., 2005; Watts, 2005). Für die Aktivierung von CD4- und CD8-T-Zellen scheinen dabei unterschiedliche Costimulatoren erforderlich zu sein (Whitmire and Ahmed, 2000).

Eine besondere Rolle kommt in dieser Arbeit CD40 zu, da Mäusen  $\alpha$ -CD40mAb injiziert wurde, um DCs zu aktivieren (Bonifaz et al., 2002; Hawiger et al., 2001; Steinman et al., 2003). Zum einen wurde dadurch eine Verlängerung der Antigenpräsentation auf DCs gezeigt (Obst et al., 2007) und zum anderen kann durch die Aktivierung und die damit verbundene Sekretion von Zytokinen ein pseudo-inflammatorisches Milieu generiert werden (Kimura et al., 2006).

### **3.4.1.3 Signal 3 - Zytokine**

Die alleinige Bereitstellung von Signal 1 und Signal 2 scheint aber nicht grundsätzlich ausreichend zu sein, um eine effektive T-Zell-Antwort zu erreichen, wie einige Studien zeigen (Fujii et al., 2004; Reis e Sousa, 2006). Erste Hinweise auf ein drittes Signal

brachten Experimente mit artifiziellen APCs, die das Minimum an erforderlichen Voraussetzungen für die Initiierung einer vollständigen T-Zell-Antwort *in vitro* zeigen. Die Gruppe von Mescher hat in verschiedenen Studien beobachtet, dass IL-12 oder IFN $\alpha/\beta$  für CD8-T-Zellen und IL-1 für CD4-T-Zellen möglicherweise ein solches Signal 3 sein kann. Für die Aktivierung von T-Zellen ist es zwar nicht grundsätzlich erforderlich, die Differenzierung zu Effektorzellen war aber ohne Signal 3 unter bestimmten Bedingungen suboptimal (Curtsinger and Mescher, 2010). Eine kürzlich erschienene Studie zeigt, dass das Entzündungsmilieu großen Einfluss auf die Differenzierung von CD8-T-Zellen hat und die Art der Infektion ausschlaggebend ist. Bei einer VSV-Infektion ist demnach beispielsweise IL-12 von großer Bedeutung (Obar et al., 2011).

### 3.4.2 Expansions- und Effektorphase

Infolge der Aktivierung kommt es zu starker Proliferation, der klonalen Expansion der antigenspezifischen T-Zelle, und dadurch zu einem enormen Anstieg der Anzahl an T-Zellen einer bestimmten Spezifität. Diese teilen sich während des Peaks der Immunantwort alle 6 - 8 h. Während einer LCMV-Infektion dauert die klonale Expansion für gewöhnlich etwa eine Woche, in der die Zahl der antigenspezifischen CD8-T-Zellen von einer ursprünglichen Ausgangsfrequenz von 100 - 200 naiven T-Zellen auf bis zu  $10^7$  Zellen ansteigt (Blattman et al., 2002).

### 3.4.3 Kontraktionsphase

Wie alle physiologischen Prozesse unterliegt auch das Immunsystem der Homöostase. Ist der Körper frei von Entzündung und Infektion, bewirken homöostatische Mechanismen die Aufrechterhaltung eines an sich sehr konstanten T-Zell-Kompartiments im Sinne von Organgröße und Anzahl der einzelnen Zelltypen. Während einer Infektion kommt es durch die klonale Expansion spezifischer Zellen zu einer kurzzeitigen Verschiebung dieses Gleichgewichts. Nach Abklingen der Infektion muss wieder die normale Zellzahl erreicht werden, was durch Deletion von 90-95% der Effektorzellen erzielt wird. Effektorzellen regulieren den IL-7-Rezeptor herunter und bilden weniger antiapoptotische Moleküle wie beispielsweise Bcl-2. Dadurch sind sie anfälliger für Apoptose und bedürfen weiterer Signale, um zu überleben. In dieser Phase führt ein

erneuter Antigenkontakt zum sogenannten aktivierungsinduzierten Zelltod (AICD) (Marrack and Kappler, 2004)

### 3.4.4 Bildung von Gedächtniszellen

Nach Abklingen einer Infektion und Ablation der Effektorzellen bleiben nur wenige T-Gedächtniszellen zurück, die bei einer erneuten Infektion mit dem gleichen Pathogen schneller expandieren, auf geringere Antigen dosis ansprechen und weniger Co-Stimulation benötigen, um Effektorfunktion auszubilden, als naive T-Zellen (Dutton et al., 1998; Swain et al., 2012). Auf diese Weise ist es in der Regel möglich, eine sekundäre Infektion schneller zu kontrollieren und die Symptomatik des Krankheitsverlaufs zu mildern. In diesem Zusammenhang sind auch B-Gedächtnis-Zellen, die nach einem zweiten Antigenkontakt innerhalb kürzester Zeit eine immense Menge an Antikörpern produzieren und ausschütten, äußerst wichtig. Gedächtniszellen können für sehr lange Zeit in Abwesenheit von Antigen fortbestehen und so einen lebenslangen Schutz bieten. Die Zahl an (CD8-)Gedächtniszellen bleibt dabei vor allem durch Interaktion mit Interleukin-7 und -15 (IL-7 und IL-15), welche für homöostatische Proliferation und Selbsterneuerung sorgen, sehr stabil (Cui and Kaech, 2010). In einer kürzlich erschienenen Studie (Yang et al., 2011) wurde gezeigt, dass CD8-Gedächtniszellen hauptsächlich in den klassischen lymphatischen Organen (Lymphknoten und Milz) akkumulieren, während CD4-Gedächtniszellen viel stärker in Mucosa-assoziiertem Gewebe, vor allem dem Darm, und weniger in Lymphknoten und Milz vorkommen. Dennoch ist generell sowohl für CD4- als auch für CD8-Gedächtniszellen beobachtet worden, dass sie einerseits durch lymphatisches und nicht-lymphatisches Gewebe rezirkulieren, andererseits aber auch an Infektionsherden akkumulieren können (Swain et al., 2012).

Durch Transfer einer einzigen naiven CD8-T-Zelle wurde zudem gezeigt, dass sich aus einer solchen Vorläuferzelle sowohl verschiedene Effektorzell- als auch Gedächtniszell-Populationen entwickeln können. Das Schicksal einer naiven CD-8-T-Zelle ist demnach nicht auf Effektor- oder Gedächtniszelle festgelegt; die Spezifizierung erfolgt erst nach Aktivierung der T-Zelle (Stemberger et al., 2007).

### 3.5 T-Zell-Subsets

#### 3.5.1 CD4-T-Zell-Subsets

Die Funktionen von CD4-T-Zellen sind im Allgemeinen sehr viel facettenreicher als die von CD8-T-Zellen. Sie werden aufgrund ihres charakteristischen Zytokinprofils in verschiedene Subtypen unterteilt (Abbas et al., 1996; Murphy and Reiner, 2002). Die Differenzierung zu einem dieser Subsets ist dabei von dem während der Aktivierung umgebenden Zytokin-Milieu abhängig. Obwohl zunächst angenommen wurde, dass die Differenzierung zu einem der CD4-Subtypen endgültig ist, ist diese Ansicht inzwischen revidiert.  $T_{H1}$ - und  $T_{H17}$ -Zellen können beispielsweise durch Helminthen-Infektion *In vivo* in IL-4-produzierende  $T_{H2}$ -Zellen umgewandelt werden, die ihre ursprünglich charakteristischen Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-17A nicht mehr exprimieren (Panzer et al., 2012).  $T_{reg}$ s können zum Beispiel in Peyers Plaques in  $T_{FH}$ -Zellen umgewandelt werden (Tsuji et al., 2009). Epigenetische Histon-Analysen weisen zudem darauf hin, dass einerseits terminale Differenzierung von Zytokin-Genen und andererseits Plastizität von Master-Regulator-Genen im gleichen T-Zell-Subset möglich sind (Zhou et al., 2009). In allen CD4-T-Zell-Untergruppen wurde zudem charakteristische Expression von miRNAs gezeigt, was auf eine Subset-spezifische regulatorische Rolle schließen lässt (Kuchen et al., 2010). So ist MicroRNA-29 beispielsweise an der Produktion von Transkriptionsfaktoren der T-box-Familie und Interferon- $\gamma$  in T-Helferzellen beteiligt (Steiner et al., 2011).

Zunächst wurden T-Helferzellen von Mosmann et al. aufgrund ihres spezifischen Zytokinprofils in zwei Linien unterschieden (Mosmann et al., 1986; Mosmann and Coffman, 1989), die als  $T_{H1}$  und  $T_{H2}$  bezeichnet wurden. Während  $T_{H1}$ -Zellen die Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene koordinieren, spielen  $T_{H2}$ -Zellen bei der Abwehr extrazellulärer Parasiten wie Helminthen eine wichtige Rolle. Unangemessene Aktivierung führt dabei zu Autoimmunität (Lazarevic and Glimcher, 2011; Peng, 2006). Für die Differenzierung zu  $T_{H1}$  ist IL-12 notwendig, das von APCs in Folge eines Stimulus des Toll-like Rezeptors (TLR) produziert wird und zusammen mit Signalmolekülen und Transkriptionsfaktoren wie Signal Transducer and Activator of Transcription 4 (STAT4) und T-bet eine durch IFN- $\gamma$ -Produktion charakterisierte funktionelle  $T_{H1}$ -Antwort induziert (Mullen et al., 2001; Szabo et al., 2000). In ähnlicher Weise führen IL-4, STAT6

## EINLEITUNG

---

und GATA-3 zur Differenzierung von  $T_H2$ -Zellen (Hwang et al., 2011; Lee, 2007; Lee et al., 2001).  $T_H2$ -Zellen produzieren IL-4, IL-5 und IL-13.

$T_H17$ -Zellen produzieren IL-17 und IL-22 und sind wichtig für die Bekämpfung extrazellulärer Bakterien und Pilze, besonders auf der Schleimhautoberfläche. Die Differenzierung zu  $T_H17$ -Zellen erfordert den Retinoid related Orphan Receptor (ROR) $\gamma$ t, einen Transkriptionsfaktor der durch TGF- $\beta$  in Kombination mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-6, IL-21 und IL-23 induziert wird, die die Phosphorylierung von STAT3 aktivieren (Harrington et al., 2005; Park et al., 2005).

Follikuläre T-Helferzellen ( $T_{FH}$ ) regulieren B-Zell-Antworten und sind an der Formation von Keimzentren maßgeblich beteiligt (Crotty, 2011). Ihre Differenzierung wird durch IL-6 und IL-21 über STAT3 und Bcl-6 induziert (Poholek et al., 2010). Bcl-6 unterdrückt wiederum die Differenzierung zu anderen T-Zell-Subsets.  $T_{FH}$ -Zellen exprimieren CXCR5, PD-1 und ICOS auf ihrer Zelloberfläche.

$T_{regS}$  exprimieren CD25 und produzieren TGF- $\beta$  und IL-10. Sie sind wichtig, um die Immuntoleranz aufrechtzuerhalten. Neben natürlichen  $T_{regS}$ , die aus dem Thymus stammen, können auch naive T-Zellen in der Peripherie immunsuppressive Eigenschaften erwerben und so zu induzierten  $T_{regS}$  ( $iT_{regS}$ ) werden. Beide  $T_{regS}$ -Subsets exprimieren den Forkhead Transcriptional Repressor Foxp3. Ein Fehlen von Foxp3 führt zu Autoimmunität und fehlenden  $T_{regS}$ , während die Überexpression von Foxp3 zu Immunsuppression führt. Daraus wurde geschlossen, dass Foxp3 der Master-Regulator von  $T_{regS}$  ist.  $T_{regS}$  haben eine äußerst wichtige biologische Rolle, die relative Bedeutung von natürlichen  $T_{regS}$  im Verhältnis zu  $iT_{regS}$  ist aber noch nicht geklärt (O'Shea and Paul, 2010)

### 3.5.2 CD8-T-Zell-Subsets

CD8-T-Zellen haben wie bereits beschrieben nur die Funktion, andere Zellen zu töten. Sie lassen sich daher nicht so grundsätzlich wie CD4-T-Zellen funktionell einteilen. Gedächtniszellen werden bei CD8-T-Zellen aber in verschiedene Populationen unterteilt, die sich stark in Phänotyp, Funktion, Plastizität, Verteilung, Lebensdauer und protektiver Kapazität unterscheiden; sie lassen sich aber nicht strikt durch einzelne Oberflächen-Marker von anderen abgrenzen (Jameson and Masopust, 2009). Die beiden am besten charakterisierten Subpopulationen sind Effektor-T-Gedächtniszellen (effector-memory T cells,  $T_{em}$ ) und zentrale T-Gedächtniszellen (central-memory T cells,  $T_{cm}$ )

(Sallusto et al., 1999).  $T_{cm}$  exprimieren große Mengen der Lymphknoten-Homing-Rezeptoren CD62L und CCR7 und kommen daher vermehrt in Lymphknoten vor, während  $T_{em}$   $CD62L^{lo}$   $CCR7^{lo}$  sind und daher hauptsächlich in nicht-lymphatischem Gewebe vorkommen (Cui and Kaech, 2010).

### 3.6 Die Bedeutung der Dauer des Antigenstimulus

Wie bereits beschrieben sind für die Aktivierung von T-Zellen verschiedene Signale notwendig. Neben Signal 1, das durch Bindung des pMHC-Komplexes an den TCR initiiert wird, spielen Costimulation und Zytokine für die Etablierung einer effizienten Immunantwort eine wichtige Rolle. Dabei ist aber nicht geklärt, welche Auswirkungen diese externen Signale im Einzelnen auf die Prozesse im Inneren der Zelle haben und wie die Differenzierung letztlich gesteuert wird. Auch die Beteiligung anderer Zelltypen kann unter Umständen wichtig sein wie beispielsweise im Falle der CD4-Hilfe bei der Aktivierung von CD8-T-Zellen im Rahmen bestimmter Infektionen. Welche Bedeutung speziell der Dauer des Antigenstimulus in diesem Szenario zukommt, wurde für CD4- und CD8-T-Zellen in verschiedenen experimentellen Systemen mit zum Teil kontroversen Resultaten untersucht. Die Herausforderung des methodischen Ansatzes liegt in der gezielten Beendigung des über den Antigenstimulus vermittelten Signals. Prinzipiell wäre dies durch Trennung von APC und T-Zelle, durch eine Blockade des pMHC oder TCR oder durch die Beendigung der Antigenpräsentation möglich.

#### 3.6.1 *In-vitro*-Studien

##### 3.6.1.1 CD4-T-Zellen

1998 zeigten Iezzi et al., dass die Länge der Antigenpräsentation ein wichtiger Faktor ist, der das weitere Schicksal von T-Zellen bestimmt (Iezzi et al., 1998). In *In-vitro*-Experimenten mit  $HA_{110-119}$ -spezifischen TCR-transgenen CD4-T-Zellen, die entweder mit verschiedenen Peptid-gepulsten APCs oder an den Kulturplatten gebundenen Peptid/MHC-Komplexen stimuliert wurden, waren 20 h ausreichend, um die Proliferation naiver CD4-T-Zellen zu initiieren. Eine weitere *In-vitro*-Studie (Schrum and Turka, 2002) zeigte, dass eine Verlängerung des durch pOVA-gepulste Makrophagen vermittelten Antigenstimulus die Proliferation von  $OVA_{323-339}$ -spezifischen TCR-transgenen

DO11.10-CD4-T-Zellen verstärken kann. Die Ergebnisse von Bajenoff et al. (Bajenoff et al., 2002) mit HEL<sub>46-61</sub>-spezifischen CD4-T-Zellen aus transgenen 3A9-Mäusen deuteten darauf hin, dass die Differenzierung zu Effektorzellen zwar von Antigen- und Zytokin-Verfügbarkeit abhängig ist, die ersten sieben Zellteilungen aber auch antigenunabhängig stattfinden können. Auch die Resultate von Lee et al. (Lee et al., 2002) wiesen in eine ähnliche Richtung. DO11.10-CD4-T-Zellen proliferierten nach 2 h Stimulation mit Peptid antigenunabhängig, weiterer Antigenkontakt erhöhte das Überleben und die Teilungsrate der proliferierenden Zellen aber deutlich. Die Autoren kamen daher zu dem Schluss, dass durch kurzen Antigenkontakt ein Differenzierungsprogramm initiiert wird, das durch weitere Stimulation modifizierbar ist. In einer anderen Publikation (Gett et al., 2003), die CD4- sowie CD8-T-Zellen berücksichtigt, wurde beobachtet, dass sowohl CD4- als auch CD8-T-Zellen einen langen Antigenstimulus benötigen, um eine vollständige Immunantwort zu vollziehen. Diese Studie favorisierte das Modell der progressiven Differenzierung für beide T-Zell-Gruppen.

### 3.6.1.2 CD8-T-Zellen

2001 wurde von Bevan und Fink (Bevan and Fink, 2001) in einem Übersichtsartikel für CD8-T-Zellen die „Autopilot-Hypothese“ aufgestellt. Sie fasst die Daten von drei Studien (Kaech and Ahmed, 2001; Mercado et al., 2000; van Stipdonk et al., 2001) zusammen, die in verschiedenen experimentellen Systemen dasselbe Phänomen zeigten. Ein kurzer Antigenkontakt war demnach ausreichend, um ein transkriptionelles Programm zu initiieren, welches zu Proliferation, Differenzierung und Bildung von Gedächtniszellen führt. Van Stipdonk et al. (van Stipdonk et al., 2001) verwendeten eine konstruierte APC, um einen definierten Antigenstimulus in Kombination mit einem costimulierenden Signal zu generieren. Die adherenten APCs bestanden aus einer embryonalen C57BL/6-Fibroblasten-Zelllinie (MEC-1), die B7-1 und zusätzlich ein Minigen, bestehend aus einer Signal-Sequenz und dem SIINFEKL-Peptid (pSigOVA<sub>257-264</sub>), exprimierten. OT-I-T-Zellen wurden mit den Fibroblasten-APCs für verschiedene Zeitintervalle kokultiviert und anschließend in neue Kulturplatten ohne APCs transferiert. Bereits 2 h Kokultur waren in diesem *In-vitro*-System ausreichend, um die T-Zellen für bis zu sieben Zellteilungen in der Abwesenheit von Antigen zu programmieren. In einer Publikation von 2003 zeigten sie im gleichen System, aber mit adoptivem Transfer der *in vitro* aktivierten T-Zellen, dass 20 h ausreichend aber auch notwendig waren, um dieses Differenzierungspro-

gramm in Gang zu setzen, wohingegen 4 h Aktivierung zu unvollständiger Proliferation und fehlender Effektorfunktion führte (van Stipdonk et al., 2003). Die zweite Publikation, auf die sich die Autopilot-Hypothese stützt, ist von Keach und Ahmed (Kaech and Ahmed, 2001). In Experimenten mit transgenen P14-CD8-T-Zellen, die spezifisch für das GP<sub>33-41</sub>-Peptid des Glycoproteins aus dem Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV) sind, wurde gezeigt, dass 24 h *In-vitro*-Stimulation ausreichend sind für die *In-vivo*-Expansion von CD8-Effektorzellen, die Kontraktion und die Bildung von Gedächtniszellen. Eine weitere *In-vitro*-Studie zeigte in Experimenten mit p60<sub>449-457</sub>-spezifischen CD8-T-Zellen aus WP11.12-transgenen Mäusen, dass bereits 2,5 h *In-vitro*-Stimulation mit Makrophagen-ähnlichen Zellen (RAW264.7) ausreichend waren, um bis zu acht Zellteilungen zu programmieren (Wong and Pamer, 2001).

Curtsinger et al. (Curtsinger et al., 2003) haben dagegen gezeigt, dass 6 bis 18 h *In-vitro*-Stimulation von CD8-T-Zellen in Gegenwart von IL-12 nicht ausreichend sind, um optimale Expansion und Entwicklung von Effektorfunktion zu initiieren. Wurde die Stimulation auf 64 h erhöht, zeigte sich ein extremer Anstieg in Zellzahl und Effektorfunktion.

### 3.6.2 *In-vivo*-Studien

#### 3.6.2.1 Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Verschiedene Studien (Corbin and Harty, 2004; Mercado et al., 2000; Prlic et al., 2006; Tseng et al., 2009; Williams and Bevan, 2004) wurden in einem bakteriellen System einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* (LM) generiert. Die Terminierung der Antigenpräsentation wurde hier meist durch Behandlung mit Ampicillin also durch die Eliminierung des Pathogens und die Beendigung der Infektion erreicht.

Die dritte Publikation, auf die sich die „Autopilot-Hypothese“ (Bevan and Fink, 2001) stützt, zeigt Daten, die in diesem bakteriellen System mit LM generiert wurden (Mercado et al., 2000). LLO<sub>91-99</sub>-spezifische CD8-T-Zellen wurden während der ersten 24 h der bakteriellen Infektion aktiviert, proliferierten und entwickelten Effektorfunktion auch nach Beendigung der Infektion. In einer Publikation von Williams und Bevan (Williams and Bevan, 2004) wurden CD4- und CD8-T-Zellen verglichen, mit dem Resultat, dass CD4-Immunantworten einen längeren Antigenstimulus für vollständige Ausprägung von Effektorfunktion benötigten als CD8-Immunantworten. Eine ähnliche Studie (Corbin and Harty, 2004) zeigte nach LM-Infektion entsprechende Resultate für CD4-

und CD8-T-Zellen. Während LLO<sub>190-201</sub>-spezifische CD4-T-Zellen 48 h Infektion ohne Behandlung mit Ampicillin benötigten, um eine vollständige Immunantwort an d7 zu etablieren, war für OVA<sub>257-264</sub>-spezifische CD8-T-Zellen 24 h unmodifizierte Infektion ausreichend, um ein vollständige Immunantwort zu entwickeln.

Durch die antibiotische Beseitigung des Pathogens sind die Auswirkungen der Beendigung von Antigenstimulus und Infektion an sich nicht zu trennen. Um die Infektion nicht gleichzeitig mit dem Antigenstimulus beenden zu müssen, verwendeten Prlic et al. (Prlic et al., 2006) ein experimentelles System, in dem sie die Antigenpräsentation durch Depletion der spezifischen DCs beendeten. Optimale Expansion von CD8-T-Zellen wurde beobachtet, wenn Antigen 54 h (DT-Behandlung nach 48 h) verfügbar war. Dagegen waren schon 7 h (DT-Behandlung nach 1 h) ausreichend, um Effektorfunktion wie Zytokinproduktion zu entwickeln. In einer neueren Studie (Tseng et al., 2009) wurde dagegen bei ähnlichem Versuchsaufbau beobachtet, dass die primäre Expansion von sowohl CD4- als auch CD8-T-Zellen nach Gabe von Ampicillin reduziert war, sogar, wenn das Ampicillin erst 60 h nach der Infektion injiziert wurde.

### **3.6.2.2 Aktivierung mit Virus-ähnlichen Partikel (VLPs)**

In einer *In-vivo*-Studie (Storni et al., 2003) wurde in einem experimentellen System mit Virus-ähnlichen Partikeln (VLPs) beobachtet, dass CD8-T-Zellen Antigenkontakt für einige Tage benötigten, um IFN- $\gamma$  zu produzieren. Diese Studie widerspricht damit der „Autopilot-Hypothese“ der programmierten Differenzierung von CD8-T-Zellen.

### **3.6.2.3 Blockierung des pMHC mit Antikörpern**

In einer Studie von Yarke et al. (Yarke et al., 2008) mit TCR-transgenen TEa-T-Zellen wurde für CD4-T-Zellen Antigenabhängigkeit und progressive Differenzierung gezeigt. TEa-T-Zellen exprimieren Thy1.1 (CD90.1) und V $\beta$ 6 und erkennen das I-E<sup>d</sup>  $\alpha$ -Kette-Peptid 52-68 (pE $\alpha$ )<sub>3</sub> im Kontext mit I-A<sup>b</sup>. Nach Aktivierung der T-Zellen mit E $\alpha$ RFP/LPS für 36 h wurde der pMHC-blockierende Antikörper Y-Ae-mAb injiziert, um jede weitere Interaktion zwischen TCR und pMHC zu unterbinden und so den Antigenstimulus zu beenden. Beobachtet wurde antigenabhängige Proliferation.

Erst kürzlich wurde die Frage, inwiefern die Dauer der Antigenverfügbarkeit eine Rolle spielt, hinsichtlich der Expansion und Differenzierung zu Gedächtniszellen für CD4- und

CD8-T-Zellen parallel mit den zwei spezifischen pMHC-blockierenden Antikörpern Y-Ae und 25-D.1.16 untersucht (Blair et al., 2011). Diese wurden verwendet, um den TCR-Stimulus von TEa- bzw. OT-I-T-Zellen während der primären und der sekundären Antwort einer Vesicular Stomatitis Virus (VSV)-Infektion *in vivo* zu verschiedenen Zeitpunkten zu terminieren, um dann den Einfluss auf die Expansion zu untersuchen. Für die Primärantwort wurde sowohl für CD4- als auch CD8-T-Zellen Antigenabhängigkeit gezeigt, wobei CD4-T-Zellen 3 - 4 d und CD8-T-Zellen sogar 4 -5 d Antigenverfügbarkeit für optimale Expansion benötigten. Die Studie widerspricht also der „Autopilot-Hypothese“. In einer früheren Studie der gleichen Gruppe wurde für CD4-T-Zellen bereits in Experimenten mit demselben Y-Ae-Antikörper maximale Expansion, aber defektive Effektordifferenzierung und Entwicklung zu Gedächtniszellen gezeigt (Blair and Lefrancois, 2007).

### **3.6.2.4 Doxycyclin-regulierbare Antigenpräsentation**

Durch die Doxycyclin-regulierbare Expression eines MCC-Epitops im Kontext mit MHC-I wurde in unserer Gruppe *in vivo* gezeigt, dass die Differenzierung von transgenen CD4-T-Zellen (AND) während der gesamten Expansionsphase von kontinuierlichem Antigenkontakt abhängig war und CD4-T-Zellen in Abwesenheit von Antigen die Proliferation beendeten (Obst et al., 2005).

## **3.7 Ziel der Arbeit**

Aus der Literatur lässt sich entnehmen, dass CD4- und CD8-T-Zellen hinsichtlich ihrer Antigenabhängigkeit Unterschiede aufweisen. Während in den meisten Studien mit CD4-T-Zellen antigenabhängige Proliferation und progressive Differenzierung beobachtet wurde (Blair et al., 2011; Corbin and Harty, 2004; Gett et al., 2003; Obst et al., 2005; Schrum and Turka, 2002; Williams and Bevan, 2004; Yarke et al., 2008), zeigten nur einzelne Publikationen antigenunabhängige Proliferation von CD4-T-Zellen (Bajenoff et al., 2002; Lee et al., 2002).

Bei CD8-T-Zellen wurde in einigen Studien eine frühe Programmierung der weiteren Differenzierung durch einen kurzen Antigenkontakt im Sinne der „Autopilot-Hypothese“ beobachtet (Corbin and Harty, 2004; Kaech and Ahmed, 2001; Mercado et al., 2000; Prlic et al., 2006; van Stipdonk et al., 2003; van Stipdonk et al., 2001; Williams and Bevan,

## EINLEITUNG

---

2004; Wong and Pamer, 2001). Es gibt aber wie bereits dargestellt auch diverse Studien mit gegensätzlichen Daten (Blair et al., 2011; Curtsinger et al., 2003; Gett et al., 2003; Johansen et al., 2008; Storni et al., 2003; Tseng et al., 2009), die auch für CD8-T-Zellen antigenabhängige Proliferation beschreiben. Zudem existieren nur wenige Studien, die CD4- und CD8-T-Zellen direkt vergleichen (Blair et al., 2011; Corbin and Harty, 2004; Gett et al., 2003; Williams and Bevan, 2004).

Um die Bedeutung der Dauer des Antigenstimulus weiter klären zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit drei verschiedene experimentelle Systeme verwendet, um TCR-transgene und polyklonale CD4- und CD8-T-Zellen im direkten Vergleich hinsichtlich ihrer Antigenabhängigkeit parallel zu untersuchen. Die Antigenpräsentation war entweder in transgenen Mäusen durch Gabe von Doxycyclin an- und abschaltbar oder wurde durch Depletion der antigenspezifischen DTR<sup>+</sup> DCs mit Diphtherie-Toxin beendet. In einem weiteren methodischen Ansatz wurde die Differenzierung von TCR-transgenen und polyklonalen CD4- und CD8-T-Zellen *in vivo* nach *In-vitro*-Aktivierung mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 untersucht. Dabei wurde gezeigt, inwieweit die Proliferation und Differenzierung von CD8- im Vergleich zu CD4-T-Zellen durch einen transienten Antigenstimulus programmierbar ist. Durch vergleichende Analyse des Transkriptoms wurden Unterschiede in der Genexpression bzw. -regulation von transient stimulierten CD4- und CD8-T-Zellen untersucht, und so Hinweise auf den zugrundeliegenden molekularen Mechanismus gefunden, der es CD8-T-Zellen ermöglicht, in der späten Phase der Expansion in Abwesenheit von Antigen zu proliferieren.

