

Aus dem Institut für Immunologie der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. Thomas Brocker

Funktionelle Analyse dendritischer Zellen bei Virusinfektionen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München



vorgelegt von
Caroline Andrée Bernhard
aus Haguenau, Frankreich
2012

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

Betreuer: Prof. Dr. Thomas Brocker

Zweitgutachter: Priv. Doz. Dr. Gabriele Rieder

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser

Tag der mündlichen Prüfung: 24.06.2013

Erklärung:

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorgelegte Dissertation „Funktionelle Analyse dendritischer Zellen bei Virusinfektionen“ von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde. Ich habe mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Hilfen und Quellen bedient. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder ähnlichen Form bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat auch noch keinen anderen Prüfungszwecken gedient.

Caroline A. Bernhard

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

Katrin Nopora, Caroline A. Bernhard, Christine Ried, Alejandro A. Castello, Kenneth M. Murphy, Peggy Marconi, Ulrich Koszinowski and Thomas Brocker (2012). MHC class I cross-presentation by dendritic cells counteracts viral immune evasion. *Front. Immun.* 3:348. doi: 10.3389/fimmu.2012.00348

Caroline A. Bernhard, Christine Ried, Stefan Kochanek, Florian Kreppel and Thomas Brocker. Essential antigen presenting function of marginal zone macrophages. (Manuskript in Vorbereitung)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	5
1 Verzeichnis der Abkürzungen	8
2 Zusammenfassung	10
3 Summary	12
4 Einleitung	13
4.1 <i>Das Immunsystem der Säugetiere</i>	13
4.2 <i>Die Rezeptoren der Antigenpräsentation und Erkennung</i>	14
4.2.1 MHC	14
4.2.2 T-Zell-Rezeptor (TCR)	15
4.3 <i>T-Zellentwicklung</i>	16
4.4 <i>Aktivierung von T-Zellen und Effektorfunktionen</i>	17
4.5 <i>Prozessierung und Präsentation von Antigenen</i>	18
4.5.1 Prozessierung und Beladung von exogenen Peptiden für MHC-II	18
4.5.2 Prozessierung und Beladung von endogenen Peptiden für MHC-I	19
4.5.3 Präsentation exogener Peptide über MHC-I: Kreuzpräsentation	20
4.6 <i>APC</i>	22
4.6.1 B-Zellen	22
4.6.2 MΦ	22
4.6.3 DC	23
4.7 <i>Verschiedene Modelle zur Untersuchung der DC Funktionen</i>	25
4.7.1 DC-Transfer bzw. Vakzinierung	26
4.7.2 Antigen-Antikörper Konjugate	26
4.7.3 <i>In vitro</i> DC Kulturen	26
4.7.4 DC Depletion <i>in vivo</i>	27
4.7.4.1 Konditionelle Depletion	27
4.7.4.2 Konstitutive Depletion	28
4.7.5 DC-MHCI, ein transgenes Mausmodell	29
4.8 <i>LCMV und das Modellantigen GP33</i>	30
4.9 <i>Zielsetzung der Arbeit</i>	31

5 Material und Methoden	33
5.1 Material	33
5.1.1 Antikörper	33
5.1.2 Chemikalien	34
5.1.3 Geräte	34
5.1.4 Lösungen und Medien	35
5.1.5 Verbrauchsmaterialien	36
5.1.6 Proteine und Peptide	36
5.1.7 Virale Vektoren	37
5.1.8 Mausstämme	37
5.2 Methoden	39
5.2.1 Adoptiver Zelltransfer	39
5.2.2 Blut und Organentnahme	39
5.2.3 Durchflusszytometrie (FACS Analyse)	42
5.2.4 Immunisierung	44
5.2.5 CFSE Färbung	45
5.2.6 <i>In vivo</i> Zytotoxizitätstest	45
5.2.7 Magnetische Zellseparation	46
5.2.8 Zellproliferation	47
5.2.9 Transduktion einer BMDC Kultur	48
5.2.10 Depletion von MΦ mittels Clodronat	48
5.2.11 Histologie (Immunfluoreszenz)	49
5.2.12 Statistik	50
6 Ergebnisse	51
6.1 Polyklonale CD8⁺ T-Zellantwort in DC-MHCI Mäusen	51
6.2 Monoklonale CD8⁺ T-Zellantwort in DC-MHCI Mäusen	54
6.3 Die Analyse der CD8 spezifischen T-Zellantwort in verschiedenen Organen	55
6.4 Die Präsentation über MHC-I D^b in DC-MHCI Mäusen	56
6.4.1 Die Präsentation des Peptid GP33 in DC-MHCI Mäusen	56
6.4.2 <i>In vivo</i> Proliferation GP33 spezifischer T-Zellen	57
6.4.3 Die Analyse der CD8 T-Zellantwort nach Immunisierung mit mCMV	59
6.5 Das LCMV K^b-Epitop GP34	60
6.6 Wildtyp-DC können D^b GP33 nicht präsentieren	61
6.7 rAd-Vektoren infizieren BMDC	63

6.8 <i>rAd-GFP infiziert Zellen in der MZ der Milz</i>	64
6.9 <i>D^b GP33 spezifische T-Zellantwort in DC depletierten Mäusen</i>	65
6.10 <i>Sowohl CD169⁺ wie auch SIGN-R1⁺ MΦ werden von rAd-GFP infiziert</i>	67
6.11 <i>Die Aktivierung D^b GP33 spezifischer T-Zellen in Lymphknoten</i>	68
6.12 <i>Die polyklonale CD8 T-Zellantwort: LCMV-GP gesamt</i>	69
6.13 <i>Die Rolle der MΦ für LCMV-WE</i>	71
6.14 <i>Die Depletion von MΦ verhindert eine Aktivierung GP33 spezifischer T-Zellen</i>	72
7 Diskussion	75
7.1 <i>Die Rolle dendritischer Zellen für die Aktivierung GP33 spezifischer T-Zellen</i>	75
7.2 <i>Die Rolle der MΦ für die Aktivierung adaptiver Immunantworten</i>	77
7.3 <i>DC aktivieren D^b GP33 spezifische T-Zellen in vivo nur sehr ineffizient</i>	79
7.4 <i>DC-spezifische Vakzinierung</i>	83
7.5 <i>Schlussfolgerungen und Ausblick</i>	84
8 Literaturverzeichnis	87
9 Lebenslauf	96
10 Danksagung	98

1 Verzeichnis der Abkürzungen

α-DG	α-Dystroglycan
APC	Antigenpräsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>)
Arm	LCMV (<i>Armstrong</i>)
AVYNFATC	Aminosäuresequenz aus LCMV Glykoprotein gp ₃₄₋₄₁ (GP34)
β2m	β-2-Mikroglobulin
CD	Oberflächenantigen (<i>cluster of differentiation</i>)
cDC	konventionelle DC (<i>conventional DC</i>)
CFSE	Carboxyfluorescein-diacetate-succinimidylester
CL13	LCMV-Stamm (<i>LCMV strain: clone 13</i>)
cTEC	kortikale Thymusepithelzelle (<i>cortical thymic epithelial cell</i>)
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt (cytotoxic T lymphocyte)
DC	dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
DT	Diphtherie Toxin
ER	endoplasmatisches Reticulum
ERAAP	(<i>endoplasmatic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing</i>)
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsorter (<i>fluorescence activated cell sorter</i>)
Flt3	(<i>FMS-like tyrosine kinase 3</i>)
GFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
GM-CSF	(<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
GP	Glykoprotein
hbEGF	heparin-bindender epidermaler Wachstumsfaktor (<i>heparin-binding epidermal growth factor</i>)
HGIAASPI	Aminosäuresequenz aus mCMV (M45)
HLA	humaner Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>human leukocyte antigen</i>)
IFN γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
i.p. / i.v.	intraperitoneal / intravenös
IRAP	(<i>insulin-regulated aminopeptidase</i>)
KAVYNFATC	Aminosäuresequenz aus LCMV Glykoprotein gp ₃₃₋₄₁ (GP33)

LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis Virus (<i>lymphocyte choriomeningitis virus</i>)
LPS	Lipopolsaccharid
L RNA	großes RNA Segment (<i>large RNA</i>)
mCMV	murines Cytomegalovirus (<i>murine cytomegalovirus</i>)
MΦ	Makrophagen
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MMM	Marginal metallophile MΦ (<i>marginal metallophilic macrophages</i>)
MOI	Vielzahl der Infektionen (<i>multiplicity of infection</i>)
MZ	Marginalzone
MZM	Marginalzonen MΦ (<i>marginal zone macrophages</i>)
NP	Nukleoprotein
OVA	Hühner-Ovalbumin
PAMPS	konservierte mikrobielle Strukturen (<i>pathogen-associated molecular patterns</i>)
pDC	plasmazytoide DC (<i>plasmacytoid DC</i>)
PFA	Paraformaldehyd
SIINFEKL	Aminosäuresequenz aus OVA ₂₅₇₋₂₆₄
S RNA	kleines RNA Segment (<i>small RNA</i>)
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>T-cell receptor</i>)
TLR	Toll-like Rezeptoren (<i>toll-like receptors</i>)
TNF	Tumornekrosefaktor
TVTGPCLL	Aminosäuresequenz aus mCMV (m139)
vp	Viruspartikel
VSV	vesikuläres Stomatitis Virus (<i>vesicular stomatitis virus</i>)

Formelgrößen werden in der vorliegenden Arbeit mit den international gebräuchlichen SI-Einheiten und Aminosäuren entsprechend ihres Einbuchstabenkodes abgekürzt. Für die Abkürzungen gebräuchlicher Wörter der deutschen Sprache wird gemäß Duden verfahren.

2 Zusammenfassung

Zur Entwicklung zytotoxischer T-Lymphozyten (*cytotoxic T lymphocyte*, CTL) müssen naive CD8 T-Zellen spezifische Antigen/MHC-I Komplexe (Haupthistokompatibilitätskomplex, *major histo compatibility complex*) auf antigenpräsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*, APC) im Kontext kostimulatorischer Moleküle und Zytokine erkennen. Dendritische Zellen (*dendritic cells*, DC) liefern all diese erforderlichen Signale und werden deshalb häufig als die wichtigsten APC im Immunsystem angesehen.

In dieser Arbeit wurde ein transgenes Mausmodell (DC-MHCI), bei dem die Expression von MHC-I restriktiv auf DC verwendet wird, um zu untersuchen welche Kapazitäten und Effekte DC auf die Entwicklung von CTL haben, wenn sie die einzigen APC sind, die das Antigen präsentieren können. Nach der Immunisierung von DC-MHCI und Wildtyp-Mäusen (C57BL/6) mit einem replikations-defizienten Adenovektor (rAd-GP33), der das Epitop gp₃₃₋₄₁ (GP33) aus dem Glykoprotein (GP) des lymphozytären choriomeningitis Virus (*lymphocyte choriomeningitis virus*, LCMV) exprimiert, konnte nur in C57BL/6 aber nicht in DC-MHCI Mäusen eine Expansion D^b GP33 spezifischer T-Zellen detektiert werden.

Das Epitop GP33, welches über MHC-I D^b präsentiert wird, enthält das eine Aminosäure kürzere Epitop GP34 (gp₃₄₋₄₁), welches MHC-I K^b restriktiv ist. Durch die Verwendung D^b GP33 und K^b GP34 spezifischer Multimere konnte gezeigt werden, dass DC-MHCI Mäusen die Fähigkeit zur Aktivierung D^b GP33 spezifischer T-Zellen fehlt, wohingegen sie in der Lage sind K^b GP34 spezifische T-Zellantworten zu generieren. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass DC aus DC-MHCI und Wildtyp-Mäusen die gleichen Kapazitäten besitzen, und dass auch die DC aus C57BL/6 nicht in der Lage sind das längere Epitop zu präsentieren. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass andere APC wichtig sind um CTL Antworten gegen das Epitop GP33 zu generieren.

Um dies näher zu untersuchen, wurden immun-histologische Analysen von Milzen aus rAd-GFP immunisierten C57BL/6 Mäusen durchgeführt, um die Lokalisation des Virus zu verfolgen und damit den Zelltyp identifizieren zu können. GFP-Expression konnte in Makrophagen (MΦ) der Marginalzone (MZ) detektiert werden. Die K^b GP34 spezifische T-Zellantwort in den DC-MHCI Mäusen scheint demnach durch Kreuzpräsentation vermittelt zu werden, da DC *in vivo* von den Adenovektoren nicht infiziert wurden. Die direkte Infektion von DC *in vitro* führte hingegen zur Aktivierung D^b GP33 spezifischer T-Zellen. Diese

Zusammenfassung

Ergebnisse zeigen eine Dichotomie zwischen direkter und Kreuzpräsentation im Fall von GP und nur die *in vivo* direkt infizierten MΦ können sowohl D^b GP33 als auch K^b GP34 spezifische T-Zellen aktivieren.

3 Summary

To develop cytotoxic effector functions, naive CD8⁺ T lymphocytes must recognize specific antigen/MHC-I complexes on APC in the context of costimulatory molecules and cytokines. DC can provide all of these required signals and are commonly thought of as the most important antigen presenting cells in the immune system.

We used transgenic mice in which MHC-I expression is restricted to DC (DC-MHCI mice) to assess quantitative and qualitative effects on CD8⁺ T-cell priming when only DC present antigen. Following immunization with a replication-deficient Adenovirus (rAd-GP33) expressing the epitope gp₃₃₋₄₁ (GP33) of the glycoprotein of LCMV we could not detect priming of D^b GP33 specific T cells in DC-MHCI mice.

The epitope GP33, which is presented via MHC-I D^b contains the one amino acid shorter epitope gp₃₄₋₄₁ (GP34), which is K^b restricted. Using MHC multimers for D^b GP33 and K^b GP34 we were able to show, that DC-MHCI mice completely lacked the ability to prime GP33 restricted CTL, while they elicit normal GP34 CTL responses.

Next we were able to show, that DC from DC-MHCI and wild-type mice have the same capacities and also DC from C57BL/6 mice were not able to present the longer epitope. This data suggested that there might be other APC important to induce CTL responses against GP33 epitope.

To further investigate this question we performed histological analysis of spleens from rAd-GFP infected C57BL/6 mice in order to localize the vector and to identify the infected cell type. GFP-expression was confined to MΦ of the MZ. The K^b GP34 specific T-cell response in DC-MHCI mice seems to be mediated by crosspresentation, since *in vivo* the adenovectors did not infect DC. However direct infection of DC *in vitro* led to the activation of D^b GP33 specific T-cells.

Our data indicate a dichotomy between direct and crosspresentation in the case of GP and only MΦ, that are directly infected *in vivo*, are able to activate D^b GP33 and K^b GP34 specific T-cells.

4 Einleitung

4.1 Das Immunsystem der Säugetiere

Das Immunsystem schützt den Körper durch verschiedenste Methoden vor Pathogenen wie Bakterien, Viren, Pilzen sowie ein- und mehrzelligen Parasiten. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen dem angeborenen und dem adaptivem Immunsystem, wobei letzteres nur bei Vertebraten zu finden ist. Das angeborene Immunsystem zeichnet sich durch seine schnelle Wirkungsweise aus und bildet durch physikalische Barrieren wie zum Beispiel die Haut, Schleimhäute und Tränenflüssigkeit die erste Verteidigungslinie. Gelingt es Pathogenen dennoch in den Körper einzudringen, so spielen MΦ und natürliche Killer Zellen eine entscheidende Rolle. MΦ besitzen auf ihrer Oberfläche eine Reihe von Rezeptoren, wie zum Beispiel Toll-ähnliche Rezeptoren (*toll-like receptors*, TLRs), die es ihnen erlaubt Krankheitserreger zu erkennen und zu phagozytieren. Dies führt zu einer Aktivierung der MΦ und zu einer lokalen Entzündungsreaktion, die die Aktivierung des Komplementsystems und das Anlocken weiterer phagozytierender Zellen wie Neutrophilen zur Folge hat. Reichen die Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems nicht aus den Erreger zu eliminieren, so wird das adaptive Immunsystem eingeschaltet. Dieses zeichnet sich im Gegensatz zu dem angeborenen Immunsystem durch Rezeptoren höherer Spezifität und die Fähigkeit zur Gedächtnisfunktion aus. Das immunologische Gedächtnis schützt den Körper schneller und effektiver sollte es zu einer erneuten Infektion mit einem bereits bekannten Pathogen kommen. Die Effektorzellen und deren Funktionen der adaptiven Immunität stehen nicht sofort zur Verfügung sondern müssen induziert werden. Dies erklärt warum in den ersten 12 Stunden einer Infektion zunächst nur das angeborene Immunsystem eingreift und die adaptive Antwort mit einer Verzögerung von ca. ein bis fünf Tagen einsetzt.

APC, wie MΦ, B-Zellen und DC, spielen bei der adaptiven Immunantwort eine entscheidende Rolle. Diese Zellen zirkulieren im Lymph- und Blutsystem des Körpers, nehmen Antigen auf und prozessieren es in kleinere Fragmente, sogenannte Peptide. Diese werden dann über Moleküle des MHC an antigenspezifische CD4 und CD8 T-Zellen präsentiert. Hierbei spricht man von der zell-vermittelten Immunität, die sich hauptsächlich gegen intrazelluläre Erreger richtet. Im Gegensatz dazu gibt es die humorale Immunität, die durch B-Zellen, die Antikörper produzieren vermittelt wird und sich gegen extrazelluläre Pathogene richtet.

4.2 Die Rezeptoren der Antigenpräsentation und Erkennung

APC nehmen Antigen auf und präsentieren die prozessierten Peptide im Kontext von MHC-I bzw. MHC-II. Die Erkennung der so präsentierten Peptide durch T-Zellen erfolgt nur, wenn sowohl das Antigen, sowie auch das MHC-Molekül vom T-Zell-Rezeptor (*T-cell receptor*, TCR) erkannt wird. Es handelt sich also um eine zweifache Erkennung und darüber hinaus sind kostimulatorische Moleküle wie zum Beispiel CD80/86 auf der APC nötig, damit naive T-Zellen aktiviert werden können.

4.2.1 MHC

Der MHC ist eine polymorphe Gruppe von Genen, die sich beim Menschen auf Chromosom 6 und bei der Maus auf Chromosom 17 befinden. Im Menschen bezeichnet man diese Gene als HLA (*human leukocyte antigen*), wohingegen man in der Maus von H-2 Genen spricht. Es existieren multiple Varianten von jedem Gen innerhalb einer Population, was das hohe Maß an Polymorphismus erklärt. Die Proteine die von dieser Region kodiert werden, haben hauptsächlich die Funktion Antigen zu präsentieren. Es gibt zwei Arten von MHC-Molekülen, MHC-I präsentiert Peptide antigenspezifischen CD8 T-Zellen, wohingegen CD4 T-Zellen Antigen im Kontext von MHC-II Molekülen erkennen. MHC-I Moleküle bestehen aus zwei Polypeptidketten, wobei die α Kette im MHC kodiert ist, die kleinere Kette, das sogenannte $\beta 2$ Mikroglobulin ($\beta 2m$) hingegen befindet sich im Menschen auf Chromosom 15 und in der Maus auf Chromosom 2. Das $\beta 2m$ ist an die membran durchspannende α Kette nicht kovalent gebunden. Für MHC-I Moleküle kodieren je drei Gene, wobei man beim Menschen von HLA-A, -B und -C spricht und bei der Maus von H-2K, D, L. Für MHC-II kodieren im Menschen die Gene HLA-DP, -DQ, -DR und in der Maus H-2 I-A und H-2 I-E. Bei Maus – Inzuchtstämmen haben alle Individuen das gleiche Allel, so tragen zum Beispiel C57BL/6 Tiere alle das Allel b auf der H-2 Region. So existieren also ausschließlich MHC-I K^b und D^b Moleküle in den C57BL/6 Mäusen.

MHC-I wird von nahezu jeder Zelle exprimiert und bindet bevorzugt endogene (in der Zelle vorkommende) Peptide einer Länge von acht bis zehn Aminosäuren, wobei diese auch häufig

von Pathogenen wie Viren, welche die Zelle infiziert haben, stammen können. Das MHC-II Molekül hingegen besteht aus einer α und einer β Kette, die beide die Membran durchspannen. MHC-II bindet nur Peptide die von außen (exogen) aufgenommen wurden, endogene Antigene werden nicht über MHC-II präsentiert. In der Maus exprimieren APC wie DC, MΦ und B-Zellen, sowie verschiedene Arten von Epithel- und Stromazellen MHC-II auf ihrer Oberfläche.

4.2.2 T-Zell-Rezeptor (TCR)

Der TCR ist ein membranständiges Heterodimer aus zwei unterschiedlichen Polypeptidketten, wobei es sich in den meisten Fällen um eine TCR α und eine TCR β Kette handelt, die durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind (Marrack et al., 1987). Des weiteren gibt es eine kleine Gruppe von T-Zellen, die ein $\gamma:\delta$ Heterodimer exprimieren. Der extrazelluläre Teil beider Ketten besteht aus einer konstanten und einer variablen Region. Die hohe Diversität des TCR ergibt sich aus der somatischen Rekombination nicht homologer Gensegmente, hierbei werden verschiedene Abschnitte (V-, D- und J-Gensegmente) umgelagert und neu kombiniert. Während dieser Umlagerung kommt es zum zufälligen Einbau sogenannter P- und N-Nukleotide, dies erhöht die Diversität nochmals. Das TCR-Repertoire wird auf 10^{12} - 10^{15} verschiedene Rezeptoren geschätzt.

Der TCR erkennt und bindet den Peptid/MHC Komplex, kann aber keine Signale in das Zellinnere weiterleiten. Das $\alpha:\beta$ Heterodimer ist mit einem sogenannten CD3 Komplex, der für die Signalweiterleitung verantwortlich ist, assoziiert.

4.3 T-Zellentwicklung

Im Folgenden wird nur auf die Entwicklung von $\alpha:\beta$ T-Zellen eingegangen, da diese relevant sind für die vorliegende Arbeit. Vorläuferzellen, die aus dem Knochenmark in den Thymus einwandern, sind negativ für CD3 sowie für die Korezeptoren CD4 und CD8. Aufgrund des Fehlens dieser beiden letztgenannten Rezeptoren, werden T-Vorläuferzellen in diesem Stadium als doppelt-negative Thymozyten bezeichnet. Der Thymus lässt sich in zwei Hauptbereiche unterteilen, den peripheren Kortex und die zentrale Medulla (Ladi et al., 2006; Takahama, 2006). Die Entwicklung der Thymozyten beginnt im Kortex mit der Umlagerung der Gensegmente für die β Kette. Eine erfolgreiche Rearrangierung führt zur Expression des prä-T Zellrezeptors (von Boehmer et al., 1997), bestehend aus der β Kette und einer vorläufigen α Kette in Kombination mit CD3. Die Zelle proliferiert und die Korezeptoren CD4 und CD8 werden exprimiert. Diese doppelt-positiven Thymozyten beginnen mit der Kombination der Gensegmente für die α Kette und exprimieren schließlich einen vollständigen TCR. Nur Thymozyten die in der Lage sind MHC/Selbstpeptid Komplexe zu erkennen und zu binden, werden positiv selektiert und können sich weiter entwickeln (von Boehmer, 1994). Hierbei kommt es zu der Entscheidung zwischen den beiden Korezeptoren, T-Zellen die Peptid im Kontext von MHC-I erkennen exprimieren CD8 wohingegen MHC-II von CD4 T-Zellen erkannt wird. Die Thymozyten wandern schließlich in die Medulla und werden negativ selektiert, das bedeutet T-Zellen die Selbstantigene mit hoher Affinität binden werden eliminiert. Dies ist wichtig um zu gewährleisten, dass T-Zellen die schließlich in die Peripherie auswandern nicht körpereigene Strukturen angreifen, was zu Autoimmunkrankheiten führen könnte (Kyewski et al., 2004). Die negative Selektion führt nicht zu einer 100% Eliminierung autoreaktiver T-Zellen, da nicht alle peripheren Selbstpeptide im Thymus präsentiert werden. T-Zellen, die autogene Antigene in der Peripherie erkennen, werden durch die sogenannte periphere Toleranz eliminiert, wobei dies durch klonale Deletion, die Aktivierung von Anergie oder durch die Suppression regulatorischer T-Zellen erfolgt (Annacker et al., 2001; Palmer, 2003).

4.4 Aktivierung von T-Zellen und Effektorfunktionen

Sobald die Entwicklung der T-Zellen im Thymus abgeschlossen ist, wandern diese durch das Blut und Lymphsystem durch den Organismus. Damit eine naive T-Zelle aktiviert werden kann, bedarf es dreier verschiedener Signale, die von APC zur Verfügung gestellt werden. Bei Signal 1 handelt es sich um die Erkennung und Bindung des TCR an sein spezifisches Antigen, dass von APC im Peptid/MHC-Komplex präsentiert wird. Als nächstes spielen sogenannte kostimulatorische Moleküle eine entscheidende Rolle, wie zum Beispiel CD28 auf der T-Zelle, das an CD80/86 auf der DC bindet (Boise et al., 1995). Signal 2 umfasst aber nicht nur positive sondern auch negative kostimulatorische Signale, die fein aufeinander abgestimmt sind (Subudhi et al., 2005). Letztlich kommt es zur Expansion und Differenzierung der antigenspezifischen T-Zelle. In welche Richtung sich die T-Zelle weiterentwickelt, wird vor allem durch ein Zusammenspiel verschiedener Zytokine bestimmt (Signal 3) (Murphy et al., 2002). So führt zum Beispiel die Produktion von IL-6 und TGF- β zur Aktivierung von Th17 Zellen. Diese Zellen regen Stromazellen an Chemokine zu produzieren, die dann Neutrophile anlocken. In Gegenwart von TGF- β und wenn weder IL-6, IFN γ , noch IL-12 vorhanden sind, führt dies bevorzugt zur Aktivierung sogenannter FoxP3 exprimierender regulatorischer T-Zellen (Campbell et al., 2011). Die Ausschüttung von IFN γ und IL-12 durch APC führt zur Generierung von Th1 Zellen, wobei Th2 Zellen eher durch IL-4 und Notch-Liganden induziert werden. Th1 Zellen aktivieren vor allem MΦ und helfen so bei der Eliminierung intrazellulärer Mikroorganismen. Darüber hinaus sind sie in der Lage B-Zellen zur Produktion von IgG Antikörpern anzuregen. Th2 Zellen hingegen aktivieren B-Zellen und regen deren Expansion und Produktion von Antikörpern wie IgE an.

Alle bisher beschriebenen T-Zellen gehören zu der Gruppe der CD4 $^{+}$ T-Zellen. CD8 $^{+}$ T-Zellen hingegen differenzieren zu zytotoxischen Effektorzellen, die virusinfizierte- oder Tumorzellen erkennen und abtöten. Zytotoxische T-Zellen besitzen spezialisierte Granula, die zytotoxische Proteine beinhalten. Bindet eine solche T-Zelle an ihre Zielzelle so kommt es zur Polarisierung und damit zielgerichteten Ausschüttung der zytotoxischen Proteine (Harty et al., 2000).

4.5 Prozessierung und Präsentation von Antigenen

Damit T-Zellen ihr spezifisches Antigen im Kontext von MHC-I bzw.-II erkennen und binden können, müssen die Peptide zunächst von APC prozessiert werden. Die Prozessierung von Peptiden für CD4 bzw CD8 und damit die Beladung von MHC-II bzw.-I läuft nach bestimmten Mechanismen und in unterschiedlichen Kompartimenten ab.

4.5.1 Prozessierung und Beladung von exogenen Peptiden für MHC-II

Zellen können zum Beispiel durch rezeptorvermittelte Endozytose oder durch Makropinozytose exogene (nicht in der Zelle vorkommende) Proteine aufnehmen. Dabei wird das Antigen von intrazellulären Vesikeln, sogenannten Endosomen aufgenommen, die dann mit Lysosomen verschmelzen. Die Veränderung des pH-Wertes hin zu einem sauren Milieu führt zu der Aktivierung von Proteasen, die das Antigen in Peptidfragmente degradieren. Im endoplasmatischen Reticulum (*ER*) bindet eine invariante Kette an die neu synthetisierten MHC-II Moleküle. Diese Kette stabilisiert zum einen das MHC Molekül und sorgt zum anderen dafür, dass nicht endogene Peptide im ER gebunden werden. Darüber hinaus leitet die invariante Kette das MHC-II Molekül zu einem endosomalen Kompartiment mit niedrigem pH. Dort wird die Kette schrittweise durch Proteasen wie zum Beispiel Cathepsin S abgebaut (Hsieh et al., 2002), wobei am Ende nur ein kleines Fragment namens CLIP in der Bindungsgrube bleibt. Ein Protein, das im MHC kodiert ist (HLA-DM im Menschen und H-2M in der Maus) sorgt für den Austausch des Clip Fragments gegen Antigen und der so entstandene MHC-II/Peptidkomplex wird an die Oberfläche transportiert.

4.5.2 Prozessierung und Beladung von endogenen Peptiden für MHC-I

Alle im Zytosol produzierten Proteine einer Zelle werden als endogen bezeichnet. Jede kernhaltige Zelle exprimiert MHC-I auf ihrer Oberfläche, dies ist wichtig, damit virusinfizierte- oder Tumorzellen Antigen präsentieren und vom Immunsystem eliminiert werden können. Der Abbau zytosolischer Proteine erfolgt hauptsächlich durch die Markierung mittels Ubiquitin und die Degradierung in Proteasomen, großen multikatalytischen Proteasen aus verschiedenen Untereinheiten. Während einer Infektion und der damit verbundenen Ausschüttung von Interferonen kann es zur Modifizierung der Untereinheiten kommen, man spricht dann nicht mehr vom konstitutiven sondern vom Immunoproteasom (Griffin et al., 1998; Groettrup et al., 2010). Der Austausch der konstitutiven Einheiten führt zu einer veränderten enzymatischen Aktivität des Proteasoms. Die synthetisierten Peptide werden dann in das ER weitergeleitet, wobei sie durch Chaperone vor weiterem Abbau im Cytosol geschützt sind. Die meisten Peptide, die im ER ankommen sind zu lang um an MHC-I zu binden und werden am Aminoterminalen durch Aminopeptidasen wie zum Beispiel ERAAP (*endoplasmatic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing*) getrimmt (Saric et al., 2002). Hammer et al. (Hammer et al., 2005) fanden in ERAAP knockout Mäusen eine gestörte Generierung natürlicher Peptide, eine verminderte Stabilität von MHC-I/Peptidkomplexen und geringere CD8⁺ T-Zellantworten. Dies verdeutlicht die wichtige Rolle dieser Peptidase bei der Herstellung eines normalen MHC-I : Peptidrepertoires.

