

# Funktionen dendritischer Zellen in der Haut

## **Dissertation**

zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

## **Tobias Hain**

geboren am 17.04.1986 in Köln

Mainz, 25.02.2016

Berichtersteller:

Berichtersteller:

Tag der mündlichen Prüfung: 16.06.2016

Für Nadine  
Lenja  
und Bela

„Die Zukunft soll man nicht voraussehen wollen,  
sondern möglich machen.“

Antoine de Saint-Exupéry

# Abkürzungsverzeichnis

---

## Abkürzungen

°C	Grad Celcius
4OH-TAM	4-Hydroxytamoxifen
ACK	Ammonium-Chloride-Potassium
ALN	aurikulare Lymphknoten
APC	<i>antigen-presenting cell</i>
AS	Aminosäure
B-Zellen	<i>bursa fabricii</i> -Zellen
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
BLN	brachiale Lymphknoten
BMDC	Bone marrow derived dendritic cells
bp	<b>Basenpaare</b>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CCR	<i>C-C chemokine receptor type</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CFSE	<i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>
CLIP	Class II-associated invariant chain peptide
CO <sub>2</sub>	<i>Kohlendioxid</i>
CTL	<i>Cytotoxic T lymphocytes</i>
DC	Dendritische Zellen
DIETER	<i>dendritic cell specific inducible expression of t-cell epitopes after recombination</i>
dLN	drainierende Lymphknoten
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamidtetraessigsäure
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EtOH	Ethanol
FACS	Durchflusszytometrie (engl. <i>Fluorescence-activated cell sorting</i> )
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
fwd/F	<i>forward</i>
GM-CSF	Granulolyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GP	Glycoprotein
HBSS	Hanks` Balanced Salt Solution
hi	high
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IL	Interleukin
ILN	inguinale Lymphknoten
IMDM	Iscoe`s Modified Dulbecco`s Medium
INF	Interferon
int	intermediate
LC	Langerhans-Zellen
LCMV	Lymphocytic Choriomeningitis Virus
LPS	Lipopolysaccharide
lo	low

## Abkürzungsverzeichnis

---

MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
MLN	mesenteriale Lymphknoten
mRNA	<i>messenger RNA</i>
ndLN	nicht drainierende Lymphknoten
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NP	Nucleoprotein
PAMP	<i>pathogen associated molecular patterns</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pfu	<i>plaque-forming unit</i>
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
qPCR	Real-Time-quantitative-PCR
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
rev/R	<i>reverse</i>
RFU	<i>relative fluorescence units</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	(engl. <i>revolutions per minute</i> )
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s.s.	<i>skin scarification</i>
SDQ	Swiss Dirty Quick
T-Zellen	Thymus-Zellen
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
T <sub>CM</sub> -Zellen	<i>central memory T-cells</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i>
T <sub>EF</sub> -Zellen	<i>T-effector cells</i>
T <sub>EM</sub> -Zellen	<i>effector memory T-cells</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
T <sub>RM</sub> -Zellen	<i>tissue-resident memory T-cells</i>
U	<i>Unit</i>
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
VV	<i>Vaccinia Virus</i>
WR	<i>Western Reserve</i>
WT	Wildtyp

### Zusammenfassung

Dendritische Zellen (DCs) spielen eine entscheidende Rolle bei der Induktion und Regulation von T-Zell Antworten. Sie sind fähig  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen zu aktivieren und die Differenzierung zu mediieren. In der Haut sind mindestens fünf phänotypisch verschiedene Subpopulationen unterscheidbar, die durch ihre Expression der Zelloberflächenmarker  $CD207$ ,  $CD103$  und  $CD11b$  unterschieden werden können.

In dieser Arbeit wurde ein Mausmodell verwendet, welches die durch Tamoxifen induzierbare Expression und Präsentation eines lymphozytären choriomeningitis Virus (LCMV) Antigen ( $GP_{33-41}$ ) selektiv auf DCs erlaubt (DIETER I). Topikale Applikation von 4-Hydroxytamoxifen (4OH-TAM) auf der Haut induziert die Antigenpräsentation selektiv auf Haut DCs. Diese migrieren in drainierende Lymphknoten und präsentieren dort, im Gegensatz zu residenten DCs, das Antigen. Durch Aktivierung der DCs mittels anti- $CD40$  wurde eine stabile zytotoxische T-Zell Antwort (CTL) gegen das transgene Antigen induziert. Diese T-Zellen haben einen *skin homing* Phänotyp und wirken protektiv gegen eine lokale Infektion der Haut mit einem rekombinanten *Vaccinia* Virus, welcher  $GP_{33-41}$  exprimiert.

Andere Studien wiesen darauf hin, dass  $CD207^- CD11b^-$  dermale DCs keine *skin homing* CTLs induzieren können. Durch Kreuzen der DIETER I Maus mit Mausmodellen, welche bestimmte DC Subpopulationen in der Haut nicht aufweisen, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass zumindest für Antigene, die nicht kreuzpräsentationsabhängig sind,  $CD207^- CD11b^+$  dermale DCs in der Lage sind *skin homing* CTL Antwort zu induzieren, die gegen eine lokale virale Infektion protektiert.

Gewebe-residente Gedächtnis T-Zellen ( $T_{RM}$ ) bieten eine erste und schnelle Antwort gegen wiederkehrende Infektionen, durch die Pathogene wirkungsvoll eliminiert werden. Durch selektive Präsentation von  $GP_{31-44}$  Antigen auf Haut DCs in DIETER I Mäusen und unter Verwendung von Mausmodellen, denen bestimmte DC Subpopulationen fehlen, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass dermale DCs in der Lage sind  $CD8^+ T_{RM}$  zu reaktivieren.

Um unsere Untersuchungen auf  $CD4^+$  T-Zell Antworten auszuweiten, wurde eine neue transgene Mauslinie hergestellt, die eine Tamoxifen-induzierbare Expression und Präsentation des Haupthistokompatibilitäts Komplex-II (MHC II) restringierten

## Zusammenfassung

---

Peptids OVA<sub>323-339</sub> auf DCs erlaubt (DIETER II). In diesen Mäusen wurde die Proliferation von OVA<sub>323-339</sub> spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen (OT-II) nach Tamoxifengabe induziert und eine Differenzierung zu T<sub>H</sub>1 Zellen gefördert. Nach topikaler 4OH-TAM Behandlung zeigten OT-II Zellen einen *skin homing* Phänotyp und protekierten leicht gegen eine lokale Infektion der Haut mit einem Ovalbumin exprimierenden *Vaccinia* Virus.



### Abstract

Dendritic cells (DC) are important inducers and regulators of T cell responses; they are able to induce activation and modulate the differentiation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. In the skin there are at least five phenotypically distinct subpopulations that can be distinguished by differential expression of the cell surface markers CD207, CD103 and CD11b.

We are using an inducible transgenic mouse (DIETER I mice), that allows tamoxifen inducible expression and presentation of a lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) antigen (GP<sub>33-41</sub>) selectively on DCs. Topical application of 4-hydroxytamoxifen (4OH-TAM) on the skin induces antigen selectively in skin DCs. Consequently in skin draining lymph nodes antigen is only presented by DCs that have emigrated from the skin and not by resident DCs. When DCs are activated simultaneously to induction of antigen by anti-CD40, a robust cytotoxic T cell lymphocyte (CTL) response to the transgenic antigen is primed. These T cells show skin homing properties and are protective against a local challenge infection of the skin with a recombinant *vaccinia* virus expressing GP<sub>33-41</sub>.

Previous studies have suggested, that CD207<sup>-</sup> CD11b<sup>-</sup> dermal DCs are indispensable for the priming of a skin homing CTL response. However, by crossing DIETER I mice to mouse models that lack certain DC subsets in the skin, we show that, at least for antigens that are not dependent on cross presentation CD207<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> dermal DCs are fully competent to prime a skin homing CTL response that is capable of protection against a local virus challenge.

Tissue-resident memory T cells (T<sub>RM</sub>) provide a first response against infections reencountered at body surfaces, where they accelerate pathogen clearance. By selective presentation of GP<sub>31-44</sub> antigen on skin DCs in DIETER I mice and mouse models that lack certain DC subsets in the skin we could show, that dermal DCs are able to reactivate CD8<sup>+</sup> T<sub>RM</sub>.

To extend our studies to CD4<sup>+</sup> T cell response, we have generated a new transgenic mouse line that allows the tamoxifen inducible selective expression of the ovalbumin derived antigen OVA<sub>323-339</sub> on the major histocompatibility complex II (MHC II) on DCs (DIETER II mice). Tamoxifen treatment of DIETER II mice induced proliferation and differentiation of OVA<sub>323-339</sub> specific CD4<sup>+</sup> T cells (OT-II). After topical application of 4OH-TAM to the skin, primed OT-II cells showed a skin homing phenotype and

## Abstract

---

were able to confer some protection against a local challenge infection of the skin with a recombinant *vaccinia* virus expressing ovalbumin.

# Inhaltsverzeichnis

---

ABKÜRZUNGEN .....	IV
ZUSAMMENFASSUNG.....	VI
ABSTRACT .....	VIII
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Das Immunsystem .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Die Zellen des Immunsystems.....	2
1.1.2 Das angeborene Immunsystem .....	2
1.1.3 Das adaptive Immunsystem.....	3
<b>1.2 T-Zellen.....</b>	<b>4</b>
1.2.1 T-Zell Populationen .....	5
1.2.2 Tissue-Resident Memory T-Zellen.....	7
<b>1.3 Dendritische Zellen .....</b>	<b>8</b>
1.3.1 DCs das Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität.....	10
1.3.2 Dendritische Zellen der Haut .....	12
1.3.2.1 Langerhans-Zellen.....	14
1.3.2.2 CD207 <sup>+</sup> dermale DCs.....	15
1.3.2.3 CD11b <sup>+</sup> DDCs.....	15
1.3.2.4 moDCs, Makrophagen und pDCs.....	16
<b>2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....</b>	<b>17</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODE .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1 Material.....</b>	<b>18</b>
3.1.1 Plastik- und Glasware.....	18
3.1.2 Geräte und Hilfsmittel.....	19
3.1.3 Chemikalien.....	20
3.1.4 Weitere Substanzen .....	21
3.1.5 Puffer .....	22
3.1.6 Medien .....	24
3.1.7 Medienzusätze.....	25
3.1.8 Medien für Zellkulturen .....	25
3.1.9 Enzyme.....	26
3.1.10 Kits .....	26
3.1.11 Oligonukleotide / Primer.....	27
3.1.12 Antikörper.....	28
3.1.12.1 Antikörper für Durchflusssytometrie .....	28
3.1.12.2 Antikörper / Beads zur Aufreinigung muriner Zellpopulationen .....	31
3.1.13 Zelllinien.....	32
3.1.14 Virus .....	32
3.1.15 Mausstämme .....	32
3.1.15.1 C57BL/6J (Wildtyp-Stamm).....	32
3.1.15.2 C57BL/6J, Ly5.1 (B6.SJL-Ptprc <sup>a</sup> Pepc <sup>b</sup> /BoyJ).....	32
3.1.15.3 CD11cCreER <sub>T</sub> x ST33 (DIETER I)-Mäuse.....	33

# Inhaltsverzeichnis

---

3.1.15.4 Nur77 <sup>GFP</sup> (C57BL/6-Tg(Nr4a1-EGFP/cre)820Khog/J).....	33
3.1.15.5 P14 (B6;D2-Tg(TcrLCMV)327Sdz/JDvsJ).....	33
3.1.15.6 LangDTREGFP (B6.129S2-CD207 <sup>tm3(DTR/GFP)Mal</sup> /J).....	33
3.1.15.7 Batf3 <sup>-/-</sup> (B6.129S(C)-Batf3 <sup>tm1Kmm</sup> /J).....	34
3.1.15.8 OT-II (B6.Cg-Tg(TcraTcrb)425Cbn/J).....	34
3.1.15.9 Cre-Deleter (B6.C-Tg(CMV-cre)1Cgn/J).....	34
3.1.15.10 Rosa26-RFP (B6;129S6-Gt(ROSA)26Sor <sup>tm14(CAG-tdTomato)Hze</sup> /J).....	34
<b>3.2 Methode.....</b>	<b>35</b>
3.2.1 Zellbiologische Methoden.....	35
3.2.1.1 Zellkultur.....	35
3.2.1.2 Auftauen von BSC-40 Zellen.....	35
3.2.1.3 Kultivieren von BSC-40 Zellen.....	35
3.2.1.4 Einfrieren von Zellen.....	36
3.2.1.5 Bestimmung der Lebendzellzahl.....	36
3.2.1.6 Herstellen von Bone Marrow Derived DCs (BMDCs).....	37
3.2.1.7 Nur77 in vitro Aktivitätsassay.....	37
3.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	38
3.2.2.1 Verdau von Gewebe für PCR und qPCR.....	38
3.2.2.2 Reverse Transkription.....	39
3.2.2.3 Polymerase Chain Reaction (PCR).....	40
3.2.2.4 DNA Agarosegelelektrophorese.....	42
3.2.2.5 Quantitative real-time-PCR (qPCR).....	42
3.2.2.6 Klonieren mit DNA.....	43
3.2.2.6.1 Isolation von DNA Fragmenten aus Agarosegelen.....	44
3.2.2.6.2 Mutationen via PCR einfügen (site directed mutagenesis).....	44
3.2.2.6.3 Photometrische Bestimmung von DNA Lösungen.....	46
3.2.2.6.4 Herstellen von kompetenten Bakterien.....	46
3.2.2.6.5 Transformation von Plasmiden in Bakterien.....	47
3.2.2.6.6 Mini- und Maxipräparation von Plasmiden aus Bakterien.....	47
3.2.2.6.7 DNA Sequenzierung.....	48
3.2.2.6.8 Klonieren des CD11c.STOP.li.OVA.eGFP Konstrukt.....	48
3.2.2.7 Herstellen von anti-CD40.....	49
3.2.2.8 Arbeiten mit Virus.....	50
3.2.2.8.1 Gewinnung großer Mengen des Vaccinia Virus.....	50
3.2.2.8.2 Virustiterbestimmung mittels Plaque Assay.....	50
3.2.2.8.3 Infektion der Tiere mit Vaccinia Virus via skin scarification (s.s.).....	51
3.2.2.8.4 Virustiterbestimmung in der Haut.....	51
3.2.2.9 Isolation von Zellen.....	52
3.2.2.9.1 Isolation von T-Lymphozyten aus Hautgewebe.....	52
3.2.2.9.2 Isolation von dendritischen Zellen aus Hautgewebe.....	52
3.2.2.9.3 Isolation von Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten.....	53
3.2.2.9.4 DC Isolation über Optiprep-Gradienten.....	54
3.2.2.9.5 Trennung von T-Zellen über Magnetic Activated Cell Sorting (MACS).....	54
3.2.2.10 Färben der Zellen für die Durchflusszytometrie.....	55
3.2.3 Arbeiten mit Tieren.....	56
3.2.3.1 Entnahme von Blut bei Mäusen.....	56
3.2.3.2 Blutproben aufarbeiten und Lysieren der Erythrozyten.....	56
3.2.3.3 Genotypisierung von transgenen Mäusen mit Blut.....	57
3.2.3.4 Herstellen von Knochenmarkschimären.....	57
3.2.3.5 Depletion von Langerin <sup>+</sup> Zellen mittels Diphtherie Toxin.....	58
3.2.3.6 Färben von Zellen mit CFSE.....	58
3.2.3.7 Adoptiver T-Zell Transfer.....	59
3.2.3.8 Betäuben von Mäusen mit Ketamin/Xylazin.....	59

# Inhaltsverzeichnis

---

3.2.3.9 Behandlungen mit 4OH-Tamoxifen (4OH-TAM), Tamoxifen (TAM) und Injektion von anti-CD40 ...	59
<b>4 ERGEBNISSE</b> .....	<b>61</b>
<b>4.1 Teil I</b> .....	<b>61</b>
4.1.1 Topikale Behandlung der Haut mit 4OH-Tamoxifen induziert lokale RFP Expression in Dendritischen Zellen der Haut.....	61
4.1.2 Topikale 4OH-Tamoxifen Behandlung wirkt auf Langerhans Zellen, dermale DCs und auf monozytäre DCs, aber nicht auf Makrophagen .....	64
4.1.3 Behandlung mit 4OH-Tamoxifen induziert GP <sub>33-41</sub> Expression und Präsentation in Haut DCs, die spezifische CD8 T-Zellen induzieren können.....	70
4.1.4 DCs in der Haut induzieren GP <sub>33-41</sub> spezifische „ <i>skin homing</i> “ CD8 T-Zellen, die gegen Hautinfektion mit rekombinanten GP <sub>33-41</sub> exprimierenden <i>Vaccinia</i> protektieren.....	73
4.1.5 Mit Hilfe von LangDTR und Batf3 <sup>-/-</sup> Mäusen kann die Funktion verschiedener DC Subtypen in der Haut analysiert werden .....	76
4.1.6 CD11b <sup>+</sup> DDCs sind kompetent eine funktionelle „ <i>skin homing</i> “ CTL Antwort auszulösen.....	80
4.1.7 Dermale DCs können Haut residente Memory T-Zellen reaktivieren .....	83
<b>4.2 Teil II</b> .....	<b>88</b>
4.2.1 DIETER II Mäuse präsentieren induzierbar OVA <sub>323-339</sub> und aktivieren OT-II Zellen <i>in vitro</i> .....	88
4.2.2 DIETER II Mäuse präsentieren induzierbar OVA <sub>323-339</sub> und aktivieren OT-II Zellen <i>in vivo</i> .....	93
4.2.3 DIETER II Mäuse induzieren effektive T <sub>H</sub> 1 Antwort bei Injektion von Tamoxifen .....	95
4.2.4 Induzierte <i>skin homing</i> CD4 T-Zell Antwort in DIETER II Mäusen protektiert leicht gegen rekombinante VV-OVA (s.s.) Infektion.....	99
<b>5 DISKUSSION</b> .....	<b>101</b>
<b>5.1 Teil I</b> .....	<b>103</b>
5.1.1 Migration .....	103
5.1.2 Die Fähigkeit von DC Subtypen eine funktionelle „ <i>skin homing</i> “ CD8 T-Zell Antwort zu induzieren.....	105
5.1.3 Tissue-Resident Memory T-Zellen.....	110
<b>5.2 Teil II</b> .....	<b>113</b>
5.2.1 Induzierbar OVA <sub>323-339</sub> exprimierendes transgenes Mausmodell.....	113
<b>6 QUELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>117</b>

# Einleitung

---

## 1 Einleitung

### 1.1 Das Immunsystem

Der menschliche Körper ist von einer Vielzahl von Mikroorganismen, die in die vier großen Gruppen Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten eingeteilt werden, umgeben, von denen viele Krankheiten verursachen. Um einer ständigen Ansteckung zu entgehen, ist der Körper durch eine Reihe verschiedener Effektorzellen und Moleküle, die zusammen das Immunsystem bilden, vor Krankheitserregern und den Schäden, die diese verursachen, sowie vor anderen schädlichen Substanzen wie etwa vor Toxinen geschützt.

Die Reaktion, die wir gegenüber einer Infektion entwickeln, bezeichnet man als Immunantwort oder Immunreaktion. Diese lässt sich in eine angeborene und in eine adaptive Immunantwort unterteilen. Wird der Mensch mit Pathogenen konfrontiert, die die erste Schutzbarriere des Körpers überwunden haben, wird sofort eine humorale und zelluläre Immunantwort des angeborenen Immunsystems ausgelöst (Tab. 1). Die angeborene Immunreaktion reagiert sofort und effizient, jedoch unspezifisch auf eine Vielzahl von Pathogenen (Janeway & Medzhitov 2002). Im Gegensatz zur angeborenen Immunantwort benötigt die adaptive Immunantwort mehr Zeit (7-8 Tage) um sich zu entwickeln. Die adaptive Immunantwort ist jedoch hochspezifisch und weist eine große Diversität an Antigen-Rezeptoren auf (Burnet 1976). Außerdem kommt es bei der adaptiven Immunantwort, im Gegensatz zur angeborenen Immunantwort zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, welches bei erneuter Infektion mit dem gleichen Pathogen eine schnellere und effizientere Immunantwort auslöst (Ochsenbein et al. 2000; Wherry et al. 2003).

**Tabelle 1: Bestandteile des angeborenen und adaptiven Immunsystems.**

Bestandteile	angeborenes Immunsystem	adaptives Immunsystem
zellulär	Dendritische Zellen Granulozyten Makrophagen Mastzellen Monozyten NK-Zellen	T-Zellen B-Zellen APCs
humoral	Komplementsystem Interferone Lysozyme Defensine	Antikörper Zytokine

# Einleitung

---

## 1.1.1 Die Zellen des Immunsystems

Fast alle Zellen des Immunsystems stammen von den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark ab. Aus diesen entwickeln sich Stammzellen mit eingeschränktem Potenzial: die direkten Vorläuferzellen der roten Blutkörperchen, die Blutplättchen und die lymphoide, sowie die myeloide Vorläuferzelle (Orkin & Zon 2008). Einzig die Langerhans-Zellen (LC) haben keinen hämatopoetischen Ursprung (Chorro et al. 2009).

Aus den myeloiden Vorläuferzellen entwickeln sich (neutrophile-/ eosinophile-/ basophile-) Granulozyten, unreife dendritische Zellen, Mastzellen, Monozyten, sowie Blutplättchen und Erythrozyten (Orkin & Zon 2008). Die gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzellen entwickeln sich zu B-Zellen, T-Zellen und zu natürlichen Killerzellen (NK) (Orkin & Zon 2008). DCs können sich sowohl aus lymphoiden als auch aus myeloiden Vorläuferzellen entwickeln (Poltorak & Schraml 2015).

## 1.1.2 Das angeborene Immunsystem

Das Oberflächenepithel bildet die erste Schutzbarriere des Körpers die das Eindringen der Pathogene zu verhindern versucht. Durchbrechen Pathogene diese Barriere, sind die Abwehrsysteme der angeborenen Immunität bei der Bekämpfung zahlreicher Krankheitserreger die erste wirksame, sofortige Abwehrreaktion. Die Mikroorganismen werden durch Phagozytose aufgenommen, eine Entzündungsreaktion wird ausgelöst und der Eindringling zerstört (Janeway & Medzhitov 2002). Die angeborene Immunantwort ist jedoch dadurch eingeschränkt, dass sie von einem begrenzten und nicht wandlungsfähigen Repertoire von Rezeptoren abhängig ist, um Mikroorganismen zu erkennen.

Dendritische Zellen, Makrophagen, neutrophile Granulozyten und viele andere Zelltypen erkennen konservierte molekulare Strukturen von Pathogenen und Mikroorganismen über *pattern recognition receptors* (PRR). Diese schließen *toll-like receptors* (TLR), *nucleotide-binding oligomerization domain* (Nod)-, *leucine-rich repeat-containing receptors* (NLRs), *RIG-I like receptors* (RLRs), *C-type lectin receptors* (CLRs), *cyclic GAMP synthase* (cGAS) und *AIM-2 like receptors* mit ein.

## Einleitung

---

Die Strukturen, die sie erkennen, werden *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) genannt. Sie sind strukturell divers und bestehen aus komplexen Polysacchariden, Glycolipiden, Lipoproteinen, Nukleotiden oder Nukleinsäuren (Iwasaki & Medzhitov 2015; Diebold 2009; Diner et al. 2013).

Die TLRs sind eine wichtige Familie von Mustererkennungsrezeptoren, die auf Makrophagen und anderen Immunzellen vorkommen und verschiedene Komponenten von Mikroorganismen binden können, wie z.B. TLR-2 unter anderem Zellwandkomponenten von grampositiven Bakterien, während TLR-4 die LPS von gramnegativen Bakterien binden. Andere Rezeptoren wie Mannose-, Glucan- und Scavenger-Rezeptoren binden Kohlenhydrate der Zellwände von Bakterien, Hefen und Pilzen (Janeway & Medzhitov 2002). Durch die Aktivierung über die PAMPs werden unreife DCs in die Lage versetzt, naive T-Lymphozyten zu aktivieren und das adaptive Immunsystem zu induzieren. Dadurch stellen sie die Verknüpfung von angeborenem und adaptivem Immunsystem her (Steinman & Hemmi 2006).

### 1.1.3 Das adaptive Immunsystem

Das adaptive Immunsystem ist von den Einschränkungen, mit denen das angeborene Immunsystem konfrontiert ist, nicht betroffen. Es zeichnet sich durch eine hohe Spezifität, Diversität und ein immunologisches Gedächtnis aus, das zu einer schnellen und effektiven Immunantwort bei einer erneuten Infektion mit dem identischen Pathogen führt. Zwei Gruppen von Zellen stellen die wesentlichen Elemente der adaptiven Immunantwort dar, die T- und B-Zellen. Anstelle von mehreren verschiedenen Rezeptoren, die jeweils ein konventionelles Oberflächenmerkmal von unterschiedlichen Krankheitserregern erkennen, trägt jeder Lymphozyt nur Antigenrezeptoren, die für ein einziges Epitop spezifisch sind (Burnet 1976).

Diese Diversität entsteht während der Lymphozytenentwicklung durch Rekombination vieler Gensegmente (*combinatorial diversity*) (Grawunder et al. 1998), Ein- und Ausbau zusätzlicher Nukleotide (*junctional diversity*) (Jeske et al. 1984) und somatischer Hypermutation (Teng & Papavasiliou 2007), was Millionen Antigenspezifitäten zur Folge hat. Nur Lymphozyten, die auf ein Antigen treffen, für das ihr Rezeptor spezifisch ist und kostimulatorische Moleküle und Zytokine zugegen



## Einleitung

---

sind, werden aktiviert, um zu proliferieren und sich zu Effektorzellen zu differenzieren. Bei der Proliferation entstehen viele identische Nachkommen, ein Vorgang der als klonale Expansion bezeichnet wird. Ist die Infektion effektiv bekämpft, gehen die spezifischen Lymphozyten in Apoptose, nur wenige von ihnen bleiben zurück und bilden das immunologische Gedächtnis.

### 1.2 T-Zellen

T-Zellen entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarkes und werden anhand ihres T-Zellrezeptors (TCR), einem Heterodimer zweier Ketten, unterschieden. Der Großteil der T-Lymphozyten weist einen  $\alpha\beta$ -TCR auf, weitaus seltener ist der  $\gamma\delta$ -TCR zu finden. T-Zellen mit  $\alpha\beta$ -TCR werden außerdem in CD4 und CD8 T-Zellen unterteilt. T-Lymphozyten die einen funktionsfähigen TCR exprimieren, werden im Thymus selektioniert (Carpenter & Bosselut 2010). Bei der positiven Selektion können nur T-Lymphozyten ausreifen, die mit MHC-Molekülen interagieren können. T-Zellen mit einem TCR der Bindung mit einem MHC-Peptid-Komplex mit zu hoher Affinität eingeht, werden negativ selektioniert (A. Ziegler et al. 2009; Sprent et al. 1988), was eine Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen dieser T-Lymphozyten mit sich bringt (Lo et al. 1986; Sprent et al. 1988; Hengartner et al. 1988). Nur Lymphozyten, die auf ein Antigen treffen, an das ihr Rezeptor bindet und kostimulatorische Moleküle (CD80/CD86) und Zytokine zugegen sind, werden aktiviert, um zu proliferieren und sich zu Effektor T ( $T_{EF}$ ) Zellen zu differenzieren. Im Thymus entwickeln sich zwei Typen (CD4 und CD8) von reifen, aktivierbaren, naiven T-Zellen. CD4 T-Zellen differenzieren nach ihrer Aktivierung durch einen MHC-II-Peptid-Komplex und unter dem Einfluss verschiedener Zytokine zu T-Helfer-Zellen ( $T_H$ ):  $T_{H1}$ ,  $T_{H2}$ ,  $T_{H17}$ , regulatorischen T-Zellen (Tregs) und T-follikuläre-Helfer-Zellen ( $T_{FH}$ ).  $T_{FH}$  interagieren vorwiegend mit B-Zellen und medieren den Antikörperklassenwechsel (Iwasaki & Medzhitov 2015). Eine T-Zell-abhängige Antikörper-Antwort benötigt drei Signale: Erkennung des spezifischen Antigens durch die B-Zelle, Kostimulation durch  $T_{FH}$  Zellen über CD40-CD40L Interaktion und Zytokine, die den Klassenwechsel der Antikörper auslösen (Iwasaki & Medzhitov 2015). B-Zellen können aber auch T-Zell-unabhängig Antikörper produzieren, führen dabei aber keinen Klassenwechsel durch, wodurch nur Immunglobuline der Klasse

## Einleitung

---

M (IgM) produziert werden (Haas et al. 2005; Alugupalli et al. 2004; Baumgarth et al. 2000).

### 1.2.1 T-Zell Populationen

T<sub>H</sub>1 Zellen unterstützen eine zelluläre Immunantwort. Ihre Differenzierung ist abhängig von IL-12 und dem Transkriptionsfaktor T-bet. Sie sekretieren große Mengen an IL-2, INF- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ . Diese wirken sowohl auf Lymphozyten, als auch auf nicht-lymphozytäre Zellen, fördern Inflammation und wirken sich auf die Proliferation von CD4 T-Zellen aus (Henden & Hill 2015).

T<sub>H</sub>17 Zellen sind pro-inflammatorische T-Zellen, die bei vielen Erkrankungen eine Rolle spielen, so bei Psoriasis, rheumatoider Arthritis, Multipler Sklerose, Morbus Crohn, Asthma und anderen bakteriell bedingten Erkrankungen. Ihre Entwicklung ist abhängig von TGF $\beta$ , IL-6 und IL-23. Sie sekretieren IL-17, IL-17F und TNF und werden über den Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t definiert. Ihre sekretierten Zytokine wirken auf Lymphozyten und nicht-lymphozytäre Zellen. Welche aktive Funktion sie haben wird diskutiert (Henden & Hill 2015; Korn et al. 2009). Einige Studien weisen darauf hin, dass T<sub>H</sub>17 Zellen bei Infektionen mit *M. tuberculosis* eine regulierende Rolle zukommt (da Silva et al. 2015).

T<sub>H</sub>2-Zellen differenzieren sich unter Einfluss von IL-4 und IL-25. Sie zeichnen sich durch Aktivität des Transkriptionsfaktors GATA-3 und Produktion von IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 aus. IL-4 fördert die Entwicklung der T<sub>H</sub>2-Antwort, IL-5 lockt eosinophile Granulozyten an, welche beispielsweise in Asthmaerkrankungen eine Rolle spielen. IL-13 bewirkt einen Klassenwechsel zu IgE in B-Zellen, wodurch die Bekämpfung von Parasiten wie Helminthen gefördert wird (Henden & Hill 2015; Iwasaki & Medzhitov 2015; Wynn 2015).

CD8 T-Zellen benötigen einen MHC-I-Peptid-Komplex um aktiviert zu werden (Zinkernagel & Doherty 1974). Sie differenzieren nach ihrer Aktivierung zu zytotoxischen T-Zellen (CTL), die mit Hilfe ihres spezifischen TCRs an Zellen binden, die einen MHC-I-Peptid-Komplexe (z.B. virale Peptide) exprimieren. CTLs lysieren die infizierte Zelle mittels Perforin, welches sie ausschüttet, oder lösen mittels Fas-

## Einleitung

---

Ligand die Apoptose der Fas exprimierenden, infizierten Zelle aus (Nagata & Golstein 1995). Außerdem schütten CTLs inflammatorische Cytokine wie INF- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  aus. Nach der Expansionsphase kommt es zu einer Rückbildung der T<sub>EF</sub>-Zellen. Während dieser Phase verenden 90-95% der Effektor T-Zellen, die verbleibenden 5-10% differenzieren zu unterschiedlichen Typen von Memory T-Zellen aus (Kaech & Wherry 2007). Diese Memory T-Zellen sorgen bei einem erneuten Kontakt mit dem Pathogen für eine schnellere und effizientere Immunantwort (Ochsenbein et al. 2000; Wherry et al. 2003).

Während der Induktion einer T-Zell-Antwort werden die T-Zellen durch DC instruiert bestimmte sogenannte ‚*homing* Rezeptoren‘ zu exprimieren. Diese Chemokin- und Selektinrezeptoren, sowie Integrine (Islam & Luster 2012) verleihen ihnen die Fähigkeit in bestimmte Gewebe einzuwandern (Sigmundsdottir & Butcher 2008; Sigmundsdottir et al. 2007). Beispielsweise exprimieren T-Zellen, die in mukosales Gewebe wandern, das Integrin  $\alpha 4\beta 7$  und den Chemokinrezeptor CCR9, was ihnen das Passagieren in das Zielgewebe ermöglicht (Briskin et al. 1997; Kunkel et al. 2000). T-Zellen, deren Bestimmungsort die Haut ist („*skin homing*“), exprimieren hingegen die Chemokinrezeptoren CCR4 und CCR10 sowie E- und P-Selektin Ligand (Ley et al. 2007).

Die Liganden für CCR4 und CCR10 sind CCL17 und CCL27, welche von Endothelzellen und Keratinozyten der Epidermis unter inflammatorischen Bedingungen gebildet werden (Campbell et al. 1999; Homey et al. 2002). E- und P-Selektin-Liganden binden spezifisch an E-Selektin und sind für die rollende Bewegung von Leukozyten entlang der Oberfläche von Endothelzellen unabkömmlich (Alon et al. 1995; Hidalgo et al. 2007; da Costa Martins et al. 2007). Leukozyten gelangen anschließend über verschiedene Routen (Parazelluläre und Transzelluläre Route) in das Zielgewebe (Ley et al. 2007).

Für „*skin homing*“ T Zellen konnte gezeigt werden, dass DCs der Haut die den aktiven Metaboliten von Vitamin D3, 1,25(OH)<sub>2</sub>D3, nach Bestrahlung mit Sonnenlicht produzieren die Expression von CCR10 in T-Zellen, induzieren (Sigmundsdottir et al. 2007).

# Einleitung

---

## 1.2.2 Tissue-Resident Memory T-Zellen

In einer T Zell Antwort entstehen Effektor Z-zellen ( $T_{EF}$ ), Effektor Memory T-Zellen ( $T_{EM}$ ), Zentrale Memory T-Zellen ( $T_{CM}$ ) und Gewebe residente Memory T-Zellen ( $T_{RM}$ ).

$T_{CM}$  patrouillieren wie naive T-Zellen über den Blutstrom durch den Körper und gelangen in SLOs, wie die Lymphknoten und die weiße Pulpa der Milz (Andrian & C. R. Mackay 2000; Sallusto et al. 1999). Ebenso durchlaufen sie eine stabile und zügige Proliferation und Differenzierung in Effektor T-Zellen, nachdem sie ihr spezifisches Antigen erneut erkannt haben. Anschließend migrieren sie von den SLOs zu inflammatorischen Geweben, um die Infektion zu beseitigen (Andrian & C. R. Mackay 2000).

$T_{EM}$  besitzen keine Lymphknoten *homing*-Rezeptoren, wie CD62L oder CCR7, wodurch sie nicht in SLOs migrieren können. Dennoch exprimieren sie andere *homing*-Rezeptoren, wodurch man lange Zeit glaubte, sie würden zwischen Blut und nicht-lymphatischen Geweben (NLT, *not lymphatic tissue*) rezirkulieren. Da sie eher Effektorfunktion als proliferative Eigenschaften besitzen und man auch in Geweben Memory T-Zellen noch lange nach Infektionen nachweisen konnte, wurde daraus rückgeschlossen, dass es sich dabei um  $T_{EM}$  handelte (Butcher & Picker 1996; C. R. Mackay et al. 1990; Sallusto et al. 1999; Masopust et al. 2001; Reinhardt et al. 2001). Es kamen Zweifel an dieser Theorie auf, so hätten  $T_{EM}$ , um das Gewebe zu verlassen, über afferente Lymphbahnen migrieren müssen, was in der Regel ohne Expression von CCR7 nicht möglich ist (Hawke et al. 1998; Hogan et al. 2001; Masopust et al. 2001). Erst in jüngerer Zeit konnte eindeutig gezeigt werden, dass eine Population von Memory T-Zellen in NLTs sesshaft ist. Durch diese Eigenschaft wurden sie „*tissue resident memory*“ ( $T_{RM}$ ) T-Zellen genannt (Gebhardt et al. 2011; Jiang et al. 2012; Masopust et al. 2010; Teijaro et al. 2011; Wakim et al. 2010; Schenkel & Masopust 2014).

Während einer akuten viralen Infektion exprimieren  $T_{EF}$  *homing*-Rezeptoren, die es ihnen ermöglichen in inflammatorisches Gewebe gezielt einzuwandern. Eine *Vaccinia*-Infektion führt unter anderem zur Expression des Haut „*homing*“ Marker P-Selektin und E-Selektin Ligand. Nach Erreichen des Zielortes werden die Marker CD103 sowie CD69 hoch reguliert (Masopust et al. 2006; Jiang et al. 2012).  $T_{RM}$  exprimieren kein CD62L (Casey et al. 2012) und besitzen keine migratorischen

## Einleitung

---

Fähigkeiten, wie parabiotische und Transplantationsexperimente zeigten (Masopust et al. 2010; Wakim et al. 2010; Gebhardt et al. 2009; Jiang et al. 2012). Dennoch konnte gezeigt werden, dass sie für die Protektion einer Reinfektion von großer Bedeutung sind (Jiang et al. 2012).

Da  $T_{RM}$  in nicht NLTs verweilen (Zaid et al. 2014) können sie sofort auf eindringende Pathogene reagieren, noch bevor Pathogene oder Antigene von Pathogenen zu SLOs transportiert werden oder Inflammation andere Immunzellen anlockt (Nolz & Harty 2014). So wurde gezeigt, dass bei Fehlen von  $T_{RM}$ , jedoch in Anwesenheit von zirkulierenden Memory-T-Zellen, eine virale Reinfektion nur verzögert kontrolliert werden konnte (Jiang et al. 2012; Teijaro et al. 2011).

$T_{RM}$  in der Haut besitzen eine dendritische Morphologie, migrieren aktiv durch Gewebe und tasten Zellen nach ihrem spezifischen Antigen ab. Während einer Inflammation steigt die Mobilität stark an (Zaid et al. 2014; Ariotti et al. 2012; Gebhardt et al. 2011).

Erkennen sie eine infizierte Zelle, mediieren sie Zytotoxizität über Granzym B (Wakim et al. 2010; Casey et al. 2012; Nolz & Harty 2014) und produzieren  $INF\gamma$  (Müller et al. 2012), was sowohl auf infizierte Zellen wirkt, aber auch auf das gesamte umgebende Gewebe (Ariotti et al. 2014; Müller et al. 2012).  $INF\gamma$  wirkt auf Endothelzellen, sodass diese VCAM-1 hoch regulieren, dies erhöht die Rekrutierung und die Infiltration von CD8 T-Zellen und B-Zellen (Schenkel & Masopust 2014). Weiterhin induziert  $INF-\gamma$  in dem gesamten Gewebe einen antiviralen Status (Ariotti et al. 2014).

Obwohl CD8  $T_{RM}$  der Haut in der Epidermis lokalisiert sind und mit Langerhans-Zellen in engem Kontakt stehen, brauchen sie keine Langerhans-Zellen für ihre Persistenz in diesem Kompartiment (Zaid et al. 2014).

### 1.3 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen wurden erstmals 1973 von Ralph Steinman beschrieben (Steinman & Z. A. Cohn 1973; Steinman & Z. A. Cohn 1974). In der Folge konnte durch Untersuchungen an in vitro aus Knochenmark ausdifferenzierten DCs (BMDC, *bone marrow derived DCs*) gezeigt werden, dass DCs darauf spezialisiert sind Antigene aufzunehmen und auf ihrer Zelloberfläche über

## Einleitung

---

Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC, *major histocompatibility complex*) Klasse I und II zu präsentieren (Witmer-Pack et al. 1987; Banchereau & Steinman 1998).

Dabei werden endogene Proteine durch das Proteasom in Peptide sezerniert, die über MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexe auf die Zelloberfläche zur Präsentation transportiert werden. Hingegen werden exogene Proteine über Makropinozytose, Phagozytose oder rezeptorvermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen und in Endolysosomen durch spezielle Proteasen prozessiert. Dort werden sie von MHC-Klasse-II-Molekülen gebunden, zur Zelloberfläche transportiert und präsentiert (Sherman et al. 1995; Denzin & Cresswell 1995).

Neben DCs die in den sekundär lymphatischen Organen (SLO) resident sind, sind DCs auch in nahezu allen peripheren Geweben zu finden, von wo sie in SLO migrieren können. Dabei nehmen sie Antigene aus der Peripherie auf, durchlaufen eine Reifung, die Maturation genannt wird, und transportieren die Antigene zu SLOs um sie dort unter anderem T-Zellen zu präsentieren. Somit nehmen DCs eine zentrale Funktion in der Induktion und der Kontrolle einer Immunantwort ein (Steinman & Hemmi 2006).

Mittlerweile ist bekannt, dass DCs, Monozyten und Makrophagen sich aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle entwickeln und DCs weiterhin grob in zwei Subtypen unterschieden werden können: plasmazytoide DCs (pDCs) und konventionelle oder klassische DCs (cDC, *conventional DC*). Das klassische Modell geht von einer gemeinsamen bipotenten Vorläuferzelle im Knochenmark aus, der Makrophagen- und DC-Vorläuferzelle (MDP, *macrophage and DC progenitor*). Aus dieser entwickelt sich zum einen die gemeinsame DC-Vorläuferzelle (CDP, *common DC progenitor*) und zum anderen die Monozyten. CDPs wiederum entwickeln sich zu pDCs und zu Vorläuferzellen der DCs, die pre-DCs. Noch im Knochenmark reifen pDCs und Monozyten vollständig aus und können periphere Organe über den Blutstrom erreichen. Im Gegensatz dazu erreicht die noch nicht vollständig entwickelte pre-DC über den Blutstrom periphere lymphatische Organe und auch nicht-lymphatische Organe und differenziert dort vollständig aus. In letzterem können Monozyten unter inflammatorischen Bedingungen auch weitere Differenzierungsstadien, wie den moDC (monozytäre DC) oder moMakrophagen (monozytäre Makrophagen), erreichen (Poltorak & Schraml 2015).

## Einleitung

---

Einen besonderen DC Typ stellen die Langerhans-Zellen (LC, *langerhans cell*) dar, die einen vollkommen anderen Ursprung haben und nicht aus Vorläuferzellen aus dem Blut generiert werden. Diese Zellen werden allerdings später intensiver besprochen.

Während alle DCs die Expression von MHC-Klasse-II und dem Integrin CD11c gemeinsam haben, gibt es spezifische Oberflächenmoleküle durch die DCs in Subpopulationen differenziert werden können. Die pDCs exprimieren im Gegensatz zu den cDCs geringere Mengen an CD11c, sowie die Oberflächenmarker B220 und Ly6C (Swiecki et al. 2010).