## 4 MATERIAL UND METHODEN

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Chemikalien

<b>Produkt</b>	<b>Bezugsquelle</b>
2-Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Bio&SELL (Feucht)
Brefeldin A	Applichem (Darmstadt)
BSA	Roth (Karlsruhe)
CFDA SE Cell Tracer Kit	Invitrogen Molecular Probes
DAPI	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
DMEM	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
DNase I	Roche Diagnostics (Penzberg)
Doxycylin-Hyclat	Sigma-Aldrich (St-Louis, MO)
Ethidiumbromid - 1% Lösung	Applichem (Darmstadt)
FCS	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Fixation Buffer	Biolegend (San Diego, CA)
Gene Ruler Ladder Mix	Fermentas (St. Leon-Rot)
HEPES Buffer (1M)	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
Ionomycin-Calciumsalz	Applichem (Darmstadt)
L-Glutamin	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
Liberase Cl	Roche Diagnostics (Penzberg)
LSM1077	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
MEM NEAA (100x)	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
Neomycinsulfat	Applichem (Darmstadt)
PBS	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
Permeabilization Wash Buffer (10x)	Biolegend (Aachen)
Phenol equilibriert	Applichem (Darmstadt)
Phorbol-12-Myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich (Seelze)
Polymyxin-B-Sulfat	Applichem (Darmstadt)

## MATERIAL UND METHODEN

---

<b>Produkt</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Proteinase K	Diagonal (Münster)
Random Hexamer Primer	Fermentas (St. Leon-Rot)
RBC Lysis Buffer 10X	Biolegend (San Diego, CA)
rmIL-7	Immunotools (Friesoythe)
RPMI 1640 without L-Glutamine, with	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
Phenol Red	
SuperScript III Rev. Transkriptase	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Taq DNA Polymerase	Diagonal (Münster)
TRizol	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Trypanblau	Roth (Karlsruhe)
Volvic	Danone Waters Deutschland (Frankfurt)

### 4.1.2 Pufferlösungen und Medien

<b>Agarosegel-Ladepuffer</b>	250 mg Orange G 30 ml 30 % Glycerin 70 ml H <sub>2</sub> O
<b>CFSE-Medium</b>	PBS 0,1 % BSA
<b>FACS-Medium</b>	DMEM (ohne Phenolrot) 1 % BSA 10 mM Hepes
<b>GeneRuler</b>	100 µl Marker 700 µl TAE 200 µl Orange G-Lösung
<b>MACS-Puffer (entgast)</b>	PBS 1 mM EDTA 0,5 % BSA
<b>Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol</b>	25 ml Phenol pH 7,5 - 8 24 ml Chloroform 1 ml Isoamylalkohol; 5 min bei 2.000 rpm zentrifugieren
<b>Proteinkinase K-Puffer</b>	10 mM TRIS, pH 8 5 mM EDTA 1 % SDS 0,3 M NaOAc, pH 8 + Proteinkinase K (200 µg/ml)

## MATERIAL UND METHODEN

---

<b>TAE-Puffer (50x)</b>	242 g TRIS 57,1 ml 99 % Essigsäure 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8) mit H <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen
<b>TE</b>	1 M TRIS, pH 7,6 500 mM EDTA
<b>Zellkulturmedium</b>	RPMI 1640 (ohne L-Glutamin, mit Phenolrot) 10 % FCS (v/v) 5 mM L-Glutamin 5 µM 2-Mercaptoethanol 1 % Penicillin + Streptomycin (v/v) MEM NEAA

### 4.1.3 Verbrauchsmaterialien

<b>Produkt</b>	<b>Bezugsquelle</b>
FACS-Röhrchen (5 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Filterpipettenspitzen TipOne	StarLab (Hamburg)
Insulinspritzen Microfine (1 ml, U 100)	BD Falcon (Lincon Park, NJ, USA)
MACS Anti-Biotin MicroBeads	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
MACS LS Trennsäulen	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Objektträger, geschnitten, Mattrand	Diagonal (Münster)
PCR-Platten 96-well, 0,2 µl; -Reaktionsgefäße	Diagonal (Münster)
Pipettenspitzen (weiß und blau)	Peske (Aindlingen-Arnhofen)
PP-Röhrchen (15 und 50 ml)	Sarstedt/Greiner/BD
Reagiergefäße (1,5 und 2 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Reaktionsröhrchen (5 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Serologische Pipetten (2, 5, 10 und 25 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Stericup & Steritop	Millipore (Bedford, MA, USA)
Sterilfilter Millex-GP 33 mm, 0,22 µm	Millipore (Bedford, MA, USA)
Tissue culture plates, 96-well, rb	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellsiebe (100 µm)	BD Falcon (Lincon Park, NJ, USA)

## MATERIAL UND METHODEN

### 4.1.4 Antikörper

Spezifität	Konjugat	Klon	Bezugsquelle
CD4	PE	RM4-5	eBioscience (San Diego, CA)
CD4	PerCP Cy5.5	Gk1.5	eBioscience (San Diego, CA)
CD4	Al647	Gk1.5	eBioscience (San Diego, CA)
CD4	bio	RM4-5	Biolegend (San Diego, CA)
CD8	PE	53-6.7	Biolegend (San Diego, CA)
CD8	PerCP	53-6.7	Biolegend (San Diego, CA)
CD8	bio	53-6.7	Biolegend (San Diego, CA)
CD11b	bio	M1/70	Biolegend (San Diego, CA)
CD11c	bio	N418	Biolegend (San Diego, CA)
CD16/32	-	93	eBioscience (San Diego, CA)
CD44	FITC	IM7	eBioscience (San Diego, CA)
CD45.1	FITC	A20	Biolegend (San Diego, CA)
CD45.1	AL647	A20	Biolegend (San Diego, CA)
CD45.1	Pacific Blue	A20	Biolegend (San Diego, CA)
CD45.1	bio	A20	Biolegend (San Diego, CA)
CD45.2	Al647	104	Biolegend (San Diego, CA)
CD45.R	PE-Cy5.5	RA3-6B2	Biolegend (San Diego, CA)
CD45.R	bio	RA3-6B2	Biolegend (San Diego, CA)
CD49b	bio	DX5	Biolegend (San Diego, CA)
CD62L	PE	MEL-14	Biolegend (San Diego, CA)
CD69	PE	H1.2F3	Biolegend (San Diego, CA)
CD90.1	PerCP	OX7	Biolegend (San Diego, CA)
CD90.2	PE	30-H12	Biolegend (San Diego, CA)
GR-1	bio	RB6-85C	Biolegend (San Diego, CA)
IFN- $\gamma$	APC	XMG1.2	Biolegend (San Diego, CA)
TCR- $\beta$	Al488	H57-597	Biolegend (San Diego, CA)
TER119	bio	TER-119	Biolegend (San Diego, CA)
V $\alpha$ 2	FITC	CL7213F	Cedarlane (Burlington, Ontario, Canada)
V $\beta$ 3	FITC	Kj25	N. Asinovski, C. Benoist, D. Mathis (Harvard Medical School, Boston, MA, USA)
V $\beta$ 5.1/5.2	PE	MR9-4	BD Biosciences (San Jose, CA)

## MATERIAL UND METHODEN

---

### 4.1.5 Oligonukleotide

Für die Genotypisierung der transgenen Mäuse wurden folgenden Oligonukleotide von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen:

Name	Sequenz (5'-3')	Typisierung von
R083	CTGGGAGTTGAGCAGCCTAC	li-rTA (mit R084)
R084	CTCCTGTTCTCCAATACGC	li-rTA (mit R083)
R0230	GACGCTTGGTAGCCTGTTTC	TIM (mit R0231)
R0231	GTCTCTGTCCTGGTGGCTCT	TIM (mit R0230)
R0237	AGCTGACCCTGAAGTTCATCTG	DTR (GFP, mit 238)
R0238	CATGATATAGACGTTGTGGCTGTT	DTR (GFP, mit 237)
R0241	GCCACCATGAAGCTGCTGCCG	DTR-1 (Jung 2002)
R0242	TCAGTGGGAATTAGTCATGCC	DTR-2 (Jung 2002)
R0259	GGACAATGAGCATGTTGGTG	Act-Ova (mit R0260)
R0260	TACCACCTCTCTGCCTGCTT	Act-Ova (mit R0259)
R0261	TGCTGTTGCCTGATGAAGTC	Act-Ova (mit R0262)
R0262	GAATGGATGGTCAGCCCTAA	Act-Ova (mit R0261)
R0266	TTCCCGCAGAACTCAGAAGT	TSO (mit R0248)
R0267	TGTAAGCTCTTGGGGAATGG	TSO (mit R0268, 288)
R0268	TGGAGGGTGTCCGGAATAGAC	TSO (mit R0267, 284, 285)
R0280	CCTGTACTGGCACGTGAAGA	li-rTA (mit R0281)
R0281	GTCTCAGAAGTGGGGGCATA	li-rTA (mit R0280, 282, 283)
R0282	GGACAGGCATCATACCCACT	li-rTA (mit R0281)
R0283	TCTCAGAAGTGGGGGCATAG	li-rTA (mit R0281)
R0284	GCCTTTGACACCTACCAGGA	TSO (mit R0268)
R0285	ATCCAGGCTTTTTGACAACG	TSO (mit R0268)
R0286	CCTAAAATCCCTTTGGCACA	TSO (mit R0287)
R0287	CGTTGTCAAAAAGCCTGGAT	TSO (mit R0286)
R0288	GCATCCACTCACGGATTTCT	TSO (mit R0267)
R0296	ATCTTCCAGTTCACGCCATC	TIM/Ii-MCC (mit R0297)
R0297	CGCCTAGACAAGCTGACCAT	TIM/Ii-MCC (mit R0296)
R0298	AGAGAGCCAGAAAGGTGCAG	TIM/Ii-MCC (mit R0299)
R0299	AGCAGATGCATCACATGGTC	TIM/Ii-MCC (mit R0298)

## MATERIAL UND METHODEN

---

### 4.1.6 Geräte

Gerät	Hersteller
Brutschrank	Heraeus (Hanau)
Elektrophorese Power Supply (EPS 200)	Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)
Elektrophorese-Kammer	Werkstatt, Institut für Immunologie
FACSAria	BD Biosciences (San Jose, CA)
FACSCalibur, FACSCanto II	BD (Franklin Lakes, NJ, USA)
Feinwaage (EMB 600-2)	Kern (Balingen-Frommern)
Geldokumentationssystem	Intas (Göttingen)
Magnetrührer	Heidolph (Schwabach)
Mikroskop Labovert FS	Leitz (Wetzlar)
pH-Meter inolab	WTW (Weilheim)
Pipetten	Gilson (Middleton, WI, USA)
Pipettierhilfe pipetboy comfort	IBS Integra biosciences (Fernwald)
Sterilbank HeraSafe	Heraeus (Hanau)
Thermocycler T1	Biometra (Göttingen)
Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge 5417C	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge Biofuge 13	Heraeus (Hanau)
Transferpette S-12	Brand (Wertheim)
Vortex-Genie2	Bender & Hoben AG (Zürich, Schweiz)
Wasserbad MT/2	Lauda (Lauda-Königshofen)
Zentrifuge Rotanta 46 RS	Hettich (Tuttlingen)

### 4.1.7 Software

Software	Anwendung
CellQuest Pro 5.2.1 (BD, Franklin Lakes, NJ, USA)	BD FACSCalibur
FACSDiva 6.1.3 (BD, Franklin Lakes, NJ, USA)	BD FACSCanto II
FACSDiva 4.1 (BD, Franklin Lakes, NJ, USA)	BD FACSAria
FlowJo 8.8.6 für Mac (TreeStar, Ashland, OR, USA)	Auswertung FACS-Daten
GenePattern (Broad Institute, Cambridge, MA, USA)	Auswertung Microarray-Daten
Prism 5.0b (GraphPad, La Jolla, CA, USA)	Statistische Auswertung

### 4.2 Mauslinien

Alle Tiere wurden im Tierstall des Instituts für Immunologie der LMU München gehalten. Für die vorliegende Arbeit wurden folgende Mauslinien verwendet.

#### 4.2.1 Wildtypmäuse

##### 4.2.1.1 B10.BR (B10.BR- $H2^k$ $H2-T18^a$ /SgSn)

Alle Mauslinien, die für Experimente mit CD4-T-Zellen verwendet wurden (AND, TIM und Ii-MCC) haben den gleichen genetischen Hintergrund B10.BR (B10.BR- $H2^k$   $H2-T18^a$ /SgSn) gemäß <http://www.informatics.jax.org/mgihome/other/citation.shtml>, Mouse Genome Database) und MHC-Haplotyp. In den Ursprungstamm C57BL/10SnSg wurde  $H-2^k$  aus C57BR eingekreuzt. Die Mauslinie wurde 2006 von Jackson Laboratory bezogen und seither im Institut für Immunologie der LMU München gehalten.

##### 4.2.1.2 B6 (C57BL/6J)

Alle Mauslinien, die für Experimente mit CD8-T-Zellen verwendet wurden (OT-I, TSO und Act-OVA) haben B6 (C57BL/6) als genetischen Hintergrund. B6-Mäuse dienen daher als Wildtyp-Kontrollen.

#### 4.2.2 TCR-transgene Mäuse

##### 4.2.2.1 AND

AND (Tg(TcrAND)53Hed)-Mäuse wurden als CD4-T-Zell-Donoren verwendet. Die T-Zellen tragen einen TCR, der von den beiden ursprünglich koinjizierten Konstrukten der  $V\alpha 11^+$  TCR- $\alpha$ -Kette aus T-Zell-Klon AN6.2 und der  $V\beta 3^+$  TCR- $\beta$ -Kette aus T-Zell-Klon 5C.C7 codiert werden (Kaye et al., 1989). Beide Konstrukte sind spezifisch für das carboxyterminale Fragment des Tauben- bzw. Motten-Cytochrom C (PCC bzw. MCC) und  $H-2E^k$ . Die  $\alpha$ -Kette dieses TCR unterscheidet sich in einer Aminosäure (Alanin statt Threonin an Position 99) von der  $\alpha$ -Kette des TCR aus Tg(TcraTcrbAD10)1Hed-Mäusen. Die T-Zellen von AND-Mäusen tragen fast ausschließlich den transgenen TCR, da sie im Thymus nicht die V(D)-J Rekombination durchlaufen müssen und das Rearrangement der endogenen TCR-Gene effizient unterdrücken können. Das Verhältnis von CD4<sup>+</sup>- zu CD8<sup>+</sup>-

einzelpositiven Thymozyten verschiebt sich in AND-transgenen Mäusen auf 40:1 im Vergleich zu 2:1 im Wildtyp. Diese starke Erhöhung der Anzahl an CD4<sup>+</sup>-CD8<sup>+</sup>-T-Zellen ist durch eine verfrühte Expression des TCR, Allelexklusion insbesondere am  $\beta$ -Locus und effiziente positive Selektion zu erklären.

### 4.2.2.2 OT-I

OT-I (Tg(TcraTcrb)1100Mjb)-Mäuse wurden analog zu AND als CD8-T-Zell-Donor verwendet. Diese Mäuse tragen zwei ursprünglich koinjizierte Konstrukte, die für die TCR- $\alpha$ -Kette V $\alpha$ 2 (Tcra-V2, Tcra-J(alpha26)) und die TCR- $\beta$ -Kette V $\beta$ 5 (Tcrb-V5, Tcrb-D(beta2)) codieren (Hogquist et al., 1994). Der transgene TCR erkennt spezifisch das OVA<sub>257-264</sub>-Peptid (SIINFEKL) im Kontext von H-2K<sup>b</sup>. Die cDNA der rearrangierten  $\alpha$ -Kette ist spezifisch für Ovalbumin und wird unter der Kontrolle eines 2-kb-Fragments des H-2K<sup>b</sup>-Promotors exprimiert. Das Konstrukt der  $\beta$ -Kette besteht aus einem genomischen Fragment, das für die  $\beta$ -Kette codiert, und endogenen Promotor-Regionen aus dem T-Zell-Klon B3. Fast alle T-Zellen dieser Mäuse tragen den transgenen TCR, weil die Umlagerung weiterer TCR-Gene durch das Transgen verhindert wird.

### 4.2.2.3 Ursprung der kongenen Marker

AND und OT-I wurden mit entsprechenden B6-Wildtypmäusen gekreuzt, die einen der beiden kongenen Marker CD45.1 oder CD90.1 tragen. Ursprünglich stammen die für die kongenen Marker codierenden Gene aus B6.SJL-Ptprca Pepcb/BoyJ bzw. B6.PL-Thy1a/CyJ (The Jackson Laboratory).

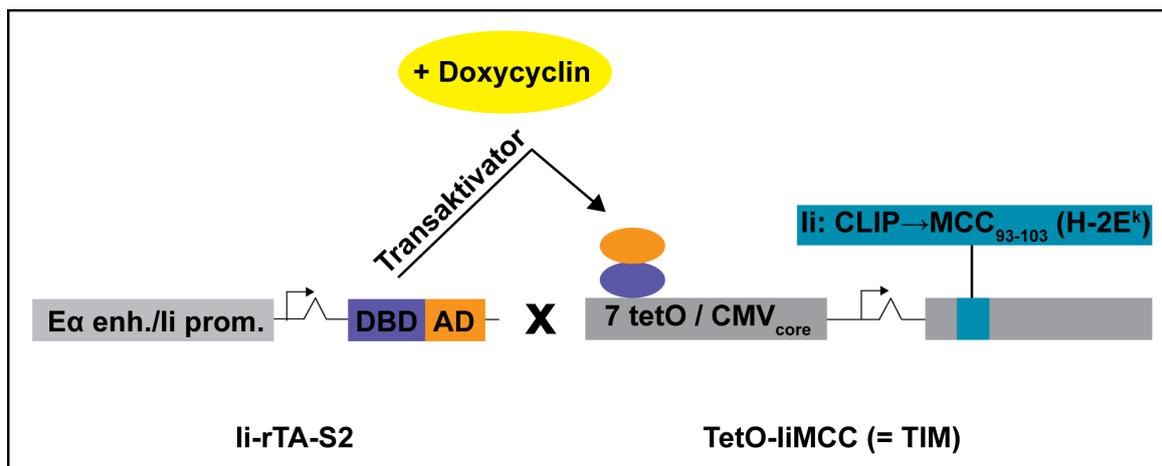
## 4.2.3 Doppelt-transgene Mäuse mit Dox-regulierbarer Antigenexpression

### 4.2.3.1 Ii-rtTA x TIM (TIM)

Ii-rtTA x TIM-Mäuse exprimieren in Abhängigkeit von Doxycylin (Dox) MCC<sub>93-103</sub> auf H-2E<sup>k</sup> und wurden als Rezipient für AND-T-Zellen verwendet. Sie tragen zwei Transgene, Ii-rtTA und TIM (TetO-Ii-MCC, tet-regulierbare Invariante Kette mit MCC; siehe Abb. 4-1). Ii-rtTA (Tg(Cd74-rtTA)#Doi) codiert für einen reversen Tetracyclin-Transaktivator, rTA (Urlinger et al., 2000), der unter der Kontrolle eines Hybrid-Elements aus

## MATERIAL UND METHODEN

H2-E $\alpha$ -Enhancer und CD74-Promotor (van Santen et al., 2000) konstitutiv in allen MHC-II-positiven Zellen exprimiert wird (Obst et al., 2005). Der Transaktivator bindet in Anwesenheit von Dox reversibel an die Tetracyclin-Operator-Sequenz (tetO) des zweiten Transgens TIM (Tg(tetO-Cd74/MCC)#Doi), das daraufhin transkribiert wird. Sieben tetO-Sequenzen wurden mit dem CMV minimal promoter kombiniert, um die Expression des TIM-Konstruktes in Abhängigkeit von Dox regulieren zu können (Gossen and Bujard, 1992). Der ORF besteht aus einer Ii-cDNA und einem Segment cDNA aus Mottencytrochrom C, das für MCC<sub>93-103</sub> codiert und die CLIP-Region (vgl. 3.2.4) der Ii ersetzt, die für die Aminosäurereste 88 bis 98 codiert (van Santen et al., 2004). Dadurch wird das MCC-Peptid effektiv in den MHC-II-Beladungsweg eingeschleust, ohne mit endogenem Ii zu konkurrieren. Die Expression des Antigens korreliert dabei streng mit der Gabe von Dox im Trinkwasser und ist dadurch an- und abschaltbar. Aus ungeklärten Gründen wird TIM hauptsächlich in DCs, aber nicht in B-Zellen exprimiert (Obst et al., 2005).



**Abb. 4-1 Überblick über das doppelt-transgene System aus Ii-rTA und TIM zur Dox-induzierbaren Expression des MHC-II-restringierten Epitops MCC<sub>93-103</sub>.** Gezeigt ist das Konstrukt von Ii-rTA (Invariante Kette mit reversem Transaktivator) und TIM (TetO-Ii-MCC, tet-regulierbare Invariante Kette mit MCC). Ii-rTA besteht aus dem Promotor der invarianten Kette und dem E $\alpha$ -Enhancer sowie der für den reversen tetO-Transaktivator (rTA) codierenden Sequenz. TIM besteht aus der Transaktivator-Zielsequenz (7 tet-O), dem CMV-Promotor und der für Ii mit MCC<sub>93-103</sub> codierenden Sequenz. In Anwesenheit von Doxycyclin bindet rTA an die tet-Operator-Sequenz (tetO) und induziert die Transkription der Invarianten Kette mit eingebautem MCC<sub>93-103</sub>.

### 4.2.3.2 li-rTA x TSO (TSO)

Die doppelt-transgene Mauslinie li-rTA x TSO (TSO) wurde als Empfänger für OT-I-T-Zellen verwendet. Sie wurde vor Beginn dieser Arbeit zur Dox-induzierbaren Expression eines MHC-I-restringierten OVA-Peptids generiert. Analog zu TIM wird auch li-rTA als Transaktivator verwendet. Bislang wurden keine Daten aus Experimenten mit dieser Mauslinie publiziert. Daher wird sie im Kapitel *Ergebnisse* näher beschrieben (siehe 5.1.2; Abb. 5-4).

### 4.2.4 Transgene Mäuse mit konstitutiver Antigenexpression

#### 4.2.4.1 li-MCC (x CD11c-DTR)

li-MCC-transgene Mäuse (Tg(H2-Ea-Cd74/MCC)37GNnak) exprimieren ein Fusionsprotein aus MCC<sub>88-103</sub> und H-2E<sup>k</sup> unter der Kontrolle eines H-2E<sup>α</sup>-Promotors (Yamashiro et al., 2002). Alle MHC-II-positiven Zellen exprimieren den Peptid-MHC-Komplex dadurch konstitutiv. Im Gegensatz zur Expression von MCC<sub>93-103</sub> in li-rTA x TIM-Mäusen wird das Transgen in li-MCC-Mäusen in B-Zellen vergleichbar stark wie in DCs exprimiert (Han et al., 2010).

Die Mauslinie li-MCC wurde mit CD11c-DTR (Tg(Itgax-DTR/EGFP)57Lan) (Jung et al., 2002) gekreuzt, um Mäuse zu generieren, die DCs ausbilden, die einen Diphtherietoxinrezeptor (DTR) tragen und somit mit Diphtherietoxin (DT) spezifisch depletiert werden können. Das Transgen ist eine Fusion aus dem DTR (Affe) und GFP unter der Kontrolle des murinen DC-spezifischen CD11c-Promotors. Immunohistochemische und durchflusszytometrische Analysen zeigen, dass das Transgen spezifisch auf DCs in der Milz exprimiert wird (Jung et al., 2002).

#### 4.2.4.2 Act-mOVA (x CD11c-DTR)

Act-mOVA (Tg(CAG-OVA)916Jen) ist eine transgene Mauslinie, die konstitutiv das Ovalbumin-Protein aus dem Huhn membranständig exprimiert (Ehst et al., 2003). Das Transgen besteht aus der cDNA des Hühner-Ovalbumins, der die 5' Leader-Sequenz des H2-K<sup>b</sup>-Gens aus der Maus vorausgeht. Die Expression wird durch den Beta-Actin-Promotor aus dem Huhn kontrolliert, der unter der Kontrolle des CMV immediate early enhancer steht. Die Ovalbumin-Expression wurde auf Zellen aller Organe detektiert.

Act-mOVA-Mäuse wurden analog zu Ii-MCC mit CD11c-DTR (siehe 4.2.4.1) gekreuzt, um Mäuse mit Antigen präsentierenden DCs zu generieren, die durch DT depletierbar sind.

### 4.3 Methoden

#### 4.3.1 Molekularbiologische Methoden

##### 4.3.1.1 Isolierung genomischer DNA aus Gewebeproben

Um die transgenen Mäuse zu typisieren, wurde zunächst die genomische DNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert. Dazu wurde den zu typisierenden Mäusen ein 1-2 mm großes Stück am Schwanzende abgeschnitten, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 250 µl Proteinkinase K-Puffer (PK-Puffer) bei 37 °C im Brutschrank (ON) oder bei -55 °C im Thermomixer (> 4 h) verdaut. Anschließend wurde den Ansätzen 250 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (pH > 6.6) hinzugefügt. Die Proben wurden mehrmals geschüttelt und 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit 1 ml Ethanol (EtOH) überführt. Durch Invertieren wurde die DNA gefällt, mit einer Pipettenspitze isoliert und in ein PCR-Gefäß mit 100 µl TE überführt.

##### 4.3.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Typisierung der transgenen Mäuse wurde die aus den Schwanzspitzen isolierte DNA in einer PCR eingesetzt, um spezifische DNA-Sequenzen zu amplifizieren und so das entsprechende Transgen nachzuweisen. Durch die Verwendung zweier spezifisch bindender Oligonukleotid-Primer (vgl. 4.1.5), die die zu amplifizierende DNA-Sequenz flankieren, lassen sich DNA-Bereiche hochspezifisch mittels einer hitzestabilen DNA-Polymerase vervielfältigen. Durch mehrere aufeinanderfolgende temperaturabhängige Denaturierungs-, Primeranlagerungs- und Polymerisationsschritte kommt es zu einer exponentiellen Zunahme des gewünschten Fragments, dessen Enden und damit auch dessen Länge durch die Primer festgelegt sind. Anschließend können die PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese aufgetrennt werden und die für das jeweilige Transgen spezifischen DNA-Fragmente aufgrund ihrer spezifischen Länge identifiziert werden.

## MATERIAL UND METHODEN

---

PCR-Reaktionsansatz (1x):	PCR-Puffer (1x)	(2,5 µl)
	0,5 M Betain	(2,5 µl)
	0,5 µM Primer1	(1,25 µl)
	0,5 µM Primer2	(1,25 µl)
	0,2 mM dNTPs	(0,5 µl)
	0,125 U/r Taq	(0,125 µl)
	H <sub>2</sub> O	(15,875 µl)
	DNA (in TE)	(1 µl)

Zur Amplifikation im Thermocycler wurden die folgenden Bedingungen gewählt:

- 1) 5 min 95 °C
  - 2) 30 sek 95 °C
  - 3) 45 sek 55 °C
  - 4) 45 sek 72 °C
  - 5) 5 min 72 °C
  - 6) 10 sek 20 °C (anschließend Aufbewahrung bei RT)
- zurück zu 2),  
insgesamt 35 Zyklen
- 

### 4.3.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung und Identifizierung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Dazu wurden Horizontalgele (150 ml TAE-Puffer, 1,5 - 2 % Agarose) mit 0,005 % Ethidiumbromidlösung verwendet. Als Längenstandard wurde 100 bp-DNA Ladder auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 120 Volt in einer Elektrophorese-Kammer. Die Auswertung der Gele erfolgte unter UV-Licht mit einem Geldokumentationssystem.

### 4.3.1.4 Isolierung von Total-RNA aus primären Zellen

3 - 8 x 10<sup>4</sup> CD4- bzw. CD8-T-Zellen wurden direkt in 1 ml TRIzol sortiert und bis zur Isolierung der RNA bei - 20 °C gelagert. Nach dem Auftauen wurden 200 µl Chloroform pro Ansatz zugegeben, 15 sek geschüttelt und 2 - 3 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben 15 min bei 12.000 rpm und 2 - 8 °C zentrifugiert. Die obere, die RNA enthaltende Phase wurde in ein neues Reagiergefäß transferiert und 500 µl Isopropanol hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei RT wurde 10 min bei 2 - 8 °C

zentrifugiert, der Überstand verworfen und mit 70 %igem EtOH gewaschen. Nach Luft-trocknung wurde die isolierte RNA in 20 µl H<sub>2</sub>O gelöst und bei - 80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

### **4.3.1.5 Transkriptomanalyse (Microarray)**

Die zu analysierenden Zellen wurden am Helmholtz Zentrum München (Zellsortier-service, Institut für Molekulare Immunologie, mit Hilfe von Dr. Joachim Ellwart) mit einem MoFlo-Gerät (Cytomation, Fort Collins, CO, USA) zweimal sortiert, um eine Reinhard von annähernd 100% zu erhalten. Beim zweiten Durchlauf wurden die Zellen direkt in TRIzol sortiert und anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert (siehe 4.3.1.4). Diese wurde mit einem Affymetrix Two-cycle target labeling kit nach Herstellerangaben markiert und jeweils drei Replikate auf einen DNA-Chip hybridisiert (Affymetrix Mouse 430 v 2.0). Die Markierung, Hybridisierung und Berechnung der Expressionswerte wurde an der Expression Core Facility der TU München unter der Leitung von Dr. Reinhard Hoffmann durchgeführt. Für die weitere Auswertung und die graphische Darstellung wurde die freizugängliche GenePattern Software (Broad Institute, Cambridge, MA, USA) verwendet.

### **4.3.2 Zell- und immunbiologische Methoden**

#### **4.3.2.1 Generierung von Knochenmarkchimären**

Die Empfängertiere wurden an Tag - 2 vor dem Knochenmarktransfer und am Tag des Transfers mit jeweils 500 R (= 5 Gy) bestrahlt. Sie wurden von Tag - 2 an ständig mit Trinkwasser versorgt, das 2 g/l Neomycinsulfat und 0,1 g/l Polymyxin-B-Sulfat enthielt. Zur Entnahme des Knochenmarks wurden die Spender-Mäuse zunächst durch CO<sub>2</sub> getötet, mit 70 %igem EtOH äußerlich desinfiziert und auf einem Sezierbrett fixiert. Anschließend wurden Femur und Tibia der Hinterbeine entnommen und in 5 ml EtOH gegeben. Unter der Sterilbank wurde eine 10 ml-Spritze mit Medium gefüllt und mit einer 23 G-Kanüle versehen. Die Knochen wurden in eine kleine Petrischale gegeben, jeweils an beiden Enden mit einer Schere abgeschnitten und das Knochenmark mit jeweils etwa 1 ml Medium aus den Knochen in ein 15 ml-Röhrchen gespült. Das Knochenmark wurde resuspendiert und 5 min bei 1.500 rpm und 4 °C zentrifugiert.

## MATERIAL UND METHODEN

---

Anschließend wurden die Erythrozyten in 3 ml RBC-Puffer 5 min bei RT lysiert. Die Zellen wurden 2 x mit PBS gewaschen und die Zellsuspension auf  $5 \times 10^7$ /ml eingestellt. Anschließend wurde jeder Empfängermaus 100  $\mu$ l Zellsuspension ( $5 \times 10^6$  Zellen) i.v. injiziert.

### 4.3.2.2 Organentnahme und Herstellung einer Einzelzellsuspension

Für die vorliegende Arbeit wurden Lymphknoten und Milzen im Allgemeinen entweder aus Donoren entnommen, um T-Zellen oder DCs für Experimente *in vitro* oder *in vivo* (adoptiver Transfer) zu gewinnen, oder aber aus Rezipienten, um anschließend eine finale Analyse der T-Zellen mittels Durchflusszytometer oder Microarray durchzuführen.

Vor der Organentnahme wurden die Mäuse durch Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) getötet, mit 70 %igem EtOH äußerlich desinfiziert und auf einem Sezierbrett fixiert. Die axillären, inguinalen und brachialen Lymphknoten (Van den Broeck et al., 2006) wurden mit feinen Pinzetten entnommen, die Milz wurde mit einer feinen Schere herausgelöst, und alle Organe wurden in Puffer (FACS-Medium bzw. MACS-Puffer oder PBS) auf Eis bis zur weiteren Verwendung gelagert. Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension für den adoptiven Transfer oder für die durchflusszytometrische Analyse, wurden die Organe in eine Petrischale ( $\varnothing$  5 cm) mit 2 ml Puffer zwischen 2 Objektträgern zerrieben und über ein Gazestück (Porengröße 100  $\mu$ m) gefiltert in ein 5 ml-Reaktionsröhrchen überführt. Um eine Einzelzellsuspension für die MACS-Aufreinigung und spätere *In-vitro*-Kultur herzustellen, wurden die Organe unter der Sterilbank durch Zellsiebe gedrückt. Die Zellsuspension wurde bei 1.500 rpm und 4 °C 5 min zentrifugiert. Nach Abschütten des Überstandes wurden die Zellen je nach weiterer Verwendung im entsprechenden Puffer oder Medium resuspendiert.

Sollten die Milzzellen lediglich durchflusszytometrisch analysiert werden, wurden sie für 3 min in 5 ml RBC Lysis Buffer bei RT einer Erythrozytenlyse unterzogen. Anschließend wurden sie zweimal in 5 ml FACS-Medium gewaschen und gefärbt (siehe 4.3.2.3). Sollten dagegen die T-Zellen aus den Milzen mittels MACS-Zellseparation aufgereinigt werden, wurden die Lymphozyten zunächst durch Dichtegradienten-zentrifugation mittels LSM1077 von den Erythrozyten und Granulozyten getrennt. Anschließend wurde die MACS-Zellseparation (siehe 4.3.2.4) durchgeführt.

Die Zahl der lebenden Zellen wurde mithilfe einer Neubauer-Zählkammer (Tiefe 0,1 mm, 0,0025 mm<sup>2</sup>) und Trypanblau lichtmikroskopisch bestimmt.

### 4.3.2.3 Durchflusszytometrie

Mithilfe eines Durchflusszytometers (FACS) kann die Größe, Granularität und die relative Fluoreszenzintensität einer Zelle gemessen werden. Die Zellen passieren in einem Flüssigkeitsstrom einzeln einen fokussierten Laserstrahl, wobei das Licht durch jede Zelle spezifisch gestreut wird. Das Vorwärtsstreulicht (FSC, Forward scatter) gibt Auskunft über die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht (SSC, Side Scatter) über die Granularität der Zelle. Neben dem Streulicht kann auch Fluoreszenz gemessen werden. Werden die Zellen vor der Messung mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern beispielsweise gegen bestimmte Zelloberflächenmoleküle wie CD4 und CD8 markiert, kann über die Emittierung des Lichts eine spezifische Analyse der Zellen erfolgen. Das gestreute und emittierte Licht wird von Detektoren gesammelt, die das Licht in elektrische Signale umwandeln.

Gängige Darstellungsformen der Daten sind das Histogramm, bei dem nur eine Fluoreszenz oder Streugröße gezeigt wird, oder das Punktwolkendiagramm (Dot Plot), bei dem jeweils zwei Fluoreszenzen beziehungsweise Streugrößen gegeneinander dargestellt werden. Die Messungen wurden mit einem FACSCalibur oder einem FACSCanto II durchgeführt. Die Datenaufnahme erfolgte mit CellQuest oder FACS-Diva Software, die Datenauswertung mit FlowJo-Software.

#### Färbung von Lymphozyten mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern

50 - 100 µl Zellsuspension wurden mit dem gleichen Volumen an vorverdünntem Antikörper-Gemisch 20 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Medium gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. War im 1. Schritt ein biotinylierter Antikörper verwendet worden, wurde anschließend in einem 2. Schritt mit Fluorochrom-gekoppeltem Streptavidin gefärbt. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen bis zur durchflusszytometrischen Analyse bei 4 °C in Dunkelheit aufbewahrt. Um lebende von toten Zellen besser unterscheiden zu können, wurde bei einigen Experimenten 15 min vor der Analyse DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) zu den Proben gegeben. DAPI kann nur in tote Zellen eintreten, da deren Membran porös ist. Im Zellkern interkaliert es in die DNA und färbt diese.

### Intrazelluläre Zytokinfärbung

Um die Zytokinproduktion von T-Zellen durchflusszytometrisch nachweisen zu können, müssen diese zunächst *in vitro* restimuliert werden (siehe 4.3.2.9). Nach der Ernte der Zellen wurden zunächst die Oberflächenmoleküle CD4 bzw. CD8 und CD45.1 bzw. CD90.1 wie oben beschrieben in 96-well-Platten gefärbt. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, in Fixierungs-Puffer (Fixation Buffer) resuspendiert und 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen 2 x mit Perm-Wasch-Puffer (Permeabilization Wash Buffer) gewaschen. Anschließend wurden sie aufgeteilt und pro Bedingung jeweils mit in Perm-Wasch-Puffer verdünntem  $\alpha$ -IFN- $\gamma$ -APC,  $\alpha$ -IL-2-APC,  $\alpha$ -TNF- $\alpha$ -APC oder der Isotypkontrolle gefärbt. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei RT im Dunkeln. Nach zwei weiteren Waschschrritten wurden die Zellen in FACS-Medium aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert.