Die im Zytosol synthetisierten Peptide müssen in das ER geleitet werden, um dort auf MHC-I Moleküle geladen zu werden. Diesen Transport übernimmt ein heterodimeres Protein, bestehend aus TAP1 und TAP2. Noch nicht vollständig gefaltete MHC-I α Ketten binden an das Chaperon Calnexin und werden so im ER gehalten, bis β 2m bindet. Letztlich binden die MHC-I Moleküle über Tapasin an TAP und die Beladung mit Peptid erfolgt. Erst dann ist der Komplex stabil und kann auf der Zelloberfläche exprimiert werden.

4.5.3 Präsentation exogener Peptide über MHC-I: Kreuzpräsentation

Neben den beiden zuvor beschrieben direkten Wegen der Antigen Aufnahme und Prozessierung, gibt es auch die Möglichkeit, dass exogen aufgenommene Proteine über MHC-I an CD8 T-Zellen präsentiert werden. Hierbei spricht man von der sogenannten Kreuzpräsentation, die in den letzten Jahren Gegenstand vieler wissenschaftlicher Untersuchungen war und nach wie vor ist. Diese Art der Präsentation spielt zum Beispiel vor allem bei Viren, die APC, wie DC nicht direkt infizieren oder infizierte Zellen inaktivieren, eine entscheidende Rolle und führt so zur Aktivierung antiviraler zytotoxischer CD8 T-Zellen. Dabei stellt sich die Frage wie exogen aufgenommenes Material in den MHC-I-Präsentationsweg gelangen kann. Momentan wird hauptsächlich zwischen zwei Arten der Kreuzpräsentation unterschieden, dem zytosolischen und dem vakuolären Weg (Joffre et al., 2012) (*Abbildung 4.1*). Nach Phagozytose exogener Proteine können diese in das Zytosol exportiert werden und dort durch das Proteasom abgebaut werden. Die so synthetisierten Peptide gelangen durch TAP in das ER und können dort an neu hergestellte MHC-I Moleküle binden. Es konnte gezeigt werden, dass bei diesem zytosolischen Weg Aminopeptidasen wie ERAAP und vor allem IRAP (*insulin-regulated aminopeptidase*) eine entscheidende Rolle spielen um passende Peptide für die Beladung von MHC-I zu generieren (Saveanu et al., 2009). Im Gegensatz dazu ist der vakuoläre Weg unabhängig von TAP, die exogenen Peptide werden in Phagosomen aufgenommen, abgebaut und auf MHC-I Moleküle geladen. Noch nicht abschließend geklärt ist die Frage, woher die MHC-I Moleküle für die Kreuzpräsentation stammen. Unter anderem konnte kürzlich gezeigt werden, dass CD74 den Transport von neu synthetisierten MHC-I Molekülen vom ER zu endozytischen Kompartimenten in DC vermittelt (Basha et al., 2012).

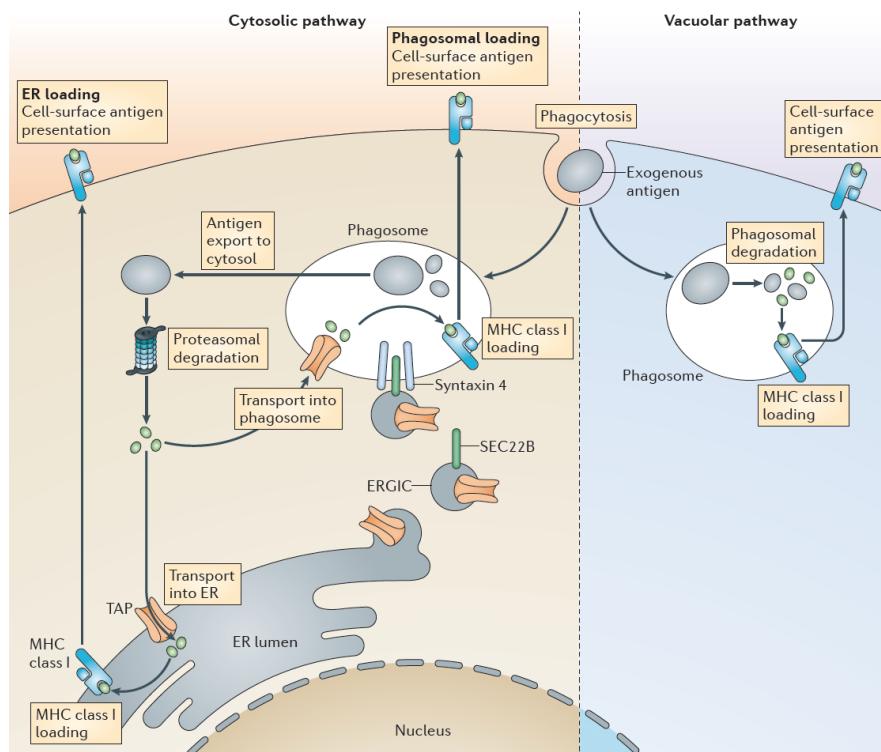


Abbildung 4.1: Übersicht über den zytosolischen und vakuolären Kreuzpräsentationsweg aus (Joffre et al., 2012)

Es gibt, wie später in dieser Arbeit noch genauer beschrieben wird, eine Reihe verschiedener DC-Subtypen, die unterschiedliche Aufgaben im Immunsystem wahrnehmen. Residente $CD8^+CD11b^-$ DC die man in Milz, Lymphknoten und Thymus findet, sowie migratorische $CD103^+CD11b^-$ DC scheinen besonders effizient bei der Kreuzpräsentation zu sein. Die Fähigkeit Antigene effizient durch Kreuzpräsentation zu präsentieren wird durch Cytokine, wie GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), die bei der Entwicklung der $CD8^+$ DC Linie eine entscheidende Rolle spielen, gefördert (Dresch et al., 2012; Sathe et al., 2011). Aber auch andere APC wie MΦ besitzen die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation, so konnten beispielsweise Asano et al. (Asano et al., 2011) kürzlich zeigen, dass $CD169^+$ MΦ tumorassoziierte Antigene kreuzpräsentieren können.

4.6 APC

B-Zellen, MΦ und DC werden aufgrund ihrer Fähigkeit naive T-Zellen zu aktivieren als APC bezeichnet und werden im Folgenden näher beschrieben.

4.6.1 B-Zellen

B-Zellen sind die wichtigsten Effektorzellen der humoralen Immunantwort und darauf spezialisiert über ihren B-Zellrezeptor Antigene in ihrer nativen Form zu erkennen. Sobald sie aktiviert wurden und zu Plasmazellen differenzieren, können sie große Mengen an Antikörper der gleichen Spezifität produzieren und sezernieren. Darüber hinaus können B-Zellen die aufgenommenen Antigene aber auch prozessieren und über MHC-II präsentieren. Somit können sie als APC fungieren, sind dabei aber deutlich ineffizienter als MΦ und DC. Dies ist unter anderem darin begründet, dass B-Zellen zu ihrer vollständigen Aktivierung die Hilfe von CD4 T-Zellen benötigen.

4.6.2 MΦ

MΦ sind große mononukleäre Phagozyten, die in allen Geweben vorkommen. Sie besitzen eine Reihe verschiedener Rezeptoren, wie zum Beispiel TLRs, Scavengerrezeptoren und C-Typ-Lektine, die es ihnen ermöglicht, verschiedene konservierte mikrobielle Strukturen (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPS) zu erkennen und Mikroorganismen aufzunehmen. MΦ lassen sich durch spezifische Oberflächenmarker wie CD11b, F4/80 und CD68 charakterisieren (Martinez-Pomares et al., 2012). In der Milz trennt die MZ die rote Pulpa, einen Ort für den Abbau roter Blutzellen, von der weißen Pulpa, in der sich B-Zellfollikel und T-Zellzonen befinden. In der roten Pulpa befinden sich $F4/80^+$ MΦ, wohingegen in der MZ zwei Arten von MΦ unterschieden werden. Die marginal metallophilen MΦ (*marginal metallophilic macrophages*, MMM), die CD169 exprimieren (Crocker et al., 1989; van den Berg et al., 1992) befinden sich im inneren Teil der MZ. Die MZ-MΦ (*marginal zone macrophages*, MZM) dagegen exprimieren SIGN-R1 (Geijtenbeek

et al., 2002) und befinden sich in der äußeren MZ. Auch in den Lymphknoten findet man diese beiden Arten von MΦ (Geijtenbeek et al., 2002).

In den letzten Jahren gab es verschiedene Studien, die zeigen konnten, dass vor allem CD169⁺ MΦ nicht nur eine Rolle bei der Aktivierung von B-Zellen spielen, (Carrasco et al., 2007; Junt et al., 2007) sondern auch bei der Aktivierung von CD8 T-Zellen (Asano et al., 2011; Backer et al., 2010), der Rekrutierung von plasmazytoiden DC (*plasmacytoid DC*, pDC) und der Produktion von IFN.

4.6.3 DC

DC spielen eine Schlüsselrolle im adaptiven Immunsystem, sowie beim Auslösen von Toleranz. Bei diesen Zellen handelt es sich um eine heterogene Gruppe, die in unterschiedliche DC-Subtypen aufgeteilt wird. Diese Unterteilung erfolgt unter anderem auf der Basis der Expression unterschiedlicher Oberflächenmarker. Aufgrund dessen können zwei Hauptgruppen unterschieden werden: konventionelle DC (*conventional DC*, cDC) und pDC (Belz et al., 2012; Segura et al., 2009).

Vor allem cDC sind spezialisiert für die Aufnahme und Prozessierung von Antigen und zeichnen sich durch eine hohe Expression von CD11c aus. Man unterteilt sie weiter in residente DC, die wiederum anhand der CD8 Expression unterschieden werden können, und in migratorische DC. Letztere wandern aus dem Gewebe in die Lymphknoten und sind nicht in der Milz zu finden. Man unterscheidet hierbei zwischen CD11b⁺CD103⁻ und CD11b⁻CD103⁺ DC (Segura et al., 2009).

Dagegen zeichnen sich pDC durch die Produktion großer Mengen an Typ I Interferon aus und spielen daher eine wichtige Rolle bei der Antwort auf verschiedene Pathogene. Charakteristisch für diese Zellen ist die Expression von B220 und intermediäre Level an CD11c.

Darüber hinaus gibt es noch eine Reihe weiterer DC-Subtypen, wie zum Beispiel Langerhanszellen in der Haut. Auf diese verschiedenen Arten soll hier aber nicht näher eingegangen werden.

Abbildung 4.2 zeigt einen Überblick der verschiedenen hier beschriebenen DC-Subtypen.

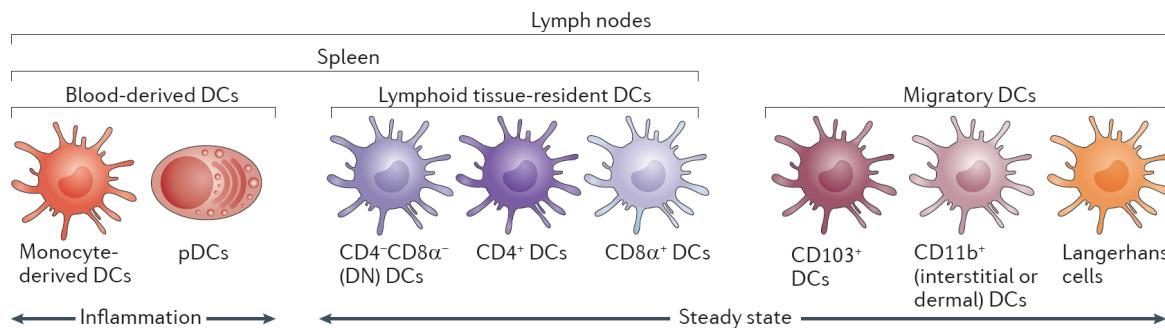


Abbildung 4.2: Überblick über lymphoide DC in der Maus aus (Belz et al., 2012)

DC liegen in verschiedenen Aktivierungs- bzw. Reifestadien vor und gerade dieses Merkmal macht sie so effizient bei der Aufnahme und Prozessierung von Antigen, sowie der anschließenden Präsentation dieser Antigene an T-Zellen. Im unreifen Stadium nehmen DC Antigen durch Phagozytose, Makropinozytose oder rezeptorvermittelte Endozytose auf. Dafür stehen ihnen verschiedene Rezeptoren wie zum Beispiel DEC205 und Mannoserezeptoren zur Verfügung. In diesem Stadium exprimieren DC noch wenig kostimulatorischen Moleküle. Liegt eine Infektion vor und DC erkennen sogenannte PAMPs, wie beispielsweise Proteine oder Nukleinsäuren, führt dies zu ihrer Reifung (Kawai et al., 2010). Die veränderte Expression von Zytokinrezeptoren ermöglicht letztlich den Eintritt der DC in das periphere lymphatische Gewebe. Darüber hinaus exprimieren reife DC vermehrt MHC-I und -II sowie kostimulatorische Moleküle wie zum Beispiel CD80/86. In diesem Stadium verlieren DC weitestgehend die Fähigkeit Antigen aufzunehmen, sind aber in der Lage naive T-Zellen zu aktivieren. Allerdings konnten Platt et al. (Platt et al., 2010) kürzlich zeigen, dass reife DC zwar ihre Kapazität zur Makropinozytose herunter regulieren, aber dennoch weiterhin in der Lage sind, über endozytische Rezeptoren Antigen aufzunehmen und zu präsentieren.

DC besitzen eine Vielzahl an Effektorfunktionen, die es ihnen nicht nur ermöglicht verschiedene Arten von naiven T-Zellen zu aktivieren, sondern auch durch die Ausschüttung verschiedener Zytokine (Signal 3) die weiteren Funktionen der T-Zellen zu bestimmen. In der Literatur werden verschiedene Modelle diskutiert, welche die Fähigkeit von DC die Differenzierung der CD4 T-Zellen zu distinkten Effektorzellen zu lenken, zu erklären versuchen (Reis e Sousa, 2006).

Aufgrund dieser Fähigkeiten spielen cDC eine entscheidende Rolle bei der Bekämpfung verschiedenster Pathogene. Tabelle 4.1 zeigt eine Zusammenfassung dieser Krankheitserreger, die durch Studien in denen DC *in vivo* depletiert worden sind, herausgearbeitet werden konnten (Bar-On et al., 2010).

Pathogene	
Viren	LCMV Herpes Simplex 1 Vesikuläres Stromatitis Virus Influenza Respiratorisches Syncytial Virus Herpes Simplex murines Hepatitis Virus
Bakterien	Listerien Mykobakterien Salmonellen
Parasiten	Plasmodium Leishmanien Toxoplasma Gondii Nippostrongylus brasiliensis

Tabelle 4.1: Pathogene bei deren Bekämpfung cDC eine entscheidende Rolle spielen, aus (Bar-On et al., 2010), verändert.

4.7 Verschiedene Modelle zur Untersuchung der DC Funktionen

Aufgrund ihrer zentralen Rolle im Immunsystem waren und sind DC Gegenstand vieler wissenschaftlicher Untersuchungen. Um die Rolle und Funktionen dieser Zellen genauer untersuchen zu können, stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung (Bar-On et al., 2010).

4.7.1 DC-Transfer bzw. Vakzinierung

Es besteht die Möglichkeit, *in vitro* generierte DC adoptiv zu transferieren und wenn diese zuvor mit Antigen beladen worden waren, so spricht man von der DC Vakzinierung. Ein limitierender Faktor die Funktion von DC durch Transfer zu studieren, oder therapeutisch einzusetzen liegt darin, dass die meisten dieser Zellen an der Injektionsstelle verbleiben und relativ schnell sterben. Daher erreichen transferierte DC ihren entsprechenden physiologischen Wirkungsort nur sehr ineffizient. Dennoch konnte gezeigt werden, dass antigenbeladene DC sowohl in der Maus wie auch im Menschen T-Zellen stimulieren können und ein wichtiges Instrument bei der Entwicklung von Krebstherapien darstellen. So konnten in verschiedenen klinischen Studien DC *in vitro* mit Tumorantigenen beladen und wieder injiziert werden. Dabei macht man sich die Fähigkeit der DC zu T-Zellzonen in lymphoiden Organen wandern zu können und dort T-Zellen zu aktivieren zu nutze (Gilboa, 2007; Steinman et al., 2007). Beim Menschen werden für die Herstellung dieser DC Monozyten aus dem Blut verwendet.

4.7.2 Antigen-Antikörper Konjugate

Diese Art der Untersuchung zur Funktion der DC verwendet cDC-spezifische Oberflächenrezeptoren wie zum Beispiel DEC205 (Bonifaz et al., 2002). Beispielsweise konnten Ovalbumin/Antikörper-Konjugate mit oder ohne Aktivierungsstimulus dazu genutzt werden unreife bzw. reife DC zu generieren, die das Antigen aufnehmen, prozessieren und damit schließlich Toleranz oder Immunität auslösen (Dudziak et al., 2007; Hawiger et al., 2001). Auch Tumorantigene können so durch spezifische Antikörper direkt DC in T-Zellzonen zugeführt werden (Steinman et al., 2007).

4.7.3 *In vitro* DC Kulturen

Einige der Hauptfunktionen klassischer DC, wie zum Beispiel die Fähigkeit in zwei verschiedenen Reifestadien vorzuliegen, wurden mittels *in vitro* DC Kulturen untersucht. Dabei lassen sich Vorläuferzellen aus dem Knochenmark isolieren und unter Einfluss von

Wachstumsfaktoren wie GM-CSF oder Flt3- (*FMS-like tyrosine kinase 3*) Ligand, die auch bei der Entwicklung der DC *in vivo* eine Rolle spielen, zu DC differenzieren. Auch wenn diese Kulturen sehr wichtig sind bei der Untersuchung der DC Funktionen, so stellen sie doch ein relativ vereinfachtes System dar, dass nicht das komplexe *in vivo* DC Netzwerk aus verschiedenen Subtypen nachahmen kann. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass durch GM-CSF Kulturen eher DC generiert werden, die mehr monozyten-abgeleiteten DC als cDC ähneln. Die *in vitro* durch Flt3L generierten DC kommen den *in vivo* cDC näher (Brasel et al., 2000; Naik et al., 2005). Kürzlich konnten durch die Verwendung beider Wachstumsfaktoren in einer Kultur CD103⁺ DC mit der Fähigkeit zur Kreuzpräsentation generiert werden (Sathe et al., 2011).

4.7.4 DC Depletion *in vivo*

Eine weitere Möglichkeit DC Funktionen *in vivo* zu untersuchen bzw. vielmehr zu analysieren, welche Konsequenzen daraus resultieren, wenn DC nicht mehr vorhanden sind, besteht darin, Mausmodelle zu verwenden, die die konditionelle oder konstitutive Depletion von CD11c⁺ DC erlauben. Beide Systeme machen sich den Gebrauch des Diphtherie Toxins (*DT*) zu nutze. Die Zytotoxizität dieses Toxins besteht darin, dass es nur durch rezeptor-vermittelte Endozytose über den *DT*-Rezeptor (*DTR*), ein Vorläufer des heparin-bindenden epidermalen Wachstumsfaktor (*heparin-binding epidermal growth factor, hbEGF*) in die Zelle gelangen kann (Naglich et al., 1992). Dieser Rezeptor weist in Mäusen einen Polymorphismus auf, der die Bindung des Toxins und damit die apoptotische Wirkung auf die Zielzelle verhindert. Das Toxin besteht aus zwei Untereinheiten, die nach der Internalisierung die Proteinsynthese inhibieren und so zum Tod der Zelle führen.

4.7.4.1 Konditionelle Depletion

Dieses Mausmodell trägt ein humanes DTR Transgen unter der Kontrolle des CD11c Promoters und durch DTR Expression werden cDC sensiv für DT (Jung et al., 2002). Durch die Gabe des Toxins, werden alle CD11c⁺ Zellen depletiert. Probst et al (Probst et al., 2005a) konnten zeigen, dass der Höhepunkt der Depletion 18 Stunden nach Gabe des Toxins vorliegt,

wobei nicht nur cDC sondern auch bestimmte MΦ, wie alveolare-, F4/80⁺- MΦ, MMM und MZM, die ebenfalls CD11c exprimieren, fehlen. Die Repopulation der Milz mit F4/80⁺ MΦ erfolgte bereits fünf Tage nach Verabreichung von DT, wohingegen CD169⁺ und SIGN-R1⁺ MΦ erst nach zehn Tagen wieder detektierbar waren. Im Gegensatz dazu ließen sich DC bereist 42 Stunden nach der Gabe des Toxins in der Milz wieder immun-histochemisch anfärben. Ein Nachteil dieses Modells besteht darin, dass wiederholte Injektionen des Toxins zu schädigenden Nebenwirkungen führen. Allerdings lässt sich dies durch Chimären, also Wildtyp-Mäuse die mit CD11c-DTR transgenem Knochenmark rekonstituiert werden, umgehen, sodass auch über längere Zeiträume das Fehlen der cDC untersucht werden kann. Jung et al. (Jung et al., 2002) konnten mit diesem Mausmodell zeigen, dass DC eine entscheidende Rolle bei der Kreuzpräsentation zellassoziierten OVAs spielen und diese Mäuse nicht in der Lage sind, T-Zellantworten gegen *Listeria Monocytogenes* und *Plasmodium Yoelii* zu generieren.

Kürzlich wurde ein Zinkfinger-Transkriptionsfaktor zDC (Zbtb46, Btdb4) beschrieben, der spezifisch von cDC und deren Vorläufern, aber nicht von Monozyten, pDC oder anderen Zellen des Immunsystems exprimiert wird (Meredith et al., 2012). Meredith et al. fügten die DTR cDNS in das 3'UTR des zDC Lokus ein. Diese sogenannten zDC-DTR Mäuse haben im Gegensatz zu den CD11c-DTR Mäusen den Vorteil, dass nur cDC fehlen, alle anderen Zellen wie beispielsweise MΦ aber nicht depeltiert werden. Allerdings ist es auch bei diesem Mausstamm nötig auf Chimären zurückzugreifen, da die wiederholte Gabe des Toxins zu unerwünschten Nebenwirkungen führt.

4.7.4.2 Konstitutive Depletion

Zur konstitutiven Depletion der DC *in vivo* wurden CD11c-Cre Mäuse mit Mäusen verpaart, die Diphterie Toxin A (DTA) unter der Kontrolle einer loxP-flankierenden Neomycin resistenten Kassette des ROSA26 Lokus exprimieren. Cre-vermitteltes Ausschneiden der Kassette führt zur Expression von DTA und damit zum konstitutiven Verlust der cDC, pDC und Langerhanszellen (Ohnmacht et al., 2009). Zwei unabhängige Arbeitsgruppen generierten diesen Mausstamm zeitgleich, wobei sich die beiden Mausstämme lediglich durch die Herkunft des DTA unterscheiden. Dennoch zeigte die Arbeitsgruppe um Jung (Birnberg et al.,

2008), dass ihre Mäuse noch größtenteils pDC und Langerhanszellen besitzen. In der vorliegenden Arbeit wurden die von Ohnmacht et al. publizierten Mäuse verwendet.

Birnberg et al konnten zeigen, dass die konstitutive Depletion der cDC einhergeht mit einer normalen Entwicklung und Homeostase der T-Zellen. Ohnmacht et al. hingegen fanden in ihren Mäusen eine erhöhte Anzahl an einfach positiven CD4 T-Zellen und eine daraus resultierende spontane Autoimmunität, die letztlich den Tod der Mäuse im Alter von ca. zwei Monaten zur Folge hat. Die Diskrepanz zwischen diesen beiden Mausstämmen lässt sich nicht abschließend klären, ist aber zum Teil wahrscheinlich auf den unterschiedlichen genetischen Hintergrund und die Haltung der Mäuse in verschiedenen Stallungen zurückzuführen (Bar-On et al., 2010).

4.7.5 DC-MHCI, ein transgenes Mausmodell

In diesem transgenen Mausstamm wird MHC-I selektiv nur auf DC und Epithelzellen im Thymus exprimiert, alle anderen Zellen weisen keine MHC-I Expression auf (Kurts et al., 2001). Dazu wurde ein doppelt-transgener Mausstamm generiert, in dem β 2m unter dem DC spezifischen CD11c Promotor und dem Keratin 14 (K14) Promotor in ansonsten β 2m defizienten Mäusen, exprimiert wird. Dies führt zu einer Expression von MHC-I auf DC und kortikalen Thymusepithelzellen (*cortical thymic epithelial cells*, cTECs), wodurch es zu positiver und negativer Selektion und damit zu einem normalen T-Zellrepertoire kommt. In diesen Mäusen kann man somit spezifische CD8 T-Zellantworten studieren, die nur von DC induziert worden sind, da alle anderen APC negativ sind für MHC-I. Kurts et al (Kurts et al., 2001) konnten mit diesem Modell zeigen, dass DC ausreichen, um *in vivo* CD8 T-Zellen Selbstantigene durch Kreuzpräsentation zu präsentieren. Eine andere Studie untersuchte die Rolle der DC bei der Selektion naiver T-Zellen und fand heraus, dass DC ausreichen für die negative Selektion, wohingegen für die positive Selektion cTECs im Thymus entscheidend sind (Cannarile et al., 2004). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass DC ausreichen um die homöostatische Proliferation von CD8 T-Zellen auszulösen (Gruber et al., 2005).

In einer weiteren Untersuchung wurden die DC-MHCI Mäuse mit HSV-OVA immunisiert und es wurde nachgewiesen, dass sowohl die OVA-spezifische als auch die HSV-spezifische CD8 T-Zellantwort über einen Zeitraum von 60 Tagen in den transgenen Tieren im Vergleich zu C57/BL6 fünf bis sieben mal höher lag (Gruber et al., 2010). In Wildtyp-Mäusen führt die

Erkennung des Antigens auf parenchymalen nicht professionellen APC zu der Aktivierung von bim (einem Molekül aus der proapoptotischen bcl2 Familie) in zytotoxischen T-Zellen.

4.8 LCMV und das Modellantigen GP33

Neben dem MHC-I K^b restringierten Hühner Ovalbumin (OVA) Epitop OVA₂₅₇₋₂₆₄, ist auch das MHC-I D^b restringierte Epitop GP33 aus dem Glykoprotein von LCMV, ein beliebtes und intensiv studiertes Modellantigen, um die Aktivierung und Funktion zytotoxischer T-Zellen zu untersuchen. So ist beispielsweise die fundamentale Entdeckung der MHC Restriktion auf Untersuchungen mit diesem Virus zurückzuführen (Zinkernagel et al., 1974). LCMV aus der Familie der Arenaviren ist ein negativ-Einzelstrang RNS Virus, dessen Genom aus zwei Segmenten besteht. Ein kleines RNS (*small RNA, S RNA*) und ein großes RNS (*large RNA, L RNA*) Segment. Die S RNA kodiert für das virale Glykoprotein (*GP*) und das Nukleoprotein (*NP*), wohingegen die Proteine L (virale Polymerase) und Z (RNA-bindendes Protein) von der L RNA kodiert werden. GP wird posttranslational in GP1, das die Aminosäuren 1- 264 umfasst und in GP2 mit den Aminosäuren 264-486 gespalten. Der natürliche Wirt dieses Virus sind Nagetiere wie die Maus. Die Infektion der Zelle erfolgt über die rezeptorvermittelte Aufnahme von Virionen in endoplasmatischen Vesikeln. Die Änderung des pH Wertes führt zur Freilassung der viralen Nucleokapside in das Zytoplasma der Zelle und dort beginnt schließlich die Replikation des Virus. Der Rezeptor für die Aufnahme von LCMV, sowie auch anderer Arenaviren ist α -Dystroglycan (α -DG) (Cao et al., 1998), ein zellulärer Rezeptor für extrazelluläre Matrixproteine. Es existieren unterschiedliche Stämme von LCMV (Dutko et al., 1983), wobei häufig zwischen zwei Typen unterschieden wird. Bei clone 13 (*C1 13*) handelt es sich um eine immunsuppressive Variante, die eine persistierende Infektion zu Folge hat, wohingegen Armstrong (Arm) das Immunsystem nicht supprimiert und innerhalb weniger Tage durch spezifische CD8 T-Zellen eliminiert werden kann. LCMV ist kein zytopathisches Virus, führt also nicht direkt zu morphologischen, zellschädigenden Veränderungen der infizierten Zelle. Es konnte aber gezeigt werden, dass durch virusspezifische T-Zellen indirekt zytopathische Effekte hervorgerufen werden. Odermatt et al (Odermatt et al., 1991) fanden heraus, dass mit der Zerstörung LCMV-infizierter APC durch virusspezifische CTL eine Zerstörung der follikulären Struktur von Milz und Lymphknoten einhergeht.

