

Aus dem Institut für Immunologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig
und
der Dermatologischen Klinik
der Friedrich-Alexander Universität Erlangen

**Charakterisierung von Subpopulationen Dendritischer Zellen
und der Expression von C-Typ-Lektinrezeptoren in humanen
Geweben mittels Immunfluoreszenzmikroskopie**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Nathalie Eissing, geb. Bleny
aus Stuttgart

Leipzig, 2011

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Uwe Truyen

Betreuer: Prof. Dr. Gottfried Alber

Prof. Dr. Diana Dudziak

Gutachter: Prof. Dr. Gottfried Alber, Institut für Immunologie,
Veterinärmedizinische Fakultät Leipzig

Prof. Dr. Diana Dudziak, Dermatologische Klinik,
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Prof. Dr. Manfred Lutz, Institut für Virologie,
Universität Würzburg

Tag der Verteidigung: 6.9.2011

Teile dieser Arbeit werden wie folgt veröffentlicht:

Heidkamp GF, Heger L, Schmitt V, **Eissing N**, Neubert K, Bozzacco F, Trumpfheller C, Zebroski H, Nussenzweig MC, Nimmerjahn F, Dudziak D. Antigen targeting to human C-type lectin DCIR elicits CD4⁺ T cell responses *in vitro*.

Manuskript in Vorbereitung

Heidkamp GF, **Eissing N**, Baranska A, Schuler G, Cesnjevar R, Purbojo A, Hartmann A, Iro H., Ullrich E, Nimmerjahn F, Dudziak D. Characterization of human DC subpopulations in human primary and secondary lymphoid organs

Manuskript in Vorbereitung

Heidkamp GF, **Eissing N**, Cesnjevar R, Purbojo A, Ullrich E, Nimmerjahn F, Dudziak D. Missing DC subpopulations in Trisomie 21 patients

Manuskript in Vorbereitung

Heidkamp GF*, **Eissing N***, Cesnjevar R, Purbojo A, Ullrich E, Nimmerjahn F, Dudziak D. CD1c/BDCA1 characterizes thymic double positive T cells.

*These authors contributed equally.

Manuskript in Vorbereitung

Für Elfriede und Robert Bleny

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	1
2	Literaturübersicht.....	2
2.1	Anatomie und Immunologie humanen Gewebes	2
2.1.1	Milz.....	2
2.1.2	Thymus	4
2.1.3	Tonsillen.....	5
2.2	Dendritische Zellen	6
2.2.1	Antigenaufnahme, Reifung und Morphologie	6
2.2.2	Antigenprozessierung und –präsentation	7
2.2.3	Funktionen Dendritischer Zellen.....	10
2.2.4	DC-Subpopulationen in der Maus	12
2.2.5	DC-Subpopulationen im Menschen.....	13
2.3	C-Typ-Lektinrezeptoren	16
2.4	Antigenbeladung mittels rekombinanter Antikörper.....	18
3	Material und Methoden.....	21
3.1	Material	21
3.1.1	Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	21
3.1.2	Standardlösungen, Puffer und Medien.....	21
3.1.3	Antikörper gegen humane Antigene.....	22
3.1.4	Oligonukleotide zur Klonierung und Sequenzierung	24
3.1.5	Molekulare Größenmarker	26
3.1.6	Software	26
3.1.7	Verwendete Gewebe in der Immunfluoreszenz.....	27
3.1.8	Zelllinien	27
3.1.9	Verwendete Kits	27
3.1.10	Enzyme	28
3.1.11	Plasmide	28
3.2	Methoden.....	29
3.2.1.	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	29
3.2.2	Annealing und Phosphorylierung der Oligonukleotide.....	29
3.2.3	Agarose-Gelelektrophorese der DNA.....	30
3.2.4	Reinigung der DNA	30

3.2.5	Verdau der DNA mit Restriktionsenzymen.....	31
3.2.6	Konzentrationsbestimmung der DNA.....	31
3.2.7	Ligation der DNA.....	31
3.2.8	Herstellung kompetenter Bakterien.....	33
3.2.9	Transformation in kompetente Bakterien.....	33
3.2.10	Minipräparation.....	34
3.2.11	Maxipräparation.....	35
3.2.12	Sequenzierung der DNA.....	35
3.2.13	Transfektion durch Calcium-Phosphat-Präzipitation.....	36
3.2.14	Ammoniumsulfatfällung und Dialyse von Proteinen.....	37
3.2.15	Reinigung der Proteine mit Ni-NTA Beads.....	37
3.2.16	Reinigung der Antikörper (TROMA1) mit Protein-G Beads..	38
3.2.17	Coomassie-Gel.....	39
3.2.18	Konzentration von Protein durch Zentrifugation.....	40
3.2.19	Konzentrationsbestimmung nach Bradford.....	40
3.2.20	LPS-Removal und LPS-Test.....	41
3.2.21	Mykoplasmentest.....	41
3.2.22	Kultivierung der Zelllinien.....	42
3.2.23	Berechnung der Zellzahl.....	43
3.2.24	Kryokonservierung und Auftauen der Zellen.....	44
3.2.25	Immunfluoreszenzmikroskopie.....	44
4	Ergebnisse.....	46
4.1	Etablierung der Immunfluoreszenzmikroskopie an humanen Geweben.....	46
4.1.1	Humane Milz.....	48
4.1.1.1	Strukturgebende Färbungen.....	48
4.1.1.2	DC-Subpopulationen.....	49
4.1.1.3	Isotypkontrolle der BDCA-Antikörper in der Milz.....	51
4.1.1.4	C-Typ-Lektinrezeptor-Färbungen.....	52
4.1.2	Humaner Thymus.....	55
4.1.2.1	Strukturgebende Färbungen.....	55
4.1.2.2	DC-Subpopulationen.....	57
4.1.2.3	Isotypkontrolle der BDCA-Antikörper im Thymus.....	59
4.1.2.4	C-Typ-Lektinrezeptoren.....	60

4.1.3	Humane Tonsillen	63
4.2	Produktion löslicher C-Typ-Lektinrezeptor-Proteine.....	66
4.2.1	Eliminierung einer Xba-I Restriktionsschnittstelle im Vektor pcDNA3.1	67
4.2.2	C-Typ-Lektinrezeptor-DNA.....	68
4.2.3	Transfektion von HEK293T-Zellen und Proteinelution	70
5	Diskussion	73
6	Zusammenfassung	85
7	Summary	87
8	Literaturverzeichnis	89
9	Anhang	107

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AEP	Asparaginy Endopeptidase, Legumain
α	anti
Amp	Ampicillin
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
A488	Alexa 488 Fluorophor (Farbstoff, absorbiert 495nm und emittiert 519nm)
A647	Alexa 647 Fluorophor (Farbstoff, absorbiert 650nm und emittiert 665nm)
BDCA	“blood derived dendritic cell antigen” (Antigene Dendritischer Zellen abgeleitet aus dem Blut)
Bio	Biotin
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
ca.	circa
CD	“cluster of differentiation” (Unterscheidungsgruppen)
cDNA	“complementary DNA” (komplementäre DNA)
CLIP	“class II li peptide“ (an MHC-II Moleküle gebundene degradierte invariante Kette)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRD	“carbohydrate recognition domain“ (Kohlenhydrat-Erkennungsdomäne)
CTL	zytotoxische T-Zelle
Cy3	Indocarboyanin (Farbstoff, absorbiert 550nm und emittiert 570nm)
DC	Dendritische Zelle
DDC	Dermale Dendritische Zelle
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser
DMEM	“Dulbecco's Modified Eagle's Medium” (Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium)
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	“Deoxyribonucleic acid“ (Desoxyribonukleinsäure)
Dy549	Farbstoff, absorbiert 558nm und emittiert 572nm
Dy649	Farbstoff, absorbiert 653nm und emittiert 674nm
EB-Puffer	Elutionspuffer
ELISA	“enzyme-linked-immunosorbent-assay“ (enzymgekoppelter Immunabsorptionstest)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAAP	“endoplasmic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing“ (mit der Antigenprozessierung assoziierte Aminopeptidase des Endoplasmatischen Retikulums)
FACS	“fluorescence-activated cell sorting“ (Durchflusszytometrie)
FCS	Fetales Kälberserum
FDC	Follikuläre Dendritische Zelle
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
g	Gramm
GILT	“Gamma-interferon-inducible lysosomal thiolreductase“ (durch Interferon- γ induzierbare lysosomale Thiolreduktase)
h	human
HEL	“hen egg lysozyme“ (Hühnereiweiß-Lysozym)
HF	“High Fidelity“ (hohe Genauigkeit)
HS	“Hot Start“ (heißer Start)
IL	Interleukin
ISF-Medium	serumfreies Medium für Hybridomazellkultur
IVIg	Intravenöses Immunglobulin
κ	Kappa
kDa	Kilo-Dalton
Konz.	Konzentration
l	Liter
LAL	“Limulus ameocyte lysate“ (Limulus-Amöbozyten-Lysat)
LB-Medium	“lysogeny broth“-Medium

LC	Langerhans Zelle
li	invariante Kette des MHC-II-Moleküls
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mol = mol/l
m	murin
mDC	myeloide Dendritische Zelle
MDP	“Macrophage and DC precursor“ Zelle (Vorläuferzelle Dendritischer Zellen und Makrophagen)
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MHC	“major histocompatibility complex“ (Haupthistokompatibilitätskomplex-Proteine)
min	Minute(n)
mM	Millimolar
µm	Mikrometer
ml	Milliliter
MoDCs	aus Monozyten gereifte DCs
mTEC	medulläre Thymusepithelzellen
NEA	nicht essentielle Aminosäuren
Ni-NTA	Nickel-Nitril-Tri-Azetat
NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
OD	Optische Dichte
OVA	Ovalbumin
p.a.	“pro analysis“
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	“Pathogen associated molecular patterns“ (Pathogen-assoziierte molekulare Muster)
PCR	Polymerasekettenreaktion
pDCs	plasmazytoide Dendritische Zelle
PE	Phycoerythrin
Pen	Penicillin
pH	“potentia Hydrogenii“ (negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration)
pMHC	Peptid-MHC-Komplex
PNK	Polynukleotidkinase

PRR	“Pattern Recognition Rezeptor“ (Mustererkennungsrezeptor)
rpm	“rounds per minute“ (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Zellkulturmedium benannt nach “Roswell Park Memorial Institut”
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SA	Streptavidin
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde(n)
s.f.	sterilfiltriert
TAE-Puffer	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
TAP	“transporter associated with antigen processing” (Antigenpeptid-Transporter)
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF- β	“transforming growth factor”- β (Transformierender Wachstumsfaktor- β)
T _H 1	T-Helfer 1
T _H 2	T-Helfer 2
T _H 9	T-Helfer 9
T _H 17	T-Helfer 17
TLR	Toll-like Rezeptor
T _m	Schmelztemperatur
TNF α	Tumor Nekrosefaktor α
Treg	Regulatorische T-Zelle
TSLP	“thymic stromal lymphopoetin“ (thymisches stromales Lymphopoietin)
U	Unit (Enzymeinheit)
UV	Ultraviolett
v/v	Volume to volume
w/v	Weight to volume
°C	Grad Celsius

1 Einleitung und Zielsetzung

Die Dendritische Zelle (DC) ist die am effektivsten arbeitende Antigen-präsentierende Zelle (APC) des Immunsystems. Sie stellt eine Verbindung vom angeborenen zum erworbenen Immunsystem dar, da sie als Teil des angeborenen Immunsystems T-Zellen des erworbenen Immunsystems aktivieren kann. Neben der Ausprägung einer spezifischen Immunantwort sind DCs für die Entwicklung und Aufrechterhaltung von zentraler und peripherer Toleranz essentiell.

Als mitunter wichtigste Dirigenten der Immunantwort stellen DCs wesentliche Ansatzpunkte zur Manipulation des Immunsystems dar. Wünschenswert wäre es einerseits, Toleranz zu induzieren, um Autoimmunität bzw. Transplantatabstoßungen zu verhindern, und andererseits, Toleranz zu brechen, um tumorreduzierende, unterdrückte Immunantworten wieder aktivieren zu können. Des Weiteren wäre im Sinne einer effizienten Vakzinierung, die Induktion einer CD4⁺ T-Zell- und humoralen Immunantwort erstrebenswert. Im Mausmodell wurde bereits gezeigt, dass die *in vivo* Antigenbeladung definierter DC-Subpopulationen über bestimmte Oberflächenrezeptoren zu differenzierten T-Zellantworten führen kann (DUDZIAK et al. 2007). Für eine potentielle Antigenbeladung humaner DCs stehen derzeit jedoch nur ungenügend Informationen über einzelne DC-Subpopulationen und deren Expression endozytotischer Rezeptoren zur Verfügung. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Verteilung der DC-Subpopulationen in humanen Geweben (Milz, Thymus und Tonsillen) mittels Immunfluoreszenz zu untersuchen. Auch die Expression der C-Typ-Lektinrezeptoren, welche effiziente Endozytosemarker sind, sollte untersucht werden. Des Weiteren wurden C-Typ-Lektinrezeptoren, von denen es keine kommerziell verfügbaren Antikörper bzw. Hybridomzellen gibt, in einen Vektor kloniert, und lösliche Varianten der C-Typ-Lektinrezeptor-Proteine nach Transfektion in eukaryotischen Zellen gewonnen. Spezifisch exprimierte Oberflächenrezeptoren könnten in Zukunft zur Antigenbeladung humaner DC-Subpopulationen verwendet werden, um damit eine spezifische Immunantwort hervorzurufen.

Die *in vivo* Antigenbeladung von DC-Subpopulationen stellt zukunftsweisend eine neue Therapiemöglichkeit, insbesondere bei der Behandlung von Tumoren, dar.

2 Literaturübersicht

2.1 Anatomie und Immunologie humanen Gewebes

2.1.1 Milz

Die Milz ist das größte Blutfilterorgan des Körpers und dient ebenfalls als Blutspeicherorgan (STEINIGER et al. 2000, MEBIUS und KRAAL 2005). Sie ist umgeben von einer Bindegewebskapsel, welche sich in feine Trabekel aufteilt und das Gewebe stützt. Weiterhin verfügt die Milz über ein großes Gefäßgeflecht. Eine afferente Arterie teilt sich auf in kleinere Arteriolen. Diese durchlaufen das Gewebe und sammeln sich in großen venösen Sinusoiden (Abb. 1A). Die Arteriolen werden ummantelt von B-Zellfollikeln und einer T-Zellzone, welche zusammen die weiße Pulpa, den lymphatischen Anteil des Organs, formen. Die rote Pulpa ist nach den großen sinusoidalen Strukturen benannt und wird von der weißen Pulpa durch eine sogenannte Marginalzone getrennt. In der roten Pulpa werden alte Erythrozyten von Makrophagen aus dem Blut gefiltert (MEBIUS und KRAAL 2005).

In der Feinstruktur der weißen Pulpa lassen sich Unterschiede vom murinen zum humanen System feststellen. Die murine Marginalzone umgibt die B-Zellfollikel sowie die dazwischen liegende T-Zellzone vollständig (Abb. 1B). Im humanen System hingegen liegt ein B-Zellfollikel im Zentrum und wird von der T-Zellzone und der Marginalzone vollständig umkreist (Abb. 1C). Die alles umgebende Zone wird hierbei perifollikuläre Zone genannt (MEBIUS und KRAAL 2005). Als Verbindungsstruktur zwischen roter und weißer Pulpa findet in der Marginalzone eine ständige Zellwanderung vom Blut in das Gewebe und anders herum statt (MEBIUS und KRAAL 2005).

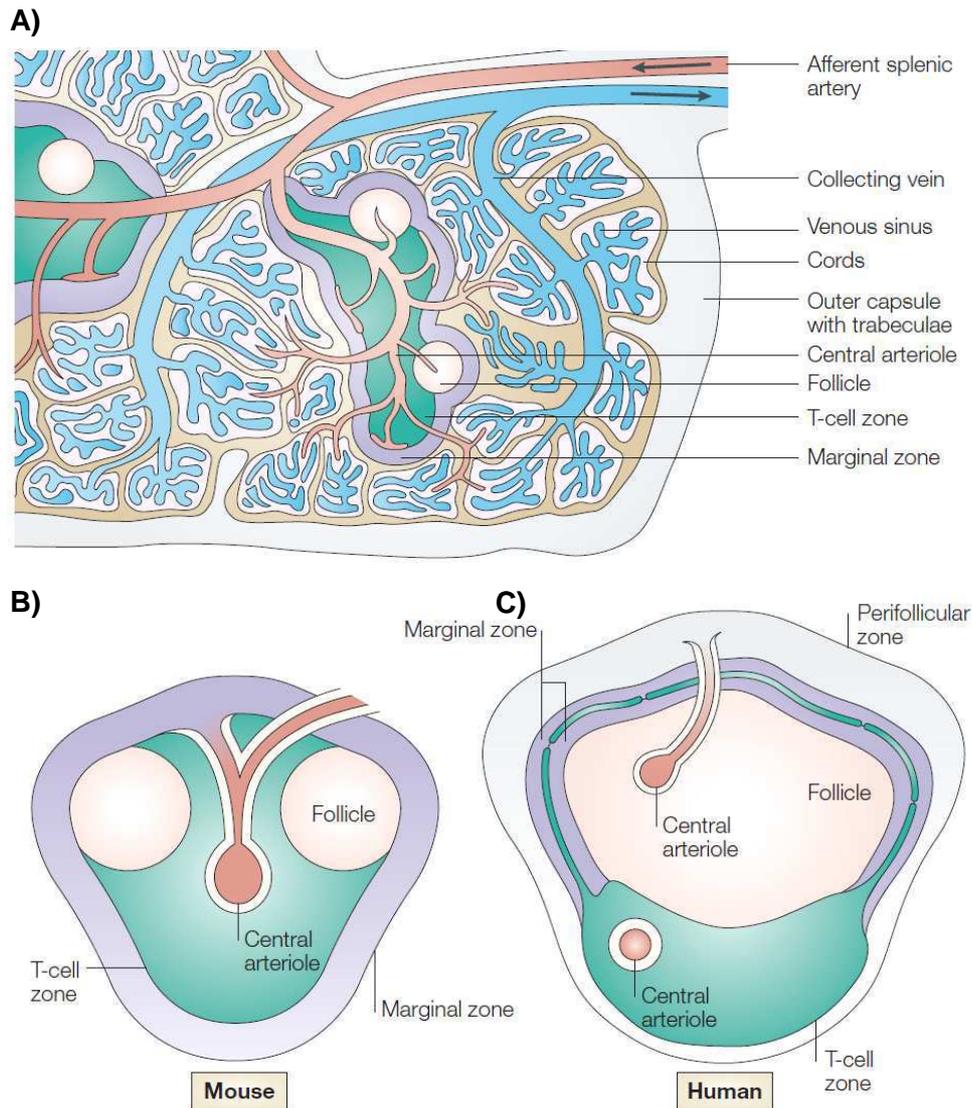


Abb. 1 Anatomie der Milz und Feinstruktur der weißen Pulpa

A) Eine afferente Arterie teilt sich in feinere Arteriolen auf und wird dabei von der weißen Pulpa (B-Zellfollikel und T-Zellzone) umgeben. Die Marginalzone trennt weiße von roter Pulpa. Nach der Aufteilung in Arteriolen münden diese in ein sinusoidales Venensystem, welches die rote Pulpa beschreibt. Die Milz wird außen von einer Bindegewebskapsel umgeben, die sich in Trabekel aufteilt. Dargestellt sind die Feinstrukturen von B) muriner und C) humaner weißer Pulpa. B) Im murinen System trennt die T-Zellzone die B-Zellfollikel, wobei die Arteriole zentral in dieser T-Zellzone liegt. C) In der humanen Milz ist die T-Zellzone sichelförmig um die B-Zellfollikel gelegt und umkreist diesen vollständig. Eine Arteriole liegt in der T-Zellzone, die andere befindet sich im B-Zellfollikel. Die Zone, die all diese Strukturen umgibt, wird perifollikuläre Zone genannt (MEBIUS und KRAAL 2005).

2.1.2 Thymus

Der Thymus ist für die Selektion der T-Zellen verantwortlich und bildet sich als lymphatisches Organ zu Beginn der Geschlechtsreife zurück (WELSCH 2004). Er kann durch Bindegewebssepten strukturell in Kortex und Medulla unterteilt werden, wobei sich in der Medulla die für den Thymus typischen Hassall-Körperchen befinden (HASSALL 1849, JANEWAY et al. 2001). T-Lymphozyten wandern als Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in die Thymusrinde ein. Neben kortikalen Thymusepithelzellen befinden sich im Kortex vor allem unreife T-Zellen (Abb. 2). Bei der Wanderung Richtung Medulla werden diese einer Positiv- und Negativselektion unterzogen und zum größten Teil eliminiert (VON BOEHMER 2009, GALLEGOS und BEVAN 2006). Diese verbleibenden T-Zellen sind tolerant gegenüber Selbstantigenen und erkennen fremde Antigene. Über die Medulla und angrenzende Blutgefäße wandern die positiv selektionierten T-Zellen in der Peripherie in sekundäre lymphatische Organe ein (JANEWAY et al. 2001).

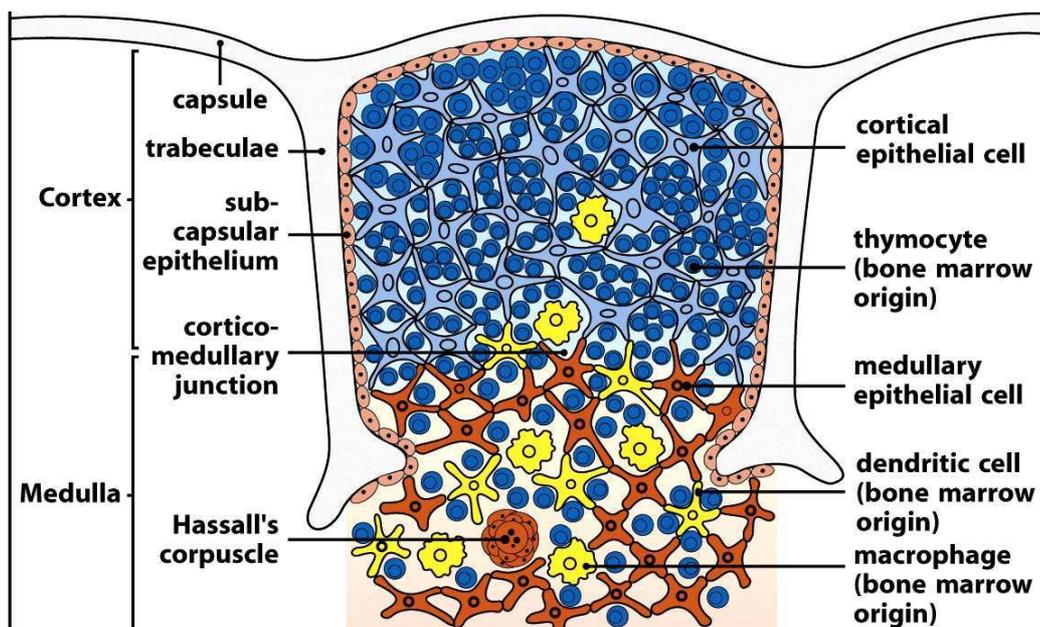


Abb. 2 Zelluläre Organisation des Thymus

Der Thymus kann unterteilt werden in eine kortikale (äußere) und medulläre (innere) Zone, wobei die Übergangszone als kortikomedulläre Verbindung bezeichnet wird. Von einer Bindegewebskapsel ausgehend wird das Gewebe mit Trabekeln durchsetzt, und diese mit einem subkapsulärem Epithel ausgekleidet. Der Kortex besteht vorwiegend aus unreifen, aus dem Knochenmark eingewanderten Thymozyten, kortikalen Epithelzellen und vereinzelt Makrophagen. In der Medulla sind um das Hassall-Körperchen vor allem aus dem Knochenmark stammende Makrophagen, DCs sowie medulläre Thymusepithelzellen lokalisiert. Modifiziert nach JANEWAY et al. (2001).

In der Medulla sind neben Hassall-Körperchen und reifen Thymozyten, Makrophagen, DCs sowie medulläre Thymusepithelzellen (mTECs) lokalisiert. Aufgrund der Anwesenheit von Zelltrümmern und kondensiertem Material (Keratin, Präkeratin) im Inneren der Hassall-Körperchen vermutet man einen Zusammenhang mit dem Abbau gealterter bzw. apoptotischer Zellen (HASSALL 1849, VON GAUDECKER und SCHMALE 1974, WATANABE et al. 2005). Die Produktion mehrerer Zytokine (IL-7, TGF- α , *stromal cell derived factor* SDF-1 sowie TSLP) durch mTECs, welche die Hassall-Körperchen auskleiden, wurde beschrieben (ZAITSEVA et al. 2002, HE et al. 1995, LE et al. 1991).

2.1.3 Tonsillen

Tonsillen stellen lymphatische Organe des Mundhöhlen- und Rachenbereiches dar und werden durch die Einfaltung des Oberflächenepithels von Krypten durchzogen. Entlang dieser Krypten befinden sich B-Zellfollikel und eine parafollikuläre T-Zellzone. Tonsillen werden von einer Bindegewebskapsel umspannt, welche teilweise zusammen mit den Krypten in die Tiefe zieht (Abb. 3).

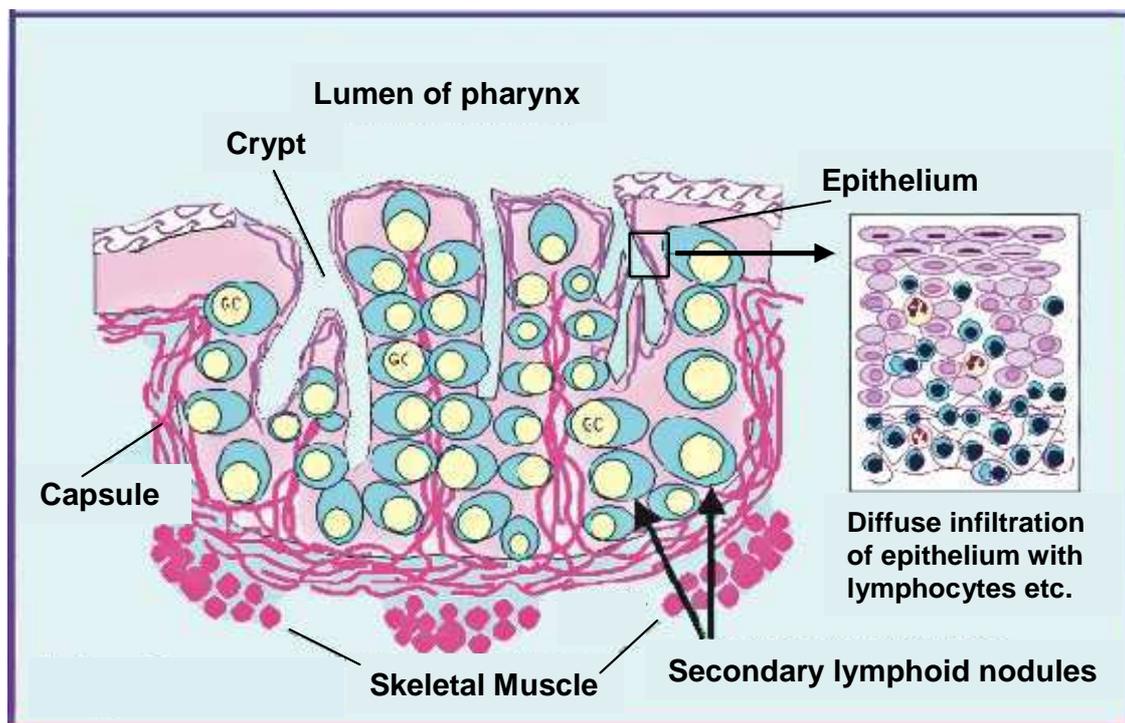


Abb. 3 Aufbau der Tonsillen

Tonsillen sind umgeben von einer Bindegewebskapsel, welche von Skelettmuskeln umrahmt wird. Die ins Lumen des Rachens ragende Oberfläche der Tonsillen ist von Krypten durchzogen. Unterhalb des mit infiltrativen Zellen durchzogenen Epithels ordnen sich B-Zellfollikel nebeneinander an und sind von einer parafollikulären T-Zellzone umgeben. B-Zellfollikel lassen sich je nach Reifungsstadium in primäre und sekundäre B-Zellfollikel unterteilen. Modifiziert nach SZAKAL (2003).

Die B-Zellfollikel lassen sich histologisch je nach Reifungsstadium in Primärfollikel und Sekundärfollikel unterteilen. Erstere sind gekennzeichnet durch die Anwesenheit von Lymphozyten, welche keinen Antigen-Kontakt hatten. Sekundärfollikel hingegen beinhalten ein helles Keimzentrum mit Lymphoblasten, DCs und Makrophagen, sowie einer hellen Kappe (Corona) von B-Gedächtniszellen (WELSCH 2004, BENNINGHOFF und DRENCKHAHN 2002).

2.2 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DCs) wurden erstmals von Paul Langerhans 1868 in der humanen Haut entdeckt. Jedoch wurde ihre tatsächliche Funktion erst 100 Jahre später durch Ralph Steinmann beschrieben (STEINMAN et al. 1974). DCs können in lymphoiden und nicht-lymphoiden Geweben sowie dem Blut gefunden werden. Die zum angeborenen Immunsystem zählenden DCs stellen die am effektivsten arbeitenden Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) dar und aktivieren andere Zellen des Immunsystems, hauptsächlich jedoch die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (BANCHEREAU und STEINMAN 1998). Sie bilden dadurch eine Verbindung vom angeborenen zum adaptiven Immunsystem.

2.2.1 Antigenaufnahme, Reifung und Morphologie

DCs reifen im Knochenmark aus hämatopoetischen CD34⁺ Stammzellen über die Zwischenstufe einer *Macrophage and DC precursor* Zelle (MDP) heran. Anschließend wandern die Vorläuferzellen in die peripheren Organe ein (ARDAVIN et al. 2001, LIU et al. 2009). Im Gewebe fungieren sogenannte unreife DCs als eine der ersten Barrieren des Immunsystems, indem sie Partikel über lange Zytoplasmafortsätze aus ihrer Umgebung zu sich heranziehen. Die Partikel werden je nach Größe und Beschaffenheit passiv über Makropinozytose oder aktiv über Phagozytose bzw. rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen (INABA et al. 1998, MELLMAN und STEINMAN 2001). Dabei können die Partikel endogenen (apoptotische Partikel, Selbstprotein) oder exogenen (bakterielle oder virale Bestandteile) Ursprungs sein (BANCHEREAU und STEINMAN 1998, SHORTMAN und LIU 2002). Die rezeptorvermittelte Endozytose erfolgt über Fc-Rezeptoren oder Mustererkennungsrezeptoren (*Pattern recognition receptors*, PRRs) wie C-Typ-Lektinrezeptoren (MEDZHITOV und JANEWAY 2000, AMIGORENA et al. 1992, FIDGOR et al. 2002, TAKEUCHI und AKIRA 2010). Toll-like Rezeptoren (*toll like receptors*, TLRs) stellen ebenfalls eine wichtige Rezeptorfamilie im Zusammenhang mit der Aktivierung von DCs dar (MEDZHITOV und JANEWAY 2000). Die Antigenaufnahme bzw. Erkennung von

mikrobiellen oder viralen Bestandteilen wie doppelsträngiger Ribonukleinsäure (RNA), Lipopolysacchariden (LPS), Flagellin, Lipoproteinen und DNA mit CpG-Motiven, führt zu einer Reifung der DC. Damit verbunden sind morphologische Veränderungen der DCs mit gleichzeitig stattfindender Wanderung aus den peripheren in die sekundären lymphatischen Organe (STEINMAN et al. 2000). Während dieser Prozesse, werden die auf unreifen DCs nur marginal exprimierten Oberflächenmarker und kostimulatorischen Moleküle wie CD40, CD80 und CD86 sowie Haupthistokompatibilitätskomplex-Proteine I und II (*major histocompatibility complex*, MHC) auf reifenden DCs hochreguliert. Gleichzeitig werden Rezeptoren zur Antigenaufnahme supprimiert und Zytokine (z.B.: IL-10, IL-12, IL-18, TNF α) sowie Chemokine (z.B.: IL-8, MIP- β und SLC) ausgeschüttet (BANCHEREAU et al. 2000, REIS E SOUSA et al. 1997). Reife DCs sind nun in der Lage, T-Zellen zu stimulieren und eine Antwort des adaptiven Immunsystems zu initiieren (BANCHEREAU und STEINMAN 1998).

2.2.2 Antigenprozessierung und -präsentation

Nach der Antigenaufnahme und während der Wanderung der DCs aus den peripheren in die sekundären lymphatischen Organe wird aufgenommenes Antigen prozessiert und Peptidfragmente auf der Zelloberfläche als Peptid-MHC-Komplex (pMHC) präsentiert (SCHMID et al. 1997, SWANSON und WATTS 1995). Die MHC-Proteine lassen sich in zwei Klassen einteilen: MHC-I und MHC-II. MHC-I Moleküle werden von allen kernhaltigen Zellen exprimiert und können im Proteasom prozessierte, endogene Pathogene, d.h. sowohl intrazelluläre virale, als auch im Zytosol vorhandene Proteine über den pMHC-I-Komplex präsentieren. Über den ATP-abhängigen TAP 1/2 (*transporter associated with antigen processing*) Antigenpeptid-Transporter gelangen diese weiter ins Endoplasmatische Retikulum (ER). Dort werden sie durch spezifische Peptidasen (*endoplasmic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing*, ERAAP) verkürzt und als acht bis zehn Aminosäure-große Fragmente auf das MHC-I-Molekül, welches vom Chaperon Calnexin dissoziiert und durch β 2-Mikroglobulin stabilisiert wird, geladen (CRESSWELL et al. 2005). Weiterhin erfolgt der Transport über das Golgi-Netzwerk an die Oberfläche der Zellen, wo der pMHC-I-Komplex an die CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen (CTLs) präsentiert werden kann (RAMMENSEE et al 1993, ZINKERNAGEL und DOHERTY 1979, VILLADANGOS et al. 2007). Letztere eliminieren daraufhin Zellen, welche als Pathogen-infiziert erkannt werden.

Neben der Präsentation endogener Peptide nehmen DCs auch exogene Partikel über rezeptorvermittelte Endozytose, Phagozytose oder Makropinozytose auf, die sie ebenfalls über den MHC-I Weg an CTLs präsentieren (BEVAN 1976). Dieser alternative Weg wird

„*cross-presentation*“ (Kreuzpräsentation) genannt und wurde für Antigene vitaler und apoptotischer Zellen, für Immunkomplexe und lösliche Antigene bereits nachgewiesen (HARSHYNE et al. 2001, DUDZIAK et al. 2007, CRESSWELL et al. 2005, HEATH et al. 2004, ACKERMAN et al. 2005, ALBERT et al. 1998). Hierbei scheint es zwei unterschiedliche Wege zu geben: einen TAP-abhängigen sowie einen TAP-unabhängigen Weg. Die TAP-abhängige Variante beruht auf einem Phagosom-Zytosol-Transfer, wobei Antigen ins Phagosom aufgenommen und ins Zytosol transferiert wird. Dort wird es von Proteasomen hydrolysiert, über den TAP-Transporter in das ER transportiert und auf MHC-I Moleküle geladen (HEATH et al. 2004, ROCK und SHEN 2005). Der TAP-unabhängige Mechanismus beruht auf der Internalisierung der Antigene in Phagosomen und der Degradierung durch endosomale Proteasen wie Cathepsin S. Die entstandenen Oligopeptide werden direkt in ER-Phagosomen an MHC-I Moleküle gebunden und an die Zelloberfläche transportiert (BANCHEREAU et al. 2000, ROCK und SHEN 2005, MELLMAN und CRESSWELL 2010, HEGDE und PLOEGH 2010). Die Kreuzpräsentation ist essentiell zur Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz gegenüber körpereigenen Proteinen und kann zur Aktivierung der CTLs gegen virusinfizierte und neoplastische Zellen führen (KURTS et al. 1996, DEN HAAN et al. 2000).

Aktivierte B-Zellen, DCs, Makrophagen und medulläre Thymusepithelzellen (mTEC) exprimieren außerdem MHC-II Moleküle auf ihrer Oberfläche (KOBLE und KYEWSKI 2009, MELLMAN 1990, VILLADANGOS et al. 2000). MHC-II positive APCs nehmen Fremdprotein, vor allem bakterielle Bestandteile, in frühe und späte Endosomen über Phagozytose bzw. rezeptorvermittelte Endozytose auf. Thiolgruppen der aufgenommenen Proteine werden in Lysosomen durch die Thiolreduktase GILT (*Gamma-interferon-inducible lysosomal thiolreductase*) gespalten (BARJAKTAREVIC et al. 2006). Proteolytierte Antigene werden zu MHC-Klasse-II-Kompartimenten, welche viele MHC-II Moleküle beinhalten, im ER transportiert (SALLUSTO und LANZAVECCHIA 1994, KLEIJMEER et al. 1995, MELLMAN und STEINMAN 2001). Diese MHC-II Moleküle werden durch ihre invariante Kette (Ii) blockiert. Wird Ii durch Cathepsine wie Cystein-Proteasen oder die Asparagyl Endopeptidase (AEP, Legumain) degradiert, kann das daraus entstandene, an MHC-II Moleküle gebundene, *class II Ii peptide* (CLIP) durch Antigene ersetzt werden (KLEIJMEER et al. 1995). Das Chaperon H2-DM tauscht CLIP gegen das 10-30 Aminosäuren-große, prozessierte antigene Peptid aus. Abschließend wird das Antigen-beladene MHC-II Molekül über Endosomen an die Zelloberfläche gebracht und als pMHC-II-Komplex präsentiert (TOWNSEND und BODMER 1989, DELAMARRE et al. 2005). CD4⁺ T-Helfer Zellen werden nach dem Erkennen der Immunkomplexe stimuliert, differenzieren zu T_H1 und T_H2 T-Zellen und leiten eine koordinierte Immunantwort ein (O’GARRA und ARAI 2000, DUDZIAK et al. 2007, SOARES et al. 2007).

Neben der klassischen endozytotischen Aufnahme extrazellulär lokalisierter Pathogene sind APCs befähigt intrazelluläre Pathogene via MHC-II zu präsentieren. Dieser zweite alternative Antigenpräsentierungsweg wird durch Autophagie vermittelt. Hierbei gibt es drei verschiedene Aufnahmewege in Lysosomen: Makroautophagie, Mikroautophagie und Chaperon-gesteuerte Autophagie (*chaperone-mediated autophagy, CMA*) (NIMMERJAHN et al. 2003, MÜNZ 2010).

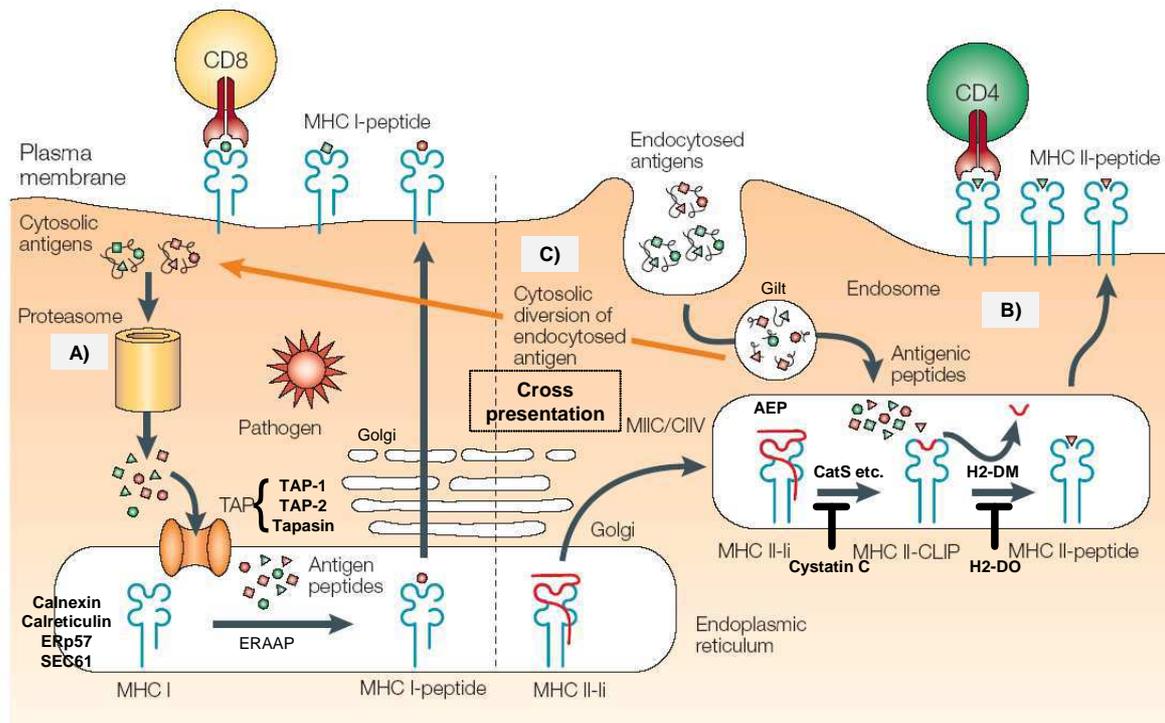


Abb. 4 Antigenpräsentation und -prozessierung in DCs

Antigene können in DCs auf verschiedenen Wegen prozessiert und via MHC-I oder II präsentiert werden. A) Zytosolisch lokalisierte Antigene werden durch das Proteasom degradiert und per TAP-Transporter in das Lumen des ER transferiert. Dort werden sie durch Proteasen (ERAAP) in kleinere 7-9 Aminosäure (AS)-große Fragmente aufgespalten und mit der Hilfe von Calnexin, Calretikulin, ERp57 und Tapsin auf MHC-I Moleküle geladen. Über den Golgi-Apparat wird der MHC-Komplex an die Zelloberfläche gebracht und das Antigen via MHC-I an $CD8^+$ CTLs präsentiert. B) Extrazellulär lokalisierte Antigene werden von APCs mittels rezeptorvermittelter Endozytose, Makropinozytose oder Phagozytose aufgenommen und durch den MHC-II-Prozessierungsweg an $CD4^+$ T-Helferzellen präsentiert. Daneben können auch intrazelluläre Pathogene via Autophagie in Lysosomen aufgenommen werden. Nach Verschmelzung des Phagosoms mit dem Lysosom werden Pathogene durch das saure Milieu abgetötet und die Proteinstruktur durch lysosomale Enzyme aufgelöst. Thiol-Reduktasen (GILT) sorgen für die Entstehung Antigen-wirksamer Peptide. MHC-II-li Moleküle werden aus dem ER über den Golgi-Apparat in MHC-II reiche Kompartimente transportiert. Durch Cathepsin S und AEP (Legumain) kann die Blockade der invarianten Kette (li) aufgehoben und Antigen-wirksame Peptide auf das MHC-II Molekül geladen werden. Cystatin C reguliert diesen Prozess als Antagonist. H2-DM führt zum Austausch des li-Peptids auf dem MHC-II Moleküle mit dem Antigen, wobei H2-DO diesen Prozess inhibiert. Anschließend wird der Komplex an die Zelloberfläche transportiert und den $CD4^+$ T-Zellen präsentiert. C) Die Kreuzpräsentation stellt die endozytotische Aufnahme von Antigenen exogenen Ursprungs in DCs und die anschließende Präsentation via MHC-I an CTLs dar. Neueste Erkenntnisse gehen davon aus, dass dafür Teile des ER mit dem Phagosom verschmelzen. Durch Proteine des ER (Sec61) gelangen Peptidfragmente aus dem ER in das Zytosol und können in die Prozessierung über den MHC-I-Weg geschleust werden. Modifiziert nach HEATH und CARBONE (2001) und freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Prof. Dudziak.

2.2.3 Funktionen Dendritischer Zellen

DCs besitzen zwei wesentliche Funktionen: einerseits vermitteln sie spezifische Immunantworten, andererseits halten sie die periphere und zentrale Toleranz aufrecht (BANCHEREAU und STEINMAN 1998, LIU und NUSSENZWEIG 2010, STEINMAN et al. 2003). Im Thymus stellt die Entwicklung der T-Zellen einen komplizierten Prozess dar, der in Abhängigkeit der Interaktion von Thymozyten, Thymusepithelzellen und DCs stattfindet (VON BOEHMER 2009). Zur Erzeugung zentraler Toleranz nehmen DCs im Thymus gewebespezifische Antigene auf, präsentieren diese an T-Zellen und eliminieren auto-reaktive Thymozyten (GALLEGOS und BEVAN 2006). Der Prozess der Negativselektion führt somit zur Toleranz gegen Selbstantigene. T-Zellen, die einen niedrig affinen T-Zell-Rezeptor (TCR) exprimieren, oder die spezifisch sind für Antigene, welche nicht im Thymus präsentiert werden, können der Negativselektion entkommen (BOUNEAUD et al. 2000, ANDERTON et al. 2001, YIN et al. 2011). Somit ist es nötig, auch in der Peripherie eine Toleranz aufzubauen, um Autoimmunprozessen im adaptiven Immunsystem entgegenzuwirken. Hierfür stehen verschiedene Mechanismen zur Verfügung. Neben der Aufnahme mikrobieller Bestandteile sind unreife DCs auch in der Lage unter nicht-inflammatorischen Bedingungen („steady state“) abgestorbene körpereigene Zellen und Selbstproteine aus der Umgebung endozytotisch aufzunehmen und im MHC-Kontext zu präsentieren (STEINMAN und NUSSENZWEIG 2002, LUTZ und SCHULER 2002). Da die DCs bei der Aufnahme von Selbstantigenen nicht bzw. nur marginal zu reifen beginnen, erfolgt die Antigenpräsentation im Kontext einer geringen Anzahl kostimulatorischer Moleküle (LUTZ und SCHULER 2002). T-Zellen, die der Negativselektion im Thymus entkommen sind und Antigen im nicht-inflammatorischen Kontext erkennen, werden entweder deletiert oder in Anergie getrieben (STEINMAN et al. 2003). Man nimmt an, dass dieser Prozess durch regulatorische T-Zellen (Tregs) beeinflusst wird (YAMAZAKI et al. 2007, STEINMAN und NUSSENZWEIG 2002, LUTZ und KURTS 2009, STEINMAN et al. 2003).

