

Regulation der Funktion Dendritischer Zellen
im immunologischen Steady State

Dissertation

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Sabine Muth

geboren am 25. August 1982 in Mainz

Mainz, August 2012

Tag der mündlichen Prüfung: 1. Februar 2013

Für meinen Mann

Zusammenfassung

Periphere Toleranz Mechanismen sind für die Kontrolle autoreaktiver T-Zellen, welche bei der negativen Selektion im Thymus nicht eliminiert wurden, von größter Bedeutung und verhindern die Entstehung von Autoimmunität. Ruhende Dendritische Zellen (DCs) im immunologischen Steady State, das heißt in Abwesenheit von Infektionen oder Entzündungen, spielen eine zentrale Rolle in der peripheren Toleranz Induktion. Diese Dissertation untersucht tolerogene Dendritische Zellen im immunologischen Steady State und analysiert den Einfluss von unterschiedlichen Zelltypen und Mechanismen auf die periphere Toleranz Induktion durch Dendritische Zellen unter homöostatischen Bedingungen. Als Modellsystem wurde hierfür ein transgenes Mausmodell verwendet, welches die induzierbare Expression transgen kodierter CD8+ T-Zell (CTL) Epitope auf ruhenden DCs ermöglicht. Wir konnten zeigen, dass die periphere Toleranz Induktion durch Dendritische Zellen in Abwesenheit von suppressiven CD4+ T-Zellen beeinträchtigt ist. Nach Depletion von CD4+ T-Zellen hatten Dendritische Zellen einen aktivierten Phänotyp und lösten eine funktionale CTL-Antwort aus, anstatt periphere CD8+ T-Zellen zu tolerieren. Dabei konnten wir FoxP3+ CD4+ T-Zellen als die Population suppressiver CD4+ T-Zellen identifizieren, welche die T-Zell Aktivierung durch Dendritische Zellen im immunologischen Steady State verhindert. Wir konnten verdeutlichen, dass für die Suppression von steady-state DCs die Erkennung von MHCII Molekülen auf Dendritischen Zellen durch den T-Zell-Rezeptor regulatorischer T-Zellen zwingend erforderlich ist. Ebenso wie nach CD4+ T-Zell Depletion war die periphere Toleranz Induktion durch DCs, welche nicht mit CD4+ T-Zellen interagieren konnten, beeinträchtigt. Gleichzeitig zeigten auch diese Dendritische Zellen einen aktivierten Phänotyp. Wir konnten zudem zeigen, dass sich als Folge fehlender direkter Interaktion zwischen Dendritischen Zellen und regulatorischen T-Zellen spontane Autoimmunität entwickelt, welche durch autoreaktive CD8+ T-Zellen mediiert wird. Weiterhin haben wir ein Modellsystem entwickelt, mit dem wir die unterschiedlichen Mechanismen und Moleküle, die bei der regulatorischen T-Zell mediierten Suppression von Dendritischen Zellen im immunologischen Steady State eine Rolle spielen, untersuchen können. Mit diesem Modellsystem konnten wir verdeutlichen, dass regulatorische T-Zellen CTLA-4 und LFA-1 exprimieren müssen, um Dendritische Zellen zu supprimieren, nicht aber IL-10. Zudem haben wir untersucht, welche Signale die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen im immunologischen Steady State in Abwesenheit suppressiver CD4+ T-Zellen fördern und somit das T-Zell Priming, das heißt das Auslösen einer funktionalen T-Zell Antwort, medieren. Wir konnten zeigen, dass basale Level an Typ I Interferonen sowie CD40 Signale, welche von adaptiven

Immunzellen geliefert werden, hierfür entscheidend sind. Dabei erfordert das Priming zytotoxischer T-Zellen durch steady-state DCs in Abwesenheit regulatorischer T-Zellen die Expression von CD70 auf Dendritischen Zellen. In einem weiteren Teil dieser Arbeit haben wir die Beteiligung unterschiedlicher Subklassen Dendritischer Zellen in der peripheren Toleranz Induktion untersucht. Unsere Ergebnisse verdeutlichen, dass periphere CD8+ T-Zell Toleranz lediglich durch CD8+ Dendritische Zellen induziert wird, nicht aber durch CD8- Dendritische Zellen.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.1.1	Das angeborene Immunsystem	1
1.1.2	Rezeptoren des angeborenen Immunsystems	2
1.1.3	Das adaptive Immunsystem	3
1.2	T-Zellen	4
1.2.1	T-Zell Toleranz	5
1.2.2	Suppressions-Mechanismen regulatorischer T-Zellen	6
1.3	Dendritische Zellen	7
1.3.1	Dendritische Zellen in der Induktion von T-Zell Antworten	8
1.3.2	Dendritische Zellen in der Induktion von peripherer T-Zell Toleranz	10
1.3.3	Subklassen Dendritischer Zellen in der Maus	10
1.4	Das DIETER Maus Model	12
1.5	Ziel der Arbeit	14
2.	Material und Methoden	15
2.1	Material	15
2.1.1	Geräte	15
2.1.2	Verbrauchsmaterial	15
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien	16
2.1.4	Enzyme	17
2.1.5	Puffer	18
2.1.6	Lösungen	18
2.1.7	Peptide	19
2.1.8	Oligonukleotide	19

2.1.9	Antikörper	20
2.1.10	Zelllinien	23
2.1.11	Zellkultur Medien	24
2.1.12	Mausstämme	25
2.1.13	Viren	27
2.2	Methoden	28
2.2.1	Zellkultur	28
2.2.1.1	Kultivierung von Zellen	28
2.2.1.2	Kryokonservierung von Zellen	28
2.2.1.3	Auftauen von Zellen	29
2.2.1.4	Bestimmung der Lebendzellzahl	29
2.2.2	Biochemische Methoden	29
2.2.2.1	Affinitätschromatographie zur Aufreinigung von Antikörpern	29
2.2.3	Tierexperimentelle Methoden	29
2.2.3.1	Blutentnahme und Lymphozyten Aufreinigung	30
2.2.3.2	Milz Entnahme und Präparation	30
2.2.3.3	Lymphknoten Entnahme und Präparation	30
2.2.3.4	Dendritische Zell Isolation aus Milz und Lymphknoten	31
2.2.3.5	Genotypisierung transgener Mäuse mittels PCR	31
2.2.3.6	Genotypisierung transgener Mäuse im Blut	33
2.2.3.7	Generierung von Knochenmarkchimären	33
2.2.3.8	Beurteilung von Autoimmunität	34
2.2.3.9	Infektion mit LCMV	34
2.2.3.10	Induktion der Antigenpräsentation in DIETER Mäusen und funktioneller Readout	35
2.2.3.11	CD4+ T-Zell Depletion in DIETER Mäusen	35
2.2.3.12	<i>In vivo</i> Suppressions Assay regulatorischer T-Zellen	35
2.2.4	Immunbiologische Methoden	35
2.2.4.1	Färbung von Lymphozyten mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper	35
2.2.4.2	Nachweis Antigen spezifischer T-Zellen mittels Tetramer	36
2.2.4.3	Intrazelluläre Färbung von IFN γ	36
2.2.4.4	Durchflusszytometrie (FACS)	37
2.2.4.5	Magnetische Zellseparation (MACS) zur positiven Selektion von T-Zellen	37

2.2.4.6	In vitro Proliferationstest durch [³ H]-Thymidin Einbau	39
2.2.4.7	Plaque Assay zur Bestimmung des Virus-Titers	40
2.2.4.8	Aufkonzentration von Dendritischen Zellen mittels Dichtegradienten-Zentrifugation	41
2.2.4.9	Quantitative Analyse der Antigenpräsentation von DIETER Mäusen	41
2.2.4.10	Immunhistochemie (Histologie)	42
2.2.5	Statistische Analyse	42
3.	Ergebnisse	43
3.1	Kooperation von regulatorischen CD4+ T-Zellen und Dendritischen Zellen im immunologischen Steady State	43
3.1.1	Die periphere Toleranz Induktion durch Dendritische Zellen ist in Abwesenheit von suppressiven CD4+ T-Zellen beeinträchtigt	43
3.1.2	Dendritische Zellen und suppressive CD4+ T-Zellen müssen direkt miteinander interagieren, um CD8+ T-Zell Toleranz zu induzieren	46
3.1.3	Normale Anzahl funktionaler FoxP3+ CD4+ regulatorischer T-Zellen in MHCII-/-DIETER I WT gemischten Knochenmarkchimären	48
3.1.4	Normale Periphere Toleranz Induktion durch MHCII kompetente Dendritische Zellen in Mäusen, deren APCs zur Hälfte MHCII defizient sind	50
3.1.5	MHCII defiziente DCs sind im Vergleich zu WT DCs aktiviert	51
3.1.6	Dendritische Zellen, welche nicht mit CD4+ T-Zellen interagieren können, induzieren CTL medierte Autoimmunität	52
3.1.7	CTL medierte Autoimmunität in MHCII-/- I WT Chimären wird durch MHCII defiziente DCs induziert	55

3.2	Mechanismen FoxP3+ CD4+ regulatorischer T-Zell mediierter Suppression von Dendritischen Zellen im immunologischen Steady State	56
3.2.1	Modelbeschreibung zur Untersuchung der Mechanismen FoxP3+ CD4+ T-Zell mediierter Suppression von Dendritischen Zellen <i>in vivo</i>	56
3.2.2	FoxP3+ regulatorische T-Zellen sind die suppressive CD4+ T- Zell Population, welche die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen im immunologischen Steady State supprimiert	58
3.2.3	Einfluss von CTLA-4 auf die Treg medierte Suppression von Dendritischen Zellen im immunologischen Steady State	60
3.2.4	Einfluss von LFA-1 auf die Treg medierte Suppression von Dendritischen Zellen im immunologischen Steady State	61
3.2.5	Einfluss von Interleukin-10 auf die Treg medierte Suppression von Dendritischen Zellen im immunologischen Steady State	63
3.3	Zelltypen und Mechanismen, welche Dendritische Zellen im immunologischen Steady State in der Abwesenheit von suppressiven CD4+ T-Zellen aktivieren	65
3.3.1	Die Rolle von Typ I Interferonen auf die funktionelle Aktivierung von Dendritischen Zellen im immunologischen Steady State in Abwesenheit von suppressiven CD4+ T-Zellen	65
3.3.1.1	Modellsystem	65
3.3.1.2	Normale Entwicklung und Antigenpräsentation von Typ I IFN Rezeptor defizienten Dendritischen Zellen in IFNR-/-DIETER I WT gemischten Knochenmarkchimären	66
3.3.1.3	Typ I IFN Rezeptor defiziente Dendritische Zellen aktivieren CTLs in Abwesenheit von suppressiven CD4+ T-Zellen schwächer als WT DCs	68
3.3.1.4	Typ I IFN tragen zur Aktivierung Dendritischer Zellen im immunologischen Steady State bei	69

3.3.1.5	Suppressive CD4+ T-Zellen verhindern die Aktivierung Dendritischer Zellen durch tonische Typ I Interferone im immunologischen Steady State	71
3.3.1.6	Die Aktivierung Dendritischer Zellen durch Anti-CD40 ist abhängig von Typ I Interferonen	72
3.3.2	Die Rolle von CD40 Signalen auf die funktionelle Aktivierung von Dendritischen Zellen im immunologischen Steady State in Abwesenheit von suppressiven CD4+ T-Zellen	74
3.3.2.1	Modellsystem	74
3.3.2.2	Normale Entwicklung und Antigenpräsentation von CD40 defizienten DCs in CD40 ^{-/-} DIETER I WT gemischten Knochenmarkchimären	74
3.3.2.3	CD40 defiziente Dendritische Zellen lösen in Abwesenheit von suppressiven CD4+ T-Zellen eine stark reduzierte CTL-Antwort aus	76
3.3.2.4	CD40 defiziente Dendritische Zellen zeigen in Abwesenheit von suppressiven CD4+ T-Zellen einen aktivierten Phänotyp	77
3.3.2.5	Blockierung des CD70 Signalweges beeinträchtigt die CTL Aktivierung im immunologischen Steady State in Abwesenheit von suppressiven CD4+ T-Zellen	79
3.3.2.6	Zellen des adaptiven Immunsystems medieren die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen durch CD40 Ligation im immunologischen Steady State in Abwesenheit von suppressiven CD4+ T-Zellen	80
3.3.3	Die Rolle von TLR-Liganden auf die funktionelle Aktivierung von Dendritischen Zellen im immunologischen Steady State in Abwesenheit von suppressiven CD4+ T-Zellen	83
3.3.3.1	Modellsystem	83
3.3.3.2	MyD88 defiziente Dendritische Zellen können ebenso wie WT DCs zytotoxische T-Zellen in Abwesenheit von suppressiven CD4+ T-Zellen aktivieren	84
3.4	Periphere Toleranz Induktion durch CD8+ Dendritische Zellen	86
3.4.1	Die Periphere Toleranz Induktion ist in Mäusen, welche defizient für CD8+ Dendritische Zellen sind, beeinträchtigt	86

4.	Diskussion	95
4.1	Suppression von Dendritischen Zellen im immunologischen Steady State	96
4.2	Funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen im immunologischen Steady State in Abwesenheit von regulatorischen T-Zellen	103
4.3	Subtypen Dendritischer Zellen in der Peripheren Toleranz Induktion und der Aktivierung von T-Zell Immunantworten	109
5.	Literaturverzeichnis	113
6.	Abkürzungen	123
7.	Anhang	125
7.1	Eidesstattliche Erklärung	125
7.2	Publikationen	126
7.3	Lebenslauf	127

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem besteht aus verschiedenen lymphoiden Organen, Zelltypen und humoralen Mediatoren, deren komplexes Zusammenspiel den Organismus vor Infektionen durch unterschiedliche Pathogene wie Bakterien, Pilze, Viren und Parasiten schützt. Dabei wird das Immunsystem von Vertebraten in die angeborene und die erworbene Immunität unterteilt.

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem reagiert schnell und effizient auf eine Vielzahl von Pathogenen, entwickelt jedoch im Gegensatz zum adaptiven Immunsystem kein immunologisches Gedächtnis. Die Erkennung schädlicher Mikroorganismen wird durch verschiedene keimbahnkodierte „Mustererkennende“ Rezeptoren, den sogenannten pathogen recognition receptors (PRR) gewährleistet, die konservierte molekulare Strukturen unterschiedlicher Pathogene erkennen und unter anderem deren Phagozytose oder die Sekretion von Effektor-Molekülen induzieren (Janeway and Medzhitov 2002). Neben Vertebraten besitzen auch Invertebraten eine angeborene Immunität, die es ihnen ermöglicht, invasive Mikroorganismen zu erkennen und zu eliminieren. Einige der Effektor-Mechanismen des angeborenen Immunsystems wie die Produktion anti-mikrobiell wirkender Defensine sind evolutionär konserviert und nicht nur in Tieren, sondern auch in Pflanzen zu finden (Hoffmann, Kafatos et al. 1999). Das angeborene Immunsystem von Vertebraten umfasst zelluläre Komponenten, wie Makrophagen, natürliche Killerzellen, Granulozyten, Dendritische Zellen und Mastzellen sowie humorale Faktoren, zu denen Cytokine, Chemokine, Akute-Phase Proteine und Proteine des Komplementsystems zählen. Durchbricht ein Pathogen die physikalischen und chemischen Barrieren der Haut oder der Schleimhäute, werden die Zellen des angeborenen Immunsystems aktiviert und eine Inflammation ausgelöst. Maßgeblich an der initialen Immunantwort beteiligt sind im Gewebe residente Makrophagen, welche eingedrungene Pathogene direkt erkennen, phagozytieren und intrazellulär abtöten. Ein weiterer wichtiger Effektor-Mechanismus aktivierter Makrophagen ist die Sekretion pro-inflammatorischer Cytokine und Chemokine, wodurch eine Entzündungsreaktion induziert wird und weitere Immunzellen, darunter hauptsächlich die ebenfalls phagozytisch aktiven neutrophilen Granulozyten, an den Ort der Infektion rekrutiert werden. Neben den Phagozyten übernimmt das Komplementsystem, ein komplexes kaskadenartiges System aus unterschiedlichen enzymatisch aktiven Serumproteinen, eine wichtige Funktion in der

angeborenen Immunität. Es wird unter anderem durch bestimmte pathogene Oberflächenstrukturen aktiviert, wodurch letztendlich die Lyse und Opsonierung von invasiven Mikroorganismen mediiert wird (Parkin and Cohen 2001). Weitere Zellen des angeborenen Immunsystems sind natürliche Killerzellen, welche auf die Abwehr Virus infizierter Zellen und maligner Zellen spezialisiert sind (Biron, Nguyen et al. 1999), sowie Mastzellen und Basophile, die nach Aktivierung intrazellulär gespeicherte inflammatorische Mediatoren, wie Histamine, Prostaglandine und Leukotrine sekretieren (Delves and Roitt 2000). Zentrale Funktion in der angeborenen Immunität haben zudem Dendritische Zellen (DCs), welche als professionelle Antigenpräsentierende Zellen (APCs) naive Lymphozyten des adaptiven Immunsystems aktivieren können und somit als Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität fungieren.

1.1.2 Rezeptoren des angeborenen Immunsystems

Die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems werden als pathogen recognition receptors (PRR) zusammengefasst und erkennen konservierte molekulare Strukturen unterschiedlicher Pathogene, die sogenannten pathogen associated molecular patterns (PAMPs), darunter bakterielle und virale Nukleinsäuren, sowie Lipid- und Proteinbestandteile verschiedener mikrobieller Oberflächenmoleküle. Die PRRs sind keimbahnkodiert, sodass im Gegensatz zu den Rezeptoren des adaptiven Immunsystems alle Zellen des gleichen Zelltyps Rezeptoren mit identischer Spezifität exprimieren. Dabei kann die Aktivierung der PRRs in der Phagozytose des Pathogens, der Induktion pro-inflammatorischer Signalkaskaden, der Expression kostimulatorischer Moleküle, der Sekretion von Effektor-Molekülen, oder der Induktion von Apoptose resultieren (Janeway and Medzhitov 2002). Sekretierte PRR, wie das Mannose-bindende Lektin, das C-reaktive Protein oder das Serum-Amyloid Protein fungieren hauptsächlich als Opsonine von pathogenen Mikroorganismen und medieren deren Phagozytose sowie die Aktivierung des Komplementsystems (Janeway and Medzhitov 2002). Zu den am besten charakterisierten PRRs zählen die Rezeptoren der Toll-like Familie. TLR sind Typ I Transmembran Proteine, deren extrazelluläre Domäne der Erkennung von PAMPs dient, während die intrazelluläre Domäne eine Toll-Interleukin-1 Rezeptor (TIR) Sequenz beinhaltet und die Signaltransduktion mediiert (Kawai and Akira 2010). Die Ligandierung der TLRs rekrutiert Adaptorproteine, darunter den Myeloiden Differenzierungs Faktor 88 (MyD88) und das TIR-domain-containing adaptor inducing IFN- β Protein (TRIF), wodurch eine Signalkaskade induziert wird, die letztendlich in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und der Produktion pro-inflammatorischer Cytokine,

Chemokine und Typ I Interferone resultiert (Akira, Uematsu et al. 2006). Bisher wurden 10 funktionelle Toll-like Rezeptoren (TLR) im Menschen und 12 TLRs in der Maus identifiziert, wobei TLR1-9 in beiden Spezies evolutionär konserviert sind (Kawai and Akira 2010). Die TLRs unterscheiden sich hinsichtlich ihrer zellulären Lokalisation sowie der Erkennung verschiedener PAMPs. Während die meisten TLR (TLR 1, 2, 4, 5, 6 und 11) auf der Zelloberfläche exprimiert werden und überwiegend pathogene Oberflächenstrukturen erkennen, wie Lipopolysaccharide (TLR4), Flagellin (TLR5), oder unterschiedliche Lipidverbindungen der Membran Gram-positiver Bakterien (TLR2), befinden sich einige TLR (TLR 3, 7, 8 und 9) in intrazellulären Kompartimenten, wie Endosomen und Lysosomen, und dienen der Erkennung von mikrobiellen Nukleinsäuren, darunter virale doppel-strängige RNA (TLR3), virale einzel-strängige RNA (TLR7/8) sowie bakterielle und virale DNA (TLR9) (Kawai and Akira 2010). Mit Ausnahme des TLR3 ist das Adaptorprotein MyD88 in der Signalkaskade aller TLRs beteiligt. In MyD88 defizienten Zellen ist die Funktion der TLRs, außer des TLR3s, daher beeinträchtigt. Über TLR3 und TLR4 können MyD88 defiziente Zellen jedoch die Produktion von Typ I Interferonen induzieren. Diese MyD88 unabhängige Signalkaskade der TLR3 und TLR4 ist abhängig von TRIF (Akira, Uematsu et al. 2006). Weitere wichtige PRRs des angeborenen Immunsystems sind zytoplasmatische Rezeptoren, die Bestandteile von Viren und Bakterien im Zytoplasma infizierter Zellen erkennen. Zu diesen Rezeptoren zählen die RIG-I-like Rezeptoren, darunter RIG-I und Mda5, welche als Sensoren viraler RNA fungieren und eine antivirale Immunantwort auslösen (Kawai and Akira 2010), sowie Nod-like Rezeptoren, die hauptsächlich bakterielle Komponenten erkennen (Akira, Uematsu et al. 2006).

1.1.3 Das adaptive Immunsystem

In Vertebraten hat sich zusätzlich zum angeborenen Immunsystem das adaptive Immunsystem entwickelt. Es wird durch Lymphozyten, den T- und B-Zellen, vermittelt und in die durch B-Zellen medierte humorale Immunität sowie die durch T-Zellen medierte zellvermittelte Immunität unterteilt. Das adaptive Immunsystem ist hochspezifisch und basiert auf einer hohen Diversität an Antigen-Rezeptoren, welche durch somatische Rekombination frei kombinierbarer Gensegmente, den V, D und J-Genen, während der Entwicklung der Lymphozyten generiert werden. Dabei exprimiert jeder Lymphozyt Antigen-Rezeptoren einer einzigen Spezifität, sodass ein vielfältiges Repertoire an adaptiven Immunzellen vorliegt (Cooper and Alder 2006). Die Erkennung eines Antigens durch den T-Zell beziehungsweise B-Zell Rezeptor, induziert die Proliferation der spezifischen Lymphozyten, wodurch aus einer antigen-spezifischen Immunzelle viele Lymphozyten der gleichen Spezifität generiert werden. Diese

sogenannte klonale Expansion und die daraus resultierende Initiierung der adaptiven Immunantwort benötigt im Gegensatz zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems mehr Zeit, jedoch können auf Grund der hohen Variabilität der Rezeptoren des adaptiven Immunsystems verschiedenartige Antigene aller Pathogene oder Toxine erkannt und eine hochspezifische Immunantwort ausgelöst werden (Cooper and Alder 2006). Gleichzeitig stellen Antigene körpereigener Zellen allerdings auch potenzielle Angriffsziele der Lymphozyten dar. Um die Entstehung von Autoimmunität zu verhindern, haben sich unterschiedliche Mechanismen immunologischer Toleranz entwickelt, welche körpereigene von körperfremden Strukturen unterscheiden und die Kontrolle autoreaktiver T-Zellen gewährleisten. Neben der Induktion einer antigenspezifischen Immunantwort ist die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses weiteres charakteristisches Merkmal adaptiver Immunität. Dadurch sind bei erneuter Infektion mit dem gleichen Pathogen die spezifischen Lymphozyten in sehr viel höherer Frequenz vorhanden. Zudem können Gedächtnis-Lymphozyten sehr viel schneller aktiviert werden und eine effizientere Immunantwort auslösen.

1.2 T-Zellen

T-Zellen werden an Hand der Zusammensetzung ihres T-Zell Rezeptors in $\alpha\beta$ T-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen unterschieden. $\alpha\beta$ T-Zellen bilden den Großteil der T-Zell Population und werden in CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen unterteilt. CD4⁺ T-Zellen dirigieren die zelluläre Immunantwort und induzieren unter anderem die Rekrutierung und Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen, Makrophagen und Neutrophilen. Zudem unterstützen sie B-Zellen in der Produktion und Affinitätsreifung von Antikörpern (Zhu and Paul 2010). Nach ihrer Aktivierung differenzieren naive CD4⁺ T-Zellen in unterschiedliche Subtypen, darunter T_H1-, T_H2-, T_H17-Zellen sowie induzierte regulatorische T-Zellen (iTregs), die sich hinsichtlich ihrer Produktion an Cytokinen funktionell voneinander unterscheiden (Zhu, Yamane et al. 2010). Eine weitere Subpopulation von CD4⁺ T-Zellen bilden natürliche regulatorische T-Zellen (nTregs), die ebenso wie iTregs periphere Toleranz induzieren und Immunantworten regulieren und supprimieren. Im Gegensatz zu iTregs differenzieren nTregs nicht aus naiven CD4⁺ T-Zellen in der Peripherie, sondern entwickeln sich direkt im Thymus (Josefowicz, Lu et al. 2012). Aktivierte CD8⁺ T-Zellen differenzieren zu zytotoxischen T-Zellen (CTL), die infizierte Zellen direkt abtöten können, indem sie durch einen Perforin und Granzyme B abhängigen Mechanismus oder alternativ über FasLigand-Fas Interaktion Apoptose in ihren Zielzellen induzieren. Weiterhin produzieren aktivierte CD8⁺ T-Zellen inflammatorische Cytokine wie IFN γ und TNF α (Parkin and Cohen 2001). $\alpha\beta$ T-Zellen binden ihre spezifischen Antigene nur, wenn sie gemeinsam mit einem Selbst-MHC

Molekül präsentiert werden (Zinkernagel and Doherty 1974). Diese Selbstpeptid-MHC Restriktion wird während der Entwicklung der T-Zellen im Thymus in einem als positive Selektion bezeichneten Prozess etabliert (Carpenter and Bosselut 2010). Dabei erkennen CD4+ T-Zellen MHC Klasse II restringierte Peptide und CD8+ T-Zellen MHC Klasse I-Peptid Komplexe (Rosenthal and Shevach 1973; Zinkernagel and Doherty 1974). Damit T-Zellen ihre Effektor-Funktion erlangen, müssen sie neben der spezifischen Antigenerkennung zusätzlich durch professionelle Antigenpräsentierende Zellen aktiviert werden. Diese sogenannte Kostimulation von T-Zellen wird sehr effektiv durch Interaktion zwischen den kostimulatorischen Molekülen CD80/ CD86, welche auf aktivierten DCs exprimiert werden und dem auf T-Zellen exprimierten CD28 erzielt. Die effektive Kostimulation von T-Zellen unterstützt die T-Zell Proliferation, die Produktion von Cytokinen sowie das Überleben der T-Zellen (Smith-Garvin, Koretzky et al. 2009). Ferner ist gezeigt worden, dass Dendritische Zellen für die funktionale Aktivierung von T-Zell Antworten das Effektor-Molekül CD70 exprimieren müssen (Schildknecht, Miescher et al. 2007). Nach Aktivierung differenziert ein Teil der T-Zellpopulation zu langlebigen Gedächtniszellen, sodass bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Pathogen eine schnellere und effizientere Immunantwort ausgelöst wird (Sallusto, Geginat et al. 2004).

1.2.1 T-Zell Toleranz

Während der Entwicklung von T-Zellen im Thymus kommt es auf Grund der randomisierten Umlagerung der VDJ Gene des TZR zur Entstehung von potenziell autoreaktiven T-Zellen. Um Immunantworten gegen körpereigene Zellen und damit die Entstehung von Autoimmunität zu verhindern, haben sich verschiedene Mechanismen immunologischer Toleranz entwickelt, die sich in zentrale und periphere Toleranz Induktion unterteilen. Die zentrale Toleranz eliminiert schon während der Entwicklung der T-Zellen im Thymus durch den Mechanismus der negativen Selektion autoreaktive T-Zellen aus dem Pool heranreifender Thymozyten und verhindert, dass T-Zellen, die spezifisch für körpereigene Proteine sind, den Thymus verlassen. Die negative Selektion wird durch Dendritische Zellen sowie medulläre Thymusepithelzellen mediiert. Diese präsentieren den Thymozyten Autoantigene, wobei Apoptose in allen Thymozyten induziert wird, die Selbstpeptid-MHC Komplexe mit hoher Affinität binden. Abhängig vom Transkriptionsfaktor Autoimmune-Regulator (AIRE) präsentieren medulläre Thymusepithelzellen zudem ektopisch gewebespezifische Autoantigene, wodurch die Präsentation von Antigenen, die nur in peripheren Geweben und nicht im Thymus exprimiert werden, gewährleistet ist (Carpenter and Bosselut 2010). Trotz ihrer Effizienz ist die zentrale Toleranz Induktion unvollständig, sodass autoreaktive T-Zellen

in die Peripherie gelangen. Einige Selbst-Antigene werden nur in immunprivilegierten Geweben exprimiert, wodurch die spezifischen autoreaktiven T-Zellen keinen Kontakt mit ihrem Epitop haben. Andere Antigene werden in so geringen Konzentrationen exprimiert, dass keine effiziente T-Zell Rezeptor Stimulation erfolgt. Durch diese sogenannte immunologische Ignoranz bleiben die potenziell autoreaktiven T-Zellen naiv und lösen keine Immunantwort aus (Ohashi, Oehen et al. 1991). Um alle weiteren, nicht ignoranten autoreaktiven T-Zellen zu kontrollieren, haben sich ergänzend zu den Mechanismen zentraler Toleranz verschiedene Mechanismen peripherer Toleranz Induktion entwickelt, die sich in dominante und rezessive Mechanismen unterteilen lassen (Sakaguchi, Yamaguchi et al. 2008). Dominante Toleranz wird durch regulatorische T-Zellen mediiert und wirkt zell-extrinsisch. Dabei supprimieren regulatorische T-Zellen aktiv Immunantworten, indem sie die Aktivierung und klonale Expansion autoreaktiver T-Zellen kontrollieren (Sakaguchi, Yamaguchi et al. 2008). Die Mechanismen rezessiver Toleranz, zu denen Anergie und klonale Deletion zählen, wirken im Gegensatz zu dominanter Toleranz Induktion zell-intrinsisch und werden durch Dendritische Zellen vermittelt. So führt die Präsentation von Antigenen auf ruhenden Dendritischen Zellen im immunologischen Steady State, das heißt in Abwesenheit einer Infektion, zu einer funktionalen Inaktivierung der spezifischen T-Zellen (Anergie) (Schwartz 2003) oder resultiert im Aktivierungs-induzierten Zelltod der T-Zellen (Deletion) (Green, Droin et al. 2003).

1.2.2 Suppressions-Mechanismen regulatorischer T-Zellen

Die Population FoxP3⁺ CD4⁺ T-Zellen umfasst etwa 5-10% aller CD4⁺ T-Zellen in der Peripherie und übernimmt die zentrale Funktion in der dominanten Suppression von Immunantworten. So führen Beeinträchtigungen in der Entwicklung oder der Funktion regulatorischer T-Zellen (Tregs) zur Entstehung von inflammatorischen Krankheiten und Autoimmunität in Mensch und Maus (Sakaguchi, Yamaguchi et al. 2008). Die Mechanismen Treg medierter Suppression sind vielseitig und können inhibierend auf die Funktion verschiedener Immunzellen einwirken, darunter naive und aktivierte T-Zellen, Dendritische Zellen, Makrophagen, B-Zellen, Mastzellen sowie NK- und NKT-Zellen (Shevach 2009). Zu den Suppressions-Mechanismen zählen die Sekretion der anti-inflammatorischen Cytokine IL-10 (Asseman, Mauze et al. 1999), TGF β (Read, Malmstrom et al. 2000) und IL-35 (Collison, Workman et al. 2007), der Verbrauch an IL-2, welcher Apoptose in den zu inhibierenden Effektor-Zellen induziert (Pandiyan, Zheng et al. 2007) sowie die Produktion von perizellulärem Adenosin, das die Funktion der Treg umgebenden Zellen inhibiert (Deaglio, Dwyer et al. 2007). Im Gegensatz zur Sekretion anti-inflammatorischer Cytokine, welche Zellkontakt-unabhängig

suppressierend wirken, erfordert der Verbrauch an IL-2 und die Produktion von perizellulärem Adenosin die räumliche Nähe zwischen Tregs und entsprechenden Zielzellen. Weiterhin können Tregs durch direkte Zell-Interaktion Immunantworten supprimieren. So können Tregs ähnlich wie zytotoxische T-Zellen über einen Granzyme B und Perforin abhängigen Mechanismus ihre Zielzellen direkt lysieren (Gondek, Lu et al. 2005; Cao, Cai et al. 2007). Durch Rezeptor-Ligand Interaktion, darunter Galectin-1, können Tregs Apoptose in ihren Zielzellen induzieren oder deren Funktion und Proliferation inhibieren (Garin, Chu et al. 2007). Eine Schlüsselrolle übernehmen ferner Suppressions-Mechanismen, in denen die funktionelle Modifikation von Dendritischen Zellen erzielt wird. Da Dendritische Zellen zentrale Funktion in der Kontrolle von T-Zell Antworten haben, ist die Suppression Dendritischer Zellen unter homöostatischen Bedingungen für die Aufrechterhaltung peripherer Toleranz essentiell. So zeigen DCs in Abwesenheit regulatorischer T-Zellen einen aktivierten Phänotyp und aktivieren funktionale CTL-Antworten, anstatt periphere CD8+ T-Zell Toleranz zu inhibieren (Schildknecht, Brauer et al. 2010). Für unterschiedliche Suppressions-Mechanismen ist bekannt, dass sie primär die Funktion und Reifung von Dendritischen Zellen erzielen, wodurch letztendlich die Aktivierung von T-Zellantworten supprimiert wird. So induziert die direkte Interaktion von CTLA-4 auf regulatorischen T-Zellen mit CD80 und CD86 auf DCs die Expression von Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) in Dendritischen Zellen und trägt so zur peripheren T-Zell Toleranz bei (Grohmann, Orabona et al. 2002). Die Bindung von LAG-3 an MHCII Moleküle auf Dendritischen Zellen inhibiert ferner die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen (Liang, Workman et al. 2008). Da viele Mechanismen Treg medierter Suppression sowohl die Funktion von T-Zellen als auch von Dendritischen Zellen modifizieren können (Shevach 2009), ist nicht ganz klar, welche der Mechanismen primär über die Suppression Dendritischer Zellen erfolgen. Unklar ist auch, ob Mechanismen Treg medierter Suppression, welche T-Zellen direkt inhibieren, wie die Produktion von TGF β oder die Aktivierung von latenten TGF β (Fahlen, Read et al. 2005; Li, Wan et al. 2007; Travis, Reizis et al. 2007), die gleichzeitige Bindung von Tregs und T-Zellen an die selbe Dendritische Zelle erfordern.