Replizierende Viren wie LCMV haben den Nachteil, dass sich die Infektion auf weitere Zellen ausbreiten kann, und es kann wie zuvor beschrieben, zu immunsuppressiven und zytophatischen Effekten kommen. Nicht replizierende Vektoren stellen deshalb ein hervorragendes Instrument dar, um die antigenpräsentierenden Fähigkeiten infizierter Zellen zu untersuchen. Aufgrund dessen wurden die meisten Untersuchungen in dieser Arbeit mit einem rekombinanten Adenovektor, der das Modelantigen GP33 exprimiert, durchgeführt. Adenoviren sind nicht umhüllte einfach-doppelsträngige DNS Viren, mit einer Genomgröße von ca. 30-35 Kilobasen (Lasaro et al., 2009). In den meisten wissenschaftlichen Studien die mit dieser Art von Vektoren arbeiten handelt es sich um den humanen Serotyp 5, so auch in der vorliegenden Arbeit. Adenovektoren besitzen einige Merkmale, wie zum Beispiel die Fähigkeit robuste Immunantworten auszulösen, die sie nützlich machen für den Einsatz als Vakzine (Khare et al., 2011). In der klinischen Pharmakologie kommen hauptsächlich die Serotypen 2 und 5 zum Einsatz.

4.9 Zielsetzung der Arbeit

DC spielen im Immunsystem eine entscheidende Rolle aufgrund ihrer Fähigkeit Antigen aufzunehmen, zu T-Zellzonen zu wandern und dort naive T-Zellen zu aktivieren. In der vorliegenden Arbeit sollte die Kapazität der DC CTL zu generieren untersucht werden, wenn sie die einzigen APC sind, die Antigen präsentieren können. Dazu wurde das bereits zuvor beschriebene Mausmodell DC-MHCI verwendet, welches es ermöglicht, die qualitativen und quantitativen Effekte auf CD8 T-Zellen zu untersuchen, wenn DC die einzigen APC sind, die Antigen präsentieren können. Wie bereits erwähnt, konnten Gruber et al. (Gruber et al., 2010) mit diesem Mausmodell zeigen, dass DC ausreichen um sowohl OVA spezifische als auch für das Glykoprotein von HSV spezifische T-Zellen zu generieren. Vielmehr war es sogar so, dass die Präsentation der Antigene auf nicht-DC eine Verringerung der T-Zellexpansion zur Folge hatte.

Neben OVA ist auch GP33 ein gut untersuchtes Modellantigen in der Immunologie und die Rolle der DC im Bezug auf dieses Antigen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. So konnten beispielsweise Probst et al. (Probst et al., 2005b) zeigen, dass DC unumgänglich sind für eine Aktivierung LCMV spezifischer T-Zellen, wohingegen eine andere Arbeitsgruppe

(Thomas et al., 2007) postuliert, dass nicht-hematopoetische Zellen entscheidend sind für die klonale Expansion GP33 spezifischer CD8 T-Zellen.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle der DC für dieses Modellantigen genauer untersucht werden und gezeigt werden, ob auch im Fall von GP33 eine Präsentation auf nicht-APC zu einer Verringerung der Expansion spezifischer T-Zellen führt. Gerade im Hinblick auf die Optimierung von Vakzinen, ist es wichtig zu verstehen, welche Mechanismen der effizienten Aktivierung und Differenzierung von Effektor- und Gedächtnis-CTL zu Grunde liegen.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Antikörper

Tabelle 5.1: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie

Spezifität (Anti-Maus-)	Konjugat	Klon	Bezugsquelle
CD4	PerCP	H129.9	BD Bioscience
CD8	FITC PerCP APC	53-6.7	BD Bioscience
CD11c	PeCy5.5	N418	eBioscience
CD19	PerCP	1D3	BD Bioscience
CD40	APC	1C10	eBioscience
CD44	PE APC	IM7.8.1 IM7	Caltag BD Bioscience
CD62L	FITC APC	MEL-14	BD Bioscience
CD86	PE	GL1	BD Bioscience
CD90.1	FITC PerCP APC	Ox-7 Ox-7 HIS51	BD Bioscience
CD107a	PE	eBio1D4B	eBioscience
B220	FITC	RAR-6B2	eBioscience
CD169	Biotin	Moma-1	Acris
F4/80	APC	BM8	eBioscience
H-2D ^b	FITC	KH95	BD Bioscience
H-2K ^b	PE	AF6-88.5	BD Bioscience
I-A ^b	Bio	25-9-17	BD Bioscience
IFN γ	PE	XMG1.2	BD Bioscience
IL-2	PE-Cy7	JES6-5H4	eBioscience

TNF α	FITC	MP6-XT22	eBioscience
Vo2-TCR	FITC PE APC	B20.1	BD Bioscience
Vo5.1/5.2-TCR	PE	MR9-4	BD Bioscience

Für die intrazelluläre Färbung von IFN γ , TNF α und IL-2 wurde das Cytofix/Cytoperm Kit der Firma BD Bioscience (San Diego) verwendet.

ITAgTM MHC Multimere H-2D^b/KAVYNFATC (GP33) bzw. H-2K^b/AVYNFATC (GP34) wurden von der Firma Beckman Coulter (Fullerton, USA) und das Pro5-MHC-Multimer H-2K^b/SSINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄), sowie das zugehörige PE- bzw. APC- Konjugat wurde von der Firma ProImmune (Deutschland) bezogen. Für die Unterscheidung lebender Zellen von Toten wurde Dapi oder Violet Fluorescent Reactive Dye (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) eingesetzt.

5.1.2 Chemikalien

Alle verwendeten Lösungen, Medien und Puffer wurden mit zweifach destilliertem Wasser angesetzt. Wenn nicht anders vermerkt wurden die Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (St. Louis, MO, USA) im jeweils höchsten Reinheitsgrad bezogen. Die Herkunft speziell benötigter Reagenzien ist der entsprechenden Methodenbeschreibung zu entnehmen.

5.1.3 Geräte

Für die Experimente wurden folgende Geräte verwendet:

Brutschrank (Hera cell, von Heraeus), Chemikalienwaage (Kern, Albstadt), Durchflusszytometer (FACSCalibur und FACSCanto von Becton Dickinson), Feinwaage (Adventurer, Ohaus Corp., Pine Brooks, NJ, USA), Magnetrührer (Ika Labortechnik, Staufen), Pipetten (Gilson, Middleton, WI, USA), Pipettierhilfe (Integra Biosciences, Baar, Schweiz), Sterilbank (Heraeus), Tischzentrifuge (Centrifuge 5415 D, Eppendorf, Hamburg), UV-Lampe (UVC 30, Kendro, Langenselbold), Vortex-Genie2 (Scientific Industries, Bohemia, NY, USA),

Wasserbad (Grant Instruments Ltd., Barrington Cambridge, England), Zellzählgerät (Coulter Counter Z2, Beckman Coulter, Krefeld), Zentrifuge (Rotixa RP, Hettich, Tuttlingen). Alle anderen verwendeten Geräte sind in den jeweiligen Methodenbeschreibungen erwähnt.

5.1.4 Lösungen und Medien

ACK-Puffer	8,29 g NH ₄ Cl 1 g KHCO ₃ 37,2 mg Na ₂ EDTA H ₂ O ad 1 l pH 7,2-7,4 mit 1 N HCl einstellen und durch 0,2 µm Filter steril filtrieren
CFSE Puffer	Dulbecco`s PBS (PAA) ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ 0,1 % FBS (v/v)
FACS-Puffer	0,01 % Natriumazid (v/v) 2 % FBS (v/v) PBS
PBS-Heparin	Dulbecco`s PBS (PAA) ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ 2% (v/v) Heparin-Natrium (25000 I.E/ 5ml, Ratiopharm, Ulm, Deutschland)
MACS-Puffer	Dulbecco`s PBS (PAA) ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ 0,5 % FBS (v/v) 2 mM EDTA
Verdaupuffer	RPMI-1640 (PAA) 0,4 mg/ml Liberase DL 0,02 mg/ml DNase I
Zellkulturmedium für T-Zellen	RPMI-1640 (PAA) 10 % FBS (inaktiviert, v/v)

100 U/ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin
500 mM β -Mercaptoethanol

Zellkulturmedium für DC	RPMI-1640 (PAA) mit Glutamin 5 % FBS (inaktiviert, v/v) 10 mM Hepes 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 500 mM β -Mercaptoethanol 25 ng/ml GMCSF
-------------------------	---

5.1.5 Verbrauchsmaterialien

Folgende Verbrauchsmaterialien wurden benutzt:

Einmalspritzen 0,3 mm x 12mm	Braun, Melsungen, Deutschland
Plastik-Petrischalen	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Reaktionsgefäß 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsrörchen 5 ml (FACS)	BD, Franklin Lakes, NJ USA
Reaktionsgefäß 15 ml und 50 ml	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatten	Nunc, Dänemark

Sonstige Zellkulturmaterialien und -plastikwaren wurden von den Firmen Falcon, Becton Dickinson (Franklin Labs. NJ, USA), Nunc (Wiesbaden) und Greiner (Frickenhausen) erworben.

5.1.6 Proteine und Peptide

Die Peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ (pOVA257-264) aus Hühner-Ovalbumin, Peptid GP33 aus Glycoprotein 1 von LCMV und die mCMV Peptide M45₉₈₅₋₉₉₃ bzw das Peptid m139₄₁₉₋₄₂₆ wurden von der Firma NeoMPS (Strasburg, Frankreich) synthetisiert und bezogen.

5.1.7 Virale Vektoren

Die replikations-defizienten, rekombinanten Adenovektoren rAd-GP33, rAd-OVA und rAd-GFP wurden im Labor von Florian Kreppel (Universität Ulm, Deutschland) hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Hierbei handelt es sich um den humanen Serotyp 5 mit einer E1 Deletion. Die Expression der Modelantigene erfolgt unter einem hCMV Promotor.

LCMV WE (Dutko et al., 1983) wurde freundlicherweise von David Vöhringer (Universität Erlangen, Deutschland) bereit gestellt.

Der replikations-defiziente und rekombinante Vaccinia- Vektor V-331 VVG2 (Vacc- full) wurde freundlicherweise von Daniel Pinschewer (Universität Genf, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Vacc- full exprimiert das gesamte Glykoprotein aus LCMV.

Das Virus mCMV-wt wurde im Labor von Zsolt Ruzsics (Max von Pettenkofer Institut München, Deutschland) hergestellt.

5.1.8 Mausstämme

Alle Mäuse wurden im Tierstall des Instituts für Immunologie in München gehalten. Nachfolgende Mäuse wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

C57BL/6

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

DC-MHCI (K14β2mxCD11c-MHCI)

Bei diesem Stamm handelt es sich um eine Kreuzung aus CD11c-MHCI und K14-β2m. In K14-β2m Mäusen wird β2m nur unter der Kontrolle des K14-Promotors exprimiert ($\beta 2m^{-/-}$ -Hintergrund). Dies führt zur selektiven Expression von MHC-I auf kortikalen Thymusepithelzellen (cTEC) (Carbone et al., 1998), während alle anderen Zellen negativ für MHC-I sind. Diese Maus verfügt über die Fähigkeit der positiven, jedoch nicht der negativen Thymusselektion von CD8-T-Zellen. CD11c-MHCI Mäuse wurden ebenfalls im genetischen $\beta 2m^{-/-}$ -Hintergrund generiert und β2m wurde unter der Kontrolle des CD11c-Promotors

exprimiert. Dies hat eine funktionelle MHC-I Expression selektiv auf DC zur Folge, wohingegen MHC-I auf allen anderen Zellen aufgrund des $\beta 2m^{-/-}$ Hintergrundes nicht exprimiert wird (Kurts et al., 2001). Durch Abwesenheit der positiven Thymusselektion werden keine endogenen CD8 T-Zellen generiert. Die Kreuzung der CD11c-MHCI Mäuse mit den K14- $\beta 2m$ Mäusen, führt zur Wiederherstellung der funktionellen positiven sowie der negativen Thymusselektion von CD8 T-Zellen, da hier kortikale Thymusepithelzellen und DC MHC-I exprimieren.

P14

Dieser Mausstamm ist transgen für einen TCR, der das Epitop GP33 aus GP 1 von LCMV im Kontext von MHC-I D^b erkennt (Brandle et al., 1995; Pircher et al., 1989).

Δ -DC

Um diesen Mausstamm zu generieren wurden CD11c-Cre Mäuse, die die Cre Rekombinase selektiv in CD11c⁺ Zellen exprimieren (Caton et al., 2007) mit einem Stamm verpaart, der das DTA unter der Kontrolle einer LoxP-flankierten Neomycin resistenten Kassette des ROSA26-Locus exprimiert. Dies hat die Expression von DTA und den konstitutiven Verlust von konventionellen DC, pDC und Langerhanszellen zur Folge (Ohnmacht et al., 2009).

CD11c-DTR

Dieser Mausstamm trägt ein Transgen, das ein humanes DT Rezeptor Fusionsprotein unter der Kontrolle des murinen CD11c Promoters exprimiert. Murine Zellen sind im Gegensatz zu humanen Zellen nicht sensitiv für das Diphterie Toxin. Die Zytotoxizität dieses Toxins ist abhängig von rezeptorvermittelter Endozytose und führt zur Apoptose in den betreffenden Zellen. Somit führt die Gabe des Toxins in diesem transgenen Mausstamm zur selektiven Depletion CD11c⁺ Zellen (Jung et al., 2002).

5.2 Methoden

5.2.1 Adoptiver Zelltransfer

Diese Methode ermöglicht es, das Verhalten antigenspezifischer T-Zellen *in vivo* zu untersuchen. In nicht immunisierten Mäusen ist die Anzahl an antigenspezifischen T-Zellen zu gering, um mit Antikörpern nachgewiesen werden zu können. Durch den Transfer von T-Zellen in syngene Rezipienten entsteht eine Zellpopulation in den Empfängertieren, die groß genug ist, um zum Beispiel mittels Durchflusszytometrie detektiert zu werden. Für den adoptiven Zelltransfer wurden Einzelzellsuspensionen aus Milzen von P14-TCR transgenen Mäusen hergestellt. Mittels ACK-Puffer wurden die Erythrozyten lysiert und anschließend die T-Zellen durch negative Selektion (MACS) isoliert. Um die Reinheit der T-Zell-Fraktion zu bestimmen wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Direkt vor der Injektion in syngene, gleichgeschlechtliche Mäuse, wurden die Zellen durch ein Nylonnetz (Reichert Chemie Technik, Porengröße 51µm) filtriert, um Zellaggregate zu vermeiden. Die transferierten T-Zellen wurden durch Färbung mit dem kongenen Marker CD90.1 und anti-CD8-Antikörper detektiert.

5.2.2 Blut und Organentnahme

A) Isolation von Lymphozyten aus peripherem Blut

Hierzu wurden die Mäuse vor der Blutentnahme unter einer Infrarotlampe erwärmt, wodurch sich die Blutgefäße erweitern und die Durchblutung gefördert wird. Durch einen Schnitt an der Schwanzvene wurde den Tieren etwa drei bis fünf Tropfen Blut abgenommen (ca. 100-200µl) und direkt mit 50µl Heparin-Natrium (2500 I.E./5 ml, Ratiopharm, Ulm, Deutschland) gemischt, um einer Blutgerinnung vorzubeugen. Daraufhin wurden 50µl Blut in ein FACS-Röhrchen überführt und mit den gewünschten Antikörpern gefärbt. Im Anschluss erfolgte eine Erythrozytenlyse mittels 2 ml BD Pharm Lyse™ Puffer (BD Pharmingen) für 15 min bei

Raumtemperatur. Anschließend wurden die Proben einmal mit FACS-Puffer gewaschen und dann bis zur Analyse am Durchflusszytometer bei 4°C aufbewahrt.

B) Organentnahme und Herstellung einer Einzelzellsuspension

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

Milz

Die Milz wurde mit einer feinen Schere herausgeschnitten und bis zur weiteren Verwendung je nach Analyse entweder in RPMI 1640 Medium oder MACS Puffer auf Eis gelagert. Anschließend wurde die Milz zur Herstellung einer Einzelzellsuspension zwischen zwei Gazetstückchen (Franz Eckert GmbH, Waldkirch, Deutschland, Porengröße 100 µm) mit dem Stempel einer 1 ml Injektionsspritze (Omnifix, Braun) zerrieben. Die Zellsuspension wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 300 g und 4°C für fünf Minuten zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurden die Erythrozyten lysiert und die Zellen anschließend im gewünschten Medium oder Puffer aufgenommen. Für die bessere Analyse dendritischer Zellen aus der Milz, wurde das Organ vor dem Zerreiben in Verdaupuffer inkubiert. Dazu wurden 2 ml des Puffers mit einer 5 ml Spritze (BD Discardit™ II) an verschiedenen Stellen in das Organ injiziert und anschließend 20 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Organ mittels Cell Strainer (BD Falcon™, Porengröße 100 µm) zerrieben und dann bei 300 g für 5 min bei 4°C abzentrifugiert.

Leber und Lunge

Zunächst wurde die Aorta durchtrennt und das austretende Blut mit Zellstoff aufgenommen. Dies erleichtert die nachfolgende Spülung der Organe mit PBS-Heparin, um die Blutlymphozyten zu entfernen. Um die Gewebe aufzuschließen wurde das gleiche Verdauprotokoll wie bei der Milz durchgeführt und schließlich wurden die Erythrozyten lysiert. Die Einzelzellsuspensionen wurden im gewünschten Medium aufgenommen.

Lymphknoten

Die zervikalen, brachialen, axillären und inguinalen Lymphknoten wurden mittels feinen Pipetten entnommen und die weitere Behandlung erfolgte wie für die Milz beschrieben, wobei eine Erythrozytenlyse mittels ACK nicht nötig ist.

Knochenmark

Zur Isolierung von Knochenmark wurden die Ober- und Unterschenkel entnommen, von einander getrennt und mit Hilfe eines Tuches (Kimberly-Clark Professional, Carl Roth, Karlsruhe) von Muskeln und Sehnen befreit. Die Knochen wurden dann in einen Mörser gegeben, kurz mit 70%igem Ethanol desinfiziert und schließlich in RPMI-1640 Medium zerrieben. Das Knochenmark wurde aus dem Überstand isoliert und über einen Cell Strainer filtriert. Anschließend wurde eine Erythrozytenlyse durchgeführt. In einer Petrischale wurden 1×10^7 Zellen in 10 ml DC-Medium für fünf bis sieben Tage kultiviert um eine BMDC Kultur (*bone marrow derived dendritic cells*) zu erhalten.

Erythrozytenlyse

Zur Lyse der Erythrozyten wurden die Zellpellets in 5 ml ACK-Puffer suspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Erythrozyten fehlt eine Natrium-Kalium Pumpe, demnach können einströmende Ionen nicht aus der Zelle befördert werden. Um den osmotischen Druck auszugleichen, strömt Wasser in die Zelle und bringt diese zum Platzen. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension mit 5 ml FACS-Puffer verdünnt und bei 300 g und 4°C für 5 min zentrifugiert und anschließend der Überstand abgekippt. Das Pellet wurde je nach Analyse in Puffer oder Medium resuspendiert und auf Eis gelagert.

Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahlen wurden mit dem Coulter Counter Z2 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA) bestimmt. Das Zählprinzip beruht auf der messbaren Veränderung des elektrischen Widerstandes, der von einer Zelle ausgelöst wird, die in einer elektrisch-leitfähigen Flüssigkeit suspendiert wird und eine Kapillaröffnung zwischen zwei Elektroden passiert. Die Anzahl der Impulse gibt die Zahl der aufgenommenen Zellen wieder und die Höhe des ausgelösten elektrischen Impulses ist proportional zum Volumen der Zelle. Durch diese Methode lassen sich Zellen in sehr engen Größenverteilungen zählen. Die Zugabe von Zap-

O-Globin (Beckman Coulter, Inc, Fullerton, CA, USA) erlaubt die Unterscheidung lebender Zellen von toten Zellen und Erythrozyten.

Für eine Messung wurden 10 ml Isoton II Lösung (Beckman Coulter) mit 10 μ l Zellsuspension und 2 μ l Zap-O-Globin vermischt und im Coulter Counter Z2 analysiert.

5.2.3 Durchflusszytometrie (FACS Analyse)

Mit einem FACS Gerät (FACS) lässt sich die relative Größe, Granularität und die relative Fluoreszenzintensität einer Zelle bestimmen. Dazu werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom zu einem Laser geleitet, wobei Licht beim Auftreffen auf die Zelle gestreut wird. Das Vorwärtsstreulicht gibt Auskunft über die Größe einer Zelle und das Seitwärtsstreulicht ist das Maß für die Granularität einer Zelle. Durch diese beiden Parameter lassen sich zum einen tote Zellen durch ihre geringere Größe und zum anderen MΦ sowie Granulozyten durch ihre stärkere Granularität von der Lymphozytenpopulation abgrenzen. Die fluoreszenzmarkierten Antikörper, mit denen die Zellen markiert wurden, absorbieren Licht einer spezifischen Wellenlänge und emittieren Licht einer höheren Wellenlänge. Sogenannte *Photomultiplier* wandeln das emittierte Licht in elektronische Signale um und geben somit Auskunft über die Anzahl fluoreszenzmarkierter Zellen sowie deren Fluoreszenzintensität. Die interessierende Zellpopulation kann bei der Analyse durch Eingrenzen der entsprechende Region genauer untersucht werden. Übliche Darstellungsweisen sind das Histogramm, bei dem nur eine Fluoreszenz dargestellt wird oder das Punktwolkendiagramm (Dot plot) bei dem zwei Fluoreszenzen gegeneinander dargestellt werden.

Die Messungen erfolgten an einem FACSCalibur- oder an einem FACSCantoII-Durchflusszytometer (BD, Franklin Lakes, NJ, USA). Die Datenaufnahme erfolgte mit CellQuest Software, Version 3.4 bzw. BD FACSDiva Software, Version 2.2 (Becton, Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, USA). Die FlowJo-Software (Tree-star, Ashland, OR, USA) wurde für die Datenanalyse verwendet.

Färbung von Lymphozyten mit fluorochrommarkierten Antikörpern

In einem 5 ml FACS-Röhrchen wurden 50-100 μ l der Zellsuspension mit dem gleichen Volumen einer doppelkonzentrierten Antikörperlösung in PBS vermischt und 20 min auf Eis

inkubiert. Daraufhin wurden ungebundene Antikörper durch einmaliges Waschen mit FACS-Puffer entfernt. Falls nötig schloss sich ein zweiter Färbeschritt mit einem sekundären Antikörper oder Reagenz wie zum Beispiel Streptavidin an. Nach dem letzten Waschschritt verblieben ca. 200 µl Zellsuspension im FACS-Röhrchen, das bis zur Analyse lichtgeschützt auf Eis gelagert wurde.

Multimerfärbung

Endogene, polyklonale T-Zell-Populationen, die während einer Immunantwort aktiviert werden und expandieren, besitzen ein diverses TCR-Repertoire. Mit Hilfe ihres natürlichen Liganden, dem MHC:Peptid-Komplex, können epitopspezifische T-Zellen nachgewiesen werden. Die Kopplung dieses Komplexes an ein Fluorochrom ermöglicht die Quantifizierung und Isolierung der antigenspezifischen T-Zellen nach Bindung der löslichen MHC-Komplexe *ex vivo*. In ihrer monomeren Form haben MHC:Peptid-Komplexe eine hohe Dissoziationsrate vom TCR. Die Multimerisierung dieser Komplexe zu Tetrameren oder Multimeren erhöht ihre Avidität (Altman et al., 1996).

Für die Multimerfärbung wurden 3 µl biotinyliertes Multimer pro Probe eingesetzt und bei 4°C für 20 min inkubiert. Im Anschluss wurde einmal mit FACS-Puffer gewaschen und dann 5 µl des fluorochromgekoppelten Sekundärantikörpers zugegeben. Es folgte wieder eine 20 minütige Inkubation bei 4°C im Dunkeln und anschließend wurden die Proben mit FACS-Puffer gewaschen und dann bis zur Analyse im Kühlschrank gelagert.

Im Fall der direktmarkierten Multimere wurde 3 µl Multimer pro Probe eingesetzt und bei RT für 30 min inkubiert. Danach wurde einmal mit FACS-Puffer gewaschen und es folgte eine Antikörperfärbung.

Intrazelluläre Zytokinfärbung in T-Zellen *ex vivo*

Die Zytokinproduktion von T-Zellen lässt sich nachweisen, indem diese nach der Isolierung *in vitro* restimuliert werden. Jedoch werden dabei keine naiven T-Zellen aktiviert, sondern nur bereits voraktivierte Zellen zur Zytokinproduktion angeregt. Um Zytokine in einer Zelle anzuhäufen und damit nachweisen zu können, muss die Zytokinsekretion mittels Brefeldin A (BD, Franklin Lakes, NJ USA) inhibiert werden. Damit die Antikörper für die intrazelluläre Zytokinfärbung in die Zelle eindringen können, müssen die Zellwände permeabilisiert werden. Um nach der Permeabilisierung der Zellwände ein Auslaufen und Absterben der Zellen zu vermeiden, werden diese mittels Paraformaldehyd (*PFA*) fixiert.

Eine Einzelzellsuspension von 2×10^6 Milzzellen aus einer immunisierten Maus wurde in Zellkulturmedium mit 1 µg/ml Peptid und anti-CD107a bei 37°C und 5% CO₂ in einer 96-

Lochplatte inkubiert, nach einer Stunde wurde 1 µl Brefeldin A/ml hinzupipettiert und weitere drei Stunden inkubiert. Danach wurden die Zellen für CD8 und mit lebend/Tod Farbstoff gefärbt. Anschließend wurden die Zellen mittels Cytofix/Cytoperm (BD, Franklin Lakes, NJ USA) permeabilisiert und eine intrazelluläre Färbung schloss sich an. Bis zur Analyse am FACS wurden die Zellen im Kühlschrank aufbewahrt.

5.2.4 Immunisierung

Diphtherie Toxin

Zur Depletion CD11c⁺ Zellen, wie zum Beispiel DC wurden den CD11c-DTR Mäusen 100 ng Diphtherie Toxin in PBS i.p. verabreicht.

Lösliche Peptide

Als immunologisches Agens wurde LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) verwendet und dieses zusammen mit dem entsprechenden Peptid i.v. verabreicht. Hierzu wurden pro Maus 20 µg LPS und 10 µg Peptid gemischt und in PBS injiziert.

Immunisierung mit rekombinanten Viren (rAd-GP33, rAd-OVA, rAd-GFP, Vaccinia)

Alle Viren wurden auf Eis aufgetaut und dort bis zur Injektion gelagert.

Die Viren rAd-GP33, rAd-OVA sowie rAd-GFP wurden mit PBS bis zur gewünschten Konzentration von 1×10^9 vp (*Viruspartikel*)/Maus verdünnt. Zur Immunisierung wurden 200 µl in die Schwanzvene injiziert, dies entsprach bei Vaccinia 2×10^6 pfu pro Maus.

Immunisierung mit nicht-rekombinanten Viren (LCMV-WE, mCMV-wt)

Für die Immunisierung wurde das jeweilige Virus auf Eis aufgetaut und im Fall von mCMV-wt wurde das Virus bis zur gewünschten Konzentration von 2×10^6 pfu / Maus mit PBS verdünnt und dann i.p. injiziert. Im Fall von LCMV-WE wurden 5×10^4 pfu pro Maus intravenös verabreicht.

5.2.5 CFSE Färbung

Die Markierung mit Carboxyfluorescein-Succinimidyl Esters (CFSE) ermöglicht die Analyse von Zellteilung *in vivo* und *in vitro*. Der Farbstoff dringt passiv in die Zellen ein und bindet an Aminogruppen zellulärer Proteine der Zellmembran und des Zytosols. Bei jeder Zellteilung wird der Farbstoff zu gleichen Teilen an die Tochterzellen weitergegeben, die dann somit nur noch die Hälfte der ursprünglichen Fluoreszenzintensität besitzen. Anhand dieser abnehmenden Intensität lässt sich jede nachfolgende Generation einer proliferierenden Zellpopulation identifizieren.

Zur CFSE Markierung wurden Einzelzellsuspensionen aus der Milz hergestellt und die Erythrozyten mittels ACK-Puffer lysiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen um Reste von FBS aus der Lösung zu entfernen, da diese die CFSE-Färbung inhibieren würden. Anschließend wurden die Zellen mit $12 \mu\text{M}$ CFSE pro $1-50 \times 10^6$ Zellen 10 min bei 37°C 5% CO_2 inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml reinem FBS gestoppt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für die Injektion in PBS bzw. für *in vitro* Versuche in Medium suspendiert.

5.2.6 *In vivo* Zytotoxizitätstest

Mit Hilfe dieser Methode lässt sich die zytotoxische Effektorfunktion von CD8-T-Zellen *in vivo* nachweisen. Dabei eliminieren antigenspezifische CD8-T-Zellen selektiv peptidbeladene, CFSE markierte Milzzellen. Als interne Referenz wurden unbeladene Milzzellen mit einer geringeren Menge an CFSE markiert, um sie so durchflusszytometrisch von der beladenen Population unterscheiden zu können. Zunächst wurde eine Einzelzellsuspension aus der Milz hergestellt und die Erythrozyten lysiert. Schließlich wurden die Zellen in Zellkulturmedium aufgenommen und in zwei gleich große Populationen aufgeteilt und für eine Stunde bei 37°C und 5 % CO_2 mit Peptid (GP33, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder ohne inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und dann mit CFSE, wie unter Punkt 5.2.5 beschrieben gefärbt, wobei die peptidbeladene Population mit einer hohen CFSE Konzentration ($2,5 \mu\text{M}$) ($\text{CFSE}^{\text{high}}$) und die unbeladenen Zellen mit einer niedrigen CFSE Konzentration ($0,5 \mu\text{M}$) (CFSE^{low}) markiert wurden. Vor der Injektion wurden die beiden

Populationen im Verhältnis 1:1 gemischt und pro Maus wurden 1×10^7 Zellen injiziert. Die Zellen wurden in syngene Mäuse transferiert, die acht Tage vorher mit rAd-GP33 immunisiert worden waren. Nach vier bis fünf Stunden wurden die Mäuse getötet und die Milzen entnommen. Die Milzzellen wurden ohne weitere Färbung durchflusszytometrisch analysiert und die beiden Populationen wurden durch ihre unterschiedlichen CFSE-Fluoreszenzintensitäten detektiert.