Neben der Induktion von Toleranz ist eine gerichtete Immunantwort essentiell zur Ausbildung eines funktionierenden Immunsystems. Im Gegensatz zu unreifen DCs sind reife DCs dann in der Lage T-Zellen zu stimulieren, wenn sie Antigene an der Zelloberfläche im MHC-Kontext zusammen mit kostimulatorischen Signalen präsentieren. Anschließend können sich die naiven T-Zellen, je nach Zytokinmilieu, in T_H1 , T_H2 , T_H9 oder T_H17 T-Zell Subpopulationen differenzieren (O’GARRA 1998, MOSER und MURPHY 2000, KALINSKI und MOSER 2005, YAMAZAKI et al. 2007, VELDHOEN et al. 2008, SALLUSTO und LANZAVECCHIA 2010). Durch die Anwesenheit reifer DCs und produziertem Interleukin-12 (IL-12) resultieren Interferon (IFN)- γ und Lymphotoxin-produzierende T_H1 T-Zellen. Diese führen zu einer zellvermittelten Immunantwort und bekämpfen vor allem

intrazelluläre Pathogene (virale, mikrobielle und tumorassoziierte) (MOSMANN et al. 1986, O'GARRA 1998, SALLUSTO und LANZAVECCHIA 2009). Im Kontext mit IL-4 entwickeln sich T-Zellen zu T_H2 T-Zellen, welche IL-4 und IL-5 sekretieren (BANCHEREAU und STEINMAN 1998). Diese leiten eine humorale Immunantwort ein, indem sie durch die Produktion von IL-4 und IL-5 zur Aktivierung von B-Zellen und somit einer gesteigerten Antikörperproduktion führen (BANCHEREAU und STEINMAN 1998, ZHU und PAUL 2010). Ebenso schützen T_H2 T-Zellen durch die Stimulierung eosinophiler Granulozyten vor Helminthen (YAMAZAKI et al. 2007). Eine Differenzierung in T_H17 T-Zellen erfolgt nach der Produktion von IL-1 β , IL-6 und IL-23 durch DCs und Makrophagen. T_H17 T-Zellen schützen durch die Produktion von IL-17 vor extrazellulären Infektionen (fungal und bakteriell) (KOLLS und LINDEN 2004, YAMAZAKI et al. 2007, SALLUSTO und LANZAVECCHIA 2010). Durch die Stimulation von T_H2 T-Zellen mit dem *transforming growth factor* (TGF)- β , können diese in T_H9 T-Zellen transformiert werden (VELDHOEN et al. 2008). Diese Subpopulation produziert große Mengen an IL-9, wirkt proinflammatorisch und trägt somit zur Entwicklung von Allergien bei (DARDALHON et al. 2008, XING et al. 2011). CD4⁺ T-Zellen können sich auch zu Tregs entwickeln, welche eine supprimierende Wirkung auf das Immunsystem haben (YAMAZAKI et al. 2007). DCs selbst können Zytokin- und Chemokinproduktion induzieren oder diese ausschütten (IL-12, Typ I und II Interferon). Somit werden mehr Zellen, z.B. B-, T-Zellen und Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen), an den Ort der Immunantwort rekrutiert (MELLMAN und STEINMAN 2001). Die reife DC exprimiert zehn-100mal mehr MHC-Komplexe bzw. MHC-Moleküle an der Zelloberfläche als andere APCs und ist dadurch befähigt, 100 bis 3.000 unterschiedliche Antigen-spezifische T-Zellen zu aktivieren (BANCHEREAU und STEINMAN 1998, INABA et al. 1997, BHARDWAJ et al. 1993, YEWDELL und LEV 2007).

Neben den professionellen APCs können auch nicht-professionelle APCs epithelialen oder parenchymalen Ursprungs, wie Keratinozyten oder Hepatozyten, durch eine Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen (IFN- γ oder TNF (Tumor Nekrosefaktor)- α) MHC-II exprimieren und als APCs fungieren (TAKAGI et al. 2006, AUBÖCK et al. 1986, NAGAFUCHI und SCHEUER 1986).

2.2.4 DC-Subpopulationen in der Maus

DCs stellen eine sehr heterogene Population dar und unterscheiden sich in vielen Eigenschaften wie exprimierte Oberflächenantigene, Ursprung und Funktion (SHORTMAN und LIU 2002, MERAD und MANZ 2009, ZABA et al. 2008, MEDZHITOV und JANEWAY 2000). Grundsätzlich können mindestens elf verschiedene Populationen aufgrund ihres Oberflächenphänotyps in den lymphoiden und nicht-lymphoiden Organen definiert werden.

In der murinen Milz kommen insgesamt drei Hauptpopulationen vor: $CD11c^+CD8^+$, $CD11c^+CD8^-$ und $CD11c^+B220^+$ DCs. Die hauptsächlich in der T-Zellzone lokalisierten sogenannten „lymphoiden“ DCs sind durch die Expression von CD8, CD11c und dem C-Typ-Lektinrezeptor DEC205 ($CD11c^+CD8^+DEC205^+$) charakterisiert. Man geht davon aus, dass $CD11c^+CD8^+$ DCs eine wichtige Rolle bei der Abwehr viraler Infektionen spielen, da sie die bislang einzigen beschriebenen Zellen sind, die Antigene effizient über Kreuzpräsentation (MHC-I) an $CD8^+$ T-Zellen bereitstellen können (DUDZIAK et al. 2007, BEVAN 1976, DEN HAAN et al. 2000). Diskutiert wird ebenfalls die Funktion eingewandelter, aus Monozyten gereifter DC-SIGN (*dendritic cell specific ICAM-3 grabbing non-integrin*)-positiver DCs, Antigene kreuzpräsentieren zu können (CHEONG et al. 2010). Die zweite sogenannte „myeloide“ Subpopulation ist positiv für CD11c und den C-Typ-Lektinrezeptor *dendritic cell inhibitory receptor 2* (DCIR2), jedoch negativ für CD8 ($CD11c^+CD8^-DCIR2^+$). Diese sind in der roten Pulpa bzw. in der sogenannten „Bridging Area“ (Marginalzone) lokalisiert (DUDZIAK et al. 2007, IDOYAGA et al. 2009). $CD11c^+CD8^-$ DCs sind effizienter in der Prozessierung und Präsentation von Antigenen über MHC-II (DUDZIAK et al. 2007, BEVAN 2006, SHORTMAN und HEATH 2010). Sie können anhand des Markers CD4 weiter in $CD11c^+CD8^-CD4^+$ und $CD11c^+CD8^-CD4^-$ Subpopulationen unterteilt werden (MARTIN et al. 2000, HOCHREIN et al. 2001, SHORTMAN und LIU 2002, VREMEC et al. 2000). Ursprünglich ging man davon aus, dass $CD11c^+CD8^+DEC205^+$ Zellen von lymphoiden und $CD11c^+CD8^-DCIR2^+$ Zellen von myeloiden Vorläuferzellen abstammen (WU et al. 1996, GUERRIERO et al. 2000). Durch aufwändige Transferexperimente wurde dies in letzter Zeit jedoch weitestgehend widerlegt. Im Allgemeinen geht man heute von einem myeloiden Ursprung der meisten DCs aus (LIU et al. 2009, MANZ et al. 2001). Die dritte Hauptpopulation stellen die plasmazytoiden DCs (pDCs) dar, welche CD11c, B220, PDCA-1, Siglec-H und GR-1 als Oberflächenmarker exprimieren (NAKANO et al. 2001, BLASIUS et al. 2006, BLASIUS et al. 2004). Sie kommen in allen lymphoiden Organen vor und scheinen unter anderem aufgrund ihrer Fähigkeit, regulatorische T-Zellen induzieren zu können, eine noch nicht ganz geklärte Rolle in der Aufrechterhaltung peripherer Toleranz zu spielen (MARTIN et

al. 2002, GEHRIE et al. 2011). Nach Kontakt mit mikrobiellen Proteinen produzieren pDCs große Mengen an Typ I IFN in Form von IFN- α und IFN- β (ASSELIN-PATUREL et al. 2001, SHORTMAN und LIU 2002, LIU 2005).

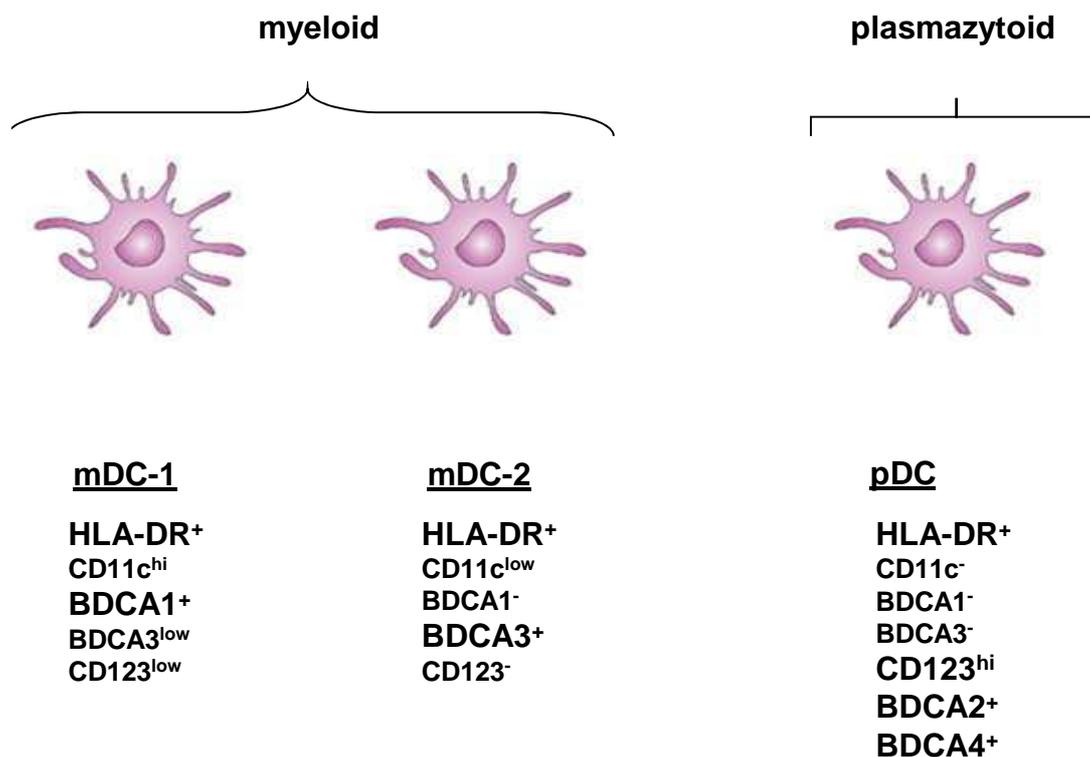
CD11c⁺CD8⁺ und CD11c⁺CD8⁻ DC können auch in anderen lymphoiden Organen wie Thymus, Milz, Peyer-Platten, Leber und Lymphknoten gefunden werden (VREMEC et al. 1992). Die DCs im Lymphknoten können in residente und migratorische DCs unterschieden werden. Residente DCs stammen von Blutvorläuferzellen ab und entsprechen den zwei Hauptpopulationen der murinen Milz. Die migrierenden DCs können anhand der Expression von CD11c^{int}CD8^{int} und MHC-II^{high} definiert werden. Migratorischen DCs ist es möglich, zu CD11c⁺CD8⁺ residenten DCs im Lymphknoten zu differenzieren. In Leber, Darm und Lunge können die als CD103⁺CD8⁺ definierten Zellen mit den CD11c⁺CD8⁺CD205⁺ Zellen der Milz gleichgesetzt werden (GINHOUX et al. 2009, EDELSON et al. 2010).

In der murinen Haut können mindestens fünf verschiedene CD11c⁺ DC-Populationen gefunden werden (KISSENPENNIG et al. 2005, ASSELIN-PATUREL et al. 2003). Dabei werden Langerhans Zellen (LCs), dermale Dendritische Zellen (DDCs) und pDCs unterschieden (ASSELIN-PATUREL et al. 2003). Diese drei Subpopulationen sind in der Lage, als migratorische DCs in den drainierenden Lymphknoten einzuwandern (CROZAT et al. 2010, HENRI et al. 2001). DDCs können weiterhin aufgrund der Expression des C-Typ-Lektinrezeptors Langerin (CD207) in zwei Subpopulationen eingeteilt werden: CD207⁻CD103⁺CD11b^{low} und CD207⁺CD103⁻CD11b^{high} Zellen (MERAD und MANZ 2009, CROZAT et al. 2010). Neben LCs und DDCs kommen migratorische HLA-DR⁺CD207⁺ LCs in der Dermis vor (GINHOUX et al. 2010). Nach neuesten Erkenntnissen stammen CD8⁻CD207⁺ Zellen im drainierenden Lymphknoten nicht nur von diesen migratorischen LCs, sondern direkt aus dem Knochenmark ab (GINHOUX et al. 2010).

2.2.5 DC-Subpopulationen im Menschen

Das meiste Wissen über humane DC stammt von in der Zellkultur aus Monozyten differenzierten DCs (MoDCs). In humanem peripherem Blut machen DCs weniger als 1% aller zirkulierenden Blutzellen aus. Sie können durch die Expression von MHC-II (human leukocyte antigen, HLA-DR) und die Abwesenheit der Marker, die von B-, T- und NK-Zellen exprimiert werden (CD19, CD56, CD3 und CD20), als Lineage negativ (Lin⁻) definiert werden (MACDONALD et al. 2002). Zur weiteren Einteilung der DCs kann der Marker CD11c verwendet werden. Im Gegensatz zu pDCs in der Maus exprimieren humane pDCs kein oder wenig CD11c (DZIOONEK et al. 2000). Neben der Abwesenheit von CD11c werden pDCs durch die Expression der Marker CD123, BDCA2 (*Blood*

derived dendritic cell antigen 2, oder CD303) und BDCA4 (CD304) definiert. Humane CD11c⁺ Zellen werden als myeloide DCs (mDCs) bezeichnet. Diese können weiterhin unterteilt werden in BDCA1⁺ (CD1c⁺) und CD11c⁺ mDC-1 DCs sowie BDCA3⁺ (CD141⁺) und CD11c^{low} mDC-2 DCs (DZIOANEK et al. 2000, JONGBLOED et al. 2010, BACHEM et al. 2010, POULIN et al. 2010). Neben den bereits gut charakterisierten DCs des humanen Bluts ist über die DCs im humanen Gewebe vergleichsweise wenig bekannt.



- LIN⁻ : CD3, CD19, CD20, CD56 negativ

Abb.5 DC-Subpopulationen im humanen peripheren Blut

Dargestellt sind die im Blut vorhandenen HLA-DR⁺ DC-Subpopulationen des Menschen. Die myeloiden Zelllinien differenzieren sich in mDC-1 DCs (CD11c⁺BDCA1⁺BDCA3^{low}CD123^{low}) und mDC-2 DCs (CD11c^{low}BDCA3⁺BDCA1⁻CD123⁻). Plasmazytoide pDCs exprimieren CD123, BDCA2, BDCA4 und sind negativ für die Oberflächenmarker CD11c, BDCA1 und BDCA3. Die Abbildung wurde nach MACDONALD et al. (2001) und DZIOANEK et al. (2000) angefertigt und von Frau Prof. Dudziak zur Verfügung gestellt.

In der Lunge sind mDC-1 DCs (BDCA1⁺, HLADR⁺), mDC-2 DCs (BDCA3⁺, HLADR⁺) und pDCs (CD123⁺, BDCA2⁺) wiederzufinden. Pulmonale mDCs exprimieren im Vergleich zu pulmonalen pDCs eine größere Anzahl kostimulatorischer Moleküle wie CD40, CD80, CD86 und CD54. Pulmonale pDCs hingegen sind in der Lunge für die Koordination tolerogener Immunantworten zuständig (DEMEDTS et al. 2005, MASTEN et al. 2006).

Die Anwesenheit von mDC-1 DCs und mDC-2 DCs in der Haut wurde vor allem in der Epidermis beschrieben. Eine Lokalisation von pDCs und mDC-1 DCs wurde in der Dermis

festgestellt (ZABA et al. 2008, NARBUTT et al. 2006, BANGERT et al. 2003). In der Haut sind LCs in der Epidermis lokalisiert und treten in engen Kontakt mit Keratinozyten (ZABA et al. 2008). Sie werden als separater Subtyp beschrieben, da sie einzigartige Marker wie CD1a, Langerin (CD207) und die Anwesenheit von Birbeck Granula aufweisen (VALLADEAU et al. 2000, LENZ et al. 1993, SHORTMAN und LIU 2002). Diese „tennis-schläger-förmigen“ zytoplasmatischen Strukturen sind einzigartig für LCs. Sie wurden in ähnlicher Ausprägung auch in vaskulären DCs gefunden und sollen für die Antigenpräsentation der LCs und Virusdegradation relevant sein (BOBRY SHEV et al. 1997, ROMANI et al. 2010, DE JONG und GEIJTENBEEK 2010).

In der humanen Milz wurde die Lokalisation der pDCs (BDCA2⁺CD123⁺) in der Marginal- bzw. periarteriolären Zone beschrieben. Diese produzieren, wie ihre murinen Verwandten, IFN- α bzw. IFN- β als Antwort auf mikrobielle Stimuli (NASCIMBENI et al. 2009). Die Anwesenheit von nicht genauer definierten mDCs (CD11c⁺ bzw. CD11c⁺CD205⁺) wurde in der Marginalzone, am Übergang von weißer zu roter Pulpa, sowie der T-Zell- und B-Zellzone festgestellt (MCILROY et al. 2001, PACK et al. 2008).

DCs im Thymus sind vor allem in der Medulla bzw. in der Übergangszone von Medulla und Kortex lokalisiert (WU und SHORTMAN 2005). Durch die Produktion von IFN- α , - β und die fehlende Expression von CD11c können auch thymische pDCs, vereinzelt im Kortex, definiert werden. (BENDRISS-VERMARE et al. 2001). Die konventionellen CD11c- und CD4-exprimierenden mDCs werden anhand von CD11b in zwei Subpopulationen unterteilt. Die zahlenmäßig größere Population sind thymische CD11b⁻ mDCs, welche mehr ko-stimulatorische Marker wie CD86 exprimieren, als die kleinere Populationen der CD11b⁺ mDCs (VANDENABEELE et al. 2001, WU und SHORTMAN 2005). Epithelzellen der Hassall-Körperchen sekretieren *Thymic stromal lymphopoietin* (TSLP), welches migratorische CD11c⁺ DCs zur vermehrten Expression kostimulatorischer Moleküle veranlasst (WATANABE et al. 2004, HANABUCHI et al. 2010).

Auch in Tonsillen wurden die drei bekannten DC-Subpopulationen mDC-1 DCs (CD11c⁺BDCA1⁺), mDC-2 DCs (CD11c^{low}BDCA3⁺) und pDCs (CD11c⁻BDCA2⁺) identifiziert (JONGBLOED et al. 2010, SUMMERS et al. 2001, LINDSTEDT et al. 2005).

Im humanen Lymphknoten konnten bisher nur BDCA3⁺Clec9a⁺ mDC-2 DCs im Parakortex, direkt unter der Bindegewebskapsel, definiert werden (JONGBLOED et al. 2010).

2.3 C-Typ-Lektinrezeptoren

C-Typ-Lektinrezeptoren gehören zur Familie der Mustererkennungsrezeptoren (PRRs), da sie bestimmte Muster (*Pathogen associated molecular patterns*, PAMP) von Pathogenen erkennen. Dazu zählen Zuckerreste, die an der Oberfläche von Bakterien und Viren vorkommen (GEJITENBEEK et al. 2004, DRICKAMER 1999, FIDGOR et al. 2002). Pathogene werden über ihre Zuckerreste an C-Typ-Lektinrezeptoren gebunden und anschließend zusammen mit dem Rezeptor internalisiert. Nach der Aufnahme werden die Pathogene prozessiert und daraus resultierende Peptidfragmente über MHC-Moleküle den T-Zellen präsentiert. C-Typ-Lektinrezeptoren bestehen aus zwei antiparallel angeordneten, membrangebunden β -Strängen und zwei α -Helices (FIDGOR et al. 2002). Sie werden in Typ I und Typ II C-Typ-Lektinrezeptoren unterschieden (Abb. 6).

Typ I C-Typ-Lektinrezeptoren sind durch acht bis zehn Kohlenhydraterkennungsdomänen (*carbohydrate recognition domain*, CRD) und einem intrazellulär lokalisierten C-Terminus charakterisiert (KANAZAWA et al. 2003, FIDGOR et al. 2002). Zu dieser Familie zählt der Makrophagen Mannose Rezeptor (MMR, CD206) mit acht Kohlenhydraterkennungsdomänen, einer cysteinreichen N-terminalen Region sowie Fibronectin Typ II Wiederholungen, welche für Zell-Zell-Interaktionen verantwortlich sind. Zur gleichen Gruppe gehört ebenfalls der DEC205-Rezeptor (CD205) mit zehn Kohlenhydraterkennungsdomänen, einer cysteinreichen N-terminalen Region sowie Fibronectin Typ II Wiederholungen (FIDGOR et al. 2002). Typ II C-Typ-Lektinrezeptoren hingegen besitzen einen extrazellulären C-Terminus, eine lange Hinge-Domäne (Gelenkregion) und nur eine einzige hochkonservierte Kohlenhydraterkennungsdomäne. Diese CRD ist wie bei den Typ I C-Typ-Lektinrezeptoren für die kalziumabhängige Antigenbindung zuständig. Mitglieder dieser Familie sind DC-SIGN, DCIR (ClecSF-6), Langerin (CD207), CLEC-1, Dectin-1 und Dectin-2 (*DC associated C-typ lectins 1 and 2*) sowie DLEC (*DC Lectin*) (FIDGOR et al. 2002). Sowohl Typ I als auch Typ II C-Typ-Lektinrezeptoren weisen intrazellulär eine Tyrosin-reiche Region auf, die für die Internalisierung in Clathrin-beschichtete Vesikel verantwortlich ist (FIDGOR et al. 2002).

Als hocheffiziente Internalisierungsrezeptoren eignen sie sich für die *in vivo* Antigenbeladung von DCs mit bestimmten Antigenen, wenn sie einzig und allein auf DCs exprimiert werden. Die Anwesenheit von hClec9a als neuer C-Typ-Lektinrezeptor, wurde im humanen Blut auf mDC-2 DCs (CD11c^{low}BDCA3⁺) und in der Maus auf CD11c⁺CD8⁺ DCs der Milz beschrieben (SANCHO et al. 2008, CAMINSCHI et al. 2008). Im Vergleich zur einzigartigen Expression des Rezeptors DEC205 auf einer DC-Subpopulation in der Maus, ist dieser sowohl auf humanen thymischen DCs als auch auf Thymozyten, T-Zellen und B-Zellen exprimiert (INABA et al. 1995, GUO et al. 2000, CAMINSCHI et al. 2009). DC-SIGN und DEC205 werden von DDCs in der humanen Haut exprimiert, wobei auf LCs

wenig DEC205 und viel Langerin detektiert werden konnte (TACKEN et al. 2005, EBNER et al. 2004). Die Anwesenheit von DC-SIGN wurde ebenso in humanen lymphatischen Geweben und Schleimhautoberflächen auf DCs begrenzt. DC-SIGN ist außerdem auf professionellen Makrophagen in Lunge und Plazenta vorhanden, und kann neben seiner Bindung einer Vielzahl von Pathogenen, wie beispielsweise HIV (Humanes Immundefizienz-Virus), auch an ICAM-1 (*Inter-Cellular Adhesion Molecule 1*) binden (VAN KOOYK und GEIJTENBEEK 2003, GEIJTENBEEK et al. 2000, TACKEN et al. 2005). MMR ist auf gewebespezifischen Makrophagen, lymphatischen und hepatischen Endothelzellen verbreitet (HE et al. 2007, GUO et al. 2000). Über die Verteilung von hDectin-1 und -2 sowie DLEC auf humanen DCs ist bisher noch nichts bekannt.

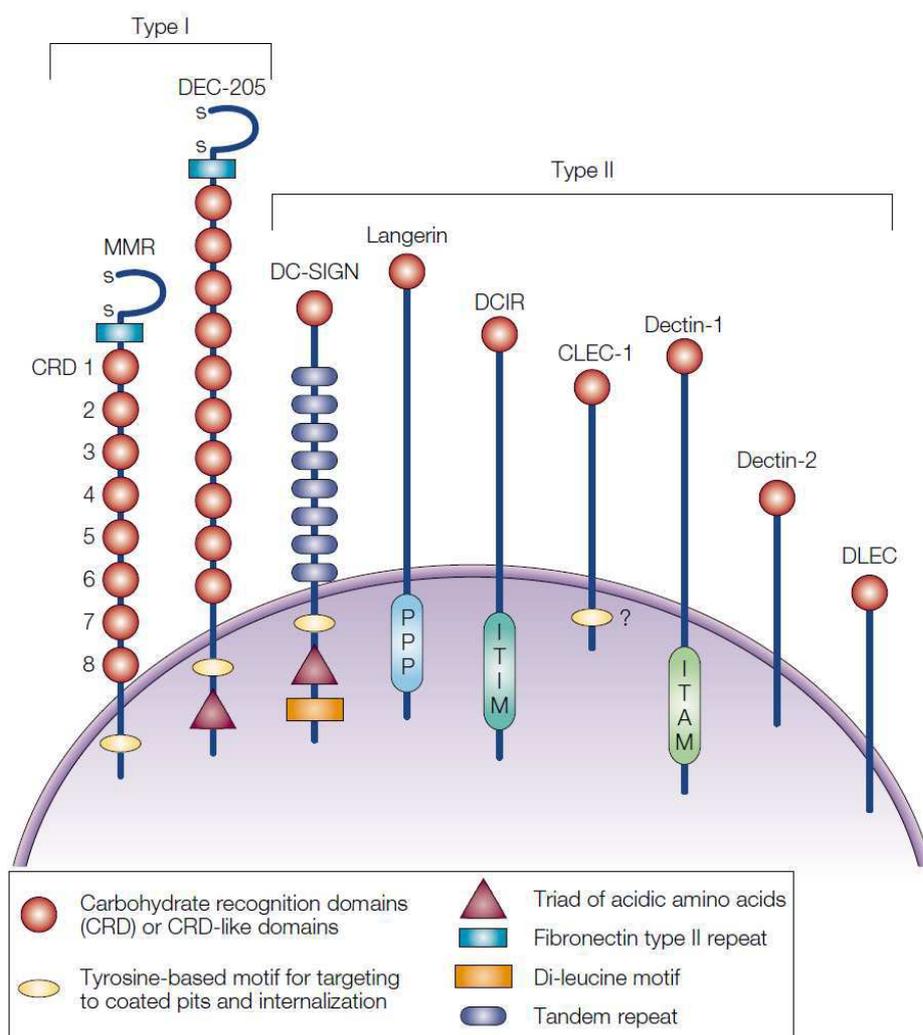


Abb.6 C-Typ-Lektinrezeptoren

C-Typ-Lektinrezeptoren oder Rezeptor-ähnliche Moleküle werden von DCs und LCs produziert. Typ I C-Typ-Lektinrezeptoren umfassen DEC205 und MMR und besitzen aminoterminaler cysteinereiche Wiederholungen (S-S), 8-10 Kohlenhydraterkennungsdomänen (CRD) und eine Fibronectin-Domäne mit Typ II Wiederholungen (FN). Typ II C-Typ-Lektinrezeptoren haben nur eine CRD am carboxyterminalen Ende der extrazellulären Domäne. Der zytosolische Abschnitt der C-Typ-Lektinrezeptoren ist sehr unterschiedlich und weist konservierte Motive auf, welche für die Antigenpräsentation entscheidend sind (FIDGOR et al. 2002).

2.4 Antigenbeladung mittels rekombinanter Antikörper

Da sie die potentesten APCs sind, stellen DCs vielversprechende Ziele für eine Manipulation des Immunsystems dar (STEINMAN und BANCHEREAU 2007, BANCHEREAU und STEINMAN 1998, STEINMAN 2010). Nicht nur zur Induktion protektiver Immunantworten bei Krebspatienten, sondern auch zur Entwicklung neuer Impfstoffe gegen HIV und Malaria könnten DCs für therapeutische Ansätze in Zukunft hilfreich sein. Zur Heilung von Autoimmunerkrankungen oder Verhinderung von Transplantatabstoßungen würde sich eine DC-vermittelte Antigen-spezifische Therapie besser eignen, als die bisher praktizierte Antigen-unabhängige Immunsuppression des gesamten Immunsystems (STEINMAN et al. 2003, STEINMAN und NUSSENZWEIG 2002). Um dieses Ziel zu erreichen, wäre es nötig, DCs mit einem bestimmten Antigen zu beladen und *in vivo* eine spezifische Immunreaktion gegen dieses Antigen hervorzurufen.

HAWIGER et al. verwendeten 2001 einen Antikörper, der gegen den murinen C-Typ-Lektin- und Endozytoserezeptor DEC205 (CD205) (Klon: NLDC145) auf CD11c⁺CD8⁺ DCs gerichtet ist (HAWIGER et al. 2001, MAHNKE et al. 2000). An den Antikörper wurde *hen egg lysozym* (HEL) als Fremdanigen gekoppelt (α -DEC-HEL). Die Verabreichung von α -DEC-HEL konnte eine vorübergehende Proliferation Antigen-spezifischer T-Zellen hervorrufen. Nach erneuter Stimulation mit dem Antikörper kam es zur Deletion bzw. Anergie der T-Zellen, was der Entwicklung einer peripheren Toleranz entspricht. Die Verabreichung von α -DEC-HEL zusammen mit einem proinflammatorisch wirkenden α -CD40-Antikörper resultierte hingegen in einer geringen Proliferation von CD4⁺ T-Zellen (HAWIGER et al. 2001). Eine andere Möglichkeit bestand in der Kopplung des Antikörpers mit Ovalbumin (OVA) (BONIFAZ et al. 2002). Hierbei konnte ebenfalls festgestellt werden, dass die Verabreichung von α -DEC-OVA unter „steady state“ Bedingungen zu einer T-Zellproliferation und bei Restimulation zu Anergie bzw. Toleranz der T-Zellen führt. Einer Injektion zusammen mit α -CD40-Antikörper folgte unter diesen proinflammatorischen Bedingungen eine Präsentation des internalisierten Antigens via DEC205 im MHC-I Kontext und somit zu einer spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort (BONIFAZ et al. 2002).

Auch die zweite große DC-Subpopulation (CD11c⁺CD8⁻) der murinen Milz kann mit einem spezifischen Antikörper angesprochen werden. DUDZIAK et al. zeigten 2007, dass der Antikörper 33D1 eine spezifische Immunantwort hervorruft und an den *dendritic cell immunoreceptor 2* (DCIR2) bindet (DUDZIAK et al. 2007). Dieser gehört ebenfalls zur Familie der C-Typ-Lektinrezeptoren und wird von murinen CD11c⁺CD8⁻DCIR2⁺ DCs exprimiert (KANAZAWA et al. 2002, DUDZIAK et al. 2007). Zu dieser murinen Rezeptor-

familie zählen auch DCIR1 (ClecSF6), DCIR2, DCIR3 und DCIR4, wobei DCIR1 und 2 potentiell inhibitorische Signale über das *immunoreceptor tyrosin based inhibitory motif* (ITIM) weitergeben (FLORNES et al 2004, KANAZAWA et al 2003).

Zur Initiierung bestimmter Immunantworten wurde neben dem DEC205-Antikörper auch der Antikörper 33D1 kloniert und rekombinant exprimiert (DUDZIAK et al. 2007). Beide Antikörper wurden so modifiziert, dass sie nicht an Fc-Rezeptoren binden konnten. Zudem wurden an die schweren Ketten der Antikörper verschiedene Antigene wie OVA, Leishmania-Antigen (*LACK*) oder *Yersinia pestis* Antigen (LcrV) genetisch gekoppelt (DUDZIAK et al. 2007, YAMAZAKI et al. 2008, SOARES et al. 2007, KAMPHORST et al. 2010; DO et al. 2010, LINDQUIST et al. 2004, SHAKHAR et al. 2005). Beide Antikörper wurden für die *in vivo* Antigenbeladung muriner Milz-DCs (CD11c⁺CD8⁻DCIR2⁺ und CD11c⁺CD8⁺DEC205⁺) eingesetzt (Abb. 7). Nach Injektion der Antikörper wurden die DCs gereinigt und im Falle von OVA mit CD8 positiven OT-I bzw. CD4 positiven OT-II transgenen T-Zellen kokultiviert. Angereicherte DCs aus Tieren, die zuvor mit DEC205-OVA beladen wurden, zeigten eine vermehrte CD8 positive OT-I und nur gering positive CD4 OT-II T-Zellantwort. Die Antigenbeladung mittels des 33D1-OVA Antikörper an CD11c⁺CD8⁻DCIR2⁺ DCs hatte hingegen eine hohe CD4 positive OT-II Antwort zur Folge, da OVA-Peptide im MHC-II Kontext präsentiert wurden (DUDZIAK et al. 2007, KAMPHORST et al. 2010). *In vivo* kam es bei Antigenbeladung von CD11c⁺CD8⁺ oder CD11c⁺CD8⁻ DCs unter „steady state“ Bedingungen nach neun Tagen zu einer Toleranzreaktion. Dies resultiert aus der Deletion der T-Zellen und fehlender T-Zellreaktion auf erneute Stimulation mit OVA-beladenen DCs und damit der Induktion regulatorischer T-Zellen (DUDZIAK et al. 2007, YAMAZAKI et al., 2008). Wurden die Antikörper α -DEC-OVA und 33D1-OVA jeweils zusammen mit α -CD40 verabreicht, kam es zu einer Vervielfachung der T-Zellproliferation und damit entweder zu einer CD8⁺ zytotoxischen (DEC205) oder CD4⁺ T-Helfer (33D1) T-Zellantwort (DUDZIAK et al. 2007). Mit diesen Experimenten konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Antigenbeladung bestimmter DC-Subpopulationen *in vivo* möglich ist und verschiedene T-Zellantworten durch unterschiedliche DC-Subpopulationen induziert werden.

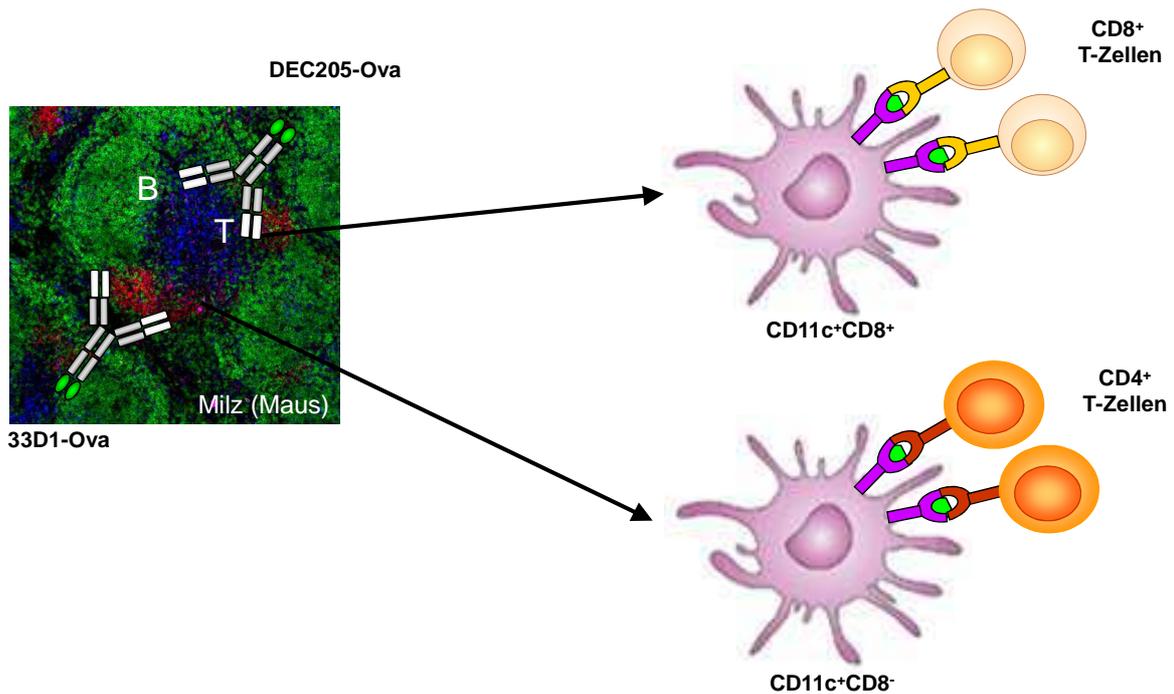


Abb.7 Murine DC-Subpopulationen und T-Zellantworten nach Antigenbeladung *in vivo*

Dargestellt ist eine Immunfluoreszenzaufnahme der murinen Milz von *Fms-like tyrosine kinase* (Flt3L)-behandelten C57BL/6 Mäusen (Daten nicht veröffentlicht, links), gefärbt mit α -DEC205-A647, 33D1-bio/SA-Cy3 (α -DCIR2-bio/SA-Cy3) und α -CD3-A488. Die CD11c⁺CD8⁺DEC205⁺ DCs sind in der T-Zellzone und CD11c⁺CD8⁻DCIR2⁺ DCs vor allem in der Marginalzone lokalisiert (links). Der DEC205-OVA Antikörper bindet an CD11c⁺CD8⁺ DCs und der 33D1-OVA Antikörper an CD11c⁺CD8⁻ DCs (rechts). Nach der *in vivo* Antigenbeladung von CD11c⁺CD8⁺ DCs mit α -DEC205-OVA Antikörpern, wird eine CD8⁺ T-Zellantwort induziert (rechts, oben). Bei Einsatz des 33D1-OVA Antikörpers, der an CD11c⁺CD8⁻ DCs bindet, ist eine CD4⁺ T-Zellantwort (rechts, unten) die Folge. Diese Abbildung wurde noch nicht publiziert und von Frau Prof. Dudziak zur Verfügung gestellt.

Durch *fluorescence activated cell sorting* (FACS)-Analysen und Immunfluoreszenzaufnahmen konnte die Expression von Langerin (CD207) auf murinen CD11c⁺CD8⁺DEC205⁺ DCs in der Milz nachgewiesen werden (IDOYAGA et al. 2009). Auf diesen Zellen wird ebenfalls Clec9a exprimiert (SANCHO et al. 2008, CAMINSCHI et al. 2008). Die Gabe eines Clec9a-Antikörpers ohne zusätzliche Stimulanzen *in vivo* induzierte eine starke T-Zellantwort. Dabei wurden sowohl CD8⁺ als auch CD4⁺ T-Zellen aktiviert (CAMINSCHI et al. 2008). Eine vergleichende Antigenbeladung von CD11c⁺CD8⁺ und CD11c⁺CD8⁻ DCs unter stimulatorischen Bedingungen mit dem gag-p24 (HIV-Proteinfragment)-gekoppelten α -Langerin, α -Clec9a und α -DEC205 bzw. α -DCIR2, führte nach Applikation zu einer vergleichbaren CD8⁺ sowie CD4⁺ T-Zellantwort (IDOYAGA et al. 2011).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien

Alle für diese Doktorarbeit verwendeten Chemikalien, Reagenzien, Gebrauchswaren und Geräte wurden von den hier aufgelisteten Firmen bezogen:

BioRad Laboratories GmbH (München); Becton Dickson (Franklin-Lakes, USA); Carl Roth GmbH & Co.KG (Karlsruhe); Eppendorf (Wesseling-Berzdorf); Greiner Bio-One AG (Frickenhausen); Gibco-Invitrogen Corporation (Karlsruhe); Merck KGaA (Darmstadt); New England Biolabs GmbH (Schwalbach i. Taunus); Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen); Roche Molecular Biochemicals GmbH (Mannheim); Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg); Sigma-Aldrich (Steinheim).

Zellkulturmaterialien wurden als sterile Einmalartikel erworben. Eingesetzte Medien und Lösungen wurden, falls nicht steril vom Hersteller erworben, für 20min bei 121°C und 1bar autoklaviert oder mithilfe eines 0,22µm großen Filters sterilfiltriert. Alle verwendeten Chemikalien entsprachen mindestens dem Reinheitsgrad „reinst“.

3.1.2 Standardlösungen, Puffer und Medien

Zur Herstellung von Puffer, Lösungen und Medien wurde doppelt deionisiertes Wasser (ddH₂O) aus der Deionisationsanlage Milli-Q Advantage A10 (Milipore, Eschenbach) mit einem spezifischen Widerstand von 18,2MΩ/cm³ verwendet. Antikörper sowie spezielle Puffer- und Medienzusammensetzungen werden bei den jeweiligen Methoden einzeln aufgelistet.

3.1.3 Antikörper gegen humane Antigene

Antikörper, welche in der Immunfluoreszenz humaner Gewebe verwendet wurden, sind in den nachfolgenden Tabellen zusammengefasst (Tab. 1, 2, 3). α -hDCIR wurde freundlicherweise von Gordon Heidkamp (Doktorand der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dudziak) zur Verfügung gestellt.

Tab. 1: Antikörper gegen humane Oberflächenantigene

Antikörper	Konjugat	Klon	Typ	Konz.	Firma
BDCA1 (CD1c)	PE	AD5-8E7	Maus IgG2a	1:50	Miltenyi Biotec
BDCA2 (CD303)	PE	AC144	Maus IgG1	1:50	Miltenyi Biotec
BDCA3 (CD141)	PE	AD5-14H12	Maus IgG1	1:50	Miltenyi Biotec
CD3	A647	UCHT1	Maus IgG1, κ	1:50	eBioscience
CD3	A488	UCHT1	Maus IgG1, κ	1:100	BioLegend
CD3	Biotin	UCHT1	Maus IgG1, κ	1:50	BD Biosciences
CD3	PE	UCHT1	Maus IgG1, κ	1:50	BD Biosciences
CD4	FITC	RPA-T4	Maus IgG1, κ	1:50	eBioscience
CD4	PE	RPA-T4	Maus IgG1, κ	1:50	eBioscience
CD8	FITC	HIT8a	Maus IgG1, κ	1:50	BD Biosciences
CD11b	Biotin	ICRF-44	Maus IgG1, κ	1:50	BioLegend
CD11c	Biotin	3.9	Maus IgG1, κ	1:50	BD Biosciences
CD11c	FITC	3.9	Maus IgG1, κ	1:50	eBioscience
CD19	A647	HIB19	Maus IgG1, κ	1:25	eBioscience
CD26	FITC	M-A261	Maus IgG1, κ	1:50	BD Biosciences
CD123	Biotin	9F5	Maus IgG1, κ	1:50	BD Biosciences
CD205	PE	MG38	Maus IgG2b, κ	1:50	BD Biosciences
CD206	PE	19.2	Maus IgG1, κ	1:50	BD Biosciences
CD207	A488	343828	Maus IgG1, κ	1:50	R&D Systems
CD209	FITC	DCN-46	Maus IgG2b, κ	1:50	BD Biosciences
Clec9a	A488	polyklonal	Maus IgG	1:50	Abnova
HLADR	A647	G46-6	Maus IgG2a, κ	1:50	BD Biosciences
HLADR	FITC	G46-6	Maus IgG2a, κ	1:50	BD Biosciences
Zytokeratin	Purified	TROMA1	Ratte IgG2a, κ	1:50	Hybridomzellen

XCR1	Purified	polyklonal	Ziege IgG	1:50	R&D Systems
hDCIR	A488	15E12	Maus IgG2a ,κ	1:50	G. Heidkamp
hDCIR	A647	15E12	Maus IgG2a, κ	1:50	G. Heidkamp

Tab. 2: Isotyp-Kontrollantikörper

Antikörper	Konjugat	Typ	Konz.	Firma
IgG2a, κ	PE	Maus	1:50	eBioscience
IgG1	PE	Maus	1:50	BD Biosciences

Tab. 3: Sekundärantikörper

Antikörper	Konjugat	Typ	Konz.	Firma
Anti-Ziege	DyLight™549	Esel IgG,	1:200	Jackson ImmunoResearch. Laboratories Inc.
Anti-FITC	DyLight™488	Maus IgG	1:200	Jackson ImmunoResearch. Laboratories Inc.
Anti-Ratte	FITC	Maus IgG	1:200	Jackson ImmunoResearch. Laboratories Inc.
Anti-Ratte	Biotin	Esel IgG	1:200	Jackson ImmunoResearch. Laboratories Inc.
Anti-PE	-	Ziege IgG	1:400	Thermo Scientific
Streptavidin	Cy3	Bakterielles Protein	1:400	Jackson ImmunoResearch. Laboratories Inc.
Streptavidin	Dy649	Bakterielles Protein	1:400	Jackson ImmunoResearch. Laboratories Inc.

3.1.4 Oligonukleotide zur Klonierung und Sequenzierung

Dargestellt sind Oligonukleotide, die zur Klonierung und Sequenzierung der C-Typ-Lektinrezeptor-DNA verwendet wurden. Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen hervorgehoben (XbaI: TCTAGA, NotI: GCGGCCGC, NheI: GCTAGC, EcoRI: GAATTC) (Tab. 4).