1.3 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DCs) wurden erstmalig in den 1970ern von Steinman und Cohn in der Milz von Mäusen identifiziert (Steinman and Cohn 1973; Steinman and Cohn 1974). Sie sind in lymphoiden Organen und nahezu allen Geweben, insbesondere an den Epithelien zu finden (Alvarez, Vollmann et al. 2008). Allgemein sind DCs darauf spezialisiert, Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und die Peptide auf ihrer

Zelloberfläche via MHC Klasse I und II Molekülen zu präsentieren (Banchereau and Steinman 1998). Endogene Proteine werden dabei durch das Proteasom in Peptide prozessiert und als MHC Klasse I-Peptid Komplex auf der DC Oberfläche präsentiert. Exogene Proteine werden durch Makropinozytose, Phagozytose oder durch Rezeptorvermittelte Endozytose mittels C-Typ Lektin-Rezeptoren oder Fc-Rezeptoren internalisiert. Anschließend werden die endozytierten Proteine durch endosomale Proteasen prozessiert und ihre Peptide auf MHC Klasse II Molekülen präsentiert (Banchereau and Steinman 1998). Alternativ können Epitope von exogenen Proteinen auch auf MHC Klasse I Molekülen präsentiert werden. Dieser Mechanismus der sogenannten Kreuzpräsentation hat eine bedeutende Funktion in unterschiedlichen viralen Infektionen, in denen Dendritische Zellen nicht selbst infiziert werden, sowie in der Tumor Immunität und der Induktion peripherer Toleranz (Kurts, Robinson et al. 2010). Charakteristisch für Dendritische Zellen ist ferner ihre Fähigkeit zur Migration, sodass sie Antigene aus der Peripherie zu den sekundären lymphoiden Organen transportieren können (Alvarez, Vollmann et al. 2008). Als professionelle Antigenpräsentierende Zellen übernehmen Dendritische Zellen zentrale Funktion in der Kontrolle von Immunantworten. Abhängig von ihrem Aktivierungszustand können DCs naive T-Zellen aktivieren oder periphere T-Zell Toleranz induzieren (Steinman 2012).

1.3.1 Dendritischen Zellen in der Induktion von T-Zell Antworten

Experimente in transgenen Mäusen, welche die Depletion von Dendritischen Zellen erlauben, haben gezeigt, dass Dendritische Zellen die wichtigsten Antigenpräsentierenden Zellen für die Aktivierung von naiven T-Zellen sind (Bar-On and Jung 2010). Durch diese Fähigkeit fungieren Dendritische Zellen als zentrales Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität. Damit Dendritische Zellen die Differenzierung und Expansion naiver T-Zellen in funktionale Effektor T-Zellen induzieren können, müssen sie selbst einen aktivierten Phänotyp aufweisen. Der aktivierte Phänotyp Dendritischer Zellen unterscheidet sich hinsichtlich der Morphologie und der Expression an kostimulatorischen und akzessorischen Molekülen maßgeblich von dem unreifer Dendritischer Zellen im immunologischen Steady State (Banchereau and Steinman 1998). Aktivierte DCs exprimieren große Mengen an kostimulatorischen Molekülen, wie CD80/ CD86 und CD70, welche für das Priming naiver T-Zellen, das heißt das Auslösen einer funktionalen T-Zell Antwort, essentiell sind (Schildknecht, Miescher et al. 2007; Smith-Garvin, Koretzky et al. 2009). Neben der Expression kostimulatorischer Moleküle produzieren aktivierte DCs inflammatorische Cytokine, welche die Differenzierung naiver T-Zellen in Effektor T-Zellen unterstützen (Joffre, Nolte et al. 2009). Zudem regulieren DCs nach ihrer

Aktivierung die Expression des Chemokin-Rezeptors CCR7 herauf, welcher die Migration Dendritischer Zellen von peripheren Geweben zu den drainierenden Lymphknoten oder der Milz dirigiert, wo sie mit naïven T-Zellen interagieren (Alvarez, Vollmann et al. 2008). Gleichzeitig exprimieren aktivierte Dendritische Zellen große Mengen an MHC Komplexen auf ihren Zelloberflächen und zeigen eine geringe endozytische Aktivität, sodass aktivierte DCs hauptsächlich prozessierte Proteine, die sie in den peripheren Geweben aufgenommen haben, präsentieren (Banchereau and Steinman 1998). Die sogenannte Maturation Dendritischer Zellen, das heißt die Aktivierung von ruhenden Dendritischen Zellen im immunologischen Steady State zu aktivierten DCs, kann durch unterschiedliche Signale induziert werden. Dendritische Zellen exprimieren eine Reihe von Pathogen-Erkennungs-Rezeptoren (PRR), darunter Toll-like Rezeptoren, NOD und RIG-I-like Rezeptoren sowie C-Typ Lektin Rezeptoren, welche konservierte Muster verschiedener Pathogene (PAMPs) erkennen und somit die direkte Aktivierung Dendritischer Zellen ermöglichen (Janeway and Medzhitov 2002). Zusätzlich können Dendritische Zellen indirekt durch sogenannte „Danger Signals“ aktiviert werden, das heißt durch Signale, welche als Folge einer Infektion, zellulären Stress oder Nekrose von anderen Zellen produziert werden (Gallucci and Matzinger 2001). Zu den inflammatorischen Cytokinen, die als Folge einer Infektion von verschiedenen Zelltypen produziert werden und die aktivierend auf Dendritische Zellen wirken, zählen $TNF\alpha$ und $IL-1\beta$, sowie Typ I Interferone (Gallucci and Matzinger 2001; Le Bon and Tough 2002). Ferner konnte gezeigt werden, dass Harnsäure, welche von beschädigten oder nekrotischen Zellen freigesetzt wird, die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen induziert (Shi, Evans et al. 2003). Neben Harnsäure begünstigen verschiedene Hitzeschock Proteine, welche von nekrotischen Zellen, nicht aber von apoptotische Zellen freigesetzt werden, die Maturation Dendritischer Zellen (Gallucci and Matzinger 2001). Die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen durch CD40 Signale stellt einen weiteren wichtigen Mechanismus indirekter DC Aktivierung dar und spielt insbesondere in der Induktion zytotoxischer T-Zell Antworten eine große Rolle. CD154, der Ligand für CD40, wird hauptsächlich von aktivierten $CD4+$ T-Zellen exprimiert. Durch die Bindung von $CD4+$ T-Zell exprimierten CD40L an CD40 auf Dendritischen Zellen wird das sogenannte „Licensing“ Dendritischer Zellen induziert, das heißt, die durch $CD4+$ T-Zell Hilfe induzierte Aktivierung der Dendritischen Zelle um eine funktionale CTL-Antwort auszulösen (Bennett, Carbone et al. 1998; Ridge, Di Rosa et al. 1998; Schoenberger, Toes et al. 1998).

1.3.2 Dendritische Zellen in der Induktion peripherer T-Zell Toleranz

Im immunologischen Steady State, das heißt in Abwesenheit von Infektionen oder Entzündungen, befinden sich Dendritische Zellen in einem ruhenden Zustand. Ruhende oder sogenannte steady-state DCs exprimieren im Gegensatz zu ihrem aktivierten Phänotyp nur geringe Mengen an kostimulatorischen Molekülen, sodass kein Priming naiver T-Zellen erfolgt (Banchereau and Steinman 1998). Stattdessen induziert die Antigenpräsentation auf Dendritischen Zellen im immunologischen Steady State periphere T-Zell Toleranz in Antigen-spezifischen CD4+ T-Zellen (Hawiger, Inaba et al. 2001) und CD8+ T-Zellen (Bonifaz, Bonnyay et al. 2002; Probst, Lagnel et al. 2003). Da steady-state DCs eine hohe endozytische Aktivität zeigen (Banchereau and Steinman 1998), präsentieren sie in Abwesenheit von Infektionen kontinuierlich Selbst-Antigene, wodurch letztendlich potenziell autoreaktive T-Zellen toleriert werden (Steinman, Hawiger et al. 2003). Somit übernehmen Dendritische Zellen zentrale Funktion in der Induktion peripherer T-Zell Toleranz. In der Induktion peripherer CD8+ T-Zell Toleranz durch Dendritische Zellen übernimmt der Mechanismus der Kreuzpräsentation, das heißt die Präsentation extrazellulärer Antigene auf MHC Klasse I Molekülen, eine zentrale Rolle. So ist gezeigt worden, dass die konstitutive Kreuzpräsentation gewebespezifischer Antigene durch Dendritische Zellen die Kreuztoleranz endogener autoreaktiver CD8+ T-Zellen mediiert. Ist hingegen die Fähigkeit Dendritischer Zellen zur Kreuzpräsentation beeinträchtigt, akkumulieren autoreaktive CD8+ T-Zellen in der peripheren lymphatischen Organen (Luckashenak, Schroeder et al. 2008). Die tolerogene Funktion Dendritischer Zellen im immunologischen Steady State erfordert ferner die Anwesenheit von regulatorischen T-Zellen. So zeigen Dendritische Zellen in Mäusen, in denen FoxP3+ CD4+ regulatorische T-Zellen depletiert wurden, einen aktivierten Phänotyp und induzieren funktionale CTL-Antworten, anstatt periphere CD8+ T-Zellen zu tolerieren (Schildknecht, Brauer et al. 2010). Da Mäuse, in denen regulatorische T-Zellen depletiert wurden, zudem Autoimmunität entwickeln (Kim, Rasmussen et al. 2007), ist nicht ganz klar, ob der aktivierte Phänotyp Dendritischer Zellen Folge der generellen Autoimmunität in Abwesenheit regulatorischer T-Zellen ist, oder ob die Aufrechterhaltung des tolerogenen Phänotyps Dendritischer Zellen im immunologischen Steady State die aktive Suppression durch regulatorische T-Zellen über direkte Treg-DC Interaktion erfordert.

1.3.3 Subklassen Dendritischer Zellen in der Maus

Dendritische Zellen repräsentieren eine heterogene Population von Zellen, die sich hinsichtlich ihrer Expression an Oberflächenmolekülen, ihrer Funktion und ihrer

Lokalisation in unterschiedlichen Geweben voneinander unterscheiden (Hashimoto, Miller et al. 2011). Gemeinsames Merkmal aller Dendritischen Zellen ist die Expression des Oberflächenmarkes CD11c sowie des MHC Klasse II Moleküls. Dendritische Zellen werden in zwei Hauptklassen, die konventionellen und die plasmazytoiden DCs unterteilt (Villadangos and Schnorrer 2007). Plasmazytoide Dendritische Zellen (pDCs) exprimieren im Gegensatz zu konventionellen DCs nur geringe Mengen an CD11c sowie die Oberflächenmoleküle B220 und Ly6C. Als spezifische Marker von pDCs wurden PDCA-1 und Siglec-H identifiziert. pDCs zirkulieren aus dem Knochenmark über das Blut und sind in allen lymphoiden Organen sowie in der Leber zu finden. Sie sind darauf spezialisiert, während viraler Infektionen große Mengen an Typ I Interferonen zu produzieren (reviewed in (Swiecki and Colonna 2010)). Hingegen besteht die Hauptfunktion konventioneller oder klassischer Dendritischer Zellen in der Aktivierung naiver T-Zellen während Infektionen beziehungsweise in der Induktion peripherer T-Zell Toleranz im immunologischen Steady State. Konventionelle DCs werden in residente und migratorische Dendritische Zellen untergliedert (reviewed in (Merad and Manz 2009)). Migratorische DCs, die auch als tissue DCs bezeichnet werden, befinden sich in peripheren Geweben, wie der Leber, der Niere und dem Pankreas, sowie an den epitheliaren Grenzflächen der Haut, der Lunge und des Darms. Dabei existieren mehrere Subtypen migratorischer DCs, die sich hinsichtlich ihrer Lokalisation und ihrer Expression an unterschiedlichen Oberflächenmolekülen voneinander unterscheiden. So zählen zu den migratorischen Dendritischen Zellen der Haut die Langerhans Zellen der Epidermis, sowie die CD103⁺ und CD103⁻ Dendritischen Zellen der Dermis (Merad and Manz 2009). Migratorische DCs nehmen in den peripheren Geweben Antigene auf und migrieren kontinuierlich, das heißt auch in Abwesenheit von Infektionen, durch die afferenten Lymphgefäße zu den drainierenden Lymphknoten, in denen sie die prozessierten Antigene präsentieren (Merad and Manz 2009). Da Milz und Thymus nicht über afferente Lymphgefäße verfügen, sind migratorische DCs in diesen lymphoiden Organen nicht zu finden (Villadangos and Schnorrer 2007). Residente DCs verbleiben in den lymphatischen Organen Milz, Thymus und Lymphknoten. An Hand der Oberflächenmarker CD4, CD8 und CD11b werden residente DCs in die 3 Subklassen, CD4⁺CD11b⁺CD8⁻ DCs, CD8⁺CD11b⁻CD4⁻ DCs und die CD11b⁺CD4⁻CD8⁻ DCs unterteilt (Vremec, Pooley et al. 2000). Dabei sind die Funktionen der verschiedenen DC Subtypen in Immunität und Toleranz Induktion nicht vollständig geklärt. Bekannt ist, dass die Kreuzpräsentation, das heißt die Präsentation extrazellulärer Antigene auf MHC Klasse I Molekülen hauptsächlich durch CD8⁺ Dendritische Zellen mediiert wird (den Haan, Lehar et al. 2000; Pooley, Heath et al. 2001). Dadurch übernehmen CD8⁺ Dendritische Zellen eine

entscheidende Funktion in der Induktion von Immunantworten gegen unterschiedliche Viren sowie in der Tumor Immunität (Hildner, Edelson et al. 2008).

1.4 Das DIETER Maus Model

DIETER Mäuse sind doppel transgene Mäuse, in denen die Expression drei verschiedener CTL-Epitope spezifisch auf Dendritischen Zellen induziert werden kann (Abb. 1) (Probst, Lagnel et al. 2003). Dabei steht die Abkürzung DIETER für dendritic cell specific inducible expression of t-cell epitopes after recombination. In DIETER Mäusen kodiert ein Transgen für eine Cre Rekombinase unter dem CD11c Promotor, sodass ausschließlich CD11c positive Zellen die Cre Rekombinase exprimieren. Dabei wird die Cre Rekombinase als Fusionsprotein mit einer mutierten Form der Hormon-Bindungsdomäne des humanen Estrogen-Rezeptors exprimiert. Der Ligand der mutierten Form des humanen Estrogen-Rezeptors ist Tamoxifen. In Abwesenheit von Tamoxifen assoziieren Hitzeschock-Proteine im Zytoplasma mit dem Cre-Fusionsprotein und verhindern so die Translokation der Cre Rekombinase vom Zytoplasma in den Zellkern. Nach Bindung von Tamoxifen an die mutierte Form der Bindedomäne des Estrogen-Rezeptors dissoziiert die Cre Rekombinase aus dem Fusionsprotein-Komplex und translokiert in den Nukleus (Feil, Brocard et al. 1996). Nach Injektion von Tamoxifen in DIETER Mäuse exprimieren etwa 5% aller Dendritischen Zellen die Cre Rekombinase (Probst, Lagnel et al. 2003). Das zweite Transgen in DIETER Mäusen wird unter dem β -Aktin Promotor exprimiert und kodiert für drei CTL-Epitope. Zwei der CTL-Epitope sind Peptide aus dem LCMV Glykoprotein (GP33) sowie dem LCMV Nukleoprotein (NP396). Das dritte CTL-Epitop entstammt der β -Galaktosidase aus *Escherichia coli* (β -Gal497). In unbehandelten DIETER Mäusen werden die CTL-Epitope nicht exprimiert, da eine loxP flankierte STOP Kasette die Translation des Transgens inhibiert. Die Expression der CTL-Epitope erfordert die Aktivität einer Rekombinase, welche die Deletion der STOP Kasette aus dem Konstrukt über homologe Rekombination der beiden loxP Elemente, welche die STOP Kasette flankieren, katalysiert. In Abwesenheit von Tamoxifen ist die unter dem CD11c Promotor kodierte Cre Rekombinase im Zytoplasma lokalisiert und somit inaktiv, sodass keine Expression der Transgen kodierten CTL-Epitope erfolgt. Tamoxifen Injektion in DIETER Mäuse ermöglicht die Translokation der Cre Rekombinase vom Zytoplasma in den Nukleus und resultiert letztendlich in der Deletion der STOP Kasette und der Expression der CTL-Epitope GP33, NP396 und β Gal auf 5% aller Dendritischen Zellen (Probst, Lagnel et al. 2003). Der Vorteil DIETER transgener Mäuse ist, dass die Induktion der Antigenpräsentation auf Dendritischen

Zellen ohne die Aktivierung der Dendritischen Zellen möglich ist, sodass sowohl die Aktivierung Dendritischer Zellen als auch die Präsentation der CTL-Epitope unabhängig voneinander kontrolliert werden können. Tamoxifen Injektion in DIETER Mäuse in Kombination mit einem aktivierenden Stimulus wie Anti-CD40 resultiert in der Antigenpräsentation auf aktivierten Dendritischen Zellen und im Priming spezifischer Effektor CD8⁺ T-Zellen, während die Injektion von Tamoxifen alleine die Antigenpräsentation auf ruhenden Dendritischen Zellen induziert und spezifische CD8⁺ T-Zellen tolerisiert (Probst, Lagnel et al. 2003). Mit diesem System ist es somit möglich, den Einfluss von Dendritischen Zellen auf die periphere Toleranz Induktion CD8⁺ T-Zellen im ungestörten immunologischen Steady State zu untersuchen.

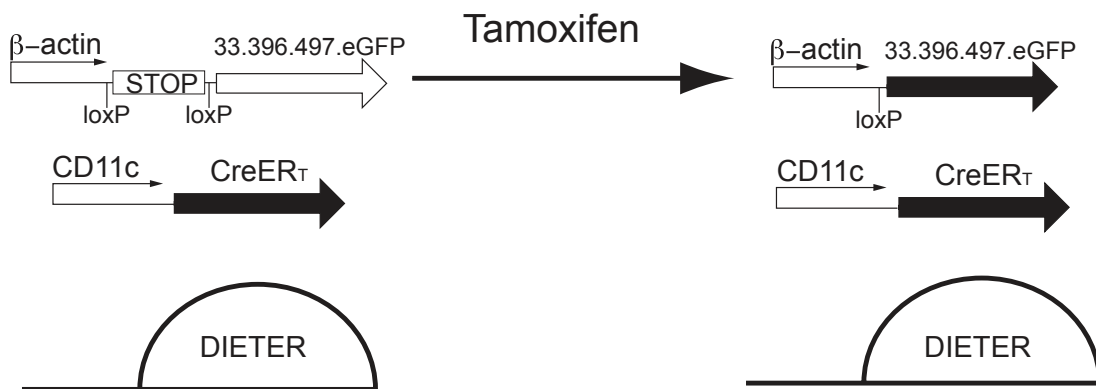


Abbildung 1. Das DIETER Maus Model

DIETER Mäuse sind doppel transgene Mäuse aus CD11cCreERT X ST33.396 Mäusen und bestehen somit aus 2 Transgenen. (1) Die Cre Rekombinase wird als Fusionsprotein mit einer mutierten Form der Bindedomäne des humanen Estrogen Rezeptors (ER) unter der Kontrolle des DC spezifischen CD11c Promotors exprimiert. In Abwesenheit von Tamoxifen, welcher als Ligand der mutierten Bindedomäne des ERs dient, ist die Cre Rekombinase mit Hitzeschock-Proteinen assoziiert, sodass die Translokation der Cre Rekombinase in den Nukleus inhibiert ist. Nach Tamoxifen Applikation translokiert die Cre Rekombinase in den Nukleus und deletiert dort loxP-flankierte Nukleotide. (2) Ein weiteres Transgen kodiert für zwei CTL-Epitope aus LCMV (GP33-41/D^b und NP396-404/D^b) und ein CTL-Epitop der β -Galaktosidase aus *E.coli* (β Gal497-505/K^b). Die CTL-Epitope werden unter dem ubiquitären β -Aktin Promotor als Fusionsprotein mit dem enhanced green fluoresent protein (eGFP) exprimiert. Promotor und Transgen sind durch eine loxP flankierte STOP Kasse voneinander getrennt, sodass das Transgen nicht exprimiert wird. Die Expression der Transgene lässt sich durch Tamoxifen Injektion induzieren. Durch Tamoxifen Injektion in DIETER Mäuse translokiert die Cre Rekombinase in den Nukleus und deletiert dort die loxP flankierte STOP Kasse, was letztendlich in der Präsentation der Transgen kodierten CTL-Epitope auf CD11c⁺ Zellen (DCs) resultiert.

1.5 Ziel der Arbeit

T-Zellen, die Autoantigene mit hoher Affinität binden, werden während ihrer Entwicklung im Thymus durch den Mechanismus der negativen Selektion aus dem Pool heranreifender Thymozyten eliminiert. Trotz der Effizienz dieser sogenannten zentralen Toleranz Induktion gelangen autoreaktive T-Zellen in die Peripherie. Um die Entstehung von Autoimmunität zu verhindern, müssen diese durch ergänzende Mechanismen immunologischer Toleranz kontrolliert werden. Dendritische Zellen im immunologischen Steady State, das heißt in Abwesenheit von Infektionen oder Entzündungen, präsentieren kontinuierlich Selbst-Antigene, wodurch autoreaktive T-Zellen deletiert oder inaktiviert werden. Somit übernehmen Dendritische Zellen zentrale Funktion in der Induktion peripherer T-Zell Toleranz. Hingegen zeigen Dendritische Zellen in der Abwesenheit regulatorischer T-Zellen einen aktivierten Phänotyp und lösen funktionale T-Zell Antworten aus, anstatt periphere Toleranz zu induzieren. Ziel dieser Arbeit war es, die Signale und Mechanismen zu untersuchen, welche auf die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen im immunologischen Steady State Einfluss nehmen. Zum einen sollten die inhibierenden Mechanismen analysiert werden, welche die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen in Abwesenheit von Infektionen supprimieren. Insbesondere sollte dabei untersucht werden, ob die Suppression Dendritischer Zellen im immunologischen Steady State die direkte Interaktion zwischen Dendritischen Zellen und regulatorischen T-Zellen erfordert. Zum anderen sollte untersucht werden, welche aktivierenden Signale in Abwesenheit regulatorischer T-Zellen die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen im immunologischen Steady State medieren.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte:

Analysenwaage (AE100, Mettler), Durchflusszytometer (FACSCanto, Becton Dickinson; LSRII, Becton Dickinson), Dyna-Magnet (Invitrogen) Entmineralisierungsanlage (Millipore) Feinwaage (L2200P Sartorius), Gelelektrophoresekammern (Bio-Rad), Geldokumentation (Gel Doc XR System, Bio-Rad), Homogenisatoren (Wheaton-Gewebe Handhomogenisator, neoLab), Inkubatoren (MCO-20AIC, Sanyo), Lichtmikroskop (CKX31, Olympus), Mausbestrahlungsanlage (OB58-BA, Buchler), Mehrkanal-Pipette (Eppendorf), PCR-Cycler (PeqStar, PeqLab), Pipettierhilfe (Integra Biosciences), Schüttler (TS100, peqLab), pH Meter (pH537, WTW), Photometer (Biophotometer 6131, Eppendorf), Rührwerk (VOS 16, VWR), Spannungsquelle (EPS 3501 XL, Amersham Pharmacia), Sterilbank (MSC-Advantage, Thermo Scientific), Tischzentrifuge (Centrifuge 5415 D Eppendorf), Vortexer (7-2020, neoLab), Zählkammer (Neubauer-Zählkammer Improved, Assistant), Zellseparationssystem (MACS Magnet, Miltenyi Biotec), Zentrifuge (Heraeus Multifuge 3L-R, Thermo Scientific)

2.1.2 Verbrauchsmaterial:

6-well Platten (Greiner), 24-well Platten (Greiner), 96-well Rundbodenplatten (Greiner), Abdeckplatten steril (Greiner), Cell Strainer (Becton Dickinson), Cryo's 2 ml (Greiner), Dialyseschlauch (Roth), Eppendorfgefäße 1,5 ml und 2 ml (Eppendorf), FACS-Röhrchen 5 ml (Becton Dickinson), Kanülen 0,4x20 mm und 0,55x25 mm (Braun), MACS Säulen (LS Column, Becton Dickinson), Pasteurpipetten (Roth), PES-Bottle-top-Filter 0,2 µm (Sartolab), Plastikröhrchen mit Schraubverschluss 2ml (Greiner), Reaktionsgefäße 15 ml und 50 ml (Greiner), Schiffchen (Corning incorporated), Spritzen 1 ml (Braun), Spritzen 5 ml (Becton Dickinson), Zellkulturflaschen (Greiner)

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien wurden analysenrein bezogen.

Chemikalie	Bezugsquelle	Artikelnummer
7-AAD (7-Aminoactinomycin)	eBioscience,	00-6993-50
β -Mercaptoethanol	Sigma	M7522
Agarose	AppliChem	A2114,1000
Ammoniumchlorid (NH_4Cl)	Roth	K298.2
BD Lysing Buffer (10x)	BD Biosciences	555899
Borgal-Lösung (24%)	Virbac	
Brefeldin A	Sigma	B6542
Calcium-Chlorid	Roth	CN93
BSA	PAA	
DAB (Diaminobenzidin)	Sigma	D5637
Diethylene glycol	Fluka	93171
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth	A994.1
Diphtherie Toxin	Calbiochem	322326
DMEM (high Glucose, no Glutamine)	Gibco (Invitrogen)	11960-044
dNTPs (100 mM)	Fermentas	R018
EDTA	Roth	8040,2
EMA (Ethidium Monoazide Bromide)	Invitrogen	E1374
Essigsäure	Fluka	45731
Ethanol 99,8%	Roth	5054.2
Ethidumbromid	Roth	7870.2
FCS	Gibco (Invitrogen)	
Forene (Isofluran)	Abott	B506
Green GoTaq Flexi Buffer (5x)	Promega	M891A
Glycerin	Roth	3783.2
HBSS	Gibco	14065056
Heparin-Natrium	Ratiopharm	N68542.01
Hepes	Roth	9105,3
Histofix 4% (Roti-Histofix 4%)	Roth	P087.3
Ionomycin	Sigma	I0634
Iscoves Medium	PAA	E15-018
Iscoves Pulver	PAA	G0018,3050
Isopropanol	Roth	CP41
Kalium-Chlorid (KCl)	Roth	6781,1
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO_3)	Merck	4854
L-Glutamin	Fluka	
Magnesium-Chlorid (25 mM)	Promega	A351H
Mitomycin C	Sigma	M0503

MEM	PAN Biotech	P03-7410
Natrium-Azid (Na-Azid)	Roth	K305.1
Natrium Chlorid (NaCl)	Roth	9265,2
Natrium-Dihydrogen-Phosphat (NaH ₂ PO ₄)	Roth	2370,1
Natrium-Pyruvat	Serva	15220.04
NP-40	Sigma	NP40S
Optiprep	Sigma	D1556
Paraformaldehyd (PFA)	Roth	335,2
Penicillin / Streptomycin	Sigma	P4333
Phenolrot	Roth	T127.1
PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat)	Sigma	P8139
Protein G	Genscript	L00209
RPMI	PAA	E15-039
Saponin	Sigma	S2149
Szintillationsflüssigkeit Rotiszint eco	Roth	0016,3
Tamoxifen	MP Biomedicals	15673
Tris Ultra Qualität (Tris-Base)	Roth	5429,3
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl)	Roth	9090,3
[H ³]-Thymidin	MP Biomedicals	
Triton X -100	Sigma	T9284
Trypanblau	Sigma	T6146
Trypsin-EDTA (25%)	Gibco (Invitrogen)	25200
Tween 20	Roth	9127,2
Wasserstoffperoxid (30%)	Sigma	1009

2.1.4 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle	Artikelnummer
DNase I	Sigma	DN25
GoTaq Polymerase	Promega	M3008
Peroxidase, gekoppelt an polyklonalen Anti-Ratte Antikörper	Jackson ImmunoResearch	112-035-175
Kollagenase Typ II (aus <i>Clostridium histolyticum</i>)	Worthington	CLS-2
Proteinase K (aus <i>Tritirachium album</i>)	Serva	33752

2.1.5 Puffer

Alle Puffer wurden mit voll entsalztem und durch Aktivkohle gereinigtem Wasser (VE-Wasser) angesetzt, sterilfiltriert (0,2 µm Sterilfilter) und bei 4°C aufbewahrt.

ACK Puffer	0,1 mM EDTA; 150 mM NH ₄ Cl; 1 mM KHCO ₃ (pH 7,3)
FACS Puffer	1% BSA; 20 mM EDTA; 0,01% Natriumazid in PBS
MACS Puffer	0,5% BSA; 5mM EDTA in PBS
Gey's Lyse Puffer	8,29 g NH ₄ Cl; 1 g KHCO ₃ ; 0,037 g EDTA in 1 L Wasser (pH 7,3)
Genomischer Lyse Puffer	50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 9.0; 0.45% NP-40; 0.45% Tween 20
HEPES Puffer	0,88% [w/v] NaCl, 1 mM EDTA; 0,5% [w/v]; 10 mM HEPES in H ₂ O pH 7,4
Overlay	DMEM; 1% Glutamin; 1% Na-Pyruvat; P/S; 10% FCS; 2% Methylcellulose
10x PBS	1,4 M NaCl; 0,1 M NaH ₂ PO ₄ in H ₂ O pH 7,2
Permeabilisierung Puffer	1% BSA; 5 mM EDTA; 0,1% Saponin; 0,01% Na-Azid in PBS
Proteinase K Aktivierungspuffer	3 mM Calcium-Chlorid; 10 mM Tris-HCl; 50 mM Kalium-Chlorid; pH 8
50x TAE	2 M Tris; 1 M Essigsäure; 50 mM EDTA
TE Puffer	1 mM EDTA; 10 mM Tris pH 8
Trypanblau Lösung	0,5% Tyrpanblau, 0,01% Na-Azid

2.1.6 Lösungen

Brefeldin A wurde mit 50% Ethanol als 1 mg/ ml Stocklösung angesetzt und bei -20°C gelagert.

Diphtherie Toxin wurde mit PBS als 10 µg/ ml Lösung angesetzt und in flüssigem Stickstoff schock-gefroren. Die Stocklösung wurde anschließend bei -80°C gelagert.

Tamoxifen	Tamoxifen (250 mg) wurde mit 1,25 ml 100%igen Ethanol aufgeschwemmt. Anschließend wurde tropfenweise 11,25 ml Gyceryl trioleate hinzupipettiert und die Lösung dabei durch vortexen homogenisiert. Bis zur vollständigen Lösung des Tamoxifens wurde dieses bei 37 °C inkubiert und gelegentlich gevortext. Die Stocklösung (20 mg/ml) wurde bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt.
Proteinase K	Lipophylisierte Proteinase K (100 mg) wurde in 5 ml Proteinase K Aktivierungspuffer gelöst und für 10 Minuten bei 56°C voraktiviert. Die Stocklösung (20 mg/ml) wurde bis zur Verwendung bei -20°C weggefroren.

2.1.7 Peptide

Die verwendeten Peptide wurden von Stefan Stevanović, (Universität Tübingen) zur Verfügung gestellt.

LCMV GP33-41	KAVYNFATM, H-2D ^b
LCMV GP276-286	SGVENPGGYCL, H-2D ^b
LCMV NP396-404	FQPQNGQFI, H-2D ^b
E.coli βgal497-505	ICPMYARV, H-2K ^b

2.1.8 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers synthetisiert. Die Oligonukleotide wurden in einer Konzentration von 100 µM in TE Puffer aufgenommen, bei 60°C für 10 Minuten gelöst und bei -20°C gelagert.

Cre fwd Primer	5' GGA CAT GTT CAG GGA TCG CCA GGC G 3'
Cre rev Primer	5' GCA TAA CCA GTG AAA CAG CAT TGC TG 3'
ST33U Primer	5' CCT CAC ATC ATT GAT GAG G 3'
ST33L Primer	5' CAC GCG GGC GTA CAT GG 3'
DTR Primer 1	5' GGG ACC ATG AAG CTG CTG CCG 3'
DTR Primer 2	5' TCA GTG GGA ATT AGT CAT GCC 3'

CD40 ^{-/-} Primer 1 (mutant)	5' TCG TCC TGC AGT TCA TTC AG 3'
CD40 ^{-/-} Primer 2	5' GGC AGT AAG ACG ATG TGA CAA CAG AG 3'
CD40 ^{-/-} Primer 3 (WT)	5' GAG ATG AGA AGG AAG AAT GGG AAA AC 3'
CD40L ^{-/-} Primer 1 (mutant)	5' GCC CTG AAT GAA CTG CAG GAC G 3'
CD40L ^{-/-} Primer 2 (mutant)	5' GGG TAG CCA ACG CTA TGT C 3'
CD40L ^{-/-} Primer 3 (WT)	5' GTT CCT CCA CCT AGT CAT TCA TC 3'
CD40L ^{-/-} Primer 4 (WT)	5' CCC AAG TGT ATG AGC ATG TGT GT 3'
IFNR ^{-/-} Primer (UM4)	5' AAG ATG TGC TGT TCC CTT CCT CTG CTC TGA 3'
IFNR ^{-/-} Primer (UM5)	5' ATT ATT AAA AGA AAA GAC GAG GCG AAG TGG 3'
IFNR ^{-/-} Primer (UM2)	5' CAG AAG TCA CAC AGT TAT CAT GGC TCA AGG 3'
IFNR ^{-/-} Primer (P2neo)	5' CTT CCT CTT GCA AAA CCA CAC TGC TCG ACA 3'
BATF3 ^{-/-} Primer1	5' TGC TAT GCA CAA ACC ACA AAC C 3'
BATF3 ^{-/-} Primer 2 (WT)	5' GTT GTG AGT CGA AAC CAC GC 3'
BATF3 ^{-/-} Primer 3 (mutant)	5' CGT TGG CTA CCC GTG ATA TTG C 3'
MyD88 ^{-/-} Primer 1	5' ATC GGC TTA AGT TGT GTG TGT CCG ACC 3'
MyD88 ^{-/-} Primer 2 (WT)	5' AAG GCC AAA GGG TGT GGT ATT AGG ACC 3'
MyD88 ^{-/-} Primer 3 (mutant)	5' ATC GCC TTC TAT CGC CTT CTT GAC GAG 3'

2.1.9 Antikörper

Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper wurden bei 4°C gelagert. Die Konzentration der Fitc (Fluorescein Isothiocyanat) und PB (Pacific Blue) markierten Antikörper betrug 0,5 mg/ml, die Konzentration der PE (Phycoerythrin) PE-Cy7, PE-Cy5, APC (Allophycocyanin) und APC-Cy7 markierten Antikörper 0,2 mg/ml. Tetramere wurden in 32% Glycerin, 2% BSA in einer Konzentration von 0,6 mg/ml bei -20°C gelagert.