### **4.3.2.4 Magnetische Zellseparation (MACS)**

Mithilfe der Magnetischen Zellseparation (MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) wird die Trennung von Zellen ermöglicht, die über spezifische Antikörper an paramagnetische Partikel (Microbeads) gekoppelt sind. Die Separation erfolgt über eine Säule, die eine optimierte Matrix enthält und sich in einem starken Magnetfeld befindet. Magnetisch markierte Zellen werden zurückgehalten, während unmarkierte Zellen die Säule ungehindert passieren. Wird die Säule aus dem Magnetfeld genommen, können die zurückgehaltenen Zellen eluiert werden. Es gibt prinzipiell zwei Möglichkeiten der Zelltrennung. Bei der positiven Selektion wird die aufzureinigende Zellpopulation magnetisch markiert, auf der Säule zurückgehalten und erst im zweiten Schritt eluiert. Bei der negativen Selektion werden dagegen die unerwünschten Zellen markiert und zurückgehalten, während sich die gewünschten Zellen im Säulen-Durchfluss befinden. Bei der Positiven Selektion ist die Ausbeute höher, bei der negativen Selektion bleiben die Zellen von Interesse unmarkiert, was für einige Experimente wichtig ist. In der vorliegenden Arbeit wurden beide Varianten angewandt.

Für die Aufreinigung von AND und OT-I-T-Zellen wurde die negative Selektion verwendet. Die Zellen aus Milz und Lymphknoten wurden dafür in 100  $\mu$ l MACS-Puffer aufgenommen und mit einem Mix aus biotinylierten Antikörpern (8  $\mu$ l  $\alpha$ -CD8 bzw.  $\alpha$ -CD4, 5  $\mu$ l  $\alpha$ -CD11b, 5  $\mu$ l  $\alpha$ -CD11c, 8  $\mu$ l  $\alpha$ -CD45R, 5  $\mu$ l  $\alpha$ -CD49, 5  $\mu$ l  $\alpha$ -GR-1 und 5  $\mu$ l  $\alpha$ -TER119; pro Spender-Maus) verdünnt in 90  $\mu$ l MACS-Puffer für 15 min auf Eis inkubiert.

## MATERIAL UND METHODEN

---

Anschließend wurden die Zellen 2 x gewaschen, in 100 µl MACS-Puffer resuspendiert und mit 20 µl  $\alpha$ -Biotin-Beads (pro Spender-Maus) in 100 µl MACS-Puffer 15 min bei 4 °C inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten wurden die Zellen in 1 ml MACS-Puffer aufgenommen und auf die äquilibrierte LS-Säule gegeben. Die Säule wurde 2 x mit je 3 ml MACS-Puffer gespült. Der gesammelte Durchfluss wurde 2 x gewaschen und die Zellen vor der weiteren Verwendung gezählt.

Für die positive Selektion von polyklonalen T-Zellen wurden die Zellen nur mit biotinyliertem Antikörper gegen CD4 bzw. CD8 inkubiert. Im Gegensatz zur negativen Selektion befanden sich die gewünschten Zellen nicht im Durchfluss, sondern wurden nach dem zweiten Spülen der Säule außerhalb des Magnetfeldes mit 5 ml MACS-Puffer und dem dafür vorgesehenen Stempel in ein neues Reaktionsgefäß eluiert. Ansonsten wurde genauso wie beschrieben verfahren.

Um die Reinheit der Zellen zu bestimmen, wurde vor der Inkubation mit  $\alpha$ -Biotin-Beads und nach der Zellzahlbestimmung 20 µl der Zellsuspension entnommen, mit Straptavidin-APC und  $\alpha$ -CD4 bzw.  $\alpha$ -CD8 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

### 4.3.2.5 Durchflusszytometrische Zellsortierung

Neben der in 4.3.2.3 beschriebenen rein analytischen Anwendung des Durchflusszytometers können einige Geräte auch zur Zellsortierung dienen. Hier können mit Fluorochromen markierte Zellen mittels elektrischer Ablenkung aus dem Flüssigkeitsstrom isoliert und somit aufgereinigt werden. Am Institut wurde ein FACSria verwendet. Die Zellen wurden nach der Färbung mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern in PBS (0.1 % FCS) aufgenommen und in reines FCS sortiert, um die Überlebensrate der Zellen zu erhöhen. Die Flussrate betrug 2 und es wurde unter ständiger Kühlung der Proben sortiert. Für die Aufreinigung der T-Zellen für die Transkriptomanalyse wurde am Helmholtz Zentrum mit einem MoFlo cell sorter (Cytomation, Fort Collins, CO, USA) sortiert. An diesem Gerät kann mit einer weitaus höheren Flussrate (25.000 Zellen/s im Vergleich zu max. 6.000 Zellen/s am FACSria) sortiert werden. Die Überlebensrate der Zellen ist durch die kürzere Dauer der Sortierung sehr viel höher. Die Zellen wurden zweimal sortiert, um eine Reinheit von annähernd 100 % zu erzielen.

### 4.3.2.6 Markierung mit CFSE

Die Markierung mit CFSE wird vor allem zur Bestimmung der Proliferation sowohl *in vitro* als auch *in vivo* verwandt. Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFDA-SE, Molecular Probes, Niederlande) ist ein membrangängiger, nicht fluoreszierender Farbstoff, der an die freien Amine zytoplasmatischer Proteine bindet, dabei aber die Zellfunktion nicht beeinträchtigt. Nach Diffusion in die Zelle wird er von intrazellulären Esterasen durch Abspaltung zweier Azetatgruppen in Carboxyfluorescein-Succinimidylester (CFSE) umgewandelt, das nicht membrangängig ist, aber fluoresziert und für Wochen im Zytoplasma der Zelle stabil bleibt. Teilt sich die Zelle, wird die Menge an CFSE zu gleichen Teilen auf die Tochterzellen aufgeteilt, wodurch die Intensität des Farbstoffes mit jeder Teilung um 50 % abnimmt, was durchflusszytometrisch detektiert werden kann.

Für die Markierung wurden die Zellen in PBS (0,1 % BSA) gewaschen, um FCS zu beseitigen.  $2 \times 10^7$ /ml Zellen wurden in 37 °C warmem PBS (0,1 % BSA) resuspendiert und in ein 50 ml-PP-Röhrchen transferiert. Während die Zellen gevortext wurden, wurden pro ml Zellsuspension 2 µl 5(6)-CFDA-SE (5 mM, in DMSO) zupipettiert, um eine Endkonzentration von 10 µM zu erhalten. Die Zellen wurden 5 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, kurz gevortext und für weitere 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit dem doppelten Volumen an FCS unterschichtet und 5 min bei 1.200 rpm und RT zentrifugiert. Die markierten gut zu erkennenden Zellen in der Interphase wurden abpipettiert und 2 x mit 5 ml PBS bei RT gewaschen, bevor sie entweder für die Zellkultur in Zellkultur-Medium oder für den adoptiven Zelltransfer in PBS resuspendiert wurden.

### 4.3.2.7 Adoptiver Zelltransfer

Durch den Transfer von Zellen in syngene Empfängertiere mit demselben genetischen Hintergrund kann das Verhalten eines bestimmten Zelltyps unter speziellen Bedingungen *in vivo* verfolgt werden, ohne dass die Zellen abgestoßen werden. Spender- und Empfängertier unterscheiden sich hierbei nur in für das Experiment wichtigen Transgenen und zusätzlich in einem kongenen Marker (CD90.1 vs. CD90.2 oder CD45.1 vs. CD45.2). So kann in der Analyse nach Versuchsende die transferierte Zellpopulation

## MATERIAL UND METHODEN

---

durchflusszytometrisch von den endogenen Empfänger-Zellen unterschieden und hinsichtlich weiterer Parameter untersucht werden.

Für den adoptiven Transfer von T-Zellen oder DCs wurden die Empfängertiere zunächst 1 - 2 min unter einer Infrarotlampe erwärmt. Durch die so erzielte Vasodilatation ist das Erkennen der lateralen Venen im Mausschwanz erleichtert. Die gewünschte Zellzahl ( $1 - 5 \times 10^6$ ) wurden als Einzellsuspension in 100  $\mu$ l sterilem PBS mittels einer Insulinspritze injiziert. Um ein längeres Nachbluten zu verhindern, wurde die Vene für einige Zeit an der Einstichstelle abgedrückt. Je nach Versuchsaufbau wurde den Empfängertieren zusätzlich intraperitoneal  $\alpha$ -CD40mAb (50  $\mu$ g in 100  $\mu$ l PBS) zur Aktivierung oder DT (Diphtherietoxin, 4 ng/g Körpergewicht in 100  $\mu$ l PBS) zur Depletion der DCs injiziert. Die Empfängertiere wurden gegebenenfalls für bestimmte Zeiträume mit Dox-haltigem (100  $\mu$ g/ml) Trinkwasser versorgt, um tet-regulierte Gene dem Versuchsablauf entsprechend an- und abzuschalten.

### 4.3.2.8 *In-vitro*-Stimulation von T-Zellen mit $\alpha$ -CD3- und $\alpha$ -CD28mAB

Zur *In-vitro*-Aktivierung von CD4- und CD8-T-Zellen wurden diese in Antikörper-beschichteten 96-well-Platten kultiviert. Dazu wurden die Platten mit je 50  $\mu$ l  $\alpha$ -CD3- und  $\alpha$ -CD28mAB (10  $\mu$ l/ml in PBS) pro well 90 min bei 37 °C inkubiert. Kontrollplatten wurden parallel mit PBS ohne Antikörper inkubiert. Anschließend wurde 2 x mit 100  $\mu$ l kaltem PBS gewaschen. Die wells wurden dabei mit einer 12-Kanal-Pipette gefüllt und anschließend mit einer schnellen Handbewegung über einem Becherglas ausgeschüttet. AND-T-Zellen wurden mit  $2 \times 10^5$  Zellen/well, OT-I-T-Zellen mit  $1,5 \times 10^5$  Zellen/well in 200  $\mu$ l Zellkultur-Medium für 48 h kultiviert. Um die Überlebensrate insbesondere der nicht stimulierten Kontroll-Zellen zu erhöhen, wurde dem Medium rmlL-7 zugesetzt (5 ng/ml).

Nach der Ernte wurden die Zellen entweder zweimal mit FACS-Medium gewaschen und anschließend für die Analyse am Durchflusszytometer mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt, oder zweimal mit PBS (0,1 % BSA) gewaschen, CFSE markiert und adoptiv in Empfängertiere transferiert.

### 4.3.2.9 Restimulation von T-Zellen *ex vivo*

Um die Zytokinproduktion von T-Zellen zeigen zu können, wurden diese nach der Isolierung *in vitro* mit Ionomycin und PMA restimuliert. Hierbei wurden *in vivo* voraktivierte Effektor-T-Zellen *ex vivo* zur Zytokinproduktion angeregt. Damit das produzierte Zytokin nicht sezerniert wird, sondern in der Zelle verbleibt und gemessen werden kann, wird nach 2 h Restimulation Brefeldin A (BFA) hinzugefügt. BFA interferiert im retrograden Transport vom Golgi-Apparat zum ER (Endoplasmatisches Retikulum), inhibiert dadurch die Zytokinsekretion und führt so zu einer Akkumulation des Zytokins in der Zelle. Für die intrazelluläre Färbung müssen die Zellwände permeabilisiert werden, damit die entsprechenden Antikörper ins Zellinnere gelangen können. Um ein Absterben der Zellen aufgrund der Permeabilisierung zu verhindern, wurden die Zellen nach der Färbung mit Paraformaldehyd fixiert.

Die Zellen wurden in je 1 ml Zellkulturmedium pro well in 24-well-Platten mit  $1 \times 10^7$  Zellen/ml mit 1 µg/ml Ionomycin (in DMSO) und 20 ng/ml PMA (Phorbol-12-Myristat-13-acetat, in DMSO) bei 37 °C restimuliert. Nach 2 h wurden 10 µg/ml BFA (in EtOH) zugegeben und für weitere 2 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mit den entsprechenden Oberflächen-Markern gefärbt (siehe 4.3.2.3).

## 5 ERGEBNISSE

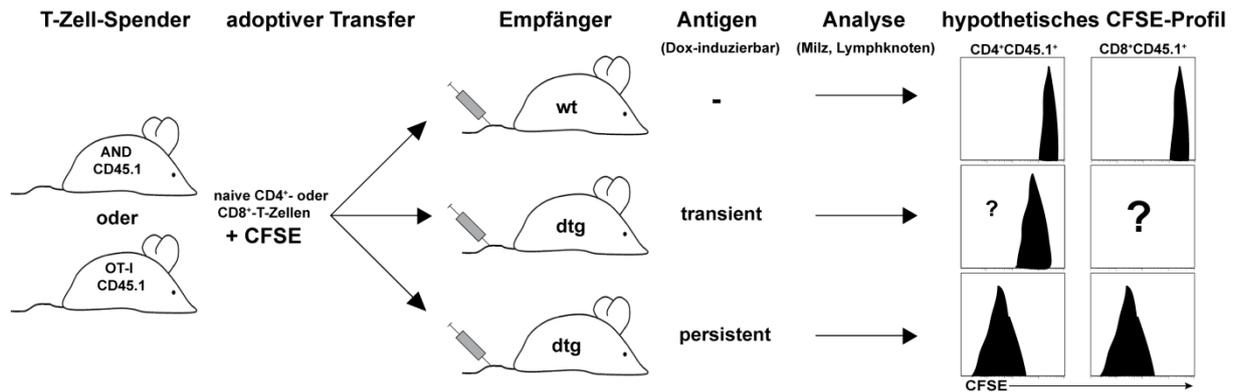
### 5.1 Methodischer Ansatz und Einführung der transgenen Maus TSO

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, existiert in der Literatur kein Konsens bezüglich der Antigenabhängigkeit der Differenzierung von CD4- und CD8-T-Zellen, obgleich für CD4-T-Zellen im Allgemeinen eine stärkere Antigenabhängigkeit als für CD8-T-Zellen beobachtet wurde (vgl. 3.6). Um die Frage nach der Antigenabhängigkeit weiter klären zu können, wurden für die vorliegende Arbeit drei verschiedene experimentelle Systeme verwendet, mit denen CD4- und CD8-T-Zellen parallel hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens nach einem zeitlich definierten, transienten Stimulus des T-Zell-Rezeptors (TCR) in der Abwesenheit von Antigen verglichen wurden. Allen Ansätzen gemein waren der adoptive Transfer von CFSE-markierten, CD4- und CD8-T-Zellen und die spätere Analyse des Proliferationsverhaltens der T-Zellen *in vivo*. Die Art des TCR-Stimulus bzw. seine zeitliche Terminierung variierten dagegen von System zu System.

#### 5.1.1 Grundexperiment: Adoptiver Transfer und induzierbare Antigenexpression

Um das Verhalten von CD4- und CD8-T-Zellen nach transientem Antigenstimulus zu untersuchen, wurden die TCR-transgenen Mausstämme AND und OT-I verwendet. AND-Mäuse besitzen fast ausschließlich CD4-T-Zellen, die einen TCR exprimieren, der spezifisch das MCC<sub>93-103</sub>-Epitop aus Motten-Cytochrom C im Kontext von MHC-II H-2E<sup>k</sup> erkennt. Sie wurden in der vorliegenden Arbeit exemplarisch für CD4-T-Zellen untersucht. T-Zellen aus OT-I-Mäuse dienen parallel dazu als Beispiel für CD8-T-Zellen. OT-I-Mäuse bilden fast ausschließlich CD8-T-Zellen, die einen TCR tragen, der spezifisch für das SIINFEKL-Epitop (OVA<sub>257-264</sub>) aus Ovalbumin im Kontext des MHC-I-Moleküls H-2K<sup>b</sup> ist. Beide Mausstämme wurden jeweils mit Mäusen gekreuzt, die einen der beiden kongenen Marker CD90.1 oder CD45.1 exprimierten. Auf diese Weise konnten die adoptiv transferierten T-Zellen *in vivo* durch Färben des spezifischen Markers durchflusszytometrisch von den endogenen Zellen der CD90.2<sup>+</sup> bzw. CD45.2<sup>+</sup> Rezipienten abgegrenzt werden. Sie wurden zudem mit CFSE markiert, um ihre Proliferation unter den jeweiligen Bedingungen *in vivo* untersuchen zu können.

## ERGEBNISSE



**Abb. 5-1 Schematische Darstellung des Grundexperiments aus adoptivem T-Zell-Transfer und Dox-induzierbarer Antigenexpression in Empfängertieren.** Untersuchung der Proliferation von TCR-transgenen CD4- und CD8-T-Zellen nach adoptivem Transfer in transgene Mäuse, die in Abhängigkeit von Dox das entsprechende spezifische Antigen entweder gar nicht, transient oder persistent präsentierten. Im hypothetischen CFSE-Profil sind Negativ-Kontrolle (oben) und Positiv-Kontrolle (unten) dargestellt. Die Proliferation nach transientem TCR-Stimulus (Mitte) wurde für CD4- und CD8-T-Zellen analog untersucht. Für CD4-positive AND-T-Zellen wurde in diesem System bereits strikte Antigenabhängigkeit beobachtet (Obst et al., 2005); zu zeigen war, ob diese auch in anderen Systemen zu beobachten ist. Für CD8-positive OT-I-T-Zellen existierten noch keine Daten in diesem System.

Das Grundexperiment ist in Abb. 5-1 schematisch dargestellt. Für AND- und OT-I-T-Zellen wurde eine *In-vivo*-Situation geschaffen, in der zunächst ein spezifischer, kurzer Antigenstimulus gegeben werden konnte, um dann das anschließende Proliferationsverhalten ohne weiteren Stimulus *in vivo* verfolgen zu können. Durch diese isolierte Betrachtung der Auswirkungen eines transienten Antigenstimulus sollte es möglich sein, Aussagen über eine eventuelle frühe Programmierung der Differenzierung von naiven CD4-T-Zellen zu Effektorzellen im Vergleich zu CD8-T-Zellen treffen zu können. Dafür wurden doppelt-transgene (dtg) Mauslinien verwendet, in denen das jeweilige spezifische Antigen in Abhängigkeit von Doxycyclin (Dox) exprimiert wird und so die Präsentation des Antigens an- und abschaltbar ist. Für AND-T-Zellen wurden Tiere des Stammes Ii-rTA x TIM (Abb. 4-1) als Empfänger verwendet, in denen das MHC-II-restringierte Epitop MCC<sub>93-103</sub> unter der Kontrolle eines Tet-induzierbaren Promotors exprimiert wird (Obst et al., 2005). Analog dazu wurde für die Untersuchung von OT-I-T-Zellen eine neue transgene Mauslinie generiert. Ii-rTA x TSO-Tiere (Tetracyclin-regulierte Signalsequenz mit OVA, Abb. 5-4) exprimieren OVA<sub>257-264</sub> als MHC-I-restringiertes Epitop nach Gabe von Dox. Diese Mauslinie wird in Abschnitt 5.1.2 näher beschrieben.

## ERGEBNISSE

---

Naive CD4- und CD8-T-Zellen wurden aus den Lymphknoten von AND CD45.1<sup>+</sup> oder OT-I CD45.1<sup>+</sup> Spendertieren isoliert und nach CFSE-Markierung in je drei Empfängertiere transferiert, um jeweils drei Bedingungen hinsichtlich der Antigenexpression untersuchen zu können. Als Kontrolle dienten nicht-transgene Tiere der Wildtyp-Linien (wt) B10.BR bzw. C57BL/6 als Empfänger. Es war davon auszugehen, dass die transferierten T-Zellen in diesen Mäusen nicht aktiviert und sich daher nicht teilen würden, weil keine spezifische Interaktion zwischen TCR und Peptid-MHC-Komplex (pMHC-TCR) stattfinden kann. Im CFSE-Profil würden sie demnach die stärkste Intensität zeigen, weil sich der Farbstoff ohne Zellteilung nicht verdünnt (Abb. 5-1, oben). Als weitere Kontrolle dienten doppelt-transgene Empfängertiere (Ii-rTA x TIM bzw. Ii-rTA x TSO), die während des gesamten Experiments mit Dox behandelt wurden und daher das spezifische Antigen persistent exprimierten. Die Folge wäre die Proliferation der T-Zellen, was an der schwächeren Intensität im CFSE-Profil zu erkennen ist (Abb. 5-1, unten). Pro Zellteilung verteilt sich der Farbstoff zu gleichen Teilen auf die beiden Tochterzellen und die Intensität halbiert sich daher.

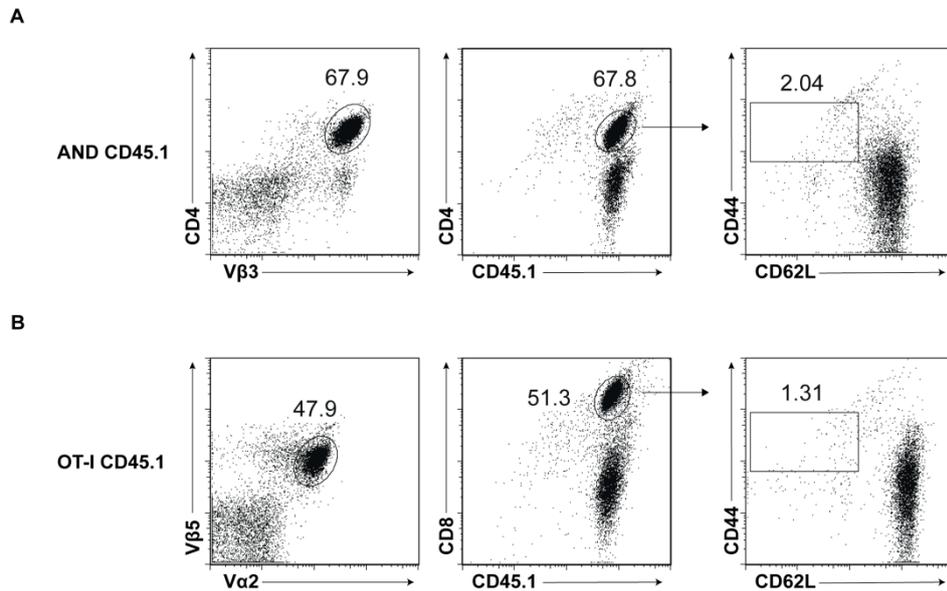
Die experimentell entscheidende Empfängermaus sollte für beide T-Zelltypen jeweils eine entsprechende doppelt-transgene Maus (Ii-rTA x TIM bzw. Ii-rTA x TSO) sein, die durch kurzzeitige Behandlung mit Dox transiente Antigenpräsentation aufweist. Zu untersuchen war, wie sich die CD4- und CD8-T-Zellen im Vergleich zueinander und zu den Kontrollen anschließend ohne weiteren Antigenstimulus *in vivo* verhalten würden (Abb. 5-1, Mitte). Für AND-T-Zellen wurde von unserer Gruppe bereits gezeigt, dass sie sich ohne weiteren Antigenstimulus in diesem System nicht weiter teilen (Obst et al., 2005). Zu prüfen war, ob das auch in anderen experimentellen Systemen zutrifft und wie sich CD8-T-Zellen in Analogie dazu verhalten.

### 5.1.1.1 Charakterisierung der TCR-transgenen T-Zellen vor dem adoptiven Transfer

Bevor die T-Zellen in die Empfängertiere transferiert wurden, wurde mittels Durchflusszytometrie sichergestellt, dass die verwendeten Zellen tatsächlich den jeweiligen spezifischen TCR und den entsprechenden kongenen Marker exprimieren und zudem naiv sind. Dazu wurden AND-Zellen mit Antikörpern gegen V $\beta$ 3, CD4 und CD45.1 (bzw. CD90.1) sowie OT-I-Zellen gegen V $\alpha$ 2, V $\beta$ 5, CD8 und CD45.1 gefärbt. Zusätzlich wurden Zellen beider Mauslinien mit Antikörpern gegen CD44 und CD62L gefärbt, um den Aktivierungsstatus zu bestimmen. Naive T-Zellen sind CD62L<sup>hi</sup> und CD44<sup>lo</sup>.

## ERGEBNISSE

Abb. 5-2 zeigt eine repräsentative Färbung von T-Zellen aus AND CD45.1 und OT-I CD45.1. 66-70% der AND-Zellen waren  $V\beta 3^+CD4^+CD45.1^+$  und  $CD62L^{hi}CD44^{lo}$ . Bei den OT-I-Zellen waren 46-52%  $V\alpha 2^+V\beta 5^+CD8^+CD45.1^+$  und naiv.



**Abb. 5-2 Identifizierung und Charakterisierung naiver antigenspezifischer T-Zellen aus T-Zell-Rezeptor-transgenen Mäusen.** Zellen aus Lymphknoten von AND CD45.1- und OT-I 45.1-Mäusen wurden in Einzelzellsuspension genommen und durchflusszytometrisch hinsichtlich ihres TCR und ihres Aktivierungsstatus analysiert. **(A)**  $CD4^+$  AND-T-Zellen wurden durch Färben der transgenen TCR- $\beta$ -Kette  $V\beta 3$  und  $CD4$  identifiziert. Zusätzlich wurde der kongene Marker  $CD45.1$  gefärbt. Der Aktivierungsstatus wurde mittels Färbung von  $CD44$  und  $CD62L$  bestimmt. Ca. 70% der Zellen waren  $V\beta 3^+CD4^+CD45.1^+$  und naiv ( $CD62L^{hi}CD44^{lo}$ ).  $>95\%$  der  $V\beta 3^+$  T-Zellen exprimieren auch die transgene  $V\alpha 11$ -Kette (nicht gezeigt). **(B)**  $CD8^+$  OT-I-T-Zellen wurden anhand der transgenen TCR-Ketten  $V\alpha 2$  und  $V\beta 5$  identifiziert. Ca. 50% der Zellen waren  $V\alpha 2^+V\beta 5^+CD8^+CD45.1^+$  und naiv.

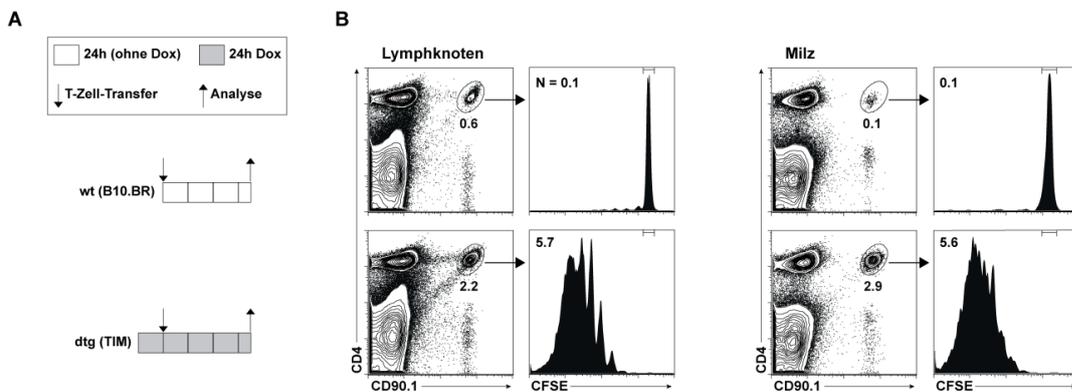
### 5.1.1.2 Proliferation von AND-T-Zellen nach adoptivem Transfer in TIM-Mäuse

Für die Untersuchung des Proliferationsverhaltens von AND-T-Zellen in Abhängigkeit zur Dauer der Antigenpräsentation wurden Tiere der doppelt-transgenen Mauslinie *Ii-rTA x TIM* (4.2.3.1) verwendet. Sie wird vereinfacht im Folgenden mit TIM oder dtg abgekürzt, da es sich bei den verwendeten Tieren ausschließlich um doppelt-transgene Mäuse handelt, die sowohl TIM- als auch *Ii-rTA*-positiv waren.

Um zu zeigen, dass AND-T-Zellen in Tieren der TIM-Linie nach Behandlung mit Dox proliferieren und sich das experimentelle System daher für die Fragestellung der vorlie-

## ERGEBNISSE

genden Arbeit eignet, wurde das in Abb. 5-3 dargestellte Experiment durchgeführt. CD4-T-Zellen wurden aus den Lymphknoten von AND CD90.1-Mäusen gewonnen und wie im vorherigen Abschnitt beschrieben analysiert. Anschließend wurden sie mit CFSE markiert und jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen in eine kontinuierlich mit Dox behandelte TIM-Maus (CD90.2) oder als Kontrolle in eine Wildtyp-Maus (B10.BR CD90.2) injiziert. Nach 84 h *in vivo* wurden Lymphknoten und Milz der Empfängertiere entnommen und die transferierten CD4<sup>+</sup>CD90.1<sup>+</sup> Zellen analysiert. Abb. 5-3 zeigt die Wiederfindungsrate und das Proliferationsverhalten der transferierten Zellen. In einem repräsentativen Experiment machten die transferierten Zellen 0,6 % aller Zellen in den analysierten Lymphknoten aus, was bei einer Gesamtzellzahl aller analysierter Lymphknoten von  $3 \times 10^7$  einer absoluten Zellzahl von  $1,8 \times 10^5$  entspricht. In der Milz machten die transferierten Zellen 0,1 % aller Zellen aus, was einer absoluten Zellzahl von  $1,3 \times 10^5$  Zellen entspricht. Das bedeutet, dass etwa ein Drittel der transferierten Zellen in Milz und Lymphknoten zu detektieren waren. In Dox-behandelten TIM-Empfängern waren im Lymphknoten 2,2 % und in der Milz 2,9 % transferierte CD4<sup>+</sup>CD90.1<sup>+</sup>-Zellen. Diese hatten sich im Lymphknoten durchschnittlich 5,7-mal und in der Milz vergleichbar oft (5,6-mal) geteilt. Geht man von einer 24-stündigen Lag-Phase und einer konstanten Teilungsrates aus, entspricht das 10,5 - 10,7 h pro Teilung.



**Abb. 5-3 CFSE-Proliferationsprofil von AND-T-Zellen bei Dox-induzierter Antigenexpression in TIM-Mäusen.** Je  $1 \times 10^6$  CFSE-markierte CD4<sup>+</sup>CD90.1<sup>+</sup> T-Zellen aus AND CD90.1-Mäusen wurden in Wildtyp- oder kontinuierlich mit Dox behandelte TIM-Mäuse transferiert. 84 h später wurden Lymphknoten und Milz der Empfängertiere entnommen und durchflusszytometrisch im Hinblick auf die transferierten Zellen analysiert. Diese wurde als CD90.1<sup>+</sup> Zellen von den endogenen Zellen (CD90.1<sup>-</sup>) der Empfänger abgegrenzt. Die Proliferation der CD4<sup>+</sup>CD90.1<sup>+</sup> AND-T-Zellen wurde anhand des CFSE-Profiles ausgewertet. Die durchschnittliche Anzahl an Zellteilungen ist mit  $N = \log_2 (MFI_{\text{Kontrolle}}/MFI_{\text{Experiment}})$  angegeben. Repräsentative Darstellung eines von 5 Experimenten mit je einer Maus pro Bedingung.

Zeigt das CFSE-Profil distinkte Peaks von sowohl geteilten als auch ungeteilten Zellen, ist leicht erkennbar, wie viele Zellteilungen stattgefunden haben, sodass ein Durchschnittswert mit Hilfe der FloJo-Software auszurechnen ist. Haben sich aber alle Zellen wie in dem dargestellten Beispiel einige Male geteilt, sind wegen abnehmender Trennungsschärfe einzelner CFSE-peaks diskrete Teilungen nicht genau zu quantifizieren (z.B. Abb. 5-3 **(B)**, unten).

Wir haben daher die durchschnittlichen Teilungen der proliferierten Zellen (Abb. 5-3 **(B)**, unten) in Bezug zur Negativ-Kontrolle der ungeteilten naiven T-Zellen (Abb. 5-3 **(B)**, oben) mit Hilfe der Mittleren Fluoreszenz-Intensität (MFI) berechnet, einem Verfahren, das in der Literatur als Proliferationsindex o.ä. wiederholt Anwendung findet (Fletcher et al., 2010; Roederer, 2011):  $N = \log_2 (MFI_{\text{Kontrolle (ungeteilt)}}/MFI_{\text{Experiment}})$ .

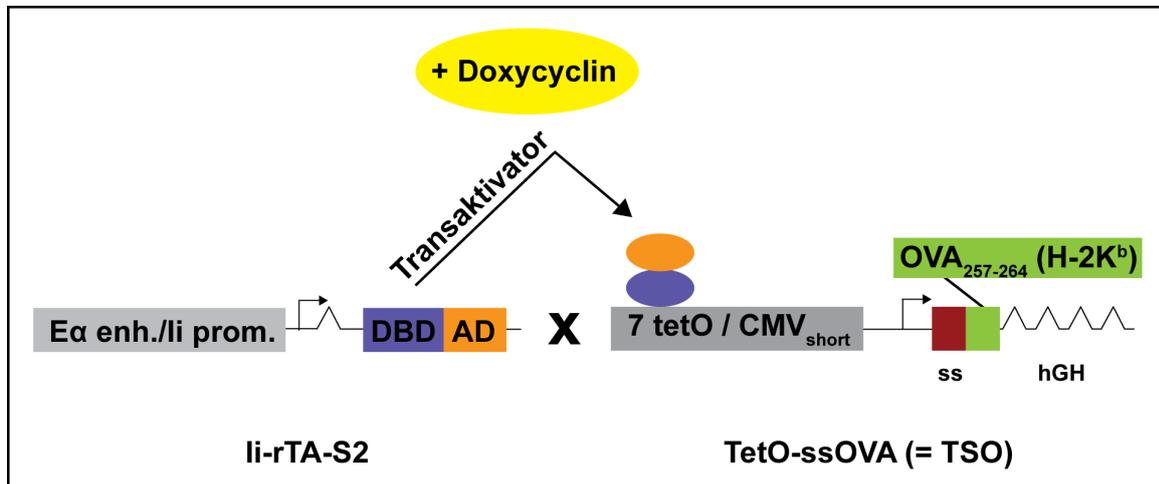
### 5.1.2 TSO: Dox-induzierbare Expression eines MHC-I-restringierten Antigens *in vivo*

Vor Beginn der Experimente für die vorliegende Arbeit wurde von Dr. Reinhard Obst und Simone Pentz als Voraussetzung für das oben dargestellte Grundexperiment (Abb. 5-1) eine neue transgene Mauslinie generiert. Parallel zur TIM-Maus sollte die neue Mauslinie ein spezifisches MHC-I-restringiertes Epitop Dox-induzierbar exprimieren. Das Transgen wurde als TSO bezeichnet; diese Abkürzung steht für Tet-regulierte Signal-Sequenz mit OVA<sub>257-264</sub>. Für die Dox-regulierbare Antigenexpression wurde der gleiche Transaktivator (Ii-rTA) verwendet wie in der TIM-Maus (Abb. 4-1).

