

# **Homöostatische Proliferation und antigenabhängige Aktivierung zytotoxischer T-Zellen *in vivo***

**Die Bedeutung der MHC-TCR-Interaktion  
vermittelt durch Dendritische Zellen**

Dissertation der Fakultät für Biologie der  
Ludwig-Maximilians-Universität München



vorgelegt von  
Anton Gruber  
aus Großarl, Österreich

München, 10. Juli 2007

Erstgutachter:	Prof. Dr. E. Weiß
Zweitgutachter:	PD Dr. Ch. Falk
Betreuer der Arbeit:	Prof. Dr. T. Brocker
(Sondergutachter)	

Tag der mündlichen Prüfung:	10. März 2008
-----------------------------	---------------

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

Gruber A., Brocker T. MHC class I-positive dendritic cells (DC) control CD8 T cell homeostasis in vivo (2005). T cell lymphopenia as a prerequisite for DC-mediated homeostatic proliferation of naive CD8 T cells. J Immunol.; 175(1):201-6.

Gruber A., Cannarile M. A., Cheminay C., Ried C., Dornmair K., Marconi P. and Brocker T. (2007). Antigen-specific interactions between non-professional APC and CD8<sup>+</sup> T cells reduce CTL effector peak sizes and memory CD8<sup>+</sup> T cell pools. Manuskript in Vorbereitung

Lauterbach H., Gruber A., Ried C., Cheminay C., and Brocker T. (2006). Insufficient APC Capacities of Dendritic Cells in Gen Gun-Mediated DNA Vaccination. J Immunol, 176: 4600–4607.

# INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS .....	5
1 VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN.....	8
2 ZUSAMMENFASSUNG .....	10
3 EINLEITUNG .....	11
3.1 Einführung in das Immunsystem der Säugetiere .....	11
3.2 Die Induktion einer adaptiven Immunantwort .....	13
3.3 Die zentralen Komponenten der Antigenpräsentation und Antigenerkennung .....	13
3.3.1 Der Haupthistokompatibilitätskomplex .....	14
3.3.2 Der TCR .....	14
3.4 Die Antigenprozessierung und Antigenpräsentation .....	15
3.4.1 Die Prozessierung endogener Proteine und Präsentation auf MHC-Klasse-I.....	15
3.4.2 Die Prozessierung exogen-aufgenommener Proteine und Präsentation auf MHC-Klasse-II .....	16
3.4.3 Die Kreuzpräsentation exogener Proteine auf MHC-Klasse-I.....	16
3.5 Die Zellen der Antigenpräsentation .....	17
3.5.1 DC.....	17
3.5.2 Makrophagen .....	17
3.5.3 B-Zellen.....	18
3.6 Die Entwicklung und Funktion der T-Lymphozyten.....	18
3.6.1 Die Stadien der T-Zell-Entwicklung .....	18
3.6.2 Die Funktion und der Aufbau des T-Zell-Kompartiments.....	19
3.6.3 Die T-Zell-Aktivierung .....	20
3.7 Die T-Zell-Homöostase .....	21
3.7.1 Die T-Zell-Selektion.....	22
3.7.2 Das T-Zell-Überleben.....	24
3.7.3 Die T-Zell-Reaktivität .....	25
3.7.4 Die HP als antigenunabhängige Aktivierung.....	25
3.7.5 Die antigenabhängige Aktivierung .....	27
3.8 Zielsetzung der Arbeit .....	29
4 MATERIAL UND METHODEN .....	30
4.1 Material.....	30
4.1.1 Chemikalien .....	30
4.1.2 Geräte .....	30
4.1.3 Pufferlösungen und Medien .....	30

4.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	32
4.1.4	Antikörper .....	33
4.1.4	Proteine, Peptide und Oligonukleotide.....	34
4.1.5	Virale Vektoren.....	34
4.1.6	Mausstämme .....	35
4.2	Methoden .....	37
4.2.1	Molekularbiologische Methoden .....	37
4.2.1.1	Agarose-Gelelektrophorese .....	37
4.2.1.2	Isolierung genomischer DNA aus Gewebebiopsien.....	37
4.2.1.3	Isolierung von Total-RNA aus primären Zellen.....	37
4.2.1.4	Synthese von komplementärer DNA (cDNA) .....	38
4.2.1.5	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	38
4.2.1.6	Quantitative PCR.....	39
4.2.1.7	CDR3-Spektratyping (TCR-V $\beta$ -Analyse) .....	40
4.2.1.8	Transkriptomanalyse (Microarray).....	42
4.2.2	Zell- und immunbiologische Methoden .....	42
4.2.2.1	Lymphozytenanreicherung aus peripherem Blut.....	42
4.2.2.2	Organentnahme und Herstellung einer Einzelzellsuspension.....	43
4.2.2.3	Durchflusszytometrie (FACS Analyse) .....	44
4.2.2.4	Magnetische Zellseparation (MACS) .....	46
4.2.2.5	Durchflusszytometrische Zellsortierung .....	47
4.2.2.6	Adoptiver Zelltransfer.....	47
4.2.2.7	Induktion von Lymphopenie.....	48
4.2.2.8	Injektion in Mäuse.....	48
4.2.2.9	Immunisierung von Mäusen .....	48
4.2.2.10	Markierung von Zellen mit Carboxyfluorescein-Diacetate-Succinimidylester (CFSE).....	49
4.2.2.11	<i>In vivo</i> BrdU-Inkorporationstest.....	50
4.2.2.12	<i>In vivo</i> Zytotoxizitätstest.....	50
4.2.2.13	Messung der Zellproliferation <i>in vitro</i> .....	51
4.2.2.14	Statistik.....	51
5	ERGEBNISSE.....	52
5.1	Die HP zytotoxischer CD8-T-Zellen .....	52
5.1.1	Die Rolle von DC .....	52
5.1.2	Die Bedeutung von MHC-I-Molekülen .....	54
5.1.3	Die Inhibition durch endogene CD4-T-Zellen.....	56
5.2	Die antigenabhängige Proliferation zytotoxischer CD8-T-Zellen .....	57
5.2.1	Die DC-vermittelte T-Zell-Aktivierung und T-Zell-Expansion (adoptiver T-Zell-Transfer) .....	57
5.2.2	Die DC-vermittelte T-Zell-Toleranz (adoptiver T-Zell-Transfer).....	59
5.2.3	Vergleichende Analyse verschiedener Antigenformulierungen (adoptiver T-Zell-Transfer) .....	60

5.2.4	Die Antigenpräsentation durch DC <i>ex vivo</i> .....	62
5.2.4	Die DC-vermittelte T-Zell-Aktivierung und T-Zell-Expansion (endogenes T-Zell-Repertoire) .....	63
5.2.6	Charakterisierung des endogenen T-Zell-Repertoires.....	66
5.2.7	Die Analyse der Zellteilungs- und Apoptoserate.....	69
5.2.8	Vergleichende Analyse des Transkriptoms (Microarray) .....	70
5.2.9	Expressionsanalyse der Apoptose-relevanten Moleküle Bcl-2 und Bim .....	72
5.2.10	Die DC-vermittelte T-Zell-Aktivierung und T-Zell-Expansion - Auswirkung auf die Bildung von Gedächtniszellen .....	73
6	DISKUSSION .....	75
6.1	Die Bedeutung von DC für die Induktion der HP .....	75
6.1.1	DC sind ausreichend, um die HP von naiven CD8-T-Zellen zu induzieren .....	76
6.1.2	Die Expression von MHC als Voraussetzung für die HP .....	77
6.1.3	Die Koregulation der Homöostase von CD4- und CD8-T-Zellen.....	78
6.2	Die Bedeutung von DC für die antigenabhängige Aktivierung naiver CD8-T-Zellen.....	80
6.2.1	Die Induktion von T-Zell-Toleranz .....	80
6.2.2	Die Induktion einer funktionellen CTL-Antwort durch die Antigenpräsentation auf DC.....	81
7	AUSBLICK .....	87
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	88
9	LEBENS LAUF .....	98
10	DANKSAGUNG .....	100

# 1 VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

APC	antigenpräsentierende Zelle ( <i>antigen presenting cell</i> )
AICD	aktivierungsinduzierter Zelltod ( <i>activation-induced cell death</i> )
ACAD	intrinsischer Zelltod ( <i>activated cell autonomous death</i> )
BrdU	Bromodesoxyuridin
Bcl-2	B cell leukemia/lymphoma 2
BCR	B-Zell-Rezeptor ( <i>B cell receptor</i> )
Bim	bcl2-like 11
CD	Oberflächenantigen ( <i>cluster of differentiation</i> )
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
CFA	<i>complete Freud's Adjuvant</i>
CFSE	Carboxyfluorescein-diacetate-succinimidylester
cTEC	kortikale Thymusepithelzelle ( <i>cortical thymic epithelial cells</i> )
Ct	Schwellenwertzyklus ( <i>Threshold cycle</i> )
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt ( <i>cytotoxic T lymphocyte</i> )
DC	Dendritische Zelle ( <i>dendritic cell</i> )
DEC205-OVA	Ovalbumin gekoppelt an anti-DEC205-Antikörper
DN	doppelt-negativer Thymozyt, CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> ( <i>double negative</i> )
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
DP	doppelt-positiver Thymozyt, CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> ( <i>double positive</i> )
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsorter ( <i>fluorescence activated cell sorter</i> )
FLIP	<i>FLICE-inhibitory protein</i>
FBS	fötales bovines Serum
HLA	humaner Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>human leukocyte antigen</i> )
HP	homöostatische Proliferation
Hprt 1	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1
HSV-1	<i>Herpes Simplex Virus</i> , Typ 1
HSVgB	HSV Glykoprotein B
HSV-OVA	Ovalbumin exprimiert durch HSV-1
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN $\gamma$	Interferon- $\gamma$
i.p. / i.v.	intraperitoneal / intravenös

LPS	Lipopolysaccharied
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
mTEC	meduläre Thymusepithelzelle ( <i>medullary thymic epithelial cells</i> )
MHC-I/MHC-II	MHC-Klasse-I/MHC-Klasse-II
MVA	modifiziertes <i>Vaccinia Ankara Virus</i>
MVA-OVA	Ovalbumin exprimiert durch MVA
OVA	Hühner-Ovalbumin
OVA-IgG	Ovalbumin-IgG Immunkomplex
PAMP	pathogenassoziierte molekulare Muster ( <i>pathogen associated molecular patterns</i> )
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
qPCR	quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RT	Raumtemperatur, beziehungsweise Reverse Transkriptase
s.c.	subkutan
SIINFEKL	OVA <sub>257-264</sub>
SSIIEFARL	HSV-Glykoprotein-B <sub>498-505</sub>
SP	einfach-positiver Thymozyt, CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> oder CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> ( <i>single positive</i> )
spMHC	Molekülkomplex bestehend aus MHC beladen mit Selbstpeptiden (Körper-eigenen Proteinbausteinen)
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor ( <i>T cell receptor</i> )
TSA	gewebsspezifische Antigene ( <i>tissue-specific antigen</i> )
TSLP	<i>thymic stromal lymphopoietin</i>
Treg	regulatorische T-Zelle
upm	Umdrehungen pro Minute

Formelgrößen werden in der folgenden 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

Dendritische Zellen (DC) übernehmen essentielle Aufgaben in der Homöostase des Immunsystems und in der Induktion von Toleranz oder Immunität. Eine besondere Wechselwirkung findet hierbei zwischen DC und T-Zellen statt, welche durch die Präsentation und Erkennung von Selbstpeptiden, beziehungsweise Fremdan antigenen, vermittelt wird. DC spielen eine wichtige Rolle bei der Selektion eines funktionellen T-Zell-Kompartiments im Thymus. In der vorliegenden Studie wurde die Funktion der Antigenpräsentation von DC für die Homöostase und die Aktivierung von CD8-T-Zellen *in vivo* untersucht.

Diese Arbeit soll zeigen, dass die Präsentation von Selbstpeptiden auf DC die homöostatische Proliferation (HP) von naiven CD8-T-Zellen induziert. Nach der Depletion von T-Zellen durch Bestrahlung oder Antikörpergabe kam es zu einer HP von naiven CD8-T-Zellen. Diese Proliferation war streng MHC-abhängig. Die Expression von MHC-I auf DC reichte aus, um eine komplette HP zu erlauben, welche im Teilungsmuster, der Aktivierungsmarkermodulation und den Proliferationsraten jener von proliferierenden Zellen in C57BL/6-Wildtypmäusen glich. Überraschenderweise waren CD4-T-Zellen in der Lage, die HP von transferierten naiven CD8-T-Zellen zu inhibieren. Erst durch die Depletion von endogenen CD4-T-Zellen kam es zu Teilungen, während CD25-positive regulatorische T-Zellen keinen Einfluss auf die HP von naiven CD8-T-Zellen ausübten.

DC sind essentiell um Toleranz beziehungsweise Immunität nach der Erkennung von Fremdan antigenen zu generieren. Um die Bedeutung der Antigenpräsentation auf DC genauer zu charakterisieren, wurde die Immunantwort in einem Mausstamm, in welchem alle Zellen MHC-I tragen zu Tieren, in denen nur DC MHC-I exprimieren und somit naive CD8-T-Zellen aktivieren können, untersucht. Hierbei wurde deutlich, dass DC ausreichten um Toleranz, als auch Immunität von naiven CD8-T-Zellen zu induzieren. Kam es jedoch zu einer differentiellen Antigenpräsentation nach systemischer Administration des Antigens (als Peptid oder Virus in die Blutbahn), waren antigenpräsentierende nicht-DC in der Lage, die Immunantwort abzuschwächen. Dies geschah durch Induktion von Apoptose, wodurch die Anzahl antigenspezifischer Effektor-T-Zellen verringert und somit auch die Formation des immunologischen Gedächtnisses beeinträchtigt werden konnte.

Diese Ergebnisse betonen die enorme Bedeutung der Antigenpräsentation durch DC, weisen aber auch auf die besondere Rolle der Antigenpräsentation durch andere Zelltypen als DC hin, welche in der Lage sind eine Immunantwort deutlich zu modulieren.

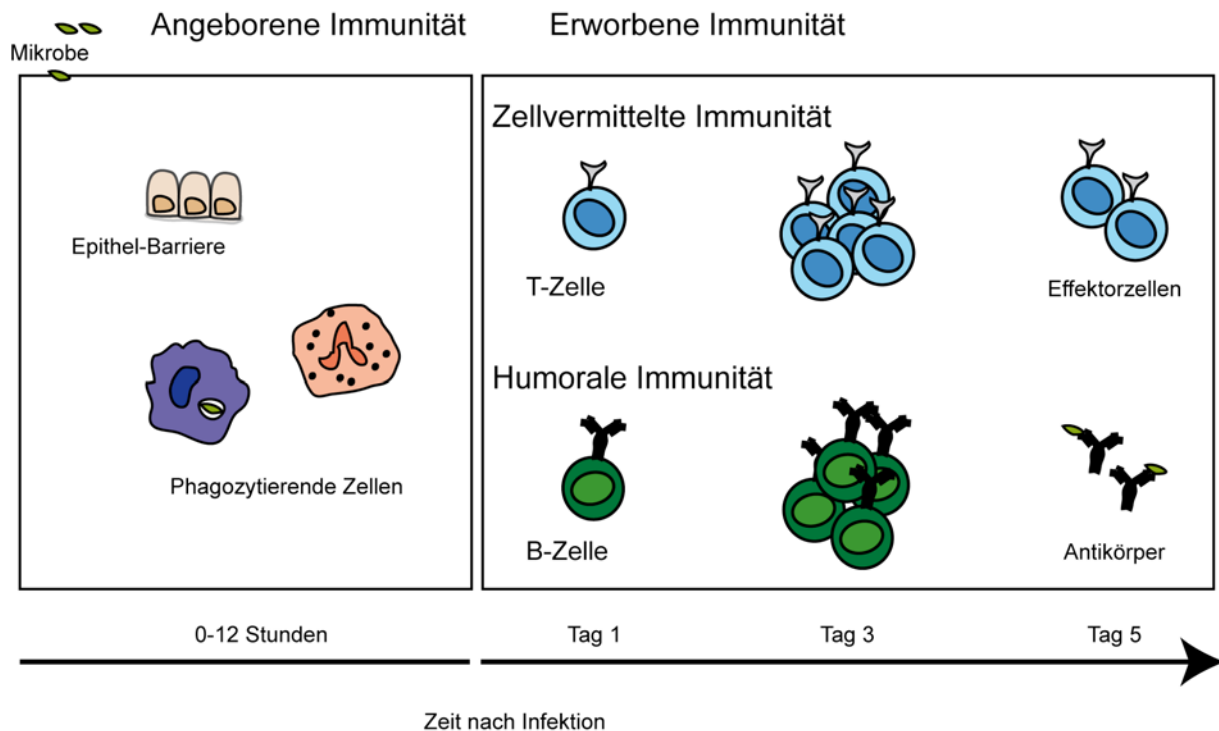
## 3 EINLEITUNG

### 3.1 Einführung in das Immunsystem der Säugetiere

Das Immunsystem ist ein körpereigener Schutzmechanismus gegen körperfremde, potentiell pathogene Organismen und Substanzen, aber auch gegen körpereigene, entartete Zellen. Um diese Funktion ausüben zu können, muss der Körper in der Lage sein, „selbst“ (Körperzelle) von „fremd“ (zum Beispiel Mikroorganismus oder Virus) zu unterscheiden. Moleküle, die eine Immunreaktion auslösen können, werden Antigene genannt. Diese Antigene können von außen (Fremdantigen), als auch vom Körper selbst (Selbstantigen, Selbstpeptid) stammen. Während der Kontakt zu „selbst“ in der Normalsituation zu einer immunologischen Reaktionsunfähigkeit führt, leitet der Kontakt mit fremden Strukturen eine Kette von Abwehrreaktionen ein. Dies führt neben der Eliminierung von Fremdorganismen auch zur Abstoßung von Transplantaten und Krebszellen, die nicht mehr als „selbst“ erkannt werden. Zusätzlich muss das Immunsystem aber auch eine Unterscheidung zwischen Gefahr und Nicht-Gefahr treffen, da nicht jede Fremdkomponente, wie zum Beispiel ein Fötus oder Nahrungsbestandteile gefährlich sind (Matzinger, 1998). Es muss also stets abgewogen werden, ob es zur Abwehr (Immunität) oder zur Akzeptanz (Toleranz) kommt. Wird dieses Gleichgewicht gestört, können Immundefizienzen, aber auch Autoimmunerkrankungen und Allergien auftreten.

Aufgebaut ist das Immunsystem aus einem Netzwerk von Zellen (Immunzellen) und löslichen Faktoren. Prinzipiell kann man zwischen einem angeborenen und einem erworbenen (adaptiven) Zweig unterscheiden. Beide Arme bauen aufeinander auf und sind eng miteinander verwoben. Das angeborene Immunsystem ist phylogenetisch älter und bildet die erste Verteidigungsfront. Es nutzt in erster Linie die Barrierefunktion der Haut und Mukosa. Dringen dennoch Fremdorganismen in den Körper ein, kommt es zu einer Entzündungsreaktion. Eindringlinge werden durch antimikrobielle Moleküle und phagozytierende Zellen eliminiert. Generell verfügt das angeborene Immunsystem nur über eine begrenzte Auswahl von Rezeptoren, welche Strukturen auf der Oberfläche von Mikroorganismen erkennen, die einer Gruppe von Erregern gemein sind. Das adaptive Immunsystem hingegen besitzt Rezeptoren, die eine sehr hohe Spezifität für das jeweilige Antigen besitzen und auch sehr kleine Abweichungen in dessen Aufbau unterscheiden können. Ein weiterer fundamentaler Unterschied liegt in der Gedächtnisfunktion des adaptiven Immunsystems, das heißt, der Körper erinnert sich an den Mikroorganismus und kann ihn bei erneuter Infektion schneller und effektiver bekämpfen als beim Erstkontakt. Die Effektormechanismen des adaptiven

Zweiges müssen induziert werden, weshalb sie erst mit einer zeitlichen Verzögerung zur Verfügung stehen. Innerhalb des adaptiven Immunsystems wird wiederum zwischen einer zellulären und einer humoralen Immunantwort unterschieden (*Abbildung 1*).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des Immunsystems.** In den ersten Stunden nach einer Infektion werden Mikroben hauptsächlich durch Komponenten des angeborenen Immunsystems bekämpft. Die erworbene Immunität, bestehend aus zellvermittelter und humoraler Immunität, benötigt eine Vorlaufzeit von einigen Tagen, bevor Effektormechanismen den Erreger eliminieren können (aus: *Cellular and Molecular Immunology*, Abbas, Lichtman, Pober, 4th Edition, 2000, modifiziert).

Die zelluläre Immunität wird durch T-Lymphozyten (T-Zellen), die humorale Immunität durch Antikörper-produzierende B-Lymphozyten (B-Zellen) geprägt. Beide Zelltypen tragen auf ihrer Oberfläche antigenspezifische Rezeptoren, die T-Zellen den T-Zell-Rezeptor (TCR) und die B-Zellen den B-Zell-Rezeptor (BCR). Während der TCR membrangebunden vorliegt, kann der BCR auch in löslicher Form als Antikörper sekretiert werden. Die zelluläre Immunität dient in erster Linie zur Beseitigung von intrazellulären Pathogenen, während die Hauptfunktion der humoralen Immunität in der Bereitstellung von Antikörpern liegt. Durch Bindung an ihre Zielstrukturen neutralisieren beziehungsweise markieren Antikörper extrazelluläre Erreger und leiten deren Eliminierung ein.

## 3.2 Die Induktion einer adaptiven Immunantwort

Um eine produktive Interaktion der verschiedenen Immunzellen zu gewährleisten, haben sich im Laufe der Evolution spezielle Strukturen und Organe entwickelt. Ein Netz von Lymphbahnen durchzieht, ähnlich den Blutgefäßen, den Körper. Ein dichtes Geflecht von Dendritischen Zellen, Langerhans Zellen und Makrophagen, unterhalb der Grenzflächen des Körpers angeordnet, beseitigen eindringende Organismen. Neben der Beseitigung stellt die Präsentation von Antigenen eine fundamentale Funktion dar. Weitere Immunzellen patrouillieren ständig durch Blut und Lymphe auf der Suche nach einem Antigen, welches auf der Oberfläche von spezialisierten Zellen präsentiert wird. Lymphknoten, die Milz und Peyer'sche Plaques bilden hier wichtige Kontaktzentren, in denen es zur Induktion einer Immunreaktion kommen kann. Das Vorhandensein von Antigen alleine reicht nicht zur Induktion einer Immunantwort aus. Entscheidend ist der Kontext, in welchem diese Erkennung stattfindet. Sind weitere Signale vorhanden, die auf Pathogene oder auf Gefahr hindeuten, ermöglichen kostimulatorische Prozesse eine volle Aktivierung des Immunsystems. Wichtig sind hierbei pathogenassoziierte molekulare Muster (PAMP), welche spezifisch für bestimmte Erregerklassen sind. Zu ihnen gehören unter anderem Lipopolysaccharid (LPS), bakterielle DNA oder virale RNA, welche von Rezeptoren erkannt werden und zur Zellaktivierung führen. Neben diesen exogenen, von Pathogenen stammenden Signalen, gibt es auch endogene Gefahrensignale, die auf Zellstress oder Gewebsschädigung hindeuten, aber nicht zwangsläufig auf eine Infektion hinweisen (Quintana and Cohen, 2005). Verschiedene Signale (Pathogen oder Gewebsschädigung) können durch ein und denselben Rezeptor, wie zum Beispiel durch den Toll-like-Rezeptor (TLR)-4 erkannt werden.

## 3.3 Die zentralen Komponenten der Antigenpräsentation und Antigenerkennung

Der antigenspezifische Rezeptor der T-Zellen erkennt das Antigen in der Regel nur dann, wenn es an Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) gebunden vorliegt (Rosenthal and Shevach, 1973; Zinkernagel and Doherty, 1974). Dieser Prozess bildet die Grundlage für die Induktion einer adaptiven Immunantwort.

### 3.3.1 Der Haupthistokompatibilitätskomplex

Der MHC stellt eine große, hochpolymorphe Genregion dar. Die Gesamtheit dieser Gene wird beim Menschen als HLA-System, bei der Maus als H-2 bezeichnet. Der hohe Polymorphismus wird durch unterschiedliche Allele für einzelne MHC-Loci erreicht, so dass jedes Individuum einen bestimmten MHC-Haplotyp besitzt. Die Hauptfunktion der von dieser Region kodierten Proteine ist die Antigenpräsentation. Dazu werden größere Moleküle, die entweder vom eigenen Körper oder aber auch von Pathogenen stammen, in kleine Fragmente gespalten und je eines dieser Fragmente an ein MHC-Molekül gebunden. Dieser Komplex wird dann auf der Zelloberfläche exprimiert und zum Beispiel von antigenspezifischen T-Zellen erkannt. Die beiden Hauptproteine, die unmittelbar mit der Antigenpräsentation von Proteinbausteinen assoziiert sind die MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle.

Strukturell besteht MHC-Klasse-I aus einer membrangebundenen  $\alpha$ -Kette und einer daran, nicht-kovalent assoziierten  $\beta_2$ -Mikroglobulin-( $\beta_2m$ )-Einheit. MHC-Klasse-I wird auf nahezu allen kernhaltigen Zellen exprimiert und bindet im Prinzip alle Peptide, die von der Zelle stammen oder in ihr (endogen) vorkommen. MHC-Klasse-II hingegen bindet nur Peptide, die nicht von der Zelle selbst sondern von Proteinen stammen, die von außen (exogen) aufgenommen werden. Nur spezielle Zelltypen, antigenpräsentierende Zellen (APC), wie DC, Makrophagen, B-Zellen und verschiedene Typen von Epithel- und Stromazellen, exprimieren MHC-Klasse-II. MHC-Klasse-II besteht aus je einer membrangebundenen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette.

### 3.3.2 Der TCR

Der TCR ist ein Heterodimer aus zwei durch eine Disulfidbrücke verbundenen, membranständigen Glykoproteinketten. Mehr als 90% aller T-Zellen exprimieren eine  $\alpha$ - und eine  $\beta$ -Kette, der Rest eine  $\gamma$ - und eine  $\delta$ -Kette. Aufgebaut sind diese Ketten aus einem variablen und einem konstanten Teil. Der BCR zeigt einen ähnlichen Aufbau, besteht allerdings aus einer so genannten schweren und einer leichten Kette. Durch somatische Rekombination nicht homologer Genabschnitte verfügen der TCR und der BCR über eine sehr hohe Diversität. In diesem Prozess werden verschiedene Gensegmente (V-, D-, und J-Segmente) durch Umlagerung ständig neu kombiniert. Zusätzlich kommt es beim TCR zum ungerichteten Einbau von so genannten N-Nukleotiden während der Genumlagerung. Das TCR-Repertoire wird auf  $10^{12}$ - $10^{15}$ , das BCR-Repertoire auf  $>10^{11}$  geschätzt.

Der TCR verfügt über keine eigene Signaltransduktionsdomäne und ist deshalb mit einem anderen Molekülkomplex (CD3) assoziiert, der eingehenden Signale ins Zellinnere weiterleitet. Wichtig ist zu betonen, dass der TCR nicht nur an das Antigen sondern auch an einen Abschnitt des MHC-Moleküls bindet – es gibt also eine zweifache Erkennung.

### **3.4 Die Antigenprozessierung und Antigenpräsentation**

Um Proteine für das Immunsystem sichtbar zu machen müssen sie in kurze Peptide gespalten und an MHC-Moleküle gebunden werden. Dazu verwendet die Zelle Organelle und Enzyme, die auf die Degradation und das Recycling von Proteinen spezialisiert sind. Die Prozessierung und Präsentation von endogenen (zellinneren) und exogenen (zelläußeren) Proteinen verläuft aber nach unterschiedlichen Regeln.

#### **3.4.1 Die Prozessierung endogener Proteine und Präsentation auf MHC-Klasse-I**

Alle im Zytosol einer Zelle produzierten Proteine werden als endogen bezeichnet. Dies können normale Eigenproteine, aber auch virale Proteine in virusinfizierten Zellen oder mutierte Proteine in Tumorzellen sein. Proteine, die zum Abbau freigegeben sind, werden von der Zelle mit einem Protein namens Ubiquitin markiert. Gespalten werden diese Proteine durch Proteasome, welche aus multiplen Untereinheiten aufgebaut sind. Im Zuge einer Infektion kann die Funktion des Proteasoms durch Einlagerung neuer Untereinheiten moduliert werden („Immunoproteasom“). Die Peptidfragmente werden dann durch TAP-Proteine in das Innere des Endoplasmatischen Retikulums (ER) transferiert. Dort werden dann die  $\alpha$ -Kette des MHC-Moleküls, das Peptid und die  $\beta_2m$ -Einheit zu einem Komplex zusammengelagert. Über den Golgi-Apparat werden diese Komplexe in Vesikeln exozytiert und auf der Zelloberfläche exprimiert. Nur der Komplex aus allen drei Einheiten ist in der Lage stabil an der Oberfläche zu verbleiben.

### **3.4.2 Die Prozessierung exogen aufgenommener Proteine und Präsentation auf MHC-Klasse-II**

Die Zelle ist im konstanten Austausch mit ihrer Umgebung und nimmt durch verschiedene Mechanismen extrazelluläres Material auf. Einer dieser Wege ist die rezeptorvermittelte Endozytose, bei der zum Beispiel an antikörpergebundenes Antigen aufgenommen wird. Nachdem das Material in Vesikel (Endosomen) internalisiert wird, kommt es zur Verschmelzung mit dem Lysosom. In diesem als Endolysosom bezeichneten Organell kommt es zum enzymatischen Abbau durch Proteasen. Der MHC-II-Komplex besteht im ER noch aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette, die mit einer invarianten Kette assoziiert sind. Diese stabilisiert den Komplex und verhindert die Bindung von endogenen Peptiden im ER. Erst in einem weiteren Schritt wird in einem zur Exozytose bestimmten Vesikel die invariante Kette entfernt, das antigene Peptid gebunden und der Komplex auf der Zelloberfläche exprimiert.

Neben exogenen können aber auch endogene Proteine auf MHC-II präsentiert werden. Dieser Mechanismus wird als Autophagie bezeichnet.

### **3.4.3 Die Kreuzpräsentation exogener Proteine auf MHC-Klasse-I**

Die Bindung von exogen aufgenommenem Material an MHC-Klasse-I, welches normalerweise auf MHC-Klasse-II präsentiert wird, nennt man Kreuzpräsentation (Übersichtsartikel: Heath and Carbone, 2001). An welcher Stelle der Endozytose und Prozessierung das exogene Material in den endogenen Präsentationsweg übertritt ist noch nicht endgültig geklärt (Rock and Shen, 2005). Der Mechanismus der Kreuzpräsentation hat eine besondere Bedeutung für die Induktion einer Immunantwort gegen bestimmte Viren. Sie gewährleistet, dass Erreger, die DC nicht direkt infizieren, trotzdem durch eine CTL-vermittelte Immunantwort eliminiert werden können. Zusätzlich spielt die Kreuzpräsentation aber auch eine wichtige Rolle bei der Toleranzinduktion gegen körpereigene Bestandteile.

## 3.5 Die Zellen der Antigenpräsentation

Zellen, die mit Hilfe einer Reihe kostimulatorischer Moleküle T-Zellen aktivieren können, werden als professionelle APC bezeichnet. Zu ihnen gehören DC, Makrophagen und B-Zellen. Bestimmte Typen von Epithel- und Endothelzellen sind ebenfalls in der Lage das Antigen zu präsentieren, werden hier aber nicht genauer beschrieben.

### 3.5.1 DC

DC werden als sehr wichtige APC betrachtet, da sie sowohl T-Zellen aktivieren als auch Toleranz induzieren können (Belz et al., 2002; Bonifaz et al., 2002; Hawiger et al., 2001; Inaba et al., 1990; Inaba and Steinman, 1985). DC lassen sich in mindestens sechs Subgruppen unterteilen, welche sich in ihrer Lokalisation unterscheiden (Übersichtsartikel: Heath et al., 2004). Generell zeigen DC eine sehr hohe Plastizität (O'Garra and Trinchieri, 2004). Gemeinsam ist ihnen aber die Expression des  $\alpha$ -Integrins CD11c. Auch bei DC wird zwischen verschiedenen Reife- beziehungsweise Aktivierungsstadien unterschieden, welche in der Fachwelt aber auch wie die Subtypenunterteilung kontrovers diskutiert werden (Reis e Sousa, 2006). Unreife DC sitzen im Gewebe und nehmen ständig Antigen auf. Einige dieser Zellen wandern konstant in die lymphatischen Organe ein, wo sie das Antigen präsentieren und vermutlich Toleranz gegen dieses hauptsächlich körpereigene Material induzieren. Sind jedoch Erregerstrukturen oder Gefahrensignale vorhanden, ändert sich die Funktion und der Phänotyp: Die Antigenaufnahme wird verringert während die Kapazität der Antigenprozessierung und –präsentation deutlich erhöht wird. Gelangt diese DC in den Lymphknoten, kommt es zur Induktion einer Immunantwort. Neben der Funktion als APC übernehmen DC zentrale Aufgaben in der Regulation und Koordination einer Immunantwort.

### 3.5.2 Makrophagen

Makrophagen sind große mononukleäre Phagozyten, welche eine wichtige Rolle in der angeborenen und adaptiven Immunität spielen (Übersichtsartikel: Gordon and Taylor, 2005). Sie besitzen je nach anatomischer Lokalisation spezialisierte Aufgaben: Im Gewebe sind sie für Auf- und Umbauarbeiten verantwortlich, Alveolarmakrophagen in der Lunge nehmen eine Vielzahl von Mikro-



organismen, Viren und anderen Partikeln auf, Makrophagen in den lymphatischen Organen beseitigen apoptotische Zellen. Bereits in der frühen Phase der Immunabwehr nehmen sie Pathogene auf und zerstören diese. Makrophagen können T-Zellen aktivieren, sie sind darin im Vergleich zu DC jedoch weniger effizient (Übersichtsartikel: Steinman and Cohn, 1973; Zammit and Lefrançois, 2006).

### 3.5.3 B-Zellen

B-Zellen erkennen Antigene in ihrer nativen Form, also direkt ohne Prozessierung und Präsentation auf MHC. Um B-Zellen zu aktivieren, müssen diese jedoch nicht nur ihr Antigen erkennen und binden, sondern auch ein aktivierendes Signal von T-Zellen erhalten. Aktivierte B-Zellen proliferieren und differenzieren in den so genannten Keimzentren von Lymphknoten und Milz. Ihre Hauptaufgabe stellt die Produktion von Antikörpern (Immunoglobulinen) dar. B-Zellen nehmen aber auch das Antigen auf, prozessieren dies und präsentieren es anderen Zellen. Neuere Untersuchungen legen den Schluss nahe, dass die Antigenpräsentation auf B-Zellen zur Toleranzinduktion in T-Zellen führen kann (Rodriguez-Pinto, 2005).