Spezifität (Anti-Maus)	Fluorochrome	Klon	Verdünnung	Isotyp	Bezugsquelle
CD4	Fitc	RM4-5	1:400	rat IgG2a, κ	BioLegend und eBioscience
	PB	RM4-5	1:500		
	PE-Cy7	RM4-5	1:400		
	PE-Cy5	RM4-5	1:1000	rat IgG2b, κ	
	PE	GK1.5	1:500		
	APC	GK1.5	1:500		
	APC-Cy7	GK1.5	1:300		

CD8a	Fitc	53-6.7	1:500	rat IgG2b, κ	BioLegend und eBioscience
	PB	53-6.7	1:500		
	PE-Cy7	53-6.7	1:400		
	APC	53-6.7	1:400		
	PE	53-6.7	1:400		
	APC-Cy7	53-6.7	1:300		
CD11c	PB	N418	1:500	Arm. Hamster IgG	BioLegend und eBioscience
	PE-Cy7	N418	1:500		
	APC-Cy7	N418	1:500		
CD16/32 (Fc Block)	-	2.4G2	1:100	rat IgG2a, λ	Eigen Herstellung
CD19	PE-Cy5	eBio1D3	1:1000	rat IgG2a, κ	eBioscience
CD40	Fitc	1C10	1:400	rat IgG2a, κ	eBioscience
	PE	1C10	1:400		
	APC	1C10	1:400		
CD44	PE-Cy7	IM7	1:400	rat IgG2b, κ	eBioscience
CD45.1	Fitc	A20	1:500	mouse IgG2a, κ	BioLegend und eBioscience
	PE	A20	1:500		
	APC	A20	1:500		
	PB	A20	1:500		
	PE-Cy7	A20	1:500		
CD45R (B220)	Fitc	RA3-6B2	1:400	rat IgG2a, κ	eBioscience
	APC	RA3-6B2	1:400		
CD62L	Fitc	MEL-14	1:400	rat IgG2a, κ	eBioscience
	APC	MEL-14	1:400		
CD70	PE	FR70	1:100	rat IgG2b, κ	eBioscience
CD80	Fitc	16-10A1	1:800	Arm. Hamster IgG	eBioscience
	PE	16-10A1	1:800		
	APC	16-10A1	1:800		
CD86	Fitc	GL-1	1:500	rat IgG2a, κ	eBioscience
	PE	GL-1	1:500		
	APC	GL-1	1:500		
F4/80	APC	BM8	1:500	rat IgG2a, κ	eBioscience
GR-1	APC	RB6-8C5	1:1000	rat IgG2b, κ	eBioscience
CD90.2	APC	53-2.1	1:1000	rat IgG2a, κ	BD
CD229.1	Fitc	30C7	1:200	rat IgG2a, κ	BD
NK1.1	Fitc	PK136	1:400	rat IgG2a, κ	eBioscience
B7H1/ PDL-1	PE	MIH5	1:200	rat IgG2a, λ	eBioscience
IFN γ	Fitc	XMG	1:400	rat IgG1, κ	Eigen Herstellung eBioscience
	APC	XMG	1:400		

MATERIAL UND METHODEN

MHCII	APC	M5/114.15.2	1:500	rat IgG2b, κ	BioLegend und eBioscience
	APC-Cy7	M5/114.15.2	1:500		
	PB	M5/114.15.2	1:1000		
TCRβ	Fitc	H57-597	1:400	hamster IgG2	eBioscience
	PE	H57-597	1:400		
V alpha 2	PE	B20.1	1:400	rat IgG2a, κ	eBioscience
FoxP3	APC	FJK-16s	1:100	rat IgG2a, κ	eBioscience
Tetramer33	PE	-	1:100	-	Eigen Herstellung
Tetramer 276	APC	-	1:100	-	Eigen Herstellung
Tetramer497	APC	-	1:200	-	Eigen Herstellung

Isotypen

Isotyp	Fluorochrome	Klon	Bezugsquelle
rat IgG2a,κ	FITC	R35-95	BD
	APC	RTK2758	BioLegend
rat IgG2b,κ	Fitc	RTK4530	BioLegend
	APC	RTK4530	BioLegend
	PE	eB	eBioscience
Arm. Hamster IgG	PE	eBio299Arm	eBioscience
	APC		
Arm Hamster IgG2,κ	Fitc	B81-3	BD

Antikörper zur Injektion in Versuchstiere

Spezifität	Klon	Isotyp	Bezugsquelle
Anti-Maus CD4	GK1.5	rat IgG2b,κ	Eigen Herstellung
Anit-Maus CD8	YTS169.4	rat IgG2b,κ	Eigen Herstellung
Anti-Maus CD40	FGK45.1	rat IgG2a,κ	Eigen Herstellung
Anti-Maus CD70	FR70	rat IgG2b,κ	Hideo Yagita, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan
NK1.1	PK136	mouse IgG2a,κ	Eigen Herstellung
Isotyp Rat IgG2b,κ	SFR8B6	-	Eigen Herstellung

Antikörper und Beads zur Aufreinigung muriner Zellpopulationen

Spezifität	Markierung	Klon	Isotyp	Bezugsquelle
Anti-Maus CD4	bio	H129.19	rat IgG2a, κ	Eigen Herstellung
Anti-Maus CD8a	MicroBeads	Ly-2	rat IgG2a	Miltenyi (130-049-401)
Anti-Maus CD25	bio	7D4	rat IgM, κ	BD und Eigen Herstellung
Streptavidin (SA)	PE MicroBeads	- -	- -	Invitrogen Miltenyi (130-048-101)
Anti-PE	MicroBeads	-	-	Miltenyi (130-048-801)

Weitere Antikörper

Spezifität	Markierung	Klon	Isotyp	Bezugsquelle
Anti-Maus CD3	-	145- 2C11		Eigen Herstellung
Anti-LCMV Nukleoprotein	-	VL4	rat	Eigen Herstellung
Polyklonaler Anti- Ratte	HRPO		Goat	Jackson Laboratory
Anti-Maus panT (Thy1.2)	DynaBeads	-	-	Invitrogen (144-43D)

2.1.10 Zelllinien

Bezeichnung	Zelltyp	Verwendung
MC57	Fibroblast	Plaque Assay
L929	Fibroblast	Kultivierung von LCMV WE
GK1.5	Hybridom	Produktion von Anti-CD4
YTS169.4	Hybridom	Produktion von Anti-CD8
FGK45.1	Hybridom	Produktion von Anti-CD40

PK136	Hybridom	Produktion von Anti-NK1.1
A20	Hybridom	A20 ist eine B-Zell Tumorlinie und wurde als KoStimulus im Proliferations Test eingesetzt.
VL4	Hybridom	Kulturüberstand wurde zur Markierung des Nukleoproteins von LCMV in Plaque Assays verwendet
SFR8B5	Hybridom	Produktion von Anti-Gr1
2G4	Hybridom	Produktion von CD16/32 (FcBlock)
7D4	Hybridom	Produktion von Anti-CD25, Aufreinigung über Protein L Säule
XMG1.2	Hybridom	Produktion von IFN γ

2.1.11 Zellkultur Medien

Fötale Kälberserum (FCS)

FCS (Gibco, Invitrogen) wurde zur Inaktivierung der Komplementkomponenten bei 56°C für 45 min im Wasserbad erhitzt. Vor Gebrauch wurde das FCS bei 600g für 10 Minuten zentrifugiert und nur der Überstand verwendet.

Rinderserumalbumin (BSA):

BSA-Pulver (Roth) wurde mit PBS als 10%ige Lösung angesetzt und sterilfiltriert.

DMEM Medium

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) high Glucose, without Glutamin (Gibco, Invitrogen) wurde zur Kultivierung von MC57 Fibroblasten sowie für den Plaque Assay verwendet. Das DMEM wurde zuvor mit 5% FCS, 1% Natrium-Pyruvat, 1% Glutamin, 1% Penicillin / Streptomycin und 50 μ M β -Mercaptoethanol komplettiert.

MEM Medium

MEM (Minimal Essential Medium Eagle) wurde als Pulver (Gibco, Invitrogen) bezogen. Das angesetzte Medium wurde sterilfiltriert (0,2 μ m) und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. MEM wurde als Blutungspuffer für die Intrazelluläre Färbung von IFN γ verwendet. Zu dem Medium wurden zusätzlich 5% FCS, 1% Natrium-Pyruvat, 1% Glutamin, 1% Penicillin / Streptomycin und 50 μ M β -Mercaptoethanol gegeben. Um die Gerinnung von Blutproben zu verhindern, wurde 50U/ ml Heparin-Natrium in das Medium pipettiert.

Iscove's Medium

Iscove's Medium ist eine Variante des DMEM Mediums (Dulbecco's Modified Eagle Medium) mit zusätzlichem Gehalt an Vitaminen, Aminosäuren und Selen. Iscove's wurde entweder als Flüssigmedium (IMDM für intrazelluläre IFN γ Färbung) oder als Pulver (Kultivierung von Hybridomzelllinien) bezogen. Zu dem Medium wurde zusätzlich 5 oder 10% FCS, 1% Natrium-Pyruvat, 1% Glutamin, 1% Penicillin / Streptomycin und 50 μ M β -Mercaptoethanol gegeben.

RPMI Medium zur Isolation von Dendritischen Zellen

RPMI Medium (PAA) wurde als Flüssigmedium bezogen und mit 5% FCS, 1% Natrium-Pyruvat, 1% Glutamin, 1% Penicillin / Streptomycin und 50 μ M β -Mercaptoethanol komplettiert. Das Medium wurde zur Isolation Dendritischer Zellen aus Milzen verwendet.

2.1.12 Mausstämme

Alle verwendeten Mausstämme wurden in der Zentralen Versuchstiereinrichtung der Universitätsmedizin Mainz unter speziell pathogenfreien (SPF) Bedingungen gezüchtet und gehalten. Die folgenden Mausstämme wurden in dieser Arbeit verwendet.

C57BL/6	Wildtypstamm. MHC-Haplotyp ist H-2 ^b .
C57BL/6-Ly5.1 (CD45.1)	Genetischer Hintergrund ist C57BL/6. Der Stamm unterscheidet sich von C57BL/6 Mäusen durch eine Punktmutation im CD45 Gen. Das CD45.1 Gen der C57BL/6 diene als Marker in gemischten Knochenmarkchimären.
CD11cCreERT x ST33	Genetischer Hintergrund ist C57BL/6. DIETER Mäuse bestehen aus den 2 Transgenen CD11cCreERT und ST33. Nach Tamoxifen Applikation exprimieren 5% aller Dendritischer Zellen drei CTL-Epitope von LCMV (GP33-41/D ^b , GP34-41/K ^b and NP396-404/D ^b) und ein CTL-Epitop der β -Galaktosidase (β -gal497-504/K ^b) (Kapitel 1.4) (Probst, Lagnel et al. 2003).
A-alpha ^{-/-}	Genetischer Hintergrund ist C57BL/6. In A-alpha ^{-/-} Mäusen ist das Exon 2 des MHC-II A α Gens durch ein Neomycin-Resistenzgen ersetzt, sodass das MHC Klasse II Protein nicht exprimiert wird (Kontgen, Suss et al. 1993).

CD11cDTR	Genetischer Hintergrund ist C57BL/6. Die Sequenzen des Diphtherie Toxin Rezeptors und des eGFPs wurden hinter den CD11c-Promotor kloniert (Jung et al., 2002).
IFN α R ^{-/-}	Das Exon 3 des IFN α R Gens wurde durch ein Neomycin-Resistenzgen ersetzt. Der genetische Hintergrund ist 129Sv. (Müller et al., 1994). Der Stamm wurde auf C57BL/6 zurückgekreuzt (Peter Aichele et al., 2006).
CD40 ^{-/-}	Genetischer Hintergrund ist C57BL/6. Exon 3 des CD40 Gens ist durch eine Neomycin-Resistenzgen-Kassette ersetzt, sodass CD40 nicht exprimiert wird (Kawabe, Naka et al. 1994).
CD40L ^{-/-}	Genetischer Hintergrund ist C57BL/6. Das CD40L Allel wird auf dem X-Chromosom codiert. In CD40L ^{-/-} Mäusen sind das Exon 3 und 4 des CD40L Gens durch eine Neomycin-Resistenz-Kassette ersetzt, sodass CD40 Ligand nicht exprimiert wird (Renshaw, Fanslow et al. 1994).
MyD88 ^{-/-}	Genetischer Hintergrund ist C57BL/6. In MyD88 ^{-/-} Mäusen sind zwei Exons des MyD88 Gens, welche für das C-terminale Ende des MyD88 Proteins kodieren, durch ein Neomycin-Resistenzgen ersetzt, sodass MyD88 nicht exprimiert wird (Adachi, Kawai et al. 1998).
TCR327xLy5.1	Genetischer Hintergrund ist C57BL/6. TCR327 Mäuse besitzen einen transgenen T-Zell-Rezeptor, der das Epitop 33-41 aus dem LCMV Glykoprotein (gp33-41) im Kontext von MHC-Klasse I H-2D ^b erkennt (Pircher, Ohashi et al. 1990).
Rag1 ^{-/-}	Genetischer Hintergrund ist C57BL/6. Rag1 ^{-/-} Mäusen fehlt das <i>recombination activating gene</i> , das die Umlagerung der V(D)J Gensegmente der T- und B- Zellrezeptoren katalysiert. Mäuse dieses Stammes besitzen daher weder T- noch B-Zellen (Mombaerts, Iacomini et al. 1992).
BATF3 ^{-/-}	Genetischer Hintergrund ist 129Sv. In BATF3 ^{-/-} Mäusen sind Exon 1 und 2 des Transkription-Faktors BATF3 (basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 3) durch eine gefloxtete Neomycin Resistenz Kassette ersetzt, sodass BATF3 nicht exprimiert wird. Als Folge dessen entwickeln BATF3 defiziente Mäuse keine CD8+ Dendritischen Zellen (Hildner, Edelson et al. 2008).

FoxP3.LuciDTR-5	Genetischer Hintergrund ist C57BL/6. GDL5 Mäusen exprimieren unter dem FoxP3 Promoter den Diphtherie-Toxin Rezeptor, das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) und die Luciferase. Durch Injektion von Diphtherie Toxin in transgene Mäuse werden 95% FoxP3+ CD4+ regulatorischen T-Zellen deletiert (Suffner, Hochweller et al. 2010).
Nur77eGFP	Genetischer Hintergrund ist C57BL/6. Nur77eGFP transgene Mäuse sind BAC transgene Mäuse, die das Grün fluoreszierende Protein (GFP) unter dem Nr4a1 (Nur77) Promoter/ Enhancer exprimieren. In T- und B-Zellen wird GFP in geringer Konzentration exprimiert. Nach Aktivierung des T- und B-Zell-Rezeptors durch Antigenbindung wird die Expression von GFP verstärkt, wobei das Expressionslevel an GFP mit der Bindungsstärke des Antigenrezeptors korreliert (Moran, Holzapfel et al. 2011).
CKO	Genetischer Hintergrund ist BALB/c. In diesem transgenen Stamm ist eine Cre Rekombinase unter dem FoxP3 Promoter kloniert. Gleichzeitig flankieren zwei loxP Elemente das CTLA4 Gen, sodass CD4+FoxP3+ T-Zellen konditional CTLA-4 defizient sind (Wing, Onishi et al. 2008).
IL-10 ^{-/-}	Genetischer Hintergrund ist C57BL/6. In IL-10 ^{-/-} Mäusen sind die Codons 5-55 des Exons 1 des IL-10 Gens durch einen 24 bp großen Linker ersetzt, der für ein Stop-Codon sowie für eine <i>neo</i> Expressions-Kassette kodiert. Zusätzlich befindet sich in Exon 3 des IL-10 Gens ein Stop-Codon (Kuhn, Lohler et al. 1993).
LFA-1 ^{-/-}	Genetischer Hintergrund ist C57BL/6. In LFA1 ^{-/-} Mäusen ist das Exon 2 des LFA-1 α Gens durch eine Neomycin-Resistenz-Kassette ersetzt, sodass das LFA-1 Protein nicht exprimiert wird (Berlin-Rufenach, Otto et al. 1999).

2.1.13 Viren

LCMV

Der LCMV Stamm WE (LCMV-WE) wurde auf L929 Fibroblasten kultiviert. Dazu wurden L929 Zellen mit 0,01 multiplicity of infection (M.O.I.) infiziert. Der Virus Titer wurde mit einem Plaque Assay (Battegay et al, 1991) bestimmt und in Iscoves

(5% FCS) Medium auf 10^3 pfu/ ml eingestellt. 2 ml Aliquotes des Virus wurden in flüssigem Stickstoff schock-gefroren und bei -80°C gelagert.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Sämtliche Arbeiten wurden an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die Zelllinien wurden bei 5% CO_2 , 37°C und 100% Luftfeuchtigkeit im Inkubator kultiviert.

2.2.1.1 Kultivierung von Zellen

MC57 Fibroblasten wurden in DMEM Medium, L292 in Iscoves (5% FCS) Medium in Zellkulturflaschen kultiviert. Das Medium konfluenten Zellen wurde abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen. Zu den Zellen wurde 3 ml Trypsin-EDTA Lösung pipettiert. Nach Ablösung der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche wurde das Trypsin durch Zugabe von 7 ml DMEM Medium inhibiert. 1/20 der Zellen wurde in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit 25 ml Medium kultiviert.

Hybridomzellen wurden in Iscoves Medium (10% FCS) in Zellkulturflaschen kultiviert. Zur Produktion monoklonaler Antikörper wurden die Hybridomzellen zunächst in 6-well Schalen herangezogen, in Zellkulturflaschen überführt und bis zur Absterbe-Phase kultiviert. Der Überstand wurde zur Aufreinigung der Antikörper verwendet.

2.2.1.2 Kryokonservierung von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden Zellen, deren Wachstum sich in der log-Phase befand, weggefroren. Fibroblasten wurden zunächst mit PBS gewaschen, die Zellen mit 3 ml Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und Trypsin durch Zugabe von 7 ml Medium inhibiert. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein 50 ml Falcon überführt. Hybridomzellen wurden aus der Zellkulturflasche direkt in ein 50 ml Röhrchen überführt. Die Zellen wurden zentrifugiert (400g, 5 Minuten) und das Zellpellet in 6 ml eiskaltem FCS mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert. Je 1 ml wurde in 2 ml Cryo Röhrchen überführt und die Zellen in einer mit 4°C kaltem Isopropanol gefüllten Einfrierbox bei -80°C über Nacht langsam abgekühlt. Die Zellen wurden anschließend in flüssigem Stickstoff bei -196°C dauerhaft gelagert.

2.2.1.3 Auftauen von Zellen

In flüssigem Stickstoff eingefrorene Zellen wurden bei 37°C im Brutschrank aufgetaut und sofort in 30 ml warmes Medium überführt. Die Zellen wurden zentrifugiert (400g, 5 Minuten) und in 10 ml Medium aufgenommen. In eine 6-well Platte wurde die Hälfte der Zellen in unterschiedliche Verdünnungen kultiviert, die andere Hälfte wurde zur Kultivierung in eine Zellkulturflasche überführt.

2.2.1.4 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte mit Trypanblau-Lösung. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde mit Trypanblau-Lösung verdünnt und in eine Neubauer Zählkammer pipettiert. Es wurde das große Quadrat in der Mitte, welches zusätzlich in fünf mal fünf Gruppenquadrate unterteilt ist, ausgezählt. Die Anzahl der lebenden Zellen in 1 ml Zellsuspension wurde durch Multiplikation der Anzahl der gezählten Zellen (N) mit dem Verdünnungsfaktor (V) und dem Kammerfaktor (10^4) ermittelt. ($N \times V \times 10^4 = \text{Zellzahl/ ml}$).

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1 Affinitätschromatographie zur Aufreinigung von Antikörpern

Kulturüberstände der Hybridome wurden in 50 ml Röhrchen zentrifugiert (3500g, 1 Stunde, 40°C) und über einen PES-Bottle-top-Filter (0,2 µm) filtriert. Der filtrierte Überstand wurde auf eine Protein G Säule (Genscript) gegeben und mit 1 Liter PBS gewaschen. Der Antikörper wurde mit 0,1 M Glycin pH2,7 eluiert und mit 1 M Tris-HCl pH9 neutralisiert. Anschließend wurde der Antikörper zweimal gegen PBS in einem Volumen von je 5 Liter dialysiert. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bestimmt. Der Antikörper wurde 0,2 µm sterilfiltriert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.3 Tierexperimentelle Methoden

Alle Tierexperimente wurden gemäß den Richtlinien der „*Federation of European Laboratory Animal Science Association*“ durchgeführt. Die Mäuse waren zu Beginn der Experimente mindestens 6 Wochen alt und hatten stets freien Zugang zu Trinkwasser und Futter.

2.2.3.1 Blutentnahme und Lymphozyten Aufreinigung

Die Blutentnahme erfolgte retroorbital. Die Mäuse wurden dazu kurzzeitig mit Isofluran (Forene) betäubt. Eine sterile Glaskapillare (Roth) wurde medial in den rechten Augenwinkel geschoben und der retrobulbäre Venenplexus durch eine leicht rotierende Bewegung der Kapillare verletzt. Das durch die Verletzung freigesetzte Blut wurde in der Kapillare aufgefangen und in 400 µl FACS Puffer überführt. Zur Analyse der Blutprobe im Durchflusszytometer wurden die Lymphozyten aus dem Vollblut aufgereinigt. Dazu wurde die Blutprobe zunächst mit kaltem PBS gewaschen. Die Lyse der Erythrozyten erfolgte entweder durch Zugabe von 2 ml Gey's Puffer oder 5 ml ACK Puffer für etwa 5 Minuten. Nach der Erythrozyten Lyse wurde die Reaktion mit PBS abgestoppt und die Lymphozyten durch Zentrifugieren bei 400g für fünf Minuten sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die aufgereinigten Lymphozyten nach einmaligen Waschen mit FACS Puffer für die Antikörper Färbung eingesetzt. Alternativ wurde die Antikörper Färbung auf Vollblut durchgeführt und die Erythrozyten erst anschließend lysiert. Nach erfolgter Färbung wurde das Vollblut mit PBS gewaschen und mit 2 ml BD Lyse Puffer inkubiert. Dieser Puffer enthält im Gegensatz zu Gey's und ACK Puffer zusätzlich Paraformaldehyd und fixiert die aufgereinigten Lymphozyten dadurch gleichzeitig. Nach der Erythrozyten Lyse wurde die Lymphozyten durch Zentrifugation sedimentiert und für die durchflusszytometrische Analyse in 150 µl FACS Puffer aufgenommen.

2.2.3.2 Milz Entnahme und Präparation

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und das Fell mit 70%igen Ethanol eingesprüht. Zur Entnahme der Milz wurde auf der linken Seite neben der Wirbelsäure das Fell aufgeschnitten und das Peritoneum geöffnet. Die Milz wurde vorsichtig von Bindegewebe und Pankreas getrennt, entnommen und in ein 15 ml Röhrchen mit 5 ml FACS Puffer oder DMEM-Medium (5% FCS, 1% Glutamin, 1% Na-Pyruvat, P/S) überführt. Zum Herstellen einer Einzelzellsuspension wurde die Milz mit einem Spritzenstempel über einem 70 µm Zellsieb zerrieben. Die Suspension wurde anschließend mit einer 10 ml Pipette durch vorsichtiges auf- und abpipettieren homogenisiert. Zur Analyse im Durchflusszytometer wurden 50 µl der Zellsuspension für die Antikörper Färbung eingesetzt.

2.2.3.3 Lymphknoten Entnahme und Präparation

Die Tiere wurden durch zervikale Dislokation abgetötet. Das Fell wurde mit Ethanol besprüht und anschließend durch einen ventralen Schnitt von der Bauchhaut getrennt. Mit einer sterilen Federstahlpinzette wurden inguinale, brachiale, axilläre und

submandibuläre Lymphknoten entnommen. Die Lymphknoten wurden zum Herstellen einer Einzelzellsuspension zunächst in 2 ml FACS Puffer gegeben und anschließend mit einem Spritzenstempel über ein 70 µm Zellsieb verrieben. Die Suspension wurde mit einer 10 ml Pipette durch vorsichtiges auf- und abpipettieren homogenisiert. Für die durchflusszytometrische Analyse wurden 100 µl der Zellsuspension zur Antikörper Färbung eingesetzt.

2.2.3.4 Dendritische Zell Isolation aus Milz und Lymphknoten

Zur Isolation Dendritischer Zellen aus Milz oder Lymphknoten wurden die entsprechenden Organe aus der Maus entnommen und mit Kollagenase 2 verdaut. Dazu wurden Milzen in 4 ml und Lymphknoten in 2 ml RPMI Medium (10% FCS) mit Kollagenase 2 (220 U/ ml) gegeben. Zum Verdau des Gewebes wurden die Organe zunächst mit Kanülen zerzupft und anschließend für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von EDTA (Endkonzentration 10 mM) abgestoppt. Dazu wurden 80 µl (Milz) bzw. 40 µl (Lymphknoten) einer 0,5 M EDTA-Lösung zu der verdauten Zellsuspension pipettiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Suspension über ein 70 µm Zellsieb gegeben und zur Antikörperfärbung in FACS-Puffer aufgenommen.

2.2.3.5 Genotypisierung transgener Mäuse mittels PCR

Die Cre und ST Transgene der unterschiedlichen Dieter Mauszüchten, sowie die Expression des Diphtherie Toxin Rezeptors der transgenen CD11cDTR Mäuse wurden mittels PCR Analyse identifiziert. Ebenso wurde der Knockout der CD40^{-/-}, CD40L^{-/-}, MyD88^{-/-}, IFN γ ^{-/-}, CD40L^{-/-}, BATF3^{-/-} Mausstämmen mit PCR überprüft.

Für die Genotypisierung wurden etwa 0,5 cm Schwanzspitze der transgenen Mäuse mit einer Schere abgetrennt und in ein steriles 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt. Bis zum Verdau wurde die Biopsie bei -20 Grad Celsius weggefroren. Zu der Schwanzbiopsie wurden 300 µl genomischer Lysepuffer und 0,5 mg/ml Proteinase K pipettiert und der Ansatz bei 65°C für etwa 3 Stunden auf dem Schüttler inkubiert. Die Proteinase K wurde nach dem Verdau für 10 Minuten bei 85°C inaktiviert. Nicht verdaute Gewebeteile wie Haare und Wirbelsäulenknorpel wurden durch Zentrifugation bei 16.000g für 5 Minuten sedimentiert. Der Überstand wurde mit 1 ml autoklavierten und vollentsalztem Wasser verdünnt. 1 µl der Probe wurden zusammen mit 5 µl 5x Green GoTaq Flexi Buffer (Promega), 2 mM MgCl₂ (2µl einer 25 mM Lösung), 8 mM dNTP-Mix (2µl einer 100 mM Lösung), 2 pmol Primer 1 und 2 pmol Primer 2, 0,2 µl GoTaq (Promega) in einem Gesamtvolumen von 25 µl ddH₂O in die PCR eingesetzt. Die verwendeten Primerpaare zur Identifizierung der

unterschiedlichen Transgene, die zugehörigen PCR Programme sowie die Größe der Amplifikate sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Transgen	Primer	PCR Programm	Amplifikate
Cre	Cre Primer fwd	94°C 30"	Transgen: 350 bp WT: -
	Cre Primer rev	65°C 30" 72°C 1' 30x	
ST	ST33U Primer	94°C 30"	Transgen: 250 bp WT: -
	ST33L Primer	60°C 30" 72°C 30" 35x	
DTR	DTR Primer 1	94°C 30"	Transgen: 625 bp WT: -
	DTR Primer 2	62°C 1' 72°C 1' 35x	
CD40 ^{-/-}	CD40 ^{-/-} Primer 1	94°C 30"	Knockout: 1169 bp Het.: 893 bp + 1169 bp WT: 893 bp
	CD40 ^{-/-} Primer 2	60°C 1'	
	CD40 ^{-/-} Primer 3	72°C 1' 35x	
CD40L ^{-/-}	CD40L ^{-/-} Primer 1	94°C 30"	Hemi-; Homozygot Knockout: (-/Y; -/-): 500 bp Hetero: 250 bp + 500 bp WT: 250 bp
	CD40L ^{-/-} Primer 2	65°C 1'	
	CD40L ^{-/-} Primer 3	72°C 1' 35x	
	CD40L ^{-/-} Primer 4		
IFNR ^{-/-}	PCR1: UM4/UM5	94°C 30"	Knockout: PCR1: 1,3 kb; PCR2: 1,2 kb; PCR3: 2,2 kb WT: PCR1: 0,15 kb; PCR2: -; PCR3: 1,2 kb
	PCR2: UM2/P2neo	58°C 30"	
	PCR3: UM2/UM4	72°C 2' 40x	
MyD88 ^{-/-}	MyD88 ^{-/-} Primer 1	94°C 30"	Knockout: 300 bp Het.: 300 bp + 500 bp WT: 500 bp
	MyD88 ^{-/-} Primer 2	60°C 30"	
	MyD88 ^{-/-} Primer 3	72°C 1' 35x	
BATF3 ^{-/-}	BATF3 ^{-/-} Primer 1	94°C 30"	Knockout: 705 bp Het.: 288 bp + 750 bp WT: 288 bp
	BATF3 ^{-/-} Primer 2	58°C 30"	
	BATF3 ^{-/-} Primer 3	72°C 30" 35x	

Die PCR Produkte wurden anschließend auf ein 1-2%iges Agarosegel aufgetragen und gelektrophoretisch bei einer Spannung von 150 Volt für etwa 10 Minuten aufgetrennt. Die Transgene wurden an Hand der spezifischen Banden identifiziert.

2.2.3.6 Genotypisierung transgener Mäuse im Blut

Die Genotypisierung der transgenen TCR327, Nur77eGFP und FoxP3xGDL5 Mäuse erfolgte im Blut, ebenso die Überprüfung des Knockouts bestimmter Stämme (A- $\alpha^{-/-}$, Rag1 $^{-/-}$). Dazu wurde den Mäusen Blut entnommen und die Lymphozyten aufgereinigt. Nach spezifischer Antikörperfärbung wurden die Lymphozyten im Durchflusszytometer analysiert.

Das TCR327 Transgen wurde nach Antikörperfärbung mit V α 2-PE und CD8-APC nachgewiesen. Im Gegensatz zu Wildtyp Mäusen, in denen 8% aller T-Zell Rezeptoren die V α 2 Kette exprimieren, weisen 90% aller T-Zellen TCR237 Transgen positiver Mäuse die V α 2 Kette auf, da der transgene T-Zell Rezeptor die Umlagerung weiterer T-Zell Rezeptorgene verhindert (Pircher, Ohashi et al. 1990).

Transgene GDL5 Mäuse exprimieren unter dem FoxP3 Promoter neben dem Diphtherie-Toxin Rezeptor das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) (Suffner, Hochweller et al. 2010). Lymphozyten aus Blut von GDL5 Mäuse wurden zusätzlich mit Anti-Maus CD4-APC gefärbt und transgene Mäuse an Hand der GFP Expression CD4 positiver Zellen identifiziert.

Nur77eGFP Mäuse wurde nach Erythrozyten Lyse direkt im Durchflusszytometer genotypisiert. Lymphozyten Transgen positiver Mäuse sind GFP positiv (Moran, Holzapfel et al. 2011).

MHC Klasse II defiziente Mäuse selektieren im Thymus auf Grund ihres Knockouts ausschließlich CD8+ T-Zellen und besitzen daher keine CD4+ T-Zellen (Kontgen, Suss et al. 1993). MHCII $^{-/-}$ Mäuse ließen sich daher von Wildtyp Mäusen (60% CD4+ aller T-Zellen) im Durchflusszytometer nach Antikörper Färbung mit TCR β -PE und CD4-APC unterscheiden.

Rag1 $^{-/-}$ Mäuse besitzen weder B noch T-Zellen, da ihnen das *recombination activating gene* fehlt (Mombaerts, Iacomini et al. 1992). Knockout Mäuse konnten daher im Durchflusszytometer nach Antikörper Färbung mit B220-Fitc und TCR β -PE identifiziert werden.

2.2.3.7 Generierung von Knochenmarkchimären

Zur Isolation des Knochenmarks wurden die Mäuse zunächst durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurde das Fell mit 70% Ethanol abgespült und an den Hinterläufen der Tiere entfernte. Femur und Tibia wurden vom Torso abgetrennt, von Muskelfleisch befreit und in eine Petrischale mit kaltem PBS gelegt. Das Knochenmark wurde mit einer 5 ml Spritze und einer 0,55x25 mm Kanüle mit PBS aus dem Knochen gespült und mit einer 10 ml Glaspipette homogenisiert. Die Zellzahl der Suspension wurde bestimmt und auf 10⁷ Zellen/ ml PBS eingestellt. Die T-Zellen des

Knochenmarks wurden anschließend für 30 Minuten mit anti-Maus pan T Dynabeads depletiert (12,5 µl Dynabeads/ 10⁷ Zellen/ ml). Nach der T-Zell Depletion wurde das Knochenmark in PBS aufgenommen.

Die Rezipienten wurden letal mit 9,5 Gy bestrahlt. Als Strahlungsquelle diente eine Cäsium-Quelle (¹³⁷Cs). Zur syngenen Rekonstitution des Knochenmarks wurde je Maus mindestens 2x 10⁶ des isolierten und T-Zell depletierten Knochenmarks in einem Volumen von 200 µl intravenös injiziert. Da die Tiere nach Bestrahlung für etwa 3 Wochen immundefizient sind, wurde über das Trinkwasser das Antibiotikum Borgal (1 mg/ml Sulfadoxin und 0.2 mg/ml Trimethoprim) appliziert. Die Knochenmarkchimäre wurden 6-12 Wochen nach Rekonstitution für Experimente verwendet. Die Rekonstitution gemischter Knochenmarkchimäre wurde im Blut der Mäuse durchflusszytometrisch an Hand der Oberflächenmoleküle CD45.1 und CD45.2 auf T-Zell Populationen überprüft.

2.2.3.8 Beurteilung von Autoimmunität

Das Gewicht von bestimmten Knochenmarkchimären (MHCII^{-/-} | WT, WT | WT) wurde zu Beginn der Rekonstitution und anschließend wöchentlich überprüft. Bei einem Gewichtsverlust von mehr als 25% des Ausgangsgewichts wurden die Mäuse abgetötet. 7 Wochen nach Rekonstitution wurde die Schwere der Autoimmunität an Hand eines Beurteilungssystems bestimmt. Das System bestand aus 5 klinischen Parametern: Gewichtsverlust (0 Punkte < 10%; 1 Punkt 10-20%; 2 Punkte > 20%), Haltung (1 Punkt Krümmung im Ruhezustand erkennbar; 2 Punkte starke Krümmung, beeinträchtigte Bewegung), Aktivität (1 Punkt leicht bis mittelstark eingeschränkt; 2 Punkte ruhend), Fellbeschaffenheit (1 Punkt leicht bis mittelmäßig struppig; 2 Punkte stark struppig) sowie Hautintaktheit (1 Punkt Schuppen an Pfoten oder Schwanz, beginnender Haarausfall; 2 Punkte haarlose Stellen) (Teshima et al, 2003) Die Summe der Punkte (maximal 10 Punkte), mit der jede Maus beurteilt wurde, spiegelte somit den Schweregrad der Autoimmunität wider.

2.2.3.9 Infektion mit LCMV

Die Infektion von Mäusen erfolgte mit einer 0,4x20 mm Kanüle intravenös (*i.v.*) in die laterale Schwanzvene. Es wurden 200 pfu LCMV-WE in einem Volumen von 200 µl pro Maus injiziert.

2.2.3.10 Induktion der Antigenexpression in DIETER Mäusen und funktioneller Readout

Die Induktion der Antigenpräsentation in DIETER Mäusen erfolgte durch die Applikation von 100 µl einer 20 mg/ml Tamoxifen Lösung *i.p.* Sieben und acht Tage nach Applikation von Tamoxifen wurden gp33 und βGal spezifische T-Zellen im Blut mittels Tetramer detektiert. Zur Überprüfung der Funktionalität gp33 spezifischer T-Zellen wurden die Mäuse mit LCMV infiziert. Fünf Tage nach Infektion wurde der Virustiter der Milz mit einem Plaque Assay quantifiziert. Tolerante gp33 spezifische T-Zellen wurden 12 Tage nach Infektion mit LCMV im Blut an Hand der IFNγ Produktion nach Restimulation mit Peptid 33 und Peptid 276 charakterisiert.

2.2.3.11 CD4⁺ T-Zell Depletion in DIETER Mäusen

Die Depletion von CD4⁺ T-Zellen erfolgte am Tag vor der Induktion der Antigenpräsentation in DIETER Mäusen durch die intravenöse Injektion von 500 µg GK1.5. Die Depletion wurde 3-5 Tage nach Antikörper Injektion im Blut überprüft. Dazu wurden Lymphozyten mit fluoreszenzmarkierten CD4 (Klon RM4-5) und TCRβ Antikörpern gefärbt.

2.2.3.12 *In vivo* Suppressions Assay regulatorischer T-Zellen

Regulatorische T-Zellen FoxP3.LuciDTR-5 Mäuse wurden durch die Injektion von 1 µg Diphtherie Toxin depletiert. 2 Tage nach Depletion wurden die CD4⁺ T-Zellen aus der Milz der Mäuse mittels MACS isoliert. 2×10^5 der aufgereinigten CD4⁺ T-Zellen wurden in Rag^{-/-} Mäuse *i.v.* injiziert. Zur Überprüfung der Funktionalität regulatorischer T-Zellen erhielten ein paar der Mäuse 10^5 CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen aus WT Mäusen oder MHCII^{-/-} I WT gemischten Chimären. Das Gewicht der Mäuse wurde anschließend wöchentlich kontrolliert.