Tab. 4: Verwendete Oligonukleotide

Nr.	Oligonukleotid	Sequenz	Länge [bp]	Tm [°C]
1	5.2 mClec9a	GCGGGG <u>TCTAGAA</u> AGTTCTTCCAGGTAT CCTC	32	67
2	3.2 mClec9a	CCCCGGG <u>GCGGCCG</u> CTCAGATGCAGGAT CCAAATG	34	83
3	5.2 mDectin-1	GCGGGG <u>TCTAGAC</u> GACACAATTCAGGG AGAAATC	34	71
4	3.2 mDectin-1	CCCCGGG <u>GCGGCCG</u> CTTACAGTTCCTTC TCACAG	33	79
5	5.1 mDectin-2	TCGGGG <u>GAAATC</u> GCCACCATGGTGCAG GAAAGACAATC	38	81
6	5.2 mDectin-2	GCGGGG <u>TCTAGAC</u> AGCCCAGTAGAAGA CTATATG	34	67
7	3.1 mDectin-2	CCCTTG <u>GCGGCCG</u> CTCATAGGTAAATC TTCTTCATTTAC	40	76
8	3.2 mDectin-2	CCCCGGG <u>GCGGCCG</u> CTCATAGGTAAATC TTCTTC	33	76
9	5.2 mLangerin	GCGGGG <u>GCTAGC</u> TTGATGGGCAAATA TTGGATG	34	75
10	3.2 mLangerin	CCCCGGG <u>GCGGCCG</u> CTCATTAGTTGTT TGGACGTAG	36	81
11	5.2 hDectin-2	GCGGGG <u>TCTAGAC</u> ATTTTACATATGGTG AAAC	32	64
12	3.2 hDectin-2	CCCCGGG <u>GCGGCCG</u> CTCATAGGTAAATC TTATTCATC	36	76

13	5.2 hDectin-1	GCGGGGTCTAGAACCATGGCTATTTGG AGATCC	33	71
14	3.2 hDectin-1	CCCCGGGCGGCCGCTTACATTGAAAAC TTCTTCTC	35	77
15	5.2 hLangerin	GCGGGGTCTAGATTTATGGGCACCATA TCAGATG	34	70
16	3.2 hLangerin	CCCCGGGCGGCCGCTCACGGTTCTGA TGGGACATAG	36	84
17	5.2 hClec9a	GCGGGGTCTAGAGTTTTCTGCATGGGA TTATTAAC	35	68
18	3.2 hClec9a	CCCCGGGCGGCCGCTCAGACAGAGGA TCTCAACG	34	82
19	3.1 EcoRI-His- (G ₄ S) ₂ -Xbal- Stop-NotI-NheI	<u>GCTAGCGCGGCCG</u> CCACTCATCTAGAG GAGCCGCCGCGCCGGAGCCGCCGCC GCCGTGGTGATGGTGATGATGG	74	100
20	5.1 EcoRI-His- (G ₄ S) ₂ -Xbal- Stop-NotI-NheI	<u>GAATTC</u> CATCATCACCATCACCACGGC GGCGGCGGCTCCGGCGGCGGGCGGCT CCTCTAGATGAGTGGCGGCGGCG	74	100
21	5.3 hLangerin	GCGGGGTCTAGAGCCACCATGACTGTG GAGAAGGAGGCCCC	40	81
22	5.3 mDectin-1	GCGGGGGAATTCGCCACCATGAAATAT CACTCTCATATAGAGAATC	46	76
23	5.4 hLangerin	GCGGGGTCTAGATATTCTACAGGTGGT TTCTCAAG	35	67
24	5.5 hLangerin	GCGGGGTCTAGAAACCAGTGTGGAGAA GGCCAAC	34	74
25	5.3 hClec9a	GCGGGGTCTAGATGTGCCCTTCAGATG AAATATTGC	36	73
26	5.4 hClec9a	GCGGGGTCTAGATTGCAGGTGTCCACC ATTGCG	33	77
27	5.3 hDectin-1	GCGGTGTCTAGAAAAGCTGTCAAACC ACAGG	32	68
28	5.4 hDectin-1	GCGGGGTCTAGATTTCTATCAAGAAATA AAGAGAACCAC	39	68
29	5.3 hDectin-2	GCGGGGTCTAGATGCCAGCCTGGGGA TGTTG	31	76

30	5.4 hDectin-2	GCGGGGTCTAGAACTACTCATATC ATTCAAGTCTC	38	67
31	5.6 hLangerin	GCGGGGTCTAGAACCAGTGTGGAGAA GGCCAA	32	73
32	5.7 hLangerin	GCGGGGTCTAGAGATATTCTACAGGTG GTTTCTCA	35	68
33	5.5 hDectin-2	GCGGGGTCTAGAGAACTACTCATAT CATTCAAG	35	65
34	5.6 hDectin-2	GCGGGGTCTAGAGTGCCAGCCTGGGG ATGTTG	32	76
1270	5.2 EcoRI-His- (G ₄ S) ₂ -XbaI	<u>GAATTC</u> CATCATCACCATCACCACGGC GGCGGCGGCTCCGGCGGCGGCGGCT	51	96
1271	3.2 EcoRI-His- (G ₄ S) ₂ -XbaI	<u>TCTAGAG</u> CCGCCGCCGCGGAGCCGC CGCCGCCGTGGTGATGGTGATGATGG	51	96
1025	3.2 T7-Sequen- zierprimer	TAATACGACTCACTATAGGG	20	38,8
	BGHrev-Se- quenzierprimer	ACTAGAAGGCACAGTCGAG		

(G₄S)₂: Glycin-Serin Linker

3.1.5 Molekulare Größenmarker

Zur Größenbestimmung der Desoxyribonukleinsäure (DNA) Fragmente wurde der Marker „2-log DNA“ von NEB (Schwabach) verwendet. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder der Firma MBI-Fermentas.

3.1.6 Software

Bilder der Immunfluoreszenzmikroskopie wurden mit der ZEN2009-Software von ZEISS ausgewertet. Primer wurden mithilfe der Clone Manager 5-Software erstellt und Sequenzen mit dem Programm GENTle analysiert.

3.1.7 Verwendete Gewebe in der Immunfluoreszenz

Die in der Immunfluoreszenz verwendeten Gewebe wurden unter Berufung auf die Ethikanträge von Frau Prof. Dudziak 3761/3762 verwendet. Das Milzgewebe stammt aus der Chirurgischen Klinik mit Poliklinik und der Pathologie in Erlangen und wurde von Prof. A. Hartmann, Prof. W. Haupt und Prof. Hohenfelder zur Verfügung gestellt. Die Thymi wurden in der kardiologischen Abteilung der Kinder- und Jugendklinik der Universität Erlangen bei Herzoperationen routinemäßig entnommen und von Prof. Cesnejvar zur Verfügung gestellt. Die Tonsillen wurden Patienten der HNO Klinik der Universität Erlangen entnommen und von Prof. Iro zur Verfügung gestellt.

3.1.8 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung
HEK293T-Zellen	Die Abkürzung HEK bezeichnet „human embryonic kidney cells“. Diese Zelllinie stammt ursprünglich aus menschlichen Nierenzellen und enthält DNA-Teile des menschlichen Adenovirus 5. HEK Zellen werden auch als hypotriploid bezeichnet und wachsen adhärent. Die Zellen wurden freundlicherweise von Frau Prof. Dudziak bereitgestellt.
TROMA1-Hybridomzellen	Die Zelllinie TROMA1 trägt die Bezeichnung des Antikörpers, welchen die Hybridomzellen produzieren. TROMA1 bindet spezifisch an Zytokeratin 8, welches durch Subpopulationen von Epithelzellen (Thymus) exprimiert wird. Die TROMA1-Zellen wurden von der Developmental Studies Hybridoma Bank der University of Iowa erworben.

3.1.9 Verwendete Kits

QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN (Hilden)
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN (Hilden)
Venor GeM	Biochrom (Cambridge, UK)
PureLink HiPure Plasmid Filter Purification Kit	Invitrogen
ABI PRISM BigDye Terminator Sequencing Ready Reaction Kit V1.1	Applied Biosystems (Carlsbad, USA)
Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Kits	LONZA (Gampel, CH)

3.1.10 Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs (Schwabach) bezogen. *T4-DNA-Ligase* und *T4-Polynukleotidkinase* wurden von MBI-Fermentas (Wilna, LIT) erworben. Für die PCR wurden Puffer sowie Taq-Polymerasen Phusion-High-Fidelity (HF) oder –Hot-Start (HS) Polymerase von FINNzymes Oy (Espoo, FIN) verwendet. Die *Taq-DNA-Polymerase*, welche für den Mykoplasmentest verwendet wurde, stammte von der Firma Peqlab (Erlangen).

3.1.11 Plasmide

Für die Klonierung von humanem (h)Langerin wurde *complementary DNA* (cDNA) aus humaner Epidermis und für murines (m)Dectin-2 cDNA aus muriner Milz verwendet. Diese wurden von Christian Lehmann und Gordon Heidkamp (Mitarbeiter der AG Dudziak) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Alle anderen C-Typ-Lektinrezeptoren wurden aus der Vorlage der folgenden Plasmide produziert, die von Gordon Heidkamp (AG Dudziak) freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden (Tab. 5).

Tab. 5: Verwendete Plasmide (Vektor pcDNA3.1)

Plasmid	Insert
639	IgG-SP + His-Tag + (G ₄ S) ₂ + mDectin-1
733	IgG-SP + His-Tag + (G ₄ S) ₂ + hDCIR
747	IgG-SP + His-Tag + (G ₄ S) ₂ + hDectin-2
751	IgG-SP + His-Tag + (G ₄ S) ₂ + hDCIR aus Dam ⁻ Bakterien gewonnen
811	IgG-SP + His-Tag + (G ₄ S) ₂ + mClec9a
814	IgG-SP + His-Tag + (G ₄ S) ₂ + hClec9a
815	IgG-SP + His-Tag + (G ₄ S) ₂ + hDectin-1
820	IgG-SP + His-Tag + (G ₄ S) ₂ + mLangerin
IgG-SP:	IgG-Signalpeptid
His-Tag:	6xHistidin-Tag
(G ₄ S) ₂ :	Glycin-Serin Linker

für 1h bei 37°C im Thermoschüttler inkubiert, anschließend mit ddH₂O verdünnt (1:2) und bis zur nachfolgenden Ligation (s. 3.2.7) bei -20°C gelagert.

3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese der DNA

Für die elektrophoretische Auftrennung der PCR Produkte im Agarosegel wurden 1,5-2,0g Agarosepulver (Serva) mit 100ml 1xTAE-Puffer in einem Erlenmeyerkolben gemischt und in der Mikrowelle bis zum Kochen erhitzt. Der Anteil der Agarose wurde je nach Größe des PCR-Produktes ausgewählt. Je kleiner das erwartete PCR-Produkt war, desto mehr Agarosepulver wurde eingesetzt. Nachdem das Agarosepulver sich vollständig löste, wurde der Gewichtsverlust mit ddH₂O ausgeglichen und 1,25µl Ethidiumbromid (10mg/ml) zugegeben. Nach dem Gießen der viskösen Flüssigkeit in eine Flachbettapparatur (Peqlab) und dem Lufttrocknen für ca. 20min wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer gestellt und mit 1xTAE-Puffer überschichtet. Vor dem Laden der Proben auf das Gel war es nötig, diese mit 1/6 des 6xVolumen DNA-Ladepuffers zu versehen. Zusätzlich wurden separat 7µl 2log DNA-Längenstandard (NEB, Schwabach) aufgetragen. Die Gelelektrophoresen wurden bei 90-120V für ca. 30min durchgeführt und die DNA mittels eines UV-Transilluminators (Herolab) und Kamerasystems analysiert. Anschließend wurden DNA-Fragmente ausgeschnitten (Transilluminator Table, Vilber Lourmat), gereinigt (s. 3.2.4) und weiterprozessiert.

6xDNA Ladepuffer:	0,25% Bromphenolblau, 25% Glycerin, 10mM EDTA
1xTAE-Puffer:	50mM Tris Base, 5mM Natriumazetat, 1mM EDTA

3.2.4 Reinigung der DNA

Vektorfragmente bzw. PCR-Produkte wurden nach dem Ausschneiden der Gelbanden aus dem Agarosegel unter UV-Licht, mithilfe des QIAquick Gel Extraction Kit von QIAGEN nach den Angaben des Herstellers gereinigt. PCR-Produkte wurden teilweise nach der Amplifikation bzw. nach Restriktion direkt über einen QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die DNA wurde je nach DNA-Menge in 30-50µl sterilem Elutions (EB)-Puffer (10mM, Tris-HCl, pH=8,5) in ein 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.5 Verdau der DNA mit Restriktionsenzymen

Um die PCR-Fragmente mit dem Vektor ligieren zu können, wurden sowohl Vektor als auch das PCR-Produkt, welches über Oligonukleotide eingebrachte Restriktionsschnittstellen enthielt (Tab. 4), mithilfe von Restriktionsendonukleasen verdaut (Präparativer Restriktionsansatz). Für einen 50µl Ansatz wurden 10µg DNA mit 5µl Restriktionspuffer 2 oder 4 (NEB), 0,5µl BSA (100x) (NEB), 1µl Restriktionsenzym 1 (20U/µl), 1µl Restriktionsenzym 2 (20U/µl) sowie der entsprechenden Menge an ddH₂O gemischt. Der Verdau erfolgte durch das Erhitzen des Ansatzes für 2h bei 37°C und das anschließende Deaktivieren der Enzyme für 20min bei 65°C. Des Weiteren wurden die Produkte angereichert, um kleinere Endsequenzen und Enzyme zu eliminieren (s. 3.2.4). Für die Restriktionsanalyse von Minipräp-DNA (s. 3.2.9) wurde ein analytischer Restriktionsansatz gewählt. Dabei wurden 5µl DNA mit 2µl Restriktionspuffer 2 oder 4 (NEB), 0,2µl BSA (100x) (NEB), je 1µl Restriktionsenzym 1 und 2 sowie 12,6µl ddH₂O versetzt. Es wurden die Restriktionsendonukleasen EcoRI (20U/µl), HindIII (20U/µl), NheI-HF (20U/µl), NotI-HF (20U/µl) und XbaI (20U/µl) (NEB) während der Klonierungsarbeit verwendet.

3.2.6 Konzentrationsbestimmung der DNA

Zur Konzentrationsbestimmung wurde die DNA entweder 1:10 oder 1:100 in 10mM Tris-HCl (pH=8,0) oder ddH₂O verdünnt. Die Optische Dichte (OD) der Proben wurde mithilfe einer 1ml UV-Einmalküvette (Eppendorf) bei einer Wellenlänge von 260nm, am Bio-Photometer (Eppendorf) bestimmt. Anfangs wurde ein Nullwert mit Tris-HCl oder ddH₂O eingestellt. Ein Wert von $OD_{260} = 1$ entspricht 50µg/ml doppelsträngiger DNA, 33 µg/ml einzelsträngige DNA sowie 20µg/ml für Oligonukleotide. Die angezeigte Relation von OD_{260} zu OD_{280} gibt den Verunreinigungsgrad der gemessenen Probe an. Bei einem Wert von 1,8 bis 2,0 ist davon auszugehen, dass reine DNA vorliegt.

3.2.7 Ligation der DNA

Ligationen bieten die Möglichkeit, *in vitro* produzierte und mit Restriktionsenzymen verdaute DNA-Fragmente zu rekombinanten Genkonstrukten zu ergänzen. Die Zusammensetzung des Ansatzes konnte mithilfe einer Konzentrationsmessung der DNA vor der Ligation optimiert werden. Der 20µl Ligationsansatz, bestehend aus 0,5-1µl verdaulichem Vektor, 1µl T4-DNA-Ligase, 2µl T4-DNA-Ligase-Puffer, 2-6µl PCR-Produkt und der entsprechenden Menge an ddH₂O, wurde für 3h bei 16°C inkubiert und in kompetente Bakterien transformiert (s. 3.2.9). Zusätzlich wurde eine Kontrollligation angefertigt, wobei

anstelle des PCR-Produktes ddH₂O verwendet wurde, um eine Religation des verdauten Vektors auszuschließen. Die im Verlauf dieser Arbeit hergestellten Konstrukte (extrazelluläre Domäne der C-Typ-Lektinrezeptoren im Vektor pcDNA3.1 mit His-Tag) können der Tabelle 6 entnommen werden.

Tab. 6: C-Typ-Lektinrezeptoren im Vektor pcDNA3.1

Plasmid	Insert
926	IgG-SP + His-Tag + (G ₄ S) ₂ (repair) + hClec9a_462bp
927	IgG-SP + His-Tag + (G ₄ S) ₂ + hClec9a_462bp
928	IgG-SP + His-Tag + (G ₄ S) ₂ + hClec9a_552bp
981	IgG-SP + His-Tag + (G ₄ S) ₂ + Stop (repair 733 Xba-Schnittstelle)+hDCIR
982	IgG-SP + His-Tag + (G ₄ S) ₂ + mDectin-2
983	IgG-SP + His-Tag + (G ₄ S) ₂ + hDectin-2
984	IgG-SP + His-Tag + (G ₄ S) ₂ + mClec9a
985	IgG-SP + His-Tag + (G ₄ S) ₂ + hClec9a
986	IgG-SP + His-Tag + (G ₄ S) ₂ + hDCIR (repair 733)
987	IgG-SP + His-Tag + (G ₄ S) ₂ + mLangerin
989	IgG-SP + His-Tag + (G ₄ S) ₂ + hDectin-1
990	IgG-SP + His-Tag + (G ₄ S) ₂ + mDectin-1
991	IgG-SP + His-Tag + (G ₄ S) ₂ (repair) + mDectin-2
992	IgG-SP + His-Tag + (G ₄ S) ₂ + hLangerin
993	IgG-SP + His-Tag + (G ₄ S) ₂ + hLangerin_418bp
994	IgG-SP + His-Tag + (G ₄ S) ₂ (repair) + hLangerin_418bp
995	IgG-SP + His-Tag + (G ₄ S) ₂ + hLangerin_607bp
996	IgG-SP + His-Tag + (G ₄ S) ₂ + hDectin-1_423bp
997	IgG-SP + His-Tag + (G ₄ S) ₂ (repair) + hDectin-1_423bp
998	IgG-SP + His-Tag + (G ₄ S) ₂ + hDectin-2_413bp
999	IgG-SP + His-Tag + (G ₄ S) ₂ + hDectin-2_464bp
IgG-SP:	IgG-Signalpeptid
His-Tag:	6xHistidin-Tag
(G ₄ S) ₂ :	Glycin-Serin Linker

Die unter 3.2.2 erwähnten Oligonukleotide wurden nach der Phosphorylierung mit dem XbaI - NotI-HF verdauten Vektor 733 (Tab. 3) ligiert. Hierfür wurden 0,25µl des Oligonukleotidgemisches mit 1µl verdautem Vektor, 1µl T4-DNA-Ligase, 2µl T4-DNA-Ligasepuffer und 12,75µl ddH₂O gemischt.

3.2.8 Herstellung kompetenter Bakterien

Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurden aus dem Glycerolstock Bakterien (*E.coli* DH5 α) mit einer Pipettenspitze entnommen und in 8ml Lysogeny Broth (LB)-Medium in ein 16ml Rundbodenröhrchen transferiert. Dieses wurde mit leicht geöffnetem Deckel bei 37°C für 14-16h und 230rpm geschüttelt. Bakterien mit enthaltener Plasmid-DNA erschienen nach der Inkubationszeit als trübes Medium. Der komplette Inhalt wurde in 400ml LB-Medium in einen 1l Erlenmeyerkolben überführt und bei 37°C und 230rpm bebrütet. Zuvor wurde jedoch 1ml des Mediums entnommen, um bei nachfolgenden Konzentrationsmessungen als Null-Wert eingesetzt zu werden. Im Abstand von je 30min wurde eine Konzentrationsbestimmung der 400ml Bakterienkultur in einer 1ml UV-Einmalküvette (Eppendorf) bei einer Wellenlänge von 600nm am Bio-Photometer (Eppendorf) durchgeführt. Nach dem Erreichen einer gewünschten Dichte von 0,4-0,6 wurde das Bakterienwachstum gestoppt, indem der Erlenmeyerkolben für ca. 30min auf Eis gelagert wurde. Die Bakterienkulturen wurden in 50ml Polypropylenröhrchen zentrifugiert (1325xg, 8min, 4°C) und der Überstand vorsichtig dekantiert. 200ml zentrifugierte Bakterienkultur wurde in 50ml Puffer Tfb1 aufgenommen und 30min im Eisbad gelagert. Anschließend wurden die Polypropylenröhrchen zentrifugiert (1325xg, 8min, 4°C), der Überstand abgenommen und alles in 10ml Puffer Tfb2 resuspendiert. In ein 1,5ml Reaktionsgefäß wurden je 100 μ l der Suspension gegeben und alles in flüssigem Stickstoff gefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die kompetenten Bakterien bei -80°C gelagert.

Puffer Tfb1: 30mM KAc; 50mM MnCl₂; 100mM RbCl; 10mM CaCl₂; 15% (w/v) Glycerin; pH=5,8

Puffer Tfb2: 10mM MOPS/NaOH (pH 7,0); 75mM CaCl₂; 10mM RbCl; 15% (w/v) Glycerin

LB-Medium: 25g LB-Pulver, 1l ddH₂O

3.2.9 Transformation in kompetente Bakterien

Die Transformation der Ligationsansätze erfolgte nach der Inkubationszeit in kompetente *E.coli*-DH5 α Zellen (s. 3.2.7). Die kompetenten Bakterien wurden von der -80°C Lagerung umgehend auf Eis gestellt und langsam aufgetaut. Nach Zugabe des Ligationsansatzes (20 μ l) zu den Bakterien (100 μ l) wurde das 1,5ml Reaktionsgefäß 20min auf Eis inkubiert, um eine Adsorption der Plasmide in die Bakterienzelle gewährleisten zu können. Anschließend wurde für 45-60s ein Hitzeschock bei 42°C durchgeführt und die Lösung im

Eisbad 2min abgekühlt. Pro Ansatz wurden 500µl Lysogeny Broth (LB)-Medium zugegeben und das Reaktionsgefäß 1h bei 37°C im Thermomixer geschüttelt (400rpm). Danach wurden die Bakterien bei 200xg, 1min und RT zentrifugiert, ca. 500µl des Überstandes verworfen, die Bakterien in den restlichen 100µl resuspendiert und auf LB/Amp Agarplatten ausplattiert. Die Bakterien wurden im Bakterieninkubator (Heraeus) bei 37°C mindestens 14-16h inkubiert. Einzelklone standen daraufhin für eine Minipräp-DNA-Analyse zur Verfügung.

LB/Amp Agarplatten: 25g LB-Pulver (Roth), 15g Agar-Agar (SIGMA), 1l ddH₂O, 1ml Ampicillin (100µg/ml)

3.2.10 Minipräparation

Um die Plasmid-DNA von den Zellbestandteilen der Bakterien zu separieren, wurde eine Minipräparation durchgeführt. Nach Transformation der Ligationsansätze wurden pro Platte 3-5 Einzelklone gepickt, je ein Teil der Einzelklone auf einer Masterplatte ausgestrichen und die restlichen Bakterien mit der Pipettenspitze in 6ml LB/Amp-Medium gegeben. Das angeimpfte 16ml Rundbodenröhrchen wurde mit leicht geöffnetem Deckel bei 37°C für 14-16h und 230rpm geschüttelt. Ampicillin-resistente Bakterien mit enthaltener Plasmid-DNA erschienen nach der Inkubationszeit als trübes Medium. Die mit Einzelklonen angeimpften Bakterienkulturen im Polypropylenröhrchen wurden zentrifugiert (1325xg, 8min, 4°C) und der Überstand vorsichtig dekantiert. Die Zellpellets wurden in 100µl P1-Resuspensionspuffer aufgenommen und in 1,5ml Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden die Zellen mit 200µl P2-Lysepuffer versetzt, 5min inkubiert und die Zellwände somit aufgeschlossen. Nach der Zugabe von 150µl P3-Neutralisationspuffer wurde die Suspension gut gemischt und ein Tropfen Chloroform (CHCl₃, 0,22µl) zur Denaturierung von Proteinen und erleichterten Phasentrennung hinzugefügt. Es folgte eine Zentrifugation (21000xg, 15min, RT) und das Überführen des Überstandes in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß. Dem Überstand wurden 750µl Isopropanol zum Ausfällen der Nukleinsäuren zugegeben, die Reaktionsgefäße kurz auf dem Vortexer gemischt und erneut zentrifugiert (21000xg, 10min, 4°C). Die gefällte DNA wurde mit 70%-igem, kaltem Ethanol gewaschen und zentrifugiert (21000xg, 5min, 4°C). Abschließend wurde das Pellet bei RT ca. 5-10min getrocknet und in 30µl EB-Puffer gelöst.

LB/Amp-Medium: 25g LB-Pulver, 1l ddH₂O, 1ml Ampicillin (100µg/ml)

Puffer P1:	50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 100µg/ml RNase, pH=8,0
Puffer P2:	0,2M NaOH, 1% SDS
Puffer P3:	3M Kaliumazetat, pH=5,0
EB-Puffer:	10 mM, Tris-HCl, pH=8,5

3.2.11 Maxipräparation

Zur Gewinnung größerer Mengen an Plasmid-DNA wurden mindestens 1l LB/Amp Medium pro Klon als Flüssigkultur angeimpft, inkubiert und in 1l großen Flaschen in einer Beckmann Avanti A10 Zentrifuge bei 5200xg, 4°C zentrifugiert. Das "PureLink HiPure Plasmid Filter Purification Kit" der Firma Invitrogen wurde nach den Angaben des Herstellers zur Plasmidisolation verwendet.

3.2.12 Sequenzierung der DNA

Die Bestimmung der Nukleotidfolge der klonierten Plasmide wurde nach der Didesoxymethode nach Sanger durchgeführt. Zur Aufbereitung der Proben in 0,2ml Reaktionsgefäßen wurde das "ABI PRISM BigDye Terminator Sequencing Ready Reaction Kit V1.1" der Firma Applied Biosystems verwendet. Zur Vervielfältigung der zu bestimmenden DNA-Proben wurde eine PCR durchgeführt. Für einen 10µl Ansatz wurden 0,5µg DNA mit 2µl BIGDye (Applied Biosystems), 1µl Sequenzier-Primer (5µM), 2µl 5x Sequenzierpuffer und der entsprechenden Menge an ddH₂O in ein 0,2ml Reaktionsgefäß gemischt. Für die nachfolgende Fällungsreaktion wurden 2µl 125mM EDTA, 2µl 3M Na-Azetat (pH=5,2) sowie 50µl Ethanol „pro analysis“ (p.a.) zu dem PCR-Ansatz gegeben und alles in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei RT wurden die Ansätze zentrifugiert (21000xg, 30min, 4°C) und der Überstand vollständig abgenommen. Danach folgte ein Waschschrift mit 70µl 70%-igem kaltem Ethanol und erneut ein Zentrifugationsschritt (21000xg, 15min, 4°C). Der Überstand wurde vollständig abgenommen und die farblose DNA bei RT getrocknet. Abschließend wurde die DNA in 15µl HighDye (Applied Biosystems) gelöst und bis zur Auswertung im Dunkeln bei 4°C gelagert.

3.2.13. Transfektion durch Calcium-Phosphat-Präzipitation

Plasmide, die klonierte und sequenzierte lösliche Varianten der extrazellulären Domäne von C-Typ-Lektinrezeptor-DNA mit einem 6xHistidin-Tag enthielten, wurden in HEK293T-Zellen transfiziert. In den Überstand sezernierte, produzierte Proteine wurden anschließend mithilfe von Nickel-Nitril-Tri-Azetat (Ni-NTA)-Superflow Beads (QIAGEN) gereinigt. Die Transfektion erfolgte in adhärenente HEK293T-Zellen. Diese wurden 48h vorher so gesplittet, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine 80%-ige Konfluenz aufwiesen. Vor Beginn der Transfektion wurde altes Kulturmedium von den Zellkulturplatten (Ø 13cm) entfernt und jede Platte mit 24ml 37°C warmem DMEM- low IgG Medium überschichtet. Der Präzipitationsansatz pro Zellkulturplatte, bestehend aus 10µl Chloroquin (100mM), 2,65ml ddH₂O, 60µg Plasmid-DNA, 5µg Helper Plasmid (553) und 300µl CaCl₂ (2,5M), wurde in einer 250ml Zellkulturflasche (Greiner) gemischt. Davon wurden 12ml tropfenweise unter ständigem Einbringen von Luftblasen durch eine zweite Pipettierhilfe in 12ml 2xHBS gegeben, bis eine opaleszierende Lösung entstand. Auf jede Zellkulturplatte wurden vorsichtig 6ml der Suspension getropft, die Platten geschwenkt und im CO₂-Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit für 8h kultiviert. Anschließend wurde ein Mediumwechsel vollzogen und die Zellen mit vorgewärmtem Serumfreien DMEM-Nutridoma Medium weiterkultiviert. Nach 5-7 Tagen wurde der Überstand abgenommen, sowie restliche Zellen durch Zentrifugation (500-700xg, 10min, 4°C) entfernt. Natriumazid (NaN₃ 20%ige Lösung) wurde auf eine Endkonzentration von 0,09% des gewonnenen Überstandes zur Prävention gegen Mikroorganismen zugegeben und der proteinhaltige Überstand danach durch einen 0,22µm Filter (Stericup®Filter Units 1000ml, Millipore) sterilfiltriert.

2x HBS Puffer: 50mM HEPES, 280mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, pH=7,09
DMEM-low IgG Medium : DMEM-Medium (500ml), 5%FCS low IgG (Invitrogen), 1mM Natriumpyruvat, 100U/ml Pen, 100µg/ml Strep und 2mM L-Glutamin
DMEM-Nutridoma Medium: DMEM-Medium (500ml), 0,5% Nutridoma (Roche), 1mM Natriumpyruvat, 100U/ml Pen, 100µg/ml Strep und 2mM L-Glutamin

3.2.14. Ammoniumsulfatfällung und Dialyse von Proteinen

Der sterilfiltrierte Transfektionsüberstand wurde gewogen, und stündlich 15% des Gesamtgewichts an Ammoniumsulfat (132,14g/mol, >95%p.a., Roth) zugegeben. Insgesamt wurden vier Portionen Ammoniumsulfat beigefügt, und das Auflösen des Salzes durch stetiges Rühren bei 4°C über Nacht beschleunigt. Da nach wurde die Ammoniumsulfatlösung in einer Beckmann Coulter Allegra®15-XR Zentrifuge zentrifugiert (1325xg, 45min, 4°C). Der Überstand wurde in neue Zentrifuge nbecher (250ml Corningröhrchen, Corning) gegeben und nochmals zentrifugiert. Das präzipitierte Protein wurde insgesamt in 5-10ml 1xPBS resuspendiert. Ungelöstes Protein wurde vor dem Einfüllen in einen Dialyseschlauch durch Zentrifugation (1325xg, 5min, 4°C) eliminiert. In einem mit 1xPBS gefüllten 5l Becher wurde die Proteinlösung, an Styroporschwimmern befestigt, bei 4°C unter kontinuierlichem Rühren dialysiert. Nach zwei- bis dreimaligem Wechseln des 1xPBS wurde am nächsten Tag Ni-NTA bzw. ProteinG zugeben.

3.2.15 Reinigung der Proteine mit Ni-NTA Beads

Proteine, welche einen 6xHis-Tag tragen, können durch die kovalente Bindung der Histidinreste an Metallchelatoren (Nickel) gebunden werden. Die verwendeten Puffer wurden frisch hergestellt, der pH-Wert eingestellt und sterilfiltriert. Ni-NTA-Superflow Beads (QIAGEN) wurden gut gemischt, 500µl davon in einem Polypropylenröhrchen mit eiskaltem PBS versetzt und bei 800xg, 10min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Beads erneut mit eiskaltem PBS resuspendiert. Dieser Vorgang wurde zwei- bis dreimal wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde die dialysierte Proteinflüssigkeit zu den Beads gegeben und mit einer bestimmten Menge (Volumen der Proteinflüssigkeit/10) an 10xLysepuffer (eiskalt) versetzt. Der Ansatz wurde für mindestens 12-16h auf einem Überkopfschüttler bei 4°C langsam rotiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Ni-NTA Beads bei 800xg, 10min und 4°C zentrifugiert, mit Waschpuffer versetzt und erneut zentrifugiert. Der Waschpuffer wurde aufbewahrt, die Beads in ca. 2ml Waschpuffer resuspendiert und auf eine Poly-Prep Chromatographie Säule (BioRad) gegeben. Nach zweimaligem Waschen der Säule mit je 5ml Waschpuffer konnten die Proteine in zehn Fraktionen eluiert werden. Dafür wurde die Säule mit je 500µl Imidazolhaltigem EB-Puffer beladen, jede Fraktion separat in einem 1,5ml Reaktionsgefäß aufgefangen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt.

10xLysepuffer (pH=8,0):	500mM NaH ₂ PO ₄ , 3000mM NaCl, 100mM Imidazol, 0,05% Tween20 in ddH ₂ O
Waschpuffer (pH=8,0):	50mM NaH ₂ PO ₄ , 300mM NaCl, 20mM Imidazol, 0,05% Tween20 in ddH ₂ O
Elutionspuffer (pH=8,0):	50mM NaH ₂ PO ₄ , 300mM NaCl, 250mM Imidazol, 0,05% Tween20 in ddH ₂ O

3.2.16 Reinigung der Antikörper (TROMA1) mittels Protein-G Beads

Von in 100% ISF-Medium kultivierten TROMA1-Hybridomzellen wurde der Überstand durch Zentrifugation bei 800xg, 10min, 4°C abgenommen und mittels eines 0,22µm Sterilfilters (Millipore) sterilfiltriert. Zur Wachstumsinhibition von Mikroorganismen wurde der Antikörperflüssigkeit die Menge an Natriumazid (NaN₃ 20%ige Lösung) zugegeben, um eine Endkonzentration von 0,09% zu erhalten. Anschließend wurden 500µl in Ethanol gelagerter Protein-G Sepharose (GE Healthcare) dreimal in jeweils 10ml PBS durch Zentrifugation bei 233xg, 5min, 4°C in einem 16ml Polypropylenröhrchen gewaschen. Dies sollte die Reste des Ethanols entfernen, um eine Bindung der Antikörper an die Protein-G Beads zu gewährleisten. Anschließend wurden die Beads in den Überstand der TROMA1-Zellen gegeben. Das Polypropylenröhrchen wurde bei 4°C für ca. 16h auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Protein-G Beads bei 233xg, 5min und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach folgten zwei Waschschriffe mit PBS und das vollständige Verwerfen des Überstandes. Die verbleibenden Beads wurden in 5ml PBS resuspendiert, über eine Poly-Prep Chromatographie Säule (BioRad) gegeben und aufgefangen. Nachdem zweimal 5ml PBS zum Waschen über die Säule gelaufen waren, konnte der Antikörper eluiert werden. Dafür wurden 100µl 1M Tris-HCl (pH=8,0) in ein 1,5ml Reaktionsgefäß vorgelegt und die Säule mit jeweils 500µl 0,1M Glycin-HCl (pH=2,7) beladen. Es wurden zehn Fraktionen eluiert, der Inhalt im Reaktionsgefäß gut gemischt und bis auf weiteres auf Eis gelagert. Das Vorhandensein von Antikörpern in den Fraktionen wurde mittels Coomassie-Gel (s. 3.2.17) ermittelt. Anschließend wurden die proteinhaltigen Antikörper-Fraktionen vereinigt, dialysiert und die finale Antikörperkonzentration nach dem LPS-Removal (s. 3.2.20) mithilfe der Bradford-Methode (s. 3.2.19) bestimmt.

3.2.17 Coomassie-Gel

Um das Vorhandensein von Protein in den eluierten Fraktionen mittels Coomassie SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) untersuchen zu können, wurden 20µl jeder Fraktion in zehn sterile 1,5ml Reaktionsgefäße überführt. Zur Denaturierung der Proteine wurden 5µl eines DTT-haltigen Proteinprobenpuffers zu jeder Fraktion gegeben und die Ansätze für 10min bei 95°C erhitzt. Das Trenngel wurde nach dem Ausgießen zwischen zwei Glasplatten mit Wasser überschichtet, um eine gerade Trennlinie zwischen den zwei Gelen zu erhalten. Auf das ausgehärtete Trenngel wurde das Sammelgel gegossen und ein 1,5mm starker Kamm mit 15 Taschen eingefügt. Das hergestellte Gel wurde in die Gelkammer (BioRAD) gestellt, welche mit 1xSDS-Laufpuffer aufgefüllt wurde. Die erhitzten Proteinfraktionen sowie 3µl Proteinstandard (PageRuler, Fermentas) wurden auf das Gel aufgetragen. Bei 80-130V wurden die Proteine in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Nachdem die Laufbande aus dem Gel gelaufen war, wurde das Gel aus der Vorrichtung genommen, mit Coomassie-Lösung überschichtet und 10min auf dem Schütteltisch gelagert. Danach wurde es stündlich, insgesamt drei- bis fünfmal, mit Entfärberlösung behandelt und anschließend 30min in eine Trocknerlösung gelegt. In Zellophanpapieren und Geltrocknungsrahmen (Roth) trocknete das Gel für ca. 12h. Von den eluierten Fraktionen 1-10 wurden proteinhaltige Fraktionen vereint und in einer Rahmenmembran (Slight-A-Lyzer®Dialysis Cassette Extra Strength, Thermo Scientific) in 1xPBS bei 4°C dialysiert. Nach zweimaligem Wechseln des 1xPBS wurde am nächsten Tag die Proteinflüssigkeit der Dialysekassette entnommen und die Proteinkonzentration per Bradford-Test bestimmt (s. 3.2.19). Daraufhin wurde ein Lipopolysaccharid (LPS)-Removal, LPS-Test (s. 3.2.20), gegebenenfalls eine Anreicherung (Konzentration) des Proteins (s. 3.2.18) durchgeführt und die Proteine in Aliquots bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Trenngel 12,5%:	5,75ml ddH ₂ O, 4ml Acrylamid/Bisacrylamid (Rotiphorese30, Roth), 1,25ml Trenngelpuffer (3M Tris-HCl, pH=8,8), 100µl SDS (10%), 90µl APS (10%), 10µl TEMED
Sammelgel 5%:	7,34ml ddH ₂ O, 1,33ml Acrylamid/Bisacrylamid (Rotiphorese30, Roth), 1,25ml Sammelgelpuffer (1M Tris-HCl, pH=6,8), 100µl SDS (10%), 90µl APS (10%), 20µl TEMED
Coomassie-Lösung:	0,55mM Coomassie Brilliant Blue R250, 30% Methanol, 10% Essigsäure
Entfärberlösung:	30% Methanol, 10% Essigsäure,
Trocknerlösung:	10% Glycerin w/v, 20% Techn. Ethanol v/v

1x SDS-Laufpuffer:	0,5% SDS (w/v), 125mM Tris-HCl, 960mM Glycerin
Protein-Ladepuffer:	0,5M Tris-HCl (pH=6,8), 10% SDS, 87% Glycerol, 1% Bromphenolblau (0,62g DTT), 0,5M EDTA

3.2.18 Konzentration von Protein durch Zentrifugation

Bei sehr geringer Proteinkonzentration und nach dem LPS-Removal erfolgte die Einengung der Proteine durch Zentrifugation. In einem Zentrifugationsröhrchen mit Filter wurde die Proteinflüssigkeit bei 1500xg und 4°C für 8-15min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal mit eiskaltem PBS wiederholt. Im letzten Waschschrift wurde die Proteinlösung auf ein Volumen von ca. 500-1000µl einkonzentriert. His-getaggte Proteine und Antikörper wurden dabei in Amicon®Ultra Centrifugal Filter Units (Millipore) mit einer Porengröße für Proteine größer 10000Da zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein steriles 1,5ml Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2.19 Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Zur quantitativen Bestimmung der löslichen, produzierten C-Typ-Lektinrezeptor-Proteine wurde ein Bradford-Test durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine photometrische Methode, bei der auch kleine Mengen an Protein erfasst werden können (10-100µg/ml). Um die ermittelten Extinktionswerte einer Proteinkonzentration zusprechen zu können, wurde eine Eichgerade erstellt. Die dafür benötigte Verdünnungsreihe (10-500µg/µl) wurde mit Bovinem Serum Albumin (BSA) (Roth) in 1xPBS angefertigt. Je 350µl ddH₂O und 100µl 5xBradford-Stammlösung (Coomassie Brilliant Blue R250) wurden auf die Proben gegeben und sofort auf einem Vortexer gemischt. Die zu messenden Proteine wurden ebenfalls in verschiedenen Verdünnungen (1:5–1:50) in 1xPBS vorbereitet und mit ddH₂O und 5xBradford-Stammlösung versetzt. Die Messung der Optischen Dichte (OD) erfolgte mithilfe einer 2ml UV-Einmalküvette (Eppendorf) bei einer Wellenlänge von 595nm am Bio-Photometer (Eppendorf). Ein Nullwert wurde mit einer Mischung aus 50µl PBS + 350µl ddH₂O + 100µl 5xBradford-Stammlösung (BioRad) eingestellt. Durch das Auftragen der bekannten Proteinkonzentrationen resultierte eine Eichgerade, an der sich die Konzentrationen der Proben ablesen ließen. Hierbei mussten die Verdünnungen der Proteine berücksichtigt und verrechnet werden. Die Durchführung des Bradford-Testes zur Konzentrationsbestimmung von Antikörpern (s. 3.2.16) geschah mithilfe von IVIg als Standard (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Nimmerjahn, Lehrstuhl für Genetik, Universität Erlangen-Nürnberg).

3.2.20 LPS-Removal und LPS-Test

Um eine mögliche Kontamination der rekombinant in Zellkultur hergestellten Proteine mit Endotoxinen auszuschließen, wurden zuerst ein LPS-Removal und anschließend ein LPS-Test durchgeführt. Die maximale Proteinkonzentration für die Gewährleistung eines erfolgreichen LPS-Removals liegt bei 1mg/ml. Für das LPS-Removal wurden neun Teile Proteinlösung mit einem Teil 10% Triton X-114 versetzt und somit eine Endkonzentration von 1% Triton eingestellt. Das 15ml Polypropylenröhrchen, in dem sich die Lösung befand, wurde 30s bei maximaler Geschwindigkeit auf dem Vortexer gemischt, bis die Lösung klar erschien. Daraufhin wurde der Ansatz für 15min in ein Eisbad gestellt, 30s auf dem Vortexer gemischt und 10min in 42°C warmem Wasserbad inkubiert. Nun besaß die Lösung eine opaleszierende Farbe und wurde bei 2000xg, 5min und RT zentrifugiert. Dieser Zentrifugationsschritt resultierte in einer Phasentrennung der angesetzten Flüssigkeit. In der oberen Phase befand sich die von LPS-befreite Proteinlösung, in der unteren die Tritonlösung inklusive Endotoxin. Vorsichtig wurde die obere Schicht in ein neues Polypropylenröhrchen überführt.

Nach der Konzentrationsbestimmung der Proteine (s. 3.2.19) wurde mithilfe des "Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Kits" von LONZA das Vorhandensein von LPS in den Proteinlösungen untersucht. Dazu wurden 5µg der jeweiligen Probe in je ein Well einer 96-Well PCR-Platte überführt. Die im Kit enthaltene Endotoxinlösung wurde 30s auf dem Vortexer gemischt und die Stopp-Reagenz-Lösung (25% Essigsäure) vorbereitet. Die Standardkurve der Endotoxinlösung wurde anhand einer Verdünnungsreihe von 0,1-1Units (U) erstellt. Anschließend wurde die mit Proben beladene PCR-Platte in einen BioRAD C1000™ ThermalCycler gestellt, welcher bereits auf 37°C vorgewärmt war. Zu den Proben wurden je 50µl, 37°C warmes LAL-Reagenz zugegeben und 10min inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von je 50µl, 37°C warmem Stopp-Reagenz auf die Proben. Alle Ansätze wurden in eine unbeschichtete 96-Well ELISA-(enzyme-linked-immunosorbent-assay) Platte (Greiner) gegeben und im SpectraMax 190 ELISA-Reader (Molecular Devices) bei 406nm ausgewertet.

3.2.21 Mykoplasmentest

Um eine Kontamination der Zelllinien mit Mykoplasmen und Acholeplasmen auszuschließen, wurde das Testkit Venor GeM nach Angaben des Herstellers (Biochrom) verwendet. Der Test basiert auf dem Prinzip der Polymerasekettenreaktion, wobei die Primer spezifisch an einen bestimmten Abschnitt (16s rRNA Region) der Mykoplasmen-DNA binden.

Durch eine interne DNA-Kontrolle konnten fehlerhafte, inhibierte oder falsch negative PCR-Ansätze erkannt werden. Die regelmäßige Wiederholung der Tests war nötig, um eine Neukontamination schnellstmöglich entdecken zu können. Für den Ansatz wurden 500µl Medienüberstand in ein 1,5ml Reaktionsgefäß gegeben, bei 18150xg, 5min, 4°C zentrifugiert und für 10min bei 95°C erhitzt. Der Zentrifugationsschritt wurde einmal wiederholt. Der Überstand wurde in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und fungierte als Template für die nachfolgende PCR-Reaktion in einer BioRAD C1000™ ThermalCycler PCR-Maschine.

PCR Ansatz

1µl	Probe/Positivkontrolle/H ₂ O
1µl	Internal-Control
1µl	Nukleotidmix
1µl	Reaction Buffer
0,1µl	Taq-DNA-Polymerase (5U/µl) (Peqlab)
5,9µl	ddH ₂ O
Σ10µl	

PCR Programm

Initiale Denaturierung	95°C	2min	
Denaturierung	95°C	10s	} 25x
Primerannealing	55°C	30s	
Elongation	72°C	30s	
Finale Elongation	72°C	4min	
	12°C	hold	

Die Ergebnisse der PCR wurden mittels TAE-Agarose-Gelelektrophorese (s. 3.2.3) verifiziert.

3.2.22 Kultivierung von Zelllinien

Arbeiten in der Zellkultur fanden ausnahmslos unter Sterilwerkbänken von Heraeus (Herasafe, KS18, Hanau) statt. Die verwendeten Zelllinien wurden in 25cm² bzw. 75cm² großen Zellkulturflaschen oder -schalen im CO₂-Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nach dem Erreichen einer Dichte von 80-90% wurden die verwendeten HEK293T-Zellen ca. 2-3min trypsinisiert (0,25% Trypsin/EDTA), bis sich die Zellen ablösten. Daraufhin wurde mithilfe von handwarmem DMEM-Standard-Medium

die Trypsinisierung gestoppt und die Zellen bei 800xg, 5min und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in DMEM-Medium resuspendiert und die Zellen mit einer Dichte von mindestens 1×10^4 Zellen/cm² in je 30ml DMEM-Medium ausgesät.

Die verwendeten TROMA1-Hybridomzellen wurden anfangs in RPMI-Standard-Medium kultiviert. Das Splitten der nicht-adhären Zellen erfolgte durch Umfüllen des Mediums inklusive Zellen in Polypropylenröhrchen und einer Zentrifugation bei 800xg, 5min und 4°C. Das Pellet wurde in RPMI-Medium resuspendiert und die Zellen in neue Zellkulturflaschen, mit einer Dichte von 5×10^5 Zellen/ml, ausgesät. Zur Antikörperproduktion wurden die TROMA1-Hybridomzellen auf Serum-freies ISF-Medium sukzessive umgestellt, bis die Hybridomzellen in 100% ISF-Standard-Medium kultiviert werden konnten.