## 3.6 Die Entwicklung und Funktion der T-Lymphozyten

Nachdem in dieser Arbeit ausschließlich T-Zellen mit einem  $\alpha\beta$ -TCR untersucht werden, wird nur deren Entwicklung und Funktion im Detail behandelt. Die Entwicklung und auch die Funktion von  $\gamma\delta$  T-Zellen zeigt wesentliche Unterschiede zu  $\alpha\beta$  T-Zellen.

### 3.6.1 Die Stadien der T-Zell-Entwicklung

B- und T-Lymphozyten stammen von einem gemeinsamen Vorläufer ab und zeigen auch in der Entwicklung viele Ähnlichkeiten.

T-Zell-Vorläufer entstehen im Knochenmark und wandern zur weiteren Reifung in den Thymus ein. Der Thymus wird neben dem Knochenmark als zentrales lymphatisches Organ bezeichnet. Seine Struktur ermöglicht eine koordinierte und fein abgestimmte Reifung der T-Lymphozyten

(Übersichtsartikel: Ladi et al., 2006; Takahama, 2006). Um die verschiedenen Reifungsstadien unterscheiden zu können wird die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle als Indikator verwendet. Für T-Lymphozyten hat sich hierbei die Verwendung der auch als Korezeptoren fungierenden CD4- und CD8-Moleküle bewährt. Im ersten Reifestadium besitzen die Zellen weder CD4 noch CD8 und werden deshalb als doppelt-negative (DN) T-Lymphozyten bezeichnet. Diese Zellen beginnen nun mit der Umlagerung der für die TCR- $\beta$ -Kette verantwortlichen Gene. Gelingt dieses Rearrangement, exprimiert diese T-Zelle den so genannten prä-TCR (von Boehmer and Fehling, 1997) und erhält ein Wachstumssignal durch diesen Rezeptor. Jetzt exprimieren auch alle Thymozyten CD4 und CD8, sie werden als doppelt-positive (DP) Lymphozyten bezeichnet. Im nächsten Schritt werden die Gene der  $\alpha$ -Kette kombiniert. Ist dies erfolgreich, wird die  $\alpha$ -Kette synthetisiert und bildet zusammen mit der  $\beta$ -Kette einen funktionellen TCR. In dieser Phase kommt es zu einem zweistufigen Selektionsprozess, der die Bindung des TCR an MHC überprüft (Thymusselektion). Im dritten Entwicklungsschritt kommt es zur abschließenden Reifung, in der sich die T-Zelle für einen Korezeptor (CD4 oder CD8) entscheidet (Übersichtsartikel: Laky and Fowlkes, 2005; Weerkamp et al., 2006). Bindet der TCR des Thymozyten an MHC-Klasse-I, entsteht ein einfach-positiver (SP) CD8-Thymozyt, bindet der TCR aber an MHC-Klasse-II, entsteht ein (SP) CD4-Thymozyt. Nach Abschluss der Reifung verlassen diese Zellen den Thymus und besiedeln als CD4- oder als CD8-T-Zellen den Organismus.

### 3.6.2 Die Funktion und der Aufbau des T-Zell-Kompartiments

T-Lymphozyten können in verschiedene Subtypen unterteilt werden: Helfer T-Zellen, zytotoxische T-Zellen (CTL) und regulatorische T-Zellen (Treg). Helfer T-Zellen verwenden als Korezeptor CD4. Sie erkennen Antigen ausschließlich in Verbindung mit MHC-Klasse-II, welches auf APC exprimiert wird. Ihre Helferaufgabe besteht darin, dass sie erstens B-Zellen zur Antikörperproduktion führen und zweitens bei der Aktivierung von CD8-T-Zellen assistieren. Zusätzlich produzieren helfer T-Zellen verschiedene Zytokine, die eine Pathogen-spezifische, koordinierte Immunantwort ermöglichen. Zytotoxische T-Zellen tragen als Korezeptor CD8 und erkennen Antigen in Verbindung mit MHC-Klasse-I. Hauptaufgabe ist die Erkennung und die Eliminierung von virusinfizierten Zellen oder Tumorzellen. T-Zellen können auch in Bezug auf ihre Entwicklung unterschieden werden. Solange die T-Zelle noch keinen Kontakt zu Antigen hatte, wird sie als naiv bezeichnet. Sobald ihr TCR aber das passende Antigen erkennt und kostimulatorische Signale hinzu-

kommen, wird sie aktiviert und führt als Effektorzelle ihre Aufgaben aus. Nach erfolgreicher Antigenbeseitigung bleibt nur eine kleine Population von antigenerfahrenen Gedächtniszellen zurück. Diese Stadien lassen sich durch die Analyse verschiedener Oberflächenmoleküle verfolgen. Als besonders hilfreich haben sich hier die Adhäsionsmoleküle CD44 und CD62L, sowie die Zytokinrezeptoren CD25 und CD127 erwiesen.

Neben Helfer- und zytotoxischen T-Zellen gibt es verschiedene Typen von regulatorischen T-Zellen, die wichtige Aufgaben in der Feinabstimmung einer Immunantwort übernehmen. Besonders hervorgehoben seien hier CD4-positive/CD25-positive und CD8-positive/CD122-positive regulatorische T-Zellen (Übersichtsartikel: Belkaid and Rouse, 2005; Jiang and Chess, 2004).

### 3.6.3 Die T-Zell-Aktivierung

Um eine T-Zelle zu aktivieren bedarf es mehrerer Voraussetzungen, die als Signal 1-3 zusammengefasst werden. Signal 1 stellt die klassische Erkennung des Antigens durch den TCR dar. Bei Abwesenheit weiterer Signale führt diese Erkennung vermutlich zu Toleranz. Signal 2 fasst kostimulatorische Signale zusammen, die zu einer Immunantwort führen. Ein Hauptmolekül ist hierbei CD28 auf der T-Zelle, welches unter anderem an CD80/86 auf DC bindet. Im Endeffekt ist Signal 2 aber ein fein abgestimmtes Gleichgewicht von positiver und negativer Kostimulation verschiedener Rezeptoren (Subudhi et al., 2005). Diese Interaktion führt zu klonaler Expansion und Differenzierung antigenspezifischer T-Zellen. Signal 3 ist eine relativ neue Erweiterung des ursprünglichen Konzeptes und beschreibt Signale, die von der APC an die T-Zelle übermittelt werden und den Typ sowie die weitere Funktion der Effektorzelle bestimmen. Eine tragende Rolle nimmt hierbei zum Beispiel Interleukin (IL)-12 ein (Trinchieri, 2003). Prinzipiell folgt die Aktivierung von naiven T-Zellen und Gedächtniszellen ähnlichen Regeln, allerdings können Gedächtniszellen schneller aktiviert werden und zeigen einen schnelleren Eintritt in die Proliferation. Dies beruht unter anderem auf veränderten Bedürfnissen bei der Kostimulation (Übersichtsartikel: Gourley et al., 2004).

Nach der Aktivierung kommt es zu einem sehr starken Anstieg der Anzahl von antigenspezifischen T-Zellen (Expansionsphase). Sie teilen sich in dieser Phase alle sechs bis acht Stunden. Somit werden innerhalb von fünf Tagen aus wenigen hundert Vorläuferzellen einer Spezifität hunderttausende Nachkommen (Klone) gebildet. Helfer T-Zellen wandern zunächst in die B-Zell-Bereiche der lymphatischen Organe ein und assistieren dort bei der B-Zell-Aktivierung. Zusätzlich

produzieren sie verschiedene Zytokine, die eine Feinabstimmung der Immunantwort erlauben. Zytotoxische T-Zellen zirkulieren durch den Körper und sind in der Lage infizierte Zellen ohne weitere Aktivierung zu töten. Dieser zytotoxische Effekt wird durch Moleküle vermittelt, die entweder direkt die Zelle schädigen oder den zellinternen, programmierten Zelltod der Zielzelle (Apoptose) induzieren. Als weitere Funktion sezernieren zytotoxische T-Zellen Interferon (IFN) $\gamma$  und Tumor Nekrose Faktor (TNF), welche direkt antivirale Mechanismen induzieren. Nach erfolgreicher Kontrolle der Infektion geht ein Großteil der Effektorzellen apoptotisch zugrunde (Kontraktionsphase), nur ein kleiner Anteil wandelt sich in Gedächtniszellen um und bleibt somit für einen längeren Zeitraum am Leben.

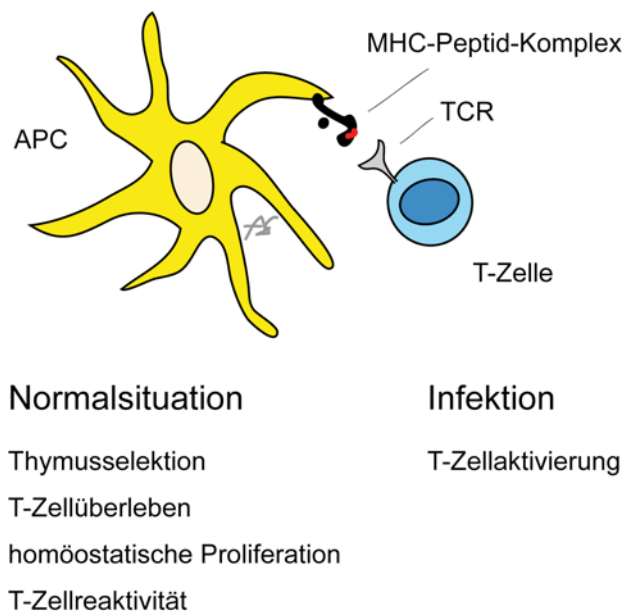
Hierauf basiert das Prinzip der Impfung. Bei einer Impfung wird Antigen in Verbindung mit Adjuvans verabreicht um T-Zellen zu aktivieren und die Bildung von langlebigen Gedächtniszellen zu induzieren, die den Körper bei einem Wiedereintritt des Pathogens schützen.

### 3.7 Die T-Zell-Homöostase

Der Körper besitzt bestimmte Mechanismen um trotz verschiedenster Umwelteinflüsse ein internes Gleichgewicht zu halten. Diese Art der Kontrolle wird Homöostase genannt. Sie bestimmt unter anderem die Größe von Organen und deren Zell-Zahl. Auch das Immunsystem unterliegt der Homöostase; Die Anzahl der Zellen in den verschiedenen Kompartimenten bleibt während des ganzen Lebens auf vergleichbarem Niveau. Diese Arbeit beschränkt sich auf T-Zellen. Homöostase kann für das T-Zell-Kompartiment zweierlei bedeuten: Unter Normalbedingungen, beim Fehlen einer Infektion, bewirken homöostatische Mechanismen die Bildung und den Erhalt eines diversen, differenzierten und funktionellen T-Zell-Kompartiments. Kommt es jedoch zu einer Infektion wird das Gleichgewicht kurzzeitig massiv verschoben. Es muss dann aber wieder an die vielschichtigen Aufgaben des Immunsystems angepasst werden. Diese Rückstellung auf Normalniveau unterliegt ebenfalls der Homöostase.

Während der verschiedenen Entwicklungs- und Lebensstadien einer T-Zelle spielt die Interaktion von MHC mit dem TCR eine essentielle Rolle (*Abbildung 2*). Hierbei sind der Ort der Erkennung (Lokalisation), der Typ der APC (DC oder Epithelzelle) und der weitere Kontext der Erkennung (gesunder Organismus oder Infektion) bedeutend. Im Thymus überleben nur jene Zellen, dessen TCR erfolgreich an MHC bindet. Ähnliches passiert in den peripheren, lymphatischen Organen. Zusätzlich moduliert die Erkennung von MHC vermutlich die Reaktionsfreudigkeit (Reaktivität)

der T-Zelle. Kommt es im Zuge einer Virusinfektion, Chemotherapie oder Bestrahlung zum massiven T-Zell-Verlust (Lymphopenie), induziert der Kontakt zu MHC eine antigenunabhängige, homöostatische Proliferation (HP), welche den Zellverlust kompensiert. Essentiell für die genannten Prozesse ist, dass Selbstpeptide gebunden an MHC erkannt werden; Die Bindung des TCR an MHC zeigt eine niedrige Affinität. Ganz anders ist dies für die Erkennung von Erregerstrukturen im Zuge einer Infektion. Hier erkennt die T-Zelle antigene Fremdpeptide gebunden an MHC mit hoher Affinität.



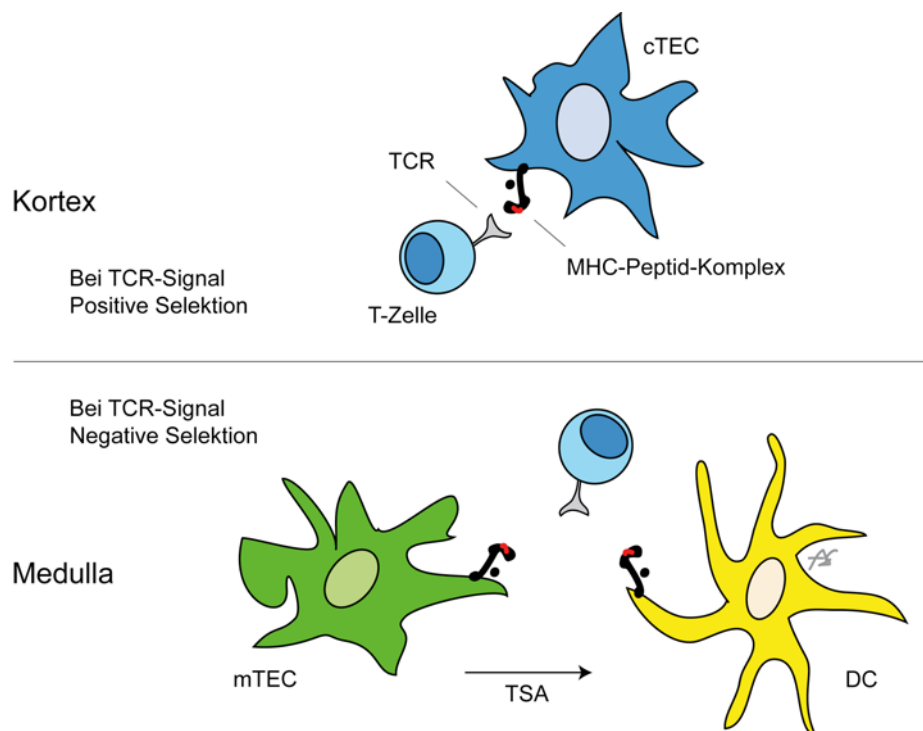
**Abbildung 2: Funktion der Interaktion zwischen dem TCR und MHC.** Darstellung verschiedener Abschnitte im Leben einer T-Zelle, die unter besonderem Einfluss der MHC-TCR-Interaktion stehen. Hierbei kann diese Interaktion aber je nach Umfeld und Stadium der Entwicklung verschiedene Konsequenzen für die T-Zelle nach sich ziehen.

Prinzipiell können CD4- und CD8-, als auch naive, beziehungsweise Gedächtnis-T-Zellen als voneinander getrennte Kompartimente betrachtet werden, die zum Teil eigenen homöostatischen Mechanismen unterworfen sind.

### 3.7.1 Die Thymusselektion

Das TCR-Repertoire ist hoch divers, es gibt sehr viele verschiedene Kombinationsmöglichkeiten und Variationen (Chao et al., 2005). Nicht jede dieser Varianten ist in der Lage überhaupt an MHC

zu binden, was jedoch eine zwingende Voraussetzung für die Antigenerkennung ist. Deshalb muss es nach dem Genrearrangement eine Qualitätskontrolle geben (*Abbildung 3*) (Übersichtsartikel: Hogquist et al., 2005). Dieser Selektionsprozess findet im Kortex, den Randbereichen des Thymus, statt. In dieser Region befinden sich kortikale Epithelzellen (cTEC), die MHC-Moleküle beladen mit so genannten Selbstpeptiden (spMHC) tragen. Das sind Peptide, die von Proteinen stammen, welche die Zelle selbst produziert. Alle Thymozyten, die erfolgreich eine  $\beta$ - und  $\alpha$ -Kette des TCR exprimieren, erhalten durch Bindung an MHC auf cTEC ein Wachstumssignal und werden positiv selektioniert; Fehlt dieses Signal, stirbt die Zelle. Der zweite Selektionsschritt, die negative Selektion, findet in der Medulla statt und entfernt Thymozyten, deren TCR eine zu hohe Affinität für spMHC besitzt. Diese Zellen sind potentiell selbstreaktiv und könnten den Körper schädigen (Autoimmunität). Die negative Selektion ist ein Mechanismus zur Induktion zentraler Toleranz und wird in erster Linie durch DC vermittelt (Cannarile et al., 2004). Eine Sonderrolle spielen medulläre Epithelzellen (mTEC). Dieser Zelltyp ist in der Lage, gewebespezifische Antigene (TSA), die normalerweise nicht im Thymus vorkommen, zu exprimieren.



**Abbildung 3: Darstellung der Thymusselektion.** Die Thymusselektion stellt einen zweistufigen Prozess dar, der ein funktionelles, selbsttolerantes T-Zell-Kompartiment generiert. Vermittelt wird sie durch spezialisierte Epithelialzellen und DC, die Selbstpeptide präsentieren. Deutlich wird die räumliche Trennung der Selektionsprozesse in Kortex und Medulla des Thymus.

Dadurch können Thymozyten, die diese Antigene erkennen, ebenfalls deletiert werden. Vermutlich präsentieren mTEC das Antigen nicht direkt, sondern geben es an DC weiter, welche damit ihre MHC-Klasse-II- und, durch Kreuzpräsentation, MHC-Klasse-I-Moleküle beladen (Gallegos and Bevan, 2004).

### 3.7.2 Das T-Zell-Überleben

In jungen Mäusen verlassen T-Zellen konstant den Thymus und besiedeln periphere, lymphatische Organe (Scollay et al., 1980). Durch Einpflanzung zusätzlicher Thymi kann die Anzahl der peripheren T-Zellen zwar erhöht werden, aber nur bis zu einem gewissen Maß (Berzins et al., 1998; Berzins et al., 1999; Wallis et al., 1978). Wird der Thymus entfernt (Thymektomie) nimmt auch die T-Zell-Zahl ab (Miller, 1965; Smith et al., 1989). Ähnliches passiert im Zuge der Alterung – es kommt zum Abbau des Thymusgewebes und zum Verlust der Funktion (Thymusinvolution). Trotzdem bleibt der Großteil der T-Zellen in der Peripherie erhalten. Die Thymusproduktion hat demnach zwar einen wichtigen Einfluss auf die Größe des peripheren T-Zell-Kompartiments (Almeida et al., 2001), zusätzliche Mechanismen bestimmen aber die Anzahl der T-Zellen in der Peripherie (Übersichtsartikel: Almeida et al., 2005; Jameson, 2005).

Ein wichtiger Überlebensfaktor nicht nur für T-Zellen ist IL-7 (Lee and Surh, 2005; Schluns et al., 2000; Tan et al., 2001). Bei Erhöhung der IL-7-Spiegel oder Manipulation der IL-7-Signalleitung nimmt die Anzahl der T-Zellen in den peripheren, lymphatischen Organen zu (Burchill et al., 2003; Kelly et al., 2003; Kieper et al., 2002). Verschiedene Studien haben die besondere Bedeutung von MHC-Selbstpeptid-Komplexen für das Überleben von naiven T-Zellen gezeigt (Brocker, 1997; Takeda et al., 1996; Tanchot et al., 1997). Fehlen die passenden MHC-Moleküle oder kommt es zum induzierten Verlust des TCR, verschwinden naive T-Zellen (Polic et al., 2001; Seddon and Zamoyska, 2002; Witherden et al., 2000). Unterstützt wird diese Annahme durch die Beobachtung früher Zeichen der Aktivierung der TCR-Signalleitungskaskade, die MHC-abhängig ist (Dorfman et al., 2000; Stefanova et al., 2002; van Oers et al., 1994). Eine Vielzahl der angeführten Studien verwendet Modelle, bei denen es zumindest partiell zur Lymphopenie kommt. Deshalb kann es eventuell zu Unterschieden im Vergleich zur Normalsituation kommen, in der das T-Zell-Kompartiment komplett ist.

Naive CD4- als auch CD8-T-Zellen scheinen ähnliche Überlebensbedingungen zu besitzen, während es aber deutliche Unterschiede zwischen naiven und Gedächtnis-T-Zellen gibt. CD8-positive

Gedächtniszellen bleiben auch bei Abwesenheit von MHC-I erhalten (Murali-Krishna et al., 1999). Ähnliches gilt für CD4-positive Gedächtniszellen (Kassiotis et al., 2002).

### 3.7.3 Die T-Zell-Reaktivität

Wie in Abschnitt 3.7.2 erwähnt, zeigen TCR-Signalleitungswege naiver T-Zellen Zeichen der Aktivierung, deren Bedeutung jedoch diskutiert wird. Einerseits kann diese Voraktivierung eine Rolle für das Überleben der T-Zelle spielen, andererseits kann die Reaktionsfreudigkeit (Reaktivität) beeinflusst werden. So konnte gezeigt werden, dass der Verlust von MHC-II die Funktionalität naiver CD4-T-Zellen beeinträchtigt (Stefanova et al., 2002). Der konstante Kontakt zu MHC ist demnach wichtig, um die T-Zelle überhaupt optimal aktivieren zu können. Ähnlich ist die Situation für CD4-Gedächtniszellen: Bei Fehlen von MHC-II ist ihre Funktion eingeschränkt (Kassiotis et al., 2002). Zu gegenteiligen Ergebnissen kommt die Gruppe von Singer: Die Interaktion des TCR mit spMHC dämpft die Reaktivität der T-Zelle und fördert periphere Toleranz, da sie den Grenzwert für die Aktivierung hebt (Bhandoola et al., 2002).

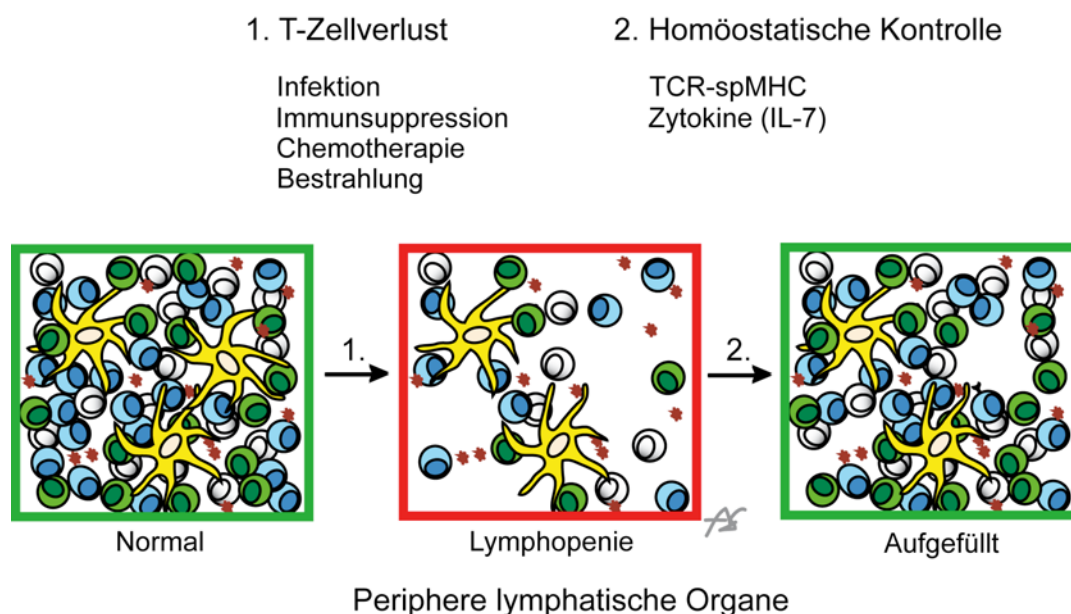
### 3.7.4 Die HP als antigenunabhängige Aktivierung

Unter Normalbedingungen sind die peripheren, lymphatischen Organe dicht gepackte Strukturen, bestehend aus einer Vielzahl von Immunzellen. Während sich in dieser Situation die Gedächtnis-T-Zellen ohne Antigenkontakt teilen und somit selbst erneuern können, teilen sich naive T-Zellen nur sehr langsam. In einem Zeitraum von fünf Wochen teilen sich weniger als 20% aller naiven T-Zellen (Tough and Sprent, 1994).

Nach massiven viralen Infektionen (Okada et al., 2000; Tumpey et al., 2000), Bestrahlung oder Chemotherapie kommt es unter anderem zum Verlust von T-Zellen. Dieser Zustand der Lymphopenie induziert Kontrollmechanismen, die zur Proliferation der verbliebenen Zellen und somit (Bell et al., 1987; Mackall et al., 1993; Miller and Stutman, 1984) zum Wiederauffüllen des Kompartiments führen (*Abbildung 4*). Bezeichnet wird dieser Prozess als HP (Bender et al., 1999; Ernst et al., 1999; Viret et al., 1999) oder auch als lymphopenieinduzierte Proliferation (Ge et al., 2001). Da die Proliferation langsam verläuft (drei bis sechs Teilungen pro Woche) und gegen Selbstpeptide, also Nicht-Antigene, gerichtet ist, wird sie auch als antigenunabhängige Proliferation be-



schrieben (Prlic and Jameson, 2002). Die klassische antigenabhängige Proliferation verläuft wesentlich schneller mit Zellteilungen innerhalb von sechs Stunden. Generell haben naive T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen verschiedene Bedürfnisse für die HP (Tanchot, Science, 1997). Als bestimmende Faktoren für naive T-Zellen wurden der Kontakt zu spMHC-Komplexen ((Bender et al., 1999; Ernst et al., 1999; Goldrath and Bevan, 1999) und das Vorhandensein von IL-7 identifiziert (Seddon and Zamoyska, 2002; Tan et al., 2001). Diese zwei Komponenten spielen also nicht nur für das Überleben, sondern auch für die HP eine entscheidende Rolle. Zusätzlich müssen aber andere Regulationswege entscheiden, wann eine naive T-Zelle „nur“ überlebt oder sich aktiv teilt (Übersichtsartikel: Freitas and Rocha, 2000; Goldrath, 2002; Marrack et al., 2000).



**Abbildung 4: Lymphopenie und die induzierte homöostatische Kontrolle.** Die HP ist ein Kontrollmechanismus zur Wiederherstellung eines funktionellen, peripheren T-Zell-Kompartiments. Nach massivem T-Zell-Verlust kommt es zur Proliferation der überlebenden Zellen, die somit das periphere T-Zell-Kompartiment auffüllen.

Die Proliferation bewirkt eine Kompensation des Zellverlustes, generiert aber Zellen mit Eigenschaften, die Gedächtniszellen beziehungsweise Effektorzellen zugeschrieben werden (Cho et al., 2000; Goldrath et al., 2000; Murali-Krishna and Ahmed, 2000). Bei der HP von naiven T-Zellen handelt es sich daher streng genommen um keine echte Homöostase, da naive T-Zellen nicht erneuert, sondern in Gedächtnis-ähnliche-T-Zellen umgewandelt werden. Außerdem kommt es bei der HP zu einer Verminderung der TCR-Diversität (Mackall et al., 1996). Nachdem es sich um keinen homöostatischen Mechanismus handelt, ist die Funktion und Bedeutung der HP strittig. Bei

der ersten Besiedlung lymphatischer Organe nach der Geburt kommt es zur Expansion der erstansiedelnden T-Zellen (Le Campion et al., 2002; Min et al., 2003). Hier könnte eine Transformation der naiven Zellen in schneller-aktivierbare Gedächtniszellen hilfreich sein, um Pathogene effektiver zu bekämpfen. Therapeutisch könnte die Induktion einer Lymphopenie als Weg zur Aufhebung der Selbsttoleranz angewendet und somit eine Krebstherapie ermöglicht werden (Baccala et al., 2005; Dummer et al., 2002). Dies ist jedoch ein riskanter Weg, da unter bestimmten Bedingungen Autoimmunerkrankungen als Folgeerscheinung auftreten können (King et al., 2004; Krupica et al., 2006). HP hat weitere klinische Relevanz, da sie Komplikation für die immunologische Toleranz von Transplantaten verursachen kann (Wu et al., 2004).

Gedächtniszellen zeigen eine echte HP und können sich somit erneuern. CD8-Gedächtniszellen sind für die Proliferation weitgehend von MHC unabhängig (Murali-Krishna et al., 1999), essentiell ist jedoch das Vorhandensein von IL-15 (Becker et al., 2002; Burkett et al., 2004; Zhang et al., 1998). CD4-Gedächtniszellen sind vermutlich MHC-abhängiger (Kassiotis et al., 2002), benötigen aber kein IL-15.

T-Zellen scheinen somit einen internen Sensor für „Freiraum“ zu besitzen, der bei Verlust von Zellen den verbliebenen T-Zellen einen Teilungsimpuls gibt. Die Frage ist hier, ob T-Zellen um limitierte Ressourcen konkurrieren (Stockinger et al., 2004; Troy and Shen, 2003) oder sich aktiv gegenseitig inhibieren (Kontaktinhibition). Der Kotransfer einer großen Anzahl von T-Zellen unterdrückt die Expansion. Die Konkurrenten müssen dazu aber in die T-Zell-Zone der lymphatischen Organe einwandern (Dummer et al., 2001). Neben T-Zellen befindet sich eine große Zahl von DC in diesem Bereich, weshalb sie vermutlich die wichtigsten APC zur Induktion der HP sind. Zum einen können sie spMHC-Komplexe präsentieren oder auch Zytokine wie IL-15 produzieren (Ge et al., 2002; Ruckert et al., 2003). Der experimentelle Nachweis der Synthese von IL-7 durch DC fehlt derzeit noch.

### 3.7.5 Die antigenabhängige Aktivierung

Arbeiten von Philippe Bousso und Thorsten Mempel haben gezeigt, dass die T-Zell-Aktivierung durch das Antigen *in vivo* ein dynamischer Prozess ist (Bousso and Robey, 2003; Mempel et al., 2004). Die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen durch DC im Lymphknoten verläuft demnach in drei Stadien. Phase 1 ist durch eine schnelle Migration der T-Zelle geprägt, es kommt zu kurzen Kontakten mit vielen DC. Diese Phase dauert bis zu acht Stunden und dient vermutlich der Suche

nach Antigen. Falls Antigen vorhanden ist, ändert sich das Verhalten der T-Zelle, es kommt zu stabilen T-Zell-DC-Kontakten (Phase 2). Diese Kontakte sind über mehrere Stunden aktiv und führen zur T-Zell-Aktivierung. Die dritte Phase beginnt nach circa 20 Stunden. Die T-Zelle wandert wieder schnell, hat multiple, kurz-andauernde Kontakte zu DC und tritt in die Proliferation ein. Bis jetzt gibt es keine Untersuchungen, inwieweit andere Zelltypen, wie B-Zellen oder Makrophagen, die Initialaktivierung von T-Zellen durch DC modulieren können.

Verschiedene Studien gehen davon aus, dass die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen nur einen kurzen Kontakt zum Antigen benötigt (Bousso and Robey, 2003; Kaeck and Ahmed, 2001; Mempel et al., 2004; van Stipdonk et al., 2001). Eine Zeitspanne von 24 Stunden reicht aus, um ein als „Autopilot“ bezeichnetes Programm zu starten, welches zu einer Reihe von Zellteilungen und zur Differenzierung in Effektorzellen führt. Die Stimulationsdauer mit dem Antigen hat aber einen deutlichen Einfluss auf die Expansion – je kürzer der Initialkontakt dauert, desto geringer ist die Anzahl der aktivierten T-Zellen (Prlic et al., 2006). Helfer T-Zellen sind notwendig um eine protektive CD8-Gedächtnisantwort zu induzieren, sie bedürfen aber einer längeren Antigenstimulation, um optimal aktiviert zu werden. Dies macht es wahrscheinlich, dass auch für die vollständige Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen das Antigen für längere Zeiträume vorhanden sein muss.

Effektor-T-Zellen besitzen erniedrigte Spiegel antiapoptotischer Moleküle, wie zum Beispiel von Bcl-2 und verlieren die Expression des IL-7-Rezeptors. Somit sind sie empfänglicher für die Apoptose und bedürfen weiterer Überlebenssignale. In dieser Phase kann ein erneuter Kontakt mit dem Antigen zum Zelltod führen. Dieser Prozess wird als aktivierungsinduzierter Zelltod (AICD) bezeichnet. Ausserdem kann es aufgrund fehlender Wachstumsfaktoren zum intrinsischen Zelltod (ACAD) kommen (Hildeman et al., 2003). Nach einer vorprogrammierten Expansionsphase, stirbt ein Großteil der Effektorzellen; Nur ein kleiner Teil überlebt und wandelt sich in Gedächtniszellen um. Eine besondere Rolle spielt hierbei die Expression einer speziellen Variante des CD8-Moleküls, welches anders als die klassische Form aufgebaut ist und nicht als Korezeptor agiert, sondern eine Signalleitung durch den TCR unterbindet (Madakamutil et al., 2004). Vermutlich erlaubt dies den T-Zellen den Zellzyklus zu verlassen und sich in Gedächtniszellen umzuwandeln.

### 3.8 Zielsetzung der Arbeit

DC übernehmen vielfältige Aufgaben in der Koordination des Immunsystems. Neben der Sekretion verschiedenster Mediatoren ist insbesondere die Präsentation von Selbstpeptiden oder Fremdantigenen essentiell für die Generierung eines funktionellen T-Zell-Kompartiments. Zwei fundamentale Prozesse im Lebenszyklus von CD8-T-Zellen, nämlich die antigenunabhängige HP und die antigenabhängige Aktivierung nach Erkennung von Fremdkomponenten, sind Gegenstand dieser Untersuchung.

Für die HP gab es widersprüchliche Befunde, welcher Zelltyp die Hauptrolle der Präsentation von Selbstpeptiden übernimmt. Eine weitere Hauptfrage war, inwieweit es eine Koregulation beziehungsweise Konkurrenz zwischen CD4- und CD8-T-Zellen um limitierte Ressourcen gibt. In dieser Studie wurde untersucht, ob DC die HP induzieren und ob die Homöostase des CD4- beziehungsweise CD8-T-Zell-Kompartiments zumindest partiell getrennt reguliert wird. Dazu wurde die homöostatische Expansion in Mäusen, in welchen alle Zellen MHC-I exprimieren (C57BL/6) mit Tieren, in denen nur DC MHC-I präsentieren (CD11c-MHCI) verglichen. In diesen Mäusen sind alle Zellen bis auf CD11c-positive DC defizient für  $\beta 2m$  und können deshalb keine stabilen MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Zelloberfläche exprimieren. Diesen Mäusen fehlt die Fähigkeit zur positiven Thymusselektion, weshalb es keine endogenen CD8-T-Zellen gibt. Dies ermöglichte die HP in unbestrahlten Mäusen und die Wechselwirkung des CD4- und CD8-T-Zellkompartiments gezielt zu untersuchen.