2.2.4 Immunbiologische Methoden

2.2.4.1 Färbung von Lymphozyten mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper

Zur Analyse im Durchflusszytometer wurden Oberflächenproteine unterschiedlicher Zellpopulationen mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. Dazu wurde zu den aufgereinigten Lymphozyten 50 µl einer mit FACS Puffer verdünnten Antikörperlösung pipettiert und für 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch Zugabe von 2 ml FACS und anschließender Zentrifugation

(400g, 5 Minuten) gewaschen. Die Probe wurde in 100 µl FACS Puffer aufgenommen. Zur Unterscheidung von toten und lebenden Zellen wurde teilweise vor der Messung zu unfixierten Lymphozyten 0,5 µg/ml 7-AAD pipettiert.

Die intrazelluläre Färbung des Transkriptionsfaktors FoxP3 erfolgte mit dem APC anti-mouse/rat FoxP3 Staining Kit der Firma eBioscience nach Anleitung des Herstellers.

Dendritische Zellen wurden vor der Antikörperfärbung für 10 Minuten mit CD16/32 (0,5 µg/ml) inkubiert, um Rezeptoren für Fc γ -Moleküle abzusättigen. Die Inkubation mit spezifischen Antikörpern erfolgte anschließend in der Fc-Rezeptoren blockierenden Lösung. Bei der FACS Analyse von Dendritischen Zellen wurde stets durch Zugabe von 7-AAD zwischen lebenden und toten Lymphozyten unterschieden.

2.2.4.2 Nachweis Antigen spezifischer T-Zellen mittels Tetramer

Um Antigen-spezifische T-Zellen aus einem polyklonalen T-Zell-Repertoire zu detektieren, wurden Tetramere verwendet. In einem Tetramer-Komplex sind vier biotinylierte und mit Peptid beladene MHC Klasse-I-Moleküle über ein Streptavidin-Molekül miteinander verbunden. Gleichzeitig war der Fluoreszenzfarbstoff PE an das Streptavidin der verwendeten MHCI-Peptid-Tetramere H-2D^b/Pep33, H-2D^b/Pep276 und H-2K^b/Pep497 gekoppelt, welcher die Detektion in der FACS-Analyse erlaubte.

Aufgereinigte Lymphozyten aus Blut, Milz oder Lymphknoten wurden mit 50 µl einer Lösung aus FACS Puffer und Tetramer für 10 Minuten bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurden zusätzlich CD8⁺ T-Zellen fluoreszenzmarkiert, um die Prozentzahl antigenspezifischer T-Zellen aller CD8⁺ T-Zellen zu quantifizieren. Für die Markierung von CD8 und weiterer Oberflächenproteine wurden zu den 50 µl Tetramerfärbung 50 µl einer vorverdünnten Antikörperlösung gegeben und für 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach zweimaligen Waschen mit FACS Puffer wurde die Probe in 100 µl FACS Puffer aufgenommen und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

2.2.4.3 Intrazelluläre Färbung von IFN γ

Zur quantitativen Analyse der Funktionalität spezifischer zytotoxischer T-Zellen wurde die IFN γ Produktion nach Restimulation mit Peptid *ex vivo* bestimmt. Den Mäusen wurde retroorbital Blut entnommen und das Blut in MEM Medium, welches 50U /ml Heparin als Gerinnungshemmer enthielt, überführt. Die Erythrozyten wurden mit ACK Puffer lysiert und die Lymphozyten in IMDM Medium aufgenommen. Zur Restimulation der Lymphozyten wurden je Ansatz 100 µl Zellsuspension in eine 96-well Platte pipettiert. Damit IFN γ von den restimulierten Zellen nicht sezerniert wurde, wurde 5 mM Brefeldin A Lösung zu dem Ansatz gegeben. Zusätzlich wurde zu jedem Ansatz

25 U/ml IL-2 pipettiert. Zur spezifischen Restimulation der T-Zellen wurde zu jedem Ansatz 4×10^{-6} M Peptidlösung (10^{-6} M final) gegeben. Um die $\text{IFN}\gamma$ Produktion nach spezifischer Restimulation mit Peptid von unspezifischer $\text{IFN}\gamma$ Produktion zu unterscheiden, wurde für jede Probe ein Ansatz ohne Peptid mitgeführt. Zusätzlich wurde für jede Probe eine Positiv-Kontrolle mit Ionomycin (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ final) und PMA (0,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$) angesetzt. Die Lymphozyten wurden in einem Gesamtvolumen von 200 μl IMDM für 6 Stunden bei 37°C restimuliert. Nach der Restimulation wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Zum Anfärben toter Zellen wurden die Lymphozyten für 10 Minuten mit 50 μl Ethidium Monoazide (EMA) (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS) auf Eis inkubiert. Zur Aktivierung von EMA wurden die Proben anschließend für 10 Minuten unter UV-Licht gestellt. Die Lymphozyten wurden zweimal mit FACS gewaschen. Zur Färbung der Oberflächenmoleküle CD8, CD19 und CD4 wurde 50 μl Antikörperlösung (CD8-APC, CD19-PeCy5, CD4-PeCy5) zu jedem Ansatz pipettiert und für 20 Minuten inkubiert. Die Lymphozyten wurden zunächst dreimal mit FACS Puffer gewaschen, anschließend mit 100 μl einer 1%igen Paraformaldehyd-Lösung (in PBS) für 10 Minuten fixiert, zentrifugiert und mit 100 μl Permeabilisierungspuffer für weitere 10 Minuten permeabilisiert. Intrazelluläres $\text{IFN}\gamma$ wurde mit anti-Maus $\text{IFN}\gamma$ -Fitc in 50 μl Perm Puffer für 20 Minuten gefärbt. Ungebundenes $\text{IFN}\gamma$ wurde mit dreimal Perm Puffer gewaschen, die Proben in 150 μl FACS Puffer und für die Messung in 5 ml FACS Röhren überführt.

2.2.4.4 Durchflusszytometrie (FACS)

Lymphozyten, deren Oberflächenmoleküle bzw. intrazelluläres $\text{IFN}\gamma$ mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt wurden, wurden mit den FACS Geräten Canto oder LSRII von BD mit der Software BD FACSDiva (BD) analysiert. Im FACS Canto wurden maximal sechs Fluoreszenzen (Fitc, PE, APC, PE-Cy7, APC-Cy7, 7AAD), im LSRII maximal sieben Fluoreszenzen (zusätzlich Pacific Blue) gleichzeitig gemessen. Die gemessenen Daten wurden anschließend mit dem Programm FlowJo Analysis (Tree Star Inc.) ausgewertet.

2.2.4.5 Magnetische Zellseparation (MACS) zur positiven Selektion von T-Zellen

CD8+ T-Zellen, regulatorische T-Zellen und CD4+ T-Zellen wurden durch magnetische Zellseparation (engl.: magnetic cell separation, MACS) aus Milzzellen aufgereinigt. Die Separation der Zellpopulation erfolgte durch positive Selektion bei 4°C . Es wurden stets eiskalte Medien und Puffer verwendet

Eine Maus wurde durch zervikale Dislokation getötet. Die Milz wurde entnommen und in 5 ml Iscoves 10% gegeben. Das Medium enthielt zudem 0,1 mg/ml DNase I. Zum Herstellen einer Einzelzellsuspension wurde die Milz mit einem Spritzenstempel über einem 70 µm Zellsieb zerrieben und in ein 50 ml Röhrchen überführt. Die Suspension wurde anschließend zentrifugiert (400g, 5 Minuten) und der Überstand verworfen.

Positive Selektion von CD8⁺ T-Zellen:

Für die Aufreinigung von CD8⁺ Zellen wurde das Zellpellet in 500 µl MACS Puffer und 30 µl Mouse CD8a (Ly-2) MicroBeads (Miltenyi) resuspendiert und für 15 Minuten bei 4°C auf einer Wippe inkubiert. Nach zweimaligen Waschen mit MACS Puffer wurde die Zellsuspension in 5 ml MACS Puffer aufgenommen und über einem 70 µm Zellsieb filtriert. Eine kalte MACS LS-Säule wurde in einen MACS Magneten gestellt und zunächst mit 5 ml MACS Puffer gewaschen. Anschließend wurde die filtrierte Zellsuspension milliliterweise auf die LS-Säule pipettiert. Nachdem die Probe vollständig in die Säule gelaufen war, wurde dreimal mit 5 ml MACS Puffer gewaschen. Die LS-Säule wurde aus dem Magneten genommen und die Zellen mit 5 ml MACS Puffer eluiert. Die Lebendzellzahl wurde bestimmt und die Reinheit der isolierten Zellpopulation durchflusszytometrisch überprüft. Dazu wurde ein Aliquot mit den Antikörpern TCRβ-PE und CD8-APC gefärbt. Die aufgereinigten CD8⁺ T-Zellen wurden in entsprechender Menge PBS aufgenommen und bis zur Verwendung auf Eis gestellt.

Positive Selektion von regulatorischen T-Zellen:

Zur Aufreinigung von CD25⁺ T-Zellen wurde das Zellpellet in 1 ml MACS Puffer mit 5 µl 7D4-bio und 10 µl CD16/32 resuspendiert und für 10 Minuten bei 4°C auf einer Wippe inkubiert. Nach Waschen mit MACS Puffer wurde das Zellpellet in 1 ml MACS Puffer mit 2,5 µl SA-PE aufgenommen und für 10 Minuten bei 4°C auf der Wippe inkubiert. Die Suspension wurde über ein 40 µm Zellsieb in ein neues 50 ml Röhrchen filtriert. Nicht gebundenes SA-PE wurde mit MACS Puffer gewaschen. Das Pellet wurde in 1 ml MACS Puffer mit 20 µl Anti-PE Beads resuspendiert und die Suspension für weitere 10 Minuten bei 4°C auf der Wippe inkubiert. Es wurde einmal mit MACS Puffer gewaschen, die Zellen in 5 ml MACS Puffer aufgenommen und über einem 70 µm Zellsieb filtriert. Zwei kalte MACS LS-Säulen wurden in zwei MACS Magneten gestellt und zunächst mit je 5 ml MACS Puffer gewaschen. Anschließend wurde die filtrierte Zellsuspension milliliterweise auf die erste LS-Säule pipettiert. Der Durchfluss wurde gegebenenfalls in einem 50 ml Röhrchen aufgefangen, um die darin enthaltenen CD4⁺ T-Zellen durch positive Selektion aufzureinigen. Nachdem die Probe vollständig in die Säule gelaufen war, wurde dreimal mit 5 ml MACS Puffer gewaschen. Die LS-Säule wurde aus dem Magneten genommen und die Zellen mit 5 ml MACS Puffer

direkt auf die zweite LS-Säule eluiert. Nachdem die Probe vollständig in die zweite Säule gelaufen war, wurde dreimal mit 5 ml MACS Puffer gewaschen. Die LS-Säule wurde aus dem Magneten genommen und die Zellen mit 5 ml MACS Puffer eluiert. Die Lebendzellzahl wurde bestimmt und die Reinheit der isolierten Zellpopulation durchflusszytometrisch überprüft. Dazu wurde ein Aliquot mit den Antikörpern CD4-APC gefärbt. Die aufgereinigten CD25+ T-Zellen wurden in entsprechender Menge PBS aufgenommen und bis zur Verwendung auf Eis gestellt. Für den T-Zell Proliferationstest wurden die CD25+ T-Zellen in TM5 Medium auf 4×10^5 /ml eingestellt.

Positive Selektion von CD4+ T-Zellen:

Die Aufreinigung von CD4+ T-Zellen erfolgte aus dem ersten Säulendurchfluss der magnetischen Zellseparation von CD25+ Zellen. Der Säulendurchfluss wurde zentrifugiert und das Zellpellet in 1 ml MACS Puffer und 2,5 µl H129.19-bio aufgenommen. Die Suspension wurde für 20 Minuten bei 4 °C auf der Wippe inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde gewaschen und die Zellen in 1 ml MACS und 25 µl SA-beads (Miltenyi) für 20 Minuten bei 4°C auf der Wippe inkubiert. Die Zellsuspension wurde mit MACS Puffer gewaschen und in 5 ml MACS Puffer aufgenommen und filtriert. Die positive Selektion der CD4+ Zellen erfolgte wie für die CD25+ Zellisolation beschrieben über zwei LS-Säulen. Die CD4+ Zellen wurden mit 5 ml MACS Puffer eluiert und die Lebendzellzahl bestimmt. Die Reinheit wurde nach Färbung eines Aliquots mit CD4-APC im Durchflusszytometer überprüft. Für den T-Zell Proliferationstest wurden die CD4+ T-Zellen in Iscoves 5% FCS Medium auf 4×10^5 /ml eingestellt.

2.2.4.6 *In vitro* T-Zell Proliferationstest durch [³H]-Thymidin Einbau

Die Funktionalität regulatorischer T-Zellen von MHCII^{-/-} I WT gemischten Knochenmarkchimären wurde *in vitro* durch Suppression der Proliferation CD4+ T-Zellen bestimmt. Die Proliferation der CD4+ T-Zellen wurde über den Einbau von radioaktiv markiertem [³H]-Thymidin in die DNA der sich teilenden Zellen gemessen. 2×10^4 CD4+ T-Zellen wurden ohne oder in Kokultur mit regulatorischen T-Zellen (2×10^4 , 1×10^4 , 5×10^3 , $2,5 \times 10^3$, $1,25 \times 10^3$) in 96-well Rundbodenplatten inkubiert. Zusätzlich wurde zu jedem Ansatz anti-CD3 Antikörper (3 µg/ml) und 2×10^3 A20 Zellen pipettiert. 2×10^7 /ml A20 Zellen wurden zuvor mit 60µg/ml Mitomycin C in MEM 2% FCS für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und die A20 Zellen anschließend 5x mit 10 ml MEM 2% FCS gewaschen. Die Stimulation erfolgte in einem Gesamtvolumen von 200 µl Iscoves 5% FCS für 2 Tage bei 37°C. Nach 2 Tagen Stimulation wurde zu jedem Ansatz 3 Tropfen [³H]-Thymidin (0,5 µCi) gegeben und für weitere 16-24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die 96-well-Platte wurde bis zur Messung bei -20°C

weggefroren. Die Lymphozyten der einzelnen Ansätze wurden auf einen Glasfaserfilter gesaugt. Der Glasfaserfilter wurde für 3 Minuten und 600 Watt in der Mikrowelle getrocknet, mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit getränkt und in einen Plastikbeutel eingeschweißt. In einem β -Szintillationszähler wurde die β -Strahlung der in die DNA proliferierender Zellen eingebauten [^3H]-Thymidine gemessen und in cpm (*counts per minute*) angegeben.

2.2.4.7 Plaque Assay zur Bestimmung des Virus-Titers

Der Virus-Titer LCMV infizierter Mäuse wurde mit dem Plaque Assay bestimmt (Battegay et al. 1991). Milzen infizierter Mäuse wurden steril entnommen und in je 2 ml DMEM Medium überführt. Bis zur Verwendung wurden die Milzen bei -80°C gelagert. Ein Homogenisator wurde in ein Rührwerk gespannt und die Milzen bei Stufe 8 homogenisiert. Die Suspension wurde anschließend in sterile 2 ml Plastikröhrchen mit Schraubverschluss überführt und für 10 Minuten bei 1200g und 4°C zentrifugiert. MC57 Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit 3 ml Trypsin/EDTA Lösung trypsinisiert, in 10 ml DMEM Medium aufgenommen und zentrifugiert. Die Zellen wurden mit DMEM Medium resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und auf 8×10^5 / ml eingestellt. Pro Well einer 24-well Platte wurden 200 μl der MC57 Zellsuspension vorgelegt. In einer 96-well Platte wurde eine 10er Verdünnungsreihe der homogenisierten Milz angesetzt. 6 Verdünnungsstufen (1/10; 1/100; 1/1000; 1/10.000; 1/100.000; 1/1.000.000) wurden anschließend zu den vorgelegten MC57 Zellen gegeben und der Assay im Inkubator bei 37°C für etwa 4 Stunden inkubiert. Nachdem die MC57 Zellen adhärent waren, wurde mit einer 25 ml Pipette in jedes Well 3 Tropfen warmes Overlay (DMEM, 10% FCS, 2% Methylcellulose) gegeben und der Assay für 2 Tage bei 37°C inkubiert. Nach 2 Tagen Inkubation wurde der Overlay ausgeschlagen, die Zellen für 15 Minuten mit 200 μl 4% Paraformaldehyd fixiert, für 20 Minuten mit 200 μl 0,5% TritonX-100 in PBS permeabilisiert und unspezifische Bindungen für 1 Stunde mit 200 μl PBS 10% FCS abgeblockt. Das Nukleoprotein von LCMV wurde anschließend mit monoklonalem Ratte Anti-LCMV Nukleoprotein Antikörper (VL4) gefärbt. Dazu wurde 200 μl VL4-Kulturüberstand (1:20) in PBS 1% FCS zu den Zellen pipettiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Entfernen nicht gebundenen Antikörpers wurde 3 mal mit PBS gewaschen. Zur Sekundärfärbung wurde 200 μl Polyklonaler Goat-Anti-Ratte-HPO (1:200) in PBS 1% FCS zu den Zellen gegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden 3 mal mit PBS gewaschen und die Plaques mit 0,5 mg/ ml DAB und 0,33 μl / ml 30%iger H_2O_2 in PBS für 10 Minuten entwickelt. Die Reaktion wurde durch Waschen der Zellen mit ddH_2O abgestoppt und die Plaques ausgezählt.

2.2.4.8 Aufkonzentration von Dendritischen Zellen mittels Dichtegradienten-Zentrifugation

Dendritische Zellen wurden aus einer Milz durch Kollagenase II Verdau isoliert und in 2 ml 15% Optiprep in HBSS mit Phenolrot aufgenommen. Pro Milz wurde in ein 15 ml Röhrchen ein Gradient aus 2 ml HBSS mit Phenolrot und 2 ml 12% Optiprep in HEPES Puffer geschichtet. Dabei hatten alle verwendeten Lösungen Raumtemperatur. Die isolierten Zellen wurden mit einer Glaskapillare unter den Gradienten geschichtet. Anschließend wurde der Gradient bei ausgeschalteter Bremse und 600g für 15 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Dendritische Zellen reichern sich oberhalb der 12% igen Optiprep Schicht an und wurden mit einer 1 ml Pipette abgenommen, in ein 50 ml Röhrchen überführt und mit 40 ml FACS Puffer gewaschen. Zur Quantitative Analyse der Antigenpräsentation von Dieter Mäusen wurden die Dendritischen Zellen in Iscoves Medium (10% FCS) aufgenommen.

2.2.4.9 Quantitative Analyse der Antigenpräsentation von DIETER Mäusen

Nur77eGFP Mäuse wurden auf TCR327xLy5.1 Mäuse gekreuzt. Die CD8+T-Zellen der Nur77eGFPxTCR327xLy5.1 transgenen Mäuse sind zu 90% GP33 spezifisch und exprimieren GFP nach Antigenerkennung. Dabei korreliert das Expressionslevel an GFP mit der Bindungsstärke des T-Zell Rezeptors (Moran et al, 2011). Zum quantitativen Vergleich der Antigenpräsentation in WT DIETER, CD40-/- DIETER und IFNR-/- DIETER Stämmen nach Tamoxifen Applikation wurden Dendritische Zellen aus den unterschiedlichen Stämmen mit Nur77eGFPxTCR327xLy5.1 transgenen CD8+ T-Zellen inkubiert. Je mehr gp33 Peptid nach Tamoxifen Applikation in den verschiedenen Dieter Mäusen auf MHC Klasse I Molekülen präsentiert wurde, desto stärker war die GFP Expression der transgenen CD8+ T-Zellen.

Den unterschiedlichen DIETER Stämmen wurde 2 mg Tamoxifen *i.p.* appliziert. 48-72 Stunden später wurden die Milzen der Tiere entnommen, Dendritische Zellen durch Kollagenase II Verdau aus den Milzen isoliert und mittels Dichtegradienten-Zentrifugation aufkonzentriert. Die Reinheit der aufgereinigten vitalen Dendritischen Zellen wurde im FACS nach Antikörperfärbung mit CD11c-PB, MHCII-APC und 7-AAD überprüft und die genaue Anzahl isolierter Dendritischer Zellen nach der Gesamtzellzahlbestimmung errechnet. Es wurden insgesamt $1,8 \times 10^5$ aufgereinigte DCs zur Analyse verwendet. Als positive Kontrolle wurden je $1,8 \times 10^5$ Dendritische Zellen aus C57BL/6 Mäusen mit unterschiedlichen Konzentrationen an GP33 Peptid (10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M) beladen. Dazu wurden die DCs mit GP33 Peptid

der jeweiligen Konzentration in einem 15 ml Falcon in 1 ml Iscoves Medium (10% FCS) für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde ungebundenes Peptid dreimal mit 15 ml Iscoves 10% gewaschen. Als negative Kontrolle wurden $1,8 \times 10^5$ unbeladene C57BL/6 DCs verwendet. In eine 96-well Rundbodenplatte wurden pro Ansatz eine dreier Verdünnungsreihe der $1,8 \times 10^5$ DCs pipettiert. CD8⁺ T-Zellen wurden aus TCR327xLy5.1 x Nur77eGFP transgenen Mäusen durch magnetische Zellseparation isoliert. Die Reinheit wurde im FACS überprüft, die Zellzahl bestimmt und je 10^4 der transgenen CD8⁺ T-Zellen zu den Dendritischen Zellen pipettiert. Der Ansatz wurde in einem Gesamtvolumen von 150 µl in Isocves Medium (10% FCS) über Nacht für etwa 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde mit FACS Puffer gewaschen und die Zellen mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern CD45.1-PE-Cy7 und CD8-APC gefärbt. Der Ansatz wurde nach der Färbung zweimal mit FACS Puffer gewaschen, in 150 µl FACS Puffer aufgenommen, in 5 ml FACS Röhrchen überführt und die Proben im FACS Gerät gemessen.

2.2.4.10 Immunhistochemie (Histologie)

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet. Pankreas, Leber, Lunge, Haut, Dünndarm, Dickdarm, Vormagen und Hauptmagen wurden entnommen und für mindestens 24 Stunden in 4% Histofix fixiert.

Die nachfolgende Bearbeitung der Gewebeproben wurde von Mitarbeitern der Core Facility Histologie der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt. Die Gewebeproben wurden in Paraffin eingebettet und in 3 µm dicke Sektionen geschnitten. Die Färbung der Schnitte erfolgte mit Hematoxylin und Eosin.

Unter dem Mikroskop (Olympus BX51) wurden die Gewebeproben im Durchlicht analysiert (Objektiv: Olympus Plan 10x/0.25) und anschließend mit einer Kamera (ColorView, Olympus) unter Verwendung des Programms Cell (Olympus Soft Imaging Solutions, Version 5.1.0.2108) dokumentiert.

2.2.5 Statistische Analyse

Mittelwerte und Standardabweichungen von n Einzelwerten wurden mit dem Programm Prism 5 (GraphPad Software) berechnet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Student's t-Test für unverbundene Stichproben mit dem Programm Prism 5 (GraphPad Software). Der t-Test errechnet den Unterschied zwischen den Mittelwerten zweier Proben. Der Unterschied galt als signifikant, wenn $p < 0,05$ war. Dabei bedeutet *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$.

3. Ergebnisse

3.1 Kooperation von regulatorischen CD4⁺ T-Zellen und Dendritischen Zellen im immunologischen Steady State

3.1.1 Die Periphere Toleranz Induktion durch Dendritische Zellen ist in der Abwesenheit von suppressiven CD4⁺ T-Zellen beeinträchtigt

Die Injektion von Tamoxifen in DIETER Mäuse induziert die Expression von zwei transgen kodierten LCMV CTL-Epitopen auf Dendritischen Zellen ohne dabei den immunologischen Steady State zu stören. Aktiviert man zeitgleich mit der Induktion der Antigenpräsentation die Dendritischen Zellen durch Applikation eines aktivierenden Stimulus, wird eine antigenspezifische funktionale Effektor CTL-Antwort ausgelöst. Die Antigenpräsentation auf ruhenden Dendritischen Zellen hingegen toleriert zytotoxische T-Zellen in der Peripherie. Diese Periphere Toleranz Induktion ist sehr robust und kann selbst durch eine Infektion mit LCMV nicht gebrochen werden (Probst, Lagnel et al. 2003). In DIETERxDEREG doppel transgenen Mäusen, welche neben der Induktion der Antigenpräsentation auf Dendritischen Zellen die Depletion regulatorischer T-Zellen erlauben, konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit von regulatorischen T-Zellen die periphere Toleranz Induktion durch Dendritische Zellen im immunologischen Steady State beeinträchtigt ist. Anstatt zytotoxische T-Zellen zu tolerisieren, aktivierten Dendritische Zellen funktionale CD8⁺ T-Zellen nach Depletion von regulatorischen T-Zellen (Schildknecht, Brauer et al. 2010). In FoxP3-DTR transgenen Mäusen, welche ebenfalls die Depletion FoxP3⁺ regulatorischer T-Zellen ermöglichen, werden in Folge regulatorischer T-Zell Depletion autoreaktive CD4⁺ T-Zellen aktiviert und es entwickelt sich Autoimmunität (Kim, Rasmussen et al. 2007). Es wurde daher zuerst untersucht, ob die beeinträchtigte periphere Toleranz Induktion durch steady-state Dendritische Zellen in DIETERxDEREG Mäusen nach Depletion von regulatorischen T-Zellen nur ein sekundärer Effekt auf Grund von CD4⁺ T-Zell medierter Autoimmunität ist. Dazu wurde die Toleranz Induktion durch steady-state Dendritische Zellen in DIETER Mäusen mit DIETER Mäusen verglichen, in denen alle CD4⁺ T-Zellen depletiert wurden. In undepletierten DIETER Mäusen wurde keine Expansion transgen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen gemessen (Abb. 2A) (Probst, Lagnel et al. 2003). In DIETER Mäusen, welche weder regulatorische noch konventionelle CD4⁺ T-Zellen besaßen, expandierten GP33-41 spezifische CD8⁺ T-Zellen hingegen massiv (Abb. 2A). Um zu überprüfen, ob die aktivierten CD8⁺ T-Zellen in CD4⁺ T-Zell depletierten DIETER Mäusen funktionale Effektor CD8⁺ T-Zellen waren, wurden die

Mäuse mit 200 pfu LCMV WE infiziert und der Virus Titer in der Milz 5 Tage nach Infektion bestimmt. In CD4⁺ T-Zell depletierten Mäusen war der Virus-Titer im Gegensatz zu undepletierten Mäusen stark reduziert (Abb. 2B). Dies deutet darauf hin, dass die Antigenpräsentation auf steady-state Dendritischen Zellen in der Abwesenheit von CD4⁺ T-Zellen funktionale Effektor CD8⁺ T-Zellen aktiviert.

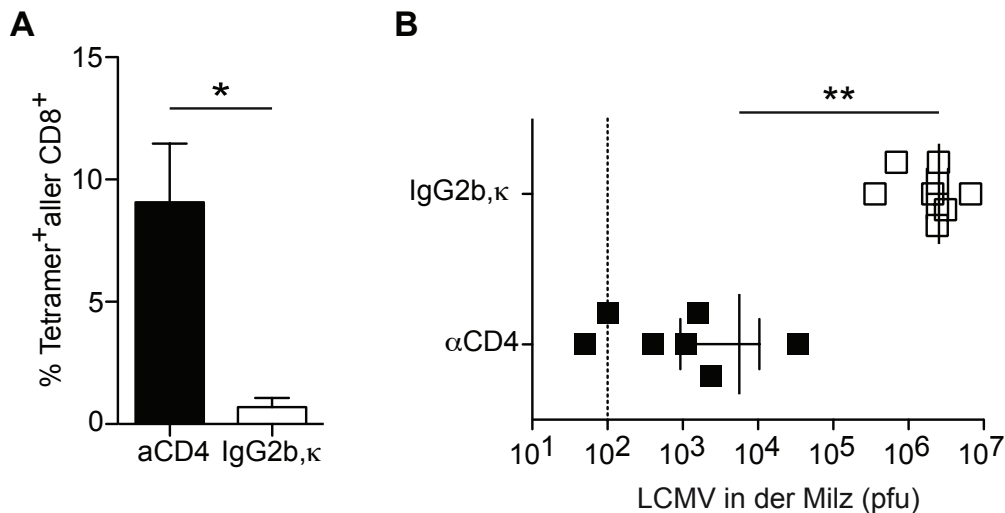


Abbildung 2. Steady-state Dendritische Zellen induzieren die Aktivierung funktionaler zytotoxischer T-Zellen anstatt periphere CD8⁺ T-Zell Toleranz nach CD4⁺ T-Zell Depletion

DIETER Mäusen wurden 0,5 mg GK1.5 *i.v.* injiziert (schwarze Symbole) oder 0,5 mg Isotyp Kontrolle *i.v.* (weiße Symbole) an Tag -1. An Tag 0 wurde die Antigenpräsentation durch die Injektion von 2 mg TAM *i.p.* induziert. **(A)** An Tag 8 wurde die Expression GP33-41 spezifischer CTLs im Blut mit MHC Klasse-I Tetramerfärbung detektiert. **(B)** An Tag 8 wurden die Mäuse *i.v.* mit 200 pfu LCMV-WE infiziert und der Virus Titer 5 Tage nach Infektion in der Milz bestimmt. Es wurden 7 Mäuse pro Gruppe verwendet. 1 Experiment von 4 Experimenten ist gezeigt.

In Experimenten mit DEREK Mäusen, die eine Depletion von FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen ermöglichen, wurde beobachtet, dass nach Depletion von regulatorischen T-Zellen Dendritische Zellen einen aktivierten Phänotyp zeigten. Gleichzeitig erhöhte sich die absolute Anzahl Dendritischer Zellen (Schildknecht, Brauer et al. 2010). In CD4⁺ T-Zell depletierten Mäusen war die Expression der Aktivierungsmarker CD80, CD86 und CD40 auf Dendritischen Zellen aus Milz und Lymphknoten ebenfalls erhöht (Abb. 3). Hingegen blieb die Anzahl Dendritischer Zellen in CD4⁺ T-Zell depletierten Mäusen konstant (Abb. 3). Gleiche Beobachtungen wurden in SMARTAx Rag^{-/-} Mäusen gemacht, welche weder regulatorische T-Zellen noch autoreaktive T-Zellen entwickeln (Kim, Rasmussen et al. 2007). Da Dendritische Zellen nur nach Depletion von regulatorischen T-Zellen in DEREK Mäusen (Schildknecht, Brauer et al. 2010) und FoxP3-DTR Mäusen (Kim, Rasmussen et al. 2007) expandieren, nicht aber nach CD4⁺ T-Zell Depletion (Abb. 3) und gleichzeitig autoreaktive CD4⁺ T-Zellen nach Depletion

von regulatorischen T-Zellen in FoxP3-DTR Mäusen aktiviert werden (Kim, Rasmussen et al. 2007), ist die Expansion Dendritischer Zellen in Abwesenheit von regulatorischen T-Zellen vermutlich auf die Aktivierung von autoreaktiven CD4⁺ T-Zellen in Treg depletierten Mäusen zurückzuführen. Im Gegensatz dazu zeigten Dendritische Zellen sowohl von Treg depletierten Mäusen (Kim, Rasmussen et al. 2007; Schildknecht, Brauer et al. 2010) als auch von CD4⁺ T-Zell depletierten Mäusen (Abb. 2 und 3) einen aktivierten Phänotyp und lösten eine zytotoxische T-Zell Antwort aus, anstatt Toleranz zu induzieren. Der aktivierte Phänotyp von Dendritischen Zellen ist in diesem Fall nicht auf autoreaktive CD4⁺ T-Zellen zurückzuführen, sondern vielmehr direkte Folge fehlender Suppression durch CD4⁺ T-Zellen.

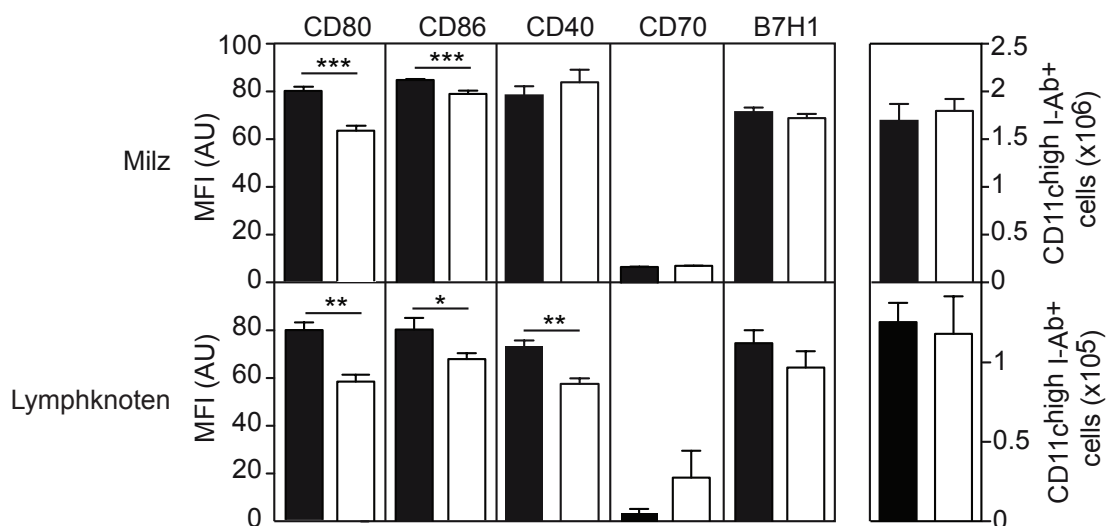


Abbildung 3. Steady-state Dendritische Zellen zeigen einen aktivierten Phänotyp nach CD4⁺ T-Zell Depletion

C57BL/6 Mäusen wurde 0,5 mg GK1.5 *i.v.* (schwarze Balken) oder 0,5 mg Isotyp Kontrolle *i.v.* injiziert und die Expression von Aktivierungsmarker in der Milz (obere Reihe) und Lymphknoten (untere Reihe) im FACS quantifiziert. Die Median Fluoreszenz von fünf Mäusen ist gezeigt. Die Abbildung rechts zeigt die Anzahl Dendritischer Zellen in Milz und Lymphknoten von CD4⁺ T-Zell depletierten (schwarze Balken) und Isotyp behandelten Mäuse (weiße Balken). Der Durchschnittswert von 5 Mäusen ist dargestellt. 1 Experiment von 5 Experimenten ist gezeigt.