DMEM-Standard-Medium: DMEM-Medium (500ml) mit 25ml fetalem Kälberserum (5% FCS, Biochrom), 5ml L-Glutamin (200mM), 5ml Penicillin/Streptomycin (10.000U/ml Penicillin und 10mg/ml Streptomycin), 5ml Natriumpyruvat (100mM)

RPMI-Standard-Medium: RPMI 1640-Medium (500ml, Invitrogen) mit 25ml FCS (5%, Biochrom), 5ml Penicillin/Streptomycin (10.000U/ml Penicillin und 10mg/ml Streptomycin), 5ml L-Glutamin (200mM), 5ml nicht essentielle Aminosäuren (1% NEA)

ISF-Standard-Medium: ISF-Medium (500ml, Biochrom) mit 5ml Penicillin/Streptomycin (10.000U/ml Penicillin und 10mg/ml Streptomycin), 5ml L-Glutamin (200mM)

3.2.23 Berechnung der Zellzahl

Um eine möglichst genaue Zelldichte gewährleisten und den Anteil toter Zellen einschätzen zu können, wurde ein Trypanblau-Test durchgeführt. Hierbei färben sich tote Zellen mit Trypanblau an, während lebende Zellen farblos bleiben, da der Farbstoff nicht in der Lage ist, eine intakte Zellmembran zu passieren. Für den Test wurden 5µl der in Medium resuspendierten Zellen in 45µl Medium verdünnt, in ein 1,5ml Reaktionsgefäß gegeben und mit 5µl Trypanblau-Lösung versetzt. Das Auszählen erfolgte in einer Zählkammer nach NEUBAUER, in welcher alle vier Großquadrate ausgezählt wurden, und die Zellzahl nach folgender Formel berechnet wurde:

$$\frac{\text{Anzahl ausgezählter Zellen}}{\text{Anzahl ausgezählter Quadrate}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerfaktor} = \text{Zellzahl/ml}$$

(Kammerfaktor = 10^4 , Verdünnungsfaktor = 10)

Trypanblau-Lösung: 100ml ddH₂O, 9g NaCl, 0,5g Trypanblaupulver, sterilfiltriert
(s.f.)

3.2.24 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen nach Zentrifugation (800xg, 5min, 4°C) in Einfriermedium (FCS + 10% Dimethylsulfoxid (DMSO)) resuspendiert und in Kryovials überführt. Anschließend erfolgte ein schrittweises Abkühlen um 1°C pro Minute bis auf -80°C in einem Mr. Frosty Einfriergefäß (NUNC). Zur Wiederverwendung und Kultivierung wurde ein Kryovial ohne Verzögerung im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Dabei war es entscheidend, die aufgetauten Zellen umgehend mit Standardmedium zu versetzen und das zelltoxische DMSO mittels Zentrifugation (800xg, 5min, 4°C) von den Zellen zu trennen. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und ausgesät.

3.2.25 Immunfluoreszenzmikroskopie

Zur histologischen Untersuchung von Kryoschnitten von Milz, Thymus und Tonsillen wurden Gewebestücke der frisch entnommenen Organe unter einer Sterilwerkbank von Heraeus (Herasafe KS18, Hanau) auf eine Größe von ca. 8 x 8 x 5mm mit einem Skalpell geschnitten. Anschließend wurden die Gewebestücke in 1xPBS geschwenkt und in Kimwipe-Tüchern (KIMWIPE, Kimberly-Clark Corporation, USA) getrocknet. In O.C.T. TissueTek (Sakura Finetechnical Co, Tokyo, Japan) und 15 x 15 x 5mm großen Cryomold Intermediate Kassetten (Sakura Finetechnical Co, Tokyo, Japan) folgte die luftblasenfreie Einbettung der Gewebe. Daraufhin wurden die Gewebe für 20min auf Trockeneis eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Nach Etablierung der Fixierungsmethode und Dicke der Gewebe (10µm, 12µm, 16µm und 20µm) wurden zur weiteren Charakterisierung 10µm dicke, serielle Schnitte der eingefrorenen Gewebe am Kryotom (JUNGCM 3000, Leica, Bensheim) auf einen Objektträger Superfrost®Plus (Thermo Scientific, Waltham, USA) gebracht und 2,5min in Aceton bei Raumtemperatur in Färbetrog-Glasschälchen (Roth) fixiert. Danach wurden die Schnitte für 12h im Dunkeln luftgetrocknet und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Für die eigentliche Immunfluoreszenzfärbung wurde das Gewebe für zweimal 5min in 1xPBS rehydriert und

der Objektträger vorsichtig mit Kimwipe-Tüchern um die Schnitte herum getrocknet. Die einzelnen Schnitte wurden mit einem Fettstift (locker marker, Daido Sangyo, Japan) eingekreist, um den Verlust der dort später aufzubringenden Flüssigkeit und eine Kontamination mit der Färbung auf dem nächstliegenden Gewebeschnitt zu minimieren. Zur Verhinderung einer unspezifischen Bindung biotinylierter Antikörper an zelluläres Biotin wurden die Gewebeschnitte zunächst in 50µl einer Streptavidin-Lösung für 15min auf einem Schwenkschüttler bei 50rpm und RT inkubiert. Nach dem Waschen in 1xPBS wurden die Schnitte mit 50µl einer Biotin-Lösung für 10min bei RT und 50rpm auf einem Schwenkschüttler gelagert. Abschließend wurde ein Waschschriff für 2min in 1xPBS durchgeführt und die Restflüssigkeit mithilfe von Kimwipe-Tüchern entfernt. Die Primärantikörper wurden in Antikörperpuffer verdünnt auf die Schnitte aufgetragen und alles in einem dunklen, feuchten Behältnis für mindestens 30min bei RT auf einem Schwenkschüttler inkubiert. Die Objektträger wurden anschließend dreimal 3min in 1xPBS gewaschen, die Restflüssigkeit mit Kimwipe-Tüchern entfernt und die Sekundärantikörper aufgetragen. Anschließend erfolgten nochmals ein Waschschriff von dreimal 3min, das Entfernen der Restflüssigkeit, sowie ggf. das Aufbringen der Tertiärantikörper. Abschließend wurden die Gewebeschnitte dreimal 3min in 1xPBS gewaschen. Nach Einbettung in MOWIOL und dem Aufbringen des Deckgläschens, wurden die Proben mindestens 12h in Dunkelheit gelagert, um einem Verblässen der labilen Antikörper entgegenzuwirken. Am nächsten Tag erfolgte eine Auswertung der Färbungen an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop (ZEISS LSM700, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinikum Erlangen). Dieses Mikroskop besitzt drei Laser mit Wellenlängen von 488, 555 und 639nm, wodurch drei Farben gleichzeitig analysiert werden können.

1xPBS Puffer:	137,0mM NaCl, 10,0mM Na ₂ PO ₄ , 1,76mM KH ₂ PO ₄ , 2,7mM KCl, (Invitrogen)
Humaner Serum Puffer:	5% Humanes Serum (LONZA, Lot Nr. 310-898-7025) in 1xPBS
Antikörperpuffer:	89% 1xPBS, 10% (BSA), 1% Fetales Kälberserum (FCS) lowIgG (Invitrogen, Lot Nr. 16250)
MOWIOL:	6ml ddH ₂ O, 6g Glycerin, 2,4g MOWIOL® 4-88 (Roth), 12ml Tris-HCl (pH=8,5), 0,1% 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO)
Streptavidin-Lösung:	4 Tropfen Streptavidinreagenz (AbD Serotec, Düsseldorf) in 1ml Humanem Serum Puffer
Biotin-Lösung:	4 Tropfen Biotinreagenz (AbD Serotec, Düsseldorf) in 1ml Humanem Serum Puffer

4 Ergebnisse

Dendritische Zellen (DCs) spielen eine wichtige Rolle in der initialen Immunantwort gegen mikrobielle und virale Erreger. Neben der sehr guten funktionellen Charakterisierung muriner DC-Subpopulationen liegen in neueren Untersuchungen nicht nur Informationen von humanen Monozyten-gereiften DCs, sondern auch von DC-Subpopulationen aus peripherem humanem Blut vor. Diese DC-Subpopulationen sind charakterisiert durch ihre fehlende Expression der sogenannten „lineage“ (Lin) Marker (CD3, CD19, CD56) und eine hohe Expression an HLA-DR (DZIOANEK et al. 2000, THOMAS et al. 1993, FREUDENTHAL et al. 1990). Die Subpopulation der humanen mDC-1 DCs ist gekennzeichnet durch die hohe Expression von BDCA1 (*Blood derived Dendritic Cell Antigen*) und CD11c. mDC-2 DCs werden im Blut durch eine hohe Expression von BDCA3 und eine eher niedrige bis fehlende Expression von CD11c beschrieben. pDCs können durch die gleichzeitige Expression von CD123, BDCA2 und BDCA4 definiert werden (siehe Abb. 5, DZIOANEK et al. 2000). Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten die im Blut vorhandenen Subpopulationen in humanen lymphoiden Geweben von Milz, Thymus und Tonsillen durch konfokale Mikroskopie untersucht werden. Weiterhin sollte die Expression prominenter C-Typ-Lektinrezeptoren (hDCIR, DEC205, MMR, Langerin und DC-SIGN) in den verschiedenen humanen Geweben untersucht werden. Parallel sollten Varianten muriner und humaner C-Typ-Lektinrezeptoren (Clec9a, Dectin-1, Dectin-2 und Langerin) kloniert, in einer His-getaggen Version als Plasmid in HEK293T-Zellen transfiziert und lösliche C-Typ-Lektinrezeptoren als Protein produziert werden. Die löslichen Proteine sollten abschließend zur Antikörperproduktion bereitgestellt werden.

4.1 Etablierung der Immunfluoreszenzmikroskopie an humanen Geweben

Die spezifische Bindung von Antikörpern an Zielzellen in Gewebeschnitten und damit die Qualität der erhaltenen Bilder in der Immunfluoreszenz ist abhängig von der Gewebebeschaffenheit, der Dicke des Gewebes, sowie der Fixierung mit der die Gewebe zur Antikörperbindung vorbehandelt wurden. Ein erstes Ziel der hier vorliegenden Doktorarbeit war daher die Etablierung der Immunfluoreszenzmikroskopie humaner Gewebe an Milzschnitten (Abb. 8).

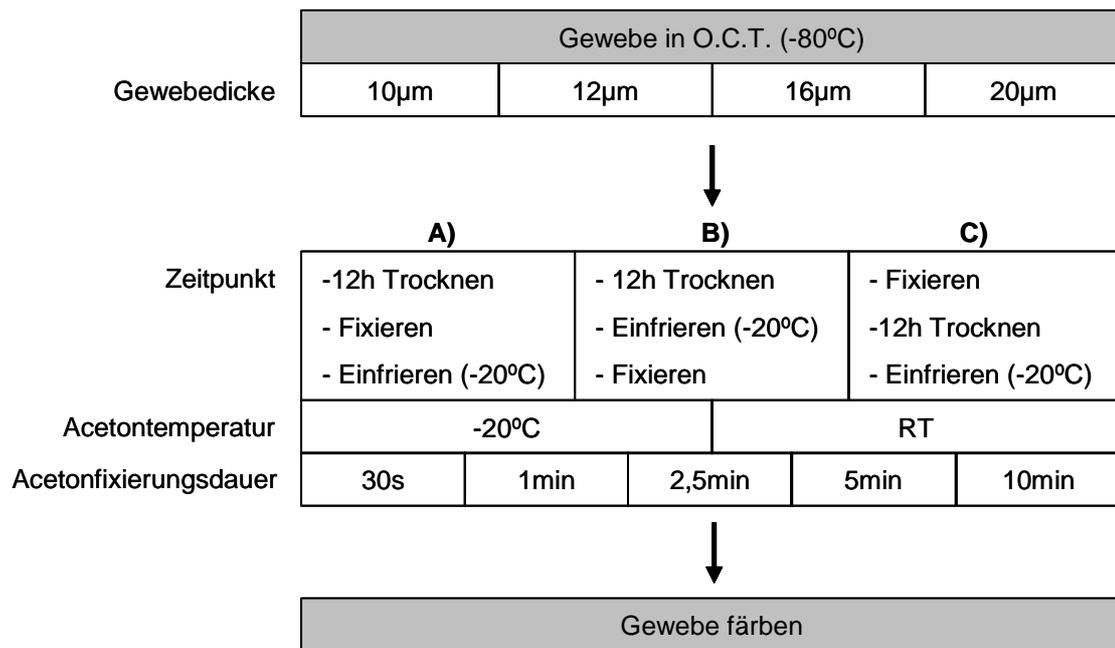


Abb.8 Schematische Darstellung zur Etablierung der Immunfluoreszenzmikroskopie

Zur Immunfluoreszenzanalyse humanen Gewebes wurden humane Milzpräparate in O.C.T. Lösung eingebettet und bei -80°C eingefroren. Am Kryotom wurden Gewebeschnitte von 10, 12, 16 und 20µm Dicke angefertigt. A) Gewebeschnitte wurden 12h bei RT getrocknet, anschließend in Aceton fixiert und bei -20°C eingefroren. B) Gewebeschnitte wurden 12h bei RT getrocknet, bei -20°C gefroren und nach Auftauen in Aceton fixiert. C) Gewebeschnitte wurden direkt in Aceton fixiert, 12h getrocknet und danach eingefroren (-20°C). A-C) Die Acetontemperatur (RT oder -20°C), sowie die Dauer der Acetonfixierung (30s, 1min, 2,5min, 5min und 10min) variierten. Nach dieser Prozessierung wurde das Gewebe mit verschiedenen Konzentrationen an Antikörpern immunhistologisch gefärbt.

Die in O.C.T. Tissue Tek eingebetteten und auf -80°C gefrorenen humanen Milzstücke wurden in 10, 12, 16 und 20µm dicken Schnitten auf Objektträger aufgebracht. Insgesamt wurden drei verschiedene Fixierungsmethoden getestet. Die erste bestand darin, die Schnitte 12h zu trocknen, zu fixieren und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C einzufrieren (Abb. 8A). Weiterhin wurde geprüft, ob es zu einer verbesserten Färbung kam, wenn die Gewebeschnitte nach dem Trocknen zunächst eingefroren und erst kurz vor dem Färben fixiert wurden (Abb. 8B). Die dritte Fixierungsmethode beruhte auf einem Fixieren der Gewebeschnitte, einem 12-stündigen Trocknen und dem anschließenden Einfrieren (Abb. 8C). Die Acetonfixierungsdauer variierte von 30s bis hin zu 10min, wobei die Temperatur des Acetons bei -20°C bzw. RT lag (Abb. 8). Nachdem alle Varianten der Gewebeprozessierung am konfokalen Mikroskop mittels einer Konzentrationsreihe an CD3, CD19 und CD11c Antikörpern (Daten nicht gezeigt) ausgewertet wurden, kann festgehalten werden, dass das Schneiden der Gewebe in 10µm dicke Schnitte, die 2,5-minütige Fixierung mit Aceton bei Raumtemperatur und die anschließende 12-stündige Trocknung der Gewebe bei Raumtemperatur, in der besten Bindung der Antikörper (siehe Material und Methoden 3.2.3) an die Gewebe und der schärfsten

Auflösung resultierte (Daten nicht gezeigt). Zudem wurden parallel die entsprechenden Antikörperverdünnungen getestet und eine Antikörperverdünnung von 1:50 für Primärantikörper festgesetzt. Für die Amplifikation biotinylierter Antikörper wurde entweder Streptavidin (SA)-Cy3 oder SA-Dy649 in einer getesteten Verdünnung von 1:400 verwendet. Das Signal der Phycoerythrin (PE)-gekoppelten Antikörper wurde mittels Ziege IgG α -PE (1:400) und Esel IgG α -Ziege-Dy549 (1:200) amplifiziert. Die Verstärkung des Signales Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-gekoppelter Antikörper erfolgte mit α -FITC-A488 (1:200) (Tab. 3). Um unspezifische Hintergrundsignale zu verringern, wurden vor dem Auftragen der Antikörper verschiedene Arten der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen im Gewebe getestet (Daten nicht gezeigt). Dabei konnte festgestellt werden, dass der Einsatz eines Fc-Blockes (Miltenyi) keine Vorteile für eine spezifischere Bindung der nachfolgend applizierten Antikörper zur Folge hat. Jedoch zeigte sich, dass neben dem Einsatz von Streptavidin/Biotin-Reagenzien auch das Blockieren der Gewebe mit humanem Serum unspezifische Signale in der Immunfluoreszenz minimieren konnte. Weiterhin wurden BSA (5%) und FCS (10%), verdünnt in PBS, als Verdünnungslösung für Antikörper und zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen im Gewebe verwendet. Alle zur Verfügung gestellten humanen Gewebe (Milz, Thymus und Tonsillen) wurden anschließend nach diesem Protokoll behandelt.

4.1.1 Humane Milz

4.1.1.1 Strukturgebende Färbungen

Um einen Überblick über anatomische Gegebenheiten der Milz zu erhalten und bei seriellen Schnitten dieselbe Region wiederfinden zu können, wurden Immunfluoreszenzbilder mit strukturgebenden Markern angefertigt. Nach Titration der Antikörper (Daten nicht gezeigt) konnten CD19⁺ B-Zellen und CD3⁺ T-Zellen in der weißen Pulpa, CD11c⁺ DCs und CD11b⁺ Monozyten/Makrophagen vorwiegend in der roten Pulpa der humanen Milz (freundlicherweise bereitgestellt durch Prof. Arndt Hartmann, Pathologie, und durch das HLA-Labor, Medizinische Klinik V, Universitätsklinikum Erlangen) detektiert werden. Die Immunfluoreszenzaufnahmen zeigen, dass T-Zellen in einer breiteren Zone sichelförmig um die B-Zellfollikel angeordnet sind, und wenige T-Zellen diesen Follikel vollständig umkreisen. In dieser Übergangszone von weißer zu roter Pulpa sind CD11b⁺ und CD11c⁺ Makrophagen, Monozyten und DCs lokalisiert (Abb. 9). Weiterhin waren CD11c⁺ Zellen nicht nur in der roten Pulpa, sondern auch innerhalb des B-Zellfollikels und in der Marginalzone zwischen weißer und roter Pulpa detektierbar.

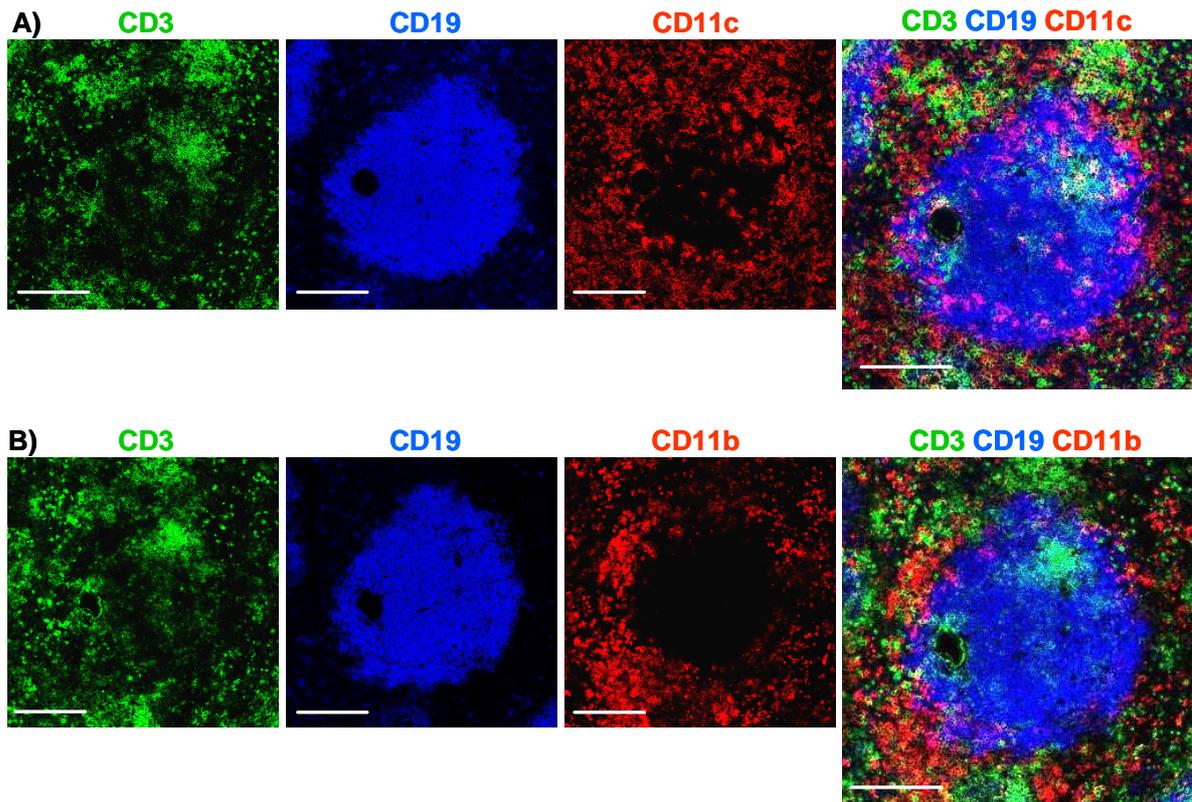


Abb.9 Immunhistologische Färbungen von Kryoschnitten humaner Milz

Die 10µm dicken Kryoschnitte wurden zur Identifizierung der B-Zellfollikel und T-Zellzone mit α -CD19-A647 (1:50) und α -CD3-A488 (1:50) für 30min bei RT gefärbt (A, B). Gleichzeitig wurden entweder A) CD11c⁺ bzw. B) CD11b⁺ Zellen mittels biotinylierter Antikörper (CD11b-bio, 1:50 und CD11c-bio, 1:50) gefärbt. Zur Detektion der biotinylierten Antikörper wurden die Gewebeschnitte anschließend mit Streptavidin (SA)-Cy3 (1:400) inkubiert. Die exemplarisch durchgeführten Färbungen (A, B) eines Spenders sind in einer 63-fachen Vergrößerung dargestellt und wurden insgesamt an Milzpräparaten fünf verschiedener Spender durchgeführt. Der Maßstabsbalken entspricht einer Größe von 200µm.

4.1.1.2 DC-Subpopulationen

Um DC-Subpopulationen in der humanen Milz zu charakterisieren, sollten zunächst die im Blut beschriebenen mDC-1 DCs, mDC-2 DCs und pDCs mit den dort verwendeten Markern untersucht werden (Abb. 5 MACDONALD et al. 2002, DZIOONEK et al., 2000). Für die Darstellung der DC-Subpopulationen in der humanen Milz wurden serielle Milzschnitte fünf verschiedener Milzspender mit Antikörpern gegen CD11c, BDCA1, BDCA2, BDCA3 und CD123 gefärbt und am konfokalen Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Dabei zeigte sich, dass CD11c⁺BDCA1⁺ mDC-1 DCs vor allem in der Marginalzone zwischen weißer und roter Pulpa sowie in der T-Zellzone lagen (Abb. 10A) und die zahlenmäßig größte DC-Subpopulation mit ca. 57 Zellen/800µm² bilden (Abb. 10B). Die zweitgrößte Subpopulation mit 48 Zellen/800µm² sind mDC-2 DCs, welche aufgrund der fehlenden bzw. sehr niedrigen Expression an CD11c schwieriger darzustellen waren (Abb. 10D). Zudem ist BDCA3 auch als Thrombomodulin bekannt, welches nicht nur auf DCs, sondern auch

auf CD11c-negativen Endothelzellen exprimiert ist (STEINIGER et al. 2001). Die $CD11c^{low}BDCA3^+$ mDC-2 DCs befanden sich hauptsächlich zirkulär in der Marginalzone und T-Zellzone angeordnet (Abb. 10C). Die $CD11c^+CD123^+BDCA2^+$ pDCs, mit ca. 18 Zellen/ $800\mu m^2$, zeigten eine Verteilung in der roten Pulpa (Abb. 10E, F). Weiterhin konnte in verschiedenen Immunfluoreszenzaufnahmen eine weitere pDC-2 ($CD123^-BDCA2^+$) Population identifiziert werden, die die zahlenmäßig geringste DC-Subpopulation mit nur 1 Zelle/ $800\mu m^2$ darstellt (Abb. 10F). Die Funktion dieser möglichen pDC-2 DCs wird derzeit im Labor von Frau Prof. Dudziak untersucht.

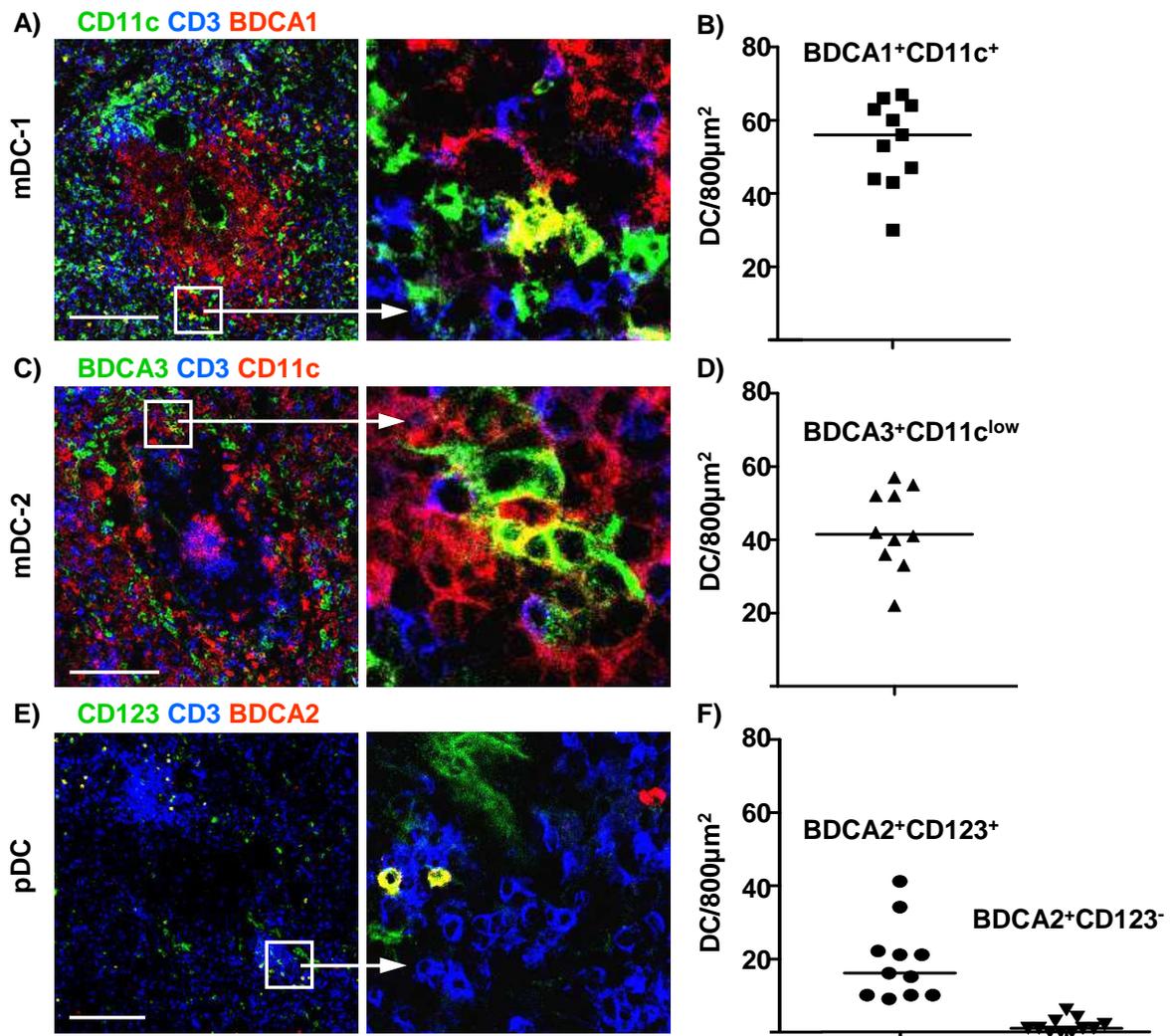


Abb.10 DC-Subpopulationen in humaner Milz

Dargestellt sind Immunfluoreszenzaufnahmen von DC-Subpopulationen: A, B) $CD11c^+BDCA1^+$ mDC-1 DCs C, D) $CD11c^{low}BDCA3^+$ mDC-2 DCs und E, F) $CD123^+BDCA2^+$ bzw. $CD123^-BDCA2^+$ pDCs in humaner Milz. A, C, E) Darstellung der Immunfluoreszenzaufnahmen in 63-facher Vergrößerung (linke Spalte, Maßstabsbalken beträgt $200\mu m$) sowie detaillierte Einzelzelldarstellungen (rechte Spalte). B, D, F) Auszählung der jeweiligen Subpopulation von A) mDC-1 DCs, C) mDC-2 DCs und E) pDCs auf einer Fläche von je $800\mu m^2$, wobei ein Punkt einer ausgezählten Immunfluoreszenzaufnahme entspricht. Es wurden je zwei bis vier Immunfluoreszenzbilder von jeweils fünf gesunden Spendern (HLA-Labor, Universitätsklinikum Erlangen) ausgezählt und ein Mittelwert errechnet.

4.1.1.3 Isotypkontrolle der BDCA-Antikörper in humaner Milz

Um in der Immunfluoreszenz das Vorhandensein falsch positiver Signale, welche durch die Antikörperstruktur aufkommen könnten, auszuschließen, wurden Isotyp-Kontrollantikörper für die Antikörper BDCA1, BDCA2 und BDCA3 verwendet (Abb. 11). Dabei wurde für BDCA1 ein IgG2a-Antikörper aus der Maus mit identischem Konjugat (PE) eingesetzt (Abb. 11A, B). Für BDCA2 und BDCA3 wurde eine IgG1 Isotypkontrolle mit PE-Konjugat genutzt (Abb. 11C-F). Von seriellen Milzschnitten wurden BDCA-Antikörperfärbungen und dazugehörige Kontrollfärbungen angefertigt und am konfokalen Lasermikroskop, mit exakt identischen Einstellungen, gescannt.

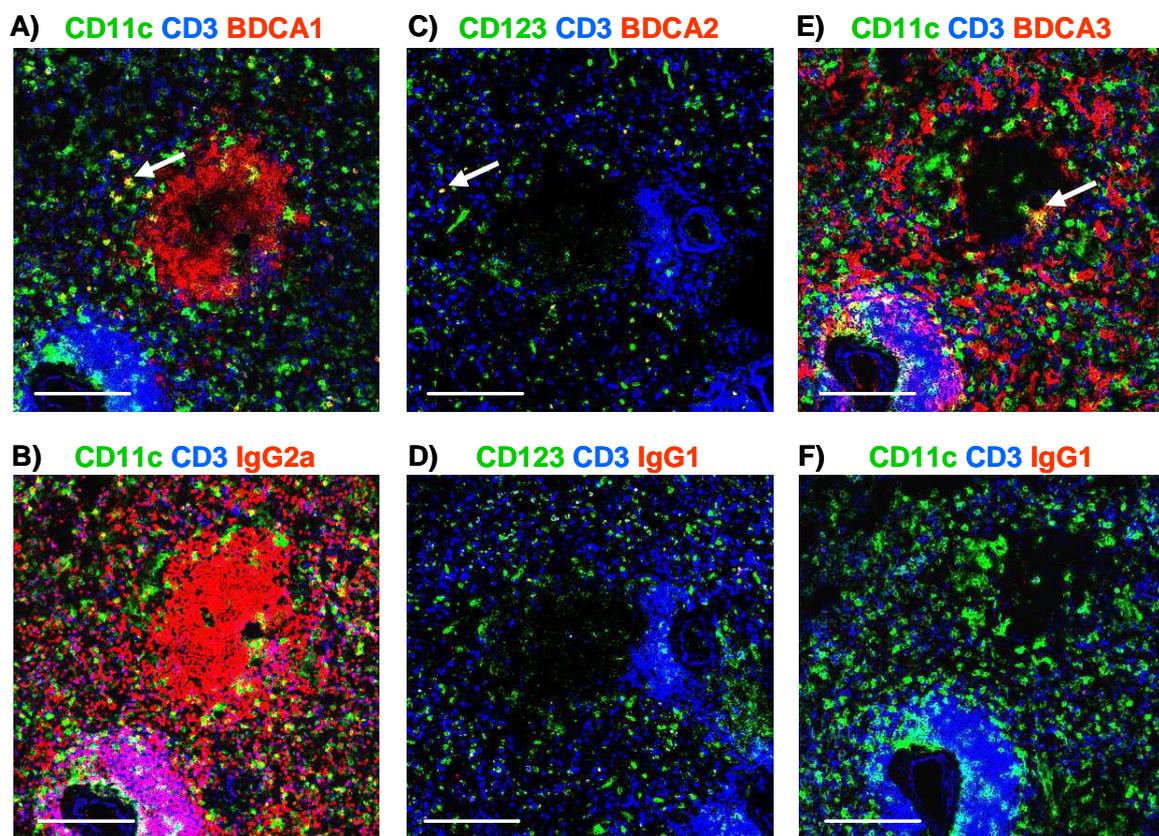


Abb. 11 Isotypkontrolle der Antikörper BDCA1, BDCA2 und BDCA3 in der Milz

Die 10µm dicken Kryoschnitte wurden mit zu testenden BDCA-Antikörpern (A, C, E) und Isotyp-Kontrollantikörpern (B, D, F) 30min bei RT inkubiert. Für die Kontrolle von α -BDCA1-PE (A, 1:50) wurde ein α -IgG2a-Kontrollantikörper (B, 1:50), für α -BDCA2-PE (C 1:50) und α -BDCA3-PE (E, 1:50) ein α -IgG1-Kontrollantikörper (D, F, 1:50) verwendet. PE-Signale wurden mittels Ziege IgG α -PE (1:400) sowie Esel IgG α -Ziege-Dy549 (1:200) amplifiziert. Die Gewebeschnitte wurden zusätzlich mit α -CD123-bio (A, B 1:50) und SA-Dy649 (1:400), bzw. α -CD11c-FITC (C-F, 1:50) und α -FITC-A488 (1:200) gefärbt bzw. Signale amplifiziert. Beispiele von DC-Subpopulationen A) mDC-1 DCs, C) pDCs und E) mDC-2 DCs sind mit Pfeilen gekennzeichnet. CD3 wurde als strukturgebender Marker verwendet und Gewebeschnitte mit α -CD3-A488 (A, B, 1:50) bzw. α -CD3-A647 (C-F, 1:50) gefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht einer Größe von 200µm.

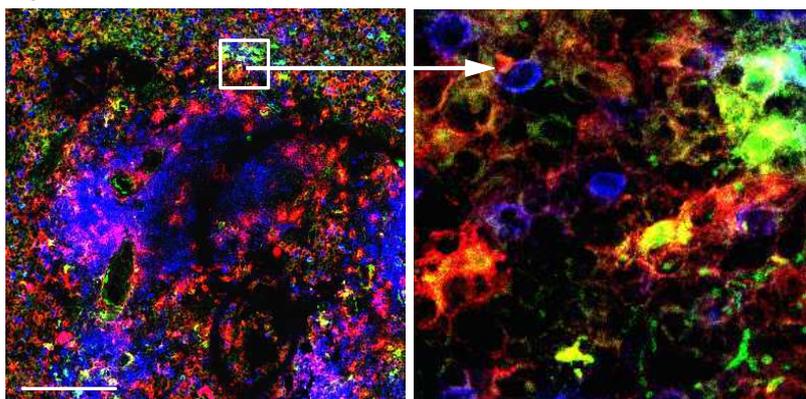
Nach Auswertung der Bilder zeigten die Kontrollfärbungen für BDCA3 und BDCA2 keine Färbung, wodurch die jeweiligen Antikörper im humanen Milzgewebe als spezifisch bezeichnet werden können (Abb. 11B, F). Die BDCA1-Kontrolle zeigte im Gegensatz dazu eine Färbung sehr vieler Zellen (Abb. 11B), die jedoch eine andere Struktur aufwiesen, als jene Zellen die nur für den BDCA1-Antikörper positiv gefärbt wurden (Abb. 11A, B). Weiterhin gab es im Vergleich zur Antikörperbindung von BDCA1 an mDC-1 DCs keine doppelt positiven Signale von IgG2a mit CD11c. Dies spricht für eine Bindung des Kontrollantikörpers an Fc-Rezeptoren oder andere unbekannte Strukturen auf der Zelloberfläche.

4.1.1.4 C-Typ-Lektinrezeptor-Färbungen

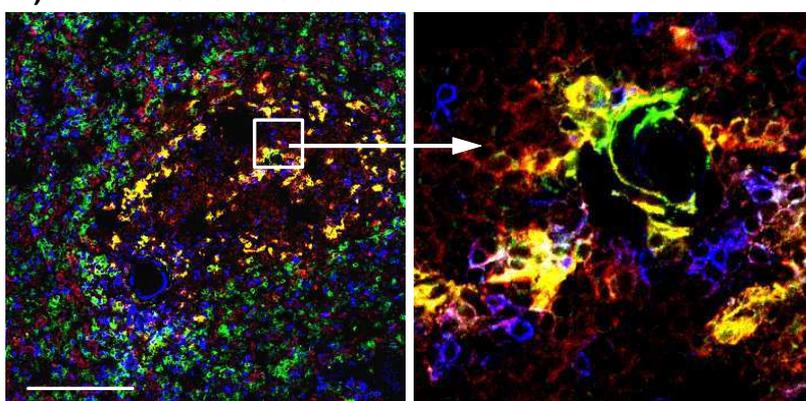
Neben der Analyse der DC-Subpopulationen sollte auch untersucht werden, welche C-Typ-Lektinrezeptoren in der humanen Milz exprimiert werden. Dazu wurden die kommerziell verfügbaren Lektinrezeptor-Antikörper für Langerin (CD207), DC-SIGN (CD209), MMR (CD206) und DEC205 (CD205) sowie der von Gordon Heidkamp produzierte monoklonale Antikörper gegen hDCIR (15E12) (HEIDKAMP et al. 2010) verwendet (Abb. 12A-E).

Die Auswertung der Immunfluoreszenzbilder zeigte, dass DC-SIGN⁺ Zellen vor allem in der roten Pulpa, außerhalb des Milzfollikels, zu finden sind (Abb. 12A, links). Weiterhin konnten zwei unterschiedliche Zelltypen identifiziert werden: CD11c⁺DC-SIGN⁺ sowie CD11c⁻DC-SIGN⁺ Zellen (Abb. 12A, rechts). Die Expression von DEC205 hingegen beschränkte sich vor allem auf Zellen innerhalb des Milzfollikels (Abb. 12B, links). Diese waren sowohl DEC205⁺ als auch CD11c⁺ (Abb. 12B, rechts). Die DCIR⁺ Zellen zeigten eine allgemeine Verteilung in der roten Pulpa und waren entweder CD11c⁺ oder CD11c⁻ (Abb. 12C). Eine Expression von MMR war auf vielen Zellen der roten Milzpulpa zu sehen (Abb. 12D, links). Vereinzelt waren CD11c⁺MMR⁺ Zellen in der Marginalzone vorhanden (Abb. 12D, rechts). Langerin⁺ Zellen waren ausschließlich außerhalb des Follikels lokalisiert und exprimieren teilweise auch CD11c (Abb. 12E).

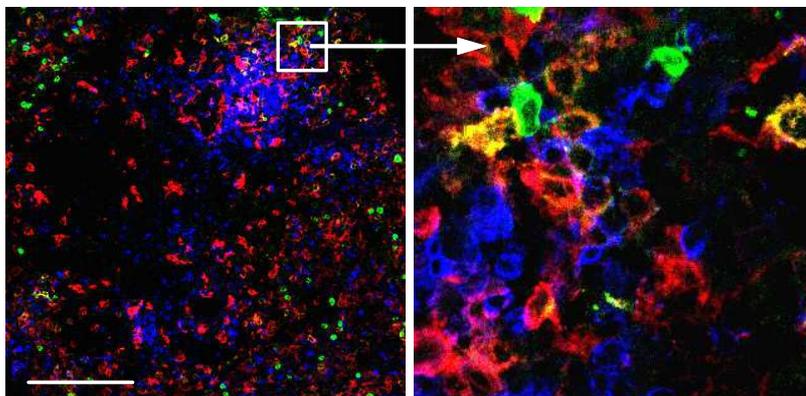
A) DC-SIGN CD3 CD11c



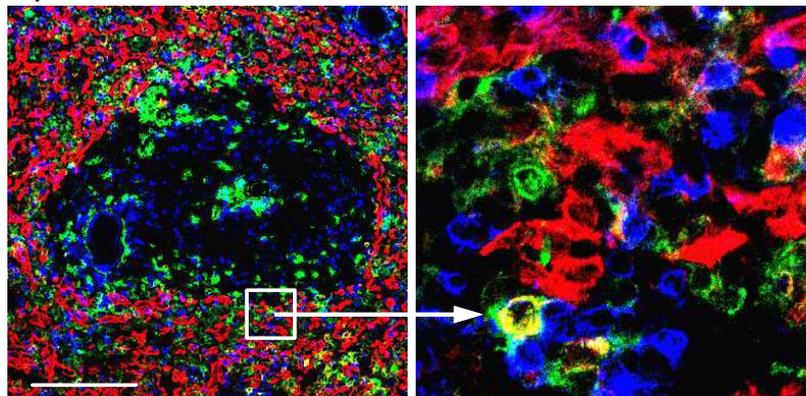
B) CD11c CD3 DEC205



C) hDCIR CD3 CD11c



D) CD11c CD3 MMR



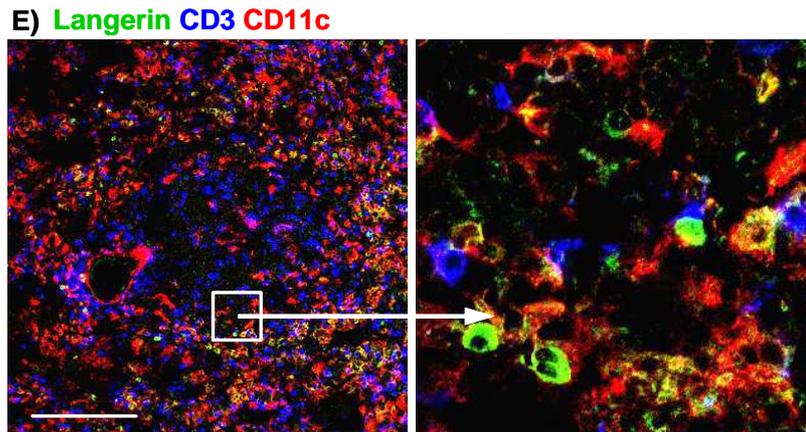


Abb. 12 C-Typ-Lektinrezeptor-Expression in humaner Milz

Die Expression der C-Typ-Lektinrezeptoren wurde durch die Färbung von 10µm dicken Kryoschnitten humaner Milz untersucht. Folgende Antikörper wurden verwendet A) α-DC-SIGN-bio (1:50) und Streptavidin-Cy3 (1:400), B) α-DEC205-PE (1:50), C) α-hDCIR-A647 (1:50), D) α-MMR-PE (1:50), E) α-Langerin-A488 (1:50). Zusätzlich wurden die Gewebeschnitte mit dem strukturgebenden Antikörper CD3 mit α-CD3-A488 (B-D, 1:50) oder α-CD3-A647 (A, E 1:50) gefärbt. CD11c⁺ Zellen wurden mittels α-CD11c-bio (B, C, E 1:50) und SA-Dy649 (1:400) bzw. SA-Cy3 (1:400) oder α-CD11c-FITC (A, D 1:50) und α-FITC-A488 (1:200) gefärbt. Die Antikörper wurden 30min bei RT auf den Gewebeschnitten inkubiert. PE-Antikörper wurden mit Ziege IgG α-PE (1:400) und Esel IgG α-Ziege-Dy549 (1:200) amplifiziert. Gezeigt werden A-E) links: Milzfollikel, umliegendes Gewebe in 63-facher Vergrößerung sowie A-E) rechts: detaillierte Einzelzell-darstellungen der C-Typ-Lektinrezeptor-positiven Zellen. Der Maßstabsbalken entspricht einer Größe von 200µm.

Zusammenfassend konnten die im Blut beschriebenen drei bekannten DC-Subpopulationen in der Milz identifiziert und eine mögliche pDC-2 DC-Subpopulation durch Immunfluoreszenz dargestellt werden. Die Isotypkontrollen von BDCA2 und BDCA3 zeigten wie erwartet keine Färbung. Interessanterweise zeigte die IgG2a-Isotypkontrolle eine Färbung von Milzzellen in anderen Regionen als die BDCA1-Färbung, was auf eine Bindung an potentiell spezifisch exprimierte Fc-Rezeptoren in der Milz hindeuten kann (unveröffentlichte Daten, Gordon Heidkamp). Alle getesteten C-Typ-Lektinrezeptoren konnten im Gewebe der humanen Milz identifiziert werden. Zum Teil wurde eine Co-Lokalisation von C-Typ-Lektinrezeptoren und CD11c festgestellt.

4.1.2 Humaner Thymus

4.1.2.1 Strukturgebende Färbungen

Zur Identifizierung anatomischer Strukturen im humanen Thymus wurden, wie in der Milz, zuerst Färbungen mit strukturgebenden Markern angefertigt. Hierfür wurden Antikörper gegen CD3, CD4, CD8, CD11c, CD11b und TROMA1 auf seriellen, 10µm dicken Thymuschnitten verwendet (Thymus freundlicherweise bereitgestellt durch Prof. Cesnjevar, Kinderklinik, Chirurgische Abteilung, Universitätsklinikum Erlangen). Die Immunfluoreszenzen bestätigten, dass sowohl CD3 als auch CD4 von Thymozyten in Kortex und Medulla exprimiert werden (Abb. 13A-D). Weiterhin waren CD11c⁺CD4⁺ Zellen in der medullären Zone zu sehen (Abb. 13B). Nach Auswertung der Bilder konnte CD8 als Marker für kortikale T-Zellen im Thymus detektiert werden (Abb. 13A). Kortikale sowie medulläre Epithelzellen wurden durch TROMA1, welches gegen Zytokeratin-8 gerichtet ist, angefärbt (Abb. 13D). CD11c⁺ Zellen waren vor allem in der Medulla vorhanden und ordnen sich zirkulär um das Hassall-Körperchen an (Abb. 13A-C). Dies diente als Orientierungshilfe und Differenzierung von Medulla und Kortex. MHC-II exprimierende HLA-DR⁺ Zellen waren vor allem in der Medulla lokalisiert, aber auch medulläre und kortikale Epithelzellen konnten als HLA-DR⁺ identifiziert werden (Abb. 13C). CD11b⁺ Zellen zeigten sich vereinzelt im Gewebe verteilt und waren auch im Hassall-Körperchen vorhanden (Abb.13D).

