

INAUGURAL – DISSERTATION

Zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht – Karls – Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Biochemiker Jörg Striegler
aus Dresden

Tag der mündlichen Prüfung:

Funktionelle Charakterisierung von
Diphtherietoxinrezeptor-transgenen Mäusen
zur konditionalen Depletion von
dendritischen Zellen

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Günter J. Hämmerling
Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Rainer Zawatzky

Angefertigt in der
Abteilung Molekulare Immunologie
(unter Leitung von Professor Dr. G. J. Hammerling)
im
Deutschen Krebsforschungszentrum
Heidelberg

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift sind bereits veröffentlicht:

Hochweller, K.*, J. Striegler*, G. J. Hammerling and N. Garbi (2008). "A novel CD11c.DTR-transgenic mouse for depletion of dendritic cells reveals their requirement for homeostatic proliferation of natural killer cells." *Eur J Immunol* 38(10): 2776-83.

Hochweller, K., T. Miloud, J. Striegler, S. Naik, G. J. Hammerling and N. Garbi (2009). "Homeostasis of dendritic cells in lymphoid organs is actively controlled by regulation of their precursors via a feed-back loop." *Blood* 114(20): 4411-21.

* zu gleichen Teilen beigetragen

Meinen Eltern

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Natalio Garbi (seit Juni 2011 Professor am Institut für Molekulare Medizin und Experimentelle Immunologie in Bonn) in der Abteilung „Molekulare Immunologie“ (Leiter: Prof. Dr. G. J. Hämmerling) des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg angefertigt.

Ich möchte mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Günter J. Hämmerling bedanken, da er mir nicht nur die Gelegenheit gab ein interessantes und spannendes Thema zu bearbeiten, sondern auch für die sehr gute Betreuung auf wissenschaftlicher und persönlicher Ebene. Mein Dank gilt ihm auch für die Organisation der Finanzierung, die Ermöglichung von zahlreichen Teilnahmen an Kongressen und Symposien sowie die Übernahme des Gutachtens und der Prüfung.

Prof. Dr. Natalio Garbi danke ich für die sehr gute Betreuung meiner Doktorarbeit. Für die Unterweisung in die „Mausarbeit“ und einer Vielzahl von immunologischen Techniken bin ich ihm zu großem Dank verpflichtet. Auch für seine stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft möchte ich ihm danken.

Für die Anfertigung des Gutachtens und die Übernahme der Prüfung möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Rainer Zawatzky (DKFZ) bedanken.

Herzlichen Dank auch an Prof. Dr. Herbert Steinbeisser (Universität Heidelberg) und Prof. Dr. Thomas Rausch (Universität Heidelberg) für die bereitwillige Übernahme der Prüfung.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Kollegen der Abteilung Molekulare Immunologie für die gute Arbeitsatmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft bedanken, besonders denen der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Garbi: Martin Wühl besonders für seine Hilfe bei ELISA, Sarah Flösser speziell für ihre Unterstützung bei der Typisierung der CD11c.DOG-Mäuse und Christine Schmitt-Mbamunyo insbesondere für ihre Hilfe bei der Anfertigung von histologischen Färbungen, Dr. Janine Suffner und Dr. Kristin Hochweller für ihre Unterstützung bei Mausexperimenten.

Bei Sabine Schmitt, Günter Küblbeck, Ulrich Klotz und Franciscus van der Hoeven möchte ich mich für die Generierung bzw. die Testung der CD11c.DOG-Mäuse bedanken.

Manuela Jaster, Elke Deibel, Angelika Frenznick und allen anderen Mitarbeitern des Tierstalles möchte ich für die Pflege meiner Mauslinien danken.

Klaus Hexel, Manuel Scheuermann und Dr. Steffen Schmitt danke ich für die Hilfe bei den Zellsortierungen und der allgemeinen Durchflusszytometrie.

Dr. Norman Nausch bin ich dankbar für seine Unterstützung bei den Experimenten zu *myeloid derived suppressor cells* (MDSC).

Zu großem Dank bin ich Prof. Dr. Thomas Schüler (seit April 2012 am Institut für Molekulare und Klinische Immunologie der Otto-von-Guericke-Universität in Magdeburg) und Prof. Dr. Natalio Garbi für ihre Unterstützung bei der Zurverfügungstellung von verschiedenen Mäusestämmen verpflichtet.

Dr. Gerd Moldenhauer danke ich für die freundliche und geduldige Beantwortung zahlreicher Fragen und für die Bereitstellung von verschiedensten Antikörpern aller Spezifitäten.

Bei Birgit Vey-Hegemann bedanke ich mich herzlich für ihre Hilfe bei der Bewältigung „formalistischer“ Probleme.

Allen „Mitdoktoranden“ möchte ich für die schöne Zeit innerhalb und außerhalb des Labors danken.

Einen herzlichen Dank auch an Dr. Marie Kühnle, Dr. Mario Berger und Dr. Janine Suffner für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Meiner Freundin Dr. Jana Gäbler danke ich in ganz besonderem Maße für ihre große Geduld, die aufmunternden Worte, ihre liebevolle Unterstützung und die schöne gemeinsame Zeit während der Dissertation.

Am Schluss möchte ich den allerherzlichsten Dank meinen Eltern aussprechen, die mir durch ihre wohlwollende Unterstützung ein sorgenfreies Studium ermöglicht und dadurch nicht unerheblich zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Zusammenfassung

Dendritische Zellen (DZ) sind die wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen und spielen deshalb eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von T-Lymphozyten. Um die Rolle von DZ bei verschiedenen immunologischen Prozessen *in vivo* zu klären, wurde in unserem Labor ein BAC-transgenes Mausmodell zur konditionellen Depletion von DZ etabliert. Die sogenannte CD11c.DOG-Maus exprimiert einen humanen Diphtherietoxin-Rezeptor (hDTR), der unter der Kontrolle des DZ-spezifischen CD11c-Promoters steht. Dadurch können DZ spezifisch durch Injektion von Diphtherietoxin (DT) depletiert werden. Die vorliegende Promotionsarbeit beschreibt eingehend das CD11c.DOG-Mausmodell und die Anwendung für die DZ-Forschung.

Es konnte gezeigt werden, dass durch DT-Gabe die verschiedenen DZ-Subpopulationen ($CD4^+CD8^-$ -DZ, $CD4^-CD8^+$ -DZ, und $CD4^-CD8^-$ -DZ) effizient depletiert wurden. Jedoch erreichten die DZ-Populationen innerhalb von ca. 4 Tagen wieder ihre ursprüngliche Zellzahl. Es liegt hier also ein Rückkopplungsmechanismus vor, in dem die bereits entstandenen DZ die Generierung von DZ aus Vorläuferzellen kontrollieren. Die DZ-Depletion beeinflusst die Populationsgröße von anderen Immunzellen nicht, mit Ausnahme der Neutrophilen Zellen, die in Abwesenheit von DZ durch einen noch nicht charakterisierten Rückkoppelungsmechanismus expandieren.

Die schnelle Wiederauffüllung des DZ-Kompartiments machte wiederholt DT-Injektionen notwendig, um DZ über einen längeren Zeitraum depletieren zu können. Bei einem anderen CD11c.DTR-Mausmodell wurde berichtet, dass die Tiere bereits nach 2-3 DT-Injektionen sterben, wahrscheinlich wegen aberranter Expression des DTR-Transgens, was die Nützlichkeit des CD11c.DTR-Stammes einschränkt (Jung et al. 2002). Unsere BAC-transgenen CD11c.DOG-Mäuse überleben jedoch problemlos kontinuierliche Gaben von DT ohne nachteiligen Effekte, höchstwahrscheinlich durch die Verwendung eines BAC-Konstrukts, welches eine hohe Promotorspezifität garantiert.

Allerdings muss hier der überraschende Befund angemerkt werden, dass nach 10-14 Tagen täglicher DT-Injektion neutralisierende Antikörper gegen DT gebildet wurden. Anscheinend reichen nach DT-Depletion die wenigen verbliebenen DZ aus, um eine Antikörperbildung zu unterstützen oder andere Zellen übernehmen die Aufgabe der Antigenpräsentation.

Nach eingehender Charakterisierung der CD11c.DOG-Mäuse wurde die Funktion von DZ *in vivo* analysiert. Dabei wurde zunächst analysiert, ob DZ bei der Aktivierung von NK-Zellen durch bakterielle Produkte beteiligt sind. In der Tat konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit von DZ *in vivo* nur eine partielle Aktivierung der NK-Zellen erfolgte.

Weitere Untersuchungen betrafen die Interaktion von T-Zellen mit DZ. In lymphoiden Organen tasten T-Zellen DZ kontinuierlich nach fremdem Antigen ab. Bisher wurde angenommen, dass die häufigen Kontakte von T-Zellen mit DZ in Abwesenheit von Fremdantigen bedeutungslos sind. T-Zellen aus DZ-depletierten CD11c.DOG-Mäusen konnten jedoch nicht mehr durch Fremdantigen aktiviert werden. Anscheinend benötigen naive T-Lymphozyten den kontinuierlichen DZ-Kontakt und eine Grundstimulierung durch DZ, um schnell und effizient auf Fremdantigene reagieren zu können.

Aufgrund der Tatsache, dass sich DZ in den CD11c.DOG Mäusen über einen längeren Zeitraum effizient depletieren lassen, wird dieser Mausstamm inzwischen in zahlreichen internationalen Laboratorien als bevorzugtes Modell für die Erforschung von DZ eingesetzt.

Summary

Dendritic cells (DC) are the main antigen-presenting cells in the immune system and, therefore, play a crucial role in T lymphocyte activation. To clarify the role of DC in various immunological processes *in vivo* our laboratory has established a BAC transgenic mouse model for conditional depletion of DC. The so-called CD11c.DOG mouse expresses the human diphtheria toxin receptor (DTR) under the control of the DC-specific CD11c promoter. Thus, DC can be specifically depleted in these mice by injection of diphtheria toxin (DT). The present study describes the detailed immunological investigation of the CD11c.DOG mouse model and its application to DC research.

The results show that the major DC subpopulations (CD4⁺CD8⁻ DC, CD4⁻CD8⁺ DC and CD4⁻CD8⁻ DC) were efficiently depleted by DT administration. However, the DC-populations returned to their original cell number within 4 days. Thus, there exists a feedback mechanism by which mature DC control the de novo generation of DC from progenitor cells. DC depletion does not affect the pool size of other immune cell populations with the exception of neutrophil cells, which strongly expanded in the absence of DC, via another not yet characterized feedback mechanism.

Owing to the fast recovery of the DC pool, repeated DT injections are required to deplete DC over a longer period of time. For another CD11c.DTR mouse model it was reported that the animals die after 2-3 DT injections, probably due to aberrant expression of the DTR transgene, thereby limiting the usefulness of this CD11c.DTR strain (Jung et al. 2002). In contrast, our CD11c.DOG mice survive continuous doses of DT without any adverse effects, most likely due to the BAC construct that ensures high promoter specificity.

In this context the unexpected finding has to be noted that after 10-14 days of daily injections of DT neutralizing antibodies against DT were formed. Apparently, the few DC that remained after DT depletion were sufficient to support antibody production. Alternatively, other cell types may have served as antigen presenting cells.

Next, the CD11c.DOG mice were used to study DC functions *in vivo* which would go beyond the classical function of DC, namely presentation of foreign antigens. First, we investigated whether DC would be involved in natural killer (NK) cell-activation by

bacterial products. Indeed, it could be shown that *in vivo* DC were required for NK cell activation as in the absence of DC only partial NK activation was achieved.

In further studies we investigated interactions between T cells and DC. In lymphoid organs, T cells continuously scan DC for foreign antigen. So far, it was assumed that the frequent contacts observed between T cells and DC in the absence of foreign antigen are without consequence. However, we observed that T cells from DC depleted mice were refractory to subsequent stimulation by foreign antigen. Thus, naive T lymphocytes require continuous contact and tonic stimulation by DC in order to respond against foreign antigen.

Due to the fact that DC can be efficiently depleted in CD11c.DOG mice DC over a long period of time, this mouse strain is now being used in many international laboratories as the preferred model for DC research.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	18
1.1	Grundzüge des Immunsystems	18
1.1.1	Angeborene Immunabwehr	18
1.1.2	Adaptive Immunabwehr	19
1.2	DZ – ein Hauptakteur des Immunsystems	20
1.2.1	Zellbiologie der DZ	21
1.2.1.1	Ursprung und Vorkommen der DZ	21
1.2.1.2	Antigen-Aufnahme, -Prozessierung und -Präsentation	24
1.2.1.3	Reifung und Migration	24
1.2.2	Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen	25
1.2.2.1	CD8 ⁺ T-Zell-vermittelte Immunantwort	26
1.2.2.2	CD4 ⁺ T-Zell-vermittelte Immunantwort	27
1.2.3	Induktion von Toleranz durch DZ	28
1.3	Interaktion zwischen DZ und NK-Zellen	29
1.4	Systeme zur Eliminierung von Immunzellen	29
1.4.1	„Suicide systems“	31
1.4.2	Diphtherietoxin-Rezeptor basierendes Zelldepletionssystem	32
1.5	Herstellung von BAC-transgenen Mäusen	37
1.6	Ziele dieser Arbeit	38
2	Material und Methoden	40
2.1	Materialien	40
2.1.1	Bezugsquellen	40
2.1.1.1	Chemikalien	40
2.1.1.2	Einmalartikel	40
2.1.2	Verwendete Kits	40
2.1.3	Geräte	41
2.1.4	Puffer und Lösungen	42
2.1.5	Viren	43
2.1.6	Bakterienstämme	43
2.1.6.1	Medien, Platten und Antibiotikum für Bakterien	43
2.1.7	Zelllinien	43
2.1.8	Medien und DPBS	44

2.1.9	Mauslinien	46
2.1.10	Antikörper	48
2.1.11	Peptide	50
2.1.12	PCR-Primer	50
2.1.13	Phosphothioat-stabilisiertes Oligodesoxynukleotid	50
2.1.14	Datenbanken/Software	50
2.2	Molekularbiologische Methoden	51
2.2.1	Transformation von <i>E.coli</i>	51
2.2.2	Plasmid-Präparation.....	51
2.2.3	Isolierung von DNA aus der Schwanzspitze von Mäusen	52
2.2.4	PCR	52
2.2.5	Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarose-Gel (DNA-Gelelektrophorese)	53
2.3	Proteinbiochemische Methoden	54
2.3.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	54
2.3.2	Western Blot.....	55
2.4	Zellbiologische Methoden	56
2.4.1	Lagerung und Kultur von Zelllinien.....	56
2.4.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	56
2.4.3	Transfektion von RMA-Zellen.....	56
2.5	Tierexperimentelle Arbeiten	57
2.5.1	Injektion von DT	57
2.5.2	Organentnahme bei Mäusen.....	58
2.5.3	Präparation von Organen für FACS, MACS oder zelluläre Assays	58
2.5.3.1	Präparation von Milz-, Knochenmark- und Lymphknotenzellen	58
2.5.3.2	Präparation der Lunge	60
2.5.3.3	Präparation von Epidermis und Dermis	60
2.5.3.4	Präparation und Kultur von BMDC	61
2.5.4	Isolierung von peripheren Blutlymphozyten zur Typisierung von transgenen Mäusen	62
2.6	Immunologische Methoden	62
2.6.1	Extrazelluläre FACS-Färbung	62
2.6.2	Intrazelluläre FACS Färbung	63
2.6.3	In vitro-Restimulation von T-Zellen zum Nachweis der IFN γ -Ausschüttung	64
2.6.4	Bestimmung der Leukozytenanzahl und DZ-Depletion.....	64
2.6.5	Isolierung von Zellpopulationen mittels Magnetpartikel	67
2.6.6	CFSE-Markierung von Milzzellen.....	67
2.6.7	In vitro-Proliferation und Stimulation.....	68

2.6.7.1	DT-basierte Depletion von RMA.DOG-Zellen.....	69
2.6.8	In vivo-Proliferation.....	70
2.6.9	Myeloid Derived Suppressor Cell-Assay.....	70
2.6.10	Immunisierungen mit Ovalbumin-Protein.....	71
2.6.11	In vivo-Stimulierung mit Poly I:C, CpG ODN oder LPS.....	71
2.6.12	Adenoviren-Applikation.....	71
2.6.13	In vivo-Zytotoxizitätsassay.....	71
2.6.14	ELISA.....	73
2.6.15	Histologie.....	74
2.6.15.1	Gewebepräparation für histologische Färbungen.....	74
2.6.15.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	75
2.6.15.3	DAB/Methylgrün-Färbung.....	75
2.7	Statistik.....	76
3	Ergebnisse.....	77
3.1	Depletion der DZ in CD11c.DOG-Mäusen.....	77
3.1.1	Nachweis der Transgenexpression in der CD11c.DOG-Maus.....	77
3.1.1.1	Nachweis des funktionellen DT-Rezeptors.....	78
3.1.1.2	eGFP im Fusionsprotein ist nicht funktional.....	79
3.1.1.3	Nachweis der immundominanten Ovalbumin-Peptide in CD11c.DOG-Mäusen.....	80
3.1.2	CD11c.DOG-Mäuse überleben im Vergleich zu CD11c.DTR-Mäusen wiederholte DT-Injektionen.....	83
3.1.3	Depletion der DZ in lymphoiden Organen.....	87
3.1.3.1	Depletion der DZ-Subtypen in der Milz.....	88
3.1.3.2	Vergleich der Depletion von DZ in lymphoiden Organen.....	90
3.1.3.3	Erhöhte DT-Mengen steigern die erreichbare DZ-Depletion in LK, KM und Thymus.....	92
3.1.3.4	Kinetik der DZ-Depletion in der Milz nach Einmalinjektion von DT.....	93
3.1.3.5	DZ-Depletion in Milz und Thymus von neonatalen Mäusen.....	95
3.1.4	Depletion von DZ in nicht-lymphoiden Organen.....	97
3.1.5	DZ-Depletion mittels aktivierter OT-I- & OT-II-T-Zellen in CD11c.DOG-Mäusen.....	98
3.1.6	Analyse anderer Leukozytenpopulationen nach DZ-Depletion.....	99
3.1.6.1	Analyse von CD11c ⁺ B-, T-, NKT- und NK-Zellen nach DT-Injektion in CD11c.DOG-Mäuse.....	99
3.1.6.2	Analyse der B- & T-Zellproliferation <i>in vitro</i> unter DT-Depletionsbedingungen....	102
3.1.6.3	Histologische Untersuchung von Makrophagenpopulationen unter Einfluss von DT.....	106
3.1.6.4	Analyse der Gr-1 ⁺ -Zellen nach DT-Injektion in CD11c.DOG-Mäusen.....	108

3.1.7	Bildung von anti-DT-Antikörpern ist abhängig von Anzahl und Dosis der DT-Injektionen	112
3.2	Zentrale Toleranz gegen Ovalbumin	118
3.3	Rolle der DZ in der Aktivierung von NK-Zellen.....	124
3.3.1	DZ-Depletion reduziert die NK-Zell-Aktivität	124
3.4	Einfluss der DZ auf die Basisaktivierung von T-Zellen	128
4	Diskussion	134
4.1	DZ-Depletion in CD11c.DOG-Mäusen	134
4.1.1	Nachweis der Transgenexpression	134
4.1.2	CD11c.DOG im Vergleich zu anderen DZ-depletierenden transgenen Mäusen.....	135
4.1.3	DZ-Depletion in lymphoiden Organen.....	138
4.1.3.1	Kinetik der DZ-Depletion in der Milz	138
4.1.3.2	Untersuchungen zur Homöostase von DZ mittels CD11c.DOG-Mäusen.....	139
4.1.4	Erfolgreiche Depletion der DZ auch in nicht lymphoiden Organen	139
4.1.5	Aktivierte OT-I- und OT-II-T-Zellen reduzieren DZ in CD11c.DOG-Mäusen.....	140
4.1.6	Analyse des Einflusses von DT auf andere Lymphozytenpopulationen	140
4.1.7	Anstieg der Gr-1 ⁺ Zellpopulation nach DT-Depletion	142
4.1.8	Dosis und Anzahl der wiederholten DT-Injektionen entscheiden über die Bildung einer wirksamen anti-DT-Antikörperantwort	142
4.1.9	Toleranzinduktion gegen Ovalbumin	143
4.2	Rolle von DZ für die NK-Zellaktivierung und NK-Zellhomöostase	143
4.3	DZ-vermittelte Basisaktivierung von T-Zellen.....	144
5	Abkürzungsverzeichnis.....	147
6	Literatur	152

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Dendritische Zelle	21
Abbildung 1.2: DZ-Entwicklung.....	22
Abbildung 1.3: DT bindet DTR-Fragment in Bändermodell Darstellung	33
Abbildung 1.4: DT-DTR Zell-Depletionsmechanismus.....	35
Abbildung 1.5: CD11c.DTROVAeGFP (CD11c.DOG)-Gen-Konstrukt.....	37
Abbildung 2.1: Selektion der Leukozyten im FSC-SSC-Diagramm	65
Abbildung 2.2: Selektion von lebenden Zellen durch Ausschluss der toten PI ⁺ Zellen.....	66
Abbildung 2.3: Mechanismus der Markierung von zellulären Proteinen durch CFDA-SE	68
Abbildung 3.1: Identifizierung von transgenen CD11c.DOG-Mauslinien.....	77
Abbildung 3.2: Vergleich der DZ-Depletion in verschiedenen CD11c.DOG-Linien	79
Abbildung 3.3: eGFP Expression in CD11c.DOG-Mäusen ist nicht funktional.....	80
Abbildung 3.4: Nachweis der immundominanten Peptide des Ovalbumins in CD11c.DOG- Mäusen mittels OT-I/II-Zellteilung	82
Abbildung 3.5: Überleben der CD11c.DTR- und CD11c.DOG-Mäuse nach wiederholten DT-Injektionen	84
Abbildung 3.6: Gewichtsveränderung von C57BL/6- und CD11c.DOG-Mäusen nach wiederholten Injektionen von unterschiedlichen DT-Konzentrationen	86
Abbildung 3.7: DZ-Depletion in der Milz von CD11c.DOG-Mäusen nach einmaliger DT-Gabe	87
Abbildung 3.8: Depletion verschiedener cDZ-Subpopulationen und pDZ in CD11c.DOG-Mäusen nach einmaliger DT-Gabe	89
Abbildung 3.9: DZ-Depletion in primären & sekundären lymphoiden Organen von CD11c.DOG-Tieren	91
Abbildung 3.10: DT-Titration zur Analyse der DZ-Depletion in lymphoiden Organen	92
Abbildung 3.11: Verlauf der DZ/pDZ-Depletionskinetik nach einmaliger DT-Injektion in CD11c.DOG-Mäusen	94
Abbildung 3.12: DZ-Depletion in der Milz und dem Thymus von neonatalen CD11c.DOG-Mäusen	96
Abbildung 3.13: Depletion von DZ in der Lunge von CD11c.DOG-Mäusen.....	97
Abbildung 3.14: Depletion der DZ in der Dermis & Epidermis von C57BL/6- & CD11c.DOG-Mäusen	98
Abbildung 3.15: DZ-Depletion mittels AdOVA-aktivierter OT-I/II-T-Zellen in CD11c.DOG-Mäusen	99
Abbildung 3.16: Analyse von CD11c ⁺ B-, CD8/CD4 T-, NK- und NKT-Zellen nach einmaliger DT-Injektion in CD11c.DOG-Mäuse	100

Abbildung 3.17: Bestimmung der Funktionalität von DT <i>in vitro</i> mittels Depletion der RMA.DOG-Zellen im Gemisch mit RMA-Zellen.....	103
Abbildung 3.18: Bestimmung der <i>in vitro</i> -Proliferation von T- & B- Zellen aus C57BL/6- & CD11c.DOG-Mäusen mittels CpG oder ConA Stimulation unter verschiedenen DT-Konzentrationen.....	104
Abbildung 3.19: <i>in vitro</i> -Stimulation mittels CpG ODN & ConA zur Bestimmung der Proliferation von B- und T-Zellen aus C57BL/6- & CD11c.DOG-Mäusen	105
Abbildung 3.20: Immunhistochemischer Nachweis verschiedener makrophagen-spezifischer Oberflächenmarker in der Milz von CD11c.DOG-Mäusen ohne/mit DT-Depletion.....	107
Abbildung 3.21: Immunhistochemischer Nachweis von Gr-1 und CD11b in der Milz von CD11c.DOG-Mäusen ohne/mit DT-Depletion	108
Abbildung 3.22: Expansion der Gr-1 ⁺ CD11b ⁺ Zellen nach einmaliger DT-Injektion in CD11c.DOG-Mäusen	109
Abbildung 3.23: Zunahme der Gr-1 ⁺ CD11b ⁺ -Zellpopulation nach DT-Injektion in der Milz von CD11c.DOG-Mäusen im Verlauf von 7 Tagen	110
Abbildung 3.24: Suppressions-Assay mit Gr-1 ⁺ F4/80 ^{+/-} -Zellen aus C57BL/6- & CD11c.DOG-Mäusen.....	111
Abbildung 3.25: Bestimmung der IgM- & IgG-Immunantwort gegen DT nach einfacher/mehrfacher DT-Gabe	113
Abbildung 3.26: Bestimmung der DZ-Depletion nach „Immunisierung“ von CD11c.DOG-Mäusen mit DT	114
Abbildung 3.27: Kontinuierliche Injektionen mit hoher DT-Dosis über einen Zeit- raum von 76 Tagen induzieren die Bildung von anti-DT-IgG-Ak.....	115
Abbildung 3.28: Inhibierung der Depletion von DT-sensitiven RMA.DOG-Zellen durch anti-DT-Ak.....	117
Abbildung 3.29: Zentrale Toleranz gegen Ovalbumin im Thymus von CD11c.DOG-Mäusen	119
Abbildung 3.30: Periphere Toleranz gegen Ovalbumin in der Milz von CD11c.DOG-Mäusen	120
Abbildung 3.31: Nachweis der peripheren OVA-Toleranz von CD11c.DOG- Mäusen mittels AdOVA-Infektion	122
Abbildung 3.32: IFN- γ Produktion der CD8 ⁺ & CD4 ⁺ T-Zellen in C57BL/6- & CD11c.DOG-Mäusen	123
Abbildung 3.33: Einfluss von DT auf NK-Zellen in CD11c.DOG-Mäusen.....	125
Abbildung 3.34: DZ sind für eine erfolgreiche NK-Aktivierung wichtig.....	127
Abbildung 3.35: <i>In vitro</i> -Proliferation von CD4 und CD8 T-Zellen nach <i>in vivo</i> - DZ-Depletion	130
Abbildung 3.36: TZR-Signalkaskade.....	131

Abbildung 3.37: Analyse der Anzahl an phospho-ERK ⁺ CD8 T-Zellen von OT-IxCD11c.DOG-Mäusen +/- DZ-Depletion <i>in vivo</i> unter OVA ₂₅₇₋₂₆₄ -Stimulation	132
---	-----

1 Einleitung

1.1 Grundzüge des Immunsystems

Die wichtigste Aufgabe des Immunsystems ist die Abwehr von Pathogenen wie Viren, Bakterien und Pilze, welche die erste Barriere – Haut und die Schleimhäute – überwunden haben. Bei Vertebraten hat sich im Verlauf der Evolution dafür ein eng verwobenes Doppelsystem aus angeborener und erworbener (adaptiver) Immunabwehr entwickelt.

1.1.1 Angeborene Immunabwehr

Die angeborene Immunität bewirkt einerseits eine lebenswichtige, schnelle Abwehrreaktion gegen Krankheitserreger, die den Organismus während der ersten Stunden und Tage einer Infektion schützt. Andererseits besitzt sie auch eine Schlüsselrolle für die Induktion der späteren Antigen-(Ag)-spezifischen, adaptiven Immunantwort.

Mikroorganismen oder körperfremde Stoffe, welche die erste Barriere (Epithelien) überwunden haben, treten einer zweiten Verteidigungslinie entgegen. Diese setzt sich aus dem Komplementsystem und verschiedenen Fresszellen (Phagozyten) zusammen. Das Komplementsystem besteht aus verschiedenen Plasmaproteinen, die auf der Oberfläche von Pathogenen eine Kaskade proteolytischer Reaktionen auslösen. Körperzellen werden davon verschont. Weiterhin wirken die Komplementproteine durch die Bindung an die Oberfläche der Eindringlinge als Chemokine und als Markierung (Opsonierung). Dadurch beschleunigen sie die Entfernung durch Phagozyten. Einen wichtigen Beitrag an der angeborenen Immunantwort leisten die Phagozyten: Monozyten/Makrophagen und Granulozyten. Sie beginnen im Gewebe oder Blut befindliche Eindringlinge rasch via Phagozytose aufzunehmen und Zytokine freizusetzen. Die Pathogen-Erkennungsmechanismen sind hierbei unspezifisch. Dies ist auch notwendig, um die unüberschaubare Anzahl unterschiedlicher Fremdantigene zu erkennen. Mithilfe von sogenannten „Pattern Recognition Receptors“ (PRR) können Fremdstrukturen mit sich in regelmäßigen Abständen wiederholenden Elementen (PAMP - *pathogen associated molecular pattern*) erkannt werden (Janeway, 1992;

Janeway, 1989). Beispiele für PRR sind *mannose receptor* (MR), *NOD-like receptors* (*nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors*; NLR), *RIG-I-like receptors* (*retinoid acid-inducible gene I-like receptors*; RLR) und *Toll-like receptors* (TLR).

Ebenfalls zur angeborenen Immunität zählen natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Sie erkennen tumor- oder virusinfizierte Zellen nicht anhand fremder Strukturen, sondern durch den Mangel an Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex-(MHC)-Klasse-I-Molekülen an der Zelloberfläche (*missing self*). Eine weitere Besonderheit ist ihre Fähigkeit, ohne vorherige Aktivierung spontan zu töten.

Die Zellen des angeborenen Immunsystems spielen bei der Initiierung und der darauffolgenden Steuerung der adaptiven Immunabwehr eine wichtige Rolle. Darum nehmen zum Beispiel dendritische Zellen (DZ) eine Zwischenstellung innerhalb beider Immunabwehrmechanismen ein.

1.1.2 Adaptive Immunabwehr

Vertebraten besitzen neben der angeborenen Immunabwehr auch noch das adaptive Immunsystem. Die Besonderheit dieses erworbenen Immunsystems liegt in der Fähigkeit, Ag-spezifisch zu reagieren und dadurch neue Pathogene zu erkennen und abzutöten (Janeway, 2004). Die wichtigsten Zellen in diesem System sind die T- und B-Lymphozyten. Sie differenzieren und vermehren sich in verschiedenen primären lymphatischen Organen. B-Zellen reifen im Knochenmark (KM), während T-Zellen zum Thymus (Thy) auswandern und dort zu naiven T-Zellen differenzieren. Lymphozyten binden mit hoher Spezifität jeweils nur ein Antigen (Ag) über ihre auf der Oberfläche befindlichen Ag-Rezeptoren. B-Zellen besitzen Immunglobuline während T-Zellen einen membranständigen T-Zell-Rezeptor (TZR) auf ihrer Oberfläche tragen. Werden B-Zellen aktiviert, so setzen sie die Immunglobuline als Antikörper (Ak) frei. Aufgrund der sehr variabel gestalteten Umordnungen (*rearrangements*) der Immunglobulin- und TZR-Gene können eine Vielzahl Ag-spezifischer Lymphozyten und Ak entstehen (Tonegawa, 1983; Davis und Bjorkman, 1988). Dadurch ist das adaptive Immunsystem in der Lage, spezifisch auf nahezu alle Ag-Stukturen zu reagieren. Da jedoch die somatische DNA-Rekombination der Gene zufällig erfolgt, entstehen auch potentiell autoreaktive Rezeptoren. Damit für den Körper gefährliche autoimmune Reaktionen des Immunsystems vermieden werden, kommt es zur Eliminierung von selbstreaktiven T- und B-Zellen durch klonale Deletion (zentrale Toleranz). Nach ihrer Reifung wandern die B- und T-Zellen (naive Zellen) via Blut und Lymphe in die sekundären lymphatische

Organe Milz und Lymphknoten (Lk), wo sie sich in B- bzw. T-Zell-Zonen ansammeln. Dort erfolgt bei Kontakt der T-Zellen mit dem für sie spezifischen Ag über Ag-präsentierenden Zellen (APZ = DZ, B-Zellen, Makrophagen) die Initiierung der zellulären Immunantwort bzw. die Produktion von spezifischen Ak durch aktivierte B-Zellen (humorale Immunität). Vorausgehend hat dabei der B-Zell-Rezeptor extrazellulär gelöste oder auf der Oberfläche von Pathogenen exprimierte Ag erkannt und bildet anschließend als Plasmazelle die spezifischen Ak.

Im Gegensatz dazu erkennt der TZR nur Ag, die an den Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (MHC) der APZ gebunden sind. Es gibt zwei MHC-Klassen. Die meisten Zellen mit Zellkern tragen MHC-Klasse-I-Moleküle, MHC-Klasse-II findet sich nur auf APZ. Nur DZ sind fähig, aufgenommene Ag nicht nur auf MHC-Klasse-II sondern auch auf MHC-Klasse-I zu präsentieren (Kreuzpräsentation; Kapitel 1.2.1.2). Die primäre Aktivierung der T-Zellen erfolgt erst in den Lymphknoten und somit nicht am Infektionsort; d.h. die Ag werden von DZ am Infektionsort aufgenommen, in die Lymphknoten transportiert und dort den T-Zellen präsentiert. Dabei unterscheidet man zwei Klassen von T-Zellen. $CD4^+$ T-Helferzellen erkennen auf MHC-Klasse-II präsentierte Ag. $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen (ZTL) erkennen Ag infizierter oder entarteter körpereigener Zellen die im Komplex mit MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden. Sie induzieren in den Zielzellen über verschiedene Wege - unter Beteiligung von Perforinen und Granzymen - Apoptose. T-Helferzellen (T_H -Zellen) produzieren Zytokine und sind daher vor allem für die Regulation und Kommunikation des Immunsystems wichtig. Sie werden in T_{H1} und T_{H2} unterteilt. T_{H1} -Zellen bewirken eher eine Verstärkung der zellulären Immunantwort (vor allem über $IFN-\gamma$ und IL-12), während T_{H2} -Zellen vermehrt die Produktion von Ak stimulieren (z.B.: über IL-4, TGF- β und IL-10).

Ein entscheidender Unterschied zum angeborenen Immunsystem besteht in der Bildung des immunologischen Gedächtnisses. Dazu werden spezielle Ag-spezifische, langlebige Gedächtniszellen generiert, die die Fähigkeit haben schneller und effektiver auf einen wiederholten Kontakt mit einem schon bekannten Ag zu reagieren.

1.2 DZ – ein Hauptakteur des Immunsystems

Unter den Zellen des angeborenen Immunsystems kommt den DZ aufgrund ihres Potentials, naive T-Lymphozyten zu aktivieren und somit deren Expansion und Differenzierung in Effektorzellen zu induzieren, eine Schlüsselfunktion zu. DZ wurden schon 1868 von Paul Langerhans in humaner Epidermis studiert. Er nahm jedoch

aufgrund der Morphologie der Zellen an, dass es sich um Nervenzellen der Haut handelte (Langerhans, 1868). 1973 entdeckten Steinman und Cohn Zellen vom DZ-Typ in muriner Milz und nannten sie wegen ihrer charakteristischen Morphologie (Abbildung 1.1) dendritische Zellen ([griech.] dendros = Baum) (Steinman und Cohn, 1974; Steinman, Lustig et al., 1974; Steinman, Adams et al., 1975; Steinman, Kaplan et al., 1979; Steinman und Cohn, 1973). Ralph M. Steinman bekam 2011 zusammen mit Jules Hoffmann und Bruce Beutler den Nobelpreis für Medizin. Steinman wurde für seine Entdeckung der DZ geehrt.

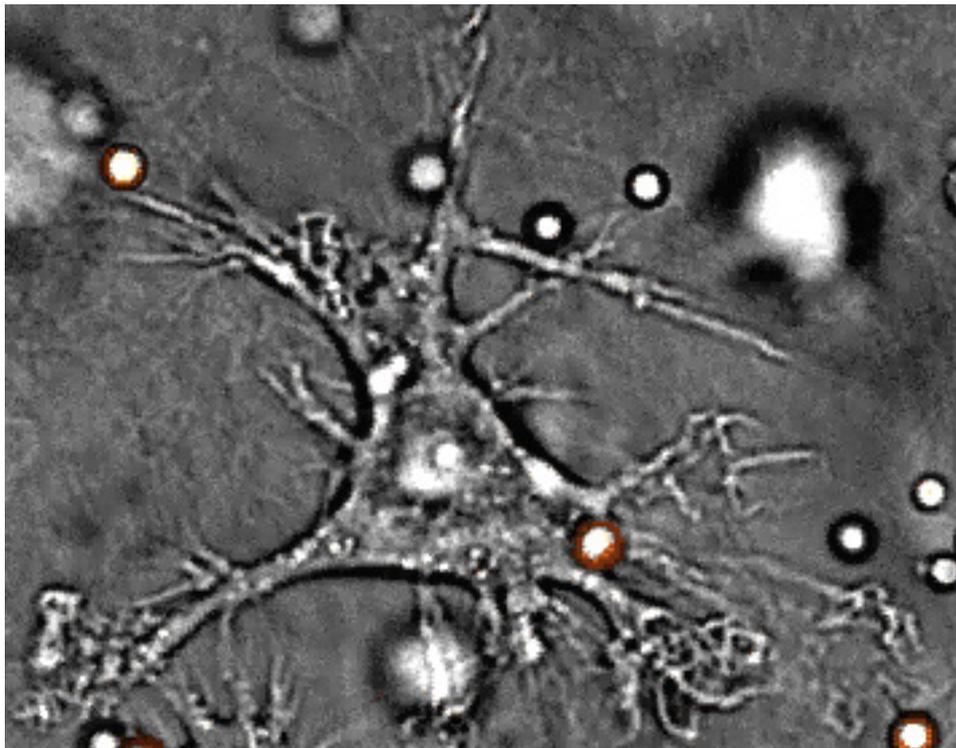


Abbildung 1.1: Dendritische Zelle

Mikroskopisches Bild einer DZ. Quelle: PLoS Pathogens - <http://pathogens.plosjournals.org/perlserv/?request=get-document&doi=10.1371/journal.ppat.0030013>

1.2.1 Zellbiologie der DZ

1.2.1.1 Ursprung und Vorkommen der DZ

Im Knochenmark vorkommende hämatopoetische, pluripotente Stammzellen bilden den Ursprung der DZ-Vorläuferzellen (wie auch aller anderen myeloischen und lymphatischen Zellen). Die weitere Entwicklung verläuft an mehreren Orten ausgehend vom Knochenmark über Blut in Milz und Lymphknoten. Alle *conventional dendritic cells* (cDZ) stammen von *common myeloid progenitors* oder *common lymphoid progenitors*

des KM ab. Plasmazytoide DZ (pDZ) dagegen bilden sich aus *estrogen-resistant myeloid progenitors* (Harman, Miller et al., 2006). Interessant ist hierbei festzustellen, dass für die Entstehung der DZ eine Expression des Zytokinrezeptors Flt3 (*FMS-related tyrosine kinase 3*) auf Vorläuferzellen notwendig ist (Abbildung 1.2).

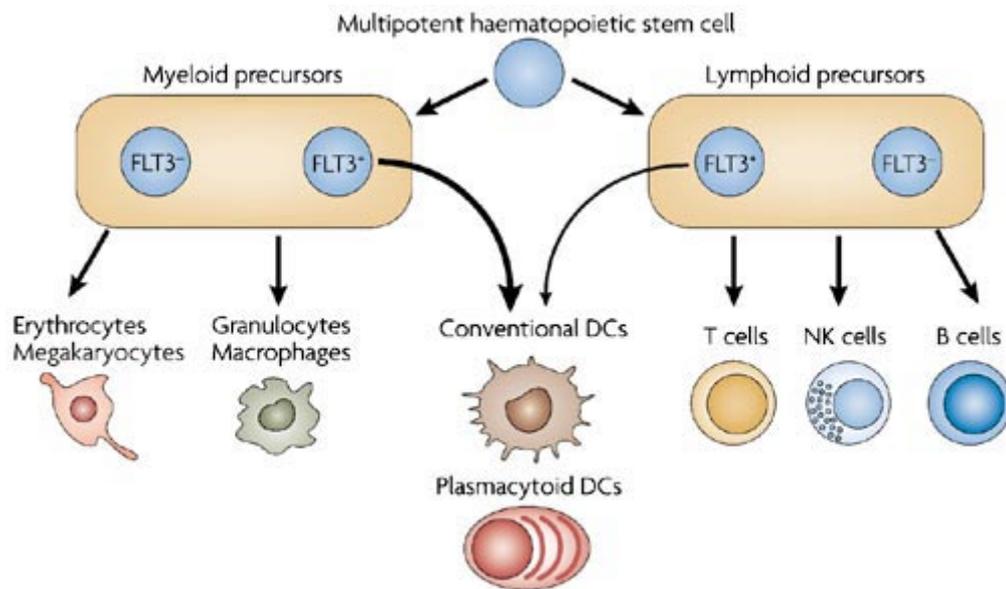


Abbildung 1.2: DZ-Entwicklung

Ursprung und Vorläuferzellen der DZ. Quelle: (Shortman und Naik, 2007)

Neben diesen frühen Vorläuferzellen existieren noch spätere Subtypen, wie pro-DZ und pre-DZ. Die pre-DZ, welche unmittelbar vor den ausdifferenzierten DZ stehen, sind auch in der Milz vorhanden. Es konnte von uns gezeigt werden, dass bei der Homöostase der DZ Vorläuferzellen in der Milz eine Quelle für reife DZ sind (Hochweller, Miloud et al., 2009).

Die DZ-Population ist sehr heterogen. So unterscheiden sich die DZ-Subtypen hinsichtlich ihrer Lokalisation, Lebensdauer, immunologischen Funktion und ihres Wanderungsverhaltens (Shortman und Naik, 2007). Hierbei kann folgende Einteilung vorgenommen werden:

Pre-DZ

Pre-DZ sind wie oben beschrieben, Vorläuferzellen von verschiedenen DZ-Subtypen mit der Fähigkeit zur Entwicklung in ausdifferenzierte DZ (z.B.: CD11c^{niedrig}B220⁺Ly6C⁺ DZ = pDZ) (Asselin-Paturel, Boonstra et al., 2001; Nakano, Yanagita et al., 2001; Shortman und Liu, 2002).

cDZ

Die CD11c⁺MHC-II^{hoch} cDZ werden unterschieden in:

Migratory dendritic cells

- sind die klassischen DZ mit ihrer Hauptfunktion als „Pathogen-Wächter“ im Gewebe,
- sie transportieren periphere Ag über die Lymphgefäße zu den Lymphknoten und präsentieren sie dort den T-Zellen und
- typische Vertreter sind Langerhanszellen (Langerin⁺) und dermale DZ (DC-SIGN⁺).

Lymphoid-tissue-resident dendritic cells

- wandern nicht durch die Lymphe,
- bleiben während ihrer Lebensdauer in einem lymphoiden Organ,
- sie sammeln und präsentieren Fremd- und Selbst-Ag in diesem lymphoiden Organ,
- werden z.B. in der Maus unterteilt in: CD4⁺CD8⁻ cDZ, CD4⁻CD8⁻ cDZ und CD4⁻CD8⁺ cDZ und
- typische Vertreter sind cDZ von Thymus und Milz.

Inflammatory dendritic cells

Sie sind unter steady-state Bedingungen nicht vorhanden, aber treten bei Entzündungsprozessen und bei mikrobieller Stimulierung auf (z.B.: TNF und induzierbare NO-Synthase produzierende DZ (Tip-DZ)) (Serbina, Salazar-Mather et al., 2003). *Inflammatory monocytes* können *inflammatory dendritic cells* hervorrufen.

Auf die CD11c^{niedrig}B220⁺Ly6C⁺CD317⁺ DZ soll hier noch einmal genauer eingegangen werden. Aufgrund ihrer morphologischen Ähnlichkeit zu den Plasmazellen, werden sie plasmazytoide DZ (pDZ) genannt (Fischer, Schmitz et al., 2004; Grouard, Rissoan et al., 1997; Facchetti, de Wolf-Peeters et al., 1988; Lennert und Remmele, 1958; Blasius, Giurisato et al., 2006). Sie reagieren auf virale oder mikrobielle Stimuli mit einer hohen Interferon-(IFN)- α -Produktion und stellen somit einen ersten

Abwehrmechanismus zur Verfügung. Sie detektieren diese Ag mittels *toll-like receptors* (TLR) in Lysosomen (z.B.: TLR9 bindet nicht-methylierte CpG Sequenzen in doppelsträngiger DNA) oder Endosomen (z.B.: TLR7 bindet einzelsträngige RNA) (Heil, Ahmad-Nejad et al., 2003; Latz, Schoenemeyer et al., 2004). Durch eine solche Virusinfektion können pDZ aus dem Knochenmark zu cDZ differenzieren (Zuniga, McGavern et al., 2004). Analog der *Lymphoid-tissue-resident dendritic cells* befinden sich die pDZ vorrangig in der T-Zell Zone der peripheren Lymphorgane.

1.2.1.2 Antigen-Aufnahme, -Prozessierung und -Präsentation

DZ gehören neben Makrophagen und B-Zellen zu den professionellen APZ. Sie besitzen die besondere Fähigkeit der Ag-Präsentation über MHC-Klasse-II-Moleküle. Die Aufnahme von Ag (apoptotischen oder nekrotischen Zellen, Pathogene oder gelöste Proteine) erfolgt dabei über Makropinozytose, Phagozytose, Endozytose oder über spezifische Rezeptoren (Lanzavecchia, 1996). Die Ag-Präsentation kann exogene oder endogene Ag umfassen. Die Prozessierung von exogenen Ag erfolgt nach dem *endocytic pathway*. Dabei wird das aufgenommene Ag über Endosomen und Lysosomen abgebaut und die Peptide schließlich auf MHC-Klasse-II-Moleküle geladen. Guermonprez et al. zeigten jedoch, dass auch endogene Ag mittels diesen Weges auf MHC-Klasse-II-Moleküle geladen werden können (Guermonprez, Valladeau et al., 2002). Endogene Ag (zytoplasmatische Ag; von Viren oder Bakterien) werden von Proteasen in Peptide zerteilt, über den Transporter TAP (*transporter associated with antigen processing*) spezifisch in das Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert und schließlich mit Hilfe von Tapasin an MHC-Klasse-I-Moleküle gebunden. Einen Spezialfall der Ag-Prozessierung/-Präsentation stellt die *cross-presentation* (Kreuzpräsentation) dar (Bevan, 1976). Dabei präsentieren APZ Peptide von exogenen Ag auf MHC-Klasse-I-Komplexen. Zytotoxische CD8⁺ T-Zellen können somit aktiviert werden (*cross-priming*) und leisten dadurch einen wichtigen Beitrag bei der Bekämpfung von intrazellulären Erregern. Aber auch Tumorzellen können, durch die Präsentation von tumorspezifischen Ag auf MHC-Klasse-I-Molekülen, von aktivierten zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen abgetötet werden.

1.2.1.3 Reifung und Migration

Die im nicht-lymphoiden Gewebe vorkommenden DZ gehören zur Gruppe der unreifen DZ, da ihnen die Fähigkeit fehlt eine Immunantwort zu induzieren. Dagegen sind sie für die Aufnahme von Ag besonders geeignet und erfüllen somit eine Wächterfunktion.

Ist durch das Vorhandensein von z.B. Pathogenen im Gewebe eine Entzündungsreaktion präsent, so reifen die DZ. Dabei treten zahlreiche Veränderungen bei den Zellen auf. So entwickeln reife DZ zahlreiche lange, zytoplasmatische Fortsätze, Dendriten genannt. Diese erhöhen die Beweglichkeit und verbessern durch die Oberflächenvergrößerung die Interaktion mit T-Zellen. Außerdem verringert sich die Endozytoseaktivität als auch die Expression endozytotischer Rezeptoren (Garrett, Chen et al., 2000). Im Gegensatz dazu werden Proteine zur T-Zellinteraktion in reifen DZ verstärkt exprimiert. Dazu zählen die Mitglieder der B7-Familie (CD86, CD80, ICOS-L), der TNF-/TNF-Rezeptorfamilie (4-1BBL, CD70, OX40L) sowie von Chemokin-Rezeptoren (z. B. CCR7). Auch die Expression von Zytokinen wie z.B. IL-12 oder von MHC-Molekülen wird verstärkt (Banchereau und Steinman, 1998; Steinman und Banchereau, 2007). Ziel all dieser Veränderungen in den reifen DZ ist eine bestmögliche Interaktion mit T-Zellen und schließlich deren Aktivierung. Die T-Zellaktivierung durch DZ ist dabei jedoch nur ein notwendiger Zwischenschritt hin zur Einleitung der spezifischen T-Zellantwort. Sie wird wesentlich dadurch geprägt, welche Ag von welchen DZ identifiziert wurden. Die PRR sind dabei ein entscheidender Faktor. Die TLR-Rezeptorfamilie gehört zu den PRR und umfasst 13 TLR, welche von den einzelnen DZ-Subtypen unterschiedlich exprimiert werden. Murine cDZ exprimieren TLR1 bis TLR5 und TLR9 sowie je nach Subpopulation TLR7 oder TLR8, während pDZ nur TLR7 und TLR9 exprimieren (Hemmi und Akira, 2005). Dadurch ergibt sich eine spezifische Reifung der einzelnen DZ-Subtypen und schließlich eine auf das Ag abgestimmte Immunantwort. Neben körperfremden Ag (z.B. mikrobielle oder virale Ag) können auch endogene Faktoren wie CD154 (CD40L) DZ aktivieren (Caux, Massacrier et al., 1994).

Bei Ausbleiben einer Entzündung können Ag-spezifische T-Zellen ihren passenden Peptid-MHC-Komplex ohne ein adäquates, kostimulatorisches Signal präsentiert bekommen, da ein Teil der unreifen DZ permanent über die Lymphgefäße in die T-Zellareale der jeweiligen drainierenden Lymphknoten gelangen. Dies hat zur Folge, dass die T-Zellen deletiert, anerg oder regulatorische T-Zellen induziert werden (Bonifaz, Bonnyay et al., 2002; Steinman, Hawiger et al., 2003).

1.2.2 Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen

DZ sind besondere APZ, da nur wenige DZ und eine geringe Ag-Menge nötig sind, um T-Zellen zu stimulieren (eine DZ kann 100-3000 T-Zellen aktivieren; Banchereau und Steinman, 1998). Bei der T-Zellstimulation durch DZ werden neben den Effektor-T-Zellen auch T-Gedächtniszellen induziert. T-Gedächtniszellen unterteilen sich in zwei

Untergruppen: Die *central memory T cells* (T_{CM} Zellen) und die *effector memory T cells* (T_{EM} Zellen), welche jeweils $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zellen sein können (Sallusto und Lanzavecchia, 2001). Sie besitzen folgenden Phänotyp: T_{EM} Zellen sind $CD45RA^+CCR7^-$ und T_{CM} Zellen $CD45RA^+CCR7^+CD45RO^+$ und unterscheiden sich damit deutlich von naiven T-Zellen. T_{EM} Zellen besitzen die charakteristische Eigenschaft, bei erneutem Ag-Kontakt eine rasche Effektorfunktion zu zeigen. Dabei wird innerhalb kurzer Zeit die Produktion von IL-4, IL-5 und IFN- γ angeschaltet. T_{CM} Zellen dagegen fehlt die unmittelbare Effektorfunktion. Sie können dafür leichter aktiviert werden, da eine geringere Kostimulation notwendig ist (CD40-Ligand-Expression wird heraufreguliert). Erfolgt in den sekundären lymphoiden Organen die Restimulation so proliferieren und differenzieren sie zu Effektorzellen. T_{CM} Zellen sind langlebiger als T_{EM} Zellen.

1.2.2.1 $CD8^+$ T-Zell-vermittelte Immunantwort

Die $CD8^+$ T-Zellen werden als zytotoxische T-Zellen (ZTL) bezeichnet, da sie in Zielzellen den programmierten Zelltod (Apoptose) einleiten. Für ihre Aktivierung und eine effektive Immunantwort benötigen sie 3 Signale.

Signal 1 erhalten sie durch den Kontakt von CD8 und TZR mit dem passenden Peptid-MHC-Klasse I-Komplex auf der Oberfläche von APZ. Das Signal 2 besteht aus dem Kontakt der $CD8^+$ T-Zellen mit kostimulatorischen Molekülen der APZ, wie z.B. CD80 und CD86 (Bindung mit CD28 auf der ZTL). Das dritte Signal bilden die Zytokine IL-12 und IFN- α/β (Curtsinger und Mescher, 2010). Sie bewirken eine gesteigerte Proliferation sowie Effektorfunktion der $CD8^+$ T-Zellen und fördern das Entstehen von langlebigen Gedächtniszellen. Die aktivierten $CD8^+$ T-Zellen bilden nun verstärkt IL-2, was zu Proliferation der $CD8^+$ T-Zellen führt und scheiden vermehrt IFN- γ aus (Makrophagenaktivierung, Steigerung der MHC-Klasse I-Expression bei Gewebszellen; (Schroder, Hertzog et al., 2004)). Bei Kontakt mit der Zielzelle sezernieren aktivierte $CD8^+$ T-Zellen verschiedene Granzyme und Perforin. Perforin sorgt für die Einschleusung der Granzyme ins Zytosol der Zielzellen. Sobald die Granzyme im Zytosol sind, werden Caspasen aktiviert und die Apoptose tritt ein. Ein weiterer Apoptose-einleitender Prozess ist die Bindung von CD95L (auf der Zelloberfläche von $CD8^+$ T-Zellen) an CD95 auf der Zielzelle.

Fehlen die zur Aktivierung notwendigen Signale, so werden die $CD8^+$ T-Zellen ignorant (Fehlen von Signal 1 - Antigen) oder anerg (Fehlen von Signal 2 - Kostimulation). Anergie (inaktive) $CD8^+$ T-Zellen reagieren dann nicht mehr auf eine Aktivierung durch z.B. DZ. Dieser Prozess ist entscheidend, da somit die Toleranz gegen eigene

Gewebeantigene gewährleistet wird. Fehlt Signal 3 so entwickeln die CD8⁺ T-Zellen keine Effektorfunktionen (Curtsinger, Lins et al., 2003).

1.2.2.2 CD4⁺ T-Zell-vermittelte Immunantwort

CD4⁺ T-Zellen werden als T-Helferzellen bezeichnet, da ihre vorrangige Funktion die Aktivierung von anderen Immunzellen darstellt. Für ihre Aktivierung und Differenzierung benötigen sie 3 Signale (Kalinski, Hilkens et al., 1999). Signal 1 wird übermittelt durch die Bindung des Peptid-MHC-Klasse-II-Komplexes auf der DZ an den TZR der CD4⁺ T-Zelle. Signal 2 wird über kostimulatorische Moleküle (1.2.2.1) und Signal 3 über die von der DZ ausgeschütteten Zytokine vermittelt. Das 3. Signal legt die T-Helferzelle auf eine der 3 Untertypen fest: T_H1, T_H2 oder T_H17.

T_H1-Zellen werden überwiegend bei Anwesenheit von IFN- γ und IL-12 gebildet und bewirken vorrangig eine Verbesserung der zellulären Immunität (Mosmann und Coffman, 1989). Dies erfolgt durch die Ausschüttung eines speziellen Zytokincocktails (enthält z.B. IFN- γ , TNF- α und IL-2). Hierdurch werden vor allem Makrophagen, aber auch B-Zellen (Bildung von IgG2a) stimuliert. Dies führt zu einer verbesserten Immunantwort gegen Viren, intrazelluläre Bakterien und Parasiten. Die ausgeschütteten Zytokine besitzen auch eine proinflammatorische Wirkung und hemmen die T_H2-Immunantwort.

Die Bildung von T_H2-Zellen wird durch IL-4 begünstigt und von IFN- γ gehemmt. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Aktivierung von B-Zellen (Ak-Bildung - humorale Immunität). Dafür werden von T_H2-Zellen die Zytokine IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 sezerniert (Takatsu und Kariyone, 2003). Neben B-Zellen werden auch Mastzellen und Granulozyten angeregt. Die stark humoral ausgerichtete T_H2-Immunantwort richtet sich vor allem gegen extrazelluläre Pathogene (Parasiten, Bakterien). Durch diese Art der Zytokinausschüttung erfolgt auch eine Inhibierung der T_H1-Immunantwort (reziproke Hemmung). So hemmt z.B. IL-10 die Makrophagenaktivierung, ein Charakteristikum der T_H1-Immunantwort.

T_H17-Zellen werden von DZ durch IL-6/TGF- β -Bildung induziert und produzieren das charakteristische IL-17 sowie IL-21, IL-22 und IL-26. Ihr „Zytokinprofil“ ermöglicht eine Immunantwort gegen extrazelluläre bakterielle und Pilz-Infektionen. Die Ausschüttung von IL-17 bewirkt, dass Neutrophile zum Entzündungsort gelangen (de Jong, Suddason et al., 2010). Da T_H17-Zellen erst relativ kürzlich identifiziert wurden, ist vieles über ihre Funktion noch unbekannt. Es ist jedoch sicher, dass T_H17-assoziierte Zytokine an

einer Reihe von humanen Autoimmunerkrankungen und entzündlichen Erkrankungen (z.B. rheumatoide Arthritis) beteiligt sind (de Jong, Suddason et al., 2010).