Die spezifische Lyse wurde anhand des Verhältnisses CFSE^{low} zu CFSE^{high} bestimmt und nach folgender Formel berechnet.

Verhältnis beider Populationen zueinander:

$$\text{Ratio (R)} = (\text{Protzentsatz CFSE}^{\text{low}} / \text{Protzentsatz CFSE}^{\text{high}})$$

Prozentsatz der spezifischen Lyse (PSL):

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

5.2.7 Magnetische Zellseparation

Die magnetische Zellseparation (MACS, Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach) dient der Isolation von Zellen mit Antikörpern, welche an paramagnetische Partikel (Microbeads) gekoppelt sind. Mit Hilfe einer Säule, die in ein starkes Magnetfeld platziert wird, werden die magnetisch markierten Zellen in der Säule zurückgehalten und können später eluiert werden, während die nicht markierten Zellen ungehindert passieren können. Dies hat zur Folge, dass zwei Arten der Separation durchgeführt werden können. Bei der positiven Isolierung wird die gewünschte Zellpopulation mit dem Antikörper markiert und dadurch auf der Säule zurückgehalten. Für die negative Isolation hingegen werden alle unerwünschten Zellen markiert, so dass sich nur die gewünschte Zellpopulation im Durchfluss befindet. In dieser Arbeit kamen beide Isolierungsstrategien zum Einsatz. P14- bzw. OTI-Zellen wurden mittels negativer Selektion mit dem CD8⁺T-Zellisolationskit aufgereinigt, wohingegen dendritische Zellen durch CD11c-Microbeads positiv isoliert wurden. Einzelzellsuspensionen aus der Milz wurden nach der Lyse der Erythrozyten, mit der vom Hersteller angegebenen Menge an Antikörper, Microbeads und MACS Puffer bei 4°C inkubiert und anschließend mit dem 20-fachen Volumen an Puffer gewaschen. Die Zellen wurden über einen Filter auf die LS⁺-Säulen gegeben um Zellaggregate zu vermeiden. Die Säulen wurden dreimal mit je 3 ml MACS Puffer gewaschen und der Durchfluss wurde gesammelt. Die auf der Säule

zurückgehaltenen Zellen wurden isoliert, indem die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die Zellpopulation durch 5 ml Puffer eluiert wurde. Um bei der Aufreinigung dendritischer Zellen eine möglichst hohe Reinheit zu erzielen, war es nötig die Zellen zweimal durch das magnetische Feld passieren zu lassen, wobei für die zweite Runde frische Säulen verwendet wurden.

5.2.8 Zellproliferation

In vivo Zellproliferation

P14-T-Zellen wurden mittels CD8⁺T-Zellisolationskit aufgereinigt und mit CFSE gefärbt. Nach dem waschen wurden die Zellen in PBS aufgenommen und jeder Maus wurden 2×10^6 Zellen intravenös verabreicht. Die Tiere wurden am gleichen Tag entweder mit 1×10^9 vp rAd-GP33 oder einer Mischung aus 20 µg LPS und 10 µg Peptid GP33 immunisiert. An Tag drei und sechs nach Immunisierung wurden die Mäuse getötet und ihre Milzen isoliert. Nach der Erythrozytenlyse erfolgte eine Färbung der Milzzellen mit anti-CD8- und anti-CD90.1-Antikörper und eine Messung am Durchflusszytometer. Die CFSE-Verdünnung gab Aufschluss über die Proliferation der Zellen.

Ex vivo Zellproliferation

Für diesen Ansatz wurden aus Milzzellen dendritische Zellen durch CD11c-Microbeads isoliert und 1×10^6 DC/ml wurden über Nacht in einer 12-Lochplatte mit 100 ng/ml LPS stimuliert um so das Ausfreien der Zellen zu gewährleisten. Am nächsten Morgen wurden diese DC für drei Stunden mit Peptid GP33 oder pOVA257-264 beladen und danach dreimal mit PBS gewaschen. C57BL/6 bzw. DC-MHCI Mäuse wurden mit 1×10^{10} vp rAd-GP33 bzw. rAd-OVA immunisiert und 24 Stunden später wurden die Milzen entnommen und die dendritischen Zellen durch CD11c-Microbeads aufgereinigt. Sowohl die peptidbeladenen DC als auch die dendritischen Zellen aus den immunisierten Mäusen wurden mit P14- respektive OT-I-Zellen, die mittels CD8⁺T-Zellisolationskit aufgereinigt worden waren, in einer 96-Lochplatte kultiviert. Dabei wurden jeweils $2,5 \times 10^4$ DC und 5×10^4 T-Zellen in 200 µl Zellkulturmedium unter Zugabe von 17×10^3 U/ml IL-2 (ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland) kultiviert. Um die Zellen an Tag drei bzw. vier nach Kultivierung am FACS auszählen zu können, wurde eine Suspension von Polystyrol Mikropartikeln (BDTM

CompBeads negative control (FBS), San Diego, CA, USA) in PBS hergestellt, wobei die Partikel unter dem Mikroskop gezählt wurden. Zu jedem DC-/T-Zellansatz wurden dann 10 µl der CompBeads hinzupipettiert und anschließend wurden die Zellen mit Violet Fluorescent Reactive Dye gefärbt. Die Anzahl lebender Zellen pro Ansatz wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Anzahl der Zellen pro Ansatz} = \frac{(\text{Anzahl gezählter Zellen})(\text{Anzahl zugefügter CompBeads})}{\text{Anzahl gezählter CompBeads}}$$

5.2.9 Transduktion einer BMDC Kultur

Zur Transduktion einer BMDC Kultur mit rAd-GFP wurde Knochenmark wie unter 5.2.2 beschrieben entnommen und kultiviert. An Tag drei der Kultur wurden die Zellen mit einer MOI 6 (*multiplicity of infection*) transduziert. Dazu wurden die Zellen geerntet, gezählt und in Gegenwart von 4 µg/ml Protaminsulfat für zwei Stunden mit der entsprechenden Menge an Virus in einer 6-Lochplatte bei 32°C und 300 g zentrifugiert. Es schloss sich eine zwei stündige Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ an und schließlich wurden die Zellen mit PBS gewaschen in DC-Medium aufgenommen und wieder für weitere drei Tage in Kultur genommen. Die Zellen wurden schließlich durchflusszytometrisch analysiert.

5.2.10 Depletion von MΦ mittels Clodronat

Ein Tag vor der Immunisierung der Mäuse mit LCMV-WE wurden die MΦ durch die Gabe von Clodronat-gefüllten Liposomen (*ClodronateLiposomes.org*) depletiert. Dazu wurde den Mäusen 7 mg/ml dieser Liposomen injiziert oder als Kontrolle PBS gefüllte Liposomen. Phagozytierende Zellen wie MΦ nehmen diese Partikel auf, wobei eine bestimmte Konzentration an Clodronat schließlich zum Zelltod führt. In der mit PBS-gefüllten Liposomen behandelten Kontrollgruppe hingegen kommt es nicht zur Depletion der MΦ. An Tag acht nach Immunisierung mit LCMV wurde mittels Multimere spezifische CD8 T-Zellen am Durchflusszytometer analysiert.

5.2.11 Histologie (Immunfluoreszenz)

A) Azeton fixierte Organe

Die Organe wurden direkt nach der Entnahme in Schälchen mit *Tissue Tek* (Sakura, Zoeterwoude, NL) eingebettet und in Flüssigstickstoff eingefroren. Die Schnitte, in einer Dicke von 5-7 µm, wurden an einem Kryotom (Leica Microsystems, Wetzlar) angefertigt, anschließend für 20 min bei -20°C in Azeton fixiert und über Nacht im Dunkeln getrocknet. Die Schnitte können auf -80°C gelagert werden. Vor der Färbung müssen sie auf Raumtemperatur gebracht werden und für 15 min in PBS, 0,25% BSA rehydriert werden. Um unspezifische Färbungen zu minimieren, wurden die Schnitte anschließend für 15 min in PBS, 0,25% BSA, 10% normalem Mausserum inkubiert. Die Schnitte wurden in einer feuchten Kammer, im Dunkeln bei Raumtemperatur für 30 min gefärbt. Nach den Färbeschritten wurde mit PBS, 0,25% BSA gewaschen und die Schnitte schließlich mit Fluoromount G (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA) eingedeckt.

B) PFA fixierte Organe zur Detektion von GFP

Die Mäuse wurden 48 Stunden vor Entnahme der Organe mit rAd-GFP immunisiert. Die entnommen Milzen und Lymphknoten wurden direkt in 2% PFA für zwei Stunden bei Raumtemperatur fixiert und anschließend in 50 ml PBS über Nacht gewaschen. Diese Art der Fixierung ist nötig, um GFP durch das Schneiden nicht zu verlieren. Anschließend wurden die Organe in Schälchen mit *Tissue Tek* eingebettet und in Flüssigstickstoff eingefroren. Zur Detektion von GFP ist es am besten die Schnitte ein Tag vor der Färbung anzufertigen und sie dann über Nacht trocknen zu lassen. Anschließend wurden die Objektträger für eine Stunde in PBS, 1% H₂O₂, 0,1% NaN₃ inkubiert. Zur Minimierung unspezifischer Hintergrundsignale wurde eine 1:100 Verdünnung von Fc-block in einer Lösung aus TNB (TSA-Kit, Perkin Elmer, Waltham USA), 1% Maus- und 1% Rattenserum hergestellt. Davon wurden 100 µl auf jeden Schnitt pipettiert und diese dann in einer feuchten Kammer für 30 min inkubiert. Es schließt sich ein Waschschnitt mit PBS an und die Blockierung für jeweils 20 min zunächst mit Streptavidin Block (Vector labs, Burlingame, USA) und dann mit Biotin Block (Vector labs, Burlingame, USA). Die Amplifizierung des GFP Signals wurde mit dem *TSA signal amplification kit* (Perkin Elmer, Waltham USA) nach Herstellerangaben durchgeführt.

C) Mikroskopie

Die unter A und B beschriebenen Präparate wurden an einem Mikroskop (DMXA-RF8, Leica Microsystems) betrachtet, mit einer Kamera (Sensys CCD, Photometrics, Tucson, AZ, USA) aufgenommen und mit dem Programm Q-Fish (Leica Microsystems) analysiert. Für die Anpassung der Helligkeit und des Kontrastes an das Druckmedium wurden die Aufnahmen mit Photoshop, (Version CS 5,1 Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA) bearbeitet.

5.2.12 Statistik

Mittelwerte und Standardabweichungen wurden mit dem Programm Prism (Version 5,0b) berechnet.

6 Ergebnisse

6.1 Polyklonale CD8⁺ T-Zellantwort in DC-MHCI Mäusen

Neben dem MHC-I K^b restringierten Hühner Ovalbumin (OVA) Epitop OVA₂₅₇₋₂₆₄ ist auch das MHC-I D^b restringierte LCMV GP Epitop GP33 eines der am besten charakterisierten und am häufigsten verwendeten Modelantigene in der Immunologie.

In den letzten Jahren haben verschiedene Studien gezeigt, dass DC entscheidend sind für die Aktivierung GP33 spezifischer T-Zellen. So konnte zum Beispiel nach der Diphtherie Toxin vermittelten *in vivo* Depletion von DC (Jung et al., 2002) keine MHC-I D^b restringierte GP33 spezifische T-Zellantwort detektiert werden (Probst et al., 2005b).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein replikations-defizienter rekombinanter Adenovektor (rAd-GP33) (CompuVac, Florian Kreppel), der GP33 aus Glycoprotein 1 von LCMV exprimiert verwendet, um die GP33 spezifische T-Zellantwort in Mäusen (DC-MHCI) zu untersuchen, in denen MHC-I selektiv auf DC exprimiert wird und diese Zellen somit die einzigen APC sind die Antigen präsentieren können (Kurts et al., 2001). Wie bereits erwähnt, wurde die polyklonale CD8⁺ T-Zellantwort in diesen DC-MHCI Mäusen, bereits nach Immunisierung mit HSV-OVA untersucht (Gruber et al., 2010) und es konnte gezeigt werden, dass nach Immunisierung mit diesem Vektor sowohl die HSV Glykoprotein B (HSVgB)-spezifische, als auch die OVA-spezifische CD8 T-Zellantwort über einen Zeitraum von bis zu 60 Tagen nach Injektion fünf bis sieben mal höher war, als in C57BL/6 Mäusen.

Aufgrund dieser Resultate und der bereits erwähnten Studien in den DC depletierten Mäusen, waren die Ergebnisse nach der Immunisierung der DC-MHCI Mäuse mit rAd-OVA, das als Kontrolle diente bzw. rAd-GP33 überraschend. Sowohl in den Wildtyp-Mäusen als auch in den DC-MHCI Mäusen konnte eine Expansion OVA spezifischer T-Zellen nachgewiesen werden (*Abbildung 6.1 A*). Die OVA-spezifische T-Zellantwort war in den DC-MHCI Mäusen zwei bis dreimal höher als in C57BL/6 Mäusen. Dies ist in Einklang mit den zuvor erwähnten Daten zu rekombinantem HSV-1 (Gruber et al., 2010).

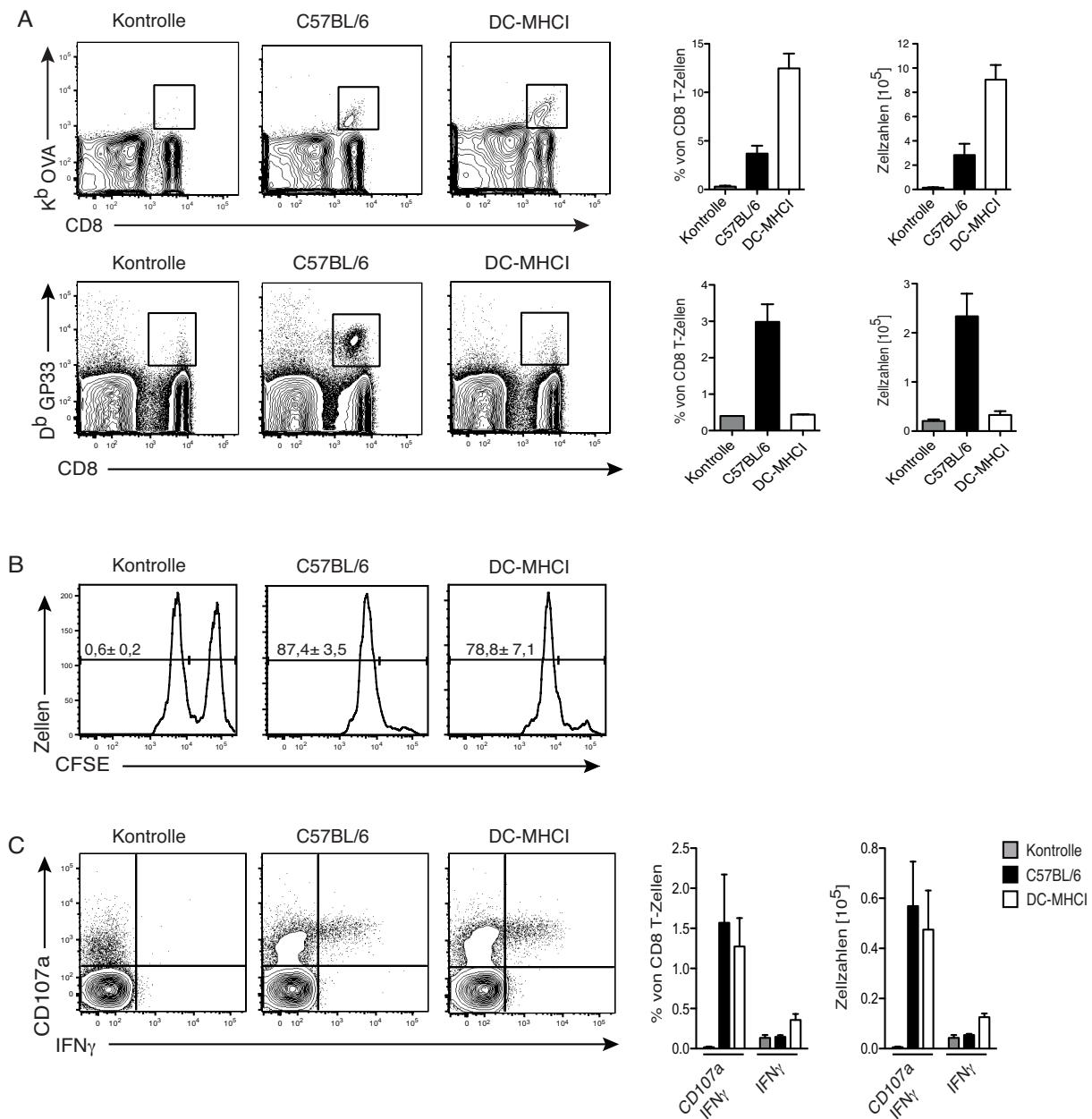


Abbildung 6.1: Polyklonale CD8⁺ T-Zellantwort (rAdOVA bzw.rAd-GP33):

(A) C57BL/6 und DC-MHCI Mäuse wurden mit 1×10^9 vp rAdOVA bzw. rAd-GP33 i.v. immunisiert und an Tag acht wurde mittels K^b OVA bzw. D^b GP33 spezifischem Multimer die Expansion der T-Zellen analysiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte C57BL/6 Mäuse. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von zwei bis vier Versuchen mit vergleichbarem Ergebnis, wobei jeweils pro Gruppe drei Tiere verwendet wurden. (B) Zum Nachweis zytotoxischer Aktivität *in vivo* wurden an Tag acht nach Immunisierung mit rAd-GP33, mit Peptid GP33 beladene Zielzellen in die Mäuse transferiert und ihre Abstoßung am FACS verfolgt. Der Prozentsatz an spezifischer Lyse wurde berechnet wie in *Material und Methoden* beschrieben. (C) C57BL/6 und DC-MHCI Mäuse wurden mit 1×10^9 vp rAdGP33 immunisiert und acht Tage später wurden die Milzen isoliert und die Splenozyten wurden mit dem Peptid GP33 für vier Stunden restimuliert. Im Anschluß erfolgte sowohl eine Färbung von CD8 und CD107a, sowie eine intrazelluläre Färbung für das Zytokin IFN γ . Der Nachweis der zytotoxischen Aktivität, sowie die Bestimmung der Zytokinproduktion wurde zweimal durchgeführt, mit je drei Tieren pro Gruppe (gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung).

Dagegen konnte nach Immunisierung mit rAd-GP33 nur in C57BL/6 Mäusen mittels D^b GP33 spezifischem Multimer die zu erwartende spezifische CD8⁺ T-Zellantwort detektiert werden. In den DC-MHCI Mäusen hingegen konnte keine Expansion D^b GP33 spezifischer T-Zellen nachgewiesen werden (*Abbildung 6.1 A*). Überraschenderweise konnten aber in den DC-MHCI Mäusen trotz ausbleibender Expansion der spezifischen T-Zellen Effektorfunktionen detektiert werden (*Abbildung 6.1 B und C*).

Für den Nachweis der zytotoxischen Aktivität, wurde acht Tage nach Immunisierung mit rAd-GP33 die Fähigkeit untersucht, antigenbeladene Zielzellen abtöten zu können. Dazu wurden in C57BL/6 und DC-MHCI Mäuse 1x10⁷ Milzzellen, die mit dem Peptid GP33 beladen worden waren, transferiert und die Abstoßung dieser Zellen am FACS analysiert. In nicht immunisierten Kontrollmäusen wird weder die unbeladene CFSE^{low} Zellfraktion, noch die beladenen CFSE^{high} Fraktion abgestoßen. In den immunisierten Tieren kam es sowohl in den Wildtyp-Mäusen als auch in den DC-MHCI Mäusen zu einer Abstoßung der beladenen Milzzellen (*Abbildung 6.1 B*). Ähnliche Befunde wie mit dem *in vivo* Zytotoxizitätsassay, ergaben sich nach der Restimulation von Milzzellen immunisierter Tiere *in vitro* mit Peptid GP33. Durch den Nachweis konnten in C57BL/6 und in DC-MHCI Tieren CD8 T-Zellen nachgewiesen werden, welche die gleichen Mengen an CD107a und IFN γ bzw. nur IFN γ produzieren (*Abbildung 6.1 C*). Offensichtlich besitzen die T-Zellen, deren Effektorfunktionen in den DC-MHCI Mäusen nachgewiesen werden konnten, nicht die MHC-I D^b Spezifität, da sie sonst, wie in den Wildtyp-Mäusen, durch das D^b Multimer detektierbar sein sollten. Für die hier beschriebene Diskrepanz, dass keine Expansion GP33 spezifischer T-Zellen, aber Effektorfunktionen in den DC-MHCI Mäusen nachweisbar waren, gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. Erstens könnte es sein, dass sich das endogene T-Zellrepertoire in den DC-MHCI Mäusen von dem der C57BL/6 Mäuse unterscheidet, dass also keine D^b GP33 spezifischen T-Zellen in den DC-MHCI Tieren generiert werden. Zweitens besteht die Möglichkeit, dass sich die spezifischen T-Zellen in den DC-MHCI Mäusen in anderen Organen als der Milz, die hier untersucht wurde, befinden. Es konnte gezeigt werden, dass β 2m als homig factor fungieren kann (Dunon et al., 1990), daher ist es denkbar, dass in diesen Mäusen die spezifischen T-Zellen nicht in die Milz wandern. Drittens könnte es sich auch um einen generellen Defekt in der Präsentation über MHC-I D^b in den DC-MHCI Mäusen handeln. Viertens könnte sich die hier beschriebene Diskrepanz dadurch erklären lassen, dass es zwei überlappende Epitope im GP 1 von LCMV gibt, die sich in ihrer

MHC-I Restriktion unterscheiden (Hudrisier et al., 1997). Um heraus zu finden, warum in den DC-MHCI Mäusen keine Expansion D^b GP33 spezifischer T-Zellen aber Effektorfunktionen detektiert werden konnten, wurden die angesprochenen Erklärungsmöglichkeiten in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht.

6.2 Monoklonale CD8⁺ T-Zellantwort in DC-MHCI Mäusen

Um zu untersuchen, ob das Ausbleiben einer GP33 spezifischen CD8 T-Zellantwort in den DC-MHCI Mäusen auf ein defektes oder lückenhaftes endogenes T-Zellrepertoire in diesen Tieren zurückzuführen ist, wurde ein adoptiver T-Zelltransfer durchgeführt, welcher die Frequenz der zu untersuchenden T-Zellen erhöht. Dazu wurden 5×10^5 CD8 T-Zellen aus P14 Mäusen in DC-MHCI und C57BL/6 Mäuse adoptiv transferiert. Durch Färbung des kongenen Markers CD90.1 konnten diese Zellen von den endogenen T-Zellen unterschieden werden. P14 Mäuse sind transgen für einen T-Zellrezeptor, der das Epitop GP33 im Kontext von MHC-I D^b erkennt. Am Tag nach dem adoptiven Transfer wurden die Mäuse mit 1×10^9 vp rAd-GP33 immunisiert und acht Tage später wurde die Expansion der P14 T-Zellen aus der Milz analysiert. In den C57BL/6 Mäusen kam es, wie zu erwarten, zu einer Proliferation der P14 T-Zellen, in den DC-MHCI Mäusen blieb eine Antwort aber erneut aus (*Abbildung 6.2*). Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass in den DC-MHCI Mäusen keine GP33 spezifischen T-Zellantworten induziert werden können. Auch die zur Verfügung gestellten spezifischen T-Zellen, um eine eventuelle Lücke im endogenen Repertoire der DC-MHCI Mäuse zu schließen, expandierten in diesen Mäusen nicht.

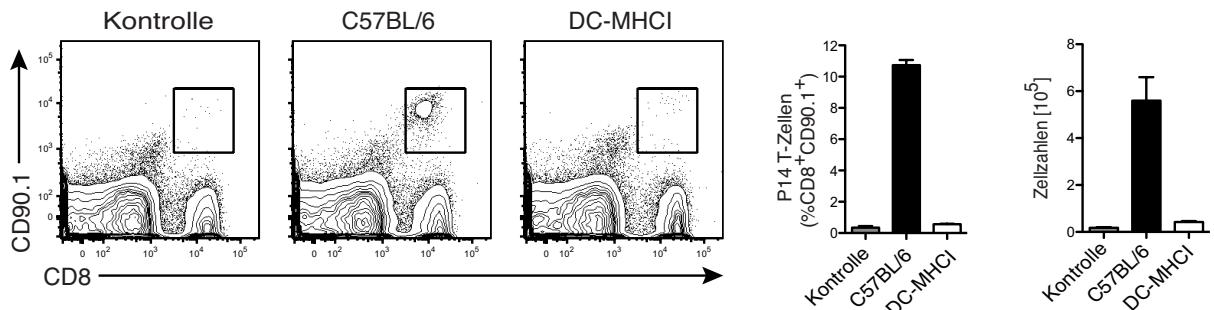


Abbildung 6.2: Monoklonale CD8⁺ T-Zellantwort (rAd-GP33)

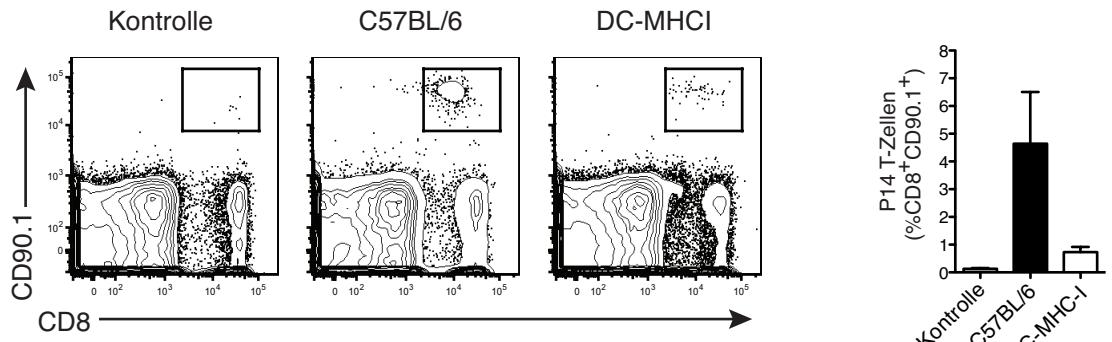
Adoptiver T-Zelltransfer von 5×10^5 P14 T-Zellen in C57BL/6 und DC-MHCI Mäuse. Ein Tag nach dem adoptiven Transfer wurden die Tiere mit 1×10^9 vp rAd-GP33 i.v. immunisiert. Die Analyse der Expansion der P14 T-Zellen aus der Milz erfolgte an Tag acht nach Immunisierung. Als Kontrolle dienten C57BL/6 Mäuse, denen P14 T-Zellen adoptiv transferiert wurden, die aber nicht immunisiert worden waren. Zu sehen ist ein repräsentatives Ergebnis von drei Experimenten mit vergleichbarem Ergebnis (dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von je drei Mäusen pro Gruppe).

6.3 Die Analyse der CD8 spezifischen T-Zellantwort in verschiedenen Organen

Bisher wurde die Expansion sowohl endogener CD8 T-Zellen als auch P14 T-Zellen nach Immunisierung der beiden Mausstämme nur in der Milz verfolgt. Um auszuschließen, dass in den DC-MHCI Mäusen keine Expansion nachgewiesen werden konnte, weil sich die Zellen eventuell in anderen Organen als der Milz befinden, wurden Lunge und Leber untersucht.

Hierzu wurden erneut 5×10^5 P14 T-Zellen in C57BL/6 und DC-MHCI Mäuse adoptiv transferiert und am nächsten Tag wurden die Mäuse mit 1×10^9 vp rAd-GP33 immunisiert. Die Expansion spezifischer T-Zellen wurde acht Tage später sowohl in der Leber als auch in der Lunge verfolgt. In C57BL/6 Mäusen konnte eine spezifische CD8 T-Zellantwort in beiden Organen detektiert werden, in DC-MHCI Mäusen hingegen kam es nur zu einer sehr ineffizienten Aktivierung spezifischer T-Zellen (Abbildung 6.3). Das Fehlen einer spezifischen CD8 T-Zellantwort in den DC-MHCI Mäusen lässt sich also nicht damit erklären, dass die Zellen in diesen Mäusen im Vergleich zu C57BL/6 in anderen Organen expandieren.

Lunge



Leber

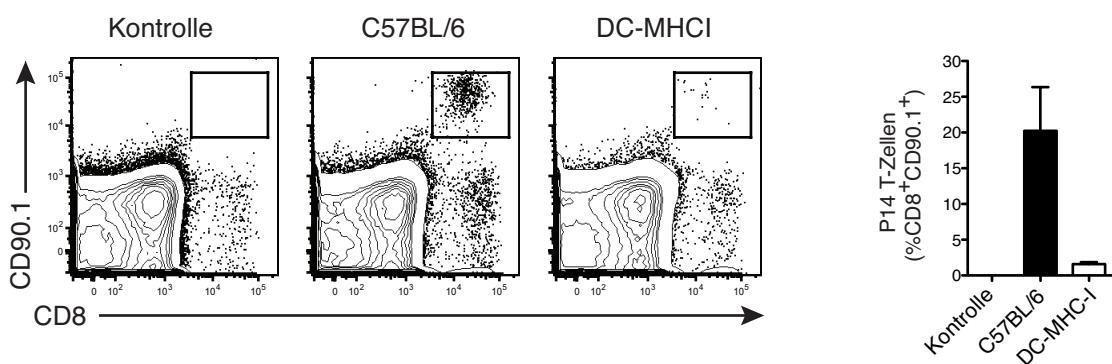


Abbildung 6.3: Monoklonale CD8⁺ T-Zellantwort (rAd-GP33) in Lunge und Leber

Adoptiver T-Zelltransfer von 5×10^5 P14 T-Zellen in C57BL/6 und DC-MHCI Mäuse. Die Immunisierung der Tiere mit 1×10^9 vp rAd-GP33 i.v. erfolgte am darauffolgenden Tag. Die Analyse der Expansion der P14 T-Zellen aus Lunge und Leber erfolgte an Tag acht nach Immunisierung. Als Kontrolle dienten C57BL/6 Mäuse, denen P14 T-Zellen adoptiv transferiert wurden, die aber nicht immunisiert worden waren. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von je drei Tieren pro Gruppe.