Da MHC-I im Gegensatz zu MHC-II auf nahezu allen kernhaltigen Zellen exprimiert wird, war zu erwarten, dass ein induzierbares System für die Expression eines MHC-I-restringierten Antigens, das keine Hintergrundexpression aufweist, schwer zu entwickeln ist. Es wurde daher der pTRE-tight-Vektor (Clontech) verwendet, der eine modifizierte, verbesserte Version des ursprünglichen Tet-Promotors (Gossen and Bujard, 1992) enthält. Im Original-Konstrukt bestand die rtTA-Ziel-Sequenz aus sieben 42bp-Wiederholungen, wobei jede der 19bp langen Tet-Operator (TetO)-Kernsequenzen von zwei Spacern flankiert wurde. In der für die TSO-Maus verwendeten modifizierten Version wurde ein Interferon Response Element (IRE) entfernt, das im Original-Konstrukt unbeabsichtigt enthalten war (Rang and Will, 2000). Der Spacer wurde zudem verkürzt, sodass die TetO-Sequenzen durch 3 ½ und nicht mehr durch 4 Windungen voneinander getrennt waren. Auf diese Weise banden die sieben Transaktivator-Moleküle alternierend auf gegenüberliegenden Seiten der DNA. Außerdem wurde ein

## ERGEBNISSE

Enhancer-Element vom CMV Promotor entfernt. In Zellkulturexperimenten ist gezeigt worden, dass dadurch die Hintergrundexpression reduziert und die Induzierbarkeit bis zu 1.000-fach erhöht wird (Agha-Mohammadi et al., 2004; Pluta et al., 2005; Rang and Will, 2000; Sprengel and Hasan, 2007).



**Abb. 5-4 Überblick über das doppelt-transgene System aus Ii-rTA und TSO zur Dox-induzierbaren Expression des MHC-I-restringierten Ovalbumin-Epitops OVA<sub>257-264</sub>.** Gezeigt ist das Konstrukt von Ii-rTA (vgl. 4.2.3.1) und TSO (TetO-ssOVA), bestehend aus der Transaktivator-Zielsequenz (7 tet-O), dem verkürzten CMV-Promotor und der für die Signalsequenz (ss), das SIINFEKL-Peptid (OVA<sub>257-264</sub>) und das humane Wachstumshormon (hGH) codierenden Sequenz. Für nähere Details zu TSO siehe Text.

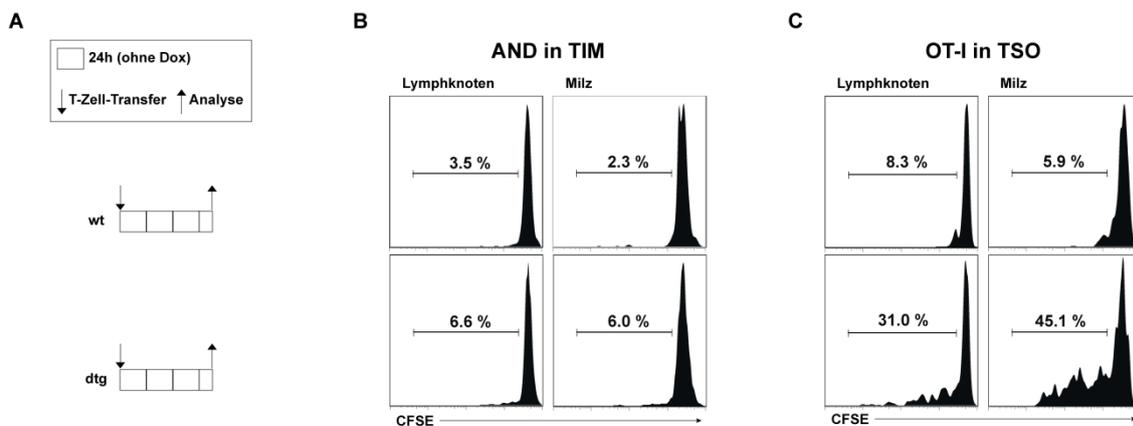
Das ssOVA-Konstrukt wurde ursprünglich von Dr. Reinhard Obst im K<sup>b</sup>/pUC19-Vektor (Weiss et al., 1983) kloniert. Im TSO-Konstrukt wird unter Kontrolle des TRE-tight Promotors ein offenes Leseraster exprimiert, das sich aus der für die Signalsequenz des H-2K<sup>b</sup>-Gens (Weiss et al., 1983) und das unmittelbar folgende OVA<sub>257-264</sub>-Epitop codierenden Sequenz und zwei anschließende Stopcodons zusammensetzt. Dahinter wurde das Gen des humanen Wachstumshormons als Standard-Splice-Substrat kloniert, da die mRNA dadurch stabilisiert und die Effizienz der Expression in transgenen Mäusen gesteigert wird (Brinster et al., 1988; Chaffin et al., 1990). Durch die Verwendung eines vorprozessierten TAP-unabhängigen Peptids an Stelle eines ganzen Proteins werden Prozessierungszeiten vermieden und eine schnelle Bereitstellung des Peptid-MHC-Komplexes sichergestellt. Zusätzlich wird die Präsentation weiterer OVA-Epitope durch MHC-II-Moleküle dadurch unmöglich. Die verwendete Kombination aus Signalsequenz und OVA<sub>257-264</sub> wurde bereits getestet und ist funktionsfähig (Obst, 1998).

## ERGEBNISSE

Für die Generierung transgener Linien wurde das ssOVA-Konstrukt pBS-TRE-tight-ssOva-hGH (TetO-ssOVA bzw. TSO) von Ronald Naumann am Max-Planck-Institut für Molekulare Zellbiologie und Genetik (Transgenic Core Facility) in Dresden in C57BL/6-Zygoten mikroinjiziert. Sieben Founder-Tiere wurden durch PCR identifiziert und mit Ii-rTA<sup>+</sup> Tieren verpaart. Dtg Nachkommen wurden wiederum durch PCR identifiziert und *in vitro* und *in vivo* auf TSO-Expression und -Induzierbarkeit getestet. Eine Linie (Nr. 7) entsprach diesen Kriterien und wurde in den hier dargestellten Experimenten verwendet.

Vereinfacht wird die doppelt-transgene Maus Ii-rTA x TSO analog zur TIM-Maus im Folgenden kurz als TSO bzw. dtg bezeichnet, da das Antigen-codierende Transgen im Mittelpunkt steht und ausschließlich doppelt-transgene Mäuse verwendet wurden, die auch Ii-rTA<sup>+</sup> waren und somit den Transaktivator exprimierten.

### 5.1.2.1 Hintergrundexpression des TSO-Antigens



#### Abb. 5-5 Hintergrundexpression des TSO-Antigens in TSO-Rezipienten ohne Dox-Behandlung.

Naive AND CD90.1- und OT-I CD90.1-T-Zellen wurden aus Lymphknoten gewonnen, CFSE-markiert und als Indikator für Antigenexpression in doppelt-transgene TIM bzw. TSO-Mäuse transferiert. Als Kontrolle wurden Wildtypmäuse (wt, B10.BR bzw. C57BL/6) als Rezipienten verwendet. **(A)** Schematischer Überblick über den Versuchsaufbau zur Überprüfung von Hintergrundexpression in Abwesenheit von Dox. Gezeigt ist der Zeitpunkt des adoptiven Transfers von naiven T-Zellen in Bezug zum Zeitpunkt der Analyse von Milz und Lymphknoten. **(B,C)** Proliferation von AND bzw. OT-I T-Zellen. Repräsentatives CFSE-Profil von AND CD90.1- und OT-I CD90.1-T-Zellen nach 84 h in der Milz und im Lymphknoten. Gezeigt sind CD4<sup>+</sup>CD90.1<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup>CD90.1<sup>+</sup> Zellen.

## ERGEBNISSE

---

Um zu prüfen, ob die Expression des TSO-Transgens auch in Abwesenheit des Induktors Dox erfolgt (also "undicht", engl. leaky, ist) und das Antigen möglicherweise auch ohne Dox-Behandlung präsentiert wird, wurden CFSE-markierte OT-I-T-Zellen als Indikator für Antigenexpression in unbehandelte doppelt-transgene TSO-Tiere transferiert. Als Kontrolle wurden nicht-transgene C57BL/6 Wildtyp-Mäuse als Empfänger verwendet. Für die TIM-Maus wurde bereits gezeigt, dass mit Hilfe von AND T-Zellen keine Hintergrundexpression des TIM-Gens nachzuweisen ist (Obst et al., 2005), was hier bestätigt werden konnte.

Abb. 5-5 zeigt den Versuchsaufbau und die Ergebnisse. Während sich AND-T-Zellen weder in unbehandelten TIM-Mäusen noch in Kontroll-Tieren teilten, wies die Proliferation von OT-I-T-Zellen in TSO-Mäusen auf Hintergrund-Expression des Antigens hin. 45,1 % der CD8-T-Zellen teilten sich in der Milz, 31 % in Lymphknoten. TSO-Mäuse konnten daher für die eigentliche Fragestellung so nicht verwendet werden. MHC-I wird im Gegensatz zu MHC-II auf fast allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Es ist also möglich, dass das Antigen nicht nur von professionellen APCs exprimiert wird, sondern auch beispielsweise von Fibroblasten oder Epithelzellen. Um die Hintergrundexpression möglicherweise zu reduzieren, wurde Knochenmark aus TSO-Mäusen in bestrahlte Wildtypmäuse transferiert. In den so entstandenen Knochenmarkchimären konnte das Antigen nur noch auf Knochenmark-abgeleiteten Zellen des hämatopoetischen Systems präsentiert werden.

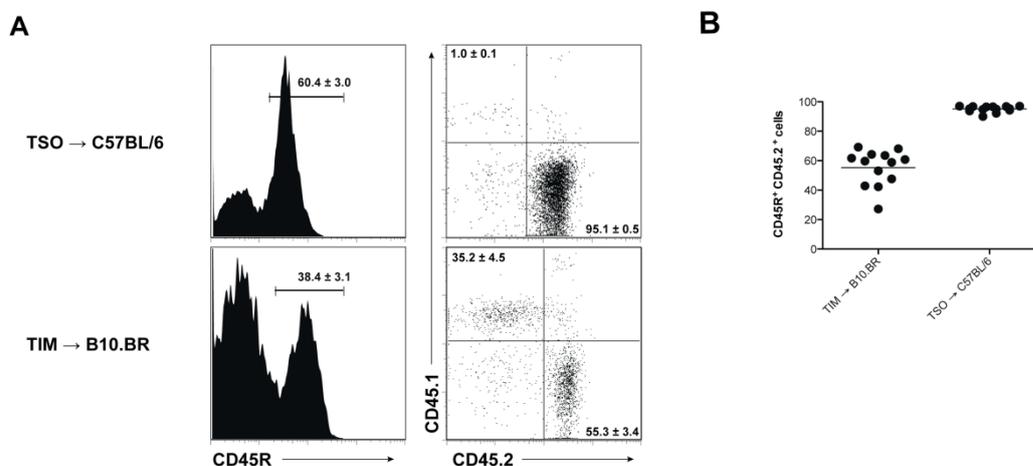
### 5.1.2.2 Generierung von Knochenmarkchimären

Um das Problem der Hintergrundexpression lösen zu können, wurden wie dargelegt Knochenmarkchimären generiert. CD45.1<sup>+</sup> Wildtypmäuse (B10.BR, C57BL/6) wurden 2 Tage vor und am Tag des Knochenmarktransfers mit je 500 R bestrahlt. Es wurde Knochenmark aus TIM- bzw. TSO-Mäusen isoliert und je  $5 \times 10^6$  Zellen pro Empfängermaus i.v. injiziert.

Um den Chimärismus der entstandenen Knochenmarkchimären TIM → B10.BR und TSO → C57BL/6 zu bestimmen, wurde den Tieren 4 - 6 Wochen nach dem Knochenmarktransfer Blut entnommen und für die durchflusszytometrische Analyse gefärbt. In Abb. 5-6 ist der Chimärismus dargestellt. Analysiert wurden CD45R<sup>+</sup> B-Zellen, die sich ausschließlich aus hämatopoetischen Stammzellen ableiten. Sie wurden hinsichtlich der Expression von CD45.1 und CD45.2 ausgewertet, wobei CD45.1 nur auf endogenen

## ERGEBNISSE

Empfängerzellen exprimiert wird, während CD45.2 nur auf Spender-abgeleiteten Zellen ausgeprägt wird. Als Chimärismus ist demnach in **(B)** der Prozentsatz an B-Zellen angegeben, die CD45.2<sup>+</sup> sind. Für TSO → C57BL/6 wurde stets ein Chimärismus von über 90 % erreicht, während der Chimärismus von TIM → B10.BR-Tieren lediglich bei durchschnittlich 55 % lag. Es wurden verschiedene Parameter wie die Strahlendosis und die zeitliche Abfolge im Versuchsprotokoll variiert, ohne eine signifikante Verbesserung zu erzielen. Da sich die TIM → B10.BR-Chimären aber trotz des unvollständig ausgeprägten Chimärismus im Allgemeinen wie TIM-Mäuse verhielten, wurden die Mäuse für die weiteren Versuche verwendet.



**Abb. 5-6 Bestimmung des Chimärismus der Knochenmarkchimären TSO → C57BL/6 und TIM → B10.BR.** CD45.1 Wildtypmäuse (B10.BR, C57BL/6) wurden 2 d vor dem Knochenmarkstransfer und am Tag des Transfers mit je 500 R bestrahlt.  $5 \times 10^6$  Knochenmarkzellen aus li-rTA x TIM- bzw. li-rTA-TSO-Mäusen wurden i.v. injiziert. **(A)** Analyse des Blutes der Knochenmarkchimären 4 - 6 Wochen nach Transfer des Knochenmarks. Gezeigt sind der Prozentsatz an CD45R<sup>+</sup> B-Zellen und der Anteil an Spender-abgeleiteten Zellen (CD45.2<sup>+</sup>) im Vergleich zu Empfänger-Zellen (CD45.1<sup>+</sup>). **(B)** Statistische Darstellung des Chimärismus als Prozentsatz der CD45R<sup>+</sup>CD45.1<sup>+</sup> Spender-abgeleiteten Zellen.

### 5.1.2.3 Regulierbare Antigenexpression in Knochenmarkchimären

Um zu testen, ob die generierten Knochenmarkchimären ohne Dox-Behandlung Hintergrundexpression aufweisen, wurden CFSE-markierte T-Zellen als Antigen-Indikatoren transferiert. In unbehandelten TSO → C57BL/6-Mäusen war im Gegensatz zu unbehandelten TSO-Mäusen keine signifikante Antigenexpression detektierbar. Die

## ERGEBNISSE

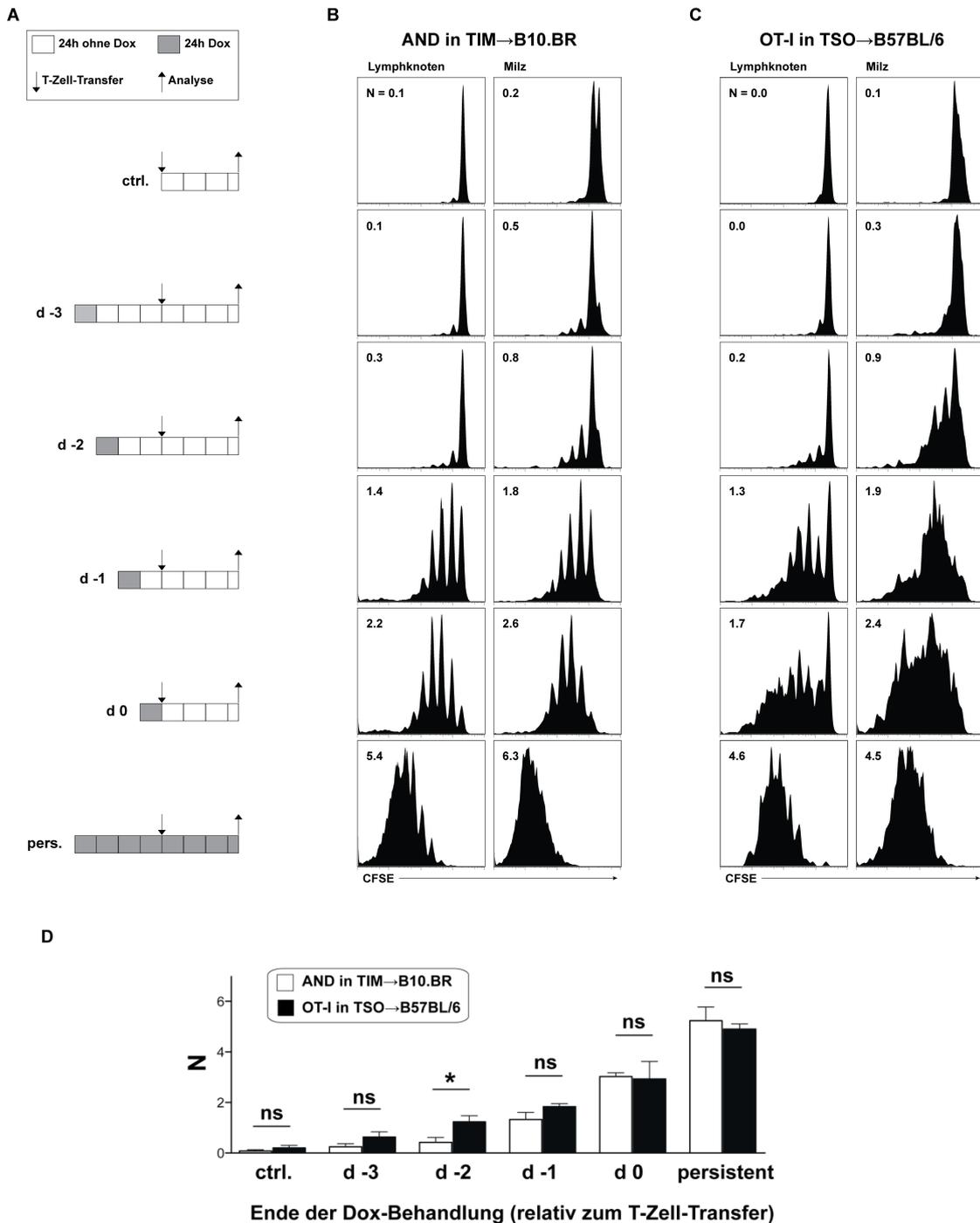
---

Ergebnisse sind nicht gesondert dargestellt, da alle weiteren Experimente immer eine nicht behandelte Chimäre als Kontrolle beinhalten (vgl. Abb. 5-7 und Abb. 5-8).

Um zu untersuchen, ob die Antigenexpression durch Gabe von Dox an- und abschaltbar ist, wurden je 6 Chimären von jeder der beiden Linien unterschiedlich mit Dox behandelt und als Empfänger für AND- bzw. OT-I-T-Zellen verwendet. Die entsprechenden CFSE-markierten T-Zellen als Indikator für das Vorhandensein von Antigen ließen in diesem Experiment nicht nur auf eventuelle Hintergrundexpression schließen sondern auch auf die Halbwertszeit der Peptid-MHC-Komplexe *in vivo*.

Vier TIM → B10.BR und vier TSO → C57BL/6-Mäusen wurden jeweils für 24 h mit Dox-haltigem Trinkwasser versorgt, bevor es wieder durch reines Wasser ersetzt wurde. Der Versuchsablauf ist in Abb. 5-7 **(A)** dargestellt. Die Dox-Behandlung der einzelnen Mäuse endete drei (d -3), zwei (d -2) oder einen (d -1) Tag vor dem adoptiven Transfer bzw. am Tag (d 0) des Transfers der entsprechenden CFSE-markierten AND- oder OT-I-T-Zellen. Zusätzlich wurde je eine Chimäre gar nicht mit Dox behandelt und diente als Negativ-Kontrolle und als Kontrolle, um Hintergrundexpression auszuschließen. Eine weitere Chimäre erhielt während des gesamten Experiments Dox und diente als Positiv-Kontrolle. Mithilfe der T-Zellen als Indikator für Antigenexpression wurde getestet, wie lange vor dem T-Zell-Transfer Dox im Trinkwasser der Empfängermäuse sein muss, damit noch soviel Antigen präsentiert wird, um als Proliferation der entsprechenden T-Zellen detektierbar zu sein. Die Proliferation dient hier als indirektes Maß für die Halbwertszeit des Peptid-MHC-Komplexes *in vivo* und lag für TIM → B10.BR-Chimären bei etwa 1 d. Gleiches gilt wie bereits früher in unserer Gruppe beobachtet für die Ursprungslinie TIM (Obst et al., 2005). Die TIM → B10.BR-Chimären scheinen also trotz schwach ausgeprägtem Chimärismus hinsichtlich der Antigenpräsentation durchaus mit TIM vergleichbar zu sein. Der in TSO → C57BL/6-Mäusen präsentierte Peptid-MHC-Komplex K<sup>b</sup>-OVA<sub>257-264</sub> scheint etwas stabiler als E<sup>k</sup>-MCC<sub>93-103</sub> zu sein. In TSO-Chimären, die von Tag -3 bis Tag -2 vor dem Transfer der T-Zellen mit Dox behandelt wurden (d -2), proliferierten die OT-I-T-Zellen in der Milz durchschnittlich 1,2-mal, während sich AND-T-Zellen unter den gleichen Bedingungen in TIM-Chimären nur 0,4-mal teilten. OT-I-T-Zellen sind aber möglicherweise auch sensitiver als AND-T-Zellen.

## ERGEBNISSE



**Abb. 5-7 Stabilität des Peptid-MHC-Komplexes *in vivo* nach Beendigung der Dox-Behandlung.** **(A)** Schematischer Überblick über die Behandlung der Knochenmarkchimären mit Dox, um das Ende der Antigenexpression nach Beendigung der Dox-Behandlung zu zeigen. Dargestellt ist der Zeitpunkt des adoptiven T-Zell-Transfers und der Analyse von Milz und Lymphknoten. **(B,C)** Repräsentatives CFSE-Profil von AND CD90.1- und OT-I CD90.1-T-Zellen nach 84 h in der Milz mit N = durchschnittliche Anzahl an Zellteilungen. Gezeigt sind CD4<sup>+</sup>CD90.1<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup>CD90.1<sup>+</sup> Zellen. **(D)** Statistische Darstellung der durchschnittlichen Zellteilungen in der Milz als indirektes Maß für die Halbwertszeit des Peptid-MHC-Komplexes *in vivo* aus 3 - 4 Experimenten mit je einer Maus pro Bedingung. Die Signifikanz wurde mittels t-Test berechnet (\*, p<0,01).

### 5.2 Antigenabhängigkeit von T-Zellen nach transientem TCR-Stimulus

#### 5.2.1 Antigenabhängige Proliferation von CD4- und CD8-T-Zellen

##### 5.2.1.1 Dox-regulierte Antigenpräsentation in Knochenmarkchimären

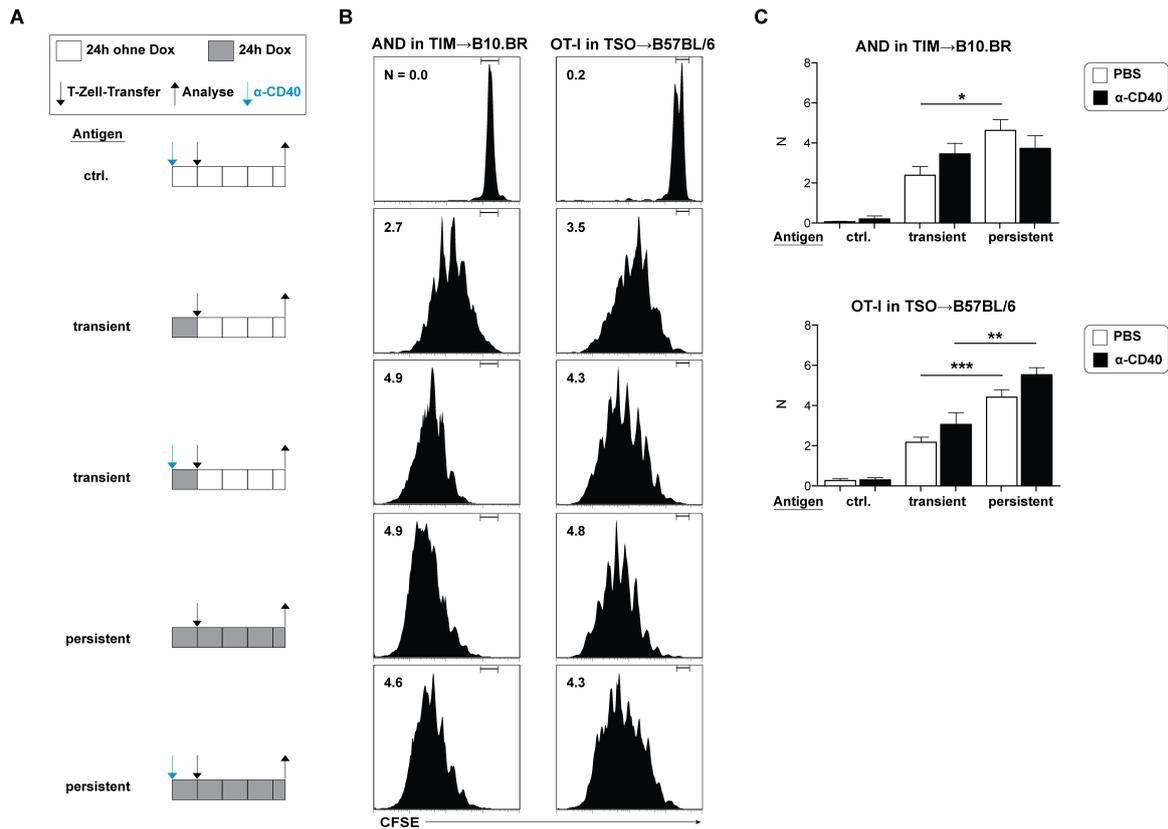
Nachdem das Problem der Hintergrundexpression des TSO-Antigens durch die Generierung von Knochenmarkchimären beseitigt werden konnte, waren alle nötigen Voraussetzungen gegeben, um das oben dargestellte Grundexperiment (Abb. 5-1) durchführen und die Frage nach der Antigenabhängigkeit der Differenzierung von CD4- und CD8-T-Zellen nach einem transienten Antigenstimulus im Vergleich untersuchen zu können.

In Abb. 5-8 sind der schematische Versuchsablauf und die Ergebnisse dargestellt. Die Antigenexpression in TSO-Knochenmarkchimären schwankte trotz stets gut ausgeprägtem Chimärismus von Experiment zu Experiment. Es ist daher schwierig, ein repräsentatives CFSE-Profil darzustellen. Der Überblick von 5 - 6 Experimenten mit statistischer Auswertung erlaubt jedoch die folgenden Aussagen.

Nach 84 h *in vivo* teilten sich AND-T-Zellen bei transientser Antigenpräsentation durchschnittlich 2,5-mal, bei persistenter Präsentation dagegen 5-mal. OT-I-T-Zellen verhielten sich ähnlich, sie zeigten bei kurzzeitiger Stimulation im Schnitt 2,3 Zellteilungen und bei ständiger Antigenpräsentation 4,5 Teilungen. Es bestanden also keine signifikanten Unterschiede zwischen CD4- und CD8-T-Zellen hinsichtlich der Antigenabhängigkeit. Keiner der beiden Zell-Typen ließ sich in diesem System früh auf weitere antigenunabhängige Teilungen programmieren.

Für AND wurde in unserer Gruppe bereits in TIM-Mäusen gezeigt, dass durch zusätzliche Behandlung der Empfänger mit  $\alpha$ -CD40 bei transientser Antigenpräsentation die Proliferation der CD4-T-Zellen auf das gleiche Maß wie unter persistenten Bedingungen gesteigert werden kann. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass durch die Aktivierung der DCs eine Verlängerung der Antigenpräsentation durch die Stabilisierung von MHC-II-Molekülen verursacht wird und dadurch die abgeschaltete TIM-Genexpression ausgeglichen wird (Obst et al., 2007). In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde die Proliferation von AND-T-Zellen in TIM  $\rightarrow$  B10.BR-Chimären auch durch zusätzliche Behandlung mit  $\alpha$ -CD40 bei transientser Dox-Verabreichung erhöht.

## ERGEBNISSE



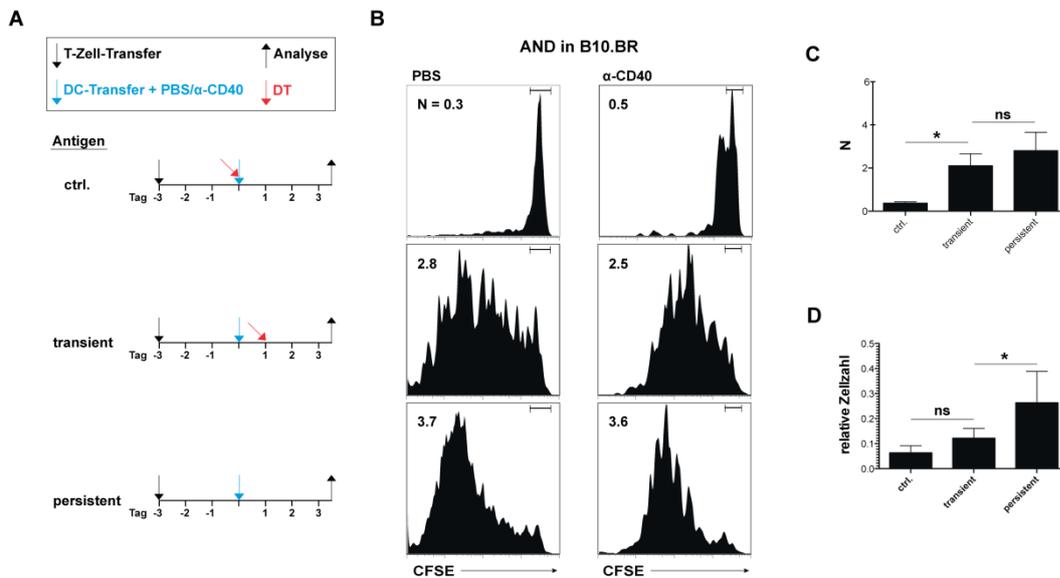
**Abb. 5-8 Antigenabhängige Proliferation von CD4- und CD8-T-Zellen in Knochenmarkchimären.** **(A)** Schematischer Überblick über die Behandlung von Knochenmarkchimären mit Dox, um transiente bzw. persistente Antigenexpression zu generieren. Dargestellt sind Zeitpunkt der Injektion von  $\alpha$ -CD40-mAb zur Aktivierung von DCs sowie Zeitpunkt des adoptiven T-Zell-Transfers und der Analyse von Milz und Lymphknoten. **(B)** Repräsentatives CFSE-Profil von AND CD90.1 und OT-I CD90.1 T-Zellen nach 84 h in der Milz mit N = durchschnittliche Anzahl an Zellteilungen. Gezeigt sind CD4<sup>+</sup>CD90.1<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup>CD90.1<sup>+</sup> Zellen. **(C)** Durchschnittliche Anzahl an Zellteilungen aus 5-6 Experimenten mit je einer Maus pro Bedingung. **(D)** Prozentuale Zellzahl an CD4<sup>+</sup>CD90.1<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup>CD90.1<sup>+</sup> Zellen in der Milz. Gezeigt sind Einzelwerte oder Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mittels t-Test berechnet (\*, p<0,01; \*\*, p<0,001; \*\*\*, p<0,0001).

### 5.2.1.2 Depletion von dendritischen Zellen durch Diphtherietoxin (DT) *in vivo*

Um die Frage der Programmierbarkeit von CD4- und CD8-T-Zellen weiter klären zu können, wurde ein alternatives experimentelles *In-vivo*-System verwendet. Es wurden wieder CFSE-markierte AND- bzw. OT-I-T-Zellen adoptiv transferiert. In diesem Fall waren allerdings alle Empfängertiere Wildtypmäuse. Der Antigenstimulus wurde über DCs vermittelt, die aus transgenen Mäusen stammten. Die DC-Spendermäuse exprimie-

## ERGEBNISSE

ren einerseits das Antigen konstitutiv und andererseits den Diphtherietoxin-Rezeptor (DTR) unter der Kontrolle eines CD11c-Promotors. Der DTR wird daher nur auf DCs exprimiert und macht diese sensitiv für DT. Auf diese Weise können transferierte DCs spezifisch durch Injektion von DT depletiert werden. Die endogenen Zellen der Rezipienten tragen keinen DTR und sind daher resistent gegen das Toxin.