3.1.2 Dendritische Zellen und suppressive CD4⁺ T-Zellen müssen direkt miteinander interagieren, um CD8⁺ T-Zell Toleranz zu induzieren

In Abwesenheit von suppressiven CD4⁺ T-Zellen ist die Induktion peripherer Toleranz durch Dendritische Zellen beeinträchtigt. Um zu untersuchen, ob CD4⁺ T-Zellen direkt mit Dendritischen Zellen interagieren müssen, damit Dendritische Zellen periphere Toleranz induzieren, wurden DIETER Mäuse auf MHCII^{-/-} Mäuse gekreuzt. MHCII^{-/-} DIETER Mäuse exprimieren nach Tamoxifen Injektion die LCMV CTL-Epitope GP33 und NP396 auf Dendritischen Zellen. Gleichzeitig können Dendritische Zellen auf Grund des Knockouts für MHC Klasse II nicht mit suppressiven CD4⁺ T-Zellen interagieren. Die Experimente wurden in gemischten Knochenmarkchimären durchgeführt. Zur Generierung der gemischten Knochenmarkchimäre wurden C57BL/6 Mäuse letal bestrahlt und mit gleicher Anzahl Knochenmarkszellen aus MHCII^{-/-} DIETER und C57BL/6 (CD45.1) rekonstituiert. Kontroll-Tiere erhielten Knochenmarkszellen aus Wildtyp DIETER und C57BL/6 (CD45.1) Mäusen. 6 Wochen nach der Knochenmarkstransplantation wurde die Rekonstitution der gemischten Knochenmarkchimäre überprüft. Dazu wurde das CD45.1/ CD45.2 Verhältnis in verschiedenen Zellpopulationen aus Blut, Milz und Lymphknoten bestimmt. In MHCII^{-/-} DIETER I WT gemischten Chimären entwickelten sich B-Zellen hauptsächlich aus WT Knochenmark. T-Zellen und Dendritischen Zellen hingegen stammten zu gleichen Teilen aus MHCII^{-/-}DIETER und WT Knochenmarkszellen ab (Abb. 4A). Tamoxifen Injektion in gemischte MHCII^{-/-}DIETER I WT Chimäre, in welchen die LCMV GP33 präsentierenden DCs kein MHCII exprimieren, führte zu einer massiven Expansion GP33 spezifischer CD8⁺ T-Zellen (Abb. 4B), die mit der Antwort in CD4-depletierten DIETER Mäusen vergleichbar war (Abb. 1A). Wie in CD4-depletierten DIETER Mäusen waren auch die aktivierten LCMV GP33 CTLs in MHCII^{-/-}DIETER I WT Chimären funktionale Effektor-Zellen und protekierten vor einer LCMV Infektion (Abb. 4C). Demnach müssen Dendritische Zellen direkt mit suppressiven CD4⁺ Zellen interagieren können, um naïve CD8⁺ T-Zellen zu tolerisieren. Dendritische Zellen, die keine kognate MHCII/TCR Verbindung mit CD4⁺ T-Zellen eingehen können, aktivierten stattdessen funktionale Effektor CTLs.

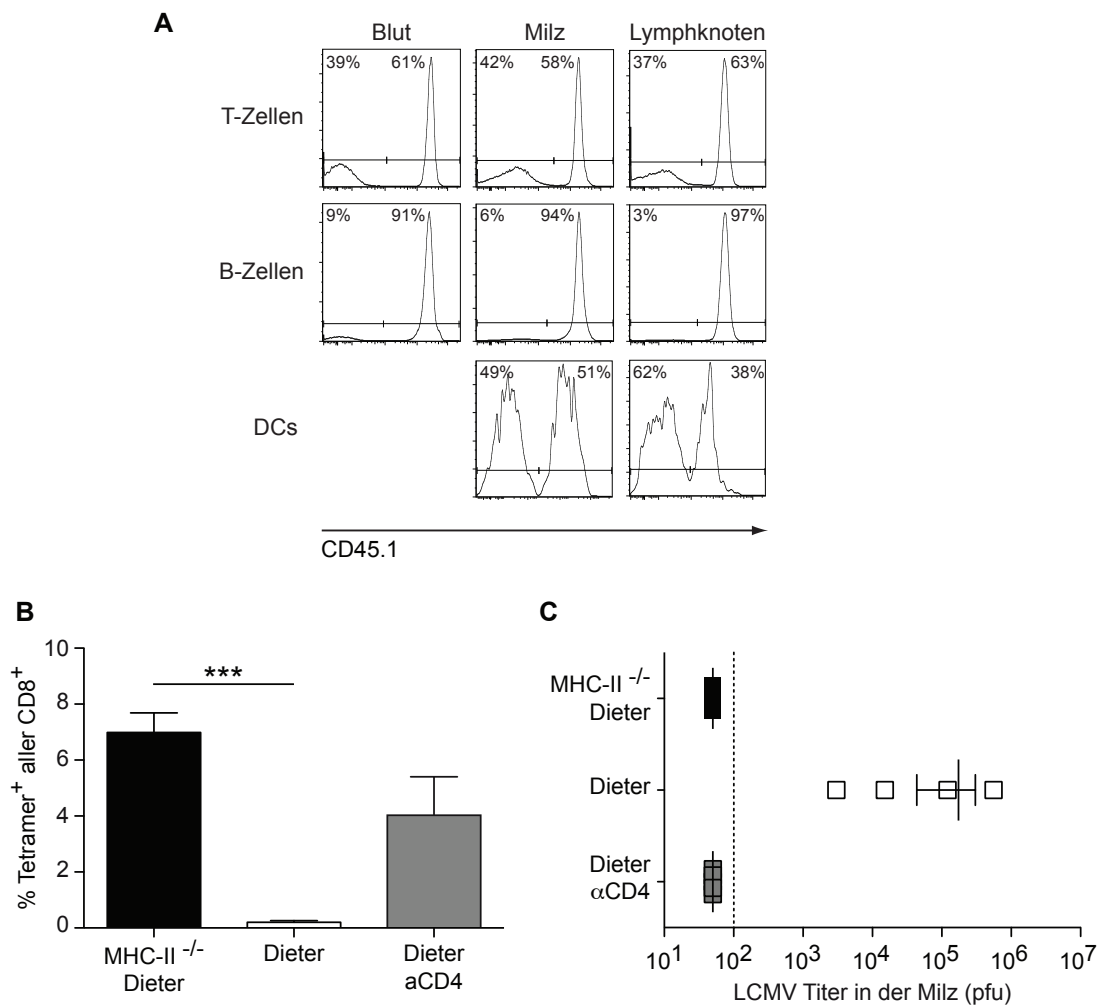


Abbildung 4. Antigenpräsentation durch MHCII defiziente Dendritische Zellen induziert die Aktivierung funktionaler zytotoxischer T-Zellen anstatt peripherer Toleranz

Es wurden gemischte Knochenmarkchimäre aus MHCII^{-/-}-DIETER I Wildtyp (CD45.1) (schwarze Symbole) oder DIETER I Wildtyp (weiße Symbole) Knochenmarkszellen generiert. (A) Die Rekonstitution von T-Zellen, B-Zellen und Dendritischen Zellen in MHCII^{-/-}-DIETER I WT Chimären wurde 6 Wochen nach Knochenmarkstransplantation im Blut, Milz und Lymphknoten von MHCII^{-/-}-DIETER I WT Chimären an Hand des CD45.1/ CD45.2 Verhältnis überprüft. (B+C) Die Antigenpräsentation auf DIETER Dendritischen Zellen wurde durch die *i.p.* Injektion von 2 mg AM an Tag 0 induziert. Als Kontrolle wurden DIETER I WT gemischte Chimäre an Tag -1 durch die Injektion von 0,5 mg GK1.5 *i.v.* CD4⁺ T-Zell depletiert. (B) An Tag 8 wurde die Expansion GP33-41 spezifischer CTLs im Blut mit MHC Klasse-I Tetramerverfärbung detektiert. (C) An Tag 8 wurden die Mäuse *i.v.* mit 200 pfu LCMV-WE infiziert und der Virus Titer 5 Tage nach Infektion in der Milz bestimmt. Es wurden 4 Mäuse pro Gruppe verwendet. 1 Experiment von 4 Experimenten ist gezeigt.

3.1.3 Normale Anzahl funktionaler FoxP3+ CD4+ regulatorischer T-Zellen in MHCII^{-/-}DIETER I WT gemischten Knochenmarkchimären

Die periphere Toleranz Induktion durch Dendritische Zellen ist in MHCII^{-/-}DIETER I WT Chimären beeinträchtigt. Um einen Defekt in der Entwicklung und Funktion regulatorischer T-Zellen in gemischten Chimären, deren APCs zur Hälfte MHCII defizient sind, auszuschließen, wurden sowohl die Anzahl, als auch die Funktion FoxP3+ Tregs in verschiedenen lymphoiden Organen verglichen. Die Anzahl FoxP3+ CD4+ T-Zellen in Milz, Blut und Lymphknoten war zwischen MHCII^{-/-} I WT und WT I WT Chimären identisch (Abb. 5A). Weiterhin waren regulatorische T-Zellen aus MHCII^{-/-} I WT Chimären *in vitro* und *in vivo* funktional. So supprimierten regulatorische T-Zellen aus MHCII^{-/-} I WT Chimären die Proliferation CD4+ T-Zellen (Abb. 5B) und unterdrückten vollständig Autoimmunität in Rag^{-/-} Mäusen, welchen Treg depletierte CD4+ T-Zellen adoptiv transferiert wurden (Abb. 5C). Die Expression von MHCII Molekülen auf der Hälfte aller Antigenpräsentierenden Zellen in gemischten Knochenmarkchimären ist folglich ausreichend, um eine normale Anzahl funktionaler FoxP3+ CD4+ T-Zellen zu selektionieren. Die beeinträchtigte Toleranz Induktion von CD8+ T-Zellen in der Peripherie durch MHCII defiziente Dendritische Zellen ist somit nicht auf einen Defekt regulatorischer T-Zellen zurückzuführen, sondern basiert vermutlich darauf, dass suppressive CD4+ T-Zellen nicht mit den CD8+ T-Zell Epitop präsentierenden Dendritischen Zellen im immunologischen Steady State interagieren können.

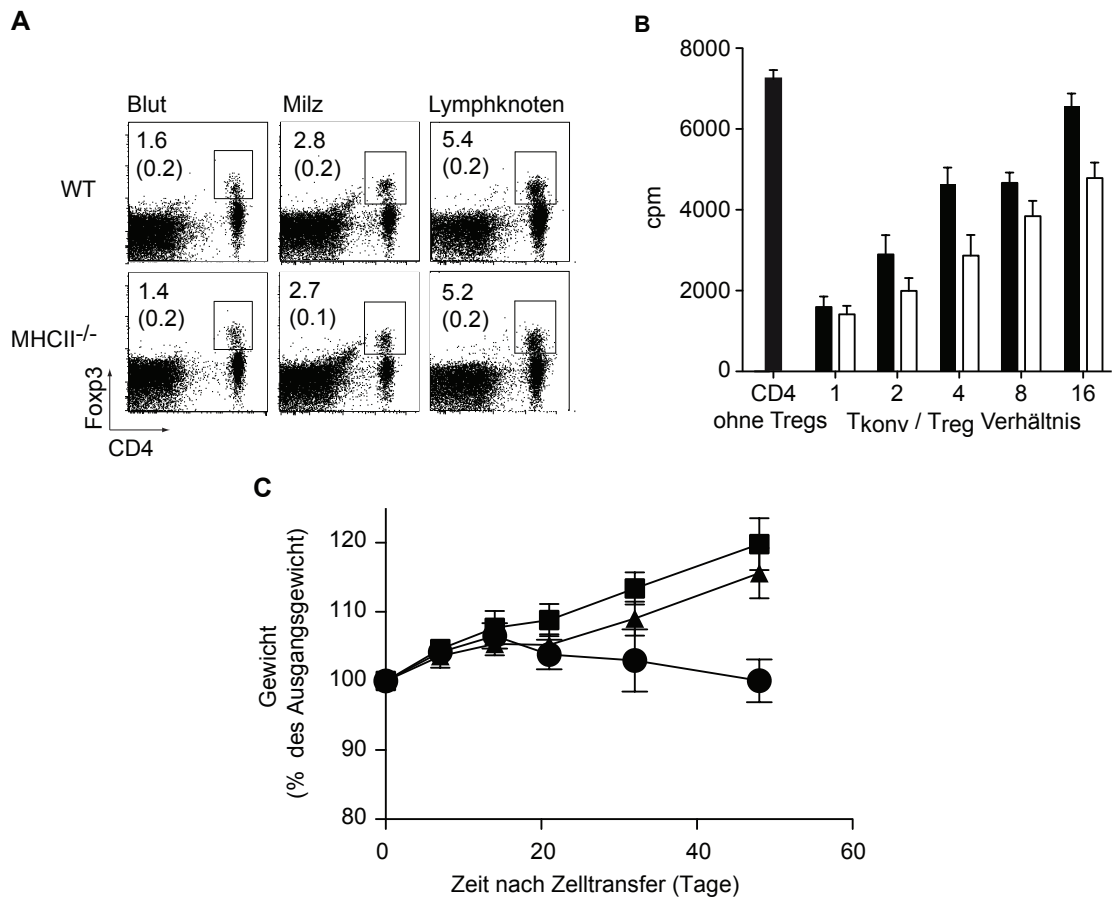


Abbildung 5. Normale Anzahl und suppressive Funktion von FoxP3+ CD4+ regulatorischen T-Zellen *in vivo* und *in vitro* in Mäusen, deren APCs zur Hälfte MHCII defizient sind.

(A) Die Anzahl FoxP3+ CD4+ T-Zellen aller Lymphozyten in Wildtyp I Wildtyp (obere Reihe) und MHCII^{-/-} I Wildtyp gemischten Knochenmarkchimären wurde 7 Wochen nach Rekonstitution mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Zahlen geben die Mittelwerte von 5 Mäusen an. (B) CD25+ CD4+ regulatorische T-Zellen wurden aus Wildtyp I Wildtyp (schwarze Balken) und MHCII^{-/-} I Wildtyp (weiße Balken) gemischten Knochenmarkchimäre mittels magnetischer Zellseparation isoliert. Die isolierten Tregs wurden mit CD4+ T-Zellen (Tconv) und anti-CD3 inkubiert. Die suppressive Funktion der regulatorischen T-Zellen wurde mittels Quantifikation der CD4+ T-Zell Proliferation an Hand von 3H-Thymidin Einbau bestimmt. 1 Experiment von 3 Experimenten ist gezeigt (C) CD4+ T-Zellen wurden FoxP3+ T-Zell depletiert. Jeweils 2x10⁵ der depletierten CD4+ T-Zellen wurden adoptiv in 15 RAG1^{-/-} Mäuse transferiert (Punkte). Jeweils 5 der Mäuse erhielten zusätzlich 1x10⁵ CD4+CD25+ Zellen, welche aus MHCII^{-/-} I Wildtyp gemischten Chimären (Quadrate) oder aus Wildtyp Mäusen (Dreiecke) isoliert wurden. Das Gewicht der Mäuse wurde in den folgenden 5 Wochen kontrolliert. 1 Experiment von 2 Experimenten ist gezeigt.

3.1.4 Normale Periphere Toleranz Induktion durch MHCII kompetente Dendritische Zellen in Mäusen, deren APCs zur Hälfte MHCII defizient sind

Um weiterhin auszuschließen, dass die beeinträchtigte periphere Toleranz Induktion durch Dendritische Zellen in MHCII^{-/-}DIETER I WT gemischten Chimären nicht auf einen Defekt von suppressiven CD4⁺ T-Zellen oder anderen systemischen Defekten zurückzuführen ist, sondern auf MHCII defiziente Dendritische Zellen *in cis*, wurden reverse gemischte Chimäre aus MHCII und WT-DIETER Knochenmark generiert. Wie in MHCII^{-/-}DIETER I WT Chimären ist auch in DIETER I MHCII^{-/-} Chimären die Hälfte aller APCs MHC Klasse II defizient. Im Unterschied zu MHCII^{-/-}DIETER I WT Chimären jedoch exprimiert die GP33 präsentierende DIETER DC in den reversen Chimären MHCII und kann somit mit suppressiven CD4 interagieren. Im extremen Gegensatz zu Mäusen, deren DIETER DCs MHCII defizient sind, führte Tamoxifen Injektion in reversen DIETER I MHCII^{-/-} gemischten Chimäre zu keiner Expansion GP33 spezifischer CTLs (Abb. 6). Dies verdeutlicht, dass nur MHCII defiziente Dendritische Zellen keine periphere CD8⁺ T-Zell Toleranz induzieren können und steady state Dendritische Zellen direkt mit suppressiven CD4⁺ T-Zellen interagieren müssen, um periphere CD8⁺ T-Zell Toleranz zu induzieren.

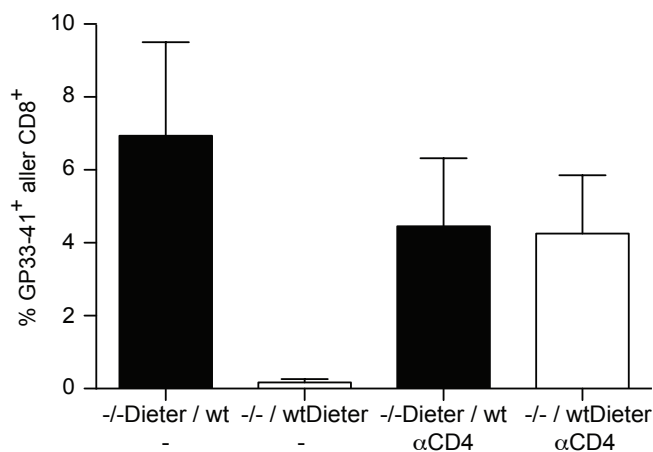


Abbildung 6. Beeinträchtigte periphere Toleranz Induktion durch MHCII defiziente DCs, nicht aber durch MHCII kompetente DCs in Mäusen, deren APCs zur Hälfte MHCII defizient sind.

Es wurden gemischte Knochenmarkchimäre aus jeweils gleicher Anzahl Knochenmarkszellen aus MHCII^{-/-}DIETER und Wildtyp (CD45.1) (schwarze Balken) oder MHCII^{-/-} und Wildtyp DIETER (CD45.1) (weiße Balken) Mäusen generiert. An Tag 0 wurde die Antigenpräsentation auf Dendritischen Zellen durch die Injektion von 2 mg Tamoxifen *i.p.* induziert. Einige Mäuse wurden an Tag -1 durch die Injektion von 0,5 mg GK1.5 *i.v.* CD4⁺ T-Zell depletiert. Die Expansion LCMV GP33-41 spezifischer CD8⁺ T-Zellen wurde 8 Tage nach Tamoxifen Injektion im Blut durch Färbung mit MHC Klasse I Tetrameren detektiert. Pro Gruppe wurden fünf Mäuse verwendet. 1 Experiment von 2 Experimenten ist gezeigt.

3.1.5 MHCII defiziente Dendritische Zellen sind im Vergleich zu WT Dendritischen Zellen aktiviert

Die FACS Analyse MHCII defizienter und MHCII kompetenter Dendritischer Zellen aus Milz und Lymphknoten von MHCII^{-/-} | WT gemischten Knochenmarkchimären ergab, dass MHCII defiziente Dendritische Zellen ein höheres Expressionslevel an kostimulatorischen Molekülen als WT Dendritische Zellen besaßen (Abb. 7). MHC Klasse II defiziente Dendritische Zellen aus Milz exprimierten signifikant mehr CD80, CD40, CD70 und B7H1 als WT DCs. Die Aktivierung MHCII defizienter Dendritischer Zellen aus Lymphknoten war hingegen weniger drastisch und nur für die Expression von CD80 signifikant. Entgegen den Erwartungen war die Expression von CD86 auf Milz und Lymphknoten MHCII defizienter DCs reduziert, wofür keine Erklärung gefunden werden konnte.

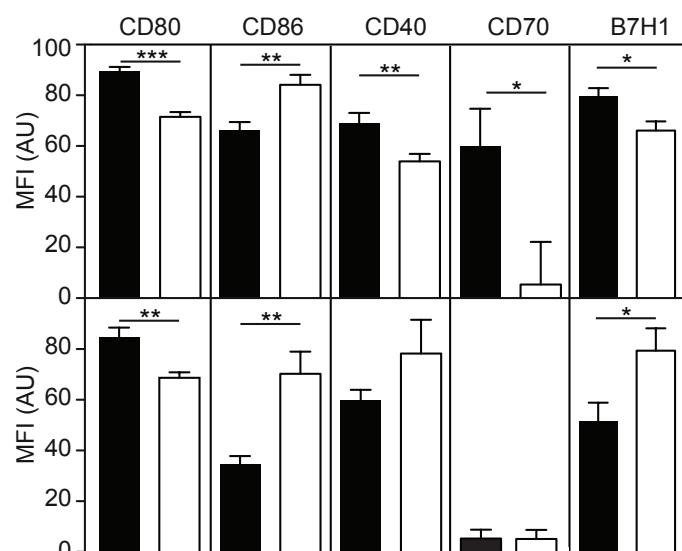


Abbildung 7. MHCII defiziente Dendritische Zellen sind im Vergleich zu Wildtyp Dendritischen Zellen aktivierter.

Dendritische Zellen wurden aus Milz (obere Reihe) und peripheren Lymphknoten (untere Reihe) von MHCII^{-/-} | Wildtyp (CD45.1) gemischten Knochenmarks Chimären isoliert. Die Expression von CD80, CD86, CD40, CD70 und B7-H1 wurde auf CD45.1⁺ (Wildtyp, weiße Balken) und CD45.1⁻ (MHC Klasse II ^{-/-}, schwarze Balken) mittels FACS Analyse quantifiziert. Dabei wurden Dendritische Zellen als CD11c⁺, F480⁻, B220⁻, Thy1.2⁻ Population identifiziert. 1 Experiment von 4 Experimenten ist gezeigt.

3.1.6 Dendritische Zellen, welche nicht mit CD4+ T-Zellen interagieren können, induzieren CTL medierte Autoimmunität

Gemischte Knochenmarkchimäre, welche mit Knochenmark aus MHCII defizienten Mäusen rekonstituiert wurden, zeigten etwa 4-6 Wochen nach der Knochenmarkstransplantation eine progressive Verschlechterung ihres generellen Gesundheitszustandes. Mäuse, die mit 50% MHCII^{-/-} Knochenmark rekonstituiert wurden, verloren leicht an Gewicht (Abb. 8A). Einige der Mäuse hatten zusätzlich weitere Krankheitssymptome, wie mangelnde Aktivität, gekrümmte Haltung, schuppige Haut oder eingeschränktes Fluchtverhalten, während WT | WT Chimäre keine Krankheitssymptome zeigten (Abb. 8C). Um den Zelltyp zu identifizieren, welcher Autoimmunität in MHCII^{-/-} | WT Chimären verursacht, wurden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in MHCII^{-/-} | WT Chimären 3 Wochen nach Transplantation des Knochenmarks depletiert. Depletion von CD8⁺ T-Zellen unterdrückte die Entwicklung von Autoimmunität vollständig (Abb. 8A-C), was darauf hindeutete, dass autoreaktive CD8⁺ T-Zellen Autoimmunität in den gemischten Chimären mediieren. Im starken Gegensatz dazu verloren alle CD4⁺ T-Zell depletierten MHCII^{-/-} | WT Chimäre massiv an Gewicht und zeigten 6 Wochen nach Rekonstitution multiple Krankheitssymptome, sodass alle Tiere spätestens 10 Wochen nach Transplantation abgetötet werden mussten (Abb. 8A-C). Histologische Untersuchungen von Pankreas und Leber zeigten mononukleäre Infiltrate in MHCII^{-/-} | WT gemischten Chimären (Abb. 8D). Keine Infiltrate wurden hingegen in CD8 depletierten Chimären gefunden. CD4 depletierte Mäuse zeigten große Infiltrate in der Leber und einen fast vollständig zerstörten exokrinen Pankreas (Abb. 8D). Vereinzelt wurden zentrale Infiltrate im Colon CD4 depletierter Chimäre gefunden. In Lunge, Haut, Magen, Dünndarm und Niere aller Tiere wurden indes keine Infiltrate detektiert (nicht gezeigt). Die extreme Pathologie der Leber und des Pankreas in CD4 depletierten MHCII^{-/-} | WT Chimären wurde zudem durch das erhöhte Level an Serum Transaminasen und die verminderte Produktion der Pankreas Enzyme Amylase und Lipase widerspiegelt (Abb. 8E). Übereinstimmend mit CTL mediierter Autoimmunität war ein hoher Anteil CD8⁺ T-Zellen aus Pankreas drainierenden Lymphknoten sowie nicht drainierenden Lymphknoten aktiviert (CD44^{high}, CD62L^{low}) (Abb. 8F).

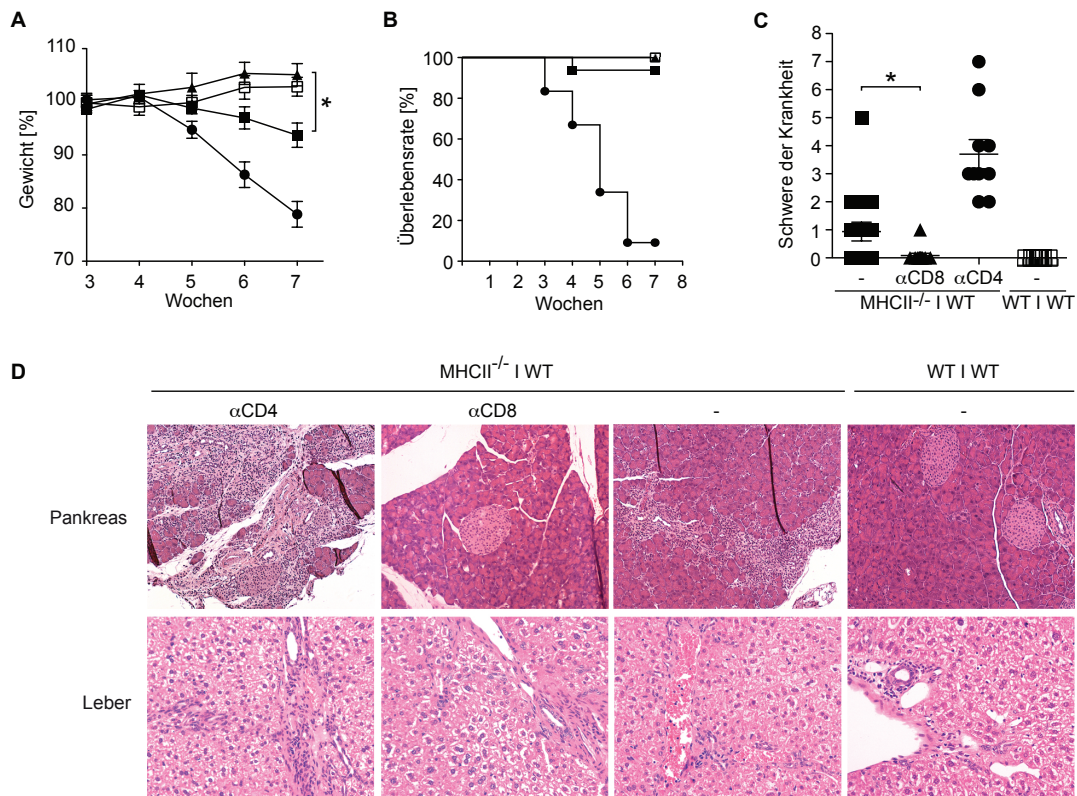


Abbildung 8. CTL medierte Autoimmunität in Mäusen, deren APCs zur Hälfte nicht mit suppressiven CD4+ T-Zellen interagieren können.

MHCII^{-/-} I Wildtyp gemischte Knochenmarkchimäre (schwarze Symbole) und Wildtyp I Wildtyp Kontroll Mäuse (weiße Symbole) wurden entweder unbehandelt gelassen (Quadrate) oder 3 Wochen nach Rekonstitution CD8+ T-Zell depletiert (0,5 mg YTS *i.p.* einmal wöchentlich) (Dreiecke) oder CD4+ T-Zell depletiert (0,5 mg GK1.5 *i.p.* einmal wöchentlich) (Punkte) (A) Das Gewicht der gemischten Chimäre wurde ab Rekonstitution 10 Wochen lang wöchentlich bestimmt. 1 Experiment von 2 Experimenten ist gezeigt. (B) Überlebensrate der Gemischten Knochenmarkchimäre ab Knochenmarks Rekonstitution. 1 Experiment von 2 Experimenten ist gezeigt. (C) Die Schwere der Autoimmunität der gemischten Knochenmarkchimäre wurde an Hand eines Punktesystems (Haltung, Gewichtsverlust, Aktivität, Fell Beschaffenheit, Haut Intaktheit) 7 Wochen nach Rekonstitution bestimmt. 1 Experiment von 2 Experimenten ist gezeigt. (D) Histologie des Pankreas und der Leber unbehandelter, CD4+ T-Zell oder CD8+ T-Zell depletierter MHCII^{-/-} I WT und WT I WT gemischter Knochenmarkchimäre 7 Wochen nach Rekonstitution. 1 Experiment von 2 Experimenten ist gezeigt.

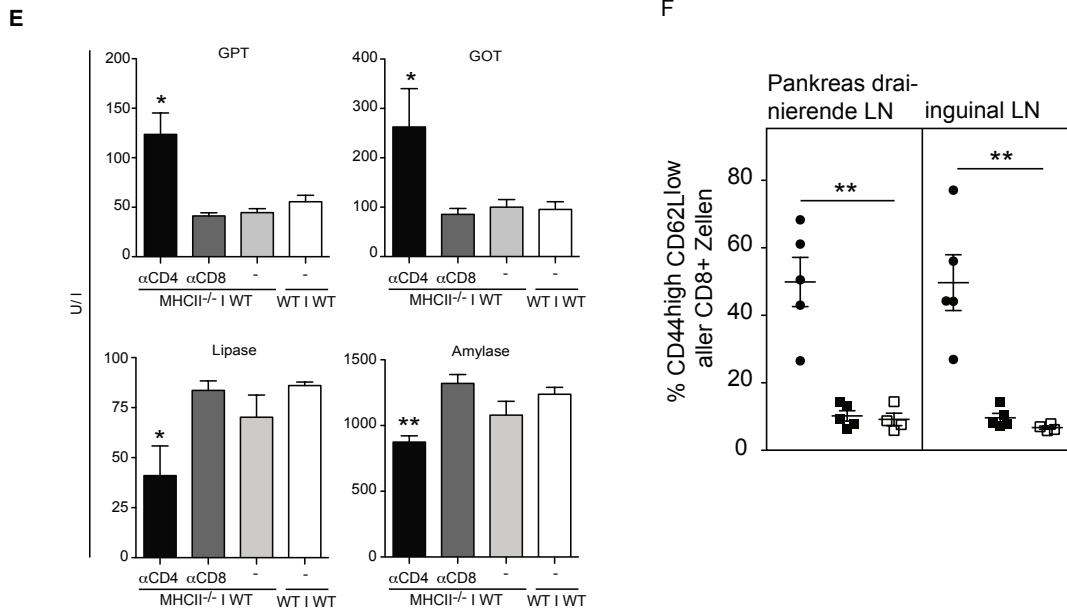


Abbildung 8. CTL medierte Autoimmunität in Mäusen, deren APCs zur Hälfte nicht mit suppressiven CD4⁺ T-Zellen interagieren können.

(E) Anteil aktivierter (CD44^{high}CD62L^{low}) CD8⁺ T-Zellen aller CD8⁺ T-Zellen aus Pankreas drainierenden und nicht drainierenden inguinalen Lymphknoten 7 Wochen nach Rekonstitution. (F) Serumspiegel von Amylase, Lipase und Transaminase von unbehandelten, CD4⁺ T-Zell depletierten oder CD8⁺ T-Zell depletierten MHCII^{-/-} I WT und WT I WT gemischten Knochenmarkchimäre 7 Wochen nach Rekonstitution. Pro Gruppe wurden 10 Mäuse verwendet.

3.1.7 CTL medierte Autoimmunität in MHCII^{-/-} I WT Chimären wird durch MHCII defiziente DCs induziert

Um zu untersuchen, ob CD8⁺ T-Zell medierte Autoimmunität in MHCII^{-/-} I WT Chimären durch MHCII defiziente DCs induziert wird, wurden MHCII^{-/-} Mäuse auf CD11cDTR Mäuse gekreuzt, welche die selektive Depletion von Dendritischen Zellen durch die Injektion von Diphtherie Toxin erlauben (Jung, Unutmaz et al. 2002). Anschließend wurden gemischte Knochenmarkchimäre aus MHCII^{-/-}CD11cDTR und WT Knochenmark generiert. Depletion MHCII defizienter DCs in MHCII^{-/-}CD11cDTR I WT gemischten Chimären hemmte die Entwicklung von Autoimmunität vollständig (Abb. 9). Dies veranschaulicht, dass CTL medierte Autoimmunität tatsächlich durch Dendritische Zellen, die nicht mit suppressiven CD4⁺ T-Zellen direkt interagieren können, hervorgerufen wird.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die kognate Verbindung zwischen steady-state DCs und suppressiven CD4⁺ T-Zellen unerlässlich für die Induktion und Aufrechterhaltung peripherer CD8⁺ T-Zell Toleranz ist und CTL medierte Autoimmunität verhindert.

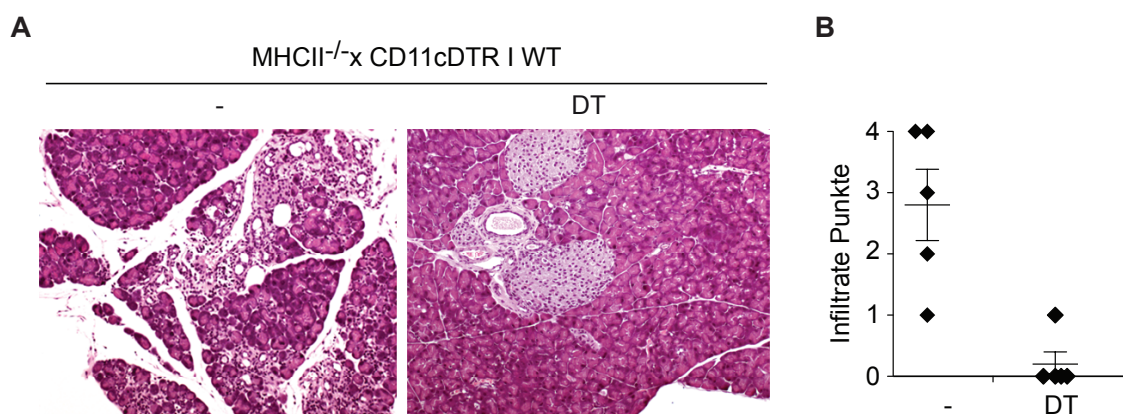


Abbildung 9. Die CTL medierte Autoimmunität ist in CD11cDTRxMHCII^{-/-} I WT nach Depletion der MHCII defizienten Dendritischen Zellen vollständig unterdrückt.

(A) Repräsentative HE-Färbung des Pankreas von CD11cDTRxMHC Klasse-II^{-/-} I Wildtyp gemischten Knochenmarkchimäre, deren MHCII defiziente Dendritische Zellen durch die Injektion von 100 ng Diphtherie Toxin 2x wöchentlich depletiert wurden (rechte Abbildung) oder unbehandelte Tiere (linke Abbildung). (B) Die Schwere der Zerstörung des Pankreas von DT behandelten oder unbehandelten CD11cDTRxMHC Klasse-II^{-/-} I Wildtyp gemischten Knochenmarkchimäre wurde an HE Färbungen von Histologieschnitten des Pankreas an Hand eines Punktesystems bestimmt. Dabei bedeutet 1= kleine Infiltrate, 2= große Infiltrate, 3= viele große Infiltrate, 4= komplette Zerstörung des Pankreas. Pro Gruppe wurden 5 Tiere verwendet.