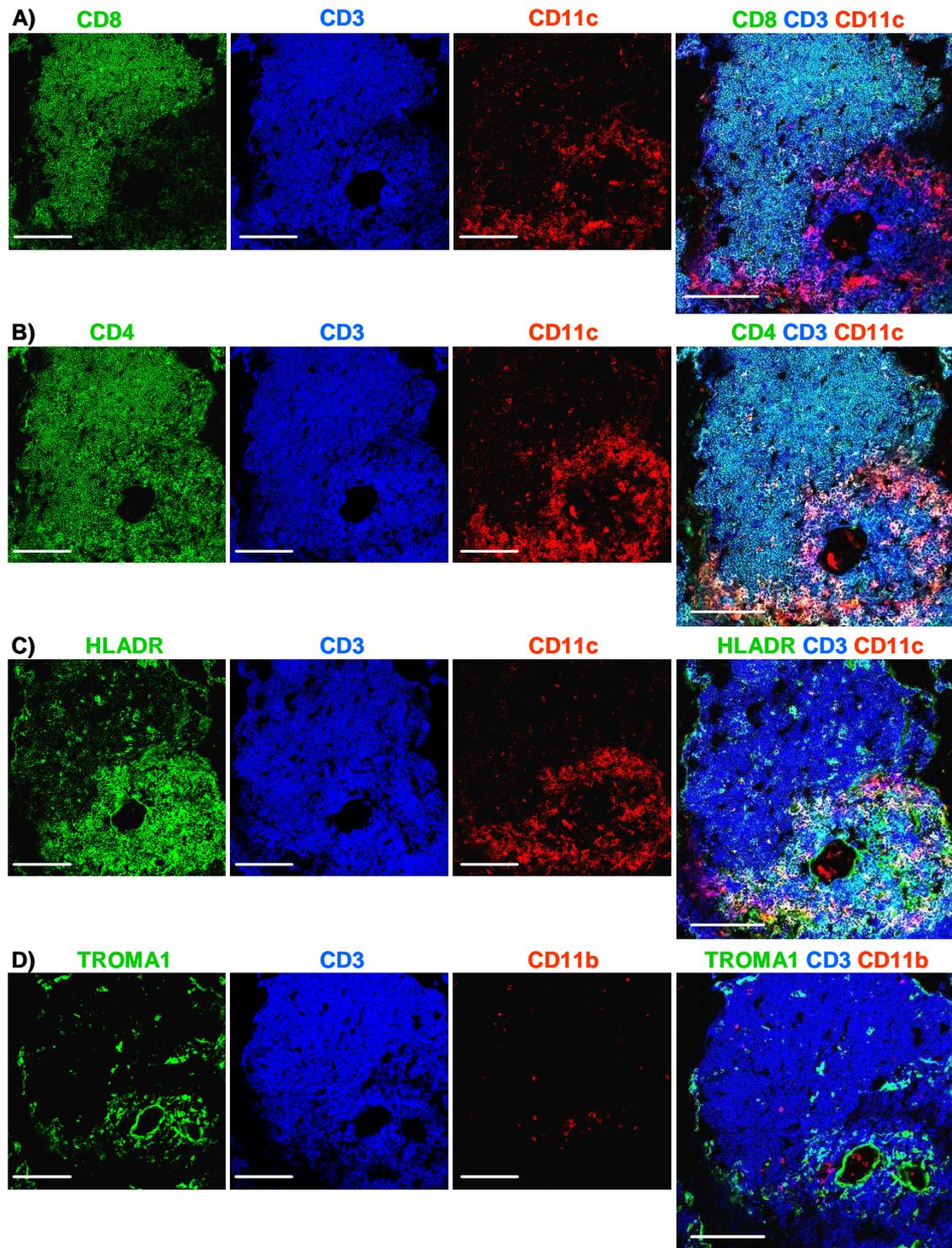


Abb. 13 Immunhistologische Färbungen von humanem Thymus

10µm dicke serielle Kryoschnitte wurden zur Identifizierung von Kortex und Medulla mit α -CD3-A647 (1:50), α -CD4-FITC (1:50) und α -CD8-FITC (1:50) für 30min bei RT inkubiert. Signale von CD4 bzw. CD8 wurden mit α -FITC-A488 (1:200) für 30min bei RT amplifiziert. A-D) $CD11c^+$ (α -CD11c-bio, 1:50) und $CD11b^+$ (α -CD11b-bio, 1:50) Zellen wurden mittels biotinylierter Antikörper inkubiert und mit dem Sekundäntikörper Streptavidin-Cy3 (1:400) gefärbt. D) TROMA1 (Ratte IgG, 1:50) wurde zur Färbung von Epithelzellen eingesetzt und mit Maus IgG α -Ratte-FITC (1:200) sowie α -FITC-A488 (1:400) amplifiziert. E) HLA-DR-A488 (1:50) zeigt alle APCs, welche MHC-II exprimieren. Die Immunfluoreszenzaufnahmen A-D) wurden exemplarisch an einem Spender durchgeführt und sind in 63-facher Vergrößerung dargestellt. Der Maßstabsbalken entspricht einer Größe von 200µm.

4.1.2.2 DC-Subpopulationen

Auch im humanen Thymus wurden Färbungen zur Charakterisierung der DC-Subpopulationen angefertigt. Hierbei sollte herausgefunden werden, ob die im Blut vorhandenen DC-Subpopulationen ebenfalls im Thymus präsent sind (Abb. 5, MACDONALD et al. 2000, DZIOŃEK et al. 2002). Folgende Marker wurden dabei verwendet: BDCA1, BDCA2, CD11c, CD123 und CD26 anstatt BDCA3. Zusätzlich wurden die Immunfluoreszenzaufnahmen vier verschiedener Thymusspender nach den DC-Subpopulationen untersucht und die Zellen auf einer Fläche von $800\mu\text{m}^2$ ausgezählt.

Nach Auswertung der Bilder zeigten sich mDC-1 DCs als $\text{CD11c}^+\text{BDCA1}^+$ Zellen vor allem in der Medulla, der Übergangszone von Kortex zu Medulla und vereinzelt im Kortex (Abb. 14A). Sie stellen die zweithäufigste DC-Subpopulation mit einem Mittelwert von ca. 56 Zellen/ $800\mu\text{m}^2$ dar (Abb. 14B). Auf der Suche nach einer Alternative für den BDCA3-Antikörper, welcher durch eine unspezifische Bindung an Thrombomodulin charakterisiert ist, wurde CD26 von Gordon Heidkamp als Marker zur Detektion der mDC-2 DCs im Thymus per FACS-Analyse identifiziert (STEINIGER et al. 2001, HEIDKAMP et al. Manuskript (2) in Vorbereitung). Durch die Expression von CD26 und CD11c konnten mDC-2 DCs als die am spärlichsten auftretende Subpopulation (26 Zellen/ $800\mu\text{m}^2$) vereinzelt in der Medulla lokalisiert werden (Abb. 14C, D). Des Weiteren waren pDCs als prominenteste Population (Mittelwert von 58 Zellen/ $800\mu\text{m}^2$) im Thymusmark vorhanden und durch die Oberflächenantigene CD123 und BDCA2 identifizierbar (Abb. 14E, F). Eine potentielle pDC-2 DC-Subpopulation konnte im Thymus nicht identifiziert werden.

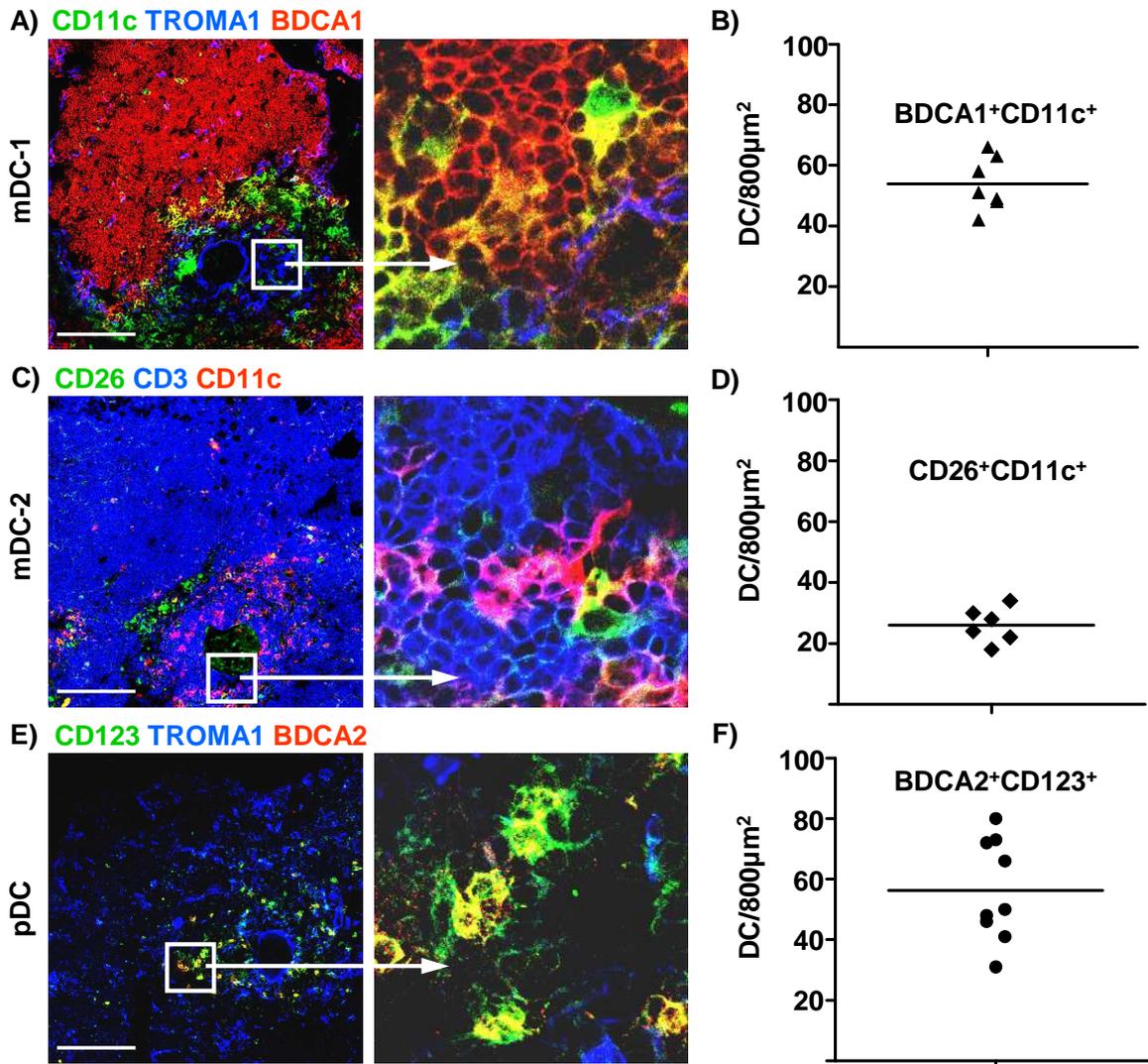


Abb. 14 DC-Subpopulationen im humanen Thymus

Immunfluoreszenzaufnahmen von 10μm dicken Kryoschnitten des humanen Thymus zur Identifizierung von DC-Subpopulationen A) mDC-1 DCs: CD11c⁺BDCA1⁺ C) mDC-2 DCs: CD11c^{low}CD26⁺ und E) pDCs: CD123⁺BDCA2⁺. Die Schnitte wurden zusätzlich mit A, E) Ratte IgG α-TROMA1 (1:50) sowie α-Ratte-FITC (1:200) und α-FITC-A488 (1:200) oder C) α-CD3-A647 (1:50) gefärbt. Dargestellt sind Aufnahmen eines Spenders mit einer Gewebefläche von ca. 800μm² (A-C, linke Spalte) in 63-facher Vergrößerung, sowie detaillierte Einzelzelldarstellungen der jeweiligen Subpopulation (mittlere Spalte). Von vier Spendern wurden je zwei bis vier Immunfluoreszenzaufnahmen angefertigt, DC-Subpopulationen auf einer Fläche von 800μm² ausgezählt und ein Mittelwert errechnet, wobei ein Punkt einer ausgezählten Immunfluoreszenzaufnahme entspricht. Der Maßstabsbalken hat eine Größe von 200μm.

4.1.2.3 Isotypkontrollen der BDCA-Antikörper im Thymus

Eine Kontrolle der BDCA-Antikörper wurde ebenfalls im Thymus durchgeführt, um auch in diesem Gewebe falsch positive Signale detektieren zu können. Die Kryoschnitte wurden mit den Antikörpern BDCA1-PE und BDCA2-PE gefärbt (Abb. 15A, C). Gleichzeitig wurde für BDCA1 eine Färbung mit dem Isotypantikörper IgG2a-PE (Maus) und für BDCA2 eine Färbung mit IgG1-PE (Maus) vorbereitet (Abb. 15B, D).

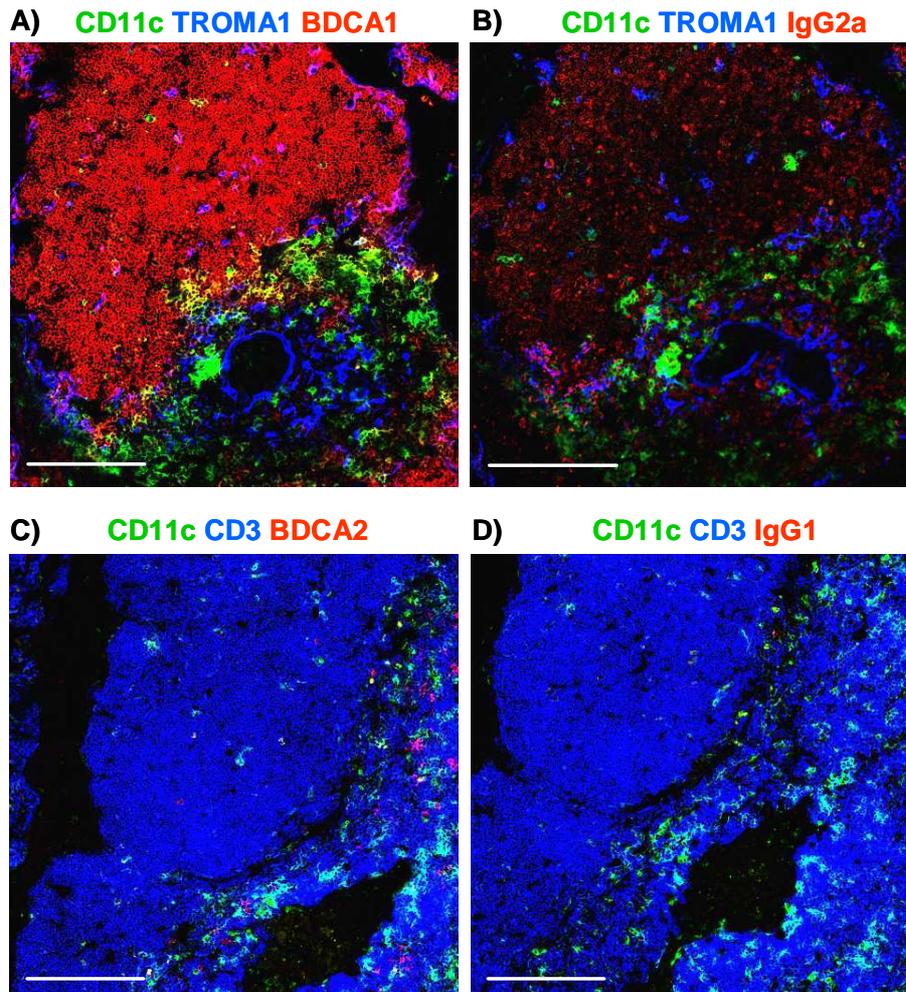


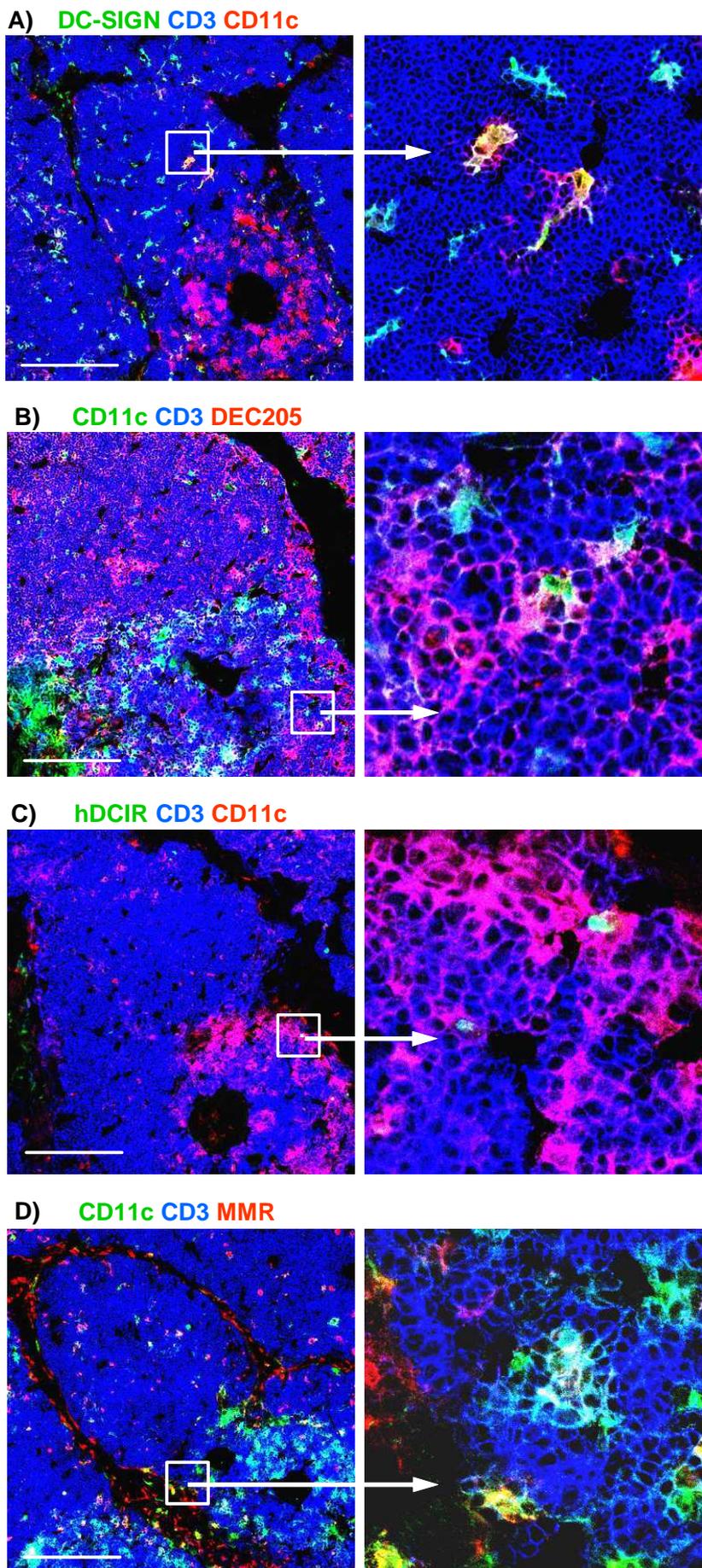
Abb. 15 Isotypkontrolle der Antikörper BDCA1-PE und BDCA2-PE im Thymus

Dargestellt sind Immunfluoreszenzaufnahmen von 10µm dicken Kryoschnitten eines humanen Thymus nach Färbung mit A) BDCA1-PE (1:50), B) IgG2a-PE (1:50), C) BDCA2-PE (1:50) sowie D) IgG1-PE (1:50) für 30min bei RT. Signale der PE-Antikörper wurden mit Ziege IgG α-PE (1:400) und Esel IgG α-Ziege-Dy549 (1:200) amplifiziert. Zusätzlich wurden alle Gewebeschnitte mit A-D) α-CD11c-FITC (1:50) und α-FITC-A488 (1:200) gefärbt. Des Weiteren wurden die Gewebe mit A, B) Ratte IgG α-TROMA1 (1:50) sowie α-rat-FITC (1:200) und α-FITC-A488 (1:200) bzw. C, D) α-CD3-A647 (1:50) gefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht einer Größe von 200µm.

Alle Antikörper wurden in der gleichen Konzentration eingesetzt und mit α -PE-goat (1:400) und α -goat-Dy549 (1:200) amplifiziert. Signale der Antikörperfärbungen sowie Kontrollfärbungen wurden am konfokalen Lasermikroskop mit den gleichen Einstellungen abgelesen, um die Auswertung der Bilder nicht zu verfälschen. Es zeigte sich, dass BDCA1 im gesamten Kortex und vereinzelt auch auf CD11c⁺ Zellen vorhanden war (Abb. 15A, HEIDKAMP et al. Manuskript (1) in Vorbereitung). Der IgG2a-PE Antikörper hingegen gab ein schwaches Signal auf einigen vereinzelt CD11c-negativen Zellen im Thymus wieder (Abb. 15B). Im Thymusmark waren solitäre BDCA2⁺ Zellen zu sehen (Abb. 15C). Diese waren wiederum in der IgG1-Isotypkontrollfärbung nicht vorhanden (Abb. 15D). Abschließend können dadurch im Thymus sowohl BDCA1 als auch BDCA2 als spezifisch bezeichnet werden. Durch die Kontrollfärbungen konnte gezeigt werden, dass sie keine falsch positiven Signale repräsentieren.

4.1.2.4 C-Typ-Lektinrezeptoren

Um herauszufinden, wie die Verteilung und Expression der C-Typ-Lektinrezeptoren sich im humanen Thymus darstellt, wurden Kryoschnitte mit den verfügbaren Antikörpern gefärbt. Verwendet wurden Antikörper gegen DC-SIGN (CD209), DEC205 (CD205), DCIR (15E12), MMR (CD206) sowie Langerin (CD207) (Abb. 16A-E). Nach der Färbung der Gewebe erfolgte die Auswertung der Bilder am konfokalen Mikroskop. Dabei konnte festgestellt werden, dass CD11c⁺DC-SIGN⁺ Zellen sowohl in der Medulla, als auch im Kortex des Thymus vorhanden sind (Abb. 16A). Ebenso waren CD11c⁻DC-SIGN⁺ Zellen im Gewebe verteilt. DEC205 stellt einen im Thymus weit verbreiteten Oberflächenmarker dar, da er sowohl von DCs als auch von Thymozyten und Epithelzellen exprimiert wird (Abb. 16B). Die Expression von DCIR war im Thymusmark nur vereinzelt auf CD11c-negativen Zellen zu erkennen (Abb. 16C). MMR konnte verteilt auf kortikalen Zellen und im umliegenden Bindegewebe lokalisiert werden. In der Medulla waren solitäre CD11c⁺MMR⁺ Zellen anzufinden (Abb. 16D). Langerin konnte nicht nachgewiesen werden, lediglich eine Färbung von Zelltrümmern ist vorhanden (Abb. 16E).



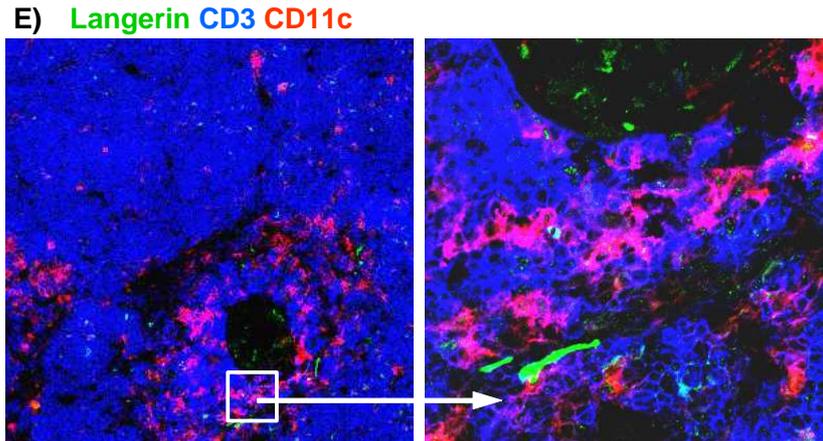


Abb. 16 C-Typ-Lektinrezeptor-Expression im humanen Thymus

Dargestellt sind C-Typ-Lektinrezeptor-Färbungen eines humanen Thymus. A) α -DC-SIGN-bio (1:50), B) α -DEC205-PE (1:50), C) α -hDCIR-A488 (1:50), D) α -MMR-PE (1:50) und E) α -Langerin-A488 (1:50) wurden jeweils mit α -CD3-A647 (1:50) sowie B-E) α -CD11c-bio (1:50) und Streptavidin-Cy3 (1:400) bzw. A) α -CD11c-FITC (1:50) und α -FITC-A488 (1:200) für 30min bei RT auf den Gewebeschnitten inkubiert. Gezeigt werden eine Fläche von je $800\mu\text{m}^2$ in 63facher Vergrößerung (A-E, oben), sowie detaillierte Einzelzelldarstellungen von C-Typ-Lektinrezeptor-exprimierenden Zellen. Der Maßstabsbalken entspricht einer Größe von $200\mu\text{m}$.

Zusammenfassend konnten alle DC-Subpopulationen des peripheren Blutes auch im Thymus lokalisiert werden. mDC-2 DCs ließen sich durch den Marker CD26 spezifisch detektieren. Die durchgeführten Isotypkontrollen der Antikörper BDCA1 und BDCA2 zeigten keine falsch positiven Signale und die Bindung dieser Antikörper im Thymus kann somit als spezifisch angesehen werden. C-Typ-Lektinrezeptor-positive Zellen waren ebenfalls im Thymus vorhanden. Eine Expression von Langerin (CD207) konnte nicht nachgewiesen werden.

4.1.4 Humane Tonsillen

Zur Charakterisierung anatomischer Gewebestrukturen humaner Tonsillen (freundlicherweise bereitgestellt durch Prof. Iro, HNO-Klinik, Universitätsklinikum Erlangen) wurden, wie mit den Geweben zuvor, zuerst Färbungen mit strukturgebenden Markern angefertigt. Danach waren CD19⁺ Zellen als großer Follikel im Gewebe zu erkennen. Sowohl innerhalb als auch außerhalb des Follikels waren CD11c⁺ Zellen vorhanden. T-Zellen (CD3⁺) waren als breite Schicht außerhalb und als Umrandung des B-Zellfollikels erkennbar (Abb. 17).

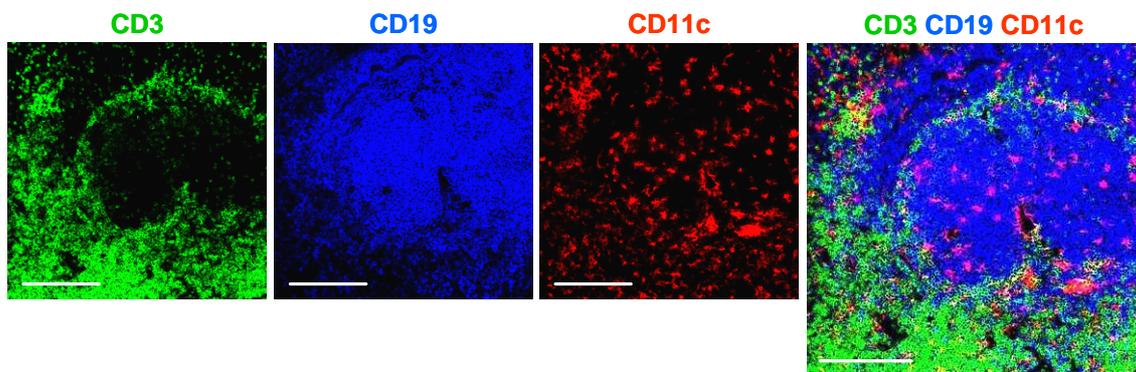


Abb. 17 Immunhistologische Färbung humaner Tonsillen

Gezeigt werden Immunfluoreszenzaufnahmen humaner Tonsillen in 63facher Vergrößerung, nach der Färbung mit spezifischen, strukturgebenden Antikörpern. Zur Identifizierung des B-Zellfollikels wurde der Antikörper α -CD19-A647 (1:50) und für die T-Zellzone der Antikörper α -CD3-A488 (1:50) für 30min bei RT auf dem Gewebe inkubiert. Ein biotinylierter CD11c-Antikörper (α -CD11c-bio, 1:50) sowie SA-Cy3 (1:400) wurden zur Detektion CD11c⁺ Zellen verwendet. Der Maßstabsbalken entspricht einer Größe von 200 μ m.

Zur Charakterisierung der DC-Subpopulationen in humanen Tonsillen wurden folgende Marker, unter Berücksichtigung der im peripheren Blut vorhandenen DCs, verwendet: CD11c, CD123, BDCA1, BDCA2, BDCA3 sowie CD3 als strukturgebender Marker (MACDONALD et al. 2002, DZIOONEK et al. 2000). Hierbei konnte festgestellt werden, dass CD11c⁺BDCA1⁺ mDC-1 DCs kreisförmig um den B-Zellfollikel angeordnet waren. (Abb. 18A). Ebenso wie CD123⁺BDCA2⁺ pDCs waren CD11c^{low}BDCA3⁺ mDC-2 DCs vereinzelt in der parafollikulären T-Zellzone vorhanden (Abb. 18B, C).

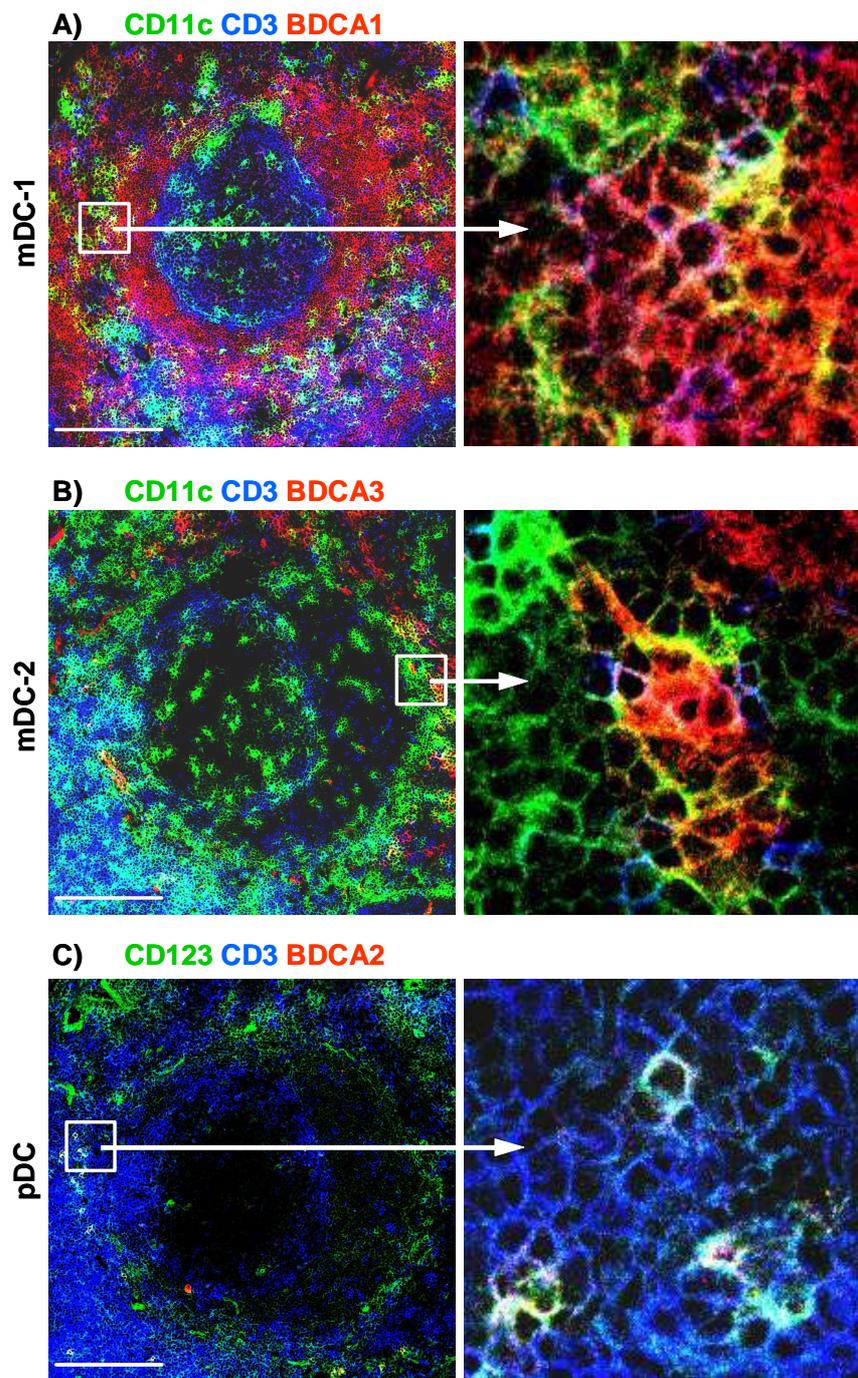


Abb.18 DC-Subpopulationen in humanen Tonsillen

Immunfluoreszenzaufnahmen von DC-Subpopulationen: Färbungen von A) $CD11c^+BDCA1^+$ mDC-1 DCs C, B) $CD11c^{low}BDCA3^+$ mDC-2 DCs und C) $CD123^+BDCA2^+$ pDCs wurden von $10\mu m$ dicken Kryoschnitten angefertigt. A-C) Darstellung der Immunfluoreszenzaufnahmen in 63-facher Vergrößerung (linke Spalte, Maßstabsbalken beträgt $200\mu m$) sowie detaillierte Einzelzelldarstellungen (rechte Spalte). α -CD3-A647 (1:50) wurde bei allen Färbungen als strukturegebender Marker verwendet. PE-Antikörper (α -BDCA1-, α -BDCA2- und α -BDCA3-PE) (1:50) wurden mit Ziege IgG α -PE (1:400) sowie Esel IgG α -Ziege-Dy549 (1:200) amplifiziert. Die Signale von α -CD11c-FITC (1:50) und α -CD123-bio (1:50) wurden mittels α -FITC-A488 (1:200) bzw. SA-Dy649 (1:400) verstärkt.

Zusätzlich wurden Isotypkontrollen der PE-Antikörper (BDCA1, BDCA2 und BDCA3) durchgeführt. Hierzu wurden Isotyp-Antikörper desselben Konjugats (PE) und Typs (Maus) verwendet. Nach Auswertung der Färbungen am konfokalen Mikroskop können die Antikörper BDCA2 und BDCA3 in humanen Tonsillen als spezifisch bezeichnet werden, da die Isotypkontrolle (IgG1) keine Signale wiedergab (Abb. 19A, B, E, F). Die Isotypkontrolle des Antikörpers BDCA2 (IgG2a) zeigte eine Bindung an sehr viele Zellen (Abb. 19C, D). Dennoch konnten keine doppelt positiven Zellen (IgG2a⁺CD11c⁺) detektiert werden, was für eine Bindung des Isotyp-Antikörpers an andere Zellstrukturen, möglicherweise Fc-Rezeptoren, spricht.

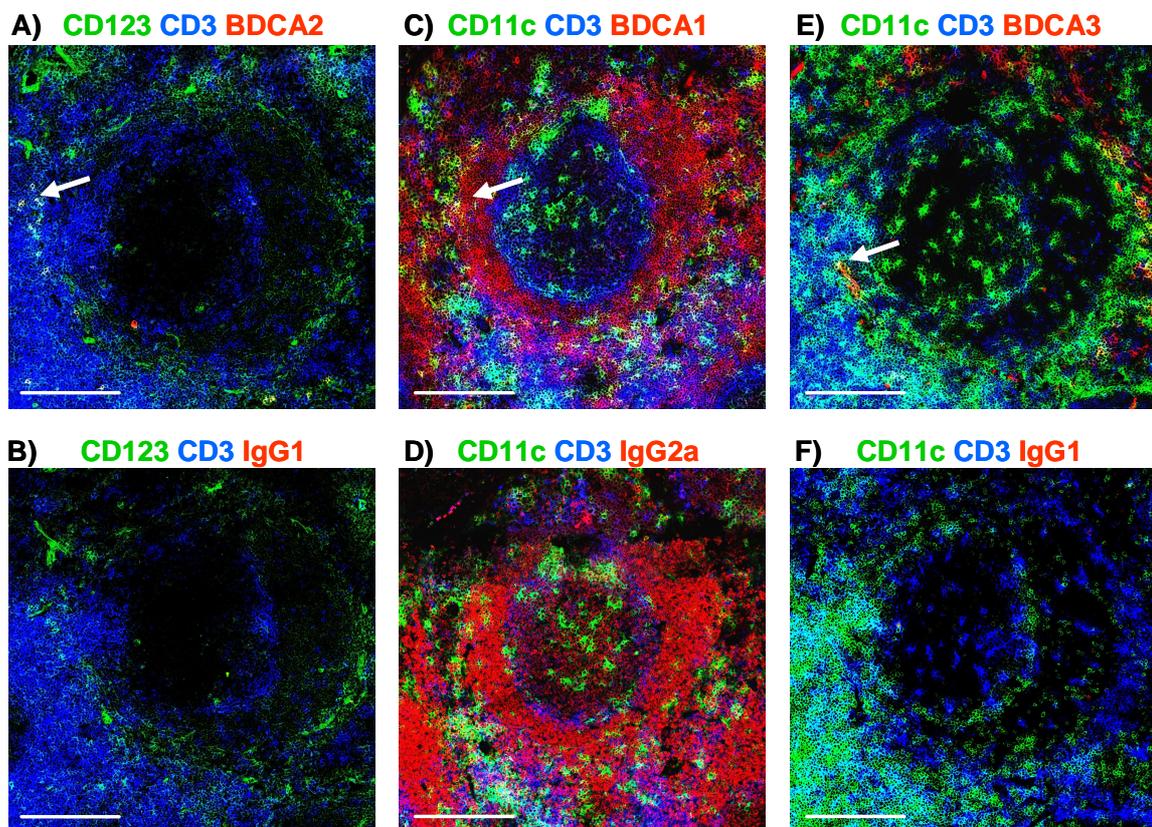


Abb. 19 Isotypkontrolle der Antikörper BDCA1, BDCA2 und BDCA3 in humanen Tonsillen

Die 10µm dicken Kryoschnitte wurden mit den zu testenden BDCA-Antikörpern (A, C, E) und Isotyp-Kontrollantikörpern (B, D, F) 30min bei RT inkubiert. Für die Kontrolle von α-BDCA1-PE (C, 1:50) wurde ein IgG2a-Antikörper (D, 1:50), für α-BDCA2-PE (A, 1:50) und α-BDCA3-PE (E, 1:50) wurde ein IgG1-Kontrollantikörper (B, F, 1:50) verwendet. PE-Signale wurden mittels Ziege IgG α-PE (1:400) sowie Esel IgG α-Ziege-Dy549 (1:200) amplifiziert. Gewebeschnitte wurden zusätzlich mit A, B) α-CD123-bio (1:50) und SA-Dy649 (1:400) bzw. C-F) α-CD11c-FITC (1:50) und α-FITC-A488 (1:200) gefärbt. Zusätzlich wurde CD3 als strukturegebender Marker verwendet, und die Gewebe mit α-CD3-A488 (A, B, 1:50) bzw. α-CD3-A647 (C-F, 1:50) gefärbt. Die Immunfluoreszenzen sind in 63facher Vergrößerung dargestellt, wobei der Maßstabsbalken einer Größe von 200µm entspricht. DC-Subpopulationen: A) pDCs, C) mDC-1 DCs und E) mDC-2 DCs sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Zusammenfassend konnte mithilfe der Immunfluoreszenzanalyse humaner Gewebe festgestellt werden, dass sowohl in Milz und Thymus, als auch in Tonsillen alle drei DC-Subpopulationen des peripheren Blutes mit den gleichen Markern detektiert werden können (mDC-1, mDC-2 und pDC) (DZIOONEK et al. 2000, MACDONALD et al. 2002). Eine zusätzliche Population (pDC-2: CD11c⁻CD123⁺BDCA2⁺) konnte in der humanen Milz identifiziert werden, deren Funktion momentan in der Arbeitsgruppe intensiv untersucht wird. Des Weiteren wurde die Expression der C-Typ-Lektinrezeptoren beschrieben. Im Gegensatz zur spezifischen Expression von murinem DCIR2 auf CD11c⁺CD8⁻ DCs sowie murinem DEC205 auf CD11c⁺CD8⁺ DCs konnte ein solch spezifisches Vorhandensein der untersuchten C-Typ-Lektinrezeptoren auf DC-Subpopulationen in humaner Milz und Thymus nicht festgestellt werden. Die C-Typ-Lektinrezeptoren in diesen Geweben zeigte sich als weit verbreitet und ein spezifischer Rezeptor konnte mit den verwendeten Antikörpern keiner bestimmten DC-Subpopulation zugeordnet werden.

4.2 Produktion löslicher C-Typ-Lektinrezeptor-Proteine

Für eine zukünftige therapeutische Antigenbeladung Dendritischer Zellen *in vivo* ist es notwendig, Antikörper zu produzieren, die sehr spezifisch an Endozytoserezeptoren auf DC-Subpopulationen binden und anschließend internalisiert werden. Um Antikörper gegen die extrazellulären Domänen von C-Typ-Lektinrezeptoren generieren zu können, sollten Protein-Varianten der C-Typ-Lektinrezeptoren ohne Transmembrandomäne in eukaryotischen Zellen produziert werden. Für die Klonierung der extrazellulären Domänen der C-Typ-Lektinrezeptoren sollten vor der Insertion dieser extrazellulären Domänen zunächst geeignete Restriktionsschnittstellen im Expressionsvektor eingefügt bzw. geändert werden. Um die starke Glykosylierung, die möglicherweise für die erfolgreiche Antikörperproduktion notwendig ist, gewährleisten zu können, sollten die für die löslichen C-Typ-Lektinrezeptoren kodierenden Plasmide anschließend in eukaryote HEK293T-Zellen transfiziert werden. Die in den Überstand sekretierten Proteine sollten aufgereinigt und proteinchemisch (Comassie-Gel, LPS-Test) kontrolliert werden.

4.2.1 Eliminierung einer Xba-I Restriktionsschnittstelle im Vektor pcDNA3.1

Um jeweils murines und humanes Dectin-1, Dectin-2, Clec9a und Langerin über die Schnittstellen XbaI und NotI in den Expressionsvektor pcDNA3.1 klonieren zu können, musste in diesem Vektor zunächst eine zweite XbaI-Schnittstelle auf der 3' Seite (Abb. 20A, rechts) deletiert werden. Der eingesetzte Vektor 733 wurde von Gordon Heidkamp freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Im Plasmid 733 lagen bereits eine lösliche Variante von humanem C-Typ-Lektinrezeptor hClecSF6/DCIR, ein His-Tag und ein Glycin-Serin Linker in Form einer $(G_4S)_2$ -Sequenz vor (Abb. 20A).

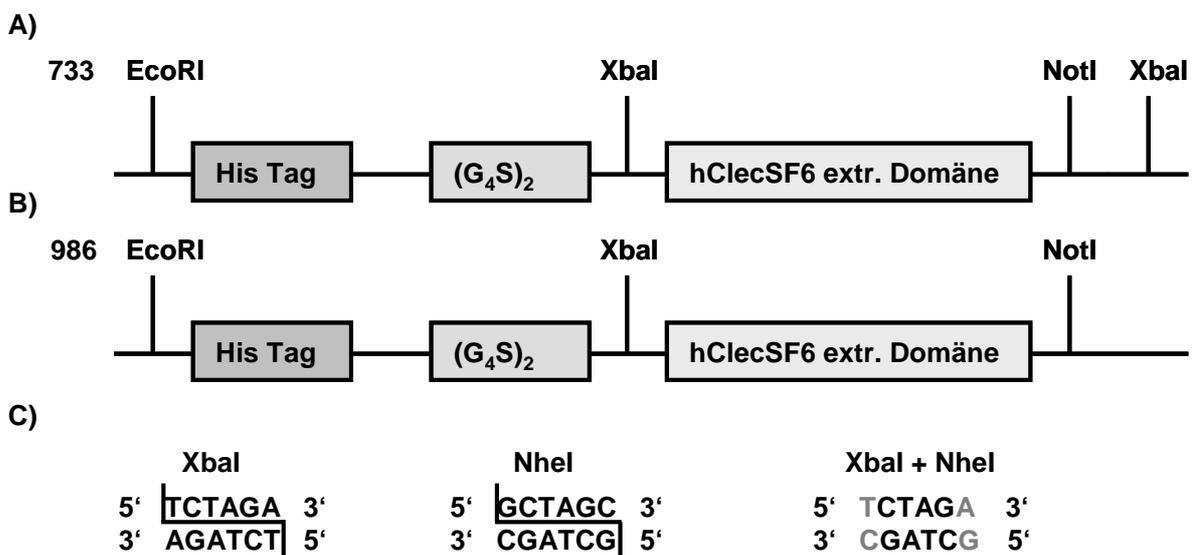


Abb. 20 Eliminierung einer Xba-I Schnittstelle im Expressionsplasmid pcDNA3.1-hClecSF6/hDCIR His

A) Plasmid 733 besteht aus dem Gerüst des Vektors pcDNA3.1 und beinhaltet zusätzlich folgende Komponenten: EcoRI-Schnittstelle, His-Tag, $(G_4S)_2$ -Linker, XbaI-Schnittstelle, hClecSF6 als extrazelluläre Domäne, NotI- und XbaI-Schnittstelle. B) Das neu entstandene Plasmid 986 stellt ein modifiziertes Plasmid 733 dar mit gleichem Grundgerüst, aber folgender Veränderung: EcoRI-Schnittstelle, His-Tag, $(G_4S)_2$ -Linker, XbaI-Schnittstelle, hClecSF6 (extrazelluläre Domäne) und abschließender NotI-Schnittstelle. C) XbaI-Sequenz (TCTAGA) und NheI-Sequenz (GCTAGC) ergänzen sich nach Verdau und Ligation fast vollständig und können somit fusionieren (XbaI und NheI). Die Schnittstelle ist jedoch damit eliminiert.

Für die Deletion der XbaI-Schnittstelle wurde ein Oligonukleotidlinker verwendet. Dieser bestand aus EcoRI - His-Tag - $(G_4S)_2$ - XbaI - Stop - NotI - NheI und wurde durch ein Annealing der komplementären DNA-Sequenzen des Oligolinkers hergestellt (Tab. 4, Nr. 19, 20). Nach Verdau des alten Vektors 733 (Abb. 20A) mit EcoRI und XbaI wurde der Vektor mit dem Oligolinker ligiert, und das eliminierte Insert des Vektors 733 (EcoRI - His-Tag - $(G_4S)_2$ - XbaI - hClecSF6/hDCIR - NotI - XbaI) durch den Oligolinker ersetzt (Tab 4, Nr. 19, 20). Dabei kam es zur Fusion der EcoRI-Schnittstellen am 5' und der XbaI-

mit der NheI-Schnittstelle am 3' Ende (Abb. 20C). Die XbaI-Schnittstelle konnte nach der Fusion mit NheI nicht erneut verdaut werden. Die Schnittstelle war somit eliminiert (Abb. 20C). Nach Überprüfung der entstandenen DNA-Sequenz und Einfügen der C-Typ-Lektinrezeptor-DNA von hClecSF6 über die Schnittstellen XbaI und NotI-HF konnte der neue Vektor 986 für die nachfolgenden Klonierungsarbeiten verwendet werden. (Abb. 20B).