Um die Thymusselektion wieder herzustellen, wurden CD11c-MHCI-Mäuse mit K14- $\beta 2m$ -Mäusen verpaart, welche  $\beta 2m$  unter der Kontrolle des K14-Promotors auf cTEC exprimieren. K14- $\beta 2m$ CD11c-MHCI-Mäuse (DC-MHCI) verfügen über funktionelle positive und negative Thymusselektion und besitzen ein normales CD8-T-Zell-Kompartiment. In diesen Mäusen wurde dann genauer untersucht, ob Antigenpräsentation auf DC ausreicht, um eine CD8-Immunantwort zu induzieren und welche Konsequenz Antigenpräsentation auf nicht-DC hat.

Ziel war es, ein besseres Verständnis zu erlangen, wie Vakzine aufgebaut sein müssen um eine optimale Antwort zytotoxischer T-Zellen und bleibendes immunologisches Gedächtnis zu generieren. Dies ist insbesondere für die Entwicklung neuer Vakzine und Vakzinierungsstrategien notwendig, um den Herausforderungen viraler Erkrankungen besser entgegenzutreten zu können.

## 4 MATERIAL UND METHODEN

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Chemikalien

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

#### 4.1.2 Geräte

Für die Untersuchung wurden folgende Geräte verwendet:

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

Alle anderen verwendeten Geräte sind in den jeweiligen Methodenbeschreibungen erwähnt.

#### 4.1.3 Pufferlösungen und Medien

ACK-Puffer

8,29 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$

1 g  $\text{KHCO}_3$

37,2 mg  $\text{Na}_2\text{EDTA}$

$\text{H}_2\text{O}$  ad 1 l

pH 7,2-7,4 mit 1 N HCl einstellen und durch

	0,2 µm Filter steril filtrieren
PBS	150 mM NaCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4 mit 5 N NaOH einstellen
PBS-Heparin	Dulbecco's PBS (Invitrogen, San Diego, CA, USA) ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> 2% (v/v) Heparin-Natrium (25000 I.E/ 5 ml, Ratiopharm, Ulm, Deutschland)
PBS-FBS	Dulbecco's PBS (Invitrogen, San Diego, CA, USA) ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> 2% FBS (v/v) (Invitrogen, San Diego, CA, USA)
FACS-Puffer	PBS 2% FBS (v/v) 0,01% NaN <sub>3</sub> (v/v)
FACS-Puffer zur Annexin V-Färbung	FACS-Puffer 2 mM CaCl <sub>2</sub>
HBSS-EDTA	HBSS (Invitrogen, San Diego, CA, USA) 1 mM EDTA
MACS-Puffer	Dulbecco's PBS (Invitrogen, San Diego, CA, USA) ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> 0,5 % BSA pH 7,4 mit 5 N NaOH einstellen
50× TAE-Puffer	242 g Tris 57,1 ml 100% (v/v) Essigsäure 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) mit H <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen

Verdaupuffer I	Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI, Invitrogen, San Diego, CA, USA) 0,2 mg/ml Kollagenase IV 0,02 mg/ml DNase I
Verdaupuffer II	Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI, Invitrogen, San Diego, CA, USA) 5% FBS (v/v) 0,35 mg/ml Kollagenase A 1 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM CaCl <sub>2</sub>
Zellkulturmedium	Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Invitrogen, San Diego, CA, USA) 10% FBS (v/v) 500 mM $\beta$ -Mercaptoethanol 1% Penizillin/Streptomycin (v/v) (Invitrogen, San Diego, CA, USA)

#### 4.1.3 Verbrauchsmaterialien

Folgende Verbrauchsmaterialien wurden benutzt:

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

#### 4.1.4 Antikörper

Die verwendeten Antikörper waren zur durchflusszytometrischen Detektion mit einem der folgenden Fluoreszenzfarbstoffe konjugiert:

FITC (Fluoresceinisothiozyanat), PE (Phycoerythrin), APC (Allophycocyanin), PerCP (Peridin-Chlorophyll-Protein), Biotin (Biotin-gekoppelte Antikörper wurden mittels eines Streptavidin Konjugats nachgewiesen). PerCP, beziehungsweise APC-konjugiertes Streptavidin (SA) wurde von der Firma Caltag (San Francisco, CA, USA) bezogen.

**Tabelle 1: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie.**

Epitop (Anti-Maus-)	Konjugat	Klon	Bezugsquelle
H-2K <sup>b</sup>	PE	AF6-88.5	BD, Franklin Lakes, NJ USA
I-A <sup>b</sup>	FITC	AF6-120.1	BD
CD4	PE PerCp APC	H129.19 und RM4-5	BD
CD8	PE FITC PerCP	53-6.7	BD
CD8	APC	5H10	Caltag, San Francisco, CA, USA
CD11c	FITC PE APC Bio	HL3	BD
CD43	PE	S7	BD
CD44	FITC APC	IM7	BD
CD44	PE	IM7.8.1	Caltag
CD45.1	FITC	A20	BD
CD62L	FITC APC	MEL-14	BD
CD122	PE	TM-β1	BD
CD127	APC	A7R34	eBioscience, San Diego, CA, USA
IFN <sub>γ</sub>	PE	XMG1.2	BD
Vα2-TCR	PE Bio	B20.1	BD
Vβ5.1/5.2-TCR	FITC PE Bio	MR9-4	BD



Zur intrazellulären Färbung von IFN $\gamma$  oder Bcl-2 wurde der Cytofix/Cytoperm Kit beziehungsweise das FITC-conjugated Bcl-2 Antibody Reagent Set, zur Analyse der BrdU-Inkorporation der FITC BrdU Flow Kit und zur Bestimmung des TCR-V $\beta$  Repertoires das Mouse V $\beta$  TCR Screening Panel der Firma BD, Franklin Lakes, NJ USA verwendet.

Zum Nachweis von Apoptose wurde ein Annexin V/FITC Kit der Firma Bender MedSystems (Wien, Österreich) herangezogen.

Pro5-MHC-Multimere H-2K<sup>b</sup>/SSINFEKL (OVA<sub>257-264</sub>), H-2K<sup>b</sup>/SSIEFARL (HSVgB<sub>498-505</sub>) und APC-Fluorotag wurden von ProImmune (Oxford, UK) bezogen.

#### **4.1.4 Proteine, Peptide und Oligonukleotide**

Hühner-Ovalbumin wurden von der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) bezogen. Die Peptide OVA<sub>257-264</sub> und OVA<sub>323-339</sub> aus Hühner-Ovalbumin, beziehungsweise HSVgB<sub>498-505</sub> aus Glykoprotein B von HSV-1, wurden von der Firma Neosystems (Strasburg, Frankreich) synthetisiert und bezogen.

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

#25: 5'-CTCCAAGTTGCTCAGAGC-3'

#19: 5'-CCATGGTGATACAAGGGAC-3'.

Hprt 1 links: 5'-TCCTCCTCAGACCGCTTTT-3'

Hprt 1 rechts: 5'-CCTGGTCATCATCGCTAATC-3'

Bcl-2 links: 5'-GATCATGCCGTCCTTAGAAAA-3'

Bcl-2 rechts: 5'-CTGCTTTTTATTTCATGAGGTACATT-3'

Bim links: 5'-GGAGACGAGTTCAACGAAACTT-3'

Bim rechts: 5'-AACAGTTGTAAGATAACCATTTGAGG-3'

Mit Ausnahme von #25 und #19 wurden die Sequenzen aller aufgeführten Oligonukleotide mittels der ProbeFinder Software (Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz) ermittelt.

#### **4.1.5 Virale Vektoren**

Der replikationsdefekte, rekombinante HSV-1-Vektor HSV-OVA wurde im Labor von P. Marconi (Universität Ferrara, Italien) konstruiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Lauterbach,

Kerksiek et al. 2004). Der ebenfalls replikationsdefekte und rekombinante MVA-Vektor (MVA-OVA) wurde im Labor von Ingo Drexler (GSF-Virologie, München) hergestellt (Kastenmüller et al., 2006).

#### **4.1.6 Mausstämme**

Alle Mäuse wurden im Tierstall des Instituts für Immunologie in München gehalten.

Folgende Mausstämme wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

##### C57BL/6

Der MHC-Haplotyp dieses als Wildtyp-Kontrolle dienenden Mausstamms ist H-2<sup>b</sup>.

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

In dem auf C57BL/6-Hintergrund generierten Mausstamm wurde selektiv das  $\beta 2$ -Mikroglobulin-Gen deletiert. Dies führt in  $\beta 2m^{-/-}$ -„knock out“-Mäusen zu einer fehlenden MHC Klasse I - Expression, da der Molekülkomplex nur stabil mit  $\beta 2m$  auf der Zelloberfläche exprimiert werden kann (Koller and Smithies, 1989). Aufgrund der Abwesenheit der positiven Thymusselektion fehlen hier endogene CD8-T-Zellen.

##### CD11c-MHCI

Dieser transgene Mausstamm wurde im genetischen  $\beta 2m^{-/-}$ -Hintergrund generiert.  $\beta 2$ -Mikroglobulin wurde unter der Kontrolle des CD11c-Promotors exprimiert. Dies führt zur funktionellen H-2<sup>b</sup>-Expression selektiv auf DC, während MHC Klasse I auf allen anderen Zellen aufgrund des fehlenden  $\beta 2$ -Mikroglobulins nicht exprimiert wird (Kurts et al., 2001). Durch die Abwesenheit der positiven Thymusselektion fehlen hier endogene CD8-T-Zellen.

##### K14- $\beta 2m \times$ CD11c-MHCI (DC-MHCI)

Dieser Stamm wurde durch eine Kreuzung aus CD11c-MHCI und K14- $\beta 2m$  generiert. In K14- $\beta 2m$  Mäusen wird  $\beta 2$ -Mikroglobulin nur unter der Kontrolle des K14-Promotors exprimiert ( $\beta 2m^{-/-}$ -Hintergrund). Dies führt zur selektiven Expression von MHC-I auf kortikalen Thymusepithelzellen (cTEC) (Capone et al., 2001), 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. Durch Kreuzung mit CD11c-MHCI-Mäusen kommt es zur Wiederherstellung so-

wohl der funktionellen positiven als auch der negativen Thymusselektion von CD8-T-Zellen, da hier kortikale Thymusepithelzellen und DC MHC-I exprimieren.

**Tabelle 2: Verwendete Mausstämmen mit Unterschieden in der MHC-I-Expression.**

	<b>C57BL/6</b>	<b>CD11c-MHCI</b>	<b>K14-β2mx CD11c-MHCI</b>	<b>K14-β2m</b>
<b>Thymus</b>	alle Zellen	DC	cTEC DC	cTEC
<b>MHC-I-Expression</b>				
<b>Peripherie</b>	alle Zellen	DC	DC	—
<b>Positive Selektion</b>	+	—	+	+
<b>Negative Selektion</b>	+	+	+	—
<b>CD4-T-Zellen</b>	+	+	+	+
<b>CD8-T-Zellen</b>	+	—	+	++

### OT-I

Dieser Mausstamm ist transgen für einen T-Zell-Rezeptor, der das Peptid OVA<sub>257-264</sub> im Kontext von MHC-Klasse- I H-2K<sup>b</sup> erkennt (Hogquist et al., 1994). Der TCR kann spezifisch mit den mAb anti-Maus-Vα2- und -Vβ 5.1/5.2-TCR nachgewiesen werden. 90% aller T-Zellen in diesen Mäusen tragen den transgenen Rezeptor, da durch das Transgen die Umlagerung weiterer T-Zell-Rezeptor-Gene verhindert wird.

### OT-II

Dieser Mausstamm ist transgen für einen T-Zell-Rezeptor, der das Peptid OVA<sub>323-339</sub> im Kontext von MHC-Klasse-II I-A<sup>b</sup> erkennt (Robertson et al., 2000). Der TCR kann spezifisch mit den mAb anti-Maus-Vα2- und -Vβ 5.1/5.2-TCR nachgewiesen werden.

## **4.2 Methoden**

### **4.2.1 Molekularbiologische Methoden**

#### **4.2.1.1 Agarose-Gelelektrophorese**

Zur Auftrennung und Identifizierung von DNA-Fragmenten wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Dazu wurden Horizontalgele (ein Prozent Agarose (w/v)) auf TAE-Pufferbasis verwendet. Zur späteren Analyse der DNA-Banden in UV-Licht wurden dem Gel 0,005% (w/v) Ethidiumbromidlösung zugesetzt. Als Längenstandard wurde die 100 Basenpaar DNA-Leiter (Invitrogen, San Diego, CA, USA) auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80 Volt in einer Elektrophoresekammer (Werkstatt, Institut für Immunologie, München, Deutschland) mit 1×TAE als Laufpuffer. Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit einem Geldokumentationssystem (Intas, Göttingen, Deutschland) fotografiert.

#### **4.2.1.2 Isolierung genomischer DNA aus Gewebebiopsien**

Die Gewebeproben (Schwanzspitzen) wurden mit einem sterilen Skalpell in ein bis zwei mm große Stücke geschnitten. Dabei wurde das Anfangsstück verworfen, um eine Kontamination mit Blutspuren anderer Mäuse zu vermeiden. Die Gewebeprobe wurde zusammen mit 100 µl sterilem H<sub>2</sub>O in ein Reaktionsgefäß gegeben. Der Ansatz wurde bei 95°C für zehn min inkubiert und anschließend kurz zentrifugiert. Dann wurden zwei µl Proteinase K (2 mg/ml) zugefügt und mit dem Ansatz vermischt. Während einer etwa zwölfstündigen Inkubation bei 54°C wurde das Schwanzstück verdaut. Bevor die freigesetzte genomische DNA verwendet werden konnte, musste die Proteinase K durch eine zehnminütige Inkubation bei 95°C inaktiviert werden. Anschließend konnte ein Aliquot der DNA direkt in einem PCR-Ansatz verwendet werden.

#### **4.2.1.3 Isolierung von Total-RNA aus primären Zellen**

$5 \times 10^4$ - $5 \times 10^5$  sortierte Zellen wurden bei 1200 upm für fünf min sedimentiert und das überschüssige Volumen entfernt. Die Zellaufschließung und RNA-Isolation erfolgte auf Basis einer Phenolextraktion durch Verwendung von TRIzol Reagent (Invitrogen, San Diego, CA, USA) nach Angaben

des Herstellers. Die isolierte RNA wurde in 20 µl H<sub>2</sub>O gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

#### **4.2.1.4      Synthese von komplementärer DNA (cDNA)**

Mit dieser Methode wird Boten-RNA (*messenger RNA*, mRNA) mit Hilfe von Oligo-(dT)-Primern und des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) in komplementäre DNA (cDNA) übersetzt, welche in dieser Arbeit als Ausgangsmaterial für die quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) verwendet wurde. Dazu wurden acht µl der RNA-Lösung durch Einsatz eines SuperScript First-Strand Kits (Invitrogen, San Diego, CA, USA) nach Herstellerangaben in cDNA revers-transkribiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### **4.2.1.5      Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurden spezifische DNA-Sequenzen amplifiziert, um das Transgen in CD11c-MHCI- oder K14-β2mxCD11c-MHCI-Mäusen nachzuweisen. Durch die Verwendung zweier spezifisch bindender Oligonukleotid-Primer (#19, #25), die die zu amplifizierende Sequenz flankieren, lassen sich spezifische DNA-Bereiche enzymatisch vervielfältigen. Durch mehrere aufeinander folgende temperaturabhängige Denaturierungs-, Primeranlagerungs- und Polymerisationsschritte kommt es zu einer exponentiellen Zunahme des gewünschten Fragments, dessen Enden durch die Primer festgelegt sind. Die DNA-Polymerisation erfolgt durch eine hitzestabile DNA-Polymerase.

PCR-Reaktionsansatz (1x):

- 1 µl Gewebeisolat (siehe Isolierung genomischer DNA aus Gewebebiopsien)
- 2,5 µl Primer #19 (10 pmol/µl)
- 2,5 µl Primer #25 (10 pmol/µl)
- 12,5 µl ReddyMix PCR Master Mix (Abgene, Epsom, UK)
- 6,5 µl H<sub>2</sub>O

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

1. 5 min 95°C
2. 30 sek 95°C
3. 30 sek 53°C
4. 30 sek 72°C, zurück zu 2. (total 30 Zyklen)
5. 10 min 72°C

#### **4.2.1.6 Quantitative PCR**

Zur Analyse der Genexpression ausgewählter Gene wurde ein RT-qPCR-System basierend auf einem 5'-Nuklease Test (Taqman assay) gewählt. Hierzu wird RNA isoliert, revers-transkribiert und mittels PCR amplifiziert und quantifiziert. Die Quantifizierung der Amplifikation erfolgt hierbei in Echtzeit, es wird also der Amplifikationsverlauf über einen Zeitraum und nicht der Endpunkt gemessen. Spezifität wird durch den Einsatz zweier flankierender Primer und einer dazwischen liegenden Probe, die jeweils an die Zielstruktur binden, erreicht. Im Zuge der Polymerisation wird Fluoreszenz eines an die Probe gekoppelten Fluorochromes ermöglicht, welche dann durch das Gerät detektiert wird. Auf diese Art kann die Kopienzahl der Boten-RNA in Relation zu einem Kontrollgen bestimmt werden. Dazu wird der Schwellenwert-Zyklus ( $C_t$ ), an dem die Amplifikation in die exponentielle Phase eintritt zwischen Kontrollgen und Zielgen verglichen ( $\Delta C_t = C_t (\text{Zielgen}) - C_t (\text{Kontrollgen})$ ). Durch Vergleich der  $\Delta C_t$ -Werte einer unbehandelten Kontrolle und der Versuchsgruppe wird die relative Expression berechnet. Als Kontrollgen wurde Hprt 1 gewählt.

PCR-Reaktionsansatz (1x):

- 2 µl cDNA
- 2 µl Primer links (30 pmol/µl)
- 2 µl Primer rechts (30 pmol/µl)
- 12,5 µl Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG (Invitrogen, San Diego, CA, USA)
- 0,5 µl ROX Reference Dye (Invitrogen, San Diego, CA, USA)
- 0,25 µl Probe, Universal Probe Library Mouse (Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz)
- 5,75 µl H<sub>2</sub>O

Die einzelnen Reaktionen wurden in 96-Lochplatten, Quali PCR Platten (Kisker, Steinfurt, Deutschland), pipettiert und kurz zentrifugiert, bevor die Platten mit Folie, PCR-Folie Ultra Clear RT PCR (Kisker, Steinfurt, Deutschland), versiegelt wurden.

Zur Amplifikation und Detektion der gewünschten DNA-Fragmente im ABI 7000 Sequence Detection System, Software Version 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) wurden in der Regel folgende Reaktionsbedingungen gewählt:

1. 2 min 50°C
2. 10 min 95°C
3. 15 sek 95°C
4. 60 sek 60°C, zurück zu 3. (total 40 Zyklen)

#### **4.2.1.7 CDR3-Spektratyping (TCR-V $\beta$ -Analyse)**

Mittels CDR3-Spektratyping können verschiedene T-Zell-Klonfamilien unterschieden werden, weshalb diese Methode angewandt wird, um Unterschiede im T-Zell-Repertoire festzustellen. Dazu wird das Transkriptom der Zelle mittels PCR auf verschiedene Rearrangements der CDR3-Region, bestehend aus der variablen-Domäne (V) und der joining-Domäne (J), untersucht. Die Analyse wurde an der  $\beta$ -Kette des TCR durchgeführt. Dazu wurde die CDR3-Region des TCR durch Einsatz spezifischer Oligonukleotide amplifiziert (Immuno-PCR) und die Amplifikate in einer anschließenden Primer-Extension (Run-off-PCR) mit Fluorochromen markiert. Die PCR-Amplifikation und Markierungsreaktion der Amplifikate wurden wie in (Pannetier et al., 1993) durchgeführt. Diese Sequenzen können durch Elektrophorese getrennt und analysiert werden. Unter Normbedingungen sind die Fragmentlängen, die typischerweise zwischen sieben und 14 Nukleotide lang sind, normalverteilt (Gauß-Verteilung). Ist eine spezielle Fragmentlänge überrepräsentiert, ist dies als Verschiebung der Gauß-Verteilung erkenntlich. Eine solche Abweichung wird zum Beispiel durch die klonale Expansion einer T-Zelle einer Spezifität hervorgerufen.

Milzzellen von unbehandelten oder HSV-infizierten Mäusen (Tag sechs nach Immunisierung) wurden mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung aufgereinigt. Im Anschluss wurde RNA mittels PureLink Micro-to-Midi (Invitrogen, San Diego, CA, USA) isoliert und cDNA-Synthese mittels SuperScript First Strand Kitsystem (Invitrogen, San Diego, CA, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Für die Immuno-PCR wurde folgender Reaktionsansatz erstellt und anschließend zu den bereits in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte vorgelegten TCR-V $\beta$ -Primer (2,5  $\mu$ l, 10 mol/ $\mu$ l) zugegeben. Folgende TCR-V $\beta$ -Primer wurden verwendet: 1, 2, 3.1, 4, 5.1, 5.2, 5.3, 6, 7, 8.1, 8.2, 8.3, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20.

Immuno-PCR Reaktionsansatz (1x):

- 2,5 µl TCR-Cβ-Primer (10 pmol/µl)
- 0,5 µl dNTP (20 mM)
- 5 µl Taq-Puffer (Boehringer, Ingelheim, Deutschland)
- 0,2 µl Taq-Polymerase (Boehringer, Ingelheim, Deutschland)
- 38,5 µl H<sub>2</sub>O
- 1 µl cDNA (aus 5x10<sup>3</sup> bis 5x10<sup>4</sup> Zellen)

Für die darauf anschließende Run-off-PCR wurden zuerst TCR-Jβ-Primer (fünf µl, zehn µmol/µl) in je eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte vorgelegt bevor fünf µl des folgenden Mix zugeben wurden. Folgende Fluorochrom-konjugierten TCR-Jβ-Primer wurden verwendet: 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.7. Durch Kombination der verwendeten Amplifikate kann der Umfang der Run-off-PCR eingeschränkt werden.

Run-off-PCR Reaktionsansatz:

- 15 µl Amplifikat 1 (je eines von TCR-Vβ 10, 6, 9, 16, 20, 3.1, 11, 14)
- 15 µl Amplifikat 2 (je eines von TCR-Vβ 19, 2, 13, 17, 18, 1, 15, 7)
- 15 µl Amplifikat 3 (je eines von TCR-Vβ 4, 5.3, 12, 5.2, 8.3, 5.1, 8.1, 8.2)
- 1,7 µl dNTP (20mM)
- 16,7 µl Puffer (Boehringer, Ingelheim, Deutschland)
- 14,2 µl H<sub>2</sub>O
- 0,4 µl Taq-Polymerase (Boehringer, Ingelheim, Deutschland)

Die Immuno- und Run-off-PCR wurden in einem Eppendorf Mastercycler, die Detektion der Amplifikate mittels Elektrophorese in einem DNA Sequencer, Software GeneScan (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) durchgeführt. In der Regel wurden folgende Reaktionsbedingungen für die Immuno-PCR gewählt:

1. 1 min 94°C
2. 70 sek 94°C
3. 60 sek 60°C
4. 4 min 72°C, zurück zu 2. (total 40 Zyklen)
5. 10 min 72°C

Für die Run-off-PCR wurden folgende Reaktionsbedingungen gewählt:



1. 1 min 94°C
2. 60 sek 58°C
3. 60 sek 72°C, zurück zu 2. (total 12 Zyklen)
4. 10 min 72°C

Die Auftrennung der markierten Fragmente auf Sequenziergelen und die Auswertung der Fragmentlängenverteilung wurden freundlicherweise von Frau Ingrid Eiglmeier unter Leitung von Herrn Dr. Klaus Dornmayr am Institut für Neuroimmunologie (MPI München) durchgeführt.

#### **4.2.1.8 Transkriptomanalyse (Microarray)**

Milzzellen von unbehandelten oder HSV-infizierten Mäusen (Tag sechs nach Immunisierung) wurden durch durchflusszytometrische Zellsortierung aufgereinigt ( $5 \times 10^4$  bis  $5 \times 10^5$  Zellen). Total-RNA wurde mittels TRIzol isoliert und mit einem Affymetrix Two-cycle target labelling kit nach Herstellerangaben markiert. Je drei Replikate wurden auf einen DNA-Chip hybridisiert (Affymetrix Mouse 430v2). Die Markierung, Hybridisierung, Datennormalisierung und Berechnung der Expressionswerte wurden in der zur LMU- und TU- gehörigen Affymetrix Core Facility durchgeführt. Für die graphische Darstellung die freizugängliche GenePattern Software (Broad Institute, Cambridge, MA, USA) verwendet.

### **4.2.2 Zell- und immunbiologische Methoden**

#### **4.2.2.1 Lymphozytenanreicherung aus peripherem Blut**

Für die Blutabnahme wurde die Maus unter einer Infrarotlampe erwärmt. Dies führt zur Weitung der Blutgefäße (Vasodilatation) und somit zur Förderung der Durchblutung. Durch einen Schnitt in die untere Schwanzvene wurden der Maus einige Tropfen (ca. 100 bis 200  $\mu$ l) Blut entnommen und sofort mit ca. 50  $\mu$ l Heparin-Natrium (25000 I.E./fünf ml, Ratiopharm, Ulm, Deutschland) vermischt, um die Blutgerinnung zu verhindern. Nach Zugabe von zwei ml FACS-Puffer (RT) wurde mit einem ml Lymphozytenseparationsmedium (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) (RT) unterschichtet und 30 min bei 1500 upm und 20°C zentrifugiert. Während der Zentrifugation passieren Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten und tote Zellen das Separationsmedium, wohingegen Lymphozyten aufgrund ihrer geringen Dichte auf dem Medium schwimmen. Dieser

sich in der Interphase befindende Lymphozytenring wurde mit einer Pasteurpipette in ein neues fünf ml Reaktionsgefäß mit drei ml kaltem FACS-Puffer überführt und fünf min bei 1200 upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend bis auf ca. 100 µl abgesaugt.

#### **4.2.2.2 Organentnahme und Herstellung einer Einzelzellsuspension**

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

##### Lymphknoten (LK) und Milz

Die zervikalen, brachialen, axillären und inguinalen Lymphknoten wurden mit feinen Pinzetten entnommen und in Puffer (FACS-, MACS-Puffer, beziehungsweise PBS-FBS) auf Eis bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Milz wurde mit einer feinen Schere herausgelöst und in Puffer auf Eis gelagert.

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

##### Leber

Nach Durchtrennung der Aorta wurde die Leber durch Punktion der Pfortader mit PBS-Heparin gespült um Blutlymphozyten zu entfernen. Die Leber wurde dann nach Entfernung der Gallenblase entnommen, in kleine Stücke zerkleinert und in zehn ml Verdaupuffer I für 40 min bei 37°C unter Schütteln aufgeschlossen. Anschließend wurden die Gewebestücke zwischen Netzen analog zur Milz zerrieben und in final 50 ml PBS-FBS aufgenommen. Die Suspension wurde für fünf min bei 500 upm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Röhrchen transferiert. Nach erneuter Zentrifugation für zehn min bei 1200 upm wurde der Überstand verworfen und das Pellet in einem ml Puffer suspendiert.

##### Lunge

Nach Durchtrennung der Aorta wurde die Lunge über Punktion des Herzens mit PBS-Heparin gespült um Blutlymphozyten zu entfernen. Die Lunge wurde entnommen, in kleine Stücke zer-

kleinert und in HBSS-EDTA für 30 min (RT) geschüttelt. Dann wurde das Gewebe mit PBS-FBS gewaschen, in fünf ml Verdaupuffer II überführt und für 30 min bei 37°C aufgeschlossen. Anschließend wurden das Gewebe in PBS-FBS gewaschen und die Gewebestücke analog zum Milzgewebe zerrieben um eine Einzelsuspension zu erstellen.

#### Erythrozytenlyse

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

#### Bestimmung der Zell-Zahl

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

#### **4.2.2.3 Durchflusszytometrie (FACS Analyse)**

Mit einem FACS Gerät (FACS) kann die relative Größe, Granularität oder interne Komplexität und die relative Fluoreszenzintensität einer Zelle gemessen werden. Zellen werden dazu in einem Flüssigkeitsstrom durch einen fokussierten Laserstrahl geleitet, wobei beim einzelnen Passieren einer Zelle Licht gestreut wird. Das Vorwärtsstreulicht ist das Maß für die Zellgröße und das Seitwärtsstreulicht das Maß für die Granularität einer Zelle. Die Fluorochrome, mit denen die Zellen gegebenenfalls markiert wurden, absorbieren Licht einer spezifischen Wellenlänge und emittieren Licht einer höheren Wellenlänge. Bei der Analyse der aufgenommenen Zellen kann die interessierende Zellpopulation durch Eingrenzen der entsprechenden Region genau betrachtet werden. Gängige Darstellungsweisen sind das Histogramm, bei dem nur eine Streugröße oder Fluoreszenz dar-

gestellt wird, oder das Punktwolkendiagramm, bei dem zwei Streugrößen beziehungsweise Fluoreszenzen gegeneinander dargestellt werden.

Die Messungen erfolgten mit einem FACSCalibur- oder FACS Aria-Durchflusszytometer (BD, Franklin Lakes, NJ, USA). Die Datenaufnahme und -analyse erfolgte mit CellQuest oder FACS Diva Software (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) beziehungsweise FlowJo-Software (Tree-star, Ashland, OR, USA)

#### Färbung von Lymphozyten mit fluorochrommarkierten Antikörpern

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

#### Nachweis antigenspezifischer T-Zellen mittels MHC-Multimeren

Endogene, polyklonale T-Zell-Populationen, die als Immunantwort auf eine Immunisierung expandieren, besitzen ein diverses TCR-Repertoire. Um epitopspezifische T-Zellen zu detektieren, kann der spezielle Ligand des jeweiligen TCR, der MHC-Peptid/Epitop-Komplex eingesetzt werden. Wird dieser Komplex an ein Fluorochrom konjugiert, sind die antigenspezifischen T-Zellen nach Bindung der löslichen MHC-Komplexe *ex vivo* durchflusszytometrisch quantifizierbar und isolierbar. Durch zusätzliche Multimerisierung dieser Komplexe zu beispielsweise Tetrameren oder Pentameren wird ihre Avidität zusätzlich erhöht. Es wurden Multimere der Firma ProImmune (Oxford, UK) verwendet. Die Färbung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

#### Nachweis von Apoptose

Eines der ersten Anzeichen von Apoptose ist, dass im Zuge der Veränderung der Plasmamembran Phosphatidylserin von der inneren auf die äußere Seite transloziert und so für Annexin V zugänglich wird. Annexin V ist ein  $\text{Ca}^{2+}$  abhängiges Phospholipid-Bindeprotein mit einer hohen Affinität für Phosphatidylserin. Aktinomycin (7-AAD) ist ein fluoreszierender Farbstoff, der an die DNA bindet. Er kann die Plasmamembran von lebendigen Zellen oder solchen, die sich in der ersten Phase der Apoptose befinden nicht durchdringen. Zellen, die sich jedoch in späteren Phasen der Apoptose befinden oder schon tot sind, haben die Integrität ihrer Plasmamembran verloren und sind durchlässig für 7-AAD. Mit Hilfe einer Färbung mit Annexin V und 7-AAD können also lebendige Zellen (Annexin V<sup>-</sup>, 7-AAD<sup>-</sup>) von proapoptotischen Zellen (Annexin V-positiv, 7-AAD-

negativ) und Zellen im Endstadium der Apoptose unterschieden werden (Annexin V-positiv, 7-AAD-positiv).

Die Apoptose-Induktion wurde durch FACS-Analyse mit Annexin V (Bender MedSystems, Wien, Österreich) und 7-AAD (BD, Franklin Lakes, NJ USA) kontrolliert. Die Färbung von  $5 \times 10^6$  Zellen in 100  $\mu$ l FACS-Puffer erfolgte analog zu der oben beschriebenen Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern. Danach wurden die Zellen gewaschen und in 180  $\mu$ l FACS-Puffer (+ 2 mM  $\text{CaCl}_2$ ) aufgenommen. In einem zweiten Schritt erfolgte die Färbung für Annexin V und 7-AAD durch Zugabe von jeweils 20  $\mu$ l. Nach 15 min Inkubation (RT) wurden die Zellen in FACS-Puffer (+ 2 mM  $\text{CaCl}_2$ ) gewaschen und analysiert.

#### Intrazelluläre Zytokinfärbungen in T-Zellen *ex vivo*

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

Eine Einzelzellsuspension von  $1 \times 10^7$  Milzzellen aus einer immunisierten Maus wurde in Zellmedium mit 20  $\mu$ g/ml Peptid in Gegenwart von einem  $\mu$ l Brefeldin A/ml für vier Stunden bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  in einer 24-Lochplatte inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mittels Cytofix/Cytoperm (BD, Franklin Lakes, NJ USA) nach Herstellerangaben gefärbt. Bis zur FACS-Analyse wurden die Zellen bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

#### **4.2.2.4      Magnetische Zellseparation (MACS)**

Die magnetische Zellseparation (MACS, Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach) beruht auf der Separation von Zellen mit Antikörpern, welche an paramagnetische Partikel (Microbeads) gekoppelt sind. Die Separation erfolgt mit Hilfe einer Säule, die in ein starkes Magnetfeld platziert wird. Die magnetisch markierten Zellen werden dadurch in der Säule zurückgehalten, während die unmarkierten Zellen passieren. Sobald die Säule aus dem Magnetfeld herausgenommen wird, können die magnetisch zurückgehaltenen Zellen eluiert werden. Es können prinzipiell zwei Isolationsstrategien verfolgt werden: a) positive Selektion/Isolierung (Microbeads), das heißt die gewünschte

Zellpopulation wird mit Antikörpern markiert und auf der Säule zurückgehalten oder b) negative Selektion/Isolierung (Isolation kit), das heißt alle unerwünschten Zellen werden markiert und zurückgehalten. In dieser Arbeit wurden beide Strategien angewendet. Naive CD8-T-Zellen wurden mittels CD8-T-Zell-Isolationskit gereinigt, mit FITC-gekoppelten anti-CD44-Antikörper gefärbt und dann CD44-positive Zellen mit FITC-Microbeads depletiert. OT-I- beziehungsweise OT-II-Zellen wurden mittels CD8- beziehungsweise CD4-T-Zell-Isolationskit, DC mit CD11c-Microbeads isoliert. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

#### **4.2.2.5 Durchflusszytometrische Zellsortierung**

Eine Weiterentwicklung des klassischen Durchflusszytometers dient der Zellsortierung. Hier können zuerst mittels Fluorochromen markierte Zellen aus dem Flüssigkeitsstrom mittels elektrischer Ablenkung isoliert und somit gereinigt werden. Dazu wurde ein FACS Aria (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) eingesetzt. Die Zellen wurden dazu in PBS-FBS aufgenommen und mittels Antikörpern beziehungsweise Multimeren angefärbt. Die Sortierung erfolgte mit einer Flussrate von maximal zwei unter ständiger Kühlung der Probe. Die erzielte Reinheit der Zielpopulation lag bei 90 bis 99 %.