6.4 Die Präsentation über MHC-I D^b in DC-MHCI Mäusen

6.4.1 Die Präsentation des Peptid GP33 in DC-MHCI Mäusen

Bei der Analyse der DC-MHCI Mäuse mit dem rekombinanten HSV-1-Vektor (Gruber et al., 2005) wurde eine MHC-I K^b Antwort detektiert, da die Präsentation sowohl des Peptids SIEEFARL aus GP B des Virus als auch des OVA-Peptids SIINFEKL über MHC-I K^b erfolgt. Das Peptid GP33 aus GP 1 von LCMV wird aber über MHC-I D^b präsentiert. Es besteht also die Möglichkeit, dass die DC-MHCI Mäuse einen generellen Defekt in der D^b Präsentation haben und somit keine D^b GP33 spezifische Antwort generieren können. Um diese

Möglichkeit genauer untersuchen zu können, wurde den Mäusen nach adoptivem Transfer GP33 spezifischer T-Zellen am nächsten Tag LPS und Peptid GP33 verabreicht. LPS fungiert in diesem Versuch als Adjuvans zur Stimulierung der DC. Diese präsentieren das Peptid dann direkt über MHC-I D^b, eine Aufnahme und Prozessierung wie im Fall von Virus ist also nicht nötig.

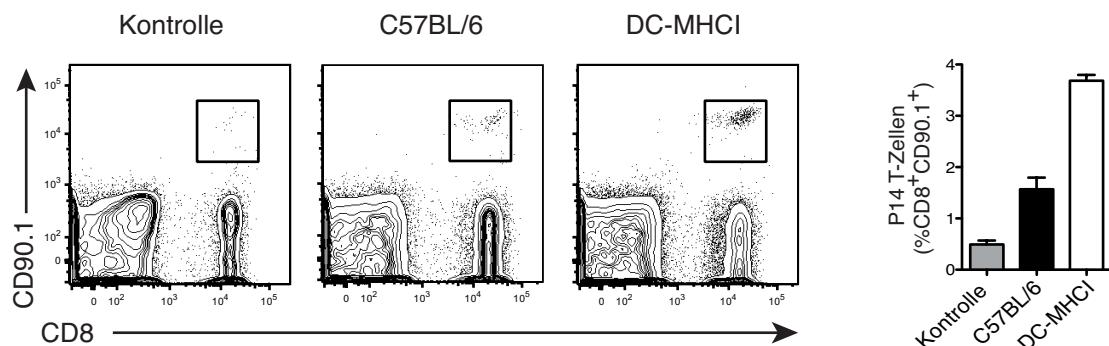


Abbildung 6.4: Monoklonale CD8⁺ T-Zellantwort (Peptid GP33)

Adoptiver T-Zelltransfer von 5×10^5 P14 T-Zellen in C57BL/6 und DC-MHCI Mäuse. Am nächsten Tag wurde den Tieren 20 µg LPS und 10 µg Peptid GP33 i.v. injiziert. An Tag drei nach Immunisierung erfolgte die Analyse der Expansion der P14 T-Zellen aus der Milz. Als Kontrolle dienten C57BL/6 Mäuse, denen P14 T-Zellen adoptiv transferiert wurden, die aber nicht immunisiert worden waren. Pro Gruppe wurden je drei Mäuse verwendet und gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung.

An Tag drei nach Immunisierung mit Peptid und LPS wurde die Expansion der P14 T-Zellen aus der Milz analysiert. Es konnte sowohl eine Proliferation der spezifischen T-Zellen in den C57BL/6 als auch in den DC-MHCI Mäusen nachgewiesen werden (*Abbildung 6.4*), wobei die Expansion der spezifischen T-Zellen in den DC-MHCI Mäusen höher ausfiel als in C57BL/6. Dies ist wieder in Einklang mit den bereits vorhandenen und erwähnten Daten zu rekombinantem HSV-1 (Gruber et al., 2010). Ein genereller Defekt in der Präsentation über MHC-I D^b scheint also in den DC-MHCI Tieren nicht vorzuliegen, da es sonst zu keiner Expansion der D^b GP33 spezifischen T-Zellen in den DC-MHCI Mäusen kommen würde.

6.4.2 *In vivo* Proliferation GP33 spezifischer T-Zellen

Das vorangegangene Experiment lässt den Schluss zu, dass es keinen generellen Defekt in der Präsentation über MHC-I D^b und der Aktivierung D^b GP33 spezifischer T-Zellen in DC-MHCI Mäusen gibt, solange das vorgefertigte Peptid zur Verfügung steht. Um dies zu

bestätigen, wurde die *in vivo* Proliferation nach Gabe des Peptids, als auch nach Immunisierung mit rAd-GP33 analysiert. Dazu wurden C57BL/6 und DC-MHCI Mäusen am gleichen Tag sowohl CFSE gefärbte P14 T-Zellen als auch LPS und Peptid GP33 oder rAd-GP33 injiziert. Drei Tage später wurde durchflusszytometrisch die Proliferation der T-Zellen aus der Milz anhand des CFSE Profils analysiert. In C57BL/6 Mäusen expandierten die spezifischen T-Zellen sowohl nach Injektion von LPS und Peptid, als auch nach Immunisierung mit rAd-GP33. Eine Proliferation der P14 T-Zellen in den DC-MHCI Tieren konnte hingegen nur nach Verabreichung des Peptids nachgewiesen werden (*Abbildung 6.5*). Dieses Ergebnis bestätigt die Vermutung, dass DC nur das vorgeformte Peptid GP33 präsentieren können, nicht aber das Epitop selbst generieren.

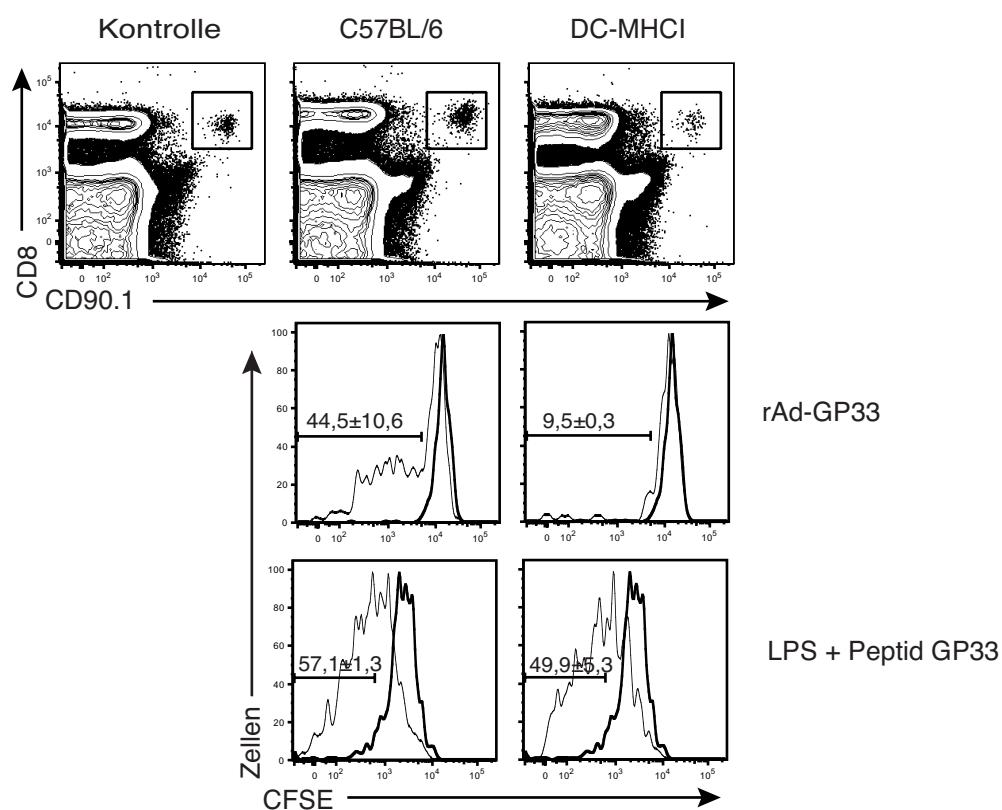


Abbildung 6.5: *In vivo* Proliferation GP33 spezifischer T-Zellen

C57BL/6 und DC-MHCI Mäusen wurden zeitgleich 2×10^6 CFSE gefärbte P14 T-Zellen in die eine Schwanzvene injiziert und in die andere Vene entweder 20 µg LPS und 10 µg Peptid GP33 oder 1×10^9 vp rAd-GP33. An Tag drei nach Immunisierung wurden die Milzen entnommen und die Expansion der spezifischen T-Zellen wurde anhand des CFSE Profils am Durchflusszytometer analysiert. Als Kontrolle dienten Tiere, denen ausschließlich T-Zellen adoptiv transferiert worden sind (dickere Linie). Zu sehen ist ein repräsentatives Experiment von drei mit jeweils zwei Tieren pro Gruppe (dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung).

6.4.3 Die Analyse der CD8 T-Zellantwort nach Immunisierung mit mCMV

Das murine Cytomegalovirus (mCMV) ist ein natürlich vorkommendes Pathogen von Labormäusen und es sind sowohl Epitope bekannt, die über MHC-I D^b als auch über MHC-I K^b präsentiert werden (Munks et al., 2006). Dies ermöglicht eine Analyse spezifischer CD8 T-Zellantworten der Präsentation über beide MHC-I Arten. Es wurden zwei verschiedene Epitope in einem Restimulationsassay untersucht. Das Epitop TVTGPCLL (m139) wird über MHC-I K^b und das Epitop HGIAASPI (M45) wird über MHC-I D^b präsentiert. C57BL/6 und DC-MHCI Mäuse wurden intraperitoneal (i.p.) mit mCMV immunisiert und die Fähigkeit zur Produktion von IFN γ wurde sieben Tage nach der Immunisierung in der Milz untersucht. Nach Restimulation mit den entsprechenden Peptiden für MHC-I D^b bzw. K^b konnten sowohl die CD8 T-Zellen aus den C57BL/6 Mäusen als auch aus den DC-MHCI Tieren IFN γ produzieren (Abbildung 6.6). Es können also in beiden Mausstämmen antigenspezifische T-Zellen mit Effektorfunktion generiert werden, wobei auch hier die Antwort in den DC-MHCI Mäusen wieder höher ausfiel als in C57BL/6. Dieses Ergebnis unterstützt die Befunde, dass DC in den DC-MHCI Mäusen generell in der Lage sind Virus zu prozessieren und über MHC-I D^b zu präsentieren.

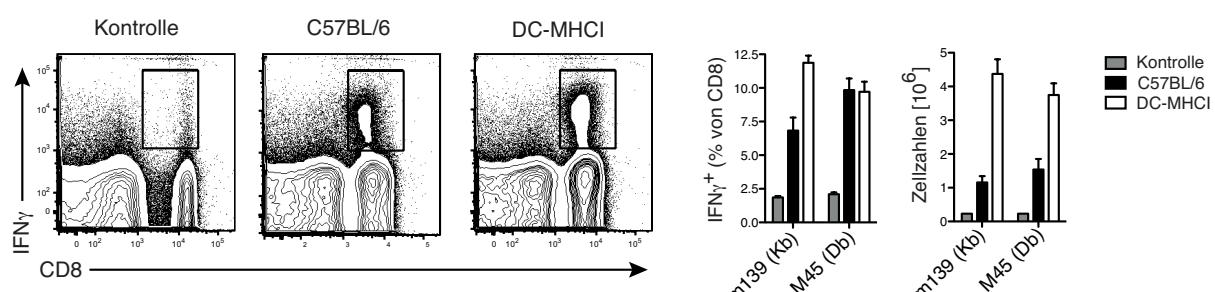


Abbildung 6.6: Effektorfunktion mCMV spezifischer T-Zellen

C57BL/6 und DC-MHCI Mäuse wurden mit 2×10^6 pfu mCMV i.p. immunisiert. Zur Analyse der IFN γ Produktion und damit der Effektorfunktion antigenspezifischer T-Zellen wurden an Tag sieben nach Immunisierung Milzzellen isoliert und mit den Peptiden m139 bzw. M45 *in vitro* für vier Stunden restimuliert. Es folgte eine extrazelluläre Färbung für CD8, sowie eine intrazelluläre für IFN γ . Dargestellt sind sowohl die Prozente CD8⁺ T-Zellen die IFN γ produzieren sowie die Zellzahlen. Pro Gruppe wurden drei Mäuse verwendet und die Mittelwerte \pm Standardabweichung sind gezeigt.

6.5 Das LCMV **K^b**-Epitop GP34

Wie bereits zuvor beschrieben, konnten in den DC-MHCI Mäusen trotz des Ausbleibens einer antigenspezifischen Expansion der T-Zellen Effektorfunktionen detektiert werden. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz in den DC-MHCI Mäusen liegt eventuell darin, dass es zwei überlappende Epitope im GP 1 von LCMV gibt. Hudrisier et al. (Hudrisier et al., 1997) konnten zeigen, dass das MHC-I D^b restriktierte GP1 Epitop GP33 aus der Signalsequenz von LCMV auch ein immunodominantes Epitop im Kontext von MHC-I K^b darstellt. Das Minimalepitop für MHC-I K^b GP34, ist nur eine Aminosäure kürzer, als das D^b Epitop GP33. Nachfolgend sind die beiden Peptide dargestellt:

KAVYNFATC	GP33 (gp ₃₃₋₄₁)	MHC-I D^b
AVYNFATC	GP34 (gp ₃₄₋₄₁)	MHC-I K^b

Um zu untersuchen, ob die DC in den DC-MHCI Mäusen in der Lage sind, dass K^b Epitop zu präsentieren und damit eine Expansion GP34 spezifischer T-Zellen zu bewerkstelligen, wurden Multimerfärbungen für K^b GP34 durchgeführt. Hierzu wurden Wildtyp-Mäuse und DC-MHCI Mäuse mit rAd-GP33 immunisiert und an Tag acht wurde mittels K^b GP34 spezifischem Multimer die Proliferation der antigenspezifischen T-Zellen aus der Milz analysiert. Um den Unterschied zwischen MHC-I D^b und K^b zu verdeutlichen ist in der Abbildung 6.7 nochmals die Multimerfärbung D^b GP33 spezifischer T-Zellen aus Abbildung 6.1 dargestellt.

In den C57BL/6 Mäusen konnte eine Expansion von T-Zellen beider Spezifitäten detektiert werden, also sowohl D^b GP33 spezifische CD8 T-Zellen, als auch K^b GP34 spezifische T-Zellen. In den DC-MHCI Mäusen lässt sich keine Proliferation von T-Zellen der D^b GP33 Spezifität nachweisen, es konnte aber eine deutliche Population von CD8 T-Zellen spezifisch für das kürzere K^b GP34 Epitop detektiert werden (*Abbildung 6.7*).

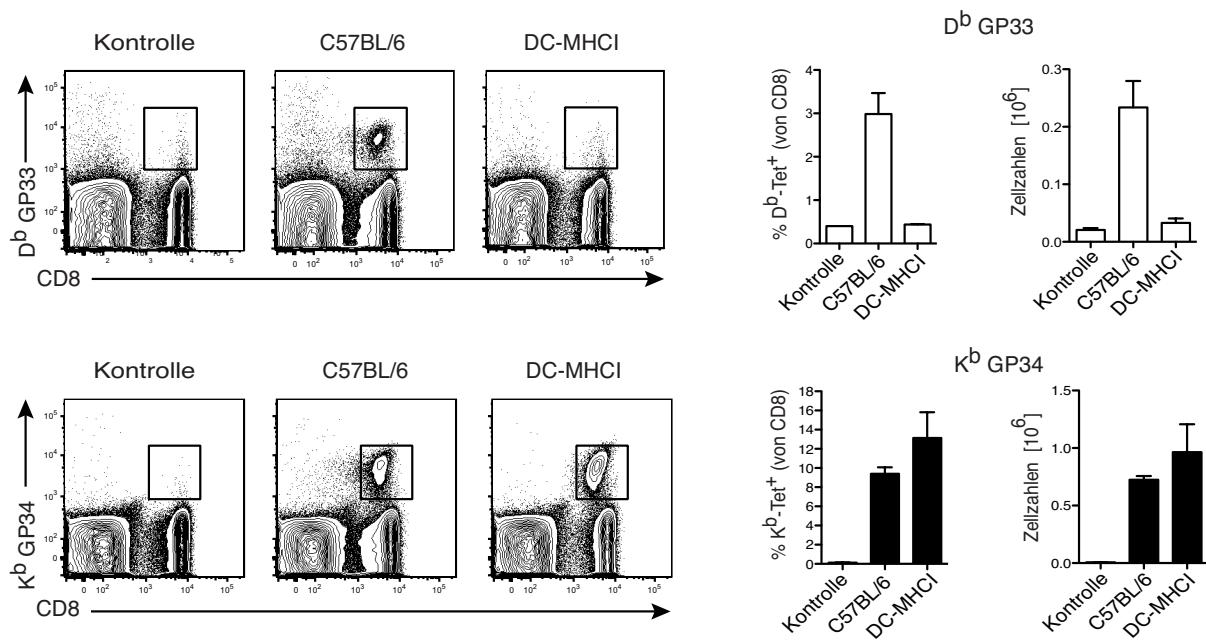


Abbildung 6.7: D^b GP33 und K^b GP34- Multimerfärbung

C57BL/6 und DC-MHCI Mäuse wurden mit 1×10^9 vp rAd-GP33 immunisiert. Nach acht Tagen wurden die Milzen isoliert und eine Multimerfärbung durchgeführt. Gezeigt ist der Prozentsatz D^b bzw. K^b spezifischer CD8 T-Zellen, so wie jeweils die Zellzahlen. Die Abbildung zu D^b GP33 ist identisch zu Abbildung 6.1. Als Kontrolle dienten nicht immunisierte C57BL/6 Mäuse. Pro Gruppe wurden drei Mäuse verwendet, wobei hier ein repräsentatives Experiment aus fünf unabhängigen Versuchen dargestellt ist (Mittelwerte \pm Standardabweichung).

Wenn nur DC Antigen präsentieren (im Fall von DC-MHCI), kommt es nicht zu einer Expansion D^b GP33 spezifischer T-Zellen. Für die Expansion dieser Zellen in den C57BL/6 Mäusen scheinen also andere Zellen als DC verantwortlich zu sein. Die Detektion einer K^b GP34 spezifischen T-Zellpopulation in den DC-MHCI Mäusen stellt eine Erklärung für die Effektorfunktion in diesen Mäusen dar (Abbildung 6.1). Das GP33 Epitop bindet sowohl an MHC-I D^b als auch an K^b (Achour et al., 2002), wobei, wie bereits zuvor erwähnt das Minimalepitop für D^b KAVYNNVATC (GP33) ist und für K^b AVYNFATC (GP34). Die K^b GP34 spezifischen T-Zellen führen zur Abstoßung der mit Peptid beladenen Milzzellen, da sie das Epitop im Kontext von MHC-I K^b erkennen. Die spezifischen MHC-I K^b T-Zellen sind in den DC-MHCI Tieren die Zellen, welche die detektierten Zytokine generieren.

6.6 Wildtyp-DC können D^b GP33 nicht präsentieren

Die Detektion von CD8 T-Zellen beider Spezifitäten in C57BL/6 Mäusen, könnte daher resultieren, dass Wildtyp-DC im Gegensatz zu den DC-MHCI transgenen DC das längere

Epitop prozessieren und über D^b präsentieren können. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass die D^b GP33 spezifischen T-Zellen durch andere APC, die in den DC-MHCI Tieren MHC-I negativ sind, induziert werden. Um zu untersuchen, ob die DC aus einer C57BL/6 Maus in der Lage sind GP33 über D^b zu präsentieren und so die Proliferation von P14 T-Zellen auslösen, wurden Wildtyp-Tiere und DC-MHCI Mäuse mit rAd-GP33 immunisiert und 24 Stunden später wurden die Milzen isoliert. Nach dem Verdau der Organe wurden die CD11c⁺ Zellen isoliert und mit P14 T-Zellen zusammengesetzt. Als Kontrolle dienten DC die aus nicht immunisierten Tieren aus der Milz isoliert wurden und vor der Kultivierung mit den spezifischen T-Zellen mit Peptid beladen worden waren. Das gleiche Experiment wurde auch nach Immunisierung mit rAd-OVA und OTI T-Zellen durchgeführt.

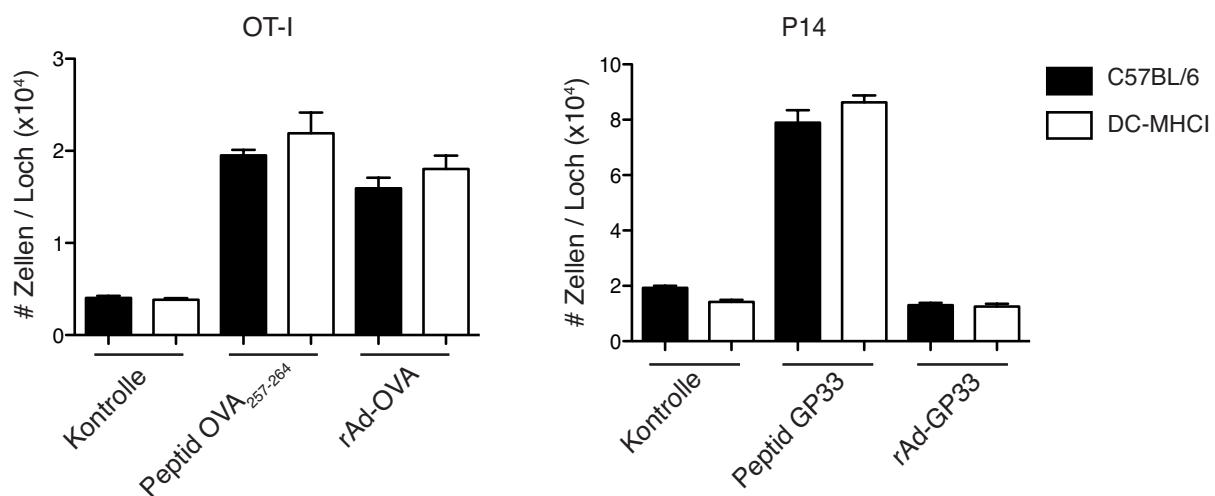


Abbildung 6.8: Wildtyp-DC können D^b GP33 nicht präsentieren

C57BL/6 und DC-MHCI Mäuse wurden mit 1×10^{10} vp rAd-OVA oder rAd-GP33 immunisiert. Am nächsten Tag wurden die Milzen entnommen und die DC wurden mittels CD11c MACSBeads isoliert. Aus nicht immunisierten Mäusen wurden ebenfalls CD11c⁺ Zellen isoliert und mit Peptid SIINFEKL oder GP33 für drei Stunden inkubiert. Diese und die mit Virus infizierten DC wurden für vier Tage zusammen mit den spezifischen T-Zellen kultiviert. Als Kontrolle dienten DC, die weder mit Virus infiziert noch mit Peptid beladen worden waren. Um die Anzahl der T-Zellen am FACS bestimmen zu können, wurde als interner Standard pro Probe eine bestimmte Menge an Polystyrol Mikropartikel gemessen. Die Anzahl an Zellen pro Probe wurde wie in *Material und Methoden* beschrieben berechnet. Es ist eines von zwei Experimenten mit vergleichbarem Ergebnis dargestellt, wobei pro Probe Triplikate angesetzt wurden (Mittelwert \pm Standardabweichung).

Im Fall von OVA wurden die spezifischen T-Zellen durch die DC aus beiden Mausstämmen aktiviert (*Abbildung 6.8*). Dies spricht für vergleichbare APC Kapazitäten und zeigt, dass nach Immunisierung mit rAd-OVA *in vivo* das Antigen von den DC prozessiert und präsentiert werden kann. Im Gegensatz dazu konnte keine Proliferation spezifischer T-Zellen nach Immunisierung mit rAd-GP33 nachgewiesen werden, unabhängig davon, ob es sich um

Wildtyp oder DC aus DC-MHCI Tieren handelt (*Abbildung 6.8*). Dies lässt den Schluss zu, dass DC generell nicht in der Lage sind das Epitop GP33 über MHC-I D^b zu präsentieren. Wie zu erwarten war führt die exogene Beladung von DC mit Peptid GP33 aus beiden Mausstämmen zu einer Proliferation der P14 T-Zellen.

6.7 rAd-Vektoren infizieren BMDC

Im vorangegangenen Experiment konnte nachgewiesen werden, dass DC aus rAd-OVA immunisierten Mäusen OTI T-Zellen aktivieren können, wohingegen es nicht zu einer Expansion von P14 T-Zellen durch DC aus rAd-GP33 immunisierten Mäusen kam. Aufgrund dessen sollte im weiteren Verlauf untersucht werden, ob es möglich ist BMDC *in vitro* mit einem Adenovektor der GFP exprimiert, zu infizieren. Es konnte gezeigt werden, dass die BMDC drei Tage nach der Infektion mit diesem Vektor GFP exprimieren (*Abbildung 6.9 A*). Darüber hinaus wurden BMDC aus C57BL/6 mit rAd-GP33 infiziert und dann zusammen mit CFSE gefärbten P14 T-Zellen kultiviert. Die Proliferation der spezifischen T-Zellen konnte drei Tage später anhand des CFSE-Profils am FACS nachgewiesen werden (*Abbildung 6.9 B*). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass DC, die *in vitro* direkt mit rAd-GP33 infiziert werden, das D^b GP33 Epitop effizient präsentieren können, wohingegen *in vivo* keine D^b spezifische Antwort generiert werden kann. Die Tatsache, dass in Wildtyp-Mäusen nach der Immunisierung mit rAd-GP33 T-Zellen beider Spezifitäten nachweisbar sind, *ex vivo* isolierte DC aus diesen Mäusen aber P14 T-Zellen nicht aktivieren können, lässt vermuten dass andere APC für die D^b spezifische Antwort nötig sind. Des Weiteren legen diese Ergebnisse den Schluss nahe, dass das D^b GP33 Epitop durch direkte MHCI-Präsentation von DCs generiert werden kann, aber *in vivo* DC das GP33 Peptid evtl. nicht direkt, sondern kreuzpräsentieren.

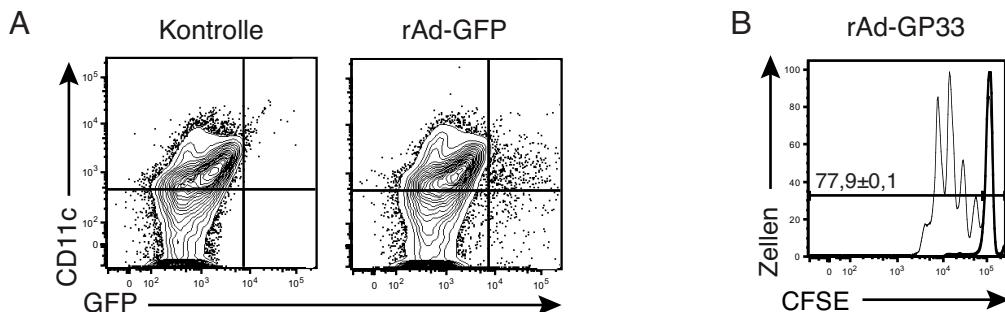


Abbildung 6.9: Infektion von BMDC mit rAd-GFP bzw rAdGP33

(A) BMDC aus C57BL/6 wurden an Tag drei der Kultur mit MOI6 (Vielzahl der Infektionen, *multiplicity of infection*) transduziert. Die Analyse GFP⁺CD11c⁺ Zellen erfolgte drei Tage später am FACS. (B) Die Infektion der BMDC mit rAd-GP33 (MOI5) wurde ebenfalls an Tag drei durchgeführt. Die DC wurden vier Tage später mit CFSE gefärbten P14 T-Zellen kultiviert und nach weiteren drei Tagen wurde die Proliferation der spezifischen CD8⁺ T-Zellen am FACS ermittelt. Für beide Experimente dienten als Kontrolle nicht transduzierte BMDC (dickere Linie in B). Das Experiment wurde zweimal durchgeführt, gezeigt ist der Mittelwert ± Standardabweichung.

6.8 rAd-GFP infiziert Zellen in der MZ der Milz

Aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse, die den Schluss zulassen, dass für die Aktivierung D^b GP33 spezifischer T-Zellen andere APC als DC verantwortlich sind, sollten diese Zellen identifiziert werden. Dazu wurden histologische Analysen von Milzschnitten einer C57/BL6 Maus angefertigt. Zuvor wurde die Maus mit rAd-GFP immunisiert, um so die Lokalisierung des Vektors in der Milz verfolgen zu können. Zwei Tage nach der Infektion mit dem Vektor lässt sich GFP hauptsächlich in den Zellen der MZ nachweisen (*Abbildung 6.10 A*). Dies ist im Einklang mit Resultaten von Backer et al. (Backer et al., 2010), die zeigen konnten dass nach Immunisierung mit einem GFP exprimierenden Adenovektor das Virus hauptsächlich in CD169⁺ MΦ detektierbar ist und legt die Vermutung nahe, dass MΦ eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der GP33 spezifischen T-Zellantwort spielen. Die MΦ sollten in den DC-MHCI Mäusen negativ sein für MHC-I und dies konnte durch die Färbung von Splenozyten mit anti-CD169, anti-CD11c und anti-MHC-I bestätigt werden (*Abbildung 6.10 B*). In MHC-I Knockout Tieren (dünne durchgezogene Linie), die in diesem Versuch als Kontrolle dienten, konnte weder MHC-I Expression auf CD11c⁺ noch auf CD169⁺ Zellen nachgewiesen werden. In den DC-MHCI-Mäusen hingegen (dicke durchgezogene Linie), wird MHC-I, wie zu erwarten war, auf CD11c⁺ aber nicht auf CD169⁺

Zellen exprimiert und in Wildtyp-Mäusen (gestrichelte Linie) konnte MHC-I Expression sowohl auf CD11c⁺ als auch auf CD169⁺ Zellen nachgewiesen werden.