3.2 Mechanismen FoxP3⁺ CD4⁺ regulatorischer T-Zell mediierter Suppression von Dendritischen Zellen im immunologischen Steady State

3.2.1 Modelbeschreibung zur Untersuchung der Mechanismen FoxP3⁺ CD4⁺ T-Zell mediierter Suppression von Dendritischen Zellen *in vivo*

Dendritische Zellen im immunologischen Steady State müssen direkt mit suppressiven CD4⁺ T-Zellen interagieren, um periphere Toleranz in naïven CD8⁺ T-Zellen zu induzieren. Können regulatorische T-Zellen Dendritische Zellen nicht über MHCII-T-Zell-Rezeptor Interaktion erkennen, zeigen Dendritische Zellen einen aktivierten Phänotyp (Abb. 6) und lösen eine funktionale Effektor CTL-Antwort aus (Abb. 4). Die molekularen Mechanismen mit denen regulatorische T-Zellen und Dendritische Zellen interagieren, um periphere Toleranz zu induzieren, sind indes nicht vollständig geklärt. Für die Funktion Treg mediierter Suppression wurden bisher eine Reihe von Molekülen, darunter die Cytokine IL-10, TGF β , IL-35 und Perforin, der sekundäre Botenstoff cAMP, die Zelloberflächen Moleküle CTLA-4, LAG3, CD39 und Neuropilin-1 sowie das Adhensionsmolekül LFA-1 identifiziert (reviewed in (Sakaguchi, Yamaguchi et al. 2008; Shevach 2009)). Um zu untersuchen, welche Mechanismen bei der regulatorischen T-Zell medierten Suppression von Dendritischen Zellen im immunologischen Steady State *in vivo* entscheidend sind, wurde ein Model entwickelt, welches erlaubt, die Funktion von regulatorischen T-Zellen defizient für einzelne dieser Moleküle zu analysieren. Dazu wurden gemischte Knochenmarkchimäre generiert. Zur induzierbaren Expression von Antigen erhielten die gemischten Chimäre zu 70% Knochenmark aus Rag1^{-/-}-DIETER Mäusen, welche weder konventionelle noch regulatorischen T-Zellen entwickeln. Neben dem Rag1^{-/-}-DIETER Knochenmark wurden die Mäuse zu 15% aus Knochenmark von Treg depletierbaren FoxP3.LuciDTR-5 Mäusen (Suffner, Hochweller et al. 2010) und zu 15% aus Knochenmark von unterschiedlichen Knockout Mäusen (LFA1^{-/-}, IL-10^{-/-} und CKO Mäusen) generiert (Abb. 10). Der Vorteil dieser gemischten Knochenmarkchimäre ist, dass die Hälfte aller T-Zellen Wildtyp sind und sich daher keine spontane Autoimmunität in den Chimären entwickelt. Nach Injektion von Diphtherie Toxin wird der Anteil Wildtyp regulatorischer T-Zellen depletiert. Übrig bleiben regulatorische T-Zellen des jeweiligen Knockouts, sodass der Einfluss der unterschiedlichen Moleküle selektiv auf die Treg medierte Suppression Dendritischer Zellen untersucht werden kann (Abb. 10). Gleichzeitig exprimieren Wildtyp Zellen den Marker CD45.1, sodass

zwischen Knockout Zellen und Wildtyp Zellen unterschieden werden kann und intrinsische Effekte des Knockouts auf konventionelle T-Zellen ausgeschlossen werden können. Als Rezipienten wurden Rag1^{-/-} Mäuse verwendet, sodass keine strahlungsresistenten suppressiven T-Zellen die Ergebnisse beeinträchtigen konnten. Da Rag1^{-/-} Mäuse nach Bestrahlung und Rekonstitution mit Knochenmark Autoimmunität entwickeln, wurde den Mäusen neben dem Knochenmark regulatorische T-Zellen aus FoxP3-LuciDTR-5 Mäusen transferiert (Benard, Ceredig et al. 2006). Dieses Model System erlaubt die Analyse unterschiedlicher Mechanismen Treg medierter Suppression Dendritischer Zellen *in vivo* im ungestörten immunologischen Steady State.

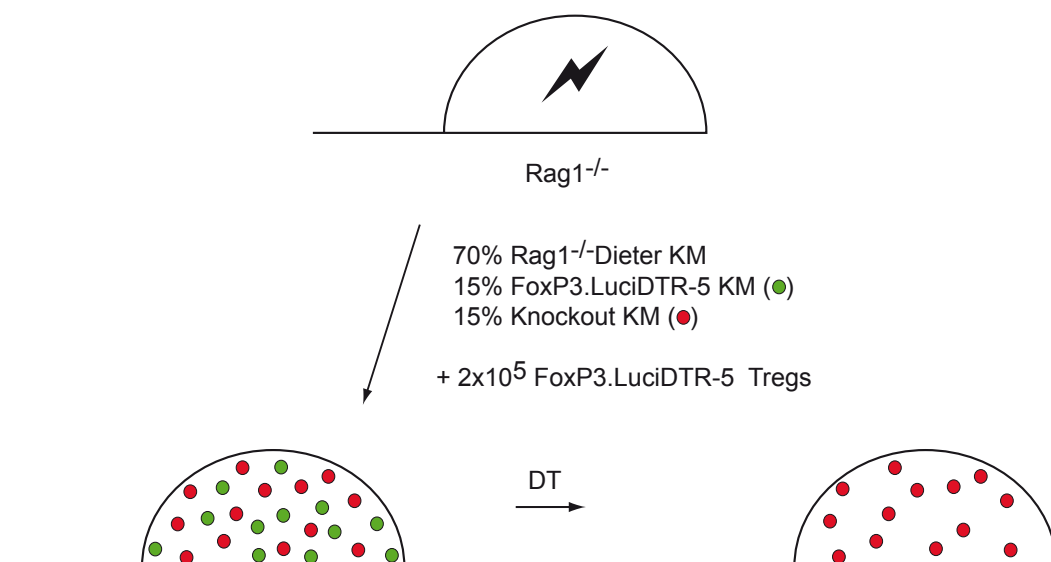


Abbildung 10. Modellsystem zur Untersuchung der Mechanismen Treg medierter Suppression *in vivo*.

Rag1^{-/-} Mäuse wurden mit 9,5 Gy letal bestrahlt und mit 70% Rag1^{-/-}-Dieter, 15% FoxP3.LuciDTR-5 und 15% Knockout Knochenmark rekonstituiert. Zusätzlich wurde den Rezipienten je 2x10⁵ FoxP3.LuciDTR-5 regulatorische T-Zellen transferiert. Regulatorische T-Zellen in den gemischten Chimären entwickeln sich zur einen Hälfte aus FoxP3.LuciDTR-5 (grüne Punkte) und zur anderen Hälfte aus Knockout Knochenmark (rote Punkte). Durch die Injektion von Diphtherie Toxin in die gemischten Chimäre werden die FoxP3.LuciDTR-5 regulatorischen T-Zellen depletiert, sodass nur regulatorische T-Zellen des Knockouts übrig bleiben.

3.2.2 FoxP3⁺ regulatorische T-Zellen sind die suppressive CD4⁺ T-Zell Population, welche die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen im immunologischen Steady State supprimiert

In DEREExDIETER doppel transgenen Mäusen, in denen neben Induktion der Antigenpräsentation transgen kodierter CTL-Epitope auf Dendritischen Zellen regulatorische T-Zellen durch die Injektion von Diphtherie Toxin depletiert werden können, ist die periphere Toleranz Induktion in Abwesenheit regulatorischer T-Zellen beeinträchtigt. So lösen DCs nach Depletion regulatorischer T-Zellen eine funktionale CTL-Antwort aus, anstatt periphere zytotoxische T-Zellen zu tolerieren (Schildknecht et al). Dabei ist das CTL Priming im Vergleich zu DIETER Mäusen, in denen alle CD4⁺ T-Zellen depletiert wurden (Abb. 2), deutlich schwächer. Daher stellte sich die Frage, ob neben CD4⁺ FoxP3⁺ T-Zellen weitere suppressive CD4⁺ T-Zellen an der Suppression Dendritischer Zellen im immunologischen Steady State beteiligt sind. Im Gegensatz zum CD4 depletierenden Antikörper ist die Depletion FoxP3⁺ Zellen in dem DEREEx Maus Model vergleichsweise ineffizient. Etwa 10% FoxP3⁺ Zellen können durch die Injektion von Diphtherie Toxin nicht depletiert werden (Lahl, Loddenkemper et al. 2007). FoxP3.LuciDTR-5 transgene Mäuse erlauben hingegen eine effizientere Depletion FoxP3⁺ T-Zellen als DEREEx Mäuse, so werden durch die Injektion von Diphtherie Toxin in FoxP3.LuciDTR-5 transgene Mäuse >95% FoxP3⁺ T-Zellen depletiert (Suffner, Hochweller et al. 2010). Daher wurden zunächst gemischte Knochenmarkchimäre aus 70% Rag1^{-/-}-DIETER und 30% FoxP3.LuciDTR-5 Mäusen generiert. Durch die Injektion von Tamoxifen in Rag1^{-/-}-DIETER I FoxP3.Luci-DTR5 gemischte Chimäre wird die Antigenpräsentation der transgen kodierten CTL-Epitope GP33-41, NP396-407 und β Gal497-505 induziert. Gleichzeitig entwickeln sich alle regulatorischen T-Zellen in diesen Chimären ausschließlich aus FoxP3.LuciDTR-5 Knochenmark, da Rag1^{-/-}-DIETER Mäuse keine T-Zellen bilden. Folglich lassen sich >95% FoxP3⁺ T-Zellen in Rag1^{-/-}-DIETER I FoxP3.LuciDTR-5 gemischten Chimären durch Injektion von Diphtherie Toxin depletieren. Regulatorische T-Zellen in rekonstituierten Rag1^{-/-}-DIETER I FoxP3.LuciDTR-5 gemischten Chimären wurden an Tag -1, Tag 0, Tag 1 und an Tag 3 durch die Injektion von Diphtherie Toxin depletiert. Die Population an CD4⁺ FoxP3⁺ T-Zellen war 2 Tage nach der ersten Diphtherie Toxin Injektion fast vollständig depletiert. Die Depletion regulatorischer T-Zellen erfolgte dabei nur transient. 8 Tage nach der ersten Diphtherie Toxin Injektion war die Population an CD4⁺ FoxP3⁺ T-Zellen fast vollständig rekonstituiert (Abb. 11A). Um zu bestätigen, dass regulatorische T-Zellen die suppressive CD4⁺ T-Zell Population ist, welche die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen im immunologischen Steady

State supprimiert, wurde die Antigenpräsentation in Treg depletierten Rag1^{-/-}-DIETER I FoxP3.LuciDTR-5 gemischten Chimären an Tag 0 durch die Injektion von Tamoxifen induziert. Tamoxifen Injektion in undepletierte Rag1^{-/-}-DIETER I FoxP3.LuciDTR-5 gemischte Chimäre führte zu keiner Expansion GP33-41 und β Gal497-505 spezifischer zytotoxischer T-Zellen (Abb. 11B+C). In Treg depletierten Rag1^{-/-}-DIETER I FoxP3.LuciDTR-5 Chimären expandierten spezifische CTLs hingegen massiv (Abb. 11B+C). Dabei war die Antwort nach Treg Depletion mit der Antwort in Chimären, in welchen alle suppressiven CD4⁺ T-Zellen depletiert wurden, vergleichbar (Abb. 11B+C). Die Suppression Dendritischer Zellen im immunologischen Steady State wird folglich von CD4⁺ FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen mediiert.

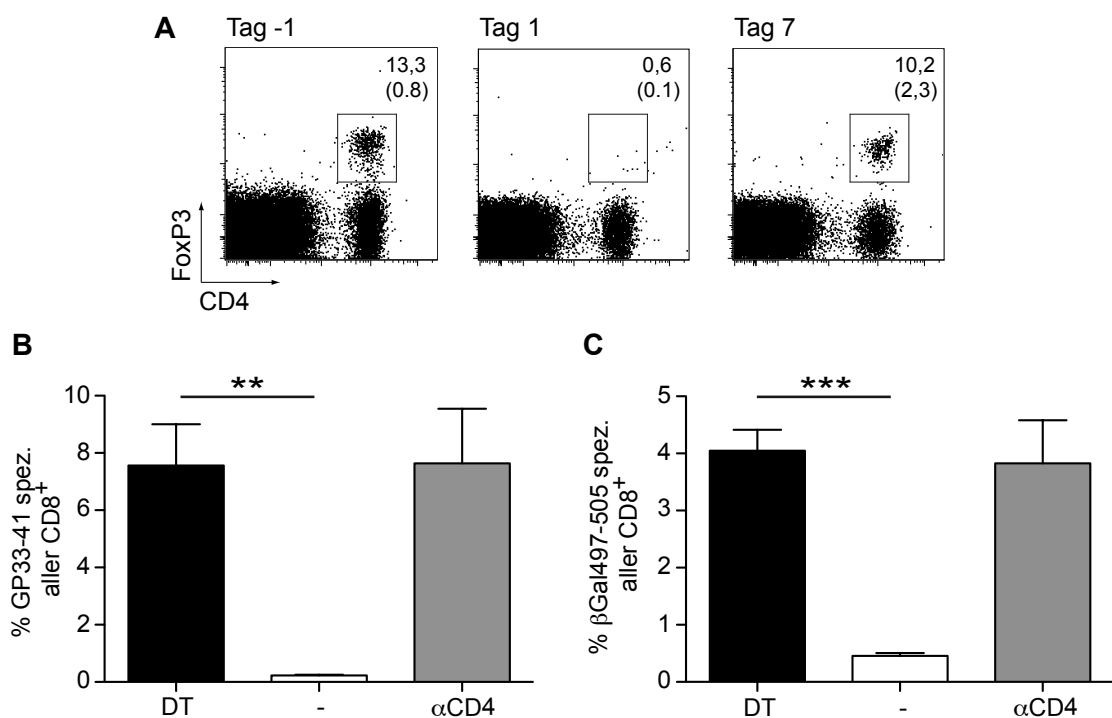


Abbildung 11. Dendritische Zellen im immunologischen Steady State lösen eine funktionale zytotoxische T-Zell Antwort nach Depletion von regulatorischen T-Zellen in Rag1^{-/-}-DIETER I FoxP3.LuciDTR-5 gemischten Knochenmarkchimären aus.

Es wurden gemischte Knochenmarkchimäre aus Rag1^{-/-}-DIETER und FoxP3.LuciDTR-5 Knochenmarkszellen in Rag1^{-/-} Mäusen generiert. An Tag 0 wurde die Antigenpräsentation auf Dendritischen Zellen durch die Injektion von 2 mg Tamoxifen *i.p.* induziert. 6 der Mäuse wurde an Tag -1, Tag 0, Tag 1 und Tag 3 je 30 ng Diphtherie Toxin/ g Maus *i.p.* injiziert. 3 der Mäuse wurde an Tag -1 0,5 mg GK1.5 *i.v.* appliziert. **(A)** An Tag -1, Tag 1 und Tag 7 wurde im Blut DT behandelter Mäuse die Frequenz an CD4⁺ FoxP3⁺ T-Zellen aller CD4⁺ Zellen bestimmt. **(B+C)** Die Expansion GP33-41 **(B)** und β Gal497-505 **(C)** spezifischer CD8⁺ T-Zellen wurde 7 Tage nach Tamoxifen Applikation im Blut mit MHC Klasse I Tetramer detektiert.

3.2.3 Einfluss von CTLA-4 auf die Treg medierte Suppression von Dendritischen Zellen im immunologischen Steady State

CTLA-4 defiziente Mäuse entwickeln eine systemische Autoimmunität und sterben etwa 3-4 Wochen nach der Geburt (Tivol, Borriello et al. 1995; Waterhouse, Penninger et al. 1995). Es gibt bereits *in vitro* und *in vivo* Hinweise darauf, dass die Expression von CTLA-4 auf regulatorischen T-Zellen für die Treg medierte Suppression von Dendritischen Zellen entscheidend ist. Mäuse, in denen ausschließlich regulatorische T-Zellen CTLA-4 defizient sind, entwickeln ebenso wie CTLA-4 Knockout Mäuse spontan systemische Proliferation der Lymphozyten und T-Zell medierte Autoimmunität und zeigen gleichzeitig eine erhöhte Expression von CD80 und CD86 auf Dendritischen Zellen (Wing, Onishi et al. 2008). Des Weiteren verdeutlichen Experimente in DIETER Mäusen die wichtige Funktion von CTLA-4 in der peripheren Toleranz Induktion. DIETER Mäuse, in denen CTLA-4 mit einem Antikörper blockiert wurde, aktivierten zytotoxische T-Zellen anstatt periphere Toleranz zu induzieren (Schildknecht, Brauer et al. 2010). Durch die bereits bekannte supprimierende Funktion von CTLA-4 Expression auf regulatorischen T-Zellen eignete sich das Molekül zur Überprüfung unseres Modellsystems. Daher wurden zunächst gemischte Knochenmarkchimäre aus 70% Rag1^{-/-}-DIETER, 15% FoxP3.LuciDTR-5 und 15% CKO Knochenmarkszellen generiert. Durch die Verwendung von CKO Knochenmark, in denen ausschließlich regulatorische T-Zellen CTLA-4 defizient sind, anstatt von Knochenmark aus CTLA KO Mäusen, in welchen alle Zellen CTLA-4 defizient sind, wurden gleichzeitig zell-intrinsische Effekte von CTLA-4 auf die Proliferation zytotoxischer T-Zellen, ausgeschlossen. In Rag1^{-/-}-DIETER I FoxP3.LuciDTR-5 I CKO gemischten Chimären konnte daher der Einfluss von CTLA-4 selektiv auf die Treg medierte Suppression von Dendritischen Zellen analysiert werden. 7 Wochen nach der Knochenmarkstransplantation wurde die Rekonstitution der regulatorischen T-Zellen im Blut an Hand der Marker CD45.1 (Wildtyp) und CD45.2 (CTLA-4 Knockout) überprüft. Die Antigenpräsentation in rekonstituierten Mäusen wurde durch die Injektion von Tamoxifen induziert. Es wurde keine Expansion GP33-41 und β Gal497-505 spezifischer zytotoxischer T-Zellen nach Tamoxifen Applikation detektiert. In Mäusen, in denen nach Depletion der Wildtyp regulatorischen T-Zellen nur CTLA-4 defiziente regulatorische T-Zellen supprimieren konnten, expandierten spezifische CD8⁺ T-Zellen hingegen. Erwartungsgemäß proliferierten spezifische CD8⁺ T-Zellen in Mäusen, in denen alle CD4⁺ T-Zellen depletiert wurden (Abb. 12). Dieses Experiment bestätigt die wichtige Rolle von CTLA-4 in der Treg medierten Suppression von Dendritischen Zellen. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass sich unser Modellsystem zur Analyse

der Mechanismen regulatorischer T-Zell mediierter Suppression von Dendritischen Zellen eignet.

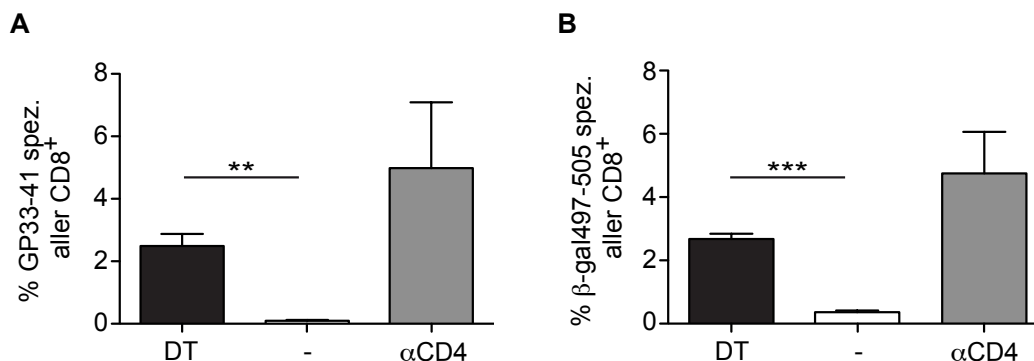


Abbildung 12. Treg medierte Suppression von Dendritischen Zellen ist CTLA-4 abhängig.

Es wurden gemischte Knochenmarkchimäre aus 70% Rag1^{-/-}DIETER, 15% FoxP3.LuciDTR-5 und 15% CKO Knochenmarkszellen in Rag1^{-/-} Mäusen wie beschrieben generiert. An Tag 0 wurde die Antigenpräsentation auf Dendritischen Zellen durch die Injektion von 2 mg Tamoxifen *i.p.* induziert. 6 der Mäuse wurde an Tag -1, Tag 0, Tag 1 und Tag 3 je 30 ng Diphtherie Toxin/ g Maus *i.p.* injiziert. 3 der Mäuse wurde an Tag -1 0,5 mg GK1.5 *i.v.* appliziert. Die Expansion GP33-41 (A) und β Gal497-505 (B) spezifischer CD8⁺ T-Zellen wurde 7 Tage nach Tamoxifen Applikation im Blut mit MHC Klasse I Tetramer detektiert

3.2.4 Einfluss von LFA-1 auf die Treg medierte Suppression von Dendritischen Zellen im immunologischen Steady State

LFA-1 ist ein Integrin, welches aus der allen Integrinen gemeinsamen β -Kette (CD18) und einer spezifischen α -Kette (CD11a) besteht. Das Adhensionsmolekül wird neben weiteren Zellen von Lymphozyten exprimiert und bindet an ICAM-1 auf Endothelzellen und APCs. Zur vollständigen Aktivierung naiver T-Zellen durch Dendritische Zellen ist die Interaktion zwischen LFA-1 und ICAM-1 notwendig (Pribila, Quale et al. 2004). Die Analyse der Funktion von LFA-1 für die Treg medierte Suppression durch die Verwendung blockierender Antikörper oder LFA-1 Knockout Mäusen gestaltet sich schwierig, da dabei neben der Suppression durch regulatorische T-Zellen stets auch die Aktivierung naiver T-Zellen beeinflusst wird. Die Generierung von gemischten Knochenmarkchimären nach dem beschriebenen Modellsystem ermöglicht hingegen die Untersuchung des Einflusses von LFA-1 selektiv auf die Funktion regulatorischer T-Zellen. Es wurden daher gemischte Knochenmarkchimäre aus 70% Rag1^{-/-}DIETER, 15% FoxP3.LuciDTR-5 und 15% LFA-1 Knockout Knochenmarkszellen generiert. 7 Wochen nach Rekonstitution wurde das Verhältnis von Wildtyp und LFA-1 Knockout regulatorischen T-Zellen im Blut an Hand der Marker CD45.1 und CD45.2 überprüft. In

den rekonstituierten Mäusen wurde die Antigenpräsentation durch die Applikation von Tamoxifen induziert. In Diphtherie Toxin behandelten Mäusen, in denen nach Depletion der Wildtyp Tregs ausschließlich LFA-1 defiziente regulatorische T-Zellen supprimieren konnten, expandierten GP33-41 spezifischen zytotoxische T-Zellen massiv. Keine Expansion spezifischer T-Zellen konnte in der undepletierten negativen Kontrolle detektiert werden. In der positiv Kontrolle, in welcher alle CD4+ T-Zellen depletiert wurden, expandierten spezifische T-Zellen erwartungsgemäß (Abb. 13). Regulatorische T-Zellen müssen demnach LFA-1 exprimieren, um Dendritische Zellen im immunologischen Steady State zu supprimieren. Fehlt regulatorischen T-Zellen LFA-1, aktivieren Dendritische Zellen zytotoxische T-Zellen anstatt periphere Toleranz zu induzieren.

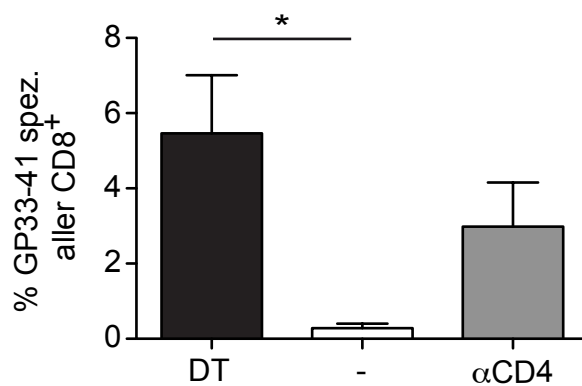


Abbildung 13. Treg medierte Suppression von Dendritischen Zellen ist LFA-1 abhängig.

Es wurden gemischte Knochenmarkchimäre aus 70% Rag1^{-/-}DIETER, 15% FoxP3.LuciDTR-5 und 15% LFA-1^{-/-} Knochenmarkszellen in Rag1^{-/-} Mäusen wie beschrieben generiert. An Tag 0 wurde die Antigenpräsentation auf Dendritischen Zellen durch die Injektion von 2 mg Tamoxifen i.p. induziert. 6 Mäusen wurde an Tag -1, Tag 0, Tag 1 und Tag 3 je 30 ng Diphtherie Toxin/ g Maus i.p. injiziert. 5 Mäusen wurde an Tag -1 0,5 mg GK1.5 i.v. appliziert. Die Expansion GP33-41 spezifischer CD8⁺ T-Zellen wurde 7 Tage nach Tamoxifen Applikation im Blut mit MHC Klasse I Tetramer detektiert.

3.2.5 Einfluss von Interleukin-10 auf die Treg medierte Suppression von Dendritischen Zellen im immunologischen Steady State

Das inhibitorische Cytokin Interleukin-10 zählt neben TGF β und IL-35 zu den humoralen Mediatoren, welche in der Treg medierten Suppression eine wichtige Rolle spielen. Während IL-10 *in vitro* keinen Einfluss auf die Treg medierte Suppression der CD4⁺ T-Zell Proliferation nimmt (Takahashi, Kuniyasu et al. 1998; Thornton and Shevach 1998), verdeutlichen Experimente *in vivo* eine bedeutende Funktion von IL-10 produzierender regulatorischer T-Zellen an den mukosalen Oberflächen von Darm und Lunge (Asseman, Mauze et al. 1999; Rubtsov, Rasmussen et al. 2008). Im Gegensatz dazu geben Experimente in DIETER Mäusen keinen Hinweis auf eine Relevanz von IL-10 in der Treg medierten Suppression von Toleranz induzierenden DCs. So löst die Induktion der Antigenpräsentation in DIETER Mäusen bei gleichzeitiger Blockade des IL-10 Rezeptors keine funktionale CTL-Antwort aus (Schildknecht, Brauer et al. 2010). Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Blockierung des IL-10 Rezeptors mit monoklonalen Antikörpern unvollständig war. Um den selektiven Einfluss von Treg produzierten IL-10 auf die Suppression von Dendritischen Zellen zu untersuchen, wurden daher gemischte Knochenmarkchimäre aus 70% Rag1^{-/-}-DIETER, 15% FoxP3.LuciDTR-5 und 15% IL-10^{-/-} Knochenmarkszellen nach dem beschriebenen Modellsystem (Abb. 9) generiert. Diphtherie Toxin Injektion in die gemischten Chimäre depletiert alle WT regulatorischen T-Zellen, sodass ausschließlich IL-10 defiziente regulatorische T-Zellen ihre supprimierende Funktion ausüben können. 7 Wochen nach Rekonstitution von Rag^{-/-}-DIETER | FoxP3.LuciDTR-5 | IL-10^{-/-} gemischten Chimären wurde das Verhältnis von IL-10 kompetenten und defizienten regulatorischen T-Zellen im Blut der Tiere an Hand der CD45.1 (WT) und CD45.2 (IL-10^{-/-}) Expression überprüft. In rekonstituierten Mäusen wurde die Antigenpräsentation der transgen kodierten CTL-Epitope durch die Injektion von Tamoxifen induziert. In einigen der Tiere wurden zusätzlich die WT regulatorischen T-Zellen durch die Injektion von Diphtherie Toxin depletiert. Eine weitere Gruppe von Mäusen wurde mit monoklonalem α CD4 Antikörper injiziert, um alle regulatorischen T-Zellen zu depletieren. 8 Tage nach der Induktion der Antigenpräsentation wurde die Population an GP33-41 und β Gal497-505 spezifischer zytotoxischer T-Zellen im Blut der Tiere bestimmt. In undepletierten Mäusen wurde keine Expansion spezifischer CTLs detektiert, während in Mäusen, in denen alle regulatorischen T-Zellen depletiert wurden, GP33-41 und β Gal497-505 spezifische CD8⁺ T-Zellen massiv expandierten. Hingegen war die Expansion spezifischer CTLs in DT behandelten Mäusen, in welchen die Suppression ausschließlich von IL-10 defizienten regulatorischen T-Zellen mediert

wurde, mit der in undepletierten Mäusen vergleichbar (Abb. 14A+B). Die Suppression Dendritischer Zellen im immunologischen Steady State durch regulatorische T-Zellen erfolgt folglich unabhängig von IL-10.

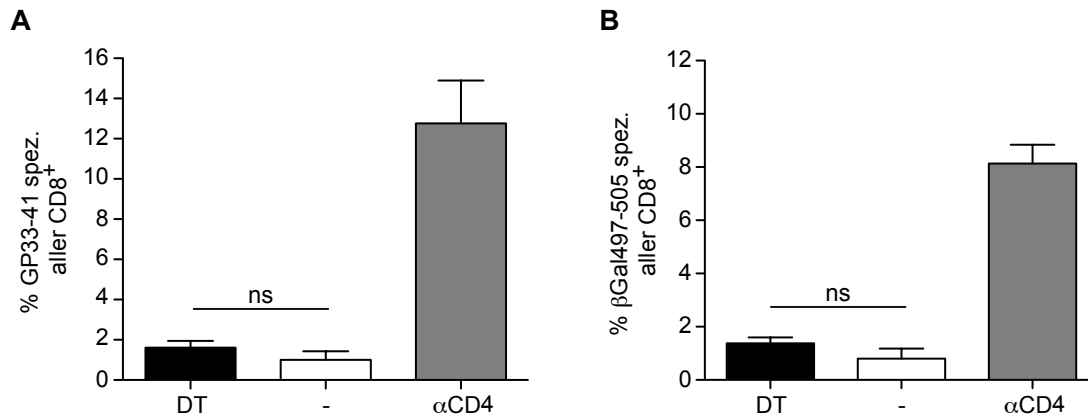


Abbildung 14. Die Treg mediierte Suppression von Dendritischen Zellen ist unabhängig von IL-10.

Es wurden gemischte Knochenmarkchimäre aus 70% Rag1^{-/-}DIETER, 15% FoxP3.LuciDTR-5 und 15% IL-10^{-/-} Knochenmarkszellen in Rag1^{-/-} Mäusen wie beschrieben generiert. An Tag 0 wurde die Antigenpräsentation auf Dendritischen Zellen durch die Injektion von 2 mg Tamoxifen *i.p.* induziert. 6 Mäusen wurde an Tag -1, Tag 0, Tag 1 und Tag 3 zusätzlich je 30 ng Diphtherie Toxin/ g Maus *i.p.* injiziert. 5 weitere Mäuse wurden an Tag -1 zusätzlich 0,5 mg GK1.5 *i.v.* appliziert. Die Expansion GP33-41 (A) und βGal497-505 spezifischer CD8⁺ T-Zellen (B) wurde 8 Tage nach Tamoxifen Applikation im Blut der Tiere mit MHC Klasse I Tetramer detektiert.

3.3 Zelltypen und Mechanismen, welche Dendritische Zellen im immunologischen Steady State in der Abwesenheit von suppressiven CD4⁺ T-Zellen aktivieren

Dendritische Zellen im immunologischen Steady State induzieren periphere Toleranz (Probst, Lagnel et al. 2003). In der Abwesenheit von regulatorischen CD4⁺ T-Zellen hingegen zeigen Dendritische Zellen einen aktivierten Phänotyp und lösen eine funktionale CTL-Antwort aus anstatt zytotoxische T-Zellen zu tolerieren (Schildknecht, Brauer et al. 2010; Muth, Schütze et al. 2012). Dendritische Zellen exprimieren eine Reihe von Pathogen-Erkennungs-Rezeptoren (PRR) und können dadurch viele verschiedene Pathogene direkt erkennen und aktiviert werden. Neben diesem direkten Aktivierungsprozess können Dendritische Zellen auch indirekt durch Signale von anderen Zellen, wie Interferone, inflammatorische Cytokine oder über Zellkontakt-abhängige Signale aktiviert werden. Inwieweit die unterschiedlichen Aktivierungs-Mechanismen und Signalmoleküle bei der Aktivierung Dendritischer Zellen im immunologischen Steady State entscheidend sind, ist nicht bekannt. Um zu untersuchen, welche Zelltypen, Signalwege und Moleküle auf die Aktivierung von Dendritischen Zellen im immunologischen Steady State in Abwesenheit regulatorischer T-Zellen Einfluss nehmen, wurde das DIETER Mausmodell in Kombination mit unterschiedlichen Knockout Mäusen verwendet, welche spezifische Defekte für einzelne Signalwege aufwiesen.

3.3.1 Die Rolle von Typ I Interferonen auf die funktionelle Aktivierung von Dendritischen Zellen im immunologischen Steady State in Abwesenheit von suppressiven CD4⁺ T-Zellen

3.3.1.1 Modellsystem

Um den Einfluss von Typ I Interferonen auf das CTL Priming und die Aktivierung von Dendritischen Zellen in Abwesenheit von suppressiven CD4⁺ Zellen im immunologischen Steady State zu analysieren, wurden DIETER Mäuse zunächst auf Typ I IFN Rezeptor Knockout Mäuse gekreuzt. Die Injektion von Tamoxifen in IFNR^{-/-} DIETER Mäuse induziert die Expression der LCMV CTL-Epitope GP33-41 und NP396, sowie des CTL-Epitops der β -Galaktosidase β Gal497 auf Dendritischen Zellen. Gleichzeitig ist der Type I IFN Signalweg blockiert, da den Zellen der Rezeptor für Typ

I IFN fehlt. Der Typ I IFN Rezeptor wird nicht nur von Dendritischen Zellen exprimiert, sondern von allen Zellen. Typ I IFN haben daher pleiotrope Effekte. Um den Einfluss von Typ I IFN selektiv auf Dendritische Zellen zu untersuchen, wurden gemischte Knochenmarkchimäre aus 50% IFNR^{-/-}DIETER Knochenmarkszellen und 50% WT (CD45.1) Knochenmarkszellen generiert. Die Hälfte aller Immunzellen dieser gemischten Chimäre waren somit Wildtyp Zellen und exprimierten den Typ I IFN Rezeptor. Nur Dendritische Zellen, welche nach Tamoxifen Injektion die transgen kodierten CTL-Epitope exprimierten, waren ausschließlich Typ I IFN Rezeptor defizient. Mit diesen IFNR^{-/-}DIETER | WT gemischten Knochenmarkchimären ließ sich der Einfluss von Typ I IFN selektiv auf die antigenpräsentierenden Dendritischen Zellen untersuchen.