Ein weiterer Typ von CD4⁺ T-Zellen sind die regulatorischen T-Zellen (T_{reg}-Zellen). Dieser jung erforschte Zelltyp ist durch die Expression von CD25 und Foxp3 (*forkhead box 3 protein*) gekennzeichnet und wird fortlaufend im Thymus generiert (von Boehmer, 2005). Sie üben einen hemmenden Einfluss auf die Immunantwort von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen durch z.B. die Sekretion von IL-10 und TGF-β aus und wirken regulierend auf die Selbsttoleranz. Eine Arbeit aus unserem Labor konnte die Beteiligung der DZ an der Homöostase von T_{reg}-Zellen zeigen (Suffner, Hochweller et al., 2010).

1.2.3 Induktion von Toleranz durch DZ

Nicht nur bei der Initiierung von Immunantworten spielen DZ eine große Rolle, sondern auch bei der Induktion und Bewahrung von T-Zell-Toleranz sowohl im Thymus (zentrale Toleranz) als auch im lymphatischen Gewebe (periphere Toleranz) (Brocker, Riedinger et al., 1997; Hawiger, Inaba et al., 2001; Lewis und Reizis, 2012). Kostimulation durch DZ (Signal 2) ist für die Aktivierung von T-Zellen essentiell. Unterbleibt die Kostimulation, wird bei Bindung von selbstreaktiven T-Zellen (Selbst-Ag-Präsentation von DZ) die T-Zell-Toleranz induziert, um den Schutz der körpereigenen Gewebe zu gewährleisten.

Dabei unterscheidet man zwei Mechanismen: Toleranz durch Deletion oder Toleranz durch Anergie (Kurts, Kosaka et al., 1997; Steinman, Hawiger et al., 2003). Bei der Toleranzinduktion durch (klonale) Deletion erfolgt eine Negativ-Selektion von autoreaktiven T-Zellen, mit hoher Affinität zu Selbstpeptid-MHC-Komplexen, durch DZ im Thymus (auch durch medulläre Thymusepithelzellen - mTEZ) und in den peripheren lymphatischen Organen. Der andere Toleranzmechanismus – Toleranz durch Anergie – ist gekennzeichnet durch ein Ausbleiben der Zytokinsynthese. Ohne Zytokine fehlen den T-Zellen die Reize zur Zellteilung und weiteren Differenzierung. Sie werden dadurch inaktiv.

Da die zentrale Toleranz nicht alle selbstreaktiven T-Zellen im Thymus depletiert (niedrigaffine T-Zellen entkommen der Deletion) ist das Vorhandensein der peripheren Toleranzmechanismen von großer Bedeutung (Bouneaud, Kourilsky et al., 2000). Die Wichtigkeit von peripherer Toleranz wird auch deutlich, wenn reife DZ z.B. Tumorzell-Ag oder Virus-Ag aufnehmen, da das zu einer parallelen Präsentation von Fremd- und

Selbst-Ag und schließlich der Initiierung einer Immunantwort führt (Berard, Blanco et al., 2000; Albert, Pearce et al., 1998). Dieser Fall macht deutlich, dass DZ eine Schlüsselposition bei der Initiierung von peripherer Toleranz einnehmen. Es wurde außerdem gezeigt, dass der Reifegrad der DZ von entscheidender Bedeutung ist (Legge, Gregg et al., 2002; Hawiger, Masilamani et al., 2004). So können unreife DZ bei CD8⁺ T-Zellen die Ausschüttung von Zytokinen verringern (werden anergisch), bei CD4⁺ T-Zellen die Deletion initiieren und T_{reg}-Zellen induzieren (Probst, Lagnel et al., 2003; Süss und Shortman, 1996; Yamazaki, Iyoda et al., 2003; Sakaguchi, 2000). DZ steuern diese Prozesse durch die Bildung/Sekretion von Zytokinen. So ist IL-10 z.B. für die Induktion von T_{reg}-Zellen notwendig und hemmt somit indirekt die Effektorfunktionen der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (Mahnke, Schmitt et al., 2002; Sakaguchi, 2000; Shevach, 2000).

1.3 Interaktion zwischen DZ und NK-Zellen

Wie bereits beschrieben, bildet die angeborene Immunabwehr einen ersten Schutzmechanismus gegen Krankheitserreger. Später setzen die Prozesse der erworbenen Immunantwort ein. Für eine optimale Immunreaktion ist eine abgestimmte, sich gegenseitig unterstützende Interaktion der beteiligten Zellen somit von großer Bedeutung. Eine enge Interaktion von DZ und NK-Zellen wurde in verschiedener Weise beobachtet (Cooper, Fehniger et al., 2004). So äußert sich der Einfluss der DZ auf NK-Zellen z.B. in der NK-Zellaktivierung, Stimulierung ihrer Zytokinproduktion und Proliferation, als auch der Apoptoseinduktion von NK-Zellen (Walzer, Dalod et al., 2005). Umgekehrt bewirken NK-Zellen eine DZ-Aktivierung (Reifung), die Lyse („*DC-editing*“) von nicht komplett gereiften DZ und erhöhen die Kreuzpräsentation von Ag durch DZ (Moretta, 2002). Die bidirektionale Kommunikation erfolgt über Zell-Zell-Kontakt und Zytokinausschüttung (Borg, Jalil et al., 2004; Della Chiesa, Romagnani et al., 2006).

Das Ergebnis der DZ-NK-Zellinteraktion beeinflusst also sowohl die angeborene als auch die adaptive Immunantwort.

1.4 Systeme zur Eliminierung von Immunzellen

Eine weitverbreitete Methodik in der biologischen Forschung nutzt das Ausschalten eines Gens/Proteins zur Untersuchung dessen (z.B. Knock-out Mutationen). Anhand der

auftretenden Veränderungen kann dann auf die Eigenschaften bzw. die Funktion(en) des Gens/Proteins geschlossen werden. Analog dazu kann die Depletion einer bestimmten Zellpopulation deren Rolle im Organismus aufklären.

Zur spezifischen Depletion von Zellen werden genetische als auch applikative Methoden verwendet. So existieren einige B-Zell-, T-Zell- und NK-Zell-defiziente Mausmodelle, wie z.B.: Prf^{Ko} (keine reifen T-, B-Zellen und keine zytotoxische NK-Zellaktivität), *NOD-scid*, $Rag1^{Ko}$ und $Rag2^{Ko}$ Mäuse (T-, B-Zell-defizient, *NOD-scid* Mäuse bilden im Alter T- und B-Zellen), *muMT* Mäuse (nahezu B-Zell-defizient) (Kagi, Ledermann et al., 1994; Shinkai, Rathbun et al., 1992; Mombaerts, Iacomini et al., 1992; Prochazka, Gaskins et al., 1992; Kitamura, Roes et al., 1991).

Es muss jedoch beachtet werden, dass die Depletion eines Zelltyps während der Embryonalentwicklung zu einem letalen Phänotyp führen kann. Dieses Problem kann durch die Wahl eines induzierbaren Modells umgangen werden.

Unter den applikativen Methoden ist das Verabreichen von depletierenden Ak eine etablierte Vorgehensweise. So können mit verschiedenen Ak z.B. $CD8^+$ T-, $CD4^+$ T-, NK- oder B-Zellen depletiert werden. Ein Beispiel dafür ist die Verwendung von anti-NK1.1-Ak zur Depletion von NK-Zellen. Die hohe Spezifität von Ak-Bindungen erlaubt eine gezielte Depletion des Zelltyps, sofern nur der gewünschte Zelltyp das Ziel-Ag trägt. Die Verfügbarkeit dieser spezifischen Ag ist ein entscheidendes Kriterium für die Wahl der Ak-vermittelten Depletion. Die vorhandenen anti-CD11c-Ak weisen jedoch keine depletierenden Eigenschaften auf, daher ist eine Depletion von DZ mittels anti-CD11c-Ak nur schlecht möglich.

Die Applikation von liposomalem Clodronat (Dichloromethylen-Bisphosphonat) ist eine gebräuchliche Methode APZ abzutöten. Nach der Aufnahme der Liposomen wird Clodronat durch lysosomale Phospholipasen freigesetzt und bei Erreichen einer bestimmten Konzentration stirbt die Zelle durch Apoptose. Doch ist dieser Prozess nicht DZ-spezifisch, sondern tötet vorrangig die phagozytierenden Makrophagen (Van Rooijen und Sanders, 1994; Zhang, Shlomchik et al., 2002).

Eine weitere Methode ist das Einbringen von zelltypspezifischen Transgenen, welche für Enzyme kodieren, wie Thymidinkinase (TK, oft Herpes simplex virus Typ 1-TK) oder Nitroreduktase, die einen Wirkstoff in seine zytotoxische Form umwandeln (Clark, Iwobi et al., 1997; Borrelli, Heyman et al., 1988). Beide Gene sind jedoch häufig vom „Transgen-Silencing“ betroffen (Palmiter, 2001). Im Falle der TK dienen Nukleosidanaloga wie Acyclovir oder 1-(2-deoxy-2-fluoro-13D-Arabinofuranosyl)-5-

Iodouracil (FIAU) als Substrate. Ihre toxischen Zwischenprodukte hemmen die DNA-Replikation und führen dadurch zum schnellen Zelltod. Ein entscheidender Nachteil besteht in der Abhängigkeit des TK-Systems von der Proliferation der Zielzellen. Eine Zellpopulation mit geringem „Turnover“ lässt sich somit nur ungenügend eliminieren. Zusätzlich ist die Zucht von TK-transgenen Mäusen kompliziert, da das TK-Gen oft nicht durch die männliche Keimbahn übermittelt wird (al-Shawi, Burke et al., 1991). Dagegen sind jedoch auch noch einige Vorteile aufzuführen, wie hohe Depletionsraten (etwa 90%), hohe Spezifität (z.B. Herpes simplex virus Typ 1-TK) und genaues Timing der Depletion (Heyman, Borrelli et al., 1989).

Da kein depletierender Ak für CD11c⁺-Zellen (alle DZ) vorhanden war, stellte ein Toxin-Depletionssystem die beste Möglichkeit zur DZ-Depletion dar.

1.4.1 „Suicide systems“

Eine in den 1970er Jahren entwickelte Methode nutzt sogenannte Immuntoxine, um Zellen bzw. Gewebe gezielt abzutöten (Barth, Winkler et al., 1997). Als primäres Anwendungsgebiet zielte die Entwicklung der Immuntoxine auf die Behandlung von Krebs durch die gezielte Eliminierung der Krebszellen. Immuntoxine sind Makromoleküle, welche aus zwei Komponenten bestehen. Ein Trägerbaustein (Ak, Zytokine oder lösliches Rezeptormolekül) ermöglicht die Bindung an die Zielzelle/-gewebe. Das Toxin (meist pflanzlich oder bakteriell; z.B.: Ricin, Diphtherietoxin (DT), *Pseudomonas* exotoxin) bildet die funktionale zweite Komponente.

Als Beispiel kann DT₃₉₀mGMCSF - ein Immuntoxin bestehend aus der N-terminalen Region von DT (Aminosäuren 1 bis 390) gekoppelt mit murinem „*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*“ (GMCSF) - genannt werden (Westcott, Abi-Habib et al., 2004). In diesem *in vivo*-Modell sind Kupffer-Zellen die Zielpopulation. Ein weiterer Vertreter der Immuntoxine ist DAB₄₈₆-IL-2 bzw. die verbesserte Variante DAB₃₈₉-IL-2 (Markenname ONTAK[®]) (Williams, Snider et al., 1990; Williams, Parker et al., 1987). Es besteht aus DT (Aminosäuren 1 bis 486 bzw. 389) und humanem IL-2, welches die Diphtherietoxin-Rezeptor (DTR)-Bindedomäne im DT ersetzt. Zellen mit IL-2-Rezeptor binden das Fusionsprotein und sterben aufgrund der Inhibierung der Proteinsynthese durch das DT-Fragment A (Kapitel 1.4.2).

ONTAK[®] oder Denileukin Diftitox wird in den USA als Medikament zur Behandlung von kutanem T-Zell-Lymphom genutzt. Neben einer Erhöhung der Überlebenszeit ohne Fortschreiten der Erkrankung (*Progression-Free Survival*) stellt sich auch eine

Verbesserung der Lebensqualität (*Quality of Life*) ein (Negro-Vilar, Prince et al., 2008; Duvic, Kuzel et al., 2002). Es muss jedoch festgestellt werden, dass zahlreiche schwere Nebenwirkungen möglich sind, wie z.B. Sehkraftverlust, systemische Kapillarlecksyndrom, Leberschäden und periphere Ödeme (Foss, 2001).

Demzufolge wird deutlich, dass Immuntoxine im Gegensatz zu monoklonalen Ak, welche die Zellen nach erfolgter Bindung durch Apoptoseinduktion, Ak-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (*antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) und komplementvermittelter Zytotoxizität (*complement-dependent cytotoxicity*, CDC) töten, besser für Patienten geeignet sind, deren Krebszellen Apoptose-resistent sind und deren Immunsystem keine ADCC oder CDC ausüben wird (Zhang, Zhang et al., 2006).

Eine weitere Alternative (bereits seit den 1980er Jahren) zur spezifischen Zelldepletion nutzt die toxische A-Untereinheit von DT (DT-A) in Kombination mit einer zellspezifischen Expression des DT-A. ROSA26-eGFP-DTA-Mäuse besitzen eine weit verbreitete Expression von *enhanced green fluorescent protein* (eGFP; Ivanova, Signore et al., 2005). Die DT-A-Transkription ist jedoch bei ihnen durch eine transkriptionale Stop-Sequenz blockiert. Erst eine Kreuzung mit Mäusen, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines zellspezifischen Promotors besitzen, entfernt das loxP-flankierte eGFP und die Stop-Sequenz. Die DT-A-Expression wird aktiviert und Cre-exprimierende Zellen werden spezifisch depletiert.

Ein weiteres Modell stellt die sogenannte tet-DTA-transgene Maus da. Sie exprimiert DT-A unter der Kontrolle des Tetrazyklin-Operators (tetO) und dem Zytomegalovirus-Promotor (Lee, Morley et al., 1998). Werden diese Tiere mit Mäusen gekreuzt, welche das *reverse tetracycline-controlled transactivator protein* oder das *tetracycline-controlled transactivator protein* in speziellen Zellpopulationen exprimieren, so kann die gewebespezifische DT-A-Expression im Nachwuchs mittels Tetrazyklin-Analog Doxzyklin induziert werden. Es ist somit in diesen doppeltransgenen Mäusen möglich, eine reversibel induzierbare Depletion von bestimmten Zellpopulationen zu erzielen.

1.4.2 Diphtherietoxin-Rezeptor basierendes Zelldepletionssystem

Eine weitere Methode zur spezifischen Eliminierung von Zellen besteht in einer gezielten Applikation von Toxinen in transgene Mäuse, deren zu depletierende Zellen den Toxinrezeptor exprimieren (mittels zellspezifischem Promotor). So wurde 2001 von Saito et al. DT zur konditionellen Depletion von genetisch modifizierten Leberzellen (Diphtherietoxin-Rezeptor⁺; DTR⁺) angewandt (Saito, Iwawaki et al., 2001).

DT wird von *Corynebacterium diphtheriae* als sekretorisches heterodimeres Protein produziert (Collier, 1975; Pappenheimer, 1977). Es besteht aus 2 Untereinheiten mit insgesamt 3 Domänen: Einer katalytischen (DT-A-Untereinheit), einer Transmembran- sowie Rezeptorbinde-Domäne (T+R Domäne = DT-B-Untereinheit) (Louie, Yang et al., 1997).

DT gelangt in die Zelle über die Bindung seiner B-Untereinheit mit der *EGF-like* Domäne des zellulären DTR (*heparin binding-EGF like growth factor precursor* = proHB-EGF) (Mitamura, Higashiyama et al., 1995; Naglich, Metherall et al., 1992).

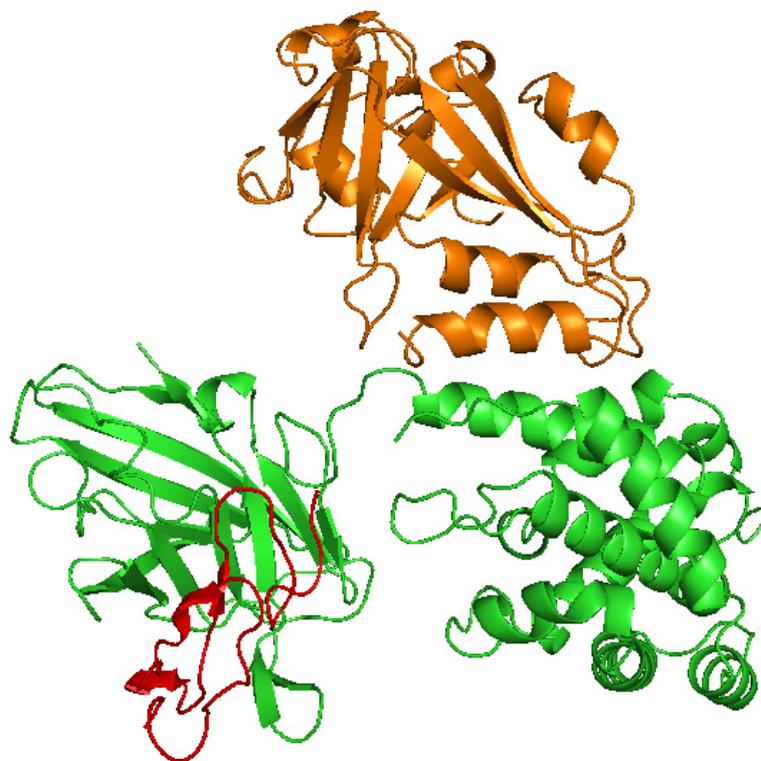


Abbildung 1.3: DT bindet DTR-Fragment in Bändermodell-Darstellung

Abgebildet ist die DT-A-Untereinheit (Orange), B-Untereinheit (Grün) und das DTR-Fragment (Rot). Der N-Terminus von DT besteht aus einer katalytischen Domäne (C-Domäne, A-Untereinheit). Er enthält 8 β -Faltblätter und 7 α -Helixes. Der C-Terminus enthält 2 Domänen (B-Untereinheit). Eine Transmembran Domäne (T-Domäne, links) ist aus 9 α -Helixes und die Rezeptor-Bindedomäne (R-Domäne, rechts) aus 10 β -Faltblättern aufgebaut. DT hat 4 Cysteinreste, die 2 internen Disulfid-Bindungen verknüpfen: C186–C201 und C461–C471 (Louie, Yang et al., 1997).

Nach der Endozytose wird die DT-A-Untereinheit aus den späten Endosomen in das Zytosol freigegeben. Dort katalysiert DT-A den Transfer von ADP-Ribose von NAD^+ an

einen modifizierten Histidinrest des Elongationsfaktors 2, was dessen Inaktivierung bewirkt (Moehring, Danley et al., 1984). Daraus resultiert eine Hemmung der Proteinsynthese und somit der Tod der Zelle. Bereits ein Molekül der A-Untereinheit stoppt aufgrund der katalytischen Funktion die Translation und verursacht somit den Zelltod (Yamaizumi, Mekada et al., 1978). Die hohe Toxizität von DT ist sowohl Vorteil als auch Nachteil, da nur kleine Mengen an DT angewandt werden müssen, aber eine eventuelle unerwünschte Expression in anderen Zellen zu deren Absterben führt.

DTR (proHB-EGF) gehört zur den Proteinen der EGF-Familie. Es ist ein Pro-Ligand (membranverankertes Protein), d.h. seine primäre Funktion wird durch die Abspaltung des Liganden (HB-EGF) durch Matrix-Metalloproteasen ausgelöst. ProHB-EGF hat verschiedene biologische Funktionen und ist z.B. involviert bei der Wundheilung, Herzentwicklung und Herzfunktion (Nanba und Higashiyama, 2004).

Die Abbildung 1.4 zeigt den Mechanismus der Depletion.

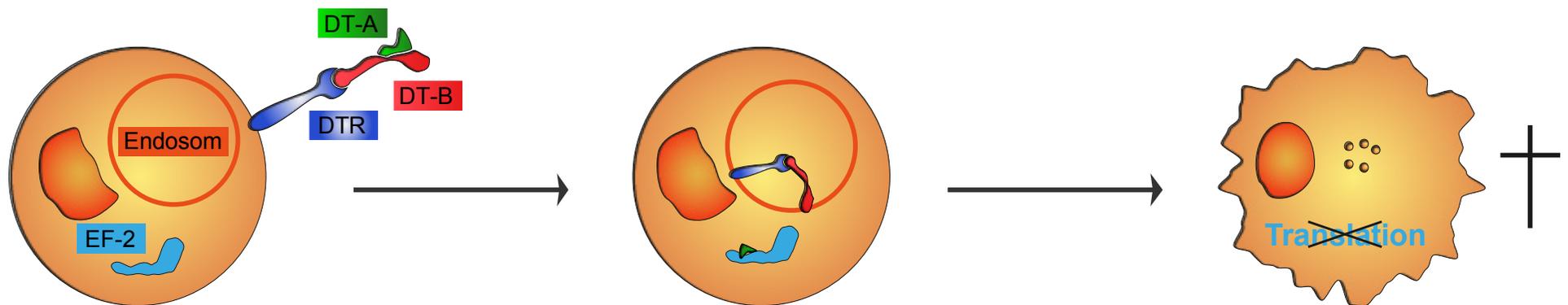


Abbildung 1.4: DT-DTR Zell-Depletionsmechanismus

DTR⁺ Zelle bindet die B-Untereinheit des DT über den DTR und bewirkt eine Internalisierung des Heterodimers. Die DT-A-Untereinheit katalysiert dann - nach Austritt aus dem Endosom - die Inaktivierung des Elongationsfaktors 2 (EF-2) über eine ADP-Ribosylierung. Ohne Translation stirbt die Zelle in kurzer Zeit ab.

Im Gegensatz zu menschlichen Zellen oder Affen-Zellen kann DT in Mauszellen nicht an den DTR binden, da dieser eine mindestens 10^5 -fach geringere Affinität für das DT besitzt (Pappenheimer, Harper et al., 1982). Die Ursache dafür sind drei Aminosäureänderungen in der extrazellulären *EGF-like* Domäne des murinen DTR, welche für die Bindung der B-Untereinheit des DT nötig sind (Mitamura, Umata et al., 1997). Insgesamt besitzt der humane DTR eine etwa 80%-ige Homologie zum murinen DTR (Mitamura, Higashiyama et al., 1995; Naglich, Metherall et al., 1992).

Die Halbwertszeit von DT beträgt etwa 4,5 h in Mäusen (Sung, Youle et al., 1990). Bei der Ermittlung der Halbwertszeit wurden 2 pmol DT iv. in Mäuse gespritzt. Dies entspricht, bei der verwendeten Menge von 8 ng/g KG DT, bei einer 20 g Maus einem 7500-fachen Überschuss. Dies ergab eine Pharmakokinetik mit 1/10 der ursprünglichen Plasma-DT Menge nach 4 h und 1/100 nach 15 h. 24 h nach der DT-Gabe ist noch ca. 1/850 im Plasma vorhanden.

In der hier vorliegenden Arbeit soll dieses System genutzt werden, um in einer transgenen Maus spezifisch DZ zu depletieren. Dazu wurde der menschliche DTR unter die Kontrolle eines DZ-spezifischen Promotors gestellt. Werden der Maus geringe DT-Mengen gespritzt, so binden nur die transgenen DZ, welche den humanen DTR exprimieren, DT und sterben, während andere DTR⁻ Zellen keinem DT-Einfluss unterliegen.

Die Vorteile dieses Systems sind:

- hohe Affinität des DT für den DTR (K_a für humanen DTR $3,6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ (Mitamura, Higashiyama et al., 1995)),
- auch ruhende, nicht proliferierende Zellen werden abgetötet, z.B. DZ.

Als DZ-spezifischer Promotor wurde CD11c genutzt. Bezüglich der Spezifität von CD11c für DZ ist zu bemerken, dass eine starke CD11c-Expression ausschließlich bei DZ zu beobachten ist. CD11c stellt den momentan spezifischsten Marker für DZ dar. Lediglich spezielle Subpopulationen von CD8^+ T-Lymphozyten (aktivierte intraepitheliale CD8^+ T-Zellen) und NK-Zellen sind als CD11c^+ -Zellen (*natural killer dendritic cells* - NKDC) beschrieben (Huleatt und Lefrancois, 1995; Pillarisetty, Katz et al., 2005; Werfel, Witter et al., 1991). CD11c ist das Integrin α_x Transmembranprotein, welches mit dem Integrin β_2 (CD18) assoziiert und den Komplementrezeptor 4 bildet. Die CD11c/CD18-Funktionen sind vielfältig. Es stellt einen Rezeptor für den inaktiven Komplementfaktor

3b dar und ist wichtig für die Adhäsion, Chemotaxis und Migration von weißen Blutkörperchen (Stewart, Thiel et al., 1995).

Um die Rolle von DZ in verschiedenen immunologischen Fragestellungen zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit dieses Zelldepletionssystem angewendet.

1.5 Herstellung von BAC-transgenen Mäusen

Jung und Kollegen veröffentlichten 2002 eine auf diesem DT-DTR-System basierende transgene Maus (CD11c.DTR) mit dem Ziel, CD11c⁺-DZ zu depletieren (Jung, Unutmaz et al., 2002). Sie setzten dabei einen klonierten CD11c-Promotor ein, der die Expression eines Fusionsprotein bestehend aus DTR aus der Grünen Meerkatze und eGFP ermöglicht. Dieses Mausmodell weist jedoch einige Nachteile auf, die uns zur Etablierung eines verbesserten Modells anregten. Da die Tiere nach wiederholten DT-Injektionen (nach 3 DT-Gaben) sterben, sind mittel- bzw. langfristige Experimente unter Ausschluss der DZ nicht durchführbar (Probst, Tschannen et al., 2005). Die aberrante Expression des konventionellen Transgens in lebensnotwendigen Zellen scheint der Grund für das Sterben der Tiere zu sein. Dies schränkt die Verwendung der CD11c.DTR-Mäuse stark ein.

Das hier verwendete Transgen-Konstrukt (Abbildung 1.5) enthält das Gen für den humanen DTR, einen Teil des Ovalbumin-(Ova)-gens (mit den immundominanten Peptiden OVA₂₅₇₋₂₆₄ (S8L) für MHC I und OVA₃₂₃₋₃₃₉ für MHC II; Aminosäuren 140-386) und das eGFP-Gen (*enhanced green fluorescent protein*).

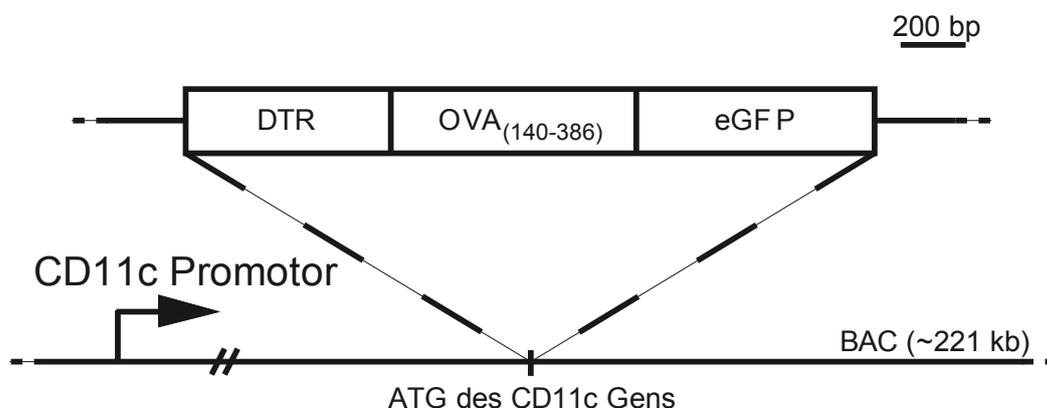


Abbildung 1.5: CD11c.DTROVAeGFP (CD11c.DOG)-Gen-Konstrukt

Das klonierte Transgen, bestehend aus humanem DTR, OVA₍₁₄₀₋₃₈₆₎ und eGFP, wurde mittels homologer Rekombination in ein BAC mit murinem CD11c-Promotor anstelle des CD11c-Gens integriert.

Die einzelnen Teile des Fusionsproteins sind über kurze Linker (2 Aminosäuren) miteinander verbunden. Das Einfügen des Ovalbumingens ermöglicht die Untersuchung der Toleranzinduktion gegen Ovalbumin. Die eGFP-Expression dient als Marker für die Transgen-Expression in den CD11c⁺-Zellen.

Das Konstrukt wurde mittels homologer Rekombination in ein BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) eingefügt, welches das Maus-CD11c-Gen mit Promotor enthält. Dadurch wird die Expression des Transgens unter dem endogenen Promotor erreicht. Da der Promotor durch lange Segmente der endogenen natürlichen DNA-Sequenz umgeben ist, wird wie bereits von Lee et al. gezeigt, eine zuverlässige Expression der Genkonstrukte erzielt und somit eine hohe Zellspezifität erreicht (Lee, Yu et al., 2001). Dies stellt die Methode mit der Erzeugung von zeitaufwendigen *knock-in* Mäusen gleich. Weitere Vorteile hierbei sind: (1) gewebespezifische Expression, da Gen-spezifische regulatorische Elemente im BAC enthalten sind und (2) mit dieser Technik muss nur eine geringe Anzahl an verschiedenen transgenen Linien erzeugt werden, da in 20-70 % der Linien die Integration des intakten BAC erfolgt. Eine schnellere Etablierung des Mausmodells ist somit möglich.

1.6 Ziele dieser Arbeit

Die von Dr. Steffen Jung mit konventioneller transgener Technologie hergestellten CD11c.DTR-Mäuse sterben schon nach 3 DT-Injektionen. Daher wurde in unserem Labor ein neues verbessertes Tiermodell zum Studium der DZ-Funktionen initiiert.

Das Ziel der Doktorarbeit war es, das neue BAC transgene CD11c.DOG-Mausmodell zunächst einer detaillierten Charakterisierung zu unterziehen. Dies beinhaltete den Nachweis der Transgenexpression in den verschiedenen, erhaltenen Linien und die Überprüfung der Funktionalität der Fusionsproteinbestandteile. Weitergehend sollte ein potentiell toxischer Einfluss von DT auf die Mäuse, hinsichtlich einer wiederholten, längeren DT-Gabe untersucht werden. Aufgrund des stark verbreiteten Vorkommen der DZ sollten die Depletionsergebnisse in den verschiedenen Organen (Milz, Lymphknoten, Knochenmark und Thymus, aber auch in den nicht lymphoiden Organen) analysiert werden. Auch die Depletionseffizienz der verschiedenen DZ-Subpopulationen sollte kontrolliert werden, um die „Qualität“ des Mausmodells in dieser Hinsicht zu dokumentieren. Eine Kinetik der DZ-Depletion und Titration des DT zur Bestimmung der optimalen Depletionsparameter (bezüglich Menge und Zeitpunkt der DT-Injektionen) vervollständigen die Analyse des Tiermodells. Weiterhin sollte der

mögliche Einfluss der DT-Injektion auf andere Leukozytenpopulationen untersucht werden, um unerwünschte Nebeneffekte auf diese Zellen auszuschließen. Das im BAC-Konstrukt integrierte Ovalbuminfragment ist für die Analyse der Toleranz von Bedeutung.

Nach der Charakterisierung des Mausmodells sollten Experimente zur Untersuchung der NK-DZ Interaktion stattfinden. Hierbei war es von Interesse, ob und wie DZ die Aktivierung von NK-Zellen beeinflussen.

Außerdem sollten Experimente zur Rolle der DZ bei der Basisaktivierung von T-Zellen als auch zum Mechanismus der Homöostase von DZ eingeleitet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Bezugsquellen

2.1.1.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien von den Firmen Roche (Mannheim), Sigma-Aldrich/Fluka (Taufkirchen), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Invitrogen (Eggenstein), Becton-Dickenson (BD) Biosciences (Heidelberg) oder Roth (Karlsruhe) in Analysequalität bezogen.

2.1.1.2 Einmalartikel

Die Plastikartikel für Zellkultur und molekularbiologischen Arbeiten wurden von den Firmen Greiner (Frickenhausen), Starlab (Hamburg), Falcon (BD Biosciences, Heidelberg), Eppendorf (Hamburg), Nalgene (Langenselbold), Gilson (Villiers le Bel, Frankreich), Nunc (Wiesbaden) und TPP (über Firma Renner, Dannstadt) bezogen.

2.1.2 Verwendete Kits

Für intrazelluläre Färbungen wurde der BD Cytotfix/Cytoperm™ Plus (incl. GolgiStop™) Kit (BD Bioscience, Heidelberg), für die Präparation von Plasmid-DNA der HiSpeed Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) und für die Detektion der Western-Blotsignale der SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate Kit (Pierce Perbio Science/Thermo Fisher Scientific, Bonn) verwendet.

2.1.3 Geräte

Tabelle 2.1: Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Axiophot 2 Mikroskop plus AxioCam Digitalkamera	Carl Zeiss (Oberkochen)
Brutschrank 3029	Forma Scientific/Thermo Fisher Scientific (Bonn)
Elektrophoresekammern Easy Cast	MWG Biotech (Ebersberg)
Eismaschine Wessamat	Zugck (Leimen)
FACScan/FACS-Calibur/FACSCanto II	Becton Dickinson (Heidelberg)
Flüssigstickstoff-Lagerbehälter	Messer Griesheim (Düsseldorf)
Kaltlichtlampe KL 1500-Z	Schott (Göttingen)
Kryostat Leica CM30505	Leica (Nußloch)
Kühlzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus (Osterode)
Lumi-Imager	Boehringer Mannheim Diagnostics/Roche (Mannheim)
Magnetrührer, Heizplatte MR 3002	Heidolph (Schwabach)
MicroBeta ² Plate Counter	Perkin Elmer (Rodgau)
Mikroskop	Olympus (Hamburg)
Neubauer Zählkammer	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
PCR-Block Peltier Thermal Cycler 200	MJ Research Inc. (Watertown, USA)
pH-Meter 761 Calimetric	Knick (Berlin)
Photometer Ultraspec 2000	Amersham Pharmacia Biotech/ GE Healthcare Europe (München)
Photometer Victor 1420	Perkin Elmer (Rodgau)
Schüttelinkubator Incubator Shaker 6725	New Brunswick Scientific, Eppendorf Vertrieb Deutschland (Nürtingen)
Schüttel-Wasserbad	Köttermann (Hänigsen)
Schüttler GFL 3015	Omnilab (Bremen)
Spannungsgeräte Biometra P25	Biotron (Göttingen)
Sterilbank Biogard Hood	Baker Company Inc. (Maine, USA)
Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus (Osterode)
Tom Tec Harvester	Zinsser Analytic (Frankfurt)
UV-Flächenstrahler	Konrad Bender (Wiesloch)
Vakuufofen	Heraeus (Osterode)
Waagen	Satorius (Göttingen) Mettler-Toledo (Giessen)
Zentrifuge Minifuge 2	Heraeus Christ (Osterode)
Zentrifuge Omnifuge 2.0 S	Heraeus Sepatech (Osterode)
Zentrifuge TJ-6	Beckman Instruments (München)

2.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 2.2: Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Bestandteile
Laufpuffer SDS-PAGE	25 mM Tris; pH 8,3 192 mM Glycin 0,1 % SDS (w/v)
Trenngel (10 %)	10 % (v/v) Rotiphorese 0,375 M Tris; pH 8,8 1 % SDS (w/v) 1 % APS (w/v) 0,04 % TEMED (v/v)
Sammelgel (5 %)	5 % (v/v) Rotiphorese 125 mM Tris; pH 6,8 0,1 % SDS (w/v) 0,1 % APS (w/v) 0,01 % TEMED (v/v)
Lysepuffer	2 % SDS (w/v) 60 mM Tris pH 6,8 100 mM DTT 50 U/ml DNase
6x SDS-Probenpuffer	62,5 mM Tris; pH 6,8 20 % Glycerin 2 % SDS (w/v) 714 mM β -Mercaptoethanol 0,025 % Bromphenolblau (w/v)
PBS/Tween	0,05 % (v/v) Tween20 in PBS; pH 7,2
Blockpuffer	5 % (w/v) Milchpulver in PBS/Tween
konz. Anodenpuffer (pH 10,4)	300 mM Tris
Anodenpuffer (pH 10,4)	25 mM Tris
Kathodenpuffer (pH 9,4)	25 mM Tris 40 mM 6-Amino-Caprinsäure
FACS-Puffer	DPBS 3 % FKS 0,1 % NaN ₃
Block-FACS-Puffer	DPBS 5 % Venimmun (poly Ig-Lösung) 3 % FKS 0,1 % NaN ₃

2.1.5 Viren

AdOVA rekombinanter Adenovirus Typ 5, der Ovalbumin exprimiert (freundlicherweise von Andreas Limmer, IMMEI Bonn, zur Verfügung gestellt; (Wingender, Garbi et al., 2006)).

2.1.6 Bakterienstämme

XL1-blue E. coli K12, recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr)]; Stratagene, Heidelberg.

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte bei 37 °C.

2.1.6.1 Medien, Platten und Antibiotikum für Bakterien

LB-Medium	1% (w/v) Bactotrypton (Difco)
(Luria Bertani)	0,5% (w/v) Hefeextrakt (Difco)
	1% (w/v) NaCl mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt; autoklaviert
LB-Platten	LB-Medium sowie 1,5% (w/v) Agar (Invitrogen)

Als Antibiotikum zur Selektion der Transformanten wurde Ampicillin mit einer Endkonzentration von 50 µg/ml verwendet.

2.1.7 Zelllinien

Die Zelllinie RMA (murines T-Zell-Lymphom) wurde erstmalig von Ljunggren und Karre beschrieben und stammt aus dem mit Rauscher-Leukämie Virus-induzierten T-Zell Lymphom RBL-5 (C57BL/6 – H-2^b-Hintergrund) ab (Ljunggren und Karre, 1985). RMA-Zellen wachsen in Suspension mit RPMI-Vollmedium.

Die generierte Zelllinie RMA.DOG entstand durch Transfektion von RMA-Zellen mit dem pCMV.DOG-Plasmid (von Prof. Dr. Garbi zur Verfügung gestellt) und einem neo-Plasmid (enthält ein *neo* Gen für die G418 Resistenz, von G. Küblbeck zur Verfügung gestellt). RMA.DOG-Zellen wurden mit 0,5 mg/ml G418 in RPMI-Vollmedium kultiviert und können durch ihre eGFP-Expression mittels FACS sortiert werden. Durch Inkubation mit Diphtherietoxin (DT) sterben diese Zellen ab (ab 10⁻¹¹ M nach 24h).

2.1.8 Medien und DPBS

D-PBS (Dulbecco's phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Invitrogen)

Bestandteile: 0,1 g/l CaCl_2 ; 0,2 g/l KCl; 0,2 g/l KH_2PO_4 ; 0,049 g/l MgCl_2 ; 8,0 g/l NaCl; 1,15 g/l Na_2HPO_4

Für die Zusammensetzung von DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Invitrogen) und RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640-Medium (Invitrogen) siehe Tabelle 2.3.

BMDC-Medium (*bone marrow-derived dendritic cells*) enthält RPMI 1640, 10 % filtriertes fötales Kälberserum (FKS), 10 % (v/v) filtrierten F1/16 Überstand (als Quelle für GM-CSF, zur Verfügung gestellt von Martin Wühl, DKFZ), 2 mM Glutamine, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin und 0,1 mM 2-Mercaptoethanol.

Tabelle 2.3: DMEM- und RPMI 1640-Medium

Komponenten	DMEM		RPMI 1640	
	Konzentration (mg/L)	Molarität (mM)	Konzentration (mg/L)	Molarität (mM)
Aminosäuren				
Glycin	30	0,4	10	0,133
L-Arginin			200	1,15
L-Arginin-HCl	84	0,398		
L-Asparagin			50	0,379
L-Asparaginsäure			20	0,15
L-Cystin-2HCl	63	0,201	65	0,208
L-Glutaminsäure			20	0,136
L-Glutamin	584	4	300	2,05
L-Histidin			15	0,0968
L-Histidin-HClxH ₂ O	42	0,2		
L-Hydroxyprolin			20	0,153
L-Isoleucin	105	0,802	50	0,382
L-Leucin	105	0,802	50	0,382
L-Lysin-HCl	146	0,798	40	0,274
L-Methionin	30	0,201	15	0,101
L-Phenylalanin	66	0,4	15	0,0909
L-Prolin			20	0,174
L-Serin	42	0,4	30	0,286
L-Threonin	95	0,798	20	0,168
L-Tryptophan	16	0,0784	5	0,0245
L-Tyrosin-Na ₂ x2 H ₂ O	104	0,398	29	0,111
L-Valin	94	0,803	20	0,171
Vitamine				
Biotin			0,2	0,00082
Cholinchlorid	4	0,0286	3	0,0214
D-Calciumpantothenat	4	0,00839	0,25	0,000524
Folsäure	4	0,00907	1	0,00227
i-Inositol	39485	0,04	35	0,194
Niacinamid	4	0,0328	1	0,0082
para-Aminobenzoessäure			1	0,0073
Pyridoxin-HCl	4	0,0196	1	0,00485
Riboflavin	0,4	0,00106	0,2	0,000532
Thiamin-HCl	4	0,0119	1	0,00297
Vitamin B12			0,005	0,0000037
anorganische Salze				
Ca(NO ₃) ₂ x4 H ₂ O			100	0,424

CaCl ₂ (wasserfrei)	200	1,8		
Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	0,1	0,000248		
MgSO ₄ (wasserfrei)	97,67	0,814	48,84	0,407
KCl	400	5,33	400	5,33
NaCl	6400	110,34	6000	103,45
Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei)			800	5,63
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	125	0,906		
andere Komponenten				
D-Glukose (Dextrose)	1000	5,56	2000	11,11
Glutathion (reduziert)			1	0,00326
Phenolrot	15	0,0399	5	0,0133
Na-Pyruvat	110	1		
ergänzende Zusätze				
Fötale Kälberserum		10%		10%
Penicillin/Streptomycin		100 U/ml		100 U/ml
Glutamin		2		2
β-Mercaptoethanol				0,1

Die Grundmedien wurden durch die ergänzenden Zusätze verfeinert (Tabelle 2.3). Bei Fötalem Kälberserum (FKS) musste vor Gebrauch eine Erhitzung für ca. 45 min bei 56 °C vorgenommen werden, um die enthaltenen Komplementfaktoren zu inaktivieren. Das im Grundmedium enthaltene L-Glutamin ist instabil und musste daher dem Vollmedium nach 2 Wochen erneut zugegeben werden.

2.1.9 Mauslinien

Alle Mäuse wurden in den Tierställen des DKFZ in Heidelberg, bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 h gehalten und hatten *ad libitum* Zugang zu Futter und Trinkwasser.

OT-I-Mäuse exprimieren einen transgenen TZR Vα2 und Vβ5, der H-2K^b zusammen mit dem Ovalbumin-Peptid 257-264 (SIINFEKL) erkennt. Bei Thy1.1 handelt es sich um ein Allel des T-Zellmarkers CD90 (Thy1). Durch das Thy1.1-Allel können T-Zellen einer Spendermaus (hier Thy1.1) von denen einer Empfängermaus (Thy1.2 bei C57BL/6-Mäusen) unterschieden werden.

Bei den OT-II-Mäusen handelt es sich um einen Mausstamm auf C57BL/6-Hintergrund, der einen transgenen TZR Vα2 und Vβ5 exprimiert, welcher I-A^b zusammen mit dem Ovalbumin-Peptid 323-339 (ISQAVHAAHAEINEAGR) erkennt. OT-II-Mäuse sind heterozygot für Thy1.1. OT-I- und OT-II-Mäuse wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Thomas Schüler (Otto-von-Guericke Universität, Magdeburg) zur Verfügung gestellt.

Die CD11c.DTR-Mäuse tragen einen transgenen Diphtherie-Toxin-Rezeptor der Grünen Meerkatze unter der Kontrolle eines klonierten CD11c-Promotors der Maus (Jung, Unutmaz et al., 2002). Durch das Spritzen von DT werden in diesen Mäusen CD11c⁺-DZ spezifisch depletiert.

Tpn^{-/-}-Mäuse enthalten eine Knock-out-Mutation (Neomycin-Resistenz-Gen im Exon 4) im Tapasin-Gen. Daher präsentieren die Zellen weniger MHC I auf ihrer Oberfläche (bei Milzzellen ~90% weniger) und sind somit ein Angriffsziel der Natürlichen Killer-Zellen (NK).

Tabelle 2.4: Mauslinien

Linienname	Linienkode	Referenz	genet. Hintergr und	Linienart
C57BL/6	C57BL/6	Dr. C.C. Little, Jackson Laboratory	H-2 ^b	Inzuchtlinie
C57BL/6J-Tg(TcraTcrb)1100Mjb/J/Thy1a	OT-I (Thy1.1)	OT-I (Hogquist, Jameson et al., 1994); Thy1 (Trowbridge und Mazauskas, 1976)	H-2 ^b	transgene Linie
	OT-IxCD11c.DOG		H-2 ^b	transgene Linie
	OT-IxRag1KO		H-2 ^b	transgene Linie
	OT-IxCD11c.DOGx Rag1KO		H-2 ^b	transgene Linie
C57BL/6J-Tg(TcraTcrb)425Cbn/Thy1a	OT-II (Thy1.1x1.2)	(Barnden, Allison et al., 1998), (Trowbridge und Mazauskas, 1976)	H-2 ^b	transgene Linie
	CD11c.DOG	(Hochweller, Striegler et al., 2008)	H-2 ^b	transgene Linie
	CD11c.DOGx Rag2KO		H-2 ^b	transgene Linie
B6.FVB-Tg(Itgax-DTR/EGFP)57Lan/J	CD11c.DTR	(Jung, Unutmaz et al., 2002)	H-2 ^b	transgene Linie
	Tpn ^{-/-}	(Garbi, Tan et al., 2000)	H-2 ^b	Knock-out Linie

Alle Mauslinien stammen aus eigener Züchtung.

2.1.10 Antikörper

Tabelle 2.5: Primärantikörper

Ak	Spezies	Isotyp	Klon	Verdünnung	Bezug
α CD3e	Hamster	IgG1, κ	145-2C11	1:100	BD
α CD3e	Hamster	IgG2, κ	500A2	1:100	BD
α CD4	Ratte	IgG2b, κ	GK1.5	1:100	BD
α CD4	Ratte	IgG2a, κ	RM4-5	1:100	BD
α CD8a	Ratte	IgG2a, κ	53-6.7	1:100	BD
α CD11b	Ratte	IgG2b, κ	M1/70	1:100	BD
α CD11c	Hamster	IgG1, λ	HL3	1:100	BD
α CD11c	Hamster	IgG	N418	1:100	Natutec
α CD19	Ratte	IgG2a, κ	1D3	1:100	BD
α CD25	Ratte	IgG1, κ	OX-39	1:100	BD
α CD25	Ratte	IgG1, λ	PC61	1:100	BD
α CD40	Ratte	IgG2a, κ	3/23	1:100	BD
α CD45RA	Ratte	IgG2b, κ	14.8	1:100	BD
α CD45 R	Ratte	IgG2a, κ	RA3-6B2	1:100	BD
α CD45.1	Maus	IgG2a, κ	A20	1:100	BD
α CD45.2	Maus	IgG2a, κ	104	1:100	BD
α CD62L	Ratte	IgG2a, κ	Mel-14	1:100	BD
α CD69	Hamster	IgG1, λ	H1.2F3	1:100	BD
α CD80	Hamster	IgG2, κ	16-10A1	1:50	BD
α CD86	Ratte	IgG2a, κ	GL1	1:100	BD
α CD90.1	Maus	IgG1, κ	OX-7	1:400	BD
α CD90.2	Ratte	IgG2b, κ	30-H12	1:400	BD
α CD90.2	Ratte	IgG2a, κ	53-2.1	1:400	BD
α hHB-EGF (α hDTR)	Ziege	IgG	polyklonal	vers.	R&D Systems
α F4/80	Ratte	IgG2a, κ	6F12	1:100	BD
α F4/80	Ratte	IgG2b	CI:A3-1	1:100	Caltag
α Foxp3	Ratte	IgG2a, κ	FJK-16a	1:100	NatuTec
α H-2 K ^b :SIINFEKL	Maus	IgG1	25D1-16	1:100	Arbeitsgruppe Hämmerling
α I-A/ α I-E	Ratte	IgG2a, κ	2G9	1:100	BD
α I-A/ α I-E	Ratte	IgG2b, κ	M5/114.15.2	1:200	BD
α I-A ^b	Maus	IgG2a, κ	KH74	1:100	BD
α IFN- γ	Ratte	IgG1	XMG1.2	1:50	BD
α Ly6G+Ly6C (Gr-1)	Ratte	IgG2b	RB6-8C5	1:100	BD

α PDCA-1	Ratte	IgG2b	JF05-1C2.4.1	1:20	Miltenyi Biotec
α NK-1.1	Maus	IgG2a, κ	PK136	1:100	BD
α H-2 K ^b	Maus	IgG2b, κ	Y-3	1:500	Arbeitsgruppe Hämmerling
α TNF	Ratte	IgG1	MP6-XT22	1:100	BD
α TCR V α 2	Ratte	IgG2a, λ	B20.1	1:100	BD
α TCR V β 5.1,5.2	Maus	IgG1, κ	MR9-4	1:100	BD

Die aufgeführten Primär- und Isotyp-Antikörper (Tabelle 2.5 bzw. Tabelle 2.6) wurden für die Durchflusszytometrie als Biotin- oder Fluorochrom-Konjugate (FITC, PE, PerCP, PerCP-Cy5.5, APC, PE-Cy7, APC-Cy7 oder APC-Alexa Fluor[®] 750) verwendet.

Tabelle 2.6: Isotyp-Kontrollantikörper

Isotyp	Spezies	Klon	Bezug
IgG1, κ	Hamster	G235-2356	BD
IgG1, κ	Hamster	A19-3	BD
IgG1, κ	Ratte	R3-34	BD
IgG2, λ	Hamster	B81-3	BD
IgG2a, κ	Maus		G. Moldenhauer, DKFZ
IgG2a, κ	Maus	G155-178	BD
IgG2a, κ	Ratte	R35-95	BD
IgG2b	Maus		Dianova
IgG2b, κ	Ratte	A95-1	BD

Die Verdünnung (Konzentration) der Isotyp-Kontrollantikörper entspricht der Verdünnung der komplementären Ak mit gleichem Fluorochrom.

Tabelle 2.7: Sekundärkonjugate

Konjugatkomplex	Verdünnung	Konzentration	Bezug
SA:Alexa Fluor [®] 488	1:100	1 mg/ml	Invitrogen
SA:PE	1:200	0,5 mg/ml	BD
SA:PE-Cy7	1:100	0,2 mg/ml	BD
SA:PerCP	1:100	0,2 mg/ml	BD
SA:PerCP-Cy5.5	1:100	0,2 mg/ml	BD
SA:Alexa Fluor [®] 647	1:100	1 mg/ml	Invitrogen
SA:APC	1:100	0,2 mg/ml	BD
SA:APC-Alexa Fluor [®] 750	1:100	0,1 mg/ml	Invitrogen
SA:APC-Cy7	1:100	0,2 mg/ml	BD

2.1.11 Peptide

Die verwendeten Peptide wurden von Dr. R. Pipkorn (DKFZ, Heidelberg) synthetisiert, über HPLC aufgereinigt und anschließend per Massenspektrometrie überprüft.

Tabelle 2.8: Peptide

Name	Länge	Sequenz 5' → 3'	MHC-Restriktion
OVA ₂₅₇₋₂₆₄ (S8L)	8-mer	SIINFEKL	MHC I
OVA ₃₂₃₋₃₃₉	17-mer	ISQAVHAAHAEINEAGR	MHC II
TagIV ₄₀₄₋₄₁₁	8-mer	VVYDFLKC	MHC I

2.1.12 PCR-Primer

Tabelle 2.9: PCR-Primer

Name	Länge	Sequenz 5' → 3'	PCR-Produkt	T _m
OVA1	22-mer	AACCTGTGCAGATGATGTACCA	499 bp	60 °C
OVA2	22-mer	GCGATGTGCTTGATACAGAAGA		
DOG1	20-mer	GGTGGTGTCTGAAGCTCTTTC	635 bp	60 °C
DOG2	20-mer	TGATGAGCTCTCTGGCTTGA		
β ₂ m1	22-mer	CACCGGAGAATGGGAAGCCGAA	297 bp	60 °C
β ₂ m2	22-mer	TCCACACAGATGGAGCGTCCAG		
DTR1	21-mer	GCCACCATGAAGCTGCTGCCG	633 bp	54–60 °C
DTR2	21-mer	TCAGTGGGAATTAGTCATGCC		

2.1.13 Phosphothioat-stabilisiertes Oligodesoxynukleotid

CpG-Oligodesoxynukleotid 1668 (CpG-ODN 1668):

20-mer 5' TCCAT**GACGTT**CCTGATGCT 3' (MWG Biotech, Ebersberg)

Das immunstimulatorische Motiv ist fett hervorgehoben (Krieg, Yi et al., 1995).

2.1.14 Datenbanken/Software

Datenbankrecherchen (Sequenzsuche und -vergleiche, Literatursuche) wurden mit Hilfe des Internetservice des National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt. Sequenzanalysen, Primerdesign, DNA-Vergleiche und Proteinsequenzanalysen erfolgten mit dem Programmpaket

DNASar/Lasergene 4. Fotos wurden mit der Carl Zeiss LSM-Image-Software (Carl Zeiss, Oberkochen) und Adobe Photoshop CS3 (Adobe) bearbeitet. Abbildungen wurden mit dem Programm Adobe Illustrator CS3 erstellt. Daten wurden mit den Programmen SigmaPlot 10 (Systat Software, Erkrath) und Excel (Microsoft) verarbeitet.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Transformation von *E.coli*

Bei der Transformation wurden 100 µl der hitzekompetenten *E. coli* XL1-blue im Eisbad aufgetaut und mit maximal 5 µl der Plasmid-DNA (10 ng sind ausreichend) gemischt. Nach 30 min auf Eis wurde der Ansatz für 2 Min bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt und noch 2 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit 500 µl antibiotikafreiem LB-Medium gemischt und eine Stunde im Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 250 µl der Bakteriensuspension auf entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert.

2.2.2 Plasmid-Präparation

Für eine „Maxi“-Präparation an Plasmid-DNA wurde 150 ml Selektiv-LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und ü/N im Schüttelinkubator bei 37 °C in einem 500 ml Erlenmeyerkolben inkubiert. Zur Plasmidpräparation wurde das HiSpeed Plasmid Maxi Kit von Qiagen verwendet. Die Bakterienkultur wurde abzentrifugiert (6000 U/min, 15 Min, 4 °C) und das Bakterienpellet in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 10 ml Puffer P2 wurde das Bakterienpellet durch Invertieren gemischt und anschließend für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Weitere 10 ml Puffer P3 wurden hinzugefügt, das Reaktionsgefäß durch Invertieren gemischt, auf eine QIAfilter-Spritze gegeben und 10 min bei RT inkubiert. Inzwischen wurde die HiSpeed Maxi Säule mit 10 ml QBT-Puffer equilibriert. Die QIAfilter-Spritze wurde dann mittels Stempel auf die HiSpeed Maxi Säule entleert und nachdem das Lysat über die Säule gelaufen war, wurde mit 60 ml QC-Puffer gewaschen. Nun wurde mit 10 ml QF-Puffer in ein frisches 50 ml-Reaktionsgefäß eluiert. Durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol (RT) wurde die eluierte DNA gefällt (Inkubation bei RT für 5 min). Während dieser Zeit wurde an eine 30 ml-Spritze das QIAprecipitator Maxi Modul angesteckt und der Stempel entfernt. Die Lösung wurde in die Spritze überführt und durch das QIAprecipitator Maxi Modul langsam und kontinuierlich gedrückt. Die im

QIAprecipitator Maxi Modul angereicherte DNA wurde mit 2 ml kaltem 70 %-igem Ethanol gewaschen und mittels Luftstrom getrocknet. Das QIAprecipitator Maxi Modul wurde an eine 5 ml-Spritze angeschlossen und die DNA mit 1 ml TE Puffer in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß eluiert. Nun wurde das Eluat erneut über das QIAprecipitator Maxi Modul gegeben (dadurch wurde eine höhere Ausbeute erreicht).

Die Konzentrationsbestimmung wurde spektroskopisch bei 260 nm durchgeführt (Absorptionsmaximum von DNA und RNA liegt bei 260 nm). Die Kontamination mit Proteinen lässt sich durch den Quotienten der Absorption bei 260 nm/280 nm ermitteln (Werte unter 1,8 gelten als gering verunreinigt). Die Verdünnung der Probe sollte einen Absorptionswert bei 260 nm von 0,1 – 1,5 ergeben, da in diesem Bereich die Konzentration der Nucleinsäuren proportional der Absorption ist. Die Nucleinsäurekonzentration wurde mit folgender Formel berechnet:

Konzentration [ng/ml] = A_{260} x Faktor des Nucleinsäuretyps x Verdünnungsfaktor

Die Faktoren sind: 50 ng/µl für dsDNA, 33 ng/µl für ssDNA und 40 ng/µl für RNA.