4.2.2 C-Typ-Lektinrezeptor-DNA

Um die extrazellulären Domänen der murinen und humanen C-Typ-Lektinrezeptoren Dectin-1, Dectin-2, Clec9a und Langerin zu klonieren, wurden mittels PCR jeweils Signalpeptid (IgG-SP), extrazelluläre Region und Hinge-Region der C-Typ-Lektinrezeptoren aus bereits vorhandenen Plasmiden (bereitgestellt von Gordon Heidkamp) oder frisch gewonnenen RNA/cDNA Proben amplifiziert (s. Tab 5). Für murine Rezeptoren wurde jeweils nur ein PCR-Produkt, für humane Rezeptoren je drei PCR-Produkte unterschiedlicher Länge eines Rezeptors hergestellt (Abb. 21A-K). Bei letzteren variierte dabei lediglich die Länge der Hinge-Region und somit der Abstand zur Transmembrandomäne. Die Größe der C-Typ-Lektin-Domäne (CLEC) blieb konstant. Die Rezeptor-DNA von mClec9a startete bei Aminosäure 88 und endete bei AS 270 (Abb. 21A, B). Lösliches mDectin-1 reichte von Aminosäure 101 bis 270, mDectin-2 von Aminosäure 49 bis 258. Der vierte murine Rezeptor war mLangerin, (AS 88-351) (Abb. 21A, B).

Zur Klonierung der extrazellulären Domänen humaner C-Typ-Lektinrezeptoren wurden jeweils mehrere Versionen hergestellt. Dabei wurden nachfolgende Konstrukte kloniert: hClec9a (AS 245, AS 263, AS 293) (Abb. 21C, D), hDectin-1 (AS 128, AS 146, AS 170) (Abb. 21E, F), hDectin-2 (AS 83, AS 112, AS 146) (Abb. 21G, H) und hLangerin (AS 17, AS 143, AS 205) (Abb. 21I, K). Durch das Einfügen von Schnittstellen (XbaI und NotI) in die Primersequenzen konnte die amplifizierte DNA mit den Restriktionsenzymen XbaI und NotI-HF verdaut und in den Vektor 986 ligiert werden. Die erfolgreich klonierten Plasmide standen nun für eine Transfektion von HEK293T-Zellen zur Verfügung.

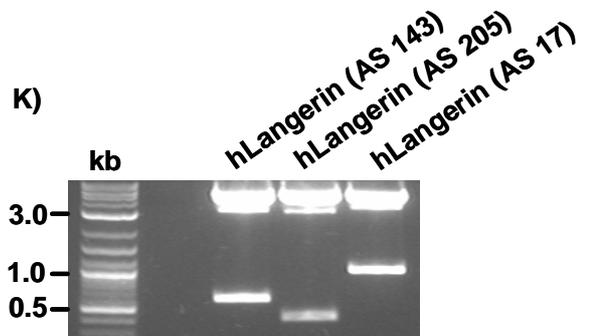
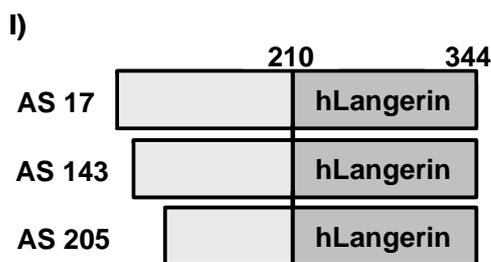
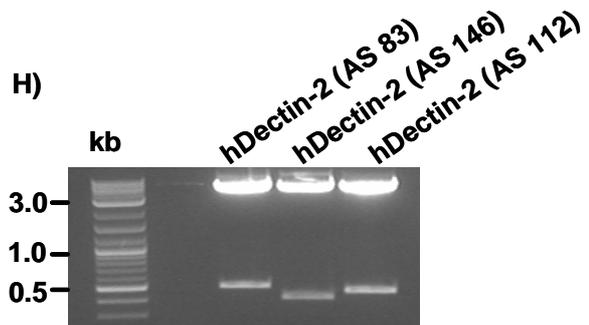
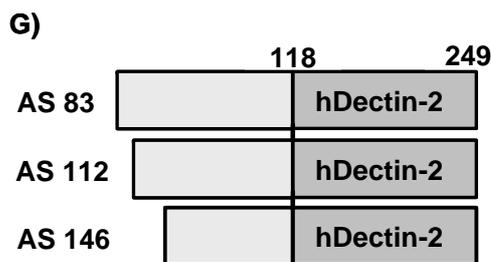
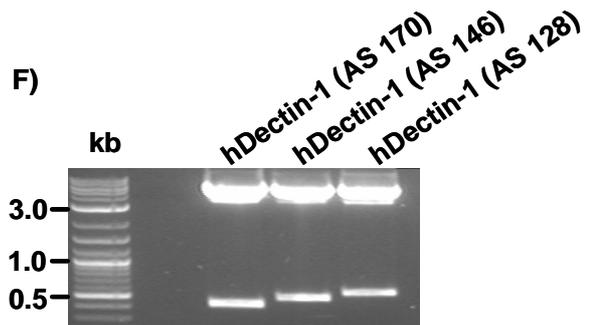
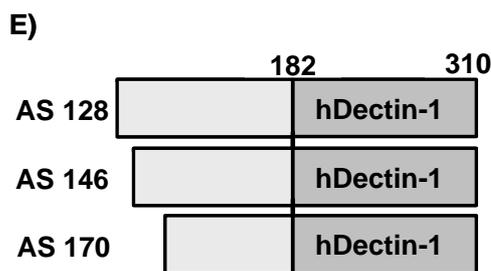
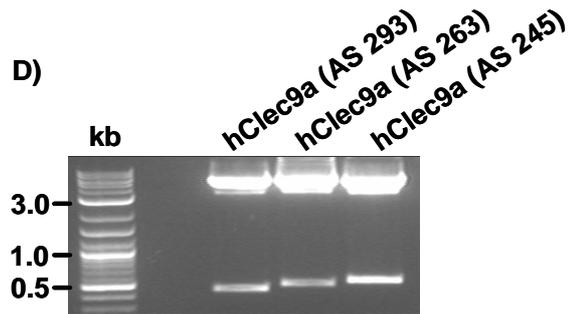
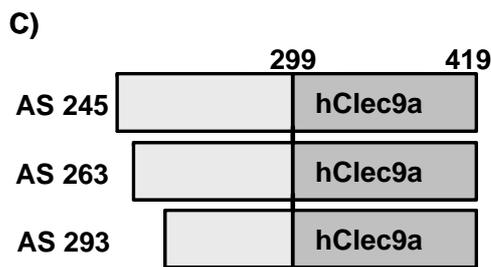
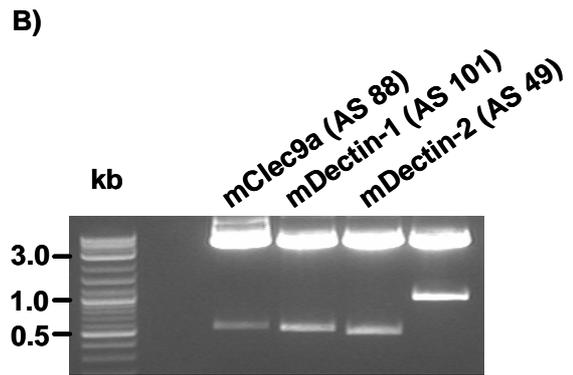
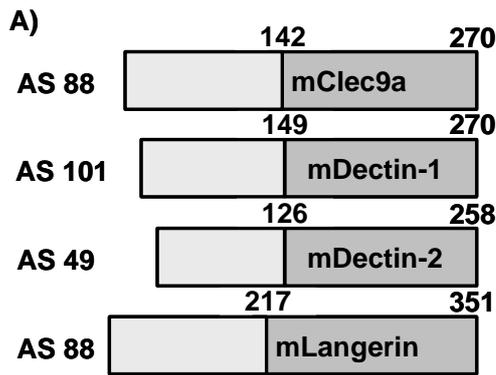


Abb. 21 C-Typ-Lektinrezeptor-DNA im Vektor 986

Zu sehen sind A, C, E, G, I) verschiedene humane und murine C-Typ-Lektinrezeptoren mit unterschiedlicher Länge der Hinge-Region und C-Typ-Lektindomäne (CLECT), sowie B, D, F, H, J) die gelelektrophoretische Auftrennung eines Testverdaus (XbaI-NotI-HF) dieser DNA-Varianten im Vektor 986 im 2%-igen Agarosegel. Als Marker wurden pro Gel 7 µl des DNA-Längenstandards „2-log DNA“ der Firma MBI Fermentas verwendet. A) mClec9a (AS 88-270) mit CLECT (AS 142-270) ist mit einer Größe B) von 549bp im Agarosegel zu sehen. mDectin-1 (AS 101-270) mit CLECT (AS 149-270) B) läuft auf einer Höhe von 510bp. B) mDectin-2 (AS 49-258) mit CLECT (AS 126-258) ist 399bp groß. mLangerin (AS 88-351) mit CLECT (AS 217-315) ist im Agarosegel mit 792bp erkennbar. C) Unterschiedliche Start-AS (245, 263 und 293) des Rezeptors hClec9a mit CLECT (AS 299-419) sind als D) hClec9a (AS 293): 381bp, hClec9a (AS 263): 471bp und hClec9a (AS 245): 525bp zu sehen. E) hDectin-1 mit CLECT (AS 182-310) und verschiedenen Längenvarianten (AS 128, 146 und 170) sind F) im Testverdaus wiederzufinden: hDectin-1 (AS 128): 549bp, hDectin-1 (AS 146): 495bp und hDectin-1 (AS 170): 459bp. G) hDectin-2 mit CLECT (AS 118-249) und verschiedenen Größenvarianten der Hinge-Region (AS 83, 112 und 146) sind H) im Agarosegel zu sehen als hDectin-2 (AS 83): 501bp, hDectin-2 (AS 112): 414bp und hDectin-2 (AS 146): 312bp. I) hLangerin mit CLECT (AS 210-344) und drei Längenvarianten (AS 17, 143 und 205) nach K) elektrophoretischer Auftrennung erkennbar als: hLangerin (AS 143): 606bp, hLangerin (AS 205): 420bp und hLangerin (AS 17): 987bp.

4.2.3 Transfektion von HEK293T-Zellen und Proteinelution

Um lösliche Proteine der klonierten C-Typ-Lektinrezeptor-DNA zu erhalten, wurden die hergestellten Plasmide (Tab. 6) in HEK293T-Zellen transfiziert. Nach 5-7 Tagen wurde der Überstand mit den darin sezernierten Proteinen abgenommen, sterilfiltriert und mit Ammoniumsulfat gefällt. Proteine wurden in 1xPBS resuspendiert, dialysiert und mit Ni-NTA Beads versetzt. Diese sind in der Lage, 6xHis-Tag tragende Proteine zu binden. Anschließend wurden die Ni-NTA Beads mit dem gebundenen Protein zentrifugiert und über einer Polyprep Chromatographie-Säule (BioRad) in Fraktionen mittels Imidazol eluiert. Nun erfolgte eine Detektion der Proteine in den eluierten Fraktionen durch ein SDS-Coomassie-Gel (Abb. 22).

Zur Überprüfung der verwendeten Reagenzien und Techniken wurde der ursprüngliche Vektor 733 und veränderter Vektor 986, beide mit hClecSF6 als Insert, transfiziert, eluiert und mittels SDS-PAGE ausgewertet (Abb. 22A, B). Das Plasmid 733 wurde bereits von Gordon Heidkamp erfolgreich in HEK293T-Zellen transfiziert und hClecSF6/hDCIR-Proteinfractionen eluiert (HEIDKAMP et al. 2010).

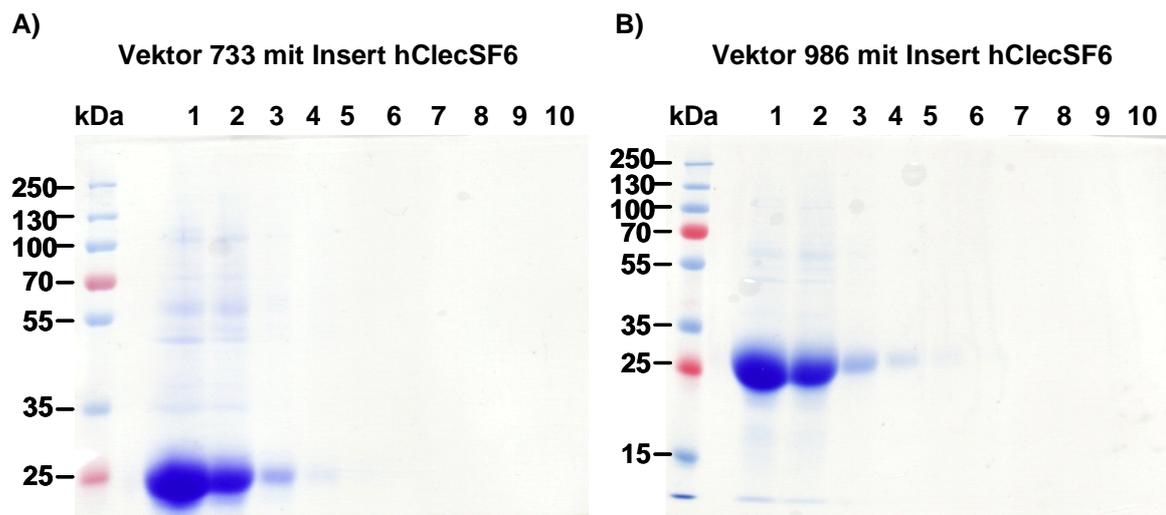


Abb. 22 Elution von hClecSF6/DCIR im Vektor 733 und 986 mit His-Tag

Nach Aufreinigung der Proteine mittels Ni-NTA Beads wurden jeweils 20µl der 10 eluierten Proteinfractionen mit 5µl Proteinauftragungspuffer gemischt, bei 95°C für 10min aufgeköcht, auf ein 12,5%iges SDS-Coomassie-Gel aufgetragen und analysiert. Als Längenstandard dienten pro Gel 3µl des Markers PageRuler™ Prestained Protein Ladder der Firma MBI Fermentas. A) hClecSF6 im Vektor 733 zeigt Proteinbanden in den Fractionen 1-4 auf einer Höhe von ca. 25 kDa. B) hClecSF6 im Vektor 986 beinhaltet ebenfalls Proteine in den Fractionen 1-4 mit einer Größe von ca. 25 kDa.

Hierbei zeigte sich nach der Transfektion beider Plasmide (733 und 986) und Elution der Proteine, dass in beiden Fällen Proteinfractionen im SDS-Coomassie-Gel vorhanden waren (Abb. 22A, B). Das Protokoll der Transfektion und Elution, sowie der modifizierte Vektor, konnten für die weitere Arbeit zur Produktion löslicher C-Typ-Lektinrezeptoren angewendet werden.

Um neue lösliche Proteine der C-Typ-Lektinrezeptoren zu erhalten, wurden die neu produzierten Plasmide transfiziert, Proteine eluiert und proteinchemisch analysiert. Die C-Typ-Lektinrezeptoren humanes Dectin-1 (989) und murines (990) Dectin-1 konnten erfolgreich im Coomassie-Gel detektiert werden (Abb. 23A, B). Dabei zeigte sich, dass hDectin-1 und mDectin-1 wahrscheinlich stark glykosyliert sind und anstelle des erwarteten Molekulargewichtes von 21kDa auf einer Höhe von ca. 30kDa (hDectin-1), bzw. anstelle von 20kDa auf einer Höhe von 28kDa (mDectin-1) liefen. Die proteinhaltigen Fractionen wurden anschließend vereinigt, und eine Konzentrationsbestimmung mittels eines Bradford-Tests durchgeführt. Die C-Typ-Lektinrezeptor-Proteine wurden einem LPS-Removal und nachfolgenden LPS-Test unterzogen. Abschließend wurden die produzierten Proteine zur Antikörperproduktion versendet (Kooperation Dr. Elisabeth Kremmer, Helmholtz-Zentrum München). An der Produktion der C-Typ-Lektinrezeptor-Proteine der anderen klonierten C-Typ-Lektinrezeptor-DNAs wird derzeit noch intensiv gearbeitet.

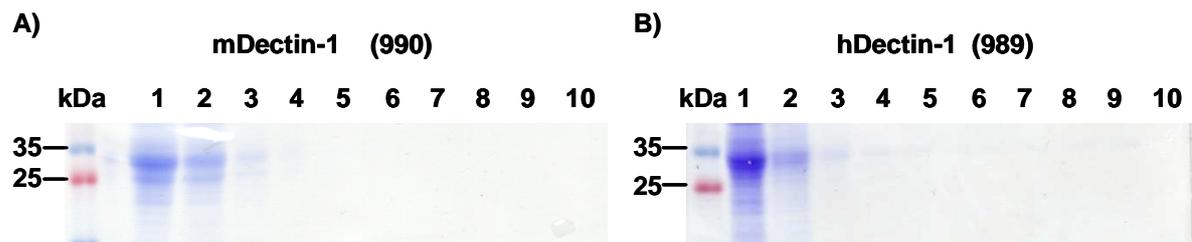


Abb. 23 Proteinelution von mDectin-1 (990) und hDectin-1 (989)

Die C-Typ-Lektinrezeptor-Proteine wurden nach der Transfektion der Plasmide (990 und 989) in HEK293T-Zellen in Fraktionen 1-10 eluiert. Die Fraktionen wurden mit je 5 μ l Proteinladepuffer versetzt, 10min bei 95 °C gekocht und auf ein 12,5%igem SDS-PAGE aufgetragen. A) Lösliches Protein von mDectin-1 ist in den Fraktionen 1-3 vorhanden und besitzt eine Größe von ca. 28kDa. B) hDectin-1 (989) konnte in den Fraktionen 1-4 bei einer Größe von ca. 30kDa nachgewiesen werden. Für das Coomassie-Gel wurden 3 μ l PageRuler™Plus der Firma MBI Fermentas aufgetragen. Anschließend wurden proteinhaltige Fraktionen vereinigt.

5 Diskussion

DCs gelten als die am effektivsten arbeitenden Antigen-präsentierenden Zellen des Immunsystems und können zu zentraler oder peripherer Toleranz bzw. zur Induktion einer spezifischen Immunantwort beitragen (BANCHEREAU und STEINMAN 1998, LIU und NUSSENZWEIG 2010, STEINMAN et al. 2003). Als Zellen, die angeborene mit adaptiver Immunantwort verbinden, stehen sie im Fokus der Wissenschaft. Im Mausmodell ist es bereits gelungen, Antigene über Antikörper, die an bestimmte Oberflächenrezeptoren binden und internalisiert werden (C-Typ-Lektinrezeptoren: DCIR2 und DEC205), in DCs zu schleusen und somit eine spezifische Immunantwort zu induzieren (DUDZIAK et al. 2007, BONIFAZ et al. 2002, HAWIGER et al. 2001). Die *in vivo* Antigenbeladung spezifischer DC-Subpopulationen könnte auch in der Humanmedizin zur therapeutischen Anwendung bei Autoimmunität, Tumoren und bei der Vakzinierung eingesetzt werden (BOZZACCO et al. 2007, STEINMAN 2010, STEINMAN und BANCHEREAU 2007). Das meiste Wissen über humane DCs stammt von Monozyten-gereiften DCs (BENDER et al. 1999, McCURLEY und MELLMAN 2010). Die Verfügbarkeit von humanem, frischem Gewebe ist eines der Haupthindernisse für die Untersuchung der DCs im Gewebe. Im Vergleich dazu sind DCs im Blut bereits sehr gut charakterisiert. Sie repräsentieren weniger als 1% aller zirkulierenden Blutzellen und sind gekennzeichnet durch die Expression von HLA-DR und die Abwesenheit der sogenannten „Lineage“ Marker (CD3, CD19, CD20 und CD56), welche auf T-, B- und NK-Zellen vorhanden sind (MACDONALD et al. 2002). DC-Subpopulationen im peripheren Blut können eingeteilt werden in konventionelle myeloide (mDC) und plasmazytoide DCs (pDC). Charakteristisch für mDC-1 DCs ist die Expression der Marker CD11c und BDCA1. mDC-2 DCs hingegen zeigen eine eher niedrige Expression von CD11c und sind zudem BDCA3 positiv, während pDCs CD123 und BDCA2 exprimieren (ANDREWS et al. 2010, POULIN et al. 2010, MAC DONALD et al. 2002).

Hauptziel der vorliegenden Doktorarbeit war es, ein Protokoll für die Immunfluoreszenzanalyse von DC-Subpopulationen in humanen lymphoiden Geweben aus Milz, Thymus und Tonsillen zu etablieren und mit den im humanen peripheren Blut beschriebenen DC-Subpopulationen zu vergleichen. Weiterhin sollte auch die Expression von C-Typ-Lektinrezeptoren und deren Verteilung in den Geweben näher untersucht werden. Zudem sollten lösliche C-Typ-Lektinrezeptoren produziert werden, um Antikörper gegen diese generieren zu können. Zukünftig könnten diese bei hoher Endozytoseaktivität für eine Antigenbeladung humaner DCs verwendet werden.

5.1 Etablierung von Immunfluoreszenzanalysen in humanem lymphoidem Gewebe

Viele der Untersuchungen humaner lymphoider Gewebe stammen aus pathologischen Befunden, in denen häufig Paraformaldehyd für die Fixierung verwendet wurde (VALLADEAU et al. 2000, PEREZ et al. 2005, GINHOUX et al. 2010). Nur sehr wenige Arbeiten existieren, in denen Immunzellen oder DCs durch konfokale Mikroskopie an frischem Gewebe charakterisiert wurden (PACK et al. 2008). Zu Beginn dieser Arbeit war in der Arbeitsgruppe ein Protokoll für die Immunfluoreszenzanalyse von lymphoidem Gewebe in der Maus etabliert. Zur Charakterisierung von DC-Subpopulationen und insbesondere deren Expression von bereits bekannten und zukünftig interessanten Endozytoserezeptoren musste dieses Protokoll jedoch an humanes Gewebe angepasst werden. Dazu war es zunächst notwendig, die Gewebeprozessierung und -fixierung zu optimieren. Letztere war besonders wichtig, um eine spezifische Bindung der Antikörper an die Gewebszellen gewährleisten und den geringen Anteil der DCs an der Gesamtzellzahl im Gewebe sichtbar machen zu können. Am Beispiel der humanen Milz wurden verschiedene Vorgehensweisen der Fixierung erprobt (Abb. 8).

Nach dem Testen der ersten Immunfluoreszenzen ergab sich, dass die geschnittenen Gewebeproben eine relativ hohe Gewebeerstörung aufwiesen, wenn die Schnitte direkt nach dem Schneiden gefroren und erst danach prozessiert, d.h. fixiert wurden (Abb. 8). In den weiteren Etablierungsarbeiten zeigte sich, dass das Fixieren direkt nach dem Schneiden, wie auch von MCILROY et al. (2001) und DHODAPKAR et al. (2004) angewandt, in den besten Immunfluoreszenzfärbungen mit einer sehr guten Abgrenzung der Zellen im Gewebe resultierte (MCILROY et al. 2001, DHODAPKAR et al. 2004). Weiterhin wurden auch die Fixierungsagentien getestet. Im Gegensatz zu den durch PACK et al. (2008) und Anna Baranska (Doktorandin der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dudziak) durchgeführten Fixierungen humaner bzw. muriner Milzschnitte mit Aceton bei -20°C wurde bei den hier verwendeten humanen Geweben eine besonders gute Auflösung der Immunfluoreszenzen erzielt, wenn das Aceton wie bei NASCIMBENI et al. (2009) und PACK et al. (2008) bei Raumtemperatur verwendet wurde (NASCIMBENI et al. 2009, PACK et al. 2008).

Weiterhin erwies sich eine Dicke der Gewebeschnitte von $10\mu\text{m}$ als optimal, um alle Zellen im Gewebe mit den getesteten Antikörpermengen und Inkubationszeiten ausreichend zu färben. Dieses Protokoll wurde ebenfalls von NASCIMBENI et al. (2009) an humanem und durch Anna Baranska an murinem Gewebe angewandt (NASCIMBENI et al. 2009, BARANSKA et al., Manuskript in Vorbereitung). Ein dünneres Schneiden als $10\mu\text{m}$ war nur bedingt möglich, da das Gewebe sehr empfindlich und brüchig war und nicht ohne Risse auf die Objektträger aufgebracht werden konnte. Das Blockieren

unspezifischer Bindungsstellen im Gewebe wurde mittels SA/Biotinreagenzien, BSA, FCS und humanem Serum durchgeführt. Im Gegensatz zum Protokoll für die Immunfluoreszenz muriner Gewebe erschienen durch das Blockieren der Fc-Rezeptoren keine weiteren Vorteile. Insgesamt ergab sich in den durchgeführten Etablierungsarbeiten, dass ein Schneiden in 10µm dicke Schnitte und die Fixierungszeit von 2,5min mit Aceton bei Raumtemperatur direkt nach dem Schneiden die besten Konditionen für eine optimale Färbung der Gewebeschnitte boten (Abb. 8).

5.2 Immunfluoreszenzanalysen humaner Milzproben

Zuvor publizierte Arbeiten, in denen histologische Präparate humaner Milzschnitte untersucht wurden, dienten als Grundlage, um nach Immunfluoreszenzfärbung eine grobe Orientierung im Gewebe zu erhalten (BUCKLEY et al. 1987, MEBIUS und KRAAL 2005). In Einklang mit den von BUCKLEY et al. (1987) bzw. MEBIUS und KRAAL (2005) gezeigten Daten weisen die erhaltenen Immunfluoreszenzaufnahmen nach Färbung von CD3, CD19, CD11c sowie CD11b darauf hin, dass der B-Zellfollikel (CD19⁺-Zellen) von einer T-Zellzone (CD3⁺ Zellen) sichelförmig umgeben ist (Abb. 9) (BUCKLEY et al. 1987, MEBIUS und KRAAL 2005). Diese sind auch um die Arteriole vermehrt angehäuft und unterbrechen die Marginalzone am Übergang von weißer zu roter Pulpa. CD11c⁺ Zellen waren sowohl innerhalb des Follikels als auch in der roten Pulpa vorhanden, wohingegen CD11b⁺ Zellen vor allem in der roten Pulpa, wie auch von McILLROY et al. (2001) gezeigt, lokalisiert waren (Abb. 8) (MCILROY et al. 2001).

Für die Untersuchung der Verteilung von DC-Subpopulationen wurden zunächst die herkömmlichen Marker für mDC-1 DCs, mDC-2 DCs und pDCs des peripheren Blutes berücksichtigt (DZIOANEK et al. 2000, MACDONALD et al. 2002). In der humanen Milz wurden bereits CD123⁺BDCA2⁺ pDCs in der Marginal- bzw. periarteriolären Zone beschrieben (NASCIMBENI et al. 2009). Unsere Immunfluoreszenzanalysen konnten die Lokalisation in der roten Pulpa bestätigen und zeigen, dass es eine Aufspaltung in potentiell zwei pDC Populationen mit BDCA2⁺CD123⁺ und BDCA2⁺CD123⁻ Zellen geben könnte. SCHWAB et al. (2010) konnten kürzlich ebenfalls zwei pDC Subpopulationen zuvor kultivierter pDCs (CD123⁺BDCA4⁺) in peripherem Blut via FACS-Analysen definieren (SCHWAB et al. 2010). Bei diesen FACS-Analysen wurde der Marker CD11c jedoch nicht als Ausschlusskriterium in die Auswertung einbezogen, und die Definition der beiden pDC Populationen nur wage umrissen (SCHWAB et al. 2010). Weiterhin zeigte sich in unseren Untersuchungen nach Auszählung aller in der Milz definierbaren pDCs, dass BDCA2⁺CD123⁺ pDC-1 DCs mit nur 18 Zellen/800µm² und BDCA2⁺CD123⁻ pDC-2 DCs mit 1 Zelle/800µm² die beiden kleinsten DC-Populationen der humanen Milz sind

(Abb. 10E). Die Funktion der sehr spärlich vorkommenden pDC-2 DCs als eigene Population wird derzeit in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dudziak intensiv untersucht. Auch die Produktion von IFN- α und $-\beta$ durch pDC-1 und pDC-2 DCs soll zukünftig via Immunfluoreszenz und intrazellulärer FACS-Färbung analysiert werden (ASSELIN-PATUREL et al. 2001, SHORTMAN und LIU 2002, LIU 2005).

Die Anwesenheit von nicht weiter definierten CD11c⁺ bzw. CD11c⁺CD205⁺ mDCs wurde in der Marginalzone, am Übergang von weißer zu roter Pulpa sowie in der T-Zell und B-Zellzone festgestellt (MCILROY et al. 2001, PACK et al. 2008). Nach Auswertung unserer Bilder zeigten sich CD11c⁺BDCA1⁺ mDC-1 DCs als die am häufigsten vorhandene Subpopulation mit ca. 57 Zellen/800 μ m² (Abb. 10), die vor allem in der Marginalzone des Follikels bzw. in der T-Zellzone, nicht jedoch in der B-Zellzone anwesend war. Diese Lokalisation stimmt nur zum Teil mit den Daten anderer Forschungsgruppen überein, welche CD11c⁺ DCs auch innerhalb der B-Zellfollikel beschreiben (MCILROY et al. 2001, PACK et al. 2008). Bei der Kofärbung mit BDCA1 bzw. BDCA3 fiel weiterhin auf, dass auch CD11c⁺BDCA1⁻ sowie CD11c⁺BDCA3⁻ Zellen vorhanden sind, sodass eine alleinige Färbung mit CD11c nicht ausschließlich auf DC-Subpopulationen deuten kann (IHANUS et al. 2007, GAHMBERG et al. 1997). Für eine Verifizierung von DCs in der humanen Milz ist daher die Berücksichtigung weiterer Oberflächenrezeptoren nötig. Neben den BDCA-Antikörpern kämen hierfür der Marker CD169 in Frage, da er spezifisch von Makrophagen in humaner Milz exprimiert wird (PACK et al. 2008). Andere Marker werden zurzeit in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dudziak (Gordon Heidkamp) intensiv per Lyoplate-Screening Experimenten identifiziert.

In durchgeführten Kontrollexperimenten zeigte sich, dass die verwendete Isotypkontrolle des BDCA1-Antikörpers eine unspezifische Bindung an fast alle Zellen des humanen Milzgewebes, jedoch nicht an CD11c⁺ Zellen aufwies (Abb. 11B). Der zu testende Antikörper BDCA1 hingegen färbte nur CD19⁺ B-Zellen und CD11c⁺ DCs an (Abb. 11A, Daten nicht gezeigt). Es ist möglich, dass der Isotyp-Kontrollantikörper an Fc-Rezeptoren oder andere Moleküle an der Zelloberfläche in der humanen Milz bindet. Alternativ könnte in Folgeexperimenten die IgG2a-PE Isotypkontrolle einer anderen Firma, oder Antikörper eines anderen IgG-Isotypes (z.B. IgG1) verwendet werden, da auch die Fc-Blockierung diese falsch positiven Signale von IgG2a nicht eliminieren konnte (Daten nicht gezeigt). Weiterhin könnte versucht werden die Glykosylierung der Antikörper abzuspalten und somit, wie von NIMMERJAHN et al. (2007) gezeigt, eine Bindung an Fc-Rezeptoren zu unterdrücken (NIMMERJAHN et al. 2007).

Die zahlenmäßig zweithäufigste Population stellen die mDC-2 DCs mit ca. 48 Zellen/800 μ m² dar (Abb. 10D). Diese sind gekennzeichnet durch die hohe Expression von BDCA3 und niedrige Expression von CD11c. Da BDCA3 als eher unspezifischer Marker

gesehen werden muss, da er an Thrombomodulin von Endothelzellen bindet, war die Co-Lokalisation mit CD11c das ausschlaggebende Kriterium, die Zellen als mDC-2 DCs zu charakterisieren (STEINIGER et al. 2001). Diese DC-Subpopulation war vor allem in der Marginalzone und T-Zellzone lokalisiert (Abb. 10C). In der Isotyp-Kontrollanalyse zeigte die vergleichende Färbung von IgG1-PE zu BDCA3-PE keine Signale und die Bindung des Antikörpers kann somit als spezifisch bezeichnet werden. Die Arbeitsgruppen von Caetano Reis e Sousa und Irina Caminschi konnten kürzlich zeigen, dass der neue vielversprechende Antikörper gegen den C-Typ-Lektinrezeptor Clec9a spezifisch mDC-2 DCs im FACS erkennt (JONGBLOED et al. 2010, POULIN et al. 2010, SANCHO et al. 2008, CAMINSCHI et al. 2008). JONGBLOED et al. (2010) verwendeten diesen selbst hergestellten Antikörper erfolgreich für Immunfluoreszenzaufnahmen zur Detektion von mDC-2 DCs in humanen Lymphknoten (JONGBLOED et al. 2010). Nach anderen Angaben scheint dieser bislang nicht kommerziell erhältliche Antikörper aber dennoch nicht für die Immunfluoreszenz geeignet zu sein (persönliche Kommunikation von Frau Prof. Dudziak mit Caetano Reis e Sousa, University College of London, UK). Deshalb bestand ein Teil der Doktorarbeit darin, sowohl Clec9a, als auch andere C-Typ-Lektinrezeptoren als lösliches Protein herzustellen, die zur Immunisierung und damit Herstellung monoklonaler Antikörper zukünftig verwendet werden sollen (Abb. 15). Ein weiterer kürzlich definierter Antikörper gegen den Chemokinrezeptor XCR-1 (Human chemokine (C motif) receptor-1), der in der Lage ist, mDC-2 DCs des Blutes gut mittels FACS-Färbung zu charakterisieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit getestet (Daten nicht gezeigt, BACHEM et al. 2010, CROZAT et al. 2010). Leider erwies sich dieser zur Detektion von mDC-2 DCs in der Immunfluoreszenz aus zweierlei Gründen als ungeeignet. Einerseits zeigte sich der Antikörper sowohl in der Färbung von Milzschnitten, als auch in FACS-Analysen trotz einer sehr hoch eingesetzten Konzentration und Amplifikation des Signales als nur gering bis nicht bindend. Andererseits konnte nicht festgestellt werden, ob die Bindung tatsächlich spezifisch für mDC-2 DCs ist, da es sich um einen polyklonalen Antikörper handelte (Daten nicht gezeigt, Tab. 3). Ebenso wurde CD26 als Marker für mDC-2 DCs in der Immunfluoreszenz getestet, konnte diese aber, im Gegensatz zu den Färbungen im Thymus, nicht spezifisch erkennen (Daten nicht gezeigt).

5.3 Immunfluoreszenzanalysen humaner Thymusproben

Der Thymus ist für die Selektion der T-Zellen verantwortlich, wobei hierbei die Interaktion von Thymozyten, Thymusepithelzellen und DCs entscheidend ist, um eine zentrale Toleranz zu erzeugen (WELSCH 2004, VON BOEHMER 2009). Zur Identifizierung

struktureller Gegebenheiten im Thymus, wurden zuerst mehrere serielle Schnitte mit dafür geeigneten Markern gefärbt (CD3, CD11c, CD11b, HLA-DR, TROMA-1). TROMA1 ist als Antikörper gegen Zytokeratin-8 gerichtet, welches von kortikalen Epithelzellen exprimiert wird und zur Definition der Organgrenzen diente (CHUNG et al. 2007). Dennoch zeigte sich nach Auswertung der Immunfluoreszenzen, dass auch mTECs und dadurch Hassall-Körperchen mit diesem Antikörper in der Medulla des Thymus detektiert werden können. mTECs sekretieren *Thymic stromal lymphopoietin* (TSLP), was zur Aktivierung von CD11c⁺ DCs führt, und exprimieren HLA-DR, wodurch sie zu den professionellen APCs zählen (KOBLE und KYEWSKI 2009, MELLMAN 1990, VILLADANGOS et al. 2000, WATANABE et al. 2004). Die Färbungen mit CD11c zeigen eine ringförmige Anordnung CD11c⁺ Zellen um das Hassall-Körperchen (Abb. 12). Diese Region ist wichtig, da dort HLA-DR exprimierende APCs und reife Thymozyten lokalisiert sind, um den Thymus mit dem Blutstrom Richtung Peripherie verlassen zu können (JANEWAY et al. 2000).

DCs im Thymus wurden bereits vor allem in der Medulla bzw. Übergangszone von Medulla und Kortex lokalisiert (WU und SHORTMAN 2006). Die Gruppe um WU und SHORTMAN et al. (2006) beschrieben in ihren Untersuchungen CD11c⁺CD4⁺ mDCs und konnten diese anhand von CD11b in CD11b⁻ und CD11b⁺ Subpopulationen unterteilen (WU und SHORTMAN 2006). Weiterhin fanden WU und SHORTMAN (2006) heraus, dass CD11b⁻mDCs mehr kostimulatorische Marker (CD86) exprimieren, als die selteneren CD11b⁺ mDCs (WU und SHORTMAN 2006). Hierbei könnte es sich bei den CD4⁺CD11c⁺CD11b⁺ Zellen jedoch auch um Makrophagen handeln, da CD4, CD11b und CD11c keine spezifischen Marker für DCs darstellen (IHANUS et al. 2007).

Insgesamt weisen unsere Experimente darauf hin, dass im Thymus mindestens drei DC-Subpopulationen existieren. Die zweithäufigste Subpopulation mit 56 Zellen/800µm² stellen die CD11c⁺BDCA1⁺ mDC-1 DCs dar (Abb. 14A, B). Diese waren vor allem in der Medulla, kortikomedullärer Verbindungsregion und vereinzelt auch im Kortex vorhanden. Zusätzlich zeigte BDCA1 eine weit verbreitete Expression in der Immunfluoreszenz. Weitere FACS- und Immunfluoreszenzuntersuchungen ergaben, dass der Marker BDCA1, der auch als alternatives MHC-Molekül CD1c bekannt ist, interessanterweise auf humanen doppelt positiven Thymozyten (CD11c⁻CD19⁻CD56⁻CD3⁺CD4⁺CD8⁺) exprimiert ist (HEIDKAMP et al., Manuskript (1) in Vorbereitung). Aufgrund der weitreichenden Screening-Experimente (Lyoplate, BD), die von Gordon Heidkamp mittels FACS-Analysen parallel zu den hier vorgestellten Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt wurden, ergab sich, dass die im Thymus als CD11c^{low}BDCA3⁺ definierten mDC-2 DCs den Marker CD26 exprimierten (HEIDKAMP et al. Manuskript (3) in Vorbereitung). Bei den darauf durchgeführten Immunfluoreszenzanalysen konnten CD26⁺ mDC-2 DCs eindeutig im Gewebe identifiziert werden (HEIDKAMP et al. Manuskript (3) in Vorbereitung). Damit

kann hier CD26 für die Darstellung von mDC-2 DCs des Thymus als neuer Marker vorgeschlagen werden. Die so charakterisierten CD11c⁺CD26⁺ mDC-2 DCs konnten nun ohne zusätzliche Färbung von BDCA3 als kleinste der drei Subpopulationen mit durchschnittlich 26 Zellen/800µm² in der Medulla detektiert werden (Abb. 14C, D). Anstelle des von WU und SHORTMAN (2006) verwendeten Antikörpers gegen CD11b erscheint die Co-Färbung mit BDCA1 für mDC-1 DCs bzw. CD26 für mDC2 DCs sinnvoller (WU und SHORTMAN 2006). Im Gegensatz zu unseren Thymus-Daten zeigen FACS-Analysen und nicht gezeigte Immunfluoreszenzaufnahmen von CD26 in der Milz leider eine weniger spezifische Abgrenzung (Daten nicht gezeigt). Von CD26 ist bisher bekannt, dass die an der Oberfläche von Zellen exprimierte Dipeptidyl Peptidase IV (CD26) ein Enzym darstellt, welches befähigt ist, N-terminale Sequenzen von Peptiden abzuspalten und zu verändern (BOSEK et al. 2004). Welche Funktion CD26 auf mDC-2 DCs im Thymus spielt, wird zukünftig geklärt werden müssen.

Ebenso konnten pDCs als IFN-α und -β produzierende Zellen im Kortex des Thymus lokalisiert werden (BENDRISS-VERMARE et al. 2000, VANDENABEELE et al. 2001, WU und SHORTMAN 2006). Im Gegensatz zu unseren Daten, in denen pDCs kein CD11c exprimieren, zeigen die von WU und SHORTMAN (2006) als CD11c^{medium}HLA-DR^{low} definierte pDCs in FACS-Analysen eine leichte Expression von CD11c (WU und SHORTMAN 2006). Auch BENDRISS-VERAMRE et al. (2004) beschrieben eine leichte Expression von CD11c auf pDCs in der Immunfluoreszenz, wobei sie diese, im Gegensatz zu unseren Daten nicht in der Medulla, sondern im Kortex lokalisierten (BENDRISS-VERMARE et al. 2004). Leider geht aus den Daten von WU und SHORTMAN (2006) sowie von BENDRISS-VERMARE et al. (2004) nicht hervor, welchen strukturellen Zustand der Thymus aufwies oder ob das Material evtl. von erkrankten Patienten stammte (BENDRISS-VERMARE et al. 2000, WU und SHORTMAN 2006). Unsere Thymus-Proben, die sich mittlerweile auf ca. 120 Thymi erstrecken, wurden dahingehend sorgfältig ausgewählt und nur dann verwendet, wenn die Kinder bis auf die notwendige Herzoperation keine weiteren Erkrankungen aufwiesen. pDCs waren in unseren Färbungen als CD123⁺BDCA2⁺-Zellen ausschließlich in der Thymusmedulla vorhanden und stellten die größte DC-Subpopulation des Thymus mit 58 Zellen/800µm² dar (Abb. 14E, F). Diese Daten stimmen mit den von Gordon Heidkamp durchgeführten FACS-Analysen des humanen Thymus überein (HEIDKAMP et al., Manuskript (3) in Vorbereitung). Im Vergleich von Thymus und Milz konnten wir im Thymus jedoch nur eine (BDCA2⁺CD123⁺) und nicht zwei pDC-Populationen definieren (Abb. 14E, F). Im Gegensatz zur Milz, konnten wir im Thymus keine falsch positiven Bindungen der verwendeten Antikörper (BDCA1, BDCA2, BDCA3) gesehen werden, was auf eine spezi-

fische Expression von Fc-Rezeptoren in sekundären lymphatischen Organen und eine eher untergeordnete Rolle der Fc-Rezeptoren im Thymus hindeuten könnte (Abb. 15).

5.4 Immunfluoreszenzenanalysen humaner Tonsillen

Tonsillen sind lymphatische Organe des Mund- und Rachenbereiches, die histologisch aus B-Zellfollikeln und einer parafollikulären T-Zellzone bestehen (WELSCH 2004). Von humanen Tonsillen konnte durch strukturgebende Färbungen gezeigt werden, dass sich riesige B-Zellfollikel unterhalb des Epithels neben einer parafollikulären T-Zellzone anordnen, wie bereits von WELSCH (2004) gezeigt. CD11c⁺ Zellen waren sowohl im Follikel als auch im umliegenden Gewebe lokalisiert. Weiterhin wurden auch Follikuläre Dendritische Zellen (FDC) in den Tonsillen beschrieben, die jedoch keine DCs im Allgemeinen darstellen (KOSCO-VILBOIS et al. 2005). In den Tonsillen wurden die drei bekannten DC-Subpopulationen der CD11c⁺BDCA1⁺ mDC-1 DCs, CD11c^{low}BDCA3⁺ mDC-2 DCs und CD11c⁻BDCA2⁺ pDCs per FACS-Analysen bereits identifiziert (JONGBLOED et al. 2010, SUMMERS et al. 2001, LINDSTEDT et al. 2005). Dies stimmt mit unseren Experimenten überein, in denen alle drei Subpopulationen in den durchgeführten Immunfluoreszenzen, anhand dieser Marker, nachgewiesen werden konnten (Abb. 17). Die DC-Subpopulationen waren vor allem in der parafollikulären T-Zellzone bzw. direkt unterhalb des Epithels lokalisiert (Abb. 18). Gleichzeitig wurden Isotypkontrollen mit den Antikörpern BDCA1, 2 und 3 durchgeführt, um eine unspezifische Bindung der Fc-Region der verwendeten Antikörper an Zellen auszuschließen. Dabei zeigte sich, wie auch in der Milz, eine Bindung des Kontrollantikörpers IgG2a an fast alle Zellen des humanen tonsillären Gewebes, jedoch nicht an CD11c⁺ Zellen (Abb. 11B, 19D). Der zu testende Antikörper BDCA1 hingegen färbte nur CD19⁺ B-Zellen und CD11c⁺ DCs an (Abb. 19C). Es ist möglich, dass ebenso wie in der Milz der Isotyp-Kontrollantikörper an Fc-Rezeptoren binden kann. Um die unspezifische Bindung zu umgehen, könnte in zukünftigen Experimenten BDCA1 als IgG1-Isotyp verwendet werden.

5.5 Expressionsanalyse von Endozytoserezeptoren im humanen Gewebe

C-Typ-Lektinrezeptoren gehören zur Familie der Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) und sind neben Fc-Rezeptoren für die Rezeptor-vermittelte Endozytose von Antigenen auf DCs verantwortlich (MEDZHITOV und JANEWAY 2000, AMIGORENA et al. 1992, FIDGOR et al. 2002). DUDZIAK et al. (2007) zeigten zum ersten Mal *in vivo*, dass durch die Antigenbeladung verschiedener DC-Subpopulationen und deren spezifisch auf der Oberfläche exprimierten C-Typ-Lektinrezeptoren, unterschiedliche T-Zellantworten *in vivo*

hervorgerufen werden konnten. Diese vielversprechende Methode könnte bei genauerer Kenntnis der Expression von C-Typ-Lektinrezeptoren auf humanen DCs, evtl. auch in therapeutischem Zusammenhang, in der Humanmedizin eingesetzt werden. Für dieses Vorhaben ist es nötig, zunächst herauszufinden, welche C-Typ-Lektinrezeptoren spezifisch auf den humanen DC-Subpopulationen im Gewebe exprimiert sind. Eine unspezifische Expression könnte bei ungenügender Menge an antigenbeladenem Antikörper unter Umständen eine Toleranzinduktion und keine gerichtete Immunantwort zur Folge haben (DHODAPKAR et al. 2008, WEINER et al. 2008).