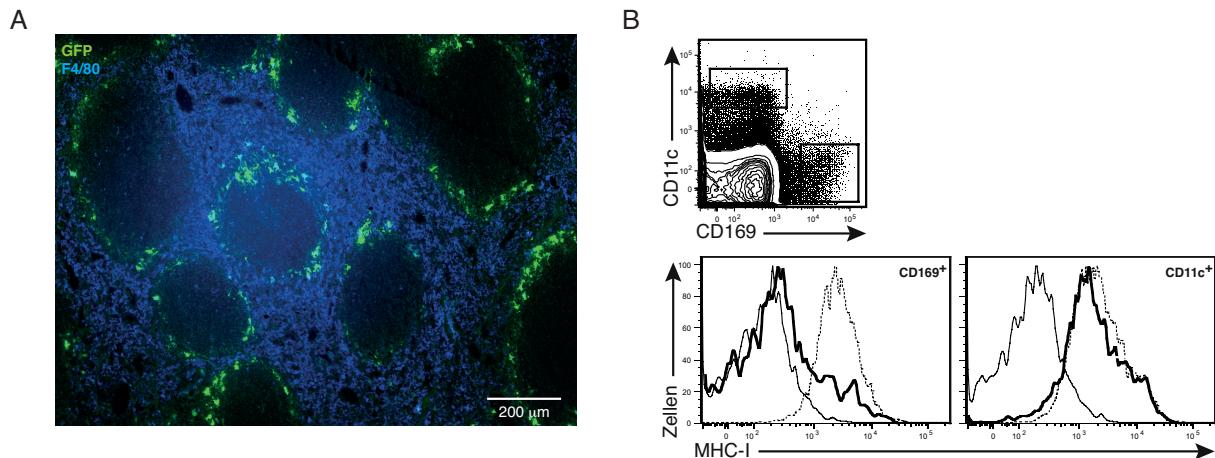


Abbildung 6.10: rAd-GFP infiziert Zellen in der MZ der Milz

(A) C57BL/6 Mäuse wurden mit 1×10^9 vp rAd-GFP i.v. immunisiert. Nach 48 Stunden wurde die Milz entnommen und in PFA fixiert. Anschließend wurden 5 μ m dicke Schnitte angefertigt. Zur Detektion von GFP wurde das TSA Signalamplifizierungskit (PerkinElmer) verwendet, außerdem wurde der Schnitt mit dem Antikörper F4/80 gefärbt. Messbalken entspricht 200 μ m. (B) Die Milzen nicht immunisierter C57BL/6 (gestrichelte Linie), DC-MHCI (dicke durchgezogene Linie) und MHC-I KO (dünne durchgezogene Linie) Mäusen wurden mittels DNase/Liberase verdaut und gefärbt mit Antikörpern für MHC-I K^b und D^b, CD11c und CD169. Es ist ein Experiment von zweien mit vergleichbarem Ergebnis dargestellt.

6.9 D^b GP33 spezifische T-Zellantwort in DC depletierten Mäusen

Um die Rolle der MΦ bei der Aktivierung D^b GP33 spezifischer CD8⁺ T-Zellen genauer zu untersuchen, wurden zwei Arten von DC-defizienten Mäusen mit rAd-GP33 immunisiert. Bei den Δ -DC Mäusen (Ohnmacht et al., 2009) handelt es sich um eine Kreuzung von CD11c-Cre Mäusen mit Tieren, die Diphtherie Toxin A (DTA) unter der Kontrolle einer loxP-flankierten STOP-Kassette im ROSA26 Lokus exprimieren. Dies hat den konstitutiven Verlust von cDC, pDC und Langerhans Zellen zur Folge. Bei den CD11c-DTR Mäusen (Jung et al., 2002) hingegen handelt es sich um ein induzierbares System. Durch die Gabe von DT werden die DC, aber auch verschiedene Arten von MΦ für einen gewissen Zeitraum *in vivo* depletiert (Probst et al., 2005a). Um sicher zu gehen, dass die Depletion der CD11c⁺ Zellen 18 Stunden nach Injektion des Toxins vollständig ist, wurde eine histologische Analyse der

Milzen durchgeführt. In den CD11c-DTR Mäusen konnten am Höhepunkt der Depletion noch vereinzelt CD11c⁺ Zellen nachgewiesen werden, wohingegen weder MΦ der roten Pulpa noch metallophile- (CD169⁺) oder MZ-MΦ (SIGN-R1⁺) detektiert wurden. Im Gegensatz dazu konnten keine DC in den Δ-DC Mäusen nachgewiesen werden, diese Mäuse besitzen aber noch alle Arten an MΦ (*Abbildung 6.11 A*).

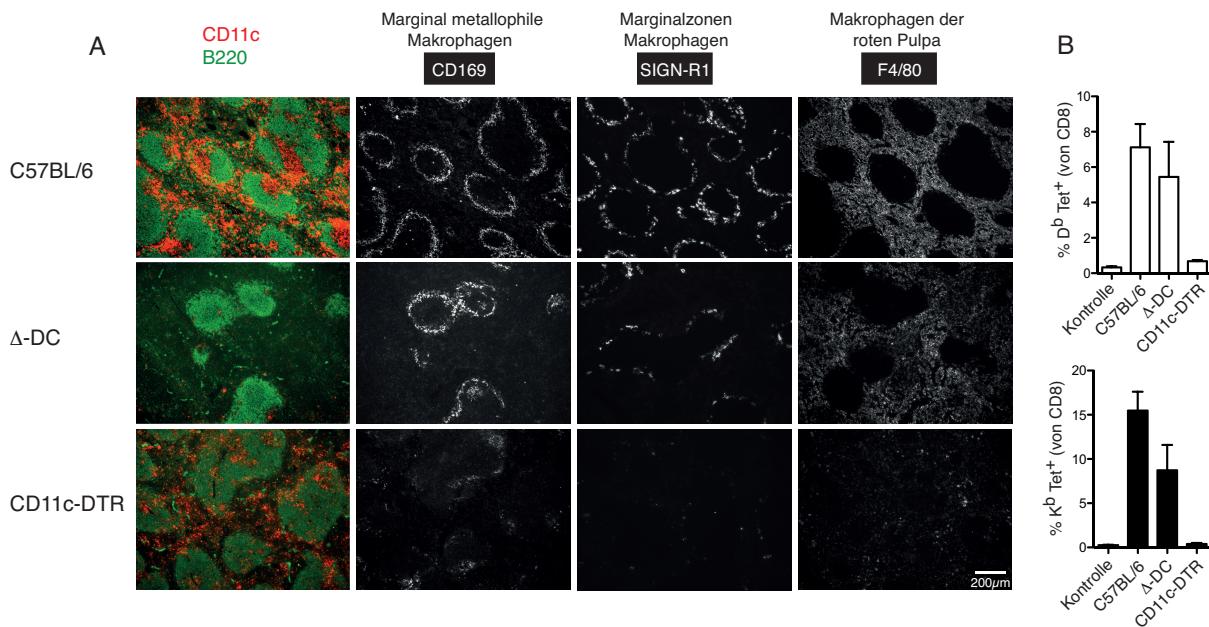


Abbildung 6.11: MΦ in der MZ der Milz sind verantwortlich für die D^b GP33 spezifische T-Zellantwort
(A) Für die immun-histologische Untersuchung wurden nicht immunisierte Mäuse verwendet, wobei die Milz der CD11c-DTR Maus 18 Stunden nach Gabe von DT entnommen wurde. Gefärbt wurde für CD11c, B220 sowie die MΦ-Marker CD169, SIGN-R1 und F4/80. Messbalken entspricht 200μm.
(B) Für die D^b und K^b Multimerfärbung wurden die verschiedenen Mausstämme mit 1×10^9 vp rAd-GP33 i.v. immunisiert und acht Tage später wurde die Expansion der spezifischen CD8⁺ T-Zellen verfolgt. Die Analyse der durchflusszytometrischen Daten erfolgte wie in Abbildung 6.7 dargestellt und das Experiment wurde viermal durchgeführt, wobei hier ein repräsentatives Resultat mit drei Mäusen pro Gruppe dargestellt ist (Mittelwert \pm Standardabweichung).

Nach der Immunisierung mit rAd-GP33 konnten mittels D^b und K^b Multimeren T-Zellen beider Spezifitäten in den Δ-DC Mäusen nachgewiesen werden, in den CD11c-DTR Mäusen kam es hingegen zu keinerlei Proliferation (*Abbildung 6.11 B*). Da in den Δ-DC Mäusen noch MΦ, aber keine DC mehr vorhanden sind, untermauert dies die Ergebnisse aus der histologischen Analyse mit rAd-GFP und lässt den Schluss zu, dass MΦ in der MZ der Milz für die Aktivierung der D^b GP33 spezifischen T-Zellantwort verantwortlich sind. Die noch vereinzelt vorkommenden DC in den CD11c-DTR Mäusen führen nicht zu einer Proliferation spezifischer CD8⁺ T-Zellen.

6.10 Sowohl CD169⁺ wie auch SIGN-R1⁺ MΦ werden von rAd-GFP infiziert

Bislang wurde gezeigt, dass MΦ aus der MZ der Milz D^b GP33 spezifische T-Zellantworten generieren können. In dieser Zone gibt es zwei Arten von MΦ, zum einen die CD169⁺ metallophilen und die SIGN-R1⁺ MZ-MΦ. CD169⁺ MΦ befinden sich in der, der weißen Pulpa zugewandten inneren Seite der MZ, die SIGN-R1⁺ Zellen hingegen auf der, der roten Pulpa zugewandten äußeren Seite (Geijtenbeek et al., 2002).

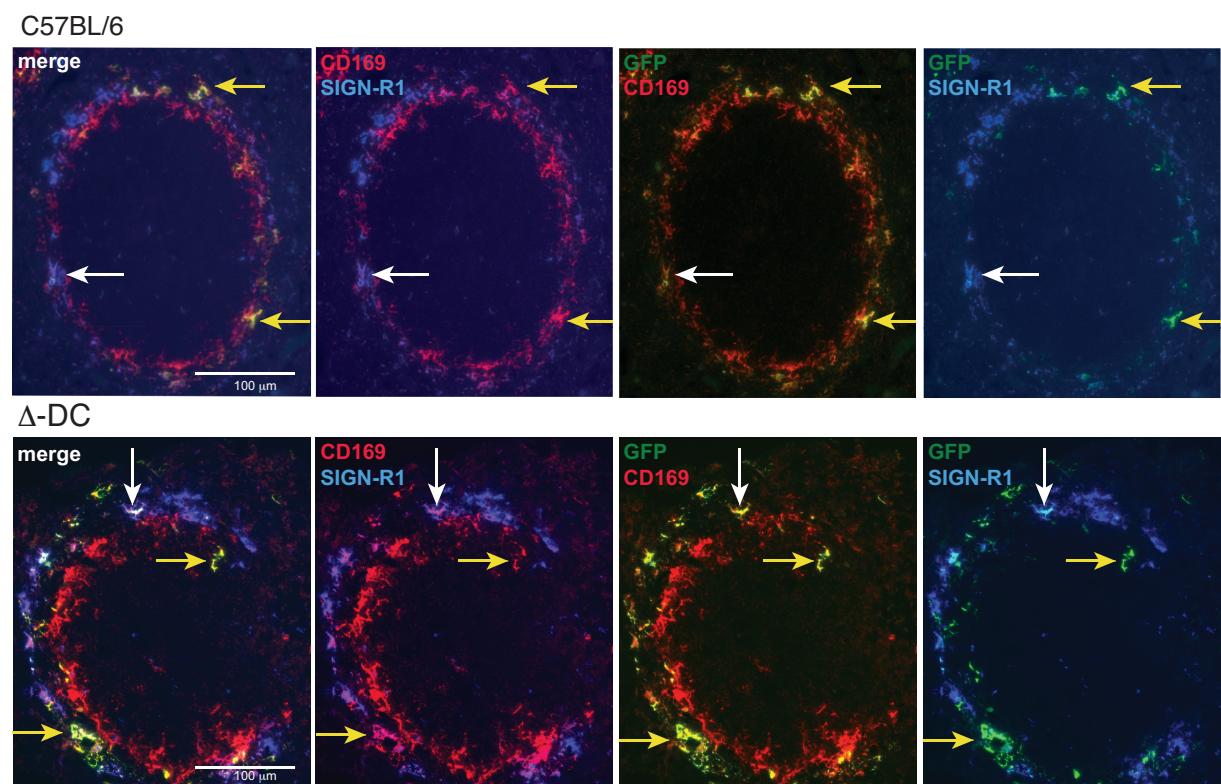


Abbildung 6.12: CD169⁺ und SIGN-R1⁺ MΦ werden von rAd-GFP infiziert

C57BL/6 und Δ-DC Mäuse wurden mit 1×10^9 vp rAd-GFP i.v. immunisiert und 48 Stunden später wurden die Milzen entnommen und in PFA fixiert. Zur Detektion von GFP wurde das TSA Signalamplifizierungskit (PerkinElmer) benutzt und die Schnitte wurden mit Antikörpern gegen CD169 und SIGN-R1 gefärbt. Weiße Pfeile zeigen Zellen positiv für CD169⁺, SIGN-R1⁺ und GFP⁺, gelbe Pfeile markieren CD169⁺ und GFP⁺ Zellen. Messbalken entspricht 100 μm.

Detailliertere histologische Untersuchungen sollten zeigen, welcher der beiden Zelltypen für die Aktivierung D^b GP33 spezifischer T-Zellen verantwortlich sein könnte. Dazu wurden

C57BL/6 und Δ -DC Mäuse mit rAd-GFP immunisiert und 48 Stunden später wurden die Milzen entnommen. Die Färbung ergab, dass viele SIGN-R1⁺ MΦ auch schwach positiv sind für CD169 (*Abbildung 6.12*), ein Befund, welcher bereits anhand von mRNA Expressionsstudien nachgewiesen werden konnte (Miyake et al., 2007). Die Tatsache, dass doppelt positive MΦ nachweisbar sind, lässt nur schwer eine Aussage darüber treffen, welcher der beiden Zelltypen für die Aktivierung GP33 spezifischer T-Zellen verantwortlich ist, offensichtlich werden beide Arten von MΦ in der MZ der Milz von rAd-GFP infiziert, was anhand der weißen Pfeile in der Abbildung (*Abbildung 6.12*) verdeutlicht werden soll. Vereinzelt konnten infizierte MΦ, die nur positiv für CD169 sind detektiert werden (gelbe Pfeile).

6.11 Die Aktivierung D^b GP33 spezifischer T-Zellen in Lymphknoten

Geijtenbeek et al. (Geijtenbeek et al., 2002) konnten zeigen, dass auch die MΦ in den Lymphknoten zum Teil positiv sind sowohl für CD169 als auch für SIGN-R1. Aufgrund dessen sollte im Folgenden zusätzlich zu den bereits analysierten Milzen auch die Lymphknoten von C57BL/6 und Δ -DC Mäusen untersucht werden. Die histologische Analyse wurde nur in Wildtyp Tieren durchgeführt. In Haut drainierenden Lymphknoten aus C57BL/6 Mäusen konnten nach der Immunisierung mit rAd-GFP infizierte CD169⁺ MΦ des subkapsulären Sinus detektiert werden, wobei auch hier wieder einige dieser MΦ sowohl positiv waren für CD169 als auch SIGN-R1 (*Abbildung 6.13 A*). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass CFSE gefärbte P14 T-Zellen aus den Lymphknoten drei Tage nach Immunisierung mit rAd-GP33 *in vivo* proliferieren und zwar auch in Δ -DC Mäusen, die keine DC haben (*Abbildung 6.13 B*).

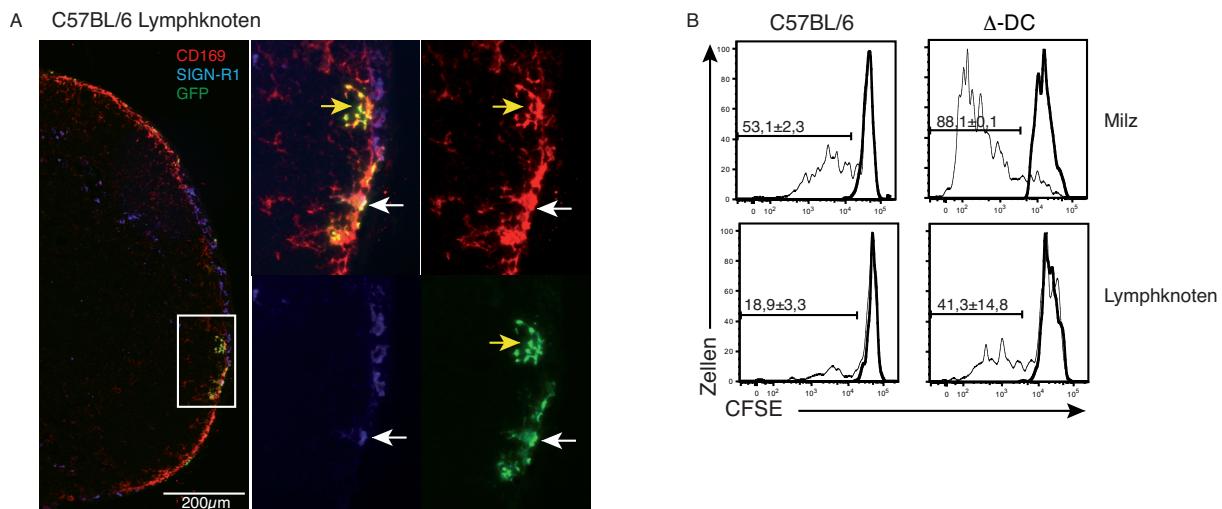


Abbildung 6.13: MΦ des subkapsulären Sinus der Lymphknoten können D^b GP33 spezifische T-Zellen aktivieren

(A) C57BL/6 wurden mit 1×10^9 vp rAd-GFP i.v. immunisiert. Die Haut drainierenden Lymphknoten wurden 48 Stunden später entnommen und in 2% PFA für zwei Stunden fixiert. Die angefertigten Schnitte wurden mit den Antikörpern CD169 und SIGN-R1 gefärbt und der Nachweis von GFP erfolgte mit dem Signalamplifizierungskit (PerkinElmer). Für den Nachweis der *in vivo* Proliferation (B) wurden 2×10^6 CFSE gefärbte P14 T-Zellen transferiert und gleichzeitig wurden die Mäuse (C57BL/6 und Δ-DC) mit 1×10^9 vp rAd-GP33 i.v. immunisiert. Drei Tage später wurden die Haut drainierenden Lymphknoten und die Milzen entnommen und die Expansion der spezifischen T-Zellen (CD8⁺ und CD90.1⁺) anhand der CFSE Verdünnung analysiert. Als Kontrolle dienten C57BL/6, denen ausschließlich T-Zellen transferiert wurden (dickere Linie).

6.12 Die polyklonale CD8 T-Zellantwort: LCMV-GP gesamt

Bisher konnte gezeigt werden, dass DC GP33 nicht präsentieren, sondern nur das kürzere Epitop K^b GP34. Wie bereits erwähnt, ist das Modelantigen GP33 im Adenovektor eingebettet in die BL26 Kassette (IKAVYNFATCGILA). Im folgenden sollte untersucht werden, ob sich die bisherigen Beobachtungen reproduzieren lassen, wenn die Mäuse mit dem gesamten GP des LCMV oder mit LCMV selbst immunisiert werden. Hierzu wurden in C57BL/6 und DC-MHCI Mäuse entweder 2×10^6 pfu Vaccinia-LCMVgp, ein Vektor der das gesamte GP von LCMV exprimiert, oder 5×10^4 pfu LCMV-WE injiziert. Nach acht Tagen wurden die Milzen isoliert und eine K^b bzw. D^b Multimerfärbung durchgeführt.

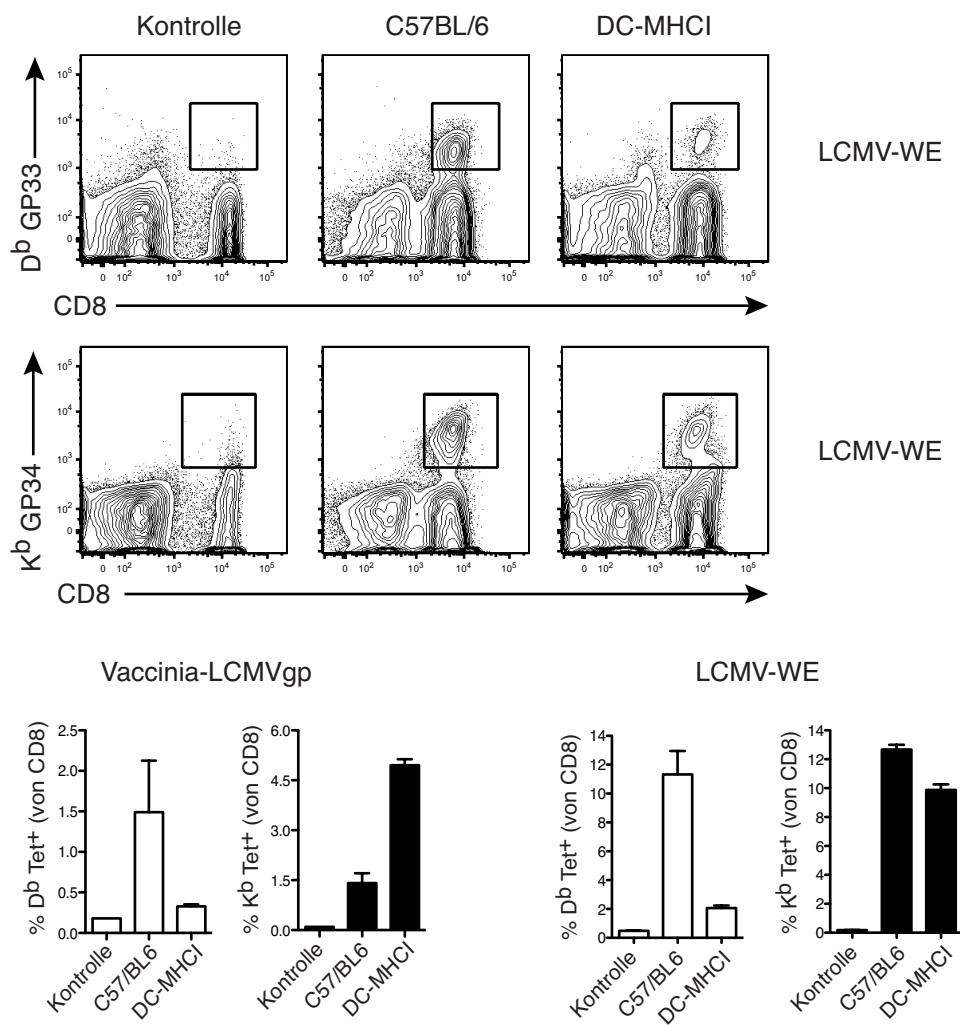


Abbildung 6.14: Vaccinia-LCMVgp und LCMV-WE führen nicht zu einer effizienten Aktivierung D^b GP33 spezifischer T-Zellen in DC-MHCI Mäusen

C57BL/6 und DC-MHCI Mäuse wurden mit 2×10^6 pfu Vaccinia-LCMVgp i.p. bzw. mit 5×10^4 pfu LCMV-WE i.v. immunisiert. Acht Tage später wurden die Milzen entnommen und eine Multimerfärbung für D^b und K^b durchgeführt. Gezeigt ist der Prozentsatz an D^b bzw K^b positiven T-Zellen, wobei je drei Tiere pro Gruppe verwendet wurden (Mittelwert \pm Standardabweichung). Als Kontrolle dienten nicht immunisierte C57BL/6 Mäuse.

Die Daten aus den Experimenten mit rAd-GP33 sind mit diesen beiden Viren vergleichbar. Auch wenn das gesamte Glycoprotein zur Verfügung steht, wird in den DC-MHCI Mäusen nur eine K^b spezifische T-Zellantwort generiert, wohingegen in den Wildtyp Mäusen für beide Spezifitäten eine Expansion der CD8 T-Zellen nachgewiesen werden konnte (*Abbildung 6.14*).

6.13 Die Rolle der MΦ für LCMV-WE

DC reichen auch dann nicht aus eine D^b GP33 spezifische T-Zellantwort zu generieren, wenn das gesamte GP zur Verfügung steht. Da gezeigt werden konnte, dass sowohl CD169⁺ als auch SIGN-R1⁺ MΦ in der Milz und Lymphknoten von rAd-GFP infiziert werden, und es in den Δ-DC Mäusen trotz nicht vorhandener DC zu einer D^b spezifischen CD8 T-Zellantwort kommt, sollte die Rolle der MΦ für das gesamte GP untersucht werden. Dazu wurden die beiden DC defizienten Mausstämme sowie zur Kontrolle C57BL/6 mit LCMV-WE immunisiert und am Höhepunkt der Antwort wurden D^b und K^b spezifische T-Zellen mittels Multimer detektiert. Wie zu erwarten war, kam es im Gegensatz zu den Wildtyp-Tieren und Δ-DC in den CD11c-DTR Mäusen, denen nach Gabe des Toxins sowohl DC als auch MΦ fehlen, nicht zu einer Expansion spezifischer T-Zellen. In den anderen beiden Mausstämmen (C57BL/6 und Δ-DC) hingegen konnten T-Zellen beider Spezifitäten nachgewiesen werden (*Abbildung 6.15 A*). Darüber hinaus konnte durch ein Restimulationsassay mit dem Peptid GP33 gezeigt werden, dass die spezifischen T-Zellen nach Immunisierung mit LCMV-WE funktionell sind. Es konnten in Wildtyp- und Δ-DC Mäusen gleiche Mengen an sowohl CD107a und IFNγ- sowie auch nur IFNγ produzierende CD8 T-Zellen detektiert werden (*Abbildung 6.15 B*). Somit spielen MΦ nicht nur im Fall von rAd-GP33, sondern auch wenn mit LCMV-WE immunisiert wird, eine entscheidende Rolle für die Expansion D^b und K^b spezifischer funktioneller T-Zellen.

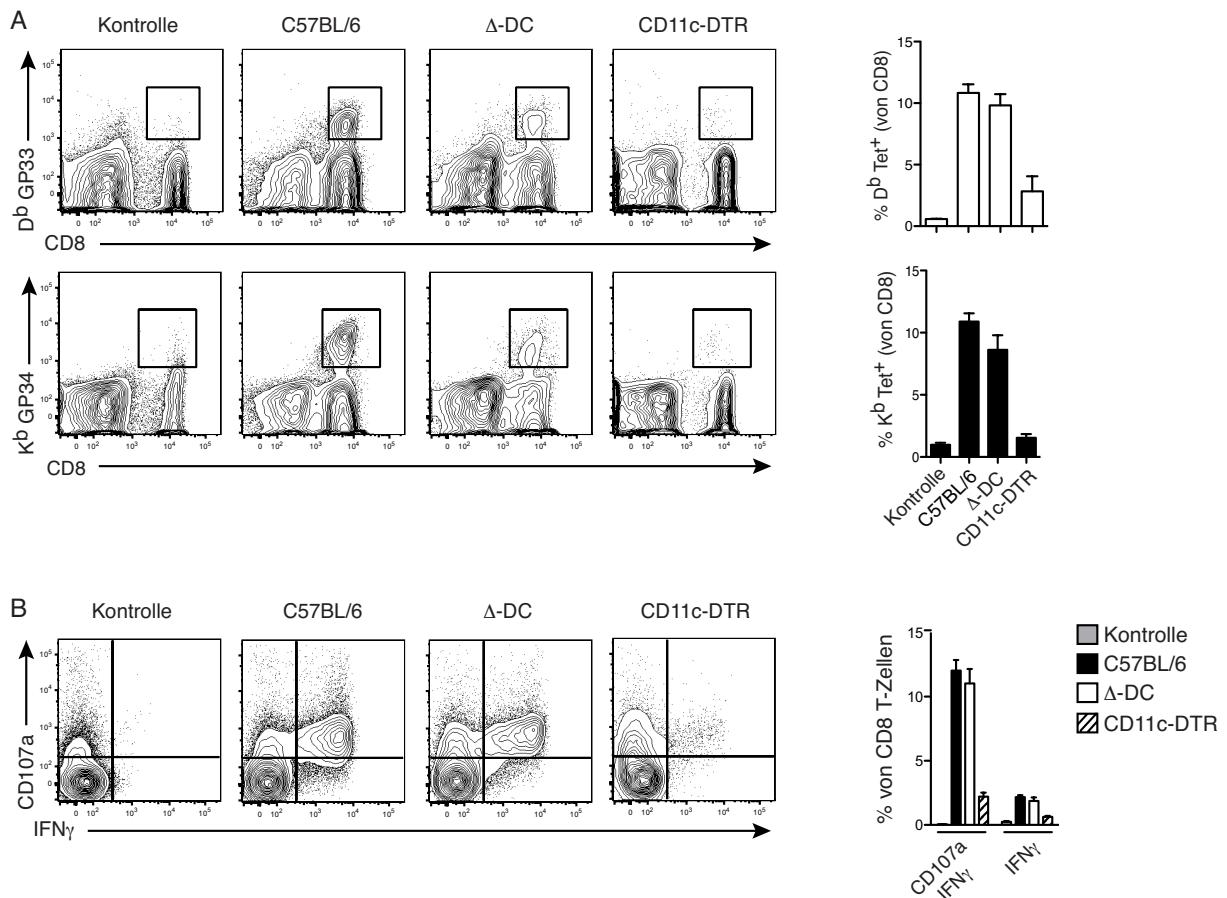


Abbildung 6.15: Expansion und Funktionalität D^b und K^b spezifischer T-Zellen in DC depletierten Mäusen nach Immunisierung mit LCMV-WE

C57BL/6, Δ-DC und CD11c-DTR Mäuse wurden mit 5×10^4 pfu LCMV immunisiert. Acht Tage später wurden die Milzen entnommen und eine D^b bzw. K^b Multimerfärbung (A) bzw. ein Restimulationsassay mit Peptid GP33 (B) durchgeführt. Für die Restimulation wurden die Splenozyten für vier Stunden mit dem Peptid inkubiert und anschließend wurde eine extrazelluläre Färbung für CD8 und CD107a und eine intrazelluläre Färbung für das Zytokin IFN γ durchgeführt. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt, wobei ein repräsentatives Experiment gezeigt ist, mit drei Tieren pro Gruppe (Mittelwert \pm Standardabweichung).