#### **4.2.2.6 Adoptiver Zelltransfer**

Der Transfer von T-Zellen in syngene Empfängertiere ermöglicht es, das Verhalten einer geringen Anzahl polyklonaler oder auch antigenspezifischer T-Zellen direkt *in vivo* zu verfolgen. Dadurch entsteht im Rezipienten eine Zell-Population, die groß genug ist, um zum Beispiel mittels Durchflusszytometrie detektiert werden zu können. Hierzu wurden Einzelzellsuspensionen aus Milz und Lymphknoten hergestellt. Die Erythrozyten in der Milzzellsuspension wurden mittels ACK-Puffer lysiert. Anschließend wurden die T-Zellen mittels negativer Selektion (MACS) isoliert. Um den prozentualen Anteil der jeweiligen T-Zell-Fraktion zu bestimmen, wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Es wurden  $2 \times 10^6$  polyklonale naive CD8-T-Zellen, beziehungsweise  $0,5 \times 10^6$  OT-I- oder OT-II-T-Zellen pro Maus i.v. transferiert. Direkt vor der Injektion wurden die Zellen durch ein Nylonnetz (Reichert Chemie Technik, Porengröße 51  $\mu\text{m}$ ) filtriert, um eine Verklumpung zu vermeiden. Es wurden nur Zellen in syngene, gleichgeschlechtliche Mäuse transferiert. Die Detektion der transferierten T-Zellen erfolgte durch Färbung kongener Marker (CD45.1 vs. CD45.2) oder anderer spezifischer Oberflächenmoleküle.

#### **4.2.2.7 Induktion von Lymphopenie**

Endogene Lymphozyten (hier T-Zellen) können entweder durch sublethale Bestrahlung mit 550 rad (Model G.C. 40; Type B (4); Atomic Energy of Canada Limited, Ontario, Kanada) oder durch Verabreichung von depletierenden Antikörpern *in vivo* entfernt werden. Während die Bestrahlung Apoptose induziert, vermitteln depletierende Antikörper eine Komplementaktivierung (immunologischer Abwehrmechanismus bestehend aus löslichen Serumproteinen), welche zur Lyse der antikörperbeschichteten Zellen führt. In dieser Arbeit wurden depletierende Antikörper anti-CD4 (Klon GK1.4), anti-CD25 (Klon PC61) und anti-90.2 (Klon 30H12) verwendet. 250 µg dieser Antikörper wurden zwei Tage vor T-Zell-Transfer und dann zweimal wöchentlich i.p. injiziert. Auf diese Art wurden über 90% der Zielzellen entfernt.

#### **4.2.2.8 Injektion in Mäuse**

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

#### **4.2.2.9 Immunisierung von Mäusen**

##### Lösliche Peptide oder Proteine

Wird Antigen (Peptid oder Protein) in Abwesenheit von inflammatorischen Mediatoren verabreicht führt dies zu T-Zell-Toleranz. Bei Vorhandensein von zum Beispiel bakteriellen Bestandteilen wie Lipopolysaccharid (LPS) kann es hingegen zu einer immunologischen Reaktion kommen. In dieser Arbeit wurde LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) als inflammatorisches Agens zusammen mit Peptid oder Protein i.v., beziehungsweise nur Peptid verabreicht. Hierzu wurden pro Maus zehn µg LPS, zehn µg OVA<sub>257-264</sub>, 100 µg OVA<sub>323-336</sub>, beziehungsweise 100 µg Protein (gelöst in PBS) gemischt und i.v. injiziert.

Immunkomplexe (OVA-IgG) oder Protein gekoppelt an Antikörper (DEC205-OVA)

Zur Erstellung von Ovalbumin-Immunkomplexen wurden fünf µg Ovalbumin mit 125 µg anti-Ovalbumin-Antikörper (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in einem Volumen von 200 µl PBS gemischt und für 30 min bei 37°C geschüttelt. Diese Lösung wurde im Anschluss direkt i.v. in Mäuse injiziert.

DEC205-OVA-Konjugate wurden freundlicherweise von Dr. Karsten Mahnke (Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellt (Bonifaz et al., 2002). Diese wurden mit 50 µg anti-CD40-Antikörper vermischt und ebenfalls direkt i.v. appliziert.

Immunisierung mit antigenbeladenen DC

Aus einer Einzelsuspension der Milz wurden CD11c-positive Zellen (DC) mittels positiver Isolierung (MACS) aufgereinigt. Die Reinheit lag bei 70 %.  $2 \times 10^6$  Zellen wurden in eine 24-Lochplatte eingesät und mit zehn µg/ml OVA<sub>257-264</sub> und zehn µg/ml LPS für eine Stunde inkubiert. Die Zellen wurden von der Platte vorsichtig gelöst und dreimal mit PBS gewaschen. Direkt vor der Injektion von  $0,5 \times 10^6$  Zellen wurden die Zellen durch ein Nylonnetz (Reichelt Chemie Technik, Porengröße 51 µm) filtriert.

Immunisierung mit rekombinanten Viren (HSV-OVA, MVA-OVA)

Die zur Immunisierung verwendeten Viren wurden auf Eis aufgetaut und mit PBS bis zur gewünschten Konzentration verdünnt. Anschließend wurde die Suspension gut gemischt, für fünf sek in ein Ultraschall-Wasserbad (Ultrason E, Greiner, Frickenhausen, Deutschland) gestellt und bis zur Injektion auf Eis gelagert. Zur i.v. Immunisierung wurden jeweils 200 µl in die Schwanzvene injiziert (entsprach  $4 \times 10^6$  pfu Virus).

#### **4.2.2.10 Markierung von Zellen mit Carboxyfluorescein-Diacetate-Succinimidylester (CFSE)**

Diese Art der Markierung wird vor allem für die Analyse von Zellteilung *in vivo* als auch *in vitro* benutzt. Der Farbstoff bindet hierbei an Proteinreste der Zellmembran und des Zytosols. Bei einer Zellteilung kommt es zur Verdünnung des Farbstoffes, jede Tochterzelle erhält 50 % des Farbstoffes, was als Abnahme der Fluoreszenzintensität messbar wird.

Zur CFSE-Markierung von Zellen wurden Einzelzellsuspensionen aus soliden Organen hergestellt und eventuell vorhandene Erythrozyten mittels ACK-Puffer entfernt. Die Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen um Reste von FBS aus der Lösung zu entfernen, da sie die Färbung mit CFSE inhibieren würde. Anschließend wurden die Zellen mit fünf µM CFSE pro  $1-50 \times 10^6$  Zellen zehn



min bei 37°C abgedunkelt inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml FBS (100%) gestoppt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und zur späteren Injektion in PBS, beziehungsweise für *in vitro* Versuche in Medium suspendiert.

#### **4.2.2.11      *In vivo* BrdU-Inkorporationstest**

Der Einbau von BrdU (Bromodesoxyuridin) in die DNA während der Synthesephase des Zellzyklus wird ebenfalls zur Analyse der Zellproliferation herangezogen. Das eingebaute BrdU kann nach intrazellulärer und intranukleärer Färbung durch einen spezifischen Antikörper nachgewiesen werden.

Für unsere Analysen wurden in unbehandelte oder immunisierte Mäuse 20 Stunden vor der Analyse ein mg BrdU (BD, Franklin Lakes, NJ USA) i.p. injiziert. Zur Analyse der BrdU-Einbauraten wurden die Tiere getötet, die Organe entnommen und eine Einzelsuspension erstellt.  $5 \times 10^6$  Zellen wurden nach den Angaben des Herstellers mit einem FITC BrdU Flow Kit (BD, Franklin Lakes, NJ USA) gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

#### **4.2.2.12      *In vivo* Zytotoxizitätstest**

Dieser Test erlaubt die Messung der zytotoxischen Effektorfunktion von CD8-T-Zellen *in vivo*. Dazu wurden Einzelzellsuspensionen aus der Milz präpariert und die Erythrozyten lysiert. Die Zellen wurden in Zellkulturmedium aufgenommen und in zwei Populationen aufgeteilt. Eine Hälfte wurde mit Peptid beladen, indem dem Zellkulturmedium das Peptid OVA<sub>257-264</sub>, beziehungsweise HSVgB<sub>498-505</sub> (20 µg/ml) zugefügt wurde. Die Zellen wurden bei 37°C für eine Stunde inkubiert und anschließend mit einer hohen Konzentration CFSE (1,7 µM) angefärbt (CFSE<sup>high</sup> Zellen). Die andere Hälfte blieb unbeladen und wurde mit einer niedrigen Konzentration CFSE (0,2 µM) angefärbt (CFSE<sup>low</sup> Zellen). Vor der Injektion wurden die Zellen beider Populationen im Verhältnis 1:1 vermischt und jeder Maus  $1 \times 10^7$  Zellen i.v. injiziert. Die Zellen wurden in syngene Mäuse transferriert, welche einige Tage bis Wochen (je nach Experiment) zuvor immunisiert worden waren. Die Mäuse wurden nach fünf bis 15 Stunden getötet, um ihre Milzen zu isolieren. Die Milzzellen wurden ohne weitere Färbung mittels Durchflusszytometrie analysiert und jede Population der transferrierten Zellen durch ihre unterschiedliche CFSE-Fluoreszenzintensität detektiert.

Anhand des Verhältnisses CFSE<sup>low</sup> zu CFSE<sup>high</sup>-Zellen wurde die spezifische Lyse nach folgender Formeln berechnet:

Verhältnis beider Populationen zueinander:

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

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

#### **4.2.2.13 Messung der Zellproliferation *in vitro***

OT-I-T-Zellen und Milz-DC wurden mittels negativer Isolation, beziehungsweise mit positiver Isolation (MACS) aufgereinigt und in PBS suspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit CFSE gefärbt. Nach dem Waschen wurden die Zellen in Zellkulturmedium aufgenommen.  $1 \times 10^5$  gefärbte OT-I-Zellen wurden mit  $1 \times 10^5$  DC in einer 24-Lochplatte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> stimuliert. Die verwendeten DC wurden 20 Stunden vorher durch Injektion von zehn µg LPS und zehn µg OVA<sub>257-264</sub> *in vivo* mit Antigen beladen und gereift. Um eine Antigenpräsentation der DC zu gewährleisten und zugleich ihre Proliferation *in vitro* zu verhindern, wurden diese mit 1000 rad (Model G.C. 40; Type B (4); Atomic Energy of Canada Limited, Ontario, Kanada) bestrahlt. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und die OT-I-T-Zellen mit Antikörpern gegen CD8 gefärbt. Anschließend konnte die Proliferation als Funktion der CFSE-Verdünnung untersucht werden.

#### **4.2.2.14 Statistik**

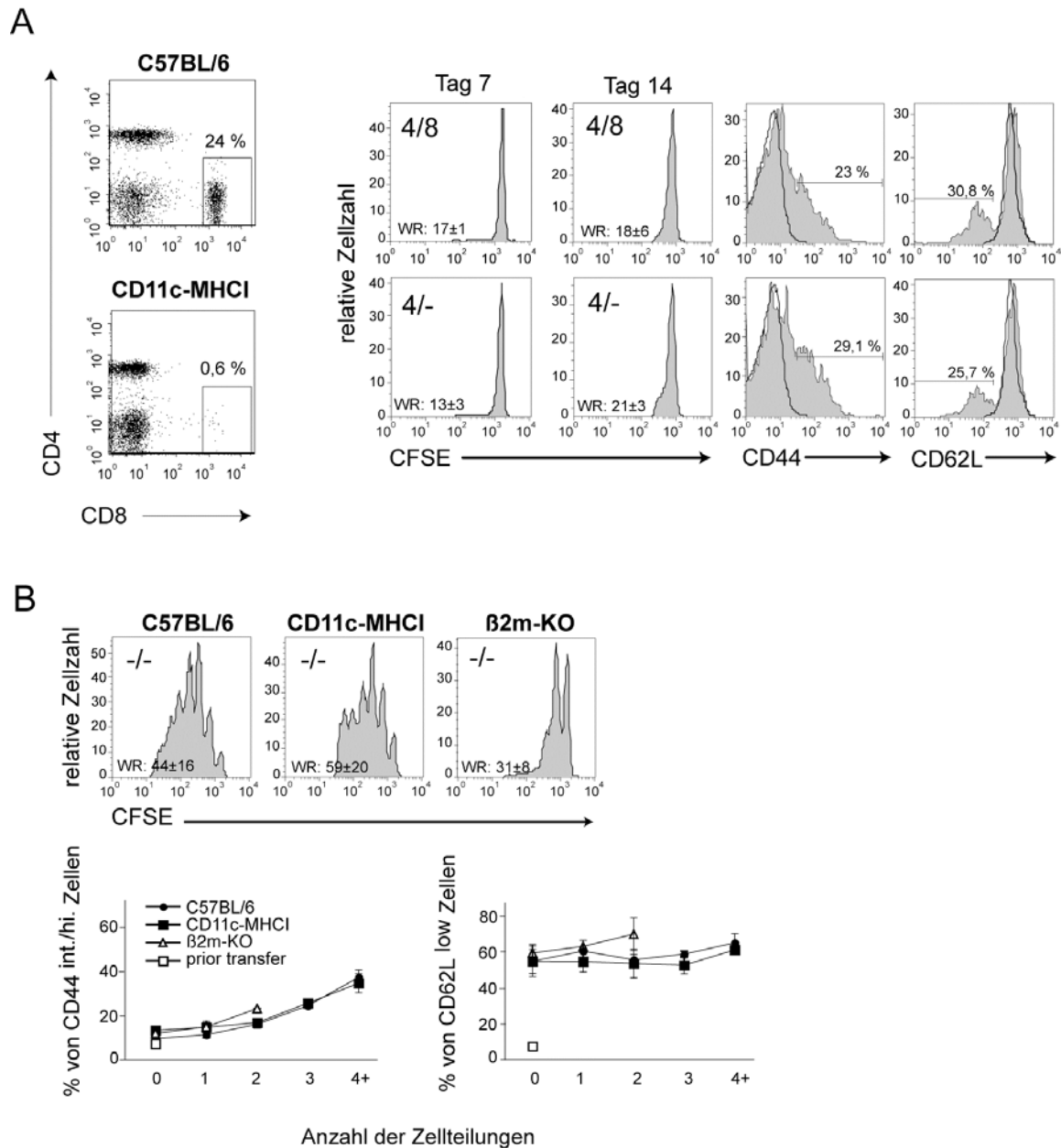
Mittelwerte, Standardabweichungen und P-Werte (Student'scher *t*-Test) wurden mit dem Programm Microsoft Excel 2001 berechnet.

## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 Die HP zytotoxischer CD8-T-Zellen

#### 5.1.1 Die Rolle von DC

Die Proliferation naiver CD8-T-Zellen verläuft in der Regel nur sehr langsam. Eine HP naiver T-Zellen tritt nur nach Lymphopenie auf, wenn T-Zellen in unbehandelte Mäuse transferiert werden, die ein komplettes T-Zell-Kompartiment besitzen, kommt es zu keinen Teilungen. Um dies zu testen wurden  $2 \times 10^6$  naive CD8-positive/CD44<sup>low</sup> T-Zellen in unbehandelte C57BL/6-Wildtypmäuse transferiert. Hierbei dient die Fluoreszenzabnahme von CFSE als Maß für die Zellproliferation. Da es zu keinen Zellteilungen kam, blieben alle Zellen (gezeigt sind Zellen der Milz) bis zu Tag 14 nach Transfer uniform hoch in ihrer Leuchtintensität (*Abbildung 5 A*). Die Wiederfindungsraten (WR) der transferierten T-Zellen waren in beiden Mausstämmen vergleichbar und lagen bei  $1-2 \times 10^5$  Zellen pro Maus (Milz und LK). Der Phänotyp änderte sich nur unwesentlich, die Zellen blieben in Bezug auf die Expression von CD44 und CD62L naiv. Auch CD8-T-Zellen, die in CD11c-MHCI-Mäuse transferiert wurden, konnten sich nicht teilen und zeigten nach wie vor einen naiven Phänotyp. Dies war unerwartet, da in CD11c-MHCI-Mäusen endogene CD8-Kompetitoren fehlten. Erst nach der Induktion von Lymphopenie mittels sublethaler Bestrahlung kam es zu einer Proliferation (*Abbildung 5 B*). In beiden Mausstämmen (C57BL/6 und CD11c-MHCI) kam es zu einer HP mit vier bis fünf Zellteilungen innerhalb von sieben Tagen. Somit sind DC in der Lage die HP von naiven zytotoxischen T-Zellen zu induzieren. Auch die Wiederfindungsraten und die Modulation von CD44 und CD62L waren vergleichbar. Mit zunehmenden Zellteilungen erwarben die Zellen die Oberflächenexpression von CD44 und verloren die Expression von CD62L. In  $\beta 2m$ -Knockout ( $\beta 2m$ -KO) Mäusen kam es trotz des Fehlens von MHC-I-Molekülen zu einer Hintergrundproliferation der transferierten T-Zellen, die jedoch wie auch die Wiederfindungsraten vermindert war.

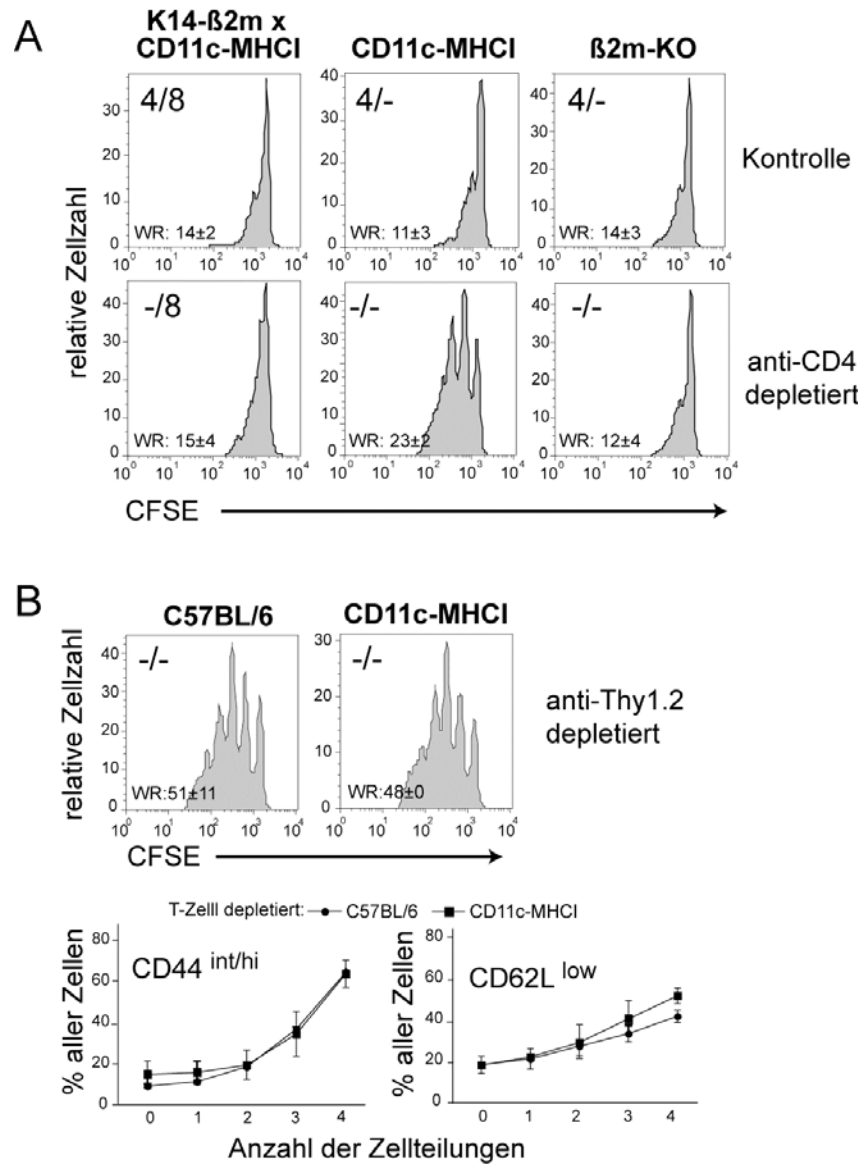


**Abbildung 5: DC und die HP naiver CD8-T-Zellen.**  $2 \times 10^6$  naive T-Zellen (CD8-positive/D44<sup>low</sup>) aus C57BL/6-Mäusen wurden in unbehandelte oder T-Zell-depletierte Mäuse i.v. transferiert. Der Status des endogenen CD4- (4) und CD8- (8) T-Zell-Kompartiments vor Transfer ist in der oberen linken Ecke des jeweiligen Histogramms schematisch verdeutlicht, fehlen die Zellen, ist dies als (-) dargestellt. (A) Die Proliferation, Wiederfindungsraten (WR) und die Modulation von CD44 und CD62L wurden am Tag sieben, beziehungsweise 14 nach Zelltransfer in der Milz analysiert (Zellen vor Transfer, schwarze Linie; Zellen nach Transfer, grau-gefüllte Linie). Die Wiederfindungsraten beziehen sich auf Milz und LK und sind  $\times 10^4$  dargestellt. (B) Mäuse wurden zwei Tage vor T-Zell-Transfer durch Bestrahlung mit 550 rad T-Zell-depletiert. Die Proliferation der transferierten Zellen wurde am Tag sieben nach dem Transfer in der Milz analysiert. Die Wiederfindungsraten wurden wie in (A) ermittelt. Die Modulation von CD44 und CD62L wurde für jede Zellteilung getrennt ermittelt und dargestellt. Gezeigt wird ein repräsentatives Experiment von drei Replikaten mit vergleichbarem Ergebnis, je Gruppe wurden drei Tiere verwendet (dargestellt sind die Einzelwerte oder der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

### 5.1.2 Die Bedeutung von MHC-I-Molekülen

Um die Abhängigkeit der HP vom Vorhandensein von MHC-I zu testen wurden MHC-I-negative CD8-T-Zellen (aus K14- $\beta$ 2m $\times$ CD11c-MHCI-Mäusen) in unbehandelte Mäuse, mit unterschiedlichen MHC-I-Expressionsprofilen, transferiert (Kontrolle, *Abbildung 6 A*). Die Verwendung von MHC-I-negativen Zellen war notwendig, da MHC-I-positive T-Zellen in  $\beta$ 2m-KO-Mäusen abgestoßen würden, während die verwendeten Mausstämmen für MHC negative Zellen tolerant sind. In K14- $\beta$ 2m $\times$ CD11c-MHCI-Mäusen unterbanden endogene CD8-T-Zellen die Proliferation. In CD11c-MHCI- und  $\beta$ 2m-KO-Mäusen kam es trotz des Fehlens von endogenen CD8-T-Zellen zu keiner Proliferation. Die Wiederfindungsraten waren in allen drei Stämmen vergleichbar. Erst nach der Depletion von endogenen CD4-T-Zellen durch anti-CD4-Antikörper kam es zu einer HP in CD11c-MHCI-Mäusen. In K14- $\beta$ 2m $\times$ CD11c-MHCI-Mäusen wurde die Proliferation durch endogene CD8-T-Zellen unterbunden. Auch in  $\beta$ 2m-KO-Mäusen konnte es zu keinen Zellteilungen kommen, obwohl endogene CD8- und CD4-T-Zellen fehlten.

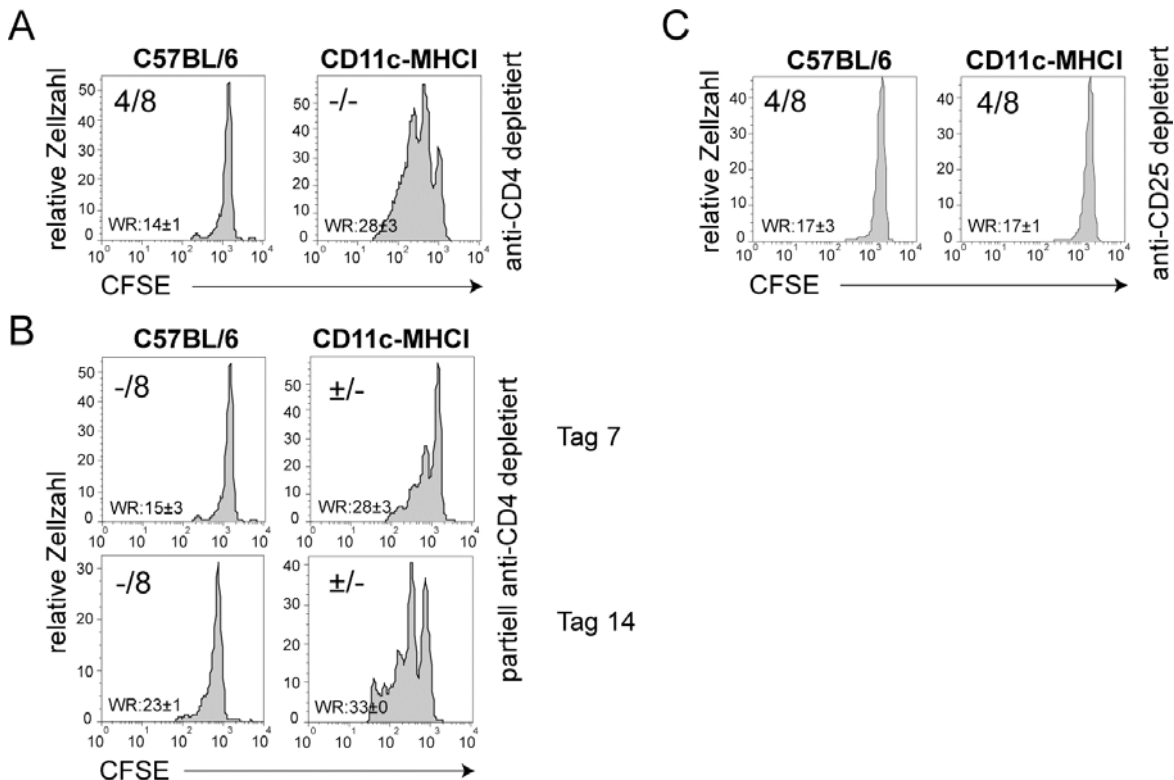
Neben der Verwendung von anti-CD4-Antikörper konnten T-Zellen auch durch Einsatz von anti-Thy1.2-Antikörper depletiert werden. In Thy1.2-depletierte Mäuse wurden naive Thy1.1-positive CD8-T-Zellen transferiert, um eine Depletion zu verhindern (*Abbildung 6 B*). Diese Zellen proliferierten in C57BL/6- und CD11c-MHCI-Mäusen und modulierten CD44 und CD62L in einem vergleichbaren Maße. Auch die Wiederfindungsraten der transferierten T-Zellen waren in beiden Mausstämmen vergleichbar. Diese Ergebnisse verdeutlichten, dass erstens MHC-I strikt notwendig war um eine HP zu induzieren, zweitens dass CD11c-positive DC ausreichend waren um diese Interaktion zu vermitteln und drittens, dass endogene CD4-T-Zellen die Proliferation von naiven CD8-T-Zellen inhibieren konnten.



**Abbildung 6: Die HP naive CD8-T-Zellen und die Bedeutung von MHC-I.**  $2 \times 10^6$  naive T-Zellen (CD8-positive/CD44<sup>low</sup>) aus K14-β2m x CD11c-MHCI- (A) oder C57BL/6-(Thy 1.1)-Mäusen (B) wurden in unbehandelte oder T-Zell-depletierte Mäuse i.v. transferiert. Der Status des endogenen CD4- (4) und CD8- (8) T-Zell-Kompartiments vor Transfer ist in der oberen linken Ecke des jeweiligen Histogramms schematisch verdeutlicht. Fehlen die Zellen ist dies als (-) dargestellt. (A) Die Proliferation in unbehandelten Kontrollen wurde in der Milz, die Wiederfindungsraten (WR) in Milz und LK ( $\times 10^4$ ) am Tag sieben nach Zelltransfer analysiert. Die HP wurde in Antikörper-depletierten Mäusen untersucht (anti-CD4 depletiert). (B) Mäuse wurden durch Gabe von anti-Thy1.2 T-Zell-depletiert. Die Proliferation der transferierten Thy1.1-positive Zellen wurde am Tag sieben nach Transfer in der Milz analysiert. Die Wiederfindungsraten wurden wie in (A) ermittelt. Die Modulation von CD44 und CD62L wurde für jede Zellteilung separat ermittelt und dargestellt. Gezeigt wird ein repräsentatives Experiment von drei Replikaten mit vergleichbarem Ergebnis, je Gruppe wurden drei Tiere verwendet (dargestellt sind der Einzelwert oder Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

### 5.1.3 Die Inhibition durch endogene CD4-T-Zellen

Wie bereits in Abbildung 6 gezeigt, konnten endogene CD4-T-Zellen die Proliferation transferierter CD8-T-Zellen unterbinden. Erst durch ihre Depletion konnte eine HP in CD11c-MHCI-Mäusen induziert werden, während in C57BL/6-Mäusen endogene CD8-T-Zellen die Proliferation unterbinden konnten (Abbildung 7 A).



**Abbildung 7: Der Einfluss von CD4-, beziehungsweise regulatorischen T-Zellen.**  $2 \times 10^6$  naive T-Zellen (CD8-positive/CD44<sup>low</sup>) aus C57BL/6-(Thy 1.1)-Mäusen wurden in unbehandelte oder T-Zell-depletierte Mäuse i.v. transferriert. Der Status des endogenen CD4- (4) und CD8- (8) T-Zell-Kompartiments vor Transfer ist in der oberen linken Ecke des jeweiligen Histogramms schematisch verdeutlicht, Fehlen die Zellen ist dies als (-) dargestellt. (A) Die Proliferation in CD4-T-Zell-depletierten Mäusen wurde in der Milz, die Wiederfindungsraten (WR) in der Milz und den LK ( $\times 10^4$ ) am Tag sieben nach Zelltransfer analysiert. (B) Mäuse wurden durch verminderte Gabe von anti-CD4-Antikörper partiell depletiert, die Zahl von CD4-T-Zellen wurde auf 30-50% reduziert. Die Proliferation der transferrierten Zellen wurde an den Tagen sieben und 14 nach Transfer in der Milz analysiert. Die Wiederfindungsraten wurden wie in (A) ermittelt. (C) Mäuse wurden durch Injektion von anti-CD25-Antikörper depletiert, die Zahl von CD4-T-Zellen wurde auf rund 10% reduziert. Die Proliferation der transferrierten Zellen wurde am Tag sieben nach Transfer in der Milz analysiert. Die Wiederfindungsraten wurden wie in (A) ermittelt. Gezeigt wird ein repräsentatives Experiment von zwei Replikaten mit vergleichbarem Ergebnis, je Gruppe wurden drei Tiere verwendet (dargestellt sind der Einzelwert oder der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

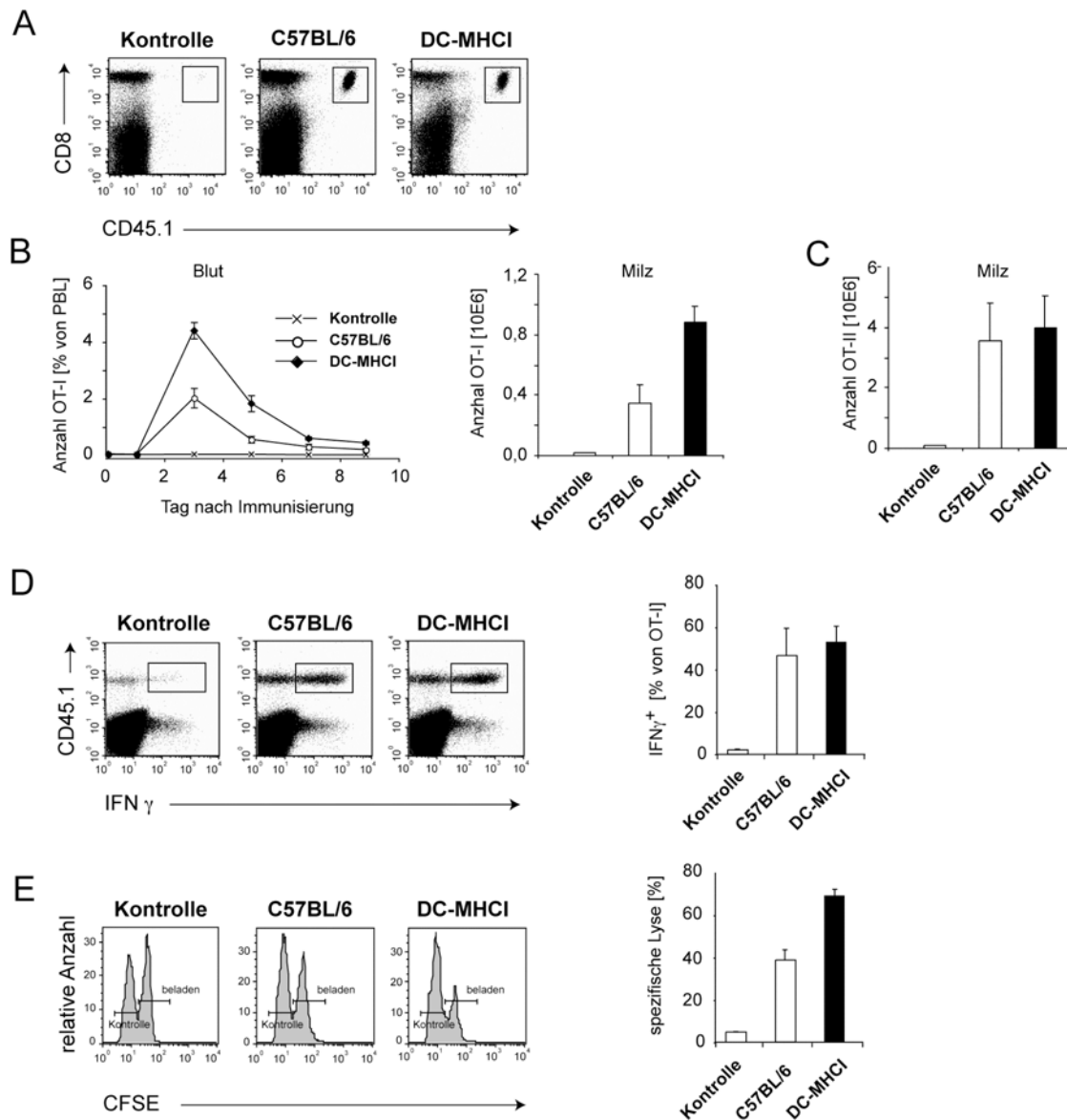
Eine Verringerung der Anzahl von CD4-T-Zellen auf 30-50% des Ausgangswertes reichte allerdings bereits aus, um die Proliferation in CD11c-MHCI-Mäusen zu gewähren (*Abbildung 7 B*). Die Proliferation wurde in diesem Fall jedoch verlangsamt im Vergleich zur Komplettdpletion von CD4-T-Zellen. CD4-positive/CD25-positive regulatorische T-Zellen nehmen in vielen immunologischen Bereichen wichtige Funktionen ein. Um ihren möglichen Einfluss zu testen wurden CD25-positive Zellen durch Antikörpergabe depletiert. In C57BL/6-Mäusen verhinderten endogene CD8-T-Zellen die Proliferation (*Abbildung 7 C*). Auch in CD11C-MHCI-Mäusen konnte keine Proliferation detektiert werden. Daraus konnte geschlossen werden, dass zwar CD4-T-Zellen aber nicht regulatorische T-Zellen die Homöostase von transferierten CD8-T-Zellen beeinflussten.