2.2.3 Isolierung von DNA aus der Schwanzspitze von Mäusen

Die zur Polymerase-Ketten-Reaktion-Analyse (PCR) benötigte genomische DNA wurde aus einer etwa 1 mm langen Mäuseschwanzspitze gewonnen (abgeändertes Protokoll von (Laird, Zijderveld et al., 1991)). Das Gewebe wurde in 20 µl Proteinase K-Puffer (50 mM Tris pH 8,0; 20 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % SDS, 2 mg/ml Proteinase K) aufgenommen und für 2 - 3 h bei 56 °C schüttelnd inkubiert. Stündlich und am Ende wurde die Probe kurz abzentrifugiert (4000 U/min, 10 Sek.) und 300 µl ddH₂O zugegeben. Durch Kochen der Probe für 1 min. wurde die Proteinase K inaktiviert. Sofort danach wurden die Reaktionsgefäße auf Eis platziert und im abgekühlten Zustand kurz bei 4000 U/min zentrifugiert. Für 50 µl PCR-Analysen wurden 3 µl als Template-DNA verwendet.

2.2.4 PCR

Mit Hilfe der PCR kann eine spezifische Sequenz eines DNA-Doppelstranges (Matrize) *in vitro* vervielfältigt werden. Einsatz fand die PCR bei der Analyse und Expression von Transgenen im Mausgenom. Die PCR verlief in 3 Schritten, die in 35 Zyklen immer wiederholt wurden. I. Denaturierung (Auftrennung) der Matrizen-DNA durch Erhitzen auf 94 °C. II. Sequenzspezifische Hybridisierung von einzelsträngigen Oligonucleotiden (Primer; 18-30 Nucleotide) an die Matrizen-DNA (*Annealing*) bei einer Temperatur

zwischen 50 °C und 68 °C. III. Verlängerung (Elongation) der Primer durch die Taq-Polymerase. Da die Komplementierung an beiden Strängen der Matrizen-DNA abläuft, wird pro Zyklus die Anzahl der Matrizen-DNA verdoppelt.

Beispiel für CD11c.DOG-Typisierung:

	1x Mix [µl]
10 x PCR Puffer	5
10 mM dNTPs	1
Ova 1 Primer (10 pmol/µl)	2
Ova 2 Primer (10 pmol/µl)	2
β ₂ m 1 Primer (10 pmol/µl)	2
β ₂ m 2 Primer (10 pmol/µl)	2
Taq Polymerase	1
ddH ₂ O	34
Template DNA (Schwanz-DNA)	3
Σ in µl	50

10x PCR Puffer

100 mM Tris pH 8,3

500 mM KCl

25 mM MgCl₂

→ gefiltert durch 0,2 µm Filter

Template-DNA: 3 µl aus 300 µl Verdau von ca. 1 mm Schwanzbiopsie

Programm:

Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
94 °C	2 min	
94 °C	0:30 min	35 Zyklen
60 °C	0:30 min	
72 °C	1:00 min	
72 °C	10 min	
4 °C	∞	

Analysiert wurde im 2 % igen Agarose-Gel.

Produktgröße: 499 bp Ova-Fragment

297 bp β₂m-Fragment

2.2.5 Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarose-Gel (DNA-Gelelektrophorese)

Mittels DNA-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente mit Längen von 0,2 bis 10 Kb in 0,7 - 2 %-igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Auftrennung erfolgt gemäß ihrer Länge. Die Agarose wurde in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 2 mM

EDTA, pH 8,0) durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und nach Abkühlen auf ca. 50 °C zum Erstarren in eine Gelwanne mit eingesetztem Kamm (zur Aussparung der Geltaschen) gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde das Gel in die Elektrophoresekammer gelegt und der Kamm entfernt. Die DNA-Proben wurden mit Ladepuffer gemischt (enthält die Referenzfarbstoffe und gewährleistet das Absinken der DNA in die Taschen) und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei 110 Volt durchgeführt. Zur Abschätzung der Fragmentgrößen wurde ein Längenmarker (1 Kb-Leiter, GeneRuler DNA Ladder Mix, MBI Fermentas, St. Leon-Rot) mit aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 15 min. in eine Schale mit 500 ml Ethidiumbromid-Lösung (1 x TAE, 0,5 µg/ml EtBr) gelegt. Die DNA-Banden wurden für präparative Gele auf dem UV-Transilluminator bei 366 nm sichtbar gemacht, zur Dokumentation mit einer Kamera fotografiert oder mit einem Lumi-Imager (Boehringer Mannheim Diagnostics/Roche, Mannheim) dokumentiert und die erhaltenen Bilder mittels Photoshop® (Adobe®, München) graphisch bearbeitet.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine nach ihrer relativen Molekülmasse aufzutrennen, wurde die SDS-PAGE nach Laemmli verwendet (Laemmli, 1970). Damit auch bei großem Probenvolumen eine gute Auftrennung erreicht werden konnte, wurde ein zweigeteiltes SDS-Gel verwendet. Zunächst wanderten die Proben in das Sammelgel und wurden hier fokussiert, bevor dann die eigentliche Auftrennung im Trenngel erfolgte. Es wurden Standardgele (16 x 16 cm Trenngelgröße) oder Minigele (8 x 7 cm Trenngelgröße) mit 10 %-igem Trenngel und 5 %-igem Sammelgel genutzt. Das Trenngel wurde zwischen zwei Glasplatten in einem Gelgiessstand (Mini-Protean® III System für Minigele, Protean® II xi für Standardgele, Biorad, München) gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde das Isopropanol abgezogen und das Sammelgel gegossen (Probenkamm einpassen!). Nachdem Aushärten des Sammelgels wurde der Probenkamm entfernt und die Probetaschen gründlich gespült. Für die Gelelektrophorese wurde nun 1x SDS-Laufpuffer in die Probetaschen eingefüllt. Die Proben (5 Mio. Zellen) wurden zweifach mit eiskaltem DPBS gewaschen und in 150 µl Lysepuffer resuspendiert. Anschließend wurde für 5 min bei 95 °C aufgeköcht, um die Proteine zu denaturieren. Nach Zentrifugation wurde

der Überstand mit 6x SDS-Probenpuffer versetzt. Mithilfe einer Hamiltonpipette wurden die Proben (20 µl bei Minigelen, bis zu 75 µl bei Standardgelen) in die Geltaschen geladen. Als Größenstandard dienten 10 µl des „Dual Color Precision Plus Protein™ Standards“ (Bereich 10 kDa – 250 kDa, #161-0374, Biorad). Die Elektrophorese wurde bei den Standardgelen mit 180 mA und 90 V bzw. bei den Minigelen mit 150 V in der Regel solange durchgeführt, bis das im SDS-Ladepuffer enthaltene Bromphenolblau die untere Grenze des Gels erreicht hatte.

2.3.2 Western Blot

Im Western Blot können Proteine, welche durch SDS-PAGE nach ihrer Größe elektrophoretisch im Gel aufgetrennt wurden, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und durch Reaktion mit einem spezifischen Ak sichtbar gemacht werden. Diese Methode erlaubt es, Proteine in Proteingemischen, wie Zell- oder Organextrakten, qualitativ und quantitativ nachzuweisen.

Dazu wurde zunächst eine Nitrocellulosemembran (PVDF-Membran, Immobilon-P, Millipore, Schwalbach) für circa 20 s in Methanol getränkt und etwa 10 min in ddH₂O inkubiert. Währenddessen wurden für ein Standardgel auf die vorher mit ausreichend ddH₂O gespülte Anode der Apparatur (Semi-dry Blotter SD 1, cti) 4 Whatman-Filterpapiere (benetzt mit konzentriertem Anodenpuffer) gelegt. Luftblasen wurden mit einer Glaspipette durch Rollen mit sanftem Druck entfernt. Darauf legte man weitere 3 Whatman-Filterpapiere, die mit Anodenpuffer getränkt wurden. Jetzt wurde die vorbereitete Nitrocellulosemembran aufgelegt. Darauf platzierte man das Gel und 3 in Kathodenpuffer getränkte Whatman-Filterpapiere. Abschließend wurde die Kathode oben aufgelegt. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Spannung von 10 V für etwa 1,5 h (2 Minigele bei 17 V für ca. 35 min, 1 Minigel nur 17 min).

Danach wurde die Membran für 1 h bei RT oder ü/N bei 4 °C in Blockpuffer geschwenkt, um freie unspezifische Bindungsstellen abzusättigen (GFL 3015, Omnilab). Anschließend wurde 3 x 5 min mit PBS/Tween gewaschen (immer unter Schwenken) und für 1 h bei RT oder ü/N bei 4 °C mit dem Erst-Ak (in Blockpuffer verdünnt) inkubiert. Die Konzentration war dabei abhängig vom verwendeten Ak. Es folgten nun 5 Waschschrte mit PBS/Tween für 5 min, Inkubation mit dem Meerrettichperoxidasegekoppeltem Sekundär-Ak (1:200000 in Blockpuffer) für 45 min bei RT sowie wiederholtem fünfmaligem Waschen mit PBS/Tween. Nun erfolgte die ECL Substratreaktion („Enhanced Chemilumineszenz“). Dazu wurde die Membran für circa

1 min mit „SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate“ (Pierce Perbio Science/Thermo Fisher Scientific, Bonn) getränkt, in eine Klarsichtfolie verpackt und die Banden des Molekulargewichtsmarkers mit einem fluoreszierenden Stift gekennzeichnet (Scienceware® „autoradiography pen“, Sigma, Schnellendorf). Die bei der Chemilumineszenz emittierten Photonen wurden mit einem Scanner (Lumi-Imager, Boehringer Mannheim Diagnostics/Roche, Mannheim) detektiert. Die digitalen Aufnahmen (16-bit tiff-Format) wurden mittels Photoshop® (Adobe®, München) bearbeitet.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Lagerung und Kultur von Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigtem Wasserdampf in beschichteten Zellkulturgefäßen kultiviert (Inkubator Hera Cell 240, Kendro, Langenselbold). Die Lagerung der Zellen erfolgte im Einfriermedium (RPMI-Vollmedium mit 10 % DMSO) in 1,5 ml Schraubdeckelröhrchen (Cryo, Nalgene, über Nunc, Langenselbold) bei –80 °C für bis zu 3 Monate oder in flüssigem Stickstoff für die Langzeitlagerung.

2.4.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um Zellen einzufrieren, wurden je 5×10^6 Zellen für 10 min bei 1500 U/min 4 °C abzentrifugiert und in 1 ml eiskaltem Einfriermedium aufgenommen. Die gekühlten Kryoröhrchen wurden zügig in einen – 80 °C Gefrierschrank transferiert und nach vollständigem durchfrieren in einen Tank mit Flüssigstickstoff überführt. Zur erneuten Kultivierung der Zellen wurden diese im Schraubdeckelröhrchen bei 37 °C aufgetaut, in ein Teströhrchen mit vorgewärmtem Zellkulturmedium überführt und das Konservierungsmedium per Zentrifugation unter obigen Bedingungen entfernt. Die Zellen wurden in frisches, vorgewärmtes Medium aufgenommen und in eine 25 oder 75 cm² Zellkulturflasche ausgesät.

2.4.3 Transfektion von RMA-Zellen

RMA-Zellen wuchsen in Suspension mit RPMI-Vollmedium. Daher bot sich die Elektroporation als Transfektionsmethode an. Hierbei wurden die Zellen in dem Elektroporationsgerät (Küvette mit Metallkontakten) in ein elektrisches Feld gebracht

und kurzen, elektrischen Impulsen mit hoher Feldstärke ausgesetzt. Dabei entstehen kurzzeitig Poren in der Zellmembran, durch die DNA in die Zelle gelangen kann.

Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen 1:2 bis 1:3 gesplittet, damit ein optimaler Zustand der Zellen bei der Transfektion gewährleistet war. Es wurden 10 Millionen Zellen pro Transfektionsansatz benötigt. Die Zellen wurden in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen bei Standardbedingungen (4 °C) zentrifugiert, mit eiskaltem DPBS gewaschen und gezählt. Von nun an wurden die Zellen permanent auf Eis gelagert und auf eine Konzentration von 5×10^7 Zellen/ml in eiskaltem Opti-Mem[®] (Invitrogen, Eggenstein) oder serumfreiem Medium eingestellt. Das Elektroporationsgerät und die Plasmidlösungen in ddH₂O (10 µg Ziel-Plasmid und 0,5 µg Selektions-Plasmid; Verhältnis 20:1) wurden vorbereitet. Nun wurde die Plasmid-DNA sowie 200 µl der Zellenlösung in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Währenddessen wurde eine 25 cm² Zellkulturflasche mit 9,5 ml RPMI-Vollmedium (ohne Selektionszusatz) vorbereitet. Anschließend platzierte man die Küvette in das Elektroporationsgerät und startete den Strompuls. Schnellstmöglich wurden die Zellen in die 25 cm² Zellkulturflasche pipettiert, die Küvette mit 300 µl RPMI-Vollmedium gewaschen und ebenfalls in die 25 cm² Zellkulturflasche überführt. Die Zellen wurden nun bei 37 °C mit 5 % CO₂ inkubiert. Nach 2 Tagen wurde das Selektionsreagenz in einer geeigneten Konzentration (z.B.: 0,5 - 1 mg/ml G418) hinzugefügt. Von Zeit zu Zeit wurde das Selektionsmedium gewechselt.

2.5 Tierexperimentelle Arbeiten

2.5.1 Injektion von DT

Für die Lagerung von DT wurde dieses beim Ansetzen der 0,1 mg/ml Stammlösung zu Aliquots a 10 µl, 20 µl, 50 µl und 500 µl eingefroren und bei -80 °C eingelagert. Die für die Injektion benötigte Menge DT wurde aufgetaut und mit kaltem DPBS auf die gewünschte DT-Konzentration verdünnt. Als Standard wurden 8 ng/g Körpergewicht (KG) DT in 200 µl intraperitoneal (ip.) in die Bauchhöhle der Maus injiziert. Dafür wurden 1 ml-Spritzen mit Kanülen der Größe 27G 0,4 mm x 19 mm (BD Biosciences, Heidelberg) verwendet.

Bei neonatalen Mäusen wurde vor Injektion der Fremdgeruch der behandschuhten Finger durch Aufnahme von Käfigstreu überdeckt! Die DT-Lösung (RT) wurde in 50 µl ip. appliziert.

2.5.2 Organentnahme bei Mäusen

Die Organentnahme erfolgte nach Tötung der Mäuse durch CO₂-Begasung oder zervikale Dislokation. Die CO₂-Begasung wurde bei der Entnahme von Lymphknoten, Thymus oder Blut bevorzugt, da hierbei eine Verletzung der Blutgefäße im Halsbereich vermieden wurde.

2.5.3 Präparation von Organen für FACS, MACS oder zelluläre Assays

2.5.3.1 Präparation von Milz-, Knochenmark- und Lymphknotenzellen

Für die Präparation von DZ wurden folgende Reagenzien verwendet:

- PBS/ 2 mM EDTA/ 0,1 %NaAzid, DPBS und 0,5 M EDTA
- **CD**: 1 mg/ml Collagenase IV (Sigma, Schnelldorf)/ 50U/ml DNase (Roche)
- **CDD**: 0,2 mg/ml Collagenase IV (Sigma, Schnelldorf)/ 25 µg/ml DNase I (ICN, Eschwege)/ 0,2 mg/ml Dispase:Grade I (Roche, Mannheim)/ 20 mM HEPES/ 2% FKS (v/v) in RPMI Medium pH 7,3

Für die Präparation ist eine schnelle Arbeitsweise wichtig. Daher sollten alle Materialien vorbereitet werden.

Tabelle 2.10: Gefäßbedarf für die Organpräparation

Milz	LK	KM	Thymus
6-Lochplatte	6 cm Petrischalen	6-Lochplatte	6-Lochplatte
5 ml Zentrifugenröhrchen (ZR) + 9 mm Magnet	5 ml ZR + 9 mm Magnet	5 ml ZR + 9 mm Magnet	5 ml ZR + 9 mm Magnet
5 ml Falcon™ Tube mit einem cell strainer cap (CSR), 35 µm (BD Biosciences, Heidelberg)	5 ml CSR	5 ml CSR	5 ml CSR+ 15 ml ZR

Eine Beschreibung der zur Präparation durchgeführten Schritte finden sich in der folgenden Tabelle.

Tabelle 2.11: Organpräparation zur Zellgewinnung

	Milz	Inguinale + brachiale + axillare LK	KM	Thymus
1.	In 6-Lochplatte auf Eis mit 2 ml CD	In 6 cm Petrischalen auf Eis mit 3 ml DPBS	In 6-Lochplatte auf Eis mit 3 ml DPBS	In 6-Lochplatte auf Eis mit 2 ml CD und Injektion von 400 µl CD in beide Seiten
2.	Injektion von 400 µl CD in beide Seiten	LK mit Schere klein schneiden oder mit gefrostenen Objektträgern leicht zerreiben (dann mit DPBS nachspülen)	KM mit Spritze und Kanüle (27G) rausspülen in 5 ml ZR mit 9 mm Magnet	Nach 5 min Thymus mit Pinzette in 1 mm Stücke reißen u. in 5 ml ZR mit 9 mm Magnet überführen
3.	Nach 5 min Milz mit Pinzette in 1 mm Stücke reißen u. in 5 ml ZR mit 9 mm Magnet überführen	1500 U/min 4 °C 10 min und resuspendieren in 500 µl CD in 5 ml ZR mit 9 mm Magnet	1500 U/min 4 °C 10 min und resuspendieren in 500 µl CD	Inkubation für 30 min in 37 °C H₂O-Bad auf Magnetrührer (langsam drehend)
4.	Inkubation für 30 min RT auf Magnetrührer (langsam drehend)	Inkubation für 45 min RT auf Magnetrührer (langsam drehend)	Inkubation für 20 min RT auf Magnetrührer (langsam drehend)	Überstand in 15 ml ZR überführen, auf Eis lagern
5.	Auf/ab pipettieren um Gewebe vollständig zu homogenisieren	Auf/ab pipettieren um Gewebe vollständig zu homogenisieren	Auf/ab pipettieren um Gewebe vollständig zu homogenisieren	Unverdautes Gewebe 2 ml CDD zugeben, auf/ab pipettieren und Inkubation für 25 min fortsetzen
6.	Auf CSR überführen und mit 1 ml PBS/EDTA waschen	Auf CSR überführen und mit 1 ml PBS/EDTA waschen	Auf CSR überführen und mit 1 ml PBS/EDTA waschen	Gesammelten Überstand mit 40 µl 0,5 M EDTA zu 5 ml ZR mit Magnet geben und Inkubation für 5 min fortsetzen
7.	1500 U/min 4 °C 10 min	1500 U/min 4 °C 10 min	1500 U/min 4 °C 10 min	Auf CSR überführen und mit 700 µl DPBS waschen
8.	Resuspendieren in 1 ml DPBS	Resuspendieren in 500 µl DPBS	Resuspendieren in 500 µl DPBS	1500 U/min 4 °C 10 min und resuspendieren in 1 ml DPBS
9.	33 µl für FACS-Messung (~2,5 Mio.) verwenden und Zellen zählen	150 µl für FACS-Messung (~2 Mio.) verwenden und Zellen zählen	100 µl für FACS-Messung (~3 Mio.) verwenden und Zellen zählen	35 µl für FACS-Messung (~3 Mio.) verwenden und Zellen zählen

Für die Präparation von T-Zellen:

Milz, Thymus oder Lymphknoten wurden in 6-Lochplatten auf Eis mit 3 ml DPBS zwischengelagert. Zur Präparation wurden sie durch sterile 40 µm Falcon™ CSR (Filterkappe, BD Biosciences, Heidelberg) mit einem Spritzenstempel gedrückt und mit 5-10 ml DPBS gewaschen. Nach Zentrifugation bei 1500 U/min für 10 min, 4 °C (Minifuge 2, Heraeus) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in DPBS oder RPMI-Vollmedium aufgenommen. Bei Bedarf wurde nach der Zentrifugation noch eine Lyse der roten Blutkörperchen durchgeführt (mit ACK-Puffer (Ammonium-Chloride-Potassium), Kapitel 2.6.13).

2.5.3.2 Präparation der Lunge

Ein Protokoll von Chen et al. wurde modifiziert verwendet (Chen, Fraire et al., 2001). Die Lunge wurde perfundiert, indem man 10 ml eiskaltes DPBS in den rechten Herzventrikel injizierte (20G Kanüle). Danach präparierte man die Lunge und entfernte noch eventuell anhaftende lungenassoziierte Lymphknoten. Die Lunge wurde nun in einer kleinen Petrischale (ohne Medium) mithilfe eines Skalpells oder zweier Pinzetten in kleinste Stückchen (< 1 mm) zerschnitten. Diese inkubierten dann in 3 ml DPBS mit 125 U/ml Collagenase I (Sigma, Schnelldorf), 60 U/ml DNase (Roche, Mannheim) und 60 U/ml Hyaluronidase (Sigma, Schnelldorf) bei 37 °C für 1 h. Durch kräftiges Pipettieren wurden größere Gewebestückchen weiter zerkleinert und man erhielt eine Einzelzellsuspension. Diese wurde durch einem CSR filtriert. Falls nötig, wurde durch eine Dichtegradientenzentrifugation (mit Lymphoprep™, Kapitel 2.5.4) weiter aufgereinigt. Abschließend wurden die Zellen in DPBS oder FACS-Puffer aufgenommen.

2.5.3.3 Präparation von Epidermis und Dermis

Nach dem Töten der Mäuse wurden sie in Ethanol getaucht, die Ohren abgeschnitten und diese in eine kleine Petrischale gelegt. Nachdem diese getrocknet waren, wurden 5 ml Trypsinlösung (2,5 % Trypsin; 2,5 % EDTA in DPBS; RT) zugegeben. Nun trennte man die 2 Ohrhälften. Die ventralen Hälften (bauchseitig, dünn) und die dorsalen Hälften (zum Rücken hin gerichtet; dick) wurden mit der Dermisseite nach unten in 7 ml Trypsinlösung bei 37 °C 45 min lang (ventrale Hälften) bzw. 90 min (dorsalen Hälften) und in je einer 6-Lochplattenkavität inkubiert. Dann war es möglich, die hauchdünne Epidermis von der Dermis zu trennen. In der Epidermis befinden sich ausschließlich die Langerhans-Zellen. Sollten alle Haut-DZ verwendet werden, so wurde auch die Dermis mitgenutzt. Dafür legte man die Epidermis und/oder Dermis auf

ein Sieb und rieb mit einem Spritzenstempel die Zellen ins eiskalte DPBS einer 10 cm Petrischale. Zum Schluss wurde die Einzelzellsuspension bei 1500 U/min 10 min bei 4 °C zentrifugiert und die Zellen in der gewünschten Lösung (z.B.: DPBS oder FACS-Puffer) resuspendiert.

2.5.3.4 Präparation und Kultur von BMDC

Für Immunisierungen mit aus dem Knochenmark gereiften, dendritischen Zellen (DZ) benötigte man eine größere Anzahl dieser Zellen. Daher wurden diese Zellen *in vitro* kultiviert und nach circa 8-10 Tagen geerntet.

Das Knochenmark für die Kultur wurde aus Tibia und Femur von Mäusen gewonnen. Dazu bereitete man sich eine 6-Lochplatte mit 4x DPBS und 1x 70 % Ethanol vor. Die Knochen wurden mit Operationsbesteck aus den Mäusen entnommen und in sterilem DPBS zwischengelagert. Anschließend wurden die Knochen für 20 s in 70 % Ethanol desinfiziert und wieder in DPBS überführt. Da diese Knochenmarkszellen über mehrere Tage inkubiert werden, war auf steriles Arbeiten zu achten. An beiden Seiten wurden die Knochen mit einer Schere aufgeschnitten und die Zellen mit DPBS aus dem Knochen herausgespült (Kanüle 27G; 0,4 x 19 mm). Die Lösung wurde in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen und anschließend für 10 min bei 4 °C und 1500 U/min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit BMDC-Medium resuspendiert und die Zellen ausgezählt. Für die Kultivierung gab man 2 Millionen Knochenmarkszellen in eine 10 cm Bakterienpetrischale mit 10 ml BMDC-Medium. Bei der Kultivierung von BMDC wurden unbeschichtete Petrischalen verwendet, da ein erleichtertes Anhaften nicht erwünscht war. Nach 3 Tagen bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde zu den Petrischalen 10 ml vorgewärmtes BMDC-Medium langsam hinzugefügt, ohne die Zellen vom Boden abzulösen. Nach weiteren 3 Tagen wurden 10 ml Medium entnommen, zentrifugierte dieses bei RT für 10 min mit 1500 U/min ab und resuspendierte die Zellen in 37 °C vorgewärmtem BMDC-Medium. 2 Tage später wiederholte man diesen Schritt und erntete nach weiteren 2 Tagen die ausgereiften BMDC. Dabei spülte man gründlich den Boden der Petrischale mit einer 5 ml Glaspipette und DPBS. Zur Kontrolle des Zustandes der BMDC wurde die Expression der Oberflächenantigene CD11c, MHCII und CD80 mittels einer FACS-Messung analysiert.

2.5.4 Isolierung von peripheren Blutlymphozyten zur Typisierung von transgenen Mäusen

Eine schnelle und einfache Methode zur Typisierung von transgenen Mäusen war die Analyse von spezifischen Oberflächenantigenen auf Blutlymphozyten. Dafür wurden 1,5 ml Reaktionsgefäße mit 400 µl Heparinpuffer (5 U/ml Heparin; 0,1 % Na-Azid; 2 % FKS) vorbereitet. In diesen Gefäßen sammelte man circa 5 Tropfen Blut aus der Schwanzvene der Mäuse. Dafür erwärmte man die Mäuse (auch Kontrollmäuse) für maximal 5 min unter einer Rotlichtlampe, überführte sie anschließend in eine Fixierkammer und ritzte die Vene am Ende des Schwanzes leicht mit einem Skalpell ein. Die Blutung wurde kurz gestillt und das gewonnene Blut gemischt. Durch das Heparin wurde das Gerinnen des Blutes verhindert und das Blut konnte in diesem Zustand kühl für einige Stunden gelagert werden. Nun wurden kleine Zentrifugeröhrchen mit 3 ml Lymphoprep™ (AXIS-SHIELD, Oslo; Dichte 1,077 g/ml) gefüllt. In diese wurde das Blut einer Maus langsam und vorsichtig am Rand hinein pipettiert. Nun erfolgte die Zentrifugation bei 1800 U/min für 20 min RT (Beckmann TJ-6; ohne Bremse). In diesem Schritt erfolgte eine Aufteilung der Bestandteile nach Dichte: Die schwereren Erythrozyten sanken nach unten und die Lymphozyten bildeten eine weiße Zwischenphase. Mit einer 1 ml-Pipette wurde die Interphase von oben abgenommen und in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde mit DPBS aufgefüllt und in einer Standard-Tischzentrifuge (Biofuge pico - Heraeus, Osterode) bei 4500 U/min für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das Pellet in 50 µl FACS-Puffer mit fluorochrommarkierten Ak-Mix resuspendiert. Nach 20 min Inkubation auf Eis unter Lichtabschluss wurde mit 1 ml DPBS gewaschen und wie oben abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 50 µl FACS-Puffer resuspendiert. Nun wurde die Durchflusszytometrieanalyse durchgeführt.

2.6 Immunologische Methoden

2.6.1 Extrazelluläre FACS-Färbung

Für Standardfärbungen wurden 1-3 Mio. Zellen in 100 µl 5 % Venimmun (v/v) FACS-Lösung (Block-FACS-Puffer) auf Eis inkubiert, um unspezifische Bindungen der Ak an Fc-Rezeptoren zu verhindern. Danach wurden die Zellen in eiskaltem FACS-Puffer mit

fluorochrom-markierten Ak (meist 1:100 verdünnt, ~ 1-5 µg/ml) resuspendiert und 20 min bei 4 °C inkubiert. Sollten mehrere Oberflächenmoleküle auf einer Zelle angefärbt werden, wurden die Ak in einer Färbung kombiniert. Die Zellen wurden anschließend 2x mit FACS-Puffer gewaschen und in 100 µl FACS-Puffer mit 1 µg/ml Propidiumiodid (PI) aufgenommen. Die Akquisition und Analyse der Zellen erfolgte an einem FACS Calibur oder Canto II (BD Biosciences, Heidelberg) mit der Software FlowJo (Treestar) oder DIVA (BD Biosciences, Heidelberg). Alternativ zu direktmarkierten Ak wurden biotinylierte Ak gefolgt von Streptavidin-Fluorochrom-Konjugaten oder unmarkierte Ak mit entsprechenden Zweit-Ak eingesetzt. Nach dem Waschen wurden die Zellen dann in dem Zweitreagenz resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und erneut 2x mit FACS-Puffer gewaschen. Abschließend wurden die Zellen in 100 µl FACS-Puffer mit 1 µg/ml PI aufgenommen.

Sollten die gefärbten Zellen im FACS-Gerät sortiert werden, so wurde auf steriles Arbeiten geachtet. Das Sortieren erfolgte am FACSVantage™-, FACSDiva™-oder FACS Aria™-Geräten. Zellen für eine spätere Kultur wurden in Medium sortiert und der Probengröße entsprechend in 6-, 24- oder 96-Lochplatten oder 25 cm²-Zellkulturflaschen überführt. Zellen für Zelltransfer in Mäuse wurden in Röhrchen mit eiskaltem DPBS sortiert und anschließend auf Eis gelagert.

2.6.2 Intrazelluläre FACS Färbung

Die Färbung von intrazellulären Molekülen erforderte eine Fixierung der Zellen. Da hierbei zahlreiche Waschschriffe notwendig waren, wurde eine Zellzahl von etwa 5 Mio. Zellen benutzt. Die intrazelluläre Markierung mit fluorochrom-markierten Ak erfolgte nach der Färbung der Oberflächenmoleküle (Kapitel 2.6.1). Anstelle des zweimaligen Waschens mit FACS-Puffer wurde 2x mit DPBS gewaschen. Das Pellet wurde nun in 100 µl Cytofix/Cytoperm-Lösung (Cytofix/Cytoperm™ Plus Kit, BD Bioscience, Heidelberg) resuspendiert und für 20 min auf Eis unter Lichtabschluss inkubiert. Nach der Fixierung wurden die Proben mit 1-fachem Perm/Wash-Puffer gewaschen und zentrifugiert (2000 U/min, 1 min 4 °C, große Tischzentrifuge für 96-Lochplatten). Vorsicht! Die fixierten Zellen können sehr leicht durch unvorsichtiges Absaugen verloren gehen! Anschließend wurde 2x mit etwa 200 µl 1-fachem Perm/Wash-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde in 100 µl 1-fachem Perm/Wash-Puffer mit Block-FACS-Puffer und den fluorochrom-markierten Ak für die intrazelluläre Färbung für 45 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen 2x mit 200 µl 1-fachem Perm/Wash-Puffer gewaschen (jeweils 5 min Inkubation vor der Zentrifugation!) und in

50-100 µl FACS-Puffer für die FACS-Messung in ein FACS-Röhrchen (Greiner, Frickenhausen) überführt.

2.6.3 *In vitro*-Restimulation von T-Zellen zum Nachweis der IFN γ -Ausschüttung

Damit eine Zytokinproduktion von *in vivo* voraktivierten T-Zellen nachgewiesen werden konnte, mussten diese nach der Isolierung *in vitro* restimuliert werden. Um einen einfachen Nachweis der Zytokine zu ermöglichen, wurde Brefeldin A verwendet. Brefeldin A inhibiert dabei den vesikulären Transport vom Endoplasmatischem Retikulum zum Golgi-Apparat und bewirkt somit eine intrazelluläre Ansammlung der Zytokine, welche dann per intrazellulärer FACS-Färbung (Kapitel 2.6.2) detektiert werden kann.

Nach Präparation der Maus-Milzzellen wurden 10^7 dieser Zellen in 5 ml RPMI-Vollmedium mit 1 µM Peptid (spezifisch für zu untersuchende T-Zellen) in einer 25 cm² Zellkulturflasche (senkrecht stehend) für 5 Tage kultiviert. Dieser Schritt diente der Proliferation der spezifischen T-Zellen bei Immunantworten mit geringem Effektoranteil.

In einer 96-Lochplatte (Rundboden) wurden 10^7 Zellen einer Milzzellsuspensionen in 100 µl RPMI-Vollmedium mit 1 µM Peptid und Brefeldin A (BD GolgiPlug, 1:1000 endverdünnt aus dem BD Cytofix/CytopermTM Plus Kit, BD Bioscience, Heidelberg) für 5 h kultiviert. Anschließend erfolgte zunächst die extrazelluläre und dann die intrazelluläre FACS-Färbung (Kapitel 2.6.2). Als negative Kontrolle dienten stimulierte Zellproben, die nicht mit dem Zytokin-spezifischen, fluorochrom-markierten AK gefärbt wurden, sondern mit dem entsprechenden Isotyp-Kontroll-Ak.

2.6.4 Bestimmung der Leukozytenanzahl und DZ-Depletion

Zur Bestimmung der Leukozyten wurden die lebenden Zellen in einer Neubauer Zählkammer (Marienfeld, Lauda-Königshofen) ausgezählt. Dabei wurde eine 0,5 %ige Trypanblaulösung (Invitrogen) zur Anfärbung toter Zellen eingesetzt (Verdünnungsfaktor; VF 1:1 bis 1:200). Tote Zellen erscheinen blau.

Die Anzahl der lebenden Zellen wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Anzahl der lebenden Zellen} = \frac{\text{Zellzahl in 2 Großquadraten} \times \text{VF} \times 10^4 \times \text{Volumen [ml]}}{2}$$

Bei der Analyse der Zellproben im FACS-Gerät wurde zunächst eine Region im FSC-SSC-Diagramm bestimmt, welche die Zelltrümmer ausschließt (Abbildung 2.1). FSC ist der *Forward-scatter* und bedeutet Vorwärtsstreulicht. Es entsteht, wenn Partikel einfallendes Laserlicht beugen und ist proportional der Zellgröße bzw. Zelloberfläche. *Side-scatter* (SSC, Seitwärtsstreulicht) ist ein Maß für die Granularität der Zellen, da es an Grenzflächen mit einem geänderten Brechungsindex entsteht.

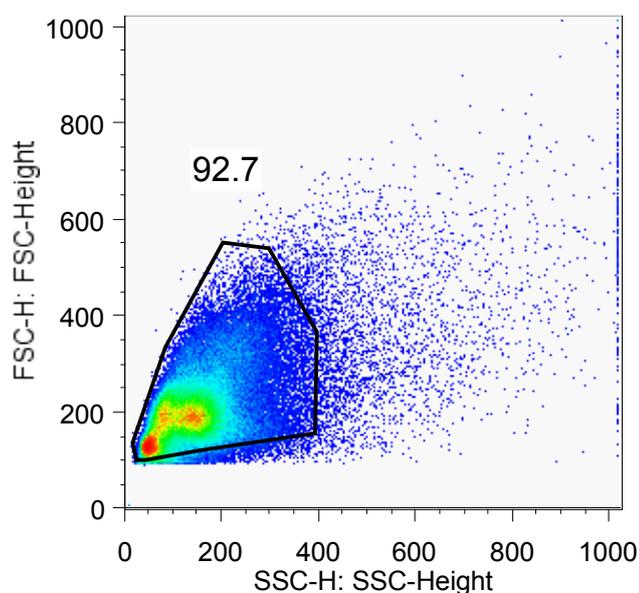


Abbildung 2.1: Selektion der Leukozyten im FSC-SSC-Diagramm

Selektion der Leukozyten sowie Deselektion von Zelltrümmern im FSC-SSC-Diagramm anhand von Größe und Lichtstreuung.

Nach Ausschluss der Zelltrümmer wurden nun lebende Zellen in einer 2. Region ausgewählt (Abbildung 2.2). Dazu wurde bei extrazellulären FACS-Färbungen PI verwendet und im Diagramm gegen einen beliebigen 2. Parameter angezeigt. Die 2. Region beinhaltet nur lebende Zellen, welche PI⁺ sind.

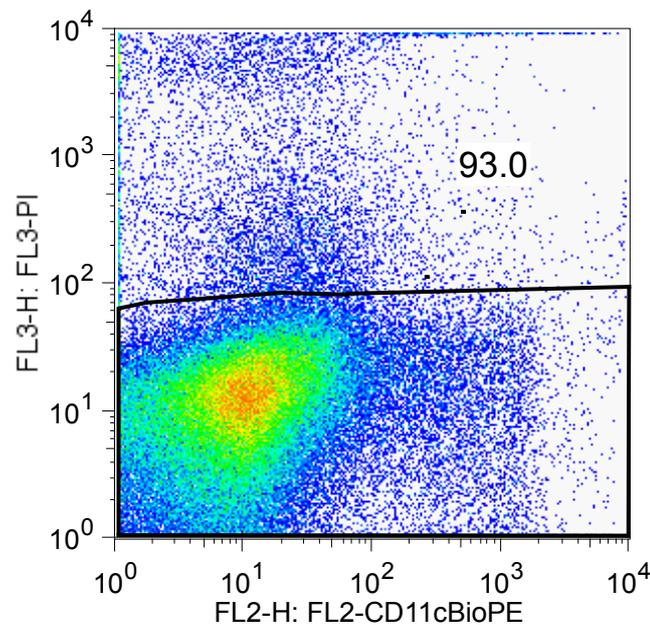


Abbildung 2.2: Selektion von lebenden Zellen durch Ausschluss der toten PI⁺Zellen

Selektion von lebenden Zellen durch PI-Färbung.

Von den lebenden Zellen ausgehend, wurden alle weiteren experimentspezifischen Regionen (z.B.: DZ-Selektion auf PI⁻ und CD11c⁺MHC-II⁺) ausgewählt.

Die DZ-Depletion ermittelte sich aus dem Verhältnis der DZ in den DT-behandelten CD11c.DOG-Mäusen und den unbehandelten bzw. ebenfalls mit DT behandelten C57BL/6-Mäusen (Referenzwert = Mittelwert der Gruppe). Die DZ-Zellzahl ergab sich aus der gezählten Lebendzellzahl x Prozentsatz der DZ-Region (Anteil der DZ an den lebenden Organzellen, DZ-Region in Abbildung 3.7 A). Die DZ-Depletion wurde wie folgt ermittelt:

$$\text{DZ-Depletion [\%]} = 100 \% - \frac{100 \% \times \text{CD11c.DOG-DZ-Zellzahl}}{\text{Mittelwert der C57BL/6 -DZ-Zellzahl}}$$

War bei Proben die Lebendzellzahl nicht geeignet als Vergleichsbasis (unterschiedliche Größe der entnommenen Organe/-teile), so wurde bei der Berechnung anstelle der Zellzahl der prozentuale Anteil der DZ an den lebenden Organzellen verwendet (%-Wert der DZ-Region im FACS-Diagramm).

2.6.5 Isolierung von Zellpopulationen mittels Magnetpartikel

MACS steht für „Magnetic cell sorting“. Dabei sind Ak gegen Oberflächenmoleküle mit superparamagnetischen, biologisch abbaubaren 50 nm kleinen Partikeln gekoppelt. Die Ak binden dann an die spezifischen Zellen und lassen eine Trennung der Zellen von unmarkierten Zellen im starken Magnetfeld (bis zu einem Tesla pro Meter) zu (Miltenyi, Muller et al., 1990; Williams, Lee et al., 1999).

Die bereits vorher gereinigte Zellsuspensionen wurde mit MACS-Laufpuffer (PBS pH 7,2; 2 mM EDTA und 0,5 % BSA) laut Herstellerangaben resuspendiert und mit den entsprechenden Partikeln im Kühlschrank für 15 min inkubiert. Anschließend wurde mit MACS-Laufpuffer gewaschen (Standard-Zentrifugation) und auf eine Konzentration von 3×10^8 Zellen/ml mit MACS-Laufpuffer eingestellt. Die LS-MACS-Säulen wurden in einen Magnethalter platziert und mit 3 ml MACS-Laufpuffer gewaschen (Säule wurde äquilibriert). Nun wurde die Zellsuspensionen appliziert (max. Zellzahlkapazität der Säule beachten!) und die MACS-Säulen 3x mit 3 ml MACS-Waschpuffer (MACS-Laufpuffer ohne 0,5 % BSA) gewaschen (negative Fraktion aufheben bei Depletion). Danach wurden die Säulen aus dem Magnethalter entnommen und mit 5 ml MACS-Laufpuffer pro Säule die positive Zellfraktion eluiert. Für eine hochreine Aufreinigung wurde das Eluat erneut auf frische Säulen im Magnethalter gegeben. Die negativen und positiven Fraktionen wurden zur Kontrolle der Reinheit einer extrazellulären FACS-Analyse unterzogen. Zum Schluss wurden die Suspensionen zentrifugiert, die Zellen gezählt und auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

2.6.6 CFSE-Markierung von Milzzellen

Mittels 5,6-Carboxyfluoreszein-Diazetat-Succinimidyl-Ester (CFDA-SE) können Zellen irreversibel für lange Zeiträume (bis zu mehreren Monaten bei nicht-teilenden Zellen) markiert werden. Dies kann zum Nachweis von Zellteilungen dienen, da die Tochtergenerationen jeweils nur die Hälfte der Fluoreszenzintensität aufweisen. CFDA-SE ist ein membrangängiges, nicht-fluoreszierendes Substrat für intrazelluläre Esterasen, die aus dem Substrat den Fluoreszenzfarbstoff CFDA freisetzen. Die Esterasen arbeiten unabhängig von Stoffwechselenergie. CFDA kann nicht durch die Membran diffundieren und akkumuliert daher in Abwesenheit einer Energiequelle intrazellulär. In Anwesenheit einer Energiequelle wird CFDA durch Multidrug-Resistance-Transportenzyme nach außen transportiert.

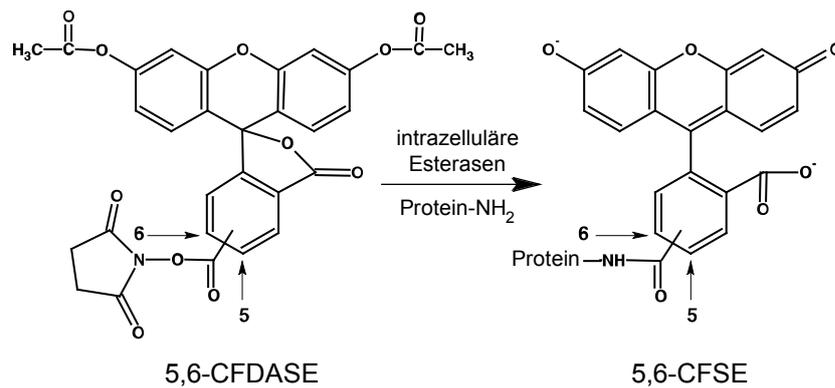


Abbildung 2.3: Mechanismus der Markierung von zellulären Proteinen durch CFDA-SE

CFDA-SE wird intrazellulär von Esterasen gespalten und bindet dann an Lysinresten von Proteinen. Adaptiert von Hoefel, Grooby et al., 2003.

Die Einzelzellsuspension wurde mit kaltem DPBS gewaschen und auf einen 40 µm Filter gegeben. Nach Standard-Zentrifugation (10-minütige Zentrifugation bei 1200 U/min und ~4 °C) wurde eine Zelldichte von 1×10^7 Zellen/ml mit DPBS (auf RT temperiert) eingestellt. Anschließend wurde der Zelllösung 5 mM 5,6-Carboxyfluoreszein-Diazetat-Succinimidyl-Ester-Stammlösung (CFDA-SE, Molecular Probes/Invitrogen) zugegeben, um eine Endkonzentration von 1 µM zu erreichen. Beim Arbeiten mit diesem Reagenz wurde auf Lichtausschluss geachtet. Nach 10-minütiger Inkubation bei RT wurde die Suspension mit einem Überschuss an eiskaltem RPMI-Medium + 10% FKS gewaschen und somit die Färbung abgestoppt. Die Zellen wurden dann 2x mit eiskaltem DPBS gewaschen, auf die gewünschte Zelldichte mittels DPBS eingestellt und den Mäusen intravenös (iv.) in die Schwanzvene injiziert.

2.6.7 *In vitro*-Proliferation und Stimulation

Die Proliferation von Zellen kann mittels dem Einbau von [^3H]-Thymidin in die neu synthetisierte DNA gemessen werden. Unter A. werden Experimente mit CpG ODN 1668 bzw. Concanavalin A (ConA) Stimulation und unter B. die Stimulation per *Staphylococcus*-Enterotoxin A (SEA) beschrieben.

A. Für die Proliferation wurden Milzzellen präpariert (Kapitel 2.5.3.1) und jeweils 10^5 Zellen in RPMI-Vollmedium pro Loch einer 96-Loch-Rundbodenplatte pipettiert (in Triplikaten). Zusätzlich wurden den Zellen verschiedene Stimuli zugefügt z.B. 0,5 µM CpG-ODN 1668 oder 5 µg/ml ConA. Außerdem wurde DT in serieller Verdünnung (1:10) von 10^{-7} - 10^{-14} M dazu gegeben und das Loch mit Medium aufgefüllt. Als Kontrollen dienten: Ohne Stimulus und 10^{-7} DT, ohne Stimulus und ohne DT bzw. mit

Stimulus und ohne DT)! Die Zellen wurden in einem Gesamtvolumen von 200 µl pro Loch bei 37 °C im Inkubator kultiviert. Nach 72 h wurden den Zellen pro Loch 50 µl [³H]-Thymidin (1 µCi, 25 ml RPMI-Vollmedium + 500 µl [³H]-Thymidin) zugegeben. 16 h nach Zugabe des [³H]-Thymidins wurden die Zellen mit dem Tom-Tec-Harvester (Zinsser Analytic, Frankfurt) geerntet. Das heißt, die Zellen wurden auf einem Glaswollfilter aufgebracht, mit Scintillationsflüssigkeit versetzt, in Folie eingeschweißt und mit dem β-Counter (MicroBeta² Plate Counter, Perkin Elmer, Rodgau) vermessen. Die Proliferationsstärke wurde in den gezählten Ereignissen pro Minute (cpm) deutlich.

B. Hier wurde die Proliferation von CD4 bzw. CD8 T-Zellen separat gemessen. Dazu erfolgte zunächst eine 30 Gray Bestrahlung von C57BL/6-Milzzellen (Quelle von APZ), welche damit nicht mehr teilungsfähig waren. 10³ dieser Zellen inkubierten für 4 h mit verschiedenen SEA-Konzentrationen (0,00005 bis 0,5 µg/ml; 1:10 Abstände) oder der Mediumkontrolle. Unterdessen erfolgte eine Aufreinigung von CD4 bzw. CD8 T-Zellen aus Milzzellen der zu untersuchenden Mäuse mittels MACS-Kit (positive Selektion, Kapitel 2.6.5). Anschließend wurden 5x10⁴ der aufgereinigten T-Zellen zu den Milzzellen hinzugegeben und für 4 Tage (CD8 T-Zellen) bzw. 5 Tage (CD4 T-Zellen) bei 37 °C im Inkubator kultiviert (Gesamtvolumen 200 µl). 16 h vor Zellernte wurde pro Loch 50 µl [³H]-Thymidin (1 µCi) zugegeben und das Experiment abschließend per β-Counter (MicroBeta² Plate Counter, Perkin Elmer, Rodgau) analysiert (oben).

2.6.7.1 DT-basierte Depletion von RMA.DOG-Zellen

A. Für die Kontrolle der DT-Aktivität bei *in vitro*-Proliferationstests wurde die DT-sensitive RMA.DOG-Zelllinie eingesetzt. Dazu wurden RMA-Zellen mit RMA.DOG-Zellen in einem definierten Verhältnis gemischt. Während RMA.DOG-Zellen ein positives eGFP-Fluoreszenzsignal aufweisen, sind RMA-Zellen eGFP⁻. Zu dieser Mischung wurde DT in serieller Verdünnung (1:10) von 10⁻⁷ - 10⁻¹⁴ M dazugegeben. Als Kontrollproben wurde ein RMA/RMA.DOG-Mix ohne DT sowie RMA- oder RMA.DOG-Zellen ohne DT (zur Abgrenzung der Regionen im FACS-Diagramm) eingesetzt. Nach Ende des Tests wurden die Proben im FACS-Gerät vermessen und die Anzahl der lebenden RMA.DOG-Zellen und die Gesamtzellzahl (Gesamtheit der lebenden RMA- und RMA.DOG-Zellen einer Probe) bestimmt.

Anhand des Verhältnisses an RMA.DOG-Zellen zu RMA-Zellen wurde die Depletion der RMA.DOG-Zellen wie folgt errechnet:

$$\text{RMA.DOG-Depletion [\%]} = 100 \% - \frac{100 \% \times \text{RMA.DOG}_{\text{Mix mit DT}} / \text{Gesamtzellzahl}_{\text{Mix mit DT}}}{\text{RMA.DOG}_{\text{Mix ohne DT}} / \text{Gesamtzellzahl}_{\text{Mix ohne DT}}}$$

B. Für die Experimente zum Nachweis der Induktion von anti-DT-Antikörper konnte ebenfalls diese Versuchsanordnung eingesetzt werden. Dabei wurde statt der DT-Verdünnungsreihe Serum seriell verdünnt (z.B. 1:100 bis 1:12000 in 1:2 Schritten) und DT konstant bei 10^{-9} M verwendet. Nach einem Tag wurden die Proben per Durchflusszytometrie hinsichtlich des Anteils an RMA.DOG-Zellen zu RMA-Zellen wie oben unter Methode A. beschrieben analysiert. Die Inhibierung der Depletion wurde über die Formel: $100 \% - \text{RMA.DOG-Depletion [\%]}$ berechnet.

2.6.8 *In vivo*-Proliferation

Für *in vivo*-Proliferationsexperimente wurden T-Zellen wie unter Kapitel 2.5.2 und Kapitel 2.5.3.1 beschrieben isoliert. Danach erfolgte die CFSE-Färbung (Kapitel 2.6.6) und iv. Injektion in die Schwanzspitze der Maus. Nach 3 Tagen erfolgte die Analyse der Milzzellen hinsichtlich der Teilung der injizierten T-Zellen per FACS-Messung. Beim Transfer von 2 verschiedenen T-Zellpopulationen konnte aufgrund der unterschiedlichen Thy1-Expression der transferierten T-Zellen (Thy1.1 zu Thy1.2 der Empfängermäuse) die gewünschte Zellpopulation durch Thy1.1-Färbung bei der Durchflusszytometrieanalyse selektiert werden.

2.6.9 Myeloid Derived Suppressor Cell-Assay

Mit Hilfe dieses Tests kann eine potentielle Myeloid Derived Suppressor Cell-Zellpopulation (MDSC) durch die Inhibierung der *in vitro*-T-Zell-Proliferation indirekt nachgewiesen werden.

Dafür wurden Milzzellen wie unter Kapitel 2.5.3.1 beschrieben präpariert (MDSC mit Collagenase/DNase-Verdau; Responderzellen wie T-Zellen) und nach extrazellulärer Färbung in Gr-1⁺F4/80⁻ sowie Gr-1⁺F4/80⁺ Zellen sortiert (Kapitel 2.6.1). Anschließend

wurden die Zellen mit 30 Gray bestrahlt. Die Responderzellen (10^5 Milzzellen) wurden in bestimmten Verhältnissen mit den sortierten MDSC (10^5 Zellen) unter Stimulation mit 2 $\mu\text{g/ml}$ ConA kultiviert und vermessen (Kapitel 2.6.7). Als Kontrollen dienten Responderzellen ohne/mit Stimulus, MDSC mit Stimulus bzw. 2×10^5 Responderzellen mit Stimulus.

2.6.10 Immunisierungen mit Ovalbumin-Protein

Den zu immunisierenden Mäusen wurden 500 μg Ovalbuminprotein (Sigma, Schnellendorf) und 50 μg CpG ODN 1668 (MWG Biotech, Ebersberg) in 100 μl an 2 Injektionsstellen subkutan in das Abdomen appliziert.

2.6.11 *In vivo*-Stimulierung mit Poly I:C, CpG ODN oder LPS

Zur Stimulierung der NK-Zellen wurden den Mäusen 200 μg Poly I:C (Sigma, Schnellendorf), 10 μg LPS (Sigma, Schnellendorf) oder 30 μg CpG ODN 1668 (MWG Biotech, Ebersberg) in DPBS ip. injiziert. Die Analyse der NK-Zellantwort (Kapitel 2.6.13) bzw. NK-Zellstimulation (CD69-Färbung für aktivierte NK-Zellen; Kapitel 2.6.1) erfolgte 16 bzw. 50 h später.

2.6.12 Adenoviren-Applikation

Zur Stimulierung der T-Zellen wurden den Mäusen (ca. 16 h vor dem Zelltransfer) 10^6 pfu Ovalbumin-exprimierender Adenovirus (AdOVA) iv. in die Schwanzvene injiziert. Dabei induzierten die adenoviralen Komponenten eine humorale und zelluläre Immunantwort gegen den Virus. Die Expression des Ovalbumins war hierbei nicht relevant.

Für Toleranzexperimente wurden ebenso 10^6 pfu AdOVA iv. in die Schwanzvene injiziert.

2.6.13 *In vivo*-Zytotoxizitätsassay

Mit dieser Methode können spezifische CD8 T-Zell- oder NK-Zellantworten bestimmt werden. Dabei setzt man ein oder mehrere Zielzellpopulationen mit einer Referenzzellpopulation ins Verhältnis und bestimmt über die Abnahme der Zielzellen die Zytotoxizität der Killerzellen. Durch unterschiedliche CFSE-Konzentrationen können die Zellgruppen voneinander getrennt im FACS-Gerät analysiert werden. Das folgende

Protokoll beschreibt die Vorgehensweise bei einer Zielzellpopulation und einer Referenzzellpopulation.

Als Zielzellen dienten Milzzellen, welche aus Spendermäusen isoliert wurden. Für die CD8 T-Zell-Antwort wurden Tiere mit dem gleichen H-2 Haplotyp wie die Empfängertiere verwendet. Beim Test der NK-Zellantwort stammte die Zielzellpopulation aus Tpn^{-/-}-Mäusen (H-2-b Haplotyp) und die Referenzzellpopulation von C57BL/6-Mäusen. Die benötigte Anzahl an Spendermäusen ergab sich aus der Anzahl der Empfängertiere (3 Empfängertiere pro Spendertier). Die Milzen wurden den Tieren entnommen und durch ein Metallsieb mit Hilfe eines Spritzenstempels gedrückt. Die Zellsuspension wurde in einer Petrischale mit eiskaltem DPBS aufgefangen. Die Schale wurde mit eiskaltem DPBS nachgespült und die Suspension in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nun wurde für 10 min bei 1200 U/min und 4 °C (Standard-Zentrifugation mit Minifuge; Heraeus) zentrifugiert und dekantierte anschließend den Überstand. Die roten Blutkörperchen wurden durch den osmotischen Schock mit 2 ml Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat-Puffer (ACK-Puffer) pro Milz (150 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM EDTA pH 7,3) lysiert. Nach 1 min auf Eis wurde die Lyse mit mindestens dem zweifachen Volumen an eiskaltem DPBS gestoppt und anschließend zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml eiskaltem DPBS resuspendiert, die Einzelzellsuspension durch einen 40 µm Filter gefiltert, einmal mit kaltem DPBS gewaschen und nach anschließender Standard-Zentrifugation auf eine Konzentration von 10⁷ Zellen/ml mit DPBS (auf RT temperiert) eingestellt. Nun erfolgte die Markierung der Zellen mit Peptiden (für den Test der NK-Zellantworten wurde nicht mit Peptiden inkubiert). Dazu wurden die Zellen in zwei Proben geteilt, eine Probe wurde zur Zielzellpopulation, d. h. mit dem dafür notwendigen Peptid bei einer Konzentration von 1 µM für 15 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die andere Zellpopulation wurde zeitgleich mit einem unspezifischen Peptid bei gleicher Konzentration ebenfalls im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die 5 mM CFDA-SE-Stammlösung (Molecular Probes/Invitrogen) 1:10 mit DPBS verdünnt. Nun wurde zeitgleich CFDA-SE in einer Endkonzentration von 2 µM (Zielzellpopulation) bzw. 0,2 µM (Referenzzellpopulation) zugegeben und sofort gemischt. Die Zellen wurden unter Lichtausschluss bei RT gelagert. Nach 15 min wurde die Markierungsreaktion durch Zugabe von 10 % RPMI-Medium gestoppt. Nun wurde das restliche Medium durch zweimaliges Waschen mit eiskaltem DPBS entfernt. Vor dem zweiten Waschen wurden die Zellsuspensionen durch einen 40 µm Filter filtriert. Die Zellen wurden jeweils in einem Volumen DPBS resuspendiert, dass sich aus der Anzahl Empfängermäuse x 0,12

ml ergibt. Damit wurde gewährleistet, dass die Zelldichte höher als 10^8 Zellen/ml war. Anschließend wurden die Zellen zweimal gezählt und auf eine Konzentration von 10^8 Zellen pro ml mit DPBS verdünnt. Die beiden Proben wurden 1:1 gemischt und den Empfängermausen in einem Volumen von 200 μ l iv. gespritzt.

4 h nach der Zelleinjektion wurden die Empfängermause getötet und deren Milz bzw. peripheren Lymphknoten entnommen. Dafür wurden bereits 6-Lochplatten mit jeweils 3 ml eiskaltem DPBS und 40 μ m Filter auf Eis vorbereitet. Das Gewebe wurde mittels Spritzenstempel durch den Filter gedrückt. 300 μ l des gemischten Filtrats wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1 μ l PI pipettiert und im FACS-Gerät analysiert. Dazu wurden mindestens 2000 Zellen der Referenzpopulation akquiriert. Die Berechnungen des %-Anteils an getöteten Zielzellen ergab sich folgendermaßen:

1. Berechnung der Rate für die behandelte bzw. unbehandelte Gruppe(n) =
$$\text{CFSE}^{\text{hoch}}\text{-Zellzahl} / \text{CFSE}^{\text{niedrig}}\text{-Zellzahl}$$
2. %-Anteil getöteter Zielzellen = $100 - ((100 \times \text{Rate}_{\text{behandelt}}) / \text{Rate}_{\text{unbehandelt}})$

2.6.14 ELISA

Durch ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) können Ag oder Ak in flüssigen Lösungen nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurde der ELISA hauptsächlich zur Bestimmung der anti-DT-Ak benutzt.