**Abb. 5-9 Antigenabhängige Proliferation von AND T-Zellen nach Depletion von transferierten DTR+Ii-MCC<sup>+</sup> DCs *in vivo*.** **(A)** Überblick über den zeitlichen Verlauf des Experiments. Angegeben sind der Zeitpunkt des adoptiven Transfers von T-Zellen und von DTR+Ii-MCC<sup>+</sup> DCs sowie der Zeitpunkt der Injektion von α-CD40-mAb (20 µg) zur Aktivierung von DCs und von Diphtherietoxin (DT, 4 ng/g Körpergewicht) zur Depletion der transferierten DTR+DCs. Als Negativ-Kontrolle wurde DT direkt nach Injektion der DCs i.p. und i.v. injiziert, um die DCs sofort zu depletieren. Um transiente Antigenpräsentation zu generieren, wurde DT 24 - 33 h nach Injektion der DCs injiziert. Für persistente Antigenpräsentation wurde kein DT injiziert. **(B)** CFSE-Profil von AND CD90.1 84 - 90 h nach Transfer der DCs in der Milz mit N = durchschnittliche Anzahl an Zellteilungen. Gezeigt sind CD4<sup>+</sup>CD90.1<sup>+</sup> Zellen. **(C)** Durchschnittliche Anzahl an Zellteilungen aus 3 Experimenten mit je einem Tier pro Bedingung. **(D)** Prozentuale Zellzahl an CD4<sup>+</sup> CD90.1<sup>+</sup> in der Milz. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mittels t-Test berechnet (\*, p<0,05).

In diesem Experiment wurden die DCs durchflusszytometrisch sortiert und anschließend zusätzlich zu den T-Zellen in die Empfängermäuse transferiert. Abb. 5-9 zeigt den Versuchsablauf und die Ergebnisse für AND-T-Zellen und Ii-MCC<sup>+</sup>DTR<sup>+</sup> DCs in B10.BR. Jeweils 1 x 10<sup>6</sup> naive CFSE-markierte AND-T-Zellen wurden adoptiv in Wildtypmäuse (B10.BR) transferiert. 3 d später wurden zusätzlich 3 - 5 x 10<sup>5</sup> sortierte Ii-MCC<sup>+</sup>DTR<sup>+</sup> DCs transferiert. Als Negativ-Kontrolle wurde der ersten Maus gleichzeitig mit den DCs

## ERGEBNISSE

---

DT injiziert, um die DCs zu depletieren, bevor sie in Kontakt mit den T-Zellen kommen konnten. Eine weitere Maus diente als zusätzliche Kontrolle und bekam keine DT-Injektion. Die T-Zellen bekamen in diesem Fall also einen persistenten Antigenstimulus. Der experimentell entscheidenden Maus wurde 24 - 33 h nach DC-Transfer DT injiziert, um die DCs zu depletieren und den T-Zellen so lediglich einen transienten Stimulus zu erteilen.

AND-T-Zellen teilten sich bei transientser Antigenpräsentation durchschnittlich 2,8-mal. Es gab allerdings sowohl ungeteilte Zellen, als auch Zellen die sich weitaus häufiger teilten. Möglicherweise ist die Depletion nicht vollständig und es haben DCs überlebt, die das Antigen weiterhin präsentierten. Verglichen mit der Positiv-Kontrolle ist aber klar ersichtlich, dass die CD4-T-Zellen durch den Antigenkontakt vor der Depletion nicht auf weitere Differenzierung programmiert wurden. In der Positiv-Kontrolle teilten sich die AND-T-Zellen durchschnittlich 3,6-mal. Auch hier gab es ungeteilte Zellen, was darauf schließen lässt, dass nicht alle T-Zellen in Kontakt mit transferierten DCs gekommen sind. Auch nach zusätzlicher Aktivierung der DCs durch Behandlung der Rezipienten mit  $\alpha$ -CD40-mAb wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt.

Zur Untersuchung von CD8-T-Zellen wurde das entsprechende Experiment auch mit OT-I-T-Zellen durchgeführt. In diesem Fall dienten Act-OVA<sup>+</sup>DTR<sup>+</sup> Mäuse als DC-Spender. Die T-Zellen proliferierten aber auch in der Negativ-Kontrolle. Um auszuschließen, dass eventuell endogene DCs das Antigen der depletierten DCs aufnehmen und kreuzpräsentierten, wurde das Experiment auch mit Rac1-defizienten Mäusen als Empfänger durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Für diese Mäuse (CD11c-Rac1 (N17)) ist gezeigt worden, dass Kreuzpräsentation auf DCs stark reduziert ist (Kerksiek et al., 2005). Dennoch teilten sich die OT-I-T-Zellen auch in dieser Negativ-Kontrolle. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang mit der überaus hohen Expression des Ovalbumins in ACT-OVA-Mäusen, die beispielsweise aus einer Studie an fetalen Zellen hervorgeht (Erlebacher et al., 2007). Da die Experimente ohne Negativ-Kontrolle nicht aussagekräftig sind, wurden die Resultate nicht abgebildet. Für DTR-Experimente wurde zudem Toxizität bei Immunisierung beschrieben (Meyer Zu Horste et al., 2010). Dieses experimentelle System eignete sich daher nicht für die Fragestellung.

### 5.2.2 Antigenunabhängige Proliferation von CD8-T-Zellen

Neben den beiden bereits dargestellten *In-vivo*-Systemen zur Untersuchung der Antigenabhängigkeit wurde noch ein weiterer methodischer Ansatz verfolgt, der eine Kombination aus *In-vitro*-Aktivierung und adoptivem Transfer von T-Zellen darstellt.

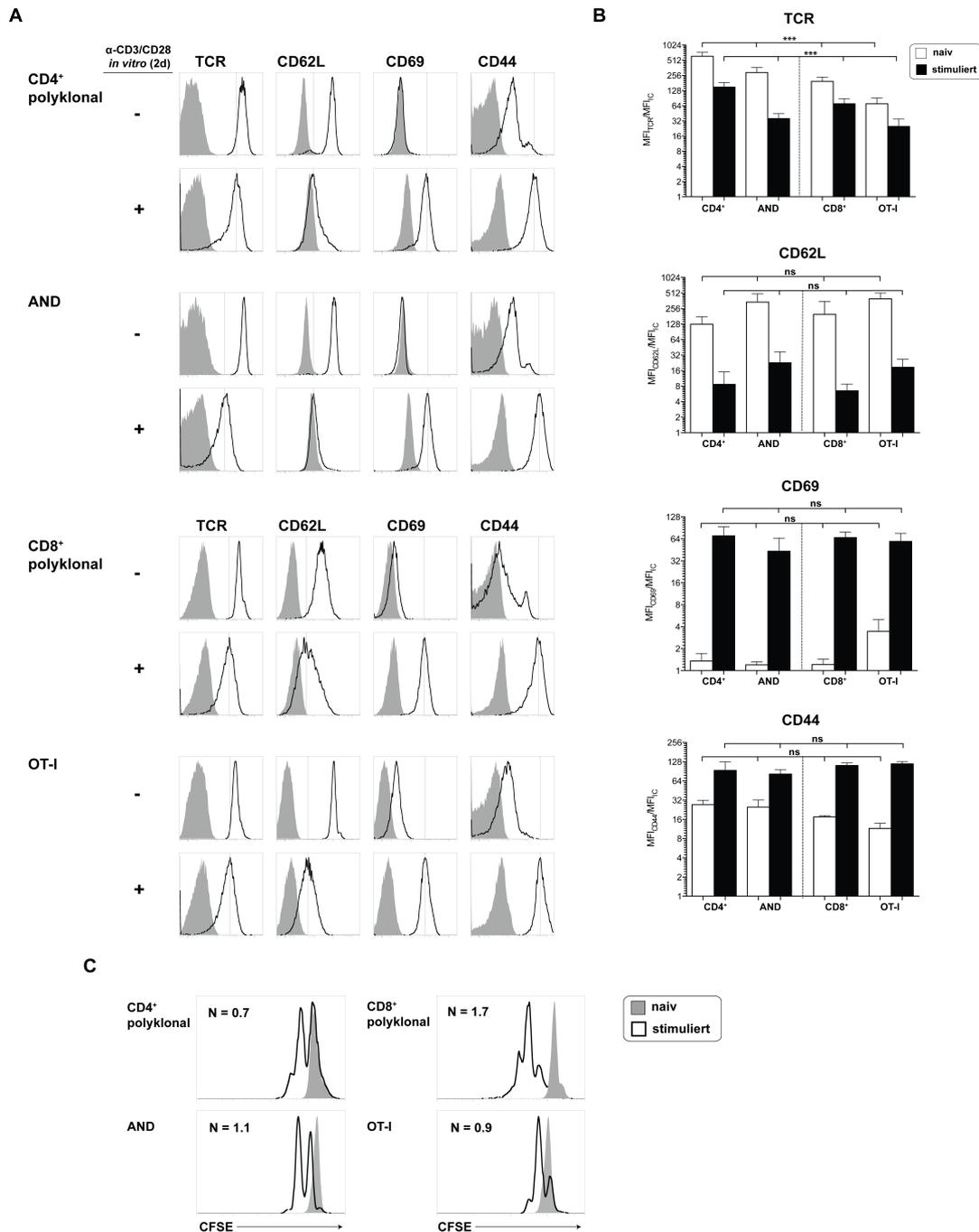
#### 5.2.2.1 *In-vitro*-Aktivierung von T-Zellen mit $\alpha$ -CD3-/CD28-Antikörpern

Die *In-vitro*-Aktivierung hat gegenüber den beiden reinen *In-vivo*-Systemen den Vorteil, CD4- und CD8-T-Zellen in exakt gleicher Weise stimulieren zu können, unabhängig von TCR-Spezifität und -Affinität, Klasse des MHC-Komplexes und Art der APC. Um zudem sicherzustellen, dass die Ergebnisse nicht nur für die sehr speziellen TCR-transgenen T-Zellen aus AND und OT-I zutreffen, sondern generelle Aussagen über CD4- und CD8-T-Zellen im Allgemeinen zulassen, wurden in diesem Versuch auch polyklonale endogene T-Zellen aus C57BL/6-Mäusen betrachtet. Dies war in den reinen *In-vivo*-Systemen nicht möglich, da der Stimulus hier antigenspezifisch und daher TCR-abhängig war.

Um zu untersuchen, ob T-Zellen durch einen *In-vitro*-Stimulus auf weitere Proliferation *in vivo* programmierbar sind, wurden CD4- bzw. CD8-T-Zellen aus Lymphknoten und Milzen von AND CD90.1-, OT-I CD90.1- bzw. C57BL/6 CD90.1-Mäusen magnetisch aufgereinigt, CFSE-markiert und für 48 h in 96-well-Platten kultiviert, die zuvor mit jeweils 10  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -CD3- und  $\alpha$ -CD28-mAb beschichtet worden waren. Die Antikörper gegen CD3 und CD28 sollten dabei das für die Aktivierung nötige Signal 1 und Signal 2 vermitteln. Als Kontrolle wurden die Zellen in Platten kultiviert, die mit PBS behandelt worden waren. Um die Überlebensrate der nicht stimulierten T-Zellen zu erhöhen, wurde dem verwendeten Medium Interleukin-7 (rmIL-7) zugesetzt. Nach 2 d *in vitro* wurden die Zellen hinsichtlich ihres Aktivierungsstatus gefärbt. In Abb. 5-10 sind die Ergebnisse dargestellt.

CD4- und CD8-T-Zellen zeigten nach 48 h *in vitro* mit  $\alpha$ -CD3- und  $\alpha$ -CD28-mAb insgesamt ein ähnliches Aktivierungsprofil. Die Unterschiede in der Expression von CD62L, CD69 und CD44 waren nicht signifikant. Nur der TCR war auf CD4-T-Zellen stärker ausgeprägt als auf CD8-T-Zellen, wurde aber in allen Gruppen infolge der Aktivierung vergleichbar stark herunterreguliert.

# ERGEBNISSE



**Abb. 5-10 Vergleichbare Expression von Aktivierungsmarkern nach *In-vitro*-Stimulation von TCR-transgenen und polyklonalen CD4- und CD8-T-Zellen.** AND-, OT-I- und polyklonale T-Zellen wurden magnetisch aufgereinigt (MACS). Polyklonale CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wurden aus C57BL/6-Mäusen gewonnen. Die Zellen wurden für 48 h in 96-well-Platten kultiviert, die mit  $\alpha$ -CD3/CD28-mAb beschichtet waren. **(A)** Repräsentative Färbung von Aktivierungsmarkern nach 48 h in Kultur. In Grau ist die Isotyp-Kontrolle dargestellt. **(B)** Statistische Darstellung der in **A** gezeigten Aktivierungsmarker. **(C)** Die T-Zellen wurden vor der Kultur mit CFSE markiert, um die beginnende Proliferation nach 48 h zu zeigen. Die durchschnittliche Anzahl an Zellteilungen ist mit N angegeben. Gezeigt sind Einzelwerte oder Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mittels ANOVA-Test berechnet (\*\*\*,  $p < 0,001$ ).

Polyklonale und transgene CD4-T-Zellen sowie polyklonale CD8-T-Zellen hatten sich durch 48 h *In-vitro*-Aktivierung durchschnittlich ein Mal geteilt (CD4 polyklonal, N = 0,7; AND, N = 1,1; CD8 polyklonal N = 0,9). Polyklonale CD8-T-Zellen zeigten dagegen durchschnittlich 1,7 Zellteilungen und teilten sich damit wie in der Literatur beschrieben etwas früher bzw. schneller als CD4-T-Zellen (Seder and Ahmed, 2003).

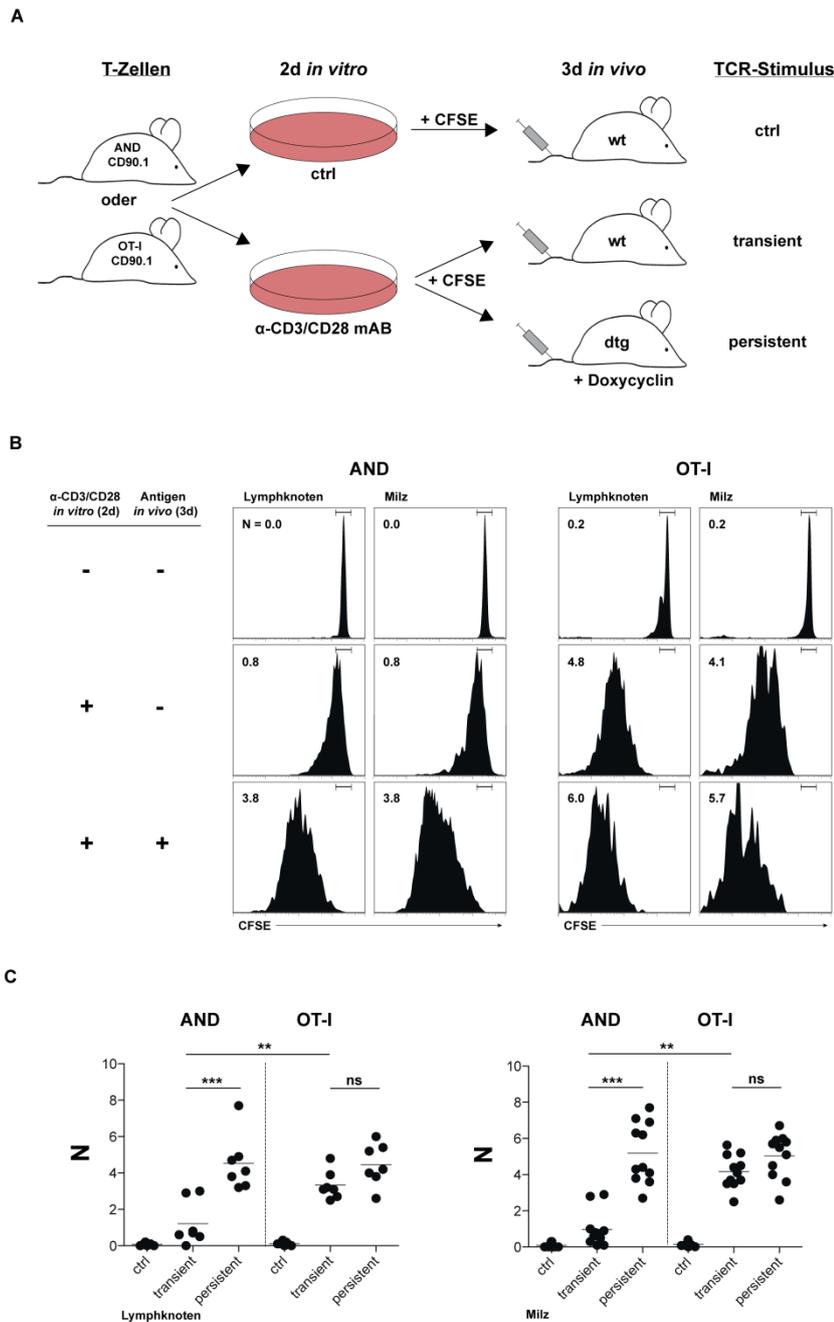
### 5.2.2.2 Adoptiver Transfer *in vitro* aktivierter TCR-transgener T-Zellen

Um zu untersuchen, ob der *In-vitro*-Stimulus ausreicht, um die weitere Differenzierung der CD4- bzw. CD8-T-Zellen zu Effektor-T-Zellen zu programmieren, wurden die aktivierten oder nicht stimulierten Kontroll-T-Zellen mit CFSE markiert und in Mäuse transferiert. Analog zu den beiden weiter oben beschriebenen reinen *In-vivo*-Systemen wurde das Proliferationsverhalten der T-Zellen auch hier unter drei verschiedenen Bedingungen betrachtet. Abb. 5-11 zeigt den Versuchsaufbau. Als Kontrollen dienten der Transfer unstimulierter T-Zellen in Wildtypmäuse und der Transfer aktivierter T-Zellen in Antigen präsentierende Mäuse. Zu untersuchen war, wie sich die transiente *In-vitro*-Aktivierung im Vergleich zu den beiden Kontroll-Bedingungen auswirken würde, wenn die T-Zellen nach dem Transfer in Wildtypmäuse keinen weiteren Antigenstimulus bekommen würden.

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben wurden die CD4- bzw. CD8-T-Zellen aus Lymphknoten und Milzen von AND CD90.1 bzw. OT-I CD90.1-Mäusen magnetisch aufgereinigt und für 48 h in 96-well-Platten kultiviert, die zuvor mit 10 µg/ml  $\alpha$ -CD3- und  $\alpha$ -CD28-mAb oder für die Negativ-Kontrolle mit PBS beschichtet worden waren. Im Gegensatz zum Aktivierungsversuch wurden die T-Zellen aber erst nach der Aktivierung direkt vor dem Transfer mit CFSE markiert. Das hat den Vorteil, dass das CFSE-Profil nur Zellteilungen zeigt, die nach der Aktivierung *in vivo* stattgefunden haben; die erste(n) Teilung(en) während der Stimulation (Abb. 5-10) wird (werden) nicht detektiert. Das ist ein weiterer Vorteil gegenüber den *In-vivo*-Systemen.

Die CD4-T-Zellen teilten sich nach *In-vitro*-Aktivierung im Lymphknoten von Wildtypmäusen durchschnittlich noch 1,2-mal und in der Milz 1,0-mal. In Lymphknoten von TIM-Mäusen, also bei persistenter Antigenpräsentation, zeigten sie dagegen durchschnittlich 4,5, in der Milz 5,2 Teilungen. Sie waren also auch unter diesen Bedingungen strikt antigenabhängig. Im Gegensatz dazu teilten sich CD8-T-Zellen nach transientem Stimulus im Lymphknoten von Wildtypmäusen 3,3-mal und in der Milz 4,2-mal.

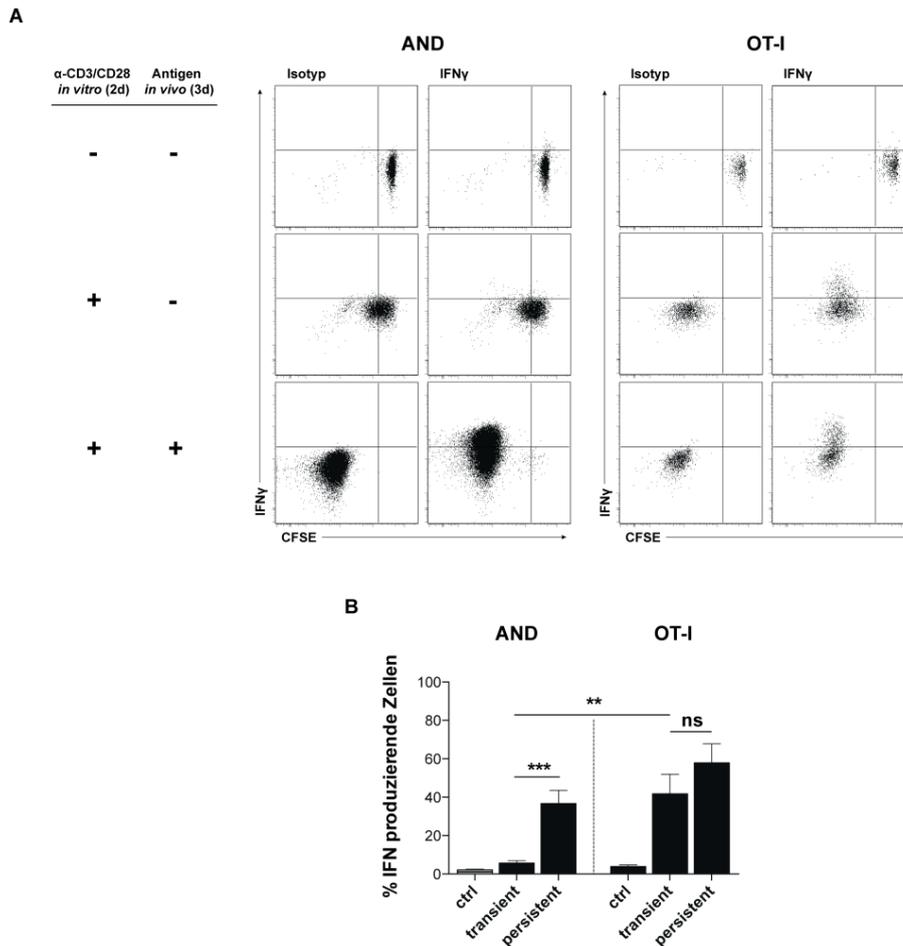
## ERGEBNISSE



**Abb. 5-11 Antigenunabhängige Proliferation von OT-I-T-Zellen nach *In-vitro*-Aktivierung.** **(A)** Schematischer Überblick über den Versuchsaufbau. AND und OT-I-T-Zellen wurden wie in Abb. 5-10 gezeigt für 48 h mit  $\alpha$ -CD3/CD28-mAb stimuliert. Anschließend wurden sie mit CFSE markiert und adoptiv in wt oder mit Dox behandelte TIM- bzw. TSO-Mäuse transferiert, um transiente bzw. persistente Bedingungen zu generieren. Als Negativ-Kontrolle wurden nicht stimulierte T-Zellen in Wildtypmäuse transferiert. Nach 64 h *in vivo* wurden Lymphknoten und Milz analysiert. **(B)** Repräsentatives CFSE-Profil von AND- und OT-I-T-Zellen nach 64 h in Lymphknoten und Milz mit N = durchschnittliche Anzahl an Zellteilungen. Gezeigt sind  $CD4^+CD90.1^+$  bzw.  $CD8^+CD90.1^+$ Zellen. **(C)** Durchschnittliche Anzahl an Zellteilungen aus 8 Experimenten mit je einer Maus pro Bedingung. Gezeigt sind Einzelwerte oder Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mittels t-Test berechnet (\*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ).

## ERGEBNISSE

Nach *In-vitro*-Aktivierung und zusätzlichem Antigenstimulus *in vivo* zeigten OT-I-T-Zellen im Lymphknoten 4,2 Zellteilungen und in der Milz 5,0. CD8-T-Zellen scheinen demnach weniger antigenabhängig zu sein als CD4-T-Zellen. Der Unterschied zwischen der Zellteilungsrate unter transienten im Gegensatz zu persistenten Bedingungen war bei OT-I-T-Zellen nicht signifikant.



**Abb. 5-12 Antigenunabhängige INF- $\gamma$ -Produktion von OT-I-T-Zellen nach *In-vitro*-Aktivierung.** AND und OT-I-T-Zellen wurden wie in Abb. 5-11 gezeigt für 48 h mit  $\alpha$ -CD3/CD28-mAb stimuliert, anschließend mit CFSE markiert und adoptiv in wt oder mit Dox behandelte TIM- bzw. TSO-Mäuse transferiert, um transiente bzw. persistente Bedingungen zu generieren. Als Negativ-Kontrolle wurden unstimulierte T-Zellen in Wildtypmäuse transferiert. Nach 64 h *in vivo* wurden die Zellen aus der Milz in Kultur genommen und für 4 h mit PMA und Ionomycin restimuliert. Nach den ersten 2 h wurde Brefeldin A zur Kultur gegeben und nach weiteren 2 h wurde intrazelluläres IFN- $\gamma$  gefärbt. **(A)** Repräsentative Darstellung der IFN- $\gamma$ -Produktion von AND- und OT-I-T-Zellen in Abhängigkeit zur Proliferation nach 64 h in der Milz. Gezeigt sind CD4<sup>+</sup>CD90.1<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup>CD90.1<sup>+</sup> Zellen. **(B)** Statistische Darstellung der IFN- $\gamma$ -produzierenden Zellen aus 8 - 10 Experimenten mit je einem Tier pro Bedingung. 4 Experimente wurden von Anne Behrendt durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mittels t-Test berechnet (\*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ).

## ERGEBNISSE

---

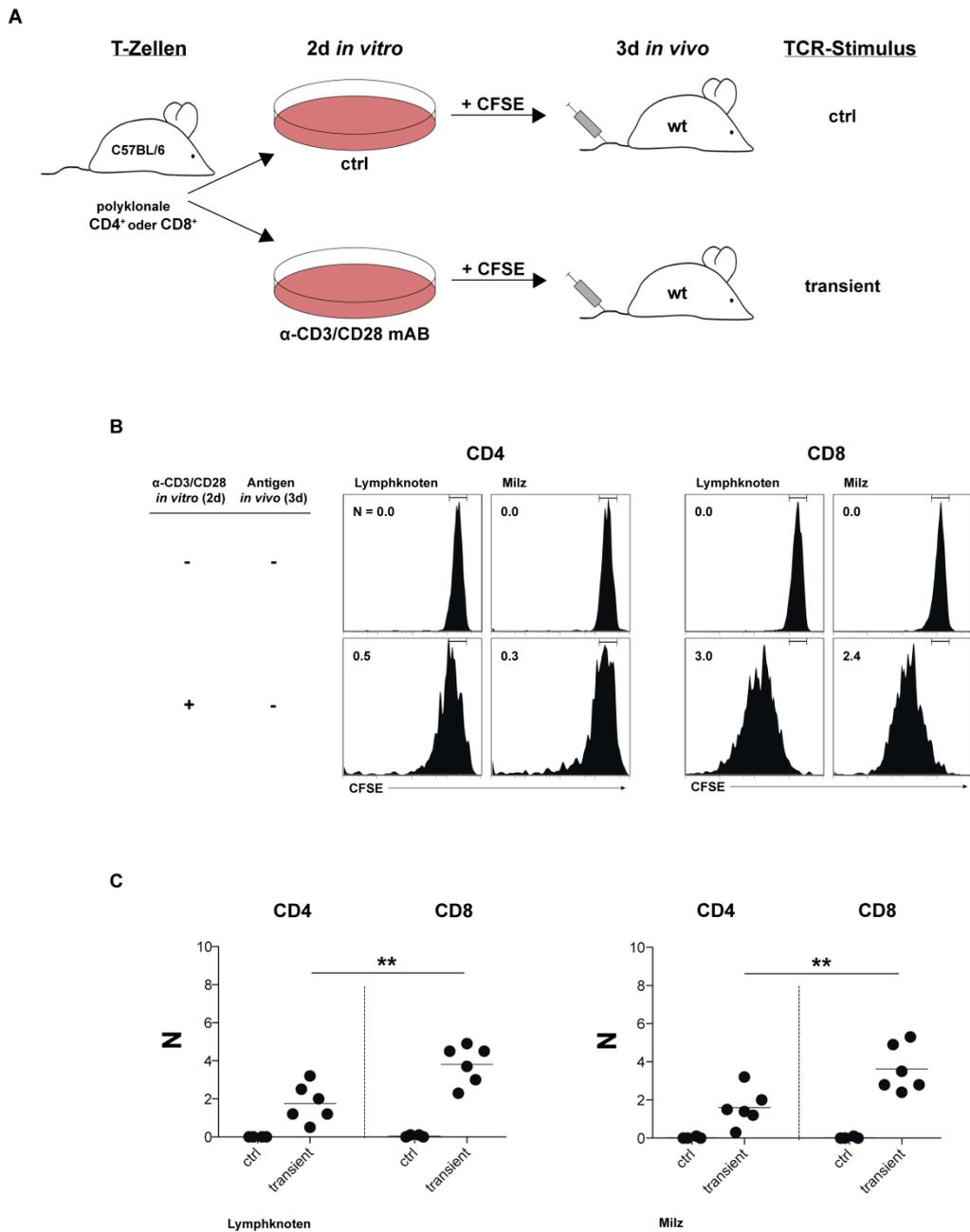
Um zu untersuchen, ob OT-I-T-Zellen unter transienten Bedingungen lediglich antigenunabhängig proliferieren oder ob sie sich auch zu Effektorzellen entwickeln, wurde die Produktion von Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), einem Zytokin, das von beiden Zelltypen nach Aktivierung gebildet wird, gemessen. Der Versuchsablauf war wie in Abb. 5-11 gezeigt, die Zellen wurden aber am Tag der Analyse nicht nur hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens analysiert, sondern auch für 4 h in Kultur genommen und mit PMA und Ionomycin restimuliert. Nach den ersten 2 h wurde Brefeldin A zur Kultur gegeben, um die Sekretion des produzierten Interferons zu verhindern. Nach weiteren 2 h wurde intrazelluläres IFN- $\gamma$  gefärbt.

Abb. 5-12 zeigt das Ergebnis in Abhängigkeit zur Proliferation. OT-I-T-Zellen teilten sich nach transientser *In-vitro*-Aktivierung nicht nur antigenunabhängig, sie produzierten durchschnittlich auch annähernd soviel (42 %) IFN- $\gamma$  wie nach persistentem TCR-Stimulus *in vitro* und *in vivo* (58 %). Die CD8-T-Zellen waren demnach infolge der Aktivierung auf weitere Differenzierung zu Effektorzellen *in vivo* programmierbar. Im Gegensatz dazu bildeten die nach transientser Aktivierung schwach proliferierenden AND-T-Zellen kaum mehr IFN- $\gamma$  als die Kontrolle (2,1 versus 5,5 %), während persistente Aktivierung zu einer IFN- $\gamma$ -Produktion von durchschnittlich 37 % führte. Demnach war nicht nur die Proliferation von CD4-T-Zellen sondern auch die Differenzierung zu IFN- $\gamma$ -produzierenden Effektorzellen während der frühen Expansion strikt antigenabhängig. Vier der acht bis zehn in der statistischen Auswertung dargestellten Experimente wurden von Anne Behrendt durchgeführt.

### 5.2.2.3 Adoptiver Transfer *in vitro* aktivierter polyklonaler T-Zellen

Um zu untersuchen, ob die gezeigten Daten nur für TCR-transgene AND- und OT-I-T-Zellen zutreffen oder aber generelle Merkmale von CD4- und CD8-T-Zellen zeigen, wurden analog zu den oben beschriebenen Versuchen mit TCR-transgenen T-Zellen auch Experimente mit polyklonalen CD4- und CD8-T-Zellen durchgeführt. Es gab in diesem Fall allerdings keine Kontrolle mit persistentem Stimulus, die Proliferation nach transientem Stimulus konnte in diesem System nur im Vergleich zur Kontrolle der nicht stimulierten Zellen betrachtet werden. Abb. 5-13 zeigt den Versuchsablauf und die Resultate.

## ERGEBNISSE



**Abb. 5-13 Antigenunabhängige Proliferation von polyklonalen CD8-T-Zellen nach *In-vitro*-Aktivierung.** **(A)** Schematischer Überblick über den Versuchsaufbau. Polyklonale CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wurden wie in Abb. 5-10 gezeigt für 48 h mit  $\alpha$ -CD3/CD28-mAb stimuliert. Anschließend wurden sie mit CFSE markiert und adoptiv in Wildtypmäuse transferiert, um Proliferation nach transienter Stimulation zu zeigen. Als Negativ-Kontrolle wurden unstimulierte T-Zellen in Wildtypmäuse transferiert. Nach 64 h *in vivo* wurden Lymphknoten und Milz der Empfängertiere analysiert. **(B)** Repräsentatives CFSE-Profil von polyklonalen CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nach 64 h in Lymphknoten und Milz (N = durchschnittliche Anzahl an Zellteilungen). Gezeigt sind CD4<sup>+</sup>CD90.1<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup>CD90.1<sup>+</sup> Zellen. **(C)** Durchschnittliche Anzahl an Zellteilungen aus 6 Experimenten mit je einem Empfängertier pro Bedingung. Gezeigt sind Einzel und Mittelwerte. Die Signifikanz wurde mittels t-Test berechnet (\*\*,  $p < 0,01$ ).