Mit Hilfe der Oberflächenmarker CD4, CD8 und CD11b werden residente DCs der Milz in 3 Subpopulationen unterteilt: CD4<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> DCs, CD8<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> DCs und CD11b<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> DCs (Vremec et al. 2000).

In Lymphknoten kommen sowohl residente DCs, die durch Vorläuferzellen aus dem Blut entstehen, als auch migratorische DCs vor. Residente DCs exprimieren hohe Level an CD11c und niedrigere Level an MHC-Klasse-II, wohingegen migratorische DCs hohe Level an MHC-Klasse-II exprimieren, jedoch weniger CD11c (Merad et al. 2013). In nicht-lymphatischen Geweben wurden in den letzten 10 Jahren weitere DC Subpopulationen identifiziert. Den DCs der Haut wird später in diesem Teil der Arbeit ein gesonderter Abschnitt gewidmet.

### 1.3.1 DCs das Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität

DCs können, ausgelöst durch verschiedene Stimuli einen Differenzierungsprozess durchlaufen der als DC Reifung bezeichnet wird. Stimuli welche die Reifung auslösen können mikrobielle Liganden für PRRs, Signale von Zellen des angeborenen Immunsystems, Immunkomplexe, die über Fc-Rezeptoren agieren, das umgebende inflammatorische Milieu oder nekrotische Zellen sein (Steinman 2008; Joffre et al. 2009).

Lymphozyten des angeborenen Immunsystems, wie NK-Zellen (*natural killer cells*), NKT-Zellen (*natural killer t cell*) oder  $\gamma\delta$ -T-Zellen können über verschiedene Mechanismen und Rezeptoren stimuliert werden. Sie können dann ihrerseits mit DCs interagieren und ihre Reifung auslösen. Wichtige Faktoren sind dabei TNF (*tumor necrose factor*) und die Interaktion über CD40-CD40L (Münz et al. 2005).

## Einleitung

---

Die Reifung einer unreifen DC, führt zu Veränderungen der Zellen. Die Hochregulierung des Chemokinrezeptors CCR7 auf reifen DCs ermöglicht es den Zellen zu sekundären lymphatischen Organen (SLO) zu wandern. Reife DCs haben nur noch reduzierte Fähigkeiten über Phagozytose exogene Proteine aufzunehmen und exprimieren die kostimulatorischen Moleküle CD80/86 und CD70 welche für die Induktion einer T-Zell-Antwort notwendig sind (Steinman 2012; Alvarez et al. 2008; Schildknecht et al. 2007; Smith-Garvin et al. 2009; Heuzé et al. 2013). Auch unreife DCs aus der Peripherie können bei Abwesenheit von Infektionen oder Entzündungen, d. h. im *steady state*, in SLOs einwandern und dort stetig Antigen präsentieren (Heuzé et al. 2013; Randolph et al. 2005).

In den Lymphknoten angekommen stehen DCs in ständigem Kontakt mit T-Zellen. DCs ohne spezifisches Antigen können pro Stunde mit 500-5000 T-Zellen in Kontakt treten. Dabei können die Kontakte wenige Sekunden oder auch einige Minuten andauern. Erkennt eine T-Zelle ihr spezifisches Antigen auf einer reifen DC, kann der Kontakt mehrere Stunden andauern (Bousso 2008). Unreife *steady-state* DCs exprimieren nur geringe Mengen an kostimulatorischen Molekülen und sezernieren keine pro-inflammatorischen Moleküle, die eine Immunantwort und die Differenzierung von T-Zellen induzieren würde (Joffre et al. 2009; Bousso 2008). Da sie aber hohe phagozytäre Aktivität besitzen (Banchereau & Steinman 1998), präsentieren sie in SLOs stetig sowohl Eigenantigene als auch ungefährliche Fremdantigene. Durch ihren unreifen Status kommt es zu keinem *Priming* naiver T-Zellen. Stattdessen tolerisieren *steady-state* DCs periphere antigenspezifische CD4 und CD8 T-Zellen und supprimieren somit potenziell autoreaktive T-Zellen (Vitali et al. 2012; Waithman et al. 2007; Hawiger et al. 2001; Probst et al. 2003; Steinman et al. 2003; Shortman & Y.-J. Liu 2002).

Reife DCs exprimieren hohe Level an MHC-Klasse-II-Molekülen, kostimulatorischen Molekülen, wie CD80/86 und CD70, und sekretieren Zytokine. Diese drei Signale induzieren effiziente T-Zell-Antworten und führen zur Differenzierung von Effektor-T-Zellen ( $T_{EF}$ ), Effektor-Memory-T-Zellen ( $T_{EM}$ ), Zentralen-Memory-T-Zellen ( $T_{CM}$ , *central memory*) und im Gewebe verweilenden Memory-T-Zellen ( $T_{RM}$ , *tissue resident memory*) (Joffre et al. 2009; Prlic et al. 2007; Schenkel & Masopust 2014).



## Einleitung

---

Welche dieser Differenzierungen eine T-Zelle durchläuft, hängt von einem komplexen Zytokinmilieu ab, welches die Zelle umgibt. Stammt der Stimulus von Viren, intrazellulären Bakterien oder Protozoen werden Typ-I-Interferone (INF- $\alpha/\beta$ ), sowie IL-6, IL-12, IL-1 $\beta$  sekretiert und eine zelluläre Immunantwort wird ausgelöst. Naive CD8 T-Zellen werden zu cytotoxischen T Lymphozyten (CTL) und töten infizierte Zellen die entsprechende Antigene über MHC-Klasse-I präsentieren. Naive CD4 T-Zellen differenzieren in Anwesenheit von IL-12 und IL-6 zu T<sub>H</sub>1 Zellen und in Anwesenheit von IL-23 und TGF- $\beta$  zu T<sub>H</sub>17 Zellen (Iwasaki & Medzhitov 2015).

Die Induktion einer Typ 2 Immunantwort, bei der ein Zytokinmilieu vorliegt, welches die Differenzierung von naiven CD4 T-Zellen zu T<sub>H</sub>2 Zellen unterstützt, ist größtenteils nicht PRR abhängig. Ausgelöst wird sie unter anderem durch Parasiten oder Allergene und benötigt Zytokine wie IL-4, IL-33 und TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*), deren Sekretion ein Resultat von Zellschäden und Stress ist, wohingegen die Quelle von IL-4 bis heute nicht vollständig geklärt wurde und Teil aktueller Diskussionen ist (Palm et al. 2012; Saenz et al. 2008; Tait Wojno & Artis 2012; Farrar et al. 2002; Ahern et al. 2008).

### 1.3.2 Dendritische Zellen der Haut

Anatomisch wird die Haut in zwei Kompartimente unterteilt, die Epidermis und die Dermis. Die Epidermis besteht aus verschiedenen Schichten: dem *stratum basale*, *spinosum*, *granulosum*, *lucidum* und *corneum*. Das *stratum basale* und *spinosum* wird auch als *stratum germinativum* zusammengefasst.

Das *stratum basale* besteht aus einer einlagigen Zellschicht, die sich mit der Basalmembran zur Dermis abgrenzt. Neben den sich teilenden Zellen befinden sich dort Sinneszellen und Melanozyten. Im *stratum spinosum* beginnt die Keratinisierung der aus den Basalzellen entstandenen Tochterzellen. Des Weiteren befinden sich dort lymphatische Zellen wie CD8 T<sub>RM</sub>, dendritische epidermale  $\gamma\delta$  T-Zellen (DETC, *dendritic epidermal  $\gamma\delta$  t cell*) und Langerhans-Zellen (LC). Die Dermis besteht größtenteils aus Fibroblasten und Kollagen-, sowie Elastanfasern, dennoch befinden sich eine Vielzahl verschiedener immunologisch relevanter Zellen in ihr. Effektor- und Memory-T-Zellen koexistieren mit dem mononuklearen phagozytären System, zu dem DCs, Monozyten und Makrophagen gehören. Die DCs können in weitere

## Einleitung

Untereinheiten differenziert werden: konventionelle DCs (cDC), monozytäre DCs (moDC) und plasmazytoide DCs (pDC). Letztere dringen allerdings nur bei Inflammation in das Gewebe ein (Gregorio et al. 2010).

Anhand ihrer Expression verschiedener Oberflächenmoleküle können diese DCs in 6 verschiedene Subpopulationen eingeteilt und von Makrophagen unterschieden werden (Henri et al. 2010; Tamoutounour et al. 2012).

**Tabelle 2: Dendritische Zell Subpopulationen in der Haut.**

Lokalisation	Subpopulation	Phänotyp
Epidermis	LC	CD207 <sup>++</sup> , CD11b <sup>int</sup> , CD103 <sup>-</sup> , EpCAM <sup>++</sup> , CD24 <sup>+</sup>
Dermis	LC in transit	CD207 <sup>++</sup> , CD11b <sup>int</sup> , CD103 <sup>-</sup> , EpCAM <sup>++</sup> , CD24 <sup>+</sup>
	CD207 <sup>+</sup> CD103 <sup>+</sup>	CD207 <sup>+</sup> , CD11b <sup>lo</sup> , CD103 <sup>+</sup> , EpCAM <sup>-/lo</sup> , CD24 <sup>+</sup>
	CD207 <sup>+</sup> CD103 <sup>-</sup>	CD207 <sup>+</sup> , CD11b <sup>lo</sup> , CD103 <sup>+</sup> , EpCAM <sup>-/lo</sup> , CD24 <sup>+</sup>
	CD207 <sup>-</sup> CD11b <sup>-</sup>	CD207 <sup>-</sup> , CD11b <sup>-/lo</sup> , CD103 <sup>-</sup> , EpCAM <sup>-</sup> , CD24 <sup>-</sup>
	CD207 <sup>-</sup> CD11b <sup>+</sup> (cDCs)	CD207 <sup>-</sup> , CD11b <sup>hi</sup> , CD103 <sup>-</sup> , EpCAM <sup>-</sup> , CD24 <sup>-</sup>
	Monozytäre DCs	CD11b <sup>+</sup> , CD64 <sup>+</sup> , CCR2 <sup>+</sup> , Ly-6C <sup>lo</sup> , CD24 <sup>-</sup>
	Dermale Makrophagen	CD11b <sup>+</sup> , CD64 <sup>hi</sup> , CCR2 <sup>lo</sup> , Ly-6C <sup>lo</sup> , CD24 <sup>-</sup>

In der Epidermis kommen ausschließlich LCs vor, die das C-type Lektin Langerin (CD207) exprimieren. Weiterhin exprimieren sie CD24 und im Gegensatz zu allen anderen DC Populationen EpCAM (*Epithelial Cell Adhesion Molecule*). Da sie, um in die Lymphknoten zu gelangen, die Dermis passieren müssen, findet man dort eine kleine Population von LCs in *transit*.

Murine DCs der Dermis (DDC, *dermal* DCS) werden durch die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle in CD207<sup>-</sup> (Langerin) CD11b<sup>+</sup> (ITGAM) DCs, CD207<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> und CD103<sup>-</sup> DCs, sowie für die beiden Marker CD11b und CD207 negative DCs unterschieden (Bursch et al. 2007; Ginhoux et al. 2007; Poulin et al. 2007; Henri et al. 2010). Weiterhin finden sich monozytär entwickelte DCs (moDC) und Makrophagen in der Haut (Tamoutounour et al. 2013). Dermale cDCs und moDCs besitzen eine kurze Lebensspanne und werden kontinuierlich aus Vorläuferzellen gebildet, die über Blutgefäße in das Gewebe eindringen (Geissmann et al. 2010). Konventionelle DCs werden aus pre-cDCs gebildet (Geissmann et al.

## Einleitung

---

2010) und moDCs aus Ly6C<sup>+</sup> Monozyten (Tamoutounour et al. 2013; Jakubzick et al. 2013; Bain et al. 2012).

Alle dermalen DCs entwickeln sich FLT3L (*Fms-related tyrosine kinase ligand 3*) abhängig (Geissmann et al. 2010; K. Liu et al. 2007), während die Entwicklung von moDCs und einem Teil der Markophagen vom Chemokinrezeptor CCR2 abhängig ist (Serbina & Pamer 2006; Tamoutounour et al. 2013).

### 1.3.2.1 Langerhans-Zellen

Langerhans-Zellen (LC, *langerhans cell*) sind strahlungsresistente Zellen, die ihren pränatalen Ursprung aus myeloiden Vorläuferzellen des Dottersacks (Chorro et al. 2009) und Monozyten der fetalen Leber haben (Hoeffel et al. 2012).

Während der Reifung werden LCs mobil, was es ihnen ermöglicht die Basalmembran, welche Epidermis von Dermis trennt, zu durchqueren, um in der Dermis lymphatische afferente Gefäße zu erreichen (Kissenpfennig et al. 2005; Konradi et al. 2013). Ihre migratorische Kinetik ist vergleichbar mit nicht-lymphoiden cDCs, wenngleich diese etwas geringer ist. Während dermale DCs sehr schnell in SLOs migrieren (Peak an Tag 2 bzw. 3), migrieren LCs etwas langsamer (Peak an Tag 4/5) (Tomura et al. 2014).

Für LCs wurden sowohl pro-inflammatorische als auch anti-inflammatorische Funktionen beschrieben. LCs können beispielsweise eine protektive Immunantwort gegen *Leishmania major* in Mäusen inhibieren (Kautz-Neu et al. 2011) und in Abwesenheit von LCs ist die Kontakthypersensitivität erhöht (Bobr et al. 2010; Gomez de Agüero et al. 2012). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass LCs an CD207 gekoppeltes Antigen kreuzpräsentieren können und CD8 T-Zellen (Flacher et al. 2014) und CD4 T-Zellen (Shklovskaya et al. 2011) tolerisieren, aber auch FoxP3<sup>+</sup> Eigenantigen-spezifische T-Zellen expandieren und induzieren (Idoyaga et al. 2013). Studien zeigten, dass LCs bei der Induktion einer T<sub>H</sub>17 Antwort während einer kutanen *Candida albicans* Infektion notwendig sind (Igyártó et al. 2011), sowie für eine humorale Immunantwort gegen Antigene, welche die Epidermis noch nicht durchquert haben (Ouchi et al. 2011).

Die Funktion von LCs ist bisher nicht endgültig geklärt. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten an Unterschieden der zur Untersuchung verwendeten Modellsysteme liegen.

## Einleitung

---

### Dermale dendritische Zellen

#### 1.3.2.2 CD207<sup>+</sup> dermale DCs

Langerin<sup>+</sup> dermale DCs können anhand der Expression des Integrins CD103 in zwei etwa gleich große Subpopulationen eingeteilt werden, die gemeinsam aber nur ca. 3-6% aller dermalen DCs in der Haut ausmachen (Henri et al. 2010). Neben der Expression von CD207 ist auch die Expression des Chemokinrezeptors XCR1 beschrieben worden (Crozat et al. 2011; Bachem et al. 2012; Yamazaki et al. 2010). Sie besitzen starke Fähigkeiten der Kreuzpräsentation und können virale Antigene und Keratinozyten produziertes Eigenantigen über MHC-Klasse-I präsentieren (Henri et al. 2010; Bedoui et al. 2009). Zudem sind sie für eine effektive CD8 T-Zell-Antwort nach viraler Hautinfektion verantwortlich (Seneschal et al. 2014). Bei Abwesenheit dieser Subpopulation kann dennoch eine T<sub>H</sub>2 medierte humorale Antwort und nach kutaner *C. albicans* Infektion eine T<sub>H</sub>1 Antwort ausgelöst werden (Igyártó et al. 2011). An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass es einige Modelle gibt, die es ermöglichen diese Zellen *in vivo* zu untersuchen. Zwei dieser Modelle kamen auch in dieser Arbeit zur Anwendung. Zum einen wurden Mäuse verwendet die Langerinpromotor-abhängig den Diphtherie Toxin-Rezeptor exprimieren und somit durch Diphtherie Toxin von Langerin<sup>+</sup> DCs depletiert werden können, zum anderen Transkriptionsfaktor Batf3 (*basic leucine zipper transcription factor ATF-like 3*) defiziente Mäuse, welche keine Langerin<sup>+</sup> DDCs entwickeln (Malissen et al. 2014; Murphy et al. 2013).

#### 1.3.2.3 CD11b<sup>+</sup> DDCs

Mit ca. 66% aller dermalen DCs, sind die CD11b<sup>+</sup> DDCs die größte Population der DCs in der Dermis. Außerdem handelt es sich hierbei um eine heterogene Population aus cDCs, moDCs und Makrophagen. CD11b<sup>+</sup> cDCs können durch die fehlende Expression der Oberflächenmoleküle Ly6C und CD64 (hoch affiner IgG Rezeptor FcγRI) von moDCs und Makrophagen unterschieden werden (Tamoutounour et al. 2013), weiterhin migrieren sie im Gegensatz zu moDCs und Makrophagen im *steady state* sehr effizient zu drainierenden Lymphknoten (Tamoutounour et al. 2013) und erreichen ihren Peak nach 48 Stunden (Tomura et al. 2014). Ob CD11b<sup>+</sup> cDCs eine spezielle Funktion haben, ist nicht vollständig geklärt. So

## Einleitung

---

wurde sowohl beschrieben, dass sie CD8 T-Zellen stimulieren, als auch dass sie CD4 T-Zell-Antwort medieren. Beispielsweise wurde beschrieben, dass CD11b<sup>+</sup> cDCs nach topikaler Immunisierung durch Kreuzpräsentation die Proliferation, nicht aber ein *skin homing* Phänotyp bei CD8 T-Zellen induziert werden konnte (Nizza & Campbell 2014). Des Weiteren können CD11b<sup>+</sup> cDCs auf TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*) reagieren und eine T<sub>H2</sub> Antwort auslösen (Kitajima & S. F. Ziegler 2013). Zudem sekretieren sie IL-23, welches für die Produktion von IL-17 und IL-22 von dermalen T-Zellen notwendig ist (Wohn et al. 2013). Trotzdem gibt es Hinweise, dass CD11b<sup>+</sup> cDCs existieren, welche Aldh1a2 (kodiert für die Retinaldehyd Dehydrogenase 2) exprimieren, welches Vitamin A in den Metaboliten Retinolsäure umwandelt. Dieser Metabolit fördert die Entstehung von regulatorischen T-Zellen (Mucida et al. 2007; Guilliams, Crozat, et al. 2010).

### **1.3.2.4 moDCs, Makrophagen und pDCs**

Monozytäre DCs in der Haut entwickeln sich aus Ly6C positiven Monozyten, die aus dem Blut in das Gewebe einwandern. Durch inflammatorische Signale regulieren sie Ly6C herunter, während MHC-Klasse-II hoch reguliert wird (Tamoutounour et al. 2013). Obwohl sich moDCs aus Monozyten entwickeln, besitzen sie Gemeinsamkeiten mit DCs. Die moDCs exprimieren geringe Level des Transkriptionsfaktors Zbtb46 (Satpathy et al. 2012; Segura et al. 2013; Meredith et al. 2012), welcher klassische DCs von anderen Immunzellen, wie pDCs und Monozyten unterscheidet, und haben eine ähnliche transkriptionelle Signatur wie CD11b<sup>+</sup> cDCs (Tamoutounour et al. 2013). Ihre migratorische Fähigkeit ist jedoch im Vergleich zu cDCs stark eingeschränkt und auf inflammatorische Signale angewiesen (Tamoutounour et al. 2013). Wie zuvor beschrieben, können moDCs und Makrophagen mit Hilfe der Oberflächenproteine Ly6C und CD64 von CD11b<sup>+</sup> cDCs differenziert werden. Die Diskriminierung zwischen moDCs und Makrophagen kann des Weiteren durch CCR2 und MerTK, eine Rezeptor Protein-Tyrosin Kinase, erfolgen (Tamoutounour et al. 2013; Gautier et al. 2012).

### 2 Zielsetzung der Arbeit

Das Netzwerk der Dendritischen Zellen in der Haut ist sehr komplex. Mindestens fünf verschiedene Subtypen lassen sich durch Expression verschiedener Oberflächenmoleküle unterscheiden. Die Funktion der Subtypen ist aktuell kaum beschrieben. Dendritische Zellen der Haut nehmen kontinuierlich Antigene ihrer Umgebung auf und wandern sowohl unter inflammatorischen Bedingungen, als auch im *steady-state* zu drainierenden Lymphknoten. Hier präsentieren sie die Antigene den T-Lymphozyten. Durch Expression von kostimulatorischen Molekülen und Sekretion von Zytokinen mediierten aktivierte dendritische Zellen die Immunantwort, um eine angemessene adaptive Pathogenabwehr des Körpers zu gewährleisten.

Ziel dieser Arbeit war es, ein Modell zu entwickeln welches die funktionelle Untersuchung dendritischer Zell Subtypen der Haut *in vivo* ermöglicht.

Dabei beschäftigt sich der erste Teil der Arbeit mit der Etablierung der Methodik und der Induktion einer protektiven „*skin homing*“ CD8 T-Zell Antwort. Dabei lag ein Schwerpunkt auf der Zuordnung dieser Funktion zu einzelnen dendritischen Zell Subtypen in der Haut.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche dendritischen Zell Subtypen der Haut gewebespezifische CD8 Memory T Zellen reaktivieren können. Diese Fähigkeit spielt bei Reinfektionen von Pathogenen eine entscheidende Rolle, da die Haut die erste Schutzbarriere für diese darstellt.

Der letzte Teil zielte auf die Etablierung eines transgenen Mausmodells, welches die funktionelle Untersuchung von dendritischen Zellen bei CD4 T-Zell Antworten *in vivo* ermöglicht. Dabei sollte ein Mausmodell entwickelt werden, welches in dendritischen Zellen ein CD4 T Zell spezifisches Peptid induzierbar präsentieren lässt. Dieses Modell bietet für weitere Forschungszwecke die Möglichkeit eine spezifische CD4 T-Zell Antwort und die Interaktion von dendritischen Zellen und CD4 T-Zellen zu untersuchen.

## Material und Methode

---

### 3 Material und Methode

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Plastik- und Glasware

Artikel	Dimensionen	Hersteller	Art. No.
Abdeckplatten (steril)		Greiner	656161
Brand® UV Küvetten		Sigma-Aldrich	7592 10
Cryo´s	2,0 mL	Greiner	122280
Einmal Handschuhe		Sempercare	3780872
Eppendorfgefäß	1,5 mL	Greiner	616 201
	2,0 mL	Greiner	623 201
FACS Röhrchen	5 mL	Sarstedt	55.1579
Kanülen	27G ½“	B.Barun	466 5406
MACS Säule		Miltenyi Biotec	130-042-401
Pasteurpipetten	5 mL	Greiner	606 180
	10 mL	nerbe plus	12-461-9108
	25 mL	Greiner	760 180
PCR Tubes + Deckel	0,2 mL	peqlab	82-0776-A
Petrischalen	100x10 mm	Capitol Scientific	172958
Pipettenspitzen		Eppendorf	
Pipettenspitzen	10 µL	nerbe plus	07-613-7300
(steril + gestopft)	20 µL		07-622-7300
	200 µL		07-662-7300
	1000 µL		07-693-7300
qPCR-Platten	96-Well	Axon	28242
Ultraklare qPCR- Deckelstreifen	8-Well	Axon	28277
Reaktionsgefäße	15 mL	Greiner	188 271
	50 mL	Greiner	227 261
Spritzen	1 mL	B.Braun	9166017V
Spritzenfilter	0,22 µm	Roth	P668.1
Well-Platten	6-Well	Greiner	657 160
	24-Well	Greiner	662 160
	96-Well	Greiner	651 101

## Material und Methode

---

Zellkulturflaschen	175 cm <sup>2</sup>	Greiner	661 175
	75 cm <sup>2</sup>	Greiner	658 175

### 3.1.2 Geräte und Hilfsmittel

Artikel	Hersteller	Typ
Analysewaage	Mettler	AE100
Durchflusszytometer	Becton Dickinson	FACSCanto LSR II
Einfrierbox	Nalge Nunc International	Nalgene® Cryo 1 °C „Mr. Frosty“ Freezing Container
Feinwaage	Sartorius	LP2200P
Geldokumentation	Bio-Rad	Gel Doc XR System
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad	
Homogenisator	neo-Lab	Wheaton-Gewebe Handhomogenisator
Inkubator	Sanyo	CO <sub>2</sub> Incubator
Kurzhaarschneider	Aesculap®	GT420 Isis
Laborrührwerk	VWR	VOS 16
Lichtmikroskop (Z)	Olympus	CKX31
Mehrkanal-Pipetten	eppendorf	
PCR-Cycler	peqLab	peqStar
pH Meter	WTW	pH 537
Photometer	Eppendorf	Biophotometer 6131
Pipetten	Eppendorf	1 µL – 1000 µL
Pipettierhilfe	Integra Biosciences	
Plattformschüttler	Heidolph	Titramax 100
qPCT Cycler	Bio-Rad	MyiQ
Rasierer	Braun	190s-1
Spannungsquelle	amersham pharmacia Biotech	EPS 3501 XL
Sterilbank	Thermo	MSC-Advantage
Thermoschüttler	peqlab	TS-100



## Material und Methode

---

Tischzentrifuge	eppendorf	Centrifuge 5415 D
Ultraschall-Homogenisator	Hielscher	VialTweeter
Vortexer	Bender&Hobein AG	Vortex Genie 2
Zählkammer	Assistant	Neubauer-Zählkammer Improved
Zellseparationssystem	Miltenyi Biotec	MACS Magnet
Zentrifuge	Thermo Scientific	Heraeus Multifuge 3L-R
	Thermo Scientific	Heraeus Multifuge 3L

### 3.1.3 Chemikalien

Artikel	Hersteller	Art. No.
4-Hydroxytamoxifen ( $\geq 70\%$ Z Isomer)	Sigma-Aldrich	H6278-10MG
Aceton	Aceton	KK40.1
Agarose	AppliChem	A2114
Ammoniumchlorid ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )	Roth	K298.2
BORGAL Lösung 24%	Virbac	19400456
Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ )	Roth	CN93
Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)	Sigma	21888
Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)	Roth	X984.2
Dibuthylphtalath	Sigma Aldrich	D2270
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth	A994.1
Diphtherie Toxin	Merck Millipore	322326
dNTPs (100 mM)	Thermo Scientific	R0182
Essigsäure	Sigma-Adrich	6755.2
Ethanol (EtOH) 96%	Roth	T171.4
Ethidiumbromid	Roth	7870.2
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth	8040.2
EvaGreen <sup>®</sup>	Axon	27490
Forene (Isofluran)	Abott	B506
Formaldehyd 37%	Roth	4979.1

## Material und Methode

---

Hepes	Roth	9105.3
Isopropanol	Roth	AE73.1
Kaliumchlorid (KCl)	Roth	6781.1
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO <sub>3</sub> )	Merck	4854
Ketamin	ratiopharm	7538837
Kristallviolett	Roth	123.1
Maisöl	Sigma-Aldrich	C8267
Magnesiumchlorid (25 mM)	Promega	A351H
Natrium-Azid (Na-Azid)	Roth	K305.1
Natrium-Dihydrogen-Phosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth	2370.1
Natriumchlorid (NaCl)	Roth	9265.2
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma	221465
Nonidet P-40	Sigma	NP40S
Optiprep	Sigma	D1556
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl)	Roth	9090.3
Trypanblau	Sigma-Aldrich	T6146
Tween-20	Roth	9127.2
Xylazin	Bayer	1320422
Xylene Cyanole FF	Sigma	X-2751

### 3.1.4 Weitere Substanzen

<b>Artikel</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Art. No.</b>
dNTP Mix (10 mM each)	Life Technolgies	R0193
Oligo (dT) Primer (50 µM)	ThermoFisher	AM5730G
Random Hexamer Primer (N6)	ThermoFisher	SO142

## Material und Methode

---

### 3.1.5 Puffer

Alle Puffer wurden in VE-Wasser angesetzt, sterilfiltriert (0,2 µm Sterilfilter) und bei 4 °C gelagert.

Bezeichnung	Zusammensetzung
ACK-Puffer	0,1 mM EDTA 150 mM NH <sub>4</sub> Cl 1 mM KHCO <sub>3</sub> (pH 7,3)
Transformations Puffer 1	30 mM Kaliumacetat 50 mM MnCl <sub>2</sub> 100 mM KCl 10 mM CaCl <sub>2</sub> pH 5,8 (mit Essigsäure eingestellt)
DNA-Blau-Lösung	500 mg Xylene Cyanole FF in 1 L H <sub>2</sub> O
Elutions Puffer (Protein G)	0.1 M Glycin, pH 2.7
FACS Puffer	PBS 1 % BSA 20 mM EDTA 0,02 % Na-Azid
Gey's Lyse Puffer	8,29 g NH <sub>4</sub> Cl 1 g KHCO <sub>3</sub> 0,037 g EDTA in 1 L H <sub>2</sub> O pH 7.3

## Material und Methode

---

Kristallviolett-Färbelösung	5 g Kristallviolett 50 mL 37% Formaldehyd 8 g NaCl 450 mL ddH <sub>2</sub> O 500 mL EtOH 96%
Neutralisationspuffer (Protein G)	1 M Tris, pH 9.0
MACS Puffer	PBS 0,5% BSA 5 mM EDTA
10x PBS	1,4 M NaCl 0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O pH 7,2
Proteinase K Aktivierungspuffer	3 mM CaCl 10 mM Tris 50 mM Kaliumchlorid; pH 8
SDQ-Puffer	50 mM KCl 10 mM Tris-HCl, pH 9,0 0,45% Nonidet P-40 0,45% Tween-20 0,1 mg/mL Proteinase K
Permeabilisierungspuffer	HBSS 2mM EDTA 0,5% BSA 0,1% Saponin
50x TAE-Puffer	2 M Tris-HCl 1 M Essigsäure 50 mM EDTA

## Material und Methode

---

Transformations Puffer 1	30 mM Kaliumacetat 50 mM MnCl <sub>2</sub> 100 mM KCl 10 mM CaCl <sub>2</sub> pH 5,8 (mit Essigsäure eingestellt)
Transformationspuffer 2	10 mM Mops 75 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM KCl 15% Glycerin pH 7 (mit KOH eingestellt)
Trypanblau Lösung	0,05 % (w/v) Trypanblau 140 mM NaCl 10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

### 3.1.6 Medien

Artikel	Hersteller	Art. No.
DMEM	Sigma-Aldrich	D5671
Dulbecco's Modified Eagle Medium		
HBSS	Sigma-Aldrich	55037C
(Hanks' Balanced Salt Solution)		
IMDM	Sigma-Aldrich	I3390
Iscove's Modified Dulbecco's Medium		
RPMI-1640	Sigma-Aldrich	R0883
Roswell Park Memorial Institute		

## Material und Methode

---

### 3.1.7 Medienzusätze

Bezeichnung	Hersteller	Art. No.
Bovines Serum Albumin (BSA)	PAA	K45-001
Fetales Bovines Serum (FBS)	Gibco	10270
L-Glutamin	Sigma-Aldrich	G7513- 100ML
Natriumpyruvat (100 mM)	Gibco	11360
Penicillin / Streptomycin	Sigma-Aldrich	P4333

### 3.1.8 Medien für Zellkulturen

Bezeichnung	Zusammensetzung
DMEM 10%	10% FCS 1% Na-Pyruvat 1% L-Glutamin 1% Penicillin / Streptomycin
RPMI-1640 10%	10% FCS 1% Na-Pyruvat 1% L-Glutamin 1% Penicillin / Streptomycin
Gefriermedium	90% FCS 10% DMSO
LB Medium	Hefeextrakt 5 g/L Trypton 10 g/L NaCl 0.5 – 10 g/L Glukose 1 g/L, pH 7.0
BMDC Medium	DMEM 10% 20 ng/ml GM-CFS bzw. 1-2% Kulturüberstand von X-6310 Zellen

## Material und Methode

---

### 3.1.9 Enzyme

Artikel	Hersteller	Art. No.
Collagenase IV	Worthington	CLSS-4
Collagenase A	Roche	010103586001
DNase I	Sigma-Aldrich	DN25-100MG
Dispase II	Sigma-Aldrich	04942078001
Go Taq <sup>®</sup> Polymerase	Promega	M7806
Proteinase K (aus <i>Tritirachium album</i> )	Serva	33752
RevertAid Reverse Transcriptase (200 U/ $\mu$ L)	Life Technologies	EP0441
10X Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich	T4174

### 3.1.10 Kits

Artikel	Hersteller	Art. No.
CD8 T Cell Isolation Kit, mouse	Miltenyi Biotec	130-104-075
CD4 T Cell Isolation Kit, mouse	Miltenyi Biotec	130-104-454
Go Taq G2 Flexi	Promega	M7806
NucleoSpin <sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel	740609.250
QuickChange II Site-Directed Mutagenesis	Agilent Technologies	200523
PureLink HiPure Plasmid Mini- und Maxiprep	Invitrogen	K2100-03 / K2100-07
5x Hot Start Taq EvaGreen <sup>®</sup> qPCR Mix	Axon	27490
Lysing Matrix D	MP Biomedicals	116913100

## Material und Methode

---

### 3.1.11 Oligonukleotide / Primer

Oligonucleotide für PCR und qPCR wurden mit Hilfe der Software Geneious konstruiert und bei der Firma Sigma-Aldrich in Konzentrationen von 100 mM synthetisiert und bezogen. Die Primer wurden zu 10 µL aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

<b>qPCR</b>	<b>Sequenz</b>
Vaccinia	F: 5' AGACCTATTCCCCCTGCCAT 3' R: 5' ATGCGGGAAGTAGTCGTCAC 3'
IFITM3	F: 5' ATGTGGTCTGGTCCCTGTTC 3' R: 5' CACCCACCATCTTCCGATCC 3'
mHGPRT	F: 5' GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG 3' R: 5' GAGGGTAGGCTGGCCTATAGGCT 3'

<b>Genotypisierung</b>	<b>Sequenz 5' - 3'</b>
Cre fwd	F: GGACATGTTCAGGGATCGCCAGGCG R: GCATAACCAGTGAAACAGCATTGCTG
ST33	F: CCTCACATCATTGATGAGG R: CACGCGGGCGTACATGG
LangDTR	WT F: GAATGACAGATCTGGCCTGAGCTCG Common R: GTAGCTTTTATATGGTCAGCCAAGG Mut F: TTCCAGCAGCTAGCCCTCTCCGAA
Batf3 <sup>-/-</sup>	Common F: TGCTATGCACAAACCACAAACC Mut R: GATACAGGCTGCTGATCTGAG WT R: GTTGTGAGTCGAAACCACGC
li.OVA	F: TGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCC R: CCAGACCTCGTGAGCAGATG
Rosa26-RFP	Mut F: AAGACCGCGAAGAGTTTGTGTC Common F: AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT WT R: GGAGCGGGAGAAATGGATATG



## Material und Methode

---

### Site-Directed

### Sequenz

### Mutagenesis

Oligonucleotid 1 5' GATCCTAAGCTTGATGG**T**ATTCGCCACCATGGATG 3'

Oligonucleotid 2 5' CTAGGATTCGAACTACC**A**TAAGCGGTGGTACCTAC 3'

### 3.1.12 Antikörper

#### 3.1.12.1 Antikörper für Durchflusssytometrie

Die Antikörper, welche für die Durchflusssytometrie genutzt wurden, sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst. Des Weiteren wurde der Fc-Block (CD16/32; Klon 2.4G2; 1:100; Rat) verwendet.

Spezifität	Fluorochrom	Klon	Verdünnung	Isotyp	Firma
mBcl-6	PE	BCL- DWN	1:100	Ratte IgG2a	eBioscience
mCD3	PerCP-Cy5.5	17A2	1:500	Ratte IgG2b	BioLegend
mCD4	APC PE PE-Cy7 Pacific Blue	GK1.5	1:1000	Ratte IgG2b	BioLegend
mCD8	APC PE PE-Cy7 BV510	53-6.7	1:500	Ratte IgG2a	BioLegend
mCD11c	APC PE-Cy7 BV510	N418	1:500	Ratte IgG2a	BioLegend

## Material und Methode

---

mCD11b	BV711	M1/70	1:500	Ratte IgG2b	BioLegend
mCD19	PE-Cy5	6D5	1:500	Ratte IgG2a	BioLegend
mCD24	FITC PE	M1/69	1:1000	Ratte IgG2b	BioLegend
mCD44	APC PE-Cy7	IM7	1:400	Ratte IgG2b	BioLegend
mCD45.1	APC PE-Cy7 Pacific Blue BV510 BV711	A20	1:500	Mouse IgG2a	BioLegend
mCD45.2	APC Pacific Blue	104	1:500	Maus IgG2a	BioLegend
mCD45R/B220	APC PE-Cy5	RA3-6B2	1:500	IgG2a	BioLegend
mCD62L	FITC PE	MEL-14	1:400	Ratte IgG2a	BioLegend
mCD64	PE	X54-5/7.1	1:500	Maus IgG1	BioLegend
mCD69	APC BV605	H1.2F3	1:400	Ham IgG	BioLegend
mCD90.2	APC	53-2.1	1:2000	IgG2a	BD

## Material und Methode

---

mCD103	PE BV421	M290	1:1000	Ratte IgG2a	BD
mCD127/IL-7R	PE BV605	A7R34	1:300	Ratte IgG2a	BioLegend
mCD185/CXCR 5	APC	SPRCL5	1:100	Ratte IgG2a	eBioscience
mCD207/ Langerin	Alexa-647	929F3.01	1:200	Ratte IgG2a	Dendritics
CD326/EpCAM	APC APC-Cy7	G8.8	1:1000	Ratte IgG2a	BioLegend
m/rCCR2	APC	L1.2 Maus pro- B Zelle Linie	1:200	Ratte IgG2b	R&D Systems
mF4/80	APC	BM8	1:500	Ratte IgG2a	BioLegend
INF- $\gamma$	FITC	XMG1.2	1:400	Ratte IgG1	Eigen- produkt
mLy-C6	BV605	AL-21	1:500	Ratte IgM	BD
mMHC II	Pacific Blue	M5/114.1 5.2	1:1000 oder 1:5000	Ratte IgG2b	BioLegend

## Material und Methode

---

mNK1.1	PE PE-Cy5	PK136	1:500	Maus IgG2a	BioLegend
Lebend/Tot	eFluor780		1:1000		eBioscience
Rek. Maus P- Selectin/CD62P Fc Chimera Protein			1:500		R&D Systems
Rek Maus E- Selectin/CD62E Fc Chimera Protein			1:500		R&D Systems
Va2	PE	B20.1	1:1000	Ratte IgG2a	BioLegend
Humanes IgG Fc	FITC		1:500	Goat, Polykl noal	Acris

### 3.1.12.2 Antikörper / Beads zur Aufreinigung muriner Zellpopulationen

Spezifität	Makierung	Klon	Verd.	Isotyp	Firma
mCD4	PE	GK1.5	1:500	Ratte IgG2b	BioLegend
mCD8a	Micro Beads	Ly-2	1:40	Ratte IgG2a	Miltenyi Biotec
mCD11c	PE	N418	1:500	Ratte IgG2a	BioLegend
Anti-PE	Micro Beads		1:20		Stem Cell

## Material und Methode

---

### 3.1.13 Zelllinien

**BSC-40** Nierenzellen aus der grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*). Die in DMEM 10% kultiviert wurden [ATCC® CRL-2761™].

### 3.1.14 Virus

*Vaccinia* Virus  
-G2 (VV G2)  
-OVA  
Rekombinantes *Vaccinia* Virus, welcher das Ovalbumin des Hühnereis (OVA) bzw. das G2 Glycoprotein von LCMV (G2) exprimiert. Der Virus wurde von HC Probst zur Verfügung gestellt und auf BSC-40 Zellen produziert.

### 3.1.15 Mausstämme

Alle verwendeten Mausstämme wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen gezüchtet und gehalten.

#### 3.1.15.1 C57BL/6J (Wildtyp-Stamm)

Die Wildtyp Mäuse wurden von Janvier Labs bezogen. Der genetische Hintergrund, aller verwendeter Mäuse war C57BL/6J, mit dem MHC-Haplotyp H-2<sup>b</sup>.

#### 3.1.15.2 C57BL/6J, Ly5.1 (B6.SJL-Ptprc<sup>a</sup> Pepc<sup>b</sup>/BoyJ)

Mäuse mit genetischem C57BL/6J Hintergrund. Der Stamm besitzt eine Punktmutation im CD45 Gen das als kongener Marker in Knochenmarkchimären oder adoptiven Transplantationsexperimenten dient.

## Material und Methode

---

### **3.1.15.3 CD11cCreER<sub>T</sub> x ST33 (DIETER I)-Mäuse**

Mäuse mit einem C57BL/6J Hintergrund. Diese Mäuse besitzen zwei Transgene, CD11cCreER<sub>T</sub> und ST33. Nach systemischer Tamoxifen Applikation exprimieren ca. 5% aller dendritischer Zellen drei LCMV CTL-Epitope (GP<sub>33-41</sub>/Db, GP<sub>34-41</sub>/Kb und NP<sub>396-404</sub>/Db) und ein CTL-Epitop der  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -gal<sub>497-504</sub>/Kb) (Probst et al. 2003)

### **3.1.15.4 Nur77<sup>GFP</sup> (C57BL/6-Tg(Nr4a1-EGFP/cre)820Khog/J)**

Diese BAC transgenen Mäuse besitzen einen C57BL/6 Hintergrund und exprimieren Grün fluoreszierendes Protein (GFP) unter dem Nr4a1 (Nur77) Promoter/Enhancer. Nach Aktivierung des T- und B-Zell Rezeptors durch Antigenbindung wird die Expression von GFP verstärkt, wobei das GFP Expressionslevel mit der Bindungsstärke des Antigenrezeptors korreliert. (Moran et al. 2011)

### **3.1.15.5 P14 (B6;D2-Tg(TcrLCMV)327Sdz/JDvsJ)**

P14 transgene Mäuse wurden durch die Nutzung der vom CTL Klon P14 isolierten  $\alpha$ - und  $\beta$ - Kette generiert. Dieser transgene T-Zell-Rezeptor erkennt das Epitop 33-41 aus dem Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV) Glycoprotein (GP<sub>33-41</sub>) im Kontext von MHC-Klasse I H-2D<sup>b</sup> (Ohashi et al. 1991; Pircher et al. 1989).

### **3.1.15.6 LangDTREGFP (B6.129S2-CD207<sup>tm3(DTR/GFP)Mal</sup>/J)**

Diese Mäuse exprimieren den humanen Diphtherie Toxin Rezeptor unter dem Langerin Promotor. Durch Injektion von Diphtherie Toxin kommt es zur Depletion aller Langerin positiven Zellen (Kissenpfennig et al. 2005; Henri et al. 2010). Die Mäuse wurden für mindestens 12 Generation auf den C57BL/6 Hintergrund gekreuzt.