## **5.2 Die antigenabhängige Proliferation zytotoxischer CD8-T-Zellen**

### **5.2.1 Die DC-vermittelte T-Zell-Aktivierung und T-Zell-Expansion (adoptiver T-Zell-Transfer)**

Um zu analysieren, ob DC ausreichen, um CD8-vermittelte Immunität zu induzieren, wurden C57BL/6- und K14- $\beta$ 2m $\times$ CD11c-MHCI-Mäuse (DC-MHCI) immunisiert und die Immunantwort verglichen. In DC-MHCI-Mäusen können nur DC (CD11c-positiv) das Antigen präsentieren. Um die Detektion zu vereinfachen und die Vorläuferfrequenz der T-Zellen anzugleichen wurden  $0,5 \times 10^6$  OT-I-T-Zellen transferiert, die spezifisch für ein Peptid aus Ovalbumin sind. Diese Zellen wurden durch Färbung des kongenen Markers CD45.1 detektiert (die Empfängertiere trugen CD45.2, *Abbildung 8 A*). 20 Stunden später wurden die Mäuse mit zehn  $\mu$ g OVA<sub>257-264</sub> Peptid und 20  $\mu$ g LPS als Adjuvans immunisiert und die Immunantwort in Blut und Milz verfolgt (*Abbildung 8 B*). Im Blut kam es zu einem deutlichen Anstieg der Anzahl von OT-I-T-Zellen verglichen zur nicht immunisierten Kontrolle. Die Maximalantwort war am Tag drei nach Immunisierung detektierbar. Überraschenderweise war die Expansion in DC-MHCI-Mäusen um das zwei- bis dreifache erhöht verglichen zu C57BL/6-Wildtypmäusen. Dies wurde durch Analyse der absoluten OT-I-Zahlen in der Milz (Tag drei nach Immunisierung) bestätigt. Als Kontrollexperiment wurden naive CD4-OT-II-T-Zellen in die beschriebenen Mäuse transferiert, bevor diese mit 100  $\mu$ g OVA<sub>323-339</sub> Peptid und 20  $\mu$ g LPS immunisiert wurden (*Abbildung 8 C*).





**Abbildung 8: Die T-Zell-Expansion und Effektorfunktionen nach der Immunisierung mit OVA-Peptid und LPS.**  $0,5 \times 10^6$  OT-I-T-Zellen (CD45.1-positiv) wurden in C57BL/6- und DC-MHCI-Mäuse i.v. transferiert. (B) Mäuse wurden nach 20 h i.v. mit zehn  $\mu\text{g}$  OVA<sub>257-264</sub> und 20  $\mu\text{g}$  LPS immunisiert und die Expansion in Blut und Milz (Tag drei nach Immunisierung) analysiert. (C)  $2 \times 10^6$  OT-II-Zellen wurden in C57BL/6- und DC-MHCI-Mäuse i.v. transferiert und 20 Stunden später i.v. mit hundert OVA<sub>323-339</sub> und 20  $\mu\text{g}$  LPS immunisiert. Die Expansion der T-Zellen wurde am Tag drei in der Milz analysiert. (D) Mäuse wurden wie in (B) immunisiert. Am Tag drei nach Immunisierung wurden die Milzen entnommen und *in vitro* mit 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  OVA<sub>257-264</sub> stimuliert. (E) Wie in (B) wurden immunisierten Mäusen am Tag 13 nach Immunisierung OVA<sub>257-264</sub>-beladenen Zielzellen verabreicht und deren Abstoßung *in vivo* in der Milz verfolgt, während unbeladene Kontrollzellen nicht abgestoßen wurden. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von drei Replikaten mit vergleichbarem Ergebnis. Je Gruppe wurden drei Tiere verwendet (dargestellt sind die Einzelwerte oder der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

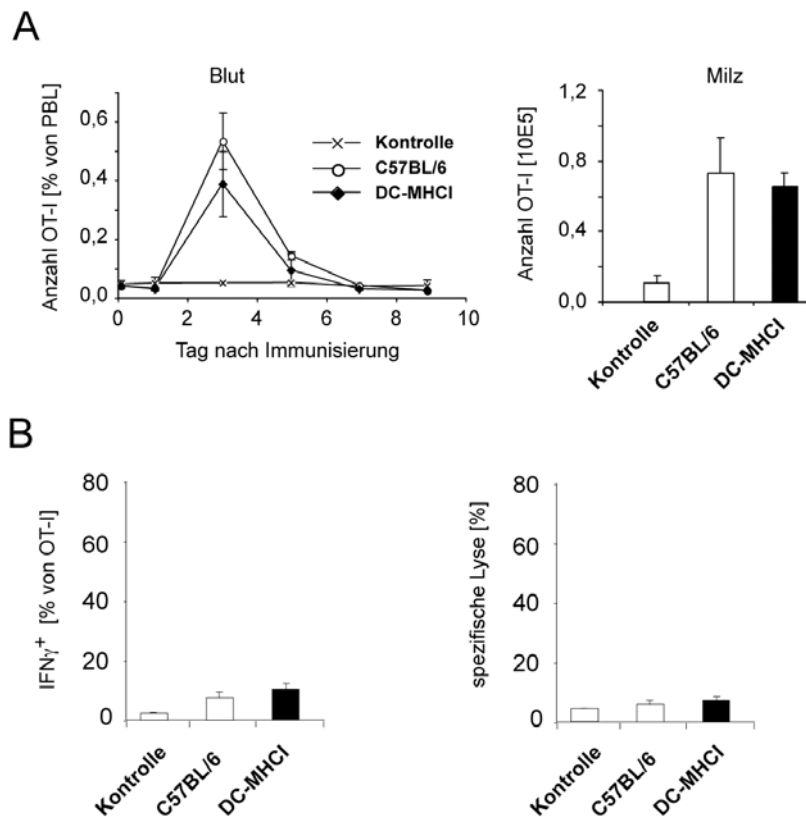
Wie erwartet war die T-Zell-Expansion in der Milz in beiden Mausstämmen vergleichbar stark, da in beiden Stämmen die MHC-Klasse-II Expression gleich war. Neben der T-Zell-Expansion wurden der Phänotyp der generierten OT-I-Zellen sowie ihre Effektorfunktionen untersucht. Die Modulation wichtiger T-Zell-Oberflächenmoleküle, wie zum Beispiel CD43, CD44, CD62L, CD122 und CD127 waren in beiden Mausstämmen vergleichbar, obwohl es zu deutlichen Unterschieden in der Anzahl der T-Zellen kam (Daten nicht gezeigt). Als Effektorfunktionen wurde die Kapazität der IFN $\gamma$ -Produktion und die Fähigkeit antigenbeladene Zielzellen abzustößen untersucht. Zur Analyse der IFN $\gamma$ -Produktion wurden die Mäuse nach dem OT-I-Transfer mit zehn  $\mu\text{g}$  OVA<sub>257-264</sub> und 20  $\mu\text{g}$  LPS i.v. immunisiert. Am Tag drei nach Immunisierung wurden die Milzen entnommen, in Kultur gebracht und *in vitro* für vier Stunden mit 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  OVA<sub>257-264</sub> restimuliert. Die Produktion von IFN $\gamma$  wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Während nicht immunisierte Kontrollmäuse keine Produktion von IFN $\gamma$  zeigten, konnte ein Großteil der OT-I-Zellen in C57BL/6- und DC-MHCI-Mäusen zur Produktion angeregt werden (*Abbildung 8 D*). Hierbei war der Anteil der IFN $\gamma$ -positiver OT-I-Zellen in beiden Stämmen gleich und lag bei rund 50%. Zur Analyse der zytotoxischen Aktivität *in vivo* wurden die Mäuse mit zehn  $\mu\text{g}$  OVA<sub>257-264</sub> und 20  $\mu\text{g}$  LPS immunisiert. Nach 13 Tagen wurden  $1 \times 10^7$  mit OVA<sub>257-264</sub>-beladenen Milzzellen in diese Mäuse transferiert und ihre Abstoßung in der Milz verfolgt (*Abbildung 8 E*). Nicht immunisierte Kontrollmäuse akzeptieren sowohl die unbeladene CFSE<sup>low</sup> Zellfraktion als auch die antigenbeladene CFSE<sup>high</sup> Zellfraktion, während immunisierte Wildtypmäuse und DC-MHCI-Mäuse die antigenbeladenen Zellen abstießen. Hierbei war die Abstoßung in DC-MHCI-Mäusen beschleunigt, da durch die gesteigerte Expansion mehr antigenspezifische OT-I-T-Zellen generiert wurden. Somit waren die T-Zellen in beiden Stämmen trotz Unterschieden in der Expansion vergleichbar im Phänotyp als auch in ihren Effektorfunktionen.

### 5.2.2 Die DC-vermittelte T-Zell-Toleranz (adoptiver T-Zell-Transfer)

Um zu analysieren, ob DC ausreichen um CD8-Toleranz zu induzieren, wurden C57BL/6- und DC-MHCI-Mäuse mit OVA<sub>257-264</sub> in Abwesenheit von Adjuvans immunisiert. Auch unter diesen Bedingungen kam es zu einer Proliferation der OT-I-Zellen in Blut und Milz, die Expansion war jedoch verringert (*Abbildung 9 A*). Im Gegensatz zu einer inflammatorischen Situation (Antigen plus LPS, *Abbildung 8*) war die T-Zell-Antwort in C57BL/6- und DC-MHCI-Mäusen vergleichbar. Die generierten Zellen waren in beiden Mausstämmen nicht mehr in der Lage *in vitro* IFN $\gamma$  zu

produzieren oder *in vivo* antigenbeladene Zielzellen abzustoßen (Abbildung 9 B). Diese Ergebnisse verdeutlichten, dass DC ausreichten um eine funktionelle CD8-T-Zell-Toleranz zu induzieren.

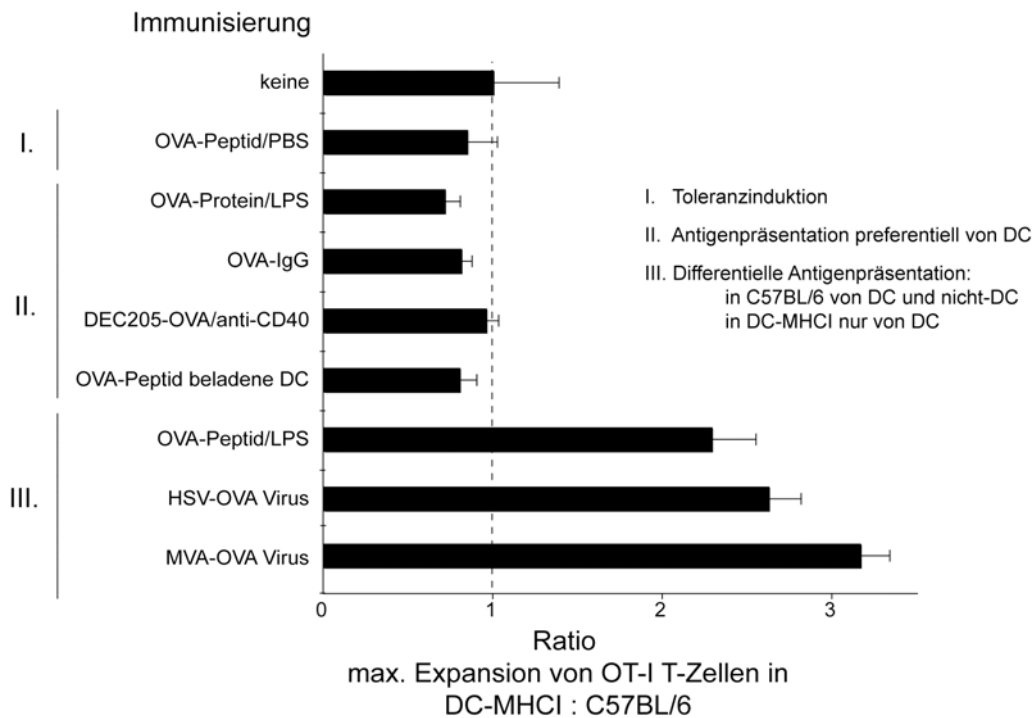


**Abbildung 9: Induktion von CD8-T-Zell-Toleranz.**  $0,5 \times 10^6$  OT-I-Zellen (CD45.1-positiv) wurden in C57BL/6- und DC-MHCI-Mäuse i.v. transferiert. (A) Mäuse wurden nach 20 Stunden i.v. mit zehn  $\mu\text{g}$  OVA<sub>257-264</sub> immunisiert und die Expansion in Blut und Milz (Tag drei nach Immunisierung) analysiert. (B) Mäuse wurden wie in (A) immunisiert. Für die Analyse der IFN $\gamma$ -Produktion wurden am Tag drei nach Immunisierung die Milzen entnommen und *in vitro* mit 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  OVA<sub>257-264</sub> stimuliert. Zur Detektion zytotoxischer Effektorfunktionen wurden immunisierten Mäusen am Tag 13 nach Immunisierung OVA<sub>257-264</sub>-beladenen Zielzellen verabreicht und deren Abstoßung *in vivo* in der Milz verfolgt, während unbeladene Kontrollen nicht abgestoßen wurden. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von zwei Replikaten mit vergleichbarem Ergebnis. Je Gruppe wurden drei Tiere verwendet (dargestellt sind die Einzelwerte oder Mittelwert und Standardabweichung).

### 5.2.3 Vergleichende Analyse verschiedener Antigenformulierungen (adoptiver T-Zell-Transfer)

Um die Expansionsunterschiede zwischen C57BL/6- und DC-MHCI-Mäusen genauer zu charakterisieren, wurden die zwei Stämme mit verschiedenen Formulierungen des Antigens (Peptid, Prote-

in, Immunkomplexe, Virus-kodiertes Antigen) immunisiert. Die Immunantwort wurde im Blut analysiert. Am Maximum der Antwort wurde das Verhältnis der Frequenz von OT-I-Zellen im Blut zwischen C57BL/6- und DC-MHCI-Mäusen verglichen. Bei einer identischen Maximaexpansion der OT-I-T-Zellen wurde als Ratio eins berechnet (*Abbildung 10*).



**Abbildung 10: Vergleichende Analyse der T-Zell-Expansion nach Einsatz verschiedener Immunisierungsarten.**

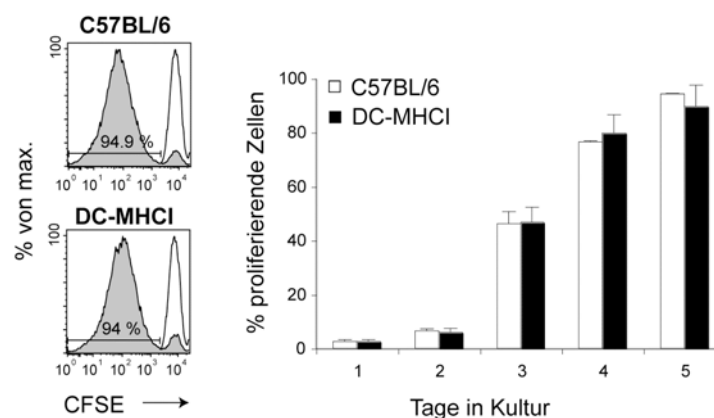
0,5x10<sup>6</sup> OT-I-Zellen wurden in C57BL/6- und DC-MHCI-Mäuse transferiert. Nach 20 Stunden wurden die Rezipienten i.v. immunisiert mit: zehn µg OVA<sub>257-264</sub>, 100 µg Ovalbumin plus 20 µg LPS, OVA-IgG (fünf µg Ovalbumin plus 125 µg anti-Ovalbumin IgG, DEC205-Ovalbumin-Konjugat plus 50 µg anti-CD40-Antikörper, OVA<sub>257-264</sub>-beladene DC (0,5x10<sup>6</sup> Zellen), OVA<sub>257-264</sub> plus 20 µg LPS oder 4x10<sup>6</sup> pfu HSV-OVA, beziehungsweise MVA-OVA. Der Anteil von OT-I-Zellen am Maximum der Antwort (Tag drei nach Immunisierung) wurde analysiert. Zur Berechnung des Ratios wurde die Frequenz von OT-I-Zellen in DC-MHCI-Mäusen zum Mittelwert der Frequenz in C57BL/6-Mäusen in Beziehung gesetzt. Die Ergebnisse stammen aus verschiedenen Experimenten und umfassen je Immunisierungsart drei bis sechs Mäuse je Stamm, wobei für die jeweilige Immunisierungsart C57BL/6- und DC-MHCI-Tiere innerhalb des gleichen Experiments verglichen wurden. Dargestellt werden der Mittelwert und die Standardabweichung.

Wurden die Mäuse nicht immunisiert, kam es zwar zu keiner Expansion, die Wiederfindungsraten in beiden Stämmen waren aber gleich. Unter Bedingungen der Toleranzinduktion (I) (10 µg OVA<sub>257-264</sub>) wurden ebenfalls keine Expansionsunterschiede festgestellt, ebenso wenn das Antigen in beiden Mäusen hauptsächlich durch DC prozessiert und präsentiert wurde (II). Dies wurde erzielt

indem das Antigen (plus Adjuvans) als Protein (100  $\mu\text{g}$  plus 20  $\mu\text{g}$  LPS), Immunkomplex (fünf  $\mu\text{g}$  Ovalbumin plus 125  $\mu\text{g}$  anti-Ovalbumin IgG, beziehungsweise DEC205-Ovalbumin-Konjugat plus 50  $\mu\text{g}$  anti-CD40-Antikörper) oder durch antigenbeladene DC ( $0,5 \times 10^6$  DC) appliziert wurde. Nur wenn differentielle Antigenpräsentation stattfinden konnte (III), wie es bei Immunisierung mit Peptid (OVA<sub>257-264</sub> plus 20  $\mu\text{g}$  LPS) oder durch Infektion mit Ovalbumin kodierenden Viren ( $4 \times 10^6$  pfu HSV-OVA, beziehungsweise MVA-OVA) erfolgte, kam es zu einer gesteigerten Akkumulation in DC-MHCI-Mäusen. Differentielle Antigenpräsentation heißt hier, dass in C57BL/6 verschiedene Zelltypen das Antigen präsentieren können, während in DC-MHCI-Mäusen dies nur DC können.

#### 5.2.4 Die Antigenpräsentation durch DC *ex vivo*

Um die Kapazität der Antigenpräsentation durch DC in C57BL/6- und DC-MHCI-Mäusen direkt *ex vivo* zu vergleichen, wurden Mäuse mit zehn  $\mu\text{g}$  OVA<sub>257-264</sub> plus 20  $\mu\text{g}$  LPS i.v. immunisiert. Nach 20 Stunden wurden die Milzen entnommen, CD11c-positive Zellen aufgereinigt und mit 1000 rad bestrahlt. Parallel dazu wurden OT-I-T-Zellen isoliert, aufgereinigt und mit CFSE markiert. Je  $0,5 \times 10^6$  DC wurden mit  $0,5 \times 10^6$  OT-I-Zellen inkubiert und die Verdünnung von CFSE als Indikator von Zellteilung an den darauf folgenden Tagen analysiert (Abbildung 11).

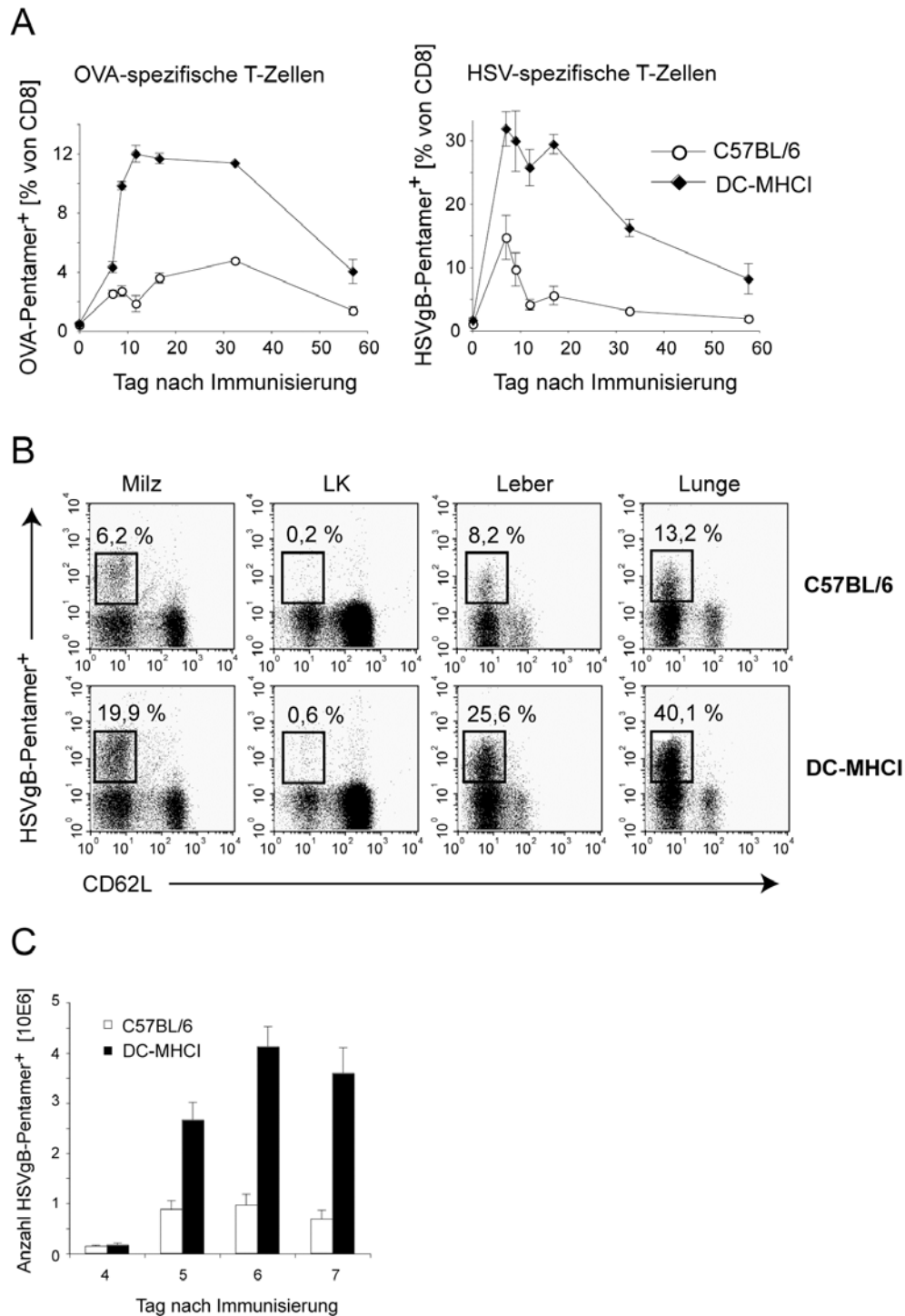


**Abbildung 11: Die Kapazität der Antigenpräsentation durch DC *ex vivo*.** DC wurden *in vivo* durch Gabe von zehn  $\mu\text{g}$  OVA<sub>257-264</sub> und 20  $\mu\text{g}$  LPS beladen. 20 Stunden später wurden DC aus Milz isoliert und aufgereinigt. Diese Zellen dienten als Stimulatoren von aufgereinigten, CFSE gefärbten OT-I-T-Zellen. Dazu wurden  $0,5 \times 10^6$  DC mit  $0,5 \times 10^6$  OT-I-Zellen inkubiert und die Proliferation an den Tagen ein bis Tag fünf in Kultur analysiert. Pro Mausstamm wurden je drei Mäuse *in vivo* mit Antigen beladen. Gezeigt wird der Einzelwert oder der Mittelwert und Standardabweichung.

An den ersten Tagen in Kultur kam es zu keinen Zellteilungen, erst am Tag drei teilten sich rund 50% aller Zellen. Am Tag fünf in Kultur hatten über 90% der Zellen proliferiert. Der Anteil geteilter Zellen war in beiden Mausstämmen an allen Tagen gleich. Somit war die Antigenbeladung der DC *in vivo* als auch deren Kapazität T-Zellen *in vitro* zu stimulieren in C57BL/6- und DC-MHCI-Mäusen vergleichbar.

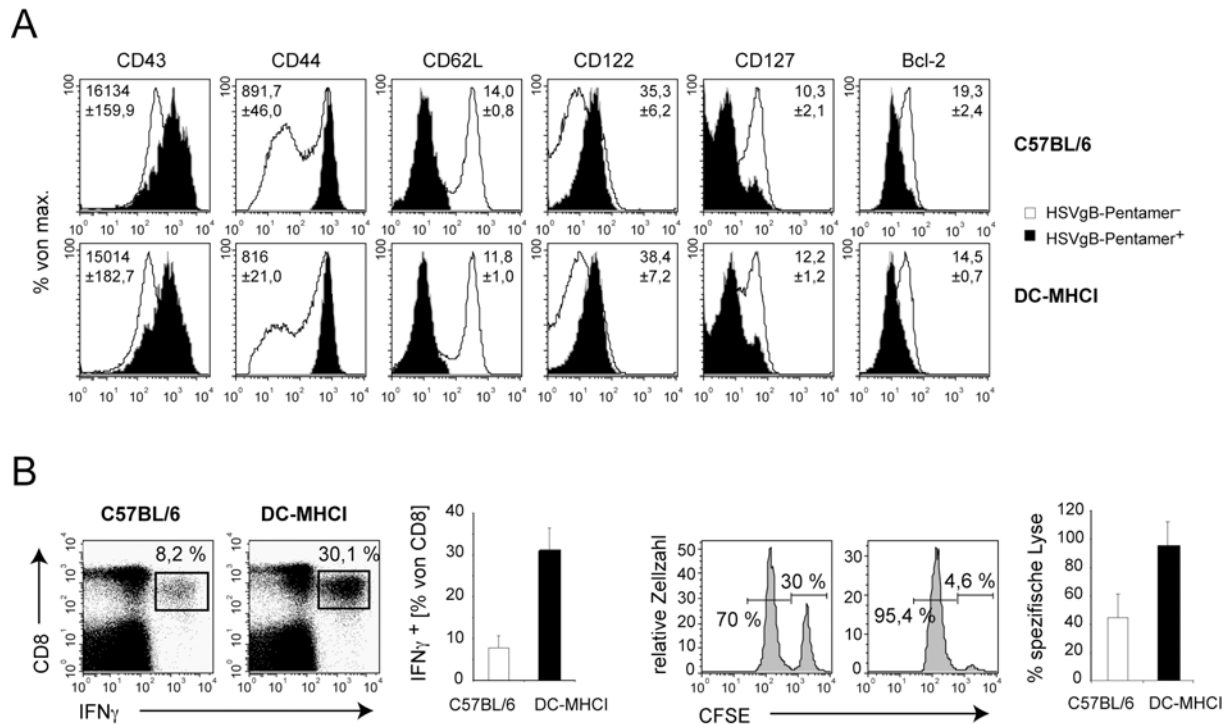
#### **5.2.4 Die DC-vermittelte T-Zell-Aktivierung und T-Zell-Expansion (endogenes T-Zell-Repertoire)**

Um mögliche Artefakte des adoptiven T-Zell-Transfers zu vermeiden, wurde als nächstes die Fähigkeit von DC analysiert eine endogene T-Zell-Antwort nach Virusinfektion zu induzieren. C57BL/6- und DC-MHCI-Mäuse wurden mit  $4 \times 10^6$  pfu HSV-OVA i.v. immunisiert. Die Expansion endogener T-Zellen wurde mittels Multimer-Färbung analysiert. Dabei konnte die Antwort zweier verschiedener Spezifitäten (Ovalbumin-spezifische und HSV-Glykoprotein-B-spezifische T-Zellen) im Blut verfolgt werden (*Abbildung 12 A*). Nach Immunisierung kam es zu einem starken Anstieg OVA<sub>257-264</sub>- und HSVgB<sub>498-505</sub>-spezifischer T-Zellen mit dem Maximum zwischen den Tagen sieben und zehn. Wie bereits im adoptiven T-Zell-Transfer-Modell gezeigt, war die Expansion in DC-MHCI-Mäusen deutlich verstärkt (drei- bis fünffach). Um Unterschiede in der Migration als Ursache auszuschließen wurden verschiedene Organe am Tag sechs nach Immunisierung untersucht (*Abbildung 12 B*). Sowohl in lymphatischen (Milz, LK), als auch in nicht-lymphatischen Organen wurden höhere Zahlen HSVgB-spezifischer T-Zellen in DC-MHCI-Mäusen detektiert. Alle antigenspezifischen T-Zellen waren aktiviert und verloren die Expression von CD62L. Während am Beginn der Immunantwort (Tag vier nach der Immunisierung) die Anzahl HSVgB-spezifischer Zellen in der Milz noch vergleichbar war, wurde der Akkumulationsunterschied an den folgenden Tagen sehr deutlich (*Abbildung 5.8 C*). Deshalb war es unwahrscheinlich, dass Unterschiede in der Vorläuferfrequenz der T-Zellen die Ursache der gesteigerten Akkumulation waren, wenn nur DC das Antigen präsentieren konnten (DC-MHCI-Mäuse).



**Abbildung 12: Die endogene T-Zell-Antwort nach der HSV-OVA Infektion.** C57BL/6- und DC-MHCI-Mäuse wurden mit  $4 \times 10^6$  pfu HSV-OVA i.v. immunisiert. Die Expansion OVA<sub>257-264</sub>- oder HSVgB<sub>498-505</sub>-spezifischer T-Zellen wurde (A) im Blut oder (B) in der Milz, den LK, der Lunge und der Leber (nur HSVgB-spezifische T-Zellen, Tag sechs nach Immunisierung) untersucht. (C) Die Akkumulation HSVgB-spezifischer T-Zellen wurde an verschiedenen Tagen in der Milz analysiert. Pro Gruppe wurden drei Mäuse immunisiert (dargestellt ist der Einzelwert oder der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung). Gezeigt wird ein repräsentatives Ergebnis eines von zweien Experimenten.

Der Phänotyp als auch die Effektorfunktionen der generierten T-Zellen waren in beiden Mausstämmen vergleichbar (Abbildung 12 A). Dazu wurden Mäuse mit HSV-OVA immunisiert und die Modulation von CD43, CD44, CD62L, CD122, CD127 und Bcl-2 am Tag fünf nach Immunisierung in der Milz analysiert. Im Vergleich zu nicht HSVgB-spezifischen T-Zellen kam es zu einer deutlichen Veränderung der untersuchten Oberflächenmoleküle auf HSVgB-spezifischen T-Zellen in beiden Mausstämmen.



**Abbildung 13. Phänotyp und Effektorfunktion HSVgB-spezifischer T-Zellen.** C57BL/6- und DC-MHCI+ Mäuse wurden mit  $4 \times 10^6$  pfu HSV-OVA i.v. immunisiert. (A) Am Tag fünf nach Transfer wurde der Phänotyp HSVgB<sub>498-505</sub>-spezifischer T-Zellen in der Milz untersucht. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten MFI (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) HSVgB-spezifischer (schwarz) und nichtspezifischen (weiß) T-Zellen. (B) Zur Analyse der IFN $\gamma$ -Produktion wurden am Tag sechs nach Immunisierung Milzzellen isoliert und *in vitro* mit HSVgB<sub>498-505</sub> Peptid restimuliert. Zur Detektion zytotoxischer Aktivität *in vivo* wurden am Tag 21 nach Immunisierung HSVgB<sub>498-505</sub>-beladene Zielzellen in die Mäuse transferiert und ihre Abstoßung in der Milz verfolgt. Dargestellt sind der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Gezeigt wird ein repräsentatives Ergebnis einer Wiederholung mit jeweils drei Tieren je Gruppe.

Die Fähigkeit zur IFN $\gamma$ -Produktion wurde am Tag sechs nach Immunisierung in der Milz untersucht, alle HSVgB-spezifischen T-Zellen konnten IFN $\gamma$  nach *in vitro* Restimulation produzieren (Abbildung 13 B, links). Die Lyse antigenbeladener Zellen war in DC-MHCI-Mäusen erhöht, da

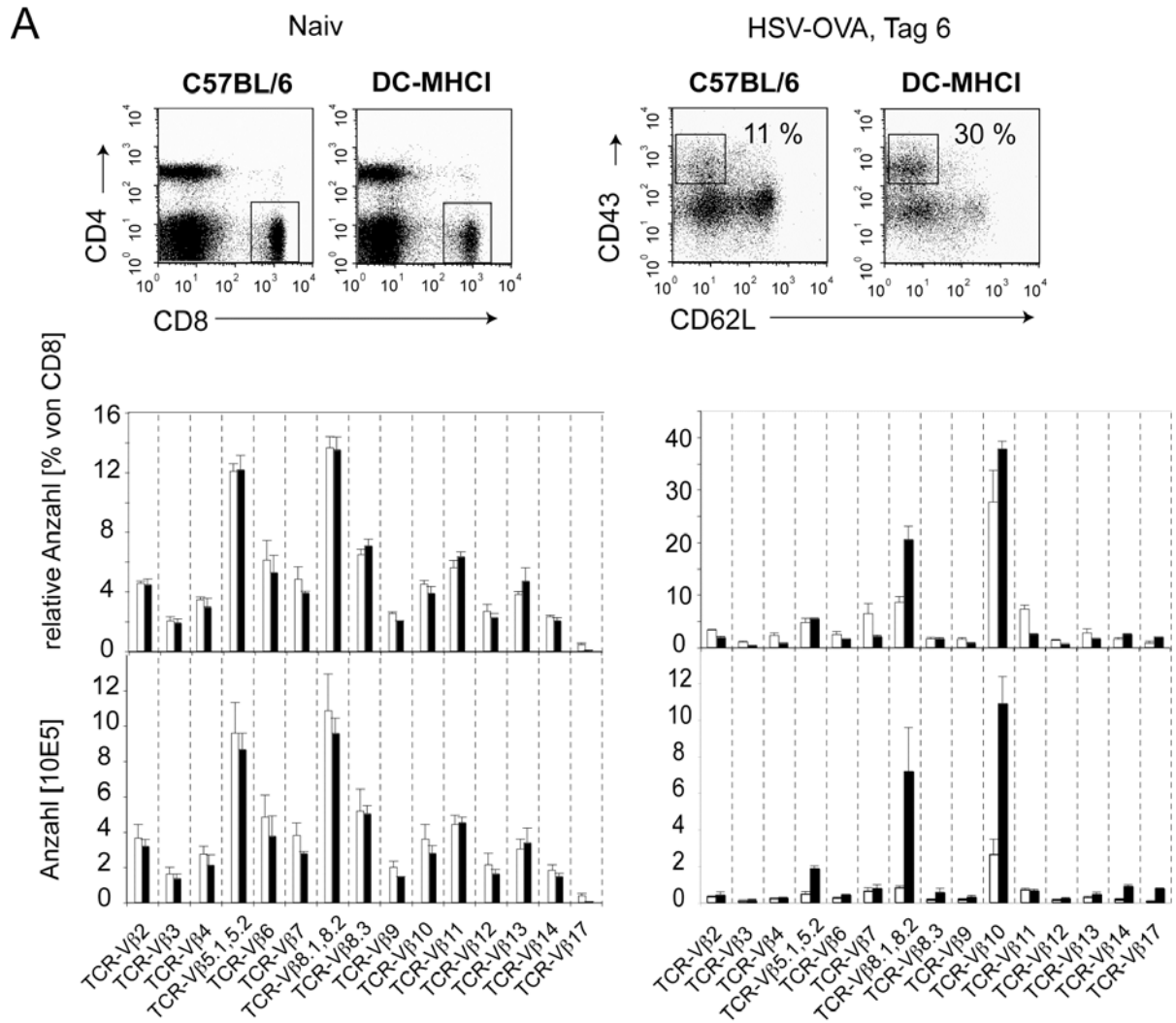


auch die Anzahl von Effektorzellen am Tag 21 nach Immunisierung höher als in C57BL/6 lag (*Abbildung 13 B, rechts*).