Zu Beginn des Tests wurden 96-Lochplatten (flacher Boden) mit DT beschichtet. Dies erfolgte durch Zugabe von 100 μ l pro Loch mit einer 3 μ g/ml konzentrierten DT-Lösung in Carbonatpuffer (pH 9,6; 50 mM $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$, steril) bei 4 °C ü/N. Mittels mehrmaligem Dekantieren der Flüssigkeit und wiederholtem Befüllen mit 200 μ l pro Loch PBS-Tween (PBS; 0,05 % Tween 20) wurden die Lochplatten dreimal gewaschen. Anschließend erfolgte das Blocken mittels Zugabe von 200 μ l pro Loch 0,2 %-igen Gelatinelösung in PBS (140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na_2HPO_4 ; 1,8 mM KH_2PO_4 ; pH 7,2) und Zugabe von 0,1% NaN_3 bei 4 °C ü/N. Die Platten wurden nun dicht mit Klarsichtfolie eingepackt und konnten nun für mehrere Monate bei 4 °C eingelagert werden.

Bevor die Probenlösung aufgetragen wurde, erfolgte wieder ein Waschschrift. Dann pipettierte man 100 µl pro Loch von dem zu untersuchenden Serum (Duplikate mit Verdünnungsreihe) bzw. Positiv- und Negativkontrollen in das jeweilige Loch und inkubierte 1h bei RT. Nach viermaligem Waschen der Platten mit PBS-Tween wurden 100 µl pro Loch peroxidasegekoppelter Zweitantikörper (gegen den zu analysierenden Ak gerichtet; 1:5000 in PBS-Tween) zugegeben und die Platten für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde wie oben beschrieben 5x gewaschen. Inzwischen wurde das 0,1% Orthophenylendiamin-Substrat (OPD-Substrat) in Substratpuffer (pH 6,0; 100 mM KH₂PO₄; steril) frisch gelöst (gemischt). Nach Ende der Inkubation wurde 0,1% (v/v) H₂O₂ zugegeben und zügig 100 µl pro Loch verteilt. Die Substratreaktion wurde unter Lichtausschluss ausgeführt und je nach Fortschritt nach 1-20 min durch Zugabe von 50 µl 2 M H₂SO₄ pro Loch gestoppt. Zur Auswertung der Farbreaktion wurde die optische Dichte der Lösungen im Multi-Photometer (Victor 1420; Perkin Elmer, Rodgau) bei 490 nm bestimmt.

2.6.15 Histologie

2.6.15.1 Gewebepräparation für histologische Färbungen

Die entnommenen Gewebe bzw. Organe wurden in sich langsam abkühlendem Isopentan (2-Methylbutan) schonend eingefroren. Mithilfe dieser Methode wurde ein Zerreißen der Gewebestruktur weitestgehend verhindert.

In einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Styroporbehälter wurde ein 400 ml-Becherglas platziert und mittels Eisengewicht beschwert. Ein 50 ml-Becherglas wurde mit etwa 20 ml Isopentan gefüllt, in flüssigem Stickstoff auf circa -50 °C abgekühlt und danach auf Eis zwischengelagert. Zum Einbetten der Gewebe bzw. Organe wurde Tissue-Tek[®] O.C.T. Compound (Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Niederlande) in beschriftete Einbetttschälchen gefüllt. Nun wurde das entnommene Gewebe bzw. Organ in das Einbetttschälchen gegeben und das Gewebe bzw. Organ blasenfrei mit zusätzlichem O.C.T. Compound bedeckt. Das Einbetttschälchen wurde in das 50 ml-Becherglas platziert und nach circa 5 min wurde das Becherglas auf das Eisengewicht des mittelgroßen Glasgefäßes gestellt, damit die Temperatur weiter sinken konnte. Nach weiteren 5 - 10 min wurden die Einbetttschälchen direkt in flüssigen Stickstoff überführt. Die Lagerung der Probe erfolgte bei -80 °C.

Die eingefrorenen Organe wurden am Kryostat bei ca. -20 °C bis -30 °C geschnitten (5-10 µm dünn), auf Objektträger aufgebracht, luftgetrocknet und anschließend für 5-

10 min in kaltem Azeton bei 4 °C fixiert (damit bleibt das Gewebe möglichst natürlich erhalten). Danach können die Schnitte mehrere Wochen bei -80 °C aufbewahrt werden.

2.6.15.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Bei der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H&E-Färbung) werden subzelluläre Bestandteile des Gewebes angefärbt. Hierbei färbt der Farbstoff Hämatoxylin die Nuklei dunkelviolett, während der rote Eosin-Farbstoff an Proteine des Zytoplasmas bindet. Zur Färbung von Gefrierschnitten wurden diese nach dem Trocknen 3 min in Hämatoxylin-Färbelösung (Sigma, Schnelldorf) getaucht, kurz mit H₂O gewaschen und dann 20 s in Differenzierungslösung (Sigma, Schnelldorf) inkubiert. Anschließend wurden die Präparate 2 bis 5 min in Eosinfärbelösung (Sigma, Schnelldorf; vor Gebrauch 0,5% (v/v) Essigsäure zugeben) getaucht. Nach kurzen Waschen mit H₂O wurden die Schnitte wie folgt dehydriert: 2x 2 min Eintauchen in 95% EtOH, 2x 2 min 100% EtOH und zuletzt 2x 2 min in Xylen. Die noch feuchten Schnitte wurden mit Acrytol überschichtet und mit einem Deckglas versiegelt.

2.6.15.3 DAB/Methylgrün-Färbung

Bei dieser indirekten immunhistologischen Färbung wurde im ersten Schritt ein spezifischer Ak (Primär-Ak) auf das zu untersuchende Gewebe aufgebracht. Im darauffolgenden Schritt wurde ein Ak aufgetragen, der den ersten Ak bindet (sogenannte Zweit- oder Sekundär-Ak). Dieser war biotinyliert und konnte daher von Streptavidin, welches mit einem Enzym (Meerrettichperoxidase) gekoppelt ist, gebunden werden. Meerrettichperoxidase löst die Farbentstehung per Enzym-Substrat-Reaktion aus, bei dem sich ein sichtbarer Farbstoff bildet. Hier wurde aus DAB (3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid) ein braunes Endprodukt gebildet und anschließend mit Methylgrün gegengefärbt.

Die Objektträger wurden zunächst bei RT 30 min unter einem Abzug getrocknet und die einzelnen Schnitte mit einem hydrophoben Stift (PapPEN, Zymed) umrandet. Die nachfolgenden Schritte erfolgten in einer mit feuchtem Zellstoff ausgelegten Kammer, um das Austrocknen der Schnitte zu verhindern. Zur Blockierung der Peroxidaseaktivität wurden die Schnitte für 10 min in 3 % H₂O₂/Methanol inkubiert und anschließend für 5 min in TBS (50 mM Tris-HCl pH 7,4 ; 150 mM NaCl; 5 mM MgCl₂·6H₂O) gewaschen. Zum Absättigen von unspezifischen Bindungsstellen wurden die Schnitte in 4 % FKS-TBS für 30 min bei RT inkubiert. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem Pri-

mär-Ak in 0,5 % FKS/TBS für 1 h bei RT. Dabei war auf eine optimale Konzentration, der Ak zu achten. Die Ak-Lösung wurde durch zweimaliges Waschen mit TBS zu je 3 min und abschließendem Waschen mit 0,5 % FKS/TBS (3 min) entfernt. Der biotinylierte Sekundär-Ak wurde für circa 30 min bei RT in einer Verdünnung von 1:200 in 0,5 % FKS/TBS inkubiert. Nun wurde die Streptavidin-Peroxidase-Lösung (ABC-Lösung, Vektor) vorbereitet und für 30 min bei RT inkubiert. Dafür wurden in je 2,5 ml sterilfiltrierten 0,5 M NaCl ein Tropfen der Lösung A bzw. ein Tropfen der Lösung B gegeben. Nach der Inkubation des Sekundär-Ak wurde wieder 3x jeweils 3 min in TBS gewaschen. Dann wurde die Lösung A mit Lösung B gemischt, auf die Schnitte pipettiert und für 30 min inkubiert. Anschließend wurde 2x für 3 min in TBS gewaschen und die Objektträger für 5 min in 0,1 M Tris pH 7,4 äquilibriert. In dieser Zeit wurde die 10 mg DAB-Tablette (Sigma, Schnelldorf) in 20 ml 0,1 M Tris (pH 7,4) gelöst und 1 μ l H₂O₂ dazugegeben. Zur Klärung der Lösung wurde ein 0,46 μ m Filter eingesetzt. Die Inkubation mit DAB erfolgte für 3 min und wurde mittels ddH₂O gestoppt. Das Gegenfärben der Schnitte geschah mit 1 %iger Methylgrünlösung für 1 min. Abschließend wurden die Objektträger 2x in 95 %igem Ethanol getaucht, 2x 2 min in 100%igem Ethanol dehydriert und 2x 2 min in Xylen inkubiert. In noch feuchtem Zustand wurden die Schnitte mit Xylen-haltigem Einbettmedium (Acrytol; Surgipath) überschichtet und mit einem Deckglas versiegelt. Die Ansicht und Aufnahme erfolgte mit einem Axiophot 2 Mikroskop plus AxioCam-Digitalkamera sowie Axiovision 3.1 Software (Carl Zeiss, Oberkochen).

2.7 Statistik

Mittelwerte wurden als arithmetisches Mittel mit ihrem Standardfehler berechnet. Zwei Messwertreihen wurden, wenn sie normal verteilt waren und eine vergleichbare Standardabweichung hatten, mit dem parametrischen Student's t-Test verglichen. Mehrere Vergleiche mit einer Kontrollgruppe wurden mit einer einseitig gerichteten Analyse der Varianzen (one-way-ANOVA) durchgeführt. Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant bezeichnet. Die Berechnungen wurden mit dem Programm SigmaStat 3.5 durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Depletion der DZ in CD11c.DOG-Mäusen

3.1.1 Nachweis der Transgenexpression in der CD11c.DOG-Maus

Da die von Steffen Jung hergestellten CD11c.DTR-Mäuse schon nach 3 DT-Injektionen sterben, bestand das Ziel ein besseres DZ-Depletionssystem in Mäusen zu etablieren (Kapitel 1.5) (Hochweller, Striegler et al., 2008; Jung, Unutmaz et al., 2002). Durch die Mikroinjektionen von Sabine Schmitt (DKFZ) und Frank van der Hoeven/Ulrich Kloz (DKFZ – Transgen-Service) wurden 3 transgene CD11c.DOG-Mäuse auf dem Hintergrund der C57BL/6-Linie generiert. Diese enthalten ein Transgen mit humanem DTR, einem Teil des Ovalbumingens (Aminosäuren 140-386) und eGFP unter einem CD11c-Promotor. Die Klonierung führte Prof. Dr. Natalio Garbi mit Hilfe von Günter Küblbeck (DKFZ) durch. Günter Küblbeck identifizierte freundlicherweise die positiven Tiere mittels Southern-Blot (CD11c.DOG.S1-S3; Abbildung 3.1).

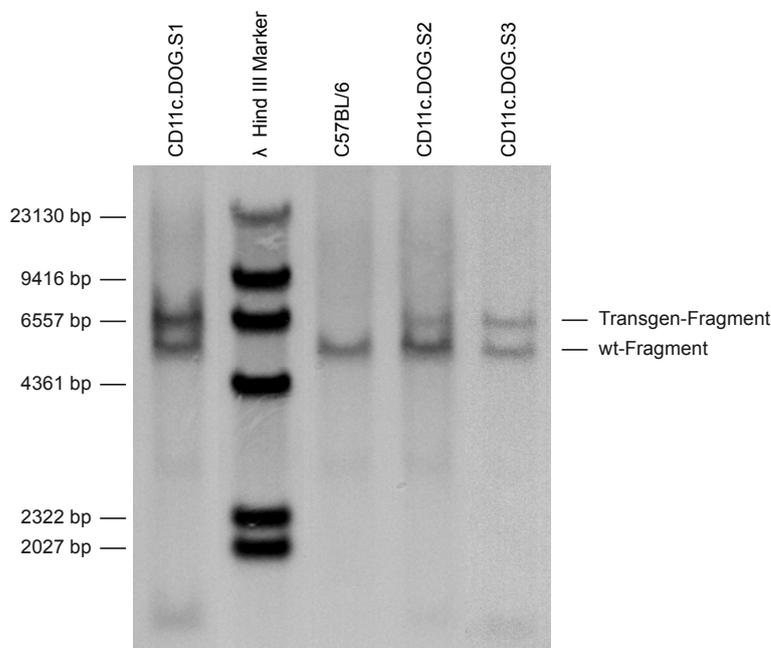


Abbildung 3.1: Identifizierung von transgenen CD11c.DOG-Mauslinien

Mit Southern Blot per CD11c-Sonde detektierte, genomische DNA von transgenen und nicht-transgenen Mäusen. Das Bild wurde freundlicherweise von G. Küblbeck (DKFZ) zur Verfügung gestellt.

3.1.1.1 Nachweis des funktionellen DT-Rezeptors

Die Depletion der DZ in diesem Mausmodell macht die korrekte Expression des DT-Rezeptors notwendig. Daher wurde zunächst die Expression und Funktionalität des DT-Rezeptors untersucht. Für die Kontrolle der DT-Rezeptorfunktion in den verschiedenen per Southern Blot identifizierten Mauslinien (CD11c.DOG-Linien S1 bis S3) und dem Vergleich der verschiedenen Mauslinien hinsichtlich ihrer Funktionalität für eine effektive Depletion der DZ wurden je 2 Tiere im Abstand von einem Tag 2x mit 8 ng/g Körpergewicht (KG) DT gespritzt. 24 h später wurden die Milzen der Tiere entnommen und nach mechanischer Separation mit einer Kollagenase/DNase-Lösung verdaut. Die Zellsuspension wurde hinsichtlich der DZ-spezifischen Zelloberflächenmoleküle mit anti-CD11c und anti-MHC-II-Ak gefärbt und im FACS-Gerät analysiert. Im Durchschnitt findet man in der Milz einer C57BL/6-Maus etwa 2 bis 3 % DZ (Abbildung 3.2 A). Diese Anzahl wurde in den Wildtypieren durch die DT-Injektion nicht reduziert (Abbildung 3.2 B). Die generierten CD11c.DOG-Mauslinien hingegen wiesen reduzierte Anteile an DZ auf (Abbildung 3.2 C-E). Linie 1 und 3 ermöglichten eine Depletion der DZ von durchschnittlich 35 % bzw. 27 % (Abbildung 3.2 C+E+G). Bei Mäusen der Linie 2 konnten eine Depletion von rund 92 % erreicht werden (Abbildung 3.2 D+G). Die Abbildung 3.2 F fasst den prozentualen Anteil an DZ aller Gruppen zusammen.

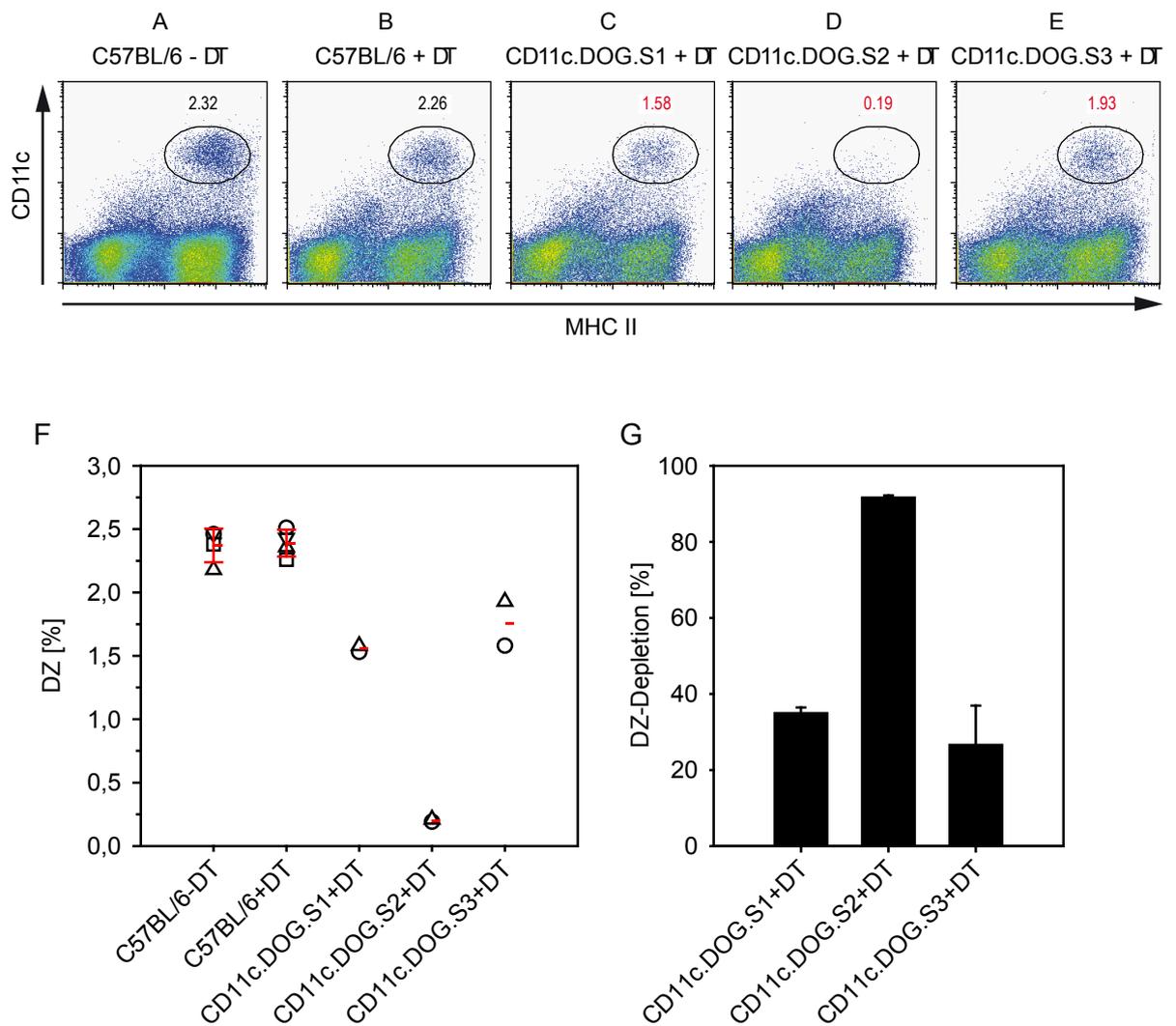


Abbildung 3.2: Vergleich der DZ-Depletion in verschiedenen CD11c.DOG-Linien

8ng/g KG DT wurde 2x im Abstand von 24 h ip. in je 2 Mäuse pro Gruppe injiziert. Nach weiteren 24 h wurden die Milzzellen präpariert und mittels FACS-Messung hinsichtlich DZ-Anzahl analysiert. Die in der Milzellsuspension enthaltenen Zellaggregate wurden mit Hilfe der Forward- und Side-Scatter-Signale ausgeschlossen. Tote Zellen wurden mittels positiver Propidiumiodidfärbung entfernt (ohne Abbildung). Es wurde jeweils der prozentuale Anteil an DZ von der Gesamtzellzahl (A-F) bzw. die proz. DZ-Depletion (G) angegeben.

Aufgrund der hier gezeigten Ergebnisse wurden alle weiteren Experimente mit den CD11c.DOG-Mäusen der Linie S2 durchgeführt, welche fortan als CD11c.DOG bezeichnet wird.

3.1.1.2 eGFP im Fusionsprotein ist nicht funktional

Für die Identifizierung der transgenen DZ wurde ein eGFP-Gen in das Transgen-Konstrukt der CD11c.DOG-Mäuse eingefügt. Zur Bestimmung der eGFP-Expression in DZ wurde in den verschiedenen CD11c.DOG-Linien und in CD11c.DTR-Mäusen (als Positiv-Kontrolle) Milzzellen durchflusszytometrisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass

die CD11c⁺-DZ und auch alle CD11c⁻-Zellen eGFP⁻ sind (in Abbildung 3.3 ist als Beispiel die CD11c.DOG.S2-Linie gezeigt). Der eGFP-Teil des Fusionsproteins scheint somit nicht funktionsfähig zu sein. Die Ursache dafür ist nicht bekannt, es könnte jedoch an einer falschen Faltung des Fusionsproteins liegen, da das Ovalbumin darin nur als Fragment vorliegt (Aminosäuren 140-386).

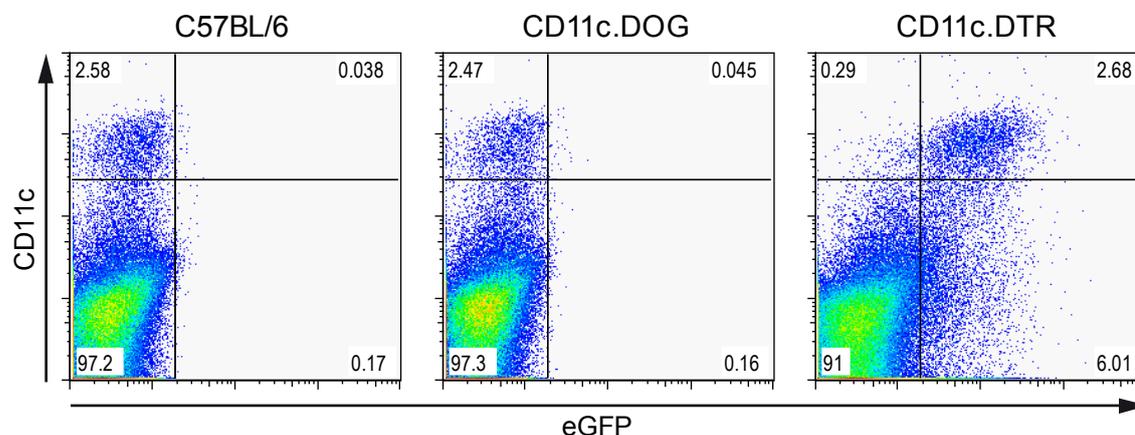


Abbildung 3.3: eGFP Expression in CD11c.DOG-Mäusen ist nicht funktional

Zur Bestimmung der eGFP-Expression wurden Milzzellen durchflusszytometrisch analysiert. Die gezeigten CD11c.DOG-Zellen sind von der Mauslinie CD11c.DOG.S2. C57BL/6-Zellen dienen als Negativ-Kontrolle und CD11c.DTR-Zellen als Positiv-Kontrolle.

3.1.1.3 Nachweis der immundominanten Ovalbumin-Peptide in CD11c.DOG-Mäusen

Ovalbumin (Eialbumin) ist in Mäusen ein Fremdprotein. In den CD11c.DOG-Tieren enthält das Transgen einen Teil des Ovalbumingens (Aminosäuren 140-386). Es entstehen somit ausschließlich Ovalbumin-Proteinfragmente. Diese werden von DZ prozessiert und präsentiert. Aufgrund der Instabilität des Ovalbuminfragmentes wird eine sehr gute Präsentation der Peptide erwartet. Dies kann zur Klärung der Frage, ob das Transgen in CD11c.DOG-Mäusen exprimiert wird, obwohl die Zellen wie in Kapitel 3.1.1.2 gezeigt eGFP⁻ sind, eingesetzt werden. Dazu wurden 10⁶ CFSE-markierte OT-I-Zellen (CFSE = 5,6-Carboxyfluoreszein Succinimidyl Ester), welche einen K^b:OVA₂₅₇₋₂₆₄-spezifischen TZR besitzen, in CD11c.DOG- & C57BL/6-Mäuse iv. transferiert (Hogquist, Jameson et al., 1994). Ebenso wurden CFSE-markierte OT-II-T-Zellen in weitere CD11c.DOG- & C57BL/6-Mäusen transferiert (3,8 x 10⁶ OT-II-Zellen). OT-II-T-Zellen tragen einen Ovalbumin-spezifischen TZR auf ihrer Oberfläche, welcher das Peptid OVA₃₂₃₋₃₃₉ an MHC-Klasse-II gebunden erkennt. Wird das Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ durch K^b (MHC-Klasse-I) oder OVA₃₂₃₋₃₃₉ durch MHC-Klasse-II auf den DZ präsentiert, so werden

die OT-I- bzw. OT-II transgenen CFSE-markierten T-Zellen aktiviert und teilen sich. Diese Teilung kann man durch die CFSE-Markierung messen. Bei jeder Zellteilung erfolgt eine Halbierung der CFSE-Menge pro Zelle. Dies wird durch die abnehmende Fluoreszenzintensität in der durchflusszytometrischen Messung sichtbar.

Um die adoptiv transferierten OT-I- bzw. OT-II-T-Zellen in der transgenen Maus wiederzufinden, bedient man sich eines pan-T-Zelloberflächenmarkers (Thy1.1). Thy1 (*Thymocyte differentiation antigen 1*) ist ein Oberflächenantigen, welches zur Identifizierung von Spender-T-Zellen in den Empfängertieren benutzt wird. Da die verwendeten OT-I/II-Zellen Thy1.1 exprimieren, können diese von den hier eingesetzten CD11c.DOG- und C57BL/6-Zellen, welche Thy1.2 exprimieren, per Thy1.1-Ak-Färbung differenziert werden. 70 h nach der Injektion der OT-I- bzw. OT-II-CFSE⁺-Zellen in CD11c.DOG- bzw. C57BL/6-Mäusen wurden die Milzzellen der Empfängertiere entnommen und auf die CFSE-Intensität der Spenderzellen analysiert (Schema des Experiments in Abbildung 3.4 A).

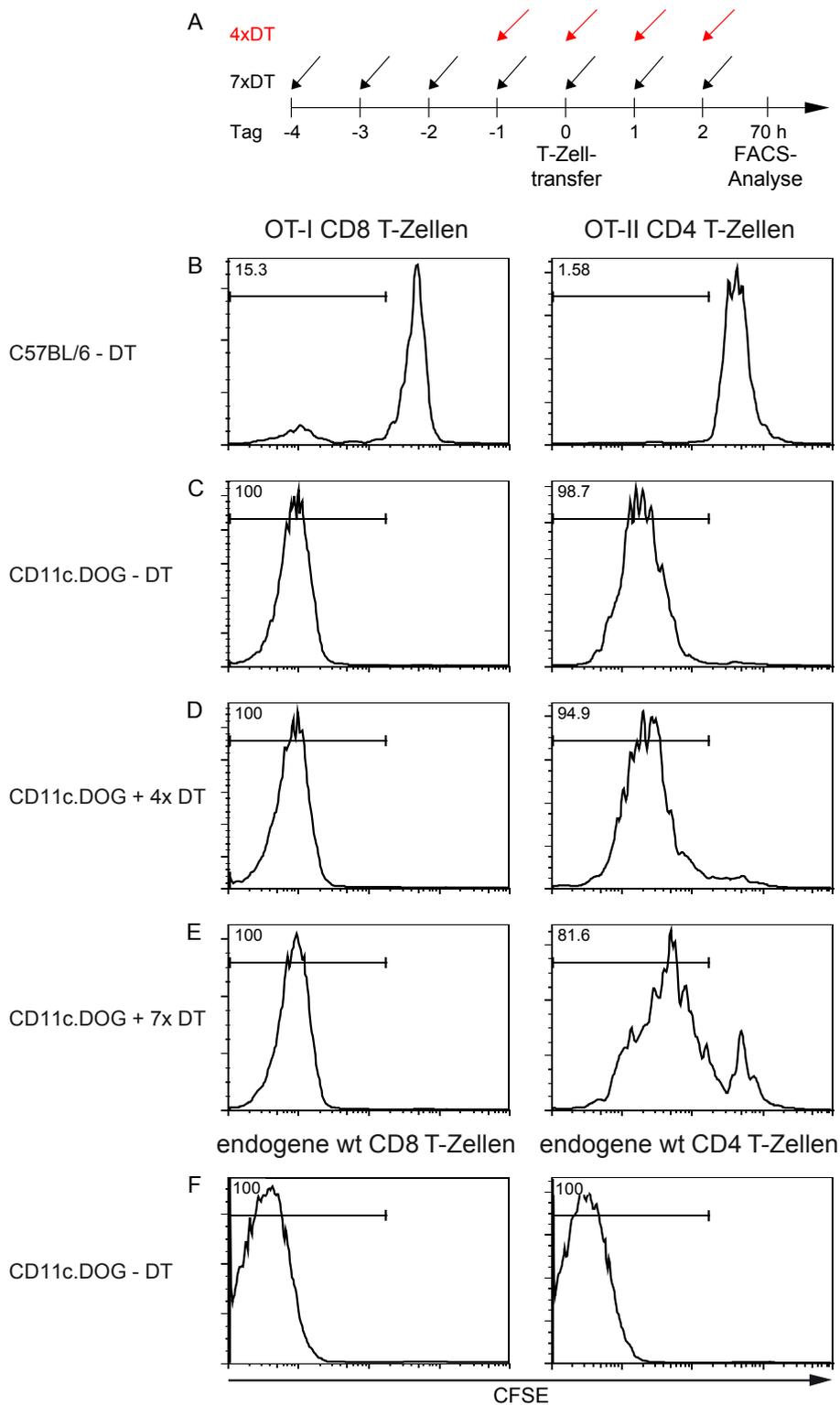


Abbildung 3.4: Nachweis der immunodominanten Peptide des Ovalbumins in CD11c.DOG-Mäusen mittels OT-I/II-Zellteilung

70 h nach dem OT-I- bzw. OT-II-Zelltransfer erfolgte die Analyse der Proliferation dieser Zellen per FACS. Die DT-Injektionen erfolgten täglich ab dem 1. bzw. 4. Tag (4x /7x DT) vor dem T-Zell-Transfer. Links sind vitale CFSE-markierte Thy1.1⁺CD8⁺ T-Zellen (OT-I) und rechts vitale CFSE-markierte Thy1.1⁺CD4⁺ Zellen (OT-II) abgebildet. Schema des Experiments (A). Gezeigt wird die Teilung der CFSE-markierten OT-I/II-Zellen in C57BL/6-Mäusen (B) & CD11c.DOG-Mäusen (C) ohne Gabe von DT, nach 4-maliger (D) bzw. 7-maliger DT-Gabe (E). Als Negativkontrolle sind die endogenen CD8 bzw. CD4 T-Zellen gezeigt (F).

C57BL/6-Mäuse exprimieren kein Ovalbumin. Daher können OT-I/II-T-Zellen nicht aktiviert werden und zur Zellteilung übergehen (Abbildung 3.4 B). Aus den Histogrammen in Abbildung 3.4 C ist klar erkennbar, dass die OT-I- und auch OT-II-T-Zellen sich in CD11c.DOG-Mäusen ohne DT mehrfach geteilt haben (ersichtlich durch abnehmende CFSE-Färbung im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen). Damit ist bewiesen, dass das Transgen exprimiert und Ovalbumin präsentiert wird. In Abbildung 3.4 F sind die endogenen CD8 bzw. CD4 T-Zellen als Negativ-Kontrolle gezeigt.

Zusätzlich sollte der Einfluss der DZ-Depletion auf die Zellteilung der OT-I- bzw. OT-II-T-Zellen untersucht werden. Durch die Depletion der DZ herrscht in CD11c.DOG-Mäusen eine starke Reduktion von präsentierten OVA₂₅₇₋₂₆₄ und OVA₃₂₃₋₃₃₉ Peptiden. Dadurch können spezifische T-Zellen weniger effektiv aktiviert werden. Für diese Analysen erhielten 2 Gruppen von CD11c.DOG-Mäusen täglich ab dem 1. bzw. 4. Tag vor dem T-Zelltransfer DT-Injektionen (4x bzw. 7x DT; Abbildung 3.4 A).

OT-I- bzw. OT-II-T-Zellen teilten sich mehrfach in CD11c.DOG-Mäusen mit DT-Behandlung (Abbildung 3.4 D+E). Interessant ist der Unterschied der Proliferation der OT-II-T-Zellen (CD4⁺) bei 4- oder 7-maliger DT-Injektion (94,9 % gegenüber 81,6 % der OT-II-CD4⁺-Zellen teilten sich). Ist die DZ-Depletion langanhaltender (7x DT) wird weniger Ovalbumin durch DZ präsentiert und OT-II-T-Zellen teilen sich langsamer. Bei den CD11c.DOG-Mäusen denen OT-I-Zellen injiziert wurden, reicht die 7-malige DZ-Depletion nicht um die OT-I-Zellteilung merklich zu reduzieren.

Durch die Teilung der OT-I- und OT-II-T-Zellen konnte gezeigt werden, dass die immundominanten Ovalbumin-Peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ und OVA₃₂₃₋₃₃₉ in CD11c.DOG-Mäusen exprimiert werden. Die vergleichbare Proliferation der OT-I- bzw. OT-II-T-Zellen im Verhältnis mit/ohne DZ-Depletion (4-malige DT-Injektion) weist auf die hohe Sensibilität dieser T-Zellen hin.

Hieraus lässt sich schließen, dass für die Zellteilung der OT-I- bzw. OT-II-T-Zellen schon die übrigen etwa 5 – 10 % Peptid-präsentierenden DZ ausreichend sind.

3.1.2 CD11c.DOG-Mäuse überleben im Vergleich zu CD11c.DTR-Mäusen wiederholte DT-Injektionen

In Kapitel 3.1.1.1 wurde die erfolgreiche Expression des humanen DTR in den CD11c.DOG.S2-Tieren anhand der starken Depletion der DZ nach Injektion von DT gezeigt. Nun war zu klären, ob auch wiederholte Gaben von DT, keinen schädigenden

Einfluss auf die Mäuse haben. Diese möglichen Einschränkungen leiteten sich von den Erfahrungen mit den CD11c.DTR-Mäusen ab. Jung und Kollegen beschrieben, dass CD11c.DTR-Mäuse nach wiederholten DT-Injektionen sterben (Jung, Unutmaz et al., 2002; Probst und van den Broek, 2005).

Die von Jung et al. beschriebenen Ergebnisse konnte mit dessen CD11c.DTR-Tieren bestätigt werden. Jeden 2. Tag wurde den Mäusen DT oder PBS ip. verabreicht. Dies ist für eine bestmögliche Depletion notwendig, da die Neupopulation der DZ sehr schnell erfolgt (dazu die Depletionskinetik in Abbildung 3.11). Die verwendeten DT-Mengen von 4 und 8 ng/g KG DT entsprechen den üblichen Mengen für die DZ-Depletion in CD11c.DTR- bzw. CD11c.DOG-Mäusen (Jung, Unutmaz et al., 2002). Bereits nach 5 Tagen waren mehr als 50 % der CD11c.DTR-Mäuse tot (grüne Linie in Abbildung 3.5). Spätestens nach 7 Tagen starben alle CD11c.DTR-Mäuse. Dies entspricht 4 DT-Injektionen a 4 ng/g KG DT. Die Ursache für das DT-verschuldete Sterben ist nicht bekannt. Im Gegensatz dazu überlebten die CD11c.DOG- und die C57BL/6-Mäuse (Abbildung 3.5, türkisfarbene bzw. schwarze Linie).

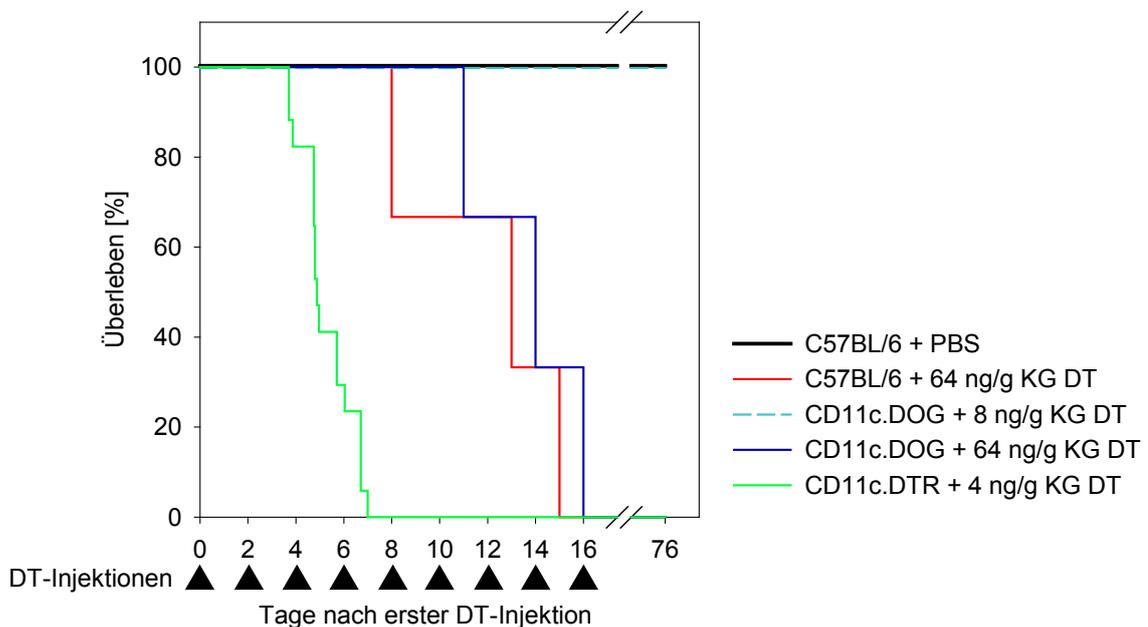


Abbildung 3.5: Überleben der CD11c.DTR- und CD11c.DOG-Mäuse nach wiederholten DT-Injektionen

Zur Bestimmung des Einflusses von verschiedenen DT-Konzentrationen auf das Überleben der Mäuse wurde in einem Abstand von jeweils 2 Tagen den C57BL/6-Mäusen PBS bzw. 64 ng/g KG DT, den CD11c.DOG-Mäusen DT 8 oder 64 ng/g KG DT sowie den CD11c.DTR-Mäusen 4 ng/g KG DT durch intraperitoneale Injektion appliziert. Die verwendeten DT-Mengen von 4 und 8 ng/g KG DT entsprechen den Standardmengen für die DZ-Depletion in der Milz dieser Tiere. Anzahl der untersuchten Tiere: CD11c.DTR n=17; CD11c.DOG + 8 ng/g KG DT n=3-17; CD11c.DOG/C57BL/6 + 64 ng/g KG DT n=3; C57BL/6 + PBS n=3-17.

Im nächsten Experiment wurde der Einfluss von DT mit einer Konzentration von 32 und 64 ng/g KG DT in C57BL/6- und CD11c.DOG-Mäusen im Vergleich mit 8 ng/g KG DT untersucht. Dies war nötig, da in manchen Organen (z.B.: Lymphknoten) die DZ-Depletion bei Standard-DT-Injektionen nicht das gleiche Ausmaß wie in der Milz erreichte (Abbildung 3.9). In der Abbildung 3.6 sind die Gewichtsveränderungen von C57BL/6- und CD11c.DOG-Mäusen dargestellt, welche über einen Zeitraum von 76 Tagen jeden zweiten Tag mit PBS (zur Kontrolle) oder verschiedenen DT-Konzentrationen ip. gespritzt wurden. Wurde die Dosis bei C57BL/6- und CD11c.DOG-Mäusen auf 64 ng/g KG DT erhöht, trat ab Tag 5 bis 8 ein Gewichtsverlust von etwa 3 - 12 % auf (Abbildung 3.6, rote bzw. dunkelblaue Linie). Dieser steigerte sich vom Tag 7 bis 14 auf 18 – 38 %, worauf die Tiere am nächsten Tag verstarben (Abbildung 3.6, sowie als Vergleich zu den CD11c.DTR-Mäusen als rote & dunkelblaue Linie in Abbildung 3.5). C57BL/6- und CD11c.DOG-Mäuse überlebten die hohen DT-Dosen für ca. 2 Wochen. Aufgrund des Sterbens von C57BL/6-Mäusen kann das Transgen als Ursache ausgeschlossen werden. Möglicherweise ist die wiederholte Injektion der DT-Menge von 64 ng/g KG DT ausreichend, um den murinen DT-Rezeptor (dieser besitzt nur eine sehr geringe Affinität für DT) zu binden und C57BL/6- und CD11c.DOG-Mäusezellen zu zerstören. Eine unspezifische Aufnahme von DT in die Zellen wäre als Ursache ebenso denkbar.

Wurde jedoch die niedrige Standarddosis von 8 ng/g KG DT oder PBS (zur Kontrolle) aller 2 Tage in C57BL/6- bzw. CD11c.DOG-Mäuse appliziert, zeigte dies keine Auffälligkeiten im Gesundheitszustand der getesteten Tiere (z. B.: bei Fellpflege, Bewegung und sonstigem Verhalten; Daten nicht gezeigt) und die Tiere überlebten bis zum Ende des Experiments (76.Tag; Abbildung 3.6).

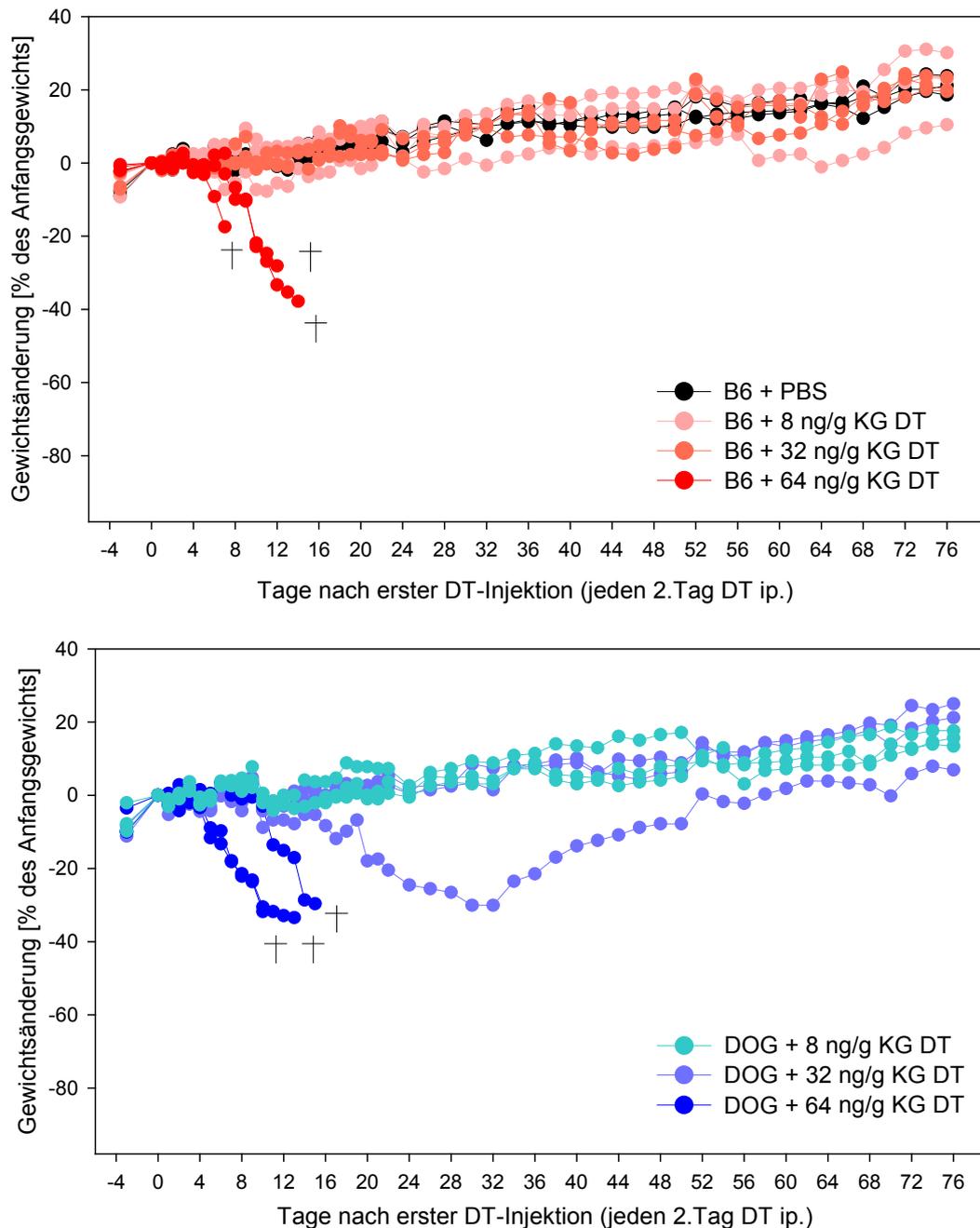


Abbildung 3.6: Gewichtsveränderung von C57BL/6- und CD11c.DOG-Mäusen nach wiederholten Injektionen von unterschiedlichen DT-Konzentrationen

Untersuchung des Einflusses von verschiedenen DT-Konzentrationen auf den Gesundheitsstatus von C57BL/6- und CD11c.DOG-Mäusen über einen Zeitraum von 76 Tagen (beobachtet durch die Gewichtsänderung). In einem Abstand von 2 Tagen wurden den Mäusen DT oder PBS ip. appliziert. Dabei wurden folgende Konzentrationen verwendet: 8, 32 & 64 ng/g KG. Pro Gruppe wurden 3 Tiere untersucht. † Tod des Tieres.

Wie bereits erwähnt, starben C57BL/6- und CD11c.DOG-Mäuse bei kontinuierlicher ip. Injektion von 64 ng/g KG DT. Eine von 3 CD11c.DOG-Mäusen, welcher 32 ng/g KG DT injiziert wurde, verlor nach 14 Tagen zunehmend Gewicht (bis zu 30 %). Ihr Gewicht

stabilisierte sich und erreichte nach 52 Tagen wieder das Anfangsgewicht. Möglicherweise liegt diese injizierte Menge an der Grenze zur DT-Verträglichkeit der Tiere. Mäuse, welche 8 ng/g KG DT gespritzt bekamen, nahmen wie die Kontrollgruppe mit PBS an Gewicht zu. Langzeitexperimente mit wiederholten DT-Injektionen sind somit bei einer Dosis von 8 ng/g KG DT pro Injektion problemlos möglich.

3.1.3 Depletion der DZ in lymphoiden Organen

Im folgenden Experiment wurde die Depletion von DZ in verschiedenen lymphoiden Organen untersucht. Zuerst wurde die Milz analysiert. Nach Einmalinjektion mit 8 ng/g KG DT ip. wurde den Versuchstieren (C57BL/6- & CD11c.DOG-Mäuse) sowie den unbehandelten Kontrolltieren (C57BL/6- & CD11c.DOG-Mäuse) die Milz entnommen und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Dazu wurde die Milz mit einer *Clostridium histolyticum* Kollagenase/DNase I Lösung bei RT verdaut. Anschließend wurde die Einzelzellsuspension mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Ak gegen die Oberflächenproteine CD11c und MHC-Klasse-II gefärbt und mittels FACS analysiert (Abbildung 3.7). Gleichzeitig wurde die Gesamtzellzahl bestimmt.

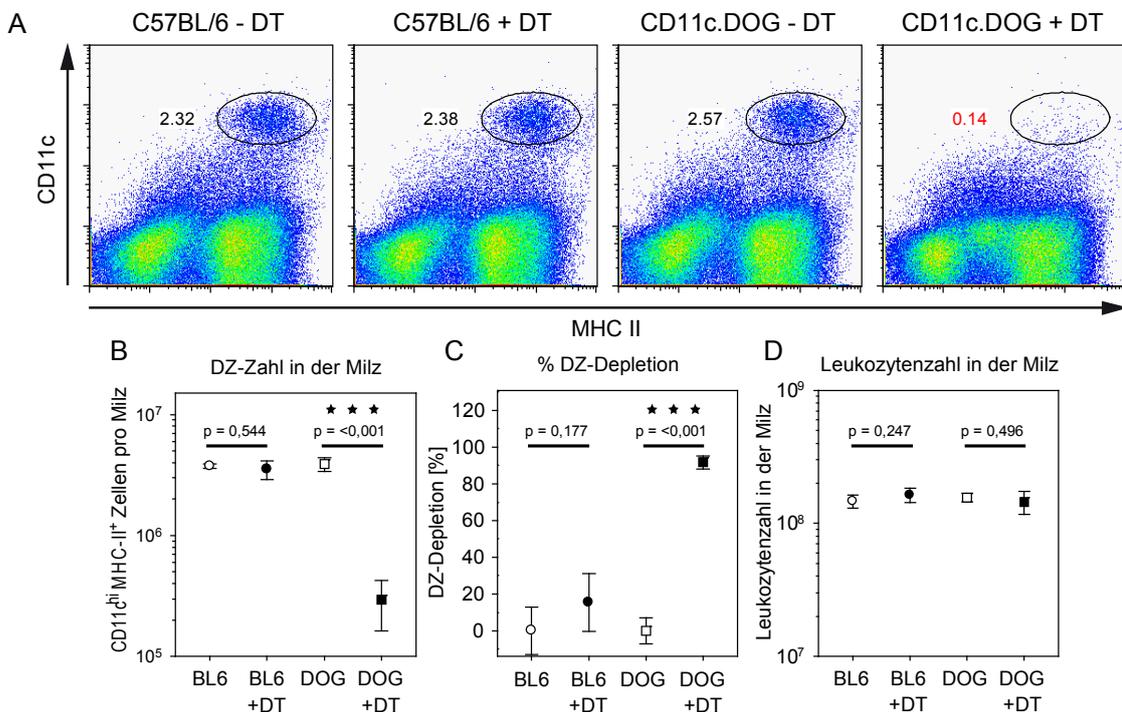


Abbildung 3.7: DZ-Depletion in der Milz von CD11c.DOG-Mäusen nach einmaliger DT-Gabe

Gezeigt sind DZ von C57BL/6- und CD11c.DOG-Mäusen ohne & mit Gabe von DT (A). 8ng/g KG DT wurde ip. in je 4 Mäuse pro Gruppe injiziert. Nach 24 h wurden die Milzzellen präpariert und hinsichtlich ihres DZ-Gehalts analysiert. Der prozentuale Anteil an DZ von der Gesamtzellzahl wird jeweils angegeben. Die Diagramme zeigen die absolute DZ-Zahl (B), prozentuale DZ-Depletion (C) und Leukozytenzahl der Milz (D).

Wie bereits in Abbildung 3.2 gezeigt, induziert DT in den CD11c.DOG.S2-Mäusen bei zweimaliger Injektion eine DZ-Depletion von $\sim 92\%$. Bei einmaliger DT-Injektion wurde eine nahezu vollständige DZ-Depletion (MHC II⁺CD11c^{hoch}-Zellen) in der Milz von CD11c.DOG-Mäusen erreicht (ca. 92 %; CD11c.DOG + DT in Abbildung 3.7 A+C). Wie in Diagramm D ersichtlich, sind keine signifikanten Differenzen der Milz-Leukozytenzahl zwischen den verschiedenen Gruppen festzustellen.

Als Ergebnis kann zusammengefasst werden, dass auch eine einmalige DT-Injektion für eine über 90 %-ige DZ-Depletion (über 24 h) in der Milz ausreichend ist.

3.1.3.1 Depletion der DZ-Subtypen in der Milz

In der vorangegangenen Analyse wurde nur die Gesamtpopulation der DZ betrachtet. Daraufhin stellten sich folgende Fragen:

- Werden die unterschiedlichen cDZ-Subtypen gleichwertig depletiert?
- Werden auch die pDZ eliminiert?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden CD11c.DOG- und C57BL/6-Mäuse einmal mit 8 ng/g KG DT gespritzt und die Milzzellen mittels Durchflusszytometrie analysiert.

In Abbildung 3.8 A wird zunächst der Anteil an lymphoiden (CD8⁺CD4⁻) und myeloiden (CD8⁻CD4⁺ & CD8⁻CD4⁻) DZ in C57BL/6-Mäusen gezeigt. Rund 17 % der DZ sind lymphoide (CD8⁺CD4⁻) DZ. 53 % aller DZ gehören zur Gruppe der myeloiden (CD8⁻CD4⁺) DZ, ca. 26 % sind myeloide CD8⁻CD4⁻ DZ und ein Rest von 5 % sind CD8⁺CD4⁺ Zellen. Lymphoide (CD8⁺CD4⁻) und myeloide (CD8⁻CD4⁺) DZ wurden zu gleich starken Anteilen (96 %) bei DT-Injektion in CD11c.DOG-Mäuse eliminiert (Abbildung 3.8 B+C). In Abbildung 3.8 B wird die Abnahme der absoluten Anzahl an DZ-Subtypen nach Depletion gezeigt. Myeloide CD8⁻CD4⁻ DZ wurden zu etwa 80 % depletiert (Abbildung 3.8 C). In den Abbildung 3.8 D-F werden die pDZ gezeigt. Sie kommen zu etwa 1 % in der Milz von naiven C57BL/6-Mäusen vor (Abbildung 3.8 D). Identifiziert wurden sie mittels des mPDCA-1 Ak (*mouse plasmacytoid dendritic cell antigen 1*). Abbildung 3.8 E zeigt die pDZ-Gesamtzellzahl in der Milz von C57BL/6- & CD11c.DOG-Mäusen unter Einfluss von DT. Wie in der Abbildung 3.8 F zu erkennen ist, erreicht die pDZ-Depletion Werte von etwas über 60 %. Ein Grund für die geringere Eliminierungsrate von pDZ im Vergleich zu cDZ könnte die geringere CD11c-Expression (Faktor 10) der pDZ sein (Nakano, Yanagita et al., 2001). Dies ist in Abbildung 3.8 D gut zu erkennen.

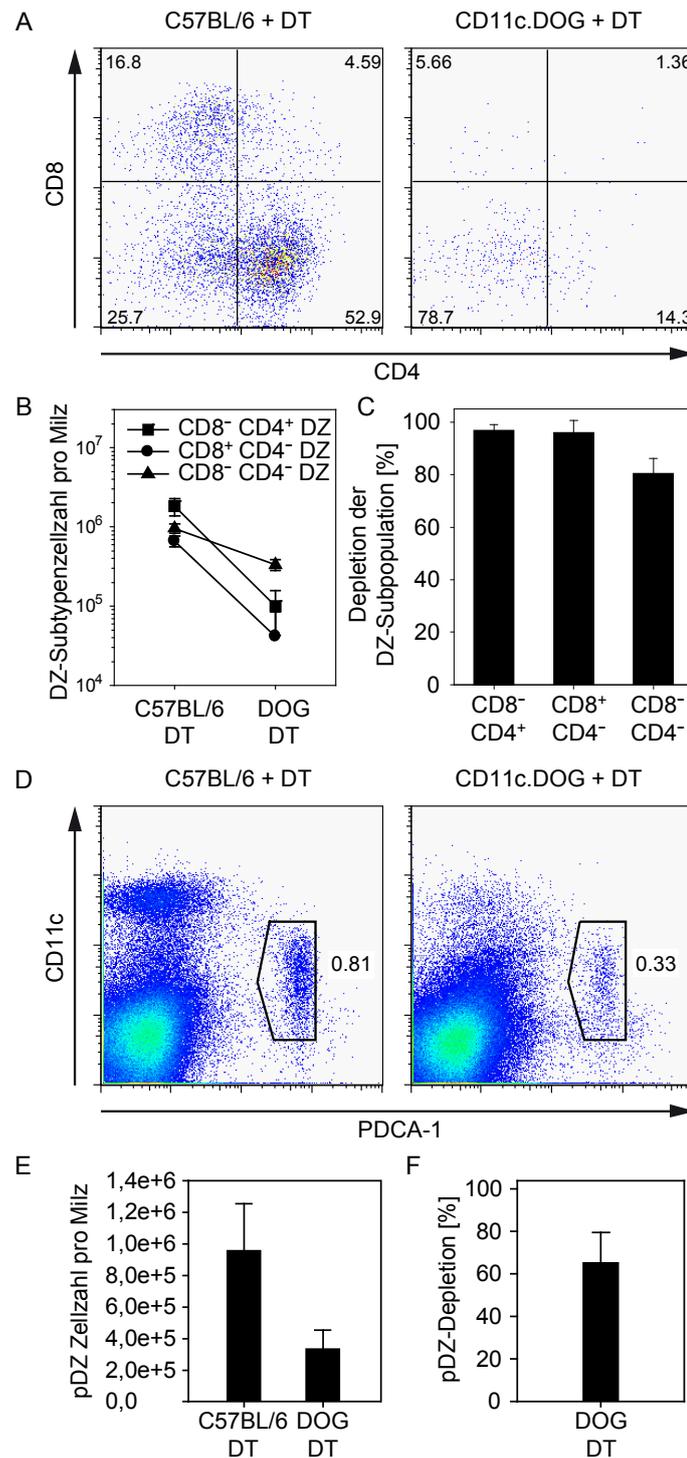


Abbildung 3.8: Depletion verschiedener cDZ-Subpopulationen und pDZ in CD11c.DOG-Mäusen nach einmaliger DT-Gabe

C57BL/6- und CD11c.DOG-Mäusen wurde 8 ng/g KG DT ip. injiziert und 24 h später die Milzzellen mittels FACS analysiert. Die Teilabbildung A zeigt MHC II⁺CD11c^{hoch}-Zellen (cDZ-Subtypen) in C57BL/6- & CD11c.DOG-Mäusen nach einmaliger DT-Gabe. In B wird die Gesamtzellzahl und in C die Depletion der verschiedenen cDZ-Subtypen in C57BL/6- & CD11c.DOG-Mäusen nach einmaliger DT-Injektion gezeigt. In D werden pDZ anhand ihrer PDCA-1 und CD11c-Expression im FACS-Diagramm dargestellt. Teilabbildung E gibt einen Überblick über die pDZ-Gesamtzellzahl der Milz in C57BL/6- & CD11c.DOG-Mäusen nach einmaliger DT-Gabe. In Teilabbildung F wird die pDZ-Depletion in CD11c.DOG-Mäusen gezeigt (zur Ermittlung wurden C57BL/6-Mäuse + DT als Referenz verwendet). n=4.