## Material und Methode

---

### **3.1.15.7 *Batf3*<sup>-/-</sup> (B6.129S(C)-*Batf3*<sup>tm1Kmm</sup>/J)**

Exon 1 und 2 des Transkriptionsfaktors BATF3 (basic leucine zipper transcription factors, ATF-like3) mutiert, sodass BAFT3 nicht exprimiert wird. (Hildner et al. 2008) Diese Mäuse entwickeln keine CD207<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> dendritischen Zellen in der Haut (Tussiwand et al. 2012; Edelson et al. 2010). Ursprünglicher genetischer Hintergrund ist 129SvEv. Diese Mäuse wurden über mindestens 12 Generationen auf C57BL/6 zurück gekreuzt.

### **3.1.15.8 *OT-II* (B6.Cg-*Tg(TcraTcrb)*425Cbn/J)**

Auf dem C57BL/6 Hintergrund exprimieren alle CD4 T-Zellen dieser Mäuse die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette des T-Zell-Rezeptors, der spezifisch die Peptidsequenz 323-339 des Hühner Ovalbumin gebunden an MHC-Klasse-II (I-Ab) erkennt (Barnden et al. 1998).

### **3.1.15.9 *Cre-Deleter* (B6.C-*Tg(CMV-cre)*1Cgn/J)**

In diesem Mausstamm auf dem C57BL/6 Hintergrund ist die Cre-Rekombinase in allen Geweben aktiv und liegt X-chromosomal. LoxP flankierte Sequenzen werden schon während der Entwicklung depletiert (Schwenk et al. 1995).

### **3.1.15.10 *Rosa26-RFP* (B6;129S6-*Gt(ROSA)26Sor*<sup>tm14(CAG-tdTomato)Hze</sup>/J)**

Diese Mäuse besitzen das Reporterogen Red Fluorescence Protein (RFP) im Rosa26 Locus mit einer loxP flankierten STOP Sequenz davor. Dadurch exprimieren Zellen in denen die Cre-Rekombinase aktiv ist dieses Reporterogen. Die Mäuse besitzen den C57BL/6 Hintergrund (Luche et al. 2007).

## **Material und Methode**

---

### **3.2 Methode**

#### **3.2.1 Zellbiologische Methoden**

##### **3.2.1.1 Zellkultur**

Alle Arbeiten mit Zellen wurden an einer sterilen Werkbank durchgeführt und im Inkubator (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% Luftfeuchtigkeit) kultiviert.

##### **3.2.1.2 Auftauen von BSC-40 Zellen**

Die bei -196 °C in Stickstoff gelagerten und in Gefriermedium eingefrorenen BSC-40 Zellen wurden bei 4 °C vorsichtig aufgetaut. Sobald die Zellen im 2 mL Cryo-Röhrchen aufgetaut waren wurden die Zellen mit einer Pipette in ein 50 mL Falcon überführt in welchem sich 10 mL auf 37 °C vorgewärmtes DMEM 10% befanden. Die Zellen wurden in einem Waschschrift bei 400 rcf, 5 min bei 4 °C zentrifugiert um sie vom zytotoxischen DMSO zu befreien. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 2 mL DMEM 10% aufgenommen. Eine Hälfte der Zellsuspension wurde in einer 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche ausgesät in die bereits 20 mL DMEM 10% vorgelegt wurden. Der zweite Milliliter wurde zu 4 mL Medium in eine Vertiefung einer 6-Well-Platte gegeben resuspendiert, 1 mL dieser Zellsuspension in das zweite Well der Platte überführt. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis in allen 6 Wells eine Verdünnungsreihe entstand. Sowohl die Zellkulturflasche als auch die 6-Well-Platte wurde unter Zellkulturbedingungen kultiviert.

##### **3.2.1.3 Kultivieren von BSC-40 Zellen**

Die konfluenten BSC-40 Zellen wurden durch Absaugen von DMEM 10% entfernt und mit 25 mL PBS gewaschen um die adhärenen, lebenden Zellen von allen nicht adhärenen, toten Zellen zu befreien. Zu den Zellen wurde 10 mL Trypsin-EDTA-Lösung gegeben und solange im Inkubator bei 37 °C gelagert, bis sich alle Zellen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst hatten (10 - 20 min). Nach Ablösen der Zellen wurde 20 mL DMEM 10% hinzugefügt um das Trypsin zu inhibieren und die Zellsuspension in einen 50 mL Falcon überführt und für 5 min, 400 rcf und 4 °C



## **Material und Methode**

---

zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt und verworfen. Nach einem weiteren Waschschrift wurde das Zellpellet mit DMEM 10% auf die gewünschte Zellzahl eingestellt und 1 mL der Lösung in eine oder mehrere neue Zellkulturflaschen überführt die bereits 25 mL DMEM 10% enthielten.

### **3.2.1.4 Einfrieren von Zellen**

Subkonfluente BSC-40-Zellen einer 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche wurden mit 10 mL Trypsin-EDTA-Lösung vom Gefäßboden gelöst, das Trypsin mit 20 mL DMEM 10% inaktiviert, und die Zellsuspension bei 400 rcf für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen, das Zellpellet in 5-7 mL Gefriermedium aufgenommen und je 1 mL wurde in ein 2 mL Cryo-Röhrchen überführt und die gefüllten Gefäße in einen auf 4 °C gekühlten Nalgene® Cryo 1 °C “Mr. Frosty” Freezing Container, mit einer Kühlrate von 1 °C/min gestellt und bei -80 °C gelagert. Am folgenden Tag wurden die Zellen für eine dauerhafte Lagerung in flüssigem Stickstoff weggefroren.

### **3.2.1.5 Bestimmung der Lebendzellzahl**

Zur Bestimmung der lebenden Zellen einer Zellsuspension wurde ein Aliquot dieser Suspension entnommen und mit Trypanblau-Lösung verdünnt. 10 µL der Verdünnung wurde auf eine Neubauer Zählkammer pipettiert und ausschließlich die farblosen, lebenden Zellen in einem oder mehr Quadraten der Zählkammer ausgezählt. Durch Multiplikation der lebenden gezählten Zellen pro Quadrat (N), dem Verdünnungsfaktor (V) und dem Kammerfaktor wurde die Lebendzellzahl je Milliliter ermittelt.

$$\text{gezählte Zellen (N)} \times \text{Verdünnungsfaktor (V)} \times \text{Kammerfaktor} = \text{Zellzahl/mL}$$

## **Material und Methode**

---

### **3.2.1.6 Herstellen von Bone Marrow Derived DCs (BMDCs)**

Alle Arbeiten wurden steril durchgeführt. Die Mäuse, aus denen BMDCs generiert werden sollten, wurden mit CO<sub>2</sub> getötet und die Hinterbeine entfernt. Femur und Tibia wurden von Haut und Muskelgewebe befreit, mit 70%-igem EtOH desinfiziert und in PBS gelagert. Beide Enden eines Röhrenknochens wurden mit einer Schere aufgeschnitten und das Knochenmark mit PBS + 1% FCS über eine 24G 1“ Kanüle herausgespült. Das Knochenmark wurde resuspendiert und über einen 70 µm Zellsieb in ein 50 mL Falcon überführt. Nach Zentrifugation bei 300 rcf und 4 °C für 5 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 1 mL/Maus Gey's Lysepuffer bei Raumtemperatur für 3-5 min lysiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 10 mL PBS gestoppt und die Zellen gezählt. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen auf 3\*10<sup>6</sup>/mL in BMDC Medium eingestellt. In eine nicht adhärenente 6-Well Platte wurden 3 mL BMDC Medium vorgelegt, in die je Well 1 mL der Zellsuspension gegeben wurden.

Nach 2 Tagen wurde die Platte vorsichtig geschwenkt, bis sich nicht adhärenente Zellen lösten. Anschließend wurden 3 mL Medium abgenommen und 3 mL frisches BMDC Medium zugegeben. Nach 2 weiteren Tagen wurden ohne Schwenken vorsichtig 3 mL Medium abgenommen und die Wells mit 3 mL frischem BMDC Medium wieder aufgefüllt.

An Tag 6-7 wurde im Mikroskop überprüft, ob Fortsätze (Dendriten) bei den Zellen vorhanden waren. Weiterhin wurden Zellen von einem Well entnommen und im Durchflusszytometer die Reinheit über MHC II und CD11c Expression überprüft.

Zum weiteren Passagieren wurden die Zellen vorsichtig entnommen, gezählt und für 5 min bei 300 rcf und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde auf 10<sup>6</sup> Zellen/mL eingestellt und 4 mL pro Well in eine neue 6-Well Platte verteilt.

### **3.2.1.7 Nur77 *in vitro* Aktivitätsassay**

Nur77<sup>GFP</sup> transgene OT-II oder P14 Zellen wurden mittels MACS aus Milzen isoliert. BMDCs oder über Optiprep-Gradienten isolierte DCs wurden auf 1,5\*10<sup>5</sup> Zellen/150 µL in DMEM 10% eingestellt. Für einige Experimente wurde den BMDCs 24–48 Stunden zuvor 2 µg 4OH-Tamoxifen in 5 mL Medium zugesetzt.

## Material und Methode

---

In die ersten Wells einer 96-Well Platte (Rundboden) wurden 150 µL DC Zellsuspension pipettiert. In die weiteren Vertiefungen 2 bis 11 der genutzten Spalten wurden 100 µL DMEM 10% vorgelegt. Anschließend wurden die DCs so verdünnt, dass eine Verdünnungsreihe entstand (1:1, 1:3, 1:9, usw.). Zu den DCs bzw. BMDCs wurden pro Well  $10^5$ , in manchen Versuchen  $5 \cdot 10^3$  Nur77<sup>GFP</sup> transgene OT-II oder P14 Zellen in 50 µL pipettiert. Negativ Kontrollen wurden mit weiteren 50 µL DMEM 10% aufgefüllt, positiv Kontrollen mit einer finalen Konzentration von 10 µM OVA<sub>323-339</sub> Peptid (OT-II) bzw. GP<sub>33-41</sub> Peptid (P14). Die Zellen wurden über Nacht unter Zellkulturbedingungen inkubiert und am nächsten Morgen im Durchflusszytometer die GFP Expression der T-Zellen analysiert.

### 3.2.2 Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.2.1 Verdau von Gewebe für PCR und qPCR

Für die Genotypisierung der Mauszüchten wurde den Tieren 2–3 mm der Schwanzspitze mit einer Schere entfernt. Die Biopsie wurde in 500 µL SDQ-Puffer mit 100 µg/mL Proteinase K aufgenommen. Die Haut für die Quantifizierung von Virus via qPCR wurde direkt nach der Entnahme in 500 µL Proteinase K aufgenommen. Die Proben wurden bei 65 °C für circa 2 Stunden oder bei 56 °C ÜN auf dem Thermoschüttler bei 900 rpm vollständig verdaut. Anschließend wurde die Proteinase K bei 95 °C für 20 min inaktiviert. Die Proben für die Genotypisierung wurden zusätzlich mit 500 µL DNA-Blau-Lösung versehen. Unverdauliche Bestandteile der Probe, wie Haare wurden durch eine Zentrifugation von 1 min bei 13.500 rpm auf dem Gefäßboden sedimentiert.

0,6 µL je Probe wurden für die PCR verwendet. Die qPCR-Proben wurden bei 4 °C gelagert oder direkt verwendet. Dazu wurde 1 µL je Probe für die qPCR entnommen. Von jeder Probe wurden Triplikate verwendet. Die Viruslast wurde anhand einer ermittelten Standardgerade berechnet.

Für die IFITM3 qPCR wurden Gewebestücke aus den Ohren herausgeschnitten und in 1 mL Trizol®-Reagents in einem Lysing Matrix D Gefäß gegeben. Anschließend wurden die Proben in der FastPrep®-24 für 30 Sekunden 4 mal auf Stufe 6 aufgeschlossen und zwischen den Schritten für 5 min auf Eis gelagert. Die Proben

## Material und Methode

---

wurden bei 16.100 rcf für 10 min zentrifugiert und 600 µL Überstand abgenommen und in ein neues 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurden je Probe 120 µL Chloroform zugegeben und die Proben für 10 Sekunden gevortext. Die Proben wurden für 15 min bei 10.400 rcf und 4°C zentrifugiert und 240 µL der wässrigen Phase abgenommen und in ein neues 1,5 mL Eppendorfgefäß pipettiert. Zu jeder Probe wurden 1,5 µL Glycogen zugegeben und nach Invertieren 400 µL Isopropanol zugegeben. Nach erneutem Invertieren wurden die Proben für 10 min bei 10.500 rcf bei 4°C zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Die Pellets wurden mit eiskaltem 75%-igem Ethanol zweimal bei 9.500 rpm gewaschen und an der Luft trocknen gelassen. Schließlich wurden die Pellets in 20 µL RNase freiem Wasser für 5 min bei 55°C gelöst und die Konzentration der RNA photometrisch bestimmt.

### 3.2.2.2 Reverse Transkription

Um die mRNA in cDNA umzuschreiben wurde wie folgt verfahren:

Komponente	Volumen	Finale Konzentration
5x RT Puffer	4 µL	1x
dNTP	2 µL	Je 1 mM
Oligo dT-Primer	1 µL	100 pmol
Random Hexamer Primer	1 µL	100 pmol
Reverse Transkriptase	1 µL	200 U
mRNA	X µL	1 µg
DEPC H <sub>2</sub> O	Auf 20 µL auffüllen	

Die Reaktionsgefäße wurden für 60 min bei 42°C im Wasserbad inkubiert und anschließend 80 µL ddH<sub>2</sub>O hinzu gegeben. Für die qPCR wurden 8 µL je Triplet verwendet.

## Material und Methode

---

### 3.2.2.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Zur Genotypisierung von Mäusen und zur Herstellung von größeren Mengen DNA Templates für eine Standardgerade der qPCR wurde das Go Taq G2 Flexi-Kit (Promega) verwendet. Für eine Reaktion wurden 0,6 µL DNA Template verwendet. Je nach Transgen oder Knock-out wurden verschiedene PCR Programme benutzt (s.u.). Mittels Agarosegelelektrophorese wurden die PCR Produkte analysiert.

Komponente	Volumen	Finale Konzentration
5x Green GoTaq Flexi		
Puffer	2 µL	1x
MgCl <sub>2</sub> Lösung (25 mM)	1.2 µL	1.5 mM
PCR Nucleotid Mix (10 mM je Nucleotid)	0.4 µL je 0.1 µL	0.2 mM pro Nucleotid 0,5 µM je Primer
Primer (je 100 µM)		
GoTaq DNA Polymerase (5 U/µL)	0.1 µL	1.25 U
DNA Template	0.6 µL	
Nuclease freies Wasser	bis 20 µL auffüllen	

Transgen	Primer	PCR Programm	Amplifikate
CD11cCreER <sub>T</sub>	Cre fwd	94 °C 30 Sek	Transgen: 350 bp
	Cre rev	60 °C 30 Sek	WT: keins
		72 °C 30 Sek	
		35x	
		72 °C 5 min	

## Material und Methode

---

ST33	ST33 fwd	94 °C 30 Sek	Transgen: 250 bp
	ST33 rev	60 °C 30 Sek	WT: keins
		72 °C 30 Sek	
		35x	
		72 °C 5 min	
LangDTR	Lang 1	94 °C 30 Sek	Transgen: 866 bp
	Lang 2	60 °C 60 Sek	WT: 329bp
	Dtox4	72 °C 120 Sek	
		35x	
		72 °C 5 min	
Batf3 <sup>-/-</sup>	Batf3 <sup>-/-</sup> fwd	94 °C 30 Sek	Transgen: 600 bp
	Batf3 <sup>-/-</sup> rev	59 °C 60 Sek	WT: 288bp
	WT rev	72 °C 60 Sek	
		35x	
		72 °C 5 min	
li.OVA	li.OVA fwd	94 °C 30 Sek	Transgen: 573 bp
	li.OVA rev	59 °C 30 Sek	WT: keins
		72 °C 30 Sek	
		35x	
		72 °C 5 min	
Rosa.RFP	Rosa mut	94 °C 30 Sek	Transgen: 320 bp
	Rosa common	58 °C 60 Sek	WT: 600 bp
	WT rev	72 °C 60 Sek	
		35x	
		72 °C 5 min	

## Material und Methode

---

### 3.2.2.4 DNA Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese diente zur Auftrennung von DNA Fragmenten nach ihrer Größe und anhand dieser zur Spezifizierung der Fragmente.

Hierzu wurde 1-2% (w/v) Agarose in TAE Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und mit 1 µg/mL Ethidiumbromid versetzt, kurz geschwenkt und in eine Gelkammer gegossen, welche bereits mit den nötigen Kämmen für die Ladetaschen versehen war. Nach 20 min erstarrte das Gel und die Kämmen wurden entfernt. Die Gelkammer wurde in die mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Wanne gelegt und darauf geachtet, dass das Gel mit TAE-Puffer vollständig bedeckt war. Anschließend wurden die Taschen mit 17 µL der zu untersuchenden PCR-Proben beladen. Manche DNA Agarosegelelektrophoresen wurden in Gegenwart von DNA Größenstandards durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden bei einer Spannung von 180 V und 20 min aufgetrennt. Im Anschluss wurde ein Bild des Geles mit *Gel Doc<sup>TM</sup> XR+ System* (Bio-Rad) aufgenommen.

### 3.2.2.5 Quantitative real-time-PCR (qPCR)

Die Technik der qPCR basiert auf dem Prinzip der PCR, wobei neben der Amplifikation des zu untersuchenden DNA-Fragmentes auch eine Quantifizierung dessen vorgenommen wird. Hinzu kommt, dass bei der qPCR die amplifizierte DNA bereits während des laufenden PCR Programmes detektiert wird.

In dieser Arbeit wurde die Methode der nicht spezifischen Fluoreszenzfärbung, mit EvaGreen<sup>®</sup> als Fluoreszenzfarbstoff verwendet. Dieser Farbstoff fluoresziert sobald dieser durch die Bindung an doppelsträngige DNA aktiviert wird. EvaGreen<sup>®</sup> wird bei  $\lambda_{\max} = 488 \text{ nm}$  angeregt und emittiert grünes Licht ( $\lambda_{\max} = 522 \text{ nm}$ ). Bei der qPCR wird nach jedem durchlaufenen Zyklus die Fluoreszenz gemessen. Die Zyklen wurden mit der Software des *Bio-Rad MyiQ<sup>TM</sup> Real-Time PCR Detection Systems* analysiert und ausgewertet. Anhand einer Standardgeraden wurde die Menge an doppelsträngiger DNA in der Probe bestimmt. Zur Überprüfung der Reinheit der Proben wurden die Schmelzkurven genutzt.

## Material und Methode

---

Für die qPCR wurden je Probe Triplets verwendet um einen Pipettierfehler zu vermeiden. Dafür wurde je Probe folgender Ansatz verwendet:

Komponente	Volumen	Finale Konzentration
Primer	3,2 µL (5 pmol/µL)	0,27 pmol/µL
cDNA	8 µL	
5x EvaGreen	12,8 µL	1x
H2O	40µL	

Anschließend wurden je 20 µL des Ansatzes für jede qPCR Messung bei folgendem Programm verwendet:

<b>qPCR Programm</b>	Denaturierung	95 °C 15 min	50 x
	Denaturierung	95 °C 15 Sekunden	
	Annealling	59 °C 15 Sekunden	
	Elongation	72 °C 15 Sekunden	

**Schmelzkurve**      95 °C – je 5 Sekunden 0,5 °C abnehmend – bis 60 °C

### 3.2.2.6 Klonieren mit DNA

Für die Klonierung des benötigten Fragmentes zur Injektion in fertilisierte C57BL/6 Oozyten wurden FastDigest Enzyme von *lifetechnologies* sowie T4 DNA Ligase von *Promega* verwendet. Die Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit dem *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Gel Kits Gel extraction* (Macherey-Nagel) durchgeführt. Die Herstellung großer Mengen von Plasmiden wurde mit kompetenten TOP10 Bakterien durchgeführt. Die Isolation von Plasmiden aus Bakterien erfolgte mit dem *PureLink® HiPure Filter Plasmid Miniprep oder Maxiprep Kit* von *lifetechnologies*.



## **Material und Methode**

---

### **3.2.2.6.1 Isolation von DNA Fragmenten aus Agarosegelen**

Zur Isolation von DNA Fragmenten aus Agarosegelen wurde das Gel auf einem UV-Lichttisch gelegt. Das Fragment mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt und gewogen. Die Isolation erfolgte nach dem Herstellerprotokoll des *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Gel Kits Gel extraction* (Macherey-Nagel). Hierfür wurde 200 µL der NTI Lösung pro 100 mg Gel (max. 200 mg Gel pro Durchlauf) in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß gegeben und das Gelfragment bei 50 °C auf dem Thermoschüttler bei 900 rpm für 5-10 min vollständig gelöst. Die Lösung wurde auf die Silica Membran der Säule, die in ein 2 mL Eppendorfgefäß gestellt wurde, gegeben und für 30 Sekunden bei 11.000 rcf in einer Tischzentrifuge (Centrifuge 5415 D) zentrifugiert. Die Säule wurde zweimal mit 700 µL NT3 bei 11.000 rcf für 30 Sekunden gewaschen. Anschließend wurde die Säule im Eppendorfgefäß zum Entfernen des Ethanol des NT3 Puffers zuerst für 5 min auf dem Thermoschüttler bei 70 °C inkubiert bevor sie erneut für 1 min bei 11.000 rcf zentrifugiert wurde. Um die DNA von der Säule zu eluieren, wurde die Säule in ein neues 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt und mit 30 µL NE-Puffer bei RT für 1 min inkubiert. Durch einen finalen Zentrifugationsschritt von einer min bei 11.000 rcf wurde die DNA-Lösung in das 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt. Nach Konzentrationsbestimmung der DNA-Lösung wurde diese bei 4 °C gelagert.

### **3.2.2.6.2 Mutationen via PCR einfügen (site directed mutagenesis)**

Für die Mutation einer EcoRI Schnittstelle wurde das QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent technologies) verwendet. Mit diesem Verfahren werden in einer PCR-Reaktion einzelne Nucleotide ausgetauscht und so gezielt Punktmutationen in einer Sequenz hervorgerufen. Dazu müssen Oligonucleotide generiert werden, die eine Länge von 25 bis 45 Basenpaaren aufweisen und zu jeder Seite des zu mutierenden Nukleotides die gleiche Anzahl an Basenpaaren besitzen. Die Primer sind dem Template dabei komplementär bis auf das in der Mitte befindliche zu mutierende Nukleotid. Die Schmelztemperatur der Oligonucleotide sollte dabei höher als 78 °C gewählt werden und wird mit folgender Formel berechnet:

## Material und Methode

---

$$T_m = 81.5 + 0.41(\%GC) - (675/N) - \%mismatch$$

N = Länge der Oligonucleotide, %GC und %mismatch = ganze Zahlen

Die Oligonucleotide sollten einen minimalen GC Gehalt von 40% aufweisen und mit einem G oder C enden.

	5' nach 3'
<b>Oligonucleotid 1</b>	GATCCTAAGCTTGATGGTATTCGCCACCATGGATG
<b>Template</b>	GATCCTAAGCTTGATGG <b>A</b> ATTCGCCACCATGGATG
<b>Oligonucleotid 2</b>	CTAGGATTCGAACTACC <b>A</b> TAAGCGGTGGTACCTAC

Der Reaktionsansatz wurde wie folgt eingesetzt:

<b>Komponente</b>	<b>Volumen/Menge</b>
10x Reaktions-Puffer	5 µL
Template dsDNA	50 ng
Oligonucleotid 1	125 ng
Oligonucleotid 2	125 ng
dNTP Mix	1 µL
<i>PfuUltra</i> HF DNA Polymerase (2.5 U/µL)	1 µL
ddH2O	Bis auf 50 µL auffüllen

Folgendes PCR Programm wurde verwendet:

Denaturierung	95 °C 30 Sekunden	18 x
Denaturierung	95 °C 30 Sekunden	
Annealing	55 °C 60 Sekunden	
Elongation	68 °C 60 Sekunden/kb	
Finale Elongation	68 °C 5 min	

## **Material und Methode**

---

Nach der PCR wurde 1  $\mu\text{L}$  Dpn I Restriktionsenzym zugegeben und für 1 Stunde bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 10  $\mu\text{L}$  des Ansatzes in hitzekompetente TOP10 Zellen transformiert und auf eine antibiotikumhaltige Agarplatte über Nacht ausgestrichen. Von den entstehenden Plaques wurden mindestens 10 zur Durchführung der Plasmid Minipräparationen verwendet. Die aufgereinigten Plasmide wurden über Restriktion mit EcoRI und DNA Sequenzierung überprüft.

### **3.2.2.6.3 Photometrische Bestimmung von DNA Lösungen**

Die Bestimmung der Konzentration von DNA Lösungen wurde mit Hilfe der optischen Dichte durchgeführt. Die DNA Lösung wurde 1:100 mit NE-Puffer (Macherey-Nagel) verdünnt und 100  $\mu\text{L}$  der Verdünnung in eine Plastik UV-Küvette überführt. Die optische Dichte wurde bei 260 nm ( $A_{260}$ ) im Photometer gemessen. Die Reinheit der untersuchten DNA Lösung wurde anhand des  $A_{260}/A_{280}$  Verhältnisses bestimmt, das Ideal liegt bei ca. 1,8.

### **3.2.2.6.4 Herstellen von kompetenten Bakterien**

Der bei –80 °C gelagerte Bakterienstamm TOP10 wurde auf einer LB Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine Kolonie wurde in 5 mL LB Medium mit einer Pipettenspitze überführt und bei 37 °C über Nacht schüttelnd inkubiert. 50  $\mu\text{L}$  wurden am folgenden Tag in frische 5 mL LB Medium überführt und für 2 Stunden bei 37 °C schüttelnd heranwachsen gelassen. Mit dieser Kultur wurden weitere 100 mL LB Medium beimpft, bis der  $OD_{550} = 0.2-0,3$  betrug. Die Kultur wurde sofort auf Eis herunter gekühlt und bei 1.800 g bei 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 20 mL Transformationspuffer 1 resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 900 g bei 4 °C für 5 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 4 mL kaltem Transformationspuffer 2 aufgenommen. Die Bakterien wurden in 200  $\mu\text{L}$  Aliquots sofort in Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert.

## Material und Methode

---

### 3.2.2.6.5 Transformation von Plasmiden in Bakterien

Bakterien und Zellen wurden auf Eis aufgetaut. 50-200 ng Plasmid oder entsprechende Volumina aus PCR Reaktionen wurden zu den TOP10 gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Lösung für 30 Sekunden im Wasserbad bei 42 °C inkubiert und sofort auf Eis gekühlt. Zu den Bakterien wurde 250 µL LB Medium gegeben und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. 80 µL des Ansatzes oder Verdünnungen wurden auf LB Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 3.2.2.6.6 Mini- und Maxipräparation von Plasmiden aus Bakterien

Für die Präparation von Plasmid DNA aus Bakterienkulturen wurden die *PureLink HiPure Pasmid Mini- und Maxiprep Kits* von *Invitrogen* verwendet. Dafür wurden im Falle der Minipräparation Kulturen von 5-10 mL Volumen verwendet während für die Maxipräparation 200 mL verwendet wurden. Alle weiteren Schritte waren bis auf die Dimension identisch und werden nur beispielhaft beschrieben.

Übernacht Kulturen von TOP10 Zellen wurden bei 4.000 rcf für 5-10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 0,4 mL bzw. 10 mL Resuspensions-Puffer (R3) aufgenommen. Dasselbe Volumen Lyse-Puffer (L7) wurde zugefügt und invertiert bis die Suspension homogen war. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden 0,4 mL bzw. 10 mL Präzipitations-Puffer (N3) hinzugegeben und invertiert. Anschließend wurden die Proben auf eine äquilibrierte Filtersäule gegeben und der Durchfluss verworfen. Die Säule wurde zweimal mit Wasch-Puffer (W8) gereinigt bis eine vollständige Elution des Filters zu erkennen war. Im Anschluss wurden 0,9 mL bzw. 15 mL Elutions-Puffer (E4) auf die Säule pipettiert und der Durchfluss in einem Gefäß aufgefangen.

Zu dem Eluat wurden 0,63 mL bzw. 10,5 mL Isopropanol gegeben und bei 13.000 rcf für 30 min bzw. 4.000 rpm für 60 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 900 µL TE Puffer aufgenommen und in ein 2 mL Eppendorf Gefäß überführt. Anschließend wurden 200 µL NaAc (3 M, pH 5.2) zugegeben und invertiert. Weitere 900 µL Isopropanol wurden hinzu pipettiert und nach invertieren für 25 min bei -80 °C inkubiert. Nach Zentrifugation bei 10.400 rcf und 4 °C für 15 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet 2 Mal mit kaltem 70%-igem EtOH gewaschen indem die Probe bei 7.200 rcf und 4 °C für 5 min zentrifugiert wurde. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand verworfen und das Pellet bei offenem

## Material und Methode

---

Gefäß an der Luft getrocknet bis der Rand des Pellets weißlich wurde. Das Pellet wurde in 50 µL bzw. 500 µL TE Puffer (TE) aufgenommen und über Nacht bei 4 °C resuspendiert. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

### 3.2.2.6.7 DNA Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmidabschnitten wurde von der Firma StarSEQ durchgeführt. Dafür wurden entsprechende Primer synthetisiert (Sigma-Aldrich) und zusammen mit 0,5-1 µg aufgereinigter Plasmid DNA zu StarSEQ versendet. Die Sequenzanalysen und Primergenerierung wurden mit dem Programm Geneious durchgeführt.

### 3.2.2.6.8 Klonieren des CD11c.STOP.li.OVA.eGFP Konstrukt

Die murine invariante Kette (li) mit OVA<sub>323-339</sub> substituiert für das CLIP Peptid wurde von Dr. Stephen Thirdborough (Tenovus Research Laboratories, Southampton, UK) (Smith et al. 2006) zur Verfügung gestellt. Mittels synthetisierten Oligonucleotiden (Sigma-Aldrich), wurde über PCR der 3' Terminus des Fragmentes mit einer 2A-like Sequenz verlängert, die eine *Bam*HI Restriktionsschnittstelle besitzt:

(5 CTGTTGAATTTTGACCTTCTTAAGCTTGCGGGAGACGTCGAGTCCAACCCCG GGCCCGTGGATCC 3) (Donnelly et al. 2001). Der 5' Terminus wurde um eine *Xho*I und *Bcu*I Schnittstelle erweitert. Nach Verdau mit FastDigest *Bam*HI und *Xho*I wurde das 735 bp große Fragment in die *multiple cloning site* (MCS) eines pEGFP-N1 Vectors kloniert. Die loxP flankierte STOP Kassette wurde aus dem pβ-actinST33.396 Vector (Probst et al. 2003) mittels Restriktionsverdau mit FastDigest *Bcu*I und *Eco*RI isoliert. Anschließend wurde die 1477 bp große STOP Kassette in die *Bcu*I und *Eco*RI gespaltene li.OVA Region des pEGFP-N1.li.OVA Vectors kloniert. Da die *Eco*RI Schnittstelle im weiteren Verlauf zu unerwünschten Rahmenbedingungen geführt hätte, wurde mittels *site directed mutagenesis* eine stille Mutation eingebaut. Vor der STOP Kassette wurde mit FastDigest *Bcu*I und nach dem eGFP mit *Not*I verdaut. Es wurden Primer synthetisiert, die den Enden komplementär waren und einen Überhang erzeugten, die zum einen die Schnittstellen *Not*I und *Bcu*I mutierten und zum anderen auf beiden Enden des 2933 bp großen Fragmentes *Eco*RI Schnittstellen zufügten. Das Insert wurde nun in

## Material und Methode

---

die *EcoRI* Site des CD11c.pDOI-5 Plasmids inseriert (Brocker et al. 1997). Das resultierende Plasmid wurde pCD11c.STOP.li.OVA.eGFP genannt.

Durch Restriktion mit FastDigest NotI und Sall entstand ein ca. 10 kb großes DNA Fragment, welches in fertilisierte C57BL/6 Oozyten injiziert wurde.

### 3.2.2.7 Herstellen von anti-CD40

Anti-CD40 wurde aus dem Hybridom FGK 45 gewonnen. Dazu wurden die Hybridome bei 37 °C rotierend in einer 5 L Flasche in 2 L IMDM 10% kultiviert, bis diese überwachsen waren. Die Zellkultur wurde bei 2.800 rcf und 4 °C für 30 min zentrifugiert und der Überstand über einen Bottletop-Filter in eine sterile Flasche filtriert. Nach Zugabe von Natrium-Azid wurde die Lösung bei 4 °C gelagert. Alle weiteren Schritte fanden bei 4 °C statt. Eine Protein G Säule wurde über Nacht mit 1 L PBS gewaschen und der Überstand aus der FGK 45 Kultur über die Säule gegeben. Die Säule wurde mit PBS gewaschen, bis eine vollständige Regeneration der Säule zu erkennen war. Anschließend wurde das restliche PBS entfernt und Elutions-Puffer (0,1 M Glycin, pH 2.7) über die Säule gegeben. Die Absorption des Durchflusses bei 280 nm und 299 nm wurde gemessen. Fraktion mit geringem (*low*) Proteingehalt ( $A_{280} \geq 400$ ) wurden aufgefangen bis die Absorption  $A_{299}$  einen Wert von 400 erreichte. Fraktionen mit hohem (*high*) Proteingehalt ( $A_{299} \geq 400$ ) wurden getrennt aufgefangen bis die Absorption bei 299 nm wieder einen Wert von 400 erreichte. Die Fraktionen mit geringem Proteingehalt wurden wieder aufgefangen und vereint. Zu den gesammelten Fraktionen wurde ca. 10% des gesammelten Volumens Neutralisations-Puffer (1 M Tris, pH 9.0) zugefügt. Die Säule wurde mit Elutions-Puffer (pH 2.3) gespült bis die Absorption  $A_{280}$  bei 0 lag. Die Säule wurde mit 20%-igem EtOH regeneriert und inkubiert.

Die gesammelten Fraktionen (*high*, *low*) wurden in je einen Dialyseschlauch gefüllt und beide Enden verknotet. Die Proben wurden dreimal für 5 Stunden in mindestens 5 L kaltem PBS unter Rühren des PBS dialysiert. Danach wurde die Proteinkonzentration der Lösungen photometrisch bestimmt und ggf. mit einem Amicon Ultra (Cutoff = 10.000 MW) durch Zentrifugation bei 2.800 rcf und 4 °C auf eine Proteinkonzentration von 3 mg/mL eingestellt und in 200  $\mu$ L Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

## **Material und Methode**

---

### **3.2.2.8 Arbeiten mit Virus**

#### **3.2.2.8.1 Gewinnung großer Mengen des Vaccinia Virus**

Hierfür wurden BSC-40 Zellen in 175 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen bis zu einer Dichte von 10<sup>7</sup> Zellen pro Flasche kultiviert. Mit einer Pasteurpipette wurde das DMEM 10% abgesaugt und 5\*10<sup>5</sup> pfu des rekombinanten VV G2 (MOI=0,05) bzw. VV-OVA in 5 mL DMEM 10% zugegeben. Um eine gute Verteilung des Virus auf den Zellen zu gewährleisten, wurden die Zellkulturflaschen bei RT für eine Stunde auf dem Plattformschüttler (450 rpm) geschwenkt. Im Anschluss wurden 20 mL DMEM 10% zugefügt und im Inkubator bei 37 °C für 36-48 Stunden bis zur Abrundung aller Zellen, inkubiert. Das Medium in den Zellkulturflaschen wurde bis auf 2 mL abgesaugt und die Flaschen bei -80 °C eingefroren. Am folgenden Tag wurden die Flaschen aufgetaut, die Zellen und das Medium zu je 1 mL in 2 mL Eppendorfgefäße überführt und im Kühlhaus bei 4 °C 3-6 mal für 10 Sekunden mit dem Ultraschall-Homogenisator sonifiziert, bis eine trübe Suspension entstand. Der Virustiter des neu gewonnen VV G2 wurde mittels Plaque Assay ermittelt und bei 4 °C oder für längere Zeit bei -80°C gelagert.

#### **3.2.2.8.2 Virustiterbestimmung mittels Plaque Assay**

Zur Bestimmung des Virustiters des VV wurden 50 µL Virus mit 450 µL DMEM 10% verdünnt und je 200 µL in zwei Wells in die erste Reihe einer 96-Well Platte gegeben. Für die Virustiterbestimmung infizierter Mäuse wurden infizierte Ohren in 1 mL Medium gegeben und das Gewebe mit einem elektrischen Pistill 30 Sekunden aufgeschlossen (Pottern) (3.2.2.8.4). Je 200 µL wurden anschließend in zwei Wells der ersten Reihe einer 96-Well Platte gegeben.

In die weiteren Vertiefungen 2 bis 11 der genutzten Spalten der 96-Well-Platte wurden 130 µL DMEM 10% vorgelegt. Mit einer Mehrkanalpipette wurden die Proben der ersten Reihe resuspendiert und 60 µL in die zweite Reihe überführt, hier erneut resuspendiert und 60 µL dieser in die dritte Reihe überführt. Nach jeweils zwei Reihen wurden die Pipettenspitzen gewechselt. Auf diese Weise entstanden in den Vertiefungen 1, 3, 5, 7, 9 und 11 der jeweiligen Spalte die Verdünnungen 1, 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000 und 1:100.000. Je 100 µL einer Verdünnung der zwei identischen Virusproben wurden vereint und in eine Vertiefung einer 24-Well-Platte

## **Material und Methode**

---

gegeben. In jede dieser Vertiefungen wurden am Vortag  $2 \cdot 10^5$  BSC-40 Zellen gesät und für 24 Stunden unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Der dichte BSC-40 Zellrasen wurde durch Ausschlagen vom Medium befreit und nach Zugabe der 200  $\mu$ L Virus-Verdünnung wurde die Verdünnung durch leichtes Schwenken für eine Stunde bei RT auf dem Plattformschüttler (450 rpm) gleichmäßig auf den BSC-40 Zellen verteilt. Im Anschluss wurden 1 mL DMEM 10% hinzugefügt und der Assay im Inkubator bei 37 °C für 24 Stunden inkubiert. Nach diesem Zeitraum waren unter dem Lichtmikroskop deutliche Plaques im Zellrasen zu erkennen. Das Medium wurde durch vorsichtiges Ausschlagen entfernt und jede der Vertiefungen mit 1 mL Kristallviolett für 30 min inkubiert. Die Platten wurden vom Kristallviolett durch mehrfaches vorsichtiges Spülen mit Wasser befreit und die entstandenen farblosen Plaques im violetten Zellrasen über einem Lichttisch gezählt. Die gezählten Plaques wurden mit dem Verdünnungsfaktor des entsprechenden Wells multipliziert um die pfu/mL zu ermitteln.

### ***3.2.2.8.3 Infektion der Tiere mit Vaccinia Virus via skin scarification (s.s.)***

Zur Infektion wurden die Mäuse mit Ketamin/Xylazin betäubt. Das zu infizierende Ohr der Tiere wurde auf eine Petrischale gelegt und mit einer Ohrmacherpinzette aufgespannt. 5  $\mu$ L des VV G2 oder VV-OVA ( $2 \cdot 10^6$  pfu/5  $\mu$ L) wurden mit einer Pipette aufgetragen und durch 25-maliges leichtes Ritzen an der Auftragsstelle mit einer 27G ½“ Einmal-Injektions-Kanüle (B.Braun) eine Irritation der Haut hervorgerufen.

### ***3.2.2.8.4 Virustiterbestimmung in der Haut***

Die Ohren, der zuvor infizierten Mäuse, wurden mit einer Schere entfernt und in 1 mL DMEM 10% bei -80 °C eingefroren oder bei 4 °C kurzfristig gelagert und sofort verwendet. Nach dem Auftauen wurde die Haut mit einem Potter homogenisiert und die Suspension bei 7.000 rcf für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde für einen Plaque Assay wie unter (3.2.2.8.2) verwendet.



## **Material und Methode**

---

### **3.2.2.9 Isolation von Zellen**

#### **3.2.2.9.1 Isolation von T-Lymphozyten aus Hautgewebe**

Die Ohren wurden mit Hilfe einer Schere knapp oberhalb des Fellansatzes der Mausohren entfernt und mit Optikerpinzetten an der Schnittkante vorsichtig aufgespalten. Nach erfolgreicher Auftrennung wurde die subdermale Seite von überflüssigem Fett- und Knorpelgewebe durch Abschaben mit Pinzetten befreit. Im Folgenden wurden die Ohren in ein 2 mL Eppendorfgefäß überführt, in dem 200 µL Verdaulösung (RPMI-1640, 10% FCS, 10 mM HEPES, 50 U/mL DNase I und 1 mg/mL Collagenase A) vorgelegt waren. Die aufgespaltenen Ohren wurden mit Hilfe einer Schere kleinstmöglich zerschnitten und im Anschluss wurde das 2 mL Eppendorfgefäß bis auf 1,5 mL mit Verdaulösung aufgefüllt. Die Hautfragmente wurden 90 min bei 800 rpm und 37 °C auf dem Thermoschüttler mit der Verdaulösung inkubiert. Danach wurden 30 µL 0,5 M EDTA zugegeben um den Verdau zu stoppen und für weitere 10 Min bei 37 °C auf dem Thermoschüttler inkubiert. Mit Hilfe einer 1000 µL Pipette und gestopften Spitzen wurden die angedauten Hautfragmente und die Lösung mehrfach resuspendiert und dann über ein 70 µm Sieb in ein 50 mL Falcon gegeben. Die Hautfragmente auf dem Sieb wurden mit 10 ml Waschpuffer (HBSS + 2 mM EDTA + 0,5% BSA) gespült. Die auf diesem Weg gewonnenen Hautzellen wurden für 10 min bei 400 rcf und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellpellets wurden in 100 µL Waschpuffer mit Fc-Block (1:100) aufgenommen, in eine 96-well Rundbodenplatte überführt und für 10 min bei 4 °C inkubiert bevor die Antikörperfärbung folgte.