3.3.1.2 Normale Entwicklung und Antigenpräsentation von Typ I IFN Rezeptor defizienten Dendritischen Zellen in IFNR^{-/-}DIETER | WT gemischten Knochenmarkchimären

In IFNR^{-/-}DIETER | WT gemischten Knochenmarkchimären war die Entwicklung der CD11b⁺ und CD8⁺ Subpopulationen Dendritischer Zellen durch den IFNR Knockout nicht beeinträchtigt. So entstanden CD8⁺ und CD11b⁺ Dendritische Zellen aus der Milz jeweils im gleichen Verhältnis aus IFNR^{-/-} und aus WT Knochenmarkszellen (Abb. 15A). Die T-Zell und B-Zell Populationen aus dem Blut IFNR^{-/-}DIETER | WT gemischter Knochenmarkchimäre reflektierten das Verhältnis an IFNR defizienten und WT DCs (nicht gezeigt), sodass die Rekonstitution der Chimäre stets an Hand der Verteilung der T-Zell Populationen im Blut der Tiere überprüft wurde. Um auszuschließen, dass die Antigenpräsentation in Typ I IFNR defizienten Dendritischen Zellen beeinträchtigt ist, wurde die Expression des LCMV CTL-Epitops GP33-41 in IFNR^{-/-}DIETER mit der in WT DIETER Mäusen verglichen. Dazu wurde die Antigenpräsentation in IFNR^{-/-}DIETER Mäusen oder WT DIETER Mäusen durch die Injektion von Tamoxifen induziert. 3 Tage nach Tamoxifen Applikation wurden DCs aus der Milz der Mäuse isoliert und mit CD8⁺ T-Zellen aus Nur77eGFPxTCR327 Mäusen inkubiert. Diese CD8⁺ T-Zellen sind spezifisch für das LCMV Epitop GP33 und exprimieren nach T-Zell Rezeptor Stimulation GFP. Der Anteil GFP⁺ CD8⁺ T-Zellen nach Inkubation mit Dendritischen Zellen aus IFNR^{-/-}DIETER oder DIETER Mäusen gab somit Aufschluss über Frequenz des präsentierten Antigens nach Tamoxifen Injektion. Sowohl die Anzahl der Antigenpräsentierenden Dendritischen Zellen als auch die Menge des präsentierten Antigens war zwischen WT DIETER und IFNR^{-/-}DIETER Mäusen identisch (Abb. 15B). Die Inkubation CD8⁺ Nur77eGFP⁺ TCR327⁺ T-Zellen mit DCs aus WT Mäusen, welche mit unterschiedlichen Konzentrationen an GP33

Peptid beladen wurden, verdeutlicht die Abhängigkeit der Frequenz GFP+ CD8+ T-Zellen von der verwendeten Peptidkonzentration sowie der Anzahl antigenpräsentierender DCs (Abb. 15C).

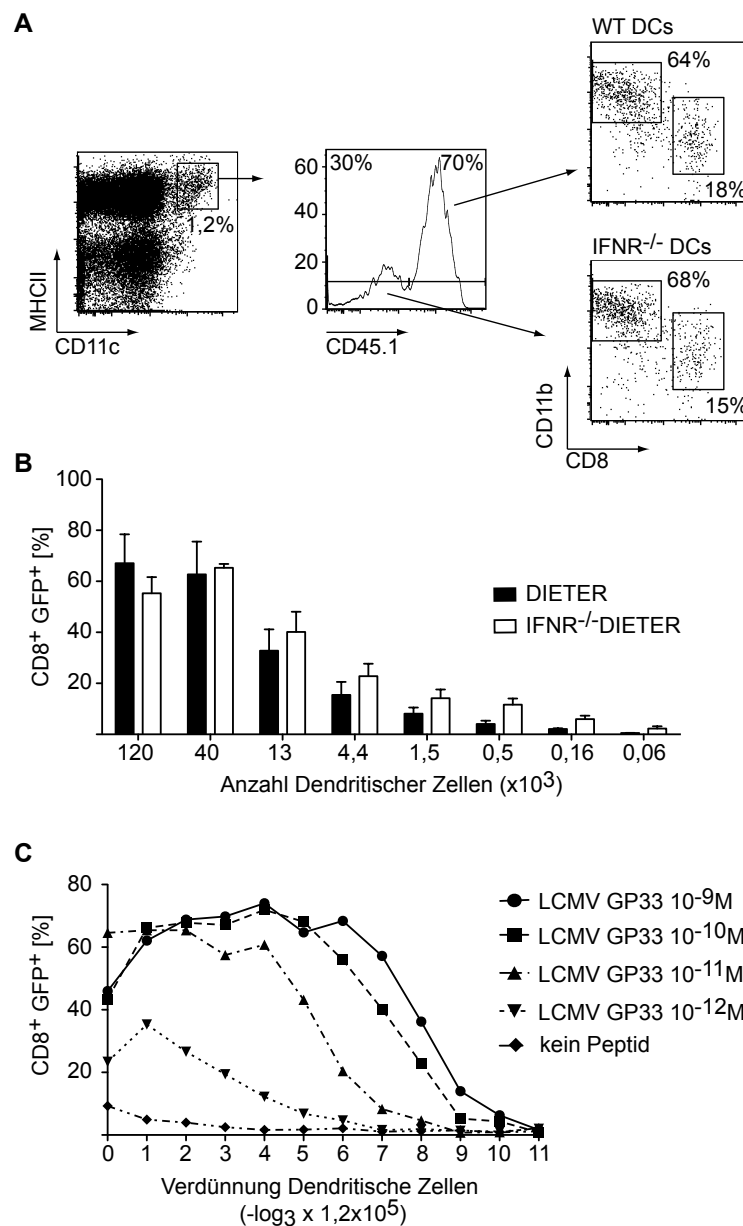


Abbildung 15. Typ I IFNR defiziente DCs aus IFNR^{-/-}DIETER I WT Chimären präsentieren vergleichbare Mengen an Antigen wie DCs aus DIETER I WT gemischten Chimären.

(A) Es wurden IFNR^{-/-}DIETER I WT gemischte Knochenmarkchimäre generiert und 6 Wochen nach Rekonstitution Dendritische Zellen (CD11c+, MHCII+) aus der Milz im FACS analysiert. Der Anteil CD11b+ und CD8+ Dendritischer Zellen von WT (CD45.1+) und IFNR^{-/-} (CD45.1-) DCs wurde bestimmt. (B) Die Antigenpräsentation von je 3 IFNR^{-/-}DIETER I WT gemischten Chimären (weiße Balken) und DIETER I WT gemischten Chimären (schwarze Balken) wurde durch die Injektion von 2 mg Tamoxifen *i.p.* induziert. 3 Tage später wurden die DCs aus den Milzen der Tiere für 16 Stunden mit 5x 10³ aufgereinigten CD8+ T-Zellen aus Nur77eGFPxTCR327 inkubiert. Der Anteil an CD8+GFP+ T-Zellen wurde im FACS bestimmt. (C) DCs aus der Milzen naiver C57BL/6 Mäusen wurde für eine Stunde mit dem LCMV Peptid GP33-41 inkubiert und für 16 Stunden mit 5x 10³ aufgereinigten CD8+ T-Zellen aus Nur77eGFPxTCR327 inkubiert. Der Anteil an CD8+GFP+ T-Zellen wurde im Durchflusszytometer bestimmt. 1 Experiment von 3 Experimenten ist gezeigt.

3.3.1.3 Typ I IFN Rezeptor defiziente Dendritische Zellen aktivieren CTLs in Abwesenheit von suppressiven CD4+ T-Zellen schwächer als WT DCs

Nach Depletion suppressiver CD4+ T-Zellen lösen Dendritische Zellen im immunologischen Steady State eine funktionale CTL-Antwort aus (Abb.2). Um zu untersuchen, ob Typ I Interferone Dendritische Zellen im immunologischen Steady State in Abwesenheit von suppressiven CD4+ T-Zellen aktivieren, wurden IFNR^{-/-}DIETER I WT gemischte Chimäre verwendet. Als Kontroll-Tiere wurden gemischte Knochenmarkchimäre aus 50% Wildtyp DIETER und 50% C57BL/6 (CD45.1) Mäusen generiert. Die Rekonstitution der gemischten Knochenmarkchimäre wurde 6 Wochen nach der Knochenmarkstransplantation im Blut überprüft. Dazu wurde das Verhältnis der CD45.1/ CD45.2 Expression in peripheren Blutzellen bestimmt. In den rekonstituierten Mäusen wurde die Antigenpräsentation der transgen kodierten CTL-Epitope durch die Injektion von Tamoxifen induziert. In IFNR^{-/-}DIETER I WT Chimären sowie in DIETER I WT Kontrollchimären wurde 8 Tage nach Tamoxifen Applikation keine Expansion an GP33-41 spezifischen CD8+ T-Zellen in Blut und Milz der Tiere detektiert. In DIETER I WT gemischten Chimären, in denen zusätzlich suppressive CD4+ T-Zellen depletiert wurden, expandierten spezifische CTLs erwartungsgemäß. Hingegen war die Expansion GP33-41 spezifischer CTLs nach Depletion von suppressiven CD4+ T-Zellen in gemischten Knochenmarkchimären, in denen die GP33-41 exprimierenden Dendritischen Zellen Typ I IFN Rezeptor defizient waren, signifikant reduziert (Abb. 16A+B). Zur Analyse der Funktionalität der aktivierten zytotoxischen T-Zellen wurden Milzzellen 8 Tage nach Tamoxifen Injektion mit dem LCMV Peptid 33 restimuliert und die IFN γ Produktion *ex vivo* bestimmt. Jeweils etwa die Hälfte der expandierten GP33-41 spezifischen CTLs von IFNR^{-/-}DIETER I WT und DIETER I WT gemischten Chimären produzierte nach Restimulation IFN γ (Abb. 16C). Dendritische Zellen im immunologischen Steady State, welche keine Typ I Interferone erkennen, lösen in Abwesenheit von suppressiven CD4+ T-Zellen demnach eine geringere CTL-Antwort aus als Wildtyp Dendritische Zellen. Dabei sind die aktivierten zytotoxischen T-Zellen jeweils funktional. Typ I IFN medieren folglich die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen im immunologischen Steady State, was durch suppressive CD4+ T-Zellen inhibiert wird.

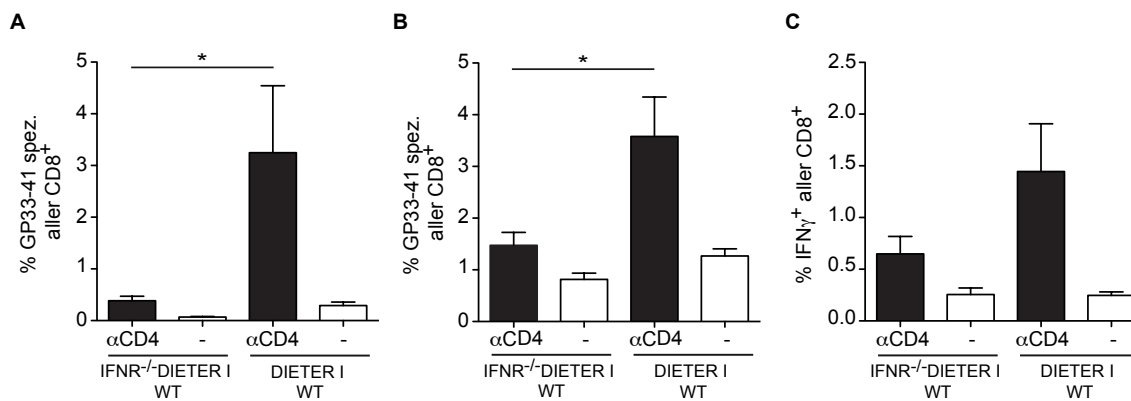


Abbildung 16. Die CTL-Antwort ist in IFNR^{-/-}DIETER I WT gemischten Chimären in Abwesenheit suppressiver CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu DIETER I WT Chimären signifikant reduziert.

Es wurden gemischte Knochenmarkchimäre aus jeweils gleicher Anzahl Knochenmarkszellen aus IFNR^{-/-}DIETER I und Wildtyp (CD45.1) oder DIETER I und Wildtyp (CD45.1) Mäusen generiert. An Tag 0 wurde die Antigenpräsentation auf Dendritischen Zellen durch die Injektion von 2 mg Tamoxifen *i.p.* (weiße Balken) induziert. Einige Mäuse wurden an Tag -1 durch die Injektion von 0,5 mg GK1.5 *i.v.* zusätzlich CD4⁺ T-Zell depletiert (schwarze Balken). Die Expansion LCMV GP33-41 spezifischer CD8⁺ T-Zellen wurde 8 Tage nach Tamoxifen Injektion im Blut (A) und Milz der Tiere (B) durch Färbung mit MHC Klasse I Tetrameren detektiert. (C) An Tag 8 nach Tamoxifen Injektion wurden Lymphozyten aus der Milz der Mäuse für 6 Stunden mit dem LCMV Peptid GP33 restimuliert und die IFN γ Produktion CD8⁺ T-Zellen bestimmt. Pro Gruppe wurden fünf Mäuse verwendet. 1 Experiment von 4 Experimenten ist gezeigt.

3.3.1.4 Typ I IFN tragen zur Aktivierung Dendritischer Zellen im immunologischen Steady State bei

Depletiert man regulatorische T-Zellen oder die gesamte CD4⁺ T-Zell Population, zeigen Dendritische Zellen im immunologischen Steady State einen aktivierten Phänotyp (Schildknecht, Brauer et al. 2010) (Abb. 3). Auch in IFNR^{-/-} I WT gemischten Chimären waren die Wildtyp DCs nach CD4⁺ T-Zell Depletion aktiviert und zeigten im Vergleich zu den undepletierten Kontrollen eine signifikant erhöhte Expression an CD80 in Milz und Lymphknoten sowie von CD86 und CD40 in Lymphknoten (Abb. 17). In Typ I IFN Rezeptor defizienten Dendritischen Zellen der gleichen gemischten Chimären wurde ebenfalls die Expression von CD80 durch die Depletion von suppressiven T-Zellen induziert. Ebenso wurde die Expression von CD40 in IFNR^{-/-} DCs aus Lymphknoten in Abwesenheit suppressiver CD4⁺ T-Zellen signifikant erhöht. Generell jedoch war das Expressionslevel der kostimulatorischen Moleküle CD86, CD40 sowie des inhibitorischen Moleküls B7H1 in IFNR defizienten Dendritischen Zellen im Vergleich zu WT Dendritischen Zellen niedriger. So war in IFNR^{-/-} Dendritischen Zellen aus der Milz die Expression von CD86, CD40 und B7H1 signifikant reduziert und wurde auch durch Depletion von CD4⁺ T-Zellen nicht induziert (Abb. 17). Das Aktivierungsniveau IFNR defizienter Dendritischer Zellen im

immunologischen Steady State ist im Vergleich zu WT Dendritischen Zellen generell tiefer. Dabei ist die Aktivierung IFNR^{-/-} Dendritischer Zellen in Abwesenheit suppressiver CD4⁺ T-Zellen zumindest für CD80 noch induzierbar. Typ I Interferone sind folglich wichtig für den Aktivierungszustand Dendritischer Zellen im immunologischen Steady State. Neben Typ I Interferonen sind jedoch weitere Signale vorhanden, deren Einfluss auf die Aktivierung Dendritischer Zellen im immunologischen Steady State durch suppressive CD4⁺ T-Zellen unterdrückt wird.

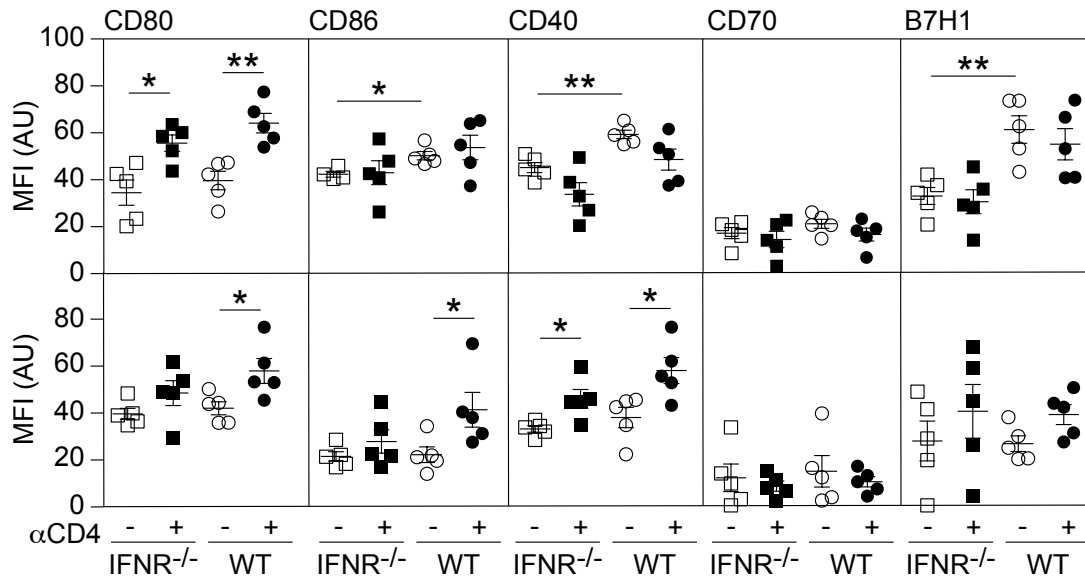


Abbildung 17. Typ I IFNR defiziente Dendritische Zellen aus IFNR^{-/-} I WT gemischten Chimären zeigen nach CD4⁺ T-Zell Depletion einen aktivierten Phänotyp

Typ I IFNR^{-/-} I Wildtyp (CD45.1) gemischten Chimären wurde 0,5 mg GK1.5 *i.v.* (schwarze Symbole) oder 0,5 mg Isotyp Kontrolle *i.v.* (weiße Symbole) injiziert. 2 Tage nach Depletion wurden Dendritische Zellen aus Milz (obere Reihe) und peripheren Lymphknoten (untere Reihe) isoliert. Die Expression von CD80, CD86, CD40, CD70 und B7-H1 wurde auf CD45.1⁺ (Wildtyp, Punkte) und CD45.1⁻ (IFNR^{-/-}, Quadrate) mittels FACS Analyse quantifiziert. Dabei wurden Dendritische Zellen als CD11c⁺, MHCII⁺ Population identifiziert. Die Median Fluoreszenz von fünf Mäusen ist gezeigt. 1 Experiment von 4 Experimenten ist gezeigt.

3.3.1.5 Suppressive CD4+ T-Zellen verhindern die Aktivierung Dendritischer Zellen durch tonische Typ I Interferone im immunologischen Steady State

Typ I Interferon Rezeptor defiziente Dendritische Zellen im immunologischen Steady State lösen nach Depletion suppressiver CD4+ T-Zellen im Vergleich zu Wildtyp Dendritischen Zellen eine signifikant reduzierte CTL-Antwort (Abb. 16). Typ I Interferone scheinen folglich wichtig für die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen in Abwesenheit von suppressiven CD4+ T-Zellen zu sein. Dabei ist unklar, ob in Abwesenheit von suppressiven CD4+ T-Zellen verstärkt Typ I Interferone produziert werden, oder ob regulatorische CD4+ T-Zellen die Aktivierung von Dendritischen Zellen gegen die im Steady State vorhandenen basalen Level an Typ I Interferonen unterdrücken. Um diese Frage zu klären, wurde untersucht, ob CD4+ T-Zell Depletion die Expression von Typ I Interferonen induziert. Dazu wurde die Menge an Typ I Interferonen in Wildtyp Mäusen vor und nach CD4+ T-Zell Depletion in $\Delta\beta$ -luc Reporter Mäuse quantifiziert. In $\Delta\beta$ -luc Reporter transgenen Mäusen ist das Gen für Typ I Interferon β durch eine Luciferase ersetzt, sodass die Expression des Typ I Interferon β Gens *in vivo* an Hand der Luciferase Aktivität visualisiert werden kann (Lienenklaus, Cornitescu et al. 2009). Naïve $\Delta\beta$ -luc Reporter Mäuse wurden CD4+ T-Zell depletiert oder erhielten einen Kontroll Antikörper des gleichen Isotypen. Anschließend wurde die Luciferase Aktivität für 4 Tage täglich bestimmt. In CD4 depletierten Mäusen konnte im Vergleich zu Kontroll Tieren keine erhöhte Expression an Luciferase detektiert werden. So war die Luciferase Aktivität in $\Delta\beta$ -luc Reporter Mäuse drei Tage vor Depletion sowie an Tag eins bis vier nach Depletion zwischen CD4 depletierten Mäusen und Kontrollen jeweils vergleichbar (Abb. 18). Die Depletion CD4+ T-Zellen induziert folglich keine Produktion an Typ I Interferon β . Dies legt nahe, dass eine gesteigerte Sensitivität Dendritischer Zellen gegenüber tonischen Typ I Interferonen in Abwesenheit suppressiver CD4+ T-Zellen für die Aktivierung Dendritischer Zellen im immunologischen Steady State nach CD4+ T-Zell Depletion verantwortlich, nicht aber eine erhöhte Produktion an Typ I Interferonen.

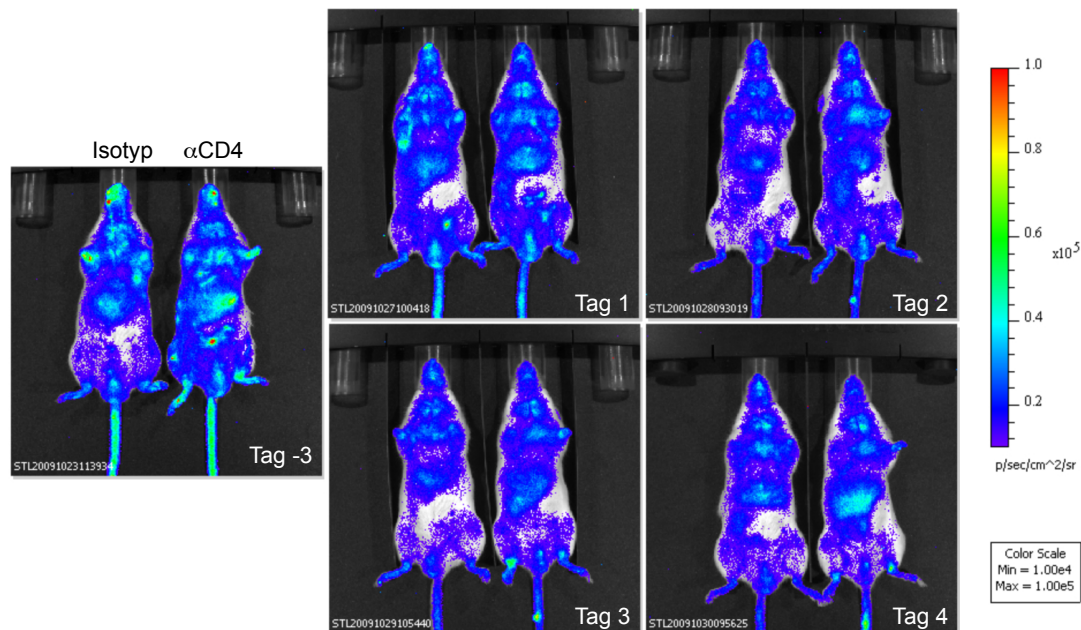


Abbildung 18. Die Expression des Typ I Interferon β Gens ist unabhängig von CD4+ T-Zell Depletion.

An Tag 0 wurde $\Delta\beta$ -luc Reporter Mäusen 0,5 mg GK1.5 *i.v.* (rechte Maus) oder 0,5 mg Isotyp Kontrolle *i.v.* (linke Maus) injiziert. An Tag -3, 1, 2, 3 und 4 wurde den Mäusen Luciferin *i.v.* injiziert und die Luciferase Aktivität in einem IVIS 200 Bildsystem visualisiert. Pro Gruppe wurden 5 Tiere in 2 unabhängigen Experimenten verwendet. Die Experimente wurden von Stefan Lienenklaus (Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig) durchgeführt.

3.3.1.6 Die Aktivierung Dendritischer Zellen durch Anti-CD40 ist abhängig von Typ I Interferonen

Antigenpräsentation auf aktivierten Dendritischen Zellen löst eine funktionale zytotoxische T-Zell Antwort aus. So expandieren in DIETER Mäusen spezifische CD8+ T-Zellen nach Induktion der Antigenpräsentation und gleichzeitiger Applikation des aktivierenden Stimulus Anti-CD40. Die expandierten Zellen sind funktional und protektieren vor einer Infektion mit LCMV (Probst, Lagnel et al. 2003). Um zu untersuchen, ob die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen, das heißt die Aktivierung Dendritischer Zellen um eine funktionale zytotoxische T-Zell Antwort auszulösen, durch Anti-CD40 abhängig von Typ I Interferonen ist, wurden IFNR^{-/-} DIETER I WT gemischte Chimäre generiert. Als Kontrollen wurden DIETER I WT gemischte Knochenmarkchimäre verwendet. Die Antigenpräsentation wurde durch Tamoxifen induziert, einige der Mäuse erhielten zusätzlich Anti-CD40. Wie zuvor in DIETER Mäusen gezeigt (Probst, Lagnel et al. 2003), expandierten in DIETER I WT Kontrollen GP33-41 spezifische zytotoxische T-Zellen nach Applikation von Tamoxifen und Anti-CD40 (Abb. 19A+B). Hingegen war die Expansion GP33 spezifischer zytotoxischer T-Zellen in IFNR^{-/-}DIETER I WT Mäusen, deren LCMV GP33

präsentierenden DCs Typ I IFN Rezeptor defizient waren, dramatisch reduziert (Abb. 19A+B). Typ I Interferone sind demnach für die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen durch Anti-CD40 zwingend erforderlich.

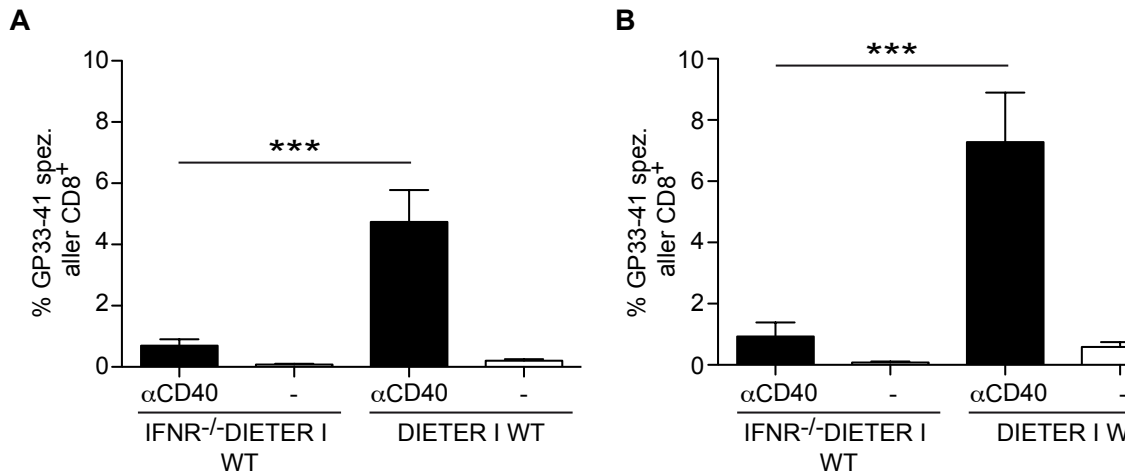


Abbildung 19. Die Aktivierung Dendritischer Zellen für eine CTL-Antwort durch Anti-CD40 ist abhängig von Typ I Interferonen.

Es wurden gemischte Knochenmarkchimäre aus jeweils gleicher Anzahl Knochenmarkszellen aus IFNR^{-/-}DIETER und Wildtyp (CD45.1) oder DIETER und Wildtyp (CD45.1) Mäusen generiert. An Tag 0 wurde die Antigenpräsentation auf Dendritischen Zellen durch die Injektion von 2 mg Tamoxifen *i.p.* induziert. Einige der Mäuse erhielten an Tag 0 durch die Injektion von 30 µg FGK45.1 *i.p.* zusätzlich den aktivierenden Stimulus Anti-CD40. Die Expansion LCMV GP33-41 spezifischer CD8⁺ T-Zellen wurde 7 Tage (A) und 8 Tage (B) nach Tamoxifen Injektion im Blut durch Färbung mit MHC Klasse I Tetrameren detektiert. Das Ergebnis zeigt 8 Tiere aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Experimente wurden dreimal wiederholt durchgeführt.

3.3.2 Die Rolle von CD40 Signalen auf die funktionelle Aktivierung von Dendritischen Zellen im immunologischen Steady State in Abwesenheit von suppressiven CD4+ T-Zellen

3.3.2.1 Modellsystem

Um zu untersuchen, welchen Einfluss CD40 Ligation auf die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen im immunologischen Steady State hat, wurden DIETER Mäuse auf CD40^{-/-} Mäuse gekreuzt. In CD40^{-/-}-DIETER Mäusen lässt sich die Expression der LCMV CTL-Epitope GP33-41 und NP396 sowie des CTL-Epitops der β -Galaktosidase β Gal497 auf Dendritischen Zellen induzieren. Gleichzeitig können antigen-präsentierende Zellen nicht durch CD40 Ligation aktiviert werden, da sie defizient für CD40 sind. Damit der Einfluss von CD40 auf die Aktivierung Antigenpräsentierender Zellen selektiv auf Dendritische Zellen untersucht werden konnte, wurden gemischte Knochenmarkchimäre aus 50% CD40^{-/-}-DIETER Knochenmarkszellen und 50% WT (CD45.1) Knochenmarkszellen generiert. Die Immunzellen der gemischten Chimäre entwickelten sich zur Hälfte aus WT Knochenmarkszellen und exprimierten somit CD40. B-Zellen, welche während ihrer Entwicklung auf CD40 Signale angewiesen sind, bildeten sich hauptsächlich aus WT Knochenmarkszellen. Dendritische Zellen hingegen, in welchen die Antigenpräsentation der transgenen CTL-Epitope GP33, NP396 und β Gal497 induzierbar war, entwickelten sich vollständig aus CD40^{-/-}-DIETER Knochenmark und waren somit ausschließlich CD40 defizient. In CD40^{-/-}-DIETER I WT gemischten Knochenmarkchimären ließ sich somit der Einfluss von CD40 Ligation selektiv auf die antigenpräsentierenden Dendritischen Zellen untersuchen.

3.3.2.2 Normale Entwicklung und Antigenpräsentation von CD40 defizienten Dendritischen Zellen in CD40^{-/-}-DIETER I WT gemischten Knochenmarkchimären

Die Entwicklung der unterschiedlichen Subpopulationen Dendritischen Zellen war in CD40^{-/-}-DIETER I WT gemischten Knochenmarkchimären nicht beeinträchtigt. 6 Wochen nach Generierung der Knochenmarkchimäre waren 20% der Dendritischen Zellen aus der Milz CD8⁺ und 65% CD11b⁺. Die CD8⁺ und CD11b⁺ Dendritischen Zellen der CD40^{-/-}-DIETER I WT Chimäre waren dabei je zur Hälfte aus WT und CD40^{-/-}-DIETER Knochenmarkszellen rekonstituiert (Abb. 20A). Ebenso rekonstituierten T-

Zellen aus Blut, Milz und Lymphknoten zu gleichen Teilen aus WT und CD40/-DIETER Knochenmarkszellen (nicht gezeigt). Auch die Antigenpräsentation in CD40 defizienten Dendritischen Zellen war durch den CD40 Knockout nicht beeinflusst. 3 Tage nach Tamoxifen Applikation präsentierten Dendritische Zellen aus CD40/-DIETER Mäuse gleiche Mengen Antigen wie WT DIETER Dendritische Zellen. So waren nach Inkubation Dendritischer Zellen aus Antigen induzierten CD40/-DIETER oder DIETER Mäusen mit Nur77eGFPxTCR327 CD8+ T-Zellen vergleichbare Frequenzen an CD8+GFP+ Zellen detektierbar (Abb. 20B).

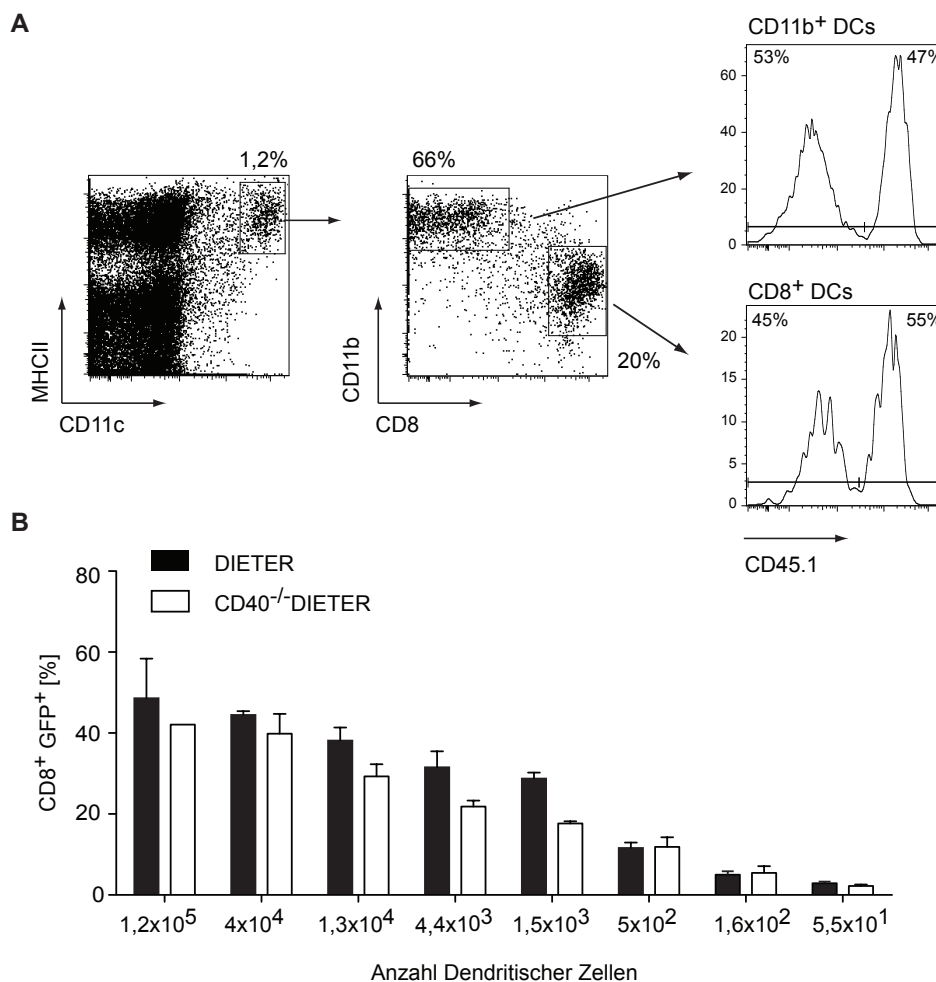


Abbildung 20. CD40 defiziente DCs entwickeln sich in CD40/-DIETER I WT gemischten Chimären zu gleichen Teilen wie WT DCs und präsentieren vergleichbare Mengen an Antigen

(A) Es wurden CD40/-DIETER I WT gemischte Knochenmarkchimäre generiert. 6 Wochen nach Rekonstitution wurden DCs aus der Milz isoliert und im Durchflusszytometer analysiert. Dabei wurde die Population Dendritischer Zellen an Hand CD11c und MHCII Expression identifiziert. Der Anteil CD11b+ und CD8+ Dendritischer Zellen, sowie das Verhältnis an WT (CD45.1+) und CD40/- (CD45.1-) Dendritischen Zellen wurde bestimmt. (B) Die Antigenpräsentation von 4 CD40/-DIETER Mäusen (weiße Balken) und 3 DIETER Mäusen (schwarze Balken) wurde durch die Injektion von 2 mg Tamoxifen *i.p.* induziert. 3 Tage später wurden die Dendritischen Zellen aus den Milzen der Tiere isoliert und für 16 Stunden mit 5×10^3 aufgereinigten CD8+ T-Zellen aus Nur77eGFPxTCR327 inkubiert. Der Anteil an CD8+GFP+ T-Zellen wurde im Durchflusszytometer bestimmt. 1 Experiment von 3 Experimenten ist gezeigt.