Insgesamt wird eine gleichmäßig hohe Depletion (96 %) der konventionellen DZ (cDZ; lymphoiden und myeloiden DZ) nach einmaliger DT-Gabe erreicht. Plasmazytoide DZ werden zu etwa 60 % eliminiert.

3.1.3.2 Vergleich der Depletion von DZ in lymphoiden Organen

Nun wurde der Einfluss der DT-vermittelten DZ-Depletion in den anderen lymphoiden Organen, wie den primären (zentralen) lymphoiden Organen (wie Knochenmark - KM - und Thymus - Thy) sowie in sekundären (peripheren) lymphoiden Organen, den Lymphknoten (Lk), untersucht.

Dazu wurde einmalig eine Dosis von 8 ng/g KG DT in CD11c.DOG-Mäuse injiziert (C57BL/6-Mäuse dienten als Kontrolle). Als Positivkontrolle (Referenz für die erfolgreiche Depletion von DZ in CD11c.DOG-Mäusen) dienten Milzzellen mit einer DZ-Depletion von ca. 90 % (Abbildung 3.9 A+B).

In den Lk (Mix aus inguinalen, axialen und brachialen Lk) beträgt bei dieser Dosis die DZ-Depletion 50 %, im KM 53 % und im Thy 75 % (Abbildung 3.9 B). Die Ergebnisse in Abbildung 3.9 zeigen, dass mit der Standarddosis von 8 ng/g KG DT und einer Einmalinjektion nur eine partielle Depletion in Lk, KM und im Thy zu erreichen ist.

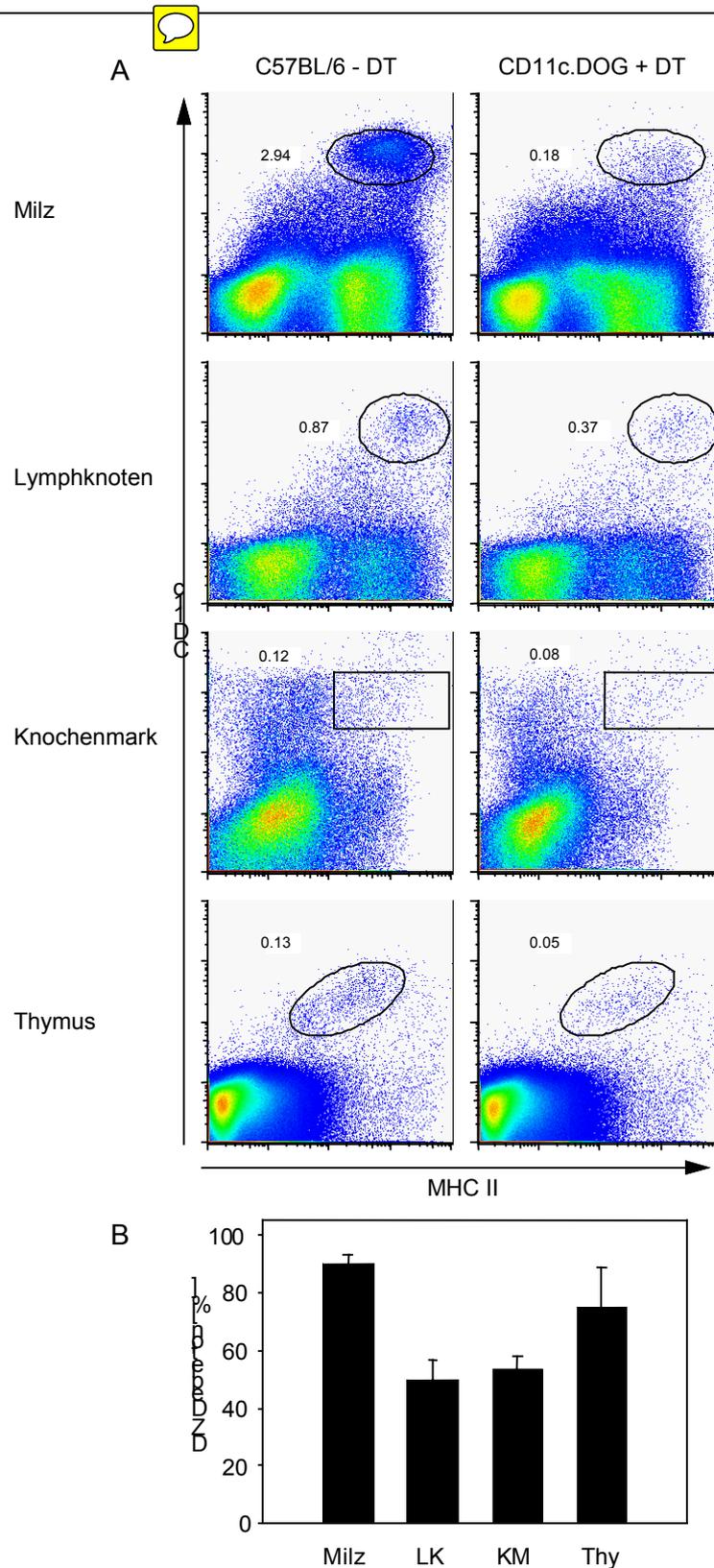


Abbildung 3.9: DZ-Depletion in primären & sekundären lymphoiden Organen von CD11c.DOG-Tieren

Dotplot-Darstellung der cDZ (A) bzw. DZ-Depletion (B) in verschiedenen lymphoiden Organen in C57BL/6- und CD11c.DOG-Mäusen nach 1x DT-Gabe. C57BL/6- und CD11c.DOG-Mäusen wurde einmalig mit 8 ng/g KG DT ip. injiziert, 24 h später die Zellen aufgereinigt und per Durchflusszytometrie analysiert (Milz n=28. LK n=4. KM n=4. Thy n=3.).

3.1.3.3 Erhöhte DT-Mengen steigern die erreichbare DZ-Depletion in LK, KM und Thymus

Da bei einer Dosis von 8 ng/g KG DT nur eine partielle DZ-Depletion in Lk, KM und Thy erreicht wurde, wurde als nächstes ein DT-Titrationsexperiment durchgeführt, um eine Konzentration zur vollständigen Depletion von DZ in diesen lymphoiden Organen zu ermitteln.

Zur Untersuchung, ob eine Steigerung der DT-Dosis die DZ-Depletion in den zuvor untersuchten Organen (Milz, Lk, KM, Thy) erhöhen kann, wurde folgendes Experiment durchgeführt. Es wurden verschiedene DT-Mengen (8, 32 & 64 ng/g KG DT) ip. injiziert, nach 24h die Zellen der verschiedenen Organe (Milz, Lk, KM & Thy) präpariert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. In Abbildung 3.10 sind die erreichten DZ-Depletionen dargestellt. Hierbei wird deutlich, dass in der Milz eine fast vollständige Depletion im Bereich von 8 - 64 ng/g KG DT erzielt wird. In den Lk (Mix aus inguinalen, axialen und brachialen Lk) und im KM, steigt die DZ-Depletion mit zunehmender DT-Dosis an und erreicht Werte von 90,4 % (LK) bzw. 70,3% (KM) bei 64 ng/g KG DT. Im Thy beträgt die Depletion bei 8 ng/g KG DT 66 % und nimmt ebenfalls bei steigender Dosis zu (84 %).

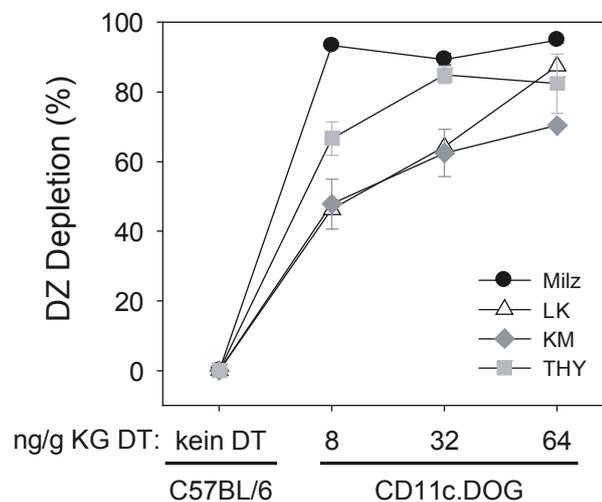


Abbildung 3.10: DT-Titration zur Analyse der DZ-Depletion in lymphoiden Organen

CD11c.DOG-Mäuse wurde einmalig 8, 32 oder 64 ng/g KG DT ip. injiziert. Als Kontrolle dienten C57BL/6-Mäuse. 24h später wurden die Zellen aufgereinigt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die DZ-Depletion basiert auf Prozentwerten der DZ-Zahl der jeweiligen Gewebe in C57BL/6- im Vergleich zu CD11c.DOG-Mäusen. Gezeigt wird der Mittelwert mit dem Durchschnittsfehler der Standardabweichung. Milz n=3-4. LK n=3. KM n=3. Thy n=3-4.

Für kurzzeitige Experimente (Abbildung 3.6), bei denen DZ in KM, Lk und Thy nahezu vollständig eliminiert werden sollen, sollte eine Dosis von 64 ng/g KG DT angewendet werden. Für die DZ-Depletion in der Milz sind 8 ng/g KG DT bereits ausreichend.

3.1.3.4 Kinetik der DZ-Depletion in der Milz nach Einmalinjektion von DT

Für Untersuchungen bei denen für Wochen DZ-defiziente Mäuse benötigt werden, ist es unbedingt nötig zu wissen, in welchem Intervall DT injiziert werden muss, damit die DZ-Depletion möglichst hoch ist. Um diese Frage beantworten zu können, wurde nach einer einmaligen DT-Injektion bestimmt, zu welchem Zeitpunkt DZ im Organismus wieder auftreten. Es wurde ein Experiment mit CD11c.DOG-Mäusen durchgeführt, bei der eine einmalige DT-Dosis von 8 ng/g KG DT verabreicht und nach bestimmten Zeitpunkten (Tag 1, 2, 4, 7, 14) der Anteil an DZ ermittelt wurde. In Abbildung 3.11 sind die DZ- bzw. pDZ-Anteile dargestellt.

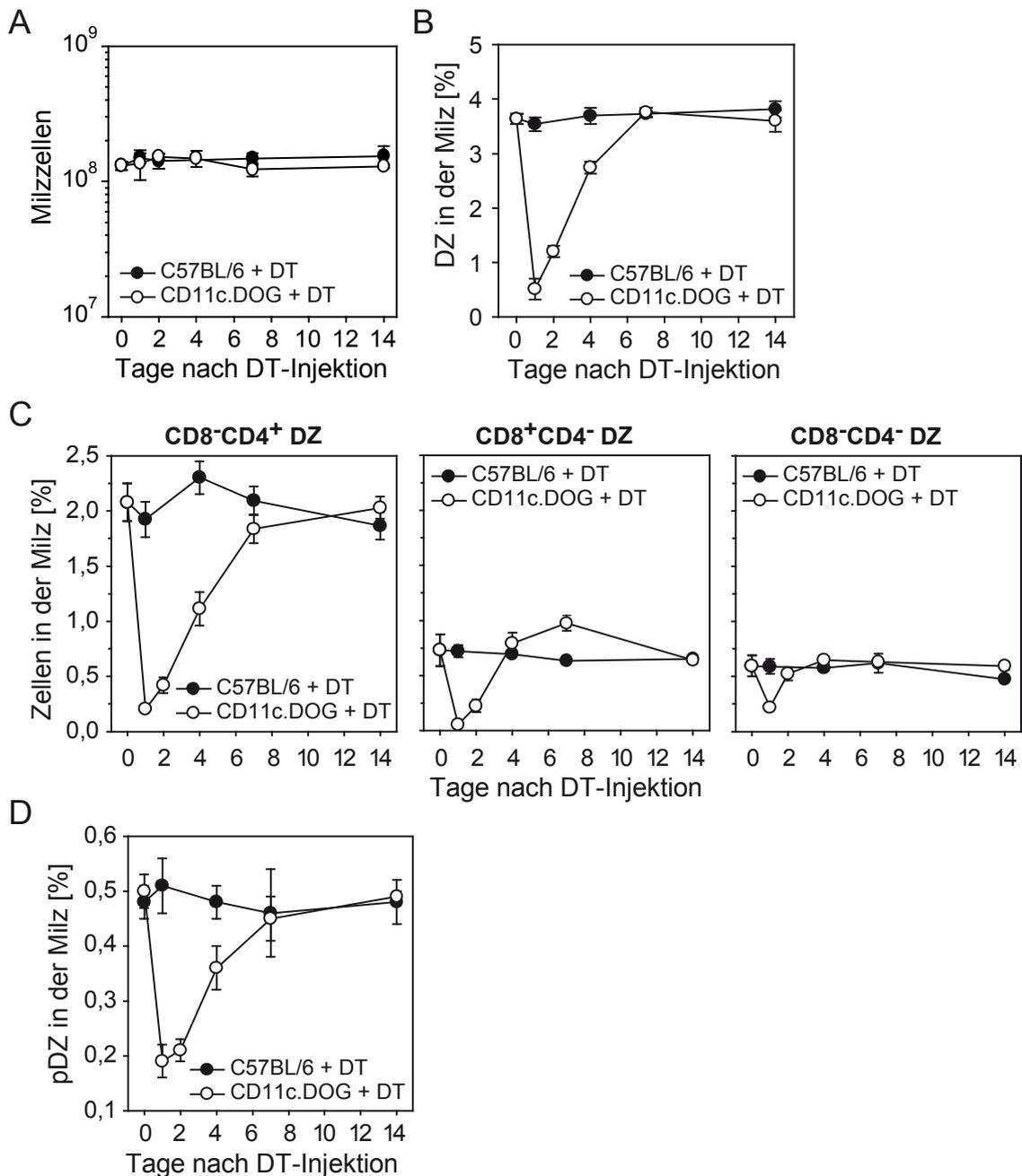


Abbildung 3.11: Verlauf der DZ/pDZ-Depletionskinetik nach einmaliger DT-Injektion in CD11c.DOG-Mäusen

C57BL/6- & CD11c.DOG-Mäusen wurde einmalig 8 ng/g KG DT ip. injiziert. Als Kontrolle dienten C57BL/6-Mäuse. Abschließend wurden die Zellen aufgereinigt und mittels FACS analysiert. CD11c^{hoch}-Zellen wurden als DZ, CD11c⁺PDCA-1⁻-Zellen als pDZ identifiziert. (A). Bestimmung der Gesamtzahl an Milzzellen B-D. Zeigt den %-Anteil der Zellpopulation in der Milz nach einmaliger DT-Gabe über einen Zeitraum von 14 Tagen an. (B). Dargestellt werden die Gesamt-DZ (CD11c⁺MHC II⁺) (C). Dargestellt werden die DZ-Subpopulationen (CD11c⁺MHC II⁺ CD4^{+/-} CD8^{+/-}) (D). Gezeigt werden pDZ (CD11c^{int} mPDCA-1⁺). Pro Gruppe n=4.

In Abbildung 3.11 A wird die absolute Milzzellenzahl dargestellt. Wie zu erkennen, treten über den gesamten Zeitverlauf keine Änderungen auf.

Abbildung 3.11 B zeigt den Verlauf der Depletion von konventionellen DZ über 14 Tage. Hierbei wird deutlich, dass die DZ-Depletion bei CD11c.DOG-Mäusen sehr schnell eintritt (unter 24 h). In einem nicht gezeigten Experiment wurde eine nahezu vollständige Depletion bereits 12 h nach DT-Injektion festgestellt. Nach 4 bis 7 Tagen wurde die ursprüngliche DZ-Zahl in der Milz wieder erreicht. Dies wird durch eine *de novo* Synthese von DZ aus CD11c^{niedrig} Vorläuferzellen erreicht, wie unsere Arbeitsgruppe in nachfolgenden Untersuchungen zeigen konnte (4.1.3.2). Wie bereits vorher gezeigt, werden DZ bei C57BL/6-Mäusen nicht durch DT depletiert.

In Abbildung 3.11 C sind die Kinetiken von myeloiden und lymphoiden DZ abgebildet. Die myeloiden CD8⁻CD4⁺ DZ zeigen eine verlangsamte Wiederherstellungskinetik im Vergleich zur Kinetik der Gesamt-DZ. Nach 4 Tagen wurden erst 54 % und nach 7 Tagen etwa 90 % der ursprünglichen Populationsgröße erreicht (im Vergleich zu 70 % bzw. 100 % der Gesamt-DZ) (Hochweller, Striegler et al., 2008). Im Gegensatz dazu konnten die CD8⁺CD4⁻ DZ ihre Zellzahl bereits nach 4 Tagen wiederherstellen. CD8⁻CD4⁻ DZ erreichten ihre normale Zellzahl bereits nach 3 Tagen.

Die Depletionskinetik der pDZ-Zellpopulation ist in Abbildung 3.11 D zu sehen. Hierbei konnte ein Erreichen der Ausgangslage nach ca. 7 Tagen beobachtet werden.

Bereits nach 48 h war eine Zunahme aller DZ-Subpopulationen zu beobachten. Daher sind wiederholte DT-Injektionen nötig, um die DZ über einen längeren Zeitraum effizient zu depletieren.

3.1.3.5 DZ-Depletion in Milz und Thymus von neonatalen Mäusen

Neugeborene Mäuse besitzen noch nicht das vollentwickelte Immunsystem der juvenilen bzw. erwachsenen Tiere. Daher stellte sich die Frage, wie hoch die Depletion von DZ in neonatalen Mäusen im Vergleich zu adulten Mäusen ist. Neugeborene CD11c.DOG- und C57BL/6-Mäuse (2 Tage alt) wurden mit 8 ng/g KG DT im Abstand von 2 Tagen dreimal ip. gespritzt. Im Alter von 8 Tagen wurde die Depletion von DZ in Milz und Thymus analysiert (Abbildung 3.12 A). Die effektive Depletion der DZ mittels DT ergab in der Milz 78 % und im Thymus 66,8 % (Abbildung 3.12 B).

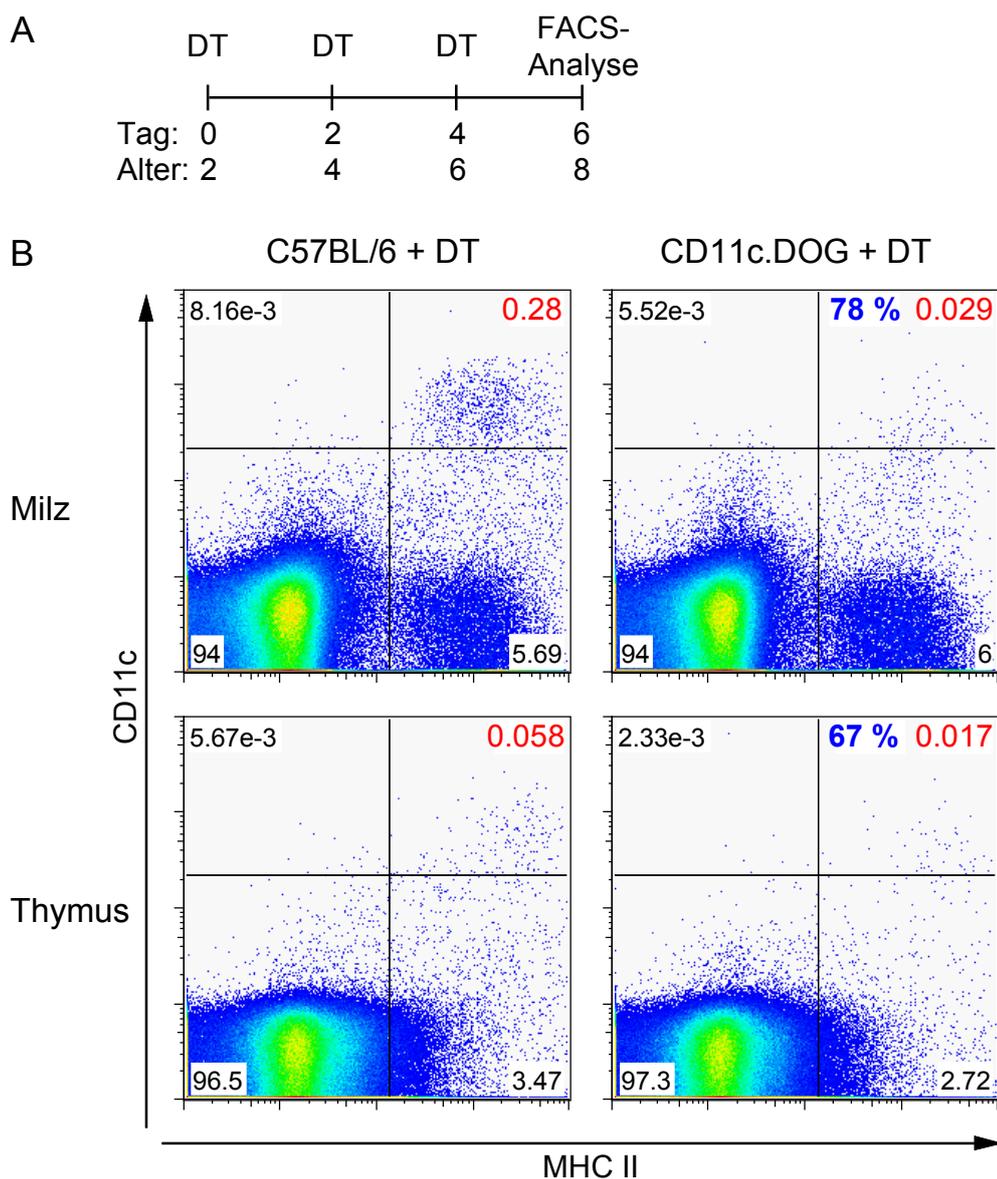


Abbildung 3.12: DZ-Depletion in der Milz und dem Thymus von neonatalen CD11c.DOG-Mäusen

(A). Ablauf des Experiments. (B). Neonatale C57BL/6- und CD11c.DOG-Mäuse im Alter von 2 Tagen wurden mit 8 ng/g KG DT ip. dreimal im Abstand von 48 h gespritzt. Im Alter von 8 Tagen wurden Milz- und Thymuszellen per Durchflusszytometrie analysiert. Blaue Prozentwerte geben die Depletion an.

Die erreichte Depletion ist somit scheinbar geringer als in adulten Mäusen. Dies ist wahrscheinlich in der späteren Depletionsanalyse begründet. Hier wurde erst 48 h nach der letzten DT-Injektion die DZ-Anzahl per Durchflusszytometrie bestimmt, in den vorherigen Experimenten wurden die Analyse schon nach 24 h durchgeführt. Die Kinetik der DT-Depletion wurde in adulten Tieren untersucht und ist in Abbildung 3.11 B dargestellt. Dabei wurde nach 48 h eine DT-vermittelte Depletion von nur 61 % festgestellt. Bei den neonatalen Tieren wurde eine Depletion von 71 % in der Milz erreicht. Es kann somit von einer gleichwertigen DZ-Depletion ausgegangen werden.

3.1.4 Depletion von DZ in nicht-lymphoiden Organen

DZ finden sich vorrangig in lymphatischen Geweben (z.B.: Milz, LK, Thymus, Lymphgefäße, KM und Peyerschen Plaques), aber DZ kommen auch in allen anderen Geweben (z.B.: Haut, Darm; nicht aber im Gehirn) vor. In der Lunge übernehmen DZ die Aufgabe der Präsentation von inhalierten Ag. Für die DZ-Depletion in der Lunge wurde einmal 8 ng/g KG DT in C57BL/6- und CD11c.DOG-Mäuse sowie 4 ng/g KG DT in die CD11c.DTR-Maus injiziert und nach 24h die DZ-Anzahl der Lunge analysiert.

Hierbei ergab sich eine Depletion der DZ in der Lunge der CD11c.DOG-Maus von 84,3 % und in der CD11c.DTR-Maus von 35,1 % (Abbildung 3.13).

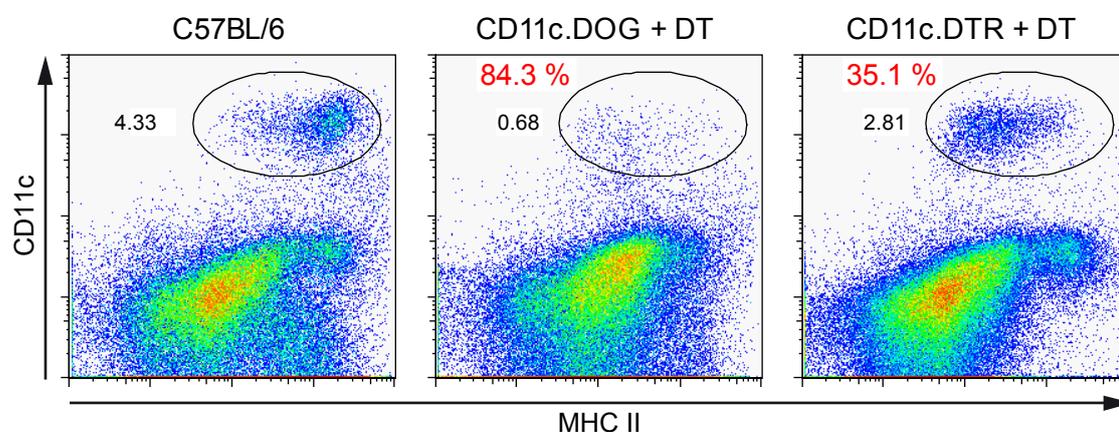


Abbildung 3.13: Depletion von DZ in der Lunge von CD11c.DOG-Mäusen

Die Mäuse wurden einmal mit 8 ng/g KG DT (bzw. 4 ng/g KG DT bei CD11c.DTR) injiziert, 1 Tag später die Lungen entnommen und die DZ per Durchflusszytometrie analysiert. Schwarze Werte entsprechen dem prozentualen Anteil an DZ. Rote Prozentsätze zeigen die DZ-Depletion. n=1.

1868 entdeckte Paul Langerhans Zellen mit dendritischer Morphologie in der Epidermis (Langerhans, 1868). Aufgrund ihrer langen Fortsätze ordnete er sie jedoch dem Nervengewebe zu. Heute werden Langerhans Zellen als intraepidermale DZ bezeichnet.

Zur Untersuchung der Depletion von CD11c⁺-Zellen (Langerhans Zellen und DZ) in der Epidermis und Dermis wurden die CD11c.DOG- & C57BL/6-Mäuse mit 8 ng/g KG DT ip. gespritzt. Nach einem Tag wurden diese Hautschichten zu einer Einzelzellsuspension präpariert und durchflusszytometrisch analysiert. In Abbildung 3.14 sind die Langerhans Zellen deutlich als CD11c^{niedrig}MHC II⁺ Zellpopulation von C57BL/6-Mäusen zu erkennen. Die Depletion ist mit 98,7 % fast vollständig. In der Dermis ist die Depletion geringfügig niedriger (91 %).

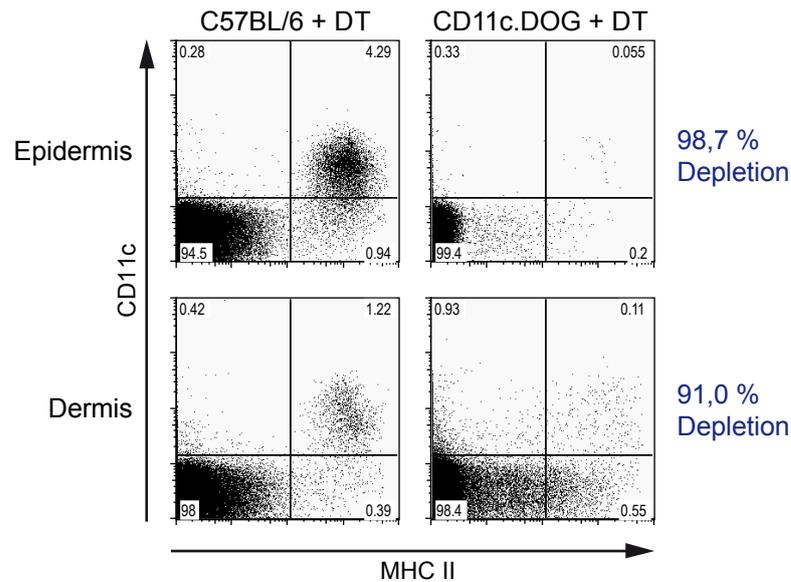


Abbildung 3.14: Depletion der DZ in der Dermis & Epidermis von C57BL/6- & CD11c.DOG-Mäusen

8 ng/g KG DT wurde einmalig in die Mäuse injiziert, 24 h später erfolgte die Präparation der dermalen Schichten aus der Schwanzhaut sowie die durchflusszytometrische Analyse. Es wurde jeweils eine Maus untersucht.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass sich auch in nicht-lymphoiden Organen, wie Lunge und Haut, eine Depletion der DZ mithilfe des DT-Depletionssystems möglich ist.

3.1.5 DZ-Depletion mittels aktivierter OT-I- & OT-II-T-Zellen in CD11c.DOG-Mäusen

Aufgrund der Präsentation der OT-I/II-spezifischen Peptide (OVA₂₅₇₋₂₆₄ und OVA₃₂₃₋₃₃₉) durch CD11c.DOG-DZ sollten diese von OT-I/II-T-Zellen erkannt und die DZ von OT-I-T-Zellen eliminiert werden können (Kapitel 1.5). Daraus ergäbe sich eine alternative Depletionsmethode, bei der aktivierte OT-I/II-T-Zellen die Funktion des DT ersetzen. Diese Methode sollte hier untersucht werden.

Um die transferierten T-Zellen zu aktivieren, wurden die Empfängermäuse (C57BL/6 bzw. CD11c.DOG) mit Ovalbumin-exprimierendem Adenovirus (AdOVA) infiziert (Schema in Abbildung 3.15 A). 16 h später wurde ein Gemisch von jeweils 1 Mio. OT-I- und OT-II-T-Zellen in die Empfängermäuse transferiert. Nach 6 Tagen wurde die DZ-Depletion in Milzzellen analysiert. Wie aus der FACS-Abbildung 3.15 B abzuleiten ist, zeigten die CD11c.DOG-Tiere eine um ca. 79 % verringerte DZ-Population im Vergleich zu C57BL/6.

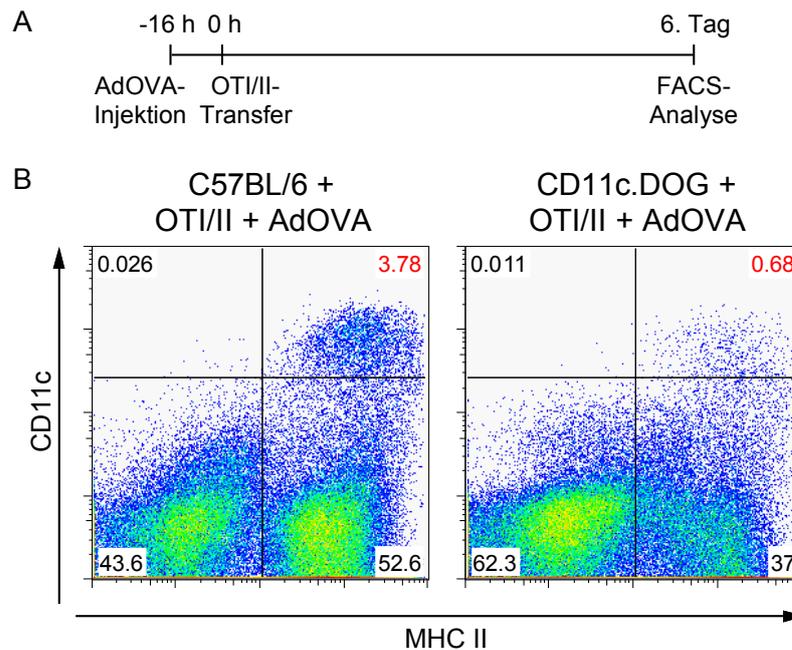


Abbildung 3.15: DZ-Depletion mittels AdOVA-aktivierter OT-I/II-T-Zellen in CD11c.DOG-Mäusen

(A). Schema des Experimentes. (B). Aktivierung der Empfängermäuse durch Infektion mit 1 Mio. pfu AdOVA ca. 16 h vor dem Transfer von je 1 Mio. OT-I- & OT-II-transgener Zellen in C57BL/6- und CD11c.DOG-Mäuse. FACS-Analyse wurde am Tag 6 nach dem Transfer durchgeführt.

Im Vergleich zur Depletion mit DT wurde hier eine geringere Depletion erzielt (Abbildung 3.7). Daher stellt diese Methode keine Alternative zur DT-Depletion dar.

3.1.6 Analyse anderer Leukozytenpopulationen nach DZ-Depletion

3.1.6.1 Analyse von CD11c⁺ B-, T-, NKT- und NK-Zellen nach DT-Injektion in CD11c.DOG-Mäuse

Nachdem gezeigt werden konnte, dass mit dem DT-DTR-System in CD11c.DOG-Mäusen eine DZ-Depletion erfolgreich durchführbar ist, war es von Interesse, die Auswirkungen der DT-Injektion auf andere Immunzellpopulationen zu analysieren.

Zunächst wurden B-, T-, NK- und NKT-Zellen hinsichtlich ihrer Expression von CD11c und einer möglichen Reduktion dieser Zelltypen, nach einer einmaligen DT-Injektion untersucht. Aufgrund der meist niedrigen CD11c-Expression dieser Zelltypen, wurden auch die CD11c^{niedrig}-Zellen untersucht, die vor allem zu den NK-Zellen gehören. In Abbildung 3.16 oben ist als Referenz die Höhe der CD11c-Expression (proportional zur Fluoreszenzintensität) in DZ von CD11c.DOG-Mäusen gezeigt. Die weiteren Zelltypen folgen darunter.

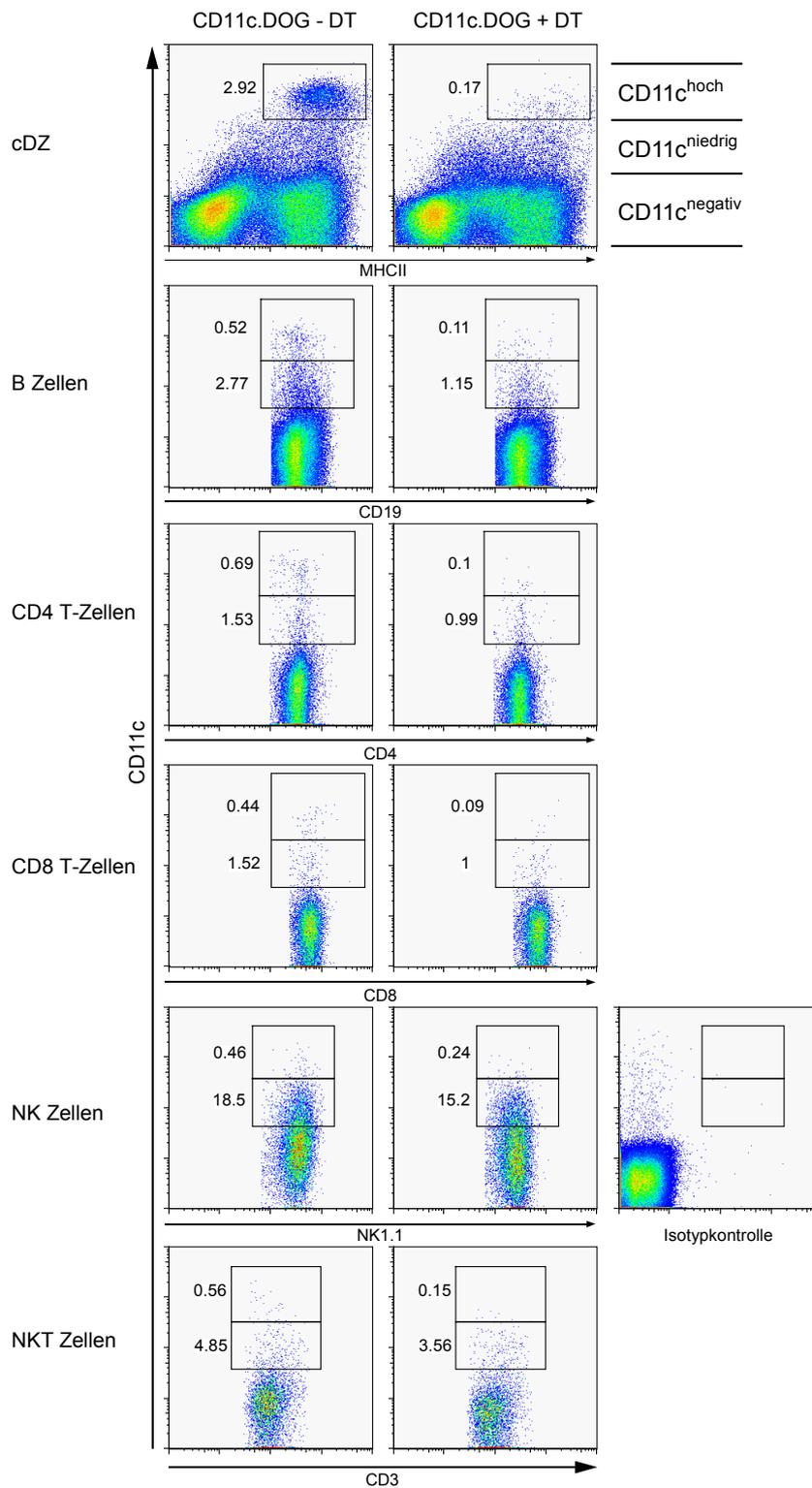


Abbildung 3.16: Analyse von CD11c⁺ B-, CD8/CD4 T-, NK- und NKT-Zellen nach einmaliger DT-Injektion in CD11c.DOG-Mäuse

8 ng/g KG DT wurde einmalig 17 h vor der durchflusszytometrischen Analyse der Milzzellen in die Mäuse injiziert. Die untere Grenze der CD11c^{hoch}-Region wurde entsprechend der DZ-Region gewählt. B-Zellen wurden auf CD19⁺-Zellen, CD4/8 T-Zellen auf CD3⁺ CD4⁺/8⁺-Zellen, NK-Zellen auf CD3⁻ NK1.1⁺-Zellen und NKT-Zellen auf CD3^{mittel} NK1.1⁺-Zellen selektiert. Die Prozentsätze sind exemplarische Werte einer analysierten Maus. Durchschnittswerte sind in Tabelle 3.1 ersichtlich. (n=4.)

Bei den DZ ist wie erwartet eine Depletion von > 90 % zu erkennen. In Tabelle 3.1 sind die Ergebnisse der verschiedenen Zelltypen aus Abbildung 3.16 als Durchschnittswerte zusammengefasst. Bei den B-Zellen wird deutlich, dass etwa 0,7 % der CD19⁺-Zellen (B-Zellen) auch CD11c^{hoch} sind, jedoch etwas schwächer CD11c exprimieren als DZ. 2,4 % der B-Zellen exprimieren CD11c^{niedrig}. Daraus lässt sich ablesen, dass etwa 85 % der CD11c^{hoch} und 61 % CD11c^{niedrig} B-Zellen depletiert wurden. Bei den CD4 T-Zellen liegt der Anteil an CD11c^{hoch} etwa bei 0,59 % und 1,69 % der CD4 T-Zellen sind CD11c^{niedrig}. Die Depletion dieser Zellen liegt etwa auf dem gleichen prozentualen Niveau wie bei den B-Zellen. Ein kleiner Prozentsatz der CD8 T-Zellen exprimieren auch CD11c wie schon von Huleatt et al. beschrieben (Huleatt und Lefrancois, 1995). Die Depletion und der Anteil an CD11c^{hoch} und CD11c^{niedrig} CD8 T-Zellen sind vergleichbar mit denen der CD4 T-Zellen. NK-Zellen weisen eine andere Verteilung der CD11c-Expression auf. Während nur 0,45 % CD11c^{hoch} sind, ist der Anteil an CD11c^{niedrig}-NK-Zellen deutlich größer (17,85 %) (Kassim, Rajasagi et al., 2006). Die Depletion der jeweiligen Zellen ist hierbei jedoch deutlich geringer als bei den vorhergehenden Zelltypen. Bei CD11c^{hoch}-NK-Zellen liegt sie um 61 % und bei den CD11c^{niedrig}-NK-Zellen um 25,7 %. NKT-Zellen enthalten einen geringeren Anteil an CD11c^{niedrig}-Zellen (4,4 %, im Vergleich zu den NK-Zellen) und etwa 0,6 % CD11c^{hoch}-NKT-Zellen. Die Depletion dieser CD11c^{hoch}-NKT-Zellen liegt bei 79 % und somit auf B- & T-Zellniveau, die Reduktion der CD11c^{niedrig}-NKT-Zellen dagegen bei nur 35,3 %.

Tabelle 3.1: Depletion von B-, CD8/CD4 T-, NKT- und NK-Zellen nach einmaliger DT-Injektion in CD11c.DOG-Mäusen

CD11c ⁺ -Zellen von:	CD11c ^{niedrig} -Zellen pro Zelltyp [%]	Depletion der CD11c ^{niedrig} -Zellen pro Zelltyp [%]	CD11c ^{hoch} -Zellen pro Zelltyp [%]	Depletion der CD11c ^{hoch} -Zellen pro Zelltyp [%]
MHC II ⁺ (DZ)	-	-	2,93	90,3
CD19 ⁺ (B Zellen)	2,42	60,9	0,71	84,5
CD3 ⁺ CD4 ⁺ (CD4 T-Zellen)	1,69	56,1	0,59	89,8
CD3 ⁺ CD8 ⁺ (CD8 T-Zellen)	1,56	49,7	0,55	83,5
CD3 ⁺ NK1.1 ⁺ (NK-Zellen)	17,85	25,7	0,45	61,7
CD3 ⁺ NK1.1 ⁺ (NKT-Zellen)	4,41	35,3	0,58	79,0

Daten stellen Durchschnittswerte dar.

Insgesamt kann man feststellen, dass B-, T-, NK- und NKT-Zellen eine sehr geringe Anzahl an CD11c^{hoch}-Zellen (< 0,72 %) enthalten. Nur diese CD11c^{hoch} B-, T-, NK- oder NKT-Zellen werden auch effektiv depletiert (61,7 bis 89,5 %). Die CD11c^{niedrig}-Zellen

bilden einen größeren Anteil innerhalb ihres Zelltyps (1,69 bis 17,85 %). Sie unterliegen jedoch nur einer geringen Depletion von 25,7 bis 60,9 %. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass DT-Injektionen in CD11c.DOG-Mäuse keinen entscheidenden Einfluss auf die Gesamtgröße der B-, T-, NK- oder NKT-Zellpopulation ausüben.

3.1.6.2 Analyse der B- & T-Zellproliferation *in vitro* unter DT-Depletionsbedingungen

In der vorherigen Analyse wurde gezeigt, dass B-Zellen, CD4 & CD8 T-Zellen und NKT-Zellen geringe Anteile von CD11c^{niedrig/hoch}-Zellen enthalten. Die Gesamtzellzahl der B-Zellen, CD4 & CD8 T-Zellen oder NKT-Zellen verändert sich nur gering nach DT-Gabe. Es stellte sich damit die Frage, ob die quantitativen Veränderungen durch eine DT-Applikation (Änderungen der CD11c^{niedrig/hoch}-Zellzahlen der verschiedenen Zelltypen) Einschränkungen bei der Funktion der Zelltypen bewirken. Daher wurden zunächst B- & T-Zellen bei *in vitro*-Stimulationsexperimenten untersucht. In diesen Versuchen wurde die Fähigkeit der B- und T-Zellen zur Zellproliferation nach Stimulation ermittelt.

Dazu wurden Milzzellen von C57BL/6- & CD11c.DOG-Mäusen mit verschiedenen DT-Konzentrationen und Stimulanzen (CpG ODN 1668 oder ConA) *in vitro* für 24 h kultiviert. Die CpG ODN 1668 Stimulation aktiviert z.B. B-Zellen, welche sich dadurch häufig teilen und somit verstärkt das zugesetzte [³H]-Thymidin einbauen. Sollte das DT einen qualitativen Effekt auf die B-Zellpopulation ausüben, so würde man eine reduzierte Proliferation und somit eine Reduktion des [³H]-Thymidin-Einbaus erwarten. Für die Analyse der T-Zellen erfolgte die Stimulation mit ConA. Als Kontrolle für die Funktionalität des DT wurden RMA.DOG- und RMA-Zellen gemischt und unter gleichen Bedingungen (ohne Stimulatoren) inkubiert. Die RMA.DOG-Zelllinie enthält ein Plasmid mit humanem DTR und ist somit DT-sensitiv. Wie unter Kapitel 2.6.7.1 A beschrieben, kann die Depletion aus dem Verhältnis der überlebenden RMA-Zellen und der durch DT absterbenden RMA.DOG-Zellen errechnet werden. Wie in Abbildung 3.17 zu erkennen, werden fast 100 % der RMA.DOG-Zellen bei einer DT-Konzentration von 10⁻¹⁰ M getötet. Die 50 %-ige Depletion nach 68 h liegt bei etwa 10⁻¹¹ M DT. Ein vergleichbarer *in vivo*-Wert (für angestrebte 100 %-ige Depletion) bei 8 ng/g KG DT und einer 20 g Maus beträgt etwa 14 x 10⁻¹⁰ M DT (Basis: Blutvolumen von etwa 2 ml; Molekulargewicht von DT ist 58342 Da; Riches, Sharp et al., 1973; Neville und Hudson, 1986). Dieser Wert liegt nur scheinbar höher, da die effektive Verfügbarkeit von DT in der Maus z.B. durch Abbauprozesse verringert wird.

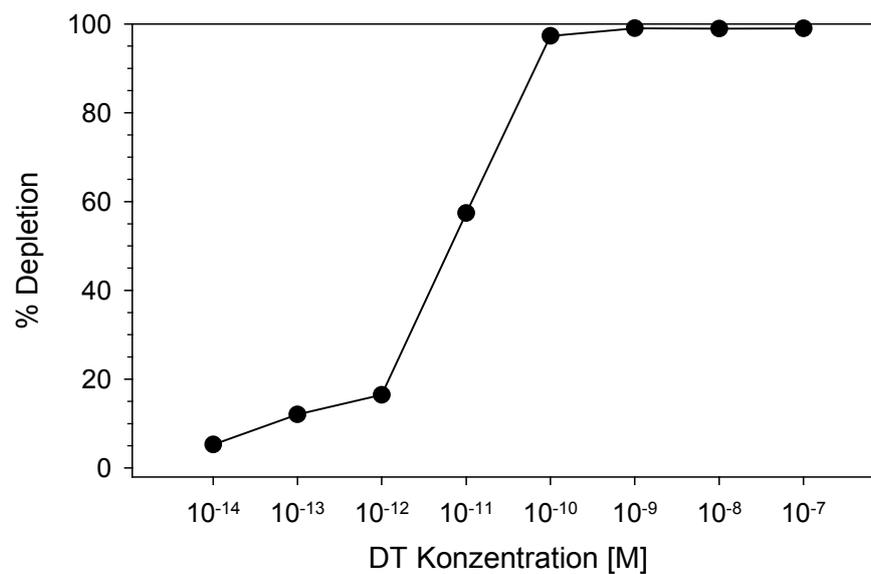


Abbildung 3.17: Bestimmung der Funktionalität von DT *in vitro* mittels Depletion der RMA.DOG-Zellen im Gemisch mit RMA-Zellen

RMA- und RMA.DOG-Zellen in einem definierten Verhältnis wurden 68h mit verschiedenen DT-Konzentrationen inkubiert. Anschließend erfolgte die Depletionsanalyse per FACS. Anhand der eGFP-Expression der RMA.DOG-Zellen kann eine Abnahme dieser Zellen im Verhältnis zu den DT-unbeeinflussten RMA-Zellen errechnet werden.

In Abbildung 3.18 A wird deutlich, dass die CD11c.DOG- und die C57BL/6-B-Zellen mit DT und CpG ODN 1668 einen vergleichbaren [^3H]-Thymidin Einbau vorweisen und somit kein Einfluss des DT auf die Proliferation von B-Zellen zu verzeichnen ist. Selbst bei hohen DT-Konzentrationen von 10^{-8} M ist die Proliferation ähnlich der ohne DT. Die Depletion der CD11c⁺ B-Zellen hat somit keinen qualitativen Einfluss bei der *in vitro*-Proliferation der B-Zellgesamtpopulation.

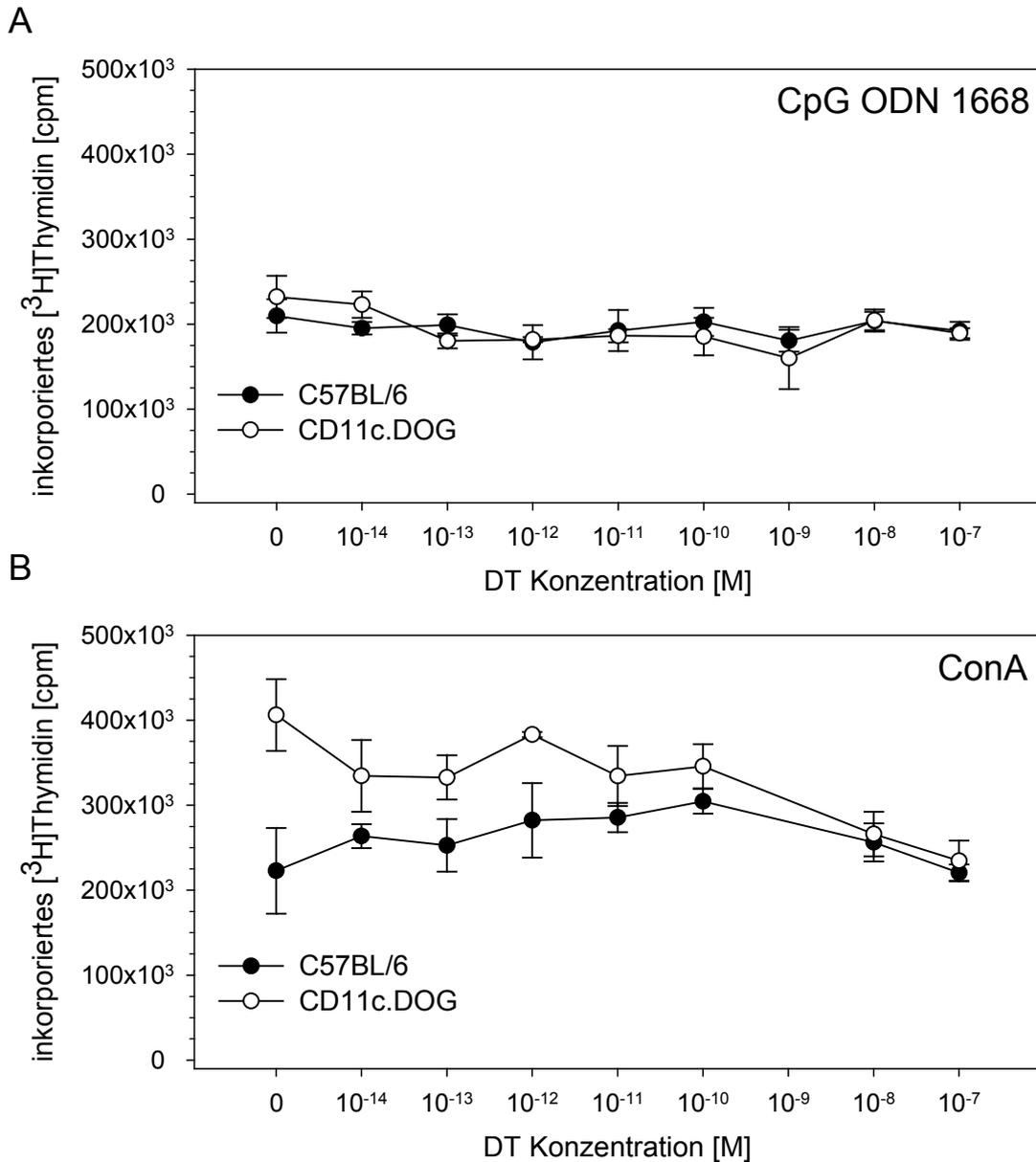


Abbildung 3.18: Bestimmung der *in vitro*-Proliferation von T- & B- Zellen aus C57BL/6- & CD11c.DOG-Mäusen mittels CpG oder ConA Stimulation unter verschiedenen DT-Konzentrationen

(A.) CpG zur Stimulation von B-Zellen. (B.) ConA zur Stimulation von T-Zellen. Milzzellen von C57BL/6- und CD11c.DOG-Mäusen wurden mit 0,5 μM CpG oder 5 $\mu\text{g/ml}$ ConA stimuliert und unter seriellen DT-Verdünnungen für 3 Tage in Flachbodenplatten inkubiert. Anschließend erfolgte eine 16-stündige Proliferation unter Zusatz von 1 μCi ^3H -Thymidin. Der Einbau des ^3H -Thymidin wurde per β -counter vermessen.

In Abbildung 3.18 B ist die Stimulation von Milzzellen mit ConA gezeigt. Hierbei traten stärkere Schwankungen der Messpunkte auf. Es zeigt sich jedoch, dass bei 10^{-8} bis 10^{-7} M DT eine leichte Reduktion der Proliferation eintrat. Dies war jedoch bei beiden Mäusestämmen zu beobachten.

Zur Verstärkung der Aussage des vorangegangenen Experiments wurde die *in vitro*-Proliferation der B- & T-Zellen anhand von CFSE-Verdünnungsprofilen (mit verschiedenen DT-Konzentrationen bzw. ohne DT) mittels FACS untersucht. C57BL/6- und CD11c.DOG-Milzzellen wurden mit CFSE markiert und für 68h mit verschiedenen DT-Konzentrationen (10^{-7} bis 10^{-14} M) unter Zugabe von CpG ODN 1668 oder ConA *in vitro* kultiviert. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der Zellen. Durch die bei einer Proliferation erfolgte stöchiometrische Verdünnung des CFSE kann die Zellteilung der gefärbten Zellen durch FACS beobachtet werden. In Abbildung 3.19 sind exemplarisch die Ergebnisse für 10^{-9} M DT und 10^{-7} M DT dargestellt.

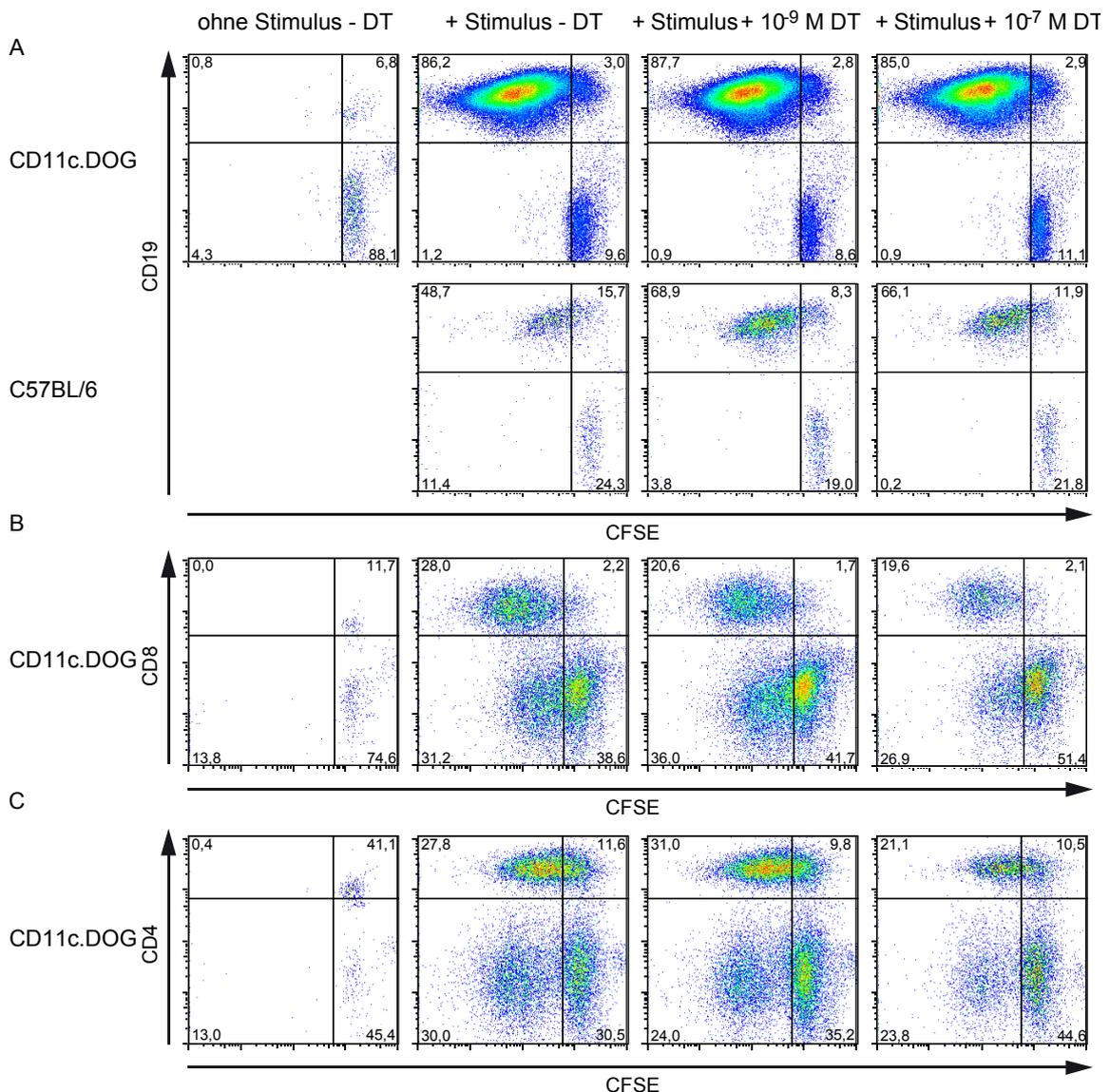


Abbildung 3.19: *in vitro*-Stimulation mittels CpG ODN & ConA zur Bestimmung der Proliferation von B- und T-Zellen aus C57BL/6- & CD11c.DOG-Mäusen

CFSE-markierte C57BL/6- und CD11c.DOG-Milzzellen wurden für 68 h mit verschiedenen DT-Konzentrationen unter Zugabe von CpG ODN 1668 (A) und ConA (B/C) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

Abbildung 3.19 A zeigt in CD11c.DOG-Mäusen stark CFSE gefärbte CD19⁺- & CD19⁻-Zellen, die unter Ausschluss von CpG ODN 1668 und DT nach 68 h ungeteilt vorliegen (oberer bzw. unterer rechter Quadrant). Bei Stimulation der Milzzellen mit CpG ODN 1668 setzt eine starke Proliferation der CD19⁺ B-Zellen ein. Die CD19⁻-Zellen dagegen teilen sich nicht. Setzt man dieser *in vitro*-Kultur DT in verschiedenen Konzentrationen zu (10^{-14} M bis 10^{-7} M), so zeigt sich, dass der Anteil an proliferierten B-Zellen nicht abnimmt (vgl. 85 % zu 86 %). Die C57BL/6-Mäuse dienten als Kontrolle, auch hier findet Proliferation nach Zugabe des Stimulus ohne Einfluss von DT statt. Eine im Vergleich zu den CD11c.DOG-Mäusen geringere Proliferation der C57BL/6-B-Zellen täuscht aufgrund der höheren initialen CFSE-Fluoreszenz.