#### **3.2.2.9.2 Isolation von dendritischen Zellen aus Hautgewebe**

Die Ohren wurden mit einer Schere abgetrennt und mit einer Pinzette an der Schnittkante aufgespalten. Mit der dermalen Seite auf 2 mL einer Dispase II-Lösung (2.5 mg/mL Dispase II, 5 U/mL DNase I in PBS) wurde die Haut in einer 6-Well Platte für 90 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Epidermis mechanisch vorsichtig von der Dermis entfernt und in getrennte 1,5 mL Eppendorfgefäße überführt. Dermis und Epidermis wurden in 200 µL Kollagenase IV Lösung (500 U/mL Kollagenase IV, 5 U/mL DNase I in DMEM 10%) mit einer Schere klein geschnitten. Anschließend wurden die Proben bis auf 1,8 mL mit Verdaulösung aufgefüllt und auf dem

## Material und Methode

---

Thermoschüttler 90 min bei 37 °C und 800 rpm inkubiert. Danach wurden 30 µL 0,5 M EDTA zugegeben um den Verdau zu stoppen und für weitere 10 min bei 37 °C auf dem Thermoschüttler inkubiert. Mit Hilfe einer 1000 µL Pipette und gestopften Spitzen wurden die angedauten Hautfragmente und die Lösung mehrfach resuspendiert und dann über ein 70 µm Sieb in ein 50 mL Falcon gegeben. Die Hautfragmente auf dem Sieb wurden mit 10 ml Waschpuffer (HBSS + 2 mM EDTA + 0,5% BSA) gespült. Nach Zentrifugation bei 400 rcf und 4 °C für 10 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 100 µL Waschpuffer mit Fc-Block (1:100) aufgenommen, in eine 96-well Rundbodenplatte überführt und für 10 min bei 4 °C inkubiert bevor die Antikörperfärbung folgte.

### **3.2.2.9.3 Isolation von Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten**

Die Mäuse wurden durch CO<sub>2</sub> getötet. Anschließend wurde ihr Fell mit 70%-igem EtOH gereinigt und das Fell durch einen ventralen Schnitt von der Bauchhaut getrennt. Mit einer sterilen Federstahlpinzette wurden Milz, inguinale (ILN), brachiale (BLN) und mesenterialen (MLN) Lymphknoten entnommen, in 1,5 mL Eppendorfgefäße überführt, welche mit 500 µL PBS versehen waren und auf Eis gelagert.

Zur Isolation der T-Lymphozyten aus den peripheren lymphatischen Organen wurden die Organe auf ein 70 µm Sieb auf einem 50 mL Falcon überführt und mit einem sterilen Spritzenstempel auf diesem vorsichtig zerrieben. Das Sieb wurde mit 10 mL FACS-Puffer gewaschen und die Zellsuspension bei 400 rcf für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen.

Für die Isolation von dendritischen Zellen wurden die Organe mit einer Schere zerkleinert und in Kollagenase IV Lösung (500 U/mL Kollagenase IV, 5 U/mL DNase I in DMEM 10%) für 90 min auf einem Thermoschüttler bei 37°C und 800 rpm inkubiert. Anschließend wurden 30 µL 0,5 M EDTA zugegeben um den Verdau zu stoppen und für weitere 10 min bei 37 °C auf dem Thermoschüttler inkubiert. Mit Hilfe einer 1000 µL Pipette und gestopften Spitzen wurden die Lösung mehrfach resuspendiert und dann über ein 70 µm Sieb in ein 50 mL Falcon gegeben. Nach Zentrifugation bei 400 rcf für 5 min bei 4 °C wurde der Überstand verworfen.

Für manche Experimente wurde die absolute Zellzahl bestimmt. Dafür wurden die Zellen in 10 mL FACS Puffer aufgenommen und gezählt. Die Zellen wurden

## Material und Methode

---

zentrifugiert und das Pellet in 100 µL FACS Puffer mit Fc-Block (1:100) aufgenommen und für 10 min bei 4 °C inkubiert und mit der Antikörperfärbung fortgeföhren.

### 3.2.2.9.4 DC Isolation über Optiprep-Gradienten

Die mit Kollagenase IV verdaute Milzsuspension (3.2.2.9.3) wurde bei 400 rcf und 4 °C für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 15%-iger Optiprep Lösung ( $\rho = 1,085$  g/ml; Optiprep in HBSS  $-Ca^{2+} -Mg^{2+}$ ; 1:3 v/v) aufgenommen. Zur Herstellung des Gradienten wurde in ein 15 mL Falcon 2 mL HBSS vorgelegt. Mit einer langen Pasteurpipette wurde das HBSS mit 4 mL 11.5%-iger Optiprep Lösung ( $\rho = 1,065$  g/ml; Optiprep in 0,88% (w/v) NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% (w/v) BSA, 10 mM Hepes-NaOH, pH 7.4; 1:4.2 v/v) unterschichtet. Der Gradient wurde zum Schluss mit der 15%igen Optiprep Zellsuspension unterschichtet und für 15 min bei 600 rcf und RT ohne Bremse zentrifugiert. Die DCs befanden sich nun auf der 11.5%-igen Schicht und wurden mit einer Pipette vorsichtig abgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit kaltem DMEM 10% gewaschen und ein Teil der Zellen zur Bestimmung der Reinheit für die Durchflusszytometrie verwendet.

### 3.2.2.9.5 Trennung von T-Zellen über Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)

*Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS) ist ein Verfahren, bestimmte Zellen aus einem Zellgemisch auszusortieren. Hierbei binden Antikörper mit Eisenpartikeln (*MicroBeads*) an spezifische Oberflächenstrukturen der Zellen. Beim Durchfluss des Zellgemisches durch eine Säule, welche von einem starken Magnetfeld umgeben ist, bleibt die gewünschte Zellpopulation, die durch *MicroBeads* markiert sind, am Magneten haften.

Die Milz einer Maus wurde entnommen und mit Zuhilfenahme eines sterilen Spritzenstempels und eines 70 µm Siebes in 5 mL DMEM 10% zerdrückt. Durch ein zweites 70 µm Sieb wurde die Suspension in ein 50 mL Falcon überführt und für 10 min bei 400 rcf und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, 1 mL MACS-Puffer mit Fc-Block (1:100) auf das Pellet gegeben und bei 4 °C für 10 min

## **Material und Methode**

---

inkubiert. Im Anschluss wurden aCD8-Beads oder aCD4-Beads (1:40) hinzugefügt, gut resuspendiert und für weitere 15 min bei 4 °C auf einer Wippe inkubiert. Danach wurde mit MACS-Puffer auf 25 mL aufgefüllt und 5 min bei 400 rcf bei 4 °C zentrifugiert. Der Waschvorgang wurde wiederholt. Anschließend wurden die Zellen in 5 mL entgastem MACS-Puffer aufgenommen und auf Eis gelagert.

Für die Isolierung wurde die auf 4 °C vorgekühlte Säule an dem Magneten befestigt und mit 5 mL MACS-Puffer equilibriert. Die Zellsuspension wurde auf die Säule gegeben und anschließend zweimal mit 5 mL MACS-Puffer gewaschen. Danach wurde die Säule vom Magnet entfernt und mit 5 mL MACS Puffer und Stempel eluiert. Die Zellen wurden gezählt und ihre Reinheit mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Abschließend wurden die Zellen auf die gewünschte Zellzahl mit sterilem HBSS eingestellt.

### ***3.2.2.10 Färben der Zellen für die Durchflusszytometrie***

Um die Zellen für die Durchflusszytometrie anzufärben, wurden die Zellen 5-10 min in 50-100 µL FACS-Puffer mit Fc-Block (1:100) bei 4 °C inkubiert. Bei Zellen die aus den Ohren isoliert wurden, wurde HBSS + 2 mM EDTA + 0,5% BSA statt FACS-Puffer genutzt. Dann wurden 100 µL des Antikörper Ansatzes zugegeben und für weitere 20 min bei 4 °C inkubiert. Bei Verwendung von Tetramer wurden die Proben zuvor für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die verwendeten Antikörper und deren Verdünnungen sind im Materialteil (3.1.12.1) aufgeführt. Abschließend wurden überschüssige Antikörper in zwei Waschschritten mit den jeweiligen Puffern entfernt. Hierzu wurden 100-150 µL Puffer zu den Zellen gegeben und für 2 min bei 570 rcf und 4 °C zentrifugiert. Zwischen den Zentrifugationsschritten wurden die Zellpellets durch Vortexen der 5 mL FACS Röhren oder durch Schütteln der 96-Well Platte aufgelockert. Abschließend wurden die Zellen in 150 µL des entsprechenden Puffers aufgenommen, in 5 mL FACS Röhren überführt und am Durchflusszytometer LSR II oder Canto von BD gemessen.

## **Material und Methode**

---

### **3.2.3 Arbeiten mit Tieren**

#### **3.2.3.1 Entnahme von Blut bei Mäusen**

Zur Genotypisierung der P14, OT-II, Nur77<sup>GFP</sup> und Ly5.1 Mäuse und zur Analyse der peripheren GP<sub>33-41</sub> spezifischen CD8 T-Zellen, P14 Zellen oder OT-II Zellen wurde den Tieren Blut entnommen. Hierzu wurden die Mäuse mit Isofluran (Furene) kurzzeitig betäubt und mit einer sterilen Glaskapillare (Roth) aus deren Augenschwamm (retroorbital) das Blut gewonnen. Das in der Kapillare aufgefangene Blut wurde in 2 mL FACS Puffer oder HBSS mit 50 U/mL Heparin in 5 mL FACS-Röhrchen überführt und bei 4 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

#### **3.2.3.2 Blutproben aufarbeiten und Lysieren der Erythrozyten**

Zur Durchführung der Analyse des Blutes mittels Durchflusszytometrie wurden die Lymphozyten des entnommen Vollblutes isoliert. Hierzu wurden die Blutproben mit FACS-Puffer oder HBSS mit 50 U/mL Heparin auf 4 mL aufgefüllt und bei 400 rcf für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und verworfen. Die Pellets wurden gevortext und mit 2 mL ACK-Puffer versehen, erneut gevortext und zur Lyse der Erythrozyten bei RT für 5 Min auf dem Plattformschüttler (600 rpm) inkubiert. Durch Zugabe von 2 mL FACS Puffer oder HBSS wurde die Reaktion gestoppt und die Lymphozyten durch Zentrifugieren für 5 min bei 4 °C bei 400 rcf sedimentiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellpellets einem weiteren Waschschrift unterzogen. Die Pellets wurden in 100 µL FACS-Puffer mit Fc-Block (1:100) aufgenommen und für 10 min bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurde mit der Antikörperfärbung fortgefahren. Im Falle von P- und E-Selektin Ligand Färbung wurde HBSS mit 3 mM Ca<sup>2+</sup>, 3 mM Mg<sup>2+</sup>, 2% BSA und 10 mM HEPES verwendet.

## Material und Methode

---

### 3.2.3.3 Genotypisierung von transgenen Mäusen mit Blut

Nach Lyse der Erythrozyten wurden die Blutproben bei 400 rcf und 4 °C für 5 min pelletiert. Anschließend mit spezifischen Antikörpern in FACS-Puffer (100 µL pro Probe) für 20 min bei 4 °C gefärbt. Nach zwei Waschschritten mit je 2 mL FACS-Puffer, 570 rcf, 4 °C für 2 min wurden die Proben in je 150 µL FACS-Puffer aufgenommen und mittels Durchflusszytometrie auf ihre Transgene hin untersucht.

Nur77<sup>eGFP</sup> transgene Mäuse exprimieren das *enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP) unter der Kontrolle der Nr4a1 (Nur77) Promotor/Enhancer Regionen innerhalb des *Bacterial Artificial Chromosome* (BAC) R4-366J14 Transgens. Aus diesem Grund weisen Mäuse, die auf dieses Transgen positiv sind GFP positive T-Zellen auf, die per Durchflusszytometer im FITC-Kanal detektiert wurden.

Die Lymphozyten der P14 Mäuse wurden mit CD8 (APC) und Vα2 (PE) gefärbt. Mäuse, welche den transgenen, für GP<sub>33-41</sub> spezifischen, TCR exprimieren sind zu 90% für die Vα2 Kette positiv, im Vergleich zu 8% bei Wildtyp Mäusen.

Äquivalent wurde bei CD4 OT-II positiven Mäusen vorgegangen.

Ly5.1 (CD45.1) positive Mäuse wurden mit den spezifischen Antikörpern CD8 (PE) und CD45.1 (APC) gefärbt. Wildtyp Mäuse des Stammes C57BL/6 und BALB/c exprimieren die CD45.2 (Ly5.2) Allele. Mäuse, die auf das Transgen Ly5.1 positiv waren, wurden anhand von CD45.1 positiven CD4 oder CD8 T-Zellen durchflusszytometrisch ermittelt

### 3.2.3.4 Herstellen von Knochenmarkschimären

C57BL/6 rezipiente Mäuse wurden letal mit 9,5 Gy einer <sup>137</sup>Cs Quelle bestrahlt und anschließend mit mindestens 2\*10<sup>6</sup> Zellen aus zuvor isolierter Knochenmark einer Donor Maus i.v. rekonstituiert. Nach 8 Wochen wurden die Mäuse für Versuchszwecke verwendet. Während der Zeit wurde dem Trinkwasser der Tiere Borgal (1:240) zugesetzt.

### ***3.2.3.5 Depletion von Langerin<sup>+</sup> Zellen mittels Diphtherie Toxin***

LangDTR positive Mäuse exprimieren unter der Kontrolle des Langerin Promotors den Rezeptor für Diphtherie Toxin (DT) (Kissenpfennig et al. 2005). Dadurch werden Langerin positive Zellen empfänglich für die toxische Wirkung des Bakterientoxins.

Um Langerhans Zellen (LC) zu depletieren wurde den Mäusen 18 und 14 Tage vor Versuchsbeginn 1 µg DT i.v. injiziert. Langerhans Zellen regenerieren wesentlich langsamer als Langerin<sup>+</sup> dermale DCs (DDCs), sodass zu diesem Zeitpunkt Langerhans Zellen abwesend sind, während Langerin<sup>+</sup> dermale DCs regeneriert wurden.

Um LCs und Langerin<sup>+</sup> DDCs zu depletieren wurde 6 Tage und 1 Tag vor Versuchsbeginn je 1 µg DT i.v. injiziert. Danach wurde jeden zweiten Tag je 1 µg DT intraperitoneal (i.p.) gegeben um die Depletion aufrecht zu erhalten.

### ***3.2.3.6 Färben von Zellen mit CFSE***

Für die Färbung von Zellen mit CFSE wurde eine 5 µM CFSE Lösung in serumfreien HBSS verwendet. Isolierte Zellen wurden durch Zentrifugieren bei 400 rcf und 4 °C für 5 min zweimal mit HBSS gewaschen und zuletzt das Zellpellet in 200 µL serumfreien HBSS resuspendiert. Von der 5 µM CFSE Lösung wurde so viel zugegeben, dass eine Zellkonzentration von  $2 \cdot 10^6$ /mL entstand. Die Zellen wurden für exakt 8 min bei RT im Dunkeln inkubiert und anschließend mit 20 mL HBSS 20% FCS die Reaktion abgestoppt. Danach wurden die Zellen zweimal mit HBSS gewaschen und erneut gezählt. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in HBSS in entsprechender Konzentration für den adoptiven Transfer eingestellt.

## **Material und Methode**

---

### **3.2.3.7 Adoptiver T-Zell Transfer**

Die P14 oder OT-II Zellen, die mittels MACS aus der Milz einer Maus isoliert wurden, wurden für manche Experimente in sterilem HBSS auf  $10^6/200 \mu\text{L}$  oder auf  $2 \cdot 10^4/200 \mu\text{L}$  eingestellt und auf Eis gelagert. Zur intravenösen (i.v.) Gabe der Zellen wurden die Rezipientenmäuse unter eine Wärmelampe bestrahlt, um die Kaudalvene besser sichtbar zu machen.  $200 \mu\text{L}$  der Zellsuspension wurden mit einer 1 mL Injekt F Spritze (B.Braun) und einer 27G  $\frac{1}{2}$ " Einmal-Injektions-Kanüle (B.Braun) in die Kaudalvene luftblasenfrei injiziert.

### **3.2.3.8 Betäuben von Mäusen mit Ketamin/Xylazin**

Um Mäuse für längere Zeit (1-2 Stunden) zu betäuben wurden  $100 \mu\text{L}$  einer Ketamin/Xylazin Lösung intraperitoneal (i.p.) injiziert. Die Lösung wurde zuvor aus Ketamin (100 mg/mL) und Xylazin (Rompun, 20 mg/mL) 1:5 in PBS verdünnt.

### **3.2.3.9 Behandlungen mit 4OH-Tamoxifen (4OH-TAM), Tamoxifen (TAM) und Injektion von anti-CD40**

Tamoxifen wurde in 10% des Endvolumens in 100%-igem EtOH vorgelöst und dann mit Maisöl unter gelegentlichem Schütteln bei  $37^\circ\text{C}$  aufgelöst, sodass die Endkonzentration der Stocklösung bei 20 mg/mL lag. Mäuse, die mit Tamoxifen behandelt wurden, bekamen  $100 \mu\text{L}$  (2 mg) einmalig intraperitoneal (i.p.) injiziert.

4OH-Tamoxifen (4OH-TAM), ein aktiver Metabolit des Tamoxifens, wurde in DMSO zu einer Konzentration von 50 mg/mL gelöst, aliquotiert und bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Zur Auftragung von 4OH-TAM wurden die Tiere mit Ketamin/Xylazin betäubt. Die Vorderpfoten wurden mit Klebeband für die Behandlungszeit fixiert um eine orale Aufnahme des 4OH-TAM durch Fellpflege zu verhindern. Mit einer Pipette wurden insgesamt  $20 \mu\text{L}$  4OH-TAM Lösung (2% 4OH-TAM Stocklösung, 15% DMSO, 35%  $\text{H}_2\text{O}$  und 48% 100%-iger EtOH) mit einer Konzentration von  $20 \mu\text{g}/20 \mu\text{L}$  auf den zuvor rasierten Rücken aufgetragen. Die Prozedur wurde am folgenden Tag



## **Material und Methode**

---

wiederholt. Für Auftragung am Ohr wurden 20 µg in 10 µl je Ohr auf Innen- und Außenseite mit einer Pipette aufgetragen. Die Mäuse wurden für eine Inkubation von 4 – 5 Stunden in einzelnen Käfigen gehalten um eine orale Aufnahme der Lösung zu verhindern. Nach der Inkubation wurden der Rücken bzw. die Ohren erst mit 50%-igem EtOH, dann mit PBS und abschließend mit einem trockenen Tuch gereinigt. Zuletzt wurden 30 µL auf dem Rücken oder 10 µL auf den Ohren einer Dibutylphtalath (DBP) Lösung (1:1 in Aceton) aufgetragen, was zu erhöhter Migration der DCs in die drainierenden Lymphknoten führt.

Anti-CD40 wurde in HBSS zu einer Konzentration von 500 µg/mL gebracht und zur Stimulation einer T-Zell Antwort zu Versuchsbeginn 100 µL (50 µg) pro Maus i.v. injiziert.

### 4 Ergebnisse

#### 4.1 Teil I

##### 4.1.1 Topikale Behandlung der Haut mit 4OH-Tamoxifen induziert lokale RFP Expression in Dendritischen Zellen der Haut

Im DIETER I (*dendritic cell specific inducible expression of t-cell epitopes after recombination*) Mausmodell ist eine Tamoxifen (TAM) induzierbare Expression des *Lymphozytären Choriomeningitis Virus* (LCMV) Peptid GP<sub>33-41</sub> des Glykoproteins in CD11c positiven Zellen möglich. Dadurch kann die Interaktion zwischen dendritischen Zellen und T-Zellen unter inflammatorischen oder nicht inflammatorischen Bedingungen untersucht werden (Probst et al. 2003).

Die intraperitoneale Injektion von Tamoxifen wirkt systemisch auf alle DCs, wodurch die Antigenexpression in einer Fraktion von Dendritischen Zellen in allen Organen induziert wird.

Um die Expression lokal in DCs der Haut zu induzieren und ihre Funktion untersuchen zu können, wurde daher die topische Applikation von Tamoxifen über die Haut etabliert. Da Tamoxifen erst in der Leber zu dem aktiven Östrogen Rezeptor Liganden 4OH-Tamoxifen (4OH-TAM) metabolisiert werden muss, und daher unabhängig von der Applikationsroute systemisch wirkt, wurde für die topische Applikation der aktive Metabolit (4OH-TAM) verwendet. Dabei wurde 4OH-TAM in einer Alkohol/Wasser/DMSO Lösung direkt auf die Haut aufgetragen.

Um zu verhindern, dass die Mäuse bei der Fellpflege 4OH-TAM oral aufnehmen können, wurden die Tiere für die Inkubationszeit von 4-5 Stunden isoliert gehalten und die Lösung im Anschluss abgewaschen.

Um die Lokalität des Effekts der 4OH-TAM Behandlung zu überprüfen, wurden CD11cCreER<sub>T</sub> transgene Mäuse mit Rosa26-RFP Mäusen gekreuzt. CD11cCreER<sub>T</sub> x Rosa26-RFP Mäuse exprimieren nach Cre Aktivierung das *red fluorescence protein* (RFP), das durchflusszytometrisch bestimmt werden kann.

Um die 4OH-TAM induzierte Cre-Aktivität in dendritischen Zellen in Haut drainierenden Lymphknoten nachzuweisen, wurden CD11cCreER<sub>T</sub> x Rosa26-RFP Mäusen auf den Ohren mit 4OH-TAM Lösung, Tamoxifen intraperitoneal (i.p.) oder

## Ergebnisse

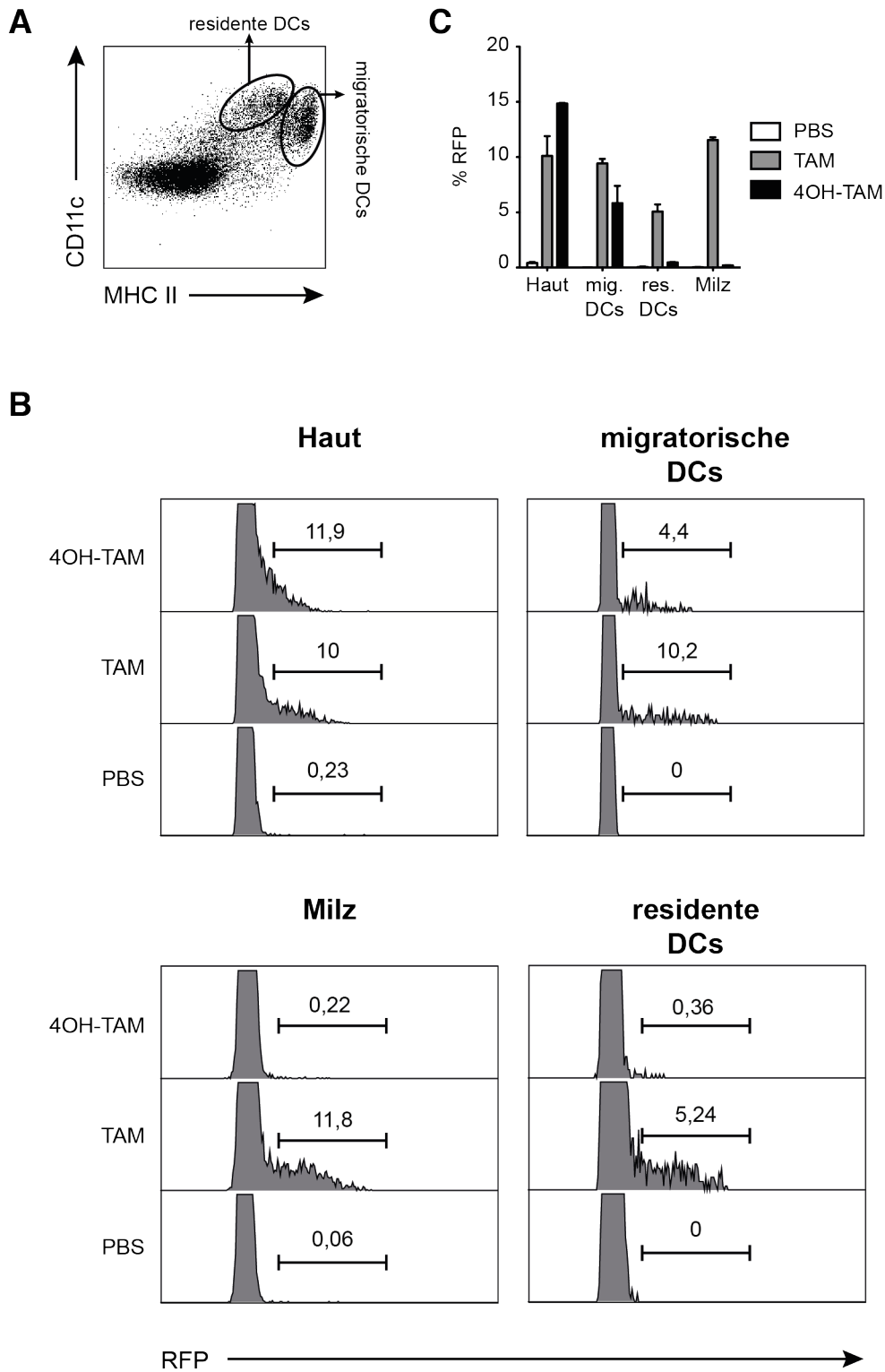
---

mit PBS behandelt. Nach drei Tagen wurden die Mäuse getötet und die Ohren sowie die drainierenden Lymphknoten und die Milz entfernt. Die Ohren wurden gespalten und 90 Minuten mit Dispase II und Kollagenase IV behandelt. Die Lymphknoten und die Milz wurden mit Kollagenase IV behandelt. Die Zellen wurden anschließend im Durchflusszytometer untersucht.

Um in drainierenden Lymphknoten migratorische von residenten DCs zu unterscheiden, wurde die unterschiedliche Expression von MHC-Klasse II und CD11c Molekülen verwendet. Migratorische DCs exprimieren MHC-Klasse II stärker und CD11c schwächer als residente DCs (Abb. 1A).

Nach Behandlung mit TAM i.p. waren nach 3 Tagen ca. 11% der Milz DCs, 10% der migratorischen DCs und ca. 5% der residenten DCs RFP positiv. Nach Behandlung mit 4OH-TAM waren weder Milz DCs noch residente DCs in Haut drainierenden LN RFP positiv. 4OH-TAM induzierte die Expression in ca. 7% der migratorischen DCs und ca. 14% der Haut DCs (Abb. 1B und C).

# Ergebnisse



**Abbildung 1: 4OH-Tamoxifen wirkt lokal auf dendritische Zellen in der Haut, die in drainierende Lymphknoten migrieren können.**

CD11c-CreER<sup>T+</sup> Rosa26-RFP<sup>+</sup> Mäuse wurden mit 20 µg 4OH-TAM auf den Ohren an zwei Tagen behandelt, bekamen einmalig 2 mg TAM i.p. oder PBS injiziert. Drei Tage später wurden die aurikulären Lymphknoten, Milz und die Haut entnommen und im Durchflusszytometer untersucht. **(A)** Gating Strategie für Lymphknoten. Lebende CD45<sup>+</sup> CD220<sup>-</sup> CD19<sup>-</sup> CD3<sup>-</sup> Zellen wurden gegen MHC II und CD11c Expression geplottet. Migratorische DCs (CD11c<sup>intermediate</sup> und MHC II<sup>high</sup>) und residente DCs (CD11c<sup>high</sup> und MHC II<sup>intermediate</sup>) wurden weiter analysiert. **(B+C)** RFP Expression der DCs Subtypen. Gezeigt ist der Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten (±SD).

## Ergebnisse

---

### 4.1.2 Topikale 4OH-Tamoxifen Behandlung wirkt auf Langerhans Zellen, dermale DCs und auf monozytäre DCs, aber nicht auf Makrophagen

Die Dendritischen Zellen der Haut sind sehr heterogen. In der Epidermis kommen ausschließlich Langerhans Zellen (Abb. 2A (V)) vor, welche im Gegensatz zu dermalen DCs nicht aus Stammzellen des Knochenmarks generiert werden (Malissen et al. 2014). DCs in der Dermis lassen sich in mindestens fünf verschiedene Subtypen unterteilen. CD207<sup>+</sup> DCs machen den geringsten Anteil aus und lassen sich mittels CD103 in zwei weitere Populationen unterteilen (Abb. 2A (III + IV)). CD11b<sup>+</sup> DCs (Abb. 2A (I)) sind heterogen und können durch Expression von CD64, Ly6-C und CCR2 in konventionelle DCs (Abb. 2A (VI)) und monozytäre DCs (moDCs) (Abb. 2A (VII)) sowie Makrophagen (Abb. 2A (VIII)) unterteilt werden. Makrophagen migrieren im Gegensatz zu konventionellen DCs nicht in die Lymphknoten während moDCs unter inflammatorischen Bedingungen zu geringerem Anteil in Lymphknoten migrieren können (Tamoutounour et al. 2013). Eine Subpopulation ist sowohl CD207 als auch CD11b negativ und wird im Weiteren als doppel negativ (DN) bezeichnet (Abb. 2A (II)) (Henri et al. 2010; Tamoutounour et al. 2012).

Um zu testen welche Subpopulationen auf die 4OH-Tamoxifen Behandlung reagieren, wann die Wirkung am Größten ist und um die Migration in die Lymphknoten zu untersuchen, wurden CD11cCreER<sup>T</sup> Rosa26-RFP<sup>+</sup> Mäuse mit 4OH-TAM behandelt oder unbehandelt verwendet (0, 1, 3, 5 und 7 Tage später wurden Ohren und drainierende Lymphknoten entnommen und DCs isoliert. Anschließend wurden die Zellen gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert.

In der Haut exprimieren ca. 2,27% der LCs drei Tage nach 4OH-TAM Behandlung RFP. Weitaus größer ist der positive Anteil der CD207<sup>+</sup> DDCs. Unter diesen waren ca. 46% der CD103<sup>+</sup> und ca. 40% der CD103<sup>-</sup> DDCs RFP positiv.

Von den CD11b<sup>+</sup> DDCs exprimierten ca. 7,7% RFP und ca. 3,7% der DN DDCs (Abb. 2C). Von den konventionellen CD11b<sup>+</sup> DDCs waren ca. 13,8% RFP positiv, von den moDCs ca. 6,6%. Makrophagen (CD64<sup>+</sup> CCR2<sup>-</sup>) exprimierten kein RFP (Abb. 2D).

## Ergebnisse

---

In den drainierenden Lymphknoten (dLN) kann bei den migratorischen DCs zwischen fünf Subpopulationen unterschieden werden.  $CD11b^+$  DCs (Abb. 2B (I)),  $CD11b^- CD207^-$  (DN) (Abb. 2B (II)) DCs,  $CD207^+ CD103^+$  DCs (Abb. 2B (III)) und  $CD207^+ CD103^-$  DCs (Abb. 2B (IV)). Letztere Population sind zum einen Teil eingewanderte LCs und zum anderen Teil  $CD207^+ CD103^-$  dermale DCs (Abb. 2B (IV)).

Die migratorischen DCs der drainierenden Lymphknoten wiesen ebenfalls sehr unterschiedliche RFP Expressionen auf. Von den  $CD11b^+$  DCs waren ca. 1,64% RFP positiv, von  $CD207^+ CD103^+$  DCs ca. 5,85%. Von den LCs exprimierten in den Lymphknoten ca. 1,3% RFP, von  $CD207^- CD11b^-$  (DN) DCs waren hingegen nur 0,27% RFP positiv (Abb. 2C).

Da diese Verhältnisse keine Auskunft darüber geben wie viele DCs aus der Haut in die Lymphknoten migrieren, wurde eine Kinetik über 7 Tage nach 4OH-TAM Behandlung durchgeführt und die Frequenz der RFP positiven DC Subtypen von allen migratorischen DCs ermittelt.

Die  $CD11b^+$  DCs migrierten am Schnellsten. Bereits am Tag 3 erreichte der Anteil der  $RFP^+ CD11b^+$  DCs an den gesamten migratorischen DCs im drainierenden LN mit 0,32% sein Maximum. Dieser Anteil reduzierte sich bis Tag 7 auf 0,26%.

$CD207^+ CD103^+$  DCs migrierten langsamer. Ihr  $RFP^+$  Anteil an allen migratorischen DCs stieg von Tag 3 mit ca. 0,04% bis Tag 7 auf ca. 0,27%.  $CD207^+ CD103^-$  DCs zeigten ein vergleichbares Migrationsverhalten wie  $CD207^+ CD103^+$  DCs. Der Anteil an  $RFP^+ CD207^+ CD103^-$  DCs an den gesamten migratorischen DCs in dem dLN stieg von Tag 3 mit etwa 0,07%, bis Tag 7 mit ca. 0,13% kontinuierlich an.  $RFP^+$  DN DCs waren hingegen kaum vertreten und hatten ihr Maximum an Tag 5 mit 0,04% aller migratorischen DCs (Abb. 2E).

Die Cre-Rekombinase abhängige Expression von Reportergenen kann, trotz identischem Locus im Genom, variieren (J. Liu et al. 2013). Daher kann von der RFP Expression in DCs von  $CD11cCreER_T^+ Rosa26-RFP^+$  Mäusen nicht im gleichem Maße auf die  $GP_{33-41}$  Expression und Präsentation DCs von DIETER I Mäusen zurückgeschlossen werden.

Es wurde daher untersucht, ob die für RFP gefundene Spezifität für migratorische Haut DCs auch für die Induktion der Antigenexpression im DIETER I Modell gilt.

## Ergebnisse

---

Dazu wurden DIETER I Mäuse mit 4OH-TAM an zwei aufeinander folgenden Tagen oder einmalig mit 2 mg TAM i.p. behandelt. Um die Migration der Haut DCs zu erhöhen wurde die Haut zusätzlich mit DBP behandelt. Am vierten Tag nach der ersten Behandlung wurden die drainierenden Lymphknoten entnommen. Die DCs wurden isoliert und mit Antikörpern für CD11c und MHC II gefärbt und durch durchflusszytometrisches Sortieren migratorische ( $CD11c^{int}$  und  $MHC^{high}$ ) von residenten ( $CD11c^{high}$  und  $MHC^{int}$ ) DCs getrennt (Abb. 2F). Anschließend wurde ein Nur77 Aktivitätsassay mit den DCs durchgeführt.

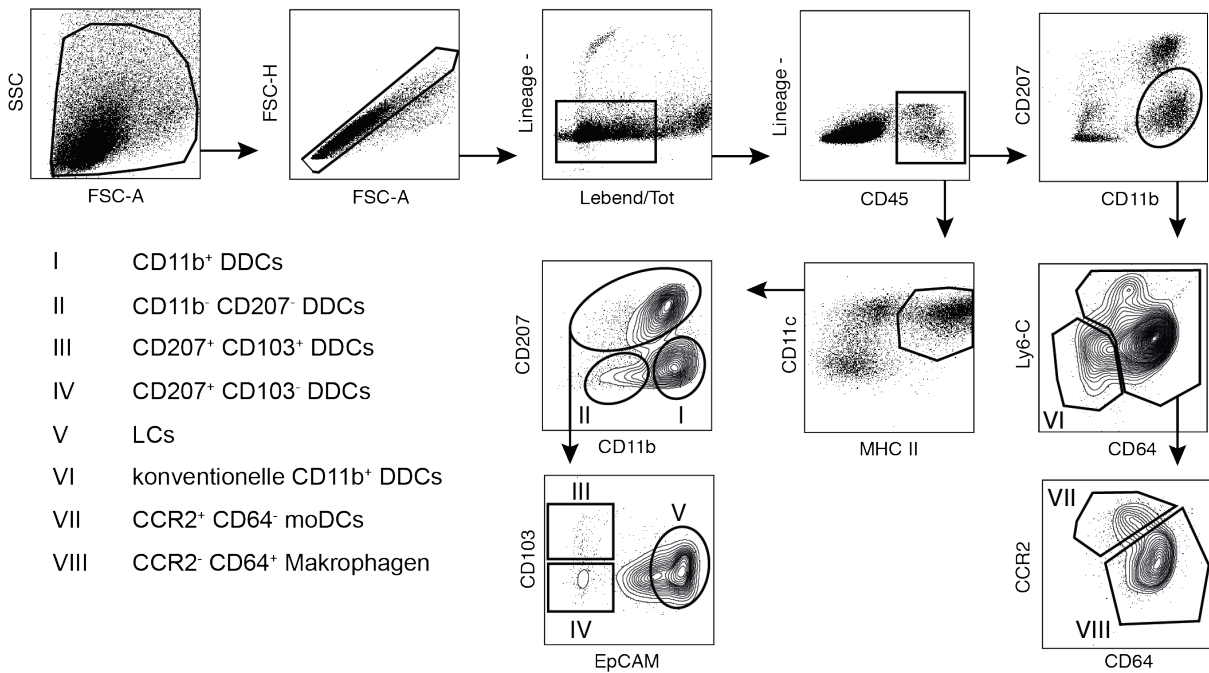
Mit systemischer Tamoxifen Behandlung (TAM i.p.) waren sowohl die residenten, als auch die migratorischen DCs in der Lage P14-Zellen zu aktivieren. Bei Behandlung mit 4OH-TAM auf der Haut aktivierten ausschließlich die migratorischen DCs P14-Zellen. Residente DCs der mit 4OH-TAM behandelten Mäuse stimulierten die T-Zellen nicht (Abb. 2F).

Dieses Experiment zeigte, dass die topikale 4OH-TAM Behandlung spezifisch auf migratorische Haut DCs wirkt und die Präsentation von  $GP_{33-41}$  induziert.

# Ergebnisse

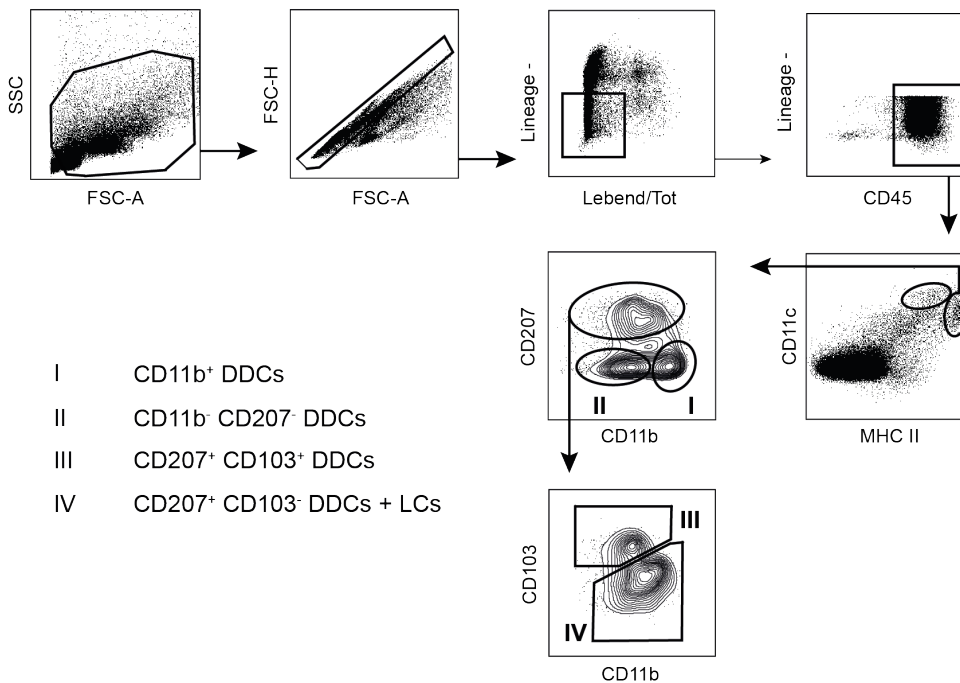
**A**

## Gating der Haut DCs



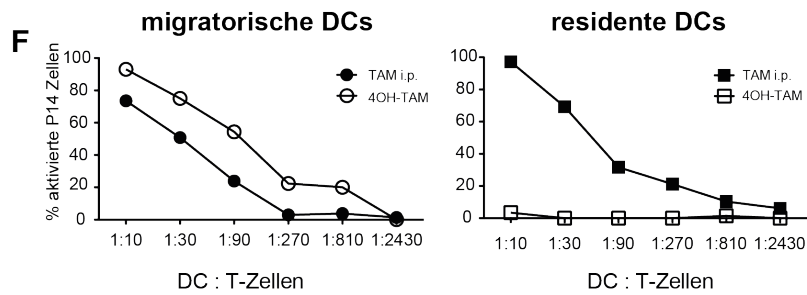
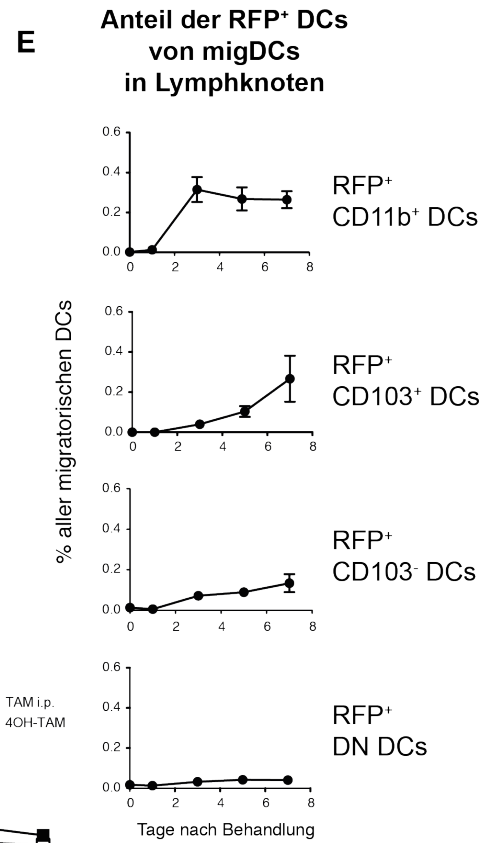
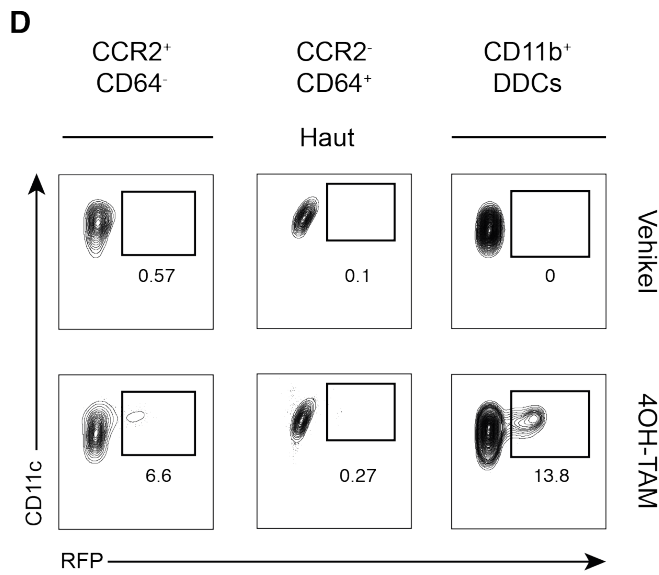
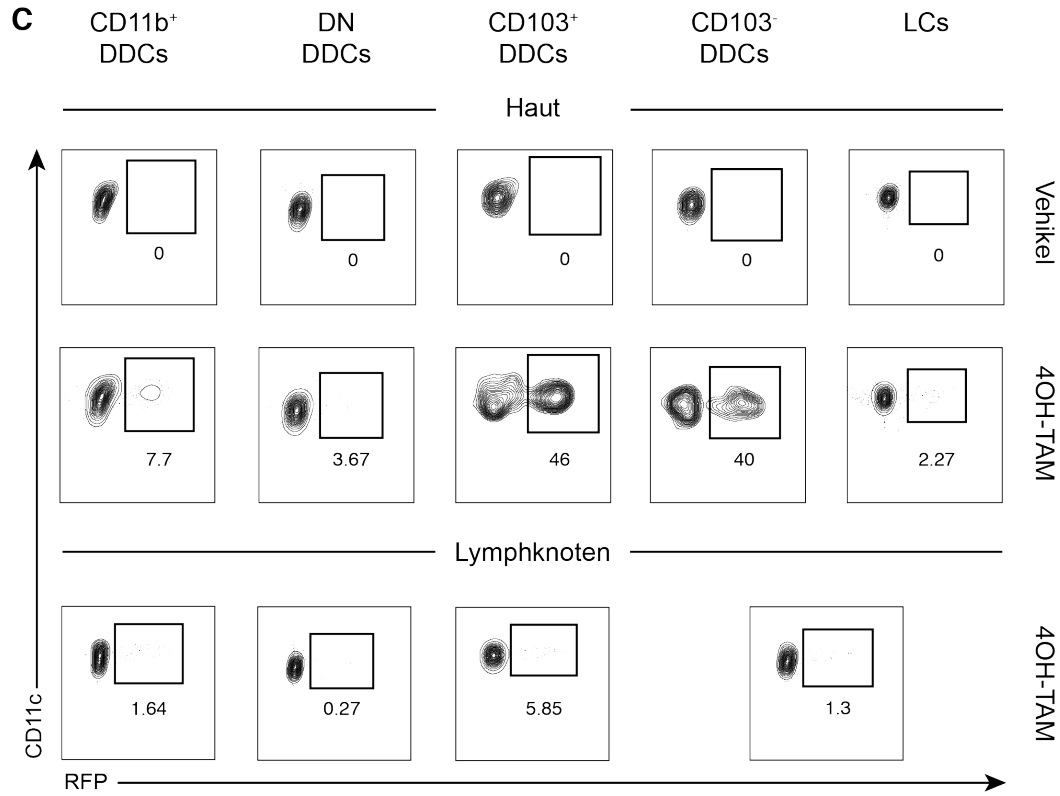
**B**

## Gating der migratorischen DCs in Lymphknoten





# Ergebnisse



## Ergebnisse

---

### **Abbildung 2: Topikale 4OH-Tamoxifen Behandlung wirkt auf DCs und moDCs in der Haut, jedoch nicht auf Makrophagen.**

CD11c-CreER<sup>+</sup> Rosa26-RFP<sup>+</sup> Mäuse wurden mit 20 µg 4OH-TAM oder Vehikel auf den Ohren an zwei Tagen behandelt. **(A)** Gating Strategie für DC Subtypen der Haut. **(B)** Gating Strategie für migratorische DC Subtypen in Haut drainierenden Lymphknoten. **(C+D)** Drei Tage nach der ersten Behandlung wurden die auricularen Lymphknoten, Milz und die Haut entnommen und im Durchflusszytometer auf RFP Expression untersucht. **(E)** Migratorische DCs wurden an den Tagen 1, 3, 5 und 7 nach Behandlung untersucht. Der Anteil der migrierten RFP positiven DC Subtypen zu allen migratorischen DCs wurde ermittelt. **(F)** DIETER I Mäuse wurden an zwei Tagen mit 20 µg 4OH-TAM auf der Haut behandelt und zusätzlich mit DBP. Nach 3 Tagen wurden die drainierenden Lymphknoten entnommen, migratorische und residente DCs wurden mit Hilfe des Aria 2 (BD) gesortet und mit P14 Nur77<sup>+</sup> T-Zellen in verschiedenen Verhältnissen über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die GFP Expression der P14-Zellen ermittelt. **(C+D)** Gezeigt sind beispielhafte Daten der Durchflusszytometrie aus zwei unabhängigen Experimenten. **(E)** Gezeigt sind die Mittelwerte (±SD) aus einem Experiment mit n=5.