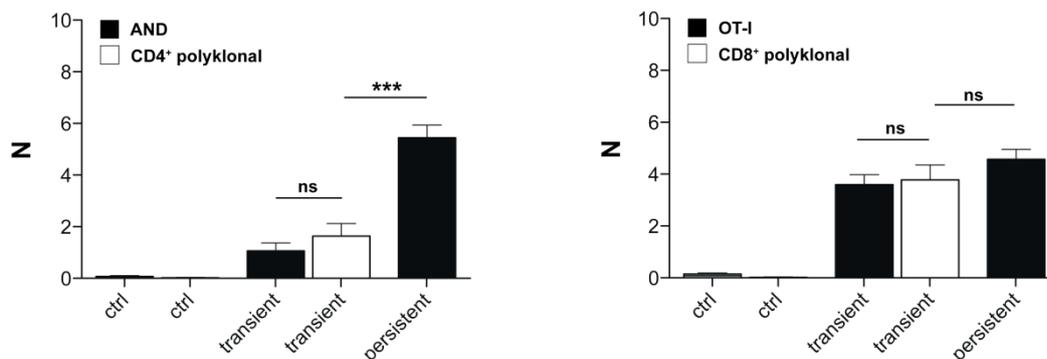
## ERGEBNISSE

Polyklonale CD4- bzw. CD8-T-Zellen wurden aus CD90.1<sup>+</sup> Wildtypmäusen mittels positiver Selektion magnetisch aufgereinigt und 48 h mit  $\alpha$ -CD3/CD28-mAb stimuliert. Anschließend wurden die aktivierten und als Kontrolle die nicht stimulierten T-Zellen mit CFSE markiert und in Wildtypmäuse (CD90.2<sup>+</sup>) transferiert.

Polyklonale CD4-T-Zellen teilten sich nach transientem Stimulus im Lymphknoten durchschnittlich 1,8-mal und in der Milz 1,6-mal. CD8-T-Zellen hatten dagegen unter den gleichen Bedingungen eine Teilungsrate von 3,8 im Lymphknoten und 3,6 in der Milz. Polyklonale T-Zellen verhielten sich demnach ähnlich wie die zuvor beschriebenen TCR-transgenen T-Zellen. Polyklonale CD4-T-Zellen waren wie AND-T-Zellen in ihrer Proliferation stärker antigenabhängig als CD8-T-Zellen.

### 5.2.2.4 Vergleichende Analyse TCR-transgener und polyklonaler T-Zellen

Um die Ergebnisse des Proliferationsverhalten von TCR-transgenen und polyklonalen T-Zellen besser vergleichen zu können, ist in Abb. 5-14 ein direkter Vergleich von einerseits CD4-T-Zellen und andererseits CD8-T-Zellen untereinander als statistische Auswertung der Ergebnisse aus Abb. 5-11 und Abb. 5-13 dargestellt.

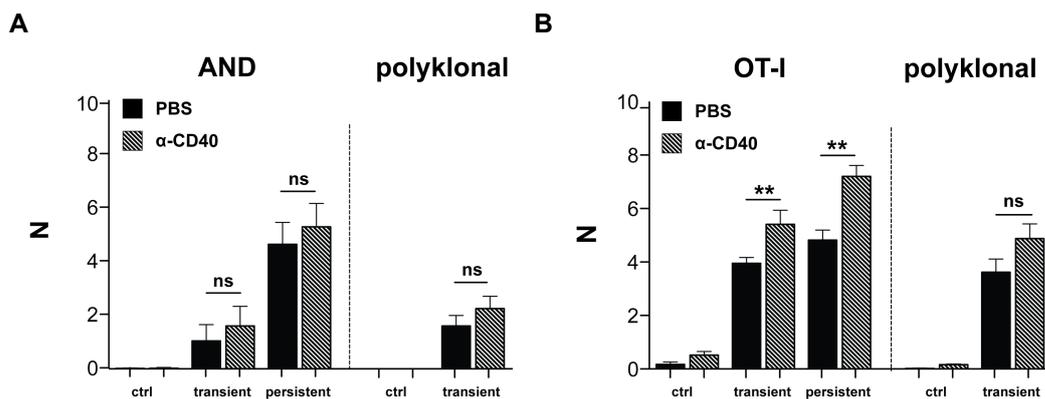


**Abb. 5-14 Antigenabhängigkeit von CD4-T-Zellen im Gegensatz zu CD8-T-Zellen nach transienter Aktivierung.** Statistischer Vergleich der in **Abb. 5-11** und **Abb. 5-13** dargestellten Resultate aus der Milz. Antigenabhängige Proliferation von AND und polyklonalen CD4-T-Zellen im Gegensatz zu antigen-unabhängiger Proliferation von OT-I und polyklonalen CD8-T-Zellen. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichung aus 8 bzw. 6 Experimenten mit je einem Tier pro Bedingung. Die Signifikanz wurde mittels t-Test berechnet (\*\*\*,  $p < 0,0001$ ).

## ERGEBNISSE

Transiente *In-vitro*-Aktivierung konnte sowohl TCR-transgene als auch polyklonale CD4-T-Zellen nicht für weitere Differenzierung zu Effektor-T-Zellen programmieren. Beide Gruppen teilten sich nach dem TCR-Stimulus *in vivo* in Abwesenheit von Antigen lediglich 1,2- bzw. 1,6-mal. TCR-transgene und polyklonale CD8-T-Zellen proliferierten dagegen unter den gleichen Bedingungen 3,6- bzw. 4,2-mal. Der Unterschied zur Kontrolle bei persistentem TCR-Stimulus war zudem nicht signifikant. CD8-T-Zellen zeigten demnach in diesem experimentellen System im Gegensatz zu CD4-T-Zellen klar antigen-unabhängige Proliferation.

Die bisherigen Experimente mit *in vitro* aktivierten T-Zellen wurden alle unter nicht-inflammatorischen Bedingungen durchgeführt, um die Bedeutung des über den TCR vermittelten Stimulus getrennt von anderen Einflüssen betrachten zu können. Möglicherweise sind CD4-T-Zellen aber stärker als CD8-T-Zellen von Faktoren wie beispielsweise Zytokinen abhängig, die bei einer natürlichen Immunantwort infolge einer Infektion *in vivo* in größerer Menge sezerniert werden als in dem hier verwendeten System. Die in Abb. 5-11 und Abb. 5-13 dargestellten Experimente wurden daher nochmals mit einer zusätzlichen Maus pro Bedingung durchgeführt, die einen Tag vor dem T-Zell-Transfer mit  $\alpha$ -CD40-mAb behandelt wurde, um durch die Aktivierung von DCs und anderen Zellen eine Pseudo-Endzündungssituation zu generieren. Abb. 5-15 zeigt die Ergebnisse.

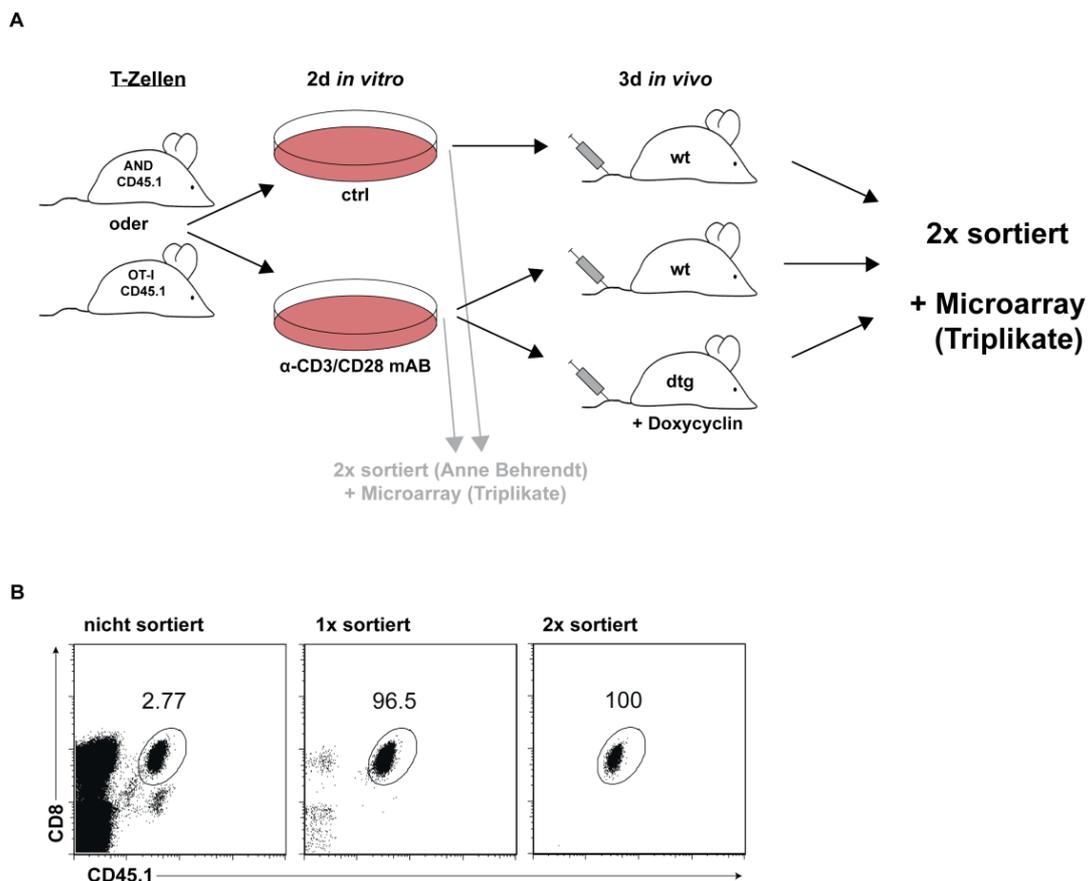


**Abb. 5-15 Antigenabhängige Proliferation von CD4-T-Zellen auch unter pseudo-inflammatorischen Bedingungen.** AND-, OT-I- und polyklonale T-Zellen wurden wie in **Abb. 5-11** und **Abb. 5-13** behandelt. Für jede Bedingung wurde einer zusätzlichen Maus 24 h vor dem T-Zell-Transfer  $\alpha$ -CD40-mAb injiziert. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichung aus 5 Experimenten mit je einem Tier pro Bedingung. Die Signifikanz wurde mittels t-Test berechnet (\*\*,  $p < 0,005$ ).

## ERGEBNISSE

Die Teilungsrate von AND- und polyklonalen CD4-T-Zellen wurde durch Behandlung der Rezipienten mit  $\alpha$ -CD40-mAb sowohl unter transienten als auch unter persistenten Bedingungen zwar schwach, aber nicht signifikant erhöht (Abb. 5-15, **(A)**). CD4-T-Zellen zeigten demnach auch im Kontext einer Entzündungssituation keine antigenunabhängige Proliferation. OT-I-T-Zellen zeigten nach Behandlung der Rezipienten mit  $\alpha$ -CD40-mAb unter transienten Bedingungen durchschnittlich 1,3 mehr Zellteilungen als ohne Behandlung. Die Proliferationsrate unter persistenten Bedingungen stieg um 2,2. Polyklonale CD8-T-Zellen teilten sich durchschnittlich 1,2-mal häufiger, der Unterschied war jedoch nicht signifikant und lässt daher keine weiteren Schlüsse zu (Abb. 5-15, **(B)**).

### 5.2.2.5 Vergleichende Analyse des Transkriptoms: Microarray



**Abb. 5-16 Schematischer Versuchsablauf und Aufreinigung der T-Zellen für die vergleichende Analyse des Transkriptoms. (A)** Überblick über den Versuchsablauf (vgl. **Abb. 5-11**). Die Sortierungen an d 2 wurden von Anne Behrendt durchgeführt. **(B)** Repräsentative Darstellung der durchflusszytometrischen Sortierung (MoFlo) von OT-I 45.1 T-Zellen an d 5. Das Experiment wurde für jede der sechs Bedingungen bis zu 12 x durchgeführt. Die jeweiligen drei Sortierungen mit der höchsten Reinheit wurden als Triplikate für die Analyse mittels Microarray verwendet.

## ERGEBNISSE

---

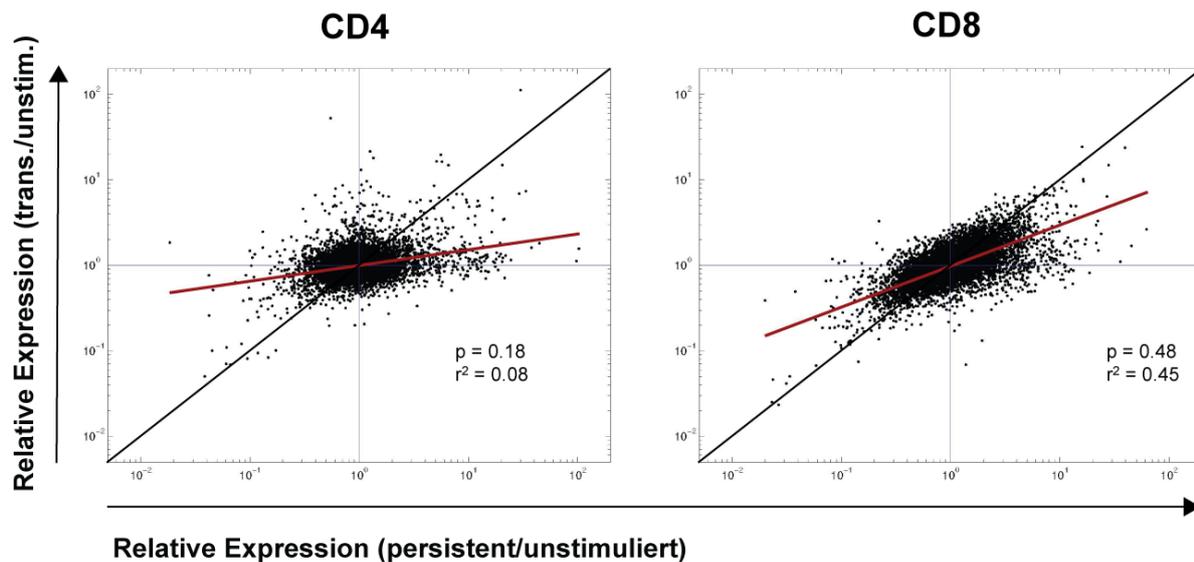
Um zu untersuchen, welche Gene in CD4- und CD8-T-Zellen nach transientem Stimulus unterschiedlich reguliert werden und damit für die antigenunabhängige Proliferation von CD8-T-Zellen nach einem kurzen TCR-Stimulus ausschlaggebend sein könnten, wurde eine vergleichende Analyse des Transkriptoms von AND- und OT-I-T-Zellen durchgeführt. Abb. 5-16 zeigt das experimentelle Vorgehen.

Der Versuchsaufbau war analog zu dem in Abb. 5-11 dargestellten Experiment, mit dem Unterschied, dass die T-Zellen nicht mit CFSE markiert wurden. Zum Zeitpunkt der Analyse wurden die T-Zellen aus Lymphknoten und Milz gepoolt und jeweils zweimal bis zu einer Reinheit von annähernd 100% sortiert. Die RNA wurde mittels TRIzol isoliert, in cDNA übersetzt und davon cRNA hergestellt. Jeweils drei Replikate wurden auf einen DNA-Chip hybridisiert (Affymetrix Mouse 430 v 2.0). Die Markierung, Hybridisierung und Berechnung der Expressionswerte wurde an der Expression Core Facility der TU München unter der Leitung von Dr. Reinhard Hoffmann durchgeführt. Die erhaltenen Expressionsdaten wurden mit der GenePattern Software v3.3.3 (<http://www.broadinstitute.org/cancer/software/genepattern>) vorverarbeitet und ausgewertet. Die Intensitäts-Datensätze (Affymetrix CEL-Files) wurden mit Hilfe des GenPattern-Moduls ExpressionFileCreator mit der Robust Multiarray Average (RMA) background correction method (Irizarry et al., 2003) normalisiert und in Genexpressions-Datensätze (gct-Files) konvertiert. Nachdem durch das CollapseDataset-Modul redundante Probesets auf Gene reduziert wurden, wurden die gct-Files mit Hilfe der Module MultiplotPreprocess und MultiplotVisualizer dargestellt.

In Abb. 5-17 ist ein Fold Change - Fold Change - Plot (FC - FC-Plot) aller untersuchten Gene für CD4- und CD8-T-Zellen dargestellt. Ein FC - FC-Plot zeigt die Änderung der Genexpression (Fold Change, FC) von Zellen unter Bedingung A (x-Achse) im Verhältnis zum FC von Zellen unter Bedingung B (y-Achse), jeweils in Bezug zu den entsprechenden Kontrollzellen. Jeder Punkt repräsentiert dabei ein Gen. Die Diagonale  $x = y$  zeigt, wo die Datenpunkte liegen würden, wenn die experimentellen Bedingungen A und B keinen unterschiedlichen Effekt auf die Genexpression haben würden. Alle Punkte bzw. Gene, die auf der Diagonale liegen, haben unter Bedingung A und Bedingung B denselben FC im Vergleich zur Kontrolle und sind daher vergleichbar reguliert. Je weiter ein Expressionswert von der Diagonalen entfernt liegt, umso größer ist der Unterschied der Expression zur Kontrolle zwischen den beiden Bedingungen. Gezeigt ist zudem die Regressionsgerade, die visuell darstellt, wie ähnlich sich die Werte unter den beiden

## ERGEBNISSE

Bedingungen sind. Je steiler die Gerade, umso näher liegen die Gene bei der Diagonalen, die den Trend der Datenpunkte darstellt.



**Abb. 5-17 Änderung des Expressionslevels aller getesteten Gene von AND- und OT-I-T-Zellen unter transienten im Vergleich zu persistenten Bedingungen.** Dargestellt ist die Änderung der Genexpression (Fold Change, FC) von transient und persistent stimulierten T-Zellen jeweils in Bezug zur Kontrolle der unstimulierten, naiven Zellen. Berechnung der linearen Regressionsgeraden in Matlab durch Cheng Guo, Fakultät für Physik.

Abb. 5-17 zeigt den FC von AND- und OT-I-T-Zellen nach transientem TCR-Stimulus im Vergleich zum FC bei persistenter Stimulation jeweils im Vergleich zu naiven Kontrollzellen. Betrachtet man den FC von AND-T-Zellen unter den beiden Bedingungen, zeigt sich, dass sich die meisten Gene nicht auf oder nahe der Diagonalen befinden, sondern eher in der Nähe der Horizontalen liegen. Das weist darauf hin, dass es zahlreiche Gene gibt, die nur bei persistenter Stimulation exprimiert sind, nicht aber unter transienten Stimulationsbedingungen. Bei OT-I-T-Zellen liegen dagegen mehr Gene auf oder nahe der Diagonalen, was darauf hindeutet, dass diese Gene unter transienten und persistenten Bedingungen ähnlich exprimiert werden. Ein kurzer Stimulus des TCR vermag demnach in CD8-T-Zellen ein transkriptionelles Programm zu initiieren, das dem persistent aktivierter T-Zellen stärker ähnelt als das in CD4-T-Zellen der Fall ist. Das Expressionsprofil von CD4-T-Zellen nach kurzem TCR-Stimulus ist dem von naiven T-Zellen ähnlicher. Dieser prinzipielle Unterschied steht im Einklang mit der gezeigten antigenunabhängigen Proliferation von OT-I-T-Zellen und der antigenabhängigen Proliferation von AND-T-Zellen.

## ERGEBNISSE

---

Der höhere Regressionskoeffizient  $p$  der CD8-Daten (0,48) bedeutet, dass mehr Gene antigenunabhängig reguliert werden als in CD4-T-Zellen (0,18). Das höhere Bestimmtheitsmaß  $r^2$  (0,45) zeigt an, dass die CD8-Daten besser mit der Trendlinie korrelieren als es für die CD4-Zellen der Fall ist, also insgesamt mehr Gene exprimiert werden.

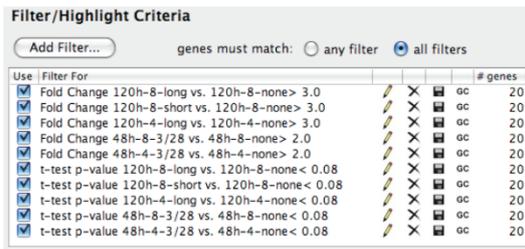
Um näher zu untersuchen, welche einzelnen Gene diesem Muster entsprechen, wurden die Gene mit Hilfe der folgenden Kriterien gefiltert (Abb. 5-18, **(A)**). Es wurden nur die Gene betrachtet, die sowohl in OT-I-T-Zellen unter transienten und persistenten Bedingungen als auch in AND-T-Zellen unter persistenten Bedingungen signifikant ( $p < 0,08$ ) mindestens dreimal stärker exprimiert waren als in der naiven Kontrolle. Unter diesen drei Bedingungen proliferierten die Zellen in den vorausgegangenen Experimenten und produzierten IFN- $\gamma$ . Jene Gene, die diesem Expressionsmuster entsprechen und unter allen drei Bedingungen in Folge der Aktivierung stärker exprimiert werden, könnten an der Regulation von Proliferation und Differenzierung beteiligt sein. Interessant ist, wie diese potentiellen „Autopilot-Gene“ in AND-T-Zellen exprimiert wurden, die einen transienten TCR-Stimulus erhielten und daraufhin keine antigenunabhängige Proliferation zeigten.

Sollten sich unter diesen potentiellen „Autopilot-Genen“ Gene finden, die in den kurz stimulierten AND-T-Zellen im Gegensatz zu den anderen drei Bedingungen herunterreguliert oder auf gleichem Level mit der Kontrolle exprimiert sind, könnten diese für die antigenunabhängige Proliferation von kurz stimulierten OT-I-T-Zellen eine Rolle spielen. Bei ähnlich starker Expression wie in den anderen drei Gruppen wären diese Gene für die gegebene Fragestellung irrelevant.

22 Gene entsprachen diesem potentiellen „Autopilot-Muster“. Um zu untersuchen, ob sie auch bereits nach 48 h Aktivierung heraufreguliert waren, wurde die Genexpression der T-Zellen nach 48 h Kultur im Vergleich zur naiven Kontrolle in einer analogen Transkriptomanalyse von Anne Behrendt bestimmt. Die Zellen wurden dazu entsprechend stimuliert und sortiert (Abb. 5-16). Die erhaltenen Daten wurden in die oben beschriebene Analyse miteinbezogen. Von den 22 potentiellen „Autopilot-Genen“ waren 20 Gene sowohl in AND- als auch in OT-I-T-Zellen bereits nach 48 h *In-vitro*-Aktivierung mit  $\alpha$ -CD3/CD28-Antikörpern signifikant ( $p < 0,08$ ) mindestens zweimal stärker exprimiert als in der naiven Kontrolle. Abb. 5-18 zeigt die Liste dieser Gene **(B)** und die Expression im Vergleich zu allen anderen Genen **(C)**.

# ERGEBNISSE

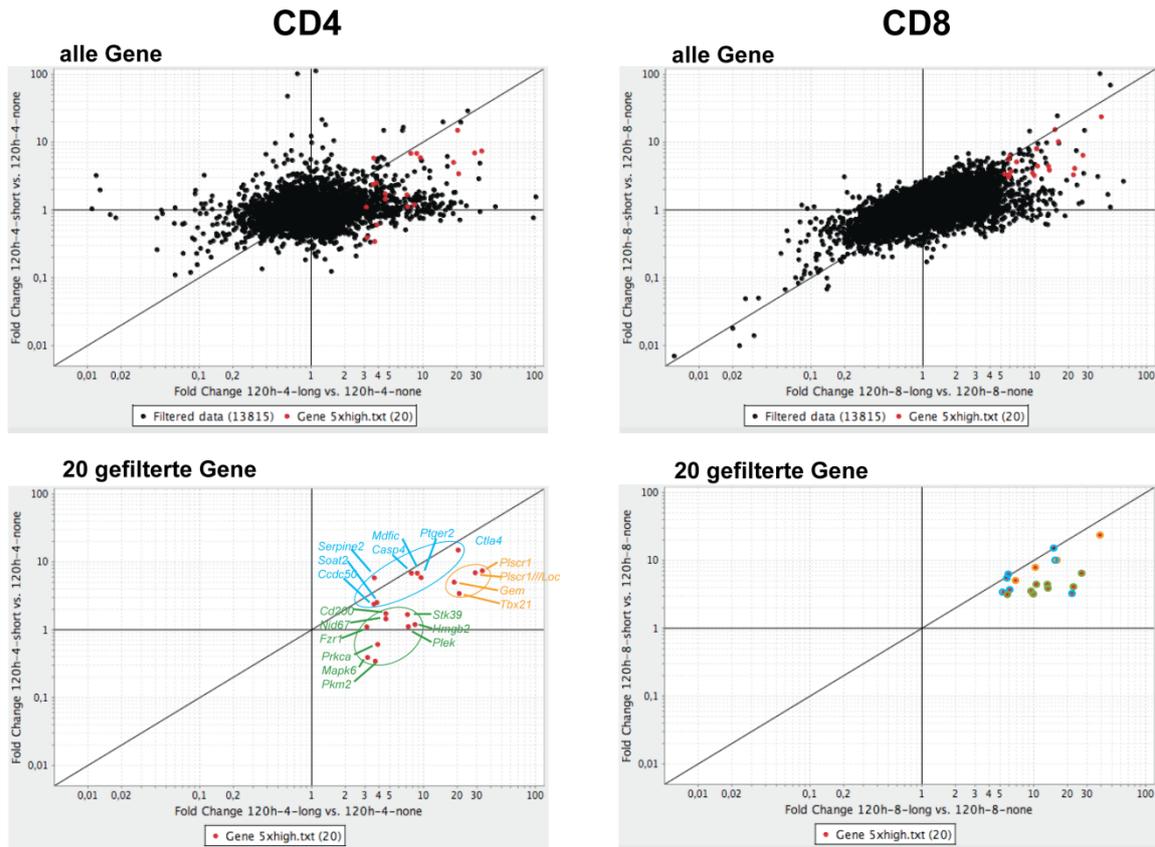
**A**



**B 20 gefilterte Gene**

Probe Na...	Description	X value	Y value
1 2010002N...	RIKEN cDNA 2010002N04 gene	1,445	0,354
2 CASP4	caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase	6,826	0,007
3 CDC50	coiled-coil domain containing 50	2,378	0,008
4 CD200	Cd200 antigen	1,73	0,478
5 CTLA4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	14,936	0,004
6 FZR1	fizzy/cell division cycle 20 related 1 (Drosophila)	1,1	0,85
7 GEM	GTP binding protein (gene overexpressed in skeletal...	5,022	0,681
8 HMGB2	high mobility group box 2 /// similar to High mobility...	1,19	0,645
9 MAPK6	mitogen-activated protein kinase 6	0,389	0,742
10 MDM2	MyoD family inhibitor domain containing	6,815	0,001
11 PKM2	pyruvate kinase, muscle	0,342	0,773
12 PLEK	pleckstrin	1,109	0,843
13 PLSCR1	phospholipid scramblase 1	6,905	0,002
14 PLSCR1	phospholipid scramblase 1 /// hypothetical LOC4333...	7,378	0
15 PRKCA	protein kinase C, alpha	0,606	0,895
16 PTGER2	prostaglandin E receptor 2 (subtype EP2)	5,865	0,001
17 SERPINE2	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, memb...	5,817	0,006
18 SOAT2	sterol O-acyltransferase 2	2,521	0,01
19 STK39	serine/threonine kinase 39, STE20/SPS1 homolog (yeast)	1,674	0,45
20 TBX21	T-box 21	3,425	0,048

**C**



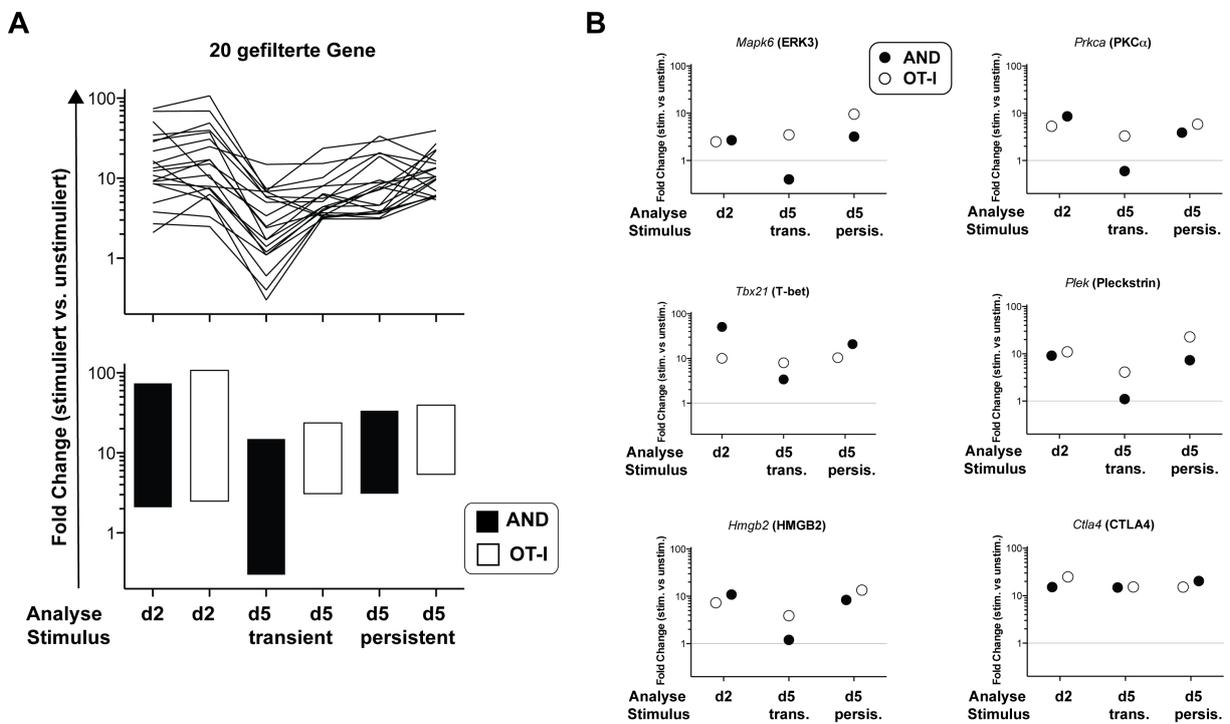
**Abb. 5-18 Überblick über die 20 potentiellen „Autopilot-Gene“.** (A) Filterkriterien für die Analyse potentieller „Autopilot-Gene“ im Multiplot Visualizer. (B) Liste der 20 gefilterten Gene mit Angabe der Änderung des Expressionslevels (X value) und des p-Wertes (Y value) von transient stimulierten AND-T-Zellen im Bezug zur Kontrolle. (C) Darstellung der Änderung des Expressionslevels der 20 Gene in transient versus persistent stimulierten AND- bzw. OT-I-T-Zellen, im Bezug zu allen analysierten Genen (obere Reihe) und isoliert mit Angabe der Gen-Bezeichnungen und/oder farbliche Zuordnung zu einer Gruppe (untere Reihe; für Details siehe Text).

Darüber hinaus wurden die gefundenen Gene bezüglich ihrer Expression in transient stimulierten AND-T-Zellen im Vergleich zu persistent stimulierten AND-T-Zellen in drei Gruppen eingeteilt. In Blau (Abb. 5-18, (C)) sind Gene dargestellt, die in transient stimu-

## ERGEBNISSE

lierten AND-T-Zellen ähnlich stark wie unter den anderen fünf Bedingungen exprimiert sind. Daher ist davon auszugehen, dass diese sieben Gene, darunter beispielsweise *Ctla4*, nicht an der Regulation der antigenunabhängigen Proliferation beteiligt sind. In Orange sind Gene dargestellt, die zwar stärker als in naiven T-Zellen, aber schwächer als unter persistenten Bedingungen exprimiert werden. Diese Gene entsprechen daher bedingt dem „Autopilot-Muster“.

Die dritte Gruppe ist in Grün dargestellt und zeigt Gene, die in transient stimulierten AND-T-Zellen im Gegensatz zu den anderen fünf Gruppen ähnlich wie in der Kontrolle exprimiert sind. Sie sind möglicherweise an der Regulation der antigenunabhängigen Proliferation beteiligt.



**Abb. 5-19** Expressionsmuster der 20 potentiellen „Autopilot-Gene“ **(A)** Expressionsmuster aller 20 Gene in AND- (schwarz) und OT-I-T-Zellen (weiß) im Vergleich nach 2 d *In-vitro*-Aktivierung (d2), transienter Aktivierung (d 5 transient; 2 d *In-vitro*-Aktivierung + 3 d *in vivo* ohne weiteres Antigen) oder persistenter Aktivierung (d 5 persistent; 2 d *In-vitro*-Aktivierung + 3 d *in vivo* mit Antigenstimulus) **(B)** Expressionsmuster einzelner Gene unter den in **(A)** beschriebenen Bedingungen.