Diese Daten verdeutlichen die Kapazität von DC endogene, antigenspezifische T-Zellen mit Effektorfunktionen zu generieren. Da es durch die Virusinfektion zu differentieller Antigenpräsentation kommt (DC in DC-MHCI versus DC plus nicht-DC in C57BL/6), war die Immunantwort in DC-MHCI-Mäusen verstärkt.

### 5.2.6 Charakterisierung des endogenen T-Zell-Repertoires

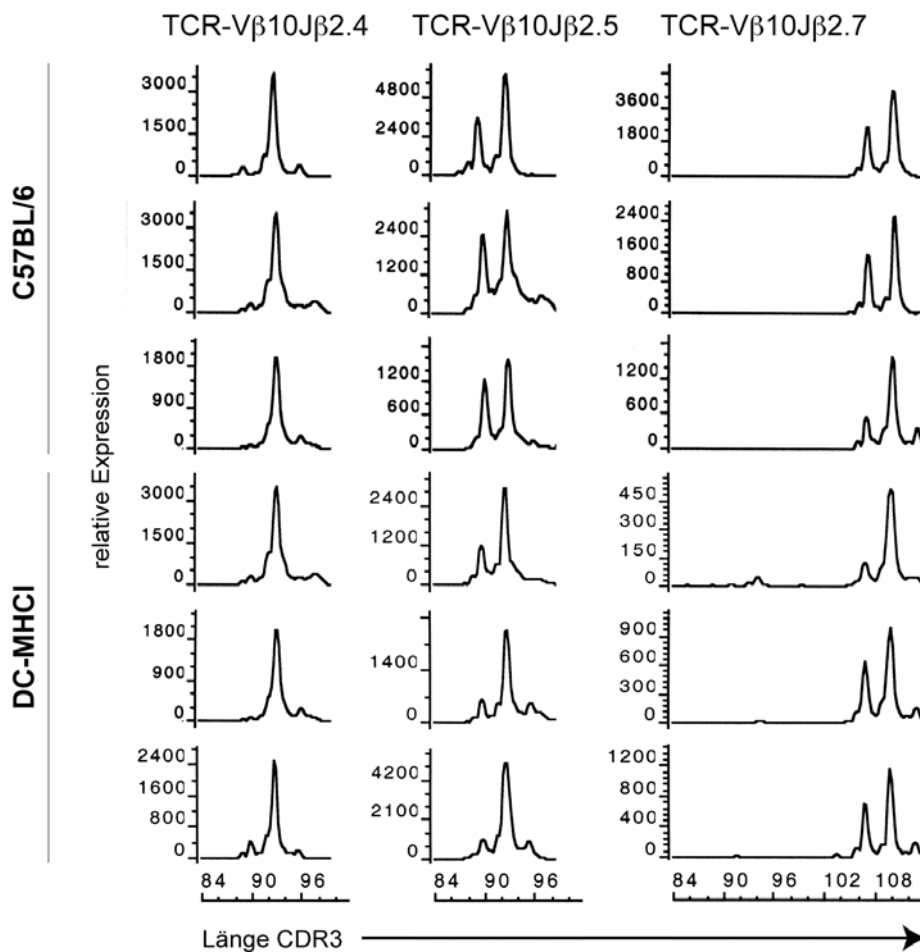
Die Expansionsunterschiede könnten durch einen möglichen Unterschied im endogenen T-Zell-Repertoire bedingt sein. Obwohl dies durch die Ergebnisse aus dem T-Zell-Transfer-Modell ausgeschlossen wurde, wurde das endogene T-Zell-Repertoire vor und nach Immunisierung mit HSV-OVA untersucht. Dazu wurde die Zusammensetzung des T-Zell-Kompartiments in durchflusszytometrischen Analysen bestimmt. Dies wurde durch auf PCR-basierende Analysen der CDR3-Region vertieft. CD8-T-Zellen aus C57BL/6- und DC-MHCI-Mäusen wurden durch Färbung einer Kombination verschiedener anti-TCR-V $\beta$ -Antikörper in die jeweiligen Unterfamilien (TCR-V $\beta$ 2-17) aufgeschlüsselt (*Abbildung 14 A, links*). Die T-Zellen aus beiden Mäusen zeigten eine vergleichbare TCR-V $\beta$ -Verteilung, mit den dominante Familien TCR-V $\beta$ 5.1, 5.2 und TCR-V $\beta$ 8.1, 8.2. Auch die absolute Anzahl der einzelnen TCR-V $\beta$ -Familien war gleich. Nach Immunisierung mit HSV-OVA wurde eine deutliche Verschiebung der TCR-V $\beta$ -Verteilung in aktivierten T-Zellen (CD43-positive/CD62L<sup>low</sup>) deutlich. Dominierend waren nun TCR-V $\beta$ 8.1, 8.2 und TCR-V $\beta$ 10 (*Abbildung 14, A, rechts*). Auf eine Kombinationsfärbung von HSVgB-spezifischen T-Zellen mittels Multimer wurde aus technischen Gründen verzichtet, um eine mögliche Wechselwirkung zwischen Multimer und anti-TCR-V $\beta$ -Antikörper auszuschließen. Die Verteilung war in beiden Mausstämmen ähnlich, es kam zwar jedoch zu leichten Abweichungen für TCR-V $\beta$ 7, 8.1, 8.2 und 11. Da in DC-MHCI-Mäusen die Akkumulation aktivierter T-Zellen deutlich erhöht war (11% zu 30%), sind auch die absoluten Zell-Zahlen von Familie TCR-V $\beta$ 8.1, 8.2 und 10 wesentlich höher als in C57BL/6- Mäusen.



**Abbildung 14 A: Das endogene T-Zell-Repertoire (Durchflusszytometrie).** C57BL/6- und DC-MHCI-Mäuse blieben unbehandelt (naiv) oder wurden mit  $4 \times 10^6$  pfu HSV-OVA i.v. immunisiert. Naive oder aktivierte CD43-positive/CD62L<sup>low</sup> CD8-T-Zellen (Tag sechs nach Immunisierung) wurden mittels Antikörper gefärbt und die Verteilung der einzelnen TCR-V $\beta$ -Familien verglichen. Pro Gruppe wurden drei Mäuse analysiert. Dargestellt werden die Einzelwerte, beziehungsweise der Mittelwert und die Standardabweichung eines repräsentativen von insgesamt zweien Experimenten.

Für detaillierte Analyse des T-Zell-Repertoires wurde die CDR3-Region des TCR untersucht. Dazu wurde aus HSVgB-spezifischen T-Zellen RNA gewonnen, revers-transkribiert und durch PCR-Amplifikation vervielfältigt und markiert. Nach der Auftrennung der markierten Fragmente konnten verschiedene TCR-V $\beta$ J $\beta$ -Rearrangements bestimmt und aufgrund der CDR3-Länge unterschieden werden (Abbildung 14 B).

B



**Abbildung 14 B: Das endogene T-Zell-Repertoire (CDR3-Spektratype).** C57BL/6- und DC-MHCI-Mäuse wurden mit  $4 \times 10^6$  pfu HSV-OVA i.v. immunisiert. HSVgB<sub>498-505</sub>-spezifische CD8-T-Zellen (Tag sechs nach Immunisierung) wurden sortiert, RNA isoliert und revers-transkribiert. Nach Amplifikation der CDR3-Region des TCR und Markierung mit Fluoreszenzfarbstoff wurden die Proben mittels Sequenziergel aufgetrennt und die Längenverteilung der CDR3-Region verglichen. Pro Gruppe wurden vier Mäuse analysiert.

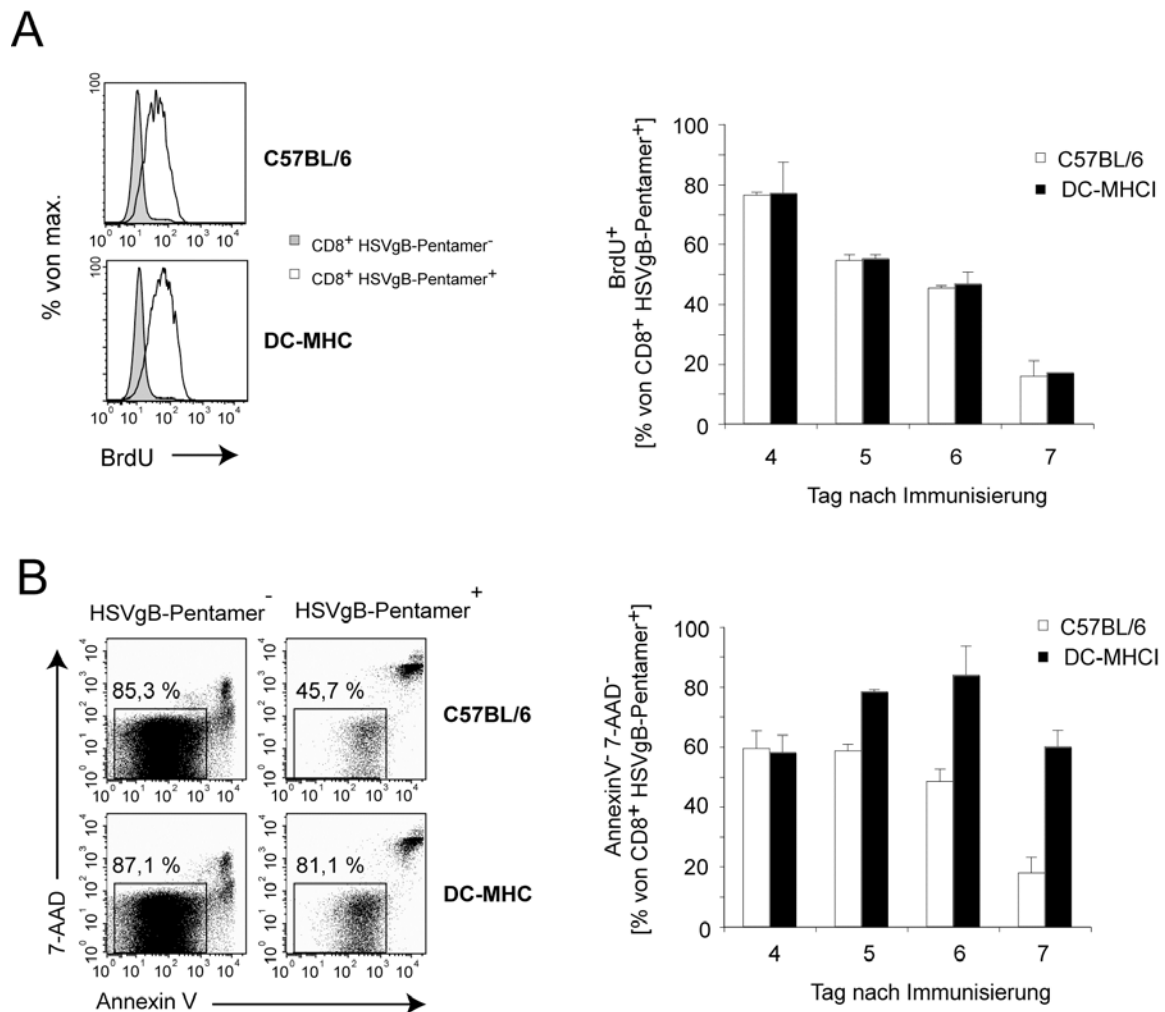
Da die HSVgB-spezifische Antwort hauptsächlich durch Mitglieder der TCR-Vβ10-Familie getragen wurden, konzentrierten sich die Untersuchung auf diese Gruppe. HSVgB-spezifische T-Zellen gehörten zu den Unterfamilien TCR-Vβ10Jβ2.4, 2.5 und 2.7. Für diese Unterfamilien kam es zu einer deutlichen Überrepräsentation (Expansion) bestimmter CDR3-Längen. Für TCR-Vβ10Jβ2.4 war eine CDR3-Fragmentlänge, für TCR-Vβ10Jβ2.5 und 2.7 zwei Fragmentlängen dominant. HSVgB-spezifische T-Zellen gehörten in C57BL/6- und DC-MHCI-Mäusen zu den gleichen TCR-Vβ10Jβ-Unterfamilien und zeigten eine vergleichbare Verteilung der CDR3-Fragmentlängen.

Diese Ergebnisse bestätigen, dass das T-Zell-Repertoire in beiden Mausstämmen nach HSV-OVA Infektion gleich war.

### 5.2.7 Die Analyse der Zellteilungs- und Apoptoserate

Wie bereits dargelegt, kommt es in DC-MHCI-Mäusen zu einer deutlich gesteigerten Akkumulation antigenspezifischer T-Zellen nach einer Immunisierung, welche eine differentielle Antigenpräsentation ermöglicht. Als Ursache kommen Unterschiede in den Zellteilungsraten oder in den Apoptoseraten in Betracht. Eine Analyse der frühen Zellteilungen aktivierter CD8-T-Zellen mittels CFSE-Färbung erbrachte für C57BL/6- und DC-MHCI-Mäusen vergleichbare Teilungsraten (*Daten nicht gezeigt*). Da durch die CFSE-Färbung nur die ersten sechs bis sieben Zellteilungen unterscheidbar waren, wurde der Einbau von Bromodesoxyuridin (BrdU) in die DNA antigenspezifischer T-Zellen untersucht. C57BL/6- und DC-MHCI-Mäusen wurden mit HSV-OVA immunisiert. 20 Stunden vor Analyse wurde den Mäusen BrdU i.p. injiziert. Zum Nachweis des BrdU-Einbaus wurden die Mäuse an den angegebenen Tagen getötet und HSVgB-spezifische T-Zellen in der Milz untersucht (*Abbildung 15 A*). Während unspezifische T-Zellen negativ für BrdU blieben, konnten HSVgB-spezifische T-Zellen BrdU in ihre DNA einbauen. Die Einbauraten waren am Tag vier nach Immunisierung mit über 70% am höchsten und fielen an den folgenden Tagen bis auf unter 20% am Tag sieben ab. Obwohl die Akkumulation HSVgB-spezifischer T-Zellen in DC-MHCI-Mäusen um das drei- bis fünffache erhöht war (*Abbildung 12 C*), war die DNA-Syntheserate in beiden Mausstämmen vergleichbar. Da die Zellteilungsrate gleich war, wurde der Einfluss möglicher Unterschiede in der Apoptoserate untersucht. Dazu wurden wiederum Mäuse mit HSV-OVA immunisiert und der Anteil lebender Zellen an verschiedenen Tagen nach Infektion bestimmt. Lebende Zellen blieben ungefärbt für Annexin V und 7-AAD, während tote Zellen durch beide Farbstoffe nachweisbar waren. Am Tag vier nach Immunisierung war der Anteil lebender Zellen in beiden Mausstämmen noch vergleichbar, während es an den folgenden Tagen zu einer deutlichen Verschiebung kam (*Abbildung 15 B*). In DC-MHCI-Mäusen nahm der Anteil lebender Zellen zu und blieb an allen Tagen deutlich höher als in C57BL/6-Mäusen.

Eine Interaktion der T-Zelle mit antigenpräsentierenden nicht-DC in C57BL/6-Mäusen erhöhte also die Apoptoserate und führte dadurch zu einer verringerten T-Zell-Akkumulation verglichen zu DC-MHCI-Mäusen.



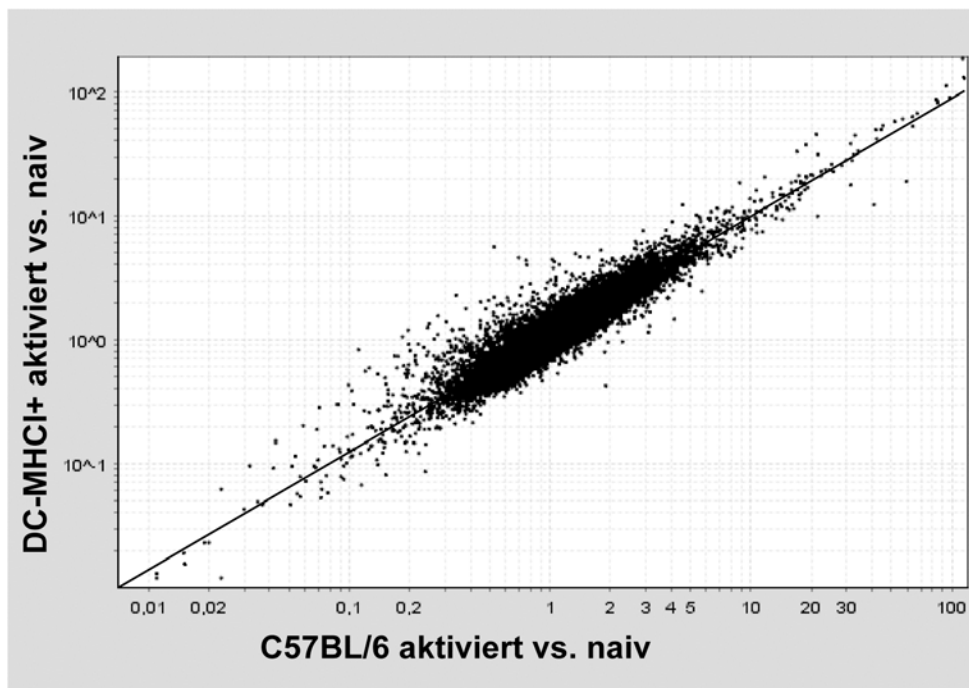
**Abbildung 15: Vergleich der Zellteilungs- und Apoptoserate.** C57BL/6- und DC-MHCI-Mäuse wurden mit  $4 \times 10^6$  pfu HSV-OVA infiziert. (A) 20 Stunden vor der Analyse wurde ein mg/ml BrdU i.p. in die Mäuse injiziert. Im Anschluss wurden Milzzellen isoliert und der Einbau von BrdU mittels Antikörperfärbung untersucht. (B) CD8-T-Zellen aus der Milz wurden isoliert und mit Annexin V und 7-AAD gefärbt. Der Anteil lebender Zellen (Annexin V-negativ/7-AAD-negativ) wurde dargestellt. Gezeigt werden die Einzelwerte, beziehungsweise der Mittelwert und die Standardabweichung. Pro Gruppe wurden drei Mäuse verwendet.

## 5.2.8 Vergleichende Analyse des Transkriptoms (Microarray)

Zur detaillierten Analyse der molekularen Mechanismen, welche die verringerten Apoptoserate in T-Zellen von DC-MHCI-Mäusen induzierten, wurde das Transkriptom HSVgB-spezifischer T-Zellen analysiert. Dazu wurden HSVgB<sub>498-505</sub>-spezifische CD8-T-Zellen aus der Milz (Tag sechs nach Immunisierung mit HSV-OVA) aufgereinigt. Als Kontrolle wurden naive CD44<sup>low</sup> CD8-T-Zellen aufgereinigt. Total-RNA wurde mit TRIzol isoliert, revers-transkribiert, markiert und auf

einen Affymetrix Expressions-Chip hybridisiert. Die Markierung, Hybridisierung und Normierung der Rohdaten wurde in unserem Auftrag von der Affymetrix Core Facility unter der Leitung von Dr. Reinhard Hoffmann durchgeführt.

Die dadurch erhaltenen Expressionsdaten aller untersuchten Gene wurden durch die Verwendung der GenePattern Software statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt (*Abbildung 16*). Dazu wurde die Änderung der Genexpression HSVgB-spezifischer T-Zellen im Vergleich zur nicht immunisierten Kontrolle (sortierte CD44<sup>low</sup> CD8-T-Zellen) untersucht. Zur graphischen Darstellung wurde auf der x-Achse diese Änderung in C57BL/6, auf der y-Achse die Änderung der Expression in DC-MHCI-Mäusen dargestellt (Gen = Punkt). Die Diagonale repräsentiert Gene, die in beiden Mausstämmen vergleichbar reguliert wurden, je weiter ein Punkt von dieser Linie entfernt lag, desto größer war der Expressionsunterschied zwischen C57BL/6 und DC-MHCI.



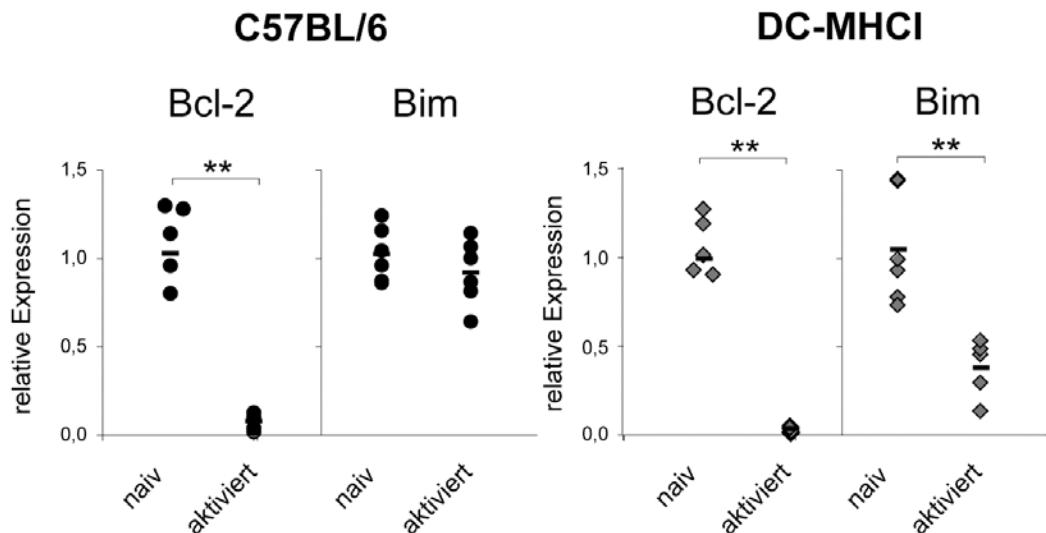
**Abbildung 16: Vergleich der Genexpression von naiven und aktivierten T-Zellen.** Mäuse wurden mit  $4 \times 10^6$  pfu HSV i.v. immunisiert. Am Tag sechs nach Immunisierung wurden aus den Milzen HSVgB<sub>498-505</sub>-spezifische T-Zellen sortiert, als Kontrolle wurde naive CD44<sup>low</sup> CD8-T-Zellen aus unbehandelten Tieren sortiert. Je Gruppe wurden drei Mäuse verwendet. Nach RNA-Isolation, Markierung und Amplifikation wurden die Proben auf einen Mouse 430v2-Affymetrix Chip hybridisiert. Die normalisierten Expressionsdaten wurden mittels GenePattern Software miteinander verglichen und graphisch dargestellt (Punkt = Gen). Dabei wurde die Expressionsänderung nach Aktivierung für C57BL/6- und DC-MHCI-Mäuse dargestellt. Die Diagonale repräsentiert Gene, die in beiden Mäusen gleich reguliert wurden. Gene, die ihre Genexpression nach Aktivierung nicht, beziehungsweise nur leicht modulierten erhielten den Wert eins.

Da die meisten Gene auf, beziehungsweise sehr nahe der Diagonale lagen, konnte man von nur sehr geringen Unterschieden in der Genexpression ausgehen. Um eine weitere Einschränkung durchführen zu können wurden alle Gene ausgewählt, die in HSVgB-spezifischen T-Zellen in DC-MHCI-Mäusen einen Expressionsunterschied zu C57BL/6 von  $\pm 60\%$  aufwiesen. In einem nächsten Schritt wurde in einer Literaturrecherche nach bekannten Apoptose-relevanten Funktionen gesucht. Auf diese Weise konnte die Kandidatenliste auf wenige Gene eingeeengt werden. Eines dieser Gene, nämlich *bcl2-like 11* kodiert für ein Protein namens Bim, welches als proapoptotisches Molekül essentielle Funktionen in der Homöostase von lymphatischen Zellen ausübt. Die Expression von Bim mRNA war in aktivierten T-Zellen aus DC-MHCI geringer als in C57BL/6-T-Zellen, was den Überlebensvorteil erklären könnte.

### 5.2.9 Expressionsanalyse der Apoptose-relevanten Moleküle Bcl-2 und Bim

Um eine mögliche Funktion von Bim in der gesteigerten Akkumulation antigenspezifischer T-Zellen in DC-MHCI-Mäusen zu bestätigen wurde die Expression von Bim mRNA mittels quantitativer PCR bestimmt. Die proapoptotische Wirkung von Bim kann durch Bcl-2, einem antiapoptotischen Molekül, inhibiert werden. Da das Mengenverhältnis von Bim mit Bcl-2 essentiell für die Entscheidung „Überleben“ beziehungsweise „Zelltod“ ist, wurde die Expression beider Gene in naiven und aktivierten T-Zellen verglichen (Bouillet et al., 2001). Dazu wurden HSVgB<sub>498-505</sub>-spezifische CD8-T-Zellen aus der Milz (Tag sechs nach Immunisierung mit HSV-OVA) aufgereinigt. Als Kontrolle wurden naive CD44<sup>low</sup> CD8-T-Zellen aufgereinigt. Total-RNA wurde mit TRIzol isoliert, revers-transkribiert und mittels PCR quantifiziert. Die Expression in aktivierten (HSVgB-spezifischen) T-Zellen wurde auf die naive Kontrolle normiert.

Die Expression von Bcl-2 mRNA fiel nach der Zellaktivierung stark ab, während die Expression von Bim in C57BL/6 nahezu unverändert blieb, womit es zu einer Verschiebung Richtung Bim-vermittelter Apoptose kommen kann (*Abbildung 17, links*). Auch in DC-MHCI-Mäusen sank die Expression von Bcl-2 stark ab, ähnlich fiel jedoch auch die Expression von Bim mRNA (*Abbildung 17, rechts*). Dadurch wurde das Verhältnis Bim zu Bcl-2 in DC-MHCI-Mäusen im Vergleich zur naiven Ausgangssituation nur leicht verändert. Dies könnte die verringerten Apoptoserate in diesen Mäusen erklären.



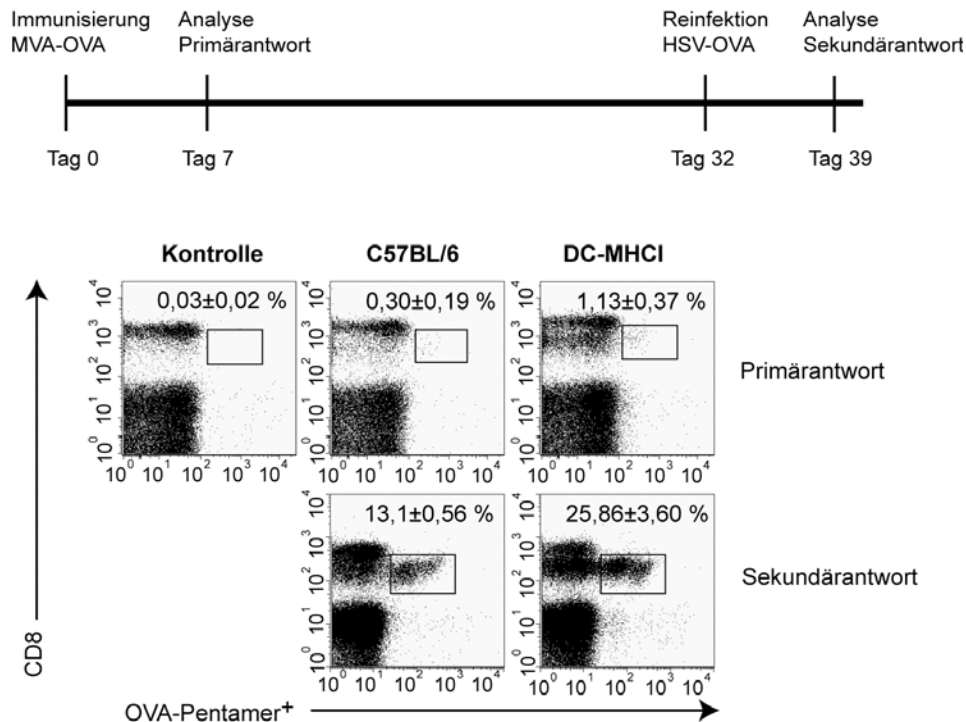
**Abbildung 17. Die Expression von Bcl-2 und Bim in naiven, beziehungsweise HSVgB-spezifischen T-Zellen.** Mäuse wurden i.v. mit  $4 \times 10^6$  pfu HSV-OVA immunisiert. HSVgB<sub>498-505</sub>-spezifische CD8-T-Zellen wurden am Tag sechs nach Immunisierung aus der Milz gewonnen und aufgereinigt. Aus nicht immunisierten Kontrolltieren wurden naive CD8-T-Zellen aufgereinigt. Total-RNA wurde mit TRIzol isoliert, revers-transkribiert und in einer Taqman-PCR quantifiziert. Die Expression von Bim und Bcl-2 wurde auf Hprt 1 normalisiert, die Expression in aktivierten (HSVgB-spezifischen) T-Zellen wurde auf die Expression in naiven T-Zellen bezogen. Dargestellt sind Einzelwerte (Kreis, Raute) und der Mittelwert (Balken). Die Signifikanz wurde mittels t-test berechnet (\*\*,  $p < 0,01$ ).

### 5.2.10 Die DC-vermittelte T-Zell-Aktivierung und T-Zell-Expansion - Auswirkung auf die Bildung von Gedächtniszellen

Wie gezeigt kann Antigenpräsentation auf nicht-DC die Expansion von CD8-T-Zellen nach der Aktivierung beeinflussen. Um die mögliche Auswirkung auf die Bildung von Gedächtniszellen zu untersuchen, wurden Mäuse mit MVA-OVA (Primärinfektion) und 32 Tage später mit HSV-OVA (Reinfektion) infiziert. Die Infektion mit MVA-OVA führte zu einer Expansion OVA-spezifischer T-Zellen im Maximum am Tag sieben mit gesteigerter Akkumulation in DC-MHCI-Mäusen (*Abbildung 18*).

Um die Bildung von OVA-spezifischen Gedächtniszellen in der Primärinfektion nachzuweisen, wurden die Mäuse mit HSV-OVA immunisiert. In beiden Mausstämmen kam es zu einer deutlichen Sekundärantwort, die wiederum in DC-MHCI-Mäusen verstärkt war (13% in C57BL/6 zu 26% antigenspezifische T-Zellen in DC-MHCI-Mäusen).





**Abbildung 18: Bildung von Gedächtniszellen nach differentieller Antigenpräsentation.** C57BL/6- und DC-MHCI-Mäuse wurden in der Primärinfektion i.v. mit  $4 \times 10^6$  MVA-OVA, in der Sekundärinfektion i.v. mit  $4 \times 10^6$  pfu HSV-OVA immunisiert. Die Antwort OVA-spezifischer T-Zellen wurde im Blut an den Tagen sieben und 39 nach der Primärinfektion bestimmt. Pro Gruppe wurden drei Tiere verwendet, gezeigt werden der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.

Dies könnte zum einen durch eine stärkere Erhöhung der Frequenz OVA-spezifischer T-Zellen nach der Primärinfektion in DC-MHCI-Mäusen bedingt sein. Zum anderen könnte die Anzahl der Gedächtniszellen, in der Reinfektion mit HSV-OVA aktiv durch antigenpräsentierende nicht-DC in C57BL/6 verringert worden sein. Somit kam es nach einer differentiellen Antigenpräsentation (DC versus DC plus nicht-DC) zu einer gesteigerten Akkumulation der Effektor- als auch Gedächtniszellen in DC-MHCI-Mäusen.

## 6 DISKUSSION

Die Interaktion zwischen dem TCR auf T-Zellen und MHC auf APC ist essentiell um ein funktionelles, selbsttolerantes T-Zell-Kompartiment zu generieren, welches in der Lage ist, Mikroorganismen und Viren zu bekämpfen und zu eliminieren. Deutlich wird hierbei, dass der Zelltyp, welcher die Selbstpeptide oder Fremdanigene präsentiert, sowie das Umfeld dieser Erkennung entscheiden, wie die T-Zelle reagiert. Zwei Prozesse, die in peripheren lymphatischen Organen die Proliferation von naiven T-Zellen induzieren, sind Gegenstand dieser Arbeit, nämlich die antigenunabhängige HP und die antigenabhängige Aktivierung nach Erkennung von Fremdstrukturen. Obwohl beide Mechanismen durch unterschiedliche Bedingungen induziert werden, zeigen sie doch in Teilaspekten ähnliche Regulation und führen im Endeffekt zur Generierung von Zellen, die Gedächtniszellen ähneln (bei HP) oder echte, antigenerfahrene Gedächtniszellen sind. Im Zuge der HP werden naive Zellen entweder partiell (Goldrath et al., 2000) oder auf Dauer (Cho et al., 2000; Ge et al., 2002) in Gedächtniszellen umgewandelt, die auch über Effektorfunktionen verfügen können (Hamilton et al., 2006). Auch bei der Erkennung von Antigen in Verbindung mit kostimulatorischen Signalen können Gedächtniszellen gebildet werden. Beide Arten der Gedächtniszellen zeigen ein vergleichbares Genexpressionsprofil (Goldrath et al., 2004) und können vergleichbare Funktionen ausüben. Deshalb können Einblicke in die „Regeln“ der HP auch ein besseres Verständnis der Prozesse mit sich bringen, die zur Ausbildung eines protektiven und langlebigen immunologischen Gedächtnisses führen. Die antigenunabhängige und die antigenabhängige Proliferation haben hohe klinische Relevanz und werden deshalb mit großem Interesse und Einsatz erforscht.

### 6.1 Die Bedeutung von DC für die Induktion der HP

Das periphere T-Zell-Kompartiment ist unter homöostatischer Kontrolle; bei Nachlassen der T-Zell-Produktion durch den Thymus wird ein kompletter Verlust der T-Zellen durch die HP verhindert. Mit zunehmendem Alter verschiebt sich das Gleichgewicht der Lymphopoese vom Thymus Richtung peripherer Replikation. Die Replikation naiver T-Zellen verläuft sehr langsam und kann dementsprechend *in vivo* nur sehr schwer direkt verfolgt werden. Es gibt aber Hinweise, die auf homöostatische Teilungen auch von naiven T-Zellen schließen lassen (Dutilh and de Boer, 2003). Bestrahlung, Chemotherapie und auch manche Virusinfektion führen zur Lymphopenie, welche

die antigenunabhängige Proliferation der verbliebenen T-Zellen induziert. Diese Bedingungen werden als Modelsituation für die Homöostase von naiven T-Zellen herangezogen. Wichtige offene Fragen sind hier, erstens, welche Zelltypen induzieren eine HP, zweitens, sind diese Teilungen strikt MHC-abhängig und drittens, inwieweit kommt es zur Konkurrenz von CD4- und CD8-T-Zellen?