Unter Abbildung 3.19 B wird die CD8 T-Zellproliferation in CD11c.DOG-Mäusen veranschaulicht (Daten der C57BL/6-Mäuse nicht gezeigt). Auch hier tritt ohne Stimulus keine Zellteilung der CD8 T-Zellen ein. Eine Reduktion der CD8 T-Zellproliferation erfolgt bei einer DT-Konzentration von 10^{-9} M. Die theoretische *in vivo*-DT-Konzentration bei 8 ng/g KG DT pro Maus beträgt im Blut etwa $1,9 \times 10^{-9}$ M (bei 20 g Maus mit 72 ml/kg KG Blutvolumen (Diehl, Hull et al., 2001)). CD8 T-Zellen sind zumindest unter diesen Bedingungen (10^{-9} M DT für 68 h) bei ihrer Proliferation beeinträchtigt.

In Abbildung 3.19 C wird die Proliferation der CD4 T-Zellen in CD11c.DOG-Mäusen abgebildet (Daten der C57BL/6-Mäuse nicht gezeigt). Ohne Stimulus erfolgt keine Zellteilung der CD4 T-Zellen. Auch hierbei teilten sich die CD4 T-Zellen mit Stimulus bei einer DT Konzentration von 10^{-9} M ohne Einschränkung (auch bei 10^{-8} M DT keine Verringerung der Proliferation). Erst bei einer sehr hohen DT- Konzentration von 10^{-7} M sank die Anzahl der proliferierenden Zellen um circa 30 %.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die CD8 T-Zellproliferation *in vitro* (bei von *in vivo* übertragenen DT-Konzentrationen) beeinträchtigt wird. Jedoch hat der Einsatz von Standard-DT-Mengen (~ 8 ng/g KG DT *in vivo*) *in vitro* keinen Einfluss auf B- und CD4-T-Zellproliferation.

3.1.6.3 Histologische Untersuchung von Makrophagenpopulationen unter Einfluss von DT

Metallophile und Marginalzonen-Makrophagen, welche durch die Proteine MOMA-1 (*Monocyte/Macrophage Marker*) bzw. ERTR-9 (Klonname; Ak bindet an SIGN-R1 = *Specific ICAM-3 Grabbing Non-Integrin*) identifiziert werden können, wurden in

CD11c.DOG-Mäusen untersucht, da sie zum Teil CD11c exprimieren. Es wurden daher immunhistochemische Färbungen durchgeführt (Abbildung 3.20). CD11c.DOG-Mäuse wurden mit/ohne 8 ng/g KG DT behandelt und nach 24 h die Milz entfernt. Die histologischen Schnitte wurden immunhistochemisch mit den Markern: F4/80 (Makrophagen der roten Pulpa), MOMA-1 und ERTR-9 inkubiert und anschließend mit DAB (3,3'-Diaminobenzidin - Tetrahydrochlorid) und Methylgrün gefärbt.

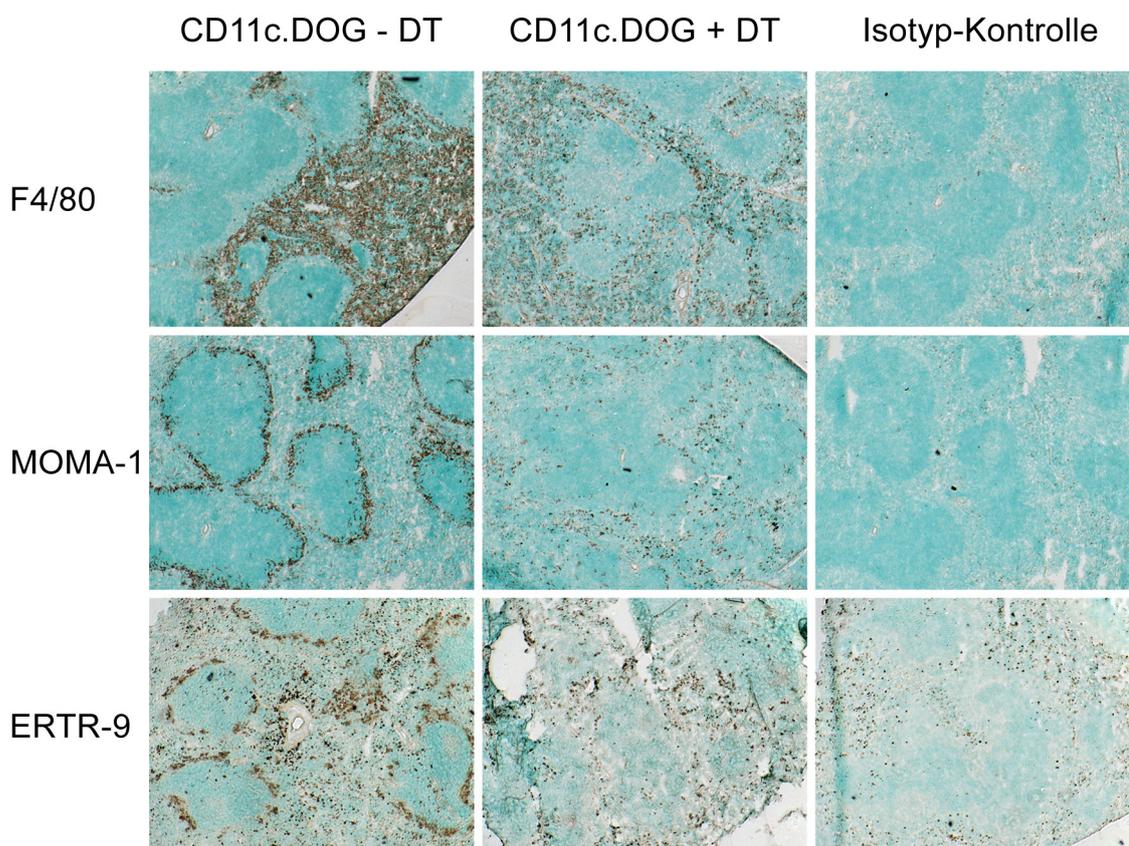


Abbildung 3.20: Immunhistochemischer Nachweis verschiedener makrophagen-spezifischer Oberflächenmarker in der Milz von CD11c.DOG-Mäusen ohne/mit DT-Depletion

CD11c.DOG-Mäuse wurden mit/ohne 8 ng/g KG DT behandelt und nach 24 h wurde die Milz entfernt. Die histologischen Schnitte wurden immunhistochemisch mit den Markern F4/80, MOMA-1 & ERTR-9 inkubiert, anschließend mit DAB gefärbt (braun) und Methylgrün gegengefärbt. Originalvergrößerung 50-fach.

Es zeigte sich bei DT-behandelten CD11c.DOG-Mäusen eine Verringerung der F4/80⁺-Färbung. Da jedoch der CD11b-Pan-Makrophagen-Marker in der Histologie keine Abnahme zeigte (Abbildung 3.21), kann man ähnlich wie bei den CD11c.DTR-Mäusen von einer Abschwächung der F4/80-Expression anstelle einer Depletion ausgehen (Probst, Tschannen et al., 2005).

Bei den metallophilen und Marginalzonen-Makrophagen (MOMA-1⁺ und ERTR-9⁺) tritt in der Histologie ebenfalls eine Verringerung der Zellzahl auf (Abbildung 3.20). Gründe

für das Absterben dieser Makrophagen kann eine CD11c-Expression sein oder die Aufnahme von toten DZ durch Makrophagen, welche dann selbst durch das DT zugrunde gehen.

Analog zu den CD11c.DTR-Mäusen kann festgestellt werden, dass aufgrund der DT-vermittelten Depletion von metallophilen und Marginalzonen-Makrophagen eine Untersuchung von Prozessen mit Beteiligung dieser Zellen nicht erfolgen sollte.

3.1.6.4 Analyse der Gr-1⁺-Zellen nach DT-Injektion in CD11c.DOG-Mäusen

Bei weiteren immunhistologischen Färbungen von Milzen aus CD11c.DOG-Mäusen nach DT-Injektionen konnte eine starke Zunahme von Gr-1⁺-Zellen (Granulozyten, auch CD11b⁺) beobachtet werden (Abbildung 3.21). Dies wurde bisher nicht bei den CD11c.DTR-Mäusen beschrieben. Daher erfolgte eine eingehendere Untersuchung dieses Sachverhaltes.

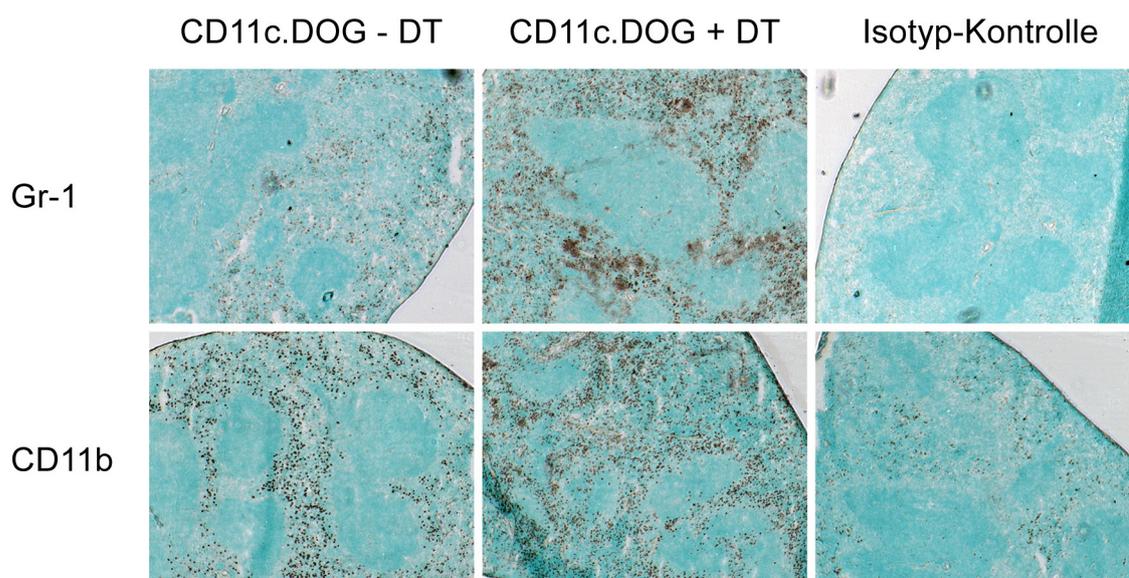


Abbildung 3.21: Immunhistochemischer Nachweis von Gr-1 und CD11b in der Milz von CD11c.DOG-Mäusen ohne/mit DT-Depletion

CD11c.DOG-Mäuse wurden mit/ohne 8 ng/g KG DT behandelt und nach 24 h die Milz entfernt. Die histologischen Schnitte wurden immunhistochemisch mit den Markern Gr-1 & CD11b inkubiert, anschließend mit DAB gefärbt (braun) und Methylgrün gegengefärbt. Schnitte in 50-facher Originalvergrößerung.

Zusätzlich zum immunhistologischen Nachweis von Gr-1 erfolgte eine Analyse mittels Durchflusszytometrie. Den C57BL/6- bzw. CD11c.DOG-Mäusen wurde einmalig 8 ng/g KG DT gespritzt und 24 h später deren Milzzellen auf Gr-1 und CD11b untersucht.

Dabei wurde bei naiven Tieren (C57BL/6 ohne DT) und bei C57BL/6-Mäusen mit DT-Injektion etwa 2 % an Gr-1⁺-Zellen detektiert (Abbildung 3.22).

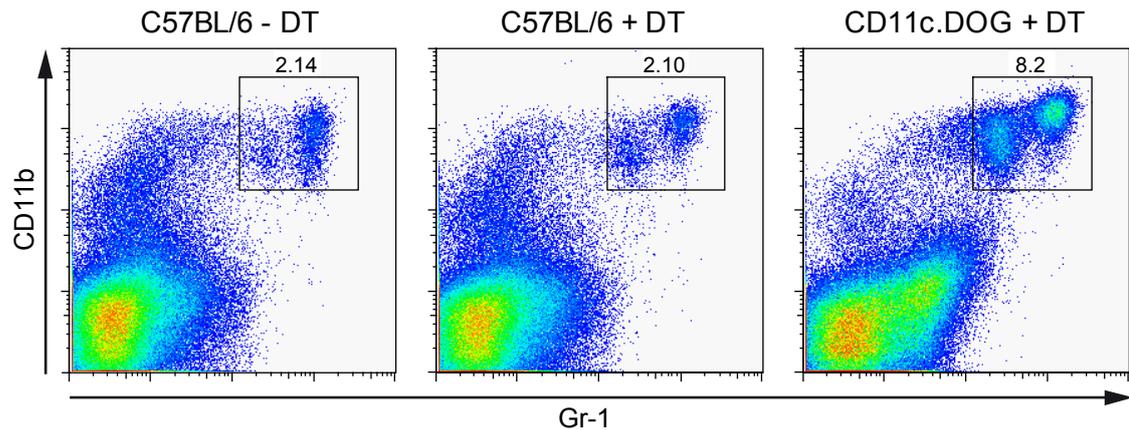


Abbildung 3.22: Expansion der Gr-1⁺CD11b⁺ Zellen nach einmaliger DT-Injektion in CD11c.DOG-Mäusen

CD11c.DOG- und C57BL/6-Mäuse wurden mit/ohne 8 ng/g KG DT behandelt, nach 24 h die Milz entfernt und eine FACS-Färbung durchgeführt.

Diese teilen sich in 2 Gruppen: Gr-1^{sehr hoch}- und Gr-1^{hoch}-Zellen. Beide Zellpopulationen sind CD11b^{hoch}. Dies gilt auch für die Gr-1-Zellen bei den CD11c.DOG-Mäusen + DT. In diesen Tieren steigt, wie schon in der Histologie zu erkennen, die Frequenz stark an. Ca. 8 % Gr-1⁺-Zellen wurden in der Milz detektiert. Dies entspricht einer Erhöhung um den Faktor 3,8. Eine Zunahme an Gr-1⁺-Zellen tritt 24 h nach DT-Injektion in CD11c.DOG-Mäusen auf. Wie sieht der anschließende Zeitraum in Bezug auf die Populationsgröße der Gr-1⁺-Zellen aus? Für die Beantwortung dieser Frage wurde eine Kinetik über einen Zeitraum von 7 Tagen angefertigt (als Kontrolle dienten C57BL/6-Mäuse). Die Abbildung 3.23 stellt die Ergebnisse dar.

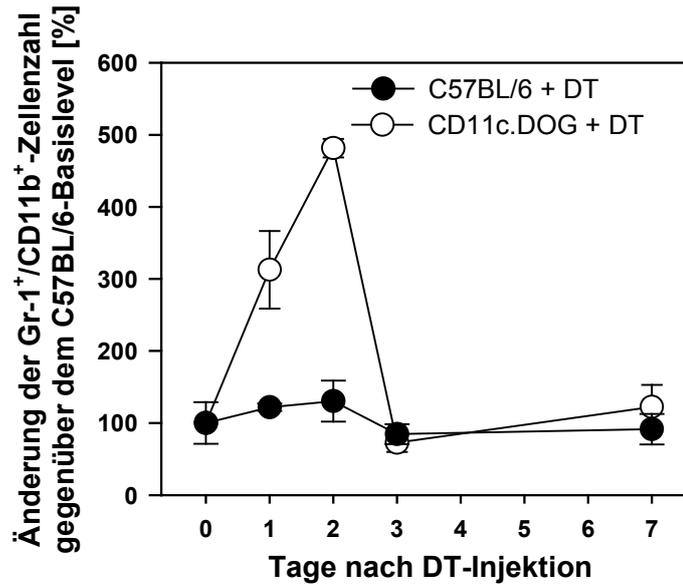


Abbildung 3.23: Zunahme der Gr-1⁺CD11b⁺-Zellpopulation nach DT-Injektion in der Milz von CD11c.DOG-Mäusen im Verlauf von 7 Tagen

CD11c.DOG- und C57BL/6-Mäuse wurden 8 ng/g KG DT zu verschiedenen Zeitpunkten injiziert, abschließend die Milz entfernt und eine FACS-Färbung durchgeführt. Für die Analyse wurde speziell auf Gr-1⁺CD11b⁺-Zellen selektiert.

Die Gr-1⁺CD11b⁺-Zellpopulation der CD11c.DOG-Mäuse nahm unter DT-Gabe im Vergleich zu den C57BL/6-Mäusen stark zu (ca. 500 %) und normalisierte sich nach etwa 3 Tagen. Die maximale Anzahl an Gr-1⁺CD11b⁺-Zellen wurde nach 2 Tagen erreicht.

Zur funktionalen Charakterisierung der Gr-1⁺CD11b⁺-Zellpopulation wurde ein Suppressions-Assay durchgeführt (Abbildung 3.24), da Gr-1⁺CD11b⁺-Zellen, speziell Gr-1⁺CD11b⁺F4/80⁺-Zellen in der Literatur als MDSC = „myeloid-derived suppressor cells“ beschrieben sind und die Aktivierung von T-Zellen sowie deren Proliferation inhibieren (Nausch, Galani et al., 2008; Bronte, Chappell et al., 1999; Mazzoni, Bronte et al., 2002). Milzzellen aus C57BL/6- und CD11c.DOG-Mäusen wurden - wie unter Kapitel 2.6.9 erläutert - präpariert, nach Gr-1⁺F4/80⁻ sowie Gr-1⁺F4/80⁺-Zellen sortiert und mit 30 Gray bestrahlt. Die sortierten MDSC wurden im Verhältnis 1:16 bis 1:1 mit den Responderzellen (C57BL/6-Milzzellen) unter Stimulation mit 2 µg/ml ConA kultiviert und die Proliferation nach 72h gemessen (³H-Thymidineinbau). Als Kontrollen dienten Responderzellen aus C57BL/6-Mäusen ohne/mit Stimulus, MDSC mit Stimulus und 2-fach Responderzellen mit Stimulus.

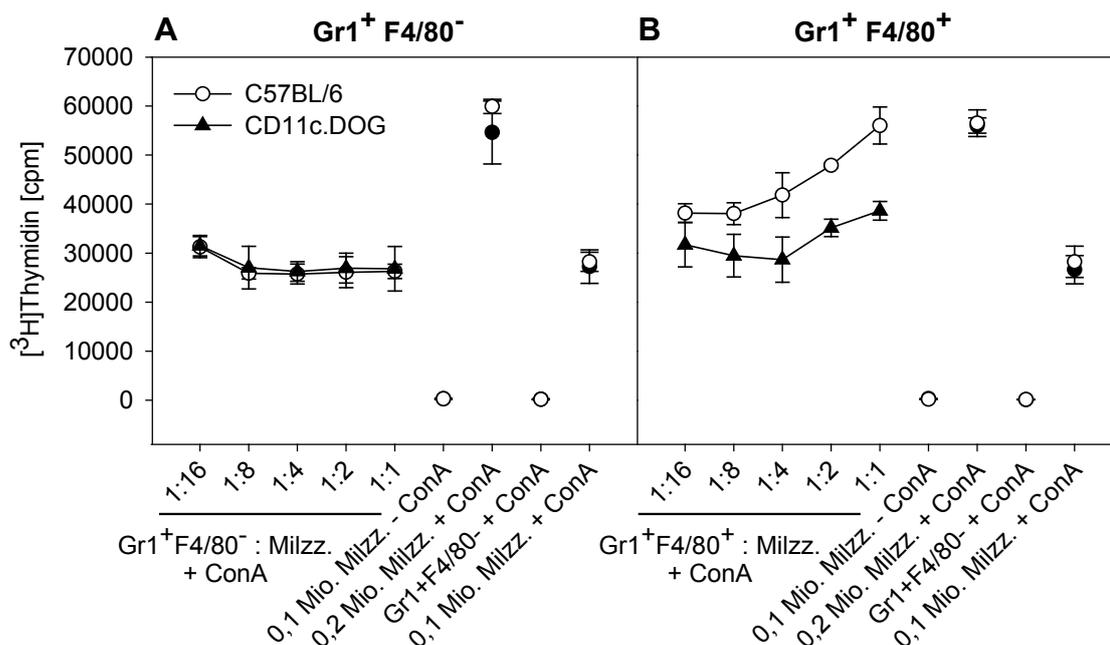


Abbildung 3.24: Suppressions-Assay mit Gr-1⁺F4/80^{-/+}-Zellen aus C57BL/6- & CD11c.DOG-Mäusen

C57BL/6 oder CD11c.DOG-Mäuse wurden mit 8 ng/g KG DT injiziert und Gr-1⁺F4/80^{-/+}-Zellen per FACS sortiert. Gr-1⁺F4/80⁻ bzw. Gr-1⁺F4/80⁺ Zellen wurden mit den Responderzellen (C57BL/6-Milzzellen) in serieller Titration unter Stimulation mit 2 µg/ml ConA kultiviert und die Proliferation gemessen. Als Kontrollen dienten 10⁵ Responderzellen ohne/mit Stimulus, 10⁵ MDSC mit Stimulus und 2 x 10⁵ Responderzellen mit Stimulus. (A.) Suppressions-Assay mit C57BL/6-Milzzellen und Gr-1⁺F4/80⁻-Zellen aus C57BL/6- oder CD11c.DOG-Mäusen. (B.) Suppressions-Assay mit C57BL/6-Milzzellen und Gr-1⁺F4/80⁺-Zellen aus C57BL/6- oder CD11c.DOG-Mäusen.

Wie in Abbildung 3.24 A zu erkennen, zeigt sich bei Anwesenheit von Gr-1⁺F4/80⁻-Zellen aus C57BL/6- oder CD11c.DOG-Mäusen, kein Unterschied bei der Proliferation der T-Zellen (Respondermilzzellen). In Abbildung 3.24 B wird deutlich, dass Gr-1⁺F4/80⁺ Zellen eine zunehmende Proliferation in beiden Mäusestämmen bewirken. Ein etwas stärkerer ³H-Thymidin-Einbau ist bei den C57BL/6-Zellen zu verzeichnen. Das heißt, es tritt eine stärkere Proliferation der C57BL/6-Responderzellen ein.

Die bei der DZ-Depletion auftretende Zunahme an Gr-1⁺CD11b⁺F4/80^{-/+}-Zellen in der Milz üben keinen suppressiven Einfluss auf die T-Zellproliferation aus. Daher können diese Gr-1⁺-Zellen nicht den MDSC zugeordnet werden.

Der hier erstmalige Anstieg von neutrophilen Zellen in Abwesenheit von DZ ist wichtig für die Abwehr von Pathogenen. So konnte in darauf basierenden Arbeiten anderer Arbeitsgruppen eine bessere Eliminierung von Bakterien erzielt werden (Autenrieth, Warnke et al., 2012; Tittel, Heuser et al., 2012).

3.1.7 Bildung von anti-DT-Antikörpern ist abhängig von Anzahl und Dosis der DT-Injektionen

Da für Langzeitstudien DZ über einen längeren Zeitraum (Wochen) abgetötet werden sollen, sind aufgrund der schnellen Regeneration der DZ (3 Tage, Abbildung 3.11) mehrfache Injektionen mit DT nötig (Hochweller, Striegler et al., 2008). Durch die mehrfache DT-Injektion wird eine Ak-Antwort gegen das Ag DT initiiert. Sollte diese Ak-Antwort jedoch gespritztes DT neutralisieren und somit die beabsichtigte DZ-Depletion verhindern, so wäre dies unerwünscht. Zur Überprüfung dieser Frage wurde den CD11c.DOG-Mäusen mehrfach 8 ng/g KG DT gespritzt (1x, 2x & 4x plus 1x zur Depletionskontrolle am Tag 21) und der anti-DT-IgM- bzw. IgG-Antikörpertiter bestimmt. Dazu wurde vor der ersten DT-Injektion und an den Tagen 4, 7, 11, 14 und 21 Serum aus der Schwanzvene gewonnen und per ELISA die Menge an anti-DT-IgM- & IgG-Ak in seriellen Verdünnungsstufen bestimmt. Ausgelesen wurden die Proben am Photometer bei einer Wellenlänge von 490 nm (Enzymsystem: Meerrettichperoxidase mit Orthophenylendiamin als Substrat; Abbildung 3.25).

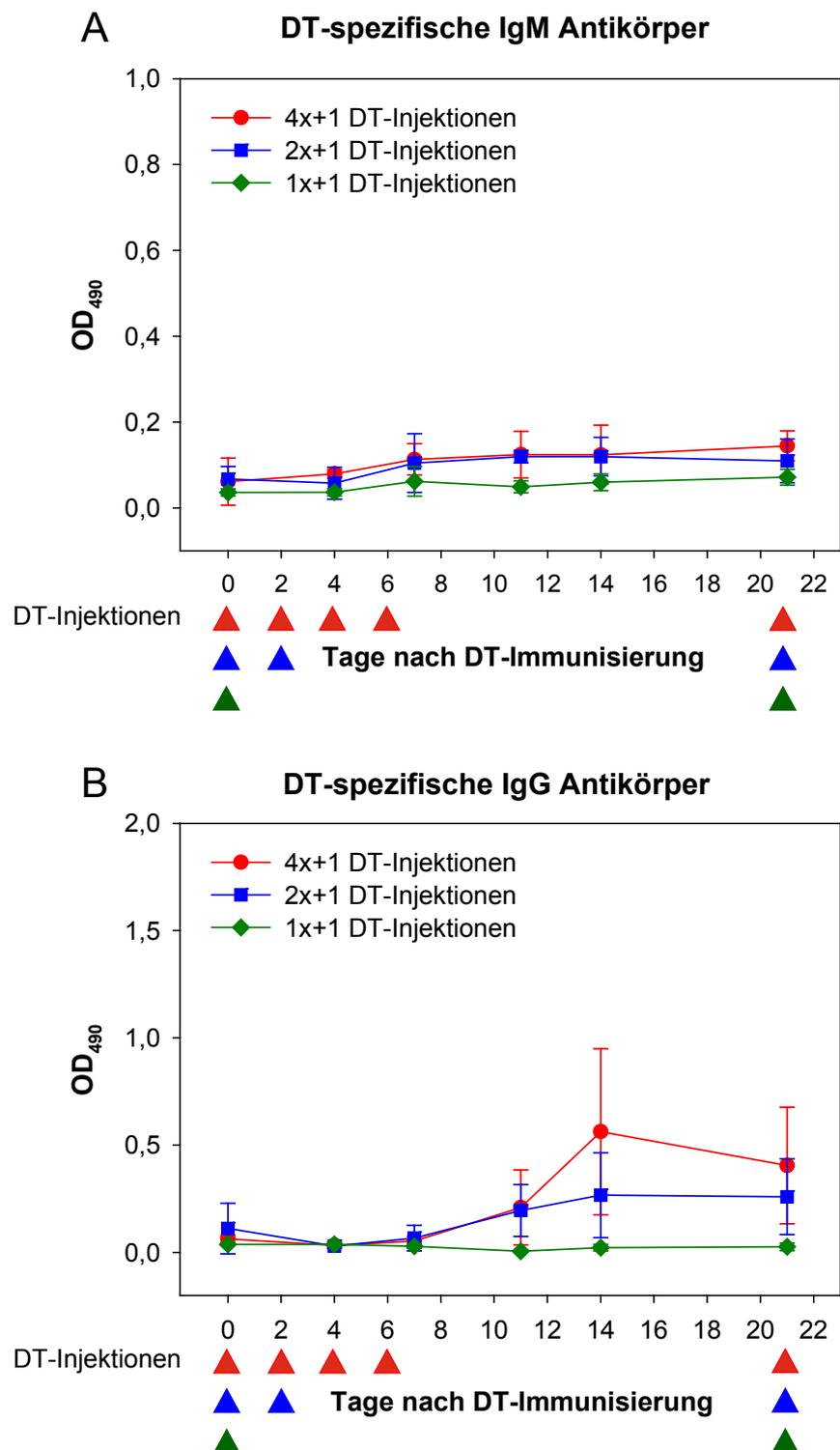


Abbildung 3.25: Bestimmung der IgM- & IgG-Immunantwort gegen DT nach einfacher/mehrfacher DT-Gabe

CD11c.DOG-Mäuse wurden mit 8 ng/g KG DT einmalig bzw. mehrmalig (durch Pfeile gekennzeichnet) ip. injiziert. Im gewonnenen Blutserum wurde mittels ELISA die anti-DT-IgM-Menge (A) & anti-DT-IgG-Menge (B) bestimmt. Gezeigt wird die Serum-Verdünnung 1:150 (Titer ~ 150). Pro Gruppe wurden 3 bzw. 4 CD11c.DOG-Mäuse eingesetzt.

Dabei wurde festgestellt, dass sowohl anti-DT-IgM-Ak als auch anti-DT-IgG-Ak in CD11c.DOG-Mäusen nur in sehr geringem Umfang gebildet wurden. Dies ist am niedrigen Titer von ca. 150 zu erkennen.

Die bestimmten Ak-Werte lassen keine ausreichende Bewertung zu, ob eine DZ-Depletion unter realen Bedingungen stattfinden würde bzw. ob DT neutralisiert wurde. Daher wurde nach 22 Tagen bestimmt, ob die letzte DT-Gabe (Tag 21) zu einer Depletion führt oder ob diese durch anti-DT-Ak verhindert wird (Abbildung 3.26).

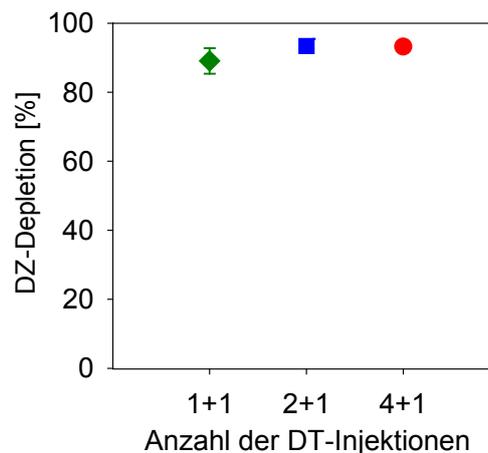


Abbildung 3.26: Bestimmung der DZ-Depletion nach „Immunisierung“ von CD11c.DOG-Mäusen mit DT

CD11c.DOG-Mäuse wurden mit 8 ng/g KG DT ip. zu folgenden Zeitpunkten (Tag 0, 2, 4, 6) einmalig, zweimal bzw. viermal behandelt/immunisiert. Am 21. Tag erfolgte die DT-Injektion für eine abschließende Depletionsanalyse zur Bestimmung der Effizienz der „DT-Immunisierungen“ nach 22 Tagen. Die Bestimmung der DZ-Depletion erfolgte durchflusszytometrisch. 3 bzw. 4 CD11c.DOG-Mäuse wurden pro Gruppe verwendet.

Dazu wurden die Milzzellen aus C57BL/6- & CD11c.DOG-Mäusen am Tag 22 isoliert und die DZ-Depletion per FACS-Messung bestimmt. Nach Auswertung der Rohdaten zeigte sich, dass in allen 3 Fällen (1x, 2x & 4x) eine fast vollständige Depletion erreicht wurde. Die gering vorhandenen anti-DT-Ak (Abbildung 3.25) konnten die DZ-Depletion nicht verhindern.

Es konnte gezeigt werden, dass keine schützende Ak-Antwort gegen DT induziert wurde und daher die DZ-Depletion über einen kürzeren Zeitraum durchgeführt werden kann.

Wie bereits gezeigt, kann eine Dosis von 8 ng/g KG DT auch über sehr lange Zeiträume in Mäuse injiziert werden, ohne eine schädliche Wirkung zu besitzen (Abbildung 3.6). Es zeigte sich jedoch, dass bei kontinuierlichen DT-Injektionen (jeden Tag) mit mehr als 11 Applikationen, keine DZ-Depletion mehr zu erzielen ist (Daten

nicht gezeigt). Daher stellte sich die Frage, ob nach lang anhaltender DT-Gabe (> 4 DT-Injektionen) eine erhöhte anti-DT-Ak-Konzentration die Ursache für das Ausbleiben der DZ-Depletion ist. Es wurde somit ein Experiment durchgeführt, bei dem über einen Zeitraum von 76 Tagen alle 48 h C57BL/6- und CD11c.DOG-Mäuse mit 8 bzw. 32 ng/g KG DT ip. injiziert wurden. Als Kontrolle dienten C57BL/6-Mäuse, die mit DPBS ip. injiziert wurden. Die unterschiedliche DT-Dosis wurde angewendet, um eine Dosisabhängigkeit feststellen zu können. Nach 22 und 76 Tagen wurde Serum entnommen und analog zum vorherigen Versuch ein anti-DT-ELISA durchgeführt (Abbildung 3.27). Bereits nach 22 Tagen bei 32 ng/g KG DT wurde in den C57BL/6- & CD11c.DOG-Mäusen ein Titer von ca. 5400 erreicht.

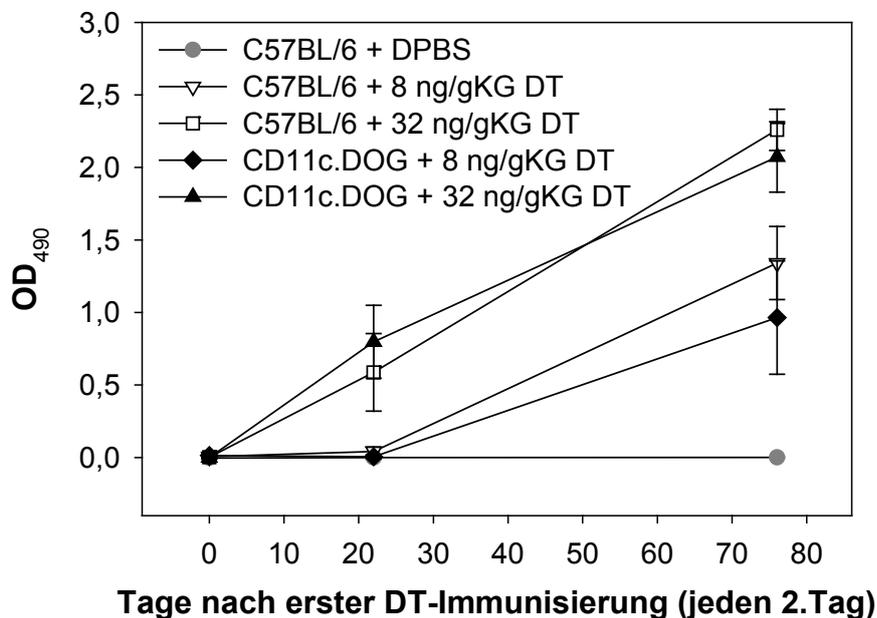


Abbildung 3.27: Kontinuierliche Injektionen mit hoher DT-Dosis über einen Zeitraum von 76 Tagen induzieren die Bildung von anti-DT-IgG-Ak

C57BL/6- und CD11c.DOG-Mäuse erhielten alle 2 Tage 8 oder 32 ng/g KG DT ip. injiziert. Nach 0, 22 und 76 Tagen wurde Serum gewonnen und ein ELISA zum Nachweis von anti-DT-Ak durchgeführt. Dargestellt sind die Ergebnisse der 1:16200-fachen Verdünnung des Serums. C57BL/6-Mäuse, die mit DPBS behandelt wurden, dienten als Negativkontrolle.

Wird hingegen die Standarddosis von 8 ng/g KG DT injiziert, so liegt der Titerwert am Tag 22 (11 Injektionen) bei beiden Mäusestämmen zwischen 100 und 200 (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis deckt sich mit den experimentellen Daten aus Abbildung 3.25, obwohl hier 11 statt 5 DT-Injektionen appliziert wurden. Daher sollte die erreichte „DT-Immunsierung“ erwartungsgemäß stärker ausfallen. Aufgrund der

Auslegung des Experiments primär auf 76 Tage (Langzeitversuch) erfolgte keine Überprüfung der DZ-Depletion nach 22 Tagen.

Nach 76 Tagen und 38 DT-Injektionen konnte bei den Gruppen mit 32 ng/g KG DT (C57BL/6 & CD11c.DOG) ein Titer von ca. 20000 gemessen werden. C57BL/6- & CD11c.DOG-Tiere bei denen eine Dosis von 8 ng/g KG DT injiziert wurde, wiesen einen Titer von ca. 10000 auf. Es konnte somit zu diesem späten Zeitpunkt (nach 11 Wochen) auch in der Gruppe mit 8 ng/g KG DT DT-spezifische Ak in umfangreicher Höhe detektiert werden.

Wie anzunehmen war, zeigte die Analyse der DZ-Depletion am Tag 76 keine Reduktion der dendritischen Zellen in CD11c.DOG-Mäusen (8/32 ng/g KG DT; Daten nicht gezeigt). Um die Wirksamkeit des am Tag 76 gewonnenen Serums bei der Inhibierung der DT-Depletion durch anti-DT-Ak zu bestimmen, wurde ein *in vitro*-Neutralisierungsversuch mit DT durchgeführt. Dabei wurden serielle Serumverdünnungen zusammen mit 10^{-9} M DT und einem Mix aus RMA- und RMA.DOG-Zellen für 23 h inkubiert. Die im Serum enthaltenen Anti-DT-Ak neutralisieren je nach Titer des Serums unterschiedliche Mengen an DT und ermöglichen somit das Überleben der RMA.DOG-Zellen. Mittels FACS-Messung konnte dann aus dem Verhältnis von RMA- zu RMA.DOG-Zellen die Depletion der RMA.DOG-Zellen und somit die Inhibierung der Depletion ermittelt werden (Kapitel 2.6.7.1 B). In Abbildung 3.28 sind die Ergebnisse dargestellt.

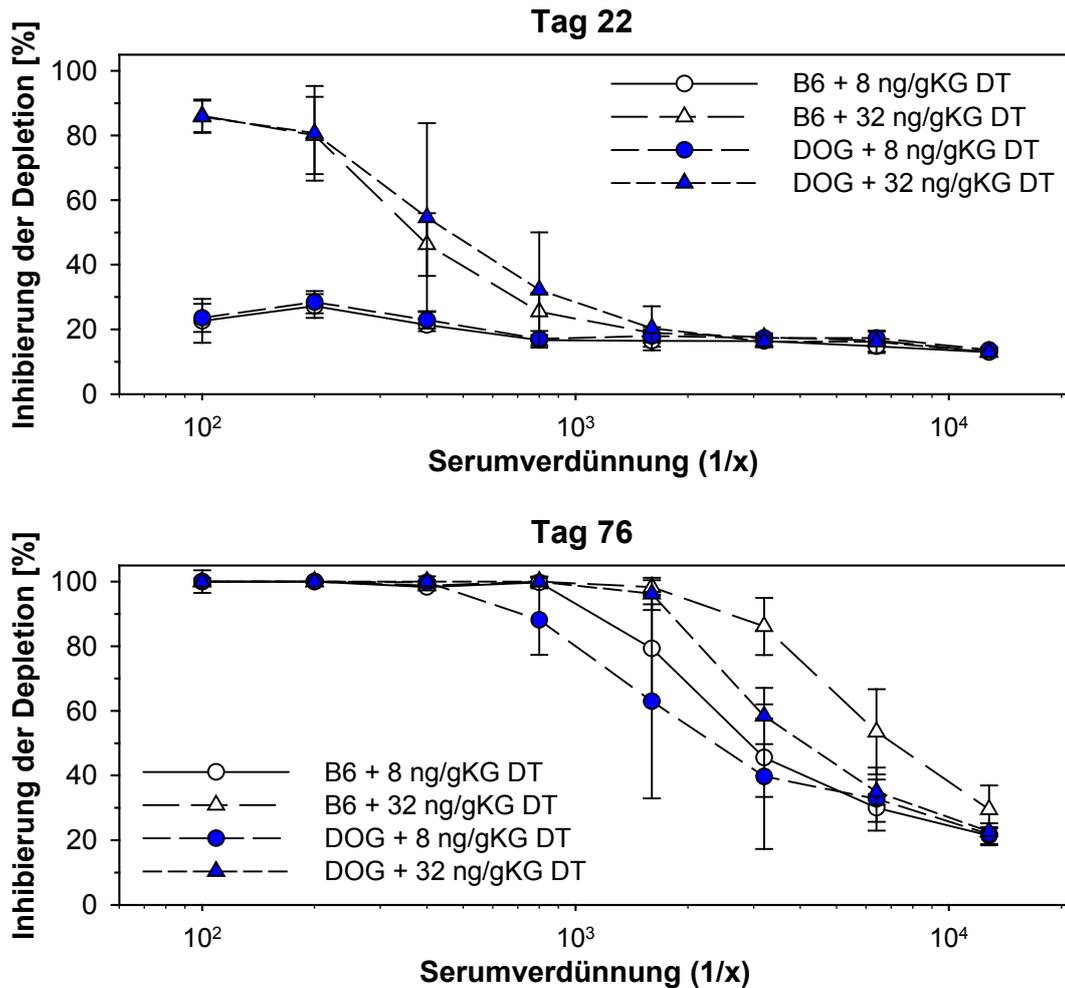


Abbildung 3.28: Inhibierung der Depletion von DT-sensitiven RMA.DOG-Zellen durch anti-DT-Ak

Depletion der RMA.DOG-Zellen *in vitro* nach Inkubation für 23 h mit 10^{-9} M DT und seriellen Serumverdünnungen. Dazu wurde ein definiertes Gemisch von RMA- & RMA.DOG-Zellen mit verdünntem Serum (1:100 bis 1:12800) der C57BL/6- & CD11c.DOG-Mäuse (mit 8 bzw. 32 ng/g KG DT aller 48 h für 22 bzw. 76 Tage) und 10^9 M DT für 23 h kultiviert. Danach konnte mittels FACS, über die eGFP-Expression der RMA.DOG-Zellen, die Reduktion dieser Zellen (im Verhältnis zu den RMA-Zellen) bestimmt werden. Die Inhibierung der Depletion (= 100 % - Depletion [%]) ließ sich damit ermitteln.

Die erzielten Ergebnisse vervollständigen die bereits oben gezeigten Resultate (Abbildung 3.27). Serum vom Tag 22 der Gruppen mit 8 ng/g KG DT (C57BL/6 & CD11c.DOG) zeigten keine Inhibierung der Depletion, im Gegensatz zu Serum der Gruppen mit 32 ng/g KG DT (C57BL/6 & CD11c.DOG). Diese Seren wiesen eine ca. 85 %-ige Inhibierung der Depletion (vgl. maximale Inhibierung der Depletion bei Tag 76 - Serumproben erreichen ca. 100 %) bei einer 1:100 Verdünnung auf. Serum, welches nach 76 Tagen gewonnen wurde, inhibiert die Depletion auch in den Gruppen (C57BL/6 & CD11c.DOG) mit 8 ng/g KG DT. So ist das Serum dieser Gruppen mit einer Verdünnung von 1:400 bzw. 1:800 fähig, eine vollständige Inhibierung der Depletion

zu erzielen. Das Serum der Gruppen mit 32 ng/g KG DT (C57BL/6- & CD11c.DOG) ist etwa 2 bis 4-fach stärker (Verdünnung 1:1600 inhibiert zu ~ 100 % die Depletion).

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass anti-DT-Ak in DT-gespritzten Mäusen induziert werden können. Der erreichte Titer und somit die Wahrscheinlichkeit zur Neutralisierung von DT durch Ak ist abhängig von der injizierten DT-Dosis und der Anzahl der Injektionen. Eindeutig festgestellt wurde die Inhibierung der DZ-Depletion nach 76 Tagen (DT-Injektion alle 48 h).

3.2 Zentrale Toleranz gegen Ovalbumin

Aufgrund der Expression der immundominanten Peptide des Ovalbumins in CD11c⁺-Zellen der CD11c.DOG-Mäuse (Abbildung 3.4) sollten diese Mäuse zentrale Toleranz gegen Ovalbumin aufweisen. Ovalbumin wird grundsätzlich nicht in C57BL/6-Tieren exprimiert, d.h. es sollten keine Ovalbumin-spezifischen T-Zellen in CD11c.DOG-Mäusen vorkommen.

Um Induktion zentraler Toleranz nachzuweisen, wurden OT-IxRag1KO-Mäuse mit CD11c.DOG-Tieren gekreuzt. Der RagKO-Hintergrund der Tiere war wichtig, damit gewährleistet ist, dass ausschließlich transgene OT-I-T-Zellen im Thymus dieser Tiere entstehen können (welche im Falle der Ausbildung von Toleranz schließlich absterben würden). OT-I-T-Zellen besitzen einen TZR bestehend aus einer $v_{\alpha}2$ - und $v_{\beta}5$ -Kette. Dieser TZR ist in der Lage, das immundominante Ovalbumin-Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ (S8L), welches von MHC I präsentiert wird, zu binden.

Die Auswertung des Experiments beinhaltete eine Durchflusszytometrieanalyse der OVA-spezifischen OT-I-Zellen des Thymus und der Milz (in den nächsten beiden Abbildungen dargestellt).

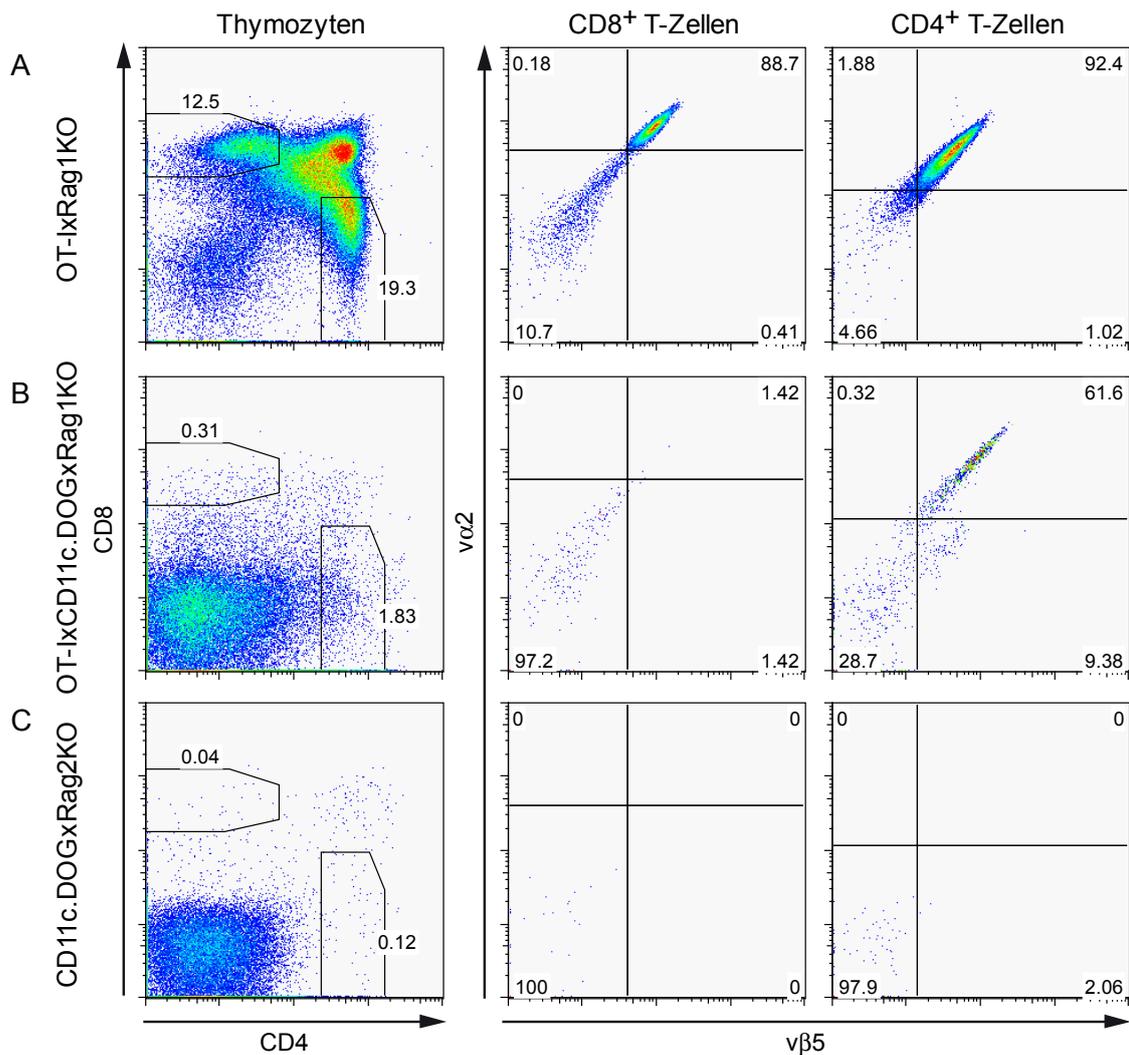


Abbildung 3.29: Zentrale Toleranz gegen Ovalbumin im Thymus von CD11c.DOG-Mäusen

Zur Bestimmung der zentralen Toleranz gegen Ovalbumin wurden CD11c.DOG-Mäuse mit OT-IxRag1KO (B) oder RAG2KO (C) gekreuzt. OT-IxRag1KO (A) dienen als Positivkontrolle zur Überprüfung der zentralen Toleranzinduktion durch OVA-Peptid. Aus adulten Mäusen wurden lebende Thymozyten präpariert und für die FACS-Analyse gefärbt. Es wurde gegen CD4, CD8, $v\alpha 2$ und $v\beta 5$ gefärbt.

In Abbildung 3.29 werden in der linken Spalte die gesamten Thymozyten, gefärbt mit anti-CD4 und anti-CD8 Ak, gezeigt. Bei den OT-IxRAG1KO-Tieren (Teilabbildung A) sieht man das klassische, schwalbenartige Muster analog zu dem einer Wildtyp-Maus (C57BL/6, Daten nicht gezeigt). Es enthält doppelt-negative, doppelt-positive und einfach $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ T-Zellen. Zeigt man nun separat CD8 bzw. CD4 T-Zellen hinsichtlich ihrer Expression der TZR-Ketten $v\alpha 2$ und $v\beta 5$, so wird deutlich, dass diese T-Zellen nahezu ausschließlich doppelt positiv sind (88,7 %). Diese Mäuse enthalten somit eine reine OVA-spezifische T-Zellpopulation im Thymus (Positivkontrolle für OVA-spezifische T-Zellen).

Die experimentell entscheidende Gruppe, die OT-IxCD11c.DOGxRag1KO-Mäuse, (Teilabbildung B) wies fast keine OVA-spezifischen CD8 T-Zellen im Thymus auf (vgl. 12,5 % CD8 T-Zellen zu 0,31 %).

Die CD11c.DOGxRag2KO-Tiere (Teilabbildung C) dienten als Kontrollgruppe, da bei diesen Mäusen sichtbar wird, dass durch das Fehlen des *Rag2*-Gens keine endogenen T-Zellen im Thymus vorhanden sind (0,04 % CD8 T-Zellen im Thymus bzw. 0,12 % CD4 T-Zellen).

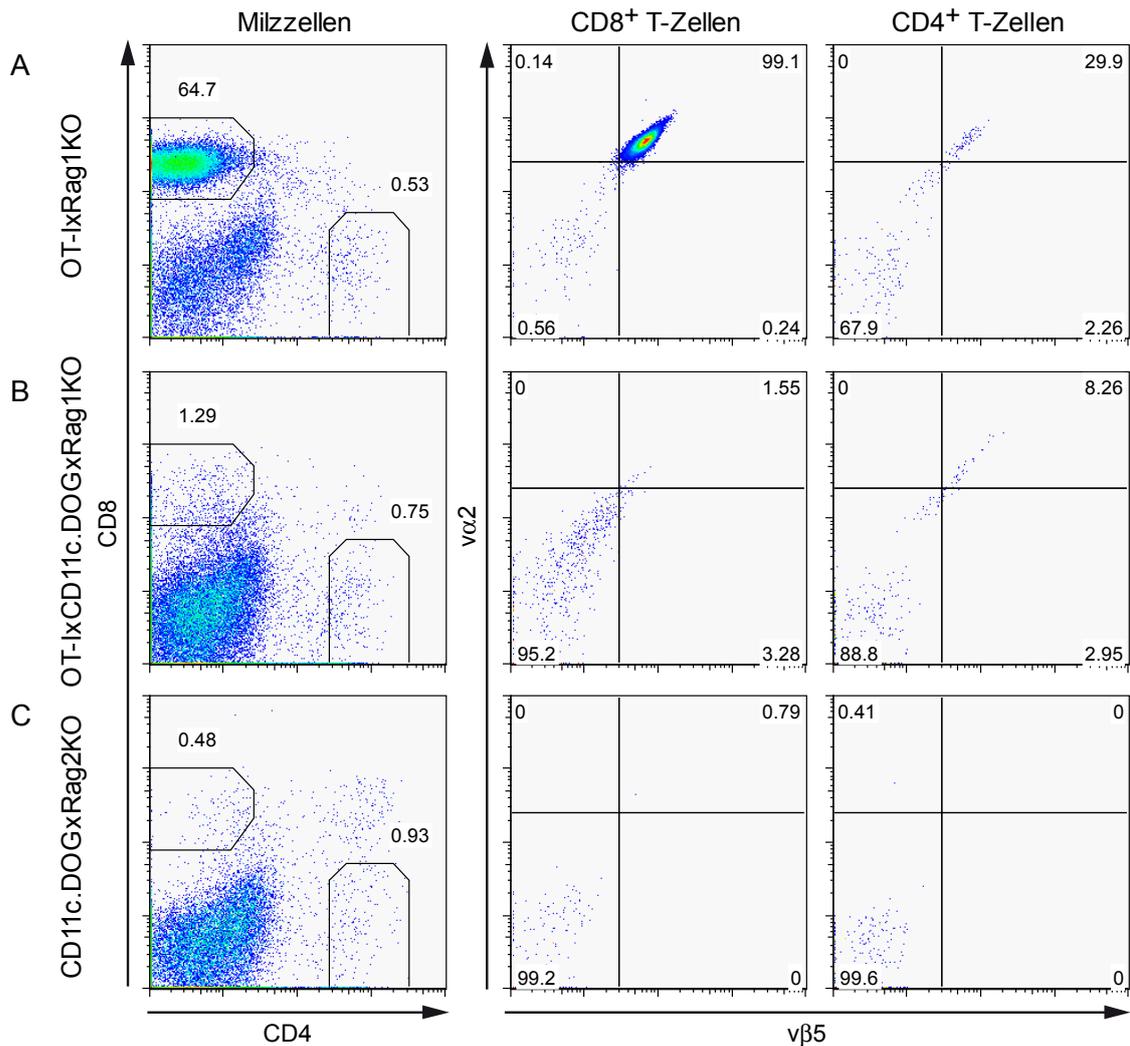


Abbildung 3.30: Periphere Toleranz gegen Ovalbumin in der Milz von CD11c.DOG-Mäusen

Für die Ermittlung der Toleranz gegen Ovalbumin in der Milz von CD11c.DOG-Mäusen wurden diese mit OT-IxRag1KO (B) oder RAG2KO (C) gekreuzt. OT-IxRag1KO (A) dienten als Positivkontrolle zur Überprüfung der Toleranzinduktion durch OVA-Peptid. Aus adulten Mäusen wurden lebende Milzzellen präpariert und für die FACS-Analyse gefärbt. Es wurde gegen CD4, CD8, vβ5 und vα2 gefärbt.