6.14 Die Depletion von MΦ verhindert eine Aktivierung GP33 spezifischer T-Zellen

MΦ lassen sich *in vivo* durch die Gabe Clodronat-gefüllter Liposomen depletiert. Die Liposomen werden von phagozytierenden Zellen aufgenommen und ab einer gewissen Konzentration an Clodronat geht die Zelle in Apoptose (van Rooijen et al., 1996).

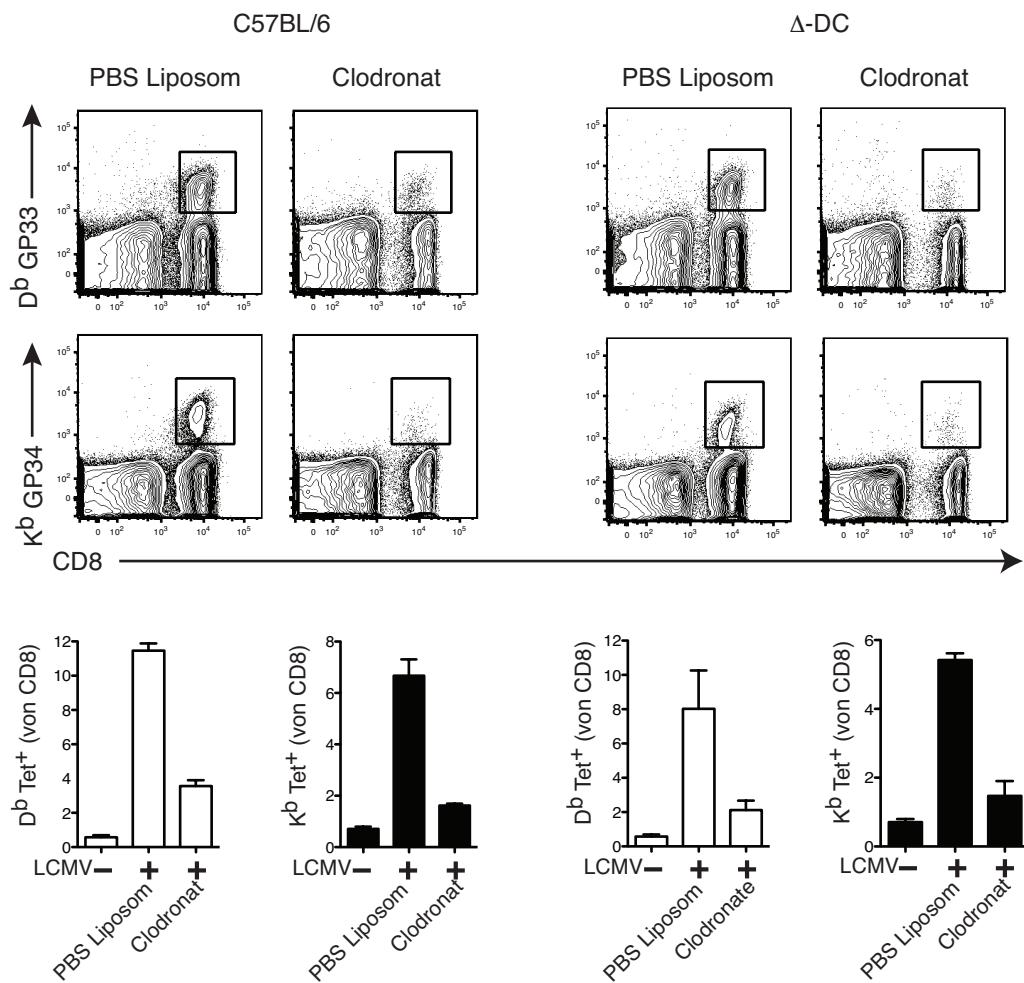


Abbildung 6.16: Eine Depletion von MΦ verhindert die Expansion D^b und K^b spezifischer T-Zellen

C57BL/6 und Δ-DC Mäuse wurden 10 mg/ml Clodronat- bzw. PBS-gefüllte Liposomen injiziert und am darauf folgenden Tag wurden die Tiere mit 5×10^4 pfu LCMV-WE immunisiert. Acht Tage später wurden die Milzen entnommen und eine D^b bzw K^b Multimerfärbung durchgeführt. Gezeigt ist eines von zwei vergleichbaren Experimenten. (Mittelwert \pm Standardabweichung; je drei Mäuse pro Gruppe)

Nach der Depletion der MΦ *in vivo* wurden die Mäuse mit LCMV-WE immunisiert und acht Tage später wurden mittels Multimeren D^b und K^b spezifische T-Zellen aus der Milz detektiert. In der Kontrollgruppe, die PBS-gefüllte Liposomen erhielt, konnten die zu erwartenden Prozentsätze an D^b GP33 und K^b GP34 spezifischen T-Zellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu kam es in den Tieren, deren MΦ depletiert worden waren zu keinerlei Expansion spezifischer T-Zellen (*Abbildung 6.16*). Durch Clodronat kommt es nicht nur zum Verlust von MΦ, sondern alle phagozytierenden Zellen also auch DC werden depletiert. In den Δ-DC Mäusen in denen es keine DC gibt, konnten in der Kontrollgruppe T-Zellen beider Spezifitäten nachgewiesen werden, in den Clodronat behandelten Tieren kam es

Ergebnisse

aber nicht zu einer Proliferation spezifischer T-Zellen. Dieses Experiment bestätigt die vorangegangenen Ergebnisse und zeigt, dass MΦ eine entscheidende Rolle spielen in der Aktivierung D^b GP33 spezifischer T-Zellen.

7 Diskussion

7.1 Die Rolle dendritischer Zellen für die Aktivierung GP33 spezifischer T-Zellen

Um naive CD8 T-Zellen zu aktivieren bedarf es professioneller APC, die das entsprechende Peptid im Kontext von MHC-I präsentieren und kostimulatorische Signale übermitteln. Allerdings exprimieren nahezu alle kernhaltigen Zellen MHC-I und so stellte sich in den letzten Jahren vor allem für Viren wie LCMV, die eine Vielzahl an verschiedenen Zellen infizieren können (Doyle et al., 1978; Homann et al., 2004), die Frage, welcher Zelltyp für die Aktivierung und weitere Expansion GP33 spezifischer CD8 T-Zellen verantwortlich ist. In der Literatur lassen sich dazu widersprüchliche Daten finden. Manche Arbeitsgruppen zeigten, dass nicht-hematopoetische Zellen einen erheblichen Beitrag leisten zur Generierung LCMV spezifischer CD8 T-Zellantworten. So fanden beispielsweise Kündig et al. (Kündig et al., 1995) heraus, dass Virus-transduzierte Fibroblasten in der Lage sind LCMV spezifische T-Zellantworten auszulösen, allerdings nur in zytokinreichen, lymphoiden Organen. Darüber hinaus, zeigte eine andere Arbeitsgruppe in Chimären in denen nur nicht-hematopoetische Zellen MHC-I exprimierten, dass diese Zellen im Fall von LCMV entscheidend sind, um die klonale Expansion GP33 spezifischer T-Zellen aufrecht zu erhalten bzw. zu verstärken, wohingegen keine Proliferation OVA-spezifischer T-Zellen detektiert werden konnte (Thomas et al., 2007). Offensichtlich reichen im Fall einer LCMV Infektion die wenigen strahlungs-resistenten APC in den Chimären aus (Sigal et al., 2000), um naive T-Zellen zu aktivieren und die infizierten nicht-hematopoetischen Zellen spielen dann eine wichtige Rolle bei der weiteren Expansion der LCMV spezifischen T-Zellen.

Im Gegensatz dazu postulierten Probst et al. (Probst et al., 2005b), dass DC essentiell sind um eine GP33 spezifische T-Zellantwort zu generieren. Die Autoren infizierten CD11c-DTR und Wildtyp-Mäuse mit LCMV-WE und verfolgten die Expansion GP33 spezifischer T-Zellen mittels D^b Multimer an Tag sieben nach Immunisierung, wobei sie in den CD11c-DTR Mäusen keine Aktivierung spezifischer T-Zellen detektieren konnten. Allerdings, wie bereits in dieser Arbeit beschrieben, werden durch die Behandlung mit DT nicht nur DC sondern auch MΦ depletiert, wie Probst et al. in einem später veröffentlichten Artikel durch

histologische Untersuchungen belegen konnten (Probst et al., 2005a). Diese Ergebnisse decken sich weitestgehend mit den in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Daten. So konnte in den CD11c-DTR Mäusen ebenfalls keine Expansion D^b GP33 oder K^b GP34 spezifischer T-Zellen nachgewiesen werden (*Abbildung 6.11 B*). Im Gegensatz dazu kam es aber in den Δ-DC Mäusen zu einer Expansion von T-Zellen beider Spezifitäten und durch histologische Analysen konnte gezeigt werden, dass diese Mäuse im Gegensatz zu den CD11c-DTR noch F4/80⁺, CD169⁺ sowie SIGN-R1⁺ MΦ besitzen und nur CD11c⁺ Zellen fehlen (*Abbildung 6.11 A*). In der Literatur wurde beschrieben - dies deckt sich auch mit den vorliegenden histologischen Färbungen -, dass nur etwa 85-90% CD11c⁺ Zellen in den CD11c-DTR Mäusen depletiert werden (Bennett et al., 2007). Dennoch reichen diese noch vorhandenen DC aber nicht aus, um eine GP33 spezifische T-Zellantwort zu generieren. Sollten DC entscheidend sein für die Aktivierung LCMV spezifischer T-Zellen, dann sollten wie bei Thomas et al. (Thomas et al., 2007) beschrieben, diese wenigen APC ausreichen und infizierte nicht-hematopoetische Zellen in den CD11c-DTR Mäusen sollten die klonale Expansion verstärken können.

Nach der Immunisierung mit rAd-GFP konnten GFP⁺ Zellen nur in den MMM und MZM der MZ der Milz (*Abbildung 6.12*) detektiert werden. Dies lieferte einen ersten Hinweis, welcher Zelltyp entscheidend sein könnte für die Aktivierung GP33 spezifischer T-Zellen. Aber auch nach der Immunisierung mit LCMV-WE, der wie bereits erwähnt verschiedene Zelltypen infiziert, konnte in den DC-MHCI Mäusen nur eine Expansion K^b spezifischer T-Zellen nachgewiesen werden (*Abbildung 6.14*), wohingegen es in den Δ-DC Mäusen zu einer Aktivierung von T-Zellen beider Spezifitäten kam (*Abbildung 6.15*). Somit lassen diese Ergebnisse den Schluss zu, dass MΦ in der MZ eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung GP33 spezifischer CD8 T-Zellantworten spielen und ausreichen funktionelle T-Zellen zu generieren. Das Ausbleiben einer LCMV spezifischen Antwort in den CD11c-DTR Mäusen ist dann nicht auf das Fehlen der DC zurückzuführen, sondern auf die zusätzliche Depletion der MΦ in diesem Mausmodell.

7.2 Die Rolle der MΦ für die Aktivierung adaptiver Immunantworten

Seit ihrer Entdeckung gelten DC als besonders effiziente APC, die entscheidend sind für die Aktivierung von Immunität bzw. Toleranz. In den letzten Jahren vermehren sich aber Publikationen, die zeigen konnten, dass auch MΦ einen wichtigen Beitrag leisten bei der Aktivierung von B- und T-Zellen. Durch die Immunisierung verschiedener Mausstämme mit rAd-GP33 bzw. LCMV-WE und die Analyse mittels D^b und K^b Multimeren (*Abbildung 6.7, 6.11, 6.14 und 6.15*) konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass MΦ essentiell sind für die Expansion spezifischer GP33 bzw. GP34 CD8 T-Zellen. So kam es in den Δ-DC Mäusen, die keine DC aber MΦ besitzen zu einer Aktivierung von T-Zellen beider Spezifitäten, wohingegen in den DC-MHCI Mäusen in denen MHC-I nur auf DC exprimiert wird (*Abbildung 6.10*), lediglich zur Aktivierung K^b spezifischer T-Zellen. In den CD11c-DTR Mäusen, die weder DC noch MΦ aufweisen, kam es zu keinerlei Expansion (*Tabelle 7.1 fasst diese Ergebnisse zusammen*). Darüber hinaus reichen MΦ nicht nur aus die Expansion spezifischer T-Zellen zu aktivieren, sondern diese CTL sind auch funktionell, wie mittels *in vitro* Restimulationsassay nachgewiesen werden konnte (*Abbildung 6.15*).

Mausstamm	APC	MHC-I Expression	T-Zell-Spezifität
C57BL/6	DC, MΦ	auf allen Zellen	D ^b und K ^b
DC-MHCI	DC, MΦ	nur auf DC	K ^b
Δ-DC	MΦ	auf allen Zellen	D ^b und K ^b
CD11c-DTR	-	auf allen Zellen	keine Expansion

Tabelle 7.1: Überblick über die Expansion D^b GP33 bzw. K^b GP34 spezifischer T-Zellen in den verwendeten Mausstämmen

Die Depletion der MΦ durch die Gabe Clodronat-gefüllter Liposomen verhinderte die Expansion spezifischer CD8 T-Zellen nach Immunisierung mit LCMV-WE (*Abbildung 6.16*). Ähnliche Ergebnisse wurden von Seiler et al. (Seiler et al., 1997) erzielt, wobei sie sich die gleiche Technik zur Depletion der MΦ zu nutze machten. Nach der Behandlung von C57BL/6 mit Clodronat-gefüllten Liposomen konnten die Mäuse eine LCMV Infektion nicht beseitigen

und das Virus breite sich auf periphere Organe aus, in denen es unkontrolliert repliziert, bevor eine schützende Immunantwort etabliert werden kann. Die Autoren schlossen daraus, dass MMM und MZM eine wichtige „Filterfunktion“ besitzen und verhindern, dass sich das Virus systemisch ausbreitet.

Durch die Gabe von Clodronat kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere phagozytierende Zellen wie beispielsweise DC depletiert werden, die eventuell wichtig sein könnten für die Eliminierung des Virus. Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit in Δ -DC Mäusen, die als Kontrolle mit PBS-gefüllten Liposomen behandelt wurden, allein durch MΦ eine Expansion von T-Zellen beider Spezifitäten erzielt werden, die dann aber in den Clodronat behandelten Mäusen ausblieb.

Auch für andere Viren konnte in den letzten Jahren nachgewiesen werden, dass MΦ eine entscheidende Rolle spielen. So wurde für VSV (*vesikulärer Stomatitis Virus, vesicular stomatitis virus*) zum einen gezeigt, dass die verstärkte Replikation des Virus in CD169⁺ MΦ die Aktivierung der adaptiven Immunantwort fördert (Honke et al., 2012) und zum anderen verhindert diese Art von MΦ, dass das Virus das zentrale Nervensystem infiziert (Iannaccone et al., 2010). Die Depletion von MΦ in Lymphknoten führte bei ca. 60 % der mit VSV infizierten Mäuse zu einer Lähmung und nach sieben bis zehn Tagen schließlich zum Tod. In dieser Studie waren MΦ nicht direkt an CD8 T-Zellantworten beteiligt, sondern kontrollieren die VSV Infektion durch die Produktion von IFN γ . Des Weiteren sind MMM und MZM erforderlich für die Aufnahme im Blut-zirkulierender Antigene und damit der Kontrolle von Infektionen wie mit *Listeria Monozytogenes*, wobei auch in diesen Versuchen die MΦ durch Clodronat-gefüllte Liposomen depletiert wurden (Aichele et al., 2003). Backer et al. (Backer et al., 2010) konnten nach der Immunisierung mit einem GFP exprimierenden Adenovektor virale Proteine in CD169⁺ MΦ detektieren, dies ist in Einklang mit den hier vorgestellten histologischen Analysen, die eine Kolokalization von GFP mit MMM und MZM zeigten (*Abbildung 6.12*). Die Autoren arbeiteten außerdem mit einem OVA exprimierenden Adenovektor und fanden heraus, dass die CD169⁺ MΦ die aufgenommenen Antigene an CD8⁺ DC in der Milz weitergeben. Dies führt letztlich zur Kreuzpräsentation und Aktivierung spezifischer CTL, wobei funktionelle CD8 T-Zellen nur aktiviert werden konnten, wenn sowohl MΦ als auch DC beteiligt waren. Für GP33 hingegen konnte durch die Immunisierung der Δ -DC Mäuse gezeigt werden, dass MΦ ausreichen um direkt funktionelle CD8 T-Zellantworten zu generieren.

MΦ haben wie DC die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation. MMM phagozytieren tumorassoziierte Antigene und aktivieren damit spezifische CD8⁺ T-Zellen. Dies konnte durch die DT vermittelte Depletion von MMM in CD169-DTR Mäusen nachgewiesen werden, in denen es nach Immunisierung toter Tumorzellen nicht mehr zur Generierung spezifischer T-Zellen kam (Asano et al., 2011). Auch bei der Aktivierung humoraler Immunantworten übernehmen CD169⁺ MΦ wichtige Aufgaben, indem sie die Verbreitung in der Lymphe zirkulierender Pathogene, wie VSV vermeiden und Antigen antiviralen B-Zellen präsentieren (Junt et al., 2007).

All diese Studien konnten zeigen, dass vor allem CD169⁺ MΦ eine wichtige Rolle spielen bei der Aktivierung adaptiver Immunantworten, gerade auch aufgrund ihrer Lokalisation, die es ihnen erlaubt im Blut und Lymphe zirkulierende Antigene aufzunehmen, Stunden bevor migratorische DC in die Lymphknoten einwandern.

7.3 DC aktivieren D^b GP33 spezifische T-Zellen *in vivo* nur sehr ineffizient

Nach Immunisierung der DC-MHCI Mäuse mit rAd-GP33 konnte keine Expansion D^b GP33 spezifischer CD8 T-Zellen nachgewiesen werden (*Abbildung 6.1*). Dieses Ergebnis wurde auch dann erzielt, wenn spezifische P14 T-Zellen vor der Immunisierung adoptiv transferiert wurden (*Abbildung 6.2*). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass virusinfizierte DC aus Wildtyp-Mäusen *ex vivo* nicht in der Lage sind P14 T-Zellen zu aktivieren. Im Vergleich zu OTI T-Zellen blieb eine Expansion der GP33 spezifischen CD8 T-Zellen aus (*Abbildung 6.8*). Aufgrund dieser Ergebnisse stellt sich die Frage, warum DC nicht in der Lage sind das Epitop GP33 über MHC-I D^b zu präsentieren.

Die meisten Peptidliganden für MHC-I werden durch das Proteasom generiert, entweder bereits in der finalen Form oder als Vorläufer, die dann am N-Terminus von Proteasen, wie beispielsweise ERAAP geschnitten werden. Die Stimulation von Zellen durch IFN γ oder TNF führt zum Austausch dreier Untereinheiten des konstitutiven Proteasoms durch die induzierbaren Untereinheiten LMP2 (*low-molecular mass polypeptide 2*), LMP7 und MECL-1 (*multicatalytic endopeptidase complex-like-1*), welche das Immunoproteasom bilden (Groettrup et al., 2010). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass der Austausch dieser

Untereinheiten eine veränderte Substratspezifität nach sich zieht und somit eine Veränderung des T-Zellrepertoires zur Folge haben kann. So wurde beispielsweise publiziert, dass die *in vitro* Überexpression der drei induzierbaren Immunoproteasom-Untereinheiten eine Steigerung der Präsentation des H-2L^d-restringierten NP118 Epitop aus dem Nukleoprotein von LCMV nach sich zieht (Schwarz et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass DC nur das kürzere K^b restringierte GP34 Epitop, aber nicht GP33 präsentieren (*Abbildung 6.7*). Aufgrund dieser Ergebnisse sollte untersucht werden, ob die veränderte Spezifität des Immunoproteasoms dafür verantwortlich ist, dass DC nur GP34 generieren. In der Literatur werden verschiedene Inhibitoren beschrieben, um einzelne Untereinheiten des Immunoproteasoms zu blockieren. In der vorliegenden Arbeit wurden DC-MHCI und C57BL/6 Mäuse mit PR-957, einem Inhibitor der LMP7 Untereinheit (Muchamuel et al., 2009), behandelt und anschließend mit rAd-GP33 immunisiert (*Daten nicht gezeigt*). Auch nach der Inhibierung dieser Untereinheit kam es in den DC-MHCI Mäusen nicht zu einer Expansion D^b GP33 spezifischer CD8 T-Zellen. Weitere Inhibitoren wurden in dieser Arbeit nicht getestet, somit kann die Rolle des Immunoproteasoms im Bezug auf die vorliegenden Ergebnisse nicht abschließend geklärt werden. Allerdings konnte in LMP2- defizienten Mäusen keine Änderung der CTL Antworten auf die Epitope GP33, GP276 und NP396 von LCMV nachgewiesen werden (Basler et al., 2004; Nussbaum et al., 2005) und in LMP7- defizienten Mäusen kam es lediglich zu einer gesteigerten Antwort auf das LCMV Epitop GP276.

Gegen einen Beitrag des Immunoproteasoms bei der hier angesprochenen Fragestellung spricht, dass in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass BMDC, die *in vitro* mit rAd-GP33 infiziert wurden in der Lage sind D^b GP33 spezifische T-Zellen zu aktivieren (*Abbildung 6.9*). Es ist davon auszugehen, dass durch die viralen inflammatorischen Signale in diesen BMDC das Immunoproteasom aktiv war. Sollte das Immunoproteasom die Generierung des längeren Epitops GP33 verhindern, so hätte es *in vitro* nicht zu einer Aktivierung der P14 T-Zellen kommen sollen. Darüber hinaus kommt es auch in MΦ durch IFN γ und TNF zur Aktivierung des Immunoproteasoms, würde dieses eine Rolle für GP33 spielen, dann sollte vermutlich auch in MΦ nur das kürzere Epitop generiert werden.

Die immun-histologischen Untersuchungen nach der Immunisierung mit rAd-GFP, durch die die Lokalisation des Virus in der Milz verfolgt wurde, ergaben, dass 48 Stunden nach Infektion GFP in der MZ zu finden ist (*Abbildung 6.10 A*). Detailliertere histologische Analysen in Milz und Haut-drainierenden Lymphknoten zeigten, dass GFP mit CD169⁺ und

SIGN-R1⁺ MΦ kolokalisiert (*Abbildung 6.12 und 6.13*). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass DC *in vivo* nicht direkt durch den Adenovektor infiziert werden. Allerdings ergab die Analyse mit einem weiteren Multimer, dass DC für die Expansion K^b GP34 spezifischer T-Zellen verantwortlich sind (*Abbildung 6.7*). Da keine direkte Infektion der DC mit rAd-GFP nachweisbar war, es aber in den DC-MHCI Mäusen zu einer Expansion K^b GP34 spezifischer CD8 T-Zellen kam, spricht dies dafür, dass die Aktivierung dieser T-Zellen durch Kreuzpräsentation vermittelt wird, wohingegen anscheinend das längere D^b GP33 Epitop nicht kreuzpräsentiert wird. Daten von Wolkers et al. (Wolkers et al., 2004) sprechen dafür, dass GP33 nicht kreuzpräsentiert wird. Bei dem Epitop GP33 aus dem Glycoprotein von LCMV handelt es sich um ein Signalpeptid und es wurde gezeigt, dass solche Peptide nur sehr ineffizient kreuzpräsentiert werden. Dazu wurden zwei verschiedene Epitope (NP₃₆₆ und E7₄₉) in ein GFP-Fusions Molekül inseriert, wobei bei einem der Konstrukte NP₃₆₆ in den N-Terminus des Signalpeptids eingefügt wurde und E7₄₉ in den C-Terminus, bei dem zweiten Konstrukt verhielt es sich genau umgekehrt. Mäuse die mit RMA-S Tumorzelllinien, die diese Konstrukte beinhalteten, behandelt worden sind, zeigten immer eine stärkere Expansion von T-Zellen spezifisch für das jeweils im C-Terminus lokalisierte Epitop. Auch wenn mit dieser Untersuchung nicht direkt GP33 analysiert wurde, spricht einiges dafür, dass Signalpeptide wie GP33 nicht kreuzpräsentiert werden. Dabei wird diskutiert, dass Signalpeptide nur sehr ineffizient kreuzpräsentiert werden, da sie sehr schnell abgebaut werden. Freigang et al. (Freigang et al., 2007) generierten eine lösliche nicht spaltbare GP Variante und konnten damit zeigen, dass diese Modifikationen zu einer gesteigerten Kreuzpräsentation dieses Antigens und zur Aktivierung spezifischer CTL führten. Allerdings liegt GP33 im Fall des in dieser Arbeit verwendeten Adenovektors nicht als Signalpeptid vor. Die Daten von Wolkers et al. (Wolkers et al., 2004) sind also vor allem im Bezug auf LCMV interessant und nach Immunisierung der DC-MHCI Mäuse mit diesem Virus konnte nur eine sehr ineffiziente D^b GP33 spezifische T-Zellantwort detektiert werden (*Abbildung 6.14*). Die bisher veröffentlichten Arbeiten zu Kreuzpräsentation von GP33 unterscheiden nicht zwischen den beiden überlappenden Epitopen im GP von LCMV. Entweder wurden funktionelle Analysen, wie beispielsweise Restimulationsassays durchgeführt, die aber keine Unterscheidung der beiden Epitope zulassen, oder es wurde mittels Multimeren die Expansion D^b spezifischer T-Zellen untersucht. Durch die Verwendung D^b und K^b spezifischer Multimere konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass DC, solange

sie nicht direkt infiziert werden nur GP34 generieren können und nur die direkt infizierten MΦ präsentieren sowohl das K^b als auch das D^b restriktierte Epitop.

Wie bereits erwähnt werden in der Literatur derzeit zwei Wege der Kreuzpräsentation diskutiert, der zytosolische und der vakuoläre Weg (*Abbildung 4.1*) (Joffre et al., 2012). Beim zytosolischen Weg, welchem derzeit die größere Bedeutung beigemessen wird, können nach der Phagozytose exogener Antigene, diese in das Zytosol entlassen werden und durch das Proteasom abgebaut werden. Die so prozessierten Antigene können schließlich über TAP in das ER transportiert und dort auf MHC-I geladen werden, oder es kommt zu einem Rücktransport in die Phagosomen und die dortige Beladung auf MHC-I. Da bei dieser Art der Kreuzpräsentation ähnliche Mechanismen (proteasomaler Abbau), wie bei der direkten Präsentation über MHC-I greifen, kann dieser Weg für GP33 ausgeschlossen werden, da gezeigt werden konnte, dass direkt infizierte DC das GP33 Epitop generieren können (*Abbildung 6.9*). Demnach bleibt der vakuoläre Kreuzpräsentationsweg bei dem die aufgenommen Antigene in Phagosomen abgebaut und auf MHC-I geladen werden.

Darüber hinaus wird in der Literatur diskutiert, welche Bedingungen vorliegen müssen, damit exogen aufgenommene Antigene überhaupt in den Kreuzpräsentationsweg gelangen und nicht über MHC-II an CD4⁺ T-Zellen präsentiert werden. So konnten beispielsweise Burgdorf et al. (Burgdorf et al., 2007) zeigen, dass der Rezeptor über den das Antigen aufgenommen wird, eine entscheidende Rolle spielt. Die Aufnahme exogener Antigene über den Mannoserezzeptor führt dazu, dass das aufgenommene Antigen in frühe endosomale Kompartimente gelangt und dies führt letztlich zur Kreuzpräsentation. Darüber hinaus gibt es Hinweise dafür, dass auch der DC Endozytoserezzeptor DEC-205, in ähnlicher Weise mit frühen Endosomen verknüpft ist. Exogene Antigene, die diesem Rezeptor, der von CD8α⁺ DC exprimiert wird, zugeführt wurden, werden kreuzpräsentiert (Dudziak et al., 2007). Ähnliche Ergebnisse konnten Mukhopadhyay et al. (Mukhopadhyay et al., 2008) erzielen. Sie führten einen adoptiven Transfer CFSE gefärbter GP33 spezifischer T-Zellen durch und immunisierten die Empfängertiere mit anti-DEC205-GP33 und konnten dann sowohl in den Lymphknoten als auch in der Milz Proliferation D^b GP33 spezifischer T-Zellen nachweisen.