### **6.1.1 DC sind ausreichend, um die HP von naiven CD8-T-Zellen zu induzieren**

Nach wie vor ist der APC-Typ, welcher eine HP induziert nicht identifiziert. Es gibt jedoch indirekte Hinweise, dass DC für die Expansion von T-Zellen nach Lymphopenie verantwortlich sind. So ist in Lymphotoxin  $\alpha$ -defizienten Tieren, welche auch eine verminderte Anzahl von DC in lymphatischen Geweben aufweisen (Wu et al., 1999) die HP von CD8-T-Zellen deutlich reduziert (Dummer et al., 2001). Ausserdem kann eine HP nur auftreten, wenn die Zellen in der Lage sind in die T-Zell-Zonen lymphatischer Organe einzuwandern (Dummer et al., 2001). Diese Bereiche verfügen über ein dichtes Netzwerk von DC. Es gibt aber auch Befunde, die gegen eine Rolle von DC sprechen. Interessanterweise ist die HP in Mäusen ohne Lymphknoten (*aly/aly* Mäuse) auch nach Entfernung der Milz unverändert (Dai and Lakkis, 2001). Hier kann es aber nach wie vor zu Interaktionen von T-Zellen mit DC in anderen Geweben kommen. Zusätzlich wurde in gemischten Knochenmarkschimären gezeigt, dass bestrahlungsresistente, nicht-knochenmarksabstammende Stromazellen eine HP von CD8-Zellen induzieren (Schluns et al., 2000).

Wie bereits beschrieben, führte der Transfer von naiven CD8-T-Zellen in unbehandelte C57BL/6-Wildtypmäuse nicht zu einer HP (*Abbildung 5 A*). Erst nach vorheriger Entfernung aller T-Zellen durch Bestrahlung kam es zu Zellteilungen (*Abbildung 5 B*). Die Expression von MHC-Klasse-I auf DC (CD11c-MHCI-Mäuse) reichte hierbei aus um, wie in Wildtypmäusen, vier bis fünf Zellteilungen zu induzieren, eine vergleichbare Anzahl von Tochterzellen zu bilden (Wiederfindungsraten) und Aktivierungsmarker (CD44, CD62L) in vergleichbarer Weise zu modulieren. Auch wenn Lymphopenie durch Injektion depletierender Antikörper, wie anti-CD4 (*Abbildung 5 A*) oder anti-Thy1.2 (*Abbildung 5 B*) herbeigeführt wurde, kam es zu einer HP in CD11c-MHCI-Empfängertieren. Wichtig ist hier zu betonen, dass in K14- $\beta$ 2mxCD11c-MHCI-Mäusen endogene CD8-T-Zellen aufgrund defekter positiver Thymusselektion fehlten (Cannarile et al., 2004). Deshalb reichte es in diesen Tieren aus CD4-T-Zellen zu depletieren um das periphere T-

Zellkompartiment komplett zu entfernen und eine HP zu induzieren, während in C57BL/6-Mäusen endogene CD8-T-Zellen die HP inhibierten (*Abbildung 6 A*). Diese Ergebnisse identifizierten DC eindeutig als APC mit der Kapazität, die HP von naiven CD8-T-Zellen zu induzieren. Allerdings konnten wir mit unserem Modell nicht eindeutig ausschließen, dass auch andere Zelltypen dazu in der Lage wären. Nachdem zusätzliche Expression von MHC-I in C57BL/6-Tieren die Geschwindigkeit oder Effizienz der HP nicht weiter steigerte, kann davon ausgegangen werden, dass DC maximale Expansion naiver T-Zellen induzieren konnten. Diese Ergebnisse wurden durch Arbeiten von S. Jung gestützt, die in einem anderen Modell die besondere Bedeutung von DC für die HP von naiven CD8-T-Zellen zeigen konnten (Zaft et al., 2005). In diesem Modell waren DC die einzigen Zellen, die den Rezeptor für das Diphtherietoxin trugen, deshalb sensitiv auf das Toxin reagierten und nach der Injektion depletiert wurden. Der Nachteil des Modells lag allerdings darin, dass DC komplett entfernt wurden und somit nicht nur die Präsentation von Selbstpeptiden, sondern auch von möglichen anderen Liganden oder Mediatoren fehlte. Somit konnte nicht untersucht werden, auf welcher Ebene die Kompetition der T-Zellen stattfand.

Verschiedene Studien gehen davon aus, dass die HP durch die gleichen Selbstpeptide gesteuert werden, welche im Thymus für die positive Selektion verantwortlich sind (Ernst et al., 1999). Im Thymus werden diese Peptide durch Epithelzellen im Kortex (cTEC) präsentiert und vermitteln Überlebenssignale an peptidspezifische Thymozyten. DC sind nicht ausreichend, um CD8-T-Zellen positiv zu selektieren (Cannarile et al., 2004). In peripheren lymphatischen Organen ist dies anders, hier induzieren DC durch Präsentation von Selbstpeptiden nicht nur Überleben sondern auch eine HP. Vermutlich werden diese Unterschiede dadurch hervorgerufen, dass im Thymuskortex nur sehr wenige DC vorhanden sind und diese Dichte nicht ausreicht um T-Zellen zu selektieren. Zusätzlich könnten Thymozyten auch andere Signale als reife T-Zellen benötigen, um von Selbstpeptiden auf DC angesprochen zu werden, weshalb sie nur von cTEC positiv selektiert werden können.

### **6.1.2 Die Expression von MHC als Voraussetzung für die HP**

Unter bestimmten Modellbedingungen lässt sich eine HP auch in Abwesenheit von MHC-Molekülen beobachten, weshalb manche Gruppen eine MHC-unabhängige Proliferation von naiven T-Zellen als möglich ansehen (Geginat et al., 2001; Schluns et al., 2000). Besonders nach der Bestrahlung kann auch in MHC-defizienten Tieren eine HP beobachtet werden, wie dies auch in

unserem Modell für naive CD8-T-Zellen in  $\beta 2m$ -KO Tieren der Fall war (*Abbildung 5 A*). Diese Proliferation war jedoch deutlich vermindert. Um die Notwendigkeit von MHC-I für die HP von naiven CD8-T-Zellen zu zeigen, wurde die Expansion in unbestrahlten  $\beta 2m$ -KO-Tieren untersucht. Dies war allerdings nur möglich, wenn  $\beta 2m$ -defiziente T-Zellen transferiert wurden, da  $\beta 2m$ -positive Zellen abgestoßen werden. Bisher standen solche CD8-T-Zellen aber nicht zur Verfügung. Erst durch eine Kreuzung von CD11c-MHCI- mit K14- $\beta 2m$  Mäusen konnten funktionelle CD8-T-Zellen generiert werden, welche selbst MHC-I-defizient waren. K14- $\beta 2m \times$ CD11c-MHCI-Mäuse hatten ein normales CD4- und CD8-T-Zell-Kompartiment und waren tolerant für MHC-I-positive als auch MHC-I-negative Zellen (Cannarile et al., 2004). Wurden CD8-T-Zellen aus diesen Tieren in  $\beta 2m$ -KO-Mäuse transferiert, in denen CD4-T-Zellen depletiert wurden, kam es trotzdem zu keiner HP, obwohl periphere T-Zellen fehlten (*Abbildung 6 A*). Erst das Vorhandensein von MHC-I-positiven DC (CD11c-MHCI) induzierte Zellteilungen, welche vergleichbar zum Teilungsmuster von MHC-I-positive CD8-T-Zellen waren (*Abbildung 7 A*).

Diese Ergebnisse verdeutlichen die essentielle Rolle von MHC-Molekülen zur Induktion der HP in naiven T-Zellen. MHC-unabhängige Teilungen sind vermutlich ein Nebeneffekt der Bestrahlung und könnten durch einen Überschuss und Zytokinen (Zytokinsturm) verursacht worden sein.

### **6.1.3 Die Koregulation der Homöostase von CD4- und CD8-T-Zellen**

Das periphere T-Zell-Kompartiment ist aus verschiedenen Nischen aufgebaut. Die Mehrzahl der Untersuchungen geht davon aus, dass naive T-Zellen und Gedächtniszellen unterschiedliche Komponenten und Faktoren benötigen um sich homostatisch zu teilen. Für die Bedürfnisse von naiven CD4- und CD8-T-Zellen ist der Wissensstand weniger einheitlich. Manche Gruppen gehen von zwei getrennten Kompartimenten aus, die unterschiedlich reguliert werden, andere finden jedoch Hinweise auf eine Koregulation (Rocha et al., 1989). In unbehandelten Tieren gibt es ein konstantes Verhältnis der Anzahl von CD4 zu CD8 von etwa 2 zu 1. In  $\beta 2m$ -KO-Mäusen fehlen CD8-T-Zellen. Die Anzahl von CD4-T-Zellen nimmt deutlich zu, sie füllen partiell den Platz des CD8-Kompartiments auf (Cannarile et al., 2004). Anders ist dies in CD11c-MHCI-Mäusen. Obwohl endogene CD8-T-Zellen fehlten, kam es nur zu einem geringen Anstieg der CD4-T-Zell-Anzahl (*Daten nicht gezeigt*). CD4- und CD8-T-Zellen sind wahrscheinlich Teile zweier getrennter Nischen, die sich nur partiell gegenseitig ersetzen können.

Wurden in CD11c-MHCI-Mäuse naive CD8-T-Zellen transferiert, kam es auch nach 14 Tagen zu keinen Zellteilungen (*Abbildung 5 A*). Es scheint, als dass die endogenen CD4-T-Zellen oder die wenigen, atypischen CD8-T-Zellen die Proliferation inhibierten. Erst nach Depletion von CD4-T-Zellen, kam es zu einer HP (*Abbildung 7 A*). Die Proliferation war geringer als bei der Bestrahlung oder der T-Zell-Depletion durch anti-Thy1.2-Antikörper, was vermutlich durch Kodepletion von CD4-positiven DC durch den anti-CD4-Antikörper bedingt war. Eine Reduktion der CD4-T-Zell-Zahlen war bereits ausreichend, um die HP von CD8-T-Zellen zu erlauben (*Abbildung 7 B*). Durch Depletion von CD4-T-Zellen wurden auch CD4-positive/CD25-positive regulatorische T-Zellen entfernt. Um den Einfluss dieses Zelltyps auf die HP von CD8-T-Zellen zu untersuchen, wurden CD25-positive Zellen durch anti-CD25-Antikörper depletiert. Dies führte zu keiner homöostatischen Proliferation von naiven CD8-T-Zellen in CD11c-MHCI-Mäusen (*Abbildung 7 C*). Es gibt also eine Koregulation des CD4- und CD8-T-Zell-Kompartiments, bei welcher zumindest CD4-T-Zellen über eine gewisse Kontrolle über die Homöostase von CD8-T-Zellen verfügen. Da CD4-T-Zellen Peptide nur auf MHC-Klasse-II und CD8-T-Zellen nur auf MHC-Klasse-I erkennen, findet die Inhibition/Kompetition vermutlich auf Ebene des Zuganges zu DC statt. Bei Fehlen von CD4-T-Zellen könnten CD8-T-Zellen einen besseren Zugang zu ihren MHC-Klasse-I-Molekülen finden. Verschiedene Studien konnten einen wichtigen Einfluss der TCR-Affinität für die HP von naiven CD8-T-Zellen zeigen (Kieper et al., 2004; Troy and Shen, 2003). T-Zellen mit höherer Affinität konnten besser mit T-Zell-Klonen geringerer Affinität konkurrieren und zeigten eine erhöhte HP. Neben MHC-Molekülen, könnten DC auf ihrer Oberfläche aber auch Liganden tragen, die zur Induktion der HP notwendig sind. Da klassische Kostimulation für die HP nicht notwendig ist (Prlic et al., 2001), könnte es sich um bislang unbekannte Moleküle handeln. So wurde bereits gezeigt, dass es in CD24-defizienten Mäusen zu einer Deregulation der T-Zell-Homöostase mit deutlich gesteigerten T-Zell-Zahlen und T-Zell-Infiltraten in verschiedenen Organen kommt (Li et al., 2006). Überraschenderweise zeigen jedoch CD24-defiziente T-Zellen eine verminderte HP (Li et al., 2004). Vermutlich wird die Kompetition von CD4- und CD8-T-Zellen aber auf Ebene der Zytokinverfügbarkeit reguliert. Nach Depletion von CD4-T-Zellen steht den naiven CD8-T-Zellen mehr IL-7 zur Verfügung. Für IL-15 konnte gezeigt werden, dass es gebunden an den IL-15-Rezeptor auf DC *in trans* anderen Zellen zur Verfügung gestellt wird und für die Homöostase von CD8-Gedächtniszellen essentiell ist (Burkett et al., 2004; Schluns et al., 2005). Es wäre interessant zu sehen, ob es einen ähnlichen Mechanismus für IL-7 oder TSLP gibt, welches dann nur T-Zellen erfolgreich angeboten werden kann, wenn diese Zugang zu DC finden.

## 6.2 Die Bedeutung von DC für die antigenabhängige Aktivierung naiver CD8-T-Zellen

DC werden als diejenige Gruppe von APC angesehen, welche den größten Einfluss auf die Induktion von Toleranz als auch einer Effektorantwort ausüben. Sie stellen die Plattform dar, welche neben der Antigenpräsentation auch kostimulatorische Moleküle und weitere Mediatoren zur Verfügung stellen, um eine optimale T-Zell-Aktivierung zu ermöglichen (Übersichtsartikel: Reis e Sousa, 2006). Eine Hauptfrage ist hier, wie ein Zelltyp wie DC so unterschiedliche Effekte wie Toleranz versus Immunität induzieren kann. Vermutlich entscheidet der Reifungsgrad (Steinman, 2000) beziehungsweise der Aktivierungszustand (Sallusto et al., 1999) darüber, ob die Erkennung des Antigens zur Toleranz oder zu einer Abwehrreaktion der T-Zelle führt.

Bis zum heutigen Zeitpunkt gibt es nur wenige Untersuchungen, welche Rolle DC für die Induktion von Toleranz, beziehungsweise Immunität *in vivo* einnehmen. Die Gruppe um Steffen Jung konnte bereits zeigen, dass eine Depletion von DC die Induktion einer CTL-Antwort gegen exogene, zellassozierte Antigene unterbindet (Jung et al., 2002). Diese Untersuchung ist nun daran interessiert, ob Antigenpräsentation beschränkt auf DC (DC-MHCI) ausreicht, um eine effiziente CTL-Antwort zu induzieren. Mit Hilfe dieses Modells kann der Umkehrschluss gemacht und untersucht werden, welche Kapazitäten DC besitzen, wenn sie die einzigen Zellen sind, die das Antigen an CD8-T-Zellen präsentieren können. Zusätzlich wird die Frage gestellt, welchen Einfluss die Antigenpräsentation auf nicht-DC hat und inwieweit eine CTL-Antwort dadurch verändert wird.

### 6.2.1 Die Induktion von T-Zell-Toleranz

Verschiedene Studien haben die wichtige Rolle von DC für die Induktion von T-Zell-Toleranz gezeigt. In der Medulla des Thymus befinden sich DC, die zentrale Toleranz induzieren. So führt die Expression von Superantigen auf MHC-Klasse-II-positive DC zur Depletion von spezifischen T-Zellen (Brocker et al., 1997). Zusätzlich konnte die Fähigkeit zur negativen Selektion von CD8-T-Zellen durch MHC-Klasse-I-positive DC nachgewiesen werden, während DC nicht zur positiven Thymusselektion in der Lage sind (Cannarile et al., 2004). Die Mechanismen der zentralen Toleranzinduktion sind jedoch nicht perfekt. Selbstreaktive T-Zellen können den Thymus verlassen und ein potentiell Risiko darstellen, welches durch periphere Toleranzmechanismen mini-

miert wird. In sekundären, lymphatischen Organen präsentieren reife DC Selbstpeptide und induzieren Toleranz peptidspezifischer T-Zellen (Guery et al., 1995; Steinman et al., 1997).

Um die Fähigkeit der Toleranzinduktion von CD8-T-Zellen durch DC *in vivo* zu testen, wurde das Antigen (OVA<sub>257-264</sub>) i.v. in Abwesenheit von Adjuvans, wie zum Beispiel LPS (*Abbildung 9*) verabreicht. Dies führte in Wildtyp- als auch in DC-MHCI-Mäusen zu einer initialen Proliferation der transferierten OT-I-Zellen mit einem Maximum am Tag drei nach der Immunisierung, bevor der Großteil der Zellen depletiert wurde (*Abbildung 9 A*). Die Zellen waren nicht in der Lage IFN $\gamma$  nach *in vitro* Restimulation zu produzieren. Ihnen fehlte auch die Fähigkeit antigenbeladene Zielzellen *in vivo* zu lysieren (*Abbildung 9 B*). Daraus konnte geschlossen werden, dass die Antigenpräsentation auf DC ausreichte, um CD8-T-Zellen erfolgreich zu tolerisieren. Da die OT-I-Zellen in DC-MHCI-Mäusen in einem ähnlichen Grade tolerant wie in C57BL/6-Mäusen waren, scheinen DC maximale Toleranz induzieren zu können.

### **6.2.2 Die Induktion einer funktionellen CTL-Antwort durch die Antigenpräsentation auf DC**

Um die Induktion einer CTL-Antwort *in vivo* zu analysieren, wurden Mäuse mit Antigen in Verbindung mit LPS immunisiert. Um die Vorläuferfrequenz antigenspezifischer T-Zellen anzugleichen und die Detektion zu vereinfachen, wurden Ovalbumin-spezifische T-Zellen transferiert und ihre Expansion nach Antigengabe verfolgt. Im Vergleich zur Gabe von OVA<sub>257-264</sub> ohne Adjuvans, erhöhte die Gabe in Verbindung mit LPS die Immunantwort deutlich (*Abbildung 8 B*). Grund dafür war die gesteigerte Überlebensrate der proliferierenden Zellen (Mitchell et al., 2001). Überraschenderweise kam es zu einer deutlich gesteigerten Akkumulation von OT-I-Zellen in Mäusen, in welchen DC die einzigen Zellen waren, die fähig zur Antigenpräsentation (DC-MHCI) sind. Die Expansion war im Vergleich zum Wildtyp um das zweifache gesteigert. Die generierten T-Zellen verfügten über Effektorfunktionen, wie die Produktion von IFN $\gamma$  nach *in vitro* Restimulation, sowie die Fähigkeit zur Lyse antigenbeladener Zellen *in vivo*. Aufgrund der erhöhten Anzahl von Effektorzellen war die Lyse jedoch gesteigert (*Abbildung 8 E*). Insgesamt schien es aber keine funktionellen Unterschiede zwischen den Effektorzellen in C57BL/6- und DC-MHCI-Mäusen zu geben. Auch eine Titration der Antigenmenge zeigte die gleiche gesteigerte Akkumulation von OT-I-Zellen in DC-MHCI-Mäusen (*Daten nicht gezeigt*).



Hierbei handelt es sich jedoch um keinen generellen Effekt in DC-MHCI-Mäusen, da nach Gabe von zum Beispiel Ovalbumin-Protein die Expansion in beiden Mausstämmen vergleichbar war (*Abbildung 10*). Die Immunantwort von CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist in beiden Mäusen wie erwartet gleich, da sich die Verteilung der MHC-Klasse-II-Expression nicht unterscheidet (*Abbildung 8 C*). Wie bereits gezeigt, war die Expression von MHC-I auf DC zwischen Wildtyp und DC-MHCI-Mäusen gleich (Cannarile et al., 2004). Zusätzlich hatten aus Knochenmark differenzierte DC (*Daten nicht gezeigt*), wie auch Milz-DC *in vitro* die gleiche Kapazität CD8-T-Zellen zu aktivieren und eine Proliferation zu induzieren (*Abbildung 11*). Daher konnte davon ausgegangen werden, dass die Form des Antigens und die Art der Verabreichung einen wichtigen Einfluss hatten, ob es zu Expansionsunterschieden kam oder nicht. Um dies genauer zu untersuchen, wurde die Expansion von OT-I-Zellen nach Immunisierung mit Ovalbumin-Immunkomplexen verglichen, Ovalbumin gekoppelt an anti-DEC205-Antikörpern, peptidbeladenen DC und Ovalbumin-kodierenden HSV-I (*Abbildung 10*). Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, führte eine Antigengabe unter toleranz-induzierenden Bedingungen (Gruppe I) zu gleicher T-Zellexpansion in C57BL/6- und DC-MHCI-Mäusen. Wurde das Antigen hauptsächlich von DC aufgenommen, prozessiert und präsentiert, wie es für die Gruppe II der Fall war, war die T-Zell-Akkumulation ebenfalls gleich. Erst wenn es zu einer differenziellen Antigenpräsentation kam (Gruppe III), dass heißt auch andere Zelltypen als DC das Antigen präsentieren konnten, kam es zu einer veränderten Akkumulation antigenspezifischer T-Zellen in Wildtypmäusen: Im Vergleich zu DC-MHCI-Mäusen war die CTL-Antwort verringert. In diesem Fall konnten in Wildtypmäusen alle Zellen das Peptidantigen präsentieren, während in DC-MHCI-Mäusen nach wie vor nur DC das Antigen präsentieren konnten.

Dieses Phänomen trat auch auf, wenn man die Expansion endogener CD8-T-Zellen nach Immunisierung mit HSV-OVA i.v. vergleicht (*Abbildung 12 A*). Hier war der Unterschied in der Akkumulation deutlich ausgeprägter. Für HSVgB- wie für Ovalbumin-spezifische T-Zellen war die Zahl in DC-MHCI-Mäusen um das drei- bis fünffache erhöht. Dies wurde nicht durch Migrationsunterschiede hervorgerufen, da auch in Milz, Lymphknoten, Leber und Lunge der gleiche Effekt beobachtet wurde (*Abbildung 12 B*). Die generierten Zellen zeigten eine vergleichbare IFN $\gamma$ -Produktion und eine beschleunigte Lyse von Zielzellen aufgrund der höheren Frequenz (*Abbildung 13 B*). Durch eine beschränkte Präsentation von Antigen auf DC kam es nicht nur zu einer Erhöhung der Anzahl von T-Zellen am Maximum der Immunantwort, sondern auch zu einer Zunahme früher Gedächtniszellen. Vermutlich hat die Höhe der Maximalantwort einen direkten Einfluss auf die Bildung von Gedächtniszellen. Dies ist jedoch nicht immer der Fall. Die retrovirale Expression eines Chimären-GM-CSF/IL-7 Rezeptors war zwar in der Lage, das Maximum der Antwort zu

steigern, was jedoch nicht zu einer verbesserten Bildung von Gedächtniszellen führte (Sun et al., 2006).

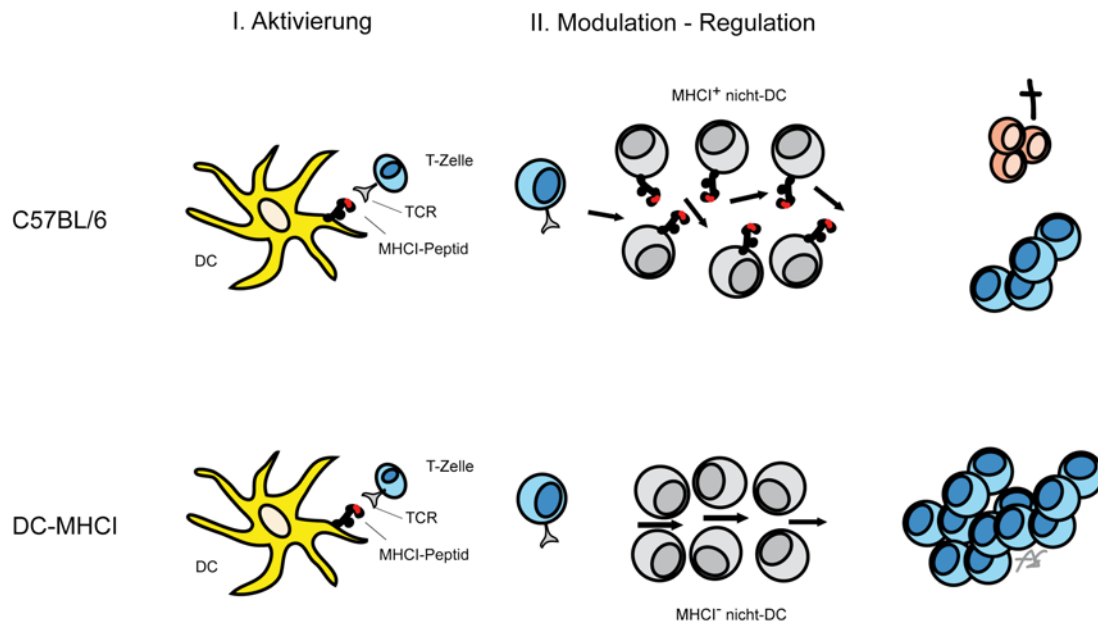
Da die unterschiedliche Akkumulation auch mittels adoptiven Zelltransfers einer bestimmten Anzahl von OT-I-Zellen nachweisbar war, war ein Unterschied in der Vorläuferfrequenz von antigen-spezifischen T-Zellen zwischen C57BL/6- und DC-MHCI-Mäusen als Ursache unwahrscheinlich. Ähnlich verhielt es sich mit Unterschieden im T-Zell-Repertoire als eine Erklärung. Dennoch wurde das TCR-V $\beta$ -Repertoire in beiden Mausstämmen verglichen. Unterschiede in der Thymus-selektion könnten in DC-MHCI-Mäusen T-Zell-Klone generieren, die leichter aktivierbar wären, die Immunantwort dominieren und so zu einer gesteigerten Akkumulation führen könnten. Die Analyse verschiedener TCR-V $\beta$ -Familien zeigte in beiden Stämmen die gleiche Verteilung (*Abbildung 14 A*). Nach Immunisierung mit HSV-OVA kam es in der Fraktion der aktivierten T-Zellen (CD43-positive/CD62L<sup>lo</sup>) zu einer deutlichen Verschiebung der Verteilung, welche durch TCR-V $\beta$ 8.1/8.2 und TCR-V $\beta$ 10 geprägt war. Für eine detailliertere Analyse wurden HSVgB-spezifische T-Zellen sortiert und mittels Spekratyping genauer untersucht. Hier konnte durch Kombination verschiedener TCR-V $\beta$ - und TCR-J $\beta$ -primer eine feinere Unterscheidung verschiedener Klonotypen erreicht werden. Die Analyse der CDR3-Längenverteilung zeigte in beiden Mausstämmen eine ähnliche Verteilung (*Abbildung 14 B*). Somit war das T-Zell-Repertoire vor und nach der Immunisierung in Wildtyp und DC-MHCI-Mäusen vergleichbar. Zusätzlich gab es auch auf Ebene des Phänotyps keine Unterschiede zwischen den generierten Effektorzellen. Alle untersuchten Aktivierungsmarker, wie CD25, CD27, CD43, CD44, CD62L, CD122 und CD127, zeigten vergleichbare Expression (*Abbildung 13 A*).

Antigenpräsentation limitiert auf DC führte in unserem Modell zu einer Steigerung der maximalen T-Zell-Antwort und bewirkte auch eine verbesserte Gedächtnisantwort (*Abbildung 18*). Nach einer Erstinfektion mit MVA-OVA kam es zu einer verstärkten Akkumulation von Ovalbumin-spezifischen T-Zellen, welche auch nach einer Zweitinfektion mit HSV-OVA zu einer erhöhten T-Zell-Antwort führte. Dies könnte Folge einer Erhöhung der Vorläuferfrequenz in DC-MHCI-Mäusen durch die Erstinfektion sein. Gedächtniszellen könnten aber ebenso wie naive CD8-T-Zellen einen Vorteil in der Expansion erfahren, wenn nur DC das Antigen präsentieren.

Warum kommt es zu Unterschieden in der Akkumulation? Aus Vergleichen früher Zellteilungs-raten mittels CFSE-Färbung konnte gezeigt werden, dass OT-I-Zellen in DC-MHCI-Mäusen leicht verzögert in die erste Zellteilung eintraten (*Daten nicht gezeigt*). Die weitere Teilungsgeschwin-digkeit war aber vergleichbar zu OT-I-Zellen, die in Wildtypmäusen aktiviert wurden. Es könnte zu einer längeren Stimulationsdauer der T-Zelle kommen, was zu einer Erhöhung des IL-2-

Spiegels und somit zu einer Steigerung der Expansion führen könnte (Spierings et al., 2006). Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da die gleiche Verzögerung der ersten Zellteilung auch nach Immunisierung mit Antigen in CFA (subkutan) auftrat, es hier aber zu keiner gesteigerten Akkumulation kam (*Daten nicht gezeigt*). Grundlage der unterschiedlichen Akkumulation könnten Unterschiede in den späten Zellteilungsraten oder in der Überlebensrate sein. Nach der Infektion mit HSV-OVA kam es zwischen Tag drei und vier zu einer Expansion HSVgB-spezifischer T-Zellen, die in beiden Mäusen noch vergleichbar stark war (*Abbildung 8 C*). Erst am Tag fünf wurde eine erheblich gesteigerte Akkumulation in DC-MHCI-Mäusen sichtbar. Die BrdU-Einbauraten und somit die Proliferation nahm im Laufe der Expansion ab, war aber an allen Zeitpunkten zwischen den zwei Mausstämmen vergleichbar (*Abbildung 15 A*). Dies deutete indirekt auf unterschiedliche Apoptoseraten hin, da die Proliferation gleich war, sich die Anzahl von antigenspezifischen T-Zellen aber in unterschiedliche Richtung entwickelte.

Ein direkter Hinweis auf unterschiedliche Apoptoseraten ergab sich durch Färbung mit AnnexinV und 7-AAD (*Abbildung 15 B*). Während der Anteil lebender HSVgB-spezifischer T-Zellen (AnnexinV-negativ/7-AAD-negativ) am Tag vier noch gleich war, kam es an den folgenden Tagen zu einer deutlichen Zunahme lebender Zellen in DC-MHCI- verglichen zu C57BL/6-Mäusen. Dies war ein direkter Beleg für unterschiedliche Apoptoseraten nach differentieller Antigenpräsentation, welche den zeitlichen Verlauf der unterschiedlichen Akkumulationsraten widerspiegelte. Daraus wurde geschlossen, dass die Antigenpräsentation auf nicht-DC Apoptose von antigenspezifischen T-Zellen induziert und die CTL-Antwort abschwächt. Diese Abschwächung führte auch zu einer verminderten Bildung von CD8-Gedächtniszellen (*Abbildung 18*). Es wurde bereits beschrieben, dass die Erkennung von Antigen in Abwesenheit von kostimulatorischen Signalen zu T-Zell-Anergie beziehungsweise Depletion führen kann (Guermónprez et al., 2002). Dies könnte in C57BL/6-Mäusen durch Antigenpräsentation auf nicht-APC der Fall sein und so zu einer verminderten Akkumulation antigenspezifischer T-Zellen führen, während in DC-MHCI-Mäusen diese Interaktion nicht zustande kommen kann (*Abbildung 19*). Eine andere Erklärungsmöglichkeit ist, dass nicht-DC als APC naive T-Zellen aktiv in Apoptose führen, wie es bereits für antigenpräsentierende B-Zellen beschrieben wurde (Fuchs and Matzinger, 1992). Dabei könnte es sich um einen der initialen Aktivierung durch DC nachgeschalteten Regulationsmechanismus handeln, welcher ein Überschießen der CTL-Antwort nach systemischer Antigenverteilung unterbindet.



**Abbildung 19: Modell der post-Aktivierungsmodulation.** Nach der initialen Aktivierung (I) der naiven T-Zelle durch DC kommt es unter Bedingungen differentieller Antigenpräsentation (systemische Administration von Antigen i.v.) zu einer weiteren Modulation/Regulation (II) der T-Zell-Expansion durch antigenpräsentierende nicht-DC in C57BL/6-Mäusen. Nur ein Teil der gebildeten Nachkommen ist in der Lage zu überleben, während die anderen Effektor-T-Zellen absterben. In DC-MHCI-Mäusen fehlt dieser Modulationsschritt, weshalb die Anzahl der gebildete Effektor-T-Zellen erhöht wird.

Wie bereits gezeigt, kann die T-Zell-Aktivierung in verschiedene Stadien unterteilt werden (Bousso and Robey, 2003). Nach der stabilen, länger andauernden Interaktion der T-Zellen kommt es in den folgenden Stunden bis Tagen noch zu einer Vielzahl von Kontakten. Dieses Zeitfenster eröffnet auch die Möglichkeit einer weiteren Modulation der initialen Aktivierung. Die vorgestellten Ergebnisse zeigen eindeutig eine antigenabhängige Modulation der CD8-T-Zell-Antwort durch MHC-I-positive nicht-DC.

Es gibt de facto keine Ergebnisse zur Bedeutung von Apoptose in der frühen Immunantwort. Berechnungen verdeutlichen jedoch, dass man aufgrund der proliferativen Kapazität mit wesentlich mehr antigenspezifischen T-Zellen rechnen könnte, als tatsächlich detektierbar sind, was wiederum indirekt für Apoptose in dieser frühen Phase spricht. Die meisten Untersuchungen zu Apoptose konzentrieren sich auf ihre Rolle in der Kontraktionsphase der T-Zell-Antwort, in welcher 90-95% aller antigenspezifischen T-Zellen entfernt werden. Hier wird zwischen aktivierungsinduziertem Zelltod (AICD) und intrinsischem Zelltod (ACAD) unterschieden (Hildeman et al., 2003). AICD wird durch externe Reize induziert und ist abhängig Fas/Fas Ligand und FLIP, während ACAD ein zellintrinsischer Prozess ist, der durch Mitglieder der Bcl-2 Familie kontrolliert wird.

Um ein besseres Verständnis apoptotischer Mechanismen in der Frühphase einer Immunantwort zu erlangen, wurde das Genexpressionsprofil naiver CD8-T-Zellen und HSVgB-spezifischer T-Zellen (Tag sechs nach der Immunisierung) analysiert und die Profile von C57BL/6- und DC-MHCI-Mäusen verglichen. Nachdem viele bereits beschriebene Mediatoren von Apoptose nicht nur auf Ebene der Translation in Protein und Lokalisation dieser Proteine in der Zelle, sondern auch auf transkriptioneller Ebene reguliert werden, konnte angenommen werden, wichtige Moleküle durch Analyse der Genexpression identifizieren zu können. Überraschenderweise konnten hierbei aber nur sehr geringe Unterschiede in der Genexpression zwischen T-Zellen aktiviert in Wildtyp oder DC-MHCI-Mäusen detektiert werden (*Abbildung 16*). Nur für einen bereits beschriebenen Mediator von Apoptose, nämlich dem proapoptotischen Molekül Bim, gab es Unterschiede in der mRNA Expression nach der T-Zell-Aktivierung (*Abbildung 17*). In naiven T-Zellen lag ein Gleichgewicht des antiapoptotischen Moleküles Bcl-2 und des proapoptotischen Moleküls Bim vor, weshalb in diesen Zellen Zellüberleben dominierte. Nach der T-Zell-Aktivierung fiel die Expression von Bcl-2, während die Expression von Bim unverändert blieb. In dieser Situation überwiegt der Zelltod (Apoptose).