Zur Untersuchung der Verteilung der Oberflächenrezeptoren via Immunfluoreszenz wurden serielle Organschnitte der humanen Gewebe angefertigt und gefärbt. Dabei konnte, wie auch bei PACK et al. (2008) gezeigt, in der humanen Milz eine Expression des DEC205-Rezeptors hauptsächlich auf CD11c⁺ Zellen innerhalb des B-Zellfollikels bzw. am Übergang zur roten Pulpa, festgestellt werden (Abb. 12B) (PACK et al. 2008). Eine geringe Expression von DEC205 auf B-Zellen wurde ebenfalls von CAMINSCHI et al. (2009) und GUO et al. (2000) gesehen (CAMINSCHI et al. 2009, GUO et al. 2000). Unsere Daten stimmen mit den Beobachtungen von PACK et al. (2008) überein, die eine DEC205-Expression hauptsächlich auf CD11c⁺ Zellen (DCs) beschrieben, wobei ein Vorhandensein von kostimulatorischen Markern wie CD86 fehlten und es sich somit höchstwahrscheinlich um unreife DCs handelt (PACK et al. 2008). Ob diese Zellen nur mDCs oder unter Umständen auch Makrophagen repräsentieren, könnte durch Co-Färbungen mit BDCA1 (mDC-1 DCs), BDCA3 (mDC-2 DCs) oder CD169 (Makrophagen) untersucht werden. Im Thymus hingegen war DEC205 als weit verbreiteter Marker zu sehen, der sowohl auf DCs als auch auf Thymozyten und Epithelzellen exprimiert war (CAMINSCHI et al. 2009, INABA et al. 1995) (Abb. 16B).

Weiterhin zeigen unsere Daten eine Expression von Langerin (CD207) in der Milz. Es waren sowohl CD11c⁺CD207⁺ Zellen als auch CD11c⁻CD207⁺ Zellen vorhanden (Abb. 12E). Dabei könnte es sich bei den CD11c⁺CD207⁺ Zellen, wie in der Maus gezeigt, um migratorische DCs handeln (VALLADEAU et al. 2000, LENZ et al. 1993). Im humanen Thymus konnten wir Langerin als Oberflächenrezeptor nicht nachweisen. Da dies der einzig verfügbare kommerzielle monoklonale Antikörper ist, und kein Zugriff auf die entsprechenden Hybridomzellen möglich ist, wurde auch humanes und murines Langerin kloniert, um lösliche Proteine für eine zukünftige Antikörperherstellung zu produzieren (Abb. 15E, 21A, I).

Weiterhin haben wir auch den Mannose-Makrophagen-Rezeptor MMR (CD206) in der Milz als weit verbreiteten Oberflächenrezeptor gesehen, da er sowohl auf Makrophagen als auch auf DCs vorhanden ist (PACK et al. 2008). Zudem konnten wir eine Co-Färbung von MMR mit CD11c erkennen (Abb. 12D). Im Thymus war es uns möglich eine

Verteilung von MMR⁺ Zellen im umliegenden Bindegewebe, in Thymuskortex und -medulla nachzuweisen. In der Medulla waren zusätzlich MMR⁺CD11c⁺ Zellen anwesend (Abb. 16D).

Im Vergleich zur MMR/DEC205-Expression zeigen unsere Daten, dass der von Gordon Heidkamp produzierte monoklonale Antikörper gegen hDCIR (15E12) nur auf wenigen Zellen in der Milz exprimiert ist (Abb. 12C, HEIDKAMP et al. 2010, HEIDKAMP et al. Manuskript (3) in Vorbereitung). Auch im Thymus konnten wir hDCIR nur auf wenigen Zellen nachweisen, wobei eine Co-Färbung mit CD11c nicht zu sehen war und die Zellen vorwiegend in der Medulla lagen (Abb. 15C). Dies steht im Kontrast zu den aus dem Blut erhaltenen Ergebnissen, in denen DCIR auf allen CD11c positiven Zellen exprimiert ist (HEIDKAMP et al. 2010).

DC-SIGN/CD209 ist als Antikörper kommerziell erhältlich und stellt einen spezifischen, bereits sehr gut untersuchten Lektinrezeptor dar (FIDGOR et al. 2002, VAN KOOYK und GEIJTENBEEK 2003, GEIJTENBEEK et al. 2000). DC-SIGN war in der humanen Milz ebenfalls auf CD11c⁺ sowie CD11c⁻ Zellen exprimiert und kein weit verbreiteter Oberflächenrezeptor (Abb. 12A). Im Thymus war DC-SIGN auf sogenannten CD11c⁺ *thymic cortical dendritic macrophages* (TCDM) im Kortex vorhanden (WAKIMOTO et al. 2008). Ebenfalls im Kortex waren DC-SIGN-exprimierende, CD11c⁻ Zellen zu erkennen. In der Medulla hingegen konnten sowohl CD11c⁻DC-SIGN⁺ sowie CD11c⁺DC-SIGN⁺ Zellen identifiziert werden. Somit stellt DC-SIGN einen eher unspezifischen Marker für DCs im humanen Thymus dar.

5.6 Produktion löslicher C-Typ-Lektinrezeptoren für die Herstellung spezifischer Antigenbeladungsantikörper

Um in Zukunft auch Antigene an humane Antikörper fusionieren und zur Antigenbeladung humaner DCs verwenden zu können, ist es ein Anliegen der Arbeitsgruppe um Frau Prof. Dudziak, monoklonale Antikörper gegen C-Typ-Lektinrezeptoren (u.a. murines und humanes Dectin-1 und -2, Clec9a und Langerin) zu produzieren. Im Rahmen der hier vorliegenden Doktorarbeit sollten diese Moleküle als lösliches Protein hergestellt werden, um anschließend monoklonale Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne zu erhalten. Vor allem an einem Antikörper gegen humanes Clec9a bestand großes Interesse, da die Expression auf mDC-2 DCs durch FACS-Analysen bereits verifiziert wurde und ein Clec9a-Antikörper somit einen guten Antikörper für Immunfluoreszenzaufnahmen und spätere Antigenbeladung darstellt (SANCHO et al. 2008, CAMINSCHI et al. 2008, JONGBLOED et al. 2010).

Da weder Antikörper, noch Hybridomzellen gegen murines und humanes Dectin-1 und -2, Clec9a und Langerin kommerziell erhältlich sind, wurde jeweils die extrazelluläre Domäne der C-Typ-Lektinrezeptor-DNA, nach dem Vorbild von HEIDKAMP et al. (2010), in einen Vektor (pcDNA3.1 mit His-Tag) kloniert (HEIDKAMP et al. 2010). Nach der Transfektion in HEK293T-Zellen wurden die Proteine mithilfe des His-Tags angereichert und gereinigt. Um zu verifizieren, dass das Protokoll der Transfektion, Fällung und Elution funktioniert, wurden der alte Vektor 733 und der neue Vektor 986 (zweite XbaI-Schnittstelle fehlt) mit hCLECSF6/DCIR in HEK293T-Zellen transfiziert (Abb. 22) (HEIDKAMP et al. 2010). Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl das Protokoll erfolgreich war als auch der neue Vektor für die Transfektion geeignet ist, denn es resultierte eine große Proteinfraction im Coomassie-Gel (Abb. 22). Im Falle von humanem und murinem Dectin-1 konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit erfolgreich lösliches Protein produziert werden (Abb. 23).

Neben humanem und murinem Dectin-1 wurden auch murines und humanes Dectin-2, Langerin und Clec9a kloniert (Abb. 21). Dabei zeigte sich nach ersten Transfektionen der löslichen C-Typ-Lektinrezeptor-Varianten, dass die Proteinsekretion nicht erfolgte (Daten nicht gezeigt). Ausschlaggebend hierfür könnte sein, dass die Sequenz der generierten löslichen Rezeptoren zu nahe an der Transmembrandomäne startete. Daher wurden jeweils zwei weitere kürzere Varianten der C-Typ-Lektinrezeptoren im Rahmen dieser Arbeit kloniert, die erst in einem späteren Abschnitt der Hinge-Region starten (Abb. 21K, Langerin (AS 143) und Langerin (AS 205), hDectin-2 AS 146 und hDectin-2 AS 112, hClec9a AS 293 und hClec9a AS 263, hDectin-1 AS 146 und hDectin-1 AS 170). Die Transfektion und Produktion dieser kürzeren Varianten in HEK293T-Zellen ist derzeit noch in Bearbeitung.

5.7 Ausblick

Monoklonale Antikörper gegen humanes und murines Dectin-1 werden aktuell generiert und werden anschließend für weitere Untersuchungen zur Verfügung stehen. Für die zukünftige Antikörperproduktion werden Tiere (Ratten) mit dem löslichen C-Typ-Lektinrezeptor-Protein immunisiert. Die aus der Milz dieser Tiere gewonnenen B-Zellen werden anschließend mit immortalisierten Myelom-Zellen fusioniert und einzelne Hybridome in der Zellkultur kultiviert werden. Überstände dieser Hybridomzellen werden mittels *enzyme linked immuno sorbent assay* (ELISA) auf ihre Bindung an das entsprechende C-Typ-Lektinrezeptor-Protein untersucht. Daraufhin werden mehrere Hybridome selektiert und die Bindung und Internalisierung der produzierten Antikörper an verschiedene Zellen im Blut via FACS-Analysen untersucht werden.

Des Weiteren soll die C-Typ-Lektinrezeptor-Expression in den humanen Tonsillen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht werden. Ebenfalls wird die Verteilung der DC-Subpopulationen in den nächsten Monaten in Gewebestücken humaner gesunder Haut sowie Melanomproben analysiert werden.

6 Zusammenfassung

Nathalie Eissing

Charakterisierung von Subpopulationen Dendritischer Zellen und der Expression von C-Typ-Lektinrezeptoren in humanen Geweben mittels Immunfluoreszenzmikroskopie

Institut für Immunologie, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig
Dermatologische Klinik, Universitätsklinik Erlangen-Nürnberg

Eingereicht im April 2011

88 Seiten, 23 Abbildungen, 6 Tabellen, 173 Literaturangaben

Schlüsselwörter: Dendritische Zellen, Immunfluoreszenz, humanes Gewebe, C-Typ-Lektinrezeptoren, DC-Subpopulationen, Antigenbeladung/Antigen-Targeting

Dendritische Zellen (DCs) sind befähigt, als potenteste Antigen-präsentierende Zelle antigenspezifische Immunantworten zu initiieren und zu regulieren. Mittels *in vivo* Antigenbeladung von spezifischen DC-Subpopulationen mit rekombinanten Antigen-gekoppelten Antikörpern gegen C-Typ-Lektinrezeptoren konnte im Mausmodell erfolgreich adaptive zelluläre und humorale Immunantworten hervorgerufen werden. Im Menschen kann dieser Ansatz therapeutisch noch nicht zum Einsatz kommen, da DC-Subpopulationen im humanen Gewebe momentan nicht ausreichend charakterisiert sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurden humane Gewebe auf das Vorhandensein der im peripheren Blut beschriebenen DC-Subpopulationen (mDC-1 DCs: CD11c⁺BDCA1⁺, mDC-2 DCs: CD11c^{low}BDCA3⁺ und pDCs: CD11c⁻CD123⁺BDCA2⁺) und die Expression von C-Typ-Lektinrezeptoren (DC-SIGN, MMR, Langerin, DCIR und DEC205) mittels Immunfluoreszenz untersucht. Anhand der vorgegebenen Marker im peripheren Blut konnten alle drei DC-Subpopulationen in der Milz, Thymus und Tonsillen detektiert werden. Zusätzlich konnte hier erstmalig eine vierte CD11c⁻CD123⁻BDCA2⁺ pDC-2 DC-Subpopulation in der Milz beschrieben werden, deren Funktion derzeit noch näher untersucht wird. Im Thymus konnte CD26 nach FACS-Analysen von Gordon Heidkamp als spezifischer Marker für mDC-2 DCs identifiziert und dies in der vorliegenden Arbeit auch durch Immunfluoreszenzaufnahmen von Gewebeschnitten verifiziert werden. CD26 stellt damit erstmalig einen Marker dar, der erfolgreich als alternativer Marker für BDCA3, welcher unspezifisch an Thrombomodulin bindet, zur Identifikation von mDC-2 DCs in der Immunfluoreszenz von Thymusproben eingesetzt werden könnte. Die getesteten Antikörper XCR-1

(monoklonal) und Clec9a (polyklonal) hingegen erschienen in der Immunfluoreszenz sowie in FACS-Analysen (Gordon Heidkamp) nicht geeignet. Weiterhin wurde die Expression ausgewählter C-Typ-Lektinrezeptoren (MMR, Langerin, DCIR, DC-SIGN und DEC205) im vorhandenen Gewebe näher betrachtet. Nach Auswertung der Immunfluoreszenzen konnte eine weit verbreitete Expression der untersuchten C-Typ-Lektinrezeptoren in humaner Milz und Thymus gefunden werden. Einzig hDCIR war auf vereinzelt Zellen exprimiert, und Langerin im Thymus nicht detektierbar. Um nicht verfügbare monoklonale Antikörper gegen C-Typ-Lektinrezeptoren zu produzieren und später Antigene an diese koppeln zu können, sollten lösliche Proteine einiger C-Typ-Lektinrezeptoren (humanes und murines Clec9a, Dectin-1 und -2, Langerin) produziert werden. Dabei gelang es bereits, lösliche Proteine der C-Typ-Lektinrezeptoren von humanem und murinem Dectin-1 zu generieren und diese zur weiteren Antikörperproduktion einzusetzen.

7 Summary

Nathalie Eissing

Characterization of dendritic cell subpopulations and C-type lectin receptors in human tissue via immunofluorescence analysis

Institute of Immunology, Veterinary Faculty, University of Leipzig
Department of Dermatology, University of Erlangen-Nuremberg

Submitted in April 2011

88 pages, 23 figures, 6 tables, 173 references

Keywords: dendritic cells, immunofluorescence analysis, human tissue, C-type lectin receptors, DC subpopulations, antigen targeting

Being the most potent antigen-presenting cells, DCs are able to initiate and regulate antigen-specific immune responses. In mice the *in vivo* antigen-targeting with antigen coupled antibodies to C-type lectin receptors of specific DC subpopulations has been successfully shown to trigger adaptive and humoral immune responses *in vivo*. This approach is not used in therapeutic context in humans, as the characterization of DC subpopulations in human tissue is not yet finished. Therefore, the aim of this thesis was to screen human lymphoid tissues for the presence of DC subpopulations, as of their definitions in human peripheral blood (mDC-1 DCs: CD11c⁺BDCA1⁺, mDC-2 DCs: CD11c^{low}BDCA3⁺ and pDCs: CD11c⁻CD123⁺BDCA2⁺). Furthermore, the expression of potential endocytosis receptors as the C-type lectin receptors DC-SIGN, MMR, Langerin, DCIR und DEC205 needed to be studied via immunofluorescence analyses. Here, it is shown that all three DC-subpopulations could be identified in human spleen, thymus and tonsils with the help of the known DC markers used in peripheral blood. Additionally, for the first time we could identify a potentially fourth CD11c⁻CD123⁻BDCA2⁺ pDC-2 DC subpopulation in human spleen. The function of this new subpopulation has to be further characterized. FACS-analyses done by Gordon Heidkamp stated that CD26 is a specific marker for mDC-2 DCs in human thymus. These data could be verified by immunofluorescence analysis. CD26 could be used to identify mDC-2 DCs in human thymus as it could be an alternative marker for BDCA3, which binds unspecifically to thrombomodulin. Other tested available antibodies such as XCR-1 (monoclonal) and Clec9a (polyclonal) seemed less useful for FACS-analyses (Gordon Heidkamp) and immunofluorescence analysis. Further, the expression of selected C-type lectin receptors (MMR, langerin,

DCIR, DC-SIGN und DEC205) was investigated. The examined immuno-fluorescence analyses show a wide spread expression of all C-type lectin receptors in human spleen and thymus. hDCIR was the only receptor uniquely expressed, whereas langerin could not be found in human thymic tissue. In addition, soluble proteins of C-type lectin receptors (human and murine Clec9a, Dectin-1 and -2, Langerin) should be produced to be able to generate monoclonal antibodies against these receptors and couple antigen onto the antibodies. In doing so we were already successful to produce soluble proteins of human and murine Dectin-1.

8 Literaturverzeichnis

Ackerman AL, Kyritsis C, Tampe R, Cresswell P. Access of soluble antigens to the endoplasmic reticulum can explain cross-presentation by dendritic cells. *Nat Immunol.* 2005 Jan;6(1):107-13.

Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature.* 1998 Mar 5;392(6671):86-9.

Amigorena S, Bonnerot C, Drake JR, Choquet D, Hunziker W, Guillet JG, et al. Cytoplasmic domain heterogeneity and functions of IgG Fc receptors in B lymphocytes. *Science.* 1992 Jun 26;256(5065):1808-12.

Anderton SM, Radu CG, Lowrey PA, Ward ES, Wraith DC. Negative selection during the peripheral immune response to antigen. *J Exp Med.* 2001 Jan 1;193(1):1-11.

Andrews DM, Estcourt MJ, Andoniou CE, Wikstrom ME, Khong A, Voigt V, et al. Innate immunity defines the capacity of antiviral T cells to limit persistent infection. *J Exp Med.* 2010 Jun 7;207(6):1333-43.

Ardavin C, Martinez del Hoyo G, Martin P, Anjuere F, Arias CF, Marin AR, et al. Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends Immunol.* 2001 Dec;22(12):691-700.

Ardavin C. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *Nat Rev Immunol.* 2003 Jul;3(7):582-90.

Asselin-Paturel C, Boonstra A, Dalod M, Durand I, Yessaad N, Dezutter-Dambuyant C, et al. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol.* 2001 Dec;2(12):1144-50.

Asselin-Paturel C, Brizard G, Pin JJ, Briere F, Trinchieri G. Mouse strain differences in plasmacytoid dendritic cell frequency and function revealed by a novel monoclonal antibody. *J Immunol.* 2003 Dec 15;171(12):6466-77.

Aubock J, Romani N, Grubauer G, Fritsch P. HLA-DR expression on keratinocytes is a common feature of diseased skin. *Br J Dermatol.* 1986 Apr;114(4):465-72.

- Bachem A, Guttler S, Hartung E, Ebstein F, Schaefer M, Tannert A, et al. Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. *J Exp Med*. 2010 Jun 7;207(6):1273-81.
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767-811.
- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998 Mar 19;392(6673):245-52
- Bangert C, Friedl J, Stary G, Stingl G, Kopp T. Immunopathologic features of allergic contact dermatitis in humans: participation of plasmacytoid dendritic cells in the pathogenesis of the disease? *J Invest Dermatol*. 2003 Dec;121(6):1409-18.
- Barjaktarevic I, Rahman A, Radoja S, Bogunovic B, Vollmer A, Vukmanovic S, et al. Inhibitory role of IFN-gamma-inducible lysosomal thiol reductase in T cell activation. *J Immunol*. 2006 Oct 1;177(7):4369-75.
- Bender A, Sapp M, Schuler G, Steinman RM, Bhardwaj N. Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J Immunol Methods*. 1996 Sept 27;196(2):121-35.
- Bendriss-Vermare N, Barthelemy C, Durand I, Bruand C, Dezutter-Dambuyant C, Moulian N, et al. Human thymus contains IFN-alpha-producing CD11c(-), myeloid CD11c(+), and mature interdigitating dendritic cells. *J Clin Invest*. 2001 Apr;107(7):835-44.
- Benninghoff A, Drenckhahn D. *Anatomie Band 2*. 15. Aufl. München: Urban & Fischer; 2002.
- Bevan MJ. Cross-priming. *Nat Immunol*. 2006 Apr;7(4):363-5.
- Bevan MJ. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med*. 1976 May 1;143(5):1283-8.

Bhardwaj N, Young JW, Nisanian AJ, Baggers J, Steinman RM. Small amounts of superantigen, when presented on dendritic cells, are sufficient to initiate T cell responses. *J Exp Med*. 1993 Aug 1;178(2):633-42.

Blasius AL, Colonna M. Sampling and signaling in plasmacytoid dendritic cells: the potential roles of Siglec-H. *Trends Immunol*. 2006 Jun;27(6):255-60.

Blasius A, Vermi W, Krug A, Facchetti F, Cella M, Colonna M. A cell-surface molecule selectively expressed on murine natural interferon-producing cells that blocks secretion of interferon-alpha. *Blood*. 2004 Jun 1;103(11):4201-6.

Bobryshev YV, Ikezawa T, Watanabe T. Formation of Birbeck granule-like structures in vascular dendritic cells in human atherosclerotic aorta. Lag-antibody to epidermal Langerhans cells recognizes cells in the aortic wall. *Atherosclerosis*. 1997 Sep;133(2):193-202.

Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC, Steinman RM. 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*. 2002 Dec 16;196(12):1627-38.

Bouneaud C, Kourilsky P, Bousso P. Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity*. 2000 Dec;13(6):829-40.

Buckley PJ, Smith MR, Braverman MF, Dickson SA. Human spleen contains phenotypic subsets of macrophages and dendritic cells that occupy discrete microanatomic locations. *Am J Pathol*. 1987 Sep;128(3):505-20.

Caminschi I, Lahoud MH, Shortman K. Enhancing immune responses by targeting antigen to DC. *Eur J Immunol*. 2009 Apr;39(4):931-8.

Caminschi I, Proietto AI, Ahmet F, Kitsoulis S, Shin Teh J, Lo JC, et al. The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement. *Blood*. 2008 Oct 15;112(8):3264-73.

Cheong C, Matos I, Choi JH, Dandamudi DB, Shrestha E, Longhi MP, et al. Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell*. 2010 Oct 29;143(3):416-29.

Cresswell P, Ackerman AL, Giodini A, Peaper DR, Wearsch PA. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. *Immunol Rev*. 2005 Oct;207:145-57.

Crozat K, Guiton R, Guilliams M, Henri S, Baranek T, Schwartz-Cornil I, et al. Comparative genomics as a tool to reveal functional equivalences between human and mouse dendritic cell subsets. *Immunol Rev*. 2010 Mar;234(1):177-98.

Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel RA, et al. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol*. 2008 Dec;9(12):1347-55.

de Jong MA, Geijtenbeek TB. Langerhans cells in innate defense against pathogens. *Trends Immunol*. 2010 Dec;31(12):452-9.

Delamarre L, Pack M, Chang H, Mellman I, Trombetta ES. Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science*. 2005 Mar 11;307(5715):1630-4.

Demedts IK, Brusselle GG, Vermaelen KY, Pauwels RA. Identification and characterization of human pulmonary dendritic cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005 Mar;32(3):177-84.

den Haan JM, Lehar SM, Bevan MJ. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med*. 2000 Dec 18;192(12):1685-96.

Dhodapkar KM, Cirignano B, Chamian F, Zagzag D, Miller DC, Finlay JL, et al. Invariant natural killer T cells are preserved in patients with glioma and exhibit antitumor lytic activity following dendritic cell-mediated expansion. *Int J Cancer*. 2004 May 10;109(6):893-9.

Drickamer K. C-type lectin-like domains. *Curr Opin Struct Biol*. 1999 Oct;9(5):585-90.

Dudziak D, Kamphorst AO, Heidkamp GF, Buchholz VR, Trumfheller C, Yamazaki S, et al. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science*. 2007 Jan 5;315(5808):107-11.

Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, et al. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol*. 2000 Dec 1;165(11):6037-46.

Ebner S, Ehammer Z, Holzmann S, Schwingshackl P, Forstner M, Stoitzner P, et al. Expression of C-type lectin receptors by subsets of dendritic cells in human skin. *Int Immunol*. 2004 Jun;16(6):877-87.

Edelson BT, Kc W, Juang R, Kohyama M, Benoit LA, Klekotka PA, et al. Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8alpha+ conventional dendritic cells. *J Exp Med*. 2010 Apr 12;207(4):823-36.

Figdor CG, van Kooyk Y, Adema GJ. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol*. 2002 Feb;2(2):77-84

Flornes LM, Bryceson YT, Spurkland A, Lorentzen JC, Dissen E, Fossum S. Identification of lectin-like receptors expressed by antigen presenting cells and neutrophils and their mapping to a novel gene complex. *Immunogenetics*. 2004 Oct;56(7):506-17.

Gahmberg CG. Leukocyte adhesion: CD11/CD18 integrins and intercellular adhesion molecules. *Curr Opin Cell Biol*. 1997 Oct;9(5):643-50.

Gallegos AM, Bevan MJ. Central tolerance: good but imperfect. *Immunol Rev*. 2006 Feb;209:290-6.

Gehrie E, Van der Touw W, Bromberg JS, Ochando JC. Plasmacytoid dendritic cells in tolerance. *Methods Mol Biol*. 2011;677:127-47.

Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, van Kooyk Y, et al. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell*. 2000 Mar 3;100(5):575-85.

Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, Engering A, Hart BA, van Kooyk Y. Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:33-54.

Ginhoux F, Liu K, Helft J, Bogunovic M, Greter M, Hashimoto D, et al. The origin and development of nonlymphoid tissue CD103+ DCs. *J Exp Med*. 2009 Dec 21;206(13):3115-30.

Ginhoux F, Merad M. Ontogeny and homeostasis of Langerhans cells. *Immunol Cell Biol*. 2010 May-Jun;88(4):387-92.

Guerriero A, Langmuir PB, Spain LM, Scott EW. PU.1 is required for myeloid-derived but not lymphoid-derived dendritic cells. *Blood*. 2000 Feb 1;95(3):879-85.

Guo M, Gong S, Maric S, Misulovin Z, Pack M, Mahnke K, et al. A monoclonal antibody to the DEC-205 endocytosis receptor on human dendritic cells. *Hum Immunol*. 2000 Aug;61(8):729-38.

Hanabuchi S, Ito T, Park WR, Watanabe N, Shaw JL, Roman E, et al. Thymic stromal lymphopoietin-activated plasmacytoid dendritic cells induce the generation of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus. *J Immunol*. 2010 Mar 15;184(6):2999-3007.

Harshyne LA, Watkins SC, Gambotto A, Barratt-Boyes SM. Dendritic cells acquire antigens from live cells for cross-presentation to CTL. *J Immunol*. 2001 Mar 15;166(6):3717-23.

Hassall AH. The microscopic anatomy of the human body, in Health and Disease. 1.Auflg. London:Taylor; 1849

Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, et al. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med*. 2001 Sep 17;194(6):769-79.

He LZ, Crocker A, Lee J, Mendoza-Ramirez J, Wang XT, Vitale LA, et al. Antigenic targeting of the human mannose receptor induces tumor immunity. *J Immunol*. 2007 May 15;178(10):6259-67.

He W, Zhang Y, Deng Y, Kabelitz D. Induction of TCR-gamma delta expression on triple-negative (CD3-4-8-) human thymocytes. Comparative analysis of the effects of IL-4 and IL-7. *J Immunol*. 1995 Apr 15;154(8):3726-31.

Heath WR, Belz GT, Behrens GM, Smith CM, Forehan SP, Parish IA, et al. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev.* 2004 Jun;199:9-26.

Heath WR, Carbone FR. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat Rev Immunol.* 2001 Nov;1(2):126-34.

Hegde RS, Ploegh HL. Quality and quantity control at the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol.* 2010 Aug;22(4):437-46.

Heidkamp GF, Bleny N, Cesnjevar R, Purbojo A, Ullrich E, Nimmerjahn F, Dudziak D. CD1c/BDCA1 characterizes thymic double positive T cells. Manuskript (1) in Vorbereitung.

Heidkamp GF, Bleny N, Cesnjevar R, Purbojo A, Ullrich E, Nimmerjahn F, Dudziak D. Missing DC subpopulations in Trisomie 21 patients. Manuskript (2) in Vorbereitung.

Heidkamp GF, Bleny N, Baranska A, Schuler G, Cesnjevar R, Purbojo A, Hartmann A, Iro H., Ullrich E, Nimmerjahn F, Dudziak D. Characterization of human DC subpopulations in human primary and secondary lymphoid organs. Manuskript (3) in Vorbereitung.

Heidkamp GF, Neubert K, Haertel E, Nimmerjahn F, Nussenzweig MC, Dudziak D. Efficient generation of a monoclonal antibody against the human C-type lectin receptor DCIR by targeting murine dendritic cells. *Immunol Lett.* 2010 Aug 16;132(1-2):69-78.

Henri S, Vremec D, Kamath A, Waithman J, Williams S, Benoist C, et al. The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. *J Immunol.* 2001 Jul 15;167(2):741-8.

Hochrein H, Shortman K, Vremec D, Scott B, Hertzog P, O'Keeffe M. Differential production of IL-12, IFN-alpha, and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets. *J Immunol.* 2001 May 1;166(9):5448-55.

Idoyaga J, Lubkin A, Fiorese C, Lahoud MH, Caminschi I, Huang Y, et al. Comparable T helper 1 (Th1) and CD8 T-cell immunity by targeting HIV gag p24 to CD8 dendritic cells within antibodies to Langerin, DEC205, and Clec9A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Feb 8;108(6):2384-9.

Idoyaga J, Suda N, Suda K, Park CG, Steinman RM. Antibody to Langerin/CD207 localizes large numbers of CD8alpha+ dendritic cells to the marginal zone of mouse spleen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Feb 3;106(5):1524-9.

Ihanus E, Uotila LM, Toivanen A, Varis M, Gahmberg CG. Red-cell ICAM-4 is a ligand for the monocyte/macrophage integrin CD11c/CD18: characterization of the binding sites on ICAM-4. *Blood*. 2007 Jan 15;109(2):802-10.

Inaba K, Pack M, Inaba M, Sakuta H, Isdell F, Steinman RM. High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes. *J Exp Med*. 1997 Aug 29;186(5):665-72.

Inaba K, Swiggard WJ, Inaba M, Meltzer J, Mirza A, Sasagawa T, et al. Tissue distribution of the DEC-205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145. I. Expression on dendritic cells and other subsets of mouse leukocytes. *Cell Immunol*. 1995 Jun;163(1):148-56.

Inaba K, Turley S, Yamaide F, Iyoda T, Mahnke K, Inaba M, et al. Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. *J Exp Med*. 1998 Dec 7;188(11):2163-73.

Janeway CA, Travers P, Walport M, et al. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5. Auflg. New York: Garland Science; 2001.

Jongbloed SL, Kassianos AJ, McDonald KJ, Clark GJ, Ju X, Angel CE, et al. Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J Exp Med*. 2010 Jun 7;207(6):1247-60.

Kalinski P, Moser M. Consensual immunity: success-driven development of T-helper-1 and T-helper-2 responses. *Nat Rev Immunol*. 2005 Mar;5(3):251-60.

Kamphorst AO, Guermonprez P, Dudziak D, Nussenzweig MC. Route of antigen uptake differentially impacts presentation by dendritic cells and activated monocytes. *J Immunol*. 2010 Sep 15;185(6):3426-35.

Kanazawa N, Okazaki T, Nishimura H, Tashiro K, Inaba K, Miyachi Y. DCIR acts as an inhibitory receptor depending on its immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. *J Invest Dermatol.* 2002 Feb;118(2):261-6.

Kanazawa N, Tashiro K, Inaba K, Miyachi Y. Dendritic cell immunoactivating receptor, a novel C-type lectin immunoreceptor, acts as an activating receptor through association with Fc receptor gamma chain. *J Biol Chem.* 2003 Aug 29;278(35):32645-52.

Kissenpfennig A, Henri S, Dubois B, Laplace-Builhe C, Perrin P, Romani N, et al. Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity.* 2005 May;22(5):643-54.

Kleijmeer MJ, Ossevoort MA, van Veen CJ, van Hellemond JJ, Neefjes JJ, Kast WM, et al. MHC class II compartments and the kinetics of antigen presentation in activated mouse spleen dendritic cells. *J Immunol.* 1995 Jun 1;154(11):5715-24.

Koble C, Kyewski B. The thymic medulla: a unique microenvironment for intercellular self-antigen transfer. *J Exp Med.* 2009 Jul 6;206(7):1505-13.

Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity.* 2004 Oct;21(4):467-76.

Kurts C, Heath WR, Carbone FR, Allison J, Miller JF, Kosaka H. Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo. *J Exp Med.* 1996 Sep 1;184(3):923-30.

Larregina AT, Morelli AE, Spencer LA, Logar AJ, Watkins SC, Thomson AW, et al. Dermal-resident CD14⁺ cells differentiate into Langerhans cells. *Nat Immunol.* 2001 Dec;2(12):1151-8.

Le PT, Lazorick S, Whichard LP, Haynes BF, Singer KH. Regulation of cytokine production in the human thymus: epidermal growth factor and transforming growth factor alpha regulate mRNA levels of interleukin 1 alpha (IL-1 alpha), IL-1 beta, and IL-6 in human thymic epithelial cells at a post-transcriptional level. *J Exp Med.* 1991 Nov 1;174(5):1147-57.

- Lenz A, Heine M, Schuler G, Romani N. Human and murine dermis contain dendritic cells. Isolation by means of a novel method and phenotypical and functional characterization. *J Clin Invest.* 1993 Dec;92(6):2587-96.
- Lindstedt M, Lundberg K, Borrebaeck CA. Gene family clustering identifies functionally associated subsets of human in vivo blood and tonsillar dendritic cells. *J Immunol.* 2005 Oct 15;175(8):4839-46.
- Liu K, Nussenzweig MC. Development and homeostasis of dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2010 Aug;40(8):2099-102.
- Liu K, Victora GD, Schwickert TA, Guermonprez P, Meredith MM, Yao K, et al. In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science.* 2009 Apr 17;324(5925):392-7
- Liu YJ. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:275-306.
- Lutz MB, Kurts C. Induction of peripheral CD4(+) T-cell tolerance and CD8(+) T-cell cross-tolerance by dendritic cells. *European Journal of Immunology.* 2009 Sep;39(9):2325-30.
- Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* 2002 Sep;23(9):445-9.
- MacDonald KP, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J, Hart DN. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood.* 2002 Dec 15;100(13):4512-20.
- Manz MG, Traver D, Akashi K, Merad M, Miyamoto T, Engleman EG, et al. Dendritic cell development from common myeloid progenitors. *Ann N Y Acad Sci.* 2001 Jun;938:167-73; discussion 73-4.
- Martin P, Del Hoyo GM, Anjuere F, Arias CF, Vargas HH, Fernandez LA, et al. Characterization of a new subpopulation of mouse CD8alpha+ B220+ dendritic cells endowed with type 1 interferon production capacity and tolerogenic potential. *Blood.* 2002 Jul 15;100(2):383-90.

- Martin P, del Hoyo GM, Anjuere F, Ruiz SR, Arias CF, Marin AR, et al. Concept of lymphoid versus myeloid dendritic cell lineages revisited: both CD8alpha(-) and CD8alpha(+) dendritic cells are generated from CD4(low) lymphoid-committed precursors. *Blood*. 2000 Oct 1;96(7):2511-9.
- Masten BJ, Olson GK, Tarleton CA, Rund C, Schuyler M, Mehran R, Archibeque T, Lipscomb MF. Characterization of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in human lung. *J Immunol*. 2006 Dec 1;177(11):7784-93.
- McCurley N, Mellman I. Monocyte-derived dendritic cells exhibit increased levels of lysosomal proteolysis as compared to other human dendritic cell populations. *PLoS One*. 2010;5(8):e11949.
- McIlroy D, Troadec C, Grassi F, Samri A, Barrou B, Autran B, et al. Investigation of human spleen dendritic cell phenotype and distribution reveals evidence of in vivo activation in a subset of organ donors. *Blood*. 2001 Jun 1;97(11):3470-7.
- Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol*. 2005 Aug;5(8):606-16.
- Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev*. 2000 Feb;173:89-97.
- Mellman I. Endocytosis and antigen processing. *Semin Immunol*. 1990 Jul;2(4):229-37.
- Mellman I, Cresswell P. Antigen processing and presentation. *Curr Opin Immunol*. 2010 Feb;22(1):78-80.
- Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*. 2001 Aug 10;106(3):255-8.
- Merad M, Manz MG. Dendritic cell homeostasis. *Blood*. 2009 Apr 9;113(15):3418-27.
- Moser M, Murphy KM. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol*. 2000 Sep;1(3):199-205.

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 1986 Apr 1;136(7):2348-57.

Munz C. Antigen processing via autophagy--not only for MHC class II presentation anymore? *Curr Opin Immunol.* 2010 Feb;22(1):89-93.

Nagafuchi Y, Scheuer PJ. Hepatic beta 2-microglobulin distribution in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol.* 1986;2(1):73-80.

Nakano H, Yanagita M, Gunn MD. CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med.* 2001 Oct 15;194(8):1171-8.

Narbutt J, Lesiak A, Sysa-Jedrzejowska A, Smolewski P, Robak T, Zalewska A. The number and distribution of blood dendritic cells in the epidermis and dermis of healthy human subjects. *Folia Histochem Cytobiol.* 2006;44(1):61-3.

Nascimbeni M, Perie L, Chorro L, Diocou S, Kreitmann L, Louis S, et al. Plasmacytoid dendritic cells accumulate in spleens from chronically HIV-infected patients but barely participate in interferon-alpha expression. *Blood.* 2009 Jun 11;113(24):6112-9.

Nimmerjahn F, Anthony RM, Ravetch JV. Agalactosylated IgG antibodies depend on cellular Fc receptors for in vivo activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 May 15;104(20):8433-7.

Nimmerjahn F, Milosevic S, Behrends U, Jaffee EM, Pardoll DM, Bornkamm GW, et al. Major histocompatibility complex class II-restricted presentation of a cytosolic antigen by autophagy. *Eur J Immunol.* 2003 May;33(5):1250-9.

O'Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity.* 1998 Mar;8(3):275-83.

O'Garra A, Arai N. The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends Cell Biol.* 2000 Dec;10(12):542-50.

- Pack M, Trumpfheller C, Thomas D, Park CG, Granelli-Piperno A, Munz C, et al. DEC-205/CD205+ dendritic cells are abundant in the white pulp of the human spleen, including the border region between the red and white pulp. *Immunology*. 2008 Mar;123(3):438-46.
- Perez L, Shurin MR, Collins B, Kogan D, Tourkova IL, Shurin GV. Comparative analysis of CD1a, S-100, CD83, and CD11c human dendritic cells in normal, premalignant, and malignant tissues. *Histol Histopathol*. 2005 Oct;20(4):1165-72.
- Poulin LF, Salio M, Griessinger E, Anjos-Afonso F, Craciun L, Chen JL, et al. Characterization of human DNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells. *J Exp Med*. 2010 Jun 7;207(6):1261-71.
- Rammensee HG, Rotzschke O, Falk K. MHC class I-restricted antigen processing--lessons from natural ligands. *Chem Immunol*. 1993;57:113-33.
- Reis e Sousa C, Hieny S, Scharon-Kersten T, Jankovic D, Charest H, Germain RN, et al. In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med*. 1997 Dec 1;186(11):1819-29.
- Rock KL, Shen L. Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol Rev*. 2005 Oct;207:166-83.
- Romani N, Clausen BE, Stoitzner P. Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. *Immunol Rev*. 2010 Mar;234(1):120-41.
- Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*. 1994 Apr 1;179(4):1109-18.
- Sallusto F, Lanzavecchia A. Human Th17 cells in infection and autoimmunity. *Microbes Infect*. 2009 Apr;11(5):620-4.
- Sallusto F, Lanzavecchia A. Monocytes join the dendritic cell family. *Cell*. 2010 Oct 29;143(3):339-40.

Sancho D, Mourao-Sa D, Joffre OP, Schulz O, Rogers NC, Pennington DJ, et al. Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin. *J Clin Invest.* 2008 Jun;118(6):2098-110.

Schmid SL. Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu Rev Biochem.* 1997;66:511-48.

Schwab N, Zozulya AL, Kieseier BC, Toyka KV, Wiendl H. An imbalance of two functionally and phenotypically different subsets of plasmacytoid dendritic cells characterizes the dysfunctional immune regulation in multiple sclerosis. *J Immunol.* 2010 May 1;184(9):5368-74.

Shortman K, Heath WR. The CD8⁺ dendritic cell subset. *Immunol Rev.* 2010 Mar;234(1):18-31.

Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol.* 2002 Mar;2(3):151-61.

Soares H, Waechter H, Glaichenhaus N, Mougneau E, Yagita H, Mizenina O, et al. A subset of dendritic cells induces CD4⁺ T cells to produce IFN-gamma by an IL-12-independent but CD70-dependent mechanism in vivo. *J Exp Med.* 2007 May 14;204(5):1095-106.

Steiniger B, Barth P, Hellinger A. The perifollicular and marginal zones of the human splenic white pulp : do fibroblasts guide lymphocyte immigration? *Am J Pathol.* 2001 Aug;159(2):501-12.

Steiniger B, Barth P. Microanatomy and function of the spleen. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2000;151:III-IX, 1-101.

Steinman RM. Some active areas of DC research and their medical potential. *Eur J Immunol.* 2010 Aug;40(8):2085-8.

Steinman RM. Some interfaces of dendritic cell biology. *APMIS.* 2003 Jul-Aug;111(7-8):675-97.

Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature*. 2007 Sep 27;449(7161):419-26.

Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:685-711.

Steinman RM, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jan 8;99(1):351-8.

Summers KL, Hock BD, McKenzie JL, Hart DN. Phenotypic characterization of five dendritic cell subsets in human tonsils. *Am J Pathol*. 2001 Jul;159(1):285-95.

Swanson JA, Watts C. Macropinocytosis. *Trends Cell Biol*. 1995 Nov;5(11):424-8.

Szakai AK. Immune System I-Palatie tonsil, 2003 (zitiert vom 2.3.2011) <http://www.people.vcu.edu/~aszakai/course_syllabi/IMMSYST.I2.htm>.

Tacke PJ, de Vries IJ, Gijzen K, Joosten B, Wu D, Rother RP, et al. Effective induction of naive and recall T-cell responses by targeting antigen to human dendritic cells via a humanized anti-DC-SIGN antibody. *Blood*. 2005 Aug 15;106(4):1278-85.

Takagi A, Nishiyama C, Kanada S, Niwa Y, Fukuyama K, Ikeda S, et al. Prolonged MHC class II expression and CIITA transcription in human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Aug 25;347(2):388-93.

Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):805-20.

Townsend A, Bodmer H. Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:601-24.

Valladeau J, Ravel O, Dezutter-Dambuyant C, Moore K, Kleijmeer M, Liu Y, et al. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity*. 2000 Jan;12(1):71-81.

Vandenabeele S, Hochrein H, Mavaddat N, Winkel K, Shortman K. Human thymus contains 2 distinct dendritic cell populations. *Blood*. 2001 Mar 15;97(6):1733-41.

van Kooyk Y, Geijtenbeek TB. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol.* 2003 Sep;3(9):697-709.

Villadangos JA, Driessen C, Shi GP, Chapman HA, Ploegh HL. Early endosomal maturation of MHC class II molecules independently of cysteine proteases and H-2DM. *EMBO J.* 2000 Mar 1;19(5):882-91.

Villadangos JA, Schnorrer P. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol.* 2007 Jul;7(7):543-55.

Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, Helmby H, Westendorf A, Buer J, et al. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol.* 2008 Dec;9(12):1341-6.

von Boehmer H. Central tolerance: essential for preventing autoimmune disease? *Eur J Immunol.* 2009 Sep;39(9):2313-6.

von Gaudecker B, Schmale EM. Similarities between Hassall's corpuscles of the human thymus and the epidermis. An investigation by electron microscopy and histochemistry. *Cell Tissue Res.* 1974;151(3):347-68.

Vremec D, Pooley J, Hochrein H, Wu L, Shortman K. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol.* 2000 Mar 15;164(6):2978-86.

Vremec D, Zorbas M, Scollay R, Saunders DJ, Ardavin CF, Wu L, et al. The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *J Exp Med.* 1992 Jul 1;176(1):47-58.

Watanabe N, Hanabuchi S, Soumelis V, Yuan W, Ho S, de Waal Malefyt R, et al. Human thymic stromal lymphopoietin promotes dendritic cell-mediated CD4+ T cell homeostatic expansion. *Nat Immunol.* 2004 Apr;5(4):426-34.

Welsch U. Sobotta Lehrbuch Histologie: Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie. 9. Auflg. München: Urban & Fischer; 2004.

Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*. 1990 Sep 21;249(4975):1431-3.

Wu L, Li CL, Shortman K. Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. *J Exp Med*. 1996 Sep 1;184(3):903-11.

Wu L, Shortman K. Heterogeneity of thymic dendritic cells. *Semin Immunol*. 2005 Aug;17(4):304-12.

Xing J, Wu Y, Ni B. Th9: a new player in asthma pathogenesis? *J Asthma*. 2011 Mar;48(2):115-25.

Yamazaki M, Pearson T, Brehm MA, Miller DM, Mangada JA, Markees TG, et al. Different mechanisms control peripheral and central tolerance in hematopoietic chimeric mice. *Am J Transplant*. 2007 Jul;7(7):1710-21.

Yamazaki S, Dudziak D, Heidkamp GF, Fiorese C, Bonito AJ, Inaba K, et al. CD8+ CD205+ splenic dendritic cells are specialized to induce Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol*. 2008 Nov 15;181(10):6923-33.

Yewdell YW, Lev A. Self-reporting peptides illuminate the MHC groove. *Nat Chem Biol*. 2007 Apr;3(4):201-2.

Yin Y, Li Y, Kerzic MC, Martin R, Mariuzza RA. Structure of a TCR with high affinity for self-antigen reveals basis for escape from negative selection. *EMBO J*. 2011 Mar 16;30(6):1137-48.

Zaba LC, Krueger JG, Lowes MA. Resident and "inflammatory" dendritic cells in human skin. *J Invest Dermatol*. 2009 Feb;129(2):302-8.

Zaitseva M, Kawamura T, Loomis R, Goldstein H, Blauvelt A, Golding H. Stromal-derived factor 1 expression in the human thymus. *J Immunol*. 2002 Mar 15;168(6):2609-17.

Zhu J, Paul WE. Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol Rev*. 2010 Nov;238(1):247-62.

Zinkernagel RM, Doherty PC. MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness. *Adv Immunol.* 1979;27:51-177.