## Ergebnisse

---

### 4.1.3 Behandlung mit 4OH-Tamoxifen induziert GP<sub>33-41</sub> Expression und Präsentation in Haut DCs, die spezifische CD8 T-Zellen induzieren können

Um eine geeignete 4OH-TAM Konzentration für *in vivo* Experimente zu ermitteln, wurde eine Titration durchgeführt. Dafür wurden DIETER I Mäuse am Rücken rasiert und mit 0, 5, 25, 100 oder 250 µg 4OH-TAM in einer Ethanol/Wasser/DMSO Lösung am Rücken an zwei aufeinander folgenden Tagen behandelt. Zusätzlich wurden den Mäusen anti-CD40 i.v. injiziert. Nach 10 Tagen wurde den Tieren Blut entnommen und auf CD8 positive GP<sub>33-41</sub> Tetramer positive T-Zellen im Durchflusszytometer analysiert.

Die Vehikel behandelte Gruppe zeigte ca. 0,3% Tetramer<sup>+</sup> Zellen aller CD8 T-Zellen. Die Behandlung mit 5 µg 4OH-TAM zeigte eine leichte Induktion einer GP<sub>33-41</sub> spezifischen CD8 T-Zell Antwort (1%).

Bei Behandlung mit 25 µg lag der GP<sub>33-41</sub> spezifische Anteil der CD8 T-Zellen bei 2,7%, mit 100 µg bei 3,7% und mit 250 µg bei 2,3%. Die 4OH-TAM Sättigung war damit bei der Behandlung mit 25 µg 4OH-TAM erreicht. Somit wurde für alle folgenden Versuche 20 µg 4OH-TAM verwendet (Abb. 3A).

Um zu testen wie stabil diese CTL Antwort über einen längeren Zeitraum ist und wann der Höhepunkt zu erwarten ist wurde eine Kinetik über 26 Tage durchgeführt. Dazu wurden DIETER I Mäuse mit 20 µg 4OH-TAM oder Vehikel auf dem Rücken an zwei aufeinander folgenden Tagen oder einmalig mit 2 mg TAM i.p. behandelt. Zusätzlich bekamen alle Mäuse 50 µg anti-CD40 i.v. injiziert. An verschiedenen Zeitpunkten wurde den Tieren Blut entnommen und im Durchflusszytometer auf GP<sub>33-41</sub> spezifische CD8 T-Zellen untersucht.

Sowohl die induzierte GP<sub>33-41</sub> spezifische CTL Antwort durch Behandlung mit 4OH-TAM, als auch mit TAM i.p. hatten ihr Maximum an Tag 12 (19,8% und 7,1%). Im Blut konnten bis Tag 26 nach Behandlung spezifische T-Zellen nachgewiesen werden. Bei der 4OH-TAM Behandlung sank der Anteil an allen CD8 T-Zellen im Blut bis Tag 29 dabei bis auf 3,2%, nach TAM i.p. Behandlung auf 13,7%.

## Ergebnisse

---

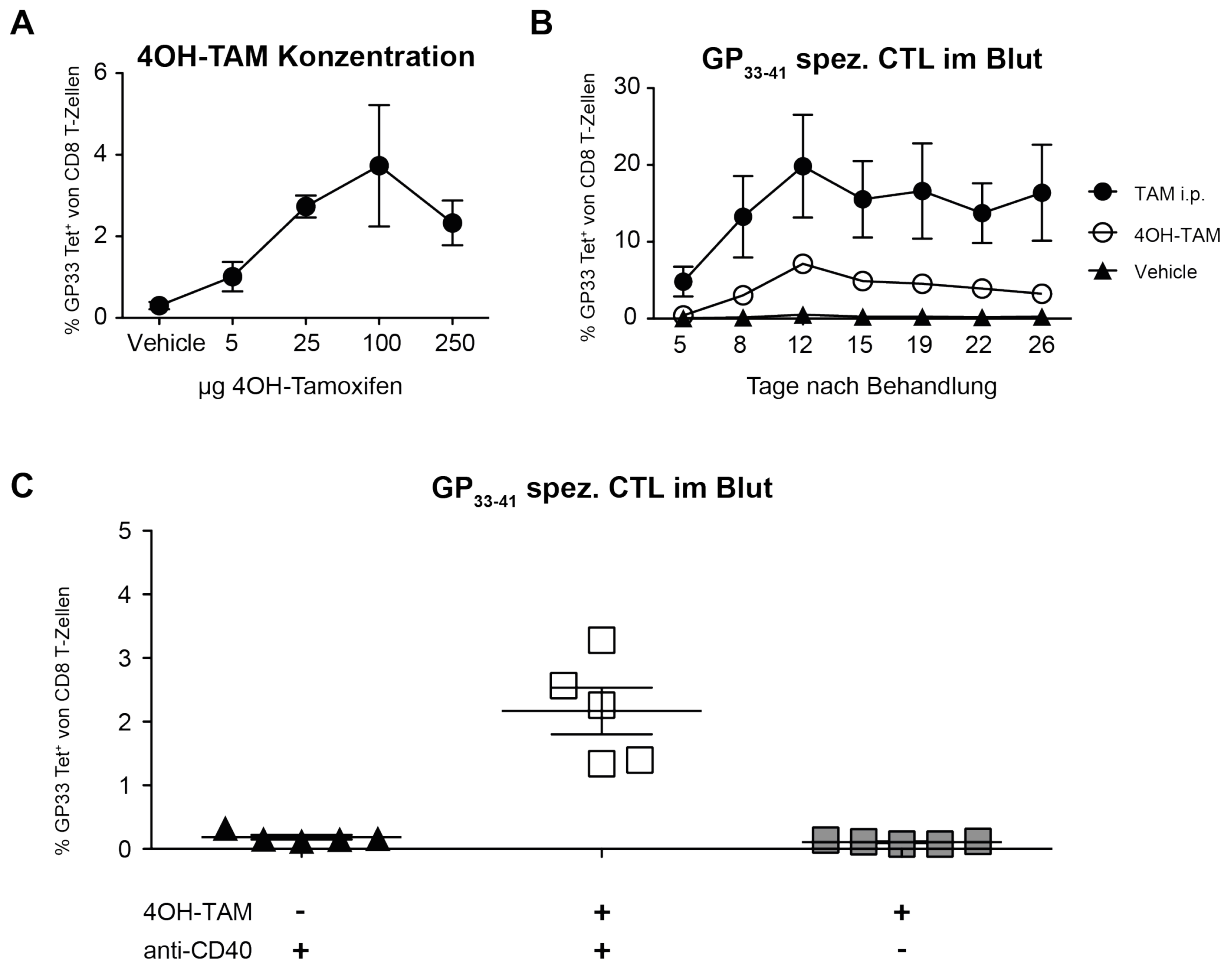
Topische Applikation von 4OH-TAM auf die Rückenhaut impliziert, dass die Mäuse rasiert werden. Da die Rasur durch Hautirritation Maturation von Haut DCs auslösen könnte wurde getestet ob diese zusammen mit 4OH-TAM eine GP<sub>33-41</sub> spezifische CTL induzieren kann.

Dafür wurden DIETER I Mäuse rasiert und mit 4OH-TAM auf der Rückenhaut behandelt. Eine Versuchsgruppe erhielt zusätzlich 4OH-TAM und eine Gruppe nur anti-CD40 i.v..

Rasieren der Haut, was zur Irritationen und das wiederum zur Aktivierung von DCs führen kann, zeigte keine GP<sub>33-41</sub> spezifische CTL Antwort. Hingegen führte die 4OH-TAM Behandlung und Stimulation mit anti-CD40 zur Induktion einer CTL Antwort in der GP<sub>33-41</sub> spezifische CTL ca. 2% aller CD8 T-Zellen ausmachten (Abb. 3C).

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zeigen, dass 20 µg 4OH-TAM für die topikale Behandlung auf der Haut ausreichend sind um eine über längere Zeit stabile GP<sub>33-41</sub> spezifische CTL Antwort auszulösen. Die 4OH-TAM Behandlung wirkt spezifisch auf Haut DCs welche in die drainierenden Lymphknoten einwandern und dort auf T-Zellen treffen können. Rasieren alleine induziert keine GP<sub>33-41</sub> spezifische CTL Antwort.

# Ergebnisse



**Abbildung 3: Behandlung mit 4OH-Tamoxifen induziert GP<sub>33-41</sub> Expression und Präsentation von migratorischen DCs, die spezifische CD8 T-Zellen induzieren können.**

(A) DIETER I Mäuse wurden mit verschiedenen Konzentrationen 4OH-TAM an zwei aufeinander folgenden Tagen behandelt und bekamen einmalig während der ersten Behandlung 50 µg anti-CD40 i.v. injiziert. Nach 10 Tagen wurden die GP<sub>33-41</sub> spezifischen CD8 T-Zellen im Blut ermittelt. (B) DIETER I Mäuse wurden mit 20 µg 4OH-TAM an zwei Tagen, einmalig mit 2 mg TAM i.p. oder PBS i.p. behandelt und 50 µg anti-CD40 i.v. injiziert. An den indizierten Tagen wurden die GP<sub>33-41</sub> spezifischen CD8 T-Zellen im Blut ermittelt. (C) DIETER I Mäuse wurden an zwei Tagen mit 4OH-TAM auf der Haut und wie angegeben zusätzlich mit anti-CD40 i.v. behandelt. Nach 10 Tagen wurde der Anteil an GP<sub>33-41</sub> spezifischen CD8 T-Zellen im Blut ermittelt. Gezeigt sind die Mittelwerte (±SD) aus einem Experiment mit n=5.

## Ergebnisse

---

### 4.1.4 DCs in der Haut induzieren GP<sub>33-41</sub> spezifische „*skin homing*“ CD8 T-Zellen, die gegen Hautinfektion mit rekombinanten GP<sub>33-41</sub> exprimierenden *Vaccinia* protektieren

T-Zellen, die mit Antigenen aus der Haut stimuliert werden, zeigen Expression von E- und P-Selektin Liganden. Endothelzellen in entzündlichem Gewebe exprimieren hingegen den Bindungspartner E- bzw. P-Selektin. Dies ermöglicht es den T-Zellen nach Verlassen der peripheren Lymphatischen Organe und Eintreten in den Blutkreislauf mit E- bzw. P-Selektin exprimierenden Endothelzellen zu interagieren und über Diapedese in das entzündete Gewebe einzudringen (Zarbock et al. 2009; Butcher & Picker 1996; Akdis et al. 1999). Die Fähigkeit der T-Zellen spezifisch in Hautgewebe einwandern zu können wird auch als „*skin homing*“ bezeichnet (Ley & Kansas 2004; Ley et al. 2007; Sheridan & Lefrançois 2011).

Um zu überprüfen ob Haut DCs von DIETER I Mäusen nach der Behandlung mit 4OH-TAM und anti-CD40 einen „*skin homing*“ Phänotyp auf T-Zellen medieren, wurden DIETER I Mäuse mit 4OH-TAM topikal und anti-CD40 i.v. behandelt. Als Vergleich zu systemisch induzierten GP<sub>33-41</sub> spezifischen CD8 T-Zellen bekam eine Gruppe 2 mg Tamoxifen intraperitoneal. Eine weitere Gruppe wurde mit Vehikel und anti-CD40 i.v. behandelt. Nach 10 Tagen wurde die Frequenz an GP<sub>33-41</sub> spezifischen CD8 T-Zellen im Blut und die Expression von E- und P-Selektin Ligand auf diesen Zellen im Durchflusszytometer bestimmt.

Die Gabe von TAM i.p. und anti-CD40 i.v. induzierte an Tag 10 nach Behandlung eine GP<sub>33-41</sub> spezifische CTL Antwort, die 15-20% aller CD8 T-Zellen im Blut ausmachte, wohingegen die Behandlung mit 4OH-TAM zu einem GP<sub>33-41</sub> spezifischen Anteil von ca. 2% aller CD8 T-Zellen führte. Bei den Vehikel behandelten Tieren war der GP<sub>33-41</sub> spezifische Anteil der CD8 T-Zellen unter 0,5% (Abb. 4A).

Von den systemisch induzierten spezifischen CD8 T-Zellen waren 28,8% E-Selektin Ligand (ESL) und zu 38% P-Selektin Ligand (PSL) positiv. Durch Haut DCs induzierte spezifische CD8 T-Zellen waren zu 77% ESL und zu 80,7% PSL positiv. Nicht GP<sub>33-41</sub> spezifische CD8 T-Zellen hatten einen ESL positiven Anteil von 9,8%-19% und einen PSL positiven Anteil von 15,7%-28,7% (Abb. 4B).

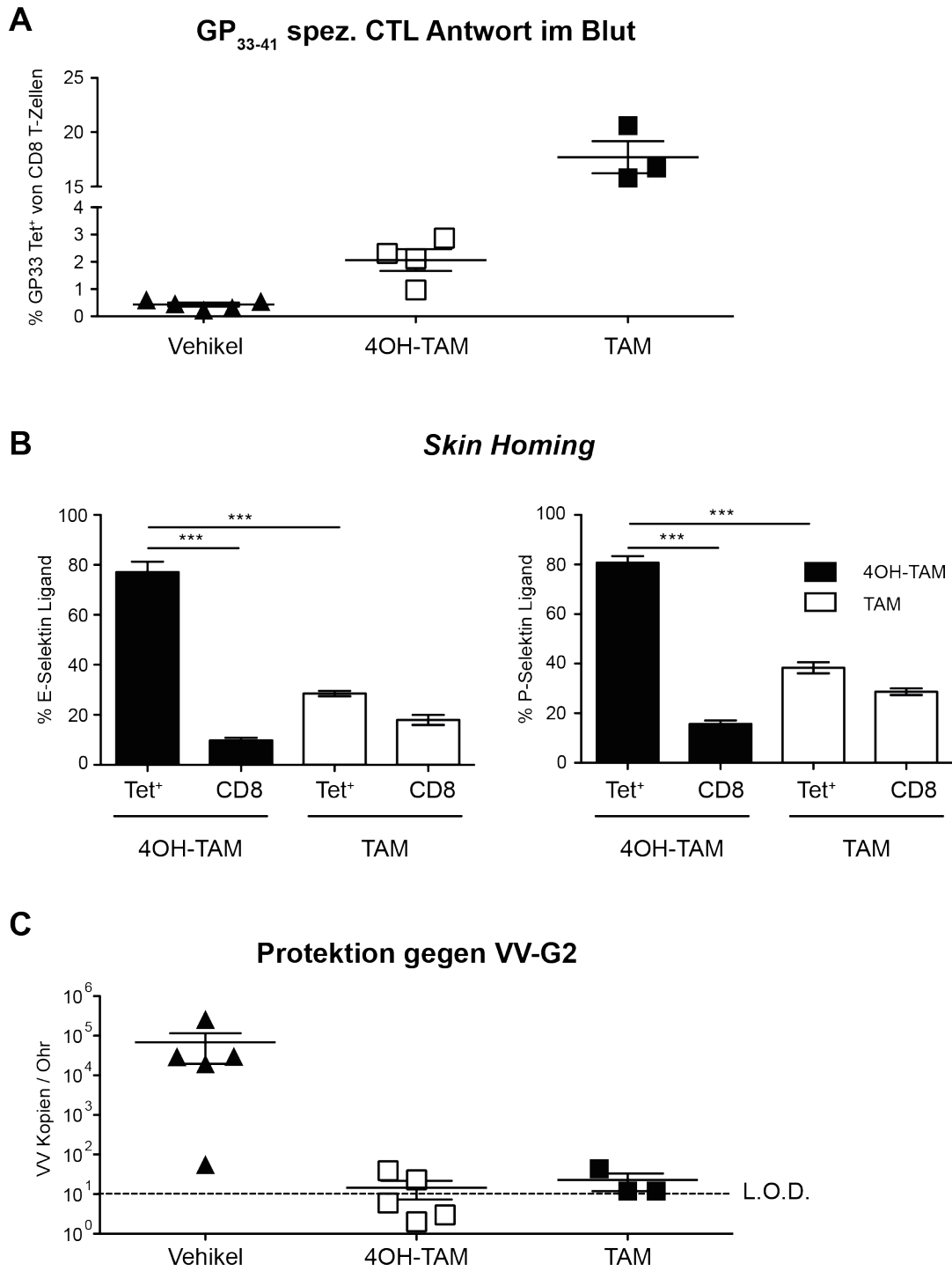
## Ergebnisse

---

Um die funktionelle Qualität dieser GP<sub>33-41</sub> spezifischen CTL Antwort zu testen wurde untersucht ob die GP<sub>33-41</sub> spezifische CTL in der Lage war Protektion gegen eine *Vaccinia* Infektion der Haut zu vermitteln. Dazu wurden die Mäuse am Tag 11 nach Tamoxifen-Behandlung mit  $2 \cdot 10^6$  pfu rekombinanten VV-G2 via *skin scarification* (s.s.) an einem Ohr infiziert. Sechs Tage nach Infektion wurde das behandelte Ohr entnommen und mit Proteinase K verdaut und mittels einer real time-PCR die vorhandene *Vaccinia* DNA Konzentration im Gewebe festgestellt.

Infizierte WT Tiere wiesen ca.  $10^5$  VV Genom Kopien auf. Sowohl die TAM i.p. behandelten, als auch die 4OH-TAM behandelten DIETER I Mäuse zeigten im Schnitt ca  $10^1$  Kopien pro Probe. Damit konnte gezeigt werden, dass die durch 4OH-TAM induzierte GP<sub>33-41</sub> spezifische CTL Antwort (Abb. 4A) ausreicht um eine Hautinfektion mit VV-G2 abzuwehren (Abb. 4C).

# Ergebnisse



**Abbildung 4: DCs in der Haut induzieren GP<sub>33-41</sub> spezifische „skin homing“ CD8 T-Zellen, die gegen rekombinantes GP<sub>33-41</sub> exprimierendes Vaccinia (s.s.) protektieren.**

DIETER I Mäuse wurden mit 4OH-TAM oder Vehikel an zwei aufeinander folgenden Tagen auf der Rückenhaut oder einmalig mit 2 mg TAM i.p. behandelt. Diese Tiere erhielten des Weiteren 50 µg anti-CD40 i.v.. (A) Nach 10 Tagen wurde der Anteil der GP<sub>33-41</sub> spezifischen CD8 T-Zellen im Blut ermittelt und (B) die Expression von E- und P-Selektin Ligand bestimmt. (C) Am Folgetag wurden die Mäuse mit 2\*10<sup>6</sup> pfu VV-G2 an einem Ohr infiziert und 7 Tage später der Virustiter in dem Gewebe gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte (±SD) aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit n=3-5. ; \*\*\*p<0,001; ungepaarter t-Test.



## Ergebnisse

---

### 4.1.5 Mit Hilfe von LangDTR und Batf3<sup>-/-</sup> Mäusen kann die Funktion verschiedener DC Subtypen in der Haut analysiert werden

Die Funktionen verschiedener DC Subpopulationen in der Haut sind noch weitestgehend unklar.

Langerhans Zellen wird in einigen Studien eine tolerogene Rolle zugeschrieben, CD207<sup>+</sup> dermale DCs können hingegen in vielen Mausmodellen eine starke CD8 T-Zell Antwort auslösen, die allerdings vor allem auf Kreuzpräsentation von Antigenen beruht (Idoyaga et al. 2013; Flacher et al. 2014; Guilliams, Henri, et al. 2010; Henri et al. 2010; Seneschal et al. 2014).

Um die funktionelle Rolle von Haut DCs *in vivo* zu untersuchen, können verschiedene Mausmodelle herangezogen werden. LangDTR Mäuse exprimieren den *Diphtherie Toxin* (DT) Rezeptor unter der Kontrolle des murinen Langerin Promoters. Mit verschiedenen Methoden der DT Darreichung können Langerhans Zellen (LC) oder alle Langerin<sup>+</sup> (CD207) Zellen in der Haut depletiert werden (Kissenpennig et al. 2005; Henri et al. 2010).

Durch Verwendung von Knochenmarks Chimären, bei denen C57BL/6 Mäuse letal bestrahlt und das Immunsystem mit Knochenmark von DIETER I Mäusen substituiert wird, ist ein Modell verwendbar, bei dem LCs des Rezipienten erhalten bleiben, dermale DCs aber aus dem Knochenmark des Donors generiert werden (Merad et al. 2002).

Ein weiteres Mausmodell in dem dermale CD207<sup>+</sup> DCs abwesend sind, sind Batf3 defiziente Mäuse. Der Transkriptionsfaktor Batf3 ist essenziell sowohl für die Entwicklung von CD207<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> DDCs, also auch für CD207<sup>+</sup> CD103<sup>-</sup> DDCs (Malissen et al. 2014; Tussiwand et al. 2012; Edelson et al. 2011; Guilliams, Henri, et al. 2010).

Um zu überprüfen ob LangDTR<sup>+</sup> Mäuse mittels DT Injektion von Langerin<sup>+</sup> DCs depletiert werden können und Batf3<sup>-/-</sup> Mäuse keine Langerin<sup>+</sup> dermalen DCs ausbilden, wurden LangDTR<sup>+</sup> mit DT behandelt. Dafür blieb eine Gruppe unbehandelt, während eine Gruppe mit 1 µg DT i.v. an Tag 6 und 1 vor Analyse behandelt („DT-1“) wurde. Des Weiteren wurden Wildtyp Mäuse (Batf3<sup>+/+</sup>) und Batf3 defiziente Mäuse (Batf3<sup>-/-</sup>) miteinander verglichen.

## Ergebnisse

---

Am Tag der Analyse wurden die Ohren sowie die drainierenden Lymphknoten entnommen und dendritische Zellen isoliert. Anschließend wurden die Zellen für die Durchflusszytometrie gefärbt und analysiert.

In der Epidermis konnten bei der „DT-1“-Gruppe keine Langerhans Zellen nachgewiesen werden. In der Dermis konnten ebenfalls keine LCs nachgewiesen werden. Die Langerin<sup>+</sup> DDCs waren in der Dermis von ca. 2,04% auf 0,1% aller dermalen DCs reduziert worden.

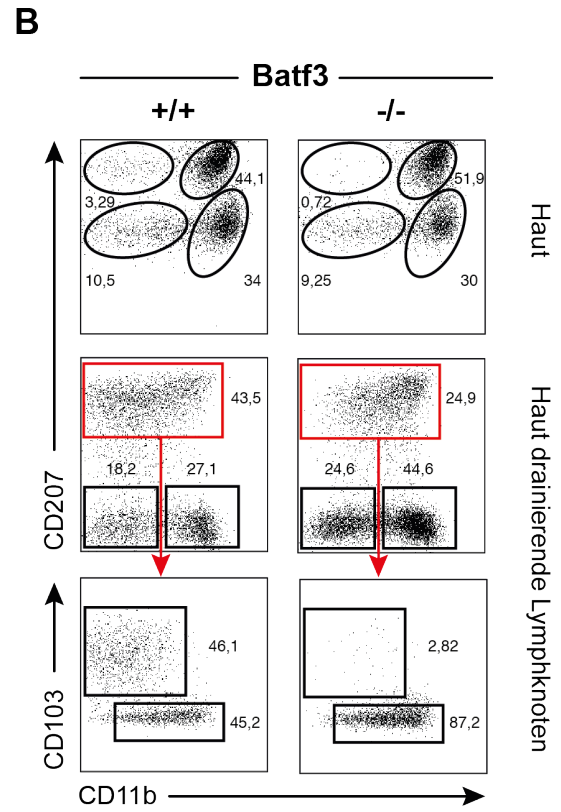
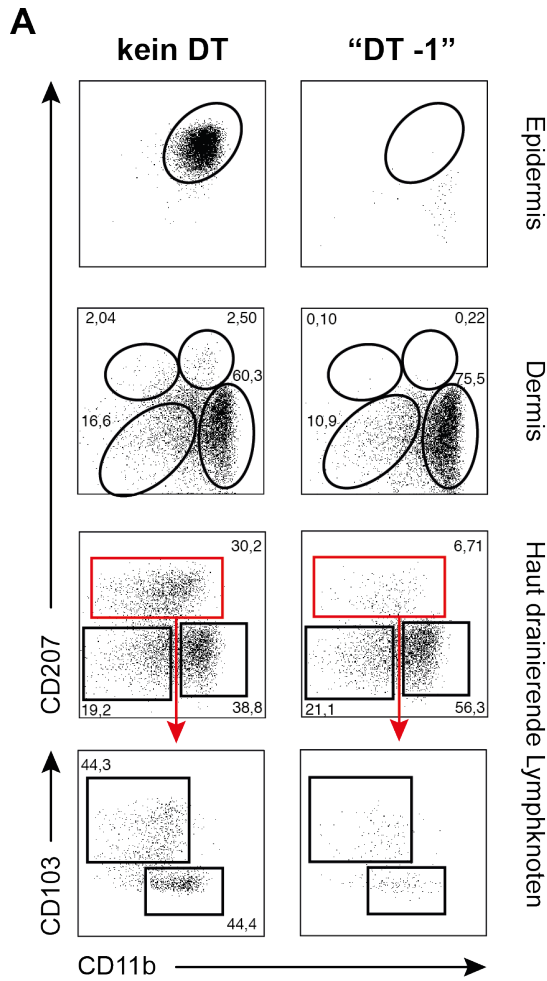
In den Lymphknoten konnten die CD207<sup>+</sup> migratorischen DCs in der „DT-1“-Gruppe von 30,2% auf 6,71% aller migratorischen DCs reduziert werden, das Verhältnis zwischen CD103<sup>+</sup> (ca. 44%) und CD103<sup>-</sup> (ca. 43%) blieb dabei gleich (Abb. 5A).

In der Haut von Batf3<sup>-/-</sup> Mäusen waren CD11b<sup>+</sup> DDCs, CD207<sup>-</sup> CD11b<sup>-</sup> (DN) DDCs und LC in ähnlicher Frequenz vorhanden. CD207<sup>+</sup> DDCs waren in Wildtyp Mäusen mit ca. 3,29%, in Batf3<sup>-/-</sup> Mäusen mit ca. 0,72% aller Haut DCs vertreten (Abb. 5B). In den Lymphknoten exprimierten in Wildtyp Mäusen 43,5% aller CD11c<sup>+</sup> MHC II<sup>+</sup> Langerin (CD207), von diesen CD207<sup>+</sup> DC waren ca. 46% CD103<sup>+</sup> dDC, der Rest war CD103<sup>-</sup>. Batf3<sup>-/-</sup> Mäuse hatten lediglich 24,9% CD207<sup>+</sup> DCs, davon 87,2% CD103<sup>-</sup> und 2,82% CD103<sup>+</sup> DCs (Abb. 5B). Die CD207<sup>+</sup> CD103<sup>-</sup> Population der drainierenden Lymphknoten ist zum größten Teil den LCs zuzuordnen. Da in der Haut keine CD207<sup>+</sup> CD103<sup>-</sup> DDCs detektierbar waren ist davon auszugehen, dass diese auch nicht in migratorischen DCs der dLN wiederzufinden sind.

Dies deckte sich mit aktueller Literatur, welche die Abhängigkeit der Entwicklung dermalen CD207<sup>+</sup> DCs von diesem Transkriptionsfaktor beschreibt (Malissen et al. 2014).

Die Ergebnisse zeigen, dass bei Kreuzen von LangDTR und Batf3<sup>-/-</sup> mit den DIETER I Transgenen, sowie der Verwendung von Knochenmarks Chimären (BMCs) Modelle entstehen, die es ermöglichen die Präsentation von GP<sub>33-41</sub> auf definierten DC Subpopulationen in der Haut zu verhindern. Entweder in dem diese die Transgene der DIETER I nicht tragen (LCs bei DIETER I → C57BL/6 BMCs; DDCs bei B6 → DIETER I BMCs) oder die Subpopulationen depletierbar bzw. abwesend sind (Abb. 5C).

# Ergebnisse



**C**

	DIETER	DIETER -> B6	Lang-DTR/DIETER -> B6 (DT-1)	Batf3 <sup>-/-</sup> /DIETER -> B6 (DT-1)	B6 -> DIETER
LC	+	-	-	-	+
CD207 <sup>+</sup> CD103 <sup>+</sup> DDC	+	+	-	-	-
CD207 <sup>+</sup> CD103 <sup>-</sup> DDC	+	+	-	-	-
CD11b <sup>+</sup> DDC	+	+	+	+	-
DN DDC	+/-	+/-	+/-	+/-	-
moDC	+	+	+	+	-
dermale Makrophagen	+	+	+	+	-

## Ergebnisse

---

**Abbildung 5: Mit Hilfe von LangDTR und Batf3<sup>-/-</sup> Mäusen kann die Funktion verschiedener DC Subtypen in der Haut analysiert werden.**

(A) LangDTR Mäuse wurden mit je 1 µg *Diphtherie Toxin* (DT) i.p. 6 und 1 Tag vor Analyse behandelt und DC Subtypen in der Haut und drainierenden Lymphknoten im Durchflusszytometer untersucht. (B) Batf3<sup>+/+</sup> und Batf3<sup>-/-</sup> Mäuse wurden in Haut und drainierenden Lymphknoten auf DC Subtypen durchflusszytometrisch untersucht. (C) Darstellung verschiedener DIETER I Modelle, die es ermöglichen GP<sub>33-41</sub> auf verschiedenen DC Subtypen zu induzieren. Gezeigt sind beispielhafte Daten der Durchflusszytometrie aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit n=3-5.

## Ergebnisse

---

### 4.1.6 CD11b<sup>+</sup> DDCs sind kompetent eine funktionelle „*skin homing*“ CTL Antwort auszulösen

Um zu untersuchen ob CD11b<sup>+</sup> DDCs eine funktionelle „*skin homing*“ CTL Antwort induzieren können, wurden verschiedene Mausmodelle (Abb. 5C) kombiniert. Um dabei zu verhindern, dass ein möglicher immunologischer Effekt durch Zerstören des empfindlichen Netzwerkes der dendritischen Zellen in der Haut entsteht in dem ganze DC Subpopulationen depletiert werden, wurden gemischte Knochenmarks Chimäre (BMCs) verwendet. Indem C57BL/6J Mäuse letal bestrahlt wurden und mit 50% Knochenmark von LangDTR x DIETER I (Ly5.2) und 50% Knochenmark von Wildtyp (Ly5.1) rekonstituiert wurden, wurde ermöglicht, alle CD207<sup>+</sup> DC die das DIETER I Transgen tragen zu depletieren und dabei verhindert, dass die vollständige Depletion einzelner Subpopulationen mögliche Nebeneffekte auslöst.

Um zu überprüfen ob ausschließlich CD207<sup>+</sup> DC für das *priming* einer funktionellen GP<sub>33-41</sub> spezifischen CTL Antwort verantwortlich sind oder CD11b<sup>+</sup> DDCs eine funktionelle „*skin homing*“ CTL Antwort induzieren können wurden DIETER I Mäuse, gemischte Knochenmarks Chimäre DIETER I + Ly5.1 → B6 BMCs, LangDTR x DIETER I + Ly5.1 → B6 BMCs („DT-1“), Batf3<sup>-/-</sup> x DIETER I + Ly5.1 → B6 BMCs, C57BL/6 → DIETER I BMCs und Wildtyp Mäuse mit 5\*10<sup>4</sup> P14-Zellen adoptiv transferiert. Durch adoptiven Transfer von GP<sub>33-41</sub> spezifischen T-Zellen wurde dabei die Sensitivität erhöht, um der geringeren Anzahl an DCs in gemischten Chimären bzw. dem Fehlen der CD207<sup>+</sup> Zellen als APCs nach Depletion Rechnung zu tragen. Einen Tag später wurden die Mäuse auf dem Rücken mit 4OH-TAM und anti-CD40 i.v. behandelt. Die 4OH-TAM Behandlung erfolgte am nächsten Tag erneut. Die „DT-1“ Gruppe wurde durch i.p. Injektion von DT an Tag 6 und 1 vor der Behandlung, sowie an jeden zweiten weiteren Tag von Langerin<sup>+</sup> DDCs depletiert.

9 Tage nach der ersten Behandlung wurde den Mäusen retroorbital Blut entnommen, und GP<sub>33-41</sub> spezifischen CD8 T-Zellen durchflusszytometrisch quantifiziert, sowie deren P- und E-Selektin Ligand Expression analysiert. An Tag 10 wurden die Mäuse mit 2\*10<sup>6</sup> pfu VV-G2 via s.s. im Ohr infiziert. Sieben Tage später wurde mittels Plaque Assay die Konzentration von infektiösem *Vaccinia* im infizierten Ohr ermittelt.

## Ergebnisse

---

9 Tage nach Behandlung waren durchschnittlich 29% der CD8 T-Zellen im Blut der DIETER I Mäuse GP<sub>33-41</sub> spezifisch. Präsentieren nur dermale DCs GP<sub>33-41</sub> (DIETER I + Ly5.1 → C57BL/6) waren von den CD8 T-Zellen im Blut ca. 21% GP<sub>33-41</sub> spezifisch. Konnten nur CD11b<sup>+</sup> DDCs GP<sub>33-41</sub> präsentieren waren 16,6% („DT-1“) bzw. 18% (Batf3<sup>-/-</sup> x DIETER I → C57BL/6) der CD8 T-Zellen im Blut GP<sub>33-41</sub> spezifisch. Die Präsentation ausschließlich durch Langerhans Zellen führte in keinem Experiment zu einer messbaren CTL Antwort (Abb. 6A).

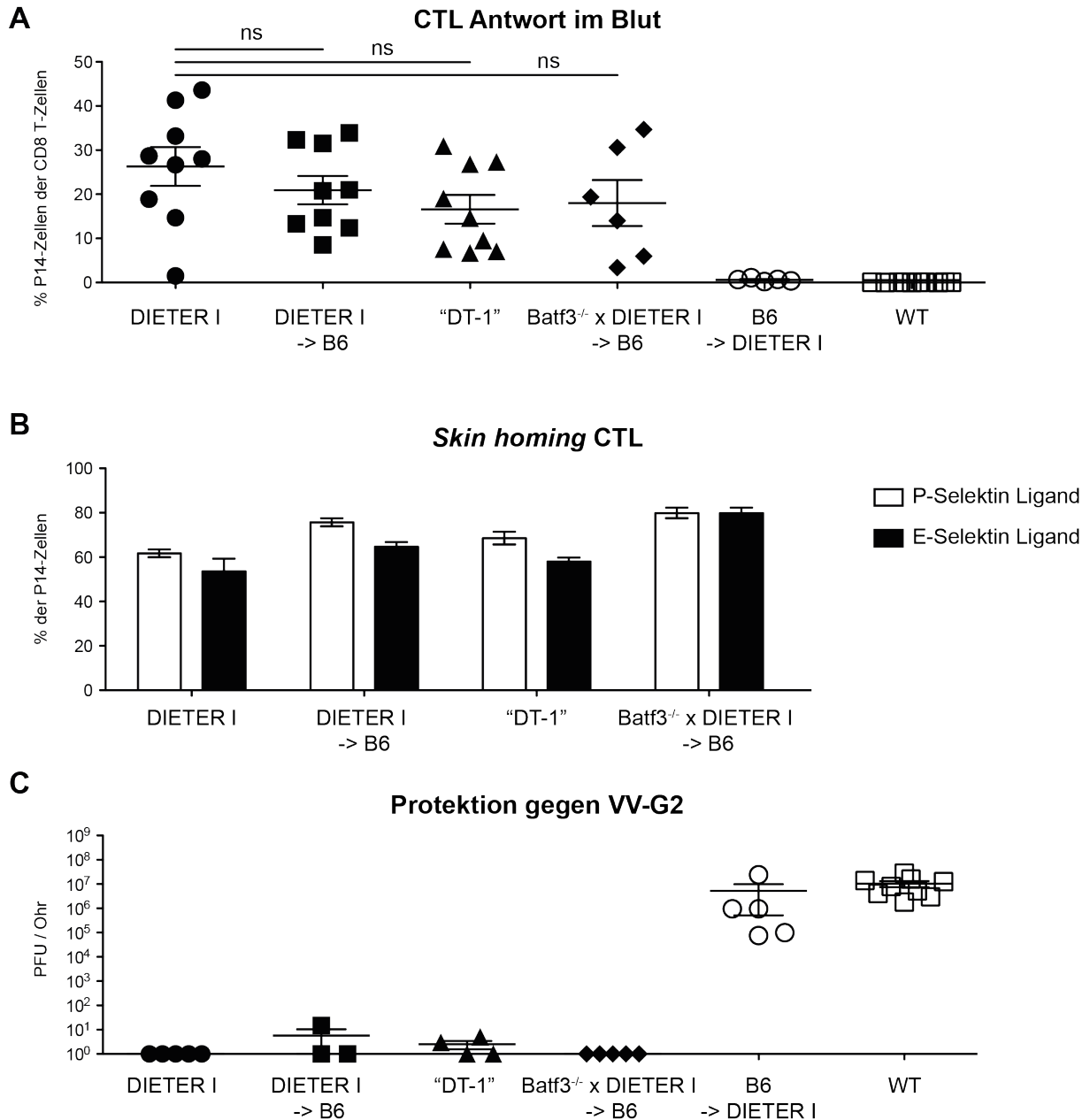
Die Reduktion der spezifischen CTL der DIETER I Gruppe zu allen anderen Gruppen kann durch die reduzierte totale Anzahl an GP<sub>33-41</sub> präsentierenden dermalen DCs erklärt werden, die durch den gemischten Chimärismus zustande kommt.

Die Expression von E-Selektin Ligand der GP<sub>33-41</sub> spezifischen Lymphozyten lag bei 54%-80%, die von P-Selektin Ligand bei 62%-80% (Abb. 6B).

In den Ohren der mit anti-CD40 behandelten Wildtyp Mäuse wurden 7 Tage nach Infektion  $1 \cdot 10^7$  pfu *Vaccinia Virus* pro Ohr gemessen. C57BL/6 → DIETER I BMCs wiesen einen Virustiter von  $5,2 \cdot 10^6$  pfu pro Ohr auf. Alle anderen Gruppen hatten eine Viruslast zwischen 0 und 5,7 pfu pro Ohr (Abb. 6C).

Dermale DCs induzierten eine GP<sub>33-41</sub> spezifische „*skin homing*“ CTL Antwort, die gegen eine *Vaccinia* Infektion in der Haut protektiv war. CD11b<sup>+</sup> dermale DCs waren dabei auch alleine fähig eine protektive spezifische CTL Antwort zu medieren. LCs alleine hingegen konnten weder eine spezifische CTL Antwort noch eine Protektion gegen eine *Vaccinia* Infektion in der Haut bewirken.