In Abb. 5-19 wird einerseits das Expressions-Muster aller 20 potentiellen „Autopilot-Gene“ innerhalb der sechs untersuchten Bedingungen verglichen und andererseits das Muster einzelner Gene dargestellt. *Ctla4* ist unter allen sechs Bedingungen ähnlich stark

## ERGEBNISSE

---

exprimiert. Die Expression der anderen fünf gezeigten Gene (*Mapk4*, *Tbx21*, *Hmgb2*, *Prkca*, *Plek*) entsprechen den Kriterien des hypothetischen „Autopilot-Musters“. Die Proteine, für die sie codieren, könnten an der Regulierung des Autopilot-Mechanismus beteiligt sein. Es ist aber nicht davon auszugehen, dass die antigenunabhängige Differenzierung der CD8-T-Zellen durch einzelne Gene reguliert ist oder es etwa gar ein Master-Regulator-Gen gibt. Viel wahrscheinlicher ist, dass die gefundenen Gene möglicherweise in einem Netzwerk verschiedener Signalwege eine Rolle spielen könnten, deren genaue Abfolge und Wechselwirkungen in Zukunft gefunden werden müssen.

### 6 DISKUSSION

T-Zellen haben eine essentielle Rolle im Immunsystem. Nach Kontakt mit dem spezifischen Antigen wird durch klonale Expansion eine immense Anzahl spezifischer Effektor-T-Zellen generiert, die durch eine Reihe verschiedener Funktionen dazu beitragen, den Krankheitserreger zu eliminieren. Darüber hinaus bilden sich Gedächtniszellen, die den Körper bei einer erneuten Infektion mit demselben Pathogen schützen. Es ist bekannt, dass neben dem Signal, das durch Bindung des Peptid-MHC-Komplexes (pMHC) an den TCR initiiert wird, Costimulation und Zytokine für die Aktivierung von T-Zellen und damit für eine effiziente Immunantwort nötig sind. Dabei ist aber nicht geklärt, welche Auswirkungen diese externen Signale im Einzelnen auf die Prozesse im Inneren der Zelle haben und wie genau die transkriptionelle Regulation gesteuert wird. Insbesondere ist nicht geklärt, ob sich der zugrundeliegende molekulare Mechanismus von CD4- und CD8-T-Zellen unterscheidet.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der Dauer des Antigenstimulus von CD4- im Vergleich zu CD8-T-Zellen in drei verschiedenen experimentellen Systemen parallel unter sterilen Bedingungen weitestgehend *in vivo* untersucht. Dabei wurde für CD4-positive TCR-transgene AND-T-Zellen nach Dox-induzierter, transienter Antigenpräsentation, sowie nach Depletion Diphtherietoxin-Rezeptor-positiver dendritischer Zellen durch Diphtherietoxin (DT) und nach *In-vitro*-Aktivierung für 48 h mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 und anschließendem adoptiven Transfer strikte Antigenabhängigkeit gezeigt. Auch für CD8-positive TCR-transgene OT-I-T-Zellen war nach Dox-induzierter, transienter Antigenpräsentation Antigenabhängigkeit der Proliferation zu beobachten, während nach 48-stündiger *In-vitro*-Aktivierung antigenunabhängige Proliferation und Differenzierung zu Interferon- $\gamma$ -produzierenden Effektorzellen gezeigt wurde. Die Ergebnisse nach *In-vitro*-Aktivierung konnten sowohl für polyklonale CD4- als auch für polyklonale CD8-T-Zellen bestätigt werden.

Durch eine vergleichende Analyse des Transkriptom konnte gezeigt werden, dass das Genexpressionsmuster von AND-T-Zellen 3 d nach Beendigung eines transienten TCR-Stimulus (d 5) durch *In-vitro*-Aktivierung stärker mit dem von naiven als mit dem von kontinuierlich stimulierten T-Zellen vergleichbar war, wohingegen die Gene von OT-I-T-Zellen 3 d nach einem transienten Stimulus ähnlich wie nach persistentem Stimulus (d 5) exprimiert wurden. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Daten bezüglich

Proliferation und Differenzierung. Zudem konnten erste Hinweise auf eine mögliche Beteiligung einzelner Gene wie beispielsweise *Tbx21* (T-bet) und *Mapk6* (ERK3) an der Regulation der antigenunabhängigen Differenzierung von OT-I-T-Zellen gefunden werden.

### **6.1 Die Bedeutung des Antigenstimulus für CD4- und CD8-T-Zellen**

Wie in der Einleitung dargestellt, wurden seit dem 2001 unter dem Titel „The CD8 response on autopilot“ erschienen Übersichtsartikel von Bevan und Fink (Bevan and Fink, 2001) viele Studien mit zum Teil widersprüchlichen Daten publiziert. Insgesamt existieren etwa gleich viele Studien, die für CD8-T-Zellen eine durch einen kurzen initialen Antigenstimulus programmierte antigenunabhängige Differenzierung zu Effektorzellen zeigen, wie Studien, in denen Antigenabhängigkeit beobachtet wurde. Bei CD4-T-Zellen wurde in einzelnen Studien antigenunabhängige Proliferation beobachtet, während alle anderen Studien eine stärkere Antigenabhängigkeit und damit eine nicht programmierte sondern progressive Differenzierung gezeigt haben.

Um die Bedeutung des Antigenstimulus für CD4- und CD8-T-Zellen im direkten Vergleich unter sterilen Bedingungen untersuchen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen eines transienten TCR-Stimulus in drei verschiedenen experimentellen Systemen parallel untersucht. Dabei wurde der Einfluss der Dauer des TCR-Stimulus unabhängig von anderen Parametern, ohne Zytokinzugabe und in einer entzündungsfreien Umgebung *in vivo* analysiert. Die Ergebnisse weisen auf progressive Differenzierung von CD4-T-Zellen hin. Für CD8-T-Zellen wurde in Abhängigkeit vom verwendeten System bedingte Antigenabhängigkeit oder programmierter Differenzierung beobachtet.

#### **6.1.1 CD8-T-Zellen sind nach Dox-induzierter Antigenpräsentation bedingt antigenabhängig**

Um die Rolle des Antigenstimulus untersuchen zu können, ist wie bereits dargelegt eine gezielte Beendigung des Stimulus durch Trennung von APC und T-Zelle, Blockade des pMHC oder TCR oder durch Beendigung der Antigenpräsentation Voraussetzung. Wie kann man einen genau definierten, regulierbaren, transienten, möglichst physiolo-

## DISKUSSION

---

gischen Antigenstimulus ohne Infektion *in vivo* generieren, ohne zwangsläufig in andere Prozesse einzugreifen?

In einem ersten methodischen Ansatz haben wir versucht, dieser Problematik durch die Tet- bzw. Dox-induzierbare Expression eines spezifischen pMHC-Komplexes in transgenen Mäusen beizukommen. Mit diesem System war es möglich, einen Antigenstimulus *in vivo* gezielt zu initiieren und wieder zu beenden. Für AND-CD4-T-Zellen wurde bereits durch Dox-regulierte Antigenexpression in TIM-Mäusen gezeigt, dass die Differenzierung zu Effektorzellen während der gesamten Expansionsphase antigenabhängig ist (Obst et al., 2005). In dieser Mauslinie wird das MHC-II-restringierte Epitop MCC<sub>93-103</sub> unter der Kontrolle eines Tet-induzierbaren Promotors exprimiert. Analog dazu wurde für die Untersuchung von OT-I-T-Zellen für die vorliegende Arbeit eine neue transgene Mauslinie generiert. li-rTA x TSO-Mäuse (TSO, Abb. 5-4) exprimieren nach Gabe von Dox OVA<sub>257-264</sub> als MHC-I-restringiertes Epitop. Nach ersten Vorversuchen stellte sich jedoch heraus, dass TSO-Mäuse auch in Abwesenheit von Dox Antigen exprimierten, was durch den Transfer CFSE-markierter OT-I-T-Zellen als Indikator detektiert werden konnte (Abb. 5-5). Durch die Generierung von TSO→C57BL/6-Knochenmarkchimären konnte das Problem der Hintergrundexpression auf nicht-hämatopoetischen Zellen gelöst werden (Abb. 5-7). Das für OT-I-T-Zellen als Histogramm dargestellte CFSE-Profil deutet zwar auf antigenunabhängige Proliferation hin (Abb. 5-8), die Daten variierten aber von Experiment zu Experiment stark. Daher war der statistische Durchschnittswert an Zellteilungen nach transientem Antigenstimulus (2,5) signifikant niedriger als unter persistenten Bedingungen (5,0) und spricht eher für bedingte Antigenabhängigkeit (Abb. 5-8, **(C)**). Behandlung der Empfängertiere mit  $\alpha$ -CD40mAb zur Aktivierung von DCs konnte die Proliferationsrate von OT-I-T-Zellen zwar unter transienten Bedingungen im Sinne einer CD4-Hilfe entsprechend erhöhen, die Abwesenheit des Antigenstimulus konnte dadurch aber nicht ausgeglichen werden. Zudem proliferierten auch persistent stimulierte CD8-T-Zellen durch Behandlung der Rezipienten mit  $\alpha$ -CD40mAb stärker als ohne den Antikörper (Abb. 5-8, **(B)**), was bedeutet, dass das Zytokin-Milieu auch nach Aktivierung, bei kontinuierlichem Stimulus Auswirkungen auf die Proliferation der CD8-T-Zellen hatte.

### 6.1.2 Antigenunabhängige Proliferation von CD8-T-Zellen ist induzierbar

So elegant das System der Dox-regulierbaren Antigenpräsentation in der Theorie auch sein mag, hat es durch die Beschränkung auf Knochenmarkchimären und die damit verbundene Variabilität der generierten Daten in der Praxis seine Grenzen. Zudem ist der in TIM- und TSO-Mäusen erzielte Antigenstimulus nicht identisch für CD4- und CD8-T-Zellen. Der pMHC-Komplex ist beispielsweise in TIM-Mäusen weniger stabil als in TSO-Mäusen (Abb. 5-7).

Durch *In-vitro*-Aktivierung mit  $\alpha$ -CD3- und  $\alpha$ -CD28-Antikörpern konnten sowohl TCR-transgene als auch polyklonale endogene T-Zellen dagegen in einem anderen methodischen Ansatz in genau gleicher Weise stimuliert werden, unabhängig von TCR-Spezifität und -Affinität, Klasse des MHC-Komplexes und Art der APC. Damit kann der Kritik, dass die Ergebnisse nur für die sehr speziellen TCR-transgenen T-Zellen aus AND und OT-I zutreffen und keine generellen Aussagen über CD4- und CD8-T-Zellen im Allgemeinen zulassen würden, begegnet werden. Um explizit die Proliferation der T-Zellen nach transienter Stimulation zeigen zu können, wurden die T-Zellen erst nach der *In-vitro*-Aktivierung direkt vor dem adoptiven Transfer mit CFSE markiert. Bei den reinen *In-vivo*-Experimenten musste die CFSE-Markierung dagegen vor dem Antigenstimulus erfolgen. Obwohl *In-vivo*-Experimente im Allgemeinen *In-vitro*-Experimenten vorzuziehen sind, hat die *In-vitro*-Stimulation in diesem Versuchsansatz den entscheidenden Vorteil, dass der Einfluss des TCR-Stimulus isoliert von anderen Parametern unter nicht-entzündlichen Bedingungen betrachtet werden kann. Durch den adoptiven Transfer wurde die Proliferation infolge der *In-vitro*-Aktivierung *in vivo*, also unter physiologischen Bedingungen betrachtet. Dabei teilten sich sowohl TCR-transgene OT-I-T-Zellen als auch polyklonale CD8-T-Zellen in der Abwesenheit von Antigen *in vivo* nahezu genauso oft wie bei kontinuierlicher Antigenpräsentation (Abb. 5-11). Die OT-I-T-Zellen proliferierten zudem nicht nur ohne weiteren Antigenstimulus, sie bildeten auch IFN- $\gamma$ , was auf Differenzierung der CD8-T-Zellen zu Effektorzellen schließen lässt (Abb. 5-12). Diese Daten unterstützen damit die Autopilot-Hypothese der programmierten Differenzierung von CD8-T-Zellen (Bevan and Fink, 2001; Mercado et al., 2000; van Stipdonk et al., 2003; Wong and Pamer, 2001). Im Widerspruch stehen die Daten dagegen zu den Resultaten einiger anderer Gruppen (Curtsinger et al., 2003; Storni et al., 2003; Tseng et al., 2009), die eine stärkere Antigenabhängigkeit von CD8-T-Zellen gezeigt haben.

## DISKUSSION

---

Zytokine sind wie bereits dargelegt für die Etablierung von Immunantworten von großer Wichtigkeit und können diese maßgeblich beeinflussen (Cox et al., 2011). Die Gruppe von Mescher beschäftigt sich mit der Bedeutung von Zytokinen als Signal 3 bei der Aktivierung von T-Zellen, das neben Antigenstimulus und Costimulation eine wichtige Rolle spielen kann (Curtsinger and Mescher, 2010). Für CD8-T-Zellen kann IL-12 oder IFN $\alpha/\beta$  und für CD4-T-Zellen möglicherweise IL-1 ein solches Signal 3 sein. Für die Aktivierung von T-Zellen ist es zwar nicht grundsätzlich erforderlich, die Differenzierung zu Effektorzellen scheint aber ohne Signal 3 suboptimal zu sein. Verglichen mit Daten dieser Arbeit (Abb. 5-12) hat IL-12 demnach einen ähnlichen Effekt wie kontinuierliche Antigenexpression (Curtsinger et al., 2003). In verschiedenen Studien wurde die Bedeutung von IL-12 und Interferon Typ 1 von der Mescher-Gruppe gezeigt. So spielen die Zytokine bei der Genregulation und Chromatin-Umformung von CD8-T-Zellen eine Rolle (Agarwal et al., 2009) und sind für die Entwicklung von Gedächtniszellen erforderlich (Xiao et al., 2009). Im Widerspruch dazu steht aber beispielsweise eine Publikation von Way et al. (Way et al., 2007), die zeigt, dass während einer Listerien-Infektion IL-12 und IFN Typ 1 nicht für die IFN- $\gamma$ -Produktion von CD8-T-Zellen erforderlich ist, stattdessen aber für die Bildung von IFN- $\gamma$  in CD4-T-Zellen. Eine kürzlich erschienene Studie von Obar et al. (Obar et al., 2011) zeigt wiederum, dass IL-12 bei VSV-Infektion eine wichtige Rolle spielt und das Entzündungsmilieu und die Art der Infektion für die Differenzierung von CD8-T-Zellen ausschlaggebend sind. Im Bezug auf Ergebnisse dieser Arbeit wäre es wichtig zu untersuchen, ob die Signal 3-Zytokine in unserem *In-vitro*-Aktivierungs-System einen Einfluss auf die Differenzierung haben.

### 6.1.3 CD4-T-Zellen sind strikt antigenabhängig

Wie in der Einleitung bereits dargelegt, sind auch die Resultate aus Studien mit CD4-T-Zellen ähnlich wie die Daten über die Antigenabhängigkeit von CD8-T-Zellen nicht einheitlich. In unserer Gruppe konnte bereits durch die Dox-regulierbare Expression eines MCC-Epitops in der TIM-Mauslinie *in vivo* gezeigt werden, dass für die Differenzierung von CD4-T-Zellen Antigenpräsentation während der gesamten Expansionsphase nötig ist und CD4-T-Zellen in Abwesenheit von Antigen ihre Proliferation einstellen (Obst et al., 2005). Diese Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit auch für TIM $\rightarrow$ B10.BR-Knochenmarkchimären, die in Analogie zu den TSO $\rightarrow$ C57BL/6-Knochenmarkchimären generiert worden sind, bestätigt (Abb. 5-8). Nach Beendigung der Anti-

## DISKUSSION

---

genexpression vollendeten die CD4-T-Zellen maximal noch den begonnenen Zellzyklus und teilten sich anschließend nicht mehr. Zudem waren die transient stimulierten T-Zellen nicht in der Lage, IFN- $\gamma$  zu bilden (Daten nicht gezeigt). Yarke et al. bestätigten in einer Studie (Yarke et al., 2008) mit TCR-transgenen TEa-CD4-T-Zellen unsere Daten. TEa exprimieren Thy1.1 (CD90.1) und V $\beta$ 6 und erkennen das I-E<sup>d</sup>  $\alpha$ -Kette-Peptid 52-68 (pE $\alpha$ )<sub>3</sub> im Kontext mit I-A<sup>b</sup>. Nach Aktivierung der T-Zellen mit E $\alpha$ RFP/LPS für 36 h wurde Y-Ae-mAb injiziert, um jede weitere Interaktion zwischen TCR und pMHC zu unterbinden. Diese *In-vivo*-Experimente sind mit unserem System der Dox-induzierbaren Antigenexpression vergleichbar und erbrachten auch entsprechende Resultate. Den adoptiven Transfer einer unphysiologisch hohen Anzahl von wie in unseren Experimenten  $1 \times 10^6$  T-Zellen sehen die Autoren allerdings kritisch. Sie gehen davon aus, dass CD4-T-Zellen mit hoher Ausgangsfrequenz suboptimal auf Immunisierung reagieren, da die spezifischen pMHC-Komplexe limitierend und das TCR-Signal dadurch reduziert sein könnte. Hataye et al. (Hataye et al., 2006) haben gezeigt, dass die Dauer der klonalen Expansion von DO11.10-TCR-transgenen T-Zellen und die Anzahl an Zellteilungen nach einer Immunisierung mit OVA reduziert ist, wenn die naive Ausgangspopulation sehr groß ist. Der Mechanismus dafür ist zwar nicht bekannt, aber es ist davon auszugehen, dass ein Zusammenhang mit der Konkurrenz von T-Zellen der gleichen Spezifität um pMHC-Komplexe besteht (Smith et al., 2000). Yarke et al. transferierten daher verschiedene Zellzahlen ( $1 \times 10^4$ ,  $2,5 \times 10^5$  und  $5 \times 10^6$ ) und fanden für die Zeitspanne bis zur ersten Zellteilung für niedrige und hohe Ausgangsfrequenzen ähnliche Werte von 38 h bzw. 34 h. 36 h nach Immunisierung teilten sich aber Zellen mit niedriger Ausgangsfrequenz alle 5,5 h, während sich Zellen mit hoher Ausgangsfrequenz nur alle 15,5 h teilten (Yarke et al., 2008). In unseren Experimenten war immer ein Kontroll-Tier mit kontinuierlicher Antigenpräsentation enthalten, das mit derselben Dosis an Dox behandelt wurde wie Rezipienten mit transients Antigenexpression. Falls die pMHC-Komplexe also limitierend sein sollten, würde das auch diese Kontrolle betreffen. In diesem Fall war aber keine verlangsamte Zellteilungsrate zu beobachten, weshalb die hohe Ausgangsfrequenz keine zutreffende Erklärung für die gehemmte Proliferation der transient stimulierten CD4-T-Zellen sein kann. Außerdem wurden die ursprünglichen Versuche in der TIM-Mauslinie auch mit niedrigen Ausgangsfrequenzen durchgeführt, ohne einen Unterschied zu den Experimenten mit hohen Frequenzen zu finden (Obst et al., 2007)

## DISKUSSION

---

Auch die *In-vitro*-Daten von Yarke et al. (Yarke et al., 2008) stehen in Einklang mit unseren Resultaten aus Experimenten mit *In-vitro*-Aktivierung durch  $\alpha$ -CD3-/CD28-Antikörpern. Zunächst wurde beobachtet, dass sich sowohl die TCR-transgenen AND-T-Zellen als auch die polyklonalen CD4-T-Zellen nach transientem TCR-Stimulus *in vivo* nicht weiter teilten. Von Laouar und Crispe wurde allerdings gezeigt, dass Proliferation und Effektor-Funktion nicht zwangsläufig zusammenhängen müssen. So produzierten aktivierte nicht proliferierende AND-T-Zellen in Knochenmarkchimären mit 90% AND-Knochenmark genauso viel IFN- $\gamma$  wie proliferierende T-Zellen, und weisen damit auf eine funktionelle Flexibilität der CD4-T-Zellen hin (Laouar and Crispe, 2000). Als Erklärung schlagen die Autoren vor, dass Proliferation besonders unter physiologischen Bedingungen für die klonale Expansion sehr geringer Ausgangsfrequenzen wichtig ist. Existiert aber bereits eine ausreichende Anzahl an spezifischen T-Zellen, könnte ein Teil direkt zur Bildung von Effektorzytokinen übergehen, ohne vorher zu proliferieren, um damit Zeit zu sparen. In unserem System mit relativ hohen Ausgangsfrequenzen bildeten die schwach proliferierenden T-Zellen kein IFN- $\gamma$  und entwickelten damit keine Effektorfunktion (Abb. 5-12).

Gestützt werden diese Daten darüber hinaus sowohl von verschiedenen *In-vitro*-Studien (Gett et al., 2003; Schrum and Turka, 2002) als auch von *In-vivo*-Daten (Corbin and Harty, 2004; Williams and Bevan, 2004), die alle antigenabhängige Proliferation von CD4-T-Zellen zeigen. Einzelne *In-vitro*-Studien zeigen dagegen antigenunabhängige Proliferation von CD4-T-Zellen (Bajenoff et al., 2002; Lee et al., 2002).

Für AND CD4-T-Zellen wurden in *In-vitro*-Experimenten zwei Phasen beim Übergang von der naiven zur Effektorzelle beschrieben, eine frühe antigenabhängige und eine späte IL-2-getriebene (Jelley-Gibbs et al., 2000). Optimale CD4-Effektorzellen werden hier bei 2 Dn Antigenstimulus und zusätzlich 2 weiteren Dn mit IL-2-Stimulus generiert. Um zu testen, ob die *in vitro* aktivierten CD4-T-Zellen möglicherweise *in vivo* ohne Antigen aber in einem Entzündungsmilieu, in dem auch IL-2 verfügbar sein sollte, eventuell weiter proliferieren, wurden die Rezipienten mit  $\alpha$ -CD40mAB behandelt (Abb. 5-15). Es wurde zwar sowohl für AND- als auch für polyklonale CD4-T-Zellen eine leichte Erhöhung der Anzahl an Zellteilungen beobachtet, diese war jedoch nicht signifikant und konnte den fehlenden Antigenstimulus nach transienter Aktivierung nicht ausgleichen.

Auch die Experimente mit Ii-MCC-DTR-Mäusen (Abb. 5-9) haben gezeigt, dass CD4-T-Zellen nicht auf weitere Differenzierung zu programmieren sind. Hier wurde der

## DISKUSSION

---

Antigenstimulus durch adoptiven Transfer von DCs in Wildtypmäuse vermittelt, die konstitutiv sowohl Antigen als auch den DTR exprimierten. Durch Injektion von Diphtherietoxin nach 24 - 33 h sollte die Antigenpräsentation durch die Depletion der DCs beendet werden und so analog zu den beiden anderen Systemen nur ein transienter Stimulus generiert werden. Zwar weisen die Daten darauf hin, dass die Depletion entweder nicht vollständig war oder das Antigen möglicherweise von anderen DCs aufgenommen und präsentiert worden ist; andererseits spricht das extrem heterogene Verhalten der CD4-T-Zellen trotz dieser experimentellen Unwägbarkeit klar gegen eine Programmierbarkeit. Neben ungeteilten Zellen und solchen, die sich genauso oft wie die Zellen unter persistenter Antigenpräsentation teilten, war jede Anzahl an Zellteilungen vertreten. Ähnliches war in Experimenten mit TIM bei einer geringen Dox-Konzentration von 10 µg/ml zu beobachten (Obst et al., 2005). Das weist darauf hin, dass Zellen, die durch Kontakt mit dem Antigen aktiviert wurden, weiterhin antigenabhängig und nicht auf weitere Differenzierung programmierbar waren.

Experimente mit Diphtherietoxin bergen aber generelle Schwierigkeiten. So wurde beispielsweise beschrieben, dass aktive Immunisierung zu Toxizität von Diphtherietoxin in Diphtherie-resistenten Mäusen führt (Meyer Zu Horste et al., 2010). Erst kürzlich wurde zudem eine Studie mit CD11c-DTR-Mäusen veröffentlicht, die DCs eine unerwartete Rolle zuschreibt; DCs kontrollieren demnach den Eintritt der Lymphocyten durch HEVs (High Endothelial Venules) in die Lymphknoten und damit auch die Regulation der Lymphocyten-Rezirkulation (Moussion and Girard, 2011). Depletion der DCs führte hier bei Injektion von Diphtherietoxin alle zwei Tage innerhalb von acht Tagen zu Reduktion von Größe und Zellularität peripherer und mucosaler Lymphknoten. In unserem Versuchsansatz wurden die entsprechenden DCs adoptiv transferiert und dann depletiert, insofern blieben die endogenen DCs der wildtypischen Rezipienten unbeeinträchtigt. Dennoch muss die Depletion von DCs dieser und anderer Mäuse durch die neue Erkenntnis generell kritisch überdacht werden.

## 6.2 Die Regulation von T-Zell-Immunantworten durch den Antigenstimulus

### 6.2.1 Die Genexpression ist nach transientem TCR-Stimulus verschieden reguliert

Für CD4-T-Zellen konnte in keinem der drei verschiedenen experimentellen Systeme Hinweise auf eine durch einen kurzen Antigenstimulus initiierte Programmierung der

## DISKUSSION

---

Differenzierung zu Effektorzellen gefunden werden; stattdessen wurde strikte Antigen-abhängigkeit gezeigt. CD8-T-Zellen konnten dagegen durch *In-vitro*-Aktivierung auf weitere Differenzierung programmiert werden. Durch vergleichende Analyse des Transkriptoms von transient und persistent *in vitro* stimulierten AND- bzw. OT-I-T-Zellen (Abb. 5-16) wurden mögliche Hinweise auf den zugrundeliegenden molekularen Mechanismus gefunden. Dabei hat sich herausgestellt, dass die Genexpression in CD4- und CD8-T-Zellen nach einem transienten TCR-Stimulus verschieden reguliert wurde (Abb. 5-17). Die meisten Gene waren in AND-T-Zellen bei persistenter Stimulation heraufreguliert und unter transienten Bedingungen ähnlich wie die naiven Kontroll-Zellen reguliert. Bei OT-I-T-Zellen sind dagegen mehr Gene unter transienten und persistenten Bedingungen ähnlich exprimiert. Ein kurzer Stimulus des TCR scheint demnach in CD8-T-Zellen ein transkriptionelles Programm zu initiieren, das dem persistent aktivierter T-Zellen stärker ähnelt als das in CD4-T-Zellen der Fall ist. Das Expressionsprofil von CD4-T-Zellen nach dem gleichen TCR-Stimulus ist dem von naiven T-Zellen ähnlicher. Dieser prinzipielle Unterschied korreliert mit den gefundenen Ergebnissen bezüglich Proliferation und Differenzierung. Neben dieser generellen Betrachtung der Genexpression, wurden die Gene hinsichtlich eines „Autopilot-Musters“ analysiert (Abb. 5-18). Dabei wurden nur Gene betrachtet, die sowohl in OT-I-T-Zellen unter transienten und persistenten Bedingungen als auch in AND-T-Zellen unter persistenten Bedingungen signifikant ( $p < 0,08$ ) mindestens dreimal stärker exprimiert wurden als in der naiven Kontrolle. Unter diesen drei Bedingungen proliferierten die Zellen in den vorausgegangenen Experimenten und produzierten IFN- $\gamma$ . Zudem wurden auch Daten von Anne Behrendt miteinbezogen, die die Genexpression von AND- und OT-I-T-Zellen nach 2 d *In-vitro*-Aktivierung betreffen. Es wurden nur Gene betrachtet, die signifikant ( $p < 0,08$ ) mindestens zweimal stärker exprimiert waren als in der Kontrolle. Jene Gene, die diesem „Autopilot-Muster“ entsprachen und unter allen fünf Bedingungen in Folge der Aktivierung stärker exprimiert waren und zudem in transient stimulierten AND-T-Zellen schwach oder schwächer als in der persistent stimulierten Kontrolle exprimiert waren, könnten potentiell an der Regulation von Proliferation und Differenzierung beteiligt sein. Es fanden sich zwölf Gene, die diesem Muster entsprachen (Abb. 5-18, **(C)**; Gruppe Grün und Orange).

Unter anderen entsprach die Expression der Extracellular-Signal Regulated Kinase ERK3 (*mapk6*) dem „Autopilot-Muster“ (Abb. 5-18 und Abb. 5-19). Für diese sehr instabile Serin/Threonin-Kinase ist gezeigt worden, dass sie in proliferierenden Zellen nach

## DISKUSSION

---

Ubiquitinylierung schnell im Proteasom abgebaut wird (Boulton et al., 1991). Daneben wurde gezeigt, dass die Halbwertszeit dieser atypischen MAP-Kinase während der Muskeldifferenzierung steigt und zu Akkumulation des Enzyms führt (Coulombe et al., 2003). Unsere Daten deuten darauf hin, dass dies möglicherweise auch bei der Differenzierung von T-Zellen der Fall sein könnte. Die genaue Funktion von ERK3 ist aber bisher nur ansatzweise geklärt und spielt in unterschiedlichen Zusammenhängen eine Rolle. So führt ERK3-Defizienz in Mäusen zu Lungeninsuffizienz und neonataler Letalität (Klinger et al., 2009). Chromosomen spreading-Experimente zeigen, dass ERK3 für die Spindelstabilität wichtig ist und daher für den Übergang von der Meta- in die Anaphase in der Reifung von Mausoozyten erforderlich ist (Li et al., 2010). Phosphorylierung stabilisiert das Protein während der Mitose und spielt daher eine Rolle im Zellzyklus (Tanguay et al., 2010).

Auch der zur Familie der T-box-Faktoren gehörende Transkriptionsfaktor T-bet entspricht dem „Autopilot-Muster“ der Genexpression in unserem System (Abb. 5-18 und Abb. 5-19). Ursprünglich als Master-Regulator für die Differenzierung von CD4-T-Zellen zu T<sub>H</sub>1-Zellen beschrieben (Szabo et al., 2000), ist inzwischen bekannt, dass T-bet auch bei der Genregulation von Natürlichen Killer-Zellen (Townsend et al., 2004), Makrophagen, Dendritischen Zellen (Lighvani et al., 2001) und nicht zuletzt CD8-T-Zellen eine Rolle spielt. T-bet wirkt in Kombination mit anderen Transkriptionsfaktoren. Nach Aktivierung schnell induziert ist T-bet für die frühe Programmierung der Zytokin-Produktion wichtig, während Eomes erst später aktiviert wird, wobei die Antigenabhängigkeit dieses Transkriptionsfaktors bislang nicht untersucht worden ist (Cruz-Guilloty et al., 2009). T-bet spielt auch eine Rolle bei der Erschöpfung von CD8-T-Zellen und der Expression inhibitorischer Rezeptoren im Rahmen einer chronischen Infektion. Dabei unterdrückt T-bet direkt die Transkription des für PD-1 codierenden Gens. Persistente Antigen-Stimulation und Entzündung führt bei chronischer LCMV-Infektion zur Herunterregulierung von T-bet, was wiederum eine schwerere Form der Erschöpfung bedingt (Kao et al., 2011). Es wird wichtig sein, in der Zukunft die Antigenabhängigkeit von t-bet, eomes und Runx3 durchflusszytometrisch zu untersuchen.

Daneben wurden einige andere Gene gefunden (Abb. 5-18 und Abb. 5-19), die an der Regulation der antigenunabhängigen Differenzierung von CD8-T-Zellen beteiligt sein könnten, darunter *Prkca*, *Plek* und *Hmgb2*, die für die Proteinkinase C $\alpha$ , Pleckstrin bzw. das High-mobility group protein B2 codieren.

Alle genannten Gene wurden mit den Expressions-Daten von aktivierten OT-I-T-Zellen im Rahmen einer Infektion mit LM bzw. VSV der Datenbank des Immunological Genome Projects (<http://www.immgen.org/databrowser/index.html>) abgeglichen und waren vergleichbar heraufreguliert.

### **6.2.2 T-Zellen sind durch progressive oder programmierte Differenzierung reguliert**

Die Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen zu Effektor-Zellen ist einerseits ein wichtiger Schritt bei der Bekämpfung von Pathogenen, sie birgt aber auch Gefahren. Gerät eine Immunantwort außer Kontrolle, kann es zu Autoimmunität und der Schädigung körpereigenen Gewebes kommen. Gerade cytotoxische CD8-T-Zellen können bei unkontrollierter Aktivierung immense Schäden bewirken. Nach Beseitigung des Pathogens sterben die Effektor-Zellen daher in der Regel während der Kontraktionsphase ab und zurück bleiben nur ruhende Gedächtniszellen, die erst bei einer erneuten Infektion mit dem gleichen Krankheitserreger aktiviert werden. Wäre es daher nicht viel zu riskant, Immunantworten nach kurzem Antigenstimulus „auf Autopilot“ laufen zu lassen? Der Vorteil liegt auf der Hand, die schnelle Aktivierung und Eliminierung des Krankheitserregers. Aber in welchem Verhältnis steht dieser zu den Risiken?

CD4-T-Zellen haben eine Reihe von verschiedenen Effektorfunktionen und bilden verschiedene Subtypen aus, die Einfluss auf die anderen Zelltypen des adaptiven Immunsystems haben. Eine gänzliche Programmierung wäre im Fall der CD4-T-Zellen sicherlich fatal. Im Mausmodell für Multiple Sklerose, der experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis (EAE), ist beispielsweise gezeigt worden, dass nach Aktivierung weiterer Antigenkontakt auch im peripheren Gewebe nötig ist, um CD4-Zellen zu reaktivieren und Effektorfunktion auszubilden (Bartholomäus et al., 2009).