7.4 DC-spezifische Vakzinierung

Die Anzahl der Gedächtnis-CTL ist direkt proportional zu der Größe der klonalen Expansion der entsprechenden naiven T-Zellen (Hou et al., 1994). Aufgrund dessen wird bei der Entwicklung neuer Impfstrategien unter anderem darauf Wert gelegt, die primäre Expansion naiver CD8 T-Zellen zu optimieren. Wie bereits erwähnt, konnten Gruber et al. (Gruber et al., 2010) nach der Immunisierung von C57BL/6 und DC-MHCI Mäusen mit einem replikationsdefizienten rekombinanten HSV-OVA Vektor eine höhere Expansion spezifischer T-Zellen sowohl für OVA, als auch für Glykoprotein B des Herpes Simplex Virus in DC-MHCI Mäusen nachweisen. Diese Ergebnisse liefern eine Erklärung für die Effizienz von Vakzinen, bei denen das Antigen *in vivo* DC zugeführt wird, wie beispielsweise durch Antikörper gegen DEC205/CD205 (Bonifaz et al., 2004). Durch die Immunisierung mit rAd-OVA konnten in der vorliegenden Arbeit ähnliche Ergebnisse erzielt werden. So kam es in den DC-MHCI Mäusen zu einer ca. zwei- bis dreifach stärkeren Expansion OVA-spezifischer T-Zellen als in den Wildtyp-Mäusen (*Abbildung 6.1*). Da, wie bereits angesprochen GFP Expression nur in MΦ der MZ detektiert werden konnte, scheint auch die OVA spezifische Antwort auf Kreuzpräsentation zurückzuführen zu sein. Durch die Immunisierung von C57BL/6 Mäusen mit Ig-OVA, das kreuzpräsentiert wird, im Vergleich zu der Verabreichung von Ig-OVA in Kombination mit OVA-Peptid, fanden Gruber et al (Gruber et al., 2010) heraus, dass auch im Fall der Kreuzpräsentation die Expression des Peptids auf allen Zellen zu einer verminderten Expansion spezifischer T-Zellen führt.

Impfstoffe, die das Antigen selektiv DC zuführen, können also einen entscheidenden Vorteil haben gegenüber solchen, die das Antigen ubiquitär verteilen. In der vorliegenden Arbeit konnte, wie bereits erwähnt, gezeigt werden, dass DC, solange sie nicht direkt infiziert werden nur GP34 spezifische T-Zellen aktivieren (*Abbildung 6.7*). Ob die beobachtete Dichotomie zwischen direkter- und Kreuzpräsentation bezüglich der Epitopspezifität auch für andere Antigene zu treffend ist, bleibt zu klären.

7.5 Schlussfolgerungen und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl durch immun-histologische Analysen nach der Immunisierung mit rAd-GFP (*Abbildung 6.10 und 6.12*), als auch durch die Depletion der MΦ mittels Clodronat gezeigt (*Abbildung 6.16*), dass MMM und MZM entscheidend sind für die Aktivierung D^b spezifischer T-Zellen. In der Literatur wird das Mausmodell CD169-DTR beschrieben, wobei die Depletion der MΦ durch DT auf dem gleichen System beruht, wie die Depletion der DC in den CD11c-DTR Mäusen (Miyake et al., 2007). Miyake et al. führten die humane DTR cDNS in das CD169 Sialoadhesin Gen ein, das spezifisch von MMM exprimiert wird. Es wäre interessant, diese Mäuse mit rAd-GP33 oder auch mit LCMV-WE zu immunisieren, um sowohl mittels K^b und D^b Multimeren die Expansion der T-Zellen zu analysieren, als auch funktionelle Assays durchzuführen. Da in diesen Mäusen DC noch vorhanden sind, MMM und MZM aber nicht, besteht die Möglichkeit, dass es *in vivo* zu einer direkten Infektion der DC kommt und diese dann, ähnlich wie *in vitro* gezeigt werden konnte (*Abbildung 6.9*), D^b GP33 spezifische T-Zellen aktivieren können. Sollte es auch in den CD169-DTR Mäusen nicht zu einer direkten Infektion der DC kommen, dann wäre wieder nur eine K^b GP34 spezifische T-Zellantwort zu erwarten. In den DC-MHCI Mäusen, in denen dieses Ergebnis erzielt wurde, sind MΦ noch vorhanden, exprimieren aber kein MHC-I (*Abbildung 6.10 B*). Zu welchem Ergebnis das Fehlen der MΦ in der MZ der CD169-DTR Mäuse führt, bleibt zu untersuchen.

Mit den in dieser Arbeit durchgeführten Analysen konnte nicht zwischen MMM und MZM unterschieden werden. Auch mit den CD169-DTR Mäusen ließe sich die Frage welcher MΦ-Typ entscheiden ist für die Aktivierung D^b spezifischer T-Zellen nicht abschließend klären. Miyake et al. zeigten, dass es in diesen Mäusen nach Gabe von DT sowohl zu einer Depletion der MMM (CD169⁺) als auch der MZM (SIGN-R1⁺) kommt. Die Autoren konnten die Expression der CD169 mRNA in beiden Arten von MΦ detektieren, allerdings ist das Expressionslevel in den MZM etwas geringer als in den MMM.

Dies deckt sich mit den immun-histologischen Analysen (*Abbildung 6.12*), die eine Unterscheidung zwischen MMM und MZM nicht erlaubten, da doppelt positive Zellen in der MZ zu finden waren.

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten funktionellen Analysen ergaben weder qualitative noch quantitative Unterschiede im Bezug auf T-Zell-Effektorfunktionen (*Abbildung 6.1 und 6.15*). Sowohl in den Δ -DC als auch in den DC-MHCI-Mäusen konnten im Vergleich zu C57BL/6 immer die gleichen Mengen an T-Zellen, die CD107a und IFN γ oder nur IFN γ produzieren, detektiert werden. Allerdings wurden die Experimente sowohl nach Immunisierung mit rAd-GP33, als auch mit LCMV-WE immer am Höhepunkt der Antwort durchgeführt. Eine Analyse der Gedächtnisantworten um zu untersuchen, wie sich der Gedächtnispool entwickelt, wenn beispielsweise nur DC das Antigen präsentieren können oder DC depletiert wurden, könnte in diesem Zusammenhang noch untersucht werden. Dies wird sich aber nur schwer realisieren lassen, da die Δ -DC Mäuse mit zunehmendem Alter erkranken (Ohnmacht et al., 2009).

Wie bereits beschrieben, konnten GFP positive Zellen nach der Immunisierung mit rAd-GFP sowohl in der Milz als auch in den Haut-drainierenden Lymphknoten 48 Stunden nach Immunisierung in MMM und MZM der MZ detektiert werden (*Abbildung 6.12 und 6.13*). Die Lokalisation des GFP änderte sich nicht bis zu sieben Tage nach Immunisierung (*Daten nicht gezeigt*). Dies liegt vermutlich daran, dass es sich bei dem Vektor um ein replikationsdefizientes Virus handelt. Bei LCMV-WE hingegen ist dies nicht der Fall, weshalb die Lokalisation dieses Virus in Milz und Lymphknoten nach Immunisierung noch untersucht werden soll. Da LCMV-GFP nicht zur Verfügung steht, wird mit dem Antikörper VL4 gearbeitet werden. Smelt et al. (Smelt et al., 2001) konnten zeigen, dass an Tag eins nach Immunisierung das Virus vor allem in der MZ detektierbar ist. Ob sich das Virus in den folgenden Tagen in der weißen Pulpa ausbreitet und eher eine persistierende Infektion zur Folge hat, oder ob es in der roten Pulpa repliziert und relativ schnell eliminiert werden kann, ist abhängig vom LCMV Stamm. Dabei konnten Smelt et al. zeigen, dass die Affinität des Virus zu seinem Rezeptor α -DG maßgeblich dafür ist, in welcher Region das Virus nach Tag eins repliziert. So führt eine starke Affinität des Virusstammes zu diesem Rezeptor eher zu einer Replikation in der weißen Pulpa, wohingegen schwachbindende Stämme eher in der roten Pulpa replizieren. Darüber hinaus zeigten Sevilla et al. (Sevilla et al., 2000), dass α -DG hauptsächlich von CD11c $^+$ Zellen exprimiert wird und dass die Interaktion zwischen Virus und Rezeptor auf DC zu deren Infektion führt. Dass macht sie zur Zielscheibe, sie werden von spezifischen T-Zellen eliminiert, was letztlich persistierende Infektionen auslösen kann. Um dies genauer in der DC-MHCI Maus und in den DC-defizienten Mausstämmen zu

Diskussion

untersuchen, sollen immun-histologische Analysen an verschiedenen Tagen nach Immunisierung durchgeführt werden, wobei neben LCMV-WE auch noch zwei weitere Stämme verwendet werden sollen, die sich in ihrer Affinität zu α -DG unterscheiden.

8 Literaturverzeichnis

Achour, A., Michaelsson, J., Harris, R.A., Odeberg, J., Grufman, P., Sandberg, J.K., Levitsky, V., Karre, K., Sandalova, T., Schneider, G. (2002). A structural basis for LCMV immune evasion: subversion of H-2D(b) and H-2K(b) presentation of gp33 revealed by comparative crystal structure. *Analyses. Immunity* 17, 757-768.

Aichele, P., Zinke, J., Grode, L., Schwendener, R.A., Kaufmann, S.H., Seiler, P. (2003). Macrophages of the splenic marginal zone are essential for trapping of blood-borne particulate antigen but dispensable for induction of specific T cell responses. *J Immunol* 171, 1148-1155.

Altman, J.D., Moss, P.A., Goulder, P.J., Barouch, D.H., McHeyzer-Williams, M.G., Bell, J.I., McMichael, A.J., Davis, M.M. (1996). Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274, 94-96.

Annacker, O., Pimenta-Araujo, R., Burlen-Defranoux, O., Bandeira, A. (2001). On the ontogeny and physiology of regulatory T cells. *Immunol Rev* 182, 5-17.

Asano, K., Nabeyama, A., Miyake, Y., Qiu, C.H., Kurita, A., Tomura, M., Kanagawa, O., Fujii, S., Tanaka, M. (2011). CD169-positive macrophages dominate antitumor immunity by crosspresenting dead cell-associated antigens. *Immunity* 34, 85-95.

Backer, R., Schwandt, T., Greuter, M., Oosting, M., Jungerkes, F., Tuting, T., Boon, L., O'Toole, T., Kraal, G., Limmer, A., den Haan, J.M. (2010). Effective collaboration between marginal metallophilic macrophages and CD8+ dendritic cells in the generation of cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 216-221.

Bar-On, L., Jung, S. (2010). Defining dendritic cells by conditional and constitutive cell ablation. *Immunol Rev* 234, 76-89.

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

Basler, M., Youhnovski, N., Van Den Broek, M., Przybylski, M., Groettrup, M. (2004). Immunoproteasomes down-regulate presentation of a subdominant T cell epitope from lymphocytic choriomeningitis virus. *J Immunol* 173, 3925-3934.

Belz, G.T., Nutt, S.L. (2012). Transcriptional programming of the dendritic cell network. *Nat Rev Immunol* 12, 101-113.

Bennett, C.L., Clausen, B.E. (2007). DC ablation in mice: promises, pitfalls, and challenges. *Trends Immunol* 28, 525-531.

Birnberg, T., Bar-On, L., Sapoznikov, A., Caton, M.L., Cervantes-Barragan, L., Makia, D., Krauthgamer, R., Brenner, O., Ludewig, B., Brockschnieder, D., *et al.* (2008). Lack of conventional dendritic cells is compatible with normal development and T cell homeostasis, but causes myeloid proliferative syndrome. *Immunity* 29, 986-997.

Boise, L.H., Minn, A.J., Noel, P.J., June, C.H., Accavitti, M.A., Lindsten, T., Thompson, C.B. (1995). CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* 3, 87-98.

Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, M.C., 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+ T cell tolerance. *J Exp Med* 196, 1627-1638.

Bonifaz, L.C., Bonnyay, D.P., Charalambous, A., Darguste, D.I., Fujii, S., Soares, H., Brimnes, M.K., Moltedo, B., Moran, T.M., Steinman, R.M. (2004). In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J Exp Med* 199, 815-824.

Brandle, D., Brduscha-Riem, K., Hayday, A.C., Owen, M.J., Hengartner, H., Pircher, H. (1995). T cell development and repertoire of mice expressing a single T cell receptor alpha chain. *Eur J Immunol* 25, 2650-2655.

Brasel, K., De Smedt, T., Smith, J.L., Maliszewski, C.R. (2000). Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures. *Blood* 96, 3029-3039.

Burgdorf, S., Kautz, A., Bohnert, V., Knolle, P.A., Kurts, C. (2007). Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science* 316, 612-616.

Campbell, D.J., Koch, M.A. (2011). Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 11, 119-130.

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

Cao, W., Henry, M.D., Borrow, P., Yamada, H., Elder, J.H., Ravkov, E.V., Nichol, S.T., Compans, R.W., Campbell, K.P., Oldstone, M.B. (1998). Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science* 282, 2079-2081.

- Carbone, F.R., Kurts, C., Bennett, S.R., Miller, J.F., Heath, W.R. (1998). Cross-presentation: a general mechanism for CTL immunity and tolerance. *Immunol Today* *19*, 368-373.
- Carrasco, Y.R., Batista, F.D. (2007). B cells acquire particulate antigen in a macrophage-rich area at the boundary between the follicle and the subcapsular sinus of the lymph node. *Immunity* *27*, 160-171.
- Caton, M.L., Smith-Raska, M.R., Reizis, B. (2007). Notch-RBP-J signaling controls the homeostasis of CD8- dendritic cells in the spleen. *J Exp Med* *204*, 1653-1664.
- Crocker, P.R., Gordon, S. (1989). Mouse macrophage hemagglutinin (sheep erythrocyte receptor) with specificity for sialylated glycoconjugates characterized by a monoclonal antibody. *J Exp Med* *169*, 1333-1346.
- Doyle, M.V., Oldstone, M.B. (1978). Interactions between viruses and lymphocytes. I. In vivo replication of lymphocytic choriomeningitis virus in mononuclear cells during both chronic and acute viral infections. *J Immunol* *121*, 1262-1269.
- Dresch, C., Leverrier, Y., Marvel, J., Shortman, K. (2012). Development of antigen cross-presentation capacity in dendritic cells. *Trends Immunol* *33*, 381-388.
- Dudziak, D., Kamphorst, A.O., Heidkamp, G.F., Buchholz, V.R., Trumppheller, C., Yamazaki, S., Cheong, C., Liu, K., Lee, H.W., Park, C.G., *et al.* (2007). Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* *315*, 107-111.
- Dunon, D., Kaufman, J., Salomonsen, J., Skjoedt, K., Vainio, O., Thiery, J.P., Imhof, B.A. (1990). T cell precursor migration towards beta 2-microglobulin is involved in thymus colonization of chicken embryos. *Embo J* *9*, 3315-3322.
- Dutko, F.J., Oldstone, M.B. (1983). Genomic and biological variation among commonly used lymphocytic choriomeningitis virus strains. *J Gen Virol* *64* (Pt 8), 1689-1698.
- Freigang, S., Eschli, B., Harris, N., Geuking, M., Quirin, K., Schrempf, S., Zellweger, R., Weber, J., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M. (2007). A lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein variant that is retained in the endoplasmic reticulum efficiently cross-primes CD8+ T cell responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *104*, 13426-13431.
- Geijtenbeek, T.B., Groot, P.C., Nolte, M.A., van Vliet, S.J., Gangaram-Panday, S.T., van Duijnhoven, G.C., Kraal, G., van Oosterhout, A.J., van Kooyk, Y. (2002). Marginal zone macrophages express a murine homologue of DC-SIGN that captures blood-borne antigens in vivo. *Blood* *100*, 2908-2916.
- Gilboa, E. (2007). DC-based cancer vaccines. *J Clin Invest* *117*, 1195-1203.

- Griffin, T.A., Nandi, D., Cruz, M., Fehling, H.J., Kaer, L.V., Monaco, J.J., Colbert, R.A. (1998). Immunoproteasome assembly: cooperative incorporation of interferon gamma (IFN-gamma)-inducible subunits. *J Exp Med* 187, 97-104.
- Groettrup, M., Kirk, C.J., Basler, M. (2010). Proteasomes in immune cells: more than peptide producers? *Nat Rev Immunol* 10, 73-78.
- Gruber, A., Brocker, T. (2005). MHC class I-positive dendritic cells (DC) control CD8 T cell homeostasis in vivo: T cell lymphopenia as a prerequisite for DC-mediated homeostatic proliferation of naive CD8 T cells. *J Immunol* 175, 201-206.
- Gruber, A., Cannarile, M.A., Cheminay, C., Ried, C., Marconi, P., Hacker, G., Brocker, T. (2010). Parenchymal cells critically curtail cytotoxic T-cell responses by inducing Bim-mediated apoptosis. *Eur J Immunol* 40, 966-975.
- Hammer, G.E., Gonzalez, F., Champsaur, M., Cado, D., Shastri, N. (2005). The aminopeptidase ERAAP shapes the peptide repertoire displayed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nat Immunol* 7, 103-112.
- Harty, J.T., Tvinneim, A.R., White, D.W. (2000). CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu Rev Immunol* 18, 275-308.
- Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., Ravetch, J.V., Steinman, R.M., Nussenzweig, M.C. (2001). Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* 194, 769-779.
- Homann, D., McGavern, D.B., Oldstone, M.B. (2004). Visualizing the viral burden: phenotypic and functional alterations of T cells and APCs during persistent infection. *J Immunol* 172, 6239-6250.
- Honke, N., Shaabani, N., Cadeddu, G., Sorg, U.R., Zhang, D.E., Trilling, M., Klingel, K., Sauter, M., Kandolf, R., Gailus, N., *et al.* (2012). Enforced viral replication activates adaptive immunity and is essential for the control of a cytopathic virus. *Nat Immunol* 13, 51-57.
- Hou, S., Hyland, L., Ryan, K.W., Portner, A., Doherty, P.C. (1994). Virus-specific CD8+ T-cell memory determined by clonal burst size. *Nature* 369, 652-654.
- Hsieh, C.S., deRoos, P., Honey, K., Beers, C., Rudensky, A.Y. (2002). A role for cathepsin L and cathepsin S in peptide generation for MHC class II presentation. *J Immunol* 168, 2618-2625.
- Hudrisier, D., Oldstone, M.B., Gairin, J.E. (1997). The signal sequence of lymphocytic choriomeningitis virus contains an immunodominant cytotoxic T cell epitope that is restricted by both H-2D(b) and H-2K(b) molecules. *Virology* 234, 62-73.

- Iannacone, M., Moseman, E.A., Tonti, E., Bosurgi, L., Junt, T., Henrickson, S.E., Whelan, S.P., Guidotti, L.G., von Andrian, U.H. (2010). Subcapsular sinus macrophages prevent CNS invasion on peripheral infection with a neurotropic virus. *Nature* *465*, 1079-1083.
- Joffre, O.P., Segura, E., Savina, A., Amigorena, S. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol* *12*, 557-569.
- 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⁺ dendritic cells abrogates priming of CD8⁺ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* *17*, 211-220.
- Junt, T., Moseman, E.A., Iannacone, M., Massberg, S., Lang, P.A., Boes, M., Fink, K., Henrickson, S.E., Shayakhmetov, D.M., Di Paolo, N.C., *et al.* (2007). Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells. *Nature* *450*, 110-114.
- Kawai, T., Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* *11*, 373-384.
- Khare, R., Chen, C.Y., Weaver, E.A., Barry, M.A. (2011). Advances and future challenges in adenoviral vector pharmacology and targeting. *Curr Gene Ther* *11*, 241-258.
- Kundig, T.M., Bachmann, M.F., DiPaolo, C., Simard, J.J., Battegay, M., Lother, H., Gessner, A., Kuhlcke, K., Ohashi, P.S., Hengartner, H., *et al.* (1995). Fibroblasts as efficient antigen-presenting cells in lymphoid organs. *Science* *268*, 1343-1347.
- Kurts, C., Cannarile, M., Klebba, I., Brocker, T. (2001). Dendritic cells are sufficient to cross-present self-antigens to CD8 T cells in vivo. *J Immunol* *166*, 1439-1442.
- Kyewski, B., Derbinski, J. (2004). Self-representation in the thymus: an extended view. *Nat Rev Immunol* *4*, 688-698.
- Ladi, E., Yin, X., Chtanova, T., Robey, E.A. (2006). Thymic microenvironments for T cell differentiation and selection. *Nat Immunol* *7*, 338-343.
- Lasaro, M.O., Ertl, H.C. (2009). New insights on adenovirus as vaccine vectors. *Mol Ther* *17*, 1333-1339.
- Marrack, P., Kappler, J. (1987). The T cell receptor. *Science* *238*, 1073-1079.
- Martinez-Pomares, L., Gordon, S. (2012). CD169⁺ macrophages at the crossroads of antigen presentation. *Trends Immunol* *33*, 66-70.

Meredith, M.M., Liu, K., Darrasse-Jeze, G., Kamphorst, A.O., Schreiber, H.A., Guermonprez, P., Idoyaga, J., Cheong, C., Yao, K.H., Niec, R.E., Nussenzweig, M.C. (2012). Expression of the zinc finger transcription factor zDC (Zbtb46, Btbd4) defines the classical dendritic cell lineage. *J Exp Med* *209*, 1153-1165.

Miyake, Y., Asano, K., Kaise, H., Uemura, M., Nakayama, M., Tanaka, M. (2007). Critical role of macrophages in the marginal zone in the suppression of immune responses to apoptotic cell-associated antigens. *J Clin Invest* *117*, 2268-2278.

Muchamuel, T., Basler, M., Aujay, M.A., Suzuki, E., Kalim, K.W., Lauer, C., Sylvain, C., Ring, E.R., Shields, J., Jiang, J., *et al.* (2009). A selective inhibitor of the immunoproteasome subunit LMP7 blocks cytokine production and attenuates progression of experimental arthritis. *Nat Med* *15*, 781-787.

Mukhopadhyaya, A., Hanafusa, T., Jarchum, I., Chen, Y.G., Iwai, Y., Serreze, D.V., Steinman, R.M., Tarbell, K.V., DiLorenzo, T.P. (2008). Selective delivery of beta cell antigen to dendritic cells in vivo leads to deletion and tolerance of autoreactive CD8+ T cells in NOD mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 6374-6379.

Munks, M.W., Gold, M.C., Zajac, A.L., Doom, C.M., Morello, C.S., Spector, D.H., Hill, A.B. (2006). Genome-wide analysis reveals a highly diverse CD8 T cell response to murine cytomegalovirus. *J Immunol* *176*, 3760-3766.

Murphy, K.M., Reiner, S.L. (2002). The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* *2*, 933-944.

Naglich, J.G., Metherall, J.E., Russell, D.W., Eidels, L. (1992). Expression cloning of a diphtheria toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like growth factor precursor. *Cell* *69*, 1051-1061.

Naik, S.H., Proietto, A.I., Wilson, N.S., Dakic, A., Schnorrer, P., Fuchsberger, M., Lahoud, M.H., O'Keeffe, M., Shao, Q.X., Chen, W.F., *et al.* (2005). Cutting edge: generation of splenic CD8+ and CD8- dendritic cell equivalents in Fms-like tyrosine kinase 3 ligand bone marrow cultures. *J Immunol* *174*, 6592-6597.

Nussbaum, A.K., Rodriguez-Carreno, M.P., Benning, N., Botten, J., Whitton, J.L. (2005). Immunoproteasome-deficient mice mount largely normal CD8+ T cell responses to lymphocytic choriomeningitis virus infection and DNA vaccination. *J Immunol* *175*, 1153-1160.

Odermatt, B., Eppler, M., Leist, T.P., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M. (1991). Virus-triggered acquired immunodeficiency by cytotoxic T-cell-dependent destruction of antigen-presenting cells and lymph follicle structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 8252-8256.

Ohnmacht, C., Pullner, A., King, S.B., Drexler, I., Meier, S., Brocker, T., Voehringer, D. (2009). Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *J Exp Med* *206*, 549-559.

Palmer, E. (2003). Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol* *3*, 383-391.

Pircher, H., Burki, K., Lang, R., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M. (1989). Tolerance induction in double specific T-cell receptor transgenic mice varies with antigen. *Nature* *342*, 559-561.

Platt, C.D., Ma, J.K., Chalouni, C., Ebersold, M., Bou-Reslan, H., Carano, R.A., Mellman, I., Delamarre, L. (2010). Mature dendritic cells use endocytic receptors to capture and present antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 4287-4292.

Probst, H.C., Tschannen, K., Odermatt, B., Schwendener, R., Zinkernagel, R.M., Van Den Broek, M. (2005a). Histological analysis of CD11c-DTR/GFP mice after in vivo depletion of dendritic cells. *Clin Exp Immunol* *141*, 398-404.

Probst, H.C., van den Broek, M. (2005b). Priming of CTLs by lymphocytic choriomeningitis virus depends on dendritic cells. *J Immunol* *174*, 3920-3924.

Reis e Sousa, C. (2006). Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* *6*, 476-483.

Saric, T., Chang, S.-C., Hattori, A., York, I.A., Markant, S., Rock, K.L., Tsujimoto, M., Goldberg, A.L. (2002). An IFN- γ -induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat Immunol* *3*, 1169-1176.

Sathe, P., Pooley, J., Vremec, D., Mintern, J., Jin, J.O., Wu, L., Kwak, J.Y., Villadangos, J.A., Shortman, K. (2011). The acquisition of antigen cross-presentation function by newly formed dendritic cells. *J Immunol* *186*, 5184-5192.

Saveanu, L., Carroll, O., Weimershaus, M., Guermonprez, P., Firat, E., Lindo, V., Greer, F., Davoust, J., Kratzer, R., Keller, S.R., *et al.* (2009). IRAP identifies an endosomal compartment required for MHC class I cross-presentation. *Science* *325*, 213-217.

Schwarz, K., van Den Broek, M., Kostka, S., Kraft, R., Soza, A., Schmidtke, G., Kloetzel, P.M., Groettrup, M. (2000). Overexpression of the proteasome subunits LMP2, LMP7, and MECL-1, but not PA28 alpha/beta, enhances the presentation of an immunodominant lymphocytic choriomeningitis virus T cell epitope. *J Immunol* *165*, 768-778.

Segura, E., Villadangos, J.A. (2009). Antigen presentation by dendritic cells in vivo. *Curr Opin Immunol* *21*, 105-110.

- Seiler, P., Aichele, P., Odermatt, B., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., Schwendener, R.A. (1997). Crucial role of marginal zone macrophages and marginal zone metallophilis in the clearance of lymphocytic choriomeningitis virus infection. *Eur J Immunol* 27, 2626-2633.
- Sevilla, N., Kunz, S., Holz, A., Lewicki, H., Homann, D., Yamada, H., Campbell, K.P., de La Torre, J.C., Oldstone, M.B. (2000). Immunosuppression and resultant viral persistence by specific viral targeting of dendritic cells. *J Exp Med* 192, 1249-1260.
- Sigal, L.J., Rock, K.L. (2000). Bone marrow-derived antigen-presenting cells are required for the generation of cytotoxic T lymphocyte responses to viruses and use transporter associated with antigen presentation (TAP)-dependent and -independent pathways of antigen presentation. *J Exp Med* 192, 1143-1150.
- Smelt, S.C., Borrow, P., Kunz, S., Cao, W., Tishon, A., Lewicki, H., Campbell, K.P., Oldstone, M.B. (2001). Differences in affinity of binding of lymphocytic choriomeningitis virus strains to the cellular receptor alpha-dystroglycan correlate with viral tropism and disease kinetics. *J Virol* 75, 448-457.
- Steinman, R.M., Banchereau, J. (2007). Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 449, 419-426.
- Subudhi, S.K., Alegre, M.L., Fu, Y.X. (2005). The balance of immune responses: costimulation verse coinhibition. *J Mol Med (Berl)* 83, 193-202.
- Takahama, Y. (2006). Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol* 6, 127-135.
- Thomas, S., Kolumam, G.A., Murali-Krishna, K. (2007). Antigen presentation by nonhemopoietic cells amplifies clonal expansion of effector CD8 T cells in a pathogen-specific manner. *J Immunol* 178, 5802-5811.
- van den Berg, T.K., Breve, J.J., Damoiseaux, J.G., Dopp, E.A., Kelm, S., Crocker, P.R., Dijkstra, C.D., Kraal, G. (1992). Sialoadhesin on macrophages: its identification as a lymphocyte adhesion molecule. *J Exp Med* 176, 647-655.
- van Rooijen, N., Sanders, A., van den Berg, T.K. (1996). Apoptosis of macrophages induced by liposome-mediated intracellular delivery of clodronate and propamidine. *J Immunol Methods* 193, 93-99.
- von Boehmer, H. (1994). Positive selection of lymphocytes. *Cell* 76, 219-228.
- von Boehmer, H., Fehling, H.J. (1997). Structure and function of the pre-T cell receptor. *Annu Rev Immunol* 15, 433-452.

Wolkers, M.C., Brouwenstijn, N., Bakker, A.H., Toebe, M., Schumacher, T.N. (2004). Antigen bias in T cell cross-priming. *Science 304*, 1314-1317.

Zinkernagel, R.M., Doherty, P.C. (1974). Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature 251*, 547-548.

10 Danksagung

Herrn Prof. Thomas Brocker möchte ich für die gute Betreuung während meiner Dissertation, zahlreiche, hilfreiche Diskussionen, neue Ideen und die Möglichkeit zu verschiedenen Kongressen zu reisen, danken.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei allen Labor-Kollegen für die fröhliche und lockere Atmosphäre. Im Besonderen möchte ich mich bei Christine Ried bedanken für die Organisation des Labors, ihre Hilfsbereitschaft und ihre Unterstützung beim Anfertigen der immun-histologischen Analysen. Herzlich bedanken möchte ich mich bei Christian Barthels, für das Lesen dieser Arbeit, dafür dass ich mit ihm immer über mein Projekt sprechen konnte und dass ihm die Mensa auch nicht gefällt.

Bei Andrea Bol möchte ich mich herzlich für die „Spezialbehandlung“ bedanken und beim gesamten Tierstall Team für die gute Betreuung unserer Mäuse.

Dr. Florian Kreppel danke ich für die Versorgung mit Adenovektoren und Prof. Daniel Pinschewer für die Bereitstellung des Vaccinia Virus.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Familie für die jahrelange Unterstützung.