# Ergebnisse



## Abbildung 6: CD11b<sup>+</sup> DDCs reichen aus um eine protektive „skin homing“ CTL Antwort auszulösen.

DIETER I und gemischte Knochenmarkchimäre DIETER I + WT → B6, LangDTR x DIETER I + WT → B6, Batf3<sup>-/-</sup> x DIETER I + WT → B6 oder B6 → DIETER I wurden adoptiv mit 5\*10<sup>4</sup> P14-Zellen transferiert und mit 4OH-TAM auf der Haut an zwei Tagen behandelt. Zusätzlich wurden 50 µg anti-CD40 i.v. verabreicht. Die „DT-1“ Gruppe bekamen an Tag 6 und 1 vor der 4OH-TAM Behandlung, sowie an jedem zweiten Tag danach 1 µg *Diphtherie Toxin* i.p. verabreicht. (A) Nach 10 Tagen wurde den Mäusen Blut entnommen und der Anteil an GP<sub>33-41</sub> spezifischen CD8 T-Zellen im Blut untersucht sowie (B) die Expression von P- und E-Selektin Ligand. (C) Am Folgetag wurde je ein Ohr der Mäuse mit 2\*10<sup>6</sup> pfu VV-G2 über s.s. infiziert. Sieben Tage später wurde der Virustiter des infizierten Ohres mit Hilfe eines Plaque Assay bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte (±SD) aus zwei unabhängigen Experimenten mit n=3-5. ns p>0,05; ungepaarter t-Test.

## Ergebnisse

---

### 4.1.7 Dermale DCs können Haut residente Memory T-Zellen reaktivieren

Nachdem CD8 T-Zellen von dendritischen Zellen aktiviert worden sind beginnen sie zu proliferieren und wandern aus den peripheren lymphatischen Organen aus. Über den Blutstrom verteilen sie sich im Körper und gelangen so zum Infektionsherd. Dort erkennen sie ihr spezifisches Antigen auf infizierten Zellen über MHC-Klasse I Moleküle und zerstören die infizierten Zellen und erzeugen durch die Sekretion von IFN- $\gamma$  einen infektionshemmenden Zustand.

Während der akuten Infektion ist die Mehrzahl der im Körper zirkulierenden spezifischen CD8 T-Zellen den Effektor T-Zellen ( $T_{\text{eff}}$ ) anzurechnen, die nach Abklingen der Infektion in Apoptose gehen.

Ein Teil der CTLs differenziert zu langlebigen Subpopulationen. CD8 *tissue resident memory* T-Zellen ( $T_{\text{RM}}$ ) sind langlebige T-Zellen, welche im Zielgewebe verharren und dort einen effektiven Schutz vor erneutem Eindringen von Pathogenen bieten (Ariotti et al. 2014; Jiang et al. 2012; Schenkel & Masopust 2014; Zaid et al. 2014).  $T_{\text{RM}}$  T-Zellen in der Haut besiedeln vor allem die Epidermis und bleiben in dieser anatomischen Nische. (Zaid et al. 2014).

Um die Reaktivierung der  $T_{\text{RM}}$  durch DCs untersuchen zu können, wurde ein Experiment etabliert, welches es zum Einen möglich macht GP<sub>33-41</sub> spezifische  $T_{\text{RM}}$  zu induzieren und zum Anderen die Präsentation von GP<sub>33-41</sub> durch DCs in der Haut zu induzieren. Dazu wurden DIETER I Mäuse mit  $5 \cdot 10^5$  CD45.1<sup>+</sup> P14-Zellen adoptiv transferiert. Am nächsten Tag wurden die Mäuse mit  $2 \cdot 10^6$  pfu am Ohr infiziert. In der akuten Infektionsphase an Tag 7 und in der Memory Phase an Tag 30 wurden die Zellen aus den Ohren isoliert und im Durchflusszytometer analysiert. An Tag 7 nach Infektion waren ca. 5% der Zellen im Ohr GP<sub>33-41</sub> spezifische P14-Zellen. In der Memory Phase reduzierte sich der Anteil auf etwa 2%. Weniger als 5% der T-Zellen in der akuten Phase besaßen CD103 auf ihrer Zelloberfläche und ca. 20% CD69, während ca. 60%  $T_{\text{RM}}$  CD103 positiv waren und etwa 80% CD69 exprimierten (Abb. 7A).

Um zu überprüfen ob DCs in der Haut in der Lage sind  $T_{\text{RM}}$ -Zellen zu reaktivieren und um einen geeigneten Zeitpunkt für die Analyse zu bestimmen wurde zunächst eine kinetische Analyse durchgeführt. Dazu wurden  $2 \cdot 10^6$  Nur77<sup>GFP+</sup> CD45.1<sup>+</sup> P14-Zellen in DIETER I oder Wildtyp Mäuse adoptiv transferiert und am Folgetag die



## Ergebnisse

---

Ohren der Mäuse mit  $2 \cdot 10^6$  pfu VV-G2 infiziert. In der Memory Phase nach Tag 30 wurden die Ohren der Mäuse mit 4OH-TAM behandelt und nach 24, 48 und 72 Stunden T-Zellen aus der Haut isoliert. Anschließend wurden die  $CD103^+ CD69^+$  TRM Zellen im Durchflusszytometer auf GFP Expression untersucht. Nach 24 Stunden lag die GFP Expression der P14-Zellen in DIETER I Mäusen mit denen in Wildtyp Mäusen auf einem Niveau (ca. 10%). In Wildtyp Mäusen sind 10% der  $Nur77^+$  P14-Zellen GFP positiv. DIETER I Mäuse hingegen zeigten eine GFP Expression in P14-Zellen von 35% nach 48 Stunden und 72 Stunden (Abb. 7B) was zeigt, dass  $T_{RM}$  T-Zellen durch DCs in der Haut reaktiviert werden können.

Um zu untersuchen welche DC Subpopulationen in der Lage sind  $T_{RM}$  zu reaktivieren und antiviralen Status in der Haut zu induzieren wurden  $1 \cdot 10^6$   $Nur77^+$  P14-Zellen mit kongenem Marker CD45.1 in DIETER I Mäuse, DIETER I + Ly5.1  $\rightarrow$  B6 BMCs, LangDTR x DIETER I + Ly5.1  $\rightarrow$  B6 BMCs („DT-1“), C57BL/6  $\rightarrow$  DIETER I BMCs und Wildtyp Mäuse adoptiv transferiert. Am nächsten Tag wurden die Mäuse an beiden Ohren mit je  $2 \cdot 10^6$  pfu VV-G2 infiziert und nach 30 Tagen mit 4OH-TAM an den Ohren behandelt. In der „DT-1“-Gruppe wurde durch Injektion von DT an Tag 6 und 1 vor der 4OH-TAM Behandlung und jeden weiteren zweiten Tag die Langerin<sup>+</sup> dDCs depletiert. 48 Stunden nach der Behandlung wurden die Ohren entnommen. Ein Teil der Ohren wurde entfernt und zur Bestimmung die Expression von IFITM3 mittels quantitativer RT-PCR bestimmt.

Die restliche Haut wurde mit Kollagenase A verdaut und für die Durchflusszytometrie gefärbt um die Antigen spezifische Aktivierung der  $T_{RM}$  über die GFP Expression aus dem  $Nur77GFP$  Transgen zu messen.

Wie im Experiment zuvor (Abb. 7B) wurden durchschnittlich 51% der  $T_{RM}$  in DIETER I Mäusen reaktiviert. Sowohl DIETER I BMCs, als auch die „DT-1“-Gruppe zeigten GFP Expression der  $T_{RM}$  von jeweils etwa 36%, was durch die halbierte Gesamtzahl der DCs in gemischten BMCs erklärt werden kann. In Wildtyp Mäusen zeigten die  $T_{RM}$  eine Grundexpression des GFP von ca. 16%. Die Unterschiede zwischen den beschriebenen Gruppen waren signifikant. Überraschenderweise zeigte die B6  $\rightarrow$  DIETER I Gruppe, deren Langerhans Zellen als einzige  $GP_{33-41}$  präsentieren konnten mit ca. 20% Reaktivierung keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe (Abb. 7C+D).

Diese Experimente zeigen, dass sowohl Langerin<sup>+</sup> dermale DCs, als auch Langerin<sup>-</sup> dermale DCs  $CD8 T_{RM}$  in der Haut reaktivieren können. Obwohl  $CD8 T_{RM}$  in der

## Ergebnisse

---

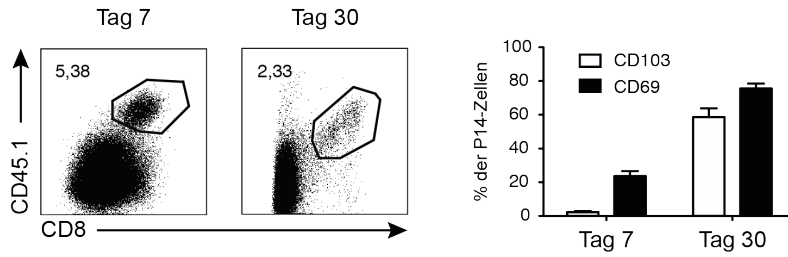
Epidermis verweilen und mit LCs interagieren (Zaid et al. 2014), werden diese nicht von LCs reaktiviert.

Induktion von Antigenexpression DIETER I Mäusen führte zu einer 6,1-fachen Induktion der IFITM3 Expression in der behandelten Haut im Vergleich zu Wildtyp Tieren. In DIETER I + Ly5.1 → B6 BMCs wurde IFITM3 um das 3,1-fache induziert. Wurden die Langerin<sup>+</sup> DDCs mit *Diphtherie Toxin* depletiert, lag die Expression noch bei dem 2,1-fachen. Im Gegensatz dazu konnten Langerhans Zellen alleine keine signifikante IFITM3 Expression in der Haut auslösen. Diese war lediglich 1,4-fach höher als die der Wildtyp Tiere (Abb. 7D).

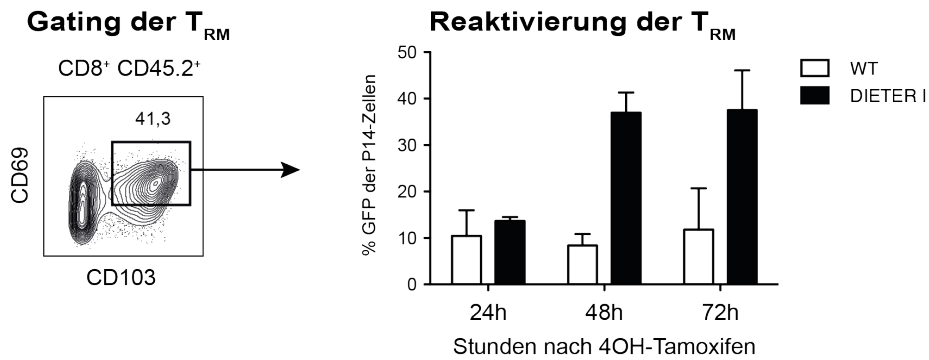
Sowohl auf Expressionsebene von GFP der P14-Zellen als auch auf Expressionsebene der IFITM3 mRNA konnte gezeigt werden, dass dermale DCs CD8 T<sub>RM</sub> reaktivieren und einen antiviralen Status in der Haut auslösen können. Hingegen waren Langerhans Zellen nicht in der Lage CD8 T<sub>RM</sub> zu reaktivieren oder die Expression von IFITM3 in der Haut zu induzieren.

# Ergebnisse

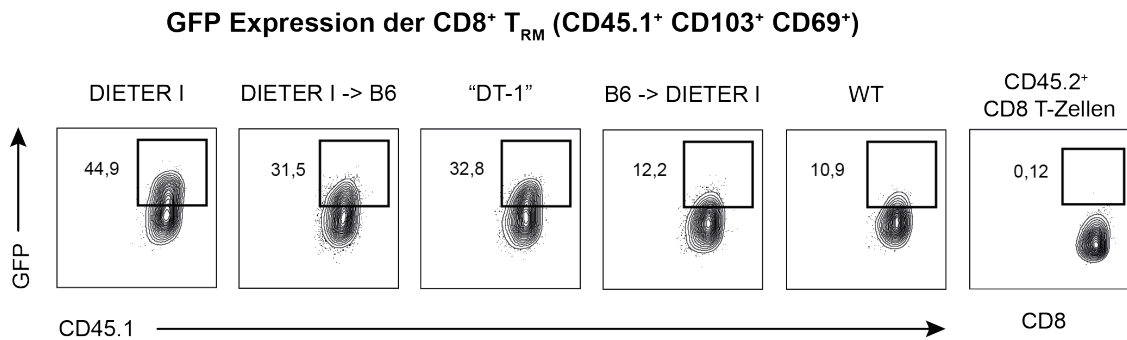
**A**



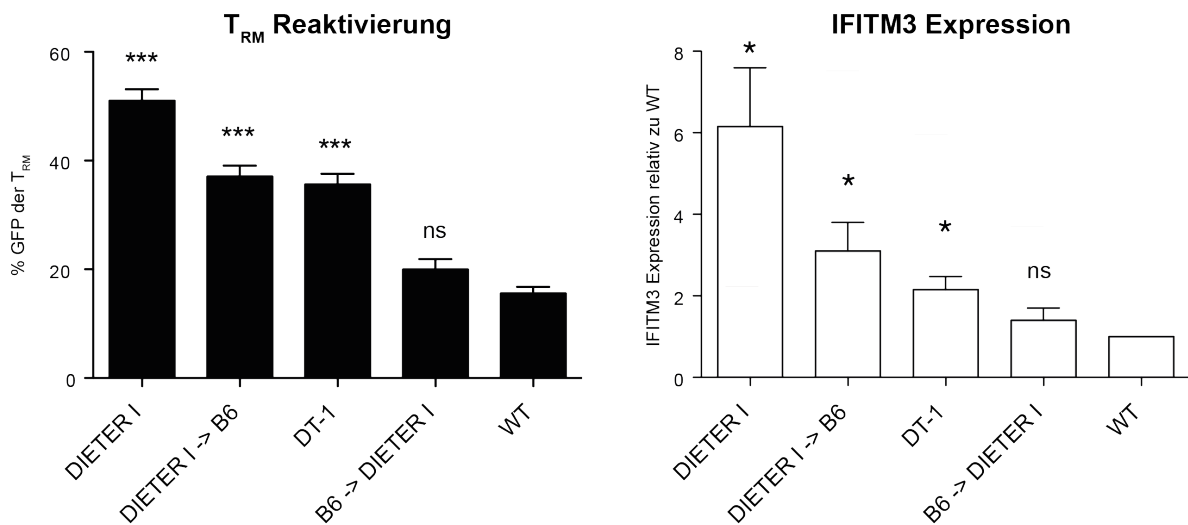
**B**



**C**



**D**



## Ergebnisse

---

### Abbildung 7: Dermale DCs reaktivieren T<sub>RM</sub>, Langerhans Zellen nicht.

10<sup>6</sup> P14-Zellen wurden C57BL/6 Mäusen i.v. adoptiv transferiert und am Folgetag die Ohren der Mäuse mit 2\*10<sup>6</sup> pfu VV-G2 s.s. infiziert. (A) In der akuten Phase an Tag 7 oder Memory Phase an Tag 30 nach Infektion wurden die Zellen aus den Ohren isoliert und im Durchflusszytometer die Expression von CD103 und CD69 bestimmt. (B) WT oder DIETER I Mäuse wurden mit Nur77<sup>+</sup> P14-Zellen adoptiv transferiert und mit VV-G2 am Ohr infiziert. An Tag 30 nach Infektion mit 4OH-TAM am Ohr behandelt und die Tissue-Resident-Memory T-Zellen (T<sub>RM</sub>) 24, 48 und 72 Stunden später isoliert und durchflusszytometrisch die GFP Expression der T<sub>RM</sub> ermittelt. (C+D) DIETER I Mäuse oder verschiedene Knochenmarkchimäre (DIETER I + WT → B6, LangDTR x DIETER I + WT → B6, B6 → DIETER I) oder WT wurden mit Nur77<sup>+</sup> P14-Zellen adoptiv transferiert und mit VV-G2 am Ohr infiziert. Nach 30 Tagen wurden die infizierten Ohren mit 4OH-TAM behandelt und 48 Stunden später T<sub>RM</sub> daraus isoliert. Die „DT-1“ Gruppe bekam an Tag 3 und 1 vor der 4OH-TAM Behandlung sowie an Tag 1 danach 1 µg *Diphtherie Toxin* i.p. verabreicht. Durchflusszytometrisch wurde die GFP Expression der T<sub>RM</sub> ermittelt. Ein Teil der Ohren wurde entfernt und die mRNA isoliert. Mittels real-time-PCR wurde die IFITM3 Expression bestimmt. Als *houeskeeping Gen* wurde HGPRT verwendet. Gezeigt sind Daten aus einem Experiment mit n=5. Mittelwert (±SD); ns p>0,05; \*p≤0,05; \*\*≤0,01; \*\*\*p≤0,001; ungepaarter t-Test.

### 4.2 Teil II

#### 4.2.1 DIETER II Mäuse präsentieren induzierbar OVA<sub>323-339</sub> und aktivieren OT-II Zellen *in vitro*

Das DIETER I Mausmodell kann genutzt werden um die Interaktion zwischen DCs und CD8 T-Zellen zu untersuchen (Probst et al. 2003). Analysen einer CD4 T-Zell Antwort sind mit diesem Mausmodell nicht möglich, da diese Tiere nur MHC-Klasse I restringierte Modellantigene exprimieren.

Daher wurde eine transgene Maus etabliert, welche das MHC-Klasse II restringierte Peptid des Huhn-Ovalbumins (OVA<sub>323-339</sub>) Tamoxifen induzierbar exprimiert und präsentiert. Unter dem CD11c Promoter wurde ein Fusionsprotein des OVA<sub>323-339</sub> mit der invarianten Kette (Ii, *invariant chain*) induzierbar exprimiert. Vor dem Ii-OVA<sub>(323-339)</sub> Fragment wurde eine loxP flankierte STOP Kasette kloniert. Durch die Wahl des CD11c Promoters ist es möglich durch Kombination mit einem zweiten Transgen für eine induzierbare Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines zellspezifischen Promoters eine Situation zu generieren bei der die Expression auf einer spezifischen Zellpopulation möglich ist.

Zusätzlich wurde nach der OVA<sub>(323-339)</sub> Sequenz eine virale 2A-like Sequenz (Donnelly et al. 2001) mit anschließendem eGFP Gen kloniert. Das Konstrukt STOP.Ii.OVA<sub>(323-339)</sub>.eGFP wurde in die EcoRI Seite des Plasmid CD11c.pDOI-5 (Brocker et al. 1997) kloniert (Abb. 8A).

Die Transgene CD11c.STOP.Ii.OVA<sub>(323-339)</sub>.eGFP Maus wurde generiert indem das ca. 10 kb große NotI-Sall Fragment des pCD11c.STOP.Ii.OVA<sub>(323-339)</sub>.eGFP in den Pronucleus von fertilisierten C57BL/6 Oozyten transferiert wurde (Abb. 8A).

Um zu testen ob die transgene Maus funktionsfähige Expression und Präsentation des OVA<sub>323-339</sub> Peptids auf MHC-Klasse II Molekülen besitzt, wurden sie mit Cre-Deleter Mäusen gekreuzt. Die für beide Transgene positiven F1 Nachkommen wurden verwendet um BMDCs herzustellen. Mit diesen wurde ein Nur77 Aktivitätsassay durchgeführt. Dafür wurden die BMDCs an Tag 7 in einer Verdünnungsreihe über Nacht mit Nur77<sup>+</sup> OT-II Zellen inkubiert und am nächsten Tag die GFP Expression der T-Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Zur Kontrolle wurde das Medium von Wildtyp BMDCs mit OVA<sub>323-339</sub> Peptid versetzt.

## Ergebnisse

---

In einem DC : T-Zell Verhältnis von 1:2 induzierten die doppel transgenen BMDCs GFP Expression in ca 60% der OT-II Zellen. Mit jeder Verdünnung nahm die Aktivierung der T-Zellen ab, bis zu einem Verhältnis von 1:1.350, bei dem keine Aktivität mehr messbar war. Die Aktivierung der T-Zellen war vergleichbar mit dem der OVA<sub>323-339</sub> Peptid versetzten Wildtyp BMDCs, welche beim Verhältnis 1:2 eine GFP Expression in 80% der OT-II Zellen aufwies, die ebenfalls bis zu einem Verhältnis von 1:1.350 auf 0% sank (Abb. 8B). Somit waren die BMDCs in der Lage OVA<sub>323-339</sub> zu exprimieren und auf MHC-Klasse II den T-Zellen zu präsentieren.

Um zu überprüfen ob die Expression und Präsentation des OVA<sub>323-339</sub> auch durch Tamoxifen induzierbar war, wurden die transgenen Mäuse mit dem CD11cCreER<sub>T</sub> Stamm gekreuzt. Dadurch entstand die DIETER II Maus (*dendritic cell specific inducible expression of t-cell epitopes on MHC class II*), von der BMDCs generiert wurden um einen Nur77 Aktivitätsassay durchzuführen. Zum Vergleich wurden BMDCs von CD11c.ST.li-OVA.eGFP und Wildtyp Mäusen verwendet. An Tag 6 wurde einem Teil der CD11c.ST.li-OVA.eGFP und der DIETER II BMDCs 4OH-Tamoxifen zugesetzt um die Cre-Rekombinase Aktivität zu induzieren. Anschließend wurde wie zuvor der Nur77 Aktivitätsassay durchgeführt.

Wurden DIETER II BMDCs mit 4OH-TAM behandelt, aktivierten diese in einem DC : T-Zell Verhältnis von 1:1 ca. 50% aller T-Zellen, die Positivkontrolle erreichte etwa 85%. Der Anteil der GFP<sup>+</sup> OT-II Zellen reduzierte sich bei DIETER II BMDCs kontinuierlich bis zu einem Verhältnis von 1:150. DIETER II BMDCs, die ohne 4OH-TAM kultiviert wurden, aktivierten in keiner Verdünnung OT-II Zellen. BMDCs von CD11c.STOP.li-OVA.eGFP transgenen Mäusen aktivierten ebenfalls weder mit noch ohne 4OH-TAM OT-II Zellen *in vitro* (Abb. 8C).

Zusätzlich wurde die Expression des Reporterproteins eGFP in den BMDCs gemessen. Nach Inkubation mit 2 µg 4OH-TAM für 48 Stunden exprimierten 3% der DIETER II BMDCs eGFP (Abb. 8D).

Dies zeigte, dass die STOP Sequenz funktionell und effizient die Expression in DIETER II Mäusen inhibierte und sowohl die Expression, als auch die Präsentation von OVA<sub>323-339</sub> und die Koexpression von eGFP in BMDCs durch Tamoxifen induzierbar war.

## Ergebnisse

---

Die Generierung der Transgenen DIETER II Mäuse schuf 3 funktionelle transgene Gründerlinien (*Founder*). Da BMDCs von allen *Foundern* in der Lage waren OT-II Zellen *in vitro* zu stimulieren, musste getestet werden, ob das klonierte Reporterogen für eGFP *in vivo* ebenfalls exprimiert wird. Gleichzeitig wurde überprüft ob andere Lymphozyten, die potentiell CD11c exprimieren können, auch durch Tamoxifen induzierbar das Transgen in DIETER II Mäusen exprimieren. Dafür wurden DIETER II Mäuse mit 2 mg Tamoxifen i.p. behandelt. Nach 3 Tagen wurde die Milz entnommen und zum Teil mit Kollagenase IV verdaut und zum anderen Teil durch ein Zellsieb zerrieben. Die Zellen wurden gefärbt und im Durchflusszytometer nach eGFP Expression untersucht.

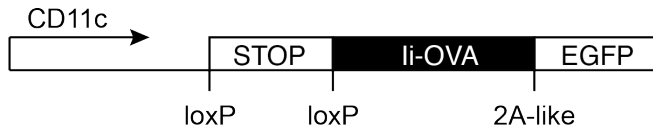
Milz DCs von DIETER II Mäusen des *Founders* 1 waren zu 0,05% eGFP positiv, Wiltyp DCs zu 0,11%. Dagegen waren ca. 2,2% der DCs von *Founder* 2 und ca. 2,96% der DCs von *Founder* 3 GFP positiv (Abb. 8E). Der Vergleich der GFP Expression zu anderen Zelltypen *in vivo* wurde mit allen *Foundern* durchgeführt. *Founder* 1 zeigte in keinem Zelltyp GFP Expression, *Founder* 2 und 3 wiesen ähnliche GFP Expressionen auf. Daher wurde repräsentativ nur *Founder* 2 gezeigt (Abb. 8F).

Wurden DIETER II Mäuse mit Tamoxifen i.p. behandelt exprimierten ca. 0,63% der Makrophagen, 0,3% der NK Zellen, 0,12% der B Zellen und weniger als 0,1% der CD8 bzw. CD4 T-Zellen GFP (Abb. 8F). Der geringe positive GFP Anteil an Makrophagen ist auf die starke Autofluoreszenz in dem gemessenen Kanal zurückzuführen. In anderen Experimenten waren die Werte im Vergleich geringer.

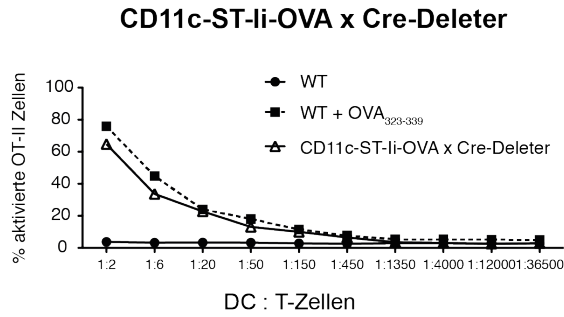
Dadurch konnte auch *in vivo* gezeigt werden, dass das Reporterprotein GFP durch Tamoxifen induzierbar funktionell und spezifisch in dendritischen Zellen exprimiert wird.

# Ergebnisse

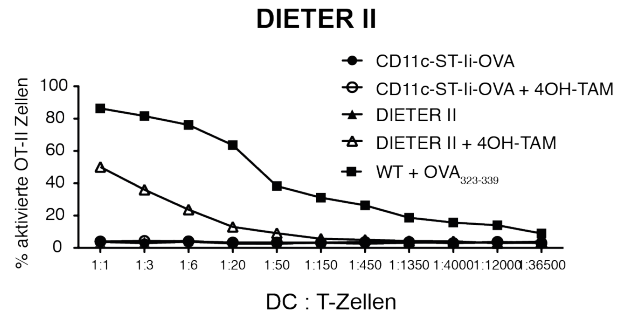
**A**



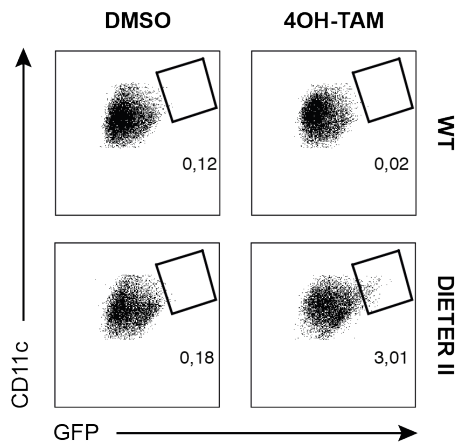
**B**



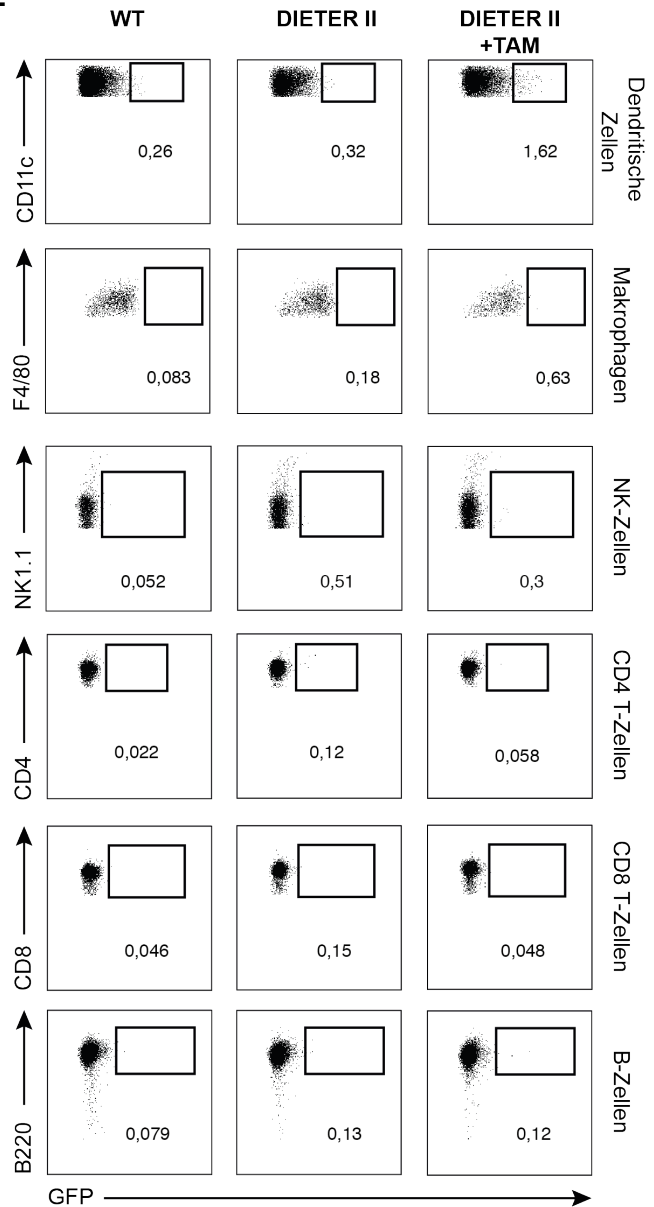
**C**



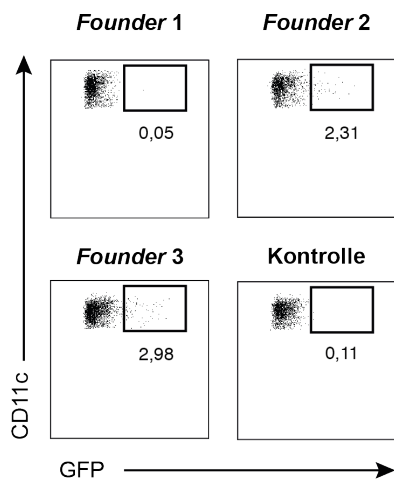
**D**



**F**



**E**





## Ergebnisse

---

### **Abbildung 8: DCs in DIETER II Mäusen präsentieren induzierbar OVA<sub>323-339</sub> und aktivieren OT-II Zellen *in vitro*.**

(A) Ein Transgen für DIETER II Mäuse wurde so kloniert, dass auf den CD11c Promotor eine loxP flankierte STOP Kasette folgte, danach das Fusionspeptid für OVA<sub>323-339</sub> und dem invariant Chain Fragment, gefolgt von dem Reportergen eGFP. (B+C) Die resultierte transgene Maus wurde mit dem konditionalen Cre-Deleter Mausstamm oder CD11cCreER<sup>+</sup> Mäusen verpaart. Aus Mäusen der F1 Generation, die positiv für die jeweiligen Transgene waren, wurde Knochenmark gewonnen, um BMDCs zu generieren. Diese wurden mit Nur77<sup>+</sup> P14-Zellen für 16 Stunden in verschiedenen Verhältnissen inkubiert und die GFP Expression der T-Zellen ermittelt. (D) Zusätzlich wurden DIETER II BMDCs für 48 Stunden mit 5 µg/mL 4OH-TAM behandelt und die GFP Expression im Durchflusszytometer ermittelt. (E) DIETER II Mäuse wurden mit 2 mg TAM i.p. behandelt und 72 Stunden später die Milzen entfernt. Verschiedene Zelltypen wurden auf Expression von GFP untersucht. Gezeigt sind Daten aus einem Experiment mit n=3-5.

### 4.2.2 DIETER II Mäuse präsentieren induzierbar OVA<sub>323-339</sub> und aktivieren OT-II Zellen *in vivo*

Die Generierung der transgenen DIETER II Mäuse schuf 3 funktionelle *Founder*. Um zu überprüfen ob die DCs der DIETER II *Founder in vivo* auch gleichermaßen OT-II Zellen stimulieren, wurden CD45.1 positive  $10^5$  OT-II Zellen (Abb. 9B) oder  $10^6$  mit CFSE gefärbte OT-II Zellen (Abb. 9A) je Maus adoptiv in Wildtyp und DIETER II Mäuse transferiert. Nach einem Tag wurde ein Teil der DIETER II Mäuse mit Tamoxifen i.p. behandelt, ein Teil blieb unbehandelt. Sieben Tage später wurde die CFSE Intensität der OT-II Zellen aus der Milz im Durchflusszytometer analysiert und der Anteil der OT-II Zellen an gesamt Lymphozyten der Milz gemessen.

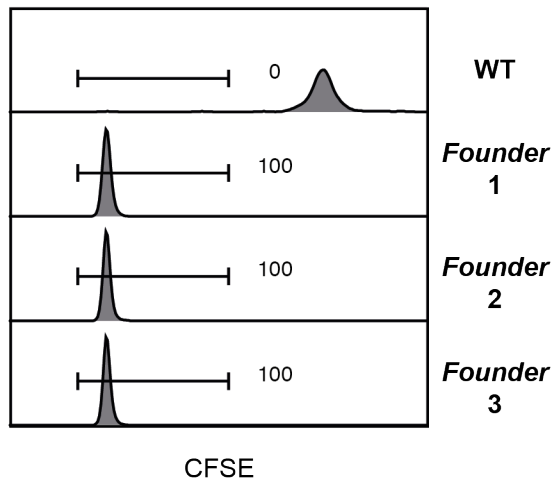
Wildtyp Mäuse zeigten nach 7 Tagen keine Proliferation der adoptiv transferierten OT-II Zellen, unbehandelte DIETER II Mäuse konnten kaum analysiert werden, da der Anteil an OT-II Zellen verschwindend gering war. (Abb. 9A+B)

In allen drei *Foundern* proliferierten die transferierten OT-II Zellen zu 100% (Abb. 9A). Der Anteil der OT-II Zellen an Lymphozyten in der Milz lag zwischen 2% und 3% (Abb. 9B). Die Unterschiede zwischen den *Founder* waren nicht signifikant. Unbehandelte DIETER II Mäuse zeigten nach 7 Tagen keine messbaren OT-II Populationen mehr.

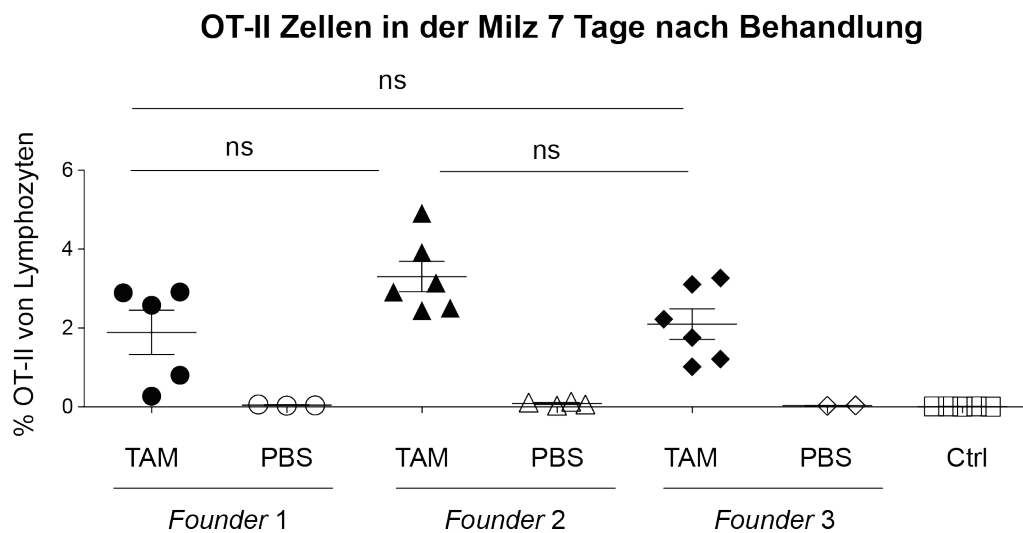
In allen DIETER II *Foundern* waren DCs in der Lage OVA<sub>323-339</sub> zu präsentieren und OT-II Zellen zur Proliferation anzuregen.

## Ergebnisse

**A**



**B**



**Abbildung 9: DIETER II Mäuse präsentierten induzierbar OVA<sub>323-339</sub> und aktivieren OT-II Zellen *in vivo*.**

OT-II Zellen wurden mit CFSE gefärbt und je Maus  $10^6$  Zellen in WT oder DIETER II Mäuse i.v. injiziert. Dabei wurden drei *Founder* der DIETER II Mäuse verglichen. Am Folgetag bekam ein Teil der Gruppen 2 mg TAM i.p., die restlichen blieben unbehandelt. Nach 7 Tagen wurden die Milzen entnommen und (A) auf Proliferation und (B) auf Expansion der OT-II Zellen hin untersucht. Gezeigt sind Daten aus einem Experiment mit  $n=3-6$ . Mittelwert ( $\pm$ SD); ns  $p>0,05$ ; ungepaarter t-Test.

### 4.2.3 DIETER II Mäuse induzieren effektive T<sub>H</sub>1 Antwort bei Injektion von Tamoxifen

CD4 T-Zellen erkennen ihr Antigen auf MHC-Klasse II Molekülen. Während CD8 T-Zellen nach Aktivierung zu zytotoxischen T Lymphozyten (CTL, *cytotoxic t lymphocyte*) werden, können CD4 T-Zellen in verschiedene Subpopulationen differenzieren. Ob sich eine CD4 T-Zelle in T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>17, iTreg oder andere T Helfer Populationen differenziert hängt maßgeblich vom vorhandenen Zytokinmilieu ab (Zhu et al. 2010; Iwasaki & Medzhitov 2015).

Um zu testen ob sich OT-II Zellen in DIETER II Mäusen in verschiedene T Helfer Zell Populationen differenzieren können, wurden OT-II Zellen adoptiv transferiert und einen Tag später mit TAM i.p. behandelt. Nach 7 Tagen wurden die Milzen entnommen. Die Lymphozyten wurden zum Einen nach T Helfer Zell Transkriptionsfaktoren im Durchflusszytometer analysiert, zum Anderen unter Anwesenheit von Brefeldin-A über Nacht restimuliert. Anschließend wurden die Zellen nach T Helfer Zell spezifischen Zytokinen gefärbt und im Durchflusszytometer untersucht.

Die transferierten OT-II Zellen exprimierten nach 7 Tagen in keinem der drei *Founder* typische Transkriptionfaktoren für T<sub>H</sub>2 (GATA-3), Treg (FoxP3), T<sub>H</sub>17 (ROR $\gamma$ t) oder den für folliculäre Helfer T-Zellen (T<sub>FH</sub>) typischen Chemokinrezeptor CXCR5 (Abb. 10A).

Jedoch zeigten die OT-II Zellen Expression von Tbet, dem für T<sub>H</sub>1 Zellen typischen Transkriptionsfaktor, dessen Expression variierte aber stark zwischen den *Foundern*. OT-II Zellen in *Founder 1* exprimierten Tbet zu ca. 50%, in *Founder 2* zu ca. 17% und in *Founder 3* zu 6%. (Abb. 10A).

T<sub>H</sub>1 Zellen produzieren pro-inflammatorisches Interferon-gamma (INF- $\gamma$ ) und zum Teil auch anti-inflammatorisches IL-10. Nach Restimulation mit OVA<sub>323-339</sub> produzierten 41% der OT-II Zellen aus *Founder 1* INF- $\gamma$  und ca. 20% IL-10. Das für T<sub>H</sub>2 typische Zytokin IL-4 konnte nicht nachgewiesen werden und lediglich 2,4% der OT-II Zellen waren für IL-17 positiv.

Die OT-II Zellen aus den *Foundern 2* und *3* exprimierten wesentlich weniger Tbet verglichen mit OT-II Zellen aus *Founder 1*. Dennoch exprimierten nach Restimulation ca. 30% der OT-II Zellen aus *Founder 2* und *3* INF- $\gamma$ . Die Expression

## Ergebnisse

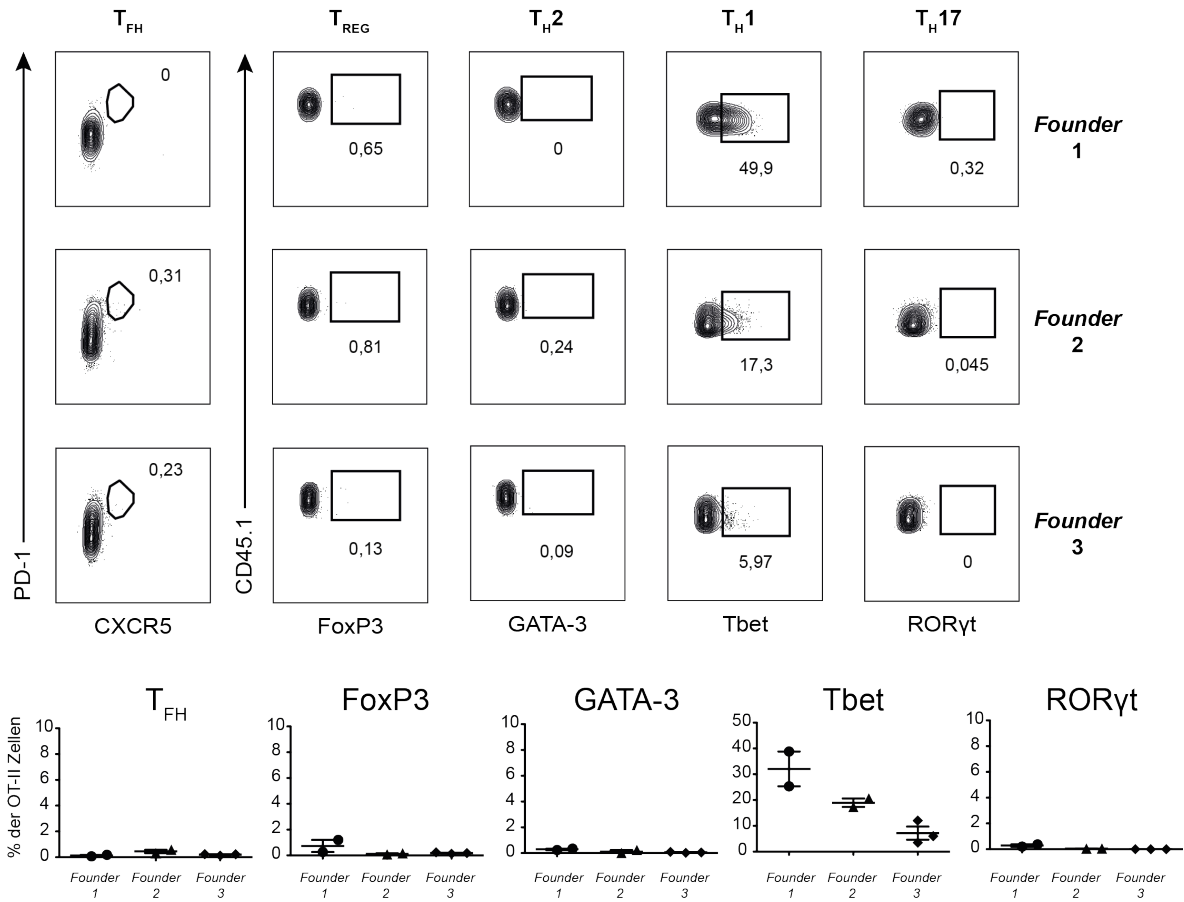
---

von IL-10 lag ebenfalls mit durchschnittlich 10% (*Founder 2*) und 17% (*Founder 3*) auf einem ähnlichen Niveau. Wie die OT-II Zellen aus *Founder 1* produzierten jene aus *Founder 2* und 3 kein IL-4 nach Restimulation mit OVA<sub>323-339</sub>. Die Expression von IL-17 lag bei 1,7% (*Founder 2*) und 2,6% (*Founder 3*) (Abb. 10B).