Es kann davon ausgegangen werden, dass diese Prozesse nicht alleine in der initialen Aktivierung durch DC vermittelt werden, sondern dass der antigenspezifische Kontakt mit anderen Zelltypen (nicht-DC) die Expression von Bim unterstützt. In einer Umgebung, in welcher nur DC Antigen präsentierten, entfiel dieser Einfluss. Die Expression von Bim nahm ab und näherte sich einem Gleichgewicht mit Bcl-2, in welchem wieder Zellüberleben gefördert wurde. Alternativ könnte die antigenspezifische Interaktion mit DC der T-Zellen wichtige Überlebenssignale vermitteln, welche die durch die Aktivierung induzierten proapoptotischen Signale aufheben (Kondo et al., 2001). Diese Fragen werden in weitergehenden Studien genauer untersucht.

## 7 AUSBLICK

Nachdem die Bedeutung von DC für die HP von naiven CD8-T-Zellen gezeigt werden konnte, sollen weitere Studien die Langzeithomöostase von naiven T-Zellen genauer untersuchen. Dazu wird zum einen das Überleben naiver CD8-T-Zellen in Mäusen mit unterschiedlicher MHC-I-Expression über einen längeren Zeitraum verfolgt. Zusätzlich wird untersucht, ob es zu Unterschieden im Repertoire oder im Phänotyp der T-Zellen kommt, wenn DC die einzigen Zellen sind, die das MHC-abhängige Überleben vermitteln. Wie bereits beschrieben, kommt es zu einer Anpassung der T-Zell-Reaktivität durch ständigen Kontakt zu MHC-I. Die Frage ist nun, ob MHC-I-Expression auf DC ausreicht, um diese Feinabstimmung zu erlauben, oder ob es durch dieses MHC-Muster zu Unterschieden in der T-Zell-Reaktivität kommen kann.

Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung von DC für die Induktion einer effektiven CTL-Antwort, sie zeigen aber auch den wichtigen Einfluss der Antigenpräsentation von anderen Zelltypen für die Immunantwort auf. Antigenpräsentation auf nicht-DC kann zum einen die Immunantwort abschwächen, sie ist aber für manche Vakzinierungen essentiell (Lauterbach et al., 2004). Deshalb ist ein besseres Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen essentiell um maßgeschneiderte Vakzinierungsstrategien auszuarbeiten. Eine interessanter Ansatz ist hier, verschiedene Vakzine in Mäusen zu testen, welche sich zum einen im Muster der MHC-I-Expression (und somit in der Antigenpräsentation), zum anderem aber auch darin unterscheiden, ob das Antigen direkt oder indirekt durch Kreuzpräsentation präsentiert werden muss. Für Untersuchungen zum Einfluss des MHC-Expressionsmusters eignet sich der Vergleich von Wildtypmäusen mit K14- $\beta$ 2m $\times$ CD11c-MHCI-Mäusen, in welchen nur DC das Antigen exprimieren. In CD11c-RacN17-Mäusen ist die Kreuzpräsentation durch eine dominant negative Form von Rac eingeschränkt, weshalb in diesen Mäusen die Bedeutung dieser Form der Antigenpräsentation untersucht werden kann. In diesen Mäusen können zwar alle Zellen das Antigen direkt präsentieren, aber DC sind nicht mehr in der Lage exogene Antigene effektiv auf MHC-Klasse-I zu präsentieren (Kerksiek et al., 2005). Eine Kreuzung dieses Stammes mit K14- $\beta$ 2m $\times$ CD11c-MHCI-Mäusen generiert Tiere, in denen DC die einzigen Zellen sind, die Antigen präsentieren können und diese Antigene auch nur in ihnen selbst (endogen) exprimiert werden können. Ein Vergleich der Immunantwort unter diesen vier verschiedenen Bedingungen erlaubt Rückschlüsse darauf, ob ein Vakzin so gestaltet werden muss, dass es alle Zellen erreicht, oder nur in DC oder nicht-DC gelangen soll. Dieses Wissen kann dazu dienen, Impfstoffe zu optimieren, beziehungsweise neu zu entwickeln um Tumore oder virale Erkrankungen besser behandeln zu können.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

Almeida, A. R., Borghans, J. A., and Freitas, A. A. (2001). T cell homeostasis: thymus regeneration and peripheral T cell restoration in mice with a reduced fraction of competent precursors. *J Exp Med* 194, 591-599.

Almeida, A. R., Rocha, B., Freitas, A. A., and Tanchot, C. (2005). Homeostasis of T cell numbers: from thymus production to peripheral compartmentalization and the indexation of regulatory T cells. *Semin Immunol* 17, 239-249.

Baccala, R., Gonzalez-Quintial, R., Dummer, W., and Theofilopoulos, A. N. (2005). Tumor immunity via homeostatic T cell proliferation: mechanistic aspects and clinical perspectives. *Springer Semin Immunopathol* 27, 75-85.

Becker, T. C., Wherry, E. J., Boone, D., Murali-Krishna, K., Antia, R., Ma, A., and Ahmed, R. (2002). Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *J Exp Med* 195, 1541-1548.

Belkaid, Y., and Rouse, B. T. (2005). Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol* 6, 353-360.

Bell, E. B., Sparshott, S. M., Drayson, M. T., and Ford, W. L. (1987). The stable and permanent expansion of functional T lymphocytes in athymic nude rats after a single injection of mature T cells. *J Immunol* 139, 1379-1384.

Belz, G. T., Heath, W. R., and Carbone, F. R. (2002). The role of dendritic cell subsets in selection between tolerance and immunity. *Immunol Cell Biol* 80, 463-468.

Bender, J., Mitchell, T., Kappler, J., and Marrack, P. (1999). CD4+ T cell division in irradiated mice requires peptides distinct from those responsible for thymic selection. *J Exp Med* 190, 367-374.

Berzins, S. P., Boyd, R. L., and Miller, J. F. (1998). The role of the thymus and recent thymic migrants in the maintenance of the adult peripheral lymphocyte pool. *J Exp Med* 187, 1839-1848.

Berzins, S. P., Godfrey, D. I., Miller, J. F., and Boyd, R. L. (1999). A central role for thymic e-migrants in peripheral T cell homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9787-9791.

Bhandoola, A., Tai, X., Eckhaus, M., Auchincloss, H., Mason, K., Rubin, S. A., Carbone, K. M., Grossman, Z., Rosenberg, A. S., and Singer, A. (2002). Peripheral expression of self-MHC-II influences the reactivity and self-tolerance of mature CD4(+) T cells: evidence from a lymphopenic T cell model. *Immunity* 17, 425-436.

Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, M. C., and Steinman, R. M. (2002). Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med* 196, 1627-1638.

- Bouillet, P., Cory, S., Zhang, L. C., Strasser, A., and Adams, J. M. (2001). Degenerative disorders caused by Bcl-2 deficiency prevented by loss of its BH3-only antagonist Bim. *Dev Cell* 1, 645-653.
- Bousso, P., and Robey, E. (2003). Dynamics of CD8+ T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes. *Nat Immunol* 4, 579-585.
- Brocker, T. (1997). Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells. *J Exp Med* 186, 1223-1232.
- Brocker, T., Riedinger, M., and Karjalainen, K. (1997). Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med* 185, 541-550.
- Burchill, M. A., Goetz, C. A., Prlic, M., O'Neil, J. J., Harmon, I. R., Bensinger, S. J., Turka, L. A., Brennan, P., Jameson, S. C., and Farrar, M. A. (2003). Distinct effects of STAT5 activation on CD4+ and CD8+ T cell homeostasis: development of CD4+CD25+ regulatory T cells versus CD8+ memory T cells. *J Immunol* 171, 5853-5864.
- Burkett, P. R., Koka, R., Chien, M., Chai, S., Boone, D. L., and Ma, A. (2004). Coordinate expression and trans presentation of interleukin (IL)-15 $\alpha$  and IL-15 supports natural killer cell and memory CD8+ T cell homeostasis. *J Exp Med* 200, 825-834.
- Cannarile, M. A., Decanis, N., van Meerwijk, J. P., and Brocker, T. (2004). The role of dendritic cells in selection of classical and nonclassical CD8+ T cells in vivo. *J Immunol* 173, 4799-4805.
- Capone, M., Romagnoli, P., Beermann, F., MacDonald, H. R., and van Meerwijk, J. P. (2001). Dissociation of thymic positive and negative selection in transgenic mice expressing major histocompatibility complex class I molecules exclusively on thymic cortical epithelial cells. *Blood* 97, 1336-1342.
- Chao, D. L., Davenport, M. P., Forrest, S., and Perelson, A. S. (2005). The effects of thymic selection on the range of T cell cross-reactivity. *Eur J Immunol* 35, 3452-3459.
- Cho, B. K., Rao, V. P., Ge, Q., Eisen, H. N., and Chen, J. (2000). Homeostasis-stimulated proliferation drives naive T cells to differentiate directly into memory T cells. *J Exp Med* 192, 549-556.
- Dai, Z., and Lakkis, F. G. (2001). Cutting edge: Secondary lymphoid organs are essential for maintaining the CD4, but not CD8, naive T cell pool. *J Immunol* 167, 6711-6715.
- Dorfman, J. R., Stefanova, I., Yasutomo, K., and Germain, R. N. (2000). CD4+ T cell survival is not directly linked to self-MHC-induced TCR signaling. *Nat Immunol* 1, 329-335.
- Dummer, W., Ernst, B., LeRoy, E., Lee, D., and Surh, C. (2001). Autologous regulation of naive T cell homeostasis within the T cell compartment. *J Immunol* 166, 2460-2468.
- Dummer, W., Niethammer, A. G., Baccala, R., Lawson, B. R., Wagner, N., Reisfeld, R. A., and Theofilopoulos, A. N. (2002). T cell homeostatic proliferation elicits effective antitumor autoimmunity. *J Clin Invest* 110, 185-192.



- Duttilh, B. E., and de Boer, R. J. (2003). Decline in excision circles requires homeostatic renewal or homeostatic death of naive T cells. *J Theor Biol* 224, 351-358.
- Ernst, B., Lee, D. S., Chang, J. M., Sprent, J., and Surh, C. D. (1999). The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery. *Immunity* 11, 173-181.
- Freitas, A. A., and Rocha, B. (2000). Population biology of lymphocytes: the flight for survival. *Annu Rev Immunol* 18, 83-111.
- Fuchs, E. J., and Matzinger, P. (1992). B cells turn off virgin but not memory T cells. *Science* 258, 1156-1159.
- Gallegos, A. M., and Bevan, M. J. (2004). Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *J Exp Med* 200, 1039-1049.
- Ge, Q., Palliser, D., Eisen, H. N., and Chen, J. (2002). Homeostatic T cell proliferation in a T cell-dendritic cell coculture system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2983-2988.
- Ge, Q., Rao, V. P., Cho, B. K., Eisen, H. N., and Chen, J. (2001). Dependence of lymphopenia-induced T cell proliferation on the abundance of peptide/ MHC epitopes and strength of their interaction with T cell receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1728-1733.
- Geginat, J., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (2001). Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells. *J Exp Med* 194, 1711-1719.
- Goldrath, A. W. (2002). Maintaining the status quo: T-cell homeostasis. *Microbes Infect* 4, 539-545.
- Goldrath, A. W., and Bevan, M. J. (1999). Low-affinity ligands for the TCR drive proliferation of mature CD8+ T cells in lymphopenic hosts. *Immunity* 11, 183-190.
- Goldrath, A. W., Bogatzki, L. Y., and Bevan, M. J. (2000). Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation. *J Exp Med* 192, 557-564.
- Goldrath, A. W., Luckey, C. J., Park, R., Benoist, C., and Mathis, D. (2004). The molecular program induced in T cells undergoing homeostatic proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16885-16890.
- Gordon, S., and Taylor, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5, 953-964.
- Gourley, T. S., Wherry, E. J., Masopust, D., and Ahmed, R. (2004). Generation and maintenance of immunological memory. *Semin Immunol* 16, 323-333.
- Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C., and Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20, 621-667.

- Guery, J. C., Sette, A., Appella, E., and Adorini, L. (1995). Constitutive presentation of dominant epitopes from endogenous naturally processed self-beta 2-microglobulin to class II-restricted T cells leads to self-tolerance. *J Immunol* *154*, 545-554.
- Hamilton, S. E., Wolkers, M. C., Schoenberger, S. P., and Jameson, S. C. (2006). The generation of protective memory-like CD8+ T cells during homeostatic proliferation requires CD4+ T cells. *Nat Immunol* *7*, 475-481.
- Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., Ravetch, J. V., Steinman, R. M., and Nussenzweig, M. C. (2001). Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* *194*, 769-779.
- Heath, W. R., Belz, G. T., Behrens, G. M., Smith, C. M., Forehan, S. P., Parish, I. A., Davey, G. M., Wilson, N. S., Carbone, F. R., and Villadangos, J. A. (2004). Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev* *199*, 9-26.
- Heath, W. R., and Carbone, F. R. (2001). Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat Rev Immunol* *1*, 126-134.
- Hildeman, D. A., Mitchell, T., Kappler, J., and Marrack, P. (2003). T cell apoptosis and reactive oxygen species. *J Clin Invest* *111*, 575-581.
- Hogquist, K. A., Baldwin, T. A., and Jameson, S. C. (2005). Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol* *5*, 772-782.
- Hogquist, K. A., Jameson, S. C., Heath, W. R., Howard, J. L., Bevan, M. J., and Carbone, F. R. (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* *76*, 17-27.
- Inaba, K., Metlay, J. P., Crowley, M. T., Witmer-Pack, M., and Steinman, R. M. (1990). Dendritic cells as antigen presenting cells in vivo. *Int Rev Immunol* *6*, 197-206.
- Inaba, K., and Steinman, R. M. (1985). Antibody responses to T-dependent antigens: contributions of dendritic cells and helper T lymphocytes. *Adv Exp Med Biol* *186*, 369-376.
- Jameson, S. C. (2005). T cell homeostasis: keeping useful T cells alive and live T cells useful. *Semin Immunol* *17*, 231-237.
- Jiang, H., and Chess, L. (2004). An integrated model of immunoregulation mediated by regulatory T cell subsets. *Adv Immunol* *83*, 253-288.
- 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.
- Kaeck, S. M., and Ahmed, R. (2001). Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nat Immunol* *2*, 415-422.
- Kassiotis, G., Garcia, S., Simpson, E., and Stockinger, B. (2002). Impairment of immunological memory in the absence of MHC despite survival of memory T cells. *Nat Immunol* *3*, 244-250.

- Kastenmuller, W., Drexler, I., Ludwig, H., Erfle, V., Peschel, C., Bernhard, H., and Sutter, G. (2006). Infection of human dendritic cells with recombinant vaccinia virus MVA reveals general persistence of viral early transcription but distinct maturation-dependent cytopathogenicity. *Virology* 350, 276-288.
- Kelly, J., Spolski, R., Imada, K., Bollenbacher, J., Lee, S., and Leonard, W. J. (2003). A role for Stat5 in CD8+ T cell homeostasis. *J Immunol* 170, 210-217.
- Kerksiek, K. M., Niedergang, F., Chavrier, P., Busch, D. H., and Brocker, T. (2005). Selective Rac1 inhibition in dendritic cells diminishes apoptotic cell uptake and cross-presentation in vivo. *Blood* 105, 742-749.
- Kieper, W. C., Burghardt, J. T., and Surh, C. D. (2004). A role for TCR affinity in regulating naive T cell homeostasis. *J Immunol* 172, 40-44.
- Kieper, W. C., Tan, J. T., Bondi-Boyd, B., Gapin, L., Sprent, J., Ceredig, R., and Surh, C. D. (2002). Overexpression of interleukin (IL)-7 leads to IL-15-independent generation of memory phenotype CD8+ T cells. *J Exp Med* 195, 1533-1539.
- King, C., Ilic, A., Koelsch, K., and Sarvetnick, N. (2004). Homeostatic expansion of T cells during immune insufficiency generates autoimmunity. *Cell* 117, 265-277.
- Koller, B. H., and Smithies, O. (1989). Inactivating the beta 2-microglobulin locus in mouse embryonic stem cells by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 8932-8935.
- Kondo, T., Cortese, I., Markovic-Plese, S., Wandinger, K. P., Carter, C., Brown, M., Leitman, S., and Martin, R. (2001). Dendritic cells signal T cells in the absence of exogenous antigen. *Nat Immunol* 2, 932-938.
- Krupica, T., Jr., Fry, T. J., and Mackall, C. L. (2006). Autoimmunity during lymphopenia: a two-hit model. *Clin Immunol* 120, 121-128.
- Kurts, C., Cannarile, M., Klebba, I., and Brocker, T. (2001). Dendritic cells are sufficient to cross-present self-antigens to CD8 T cells in vivo. *J Immunol* 166, 1439-1442.
- Ladi, E., Yin, X., Chtanova, T., and Robey, E. A. (2006). Thymic microenvironments for T cell differentiation and selection. *Nat Immunol* 7, 338-343.
- Laky, K., and Fowlkes, B. J. (2005). Receptor signals and nuclear events in CD4 and CD8 T cell lineage commitment. *Curr Opin Immunol* 17, 116-121.
- Le Campion, A., Bourgeois, C., Lambolez, F., Martin, B., Leaument, S., Dautigny, N., Tanchot, C., Penit, C., and Lucas, B. (2002). Naive T cells proliferate strongly in neonatal mice in response to self-peptide/self-MHC complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4538-4543.
- Lee, S. K., and Surh, C. D. (2005). Role of interleukin-7 in bone and T-cell homeostasis. *Immunol Rev* 208, 169-180.

- Li, O., Chang, X., Zhang, H., Kocak, E., Ding, C., Zheng, P., and Liu, Y. (2006). Massive and destructive T cell response to homeostatic cue in CD24-deficient lymphopenic hosts. *J Exp Med* 203, 1713-1720.
- Li, O., Zheng, P., and Liu, Y. (2004). CD24 expression on T cells is required for optimal T cell proliferation in lymphopenic host. *J Exp Med* 200, 1083-1089.
- Mackall, C. L., Bare, C. V., Granger, L. A., Sharrow, S. O., Titus, J. A., and Gress, R. E. (1996). Thymic-independent T cell regeneration occurs via antigen-driven expansion of peripheral T cells resulting in a repertoire that is limited in diversity and prone to skewing. *J Immunol* 156, 4609-4616.
- Mackall, C. L., Granger, L., Sheard, M. A., Cepeda, R., and Gress, R. E. (1993). T-cell regeneration after bone marrow transplantation: differential CD45 isoform expression on thymic-derived versus thymic-independent progeny. *Blood* 82, 2585-2594.
- Madakamutil, L. T., Christen, U., Lena, C. J., Wang-Zhu, Y., Attinger, A., Sundarajan, M., Ellmeier, W., von Herrath, M. G., Jensen, P., Littman, D. R., and Cheroutre, H. (2004). CD8alpha-mediated survival and differentiation of CD8 memory T cell precursors. *Science* 304, 590-593.
- Marrack, P., Bender, J., Hildeman, D., Jordan, M., Mitchell, T., Murakami, M., Sakamoto, A., Schaefer, B. C., Swanson, B., and Kappler, J. (2000). Homeostasis of alpha beta TCR+ T cells. *Nat Immunol* 1, 107-111.
- Matzinger, P. (1998). An innate sense of danger. *Semin Immunol* 10, 399-415.
- Mempel, T. R., Henrickson, S. E., and Von Andrian, U. H. (2004). T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* 427, 154-159.
- Miller, J. F. (1965). Effect of thymectomy in adult mice on immunological responsiveness. *Nature* 208, 1337-1338.
- Miller, R. A., and Stutman, O. (1984). T cell repopulation from functionally restricted splenic progenitors: 10,000-fold expansion documented by using limiting dilution analyses. *J Immunol* 133, 2925-2932.
- Min, B., McHugh, R., Sempowski, G. D., Mackall, C., Foucras, G., and Paul, W. E. (2003). Neonates support lymphopenia-induced proliferation. *Immunity* 18, 131-140.
- Mitchell, T. C., Hildeman, D., Kedl, R. M., Teague, T. K., Schaefer, B. C., White, J., Zhu, Y., Kappler, J., and Marrack, P. (2001). Immunological adjuvants promote activated T cell survival via induction of Bcl-3. *Nat Immunol* 2, 397-402.
- Murali-Krishna, K., and Ahmed, R. (2000). Cutting edge: naive T cells masquerading as memory cells. *J Immunol* 165, 1733-1737.
- Murali-Krishna, K., Lau, L. L., Sambhara, S., Lemonnier, F., Altman, J., and Ahmed, R. (1999). Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. *Science* 286, 1377-1381.

- O'Garra, A., and Trinchieri, G. (2004). Are dendritic cells afraid of commitment? *Nat Immunol* 5, 1206-1208.
- Okada, H., Kobune, F., Sato, T. A., Kohama, T., Takeuchi, Y., Abe, T., Takayama, N., Tsuchiya, T., and Tashiro, M. (2000). Extensive lymphopenia due to apoptosis of uninfected lymphocytes in acute measles patients. *Arch Virol* 145, 905-920.
- Pannetier, C., Cochet, M., Darche, S., Casrouge, A., Zoller, M., and Kourilsky, P. (1993). The sizes of the CDR3 hypervariable regions of the murine T-cell receptor beta chains vary as a function of the recombined germ-line segments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 4319-4323.
- Polic, B., Kunkel, D., Scheffold, A., and Rajewsky, K. (2001). How alpha beta T cells deal with induced TCR alpha ablation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8744-8749.
- Prlic, M., Blazar, B. R., Khoruts, A., Zell, T., and Jameson, S. C. (2001). Homeostatic expansion occurs independently of costimulatory signals. *J Immunol* 167, 5664-5668.
- Prlic, M., Hernandez-Hoyos, G., and Bevan, M. J. (2006). Duration of the initial TCR stimulus controls the magnitude but not functionality of the CD8+ T cell response. *J Exp Med* 203, 2135-2143.
- Prlic, M., and Jameson, S. C. (2002). Homeostatic expansion versus antigen-driven proliferation: common ends by different means? *Microbes Infect* 4, 531-537.
- Quintana, F. J., and Cohen, I. R. (2005). Heat shock proteins as endogenous adjuvants in sterile and septic inflammation. *J Immunol* 175, 2777-2782.
- Reis e Sousa, C. (2006). Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* 6, 476-483.
- Robertson, J. M., Jensen, P. E., and Evavold, B. D. (2000). DO11.10 and OT-II T cells recognize a C-terminal ovalbumin 323-339 epitope. *J Immunol* 164, 4706-4712.
- Rocha, B., Dautigny, N., and Pereira, P. (1989). Peripheral T lymphocytes: expansion potential and homeostatic regulation of pool sizes and CD4/CD8 ratios in vivo. *Eur J Immunol* 19, 905-911.
- Rock, K. L., and Shen, L. (2005). Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol Rev* 207, 166-183.
- Rodriguez-Pinto, D. (2005). B cells as antigen presenting cells. *Cell Immunol* 238, 67-75.
- Rosenthal, A. S., and Shevach, E. M. (1973). Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. I. Requirement for histocompatible macrophages and lymphocytes. *J Exp Med* 138, 1194-1212.
- Ruckert, R., Brandt, K., Bulanova, E., Mirghomizadeh, F., Paus, R., and Bulfone-Paus, S. (2003). Dendritic cell-derived IL-15 controls the induction of CD8 T cell immune responses. *Eur J Immunol* 33, 3493-3503.

- Sallusto, F., Palermo, B., Lenig, D., Miettinen, M., Matikainen, S., Julkunen, I., Forster, R., Burgstahler, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur J Immunol* 29, 1617-1625.
- Schluns, K. S., Kieper, W. C., Jameson, S. C., and Lefrancois, L. (2000). Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* 1, 426-432.
- Schluns, K. S., Stoklasek, T., and Lefrancois, L. (2005). The roles of interleukin-15 receptor alpha: trans-presentation, receptor component, or both? *Int J Biochem Cell Biol* 37, 1567-1571.
- Scolley, R. G., Butcher, E. C., and Weissman, I. L. (1980). Thymus cell migration. Quantitative aspects of cellular traffic from the thymus to the periphery in mice. *Eur J Immunol* 10, 210-218.
- Seddon, B., and Zamoyska, R. (2002). TCR signals mediated by Src family kinases are essential for the survival of naive T cells. *J Immunol* 169, 2997-3005.
- Smith, H., Chen, I. M., Kubo, R., and Tung, K. S. (1989). Neonatal thymectomy results in a repertoire enriched in T cells deleted in adult thymus. *Science* 245, 749-752.
- Spierings, D. C., Lemmens, E. E., Grewal, K., Schoenberger, S. P., and Green, D. R. (2006). Duration of CTL activation regulates IL-2 production required for autonomous clonal expansion. *Eur J Immunol* 36, 1707-1717.
- Stefanova, I., Dorfman, J. R., and Germain, R. N. (2002). Self-recognition promotes the foreign antigen sensitivity of naive T lymphocytes. *Nature* 420, 429-434.
- Steinman, R. M. (2000). The dendritic cell advantage: New focus for immune-based therapies. *Drug News Perspect* 13, 581-586.
- Steinman, R. M., and Cohn, Z. A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137, 1142-1162.
- Steinman, R. M., Pack, M., and Inaba, K. (1997). Dendritic cell development and maturation. *Adv Exp Med Biol* 417, 1-6.
- Stockinger, B., Barthlott, T., and Kassiotis, G. (2004). The concept of space and competition in immune regulation. *Immunology* 111, 241-247.
- Subudhi, S. K., Alegre, M. L., and Fu, Y. X. (2005). The balance of immune responses: costimulation verse coinhibition. *J Mol Med* 83, 193-202.
- Sun, J. C., Lehar, S. M., and Bevan, M. J. (2006). Augmented IL-7 signaling during viral infection drives greater expansion of effector T cells but does not enhance memory. *J Immunol* 177, 4458-4463.
- Takahama, Y. (2006). Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol* 6, 127-135.

- Takeda, S., Rodewald, H. R., Arakawa, H., Bluethmann, H., and Shimizu, T. (1996). MHC class II molecules are not required for survival of newly generated CD4<sup>+</sup> T cells, but affect their long-term life span. *Immunity* 5, 217-228.
- Tan, J. T., Dudl, E., LeRoy, E., Murray, R., Sprent, J., Weinberg, K. I., and Surh, C. D. (2001). IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8732-8737.
- Tanchot, C., Lemonnier, F. A., Perarnau, B., Freitas, A. A., and Rocha, B. (1997). Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells. *Science* 276, 2057-2062.
- Tough, D. F., and Sprent, J. (1994). Turnover of naive- and memory-phenotype T cells. *J Exp Med* 179, 1127-1135.
- Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3, 133-146.
- Troy, A. E., and Shen, H. (2003). Cutting edge: homeostatic proliferation of peripheral T lymphocytes is regulated by clonal competition. *J Immunol* 170, 672-676.
- Tumpey, T. M., Lu, X., Morken, T., Zaki, S. R., and Katz, J. M. (2000). Depletion of lymphocytes and diminished cytokine production in mice infected with a highly virulent influenza A (H5N1) virus isolated from humans. *J Virol* 74, 6105-6116.
- van Oers, N. S., Killeen, N., and Weiss, A. (1994). ZAP-70 is constitutively associated with tyrosine-phosphorylated TCR zeta in murine thymocytes and lymph node T cells. *Immunity* 1, 675-685.
- van Stipdonk, M. J., Lemmens, E. E., and Schoenberger, S. P. (2001). Naive CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation. *Nat Immunol* 2, 423-429.
- Viret, C., Wong, F. S., and Janeway, C. A., Jr. (1999). Designing and maintaining the mature TCR repertoire: the continuum of self-peptide:self-MHC complex recognition. *Immunity* 10, 559-568.
- von Boehmer, H., and Fehling, H. J. (1997). Structure and function of the pre-T cell receptor. *Annu Rev Immunol* 15, 433-452.
- Wallis, V. J., Leuchars, E., and Davies, A. J. (1978). Studies of hyperthymic mice. II. The influence of thymus grafts on cell flow through the peripheral T-cell pool. *Immunology* 35, 1037-1043.
- Weerkamp, F., Pike-Overzet, K., and Staal, F. J. (2006). T-sing progenitors to commit. *Trends Immunol* 27, 125-131.
- Witherden, D., van Oers, N., Waltzinger, C., Weiss, A., Benoist, C., and Mathis, D. (2000). Tetracycline-controllable selection of CD4(+) T cells: half-life and survival signals in the absence of major histocompatibility complex class II molecules. *J Exp Med* 191, 355-364.

- Wu, Q., Wang, Y., Wang, J., Hedgeman, E. O., Browning, J. L., and Fu, Y. X. (1999). The requirement of membrane lymphotoxin for the presence of dendritic cells in lymphoid tissues. *J Exp Med* 190, 629-638.
- Wu, Z., Bensinger, S. J., Zhang, J., Chen, C., Yuan, X., Huang, X., Markmann, J. F., Kassaei, A., Rosengard, B. R., Hancock, W. W., *et al.* (2004). Homeostatic proliferation is a barrier to transplantation tolerance. *Nat Med* 10, 87-92.
- Zaft, T., Sapoznikov, A., Krauthgamer, R., Littman, D. R., and Jung, S. (2005). CD11c<sup>high</sup> dendritic cell ablation impairs lymphopenia-driven proliferation of naive and memory CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 175, 6428-6435.
- Zammit, D. J., and Lefrançois, L. (2006). Dendritic cell-T cell interactions in the generation and maintenance of CD8 T cell memory. *Microbes Infect* 8, 1108-1115.
- Zhang, X., Sun, S., Hwang, I., Tough, D. F., and Sprent, J. (1998). Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8<sup>+</sup> T cells in vivo by IL-15. *Immunity* 8, 591-599.
- Zinkernagel, R. M., and Doherty, P. C. (1974). Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248, 701-702.



## 9 LEBENS LAUF

### Persönliche Daten

Name	Anton Gruber
Geburtstag	18. März 1977
Geburtsort	Schwarzach, Österreich
Nationalität	österreichisch
Wohnort	Barer Strasse 88, 80799 München

### Höhere Schulbildung und Studium

Juni 1996	Matura am Oberstufenrealgymnasium St. Johann im Pongau mit ausgezeichnetem Erfolg
Okt. 1997 – Juni 1998	Studium Soziologie sowie Publizistik und Kommunikationswissenschaften an der Universität Salzburg
Okt. 1998 – Dez. 2001	Studium der Biologie, Studienzweig Genetik, an der Universität Salzburg
Jan. 2002 – Juni 2002	Studium der Biologie an der Universität Kopenhagen Fach Molekulare Zellbiologie
Sept. 2002 – Juni 2003	Diplomarbeit an der Technischen Universität München, Institut für Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Betreuung durch Dr. Carsten Kirschning Titel: „Biochemical Analysis of Human MD2 Function in TLR4 mediated LPS signalling“
Okt. 2003	Diplomprüfung an der Universität Salzburg mit ausgezeichnetem Erfolg Hauptfach: Immunologie, Nebenfach: Proteinbiochemie
Dez. 2003 – April. 2007	Doktorarbeit an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Institut für Immunologie, Betreuung durch Prof. Dr. Thomas Brocker

### Veröffentlichungen

Gruber A., Cannarile M. A., Cheminay C., Ried C., Dornmair K., Marconi P. Hoffmann R. and Brocker T. Antigen-specific interactions between non-professional APC and CD8<sup>+</sup> T cells reduce CTL effector peak sizes and memory CD8<sup>+</sup> T cell pools. Manuskript submitted.

Lauterbach H., Gruber A., Ried C., Cheminay C., and Brocker T. (2006). Insufficient APC Capacities of Dendritic Cells in Gen Gun-Mediated DNA Vaccination. J Immunol, 176: 4600–4607.

Gruber A, Brocker T. MHC class I-positive dendritic cells (DC) control CD8 T cell homeostasis *in vivo* (2005). T cell lymphopenia as a prerequisite for DC-mediated homeostatic proliferation of naive CD8 T cells. *J Immunol.*; 175(1):201-6.

Gruber A, Mancek M., Wagner H., Kirschning C. J., Jerala R. (2004). Structural model of MD-2 and functional role of its basic amino acid clusters involved in cellular lipopolysaccharide recognition. *J Biol Chem.*;279(27):28475-82.

### **Kongressteilnahmen**

The midwinter conference of Immunologists, Asilomar, CA, USA, 2007. Antigenpresentation by non-dendritic cells dampens the immuneresponse by reducing the numbers of effector and memory CD8 T cells. Posterpräsentation

ENII-MUGEN Immunology summer school, Alghero, Italien, 2006. MHC class I-positive Dendritic Cells control CD8 T cell homeostasis and shape the repertoire of peripheral CD8 T cells *in vivo*. Vortrag

The midwinter conference of Immunologists, Asilomar, CA, USA, 2006. MHC class I-positive Dendritic Cells control CD8 T cell homeostasis and shape the repertoire of peripheral CD8 T cells *in vivo*. Posterpräsentation

Joint Annual Meeting of Immunology (DGfI and SSI), Kiel, Germany, 2005. MHC class I-positive dendritic cells control CD8 T cell homeostasis *in vivo*: T cell lymphopenia as a prerequisite for DC-mediated homeostatic proliferation of naive CD8 T cells. Vortrag

Keystone Symposia, Immune Tolerance, Keystone, CO, USA, 2005. MHC class I+ dendritic cells control homeostasis of naive CD8+ T cells: „access to dendritic cells“ dictates co-regulation of CD4 and CD8 T cell homeostasis. Posterpräsentation

8th International Symposium on Dendritic Cells, Brügge, Belgium, 2004. The role of dendritic cells in homeostatic proliferation of naive CD8+ T cells *in vivo*. Posterpräsentation

## **10 DANKSAGUNG**

Herrn Prof. Dr. Thomas Brocker danke ich für die gewährte forschersche Freiheit, seine Großzügigkeit und seine Wertschätzung während meiner Tätigkeit als Doktorand.

Meinen Kollegen danke ich herzlich für das fröhliche und freundschaftliche Arbeitsklima. Sehr dankbar bin ich für die enorme Flexibilität und Hilfsbereitschaft von Frau Andrea Bol. Besonders bedanke ich mich bei Frau Christine Ried, deren Engagement und verlässliche wie genaue Arbeit den Abschluss der Doktorarbeit wesentlich erleichtert haben.

Mein aufrichtiger Dank gilt meiner Freundin Angelika Kraxner und meiner Familie, die mich auf meinem Weg begleiten und mich stets unterstützen.