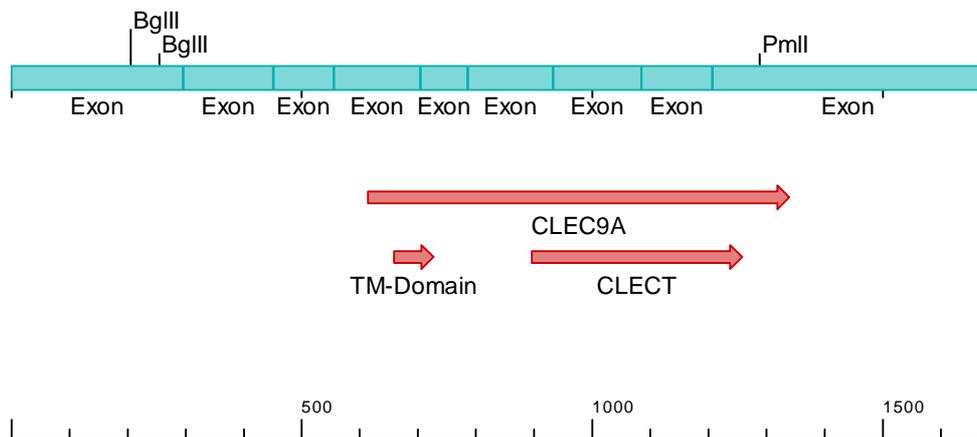
Sequenzen der C-Typ Lektinrezeptoren

Humanes Clec9a

```

1  CGTTTGTACC  CGGCTGTGGC  AATCTGTGGT  GAAGTTGAAA  TGCTTTTCTG  CTAGACTGGC
61  AACATGTTTT  GATTCTTCTC  AAATAACTCG  CAAGCTCTTG  TGAAGCACAA  CGGCCTACCT
121  TGTCTGAAG  AAAACATACT  CTAAGGCCCA  CAGATGATTA  AACCCAGCCA  TTTATGTGAC
181  AATAGCATT  TTATTTTCT  TATCAAGATC  TGGGTATTTG  ATCCACACAA  TGGTAAAGAT
241  TCCCATGTTA  GCCAAGATCT  AAATGATTCA  AACTGATGAT  ACTCTCTGCA  GAAGAGGTGA
301  CTATAAACGC  AGCCCCGTG  ATGCCAACTG  GACATATTAT  GGAGGTAGCT  GCTATGGGTT
361  CTTCAAACAC  AACTTGACAT  GGAAAGAGAG  TGAGCAGTAC  TGCAC TGACA  TGAAGGCTAC
421  TCTCTGAAG  ACTGACAACC  AGAACATTCT  GTGGATAGAA  GTC AAGGGCT  CCAATGTCTC
481  CCAAGACGAA  AGAATCCCAA  GTCTCATTTG  GAGGAATGCT  ATC ACTA ACT  AGGATTCCTG
541  GAGCTAAAA  ATTATAGGAG  TTACTTGTTT  CAGCCTCCTG  TGTGGACTGC  TTCCTATCA
601  AAGCACCTTA  GACATGCACG  AGGAAGAAAT  ATACACCTCT  CTT CAGTGGG  ATAGCCCAGC
661  ACCAGACACT  TACCAGAAAT  GTCTGTCTTC  CAACAAATGT  TCAGGAGCAT  GCTGTCTTGT
721  GATGGTGATT  TCATGTGTTT  TCTGCATGGG  ATTATTAACA  GCATCCATTT  TCTTGGGCGT
781  CAAGTTGTTG  CAGGTGTCCA  CCATTGCGAT  GCAGCAGCAA  GAAAAACTCA  TCCAACAAGA
841  GAGGGCACTG  CTAAACTTTA  CAGAATGGAA  GAGAAGCTGT  GCCCTTCAGA  TGA AATATTG
901  CCAAGCCTTC  ATGCAAAACT  CATTAA GTTC  AGCCCATAAC  AGCAGTCTTT  GTCCAAACAA
961  TTGGATT CAG  AACAGAGAAA  GTTGTTACTA  TGTCTCTGAA  ATTTGGAGCA  TTTGGCACAC
1021  CAGTCAAGAG  AATTGTTTAA  AGGAAGTTTC  CACGCTGCTA  CAAATAGAGA  GCAAAGAAGA
1081  AATGGATTTT  ATCACTGGCA  GCTTGAGGAA  GATTAAAGGA  AGCTATGATT  ACTGGGTGGG
1141  GTTGTCTCAG  GATGGACACA  GCGGACGCTG  GCTTTGGCAA  GATGGCTCCT  CTCCTTCTCC
1201  TGGCCTGTTG  CCAGCAGAGA  GATCCCAGTC  AGCTAACCAA  GTCTGTGGAT  ACGTGA A AAG
1261  CAATTCCTT  CTTTCGTCTA  ACTGCAGCAC  GTGGAAGTAT  TTTATCTGTG  AGAAGTATGC
1321  GTTGAGATCC  TCTGTCTGAA  AGAAATTGTG  TTCAAAGTGT  TCTATTACAC  TGT TATTTGG
1381  AGCATGCCAT  TGGAAAACCC  ACCCCCACCC  CCCCTCAAAA  AAACAGAACA  GTAAACCAA
1441  ATGTGGGCCA  TGAAATTAGC  AACCTGGGAC  TCAATAATAC  ACTTGGGAAT  ATTCTTCCAC
1501  ACCGTCCAGA  TTTCATTTGA  TGTTGTTTAC  ATTGCAAGAG  TAAA ACTTAT  TTAGAGCTAC
1561  AGAAGACAAA  ACCCTGAAGA  GTTAAGAACA  AACGCAAGGA  AATAATTTT  ATTGTTTAAA
1621  GCCCGAATG  ACTGTA ACTT  TCACACAAGG  TACGCATCTA  TGT TTTTGGG  GGA

```

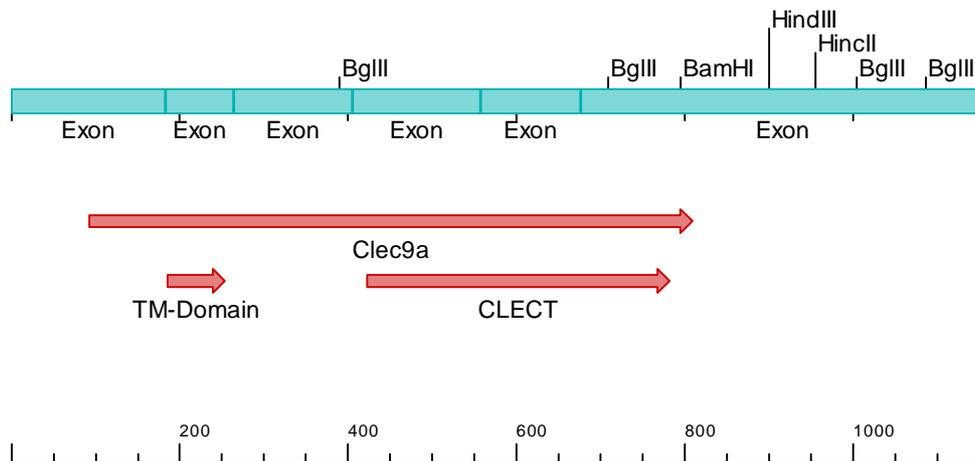


Murines Clec9a

```

1  CATTCTTGT ACCAACCTAC TCCTAACTAC AACCGAAGTT CTTTGTGCCA GGCTCCTATG
61 TAGACTGCTT CACCACTCCA AGCACCTTCA GCATGCATGC GGAAGAAATA TATACCTCTC
121 TTCAGTGGGA CATTCCTACC TCAGAGGCCT CTCAGAAGTG CCAATCCCCCT AGCAAATGTT
181 CAGGAGCATG GTGTGTTGTG ACGATGATTT CCTGTGTGGT CTGTATGGGC TTGTTAGCAA
241 CGTCCATTTT CTTGGGCATC AAGTTCTTCC AGGTATCCTC TCTTGTCTTG GAGCAGCAGG
301 AAAGACTCAT CCAACAGGAC ACAGCATTGG TGAACCTTAC ACAGTGGCAG AGGAAATACA
361 CACTGGAATA CTGCCAAGCC TTA CTGCAGA GATCTCTCCA TTCAGGTAGT GACTGCAGCC
421 CTTGTCCACA CAACTGGATT CAGAAATGGAA AAAGTTGTTA CTATGTCTTT GAACGCTGGG
481 AAATGTGGAA CATCAGTAAG AAGAGCTGTT TAAAAGAGGG CGCTAGTCTC TTTCAAATAG
541 ACAGCAAAGA AGAAAATGGAG TTCATCAGCA GTATAGGGAA ACTCAAAGGA GGAAATAAAT
601 ATTGGGTGGG AGTGTTCCTAA GATGGAATCA GTGGATCTTG GTTCTGGGAA GATGGCTCTT
661 CTCTCTCTC TGACTTGTG CCAGCAGAAA GACAGCGATC AGCCGGCCAG ATCTGTGGAT
721 ACCTCAAAGA TTCTACTCTC ATCTCAGATA AGTGCGATAG CTGGAAATAT TTTATCTGTG
781 AGAAGAAAGC ATTTGGATCC TGCATCTGAA AGATACTACT CAAAGCTACC TGTTACACAA
841 GTGTTTGAAA GAGGCCAAAG AGCAAACACA GGAGGAGATT GATGTGAGAC TATGAAGGCA
901 AGCTTGATTT TTTATTTACA CTTGGCAATA GTCTGTAACG CTTTGCAGAT TTCAGTTGAC
961 CTTGTCCATT GTGCCAAGGA AAAAAATGAT TTAGAGCTAC AGAAGATCTG ACTCAGTGAG
1021 AACAAAGAAG AGAAAATAAT TTCCTGTGTG TTTGAAAGTC CAAAGTGACG ATCCATACCA
1081 CACCGAGATC TAGCTGTCTT TGTGGGAGTT TTTATGCAAT CCTTGGTTTG TACTTTTAGT
1141 AAACAATTCT ATCTAC

```

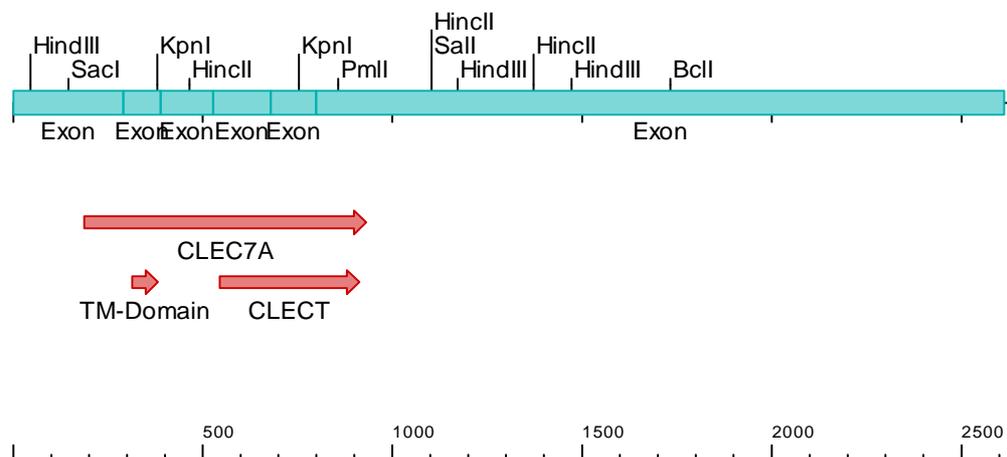


Humanes Dectin-1

```

1  AGCATAGTTT  CATTTCCTGC  TCTTGAATAT  CTGGTTGAAC  TACTTAAGCT  TAATTTGTTA
61  AACTCCGGTA  AGTACCTAGC  CCACATGATT  TGACTCAGAG  ATTCTCTTTT  GTCCACAGAC
121 AGTCATCTCA  GGAGCAGAAA  GAAAAGAGCT  CCCAAATGCT  ATATCTATTC  AGGGGCTCTC
181 AAGAACAATG  GAATATCATC  CTGATTTAGA  AAATTTGGAT  GAAGATGGAT  ATACTCAATT
241 ACACTTCGAC  TCTCAAAGCA  ATACCAGGAT  AGCTGTTGTT  TCAGAGAAAAG  GATCGTGTGC
301 TGCATCTCCT  CCTTGGCGCC  TCATTGCTGT  AATTTTGGGA  ATCCTATGCT  TGGTAATACT
361 GGTGATAGCT  GTGGTCCTGG  GTACCATGGC  TATTTGGAGA  TCCAATTCAG  GAAGCAACAC
421 ATTGGAGAA  GGCTACTTTC  TATCAAGAAA  TAAAGAGAAC  CACAGTCAAC  CCACACAATC
481 ATCTTTAGAA  GACAGTGTGA  CTCCTACCAA  AGCTGTCAA  ACCACAGGGG  TTCTTTCCAG
541 CCCTTGTCCT  CCTAATTGGA  TTATATATGA  GAAGAGCTGT  TATCTATTCA  GCATGTCACT
601 AAATTCCTGG  GATGGAAGTA  AAAGACAATG  CTGGCAACTG  GGCTTAATC  TCCTAAAGAT
661 AGACAGCTCA  AATGAATTGG  GATTTATAGT  AAAACAAGTG  TCTTCCCAAC  CTGATAATTC
721 ATTTTGGATA  GGCTTTCTC  GGCCCCAGAC  TGAGGTACCA  TGGCTCTGGG  AGGATGGATC
781 AACATTCTCT  TCTAACTTAT  TTCAGATCAG  AACCACAGCT  ACCCAAGAAA  ACCCATCTCC
841 AAATTGTGTA  TGGATTCACG  TGTCAGTCAT  TTATGACCAA  CTGTGTAGTG  TGCCCTCATA
901 TAGTATTTGT  GAGAAGAAGT  TTTCAATGTA  AGAGGAAGGG  TGGAGAAGGA  GAGAGAAATA
961 TGTGAGGTAG  TAAGGAGGAC  AGAAAACAGA  ACAGAAAAGA  GTAACAGCTG  AGGTCAAGAT
1021 AAATGCAGAA  AATGTTTAGA  GAGCTTGGCC  AACTGTAATC  TTAACCAAGA  AATTGAAGGG
1081 AGAGGCTGTG  ATTTCTGTAT  TTGTCGACCT  ACAGGTAGGC  TAGTATTATT  TTTCTAGTTA
1141 GTAGATCCCT  AGACATGGAA  TCAGGGCAGC  CAAGCTTGAG  TTTTTATTTT  TTATTTATTT
1201 ATTTTTTTGA  GATAGGGTCT  CACTTTGTTA  CCCAGGCTGG  AGTGCAGTGG  CACAATCTCG
1261 ACTCACTGCA  GCTATCTCTC  GCCTCAGCCC  CTCAAGTAGC  TGGGACTACA  GGTGCATGCC
1321 ACCATGCCAG  GCTAATTTTT  GGTGTTTTTT  GTAGAGACTG  GGTTTTGCCA  TGTGACCAA
1381 GCTGGTCTCT  AACTCCTGGG  CTTAAGTGAT  CTGCCC GCCT  TGGCCTCCCA  AAGTGTGGG
1441 ATTACAGATG  TGAGCCACCA  CACCTGGCCC  CAAGCTTGAA  TTTTCATTCT  GCCATTGACT
1501 TGGCATTTAC  CTTGGGTAAG  CCATAAGCGA  ATCTTAATTT  CTGGCTCTAT  CAGAGTTGTT
1561 TCATGCTCAA  CAATGCCATT  GAAGTGCAGC  GTGTGTTGCC  ACGAATTGAC  CCTCAATTC
1621 TAGCATAATA  TCAGTTATGA  ACTGAGGGTG  AAATATATTT  CTGAAATAGCT  AAATGAAGAA
1681 ATGGGAAAAA  ATCTTCACCA  CAGTCAAGAG  AATTTTATTA  TTTTCATCAG  TATGATCATA
1741 ATTATGATTA  TCATCTTAGT  AAAAAAGCAG  AACTCCTACT  TTTTCTTTAT  CAATTAATA
1801 GCTCAGAGAG  TACATCTGCC  ATATCTCTAA  TAGAATCTTT  TTTTTTTTTT  TTTTTTTTGA
1861 GACAGAGTTT  CGCTCTTGTT  GCCCAGGCTG  GAGTGCAACG  GCACGATCTC  GGCTCACCGC
1921 AACCTCCGCC  CCCTGGGTTC  AAGCAATTCT  CCTGCCCTCAG  CCTCCCAAGT  AGCTGGGATT
1981 ACAGTCAGGC  ACCACCACAC  CCGGCTAATT  TTGTATTTTT  TTAGTAGAGA  CAGGGTTTCT
2041 CCATGTCGGT  CAGGGTAGTC  CCGAATCCT  GACCTCAAGT  GATCTGCCTG  CCTCGGCCTC
2101 CCAAGTGCTG  GGATTACAGG  CGTGAGCCAC  TGCACCCAGC  CTAGAATCTT  GTATAATATG
2161 TAATTGTAGG  GAAACTGCTC  TCATAGGAAA  GTTTTCTGCT  TTTTAAATAC  AAAAATACAT
2221 AAAAATACAT  AAAATCTGAT  GATGAATATA  AAAAAGTAAC  CAACCTCATT  GGAACAAGTA
2281 TTAACATTTT  GGAATATGTT  TTATTAGTTT  TGTGATGTAC  TGTTTTACAA  TTTTACCAT
2341 TTTTTTCAGT  AATTACTGTA  AAATGGTATT  ATTGGAATGA  AACTATATTT  CCTCATGTGC
2401 TGATTTGTCT  TATTTTTTTC  ATACTTTCCC  ACTGGTGCTA  TTTTATTTTC  CAATGGATAT
2461 TTCTGTATTA  CTAGGGAGGC  ATTTACAGTC  CTCTAATGTT  GATTAATATG  TGAAAAGAAA
2521 TTGTACCAAT  TTTACTAAAT  TATGCAGTTT  AAAATGGATG  ATTTTATGTT  ATGTGGATTT
2581 CATTTC AATA  AAAAAAAACT  CTTATCAAAA  AAAAAAAAAA  AA

```

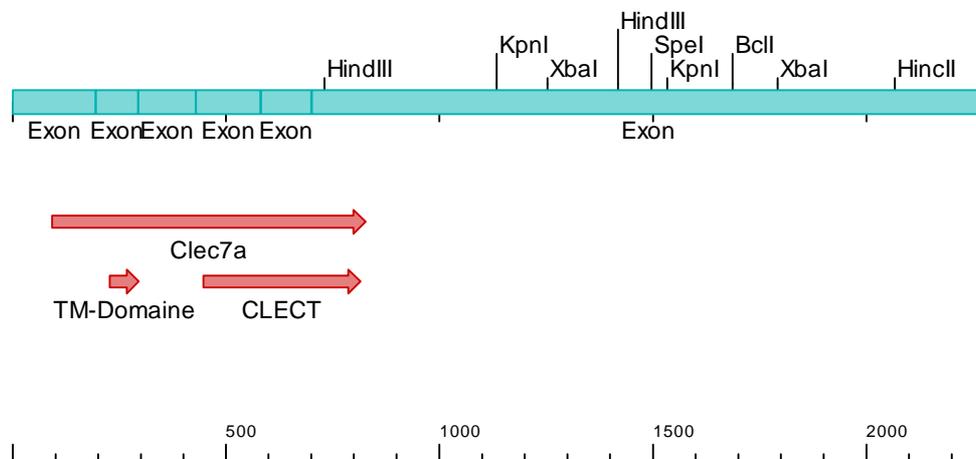


Murines Dectin-1

```

1   TTCAGGGTT TGGGTTAGTG AGCCTCATCC TGGCAGTTAT TTTATAGTAA AGAACATTCA
61  AGTGCTCTGC CTACCTAGGG CCCTGTGAAG CAATGAAATA TCACTCTCAT ATAGAGAATC
121 TGGATGAAGA TGGATATACT CAATTAGACT TCAGCACTCA AGACATCCAT AAAAGGCCCA
181 GGGGATCAGA GAAAGGAAGC CAGGCTCCAT CTTACACCTTG GAGGCCCATT GCAGTGGGTT
241 TAGGAATCCT GTGCTTTGTG GTAGTAGTGG TTGCTGCAGT GCTGGGTGCC CTAGCATTTT
301 GGCGACACAA TTCAGGGAGA AATCCAGAGG AGAAAGACAA CTTCCATATCA AGAAATAAAG
361 AGAACCACAA GCCCACAGAA TCATCTTTAG ATGAGAAGGT GGCTCCCCTCC AAGGCATCCC
421 AAACACAGG AGGTTTTTCT CAGCCTTGCC TTCCTAATTG GATCATGCAT GGAAGAGCT
481 GTTACCTATT TAGCTTCTCA GAAAATTCCT GGTATGGAAG TAAGAGACAC TGCTCCCAGC
541 TAGGTGCTCA TCTACTGAAG ATAGACAAC TCAAAGAATT TGAGTTCATT GAAAGCCAAA
601 CATCGTCTCA CCGTATTAAT GCATTTTGA TAGGCCTTTC CCGCAATCAG AGTGAAGGC
661 CATGCTCTG GGAGGATGGA TCAGCATTCT TCCCAACTC GTTTCAAGTC AGAAATACAG
721 CTCCCAGGA AAGCTTACTG CACAATTGTG TATGGATTCA TGGATCAGAG GTCTACAACC
781 AAATCTGCAA TACTTCTTCA TACAGTATCT GTGAGAAGGA ACTGTAAATG TATGTGAGAA
841 TATAAAGATG GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTAC ATGCACACAC ACCACCACCA
901 CCACCACTAC CAACAACAGA ACAGAACAGA ACAGAACAGA ACAGATTAAT ATTAATAAAC
961 AGAAAAAATG CTGGGATGCT AAGAGACTTT AACCTCATTT GAGAACTTGG ATGAAGAAGC
1021 TGAGACTTTT GTACTTGTCA TCTTCACAAA GATGGTGGCA CTATCTTCCA GTTAGGAAGT
1081 CACTAGACAT GGAGTGAGGG CAGCTCAACA ATACAGAGAA TATGTGAACC TGAGGTACCC
1141 TGACTCAAAT TTCACAACCA CAATGAAACC CCTACACTAT CAGGAAACAC TGTAGAGGAG
1201 TGAGACTGAA GACTTTAAAA GCCAGAGAAT CAGCCTACTT ACTGTGGTGT TTTCTAGACA
1261 GGACAGGGAA AGTATATCTA GAAAATAAAA ACAATACAAT TCAGCAAACA AAATCTGCAT
1321 AATGACAACC TCAGTTGGTA TGGTATGTTA TGGTATGGTA TGGGTGTAGA AGTTTCACAA
1381 GGCCCTATGA AGAACTACAG ACAGTTAAAT AGGGGGAAAG CTTTTTCTAG GATCAAGCCT
1441 ACTGAACCC AAGAAGTCAG CACTGAACAT ATGTACAGAT CAGTATCATT AAATGAACTA
1501 GTAAGACATA TACATATATG TTAATCAAAT ATTGGTACCA GAGTACACAC TGTGTTTGCA
1561 TGATTTTCTC AGTATCTACA GTACACCAGA CACAGGGAGA AGGCAAAATG AACTTCTAAA
1621 TTGAGAAGTG AAAAAAATGA GGAAGAGAA TCTTCACCAC AAATAGGGAT TCTATTTTCA
1681 CCCACATGAT CATTATTAAG ATGGCCATCA CCCAAACGTC GTGACCCAAG CTACTTCCTC
1741 AACTAGATAA CTCAAAGAGT CTGCCACCT TTTCTGATAG CAAATCTGGT ATCTAGATTT
1801 CACTGTTTCC TTATGCTGTC TGGCCAGCAG TATGACAAAG GTGCTGCCCT TTCAGGAAGC
1861 AGTCTCCTTA AATGCTGTAG TTGAAAAGAT AAATCATATC TGATAGTGAA TATTTAAAAA
1921 GCGCCAGTC AGGATAAGTG TTTTGGACA CAGAACATAT TTCATCTTTT TATGATACAC
1981 TATCTTGCAA TTAACAACCA ATTCTTAAGT CATTCTTTTA CAAACATATG ACTGGAATAT
2041 GACTGTTTCC TAGTGTGATC TGTCTGTGTTA ACTTCTAAGA TTGTCCATTA ATACCACCCT
2101 TATTTCCAGT GTGGACTTCC AAATTGCTGG GGATCTGTTT ATAGCTTTCT CAGACTAATC
2161 AATATGTGGG CAGAAATTGT GCTGAGTCCA CTGAATTGTT CTCTTGAAAA TGATTGGGTT
2221 TATGTCACTT TCATCTCAAT TGAAAACTG CTTATTAAG TATCTTTGGC CTCTGAA

```

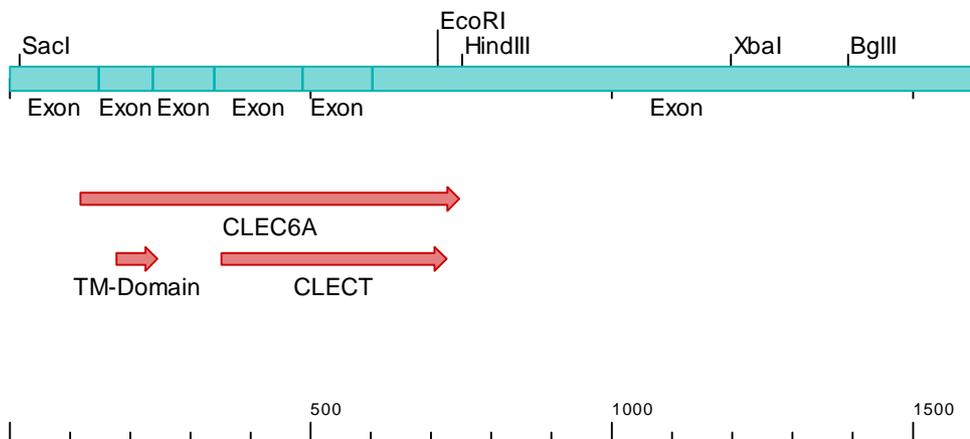


Humanes Dectin-2

```

1   GTAGCAGTTT GTCCCTGAGC TCTAGCTTCT TTAAATGAAG CTGAGTCTCT GGGCAACATC
61  TTTAGGGAGA GAGGTACAAA AGGTTCCCTG ACCTTCTCAA CACAGGGGAGC CTGCATAATG
121 ATGCAAGAGC AGCAACCTCA AAGTACAGAG AAAAGAGGCT GGTGTGCCCT GAGACTCTGG
181 TCTGTGGCTG GGATTTCCAT TGCACCTCCTC AGTGCTTGCT TCATTGTGAG CTGTGTAGTA
241 ACTTACCATT TTACATATGG TGAAACTGGC AAAAGGCTGT CTGAAC TACA CTCATATCAT
301 TCAAGTCTCA CCTGCTTCAG TGAAGGGACA AAGGTGCCAG CCTGGGGATG TTGCCAGCT
361 TCTTGGAAAGT CATTGTTGTT CAGTTGCTAC TTCATTTCCA GTGAAGAGAA GGTTTGGTCT
421 AAGAGTGAGC AGAACTGTGT TGAGATGGGA GCACATTTGG TTGTGTTCAA CACAGAAGCA
481 GAGCAGAATT TCATTGTCCA GCAGCTGAAT GAGTCATTTT CTTATTTTCT GGGGCTTTCA
541 GACCCACAAG GTAATAATAA TTGGCAATGG ATTGATAAGA CACCTTATGA GAAAAATGTC
601 AGATTTTGGC ACCTAGGTGA GCCCAATCAT TCTGCAGAGC AATGTGCTTC AATAGTCTTC
661 TGGAAACCTA CAGGATGGGG CTGGAATGAT GTTATCTGTG AAAC TAGAAG GAATTCAATA
721 TGTGAGATGA ATAAGATTTA CCTATGAGTA GAAGCTTAAT TGGAAAGAAG AGAAGAATTA
781 CTGACGTAAT TTTTCCCTG ACGTCTTTAA AATTGAACCC TATCATGAAA TGATAATTTT
841 TTCCTGAATT TACACATAAT CCTTATGTTA TAGAGGTTCA CAGAAATGGA AAGATACCTG
901 TTTCCCTTTA ATCAATCTTC TCGTTTCCTC TTTTCCATTA ATGATAGAAT GCACCCTTCC
961 TCTCTTTGTT CCATTCCTTC ACTTGTATT ATT TTTTCTT CACA CTTCATTACA
1021 CAAATATTTA TTGTTTCAGA GACTGTACTA TTTTGTGTTG TAGAAGATTT ATAAGGCAGT
1081 ATCTTTTGAA AATTATGACT TTCCTTCCTC AATATAACCAT AAAGAAATCT TTTTGGTCAA
1141 GATGGTAGTT GGAAC TACA TCATCTGAAG GCCTGACAAG AGTTGAAAGA CATGTTTTCT
1201 AGATGGCTCA CTCACATGGC TGGCAACTTG GTGTTGGCTA TTAATGTAAC CTGGAAATAA
1261 ATTTTATTCT GCAGTTAGGG ATTTGGCATT TTATATATGT TGATTCAATC AAGTTTGGCA
1321 AGCAGGGTGT TCGATACTGC TATATCCTGT ATTCTTGGTT TATTTGTTTT ATTTCTGAGA
1381 AATATGTGTT AAGATCTCTC GCTGATTGGG AATTTGTCTA TTTCTCATTT AAATTTTGTC
1441 AAATCTTTCT TTGCTTGCAA GCATTTCTTG TTACCCAAAT CTAACCTATT CCTGAAAATA
1501 TGATGGTTAG CAAAGTTTGA GATAACTAGA GCCTGTAATC CATCATTTTA AATGGCAATG
1561 ATAATGACAG TTTATTTTTA TGTATATAAA AAACCTCAAC AAATTTTCCA AAC

```

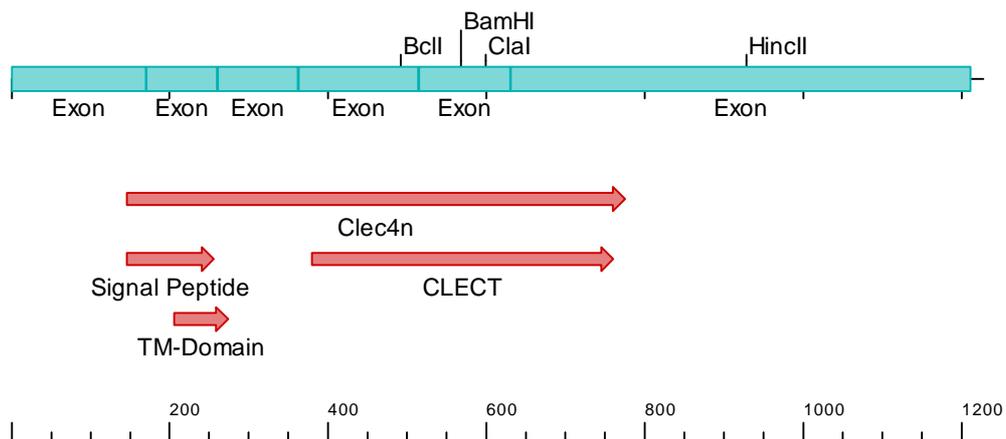


Murines Dectin-2

```

1   CATTGGCCCG CTCTGTGGCA TTAACTCAA GTGTGTGTGG AAGTTGATTC TGAACCTGG
61  CCTCTTTGAC AGAAGCCAGG TCCCTGAGTC GTATTTTGGG GACAGATGCA AGAAACCCCT
121 GACCTTCTGA ACATACACCT CAACAATGGT GCAGGAAAGA CAATCCCAAG GGAAGGGAGT
181 CTGCTGGACC CTGAGACTCT GGTCACTGTC TGTGATTTCC ATGTTACTCT TGAGTACCTG
241 TTTCATTGCG AGCTGTGTGG TGACTTACCA ATTTATTATG GACCAGCCCA GTAGAAGACT
301 ATATGAACTT CACACATACC ATTCCAGTCT CACCTGCTTC AGTGAAGGGA CTATGGTGTG
361 AGAAAAAATG TGGGGATGCT GCCCAAATCA CTGGAAGTCA TTTGGCTCCA GCTGCTACCT
421 CATTTCTACC AAGGAGAACT TCTGGAGCAC CAGTGAGCAG AACTGTGTTC AGATGGGGGC
481 TCATCTGGTG GTGATCAATA CTGAAGCGGA GCAGAATTTT ATCACCCAGC AGCTGAATGA
541 GTCACCTTCT TACTTCCTGG GTCTTTCGGA TCCACAAGGT AATGGCAAAT GGCAATGGAT
601 CGATGATACT CCTTTCAGTC AAAATGTCAG GTTCTGGCAC CCCATGAAC CCAATCTTCC
661 AGAAGACCGG TGTGTTTCAA TAGTTTACTG GAATCCTTCG AAATGGGGCT GGAATGATGT
721 TTTCTGTGAT AGTAAACACA ATTCAATATG TGAAATGAAG AAGATTTACC TATGAGTGCC
781 TGTTATTTCAT TAATATCTTT AAAGTTCAGA CCTACCAAGA AGCCATAACT TCTTGGCCTG
841 TACATCTGAC AGAGGCCGTT CTTTTCTTAG CCACTATTCT TTACTIONAAC AGAATGAGCC
901 CTTTCTCCTT CTGATGGTTA GAGTTTTGTC AACTTGACAC AAACCTAGAGT CACCTGGGGA
961 GTAGGATCTT CAGCTAAGGA ATTGCCTCTG TCAGCTTGAC CAGTCAGCAT GTCTGGGGGC
1021 ATTTTCTTGA TTAATGATTG TTGTAAGAGG GTCCAGGTGG TAAGCAAAGG TGTAAACCC
1081 ATGAAGAGCA AGCCAGGGAG CATCATCCAT CCATCTCTGC CCTCAGGTTT CTGCCCCAGG
1141 GTCTTGCCCT GGTTCCTTTC TATGAACTGC TGTACTTGA AAGTATAAGA TGAATAAACA
1201 ATTTCATCCA AAAAAAAAAA AAAAAAA

```

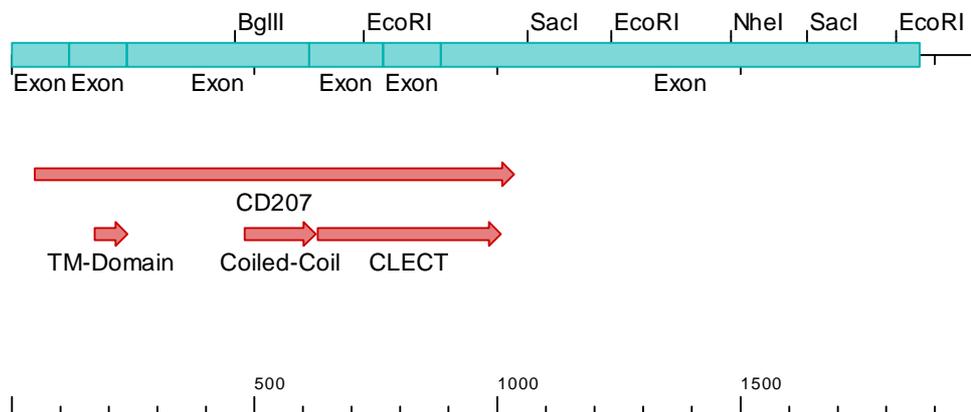


Humanes Langerin

```

1   GGCAGCCAGA AGCACCTGTG CTCCCAGGAT AAGGGTGAGC ACTCAGGATG ACTGTGGAGA
61  AGGAGGCCCC TGATGCGCAC TTCACTGTGG ACAAACAGAA CATCTCCCTC TGGCCCCGAG
121 AGCCTCCTCC CAAGTCCGGT CCATCTCTGG TCCCGGGGAA AACACCCACA GTCCGTGCTG
181 CATTAATCTG CCTGACGCTG GTCCTGGTCG CCTCCGTCC TCTGCAGGCC GTCCTTTATC
241 CCCGGTTTAT GGGCACCATA TCAGATGTAA AGACCAATGT CCAGTTGCTG AAAGGTCTGT
301 TGGACAACAT CAGCACCCCTG GATTCTGAAA TTAAAAAGAA TAGTGACGGC ATGGAGGCAG
361 CTGGCGTTCA GATCCAGATG GTGAATGAGA GCCTGGGTTA TGTGCGTTCT CAGTTCCTGA
421 AGTTAAAAAC CAGTGTGGAG AAGGCCAACG CACAGATCCA GATCTTAACA AGAAGTTGGG
481 AAGAAGTCAG TACCTTAAAT GCCCAAATCC CAGAGTTAAA AAGTGATTTG GAGAAAGCCA
541 GTGCTTTAAA TACAAAGATC CGGGCAGCTC AGGCAGCTT GGAGAATATG AGCAAAGTGC
601 TCAAACGACA AAATGATATT CTACAGTGGG TTTCTCAAGG CTGGAAGTAC TTCAAGGGGA
661 ACTTCTATTA CTTTCTCTC ATTCCAAAGA CCTGGTATAG TGCCGAGCAG TTCTGTGTGT
721 CCAGGAATTC ACACCTGACC TCGGTGACCT CAGAGAGTGA GCAGGAGTTT CTGTATAAAA
781 CAGCGGGGGG ACTCATCTAC TGGATTGGCC TGACTAAAGC AGGGATGGAA GGGGACTGGT
841 CCTGGGTGGA TGACACGCCA TTCAACAAGG TCCAAAGTGT GAGGTCTCTG ATTCCAGGTG
901 AGCCCAACAA TGCTGGGAAC AATGAACACT GTGGCAATAT AAAGGCTCCC TCACCTCAGG
961 CCTGGAATGA TGCCCCATGT GACAAAACGT TTTCTTTTCAT TTGTAAGCGA CCCTATGTCC
1021 CATCAGAACC GTGACAGGAC AGGCTCCCAA GCTCACTCTT TGAGCTCCAA CGCTTGTTAA
1081 ACATGAGGAA ATGCCTCTTT CTCCCCAGA CTCCAGGATG ACTTTGCACG TTAATTTTTT
1141 TTGCTTCAA AATTGTCCAC AGTGGCATTG TGGAGTCCGT CTGTCTTGGC TGGAAATTCT
1201 CTGACGTCTT GGAGGCAGCT GGAATGAAA GGAGAATTCA GGTAAAGTG GGAGGGGTGG
1261 GTAGAGAGGA TTTAGAAGTT CCAATTGCC TGCTAAGGAG GATCAAGACC CGTAATCCGG
1321 CATAACACCC TGGGGTTTTC CACTCTTTC GAGAAACCTC AGCTTCATCA CATCAAAGTT
1381 ACTCCAGAGC AACCAAGCAA TTCTCCTGAT ATTGTCTATC AGGGCTTTTC TTGGCCAAAC
1441 CCCCTAGAA TCCATGTCT CTGCTTAGCT GTGCTGGCAG CTAGCAGCTG GCTGTGTTTG
1501 CAGTGCAAA ATGCTCTGTT TTGGAAATCC TGCTCATGGT ATGTCCCAG TGGTTTCTTC
1561 ATCCACATCA TCTAAAGCCT GAACCCGTTT TTCTCTGGTT CAAGTCAGTG GCTGACACGG
1621 ACTTGATCT CCTTCAGAG CCGCTGGCA CCCAGCCTCC CTTCTCCTC CACTCCCTTA
1681 GTACACTGGA GTGCCGAGCC CTGCCTTCCA CCCAGCGTCC ATCCAGCCCC TGTCCTCACC
1741 TCTCCGGCAC CTCTCTCTCC TTCTGCATTT CCTATCTTCC TGTGTCTTGT GCATGGGAAG
1801 CAGCCTTCAG TGCTTCATG AATTCACCTT CCAGCTTCTT CAGAATAAAA TGCTGCCTGG
1861 GTCAAGGAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
1921 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
1981 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

```

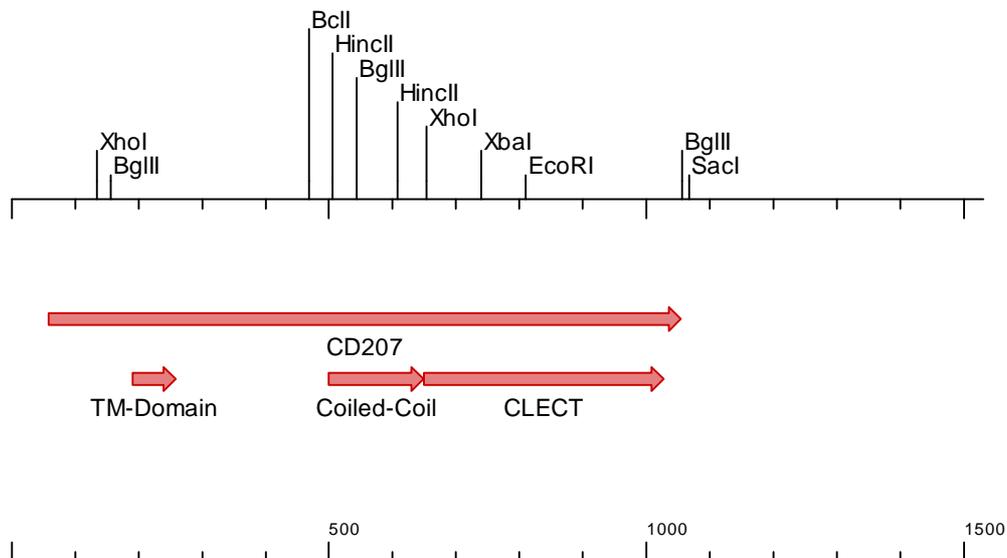


Murines Langerin

```

1   TTTCCGTTT CTTTCTGGAT AAAAAGGTCC TTGGGGAGAC AGATATTGAG AATTTCTAT
61  GCCAGAGGCA GAGATGAAGG AGGAGGCTCC CGAAGCGCAC TTCACAGTGG ACAAACAGAA
121 CATCTCTCTC TGGCCTCGAG AGCCTCCTCC CAAGCAAGAT CTGTCTCCAG TTCTAAGGAA
181 ACCTCTCTGT ATCTGCGTGG CCTTCACCTG CCTGGCATTG GTGCTGGTCA CCTCCATTGT
241 GCTTCAGGCT GTTTTCTATC CTAGGTTGAT GGGCAAAATA TTGGATGTGA AGAGTGATGC
301 CCAGATGTTG AAAGGTCGTG TGGACAACAT CAGCACCTG GGTTCGTATC TTAAGACTGA
361 AAGAGGTCGT GTGGACGATG CTGAGGTTCA GATGCAGATA GTGAACACCA CCCTCAAGAG
421 GGTGCGTTCT CAGATCCTGT CTTTGGAAAC CAGCATGAAG ATAGCCAATG ATCAGCTCCA
481 GATATTAACA ATGAGCTGGG GAGAGGTTGA CAGTCTCAGT GCCAAAATCC CAGAACTGAA
541 AAGAGATCTG GATAAAGCCA GCGCCTTGAA CACAAAGGTC CAAGGACTAC AGAACAGCTT
601 GGAGAAATGC AACAAAGCTG TCAAACAACA GAGTGACATT CTGGAGATGG TGGCTCGAGG
661 CTGGAAGTAT TTCTCGGGGA ACTTCTATTA CTTTTACGCG ACCCCAAAGA CCTGGTACAG
721 CGCAGAGCAG TTCTGTATTT CTAGAAAAGC TCACCTGACC TCAGTGTCCCT CAGAATCGGA
781 AAAAAAGTTT CTCTACAAGG CAGCAGATGG AATTCCACAC TGGATTGGAC TTACCAAAGC
841 AGGGAGCGAA GGGGACTGGT ACTGGGTGGA CCAGACATCA TTCAACAAGG AGCAAAGTAG
901 GAGGTTCTGG ATTCCAGGTG AACCCAACAA CGCAGGGAAC AATGAGCACT GTGCCAATAT
961 CAGGGTGTCT GCCCTGAAGT GCTGGAACGA TGGTCCCTGT GACAATACAT TTCTTTTCAT
1021 CTGCAAGAGG CCCTACGTCC AAACAACCTGA ATGACAGATC TGGCCTGAGC TCGGCATCTG
1081 TGGGGCAACA GTGACCTGGC TGAAGAGATG TCTCTCTCCC TGAGGCTCCA AGATTGCTCT
1141 GTACTTTACG TTTTTTTCTT GCTTGAAAAT TGTCCCAAAC ACAGCCTGTG GTCTTTCTGT
1201 CTTGGCTGGC AGTTCTCTGC TCCTGGAGGC CTTGGAGGAG CTTGGGTAA ACGGGTGAGG
1261 ACCTGAAGAG GCGTAGCAG TCCTTACTGC CCAGGCGAGG CAGGTCAGCA CACCAAACAG
1321 GTTGTTFAGA TTTTCCTGAT CCTTCTCAGA AGCCTTGGCT GACCATATAA AAGCTACATT
1381 CAAATATGAC CAGTATTTGA GGAGGCAGAC ATGCCCAAAT TTAACCATGA TACAATTTAT
1441 ACAACATGTA TTAGAACACC TCATGGTATG CTCAAATAT GTAAATATGT TGTTTTTATG
1501 TGCCTATTGC AAATAAATGT AATATTACTA

```



Danksagung

Mein großer Dank gilt Frau Prof. Dudziak, die mir es ermöglichte eine Doktorarbeit in Ihrer Arbeitsgruppe im Labor für Biologie Dendritischer Zellen am Nikolaus-Fiebiger-Zentrum für Molekulare Medizin in Erlangen anzufertigen. Die engagierte Betreuung und wissenschaftliche Ratschläge trugen im Wesentlichen zum Gelingen der Arbeit bei.

Ebenso möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Prof. Alber für die stets freundliche Unterstützung und Betreuung der Doktorarbeit bedanken.

Ich danke Gordon Heidkamp für die Einarbeitung in das Gebiet der Forschung an humanen Geweben und geduldige Beantwortung aller meiner Fragen.

Ein herzlicher Dank gilt auch Christian Lehmann, der mir bei Fragen zu molekular-biologischen Methoden weiterhalf.

Des Weiteren möchte ich mich bei Anna Baranska für die Einführung in die Immunfluoreszenzmikroskopie, bei Simone Beck für die unterstützenden Arbeiten und allen Mitarbeitern der AG Dudziak für die freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken.

Ein großer Dank geht an die Professoren und Kliniken, für die Bereitstellung humanen Gewebes und in diesem Zusammenhang die gute Zusammenarbeit. Prof. Cesnjevar (Kinder- und Jugendklinik, Chirurgische Abteilung, Universitätsklinikum Erlangen), der uns die Thymi bereitstellte. Prof. Iro, Leiter der HNO-Klinik des Universitätsklinikums Erlangen stellte uns Tonsillen zur Verfügung. Von Prof. A. Hartmann, Prof. W. Haupt und Prof. Hohenfelder der Chirurgischen Klinik mit Poliklinik und der Pathologie in Erlangen wurde uns das Milzgewebe zur Verfügung gestellt.

Außerdem möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Nikolaus-Fiebiger-Zentrums für die Nutzung des Kryotoms, bei Prof. Bogdan für die Nutzung des LSM700 am Lehrstuhl der Mikrobiologie und Hygiene, sowie bei Elisabeth Kremmer vom Helmholtz Zentrum in München für die Antikörperproduktion bedanken.

Zudem danke ich Prof. Falk Nimmerjahn für die gute Zusammenarbeit und die kritische Auseinandersetzung mit meinem Thema.

Mein Dank gilt auch Prof. Lutz für die Anfertigung des Gutachtens über die Doktorarbeit.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie danken, die mir in der Zeit während der Doktorarbeit zur Seite stand und meine Forschungsarbeiten stets unterstützte.