Parallel zum Thymus wurde auch in der Milz überprüft, ob in den CD11c.DOG-Mäusen OVA-Toleranz vorhanden ist. In Abbildung 3.30 werden die peripheren T-Zellen in der

Milz gezeigt. Im Unterschied zum Thymus sind bei OT-IxRag1KO-Mäusen (Teilabbildung A) fast keine CD4⁺ T-Zellen in der Milz vorhanden (Clarke, Barnden et al., 2000). 99,1 % der CD8⁺ T-Zellen sind $v_{\alpha}2^{+}$ und $v_{\beta}5^{+}$.

In den OT-IxCD11c.DOGxRag1KO-Mäusen (Teilabbildung B) ist analog zum Thymus ebenfalls fast keine CD8⁺ T-Zellpopulation zu detektieren. Dieses Ergebnis unterstreicht die Aussage, dass OVA₂₅₇₋₂₆₄ funktional in CD11c.DOG-Mäusen exprimiert, durch MHC-Klasse-I präsentiert wird und die CD8 T-Zellen über den OVA-spezifischen TZR deletiert werden.

Wie in Teilabbildung C zu erkennen ist, besitzen CD11c.DOGxRag2KO-Mäuse auch in der Milz keine T-Zellen.

Diese Analyse der T-Zellen in OT-IxCD11c.DOGxRag1KO-Mäusen zeigt praktisch eine vollständige Abwesenheit der OT-I-T-Zellen (in Thymus und Milz) und ist somit ein starker Hinweis für die Toleranzinduktion gegen Ovalbumin-spezifische T-Zellen in CD11c.DOG-Mäusen.

Als weiteren Beweis für die Toleranzinduktion gegen Ovalbumin in den CD11c.DOG-Mäusen wurde eine starke Immunantwort gegen Ovalbumin mittels eines für Ovalbumin kodierenden Adenovirus (AdOVA) induziert. Anschließend wurde die Stärke der Immunantwort mithilfe eines *in vivo*-Zytotoxizitätstests gegen K^b:OVA₂₅₇₋₂₆₄ (OVA₂₅₇₋₂₆₄ ist das immundominante Ovalbuminpeptid) gemessen. In C57BL/6-Mäusen wird durch die AdOVA-Infektion eine kräftige Abwehrreaktion erwartet. In den CD11c.DOG-Mäusen sollte sie aufgrund der Toleranzinduktion dagegen kaum vorhanden sein.

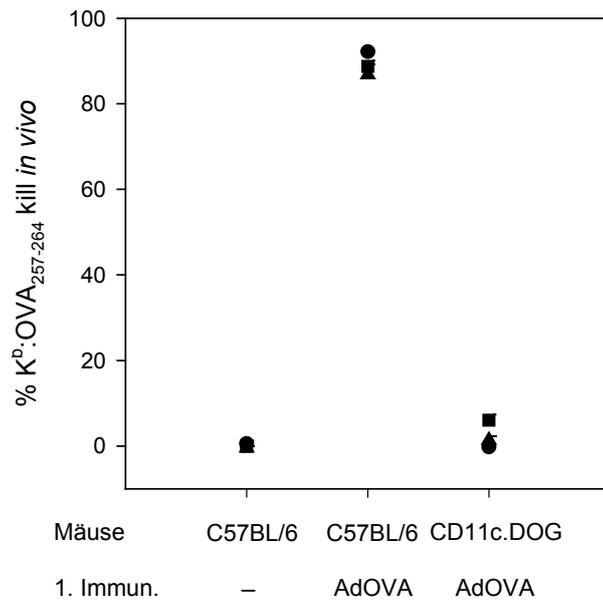


Abbildung 3.31: Nachweis der peripheren OVA-Toleranz von CD11c.DOG-Mäusen mittels AdOVA-Infektion

C57BL/6- und CD11c.DOG-Mäusen wurden 1 Mio. pfu AdOVA injiziert. Nach 7 Tagen erfolgte die Bestimmung der *in vivo*-Zytotoxizität gegen K^b:OVA₂₅₇₋₂₆₄ mittels FACS.

Wie in Abbildung 3.31 zu erkennen, weisen C57BL/6-Mäuse bei AdOVA-Infektion eine starke OVA-spezifische Immunantwort von ca. 90 % auf. Ohne Infektion ist die Zytotoxizität in C57BL/6-Mäusen praktisch nicht vorhanden. Bei den CD11c.DOG-Tieren konnte nahezu keine Immunantwort festgestellt werden. Es ist daher zu vermuten, dass keine autoreaktiven T-Zellen in der Peripherie vorhanden sind.

Als weiteren funktionalen Test für den Nachweis der möglichen Immunreaktion gegen Ovalbumin wurde die Menge an IFN- γ , welches von CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen der infizierten Tiere produziert wird, bestimmt (Abbildung 3.32). Dazu wurden 10⁷ Milzzellen der Mäuse des oben beschriebenen Experimentes mit OVA₂₅₇₋₂₆₄- und OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptiden *in vitro* für 5 Tage kultiviert. Diese Restimulation ermöglicht es, eine IFN- γ Produktion der T-Zellen per intrazellulärer FACS-Färbung nachzuweisen.

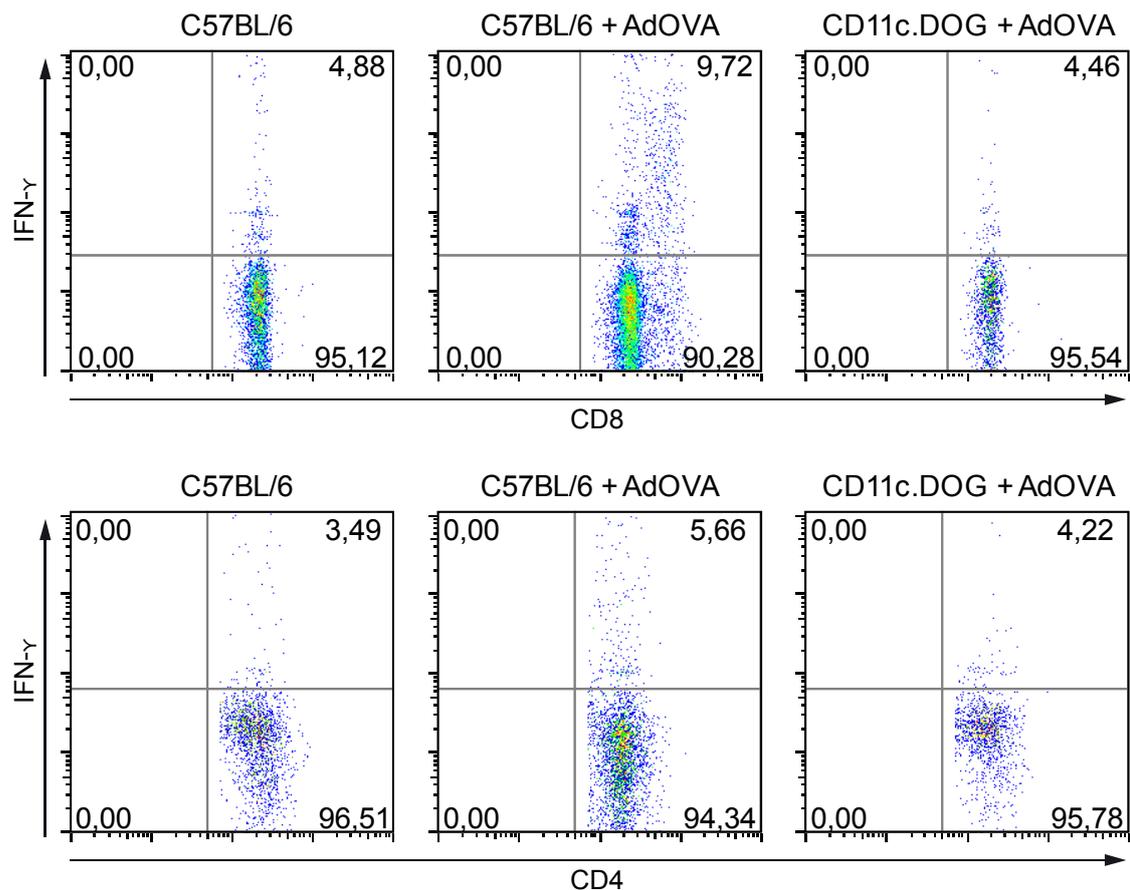


Abbildung 3.32: IFN- γ Produktion der CD8⁺ & CD4⁺ T-Zellen in C57BL/6- & CD11c.DOG-Mäusen

Nach Präparation der Milzzellen der experimentellen Tiere wurden 10^7 dieser Zellen mit $1 \mu\text{M}$ OVA₂₅₇₋₂₆₄⁻ und OVA₃₂₃₋₃₃₉⁻-Peptid für 5 Tage in einer 25 cm^2 Zellkulturflasche kultiviert. Anschließend wurden diese Zellen für 5 h mit Brefeldin A zur Akkumulation der Zytokine im Zytosol inkubiert. Per intrazellulärer FACS-Färbung wurde schließlich IFN- γ bestimmt.

Deutlich ist zu erkennen, dass ein großer Anteil der C57BL/6 CD8⁺ T-Zellen + AdOVA IFN- γ produziert (9,7 %). Die CD11c.DOG-CD8⁺ T-Zellen dagegen weisen einen geringeren Prozentsatz an IFN- γ ⁺-Zellen auf (4,5 %), der den nichtinfizierten C57BL/6 entspricht (4,9 %). Ein ähnliches Ergebnis ist bei den untersuchten CD4⁺ T-Zellen zu beobachten.

Die hier gezeigten Ergebnisse belegen, dass CD11c.DOG-Mäuse tolerant gegen Ovalbumin sind, da keine gegen Ovalbumin gerichtete Immunantwort zu verzeichnen war. Selbst die stark immunstimulatorische AdOVA-Infektion konnte die Toleranz nicht brechen.

3.3 Rolle der DZ in der Aktivierung von NK-Zellen

3.3.1 DZ-Depletion reduziert die NK-Zell-Aktivität

Wie bereits im Kapitel 3.1.6.1 gezeigt, exprimieren NK-Zellen CD11c. In diesem Experiment wurde auch deutlich, dass unter DT-Applikation die CD11c⁺ NK-Zellpopulation in der Milz zum Teil reduziert wird. Daher stellte sich die Frage, ob diese Reduktion einen funktionalen Einfluss auf die Gesamt-NK-Zellaktivität besitzt (Teilexperiment A).

Zur Überprüfung wurde folgender experimenteller Aufbau gewählt. Für das Teilexperiment A wurden CD11c.DOG-Mäuse +/- DT-Injektion genutzt. Die DT-Injektionen erfolgten 26 bzw. 18 h vor dem NK-Zell *in vivo*-Zytotoxizitätsassay (Schema in Abbildung 3.33 A, jedoch ohne CpG ODN 1668-Injektion). Bei dieser Methode injiziert man eine Zielzellpopulation (MHC-Klasse-I-defiziente Zellen, z.B.: Tapasin^{-/-}-Milzzellen) gemeinsam mit einer Referenzzellpopulation (C57BL/6-Milzzellen) in die zu untersuchenden Empfängermäuse. Durch unterschiedliche CFSE-Intensität können die Zellgruppen voneinander getrennt analysiert werden. Über die Abnahme der Zielzellen gegenüber den Referenzzellen kann die Zytotoxizität der NK-Zellen bestimmt werden.

Wie in Abbildung 3.33 C dargestellt, ist der NK-Kill *in vivo* bei den Tieren mit/ohne DT-Injektionen gleich stark (Teilexperiment A). Somit hat das Injizieren von DT und das Abtöten der DZ keinen Einfluss auf die NK-Zell-Aktivität.

Des Weiteren sollte die Rolle der DZ nach der Aktivierung der NK-Zellen mittels eines Stimulus (CpG ODN 1668) untersucht werden (Teilexperiment B).

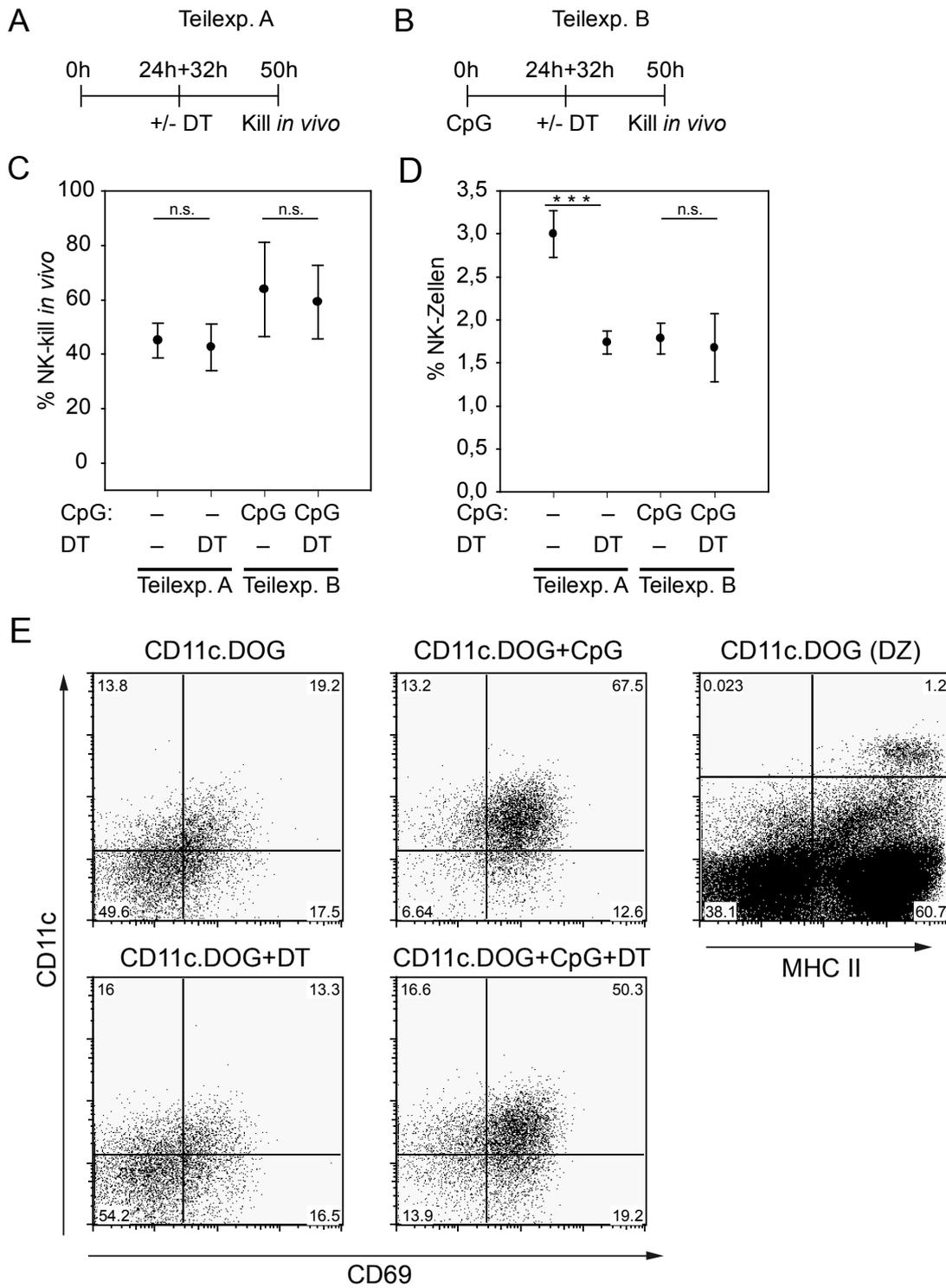


Abbildung 3.33: Einfluss von DT auf NK-Zellen in CD11c.DOG-Mäusen

(A/B) Schema der Teilerperimente A/B. Für die Teilerperimente A/B wurden CD11cDOG-Mäuse +/- DT-Injektion verwendet. 26 und 18 h vor dem NK-Zell *in vivo*-Zytotoxizitätsassay erfolgten die DT-Injektionen. Für das Teilexp. B erhielten die CD11cDOG-Mäuse einen Tag vor der ersten eventuellen DT-Injektion CpG ODN 1668 ip. als Stimulans injiziert. (C) NK-Kill *in vivo* für 2h. (D) Prozentsatz an NK-Zellen in der Milz nach NK-Kill *in vivo*. (E) Aktivierung von NK-Zellen durch CpG nach NK-Kill *in vivo* (anhand von CD11c- und CD69-FACS-Färbung). Im Vergleich dazu CD11c-Expression von DZ. Es wurde wie in Abbildung 3.2 auf lebende Zellen selektiert.

Für das Telexperiment B erhielten die CD11cDOG-Mäuse zusätzlich einen Tag vor der ersten DT-Injektion CpG ODN 1668 ip. als Stimulus injiziert (Schema in Abbildung 3.33 B). Der prinzipielle Ablauf glich dem Telexperiment A.

Der zu verzeichnende NK-Kill *in vivo* liegt bei etwa 60 % und zeigt somit den stimulierenden Effekt von CpG ODN 1668 gegenüber Telexperiment A (~ 45 % NK-Kill *in vivo*). Auch bei der NK-Zell-Aktivierung durch CpG ODN 1668 (vor der eventuellen DZ-Depletion) treten keine signifikanten Unterschiede bei dem NK-Kill *in vivo* auf. Das Vorhandensein von DZ nach der NK-Zell-Aktivierung per Stimulus ist für den NK-Kill *in vivo* somit unbedeutend.

Im Abbildung 3.33 D wird der prozentuale Anteil der NK-Zellen in der Milz aufgetragen. Zu erkennen ist dabei, dass die Injektion von DT, CpG ODN 1668 oder beidem eine ca. 43 % Abnahme der NK-Zellzahl in der Milz verursacht. Es ist davon auszugehen, dass die Wanderung der NK-Zellen in die Peripherie dafür verantwortlich ist (Persönliche Kommunikation mit A. Cerwenka, DKFZ).

Zur Überprüfung der NK-Zell-Aktivierung wurden die Aktivierungsmarker CD69 und CD11c überprüft (Abbildung 3.33 E). Durch CpG ODN 1668 steigt die Expression dieser Moleküle (ohne DT & CpG ODN 1668: von 19,2 % CD69⁺CD11c⁺-Zellen auf 67,5 %; mit DT von 13,3 % CD69⁺CD11c⁺-Zellen auf 50,3 %). Die Gabe von DT allein bewirkt keine Aktivierung der NK-Zellen (mit/ohne < 20 % CD69⁺CD11c⁺-Zellen). Zum Vergleich der CD11c-Expression bei DZ sind diese im rechten FACS-Diagramm gezeigt. Es macht deutlich, dass die Menge an CD11c pro NK-Zelle geringer ist als bei DZ (Fluoreszenzintensität).

In einem zweiten Experiment sollte die Rolle der DZ bei der NK-Zell-Aktivierung untersucht werden. Dazu erfolgte die Stimulation, im Gegensatz zum vorherigen Experiment, 24 h nach der DZ-Depletion (*in vivo*-Zytotoxizitätsassay wurde 16 h nach der DZ-Depletion gestartet; Abbildung 3.34 A). Neben CpG ODN 1668 wurden auch LPS und Poly I:C als Stimuli eingesetzt. Damit wurden Kontakte mit unterschiedlich stimulierenden Pathogenen nachgeahmt. CpG ODN 1668 (bindet an TLR9) wirkt als künstliches Analogon zu Bruchstücken mikrobieller DNA, LPS (bindet an TLR4) ist der Hauptbestandteil der Außenmembran von gram-negativen Bakterien und Poly I:C (bindet an TLR3) imitiert doppelsträngige Virus-RNA (Virusinfektionen).

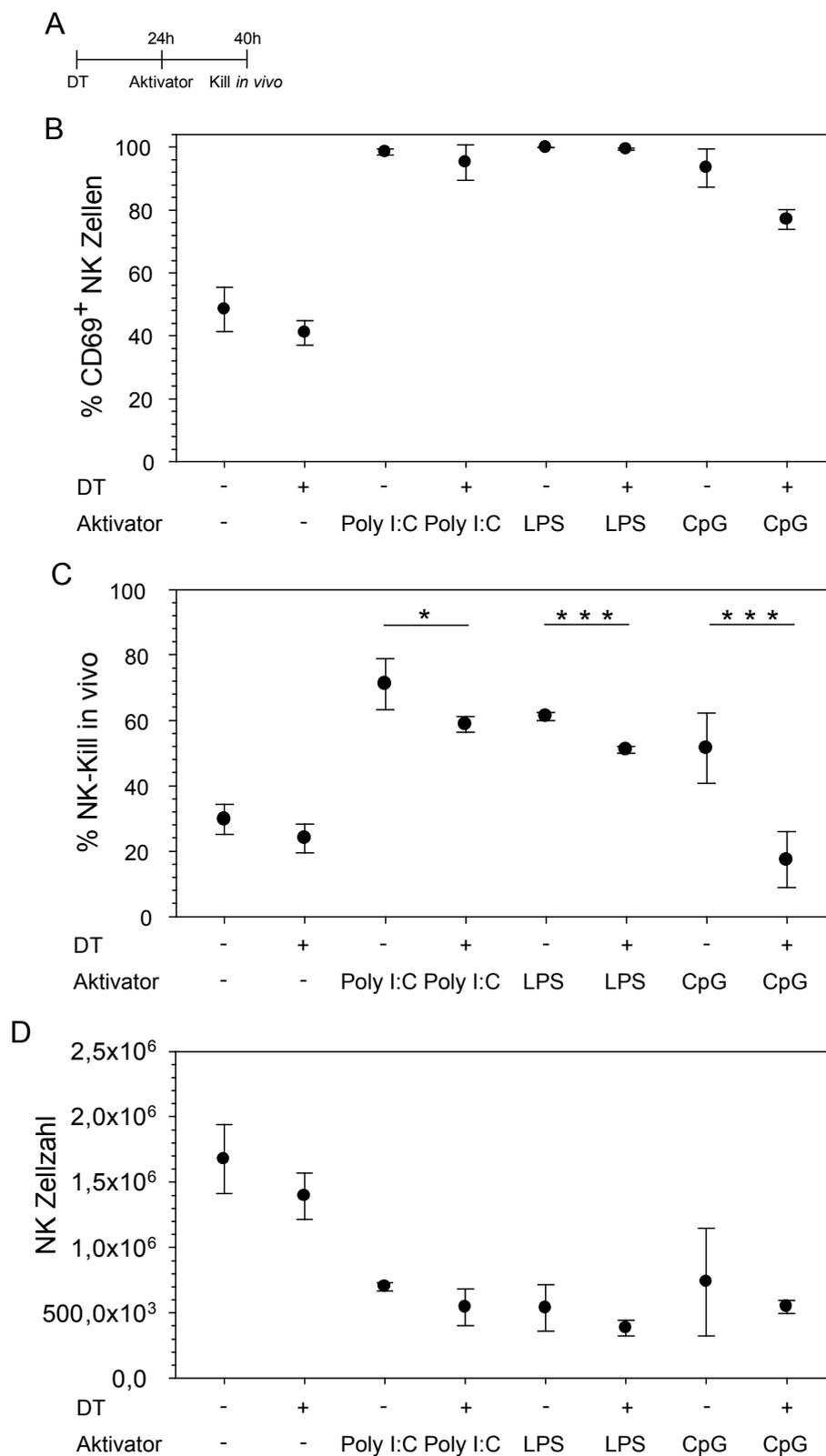


Abbildung 3.34: DZ sind für eine erfolgreiche NK-Aktivierung wichtig

(A) Schema des Experimentes. CD11cDOG-Mäuse +/- DT-Injektion erhielten 16 h vor dem NK-Zell *in vivo*-Zytotoxizitätsassay Injektionen mit folgenden Stimulanzen: Poly I:C, LPS oder CpG ODN 1668. Die Auswertung erfolgte mittels FACS-Messung. (B) Aktivierung der NK-Zellen (anhand der CD69-Expression). (C) NK-Kill *in vivo* für 2h. (D) NK-Zellzahl der Milz.

Die Abbildung 3.34 B zeigt zunächst die erfolgreiche Aktivierung der NK-Zellen (Nachweis mittels CD69-Expression) nach Stimulation durch Poly I:C, LPS oder CpG. DZ sind wichtig für die Aktivierung der NK-Zellen (Walzer, Dalod et al., 2005), daher ist durch die DZ-Depletion eine Einschränkung der NK-Zell-Aktivierung zu erwarten. Während nach Gabe von DT bei Poly I:C und LPS keine Reduktion der CD69-Expression zu verzeichnen war, sank diese bei Aktivierung mit CpG ODN 1668 von 90 % auf 77 % nach DT-Gabe (nicht signifikant).

Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in Teilabbildung C wieder. NK-Zellen, welche durch Poly I:C oder LPS aktiviert wurden (mit DT-Injektion), weisen nur eine leichte Reduktion des NK-Kill *in vivo* auf. Beide Resultate sind jedoch signifikant (Poly I:C $p < 0,05$ und LPS $p < 0,001$). Im Falle der CpG ODN 1668-Aktivierung sinkt der NK-Kill *in vivo* deutlich von 51 % (ohne DT-Gabe) auf 17 % (mit DT-Injektion, $p < 0,001$). Dieser Befund zeigt, dass die DT-induzierte Depletion der DZ die Effektorfunktion der NK-Zellen beträchtlich behindert.

Abbildung 3.34 D stellt die ermittelte NK-Zellzahl im Diagramm dar. Ohne DT und Aktivatoren liegt die Anzahl der NK-Zellen bei etwa 1,7 Mio. Durch die Injektion von DT verringert sie sich aufgrund der Depletion der CD11c⁺ NK-Zellen wie in Abbildung 3.16 und Tabelle 3.1 gezeigt bzw. durch eine Wanderung der NK-Zellen in die Peripherie durch DT (1. Experiment unter Kapitel 3.3.1). Wird ein Stimulus verabreicht, so sinkt die Zellzahl noch stärker. Der Umfang der Reduktion pro Stimulus (ohne DT) ist proportional der erreichten CD69-Aktivierung der NK-Zellen. Das weitere Absinken der NK-Zellzahl bei DT-Behandlung mit Stimuli im Vergleich ohne Stimuli (+ DT) kann durch die andere Abfolge der Injektionen begründet sein.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass DZ bei Poly I:C & LPS aber vor allem bei der CpG ODN 1668 vermittelten NK-Zellaktivierung einen essentiellen Bestandteil für das Erreichen der NK-Effektorfunktion darstellen.

3.4 Einfluss der DZ auf die Basisaktivierung von T-Zellen

Neben der Interaktion der DZ mit NK-Zellen sind vor allem Kontakte der DZ mit naiven T-Zellen entscheidend für die Ausbildung der Immunantwort. Kontakte zwischen DZ und T-Zellen, welche zur T-Zellaktivierung führen, finden fast ausschließlich in sekundären lymphoiden Organen wie Lymphknoten und Milz statt. In den Lymphknoten bilden die DZ mit ihren Dendriten ein dichtes Netzwerk, durch das sich

eingewanderte T-Zellen hindurchzwängen. Dabei tasten sie die DZ-Oberfläche nach dem MHC-Peptidkomplex ab, der zu ihrem TZR passt. Mithilfe von 2-Photonen-Mikroskopie konnte *in vivo* gezeigt werden, dass in Abwesenheit von Fremdartigen die Kontakte zwischen T-Zellen und DZ von kurzer Dauer (Sekunden bis Minuten) sind (Mempel, Henrickson et al., 2004; Celli, Garcia et al., 2005). Bei Kontakt einer T-Zelle mit einer das passende Fremdartigen tragenden DZ beträgt die Kontaktdauer länger als 30 min. Während dieser Zeit erfolgt die Aktivierung der T-Zelle. Man hat bisher angenommen, dass die kurzfristigen T-Zellen-DZ-Kontakte in Abwesenheit von Ag funktionell belanglos seien. Mithilfe der DZ-Depletion in den CD11c.DOG-Mäusen konnte nun untersucht werden, ob diese kurzfristigen Kontakte wirklich bedeutungslos sind. Hierzu wurden T-Zellen aus DZ-kompetenten und DZ-depletierten Mäusen isoliert und ihre TZR-vermittelte Stimulierbarkeit verglichen.

Als Stimulus für die TZR wurde *Staphylococcus*-Enterotoxin A (SEA) verwendet, welches eine Vielzahl von TZR aktiviert. Im Experiment wurden C57BL/6- und CD11c.DOG-Mäuse mit 8 ng/g KG DT an Tag 0 und an Tag 1 behandelt. Nach Aufreinigung der CD4 bzw. CD8 T-Zellen aus C57BL/6- bzw. CD11c.DOG-Mäusen am Tag 2 mittels MACS-Kit (positive Selektion) wurden die Zellen mit verschiedenen SEA-Konzentrationen (0,00005 bis 0,5 µg/ml) und mit bestrahlten und damit nicht mehr teilungsfähigen Milzzellen (enthalten APZ) für 4 Tage (CD8 T-Zellen) bzw. 5 Tage (CD4 T-Zellen) kultiviert. Abschließend wurde die Proliferation der T-Zellen über den [³H]-Thymidineinbau analysiert (Abbildung 3.35).

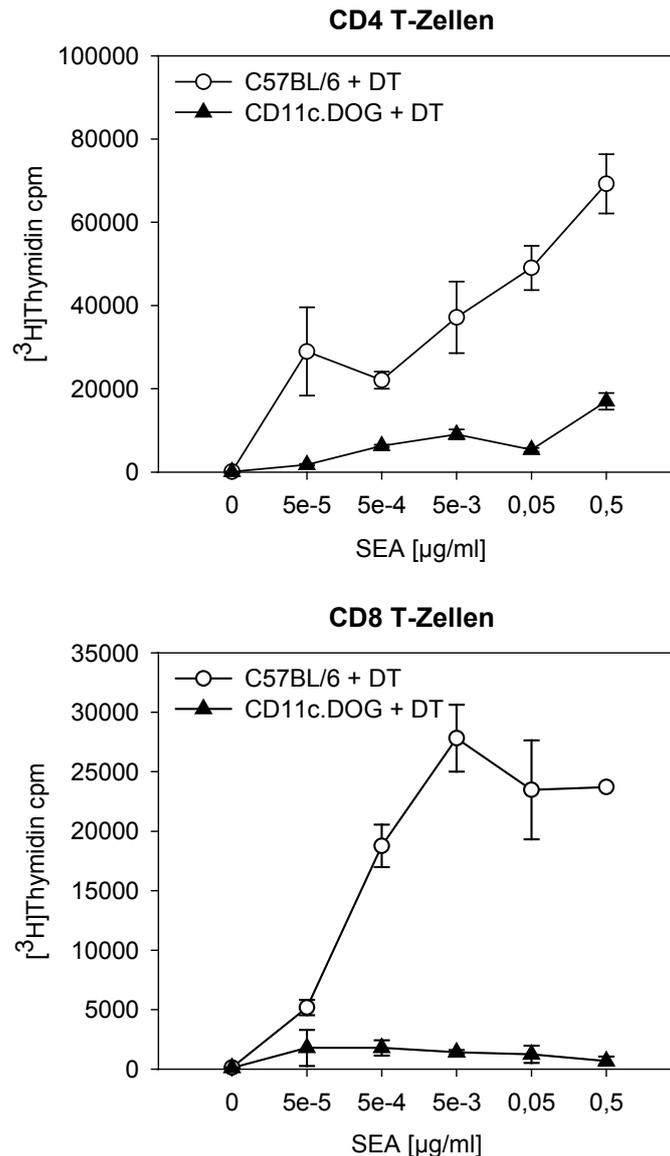


Abbildung 3.35: *In vitro*-Proliferation von CD4 und CD8 T-Zellen nach *in vivo*-DZ-Depletion

C57BL/6- und CD11c.DOG-Mäusen wurde 8 ng/g KG DT am Tag 0 & Tag 1 gespritzt. Am zweiten Tag erfolgte die Aufreinigung der CD4 bzw. CD8 T-Zellen mittels MACS-Kit (positive Selektion). Die Zellen wurden mit verschiedenen SEA-Konzentrationen (0,00005 bis 0,5 $\mu\text{g/ml}$) und mit 30 Gray bestrahlten Milzzellen (enthalten APZ; Milzzellen sind durch die Bestrahlung nicht zur Proliferation fähig) für 4 (CD8 T-Zellen) bzw. 5 Tage (CD4 T-Zellen) kultiviert. Der Einbau an [^3H]-Thymidin wurde als Maß für die Proliferation der CD4/8 T-Zellen bestimmt.

Es zeigte sich eine stark eingeschränkte *in vitro*-Proliferation von CD4 & CD8 T-Zellen unter SEA-Stimulation in CD11c.DOG-Mäusen im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen.

Dies deutet auf die wichtige Funktion der DZ in Bezug auf die Basisaktivierung von T-Zellen hin. Es ist noch zu bemerken, dass T-Zellen mit geringer Basisaktivierung bei Repopulation des DZ-Pools schnell wieder ihre Ag-Sensitivität wiedererlangen (Hochweller, Wabnitz et al., 2010).

Die DZ-Depletion führte auch zu einer Verringerung der Basis-TZR-Signalkaskadenaktivierung, welche durch die verringerte Phosphorylierung der TZR- ζ Kette im Western-Blot detektiert werden konnte (Information von Prof. Dr. N. Garbi). Die TZR- β -Expression war dagegen normal, wie inzwischen von Hochweller, Wabnitz et al., 2010 gezeigt werden konnte.

Die TZR-Signalkaskade leitet ausgehend vom TZR/CD3-Komplex durch zahlreiche Phosphorylierungen der Signalproteine die Information zu verschiedenen Transkriptionsfaktoren in den Zellkern (Abbildung 3.36).

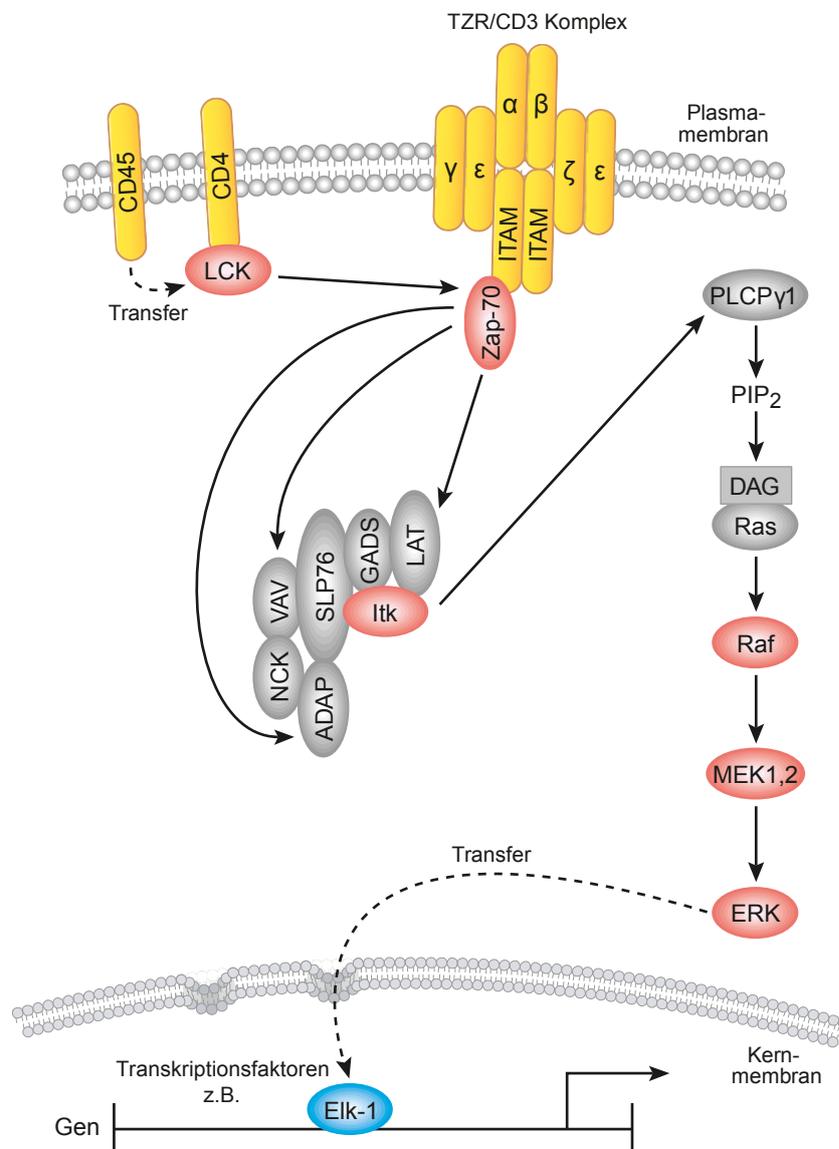


Abbildung 3.36: TZR-Signalkaskade

Proteinkinasen sind als rote Ellipsen dargestellt. Die Abbildung wurde modifiziert auf Grundlage einer Abbildung der Cell Signaling Technology, Inc.

Letzter Signalvermittler im Zytosol ist die Proteinkinase ERK (*extracellular-signal regulated kinase*). Daher sollte die Aktivierung von ERK näher unter DZ-Ausschluss (durch DZ-Depletion) oder bei Vorhandensein der DZ an frisch isolierten T-Zellen untersucht werden.

Für das in Abbildung 3.37 gezeigte *in vitro*-Experiment wurden T-Zellen (vorrangig CD8 T-Zellen) von OT-IxCD11c.DOG-Mäusen als Responderzellen (CD45.2⁺) eingesetzt.

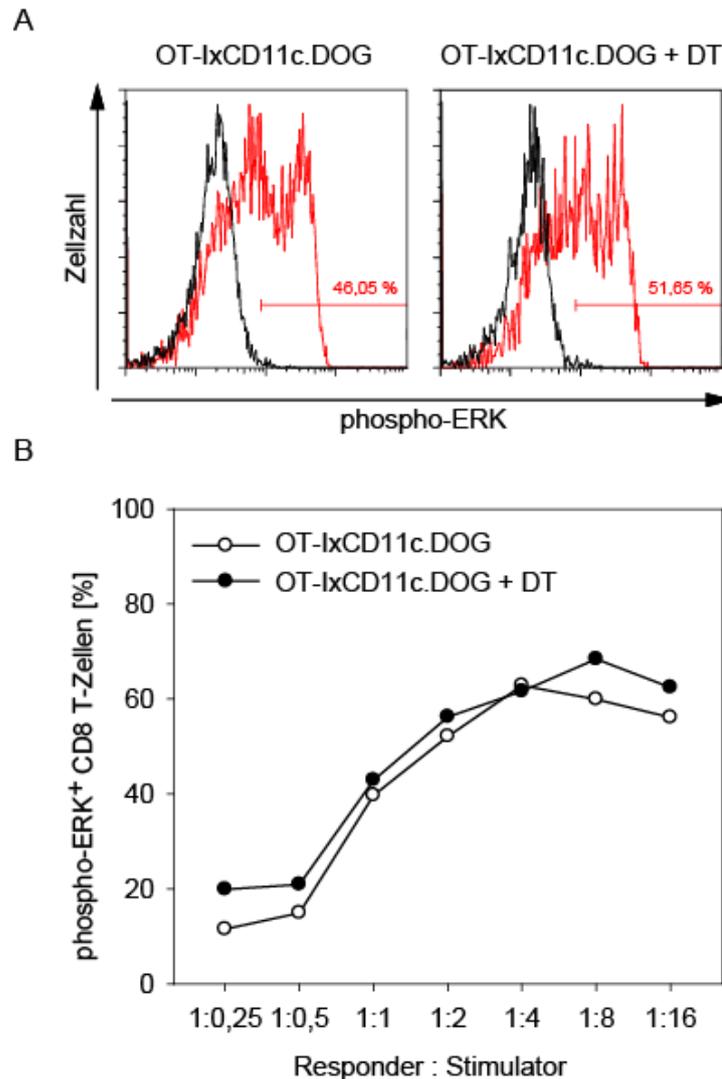


Abbildung 3.37: Analyse der Anzahl an phospho-ERK⁺ CD8 T-Zellen von OT-IxCD11c.DOG-Mäusen +/- DZ-Depletion *in vivo* unter OVA₂₅₇₋₂₆₄-Stimulation

OT-IxCD11c.DOG-Mäuse wurden 2x (48 h und 24 h vor der Inkubation mit den Responderzellen) +/- DT behandelt. Vor Zugabe der Responderzellen am Tag 0 (CD45.2⁺) inkubierten die Stimulatorzellen (CD45.1⁺) mit OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid für 30 min bei RT. Serielle Verdünnungen der Stimulatoren wurden mit den Responderzellen gemischt und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Fixierung, Permeabilisierung und Färbung der Zellen für die FACS-Messung. (A) Beispiele für eine phospho-ERK FACS-Färbung (schwarze Linie = Hintergrundkontrolle ohne Stimulatoren, rote Linie = mit Stimulatoren; Angabe der phospho-ERK⁺ CD8 T-Zellen [%]). (B) Diagramm mit dem prozentualen Anteil an phospho-ERK⁺ CD8 T-Zellen bei verschiedenen Responder/Stimulator-Verhältnissen in OT-IxCD11c.DOG-Mäusen +/-DT.

Dafür wurden diese Tiere 2x (48 h und 24 h vor der Inkubation mit den Stimulatorzellen) mit bzw. ohne DT (Kontrolle) behandelt. Die Stimulatorzellen (CD45.1⁺ Milz- & Lymphknoten-Zellen) wurden bei RT mit OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid inkubiert und anschließend seriell verdünnt. Die unterschiedlichen Mischungen von Responderzellen und Stimulatoren inkubierten dann bei 37 °C. Anschließend wurden die Zellen gegen phospho-Erk gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

Wie zu erkennen, ergibt sich bei steigender Stimulatorzellzahl eine Zunahme der phospho-ERK⁺ CD8 T-Zellen. Ein Unterschied zwischen den Responderzellen ohne/mit DT-Injektionen (folglich DZ An- bzw. Abwesenheit) konnte jedoch nicht festgestellt werden.

Das bedeutet, dass am Anfang erwähnte Reduktion der Phosphorylierung der TZR- ζ -Kette keine Änderung der phospho-ERK Menge bewirkt und sich somit kein Einfluss der DZ auf die „*downstream*“-Kinase ERK in der TZR-Signalkaskade erkennen lässt.

4 Diskussion

4.1 DZ-Depletion in CD11c.DOG-Mäusen

DZ spielen sowohl bei angeborener als auch adaptiver Immunabwehr eine entscheidende Rolle. Um die Funktion dieser Zellen genauer untersuchen zu können, wurden transgene Mäuse hergestellt, in denen DZ gezielt deletiert werden können. Durch die Depletion dieses Zelltyps sollte die Rolle der DZ bei verschiedenen immunologischen Prozessen erforscht werden.

4.1.1 Nachweis der Transgenexpression

Die von uns entwickelten transgenen Mäuse enthalten ein BAC mit einem CD11c-Promotor, welcher für ein Fusionsprotein bestehend aus humanem DTR, Ovalbuminfragment (Aminosäuren 140-386) und eGFP kodiert.

Die Kontrolle der Integration der Transgen-DNA erfolgte mittels Southern-Blot (Abbildung 3.1). Hierdurch konnten drei verschiedene Linien identifiziert werden.

Als funktionalen Nachweis der hDTR-Expression wurde die Anzahl der DZ in der Milz der drei CD11c.DOG-Mauslinien vor und nach Depletion mit DT bestimmt. Dabei zeigte sich, dass in einer der drei Linien (CD11c.DOG.S2) eine hohe DZ-Depletion (~90 %) erreicht wurde. Diese Linie wurde für die weiteren experimentellen Studien eingesetzt.

Der Nachweis der Expression der immundominanten Ovalbumin-Peptide erfolgte durch die Proliferation von OT-I- und OT-II-T-Zellen. Die Sensitivität der OT-I- und OT-II-T-Zellen wird deutlich, da selbst nach 7-facher DT-Injektion noch 100 % der OT-I-T-Zellen und 81 % der OT-II-T-Zellen proliferieren (70 h nach Zell-Transfer). Weniger als 10 % OVA-präsentierenden DZ reicht somit für die Proliferation der OT-I- bzw. OT-II-T-Zellen aus.

Die eGFP-Expression wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. EGFP konnte in den DZ von CD11c.DOG-Mäusen nicht detektiert werden. Ursachen dafür können erstens die Position nach dem Ovalbuminfragment, zweitens eine Fehlfaltung aufgrund der Position im Fusionsprotein als auch drittens durch die möglicherweise zu kurzen *Linker* (2 Aminosäuren) sein. Eine Identifizierung der transgenen Zellen sollte somit

über eine hDTR-Färbung mittels geeigneter Ak erfolgen. Der getestete anti-hDTR-Ak zeigte in der durchflusszytometrischen Analyse jedoch keine ausreichend starke Färbung.

4.1.2 CD11c.DOG im Vergleich zu anderen DZ-depletierenden transgenen Mäusen

Neben den CD11c.DOG-Mäusen existieren noch CD11c.DTR-Mäuse von Steffen Jung, welche ebenso das DTR-System zur DZ-Depletion verwenden (Jung, Unutmaz et al., 2002). Daher wurden beiden Mausmodelle hier eingehender verglichen.

Beide Mauslinien weisen Gemeinsamkeiten (C57BL/6-Hintergrundlinie, DTR-System, eGFP im Transgen enthalten) und auch Unterschiede auf (CD11c.DOG-Mäuse mit humanem statt primaten-DTR, BAC- gegenüber Plasmid-Promotor, mit bzw. ohne Ovalbuminfragment). Die Depletion von DZ wird jedoch bei beiden Mauslinien erreicht. Die nicht vorhandene eGFP-Expression in den CD11c.DOG-Mäusen stellt einen Nachteil dar. Ein Vorteil der CD11c.DOG-Mäuse ist die Expression der immundominanten Peptide des Ovalbumins, denn damit können Studien zur Toleranzinduktion durchgeführt werden. Diese Möglichkeit bietet die CD11c.DTR-Mauslinie nicht.

Ein wichtiger Vorteil der CD11c.DOG-Mäuse ist, dass sie DT-Injektionen über einen längeren Zeitraum vertragen, während die CD11c.DTR-Mäuse nach 2 bis 3 DT-Injektionen sterben wie von Jung und Kollegen bereits beschrieben (Jung, Unutmaz et al., 2002). Dadurch wird ihre Verwendbarkeit stark eingeschränkt. Die Mäuse können nur für Kurzzeitexperimente eingesetzt werden. Als Ursache kann eine aberrante Transgen-Expression (DTR-Expression) in nicht-hämatopoetischen, aber lebensnotwendigen Zellen angenommen werden (Zaft, Sapoznikov et al., 2005). Der verwendete kurze Promotorbereich (5,5 kb) könnte einer der Gründe dafür sein. Nur die aufwendige Herstellung von Knochenmarkchimären (CD11c.DTR KM → letal bestrahlte C57BL/6-Mäuse) bietet sich als Ausweichmöglichkeit für Experimente mit mehreren DT-Injektionen an (Zaft, Sapoznikov et al., 2005; Zammit, Cauley et al., 2005). Bei den CD11c.DOG-Mäusen wurde die BAC-Technologie eingesetzt, welche die Vorteile eines endogenen Promotors mit dem Vorhandensein von umfangreichen endogenen DNA-Sequenzen kombiniert (Abbildung 1.5). Dadurch wird eine zuverlässige Expression der Genkonstrukte erzielt und somit eine hohe Zellspezifität erreicht (Lee, Yu et al., 2001). Ein weiterer Vorteil von BACs ist, dass sie die nativen

Enhancer und Promotoren beinhalten. Somit entfällt die Notwendigkeit ihrer vollständigen Charakterisierung.

Bei der Langzeitdepletion zeigte sich in C57BL/6- und CD11c.DOG-Mäusen eine maximal verträgliche DT-Dosis von 32 ng/g KG DT (kontinuierlich jeden zweiten Tag). Tiere, welche wiederholt 64 ng/g KG DT injiziert bekamen, starben nach 4 – 8 DT-Gaben. Da diese Dosis über einen längeren Zeitraum verabreicht C57BL/6-Mäuse ebenfalls tötet, ist bei dieser Dosis bereits der murine DTR fähig DT zu binden und die Zellen sterben ab.

Tabelle 4.1: Zusammenfassung des Vergleiches von DTR-Mäusen mit CD11c-Promotor

Mäuse	CD11c.DTR	CD11c.DOG	CD11c.LuciDTR
Depletion über mehrere Wochen möglich	- (Mäuse sterben)	+	- (Mäuse sterben)
Promotor	5,5 kb Fragment im Plasmid	Original im BAC	Original im BAC
eGFP-Expression	+	-	+
Experimentalmmodell für Toleranz	(-)	+ (OVA-System)	(-)
Cre-Rekombinase	-	-	+
Luciferase-System	-	-	+

Während der Doktorarbeit wurde im Labor von Prof. Dr. Natalio Garbi noch ein weiteres DZ-spezifisches Mausmodell etabliert, welches das DTR-System nutzt (Tittel, Heuser et al., 2012). Diese CD11c.LuciDTR-Mäuse enthalten unter der Kontrolle des CD11c-Promotors neben eGFP, Cre-Rekombinase und DTR auch Luciferase. Damit ist nicht-invasive Ganzkörper-Biolumineszenz von DZ möglich. Die Cre-Rekombinase ermöglicht es, in DZ bei Kreuzung mit *loxP*-Mäusen spezifische Proteine an- bzw. auszuschalten. Dadurch wird die Einsatzmöglichkeit dieser DTR-Mäuse erhöht. Die Transgenexpression der CD11c.LuciDTR-Mäuse entspricht annähernd der der CD11c.DTR-Mäuse (eGFP⁺ DZ, CD11b⁺ und CD8⁺ cDZ, niedrige Expression in pDZ und keine Expression in NK-, NKT-, B-Zellen, Makrophagen und Granulozyten sowie sehr geringe Expression in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen; (Tittel, Heuser et al., 2012)). Die cDZ-Depletion in der Milz betrug über 90 %, die von pDZ etwa 50 % und der Haut-Langerhanszellen von 65 - 75 %. Die geringe Anzahl an CD11c⁺ T-Zellen wurde ebenfalls depletiert. Diese Depletionsergebnisse entsprechen denen der CD11c.DTR- und CD11c.DOG-Mäuse. In den CD11c.LuciDTR- und CD11c.DTR-Mäusen wurden zum

Teil noch CD11c^{mittel}-Plasmablasten aus der Milz depletiert. Als Nachteil der CD11c.LuciDTR-Mäuse wurde festgestellt, dass sie nicht mehr als 5 Injektionen 8 ng/g KG DT (1x täglich) überleben.

Allen Mäusen gemeinsam ist die Verwendung des CD11c-Promotors. Er wurde genutzt, da zum Zeitpunkt der Herstellung dieser Mäuse kein DZ-spezifischer Promotor bekannt war. Kürzlich wurde ein neuer cDZ-spezifischer Transkriptionsfaktor publiziert. zDC (Zbtb46) wird außer in cDZ nur noch in cDZ-Vorläuferzellen, nicht aber in pDZ, Monozyten, Makrophagen und NK-Zellen exprimiert (Meredith, Liu et al., 2012; Satpathy, Kc et al., 2012). Meredith et al. generierten eine zDC-DTR-Maus mit hDTR und mCherry (rot fluoreszierendes Protein) als knock-in im 3' UTR des Zbtb46-Lokus. In diesen Mäusen werden erfolgreich selektiv cDZ depletiert, jedoch ist mCherry nicht funktional. Zur Depletion ist zu bemerken, dass NK-, B-, T-Zellen, pDZ und aktivierte Monozyten unverändert bleiben; Neutrophile und Monozyten analog zu den CD11c.DTR- und CD11c.DOG-Mäusen jedoch zunehmen (Kapitel 4.1.7). Zur Depletion der cDZ in zDC-DTR-Mäusen ist noch anzumerken, dass in einigen nicht-lymphatischen Geweben nur eine partielle Depletion der CD11c^{hoch}MHCII⁺-DZ erfolgt, da CD11b⁺-DZ nicht nur aus cDZ-Vorläuferzellen sondern auch aus Monozyten hervorgehen, in denen das zDC-Transgen nicht exprimiert ist.

Die Sensitivität der zDC-DTR-Mäuse bezüglich DT ist ähnlich wie bei CD11c.DTR-Mäusen. Sie sterben jedoch bereits innerhalb von 24 bis 48 h nach nur einer Injektion. Dies gilt auch für zDC-DTR-Mäuse (mit Gammastrahlen behandelt und somit „frei“ für eine Besiedelung des Knochenmarks mit teilungsfähigen, unbehandelten Knochenmarkszellen) denen Knochenmarkszellen von C57BL/6-Mäusen transferiert wurden. Werden jedoch Knochenmarkszellen von zDC-DTR- in C57BL/6-Mäuse transferiert, so überleben diese Knochenmarkschimären DT-Injektionen für > 2 Wochen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass unbekannte, γ -strahlenresistente und lebensnotwendige Zellen das Transgen exprimieren.

Dies bedeutet der „z“ Promotor ist auch in anderen Nicht-DZ aktiv, da ja keine aberrante Expression bei dieser Knock-in-Maus möglich ist. Die DZ-Spezifität ist somit nicht vollständig. Die Nutzungsmöglichkeiten der zDC-DTR-Mäuse ist daher eingeschränkt.

4.1.3 DZ-Depletion in lymphoiden Organen

Da sich DZ längere Zeit in den lymphoiden Organen aufhalten, ist eine hohe DZ-Depletion hier sehr wichtig. In der Milz konnte eine nahezu vollständige Depletion der DZ erreicht werden (> 90 %). Bereits eine DT-Dosis von nur 8 ng/g KG DT ist dafür ausreichend. Eine Erhöhung der DT-Menge hat nur minimale Auswirkungen bei der DZ-Depletion in der Milz zur Folge.

In Lymphknoten, Knochenmark und Thymus wurden mit 8 ng/g KG DT DZ-Depletionen von 50 bis 66 % erreicht (Abbildung 3.10). Über die Gründe für diese geringere Depletion kann nur gemutmaßt werden. Eine Ursache dafür könnte sein, dass die Milz viel stärker durchblutet wird als Lymphknoten, Knochenmark und Thymus und somit mehr DT in die Milz gelangen könnte. Als weitere mögliche Ursache könnte eine unterschiedliche Menge von Vorläufer-DZ sein.

Damit DZ auch in Lymphknoten, Knochenmark und Thymus erfolgreich deletiert werden, sollten daher Dosen von 32 ng/g oder, wenn kurzzeitig verabreicht, auch 64 ng/g KG DT injiziert werden.

4.1.3.1 Kinetik der DZ-Depletion in der Milz

Für die DZ-Depletion über einen längeren Zeitraum sind mehrere DT-Injektionen notwendig. Damit eine gleichbleibend niedrige DZ-Zellzahl in den experimentellen Mäusen erreicht wird, muss der Zeitpunkt des Anstiegs der DZ-Zellzahl nach erster DT-Injektion bestimmt werden. Dies wurde anhand einer Depletionskinetik ermittelt.

Dabei konnte zunächst der Beginn der vollständigen DZ-Depletion festgestellt werden. 12 h nach DT-Gabe war die DZ-Depletion nahezu komplett (Abbildung 3.11). Im FACS-Diagramm wird deutlich, dass bereits zum 24 h-Zeitpunkt eine Zunahme der CD11c^{niedrig}-Zellpopulation festgestellt werden kann (Daten nicht gezeigt). Diese CD11c^{niedrig}-Zellen sind vermutlich Vorläuferzellen, welche die Basis für die bald zunehmende DZ-Population bilden, da festgestellt wurde, dass differenzierte DZ ihre Teilungsrate nicht ändern (Hochweller, Miloud et al., 2009). Bis etwa 48 h nach DT-Injektion ist die DZ-Depletion vorhanden. Erst nach 4 bis 7 Tagen wird die zahlenmäßige Wiederherstellung des DZ-Pools erreicht. Dabei treten zwischen den verschiedenen DZ-Subtypen kleine Unterschiede auf. CD8⁻CD4⁺ DZ sind länger in niedriger Anzahl vorhanden (nach ca. 7 Tagen wiederhergestellte Zellpopulation) als CD8⁺CD4⁻ DZ. Die pDZ-Zellpopulation erreicht ihr normale Zellzahl in ähnlicher Zeit wie die CD8⁻CD4⁺ DZ.

Bei einer über einen längeren Zeitraum anhaltenden, permanenten DZ-Depletion empfehlen sich somit DT-Injektionen aller 48 h.

4.1.3.2 Untersuchungen zur Homöostase von DZ mittels CD11c.DOG-Mäusen

Wie in Abbildung 3.11 gezeigt, erreicht nach etwa 4 bis 7 Tagen die DZ-Population wieder ihr ursprüngliches Niveau (ca. 3×10^6 DZ pro Milz einer Maus). Wie es genau zu dieser Wiederherstellung der Population kommt war unklar. Konkret stellten sich die Fragen, welche Zellen sind an der Expansion beteiligt und welche Signale (oder Mangel an Signalen) regulieren die Proliferation des DZ-Zellpools.

Bei T-Zellen ist der Homöostasemechanismus bereits genauer untersucht worden. Einfach erklärt: T-Zellen werden durch verschiedene Faktoren wie z. B. IL-7 zur Proliferation angeregt. Dabei wird IL-7 sukzessiv durch die größeren T-Zellzahlen „verbraucht“. Bei Erreichen einer zu niedrigen Konzentration stoppt schließlich die weitere Expansion und die Anzahl an T-Zellen erreicht ihren Normalwert (negativer Rückkopplungsprozess).