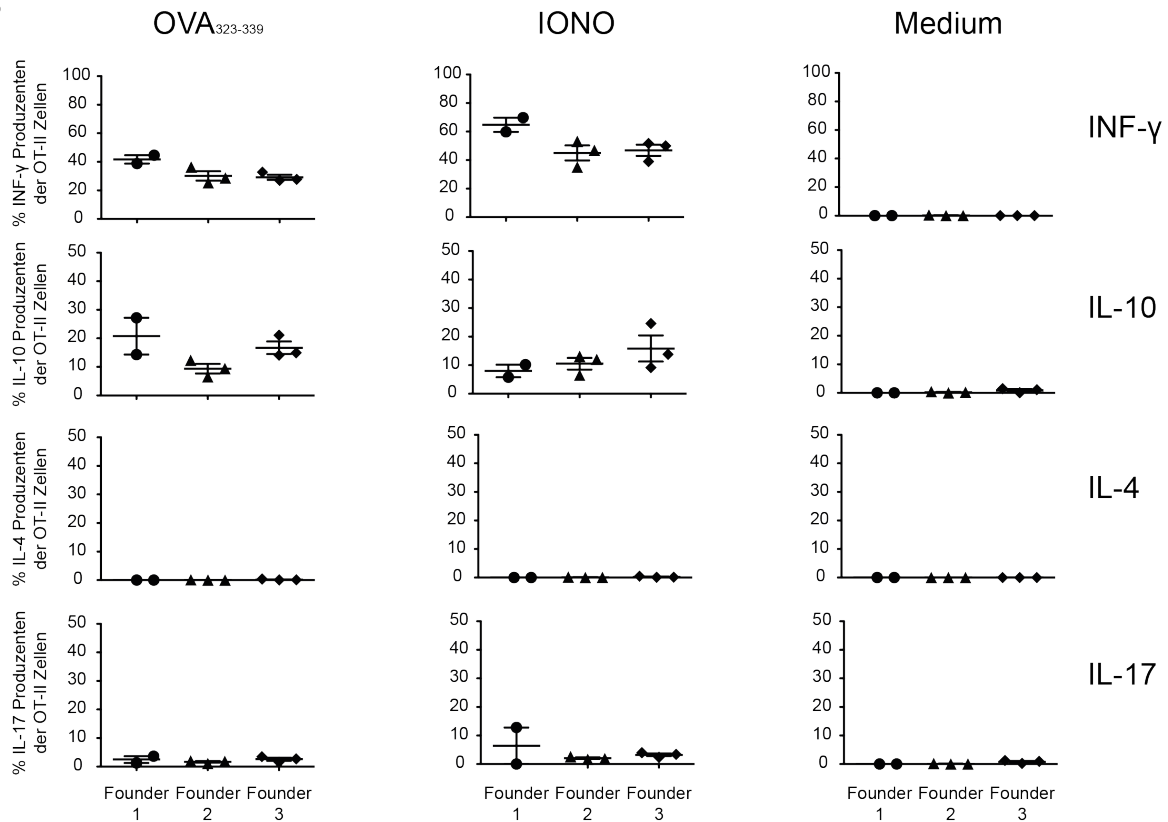
Zusammengefasst zeigen transferierte OT-II Zellen in allen DIETER II Mäusen eine starke Tendenz zur T<sub>H</sub>1 Differenzierung. Diese Differenzierung zeigt sich in der Expression von INF- $\gamma$ . Jedoch zeigte das Expressionsmuster der Transkriptionsfaktoren der transferierten OT-II Zellen in *Founder 1* stärkere Tendenz zu einer T<sub>H</sub>1 Differenzierung (Tbet), als das der *Founder 2* und 3. Hingegen liegt die INF- $\gamma$  Produktion der OT-II Zellen in allen *Foundern* ähnlich hoch.

# Ergebnisse

**A**



**B**



## Ergebnisse

---

### **Abbildung 10: DIETER II Mäuse induzieren effektive Th1 Antwort bei Injektion von Tamoxifen.**

(A) In DIETER II Mäuse wurden je  $10^6$  CFSE gefärbte OT-II Zellen i.v. adoptiv transferiert, am Folgetag bekamen die Tiere 2 mg TAM i.p. verabreicht. Dabei wurden 3 *Founder* der DIETER II Mäuse verglichen. Nach 7 Tagen wurden die Milzen entnommen und Lymphozyten isoliert. (B) DIETER II Mäuse wurden mit  $10^5$  OT-II Zellen adoptiv transferiert. Am Folgetage bekamen die Tiere 2 mg TAM i.p. verabreicht. Nach 7 Tagen wurden die Milzen entnommen und Lymphozyten isoliert. Die expandierten OT-II Zellen wurden nach ihrem Transkriptionsfaktorenprofil im Durchflusszytometer untersucht.  $10^6$  Lymphozyten wurden unter Anwesenheit von IL-2 und Brefeldin-A über Nacht mit Medium, Ionomycin oder  $10 \mu\text{M}$  OVA<sub>323-339</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Expression der Zytokine INF- $\gamma$ , IL-10, IL-4 und IL-17 im Durchflusszytometer untersucht. Gezeigt sind Daten aus einem Experiment mit n=2-3. Mittelwert ( $\pm$ SD).

### 4.2.4 Induzierte *skin homing* CD4 T-Zell Antwort in DIETER II Mäusen protektiert leicht gegen rekombinante VV-OVA (s.s.) Infektion

Da von Maloy et al., 2000 gezeigt werden konnte, dass T<sub>H</sub>1 Zellen effektiv gegen *Vaccinia* Infektionen schützen können (Maloy et al. 2000) und DIETER II Mäuse in den zuvor gezeigten Versuchen präferiert T<sub>H</sub>1 Differenzierung der OT-II Zellen unterstützen, sollte die protektive Eigenschaft der OT-II Zellen in diesem Mausmodell getestet werden.

Des Weiteren sollte überprüft werden ob über die Auftragung von 4OH-Tamoxifen auf die Haut ein „*skin homing*“ Phänotyp adoptiv transferierter OT-II Zellen erreicht werden kann.

Dazu wurden 10<sup>5</sup> OT-II Zellen je Maus adoptiv transferiert und die Mäuse entweder einen Tag später mit TAM i.p. oder an zwei aufeinander folgenden Tagen mit 4OH-TAM auf der Haut behandelt. Acht Tage später wurde den Mäusen Blut entnommen und dieses im Durchflusszytometer auf Expansion der OT-II Zellen sowie P-Selektin Ligand Expression der OT-II Zellen analysiert. Am folgenden Tag wurden die Mäuse an einem Ohr mit 2\*10<sup>6</sup> pfu über *skin scarification* mit VV-OVA infiziert. Sieben Tage nach Infektion wurden die Ohren entnommen und ein Plaque Assay durchgeführt, um die Viruslast zu bestimmen.

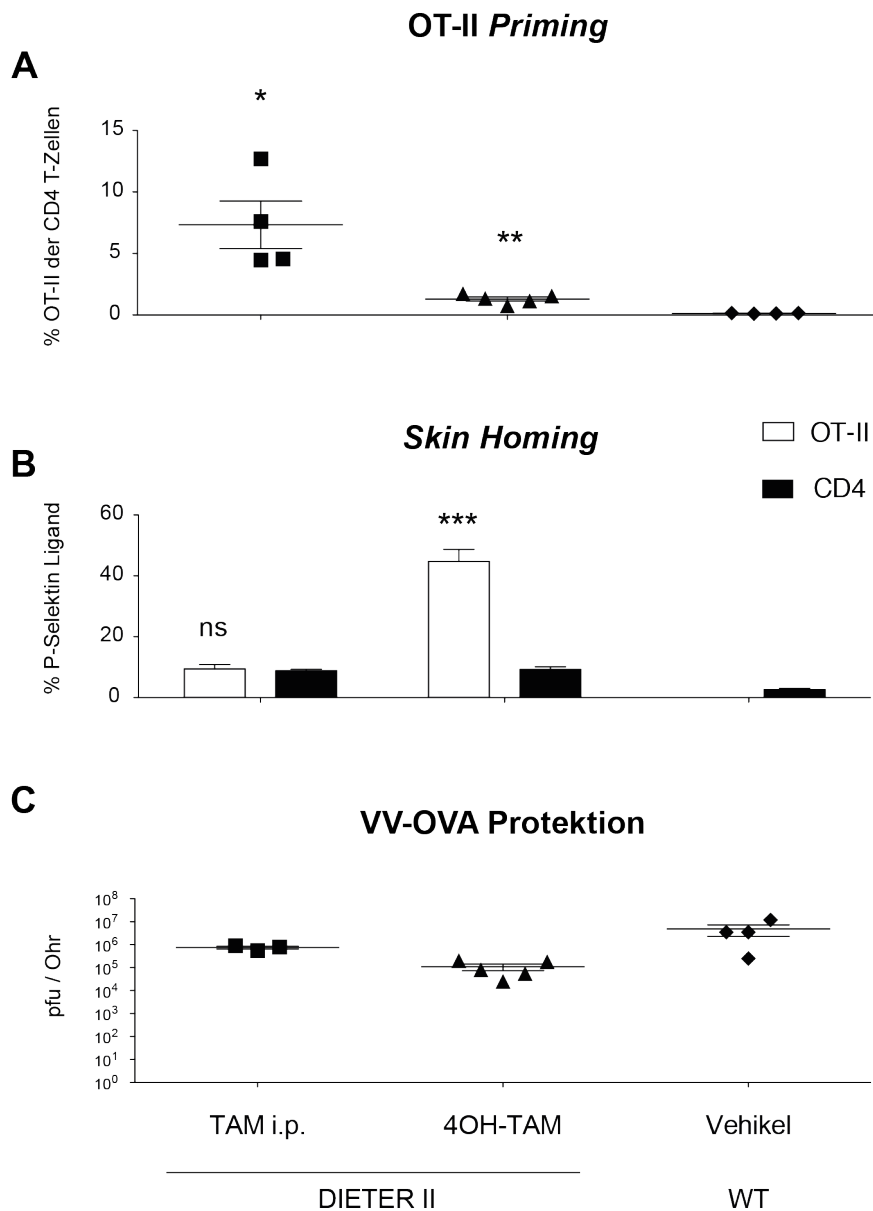
Acht Tage nach Behandlung zeigten DIETER II Mäuse die mit TAM i.p. behandelt wurden einen Anteil der OT-II Zellen von ca. 7% der CD4 T-Zellen im Blut. Wurden die Mäuse mit 4OH-TAM auf der Haut behandelt so lag der Anteil bei 1,3% (Abb. 11A).

Die Expression von P-Selectin Ligand war mit 9,5% der OT-II Zellen in TAM i.p. behandelten Mäusen zu allen anderen CD4 T-Zellen (7,8%) nicht signifikant. Mit 45% P-Selektin Ligand Expression zeigten OT-II Zellen in DIETER II Mäusen, die mit 4OH-TAM auf der Haut behandelt wurden einen signifikanten Unterschied zu den restlichen CD4 T-Zellen (9%) im Blut (Abb. 11B).

Wurden DIETER II Mäuse mit TAM i.p. behandelt, so reduzierte sich die Viruslast in dem Experiment um das 6,4-fache. DIETER II Mäuse die mit 4OH-TAM behandelt wurden wiesen eine Reduktion der Viruslast im Vergleich zur Kontrolle um das 44-fache auf (Abb. 11C).



## Ergebnisse



**Abbildung 11: Induzierte „skin homing“ CD4 T-Zell Antwort in DIETER II Mäusen schützt leicht gegen rekombinante VV-OVA (s.s.) Infektion.**

WT oder DIETER II Mäuse wurden mit  $10^5$  OT-II Zellen adoptiv transferiert. Eine Gruppe wurde mit TAM i.p. behandelt, die andere an zwei Tagen mit 4OH-TAM auf der Haut. Alle Tiere bekamen einmalig  $50 \mu\text{g}$  anti-CD40 i.v. verabreicht. **(A+B)** Nach 10 Tagen wurde die Expansion der OT-II Zellen im peripheren Blut ermittelt und die Expression von P-Selektin Ligand. **(C)** Am nächsten Tag wurden die Ohren mit  $2 \cdot 10^6$  pfu VV-OVA über s.s. infiziert und 7 Tage später die Viruslast bestimmt. Gezeigt sind Daten aus einem Experiment mit  $n=3-5$ . Mittelwert ( $\pm$ SD); ns  $p>0,05$ ; \* $p\leq 0,05$ ; \*\* $p\leq 0,01$ ; \*\*\* $p\leq 0,001$ ; ungepaarter t-Test.

### 5 Diskussion

Dendritische Zellen (DCs) stehen ihrer Funktion nach eingeordnet zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem. Sie sind professionelle Antigenpräsentierende Zellen (APC) und können naive T-Zellen direkt aktivieren und eine Effektor T-Zell Antwort auslösen. Über PRRs (*pattern recognition receptors*), wie *Toll-like* Rezeptoren, erkennen sie pathogene Strukturen und können so aktiviert werden (Iwasaki & Medzhitov 2015; Diebold 2009). Ebenfalls können DCs über sogenannte „*Danger Signals*“ aktiviert werden, welche als Folge von Infektionen, zellulärem Stress oder Nekrose produziert werden (Gallucci & Matzinger 2001).

Bei der anschließenden Reifung werden die aufgenommenen Antigene über MHC-Klasse I und II auf ihrer Zelloberfläche präsentiert. Gleichzeitig exprimieren reife DCs kostimulatorische Moleküle, wie CD80/86 und CD70, die für eine Induktion einer T-Zell Antwort notwendig sind (Steinman 2012; Alvarez et al. 2008; Schildknecht et al. 2007; Smith-Garvin et al. 2009; Heuzé et al. 2013).

Dendritische Zellen sind neben den lymphatischen Organen in nicht-lymphatischen Organen, wie der Haut, lokalisiert. Sie wandern als Vorläuferzellen in dieses Gewebe ein und differenzieren dort zu verschiedenen Subtypen aus (Malissen et al. 2014). Sowohl unter nicht-inflammatorischen Bedingungen, also im *steady state*, aber besonders unter inflammatorischen Bedingungen migrieren DCs der Haut über affarente lymphatische Gefäße in die drainierenden Lymphknoten des Gewebes. Dort präsentieren sie eigene und fremde, aufgenommene Antigene den B- und T-Zellen. Diskutiert wird das weitere Schicksal der DCs in den Lymphknoten (Randolph et al. 2005), aber sehr wahrscheinlich ist ein apoptotisches Enden der Zellen im Lymphknoten (Tomura et al. 2014).

Die Haut ist in zwei anatomisch unterschiedliche Kompartimente unterteilt, die Epidermis und die Dermis. In der Epidermis kommen als dendritische Zellen ausschließlich Langerhans Zellen (LCs) vor. Diese sind strahlungsresistent und regenerieren sich selbst. In der Dermis kommen mindestens fünf weitere DC Subpopulationen hinzu. Neben LCs, welche die Dermis passieren um zu den Lymphknoten zu gelangen, können Langerin<sup>+</sup> dermale DCs (DDCs) in CD103<sup>+</sup> und CD103<sup>-</sup> DDCs unterschieden werden. Des Weiteren existieren DDCs welche sowohl für Langerin als auch für CD11b negativ sind (doppel negativ, DN). CD11b<sup>+</sup> DDCs

## Diskussion

---

sind hingegen heterogen und werden über Expression der Oberflächenproteine CD64, CCR2 und Ly6C in konventionelle DDCs (cDDCs), monozytäre DCs (moDCs) und Makrophagen unterschieden (Henri et al. 2010; Tamoutounour et al. 2012).

Unter inflammatorischen Bedingungen finden sich vermehrt moDCs und vor Allem plasmazytoide DCs (pDCs) in dem entzündeten Gewebe (Tamoutounour et al. 2012; Gregorio et al. 2010), ihre Migrationsfähigkeit in Lymphknoten ist jedoch selbst unter diesen Umständen sehr eingeschränkt. Den konventionellen dermalen DCs gemein ist ihre Entwicklung aus DC-Vorläuferzellen aus dem Blut, während moDCs und ein Teil der Makrophagen aus Monozyten generiert werden (Tamoutounour et al. 2012).

In dieser Arbeit wurde ein Mausmodell verwendet, in dem Tamoxifen-induzierbar ein MHC-Klasse I Peptid-Komplex auf dendritischen Zellen präsentiert wird, um die DC Subsets der Haut funktionell zu untersuchen. Ein weiterer Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Etablierung eines Mausmodells welches die induzierbare Präsentation von MHC-Klasse II Peptid-Komplexen und die Untersuchung von CD4 T-Zell Antworten zum Ziel hat.

## Diskussion

---

### 5.1 Teil I

#### 5.1.1 Migration

Um die Präsentation von GP<sub>33-41</sub> nur auf DCs der Haut zu induzieren wurde der aktive Metabolit von Tamoxifen, 4OH-Tamoxifen, in einer Lösung auf die Haut von DIETER I Mäusen aufgetragen. Um die Cre-Rekombinase Aktivität zu quantifizieren wurde das Transgen CD11cCreER<sub>T</sub> mit dem Rosa26-RFP kombiniert. Zellen, die auf 4OH-Tamoxifen reagierten exprimierten in Folge das *red fluorescence protein* (RFP). Dadurch konnte zum Einen gezeigt werden, dass die topikale Behandlung mit 4OH-Tamoxifen selektiv auf Haut DCs und nicht auf residente DCs wirkt und zum anderen, dass RFP exprimierende DCs in drainierende Lymphknoten migrieren.

Jedes Haut DC Subset zeigte dabei eine eigene Migrationskinetik. Die schnellste Migration wiesen CD11b<sup>+</sup> dermale DCs auf. Die maximale Anzahl an RFP<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> migratorischen DC in den drainierenden LN wurde 3 Tage nach Behandlung gefunden. Sowohl CD103<sup>+</sup> als auch CD103<sup>-</sup> DCs migrierten langsamer. Der Anteil von RFP<sup>+</sup> CD207<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> und CD207<sup>+</sup> CD103<sup>-</sup> DCs stieg bis Tag 7 nach Behandlungsbeginn. In CD207<sup>-</sup> CD11b<sup>-</sup> DCs konnten in den drainierenden LN kaum RFP Expression nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse stimmen mit anderen Studien überein, welche die Migrationskinetiken von Haut DCs bestimmten. Kissenpfennig zeigte 2005, dass LCs langsamer in die drainierende Lymphknoten migrieren als dermale DCs (Kissenpfennig et al. 2005). In einer Studie von Michio Tomura (2014) wurde beschrieben, dass Langerhans Zellen und CD103<sup>+</sup> dermale DCs langsamer in die Lymphknoten migrierten als CD103<sup>-</sup> dermale DCs (Tomura et al. 2014). Die Definition der DCs anhand ihrer Oberflächenmoleküle wurde in dieser Studie jedoch auf eine unterschiedliche Weise als in dieser Doktorarbeit und der Studien von Sandrine Henri (2010) und Samira Tamoutounour (2013) vorgenommen. Tomura definierte die aus der Haut in die Lymphknoten migrierten Zellen mit den Markern CD103 und CD326 (EpCAM). Daraus resultierte jedoch, dass unter den von Tomura als CD103<sup>+</sup> und den CD103<sup>-</sup> bezeichneten DCs sowohl CD207<sup>-</sup> CD11b<sup>-</sup>, als auch CD207<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> dermale DCs zu finden waren, die zusammen ca. 99% dieser Population ausmachten. Unter der CD326<sup>+</sup> Population waren 9% CD207<sup>-</sup> und zu 91% CD207<sup>+</sup> Zellen. Letztere bestehen zu ca. 51% aus Langerhans Zellen und zu

## Diskussion

---

ca. 40% aus CD207<sup>+</sup> CD103<sup>-</sup> dermalen DCs. Die Unterschiede in den verschiedenen Gatings wurde in der Studie von Tomura beschrieben (Tomura et al. 2014). In dem von Tomura verwendeten Mausmodell exprimieren alle DCs ein spezielles, Grün fluoreszierendes Protein (KikGR) welches durch Bestrahlung mit violetterem Licht in eine rote Fluoreszenz umschlägt. Dies erlaubt die sofortige Markierung von DCs in der Haut und die präzise Verfolgung ihrer Migration in die drainierenden Lymphknoten. Unser Modell hingegen weist, bedingt durch die Behandlung mit 4OH-Tamoxifen, eine Verzögerung in der Expression von RFP auf, was eine kinetische Auflösung schwierig macht.

Durch Verwendung von Knochenmarkschimären konnten Tomura et al., zeigen, dass Langerhans Zellen langsamer migrieren als CD207<sup>-</sup> dermale DCs. Unsere Beobachtungen legen nahe, dass dieser Effekt größtenteils durch die schnelle Migration von CD207<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> dermalen DCs und nicht durch CD207<sup>-</sup> CD11b<sup>-</sup> dermale DCs verursacht.

Dass die DCs der Haut nach ihrem Eintritt in die drainierenden LN diese wieder über efferente Lymphgefäße verlassen ist sehr unwahrscheinlich. Das Schicksal von DCs in LN wird dennoch diskutiert (Randolph et al. 2005), es existieren starke Hinweise, die darauf schließen lassen, dass der größte Teil der in die LN migrierten DCs dort nach kurzer Zeit in Apoptose geht. Tomura (2014) konnte zeigen, dass die aus der Haut in die Lymphknoten migrierten DCs nur zu 1% im direkt benachbarten Lymphknoten und in anderen Lymphknoten zu keinem Zeitpunkt vorhanden waren. Des Weiteren wiesen im Gegensatz zu T- und B-Zellen DCs in den Lymphknoten hohe Apoptose Marker auf. Dies lässt den Schluss zu, dass die Mehrheit der migratorischen DCs in den Lymphknoten nicht rezirkulieren, sondern eine große Tendenz besitzen den apoptotischen Zelltod zu unterlaufen (Tomura et al. 2014).

### 5.1.2 Die Fähigkeit von DC Subtypen eine funktionelle „*skin homing*“ CD8 T-Zell Antwort zu induzieren

Langerhans Zellen wurden bereits 1867 von Paul Langerhans entdeckt. Viele Studien versuchen die Rolle dieser dendritischen Zelle in der Haut zu klären. In unseren Versuchen konnten wir keine durch Langerhans Zellen induzierte CD8 T-Zell Antwort detektieren. Allerdings können wir bislang nicht ausschließen, dass der Grund hierfür eine mangelnde Präsentation der transgenen Antigene auf LCs von DIETER Mäusen ist. Zwar wurde durch 4OH-Tamoxifen Behandlung von CD11cCreER<sub>T</sub> x Rosa26-RFP Expression von RFP in LC detektiert, was auf eine Aktivierung der Cre-Rekombinaseaktivität in LCs durch 4OH-TAM hindeutet, jedoch war es uns bisher nicht möglich die Präsentation von GP<sub>33-41</sub> durch LCs von 4OH-TAM behandelten DIETER Mäusen zu beweisen. Daher ist bislang nicht klar ob die CTL Antwort dadurch ausbleibt, dass LCs keine GP<sub>33-41</sub> präsentieren oder sie GP<sub>33-41</sub> präsentieren, aber nicht in der Lage sind naive CD8 T-Zellen zu aktivieren.

Für letzteres würde sprechen, dass in dieser Doktorarbeit die Aktivierung der DCs mittels anti-CD40 vermittelt wird und einige Studien darauf hinweisen, dass zum einen LCs trotz Behandlung mit anti-CD40 und poly(I:C) tolerogen wirken (Flacher et al. 2014) und zum anderen frisch isolierte LCs kein CD40 exprimieren und möglicherweise durch andere Faktoren, wie TNF- $\alpha$ , stimuliert werden müssen um die Reifung zu durchlaufen (Salgado et al. 1999).

Dafür spricht beispielsweise auch, dass Langerin<sup>+</sup> dermale DC nach Behandlung mit poly(I:C) und anti-CD40 das kostimulatorische Molekül CD70 hochregulieren, Langerhans Zellen jedoch nicht (Flacher et al. 2014). Dieses Molekül ist für die Induktion einer CD8 T-Zell Antwort notwendig. So hemmt die Blockade von CD70 auf aktivierten DCs selbst in Anwesenheit einer Infektion die Induktion einer CTL Antwort (Schildknecht et al. 2007). Auch bei einem *Vaccinia* Infektionsmodell konnte gezeigt werden, dass Langerin<sup>+</sup> dermale DCs, nicht aber Langerhans Zellen, für eine CD8 medierte Immunantwort notwendig sind (Seneschal et al. 2014).

CD207<sup>+</sup> dermale DCs leisten einen wichtigen Beitrag für die Induktion einer CD8 T-Zell Antwort durch Kreuzpräsentation (Malissen et al. 2014). Um die Funktion der DCs der Haut in einem kreuzpräsentationsunabhängigen Modell zu untersuchen

## Diskussion

---

bietet sich das DIETER I Mausmodell an, welches die endogene Produktion von GP<sub>33-41</sub> in dendritischen Zellen ermöglicht. In dieser Arbeit wurde das DIETER I Mausmodell mit dem Lang-DTREGFP (Kissenpfennig et al. 2005) und Batf3<sup>-/-</sup> (Hildner et al. 2008; Edelson et al. 2010; Tussiwand et al. 2012) Modellen kombiniert. Dadurch war es möglich in gemischten Knochenmarkschimären Langerin<sup>+</sup> dermale DCs und/oder Langerhans Zellen von der GP<sub>33-41</sub> Präsentation auszuschließen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass CD207<sup>+</sup> dermale DCs nicht zwingend notwendig sind um eine funktionelle und protektive spezifische CD8 T-Zell Antwort zu induzieren.

Dermale CD207<sup>+</sup> DCs bestehen aus einer CD103<sup>+</sup> und einer CD103<sup>-</sup> Population. Eine Studie zeigte, dass Lang-DTREGFP Mäuse, deren CD207<sup>+</sup> dermale DCs depletiert wurden, deutlich geringere Präsentation von Keratinozyten produziertem Ovalbumin, gemessen am *Priming* von spezifisch adoptiv transferierten Zellen, zeigten (Henri et al. 2010). Während einer *Vaccinia* Infektion in der Haut kommt den CD207<sup>+</sup> dermale DCs ebenfalls eine wichtige Rolle zu. In einem Lang-DTR Mausmodell konnte gezeigt werden, dass das *Priming* und die Rekrutierung zu der Infektionsstelle weniger effizient in Abwesenheit der CD207<sup>+</sup> dermalen DCs verläuft (Seneschal et al. 2014). Die „*skin homing*“ Eigenschaften der CD8 T-Zellen waren hingegen nicht beeinträchtigt. Die Ergebnisse von Vincent Flacher (2014) wiesen neben den möglichen tolerogenen Eigenschaften von Langerhans Zellen auch darauf hin, dass dermale CD207<sup>+</sup> DCs Ovalbumin, welches an CD207 Antikörper gekoppelt war, *in vivo* effizient kreuzpräsentieren können (Flacher et al. 2014).

Die Ansicht, CD207<sup>+</sup> dermale DCs seien die einzigen kreuzpräsentierenden Zellen muss möglicherweise aktualisiert werden. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass auch andere DCs Subtypen in der Lage sind, exogene Antigene auf MHC-Klasse I zu präsentieren. Eine Studie zeigte, dass CD207<sup>-</sup> CD11b<sup>-</sup> migratorische DCs aus Lymphknoten Ovalbumin *ex vivo* vergleichbar mit CD207<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> migratorischen DCs kreuzpräsentieren können (Mollah et al. 2014).

Eine andere Studie zeigte, dass humane CD1c<sup>+</sup> cDCs, das Homolog muriner CD11b<sup>+</sup> cDCs (Robbins et al. 2008), zeigten ähnliches Vermögen der Kreuzpräsentation wie humane CD141<sup>+</sup> cDCs, das Homolog muriner CD103<sup>+</sup> cDCs (L. Cohn et al. 2013; Guilliams, Henri, et al. 2010). In einem Modell der topikalen Antigenimmunisierung präsentierten sowohl Langerin<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> cDCs als auch Langerin<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> cDCs aus drainierenden Lymphknoten exogenes Antigen auf MHC-Klasse I Molekülen. In

## Diskussion

---

dieser Studie waren Langerin<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> cDCs, allerdings nicht in der Lage „*skin homing*“ auf adoptiv transferierten CD8 T-Zellen *in vivo* zu induzieren (Nizza & Campbell 2014). Dies steht im Gegensatz zu unseren Ergebnissen welche zeigen, dass CD11b<sup>+</sup> dermale DCs *in vivo* sowohl P-Selektin Ligand als auch E-Selektin Ligand auf CD8 T-Zellen induzieren können.

Das verwendete Lang-DTREGFP Modell lässt die Depletion von Langerin<sup>+</sup> Zellen zu (Kissenpfennig et al. 2005). Auch wenn die Depletion effizient verläuft, lassen sich Langerin<sup>+</sup> dermale DCs nicht vollständig aus dem Modell eliminieren, vermutlich weil diese stetig aus Vorläuferzellen nachgebildet werden. Daher wurde im Vergleich das Batf3<sup>-/-</sup> Modell mit einem C57BL/6 Hintergrund verwendet (Hildner et al. 2008). Batf3<sup>-/-</sup> Mäuse entwickeln auf einem 129S6/SvEV und BALB/c Hintergrund keine CD205<sup>+</sup> CD8 DCs in Haut drainierenden Lymphknoten (Tussiwand et al. 2012). Dieser Effekt wird bei dem C57BL/6 Hintergrund durch den Transkriptionsfaktor Batf kompensiert (Tussiwand et al. 2012). Werden allerdings die CD205<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> DCs betrachtet, zeigt sich, dass CD103<sup>-</sup> DCs in C57BL/6 Batf3<sup>-/-</sup> nicht existieren (Edelson et al. 2011). Unsere durchflusszytometrischen Ergebnisse der Haut zeigen, dass Batf3<sup>-/-</sup> Mäuse keine Langerin<sup>+</sup> dermalen DCs besitzen. In den drainierenden Lymphknoten können ebenfalls keine Langerin<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> dermalen DCs wiedergefunden werden. Ob Langerin<sup>+</sup> CD103<sup>-</sup> dermale DCs in Haut drainierenden Lymphknoten vorhanden sind ist nicht klar, da diese nicht eindeutig von Langerhans Zellen getrennt werden können, jedoch lässt die Abwesenheit der Langerin<sup>+</sup> CD103<sup>-</sup> dermalen DCs in der Haut darauf schließen, dass zumindest diese aus der Haut nicht in die drainierenden Lymphknoten eingewandert sein können.

CD207<sup>-</sup> CD11b<sup>-</sup> dermale DCs wurden bisher kaum untersucht. Eine Studie zeigte, dass diese weiter in CX3CR1<sup>+</sup> CD24<sup>-</sup> und CX3CR1<sup>-</sup> CD24<sup>+</sup> Subtypen unterschieden werden können, wobei ein funktioneller Unterschied nicht gezeigt wurde (Mollah et al. 2014). Es wurde jedoch nachgewiesen, dass CD207<sup>-</sup> CD11b<sup>-</sup> migratorische DCs aus den Lymphknoten ex vivo Ovalbumin kreuzpräsentieren. In unseren Experimenten konnten wir die Cre-Rekombinase Aktivität nach 4OH-Tamoxifen Behandlung in CD207<sup>-</sup> CD11b<sup>-</sup> dermalen DCs in der Haut nachweisen, jedoch war die Migration dieser DC Subpopulation in den Lymphknoten sehr gering, sodass eine Präsentation des GP<sub>33-41</sub> Peptids in den Lymphknoten durch diese Subpopulation sehr unwahrscheinlich ist.



## Diskussion

---

Zusammengefasst lassen unsere Ergebnisse den Schluss zu, dass CD11b<sup>+</sup> dermale DCs in der Lage sind, eine funktionelle „*skin homing*“ CD8 T-Zell Antwort zu induzieren.

Über die Funktion von CD11b<sup>+</sup> dermalen DCs ist noch nicht viel bekannt. Samira Tamoutounour zeigte 2013, dass CD11b<sup>+</sup> dermale DCs eine heterogene Population aus konventionellen DCs, monozytär entwickelten DCs und Makrophagen sind (Tamoutounour et al. 2013). In unserem Modell konnten wir zeigen, dass mit der 4OH-Tamoxifen Behandlung in sowohl konventionellen als auch monozytären DCs der Haut die Cre-Rekombinase aktiv ist, jedoch nicht in Makrophagen. Während dem *steady state*, also ohne Inflammation, werden kaum monozytäre DCs in den drainierenden Lymphknoten gefunden. Dieser Anteil kann leicht unter inflammatorischen Bedingungen steigen (Tamoutounour et al. 2013). Da in unseren Experimenten nicht ganz ausgeschlossen werden kann, dass inflammatorische Bedingungen entstehen können, kann auch nicht ganz ausgeschlossen werden, dass monozytäre DCs in die Lymphknoten wandern und GP<sub>33-41</sub> präsentieren. Dies könnte durch Verwendung von CCR2 defizienten Mäusen ausgeschlossen werden, da die Entwicklung der monozytären DCs CCR2 abhängig ist (Tamoutounour et al. 2013).

Dennoch ist ein bedeutender Beitrag beim *Priming* von CD8 T-Zellen in den Lymphknoten nicht zu erwarten. Zum einen ist ihr Anteil unter den CD207<sup>-</sup> CD11b<sup>-</sup> Zellen unter den dermalen DCs selbst nach Behandlung mit DNFB bei unter 10% und zum anderen ist ihre Fähigkeit INF- $\gamma$ <sup>+</sup> CD8 T-Zellen zu induzieren 3,5-fach geringer als die der CD207<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup> dermalen DCs (Tamoutounour et al. 2013).

Welchen Einfluss CD207<sup>-</sup> CD11b<sup>-</sup> dermale DCs bei der Induktion der GP<sub>33-41</sub> spezifischen CTL Antwort besitzen ist bislang unbekannt. Sie exprimieren den konventionellen DC spezifischen Transkriptionsfaktor Zbtb46 (Mollah et al. 2014) und ihre Entwicklung ist FLT3L abhängig (Malissen et al. 2014). CD207<sup>-</sup> CD11b<sup>-</sup> dermale DCs besitzen einen migratorischen Counterpart in den drainierenden Lymphknoten und sind sowohl unter *steady state* als auch unter inflammatorischen Bedingungen in Lymphknoten zu finden (Henri et al. 2010). Bisher ist kein humanes Homolog bekannt und ihre spezifische Funktion muss noch geklärt werden (Malissen et al. 2014).

## Diskussion

---

Dennoch fanden wir nach der 4OH-Tamoxifen Behandlung zwar Cre-Rekombinase Aktivität in CD207<sup>-</sup> CD11b<sup>-</sup> dermalen DCs in der Haut, jedoch kaum in den migrierten Zellen des Lymphknotens im Vergleich zu allen anderen Subpopulationen. Daher erscheint ihr Beitrag zu dem CD8 T-Zell *Priming* nur gering.

Viele Studien sind darauf angewiesen Antigen an einen Antikörper zu koppeln um eine spezifische Antigenaufnahme der dendritischen Zelle zu gewährleisten (Flacher et al. 2014; Idoyaga et al. 2013) oder Antigen wird unspezifisch über topikale Auftragung zur Verfügung gestellt (Nizza & Campbell 2014). Eine andere Möglichkeit ist eine physiologische infektiöse Bedingung zu schaffen, indem ein rekombinantes Virusmodell verwendet wird, welches ein spezifisches Antigen exprimiert (Seneschal et al. 2014), dabei ist es jedoch schwierig zu überprüfen welche Zellen oder Subpopulationen infiziert wurden und welchen Effekt Antigene haben, die von sterbenden Zellen stammen. So besitzen CD103<sup>+</sup> (human CD141<sup>+</sup>) cDCs das C-Typ Lektin CLEC9A (DNGR1), einen Rezeptor für beschädigtes und totes Zellmaterial (Ahrens et al. 2012; Zhang et al. 2012), wodurch diese DCs beispielsweise tumorzellassoziierte Antigene kreuzpräsentieren können. Das in dieser Arbeit etablierte Modellsystem hat den Vorteil nicht auf Kreuzpräsentation angewiesen zu sein. Im DIETER I Mausmodell wird GP<sub>33-41</sub> in CD11c<sup>+</sup> Zellen exprimiert und auf MHC Klasse I Molekülen präsentiert (Probst et al. 2003). Dadurch ist es möglich die Präsentation von GP<sub>33-41</sub> auf allen dendritischen Zellen kreuzpräsentationsunabhängig zu induzieren. Dies hat den Vorteil nur die Fähigkeit des CD8 T-Zell *Primings* untersuchen zu können, unabhängig von Verfügbarkeit, Aufnahme und Prozessierung des Antigens. Somit ist die funktionelle CTL Antwort der CD11b<sup>+</sup> cDCs, die in dieser Arbeit beschrieben wird, kreuzpräsentationsunabhängig.

Diese neuen Informationen können dazu genutzt werden gezielte Impfungen welche das Ziel haben spezifische CD8 T-Zell Antworten auszulösen auch auf diesen Zelltyp auszurichten.

### 5.1.3 Tissue-Resident Memory T-Zellen

Werden dendritische Zellen aktiviert migrieren sie in periphere lymphatische Organe und interagieren mit T-Zellen (Andrian & C. R. Mackay 2000; Sallusto et al. 1999). Erkennt eine CD8 T-Zelle ihr Antigen, das auf MHC Klasse I Molekülen präsentiert wird, beginnt sie zu proliferieren und wird zu einer Effektor T Zelle ( $T_{EF}$ ). Neben diesen entstehen auch Effektor Memory T Zellen ( $T_{EM}$ ), Zentrale Memory T Zellen ( $T_{CM}$ ) und Gewebe residente Memory T Zellen ( $T_{RM}$ ) (Schenkel & Masopust 2014).

$T_{RM}$  sind langlebig und migrieren nicht aus ihrem Zielgewebe. Charakteristisch exprimieren sie CD103 und CD69 (Schenkel & Masopust 2014). Obwohl das Integrin CD103 für die Migration in das Zielgewebe keine Rolle spielt, ist es für die Erhaltung in diesem von entscheidender Bedeutung (Casey et al. 2012; L. K. Mackay et al. 2013). So bindet CD103 das E-Catherin, welches auf der Zelloberfläche vieler Epithelzellen vorhanden ist (Cepek et al. 1994). Wie groß die Rolle des Integrins CD103 letztlich ist, ist Teil aktueller Diskussion und möglicherweise abhängig von der Lokalisation (Schenkel & Masopust 2014). In der Haut benötigen  $T_{RM}$  für ihren Erhalt lokale Signale wie IL-15 und TGF- $\beta$  (L. K. Mackay et al. 2013).

Langerhans Zellen liegen in der Epidermis und stehen mit der Außenwelt im direkten Kontakt. CD8  $T_{RM}$  sind ebenfalls in der Epidermis lokalisiert und können mit LCs interagieren (Zaid et al. 2014). Ob diese Interaktion spezifisch ist um eine schnelle Immunantwort gegen wiederkehrende eindringende Pathogene zu leisten oder andere Zellen die  $T_{RM}$  reaktivieren können war bislang unklar. Eine Studie zu den Voraussetzungen für die Aktivierung von Effektor T-Zellen in der Haut konnte zeigen, dass CD8  $T_{EF}$  von infizierten Zellen aktiviert werden und die INF- $\gamma$  Produktion induzieren, CD4  $T_{EF}$  hingegen produzierten INF- $\gamma$  ausschließlich nach Interaktion mit infizierten DCs und nicht mit DETCs (*dendritic epidermal t cells*) oder Keratinozyten (Macleod et al. 2014).

Diese Studie bezieht sich auf die Effektorphase. Unklar ist, wie die Reaktivierung von  $T_{RM}$  verläuft. Zusätzlich ist dieses Modell von der Infizierbarkeit der Zellen abhängig.

In unserem Modell konnten wir die Präsentation des MHC-Klasse I restringierten Antigens GP<sub>33-41</sub> in allen dermalen dendritischen Zellen induzieren. Durch die Verwendung des DIETER Mausmodells konnten wir zeigen, dass CD8  $T_{RM}$  von

## Diskussion

---

dermalen DCs reaktiviert werden können. Dies konnte durch die Expression von GFP in Nur77<sup>GFP</sup> positiven T-Zellen nach Aktivierung des T-Zell-Rezeptors und durch die erhöhte Expression von IFITM3 in der Haut gezeigt werden. So zeigte eine Studie über die Reaktivierung von CD8 T<sub>RM</sub>, dass durch Peptidinjektion in die Haut reaktivierte spezifische CD8 T<sub>RM</sub> durch Produktion von INF- $\gamma$  die Expression von IFITM3 in der Haut in einem Zeitraum von 6-18 Stunden erhöhen und einen antiviralen Status der Haut erzeugen (Ariotti et al. 2014).

Unter Verwendung von chimären Mäusen, bei denen nur Langerhans Zellen GP<sub>33-41</sub> nach 4OH-Tamoxifen Behandlung präsentieren konnten, zeigten Langerhans Zellen keine Reaktivierung von CD8 T<sub>RM</sub>. Dies kann zum einen daran liegen, dass sie tatsächlich keine CD8 T<sub>RM</sub> reaktivieren können, was aber infizierte Langerhans Zellen in der akuten Phase in einer anderen Studie konnten (Macleod et al. 2014). Ein anderer Grund könnte sein, dass nach der 4OH-Tamoxifen Behandlung zu wenige oder keine Langerhans Zellen das Peptid GP<sub>33-41</sub> präsentieren, um einen messbaren Effekt zu erhalten. Daher gilt noch zu klären ob Langerhans Zellen GP<sub>33-41</sub> präsentieren können und dies auch durch die 4OH-Tamoxifen Behandlung der Fall ist.