Eine kürzlich publizierte Studie zeigt, dass auch CD8-T-Zellen einem solchen weiteren Kontrollpunkt unterworfen sind (Kang et al., 2011). CD8-T-Zellen scheinen demnach zwar auf weitere Differenzierung programmierbar zu sein und während der Migration zum infizierten Gewebe weiter zu proliferieren, die Ausbildung der Effektorfunktion ist aber nicht festgelegt, sondern durch weiteren Antigenkontakt modulierbar. Dadurch ist es möglich, entweder die Effizienz der Immunantwort zu steigern oder aber immunpathologische Schäden zu verhindern. Die Programmierung von CD8-T-Zellen scheint demnach kein Alles-oder-Nichts-Signal zu sein. Aufgrund der Gratwanderung

zwischen positiven Auswirkungen im Sinne der Eliminierung des Pathogens und negativen Effekten wie der Schädigung körpereigenen Gewebes ist es von äußerster Wichtigkeit, die unzähligen Faktoren, die für die Initiierung und Aufrechterhaltung einer Immunantwort nötig sind und sich gegenseitig beeinflussen, angemessen zu regulieren. Die Dauer der Antigenpräsentation scheint in diesem Netzwerk ein kritischer Kontrollparameter zu sein, der für CD4- und CD8-T-Zellen unterschiedlich strikt reguliert ist. CD8-T-Zellen haben nur die eine Aufgabe, infizierte oder Tumor-Zellen abzutöten. Einmal zum Töten aktiviert vollziehen sie ihre Differenzierung und Effektorfunktion prinzipiell programmiert. Es gibt aber trotz Programmierung auch für CD8-T-Zellen weitere Kontrollpunkte. Bei Eintritt in das infizierte Gewebe können beispielsweise sowohl CD4-T-Zellen als auch DCs eine regulatorische Funktion gegenüber CD8-T-Zellen haben. Während für die Migration von aktivierten CD8-T-Zellen in mukosale Gewebe wie Lunge und Darm weder CD4-Hilfe noch eine Entzündung nötig ist (Masopust et al., 2001), ist der Eintritt in andere Organe wie beispielsweise die Vagina im Rahmen einer HSV-2-Infektion von IFN- $\gamma$ -produzierenden CD4-T-Zellen und inflammatorischen Chemokinen wie CXCL9 und CXCL10 abhängig, um die cytotoxische Aktivität auf das infizierte Gewebe zu begrenzen (Nakanishi et al., 2009). CD4-T-Zellen sind dagegen nicht so stark von anderen Zellen abhängig wie CD8-T-Zellen, sondern haben selbst Kontrollfunktion gegenüber anderen Zellen wie CD8-T-Zellen und B-Zellen. Es scheint daher vorteilhaft, dass CD4-T-Zellen stärker von einem persistenten Antigenstimulus abhängig sind und durch eine progressive Differenzierung anstatt einer modulierbaren Programmierbarkeit, wie im Fall der CD8-T-Zellen, reguliert werden.

### 6.3 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Differenzierung von CD4-T-Zellen in drei Systemen strikte Antigenabhängigkeit gezeigt. Die Proliferation von CD8-T-Zellen war nach transienter, Dox-induzierter Antigenpräsentation auch antigenabhängig; durch einen 48-stündigen *In-vitro*-TCR-Stimulus waren sie jedoch auf weitere Differenzierung programmierbar. Diese Programmierung der CD8-T-Zellen ist aber möglicherweise nicht so strikt, dass sie keinerlei Modulierbarkeit mehr zulässt. Es scheint eher so, als wäre die grundsätzliche Richtung vorgegeben, andere Faktoren können aber durchaus das Ausmaß der CD8-Immunantwort mit beeinflussen.

## DISKUSSION

---

Interessant wäre es, die Möglichkeiten der Modulierbarkeit zu untersuchen. Dabei könnte möglicherweise das über Zytokine vermittelte Signal 3 eine Rolle spielen. Für CD8-T-Zellen wurde gezeigt, dass IL-12 und Typ 1-Interferone einen Einfluss auf die Differenzierung haben, während für CD4-T-Zellen eine Beteiligung von IL-1 diskutiert wird. Eine weitere wichtige Frage ist, ob die *In-vitro*-Aktivierung von CD8-T-Zellen für 48 h neben antigenunabhängiger Proliferation und Bildung von IFN- $\gamma$  auch cytotoxische Effektorfunktion in Abwesenheit von Antigen programmieren kann und ob sie ausreichend ist, um die Bildung von Gedächtniszellen zu induzieren. Nachdem der Antigenstimulus bewusst getrennt von einer Entzündungssituation betrachtet worden ist, könnten nun auch zusätzlich die Auswirkungen einer Infektion durch Bakterien oder Viren untersucht werden.

Durch die vergleichende Analyse des Transkriptoms wurde ein grundsätzlicher Unterschied in der Genregulation von CD4- und CD8-T-Zellen nach transientem TCR-Stimulus gezeigt. Zudem konnten erste Hinweise auf die Beteiligung bestimmter Gene an der antigenunabhängigen Proliferation von OT-I-T-Zellen gefunden werden. Die Expression dieser Gene wird mit anderen Methoden wie beispielsweise quantitativer PCR zu bestätigen sein. Danach kann untersucht werden, ob die Überexpression dieser Gene in CD4-T-Zellen antigenunabhängige Differenzierung auslösen kann oder ob ein Knock-down der entsprechenden Gene in CD8-T-Zellen die antigenunabhängige Proliferation verhindert.

### 7 LITERATURVERZEICHNIS

Abbas, A.K., Murphy, K.M., and Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383, 787-793.

Agarwal, P., Raghavan, A., Nandiwada, S.L., Curtsinger, J.M., Bohjanen, P.R., Mueller, D.L., and Mescher, M.F. (2009). Gene regulation and chromatin remodeling by IL-12 and type I IFN in programming for CD8 T cell effector function and memory. *J Immunol* 183, 1695-1704.

Agha-Mohammadi, S., O'Malley, M., Etemad, A., Wang, Z., Xiao, X., and Lotze, M.T. (2004). Second-generation tetracycline-regulatable promoter: repositioned tet operator elements optimize transactivator synergy while shorter minimal promoter offers tight basal leakiness. *J Gene Med* 6, 817-828.

Amigorena, S., and Savina, A. (2010). Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 22, 109-117.

Bajenoff, M., Wurtz, O., and Guerder, S. (2002). Repeated antigen exposure is necessary for the differentiation, but not the initial proliferation, of naive CD4(+) T cells. *J Immunol* 168, 1723-1729.

Bartholomaeus, I., Kawakami, N., Odoardi, F., Schlager, C., Miljkovic, D., Ellwart, J.W., Klinkert, W.E., Flugel-Koch, C., Issekutz, T.B., Wekerle, H., *et al.* (2009). Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. *Nature* 462, 94-98.

Basha, G., Omilusik, K., Chavez-Steenbock, A., Reinicke, A.T., Lack, N., Choi, K.B., and Jefferies, W.A. (2012). A CD74-dependent MHC class I endolysosomal cross-presentation pathway. *Nat Immunol* 13, 237-245.

Bevan, M.J., and Fink, P.J. (2001). The CD8 response on autopilot. *Nat Immunol* 2, 381-382.

Blair, D.A., and Lefrancois, L. (2007). Increased competition for antigen during priming negatively impacts the generation of memory CD4 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 15045-15050.

Blair, D.A., Turner, D.L., Bose, T.O., Pham, Q.M., Bouchard, K.R., Williams, K.J., McAleer, J.P., Cauley, L.S., Vella, A.T., and Lefrancois, L. (2011). Duration of antigen availability influences the expansion and memory differentiation of T cells. *J Immunol* 187, 2310-2321.

Blattman, J.N., Antia, R., Sourdive, D.J., Wang, X., Kaech, S.M., Murali-Krishna, K., Altman, J.D., and Ahmed, R. (2002). Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells. *J Exp Med* 195, 657-664.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, M.C., and Steinman, R.M. (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<sup>+</sup> T cell tolerance. *J Exp Med* 196, 1627-1638.

Boulton, T.G., Nye, S.H., Robbins, D.J., Ip, N.Y., Radziejewska, E., Morgenbesser, S.D., DePinho, R.A., Panayotatos, N., Cobb, M.H., and Yancopoulos, G.D. (1991). ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell* 65, 663-675.

Bouso, P., and Robey, E. (2003). Dynamics of CD8<sup>+</sup> T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes. *Nat Immunol* 4, 579-585.

Brinster, R.L., Allen, J.M., Behringer, R.R., Gelinas, R.E., and Palmiter, R.D. (1988). Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 836-840.

Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J., and Lanzavecchia, A. (1997). Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 388, 782-787.

Chaffin, K.E., Beals, C.R., Wilkie, T.M., Forbush, K.A., Simon, M.I., and Perlmutter, R.M. (1990). Dissection of thymocyte signaling pathways by in vivo expression of pertussis toxin ADP-ribosyltransferase. *EMBO J* 9, 3821-3829.

Corbin, G.A., and Harty, J.T. (2004). Duration of infection and antigen display have minimal influence on the kinetics of the CD4<sup>+</sup> T cell response to *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 173, 5679-5687.

Coulombe, P., Rodier, G., Pelletier, S., Pellerin, J., and Meloche, S. (2003). Rapid turnover of extracellular signal-regulated kinase 3 by the ubiquitin-proteasome pathway defines a novel paradigm of mitogen-activated protein kinase regulation during cellular differentiation. *Mol Cell Biol* 23, 4542-4558.

Cox, M.A., Harrington, L.E., and Zajac, A.J. (2011). Cytokines and the inception of CD8 T cell responses. *Trends Immunol* 32, 180-186.

Crotty, S. (2011). Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol* 29, 621-663.

Cruz-Guilloty, F., Pipkin, M.E., Djuretic, I.M., Levanon, D., Lotem, J., Lichtenheld, M.G., Groner, Y., and Rao, A. (2009). Runx3 and T-box proteins cooperate to establish the transcriptional program of effector CTLs. *J Exp Med* 206, 51-59.

Cui, W., and Kaech, S.M. (2010). Generation of effector CD8<sup>+</sup> T cells and their conversion to memory T cells. *Immunol Rev* 236, 151-166.

Curtsinger, J.M., Johnson, C.M., and Mescher, M.F. (2003). CD8 T cell clonal expansion and development of effector function require prolonged exposure to antigen, costimulation, and signal 3 cytokine. *J Immunol* 171, 5165-5171.

Curtsinger, J.M., and Mescher, M.F. (2010). Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Curr Opin Immunol* 22, 333-340.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- Dengjel, J., Schoor, O., Fischer, R., Reich, M., Kraus, M., Muller, M., Kreymborg, K., Altenberend, F., Brandenburg, J., Kalbacher, H., *et al.* (2005). Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 7922-7927.
- Dutton, R.W., Bradley, L.M., and Swain, S.L. (1998). T cell memory. *Annu Rev Immunol* *16*, 201-223.
- Ehst, B.D., Ingulli, E., and Jenkins, M.K. (2003). Development of a novel transgenic mouse for the study of interactions between CD4 and CD8 T cells during graft rejection. *Am J Transplant* *3*, 1355-1362.
- Erlebacher, A., Vencato, D., Price, K.A., Zhang, D., and Glimcher, L.H. (2007). Constraints in antigen presentation severely restrict T cell recognition of the allogeneic fetus. *J Clin Invest* *117*, 1399-1411.
- Fletcher, A.L., Lukacs-Kornek, V., Reynoso, E.D., Pinner, S.E., Bellemare-Pelletier, A., Curry, M.S., Collier, A.R., Boyd, R.L., and Turley, S.J. (2010). Lymph node fibroblastic reticular cells directly present peripheral tissue antigen under steady-state and inflammatory conditions. *J Exp Med* *207*, 689-697.
- Fooksman, D.R., Vardhana, S., Vasiliver-Shamis, G., Liese, J., Blair, D.A., Waite, J., Sacristan, C., Victoria, G.D., Zanin-Zhorov, A., and Dustin, M.L. (2010). Functional anatomy of T cell activation and synapse formation. *Annu Rev Immunol* *28*, 79-105.
- Fujii, S., Liu, K., Smith, C., Bonito, A.J., and Steinman, R.M. (2004). The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation. *J Exp Med* *199*, 1607-1618.
- Gett, A.V., Sallusto, F., Lanzavecchia, A., and Geginat, J. (2003). T cell fitness determined by signal strength. *Nat Immunol* *4*, 355-360.
- Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* *5*, 953-964.
- Gossen, M., and Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 5547-5551.
- Greenwald, R.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2005). The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* *23*, 515-548.
- Griffin, T.A., Nandi, D., Cruz, M., Fehling, H.J., Kaer, L.V., Monaco, J.J., and Colbert, R.A. (1998). Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits. *J Exp Med* *187*, 97-104.
- Han, S., Asoyan, A., Rabenstein, H., Nakano, N., and Obst, R. (2010). Role of antigen persistence and dose for CD4+ T-cell exhaustion and recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 20453-20458.
- Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Weaver, C.T. (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* *6*, 1123-1132.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- Hataye, J., Moon, J.J., Khoruts, A., Reilly, C., and Jenkins, M.K. (2006). Naive and memory CD4<sup>+</sup> T cell survival controlled by clonal abundance. *Science* 312, 114-116.
- Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., Ravetch, J.V., Steinman, R.M., and Nussenzweig, M.C. (2001). Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* 194, 769-779.
- Hogquist, K.A., Jameson, S.C., Heath, W.R., Howard, J.L., Bevan, M.J., and Carbone, F.R. (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76, 17-27.
- Hwang, S.S., Kim, K., and Lee, G.R. (2011). Defective GATA-3 expression in Th2 LCR-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 410, 866-871.
- Iezzi, G., Karjalainen, K., and Lanzavecchia, A. (1998). The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* 8, 89-95.
- Irizarry, R.A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y.D., Antonellis, K.J., Scherf, U., and Speed, T.P. (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4, 249-264.
- Jameson, S.C., and Masopust, D. (2009). Diversity in T cell memory: an embarrassment of riches. *Immunity* 31, 859-871.
- Jelley-Gibbs, D.M., Lepak, N.M., Yen, M., and Swain, S.L. (2000). Two distinct stages in the transition from naive CD4 T cells to effectors, early antigen-dependent and late cytokine-driven expansion and differentiation. *J Immunol* 165, 5017-5026.
- Jensen, P.E. (2007). Recent advances in antigen processing and presentation. *Nat Immunol* 8, 1041-1048.
- Johansen, P., Storni, T., Rettig, L., Qiu, Z., Der-Sarkissian, A., Smith, K.A., Manolova, V., Lang, K.S., Senti, G., Mullhaupt, B., *et al.* (2008). Antigen kinetics determines immune reactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5189-5194.
- Jung, S., Unutmaz, D., Wong, P., Sano, G., De los Santos, K., Sparwasser, T., Wu, S., Vuthoori, S., Ko, K., Zavala, F., *et al.* (2002). In vivo depletion of CD11c<sup>+</sup> dendritic cells abrogates priming of CD8<sup>+</sup> T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 17, 211-220.
- Kaech, S.M., and Ahmed, R. (2001). Memory CD8<sup>+</sup> T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nat Immunol* 2, 415-422.
- Kang, S.S., Herz, J., Kim, J.V., Nayak, D., Stewart-Hutchinson, P., Dustin, M.L., and McGavern, D.B. (2011). Migration of cytotoxic lymphocytes in cell cycle permits local MHC I-dependent control of division at sites of viral infection. *J Exp Med* 208, 747-759.
- Kao, C., Oestreich, K.J., Paley, M.A., Crawford, A., Angelosanto, J.M., Ali, M.A., Intlekofer, A.M., Boss, J.M., Reiner, S.L., Weinmann, A.S., *et al.* (2011). Transcription factor T-bet represses expression of the inhibitory receptor PD-1 and sustains virus-specific CD8<sup>+</sup> T cell responses during chronic infection. *Nat Immunol* 12, 663-671.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- Kaye, J., Hsu, M.L., Sauron, M.E., Jameson, S.C., Gascoigne, N.R., and Hedrick, S.M. (1989). Selective development of CD4<sup>+</sup> T cells in transgenic mice expressing a class II MHC-restricted antigen receptor. *Nature* *341*, 746-749.
- Kerksiek, K.M., Niedergang, F., Chavrier, P., Busch, D.H., and Brocker, T. (2005). Selective Rac1 inhibition in dendritic cells diminishes apoptotic cell uptake and cross-presentation in vivo. *Blood* *105*, 742-749.
- Kimura, K., Moriwaki, H., Nagaki, M., Saio, M., Nakamoto, Y., Naito, M., Kuwata, K., and Chisari, F.V. (2006). Pathogenic role of B cells in anti-CD40-induced necroinflammatory liver disease. *Am J Pathol* *168*, 786-795.
- Klinger, S., Turgeon, B., Levesque, K., Wood, G.A., Aagaard-Tillery, K.M., and Meloche, S. (2009). Loss of Erk3 function in mice leads to intrauterine growth restriction, pulmonary immaturity, and neonatal lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 16710-16715.
- Kuchen, S., Resch, W., Yamane, A., Kuo, N., Li, Z., Chakraborty, T., Wei, L., Laurence, A., Yasuda, T., Peng, S., *et al.* (2010). Regulation of microRNA expression and abundance during lymphopoiesis. *Immunity* *32*, 828-839.
- Kurts, C., Kosaka, H., Carbone, F.R., Miller, J.F., and Heath, W.R. (1997). Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *J Exp Med* *186*, 239-245.
- Kurts, C., Robinson, B.W., and Knolle, P.A. (2010). Cross-priming in health and disease. *Nat Rev Immunol* *10*, 403-414.
- Kyewski, B., and Klein, L. (2006). A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol* *24*, 571-606.
- Laouar, Y., and Crispe, I.N. (2000). Functional flexibility in T cells: independent regulation of CD4<sup>+</sup> T cell proliferation and effector function in vivo. *Immunity* *13*, 291-301.
- Lazarevic, V., and Glimcher, L.H. (2011). T-bet in disease. *Nat Immunol* *12*, 597-606.
- Lee, G.R. (2007). A minor transactivation effect of GATA-3 on its target sites in the extrachromosomal status. *J Microbiol Biotechnol* *17*, 2056-2060.
- Lee, G.R., Fields, P.E., and Flavell, R.A. (2001). Regulation of IL-4 gene expression by distal regulatory elements and GATA-3 at the chromatin level. *Immunity* *14*, 447-459.
- Lee, W.T., Pasos, G., Cecchini, L., and Mittler, J.N. (2002). Continued antigen stimulation is not required during CD4(+) T cell clonal expansion. *J Immunol* *168*, 1682-1689.
- Li, S., Ou, X.H., Wang, Z.B., Xiong, B., Tong, J.S., Wei, L., Li, M., Yuan, J., Ouyang, Y.C., Hou, Y., *et al.* (2010). ERK3 is required for metaphase-anaphase transition in mouse oocyte meiosis. *PLoS One* *5*.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- Lighvani, A.A., Frucht, D.M., Jankovic, D., Yamane, H., Aliberti, J., Hissong, B.D., Nguyen, B.V., Gadina, M., Sher, A., Paul, W.E., *et al.* (2001). T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 15137-15142.
- Ma, J.K., Platt, M.Y., Eastham-Anderson, J., Shin, J.S., and Mellman, I. (2012). MHC class II distribution in dendritic cells and B cells is determined by ubiquitin chain length. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 8820-8827.
- Ma, Y., Aymeric, L., Locher, C., Kroemer, G., and Zitvogel, L. (2011). The dendritic cell-tumor cross-talk in cancer. *Curr Opin Immunol* 23, 146-152.
- Marrack, P., and Kappler, J. (2004). Control of T cell viability. *Annu Rev Immunol* 22, 765-787.
- Masopust, D., Vezys, V., Marzo, A.L., and Lefrancois, L. (2001). Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* 291, 2413-2417.
- Mempel, T.R., Henrickson, S.E., and Von Andrian, U.H. (2004). T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* 427, 154-159.
- Mercado, R., Vijh, S., Allen, S.E., Kerksiek, K., Pilip, I.M., and Pamer, E.G. (2000). Early programming of T cell populations responding to bacterial infection. *J Immunol* 165, 6833-6839.
- Meyer Zu Horste, G., Zozulya, A.L., El-Haddad, H., Lehmann, H.C., Hartung, H.P., Wiendl, H., and Kieseier, B.C. (2010). Active immunization induces toxicity of diphtheria toxin in diphtheria resistant mice--implications for neuroinflammatory models. *J Immunol Methods* 354, 80-84.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136, 2348-2357.
- Mosmann, T.R., and Coffman, R.L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7, 145-173.
- Moussion, C., and Girard, J.P. (2011). Dendritic cells control lymphocyte entry to lymph nodes through high endothelial venules. *Nature* 479, 542-546.
- Mullen, A.C., High, F.A., Hutchins, A.S., Lee, H.W., Villarino, A.V., Livingston, D.M., Kung, A.L., Cereb, N., Yao, T.P., Yang, S.Y., *et al.* (2001). Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* 292, 1907-1910.
- Murphy, K.M., and Reiner, S.L. (2002). The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2, 933-944.
- Nakanishi, Y., Lu, B., Gerard, C., and Iwasaki, A. (2009). CD8(+) T lymphocyte mobilization to virus-infected tissue requires CD4(+) T-cell help. *Nature* 462, 510-513.
- O'Shea, J.J., and Paul, W.E. (2010). Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science* 327, 1098-1102.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- Obar, J.J., Jellison, E.R., Sheridan, B.S., Blair, D.A., Pham, Q.M., Zickovich, J.M., and Lefrancois, L. (2011). Pathogen-induced inflammatory environment controls effector and memory CD8<sup>+</sup> T cell differentiation. *J Immunol* *187*, 4967-4978.
- Obst, R. (1998). Untersuchungen zum Repertoire selbst- und fremdrestringierter cytotoxischer T-Lymphocyten. Dissertation, Universität Konstanz.
- Obst, R., van Santen, H.M., Mathis, D., and Benoist, C. (2005). Antigen persistence is required throughout the expansion phase of a CD4(+) T cell response. *J Exp Med* *201*, 1555-1565.
- Obst, R., van Santen, H.M., Melamed, R., Kamphorst, A.O., Benoist, C., and Mathis, D. (2007). Sustained antigen presentation can promote an immunogenic T cell response, like dendritic cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 15460-15465.
- Panzer, M., Sitte, S., Wirth, S., Drexler, I., Sparwasser, T., and Voehringer, D. (2012). Rapid in vivo conversion of effector T cells into Th2 cells during helminth infection. *J Immunol* *188*, 615-623.
- Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y.H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., *et al.* (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* *6*, 1133-1141.
- Peng, S.L. (2006). The T-box transcription factor T-bet in immunity and autoimmunity. *Cell Mol Immunol* *3*, 87-95.
- Pluta, K., Luce, M.J., Bao, L., Agha-Mohammadi, S., and Reiser, J. (2005). Tight control of transgene expression by lentivirus vectors containing second-generation tetracycline-responsive promoters. *J Gene Med* *7*, 803-817.
- Poholek, A.C., Hansen, K., Hernandez, S.G., Eto, D., Chandele, A., Weinstein, J.S., Dong, X., Odegard, J.M., Kaech, S.M., Dent, A.L., *et al.* (2010). In vivo regulation of Bcl6 and T follicular helper cell development. *J Immunol* *185*, 313-326.
- Prlic, M., Hernandez-Hoyos, G., and Bevan, M.J. (2006). Duration of the initial TCR stimulus controls the magnitude but not functionality of the CD8<sup>+</sup> T cell response. *J Exp Med* *203*, 2135-2143.
- Rang, A., and Will, H. (2000). The tetracycline-responsive promoter contains functional interferon-inducible response elements. *Nucleic Acids Res* *28*, 1120-1125.
- Reis e Sousa, C. (2006). Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* *6*, 476-483.
- Roederer, M. (2011). Interpretation of cellular proliferation data: avoid the panglossian. *Cytometry A* *79*, 95-101.
- Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* *401*, 708-712.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- Schrum, A.G., and Turka, L.A. (2002). The proliferative capacity of individual naive CD4(+) T cells is amplified by prolonged T cell antigen receptor triggering. *J Exp Med* 196, 793-803.
- Seder, R.A., and Ahmed, R. (2003). Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nat Immunol* 4, 835-842.
- Shin, J.S., Ebersold, M., Pypaert, M., Delamarre, L., Hartley, A., and Mellman, I. (2006). Surface expression of MHC class II in dendritic cells is controlled by regulated ubiquitination. *Nature* 444, 115-118.
- Smith, A.L., Wikstrom, M.E., and Fazekas de St Groth, B. (2000). Visualizing T cell competition for peptide/MHC complexes: a specific mechanism to minimize the effect of precursor frequency. *Immunity* 13, 783-794.
- Sprenkel, R., and Hasan, M.T. (2007). Tetracycline-controlled genetic switches. *Handb Exp Pharmacol*, 49-72.
- Steiner, D.F., Thomas, M.F., Hu, J.K., Yang, Z., Babiarz, J.E., Allen, C.D., Matloubian, M., Blelloch, R., and Ansel, K.M. (2011). MicroRNA-29 regulates T-box transcription factors and interferon-gamma production in helper T cells. *Immunity* 35, 169-181.
- Steinman, R.M., and Cohn, Z.A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137, 1142-1162.
- Steinman, R.M., Hawiger, D., and Nussenzweig, M.C. (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21, 685-711.
- Stemberger, C., Huster, K.M., Koffler, M., Anderl, F., Schiemann, M., Wagner, H., and Busch, D.H. (2007). A single naive CD8+ T cell precursor can develop into diverse effector and memory subsets. *Immunity* 27, 985-997.
- Storni, T., Ruedl, C., Renner, W.A., and Bachmann, M.F. (2003). Innate immunity together with duration of antigen persistence regulate effector T cell induction. *J Immunol* 171, 795-801.
- Swain, S.L., McKinstry, K.K., and Strutt, T.M. (2012). Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses. *Nat Rev Immunol* 12, 136-148.
- Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., and Glimcher, L.H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100, 655-669.
- Tanguay, P.L., Rodier, G., and Meloche, S. (2010). C-terminal domain phosphorylation of ERK3 controlled by Cdk1 and Cdc14 regulates its stability in mitosis. *Biochem J* 428, 103-111.
- Townsend, M.J., Weinmann, A.S., Matsuda, J.L., Salomon, R., Farnham, P.J., Biron, C.A., Gapin, L., and Glimcher, L.H. (2004). T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Valpha14i NKT cells. *Immunity* 20, 477-494.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- Trombetta, E.S., and Mellman, I. (2005). Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol* 23, 975-1028.
- Tseng, K.E., Chung, C.Y., H'Ng W, S., and Wang, S.L. (2009). Early infection termination affects number of CD8+ memory T cells and protective capacities in listeria monocytogenes-infected mice upon rechallenge. *J Immunol* 182, 4590-4600.
- Tsuji, M., Komatsu, N., Kawamoto, S., Suzuki, K., Kanagawa, O., Honjo, T., Hori, S., and Fagarasan, S. (2009). Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3+ T cells in gut Peyer's patches. *Science* 323, 1488-1492.
- Urlinger, S., Baron, U., Thellmann, M., Hasan, M.T., Bujard, H., and Hillen, W. (2000). Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7963-7968.
- Van den Broeck, W., Derore, A., and Simoens, P. (2006). Anatomy and nomenclature of murine lymph nodes: Descriptive study and nomenclatory standardization in BALB/cAnNCrI mice. *J Immunol Methods* 312, 12-19.
- van der Merwe, P.A., and Dushek, O. (2011). Mechanisms for T cell receptor triggering. *Nat Rev Immunol* 11, 47-55.
- van Niel, G., Wubbolts, R., and Stoorvogel, W. (2008). Endosomal sorting of MHC class II determines antigen presentation by dendritic cells. *Curr Opin Cell Biol* 20, 437-444.
- van Niel, G., Wubbolts, R., Ten Broeke, T., Buschow, S.I., Ossendorp, F.A., Melief, C.J., Raposo, G., van Balkom, B.W., and Stoorvogel, W. (2006). Dendritic cells regulate exposure of MHC class II at their plasma membrane by oligoubiquitination. *Immunity* 25, 885-894.
- van Santen, H., Benoist, C., and Mathis, D. (2000). A cassette vector for high-level reporter expression driven by a hybrid invariant chain promoter in transgenic mice. *J Immunol Methods* 245, 133-137.
- van Santen, H.M., Benoist, C., and Mathis, D. (2004). Number of T reg cells that differentiate does not increase upon encounter of agonist ligand on thymic epithelial cells. *J Exp Med* 200, 1221-1230.
- van Stipdonk, M.J., Hardenberg, G., Bijker, M.S., Lemmens, E.E., Droin, N.M., Green, D.R., and Schoenberger, S.P. (2003). Dynamic programming of CD8+ T lymphocyte responses. *Nat Immunol* 4, 361-365.
- van Stipdonk, M.J., Lemmens, E.E., and Schoenberger, S.P. (2001). Naive CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation. *Nat Immunol* 2, 423-429.
- Watts, T.H. (2005). TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu Rev Immunol* 23, 23-68.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- Way, S.S., Havenar-Daughton, C., Kolumam, G.A., Orgun, N.N., and Murali-Krishna, K. (2007). IL-12 and type-I IFN synergize for IFN-gamma production by CD4 T cells, whereas neither are required for IFN-gamma production by CD8 T cells after *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* *178*, 4498-4505.
- Weiss, E.H., Mellor, A., Golden, L., Fahrner, K., Simpson, E., Hurst, J., and Flavell, R.A. (1983). The structure of a mutant H-2 gene suggests that the generation of polymorphism in H-2 genes may occur by gene conversion-like events. *Nature* *301*, 671-674.
- Whitmire, J.K., and Ahmed, R. (2000). Costimulation in antiviral immunity: differential requirements for CD4(+) and CD8(+) T cell responses. *Curr Opin Immunol* *12*, 448-455.
- Williams, M.A., and Bevan, M.J. (2004). Shortening the infectious period does not alter expansion of CD8 T cells but diminishes their capacity to differentiate into memory cells. *J Immunol* *173*, 6694-6702.
- Wong, P., and Pamer, E.G. (2001). Cutting edge: antigen-independent CD8 T cell proliferation. *J Immunol* *166*, 5864-5868.
- Xiao, Z., Casey, K.A., Jameson, S.C., Curtsinger, J.M., and Mescher, M.F. (2009). Programming for CD8 T cell memory development requires IL-12 or type I IFN. *J Immunol* *182*, 2786-2794.
- Yamashiro, H., Odani, Y., Hozumi, N., and Nakano, N. (2002). Hierarchical signaling thresholds determine the fates of naive T cells: partial priming leads naive T cells to unresponsiveness. *Biochem Biophys Res Commun* *299*, 148-154.
- Yang, L., Yu, Y., Kalwani, M., Tseng, T.W., and Baltimore, D. (2011). Homeostatic cytokines orchestrate the segregation of CD4 and CD8 memory T-cell reservoirs in mice. *Blood* *118*, 3039-3050.
- Yarke, C.A., Dalheimer, S.L., Zhang, N., Catron, D.M., Jenkins, M.K., and Mueller, D.L. (2008). Proliferating CD4+ T cells undergo immediate growth arrest upon cessation of TCR signaling in vivo. *J Immunol* *180*, 156-162.
- Yewdell, J.W., and Haeryfar, S.M. (2005). Understanding presentation of viral antigens to CD8+ T cells in vivo: the key to rational vaccine design. *Annu Rev Immunol* *23*, 651-682.
- Zhou, L., Chong, M.M., and Littman, D.R. (2009). Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity* *30*, 646-655.

## **DANKSAGUNG**

Ich danke Prof. Dr. Thomas Brocker und Dr. Reinhard Obst für die Betreuung meiner Doktorarbeit und die damit verbundenen Bemühungen.

Dr. Ronald Naumann danke ich für die Mikroinjektion des TSO-Konstrukts zur Generierung der transgenen Mauslinie TSO.

Dr. Joachim Ellwart danke ich für die freundliche Kooperation und die Hilfe bei der Sortierung der Zellen am MoFlo.

Dr. Reinhard Hoffmann danke ich für die Durchführung des Microarrays.

Anne Behrendt danke ich für die tolle Zusammenarbeit, die Erlaubnis, ihre Daten zu zeigen, und die Durchsicht des Manuskripts.

Cheng Guo danke ich für die Hilfe bei der Visualisierung der Microarray-Daten.

Simone Pentz danke ich besonders für die Klonierung der TSO-Mauslinie. Darüber hinaus danke ich ihr und Anna Kollar für die viele Unterstützung, insbesondere bei der Typisierung der Mäuse, und die freundschaftliche, wohltuende Atmosphäre im Labor.

Allen Tierpflegern, insbesondere Andrea Bol und Wolfgang Mertel, danke ich für die viele Mühe und Hilfsbereitschaft, sowie die zuverlässige und gewissenhafte Versorgung der Mäuse.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtliche und sinngemäße Zitate sind als solche gekennzeichnet.

München, den 29. August 2012

Hannah Rabenstein