Die Arbeiten zur DZ-Homöostase wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Garbi parallel mit den CD11c.DOG-Mäusen zu dieser Promotionsarbeit durchgeführt. Daher werden diese Ergebnisse hier kurz zusammengefasst. DZ teilen sich im Gegensatz zu T-Zellen kaum. Sie werden kontinuierlich aus DZ-Vorläuferzellen gebildet. Das Zytokin Flt3L (*Fms-related tyrosine kinase 3 ligand*) ist dabei für die Differenzierung der Vorläuferzellen in reife DZ ein essentieller Faktor (Waskow, Liu et al., 2008). Es wird von verschiedenen Gewebezellen produziert und bindet an seinen Rezeptor Flt3, welcher sich auf DZ-Vorläuferzellen und differenzierten DZ befindet. Unsere Arbeitsgruppe beobachtete nun unter DZ-Abwesenheit einen erhöhten Serumspiegel von Flt3L sowie eine erhöhte DZ-Vorläuferaktivität. Diese Ergebnisse machen es wahrscheinlich, dass durch den Verbrauch (Bindung) von Flt3L durch *de novo* generierte differenzierte DZ eine Abnahme an verfügbarem Flt3L entsteht. Der Mangel an Flt3L bewirkt bei den DZ-Vorläuferzellen schließlich einen Rückgang ihrer Proliferation. Die ursprüngliche DZ-Population wird somit ebenfalls über einen negativen Rückkopplungsmechanismus reguliert (Hochweller, Miloud et al., 2009).

4.1.4 Erfolgreiche Depletion der DZ auch in nicht lymphoiden Organen

Aufgrund der weiten Verbreitung der DZ im Körper wurden auch Lunge und Haut hinsichtlich der DZ-Depletion untersucht. Die beobachteten hohen

Depletionsergebnisse von 84 % in der Lunge, 98 % in der Epidermis bzw. 91 % in der Dermis (Abbildung 3.13 und Abbildung 3.14) können jedoch nur als Hinweis auf eine ähnlich gute Depletion in diesen Geweben gedeutet werden, da hierbei eine zu geringe Anzahl an Mäusen verwendet wurde. Ein Vergleich zwischen der CD11c.DOG- und der CD11c.DTR-Mauslinie kann bei dieser Analyse somit nicht getroffen werden.

Die erhaltenen Daten ergänzen jedoch die von van Rijt et al. gezeigten Ergebnisse, mithilfe des DTR-Depletionssystems DZ auch in der Lunge zu eliminieren (van Rijt, Jung et al., 2005).

4.1.5 Aktivierte OT-I- und OT-II-T-Zellen reduzieren DZ in CD11c.DOG-Mäusen

Als weitere Möglichkeit zur DZ-Depletion diente die Expression des OVA-Fragments in den CD11c.DOG-Mäusen. Mithilfe einer AdOVA-induzierten Aktivierung der OT-I- und OT-II-T-Zellen wurden die DZ durch ihre Präsentation der OVA₂₅₇₋₂₆₄ und OVA₃₂₃₋₃₃₉ Peptide durch zytotoxische T-Zellen lysiert. Die erzielte Depletion von 79 % nach 6 Tagen, ist nicht vollständig, in Anbetracht des Zeitraumes nach OT-I/OT-II-Transfer, ist es jedoch als gut zu beurteilen (Abbildung 3.15).

Aufgrund dieser Fakten konnte trotz eingeschränkter Verwendbarkeit ein prinzipieller Beweis für eine Reduktion der DZ per OT-I- bzw. OT-II-T-Zellen erbracht werden.

4.1.6 Analyse des Einflusses von DT auf andere Lymphozytenpopulationen

CD11c stellt den bis heute besten bekannten Marker für alle DZ-Subpopulationen dar. Daher wurde er bei der Etablierung dieser transgenen Maus verwendet. Die Expression von CD11c ist in DZ sehr ausgeprägt. CD11c wird jedoch neben DZ auch in anderen Immunzellen exprimiert, allerdings nur auf einem geringen Prozentsatz dieser Zellen.

Deshalb wurde auch der Einfluss der DT-Injektion auf andere CD11c⁺-Zellen untersucht (Abbildung 3.16). Bei der quantitativen Analyse von B-, CD8-T-, CD4-T-, NK- und NKT-Zellen wurde nur ein geringer Prozentsatz von CD11c^{hoch}-Zellen gefunden (zwischen 0,45 % und 0,72 % vom Zelltyp). Nur diese wurden mit DT depletiert (62 % bis 89 %). Der Anteil an CD11c^{niedrig} B-, CD8-T-, CD4-T-, NK- und NKT-Zellen liegt zwischen 1,5 und 4,4 %. Nur die NK-Zellen weisen einen recht hohen Prozentsatz von 17,8 % CD11c^{niedrig}-Zellen auf. Allgemein wurde aber eine deutlich geringere Depletion

der CD11c^{niedrig}-Zellen ermittelt (25 bis 61 %). Insgesamt muss festgestellt werden, dass ein geringer Anteil an Zellen außerhalb des DZ-Pools CD11c stark exprimiert und mit DT depletiert wird. Die Auswirkungen der Depletion dieser kleinen B- bzw. T-Zellpopulationen wurden anhand ihrer *in vitro*-Proliferation untersucht. Mittels CpG ODN- bzw. ConA-Stimulation (für B- bzw. T-Zellen) wurde die Zellproliferation unter DT-Einfluss beobachtet. Ein Einfluss auf die B-Zellproliferation konnte nicht festgestellt werden. Im Falle der T-Zellen wurde ebenfalls kein Unterschied bei der *in vitro*-Proliferation ersichtlich. Als zusätzliches Experiment wurden CFSE-markierte Zellen bei *in vitro*-Proliferationen eingesetzt, um auch auf Einzellebene mögliche Auswirkungen zu untersuchen. Es traten auch dabei keine Einschränkungen bei den B- und CD4 T-Zellen auf (Abbildung 3.19). Bei den CD8 T-Zellen reduzierte sich die Zellproliferation bei 10^{-9} M DT und somit möglicherweise bei *in vivo* Standard-DT-Konzentrationen (8 ng/g KG DT entspräche *in vivo* etwa $1,9 \times 10^{-9}$ M). Ob die *in vitro*-Konzentration damit vergleichbar ist, ist schwer einzuschätzen. Durch Proteinabbau und höherer Wahrscheinlichkeit von unspezifischer Bindung in der Maus gegenüber der kleinen *in vitro*-Kavität, sollte *in vivo* eine geringere effektive Konzentration, als theoretisch ermittelt, vorherrschen. CD4 T-Zellen zeigen erst bei hohen DT-Konzentrationen von 10^{-7} M ein reduziertes Teilungsvermögen. Da diese Konzentrationen *in vivo* jedoch nicht verwendet werden, stellt dies keine Beeinträchtigung beim Einsatz dieser transgenen Mäuse dar.

Aufgrund der Analysen von metallophilen und Marginalsinus-Makrophagen (MOMA-1⁺ und ERTR-9⁺) in der Milz von CD11c.DTR-Mäusen wurden auch hier diese Makrophagen-Subpopulationen histologisch untersucht (Probst, Tschannen et al., 2005). In den CD11c.DOG-Mäusen zeigte sich eine Depletion dieser Zellen. Die Ergebnisse sind analog zu den in CD11c.DTR-Mäusen gefundenen. Daher kann vermutet werden, dass diese Makrophagen ebenfalls CD11c exprimieren und daher den hDTR auf der Zelloberfläche präsentieren. Dieser Befund muss bei Experimenten mit CD11c.DOG-Mäusen bedacht werden, in denen diese Makrophagen-Subpopulationen eine Rolle spielen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in den Experimenten zwar eine geringfügige Depletion von B-, T-, NK- und NKT-Zellen gefunden wurde, eine Beeinträchtigung der biologischen Funktion der jeweiligen Gesamtzellpopulation erfolgte jedoch nicht.

4.1.7 Anstieg der Gr-1⁺ Zellpopulation nach DT-Depletion

In den histologischen Schnitten der Milz zeigte sich eine massive Zunahme von CD11b⁺ Zellen, speziell der Gr-1⁺-Zellen nach DZ-Depletion. Diese bemerkenswerte Tatsache wurde weiter in einer Kinetik untersucht (Abbildung 3.23). Es konnte gezeigt werden, dass die maximale Zunahme dieser Zellen nach etwa 2 Tagen nach DT erfolgt und daraufhin wieder eine Normalisierung nach 3 Tagen eintritt.

Diese Zellpopulation teilt sich in 2 Teilpopulationen auf, die Gr-1^{sehr hoch} oder Gr-1^{hoch} sind. Beide Populationen nehmen nach DT-Injektion in CD11c.DOG-Mäusen stark zu. Gr-1 und speziell F4/80⁺ sind in der Literatur als Marker sowohl für Monozyten und Neutrophile als auch MDSC beschrieben. Da diese Gr-1⁺-Zellen keine supprimierende Wirkung in T-Zellproliferationsexperimenten zeigten, lässt darauf schließen, dass die in dieser Arbeit untersuchten Zellen keine MDSC sondern Monozyten bzw. Neutrophile sind. Von diesen Zellen ist bekannt, dass sie Bakterien abtöten können. Tatsächlich zeigten neuere, weiterführende Untersuchungen von Tittel et al. und Autenrieth et al., dass der Anstieg an Gr-1⁺-Zellen in CD11c.DOG-Mäusen eine Steigerung der bakteriellen Immunabwehr und ein gesteigertes Überleben der Tiere zur Folge hatte (Autenrieth, Warnke et al., 2012; Tittel, Heuser et al., 2012). In mit *Yersinia enterocolitica* infizierten Milzen von DT-behandelten Mäusen waren die Bakterien vorrangig in Neutrophilen und Monozyten vorhanden. Diese Zellen konnten die Bakterien effektiver töten, da z.B. in den Neutrophilen die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies gesteigert ist. Einhergehend mit den gestiegenen Anteilen an Neutrophilen wurde ein Zuwachs an G-CSF, CCL2, CXCL1, Flt3L und IL-1α im Serum von DT-behandelten CD11c.DOG-Mäusen festgestellt.

4.1.8 Dosis und Anzahl der wiederholten DT-Injektionen entscheiden über die Bildung einer wirksamen anti-DT-Antikörperantwort

In Langzeitexperimenten mit wiederholter DT-Depletion wurde überraschenderweise keine Depletion der DZ mehr beobachtet (mehr als 11 DT-Injektionen bei täglicher Applikation). Daher wurde untersucht, ob in Experimenten mit langanhaltender DZ-Depletion durch die wiederholten DT-Injektionen neutralisierende Ak gebildet werden. Es konnte gezeigt werden, dass nur bei sehr häufig wiederholten DT-Injektionen anti-DT-Ak entstehen (Abbildung 3.27). Anti-DT-Ak wurden dabei über ihre Inhibierung der Depletion von DT-sensitiven RMA.DOG-Zellen nachgewiesen. 1:2000 bis 1:6000

verdünntes Serum von Mäusen nach 38 DT-Injektionen inhibierte zu 50 % die Depletion der DT-sensitiven RMA.DOG-Zellen.

Die Bildung von anti-DT-Ak war überraschend. Erstens wurde DT ohne ein Adjuvanz injiziert, welches normalerweise für eine Ak-Bildung notwendig ist. Zweitens sollte theoretisch keine Ak-Bildung in DZ-depletierten Tieren erfolgen, da DZ bei der Aktivierung der CD4⁺ T-Helferzellen wichtig sind und CD4⁺ T-Helferzellen wiederum durch die B-Zellinteraktion die Ak-Produktion erst einleiten. Um diesen Sachverhalt zu erklären, könnte man vermuten, dass einerseits andere Ag-präsentierende Zellen wie z. B. Makrophagen das DT präsentieren oder die verbliebenen, nicht depletierten 10 % der DZ für die DT-Präsentation genügen.

4.1.9 Toleranzinduktion gegen Ovalbumin

Bei der Analyse der T-Zellen in OT-IxCD11c.DOGxRag1KO-Mäusen konnten praktisch keine OT-I-T-Zellen im Thymus oder in der Peripherie (Milz) nachgewiesen werden (Abbildung 3.29). Folglich werden die Ovalbumin-spezifischen Zellen schon zentral im Thymus depletiert, was zur Toleranz für Ovalbumin in den CD11c.DOG-Mäusen führt.

Die Toleranz konnte in CD11c.DOG-Mäusen auch nach Infektion mit AdOVA gezeigt werden. Normalerweise induziert AdOVA eine sehr starke zytotoxische Antwort gegen Ovalbumin, aber in den CD11c.DOG-Mäusen zeigte sich im *in vivo*-Zytotoxizitätstest und bei der *in vitro* IFN- γ -Produktion nach Restimulation nahezu keine Immunantwort (Abbildung 3.31). Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass selbst das starke Immunstimulans einer AdOVA-Infektion nicht in der Lage ist, die Ovalbumin-Toleranz zu brechen.

4.2 Rolle von DZ für die NK-Zellaktivierung und NK-Zellhomöostase

DZ sind auf die Erkennung von Pathogenen spezialisiert und in fast allen Geweben des Körpers zu finden. Sie erkennen und binden Pathogene mit Hilfe der sogenannten *pattern recognition receptors* (PRR). Dies führt auf DZ zur MHC-vermittelten Präsentation von Ag, welche dann T-Zellen aktivieren und somit die Eliminierung der Pathogene einleiten. Bei einer Infektion werden jedoch häufig zuerst und sehr schnell NK-Zellen als eine erste Abwehrreaktion aktiviert. In der Literatur gibt es Hinweise, dass NK-Zellen mit DZ kommunizieren können. Deshalb untersuchte unsere Arbeitsgruppe (AG), ob NK-Zellen für die Aktivierung mit bakteriellen Produkten wie *tol*

like receptor-Liganden (TLR-Liganden) DZ benötigen. Folglich wurde mithilfe der CD11c.DOG-Mäuse die NK-Zell-Aktivierung *in vivo* in An- und Abwesenheit von DZ untersucht.

Wie unter Abbildung 3.34 gezeigt, kann eine DZ-Depletion die NK-Zellaktivität verringern, wenn sie vor der Stimulation erfolgt. Dabei treten jedoch Unterschiede zwischen den Stimulatoren (LPS, CpG ODN 1668, Poly I:C) auf. Vor allem bei der CpG ODN 1668 vermittelten NK-Zellaktivierung (über TLR-9) spielen DZ eine entscheidende Rolle ($p < 0,01$). Aber auch bei LPS und Poly I:C Stimulation (über TLR-4 bzw. TLR-3) sind DZ nötig, wie die Reduktion des NK-Kill *in vivo* zeigt. DZ sind somit für den Aktivierungsprozess von NK-Zellen (*priming*) wichtig (Hochweller, Striegler et al., 2008).

Schleicher et al. zeigten, dass die IL-12 Produktion durch DZ wichtig für die NK-Zellaktivierung ist (Schleicher, Liese et al., 2007). Ausgelöst werden diese Signale über die Bindung an die TLR der DZ.

Wurden die DZ jedoch nach Aktivierung der NK-Zellen (mit CpG ODN 1668) depletiert, so beeinflussten sie die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen nicht (Abbildung 3.33 B-E). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Pathogenabwehr durch bereits aktivierte NK-Zellen weitgehend ohne DZ-Beteiligung abläuft.

In weiteren Experimenten wurden die CD11c.DOG-Mäuse zur Klärung der Frage eingesetzt, ob DZ an der Homöostase von NK-Zellen beteiligt sind. Über die Homöostase von T-Zellen ist viel bekannt, unter anderem die Beteiligung von verschiedenen Faktoren wie DZ, Selbst-MHC-Molekülen und dem Zytokin IL-7, das für Proliferation und Überleben wichtig ist (Surh und Sprent, 2005). Im Gegensatz dazu war nur sehr wenig über die NK-Zell-Homöostase bekannt, insbesondere wurde eine Abhängigkeit von DZ bisher nicht untersucht. Von unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass von DZ produziertes IL-15 auch einen fördernden Einfluss auf die NK-Zellhomöostase ausübt (Hochweller, Striegler et al., 2008). Da die NK-Homöostase aber nicht völlig von DZ und IL-15 abhing, scheinen noch andere, nicht identifizierte Faktoren eine Rolle zu spielen.

4.3 DZ-vermittelte Basisaktivierung von T-Zellen

Mit dem hier vorgestellten CD11c.DOG-Mausmodell gelang es auch neue Einblicke, in die Basisaktivierung von T-Zellen zu gewinnen. Wie bereits erwähnt, tasten T-Zellen DZ

in lymphoiden Organen kontinuierlich auf die Anwesenheit von Fremdartigen ab. In Abwesenheit von fremdem Ag führt dieser Vorgang zu einer Vielzahl von kurzfristigen Kontakten, wobei eine DZ von 500-5000 T-Zellen pro Stunde kontaktiert wird (Mempel, Henrickson et al., 2004; Miller, Hejazi et al., 2004). Im gegenteiligen Fall, also unter Anwesenheit von Fremdartigen, werden deutlich längere Kontaktzeiten zwischen T-Zellen und DZ beobachtet (mindestens 30 bis 60 Minuten). Bisher wurde vermutet, dass die kurzzeitigen Kontakte unbedeutend für die Funktion der T-Zellen sind. Mittels der Möglichkeit der DZ-Depletion konnten wir untersuchen, ob die kurzfristigen Kontakte in Abwesenheit von Ag wirklich ohne Konsequenzen sind. In der Tat konnte gezeigt werden, dass T-Zellen aus Mäusen, in denen die DZ depletiert waren, nur noch sehr unvollständig auf den TZR-Stimulus SEA reagierten (Abbildung 3.35). Weitergehende Arbeiten von Hochweller et al. zeigten außerdem die Reversibilität dieses Prozesses in weniger als 30 Minuten, wenn die hyporesponsiven T-Zellen mit normalen DZ *in vitro* unter Abwesenheit von Ag inkubiert wurden (Hochweller, Wabnitz et al., 2010). Das Ausmaß der T-Zellantwort korrelierte auch mit der DZ-Anzahl in den lymphoiden Organen. Wurden nur 50 % der DZ depletiert, so war die T-Zellreaktivität nur teilweise eingeschränkt. Dies bedeutet umgekehrt, dass T-Zellen eine partielle Reduktion der DZ von 50 % „bemerken“ können, wie sie nach bestimmten bakteriellen Infektionen auftreten können.

Bei Experimenten mit Phorbol-12-myristat-13-acetat und Ionomycin, welche eine TZR-unabhängige Proliferation von T-Zellen bewirken, wurde kein Einfluss der DZ-Depletion festgestellt. Somit ist die Ag-Erkennung Bedingung für den Verlust der T-Zellproliferation unter DZ-Mangel. In weiterführenden Arbeiten der AG Prof. Dr. Garbi konnte gezeigt werden, dass diese Basisaktivierung der TZR durch eine permanente Stimulation mit Selbst-Peptid/MHC-Komplexen von DZ-Zellen vermittelt wird. Neben der Reduktion von Ag-spezifischer T-Zellproliferation unter DZ-Ausschluss ist auch die Etablierung von Immunsynapsen defekt.

Da die Hyporeaktivität der T-Zellen innerhalb von 20 – 30 min reversibel war, wurde der Phosphorylierungsstatus der TZR- ζ Kette von der AG Prof. Dr. Garbi im Western-Blot untersucht (Hochweller, Wabnitz et al., 2010). In der Tat konnte eine starke Reduktion der Phosphorylierung der TZR- ζ Kette in T-Zellen aus DZ-depletierten Mäusen festgestellt werden.

Um die TZR-Signalkaskade genauer zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit der Anteil an phospho-ERK⁺ CD8 T-Zellen bestimmt (ERK - *extracellular signal-*

regulated kinase). Phospho-ERK ist die aktivierte Form dieser Proteinkinase, welche direkt auf verschiedene Transkriptionsfaktoren wirkt. Im Experiment (Abbildung 3.37) konnte jedoch kein Unterschied zwischen der Anzahl an phospho-ERK⁺ CD8 T-Zellen mit/ohne DZ-Depletion beobachtet werden. Damit wird auch deutlich, dass vorrangig der initiale Teil der TZR-Signalkaskade durch die Basisaktivierung beeinflusst wird.

In vergleichbaren Arbeiten konnten Stefanova et al. zeigen, dass die Basis-TZR-Aktivität der T-Zellen durch Kontakte mit Selbst-Peptid/MHC-II-Komplexen zu erhöhten CD4 T-Zellantworten führt, jedoch identifizierten die Autoren nicht die entscheidenden APZ, nämlich die DZ (Stefanová, Dorfman et al., 2002). Der genaue Prozess inwiefern die TZR-Basisaktivierung durch eine permanente Stimulation mit Selbstpeptid/MHC-Komplexen von DZ-Zellen zur Ausbildung der Immunsynapse und der gesteigerten T-Zell-Sensibilität gegenüber fremden Ag führt, bleibt noch zu untersuchen.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass T-Zellen eine kontinuierliche Stimulierung durch Selbst-Peptid/MHC-Komplexe auf DZ benötigen. Nur so ist es ihnen möglich ihr intrinsisches Aktivierungsniveau auf eine Ebene zu bringen, die es ihnen ermöglicht, schnell und effizient auf Fremdartigen reagieren zu können. Dieser Prozess erinnert an die positive Selektion von T-Lymphozyten im Thymus, wo T-Zellen durch den Kontakt mit Selbst-Peptid/MHC-Komplexen ein positives Signal erfahren, wodurch sie überleben und schließlich in die Peripherie entlassen werden. Es ist daher vorstellbar, dass T-Zellen auch in der Peripherie dieses positive Signal benötigen, um ihre Reaktivität voll entfalten zu können.

5 Abkürzungsverzeichnis

ADCC	antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (<i>antibody dependent cell-mediated cytotoxicity</i>)
AdOVA	Adenovirus Ovalbumin kodierend
ADP	Adenosindiphosphat
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
APZ	Antigen-präsentierenden Zellen
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
bp	<i>base pairs</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CCL2	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 2</i> (auch <i>monocyte chemoattractant protein-1</i> (MCP-1))
CCR	Chemokin-Rezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDC	complement-dependent cytotoxicity
cDZ	<i>conventional dendritic cells</i>
CFSE	5,6-Carboxyfluoreszein Succinimidyl Ester
ConA	Concanavalin A
cpm	<i>counts per minute</i>
CpG	immunstimulatorisches Motiv mit Cytosin-Guanosin Dinukleotid in bakterieller DNA
CXCL1	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 1</i>

DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DC-SIGN	<i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxynukleosid-5' -triphosphat
DPBS	<i>Dulbecco 's Phosphate-Buffered-Saline</i>
DT	Diphtherietoxin
DT-A	Diphtherietoxin A Untereinheit
DTR	Diphtherietoxin-Rezeptor
DTT	Dithiothreitol
DZ	Dendritische Zellen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF-2	Elongationsfaktor-2
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanat</i>
FKS	Fötales Kälberserum
Flt3	<i>FMS-related tyrosine kinase 3</i>
Flt3L	<i>FMS-related tyrosine kinase 3 ligand</i>
Foxp3	<i>forkhead box 3 protein</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
G-CSF	<i>granulocyte-colony stimulating factor</i>

GMCSF	<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
HB-EGF	<i>heparin binding-EGF like growth factor</i> (Diphtherietoxin-Rezeptor)
HCl	Salzsäure
hDTR	humaner Diphtherietoxin-Rezeptor
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ip.	intraperitoneal
iv.	intravenös
KG	Körpergewicht
KM	Knochenmark
LK	Lymphknoten
<i>LoxP</i>	<i>locus of crossing over of P1</i>
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
mCherry	rot fluoreszierendes Protein
MDSC	<i>Myeloid Derived Suppressor Cells</i>
MOMA-1	<i>Monocyte/Macrophage Marker</i>
MR	Mannose Rezeptor
MHC	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex
mTEZ	medulläre Thymusepithelzellen
muMT	<i>immunoglobulin heavy chain of the class mu (IgM)</i>
NAD	Nicotinamid Adenin Dinukleotid
NK	natürliche Killerzellen
NKDC	<i>natural killer dendritic cells</i>
NKT	natürliche Killer-T-Zellen

NLR	<i>nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor</i>
NOD	<i>Non-Obese Diabetic</i>
ODN	Oligonukleotid
OVA	Ovalbumin
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDCA-1	<i>plasmacytoid dendritic cell antigen 1</i>
pDZ	Plasmazytoide Dendritische Zellen
PE	r-Phycoerythrin
pfu	<i>plaque forming units</i>
PI	Propidiumiodid
Prf	Perforin
proHB-EGF	<i>heparin binding-EGF like growth factor precursor</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
Rag	<i>Recombination Activating Gene</i>
RLR	<i>retinoid acid-inducible gene I-like receptors</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RT	Raumtemperatur
S8L	Ovalbumin-Peptid mit der Sequenz: SIINFEKL
sc.	subcutan
SCID	<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEA	<i>Staphylococcus-Enterotoxin A</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
T _{CM}	<i>central memory T cells</i>
TEMED	N,N,N,N Tetramethylethylendiamin

T _{EM}	<i>effector memory T cells</i>
tetO	Tetrazyklin Operator
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
T _H	T-Helferzellen
Thy	Thymus
Thy1	<i>Thymocyte differentiation antigen 1</i>
Tip-DZ	TNF und induzierbare NO-Synthase produzierende Dendritische Zellen
TK	Thymidinkinase
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{reg}	regulatorische T-Zellen
TZR	T-Zell-Rezeptor
U/min	Umdrehungen pro Minute
VF	Verdünnungsfaktor
Vol.	Volumen
Zbtb46	<i>zinc finger and BTB domain-containing protein 46</i>
zDC	<i>zinc finger transcription factor (Zbtb46)</i> , spezifisch auf cDZ exprimiert
ZTL	zytotoxische T-Lymphozyten

6 Literatur

- al-Shawi, R., J. Burke, H. Wallace, C. Jones, S. Harrison, D. Buxton, S. Maley, A. Chandley and J. O. Bishop** (1991). "The herpes simplex virus type 1 thymidine kinase is expressed in the testes of transgenic mice under the control of a cryptic promoter." *Mol Cell Biol* 11(8): 4207-16.
- Albert, M. L., S. F. Pearce, L. M. Francisco, B. Sauter, P. Roy, R. L. Silverstein and N. Bhardwaj** (1998). "Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes." *J Exp Med* 188(7): 1359-68.
- Asselin-Paturel, C., A. Boonstra, M. Dalod, I. Durand, N. Yessaad, C. Dezutter-Dambuyant, A. Vicari, A. O'Garra, C. Biron, F. Briere and G. Trinchieri** (2001). "Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology." *Nat Immunol* 2(12): 1144-50.
- Autenrieth, S. E., P. Warnke, G. H. Wabnitz, C. Lucero Estrada, K. A. Pasquevich, D. Drechsler, M. Gunter, K. Hochweller, A. Novakovic, S. Beer-Hammer, Y. Samstag, G. J. Hammerling, N. Garbi and I. B. Autenrieth** (2012). "Depletion of dendritic cells enhances innate anti-bacterial host defense through modulation of phagocyte homeostasis." *PLoS Pathog* 8(2): e1002552.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman** (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." *Nature* 392(6673): 245-52.
- Barnden, M. J., J. Allison, W. R. Heath and F. R. Carbone** (1998). "Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements." *Immunol Cell Biol* 76(1): 34-40.
- Barth, S., U. Winkler, V. Diehl and A. Engert** (1997). "[Immunotoxins. Mechanism of action and applications in malignant diseases]." *Internist (Berl)* 38(11): 1063-9.
- Berard, F., P. Blanco, J. Davoust, E. M. Neidhart-Berard, M. Nouri-Shirazi, N. Taquet, D. Rimoldi, J. C. Cerottini, J. Banchereau and A. K. Palucka** (2000). "Cross-priming of naive CD8 T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells." *J Exp Med* 192(11): 1535-44.
- Bevan, M. J.** (1976). "Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay." *J Exp Med* 143(5): 1283-8.
- Blasius, A. L., E. Giurisato, M. Cella, R. D. Schreiber, A. S. Shaw and M. Colonna** (2006). "Bone marrow stromal cell antigen 2 is a specific marker of type I IFN-producing cells in the naive mouse, but a promiscuous cell surface antigen following IFN stimulation." *J Immunol* 177(5): 3260-5.
- Bonifaz, L., D. Bonnyay, K. Mahnke, M. Rivera, M. C. Nussenzweig and R. M. Steinman** (2002). "Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance." *J Exp Med* 196(12): 1627-38.

- Borg, C., A. Jalil, D. Laderach, K. Maruyama, H. Wakasugi, S. Charrier, B. Ryffel, A. Cambi, C. Figdor, W. Vainchenker, A. Galy, A. Caignard and L. Zitvogel** (2004). "NK cell activation by dendritic cells (DCs) requires the formation of a synapse leading to IL-12 polarization in DCs." *Blood* 104(10): 3267-75.
- Borrelli, E., R. Heyman, M. Hsi and R. M. Evans** (1988). "Targeting of an inducible toxic phenotype in animal cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(20): 7572-6.
- Bouneaud, C., P. Kourilsky and P. Bousso** (2000). "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* 13(6): 829-40.
- Brocker, T., M. Riedinger and K. Karjalainen** (1997). "Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo." *J Exp Med* 185(3): 541-50.
- Bronte, V., D. B. Chappell, E. Apolloni, A. Cabrelle, M. Wang, P. Hwu and N. P. Restifo** (1999). "Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8+ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation." *J Immunol* 162(10): 5728-37.
- Caux, C., C. Massacrier, B. Vanbervliet, B. Dubois, C. Van Kooten, I. Durand and J. Banchereau** (1994). "Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking." *J Exp Med* 180(4): 1263-72.
- Celli, S., Z. Garcia and P. Bousso** (2005). "CD4 T cells integrate signals delivered during successive DC encounters in vivo." *J Exp Med* 202(9): 1271-8.
- Chen, H. D., A. E. Fraire, I. Joris, M. A. Brehm, R. M. Welsh and L. K. Selin** (2001). "Memory CD8+ T cells in heterologous antiviral immunity and immunopathology in the lung." *Nat Immunol* 2(11): 1067-76.
- Clark, A. J., M. Iwobi, W. Cui, M. Crompton, G. Harold, S. Hobbs, T. Kamalati, R. Knox, C. Neil, F. Yull and B. Gusterson** (1997). "Selective cell ablation in transgenic mice expression E. coli nitroreductase." *Gene Ther* 4(2): 101-10.
- Clarke, S. R., M. Barnden, C. Kurts, F. R. Carbone, J. F. Miller and W. R. Heath** (2000). "Characterization of the ovalbumin-specific TCR transgenic line OT-I: MHC elements for positive and negative selection." *Immunol Cell Biol* 78(2): 110-7.
- Collier, R. J.** (1975). "Diphtheria toxin: mode of action and structure." *Bacteriol Rev* 39(1): 54-85.
- Cooper, M. A., T. A. Fehniger, A. Fuchs, M. Colonna and M. A. Caligiuri** (2004). "NK cell and DC interactions." *Trends Immunol* 25(1): 47-52.
- Curtsinger, J. M., D. C. Lins and M. F. Mescher** (2003). "Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function." *J Exp Med* 197(9): 1141-51.
- Curtsinger, J. M. and M. F. Mescher** (2010). "Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation." *Curr Opin Immunol* 22(3): 333-40.
- d'Ostiani, C. F., G. Del Sero, A. Bacci, C. Montagnoli, A. Spreca, A. Mencacci, P. Ricciardi-Castagnoli and L. Romani** (2000). "Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo." *J Exp Med* 191(10): 1661-74.

- Dakic, A., Q. X. Shao, A. D'Amico, M. O'Keeffe, W. F. Chen, K. Shortman and L. Wu** (2004). "Development of the dendritic cell system during mouse ontogeny." *J Immunol* 172(2): 1018-27.
- Davis, M. M. and P. J. Bjorkman** (1988). "T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition." *Nature* 334(6181): 395-402.
- de Jong, E., T. Suddason and G. M. Lord** (2010). "Translational mini-review series on Th17 cells: development of mouse and human T helper 17 cells." *Clin Exp Immunol* 159(2): 148-58.
- Della Chiesa, M., C. Romagnani, A. Thiel, L. Moretta and A. Moretta** (2006). "Multidirectional interactions are bridging human NK cells with plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells during innate immune responses." *Blood* 108(12): 3851-8.
- Diehl, K. H., R. Hull, D. Morton, R. Pfister, Y. Rabemampianina, D. Smith, J. M. Vidal and C. van de Vorstenbosch** (2001). "A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes." *J Appl Toxicol* 21(1): 15-23.
- Duvic, M., T. M. Kuzel, E. A. Olsen, A. G. Martin, F. M. Foss, Y. H. Kim, P. W. Heald, P. Bacha, J. Nichols and A. Liepa** (2002). "Quality-of-life improvements in cutaneous T-cell lymphoma patients treated with denileukin diftitox (ONTAK)." *Clin Lymphoma* 2(4): 222-8.
- Facchetti, F., C. de Wolf-Peeters, D. Y. Mason, K. Pulford, J. J. van den Oord and V. J. Desmet** (1988). "Plasmacytoid T cells. Immunohistochemical evidence for their monocyte/macrophage origin." *Am J Pathol* 133(1): 15-21.
- Fischer, J., J. Schmitz and A. Dzionek** (2004). "mPDCA-1: A presumably novel antigen exclusively expressed by murine plasmacytoid dendritic cells." *MACS & more* 8(1): 13.
- Foss, F. M.** (2001). "Interleukin-2 fusion toxin: targeted therapy for cutaneous T cell lymphoma." *Ann N Y Acad Sci* 941: 166-76.
- Garbi, N., P. Tan, A. D. Diehl, B. J. Chambers, H. G. Ljunggren, F. Momburg and G. J. Hammerling** (2000). "Impaired immune responses and altered peptide repertoire in tapasin-deficient mice." *Nat Immunol* 1(3): 234-8.
- Garrett, W. S., L. M. Chen, R. Kroschewski, M. Ebersold, S. Turley, S. Trombetta, J. E. Galan and I. Mellman** (2000). "Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42." *Cell* 102(3): 325-34.
- Grouard, G., M. C. Rissoan, L. Filgueira, I. Durand, J. Banchereau and Y. J. Liu** (1997). "The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand." *J Exp Med* 185(6): 1101-11.
- Guermontprez, P., J. Valladeau, L. Zitvogel, C. Thery and S. Amigorena** (2002). "Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells." *Annu Rev Immunol* 20: 621-67.
- Harman, B. C., J. P. Miller, N. Nikbakht, R. Gerstein and D. Allman** (2006). "Mouse plasmacytoid dendritic cells derive exclusively from estrogen-resistant myeloid progenitors." *Blood* 108(3): 878-85.
- Hawiger, D., K. Inaba, Y. Dorsett, M. Guo, K. Mahnke, M. Rivera, J. V. Ravetch, R. M. Steinman and M. C. Nussenzweig** (2001). "Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo." *J Exp Med* 194(6): 769-79.

- Hawiger, D., R. F. Masilamani, E. Bettelli, V. K. Kuchroo and M. C. Nussenzweig** (2004). "Immunological unresponsiveness characterized by increased expression of CD5 on peripheral T cells induced by dendritic cells in vivo." *Immunity* 20(6): 695-705.
- Heil, F., P. Ahmad-Nejad, H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, T. Gellert, H. Dietrich, G. Lipford, K. Takeda, S. Akira, H. Wagner and S. Bauer** (2003). "The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily." *Eur J Immunol* 33(11): 2987-97.
- Hemmi, H. and S. Akira** (2005). "TLR signalling and the function of dendritic cells." *Chem Immunol Allergy* 86: 120-35.
- Heyman, R. A., E. Borrelli, J. Lesley, D. Anderson, D. D. Richman, S. M. Baird, R. Hyman and R. M. Evans** (1989). "Thymidine kinase obliteration: creation of transgenic mice with controlled immune deficiency." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(8): 2698-702.
- Hochweller, K., T. Miloud, J. Striegler, S. Naik, G. J. Hammerling and N. Garbi** (2009). "Homeostasis of dendritic cells in lymphoid organs is actively controlled by regulation of their precursors via a feed-back loop." *Blood* 114(20): 4411-21.
- Hochweller, K., J. Striegler, G. J. Hammerling and N. Garbi** (2008). "A novel CD11c.DTR transgenic mouse for depletion of dendritic cells reveals their requirement for homeostatic proliferation of natural killer cells." *Eur J Immunol* 38(10): 2776-83.
- Hochweller, K., G. H. Wabnitz, Y. Samstag, J. Suffner, G. J. Hammerling and N. Garbi** (2010). "Dendritic cells control T cell tonic signaling required for responsiveness to foreign antigen." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(13): 5931-6.
- Hoefel, D., W. L. Grooby, P. T. Monis, S. Andrews and C. P. Saint** (2003). "A comparative study of carboxyfluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester as indicators of bacterial activity." *J Microbiol Methods* 52(3): 379-88.
- Hogquist, K. A., S. C. Jameson, W. R. Heath, J. L. Howard, M. J. Bevan and F. R. Carbone** (1994). "T cell receptor antagonist peptides induce positive selection." *Cell* 76(1): 17-27.
- Huleatt, J. W. and L. Lefrancois** (1995). "Antigen-driven induction of CD11c on intestinal intraepithelial lymphocytes and CD8+ T cells in vivo." *J Immunol* 154(11): 5684-93.
- Ivanova, A., M. Signore, N. Caro, N. D. Greene, A. J. Copp and J. P. Martinez-Barbera** (2005). "In vivo genetic ablation by Cre-mediated expression of diphtheria toxin fragment A." *Genesis* 43(3): 129-35.
- Janeway, C. A., Jr.** (1989). "Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt 1: 1-13.
- Janeway, C. A., Jr.** (1992). "The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self." *Immunol Today* 13(1): 11-6.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., und Shlomchik, M.** (2004). *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. New York, Garland Science.

- Jung, S., D. Unutmaz, P. Wong, G. Sano, K. De los Santos, T. Sparwasser, S. Wu, S. Vuthoori, K. Ko, F. Zavala, E. G. Pamer, D. R. Littman and R. A. Lang** (2002). "In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens." *Immunity* 17(2): 211-20.
- Kagi, D., B. Ledermann, K. Burki, P. Seiler, B. Odermatt, K. J. Olsen, E. R. Podack, R. M. Zinkernagel and H. Hengartner** (1994). "Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice." *Nature* 369(6475): 31-7.
- Kalinski, P., C. M. Hilkens, E. A. Wierenga and M. L. Kapsenberg** (1999). "T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal." *Immunol Today* 20(12): 561-7.
- Kassim, S. H., N. K. Rajasagi, X. Zhao, R. Chervenak and S. R. Jennings** (2006). "In vivo ablation of CD11c-positive dendritic cells increases susceptibility to herpes simplex virus type 1 infection and diminishes NK and T-cell responses." *J Virol* 80(8): 3985-93.
- Kitamura, D., J. Roes, R. Kuhn and K. Rajewsky** (1991). "A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene." *Nature* 350(6317): 423-6.
- Krieg, A. M., A. K. Yi, S. Matson, T. J. Waldschmidt, G. A. Bishop, R. Teasdale, G. A. Koretzky and D. M. Klinman** (1995). "CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation." *Nature* 374(6522): 546-9.
- Kurts, C., H. Kosaka, F. R. Carbone, J. F. Miller and W. R. Heath** (1997). "Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells." *J Exp Med* 186(2): 239-45.
- Laemmli, U. K.** (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(259): 680-5.
- Laird, P. W., A. Zijderveld, K. Linders, M. A. Rudnicki, R. Jaenisch and A. Berns** (1991). "Simplified mammalian DNA isolation procedure." *Nucleic Acids Res* 19(15): 4293.
- Langenkamp, A., M. Messi, A. Lanzavecchia and F. Sallusto** (2000). "Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells." *Nat Immunol* 1(4): 311-6.
- Langerhans, P.** (1868). "Über die Nerven der menschlichen Haut." *Virchows Arch. path. Anat.* 44: 325-337.
- Lanzavecchia, A.** (1996). "Mechanisms of antigen uptake for presentation." *Curr Opin Immunol* 8(3): 348-54.
- Latz, E., A. Schoenemeyer, A. Visintin, K. A. Fitzgerald, B. G. Monks, C. F. Knetter, E. Lien, N. J. Nilsen, T. Espevik and D. T. Golenbock** (2004). "TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome." *Nat Immunol* 5(2): 190-8.
- Lee, E. C., D. Yu, J. Martinez de Velasco, L. Tessarollo, D. A. Swing, D. L. Court, N. A. Jenkins and N. G. Copeland** (2001). "A highly efficient Escherichia coli-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA." *Genomics* 73(1): 56-65.
- Lee, P., G. Morley, Q. Huang, A. Fischer, S. Seiler, J. W. Horner, S. Factor, D. Vaidya, J. Jalife and G. I. Fishman** (1998). "Conditional lineage ablation to model human diseases." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(19): 11371-6.

- Legge, K. L., R. K. Gregg, R. Maldonado-Lopez, L. Li, J. C. Caprio, M. Moser and H. Zaghouani** (2002). "On the role of dendritic cells in peripheral T cell tolerance and modulation of autoimmunity." *J Exp Med* 196(2): 217-27.
- Lennert, K. and W. Remmele** (1958). "[Karyometric research on lymph node cells in man. I. Germinoblasts, lymphoblasts & lymphocytes]." *Acta Haematol* 19(2): 99-113.
- Lewis, K. L. and B. Reizis** (2012). "Dendritic cells: arbiters of immunity and immunological tolerance." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(8).
- Ljunggren, H. G. and K. Karre** (1985). "Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism." *J Exp Med* 162(6): 1745-59.
- Louie, G. V., W. Yang, M. E. Bowman and S. Choe** (1997). "Crystal structure of the complex of diphtheria toxin with an extracellular fragment of its receptor." *Mol Cell* 1(1): 67-78.
- Mahnke, K., E. Schmitt, L. Bonifaz, A. H. Enk and H. Jonuleit** (2002). "Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells." *Immunol Cell Biol* 80(5): 477-83.
- Mazzoni, A., V. Bronte, A. Visintin, J. H. Spitzer, E. Apolloni, P. Serafini, P. Zanovello and D. M. Segal** (2002). "Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism." *J Immunol* 168(2): 689-95.
- Mempel, T. R., S. E. Henrickson and U. H. Von Andrian** (2004). "T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases." *Nature* 427(6970): 154-9.
- Meredith, M. M., K. Liu, G. Darrasse-Jeze, A. O. Kamphorst, H. A. Schreiber, P. Guermonprez, J. Idoyaga, C. Cheong, K. H. Yao, R. E. Niec and M. C. Nussenzweig** (2012). "Expression of the zinc finger transcription factor zDC (Zbtb46, Btbd4) defines the classical dendritic cell lineage." *J Exp Med* 209(6): 1153-65.
- Miller, M. J., A. S. Hejazi, S. H. Wei, M. D. Cahalan and I. Parker** (2004). "T cell repertoire scanning is promoted by dynamic dendritic cell behavior and random T cell motility in the lymph node." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(4): 998-1003.
- Miltenyi, S., W. Muller, W. Weichel and A. Radbruch** (1990). "High gradient magnetic cell separation with MACS." *Cytometry* 11(2): 231-8.
- Mitamura, T., S. Higashiyama, N. Taniguchi, M. Klagsbrun and E. Mekada** (1995). "Diphtheria toxin binds to the epidermal growth factor (EGF)-like domain of human heparin-binding EGF-like growth factor/diphtheria toxin receptor and inhibits specifically its mitogenic activity." *J Biol Chem* 270(3): 1015-9.
- Mitamura, T., T. Umata, F. Nakano, Y. Shishido, T. Toyoda, A. Itai, H. Kimura and E. Mekada** (1997). "Structure-function analysis of the diphtheria toxin receptor toxin binding site by site-directed mutagenesis." *J Biol Chem* 272(43): 27084-90.
- Moehring, T. J., D. E. Danley and J. M. Moehring** (1984). "In vitro biosynthesis of diphthamide, studied with mutant Chinese hamster ovary cells resistant to diphtheria toxin." *Mol Cell Biol* 4(4): 642-50.
- Mombaerts, P., J. Iacomini, R. S. Johnson, K. Herrup, S. Tonegawa and V. E. Papaioannou** (1992). "RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes." *Cell* 68(5): 869-77.

- Moretta, A.** (2002). "Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues." *Nat Rev Immunol* 2(12): 957-64.
- Mosmann, T. R. and R. L. Coffman** (1989). "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." *Annu Rev Immunol* 7: 145-73.
- Naglich, J. G., J. E. Metherall, D. W. Russell and L. Eidels** (1992). "Expression cloning of a diphtheria toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like growth factor precursor." *Cell* 69(6): 1051-61.
- Nakano, H., M. Yanagita and M. D. Gunn** (2001). "CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells." *J Exp Med* 194(8): 1171-8.
- Nanba, D. and S. Higashiyama** (2004). "Dual intracellular signaling by proteolytic cleavage of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor." *Cytokine Growth Factor Rev* 15(1): 13-9.
- Nausch, N., I. E. Galani, E. Schlecker and A. Cerwenka** (2008). "Mononuclear myeloid-derived "suppressor" cells express RAE-1 and activate natural killer cells." *Blood* 112(10): 4080-9.
- Negro-Vilar, A., H. M. Prince, M. Duvic, S. Richardson, Y. Sun and M. Acosta** (2008). "Efficacy and safety of denileukin diftitox (Dd) in cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) patients: Integrated analysis of three large phase III trials." *J Clin Oncol* 26(suppl): Abstract 8551.
- Neville, D. M., Jr. and T. H. Hudson** (1986). "Transmembrane transport of diphtheria toxin, related toxins, and colicins." *Annu Rev Biochem* 55: 195-224.
- Palmiter, R.** (2001). "Interrogation by toxin." *Nat Biotechnol* 19(8): 731-2.
- Pappenheimer, A. M., Jr.** (1977). "Diphtheria toxin." *Annu Rev Biochem* 46: 69-94.
- Pappenheimer, A. M., Jr., A. A. Harper, M. Moynihan and J. P. Brockes** (1982). "Diphtheria toxin and related proteins: effect of route of injection on toxicity and the determination of cytotoxicity for various cultured cells." *J Infect Dis* 145(1): 94-102.
- Pillarisetty, V. G., S. C. Katz, J. I. Bleier, A. B. Shah and R. P. Dematteo** (2005). "Natural killer dendritic cells have both antigen presenting and lytic function and in response to CpG produce IFN-gamma via autocrine IL-12." *J Immunol* 174(5): 2612-8.
- Probst, H. C., J. Lagnel, G. Kollias and M. van den Broek** (2003). "Inducible transgenic mice reveal resting dendritic cells as potent inducers of CD8+ T cell tolerance." *Immunity* 18(5): 713-20.
- Probst, H. C., K. Tschannen, B. Odermatt, R. Schwendener, R. M. Zinkernagel and M. Van Den Broek** (2005). "Histological analysis of CD11c-DTR/GFP mice after in vivo depletion of dendritic cells." *Clin Exp Immunol* 141(3): 398-404.
- Probst, H. C. and M. van den Broek** (2005). "Priming of CTLs by Lymphocytic Choriomeningitis Virus Depends on Dendritic Cells." *J Immunol* 174(7): 3920-4.
- Prochazka, M., H. R. Gaskins, L. D. Shultz and E. H. Leiter** (1992). "The nonobese diabetic scid mouse: model for spontaneous thymomagenesis associated with immunodeficiency." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(8): 3290-4.
- Riches, A. C., J. G. Sharp, D. B. Thomas and S. V. Smith** (1973). "Blood volume determination in the mouse." *J Physiol* 228(2): 279-84.

- Saito, M., T. Iwawaki, C. Taya, H. Yonekawa, M. Noda, Y. Inui, E. Mekada, Y. Kimata, A. Tsuru and K. Kohno** (2001). "Diphtheria toxin receptor-mediated conditional and targeted cell ablation in transgenic mice." *Nat Biotechnol* 19(8): 746-50.
- Sakaguchi, S.** (2000). "Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance." *Cell* 101(5): 455-8.
- Sallusto, F. and A. Lanzavecchia** (2001). "Exploring pathways for memory T cell generation." *J Clin Invest* 108(6): 805-6.
- Satpathy, A. T., W. Kc, J. C. Albring, B. T. Edelson, N. M. Kretzer, D. Bhattacharya, T. L. Murphy and K. M. Murphy** (2012). "Zbtb46 expression distinguishes classical dendritic cells and their committed progenitors from other immune lineages." *J Exp Med* 209(6): 1135-52.
- Schleicher, U., J. Liese, I. Knippertz, C. Kurzman, A. Hesse, A. Heit, J. A. Fischer, S. Weiss, U. Kalinke, S. Kunz and C. Bogdan** (2007). "NK cell activation in visceral leishmaniasis requires TLR9, myeloid DCs, and IL-12, but is independent of plasmacytoid DCs." *J Exp Med*.
- Schroder, K., P. J. Hertzog, T. Ravasi and D. A. Hume** (2004). "Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions." *J Leukoc Biol* 75(2): 163-89.
- Serbina, N. V., T. P. Salazar-Mather, C. A. Biron, W. A. Kuziel and E. G. Pamer** (2003). "TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection." *Immunity* 19(1): 59-70.
- Shevach, E. M.** (2000). "Regulatory T cells in autoimmunity*." *Annu Rev Immunol* 18: 423-49.
- Shinkai, Y., G. Rathbun, K. P. Lam, E. M. Oltz, V. Stewart, M. Mendelsohn, J. Charron, M. Datta, F. Young, A. M. Stall and et al.** (1992). "RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement." *Cell* 68(5): 855-67.
- Shortman, K. and Y. J. Liu** (2002). "Mouse and human dendritic cell subtypes." *Nat Rev Immunol* 2(3): 151-61.
- Shortman, K. and S. H. Naik** (2007). "Steady-state and inflammatory dendritic-cell development." *Nat Rev Immunol* 7(1): 19-30.
- Stefanová, I., J. R. Dorfman and R. N. Germain** (2002). "Self-recognition promotes the foreign antigen sensitivity of naive T lymphocytes." *Nature* 420(6914): 429-34.
- Steinman, R. M., J. C. Adams and Z. A. Cohn** (1975). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen." *J Exp Med* 141(4): 804-20.
- Steinman, R. M. and J. Banchereau** (2007). "Taking dendritic cells into medicine." *Nature* 449(7161): 419-26.
- Steinman, R. M. and Z. A. Cohn** (1973). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution." *J Exp Med* 137(5): 1142-62.
- Steinman, R. M. and Z. A. Cohn** (1974). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro." *J Exp Med* 139(2): 380-97.
- Steinman, R. M., D. Hawiger and M. C. Nussenzweig** (2003). "Tolerogenic dendritic cells." *Annu Rev Immunol* 21: 685-711.

- Steinman, R. M., G. Kaplan, M. D. Witmer and Z. A. Cohn** (1979). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro." *J Exp Med* 149(1): 1-16.
- Steinman, R. M., D. S. Lustig and Z. A. Cohn** (1974). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo." *J Exp Med* 139(6): 1431-45.
- Stewart, M., M. Thiel and N. Hogg** (1995). "Leukocyte integrins." *Curr Opin Cell Biol* 7(5): 690-6.
- Suffner, J., K. Hochweller, M. C. Kuhnle, X. Li, R. A. Kroczeck, N. Garbi and G. J. Hammerling** (2010). "Dendritic Cells Support Homeostatic Expansion of Foxp3+ Regulatory T Cells in Foxp3.LuciDTR Mice." *J Immunol*.
- Sung, C., R. J. Youle and R. L. Dedrick** (1990). "Pharmacokinetic analysis of immunotoxin uptake in solid tumors: role of plasma kinetics, capillary permeability, and binding." *Cancer Res* 50(22): 7382-92.
- Surh, C. D. and J. Sprent** (2005). "Regulation of mature T cell homeostasis." *Semin Immunol* 17(3): 183-91.
- Süss, G. and K. Shortman** (1996). "A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis." *J Exp Med* 183(4): 1789-96.
- Takatsu, K. and A. Kariyone** (2003). "The immunogenic peptide for Th1 development." *Int Immunopharmacol* 3(6): 783-800.
- Tittel, A. P., C. Heuser, C. Ohliger, C. Llanto, S. Yona, G. J. Hammerling, D. R. Engel, N. Garbi and C. Kurts** (2012). "Functionally relevant neutrophilia in CD11c diphtheria toxin receptor transgenic mice." *Nat Methods* 9(4): 385-90.
- Tonegawa, S.** (1983). "Somatic generation of antibody diversity." *Nature* 302(5909): 575-81.
- Trowbridge, I. S. and C. Mazauskas** (1976). "Immunological properties of murine thymus-dependent lymphocyte surface glycoproteins." *Eur J Immunol* 6(8): 557-62.
- van Rijt, L. S., S. Jung, A. Kleinjan, N. Vos, M. Willart, C. Duez, H. C. Hoogsteden and B. N. Lambrecht** (2005). "In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma." *J Exp Med* 201(6): 981-91.
- Van Rooijen, N. and A. Sanders** (1994). "Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications." *J Immunol Methods* 174(1-2): 83-93.
- von Boehmer, H.** (2005). "Mechanisms of suppression by suppressor T cells." *Nat Immunol* 6(4): 338-44.
- Walzer, T., M. Dalod, S. H. Robbins, L. Zitvogel and E. Vivier** (2005). "Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force"." *Blood* 106(7): 2252-8.
- Waskow, C., K. Liu, G. Darrasse-Jeze, P. Guermonprez, F. Ginhoux, M. Merad, T. Shengelia, K. Yao and M. Nussenzweig** (2008). "The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues." *Nat Immunol* 9(6): 676-83.
- Werfel, T., W. Witter and O. Gotze** (1991). "CD11b and CD11c antigens are rapidly increased on human natural killer cells upon activation." *J Immunol* 147(7): 2423-7.

- Westcott, M. M., R. J. Abi-Habib, K. A. Cohen, M. C. Willingham, S. Liu, T. H. Bugge, S. H. Leppla and A. E. Frankel** (2004). "Diphtheria toxin-murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced hepatotoxicity is mediated by Kupffer cells." *Mol Cancer Ther* 3(12): 1681-9.
- Williams, D. P., K. Parker, P. Bacha, W. Bishai, M. Borowski, F. Genbauffe, T. B. Strom and J. R. Murphy** (1987). "Diphtheria toxin receptor binding domain substitution with interleukin-2: genetic construction and properties of a diphtheria toxin-related interleukin-2 fusion protein." *Protein Eng* 1(6): 493-8.
- Williams, D. P., C. E. Snider, T. B. Strom and J. R. Murphy** (1990). "Structure/function analysis of interleukin-2-toxin (DAB486-IL-2). Fragment B sequences required for the delivery of fragment A to the cytosol of target cells." *J Biol Chem* 265(20): 11885-9.
- Williams, S. K. R., H. Lee and M. M. Turner** (1999). "Size characterization of magnetic cell sorting microbeads using flow field-flow fractionation and photon correlation spectroscopy." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 194(1-3): 248-253.
- Wingender, G., N. Garbi, B. Schumak, F. Jungerkes, E. Endl, D. von Bubnoff, J. Steitz, J. Striegler, G. Moldenhauer, T. Tuting, A. Heit, K. M. Huster, O. Takikawa, S. Akira, D. H. Busch, H. Wagner, G. J. Hammerling, P. A. Knolle and A. Limmer** (2006). "Systemic application of CpG-rich DNA suppresses adaptive T cell immunity via induction of IDO." *Eur J Immunol* 36(1): 12-20.
- Yamaizumi, M., E. Mekada, T. Uchida and Y. Okada** (1978). "One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell." *Cell* 15(1): 245-50.
- Yamazaki, S., T. Iyoda, K. Tarbell, K. Olson, K. Velinzon, K. Inaba and R. M. Steinman** (2003). "Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells." *J Exp Med* 198(2): 235-47.
- Zaft, T., A. Sapoznikov, R. Krauthgamer, D. R. Littman and S. Jung** (2005). "CD11c^{high} Dendritic Cell Ablation Impairs Lymphopenia-Driven Proliferation of Naive and Memory CD8⁺ T Cells." *J Immunol* 175(10): 6428-35.
- Zammit, D. J., L. S. Cauley, Q. M. Pham and L. Lefrancois** (2005). "Dendritic cells maximize the memory CD8 T cell response to infection." *Immunity* 22(5): 561-70.
- Zhang, H., S. Zhang, H. Zhuang and F. Lu** (2006). "Cytotoxicity of a novel fibroblast growth factor receptor targeted immunotoxin on a human ovarian teratocarcinoma cell line." *Cancer Biother Radiopharm* 21(4): 321-32.
- Zhang, Y., W. D. Shlomchik, G. Joe, J. P. Louboutin, J. Zhu, A. Rivera, D. Giannola and S. G. Emerson** (2002). "APCs in the liver and spleen recruit activated allogeneic CD8⁺ T cells to elicit hepatic graft-versus-host disease." *J Immunol* 169(12): 7111-8.
- Zuniga, E. I., D. B. McGavern, J. L. Pruneda-Paz, C. Teng and M. B. Oldstone** (2004). "Bone marrow plasmacytoid dendritic cells can differentiate into myeloid dendritic cells upon virus infection." *Nat Immunol* 5(12): 1227-34.