Dies ist wichtig zu klären, da es viele virale Infektionen gibt, die Langerhans Zellen direkt infizieren können. Humane LCs können beispielsweise direkt von dem *human immunodeficiency virus* (HIV) (Sugaya et al. 2004), dem Dengue-Virus (Wu et al. 2000; Schmid et al. 2014), dem Masern-Virus (van der Vlist et al. 2011) oder dem Herpes-Simplex-Virus (HSV) (Cunningham et al. 2010) infiziert werden. Um eine Reinfektion zu verhindern wäre es von Bedeutung, dass Langerhans Zellen als professionell antigenpräsentierende Zellen und in direktem Kontakt mit der Umwelt CD8 T<sub>RM</sub> effektiv reaktivieren können.

Unter Verwendung des Lang-DTREGFP Mausmodells konnten wir zeigen, dass nicht nur dermale DCs allgemein, sondern CD207<sup>-</sup> dermale DCs CD8 T<sub>RM</sub> reaktivieren können. Unter diesen dermalen DCs finden sich CD207<sup>-</sup> CD11b<sup>-</sup>, CD207<sup>-</sup> CD11b<sup>+</sup>, sowie monozytäre DCs wieder (Henri et al. 2010; Tamoutounour et al. 2013). Den größten Anteil haben dabei die CD11b<sup>+</sup> konventionellen DCs, unter inflammatorischen Bedingungen steigt der Anteil der monozytären DCs in der Haut stark (Tamoutounour et al. 2013). So konnte gezeigt werden, dass monozytäre DCs CD8 Memory-T-Zellen T-Zell-Rezeptor-unabhängig reaktivieren und die INF- $\gamma$

## Diskussion

---

Produktion induzieren (Soudja et al. 2012). Diese Art der Aktivierung ist zumindest zum Teil IL-15 abhängig und reguliert in CD8 Memory-T-Zellen die P- und E-Selektin Ligand Expression hoch (Nolz & Harty 2014).

Um zu klären welche weiteren Subtypen von Haut DCs die Reaktivierung von CD8 T<sub>RM</sub> vorantreiben und den Mechanismus dahinter zu entschlüsseln bedarf es noch weitere Forschungen. Unter Verwendung von FLT3 defizienten Mäusen, die keine konventionellen DCs und CCR2 defiziente Mäuse, die keine monozytären DCs entwickeln, kann geklärt werden welche dieser Subtypen CD8 T<sub>RM</sub> reaktivieren können. Des Weiteren kann im oben beschriebenen K14-CreERT Mausmodell die Rolle von Keratinozyten in diesem Zusammenhang beschrieben werden.

### 5.2 Teil II

#### 5.2.1 Induzierbar OVA<sub>323-339</sub> exprimierendes transgenes Mausmodell

Um CD4 T-Zell Antworten gegen Modellantigene *in vivo* zu untersuchen existieren verschiedene Mausmodelle und Methoden. Spezifische Antigene können auf verschiedene Arten den Zellen zugänglich gemacht werden. Dabei handelt es sich stets um exogene Verabreichung von Proteinen oder Peptiden, bei denen eine professionell antigenpräsentierende Zelle die jeweiligen Epitope aufnehmen muss um diese zu auf MHC Klasse II zu präsentieren. Beispielsweise können Peptide über topikale Auftragung auf die Haut (BS et al. 2015) für dendritische Zellen zugänglich gemacht werden. Ein anderer Weg ist die subkutane Injektion (Walton et al. 2006). Um speziell für dendritische Zellen im Darm diese Epitope zur Verfügung zu stellen stehen die Gavage (Walton et al. 2006) oder Administration über Futter zur Verfügung (Furrie et al. 1994). Diese Methoden haben den Vorteil relativ natürliche Aufnahmewege von Proteinen nachzuahmen, jedoch sind sie von der Pino- bzw. Phagozytose von dendritischen Zellen für die Präsentation auf MHC Klasse II abhängig, die je nach Protein unterschiedlich sein kann.

Um diesen Nachteil zu umgehen kann man sich der *Gene Gun Immunization* (Nagao et al. 2009) bedienen. Bei dieser Methode werden an Goldpartikeln gebundene Plasmide, die für ein Peptid oder Protein kodieren, in das Gewebe injiziert. Die Nanopartikel werden von dendritischen Zellen aufgenommen und die Peptide in den Zellen endogen synthetisiert (Wang & Lu 2013). Der Vorteil dieser Methodik ist eine effektive Vakzinierung, die mit Adjuvantien verstärkt werden kann (Wang & Lu 2013). Die Rolle der dendritischen Zellen kann dabei allerdings nicht untersucht werden, da die Aufnahme der Partikel unspezifisch ist. So konnte beispielsweise bei Verwendung von, für dendritische Zellen, spezifischen Promotoren (CD11c) weder eine CD4 noch eine CD8 T-Zell Antwort optimal induziert werden (Lauterbach et al. 2006).

Um selektiv Antigene den dendritischen Zell Subpopulationen verfügbar zu machen ist es möglich Proteine, wie Ovalbumin oder MOG, an spezifische Antikörper zu koppeln. Die Antikörper binden ein spezifisches Oberflächenmolekül der Subpopulation und werden zusammen mit dem Protein internalisiert. Über Prozessieren des Proteins werden Peptide auf MHC Klasse II für CD4 T-Zellen präsentiert. In vielen Studien wurden Antikörper verwendet, welche Langerin

## Diskussion

---

(aLangerin), CD205 bzw. DEC-205 (aDEC-205) oder DCIR2 (aDCIR2) erkennen und binden (Idoyaga et al. 2013; Neubert et al. 2014; Flacher et al. 2014). Bei dieser Methode ist die Untersuchung von CD8 T-Zell Antworten nur durch Kreuzpräsentation der jeweiligen dendritischen Zellen möglich. Des Weiteren binden die Antikörper nach Injektion auch dendritische Zellen in der Milz und anderen peripheren lymphatischen Organen des Körpers und nicht ausschließlich dendritische Zellen in der Haut (Idoyaga et al. 2013). Bei diesen Modellen ist die funktionelle Untersuchung nur von den DCs möglich, die das Antigen aufgenommen haben. Daher ist die Untersuchung anderer DC Subpopulationen nur mit anderen spezifischen Antikörpern möglich.

Um einige der oben genannten Nachteile zu umgehen wurde in dieser Arbeit ein transgenes Mausmodell etabliert, welches induzierbar das MHC Klasse II restringierte OVA<sub>323-339</sub> Peptid von Ovalbumin spezifische in dendritischen Zellen exprimiert und präsentiert. Dieses Modell besteht aus zwei Transgenen: CD11cCreER<sub>T</sub> und CD11c.STOP.li.OVA.eGFP. Der CD11c Promotor ist für die Spezifität in dendritischen Zellen verantwortlich, da neben aktivierten T-Zellen und Makrophagen vor allem dendritische Zellen CD11c exprimieren. Um in Zukunft die Expression des Peptids nur auf einzelnen DC Subpopulationen möglich zu machen wurde dieser Promotor für das Transgen des zu exprimierenden Peptids gewählt. So kann die Tamoxifen-induzierbare Cre-Rekombinase unter einem Promotor der Wahl verwendet werden, um eine spezifischere Expression in einer Subpopulation zu ermöglichen.

Erste Experimente zeigten, dass die Präsentation des OVA<sub>323-339</sub> nach systemischer Induktion durch Tamoxifen auf dendritischen Zellen der Milz erreicht werden kann und für eine Expansion adoptiv transferierter OT-II Zellen auf 2-3% aller CD4 T-Zellen der Milz ausreichend ist.

Die Expression von GFP in dendritischen Zellen von drei verschiedenen *Founder*-Linien variierte. Obwohl in zwei *Founder*-Linien die Expression von GFP nach Tamoxifen Behandlung detektierbar war, konnte kein GFP in einer der *Founder*-Linien nachgewiesen werden. Die Expansion von adoptiv transferierten OT-II Zellen nach Tamoxifen Behandlung lag hingegen in allen *Founder*-Linien nach 7 Tagen bei 2% bis 3% aller Lymphozyten in der Milz ohne signifikanten Unterschied.

## Diskussion

---

Die adoptiv transferierten OT-II Zellen zeigten in allen *Founder*-Linien, gemessen an dem Transkriptionsfaktor Tbet, eine Differenzierung zu T<sub>H</sub>1 Zellen, die je nach *Founder*-Linie variierte (30%, 20% und 10% Tbet Expression). Nach Restimulation zeigten die *Founder*-Linien anhand der INF- $\gamma$  Produktion in OT-II Zellen nicht mehr diese Variation. Andere Differenzierungen der OT-II Zellen wurden nicht gefunden. Da vor dem Transfer der OT-II Zellen nicht die CD44<sup>+</sup> Zellen depletiert wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass der T<sub>H</sub>1 Differenzierungsweg zuvor schon festgelegt war. Daher müssen Experimente durchgeführt werden bei denen lediglich naive OT-II Zellen transferiert werden und zusätzlich verschiedene Adjuvantien, welche T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 und T<sub>H</sub>17 Differenzierung begünstigen, verwendet werden.

Die Induktion der Präsentation des OVA<sub>323-339</sub> Epitops selektiv auf Haut DCs durch topische 4-OHTAM Behandlung führte ebenfalls zur Expansion von adoptiv transferierten OT-II Zellen. Dabei wiesen die durch Haut DCs aktivierten OT-II T-Zellen einen „*skin homing*“ Phänotyp auf und vermittelten eine leichte Protektion gegen eine Infektion in der Haut mit einem OVA exprimierenden *Vaccinia* Virus.

CD4 T Zellen haben wichtige Funktionen bei der Bekämpfung unterschiedlicher Pathogene. T<sub>H</sub>1 Zellen sind für die Abwehr von Krankheitserregern, wie *M. tuberculosis* (O'Garra et al. 2013) und viralen Infektionen (Parish et al. 2014; Maloy et al. 2000) von großer Bedeutung, während den T<sub>H</sub>2 Zellen für die Verteidigung gegen Parasiten, wie Helminthen (*N. brasiliensis*) und in Allergien eine bedeutende Rolle zukommt (Iwasaki & Medzhitov 2015). T<sub>H</sub>17 Zellen sind spezialisiert auf die Beseitigung von extrazellulären Bakterien und Pilzinfektionen (*Aspergillus fumigatus* oder *Candida albicans*) (Iwasaki & Medzhitov 2015). Hingegen sind CD4 regulatorische T-Zellen für die Erhaltung der peripheren T Zell Toleranz notwendig (Sakaguchi et al. 2008).

Die Differenzierung der CD4 T-Zellen in T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 und T<sub>H</sub>17 Zellen ist abhängig von Zytokinen, die auf die Zellen einwirken. Das Zytokinmilieu wird maßgeblich von stimulierenden Faktoren beeinflusst, welche auf TLRs, NLRs, Dectins, NODs und andere Rezeptoren wirken (Iwasaki & Medzhitov 2015; Portou et al. 2015).

Ob die Differenzierungen der CD4 T-Zellen auch spezifischen DC Subpopulationen zuzuordnen sind oder nur spezifische Subpopulationen auf bestimmte Stimuli reagieren bleibt zu klären.



## Diskussion

---

So können beispielsweise verschiedene DC Subpopulationen unterschiedliche TLRs exprimieren. Während plasmazytoide DCs u.a. die TLR-7 und -9 exprimieren (Guiducci et al. 2010), ist die Expression dieser TLRs in Langerhans Zellen deutlich geringer (Flacher et al. 2006). Des Weiteren können auch Keratinozyten Zytokine, wie IL-6, IL-10 oder IL-12, sowie Botenstoffe, wie TNF- $\alpha$  produzieren (Gröne 2002). Mit dem hier etablierten DIETER II Mausmodell kann ein spezifisches Epitop auf MHC-Klasse II Molekülen unabhängig von Aktivierung oder Reifung der dendritischen Zellen präsentiert werden. Unter Verwendung von Mausmodellen in denen DC Subpopulationen depletierbar sind und Chimärismus, kann zusätzlich diese Präsentation auf spezifische Subpopulationen eingegrenzt werden, um deren Funktion zu studieren. Dies ermöglicht sowohl Stimuli-abhängige als auch Stimuli-unabhängige funktionelle Studien einzelner Subpopulationen dendritischer Zellen in der Haut.

### 6 Quellenverzeichnis

- Ahern, P.P. et al., 2008. The interleukin-23 axis in intestinal inflammation. *Immunological reviews*, 226(1), pp.147–159.
- Ahrens, S. et al., 2012. F-actin is an evolutionarily conserved damage-associated molecular pattern recognized by DNGR-1, a receptor for dead cells. *Immunity*, 36(4), pp.635–645.
- Akdis, M. et al., 1999. Skin homing (cutaneous lymphocyte-associated antigen-positive) CD8<sup>+</sup> T cells respond to superantigen and contribute to eosinophilia and IgE production in atopic dermatitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 163(1), pp.466–475.
- Alon, R., Hammer, D.A. & Springer, T.A., 1995. Lifetime of the P-selectin-carbohydrate bond and its response to tensile force in hydrodynamic flow. *Nature*, 374(6522), pp.539–542.
- Alugupalli, K.R. et al., 2004. B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. *Immunity*, 21(3), pp.379–390.
- Alvarez, D., Vollmann, E.H. & Andrian, von, U.H., 2008. Mechanisms and Consequences of Dendritic Cell Migration. *Immunity*, 29(3), pp.325–342.
- Andrian, von, U.H. & Mackay, C.R., 2000. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *The New England journal of medicine*, 343(14), pp.1020–1034.
- Ariotti, S. et al., 2014. T cell memory. Skin-resident memory CD8<sup>+</sup> T cells trigger a state of tissue-wide pathogen alert. *Science*, 346(6205), pp.101–105.
- Ariotti, S. et al., 2012. Tissue-resident memory CD8<sup>+</sup> T cells continuously patrol skin epithelia to quickly recognize local antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(48), pp.19739–19744.
- Bachem, A. et al., 2012. Expression of XCR1 Characterizes the Batf3-Dependent Lineage of Dendritic Cells Capable of Antigen Cross-Presentation. *Frontiers in immunology*, 3, p.214.
- Bain, C.C. et al., 2012. Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. *Mucosal Immunology*, 6(3), pp.498–510.
- Banchereau, J. & Steinman, R.M., 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673), pp.245–252.
- Barnden, M.J. et al., 1998. Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunology and cell biology*, 76(1), pp.34–40.

## Quellenverzeichnis

---

- Baumgarth, N. et al., 2000. B-1 and B-2 cell-derived immunoglobulin M antibodies are nonredundant components of the protective response to influenza virus infection. *The Journal of experimental medicine*, 192(2), pp.271–280.
- Bedoui, S. et al., 2009. Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nature Immunology*, 10(5), pp.488–495.
- Bobr, A. et al., 2010. Acute Ablation of Langerhans Cells Enhances Skin Immune Responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 185(8), pp.4724–4728.
- Bousoo, P., 2008. T-cell activation by dendritic cells in the lymph node: lessons from the movies. *Nature Reviews Immunology*, 8(9), pp.675–684.
- Briskin, M. et al., 1997. Human mucosal addressin cell adhesion molecule-1 is preferentially expressed in intestinal tract and associated lymphoid tissue. *The American journal of pathology*, 151(1), pp.97–110.
- Brocker, T., Riedinger, M. & Karjalainen, K., 1997. Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *The Journal of experimental medicine*, 185(3), pp.541–550.
- BS, C.Y. et al., 2015. Skin dendritic cells induce follicular helper T cells and protective humoral immune responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, pp.1–18.
- Burnet, F.M., 1976. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *CA: a cancer journal for clinicians*, 26(2), pp.119–121.
- Bursch, L.S. et al., 2007. Identification of a novel population of Langerin+ dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*, 204(13), pp.3147–3156.
- Butcher, E.C. & Picker, L.J., 1996. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science (New York, N.Y.)*, 272(5258), pp.60–66.
- Campbell, J.J. et al., 1999. The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature*, 400(6746), pp.776–780.
- Carpenter, A.C. & Bosselut, R., 2010. Decision checkpoints in the thymus. *Nature Immunology*, 11(8), pp.666–673.
- Casey, K.A. et al., 2012. Antigen-Independent Differentiation and Maintenance of Effector-like Resident Memory T Cells in Tissues. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 188(10), pp.4866–4875.
- Cepek, K.L. et al., 1994. Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin. *Nature*, 372(6502), pp.190–193.

## Quellenverzeichnis

---

- Chorro, L. et al., 2009. Langerhans cell (LC) proliferation mediates neonatal development, homeostasis, and inflammation-associated expansion of the epidermal LC network. *The Journal of experimental medicine*, 206(13), pp.3089–3100.
- Cohn, L. et al., 2013. Antigen delivery to early endosomes eliminates the superiority of human blood BDCA3+ dendritic cells at cross presentation. *The Journal of experimental medicine*, 210(5), pp.1049–1063.
- Crozat, K. et al., 2011. Cutting Edge: Expression of XCR1 Defines Mouse Lymphoid-Tissue Resident and Migratory Dendritic Cells of the CD8 + Type. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 187(9), pp.4411–4415.
- Cunningham, A.L. et al., 2010. Viruses and Langerhans cells. *Immunology and cell biology*, 88(4), pp.416–423.
- da Costa Martins, P. et al., 2007. P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 Is Expressed on Endothelial Cells and Mediates Monocyte Adhesion to Activated Endothelium. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(5), pp.1023–1029.
- da Silva, M.V. et al., 2015. Complexity and Controversies over the Cytokine Profiles of T Helper Cell Subpopulations in Tuberculosis. *Journal of immunology research*, 2015, p.639107.
- Denzin, L.K. & Cresswell, P., 1995. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading. *Cell*, 82(1), pp.155–165.
- Diebold, S.S., 2009. Activation of dendritic cells by toll-like receptors and C-type lectins. *Handbook of experimental pharmacology*, 188(188), pp.3–30.
- Diner, E.J. et al., 2013. The innate immune DNA sensor cGAS produces a noncanonical cyclic dinucleotide that activates human STING. *Cell reports*, 3(5), pp.1355–1361.
- Donnelly, M.L. et al., 2001. The 'cleavage' activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed mutants and naturally occurring "2A-like" sequences. *The Journal of general virology*, 82(Pt 5), pp.1027–1041.
- Edelson, B.T. et al., 2011. Batf3-dependent CD11b(low/-) peripheral dendritic cells are GM-CSF-independent and are not required for Th cell priming after subcutaneous immunization. C. B. Spilianakis, ed. *PLoS ONE*, 6(10), p.e25660.
- Edelson, B.T. et al., 2010. Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8alpha+ conventional dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*, 207(4), pp.823–836.
- Farrar, J.D., Asnagli, H. & Murphy, K.M., 2002. T helper subset development: roles of instruction, selection, and transcription. *Journal of Clinical Investigation*, 109(4), pp.431–435.
- Flacher, V. et al., 2006. Human Langerhans cells express a specific TLR profile and differentially respond to viruses and Gram-positive bacteria. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 177(11), pp.7959–7967.

## Quellenverzeichnis

---

- Flacher, V. et al., 2014. Murine Langerin<sup>+</sup> dermal dendritic cells prime CD8<sup>+</sup> T cells while Langerhans cells induce cross-tolerance. *EMBO molecular medicine*, 6(9), pp.1191–1204.
- Furrie, E., Turner, M.W. & Strobel, S., 1994. Failure of SCID mice to generate an oral tolerogen after a feed of ovalbumin: a role for a functioning gut-associated lymphoid system. *Immunology*, 83(4), pp.562–567.
- Gallucci, S. & Matzinger, P., 2001. Danger signals: SOS to the immune system. *Current Opinion in Immunology*, 13(1), pp.114–119.
- Gautier, E.L. et al., 2012. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nature Immunology*, 13(11), pp.1118–1128.
- Gebhardt, T. et al., 2011. Different patterns of peripheral migration by memory CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. *Nature*, 477(7363), pp.216–219.
- Gebhardt, T. et al., 2009. Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nature Immunology*, 10(5), pp.524–530.
- Geissmann, F. et al., 2010. Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5966), pp.656–661.
- Ginhoux, F. et al., 2007. Blood-derived dermal langerin<sup>+</sup> dendritic cells survey the skin in the steady state. *Journal of Experimental Medicine*, 204(13), pp.3133–3146.
- Gomez de Agüero, M. et al., 2012. Langerhans cells protect from allergic contact dermatitis in mice by tolerizing CD8<sup>+</sup> T cells and activating Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Journal of Clinical Investigation*, 122(5), pp.1700–1711.
- Grawunder, U., West, R.B. & Lieber, M.R., 1998. Antigen receptor gene rearrangement. *Current Opinion in Immunology*, 10(2), pp.172–180.
- Gregorio, J. et al., 2010. Plasmacytoid dendritic cells sense skin injury and promote wound healing through type I interferons. *The Journal of experimental medicine*, 207(13), pp.2921–2930.
- Gröne, A., 2002. Keratinocytes and cytokines. *Veterinary immunology and immunopathology*, 88(1-2), pp.1–12.
- Guiducci, C. et al., 2010. TLR recognition of self nucleic acids hampers glucocorticoid activity in lupus. *Nature*, 465(7300), pp.937–941.
- Guilliams, M., Crozat, K., et al., 2010. Skin-draining lymph nodes contain dermis-derived CD103(-) dendritic cells that constitutively produce retinoic acid and induce Foxp3(+) regulatory T cells. *Blood*, 115(10), pp.1958–1968.
- Guilliams, M., Henri, S., et al., 2010. From skin dendritic cells to a simplified classification of human and mouse dendritic cell subsets. *European Journal of Immunology*, 40(8), pp.2089–2094.

## Quellenverzeichnis

---

- Haas, K.M. et al., 2005. B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity*, 23(1), pp.7–18.
- Hawiger, D. et al., 2001. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *The Journal of experimental medicine*, 194(6), pp.769–779.
- Hawke, S. et al., 1998. Long-term persistence of activated cytotoxic T lymphocytes after viral infection of the central nervous system. *The Journal of experimental medicine*, 187(10), pp.1575–1582.
- Henden, A.S. & Hill, G.R., 2015. Cytokines in Graft-versus-Host Disease. *The Journal of Immunology*, 194(10), pp.4604–4612.
- Hengartner, H. et al., 1988. Deletion of self-reactive T cells before entry into the thymus medulla. *Nature*, 336(6197), pp.388–390.
- Henri, S. et al., 2010. CD207+ CD103+ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells. *Journal of Experimental Medicine*, 207(1), pp.189–206.
- Heuzé, M.L. et al., 2013. Migration of dendritic cells: physical principles, molecular mechanisms, and functional implications. *Immunological reviews*, 256(1), pp.240–254.
- Hidalgo, A. et al., 2007. Complete Identification of E-Selectin Ligands on Neutrophils Reveals Distinct Functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity*, 26(4), pp.477–489.
- Hildner, K. et al., 2008. Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science*, 322(5904), pp.1097–1100.
- Hoeffel, G. et al., 2012. Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *The Journal of experimental medicine*, 209(6), pp.1167–1181.
- Hogan, R.J. et al., 2001. Activated Antigen-Specific CD8+ T Cells Persist in the Lungs Following Recovery from Respiratory Virus Infections. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 166(3), pp.1813–1822.
- Homey, B. et al., 2002. CCL27–CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. *Nature Medicine*, 8(2), pp.1–9.
- Idoyaga, J., Fiorese, C. & Zbytnuik, L., 2013. Specialized role of migratory dendritic cells in peripheral tolerance induction. *The Journal of clinical Investigation*, 123(1), pp.1–11.
- Igyártó, B.Z. et al., 2011. Skin-resident murine dendritic cell subsets promote distinct and opposing antigen-specific T helper cell responses. *Immunity*, 35(2), pp.260–272.
- Islam, S.A. & Luster, A.D., 2012. T cell homing to epithelial barriers in allergic disease. *Nature Medicine*, 18(5), pp.705–715.

## Quellenverzeichnis

---

- Iwasaki, A. & Medzhitov, R., 2015. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature Immunology*, 16(4), pp.343–353.
- Jakubzick, C. et al., 2013. Minimal Differentiation of Classical Monocytes as They Survey Steady-State Tissues and Transport Antigen to Lymph Nodes. *Immunity*, 39(3), pp.599–610.
- Janeway, C.A. & Medzhitov, R., 2002. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, 20, pp.197–216.
- Jeske, D.J. et al., 1984. Junctional diversity is essential to antibody activity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 133(3), pp.1090–1092.
- Jiang, X. et al., 2012. Skin infection generates non-migratory memory CD8<sup>+</sup> T(RM) cells providing global skin immunity. *Nature*, 483(7388), pp.227–231.
- Joffre, O. et al., 2009. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunological reviews*, 227(1), pp.234–247.
- Kaech, S.M. & Wherry, E.J., 2007. Heterogeneity and cell-fate decisions in effector and memory CD8<sup>+</sup> T cell differentiation during viral infection. *Immunity*, 27(3), pp.393–405.
- Kautz-Neu, K. et al., 2011. Langerhans cells are negative regulators of the anti-Leishmania response. *Journal of Experimental Medicine*, 208(5), pp.885–891.
- Kissenpfennig, A. et al., 2005. Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity*, 22(5), pp.643–654.
- Kitajima, M. & Ziegler, S.F., 2013. Cutting Edge: Identification of the Thymic Stromal Lymphopoietin-Responsive Dendritic Cell Subset Critical for Initiation of Type 2 Contact Hypersensitivity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 191(10), pp.4903–4907.
- Konradi, S. et al., 2013. Langerhans cell maturation is accompanied by induction of N-cadherin and the transcriptional regulators of epithelial-mesenchymal transition ZEB1/2. *European Journal of Immunology*, 44(2), pp.553–560.
- Korn, T. et al., 2009. IL-17 and Th17 Cells. *Annual Review of Immunology*, 27, pp.485–517.
- Kunkel, E.J. et al., 2000. Lymphocyte CC chemokine receptor 9 and epithelial thymus-expressed chemokine (TECK) expression distinguish the small intestinal immune compartment: Epithelial expression of tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional immunity. *The Journal of experimental medicine*, 192(5), pp.761–768.
- Lauterbach, H. et al., 2006. Insufficient APC capacities of dendritic cells in gene gun-mediated DNA vaccination. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(8), pp.4600–4607.

## Quellenverzeichnis

---

- Ley, K. & Kansas, G.S., 2004. Selectins in T-cell recruitment to non-lymphoid tissues and sites of inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 4(5), pp.325–335.
- Ley, K. et al., 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology*, 7(9), pp.678–689.
- Liu, J. et al., 2013. Non-parallel recombination limits Cre-LoxP-based reporters as precise indicators of conditional genetic manipulation. *genesis*, 51(6), pp.436–442.
- Liu, K. et al., 2007. Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice. *Nature Immunology*, 8(6), pp.578–583.
- Lo, D., Ron, Y. & Sprent, J., 1986. Induction of MHC-restricted specificity and tolerance in the thymus. *Immunologic research*, 5(3), pp.221–232.
- Luche, H. et al., 2007. Faithful activation of an extra-bright red fluorescent protein in “knock-in” Cre-reporter mice ideally suited for lineage tracing studies. *European Journal of Immunology*, 37(1), pp.43–53.
- Mackay, C.R., Marston, W.L. & Dudler, L., 1990. Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. *The Journal of experimental medicine*, 171(3), pp.801–817.
- Mackay, L.K. et al., 2013. The developmental pathway for CD103(+)CD8+ tissue-resident memory T cells of skin. *Nature Publishing Group*, 14(12), pp.1294–1301.
- Macleod, B.L. et al., 2014. Distinct APC subtypes drive spatially segregated CD4+ and CD8+ T-cell effector activity during skin infection with HSV-1. R. D. Everett, ed. *PLoS pathogens*, 10(8), p.e1004303.
- Malissen, B., Tamoutounour, S. & Henri, S., 2014. The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin. *Nature Publishing Group*, 14(6), pp.417–428.
- Maloy, K.J. et al., 2000. CD4(+) T cell subsets during virus infection. Protective capacity depends on effector cytokine secretion and on migratory capability. *The Journal of experimental medicine*, 191(12), pp.2159–2170.
- Masopust, D. et al., 2006. Cutting edge: gut microenvironment promotes differentiation of a unique memory CD8 T cell population. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(4), pp.2079–2083.
- Masopust, D. et al., 2010. Dynamic T cell migration program provides resident memory within intestinal epithelium. *Journal of Experimental Medicine*, 207(3), pp.553–564.
- Masopust, D. et al., 2001. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science (New York, N.Y.)*, 291(5512), pp.2413–2417.
- Merad, M. et al., 2002. Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nature Immunology*, 3(12), pp.1135–1141.



## Quellenverzeichnis

---

- Merad, M. et al., 2013. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annual Review of Immunology*, 31, pp.563–604.
- Meredith, M.M. et al., 2012. Expression of the zinc finger transcription factor zDC (Zbtb46, Btbd4) defines the classical dendritic cell lineage. *Journal of Experimental Medicine*, 209(6), pp.1153–1165.
- Mollah, S.A. et al., 2014. Flt3L Dependence Helps Define an Uncharacterized Subset of Murine Cutaneous Dendritic Cells. *The Journal of investigative dermatology*, 134(5), pp.1265–1275.
- Moran, A.E. et al., 2011. T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse. *Journal of Experimental Medicine*, 208(6), pp.1279–1289.
- Mucida, D. et al., 2007. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science*, 317(5835), pp.256–260.
- Murphy, T.L., Tussiwand, R. & Murphy, K.M., 2013. Specificity through cooperation: BATF–IRF interactions control immune-regulatory networks. *Nature Publishing Group*, 13(7), pp.499–509.
- Müller, A.J. et al., 2012. CD4+ T cells rely on a cytokine gradient to control intracellular pathogens beyond sites of antigen presentation. *Immunity*, 37(1), pp.147–157.
- Münz, C., Steinman, R.M. & Fujii, S.-I., 2005. Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity. *The Journal of experimental medicine*, 202(2), pp.203–207.
- Nagao, K. et al., 2009. Murine epidermal Langerhans cells and langerin-expressing dermal dendritic cells are unrelated and exhibit distinct functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(9), pp.3312–3317.
- Nagata, S. & Golstein, P., 1995. The Fas death factor. *Science (New York, N.Y.)*, 267(5203), pp.1449–1456.
- Neubert, K. et al., 2014. Antigen Delivery to CD11c+CD8- Dendritic Cells Induces Protective Immune Responses against Experimental Melanoma in Mice In Vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 192(12), pp.5830–5838.
- Nizza, S.T. & Campbell, J.J., 2014. CD11b+ Migratory Dendritic Cells Mediate CD8 T Cell Cross-Priming and Cutaneous Imprinting after Topical Immunization N. Gangopadhyay, ed. *PLoS ONE*, 9(3), pp.e91054–8.
- Nolz, J.C. & Harty, J.T., 2014. IL-15 regulates memory CD8+ T cell O-glycan synthesis and affects trafficking. *Journal of Clinical Investigation*, 124(3), pp.1013–1026.
- O'Garra, A. et al., 2013. The immune response in tuberculosis. *Annual Review of Immunology*, 31, pp.475–527.

## Quellenverzeichnis

---

- Ochsenbein, A.F. et al., 2000. Protective long-term antibody memory by antigen-driven and T help-dependent differentiation of long-lived memory B cells to short-lived plasma cells independent of secondary lymphoid organs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(24), pp.13263–13268.
- Ohashi, P.S. et al., 1991. Ablation of “tolerance” and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell*, 65(2), pp.305–317.
- Orkin, S.H. & Zon, L.I., 2008. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*, 132(4), pp.631–644.
- Ouchi, T. et al., 2011. Langerhans cell antigen capture through tight junctions confers preemptive immunity in experimental staphylococcal scalded skin syndrome. *The Journal of experimental medicine*, 208(13), pp.2607–2613.
- Palm, N.W., Rosenstein, R.K. & Medzhitov, R., 2012. Allergic host defences. *Nature*, 484(7395), pp.465–472.
- Parish, I.A. et al., 2014. Chronic viral infection promotes sustained Th1-derived immunoregulatory IL-10 via BLIMP-1. *Journal of Clinical Investigation*, 124(8), pp.3455–3468.
- Pircher, H. et al., 1989. Tolerance induction in double specific T-cell receptor transgenic mice varies with antigen. *Nature*, 342(6249), pp.559–561.
- Poltorak, M.P. & Schraml, B.U., 2015. Fate mapping of dendritic cells. *Frontiers in immunology*, 6, p.199.
- Portou, M.J. et al., 2015. The innate immune system, toll-like receptors and dermal wound healing: A review. *Vascular Pharmacology*, pp.1–6.
- Poulin, L.F. et al., 2007. The dermis contains langerin+ dendritic cells that develop and function independently of epidermal Langerhans cells. *Journal of Experimental Medicine*, 204(13), pp.3119–3131.
- Prlc, M., Williams, M.A. & Bevan, M.J., 2007. Requirements for CD8 T-cell priming, memory generation and maintenance. *Current Opinion in Immunology*, 19(3), pp.315–319.
- Probst, H.C. et al., 2003. Inducible transgenic mice reveal resting dendritic cells as potent inducers of CD8+ T cell tolerance. *Immunity*, 18(5), pp.713–720.
- Randolph, G.J., Angeli, V. & Swartz, M.A., 2005. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nature Reviews Immunology*, 5(8), pp.617–628.
- Reinhardt, R.L. et al., 2001. Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature*, 410(6824), pp.101–105.
- Robbins, S.H. et al., 2008. Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome biology*, 9(1), p.R17.

## Quellenverzeichnis

---

- Saenz, S.A., Taylor, B.C. & Artis, D., 2008. Welcome to the neighborhood: epithelial cell-derived cytokines license innate and adaptive immune responses at mucosal sites. *Immunological reviews*, 226, pp.172–190.
- Sakaguchi, S. et al., 2008. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell*, 133(5), pp.775–787.
- Salgado, C.G. et al., 1999. Functional CD40 ligand is expressed on epidermal Langerhans cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 66(2), pp.281–285.
- Sallusto, F. et al., 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 401(6754), pp.708–712.
- Satpathy, A.T. et al., 2012. Zbtb46 expression distinguishes classical dendritic cells and their committed progenitors from other immune lineages. *Journal of Experimental Medicine*, 209(6), pp.1135–1152.
- Schenkel, J.M. & Masopust, D., 2014. Tissue-Resident Memory T Cells. *Immunity*, 41(6), pp.886–897.
- Schildknecht, A. et al., 2007. Priming of CD8+ T cell responses by pathogens typically depends on CD70-mediated interactions with dendritic cells. *European Journal of Immunology*, 37(3), pp.716–728.
- Schmid, M.A., Diamond, M.S. & Harris, E., 2014. Dendritic cells in dengue virus infection: targets of virus replication and mediators of immunity. *Frontiers in immunology*, 5, p.647.
- Schwenk, F., Baron, U. & Rajewsky, K., 1995. A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic acids research*, 23(24), pp.5080–5081.
- Segura, E. et al., 2013. Human Inflammatory Dendritic Cells Induce Th17 Cell Differentiation. *Immunity*, 38(2), pp.336–348.
- Seneschal, J., Jiang, X. & Kupper, T.S., 2014. Langerin+ dermal DC, but not Langerhans cells, are required for effective CD8-mediated immune responses after skin scarification with vaccinia virus. *Journal of Investigative Dermatology*, 134(3), pp.686–694.
- Serbina, N.V. & Pamer, E.G., 2006. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nature Immunology*, 7(3), pp.311–317.
- Sheridan, B.S. & Lefrançois, L., 2011. Regional and mucosal memory T cells. *Nature Immunology*, 12(6), pp.485–491.
- Sherman, M.A., Weber, D.A. & Jensen, P.E., 1995. DM enhances peptide binding to class II MHC by release of invariant chain-derived peptide. *Immunity*, 3(2), pp.197–205.

## Quellenverzeichnis

---

- Shklovskaya, E. et al., 2011. Langerhans cells are precommitted to immune tolerance induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(44), pp.18049–18054.
- Shortman, K. & Liu, Y.-J., 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature Reviews Immunology*, 2(3), pp.151–161.
- Sigmundsdottir, H. & Butcher, E.C., 2008. Environmental cues, dendritic cells and the programming of tissue-selective lymphocyte trafficking. *Nature Immunology*, 9(9), pp.981–987.
- Sigmundsdottir, H. et al., 2007. DCs metabolize sunlight-induced vitamin D3 to “program” T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27. *Nature Immunology*, 8(3), pp.285–293.
- Smith, C.M. et al., 2006. CD4+ T cells specific for a model latency-associated antigen fail to control a gammaherpesvirus in vivo. *European Journal of Immunology*, 36(12), pp.3186–3197.
- Smith-Garvin, J.E., Koretzky, G.A. & Jordan, M.S., 2009. T Cell Activation. *Annual Review of Immunology*, 27(1), pp.591–619.
- Soudja, S.M. et al., 2012. Inflammatory monocytes activate memory CD8(+) T and innate NK lymphocytes independent of cognate antigen during microbial pathogen invasion. *Immunity*, 37(3), pp.549–562.
- Sprent, J. et al., 1988. T cell selection in the thymus. *Immunological reviews*, 101, pp.173–190.
- Steinman, R.M., 2012. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annual Review of Immunology*, 30, pp.1–22.
- Steinman, R.M., 2008. Dendritic cells in vivo: a key target for a new vaccine science. *Immunity*, 29(3), pp.319–324.
- Steinman, R.M. & Cohn, Z.A., 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of experimental medicine*, 137(5), pp.1142–1162.
- Steinman, R.M. & Cohn, Z.A., 1974. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *The Journal of experimental medicine*, 139(2), pp.380–397.
- Steinman, R.M. & Hemmi, H., 2006. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Current topics in microbiology and immunology*, 311, pp.17–58.
- Steinman, R.M., Hawiger, D. & Nussenzweig, M.C., 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, 21, pp.685–711.
- Sugaya, M. et al., 2004. HIV-infected Langerhans cells preferentially transmit virus to proliferating autologous CD4+ memory T cells located within Langerhans cell-T cell clusters. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 172(4), pp.2219–2224.

## Quellenverzeichnis

---

- Swiecki, M. et al., 2010. Plasmacytoid Dendritic Cell Ablation Impacts Early Interferon Responses and Antiviral NK and CD8+ T Cell Accrual. *Immunity*, 33(6), pp.955–966.
- Tait Wojno, E.D. & Artis, D., 2012. Innate lymphoid cells: balancing immunity, inflammation, and tissue repair in the intestine. *Cell host & microbe*, 12(4), pp.445–457.
- Tamoutounour, S. et al., 2012. CD64 distinguishes macrophages from dendritic cells in the gut and reveals the Th1-inducing role of mesenteric lymph node macrophages during colitis. *European Journal of Immunology*, 42(12), pp.3150–3166.
- Tamoutounour, S. et al., 2013. Origins and Functional Specialization of Macrophages and of Conventional and Monocyte-Derived Dendritic Cells in Mouse Skin. *Immunity*, pp.1–14.
- Teijaro, J.R. et al., 2011. Cutting Edge: Tissue-Retentive Lung Memory CD4 T Cells Mediate Optimal Protection to Respiratory Virus Infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 187(11), pp.5510–5514.
- Teng, G. & Papavasiliou, F.N., 2007. Immunoglobulin somatic hypermutation. *Annual review of genetics*, 41, pp.107–120.
- Tomura, M. et al., 2014. Tracking and quantification of dendritic cell migration and antigen trafficking between the skin and lymph nodes. *Scientific reports*, 4, p.6030.
- Tussiwand, R. et al., 2012. Compensatory dendritic cell development mediated by BATF-IRF interactions. *Nature*, 490(7421), pp.502–507.
- van der Vlist, M. et al., 2011. Human Langerhans cells capture measles virus through Langerin and present viral antigens to CD4+ T cells but are incapable of cross-presentation. *European Journal of Immunology*, 41(9), pp.2619–2631.
- Vitali, C. et al., 2012. Migratory, and not lymphoid-resident, dendritic cells maintain peripheral self-tolerance and prevent autoimmunity via induction of iTreg cells. *Blood*, 120(6), pp.1237–1245.
- Vremec, D. et al., 2000. CD4 and CD8 Expression by Dendritic Cell Subtypes in Mouse Thymus and Spleen. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 164(6), pp.2978–2986.
- Waithman, J. et al., 2007. Skin-derived dendritic cells can mediate deletional tolerance of class I-restricted self-reactive T cells. *Journal of immunology*, 179(7), pp.4535–4541.
- Wakim, L.M., Woodward-Davis, A. & Bevan, M.J., 2010. Memory T cells persisting within the brain after local infection show functional adaptations to their tissue of residence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(42), pp.17872–17879.

## Quellenverzeichnis

---

- Walton, K.L.W. et al., 2006. T cell-mediated oral tolerance is intact in germ-free mice. *Clinical and experimental immunology*, 143(3), pp.503–512.
- Wang, S. & Lu, S., 2013. DNA immunization. *Current protocols in microbiology*, 31, pp.18.3.1–18.3.24.
- Wherry, E.J. et al., 2003. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nature Immunology*, 4(3), pp.225–234.
- Witmer-Pack, M.D. et al., 1987. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor is essential for the viability and function of cultured murine epidermal Langerhans cells. *The Journal of experimental medicine*, 166(5), pp.1484–1498.
- Wohn, C. et al., 2013. Langerin(neg) conventional dendritic cells produce IL-23 to drive psoriatic plaque formation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(26), pp.10723–10728.
- Wu, S.J. et al., 2000. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nature Medicine*, 6(7), pp.816–820.
- Wynn, T.A., 2015. Type 2 cytokines: mechanisms and therapeutic strategies. *Nature Publishing Group*, 15(5), pp.271–282.
- Yamazaki, C. et al., 2010. Conservation of a chemokine system, XCR1 and its ligand, XCL1, between human and mice. *Biochemical and biophysical research communications*, 397(4), pp.756–761.
- Zaid, A. et al., 2014. Persistence of skin-resident memory T cells within an epidermal niche. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(14), pp.5307–5312.
- Zarbock, A. et al., 2009. PSGL-1-dependent myeloid leukocyte activation. *Journal of Leukocyte Biology*, 86(5), pp.1119–1124.
- Zhang, J.-G. et al., 2012. The dendritic cell receptor Clec9A binds damaged cells via exposed actin filaments. *Immunity*, 36(4), pp.646–657.
- Zhu, J., Yamane, H. & Paul, W.E., 2010. Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annual Review of Immunology*, 28(1), pp.445–489.
- Ziegler, A. et al., 2009. Low-affinity peptides and T-cell selection. *Trends in Immunology*, 30(2), pp.53–60.
- Zinkernagel, R.M. & Doherty, P.C., 1974. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*, 248(5450), pp.701–702.