3.3.2.3 CD40 defiziente Dendritische Zellen lösen in Abwesenheit von suppressiven CD4⁺ T-Zellen eine stark reduzierte CTL-Antwort aus

Um zu untersuchen, ob CD40 Ligation auf die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen im immunologischen Steady State Einfluss nimmt, wurden CD40^{-/-}-DIETER I WT gemischte Knochenmarkchimäre verwendet. Als Kontrollen wurden gemischte Knochenmarkchimäre aus DIETER und WT Knochenmarkszellen generiert. 6 Wochen nach Rekonstitution wurde die Antigenpräsentation der transgenen CTL-Epitope durch Injektion von Tamoxifen induziert. Einige der Tiere wurden zusätzlich CD4⁺ T-Zell depletiert. 8 Tage nach Tamoxifen Applikation wurden GP33-41⁺ CD8⁺ T-Zellen im Blut detektiert. In DIETER I WT Kontrollen expandierten keine GP33-41 spezifischen CTLs nach Induktion der Antigenpräsentation durch Tamoxifen. Ebenso konnte auch in CD40^{-/-}-DIETER I WT gemischten Chimären keine Expansion GP33-41 spezifischer CD8⁺ T-Zellen nach Tamoxifen Injektion detektiert werden. Die Präsentation der transgenen CTL-Epitope in Abwesenheit suppressiver CD4⁺ T-Zellen führte in DIETER I WT Kontrollen zu einer massiven Expansion GP33-41 spezifischer CD8⁺ T-Zellen. Im Gegensatz dazu war die Expansion GP33-41 spezifischer CTLs in CD40^{-/-}-DIETER I WT Chimären, in welchen die antigenpräsentierenden Zellen nicht durch CD40 Ligation aktiviert werden konnten, stark reduziert (Abb. 21A). Um die Funktionalität der expandierten GP33-41 spezifischen CTLs zu untersuchen, wurde in den unterschiedlichen Mäusen die Protektion vor einer Infektion mit LCMV charakterisiert. Dazu wurden die Tiere an Tag 8 mit 200 pfu LCMV infiziert. 5 Tage nach Infektion wurde der Virus-Titer in der Milz der Tiere bestimmt. CD4⁺ T-Zell depletierte DIETER I WT Kontrollen protekierten vollständig vor einer Infektion mit LCMV. In CD40^{-/-}-DIETER I WT Chimären war die Protektion gegen LCMV hingegen beeinträchtigt (Abb. 21B). CD40 Ligation nimmt demnach entscheidend Einfluss auf die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen im immunologischen Steady State. Die CD40 medierte Aktivierung Dendritischer Zellen für ein funktionales CTL Priming im immunologischen Steady State wird dabei durch suppressive CD4⁺ T-Zellen inhibiert.

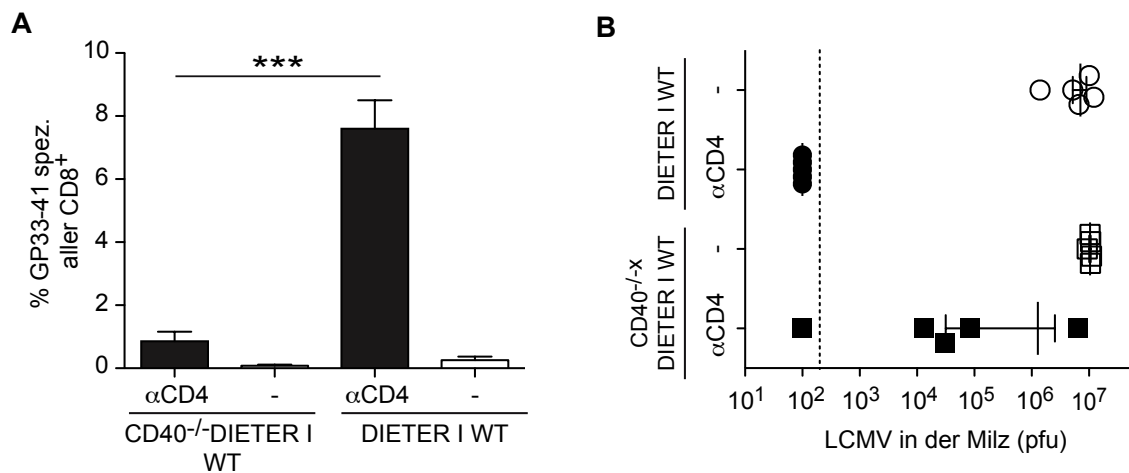


Abbildung 21. Die CTL-Antwort ist in CD40^{-/-}DIETER I WT gemischten Chimären in Abwesenheit suppressiver CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu DIETER I WT Chimären dramatisch reduziert.

Es wurden gemischte Knochenmarkchimäre aus jeweils gleicher Anzahl Knochenmarkszellen aus CD40^{-/-}DIETER und Wildtyp (CD45.1) oder DIETER und Wildtyp (CD45.1) Mäusen generiert. An Tag 0 wurde die Antigenpräsentation auf Dendritischen Zellen durch die Injektion von 2 mg Tamoxifen *i.p.* (weiße Balken) induziert. Einige Mäuse wurden an Tag -1 durch die Injektion von 0,5 mg GK1.5 *i.v.* zusätzlich CD4⁺ T-Zell depletiert (schwarze Balken). (A) An Tag 8 wurde die Expansion LCMV GP33-41 spezifischer CD8⁺ T-Zellen im Blut mit MHC Klasse I Tetramer-Färbung detektiert. (B) An Tag 8 wurden die Mäuse *i.v.* mit 200 pfu LCMV-WE infiziert und der Virus Titer 5 Tage nach Infektion in der Milz bestimmt. Es wurden 5 Mäuse pro Gruppe verwendet. 1 Experiment von 3 Experimenten ist gezeigt.

3.3.2.4 CD40 defiziente Dendritische Zellen zeigen in Abwesenheit von suppressiven CD4⁺ T-Zellen einen aktivierten Phänotyp

Die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen für eine funktionale CTL-Antwort im immunologischen Steady State ist abhängig von CD40 Ligation (Abb. 21). Um zu untersuchen, ob das reduzierte Priming zytotoxischer T-Zellen in CD4⁺ T-Zell depletierten CD40^{-/-}DIETER Mäusen auch von dem Aktivierungsniveau CD40 defizienter Dendritischer Zellen reflektiert wird, wurden CD40^{-/-} I WT gemischte Chimäre generiert. Die Hälfte der Chimäre wurde 6 Wochen nach Rekonstitution CD4⁺ T-Zell depletiert. 2 Tage nach Depletion wurden Dendritische Zellen aus Milz und Lymphknoten isoliert und der Aktivierungszustand zwischen CD40^{-/-} und WT Dendritischen Zellen verglichen. WT Dendritische Zellen waren nach CD4⁺ T-Zell Depletion aktiviert und zeigten im Vergleich zu den undepletierten Kontrollen eine signifikant erhöhte Expression an CD80 in der Milz und eine reduzierte Expression von B7H1 (Abb. 22). Auch in CD40 defizienten Dendritischen Zellen der gleichen gemischten Chimäre wurde die Expression von CD80 durch die Depletion von suppressiven T-Zellen induziert. Ebenso war die Expression von B7H1 in CD40^{-/-} DCs aus Milz und Lymphknoten in Abwesenheit suppressiver CD4⁺ T-Zellen gegenüber

undepletierten CD40^{-/-} DCs signifikant reduziert. Hingegen war das Expressionslevel von CD86 und B7H1 in CD40 defizienten Dendritischen aus Lymphknoten signifikant tiefer als das von WT Dendritischen Zellen. In Dendritischen Zellen aus der Milz konnte dies jedoch nicht beobachtet werden (Abb. 22). Abgesehen von dem niedrigeren Expressionsniveau an CD86 und B7H1 auf CD40 defizienten DCs aus Lymphknoten war der generelle Aktivierungszustand nach CD4⁺ T-Zell Depletion zwischen WT und CD40 defizienten Dendritischen Zellen vergleichbar und die Aktivierung CD40 defizienter Dendritischer Zellen in Abwesenheit suppressiver CD4⁺ T-Zellen induzierbar. Während also die funktionelle Aktivierung steady state Dendritischer Zellen in Abwesenheit suppressiver CD4⁺ T-Zellen abhängig von CD40 Ligation ist, erfolgt die Hochregulation der Aktivations-Oberflächenmarker auf Dendritischen Zellen nach CD4⁺ T-Zell Depletion unabhängig von CD40 Signalen. Die Expression der Aktivations-Oberflächenmarker auf CD40^{-/-} Dendritischer Zellen reflektiert somit nicht die funktionelle Aktivierung CD40^{-/-} Dendritischer Zellen für eine funktionale CTL-Antwort.

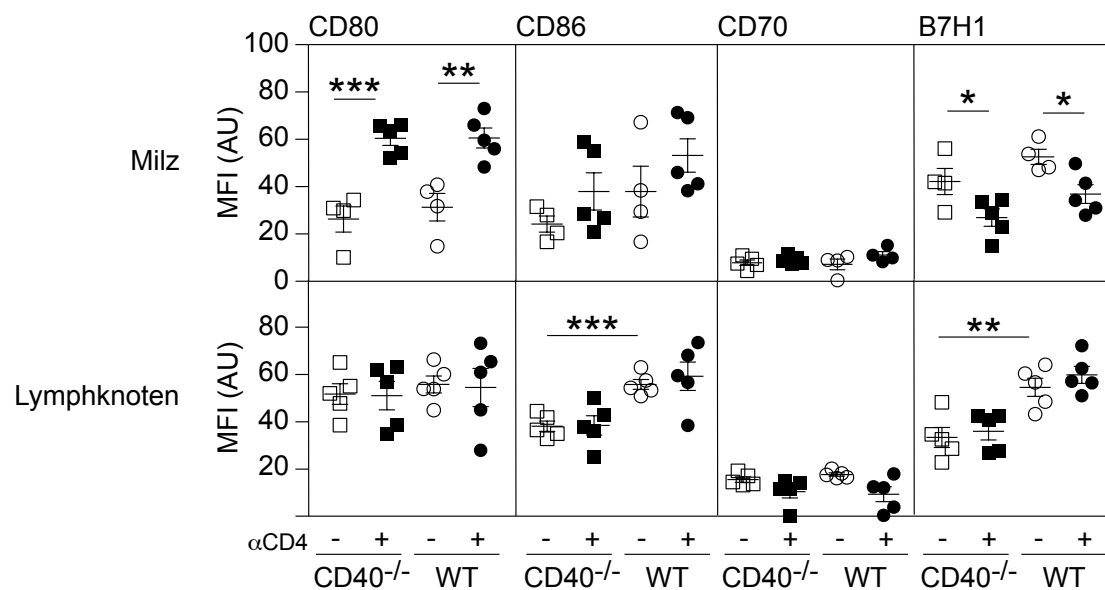


Abbildung 22. CD40 defiziente Dendritische Zellen aus CD40^{-/-} | WT gemischten Chimären zeigen nach CD4⁺ T-Zell Depletion einen aktivierten Phänotyp

CD40^{-/-} | Wildtyp (CD45.1) gemischten Chimären wurde 0,5 mg GK1.5 *i.v.* (schwarze Symbole) oder 0,5 mg Isotyp Kontrolle *i.v.* (weiße Symbole) injiziert. 2 Tage nach Depletion wurden Dendritische Zellen aus Milz (obere Reihe) und peripheren Lymphknoten (untere Reihe) isoliert. Die Expression von CD80, CD86, CD70 und B7-H1 wurde auf CD45.1⁺ (Wildtyp, Punkte) und CD45.1⁻ (CD40^{-/-}, Quadrate) mittels FACS Analyse quantifiziert. Dabei wurden Dendritische Zellen als CD11c⁺, MHCII⁺ Population identifiziert. Die Median Fluoreszenz von fünf Mäusen ist gezeigt. 1 Experiment von 4 Experimenten ist gezeigt.

3.3.2.5 Blockierung des CD70 Signalweges beeinträchtigt die CTL Aktivierung im immunologischen Steady State in Abwesenheit von suppressiven CD4⁺ T-Zellen

CD40 Stimulation auf Dendritischen Zellen, vor allem in Kombination mit TLR-Liganden, induziert die Expression von CD70 (Sanchez, McWilliams et al. 2007). Die Interaktion von CD70 mit seinem Rezeptor CD27 auf T-Zellen kostimuliert neben B7/CD28 Signalen die T-Zell-Expansion. Während die B7/CD28 Interaktion primär die T-Zellproliferation fördert, bestimmt die CD70 Ligation vorwiegend den Bestand an Effektor und Memory T-Zell Populationen (Hendriks, Xiao et al. 2003). CD70 Expression auf Dendritischen Zellen ist zwingend erforderlich, damit die Aktivierung Dendritischer Zellen durch CD40 Signale zu einer funktionalen CTL-Antwort führt (Taraban, Rowley et al. 2004; Bullock and Yagita 2005; Sanchez, McWilliams et al. 2007). So verhindert die Blockierung der CD70/CD27 Interaktion durch monoklonale Antikörper gegen CD70 die CD40 mediierte Expansion spezifischer CD8⁺ T-Zellen (Taraban, Rowley et al. 2004). Da die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen im immunologischen Steady State abhängig von CD40 Signalen ist (Abb. 21), wurde im Folgenden untersucht, ob die Aktivierung Dendritischer Zellen für eine funktionale CTL-Antwort im immunologischen Steady State ebenfalls abhängig von CD70/CD27 Interaktion ist. Dazu wurde in DIETER Knochenmarkchimären zunächst die Antigenpräsentation der transgen kodierten CTL-Epitope durch die Injektion von Tamoxifen induziert. Um den Einfluss von CD70 auf das Priming von CTLs durch steady-state DCs in Abwesenheit von suppressiven CD4⁺ T-Zellen zu untersuchen, wurden einige der Tiere CD4⁺ T-Zell depletiert und erhielten zusätzlich entweder einen CD70 blockierenden monoklonalen Antikörper oder einen Kontroll Antikörper des gleichen Isotyps. Die Expansion GP33-41 und β Gal497-505 spezifischer zytotoxischer T-Zellen wurde 8 Tage später im Blut der Tiere detektiert. In Mäusen, in denen die suppressiven CD4⁺ T-Zellen depletiert wurden, expandierten spezifische CTLs. Bei gleichzeitiger Blockade des CD70/CD27 Signalweges war die CTL-Antwort hingegen signifikant reduziert (Abb. 23A+B). Um die Funktionalität der expandierten CTLs zu charakterisieren, wurden die Mäuse an Tag 8 mit LCMV infiziert und der Virus-Titer in der Milz der Tiere 5 Tage nach Infektion bestimmt. CD4⁺ T-Zell depletierte Mäuse, die keinen CD70 blockierenden Antikörper appliziert bekamen, protekierten vollständig vor einer Infektion mit LCMV. In CD4⁺ T-Zell depletierten Mäusen, in denen zusätzlich der CD70/CD27 Signalweg blockiert war, war die Protektion gegen eine LCMV Infektion indes beeinträchtigt (Abb. 23C). Das Priming funktionaler CD8⁺ T-Zellen durch

Dendritische Zellen im immunologischen Steady State in Abwesenheit suppressiver CD4+ T-Zellen ist somit abhängig von CD70 Expression auf Dendritischen Zellen.

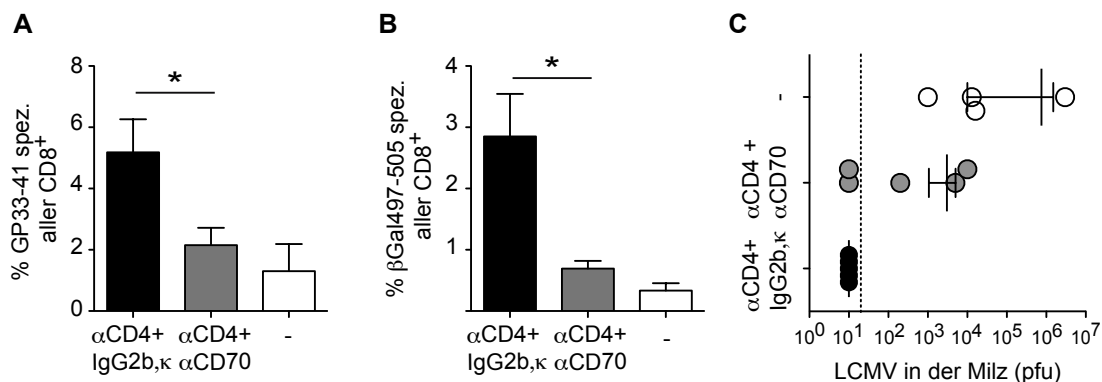


Abbildung 23. Funktionales CD8+ T-Zell Priming durch Dendritische Zellen im immunologischen Steady State in Abwesenheit von suppressiven CD4+ Zellen ist abhängig von CD70/ CD27 Interaktion.

Letal bestrahlte C57BL/6 Mäuse wurden mit Knochenmarkszellen aus DIETER transgenen Mäusen rekonstituiert. An Tag 0 wurde die Antigenpräsentation auf Dendritischen Zellen durch die Injektion von 2 mg Tamoxifen *i.p.* (weiße Balken) induziert. Eine Gruppe von Mäusen wurde an Tag -1 durch die Injektion von 0,5 mg GK1.5 *i.v.* CD4+ T-Zell depletiert, zusätzlich wurde an Tag 0 der CD70 Signalweg durch die Injektion von 0,5 mg FR70 *i.v.* blockiert (graue Balken) oder es wurde 0,5 mg Isotyp *i.v.* injiziert (schwarze Balken). **(A+B)** An Tag 8 wurde die Expansion LCMV GP33-41 **(A)** und βGal497-505 spezifischer CD8+ T-Zellen **(B)** im Blut der Tiere mit MHC Klasse I Tetramerfärbung detektiert. **(C)** An Tag 8 wurden die Mäuse *i.v.* mit 200 pfu LCMV-WE infiziert und der Virus-Titer 5 Tage nach Infektion in der Milz der Tiere bestimmt. Es wurden 5 Mäuse pro Gruppe verwendet. 1 Experiment von 3 Experimenten ist gezeigt.

3.3.2.6 Zellen des adaptiven Immunsystems medieren die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen durch CD40 Ligation im immunologischen Steady State in Abwesenheit von suppressiven CD4+ T-Zellen

In Abwesenheit suppressiver CD4+ T-Zellen lösen Dendritische Zellen im immunologischen Steady State eine funktionale zytotoxische T-Zell Antwort aus anstatt periphere CD8+ T-Zell Toleranz zu induzieren (Abb.2). Dabei nimmt die CD40 Ligation entscheidend Einfluss auf die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen im immunologischen Steady State. Sind Dendritische Zellen defizient für CD40, ist das Priming CD8+ T-Zellen in Abwesenheit suppressiver CD4+ T-Zellen gegenüber WT Dendritischen Zellen stark reduziert (Abb. 21). CD154, der Ligand für CD40, wird von aktivierten CD4+ T-Zellen, aber auch von aktivierten CD8+ T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Monozyten und Dendritischen Zellen exprimiert (reviewed in (Schonbeck and Libby 2001)). Um zu untersuchen, ob Zellen des angeborenen oder des adaptiven

Immunsystems die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen im immunologischen Steady State durch CD40 Ligation medieren, wurde ein Modellsystem entwickelt, in welchem adaptive Immunzellen CD40 Ligand defizient waren. Dazu wurden gemischte Knochenmarkchimäre aus 70% Rag^{-/-}DIETER und 30% CD40L^{-/-} Knochenmarkszellen generiert. In Rag^{-/-}DIETER I CD40L^{-/-} gemischten Chimären entwickelten sich Zellen des angeborenen Immunsystems sowohl aus CD40L^{-/-} als auch aus Rag^{-/-}DIETER Knochenmarkszellen, sodass 70% der angeborenen Immunzellen den CD40 Liganden exprimierten. Im Gegensatz dazu bildeten sich Zellen des adaptiven Immunsystems ausschließlich aus CD40L^{-/-} Knochenmarkszellen, da Rag^{-/-} Mäuse keine T-, B-, und NKT-Zellen generieren können. Adaptive Immunzellen waren somit vollständig CD40 Ligand defizient, während angeborene Immunzellen überwiegend Wildtyp Zellen waren. Um zu verhindern, dass neben Zellen des angeborenen Immunsystems zusätzlich nicht-hämatopoetische Zellen CD40 Ligand exprimierten und damit Einfluss auf CD40 Signale nehmen konnten, wurden die Chimäre in CD40L^{-/-} Mäusen generiert. Mit diesem System ließ sich der Einfluss von adaptiven Immunzellen auf die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen durch CD40 Ligation untersuchen. Als Kontrollen wurden gemischte Chimäre aus DIETER und CD40L^{-/-} Knochenmarkszellen generiert, sodass adaptive Immunzellen im Gegensatz zu Rag^{-/-}DIETER I CD40L^{-/-} Chimären zur Hälfte WT Zellen waren und den CD40 Liganden exprimierten. 6 Wochen nach der Rekonstitution von Rag^{-/-}DIETER I CD40L^{-/-} und DIETER I CD40L^{-/-} gemischten Chimären wurde die Antigenpräsentation auf transgenen Dendritischen Zellen durch die Injektion von Tamoxifen induziert. Einige der Tiere wurden zusätzlich CD4⁺ T-Zell depletiert. Um sicherzustellen, dass die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen durch CD40 Signale in diesem System generell möglich war, wurde eine Gruppe von Tieren zusätzlich i.v. mit monoklonalem anti-CD40 Antikörper injiziert. 8 Tage nach Tamoxifen Applikation wurden LCMV GP33-41 und β Gal497-505 spezifische zytotoxische T-Zell Antworten im Blut der Tiere bestimmt. In DIETER I CD40L^{-/-} Kontrollen wurde nach Tamoxifen Injektion keine Expansion GP33-41⁺ und β Gal497-505⁺ CD8⁺ T-Zellen detektiert. Waren zusätzlich suppressive CD4⁺ T-Zellen depletiert, expandierten GP33⁺ und β Gal497⁺ CD8⁺ T-Zellen. Eine vergleichbare CTL-Antwort wurde auch bei Antigenpräsentation in Anwesenheit des aktivierenden Stimulus anti-CD40 detektiert (Abb. 24A+B). Im deutlichen Gegensatz zu den DIETER I CD40L^{-/-} Kontrollen war die Expansion GP33⁺ und β Gal497⁺ CD8⁺ T-Zellen in CD4⁺ depletierten Rag^{-/-}DIETER I CD40L^{-/-} Chimären massiv reduziert (Abb. 24A+B). Wurde der CD40 Signalweg in Dendritischen Zellen indes durch die Injektion von monoklonalem anti-CD40 Antikörper induziert, expandierten spezifische CTLs. Die

Ergebnisse verdeutlichen den entscheidenden Einfluss von adaptiven Immunzellen auf die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen durch CD40 Ligation. Sind adaptive Immunzellen defizient für den CD40 Liganden, lösen Dendritische Zellen in Abwesenheit suppressiver CD4+ T-Zellen eine massiv reduzierte CTL-Antwort aus. Da die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen in Rag-/DIETER I CD40L-/- Chimären durch die Applikation von monoklonalem Anti-CD40 Antikörper generell möglich war, medieren offenbar Zellen des adaptiven Immunsystems die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen durch CD40 Ligation.

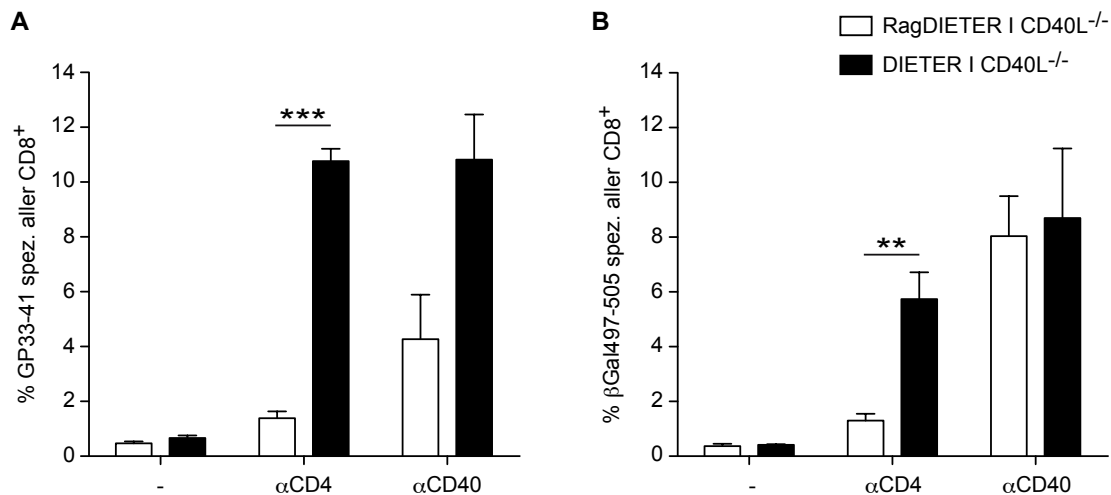


Abbildung 24. Die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen durch CD40 Ligation in Abwesenheit von suppressiven CD4+ T-Zellen wird durch Zellen des adaptiven Immunsystems mediert.

CD40L^{-/-} Mäuse wurden letal bestrahlt und mit 70% Rag-/DIETER und 30% CD40L^{-/-} Knochenmarkszellen (weiße Balken) oder 70% DIETER und 30% CD40L^{-/-} Knochenmarkszellen (schwarze Balken) rekonstituiert. An Tag 0 wurde die Antigenpräsentation auf Dendritischen Zellen durch die Injektion von 2 mg Tamoxifen *i.p.* induziert. Einige Mäuse wurden an Tag -1 durch die Injektion von 0,5 mg GK1.5 *i.v.* zusätzlich CD4+ T-Zell depletiert. Eine weitere Gruppe erhielt an Tag 0 durch die Injektion von 30 µg FGK45.1 *i.v.* zusätzlich den aktivierenden Stimulus Anti-CD40. **(A+B)** An Tag 8 wurde die Expansion LCMV GP33-41 spezifischer CD8+ T-Zellen **(A)** und βGal497-505 spezifischer CD8+ T-Zellen **(B)** im Blut mit MHC Klasse I Tetramer-Färbung detektiert. Es wurden 4-5 Mäuse pro Gruppe verwendet. 1 Experiment von 3 Experimenten ist gezeigt.

3.3.3 Die Rolle von TLR-Liganden auf die funktionelle Aktivierung von Dendritischen Zellen im immunologischen Steady State in Abwesenheit von suppressiven CD4⁺ T-Zellen

3.3.3.1 Modellsystem

Dendritische Zellen exprimieren eine Reihe von TLRs, die bestimmte Bestandteile von Bakterien, Viren und Pilzen wahrnehmen. Die Ligation der TLRs mediiert die direkte Aktivierung der DCs, wodurch diese schnell und effektiv eine Immunantwort gegen unterschiedliche Infektionen auslösen können. Dabei ist in den Signalkaskaden aller TLRs, mit Ausnahme des TLR-3, das Adaptorprotein MyD88 involviert (reviewed in (Kawai and Akira 2010)). Der Knockout des Adaptorproteins MyD88 resultiert somit in der Inaktivierung der TLR Signalkaskade, sodass eine Aktivierung MyD88 defizienter Immunzellen durch TLR-Ligation nicht möglich ist. Um den Einfluss von TLR-Ligand abhängigen Signalen auf die funktionelle Aktivierung von DCs in Abwesenheit suppressiver CD4⁺ T-Zellen zu charakterisieren, wurden MyD88 defiziente Mäuse in Kombination mit DIETER transgenen Mäusen verwendet. MyD88^{-/-}-DIETER Mäuse exprimieren nach Injektion von Tamoxifen die CTL-Epitope GP33-41 und NP396 aus LCMV, sowie des CTL-Epitops der β -Galaktosidase β Gal497 auf Dendritischen Zellen. Gleichzeitig sind die Immunzellen durch MyD88 abhängige Signale und damit durch die Aktivierung der meisten TLR nicht aktivierbar. Um die Rolle von MyD88 abhängigen Signalen selektiv auf die direkte Aktivierung Dendritischer Zellen zu untersuchen, wurden gemischte Knochenmarkchimäre aus 50% MyD88^{-/-}-DIETER Knochenmarkszellen und 50% WT (CD45.1) Knochenmarkszellen generiert. Die Hälfte aller Immunzellen dieser gemischten Chimäre waren folglich Wildtyp Zellen und exprimierten das Adaptorprotein MyD88, wodurch eine direkte Aktivierung der Zellen durch MyD88 abhängige Signale möglich war. Nur Dendritische Zellen, welche nach Tamoxifen Injektion die transgen kodierten CTL-Epitope exprimierten, waren ausschließlich MyD88 defizient und konnten daher durch TLR-Ligation nicht aktiviert werden. Mit diesen MyD88^{-/-}-DIETER | WT gemischten Knochenmarkchimären ließ sich der Einfluss von TLR-Liganden selektiv auf die funktionelle Aktivierung steady-state Dendritischer Zellen untersuchen.

3.3.3.2 MyD88 defiziente Dendritische Zellen können ebenso wie WT DCs zytotoxische T-Zellen in Abwesenheit von suppressiven CD4⁺ T-Zellen aktivieren

Um zu untersuchen, ob MyD88 abhängige Signale die funktionelle Aktivierung steady-state Dendritischer Zellen in Abwesenheit von suppressiven CD4⁺ T-Zellen medieren, wurden MyD88^{-/-}DIETER I WT gemischte Chimäre generiert. Als Kontroll-Tiere wurden gemischte Knochenmarkchimäre aus 50% Wildtyp DIETER und 50% C57BL/6 (CD45.1) Mäusen verwendet. Die Rekonstitution der gemischten Knochenmarkchimäre wurde 6 Wochen nach der Knochenmarkstransplantation im Blut an Hand des Verhältnisses der CD45.1/ CD45.2 Expression peripherer Blutzellen bestimmt. In den rekonstituierten Mäusen wurde die Antigenpräsentation der transgen kodierten CTL-Epitope durch die Injektion von Tamoxifen induziert. Zusätzlich wurde jeweils eine Gruppe von Mäusen CD4⁺ T-Zell depletiert oder erhielt den aktivierenden Stimulus Anti-CD40, wodurch in DIETER Mäusen eine funktionale CTL-Antwort gegen die induzierten Epitope ausgelöst wird (Probst, Lagnel et al. 2003). 8 Tage nach Induktion der Antigenpräsentation wurden die zytotoxischen T-Zell Antworten gegen die CTL-Epitope GP33-41 und β Gal497-505 im Blut der Tiere bestimmt. In MyD88^{-/-}DIETER I WT Chimären sowie in DIETER I WT Kontrollchimären wurde nach Tamoxifen Injektion keine Expansion an GP33-41 und β Gal497-505 spezifischen CD8⁺ T-Zellen in Blut detektiert. Wurde zusätzlich Anti-CD40 appliziert, expandierten in beiden Chimären spezifische zytotoxische T-Zellen (Abb. 25A+B). Wie zuvor gezeigt (Abb. 2), expandierten in DIETER I WT Kontrollchimären, in denen zusätzlich suppressive CD4⁺ T-Zellen depletiert wurden, die spezifischen CTLs. Die Expansion GP33-41 und β Gal497-505 spezifischer CTLs nach Depletion von suppressiven CD4⁺ T-Zellen in MyD88^{-/-}DIETER I WT gemischten Chimären, in denen die GP33 und β Gal497 exprimierenden Dendritischen Zellen nicht durch MyD88 abhängige Signale aktiviert werden konnten, war mit der CTL-Antwort in MyD88 kompetenten Kontrollchimären vergleichbar (Abb. 25A+B). MyD88 defiziente Dendritische Zellen im immunologischen Steady State, welche durch TLR-Ligation nicht aktiviert werden können, lösen somit in Abwesenheit von suppressiven CD4⁺ T-Zellen ebenso wie Wildtyp Dendritische Zellen eine CTL-Antwort aus. Demnach erfolgt die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen im immunologischen Steady State in Abwesenheit suppressiver CD4⁺ T-Zellen unabhängig von MyD88 Signalen.

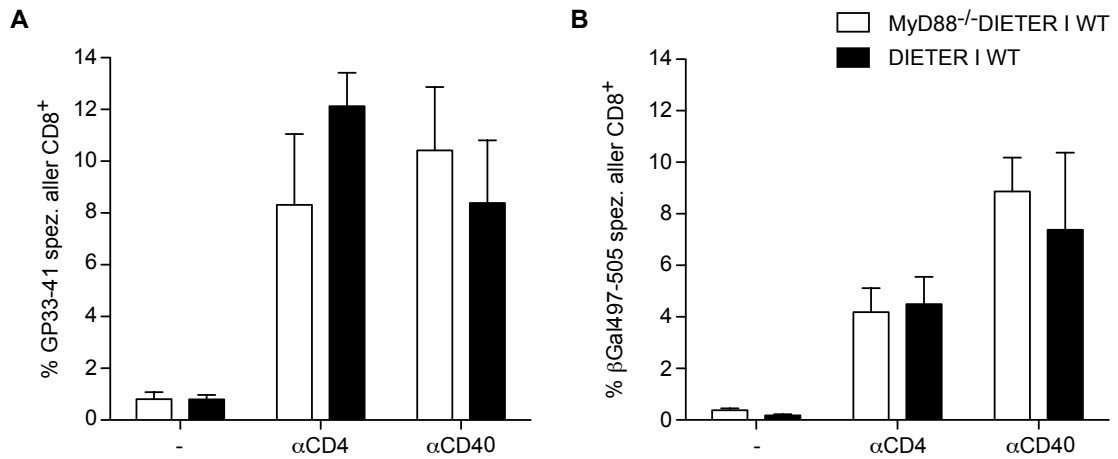


Abbildung 25. Die funktionelle Aktivierung steady-state Dendritischer Zellen in Abwesenheit suppressiver CD4⁺ T-Zellen erfolgt unabhängig von MyD88 Signalen.

Es wurden gemischte Knochenmarkchimäre aus jeweils gleicher Anzahl Knochenmarkszellen aus MyD88^{-/-}DIETER und Wildtyp (CD45.1) Mäusen (weiße Balken) oder DIETER und Wildtyp (CD45.1) Mäusen (schwarze Balken) generiert. An Tag 0 wurde die Antigenpräsentation auf transgenen Dendritischen Zellen durch die Injektion von 2 mg Tamoxifen *i.p.* induziert. Einige Mäuse wurden an Tag -1 durch die Injektion von 0,5 mg GK1.5 *i.v.* zusätzlich CD4⁺ T-Zell depletiert oder erhielten an Tag 0 durch die Injektion von 30 µg FGK45.1 *i.v.* den aktivierenden Stimulus Anti-CD40. Die Expansion LCMV GP33-41 spezifischer CD8⁺ T-Zellen (**A**) und βGal497-505 spezifischer CD8⁺ T-Zellen (**B**) wurde 8 Tage nach Tamoxifen Injektion im Blut durch Färbung mit MHC Klasse I Tetrameren detektiert.

3.4 Periphere Toleranz Induktion durch CD8+ Dendritische Zellen

Kreuzpräsentation, das heißt die Präsentation von Peptiden extrazellulärer Antigene auf MHC Klasse I Molekülen, erfolgt hauptsächlich durch CD8+ Dendritische Zellen, einer Subklasse konventioneller Dendritischer Zellen (den Haan, Lehar et al. 2000; Pooley, Heath et al. 2001; Hildner, Edelson et al. 2008). Die Kreuzpräsentation ist ein wichtiger Mechanismus der peripheren Toleranz Induktion. Können gewebespezifische Antigene nicht kreuzpräsentiert werden, ist die Toleranz Induktion CD8+ T-Zellen beeinträchtigt. Als Folge dessen akkumulieren autoreaktive CD8+ T-Zellen (Luckashenak, Schroeder et al. 2008). Es wird daher vermutet, dass CD8+ Dendritische Zellen im immunologischen Steady State eine wichtige Rolle in der sogenannten Kreuztoleranz haben. Um den Einfluss von CD8+ Dendritischen Zellen in der peripheren Toleranz Induktion zu untersuchen, wurden DIETER transgene Mäuse auf BATF3^{-/-} Mäuse gekreuzt. BATF3^{-/-} Mäusen besitzen keine CD8+ Dendritische Zellen, während sich die übrigen DC Populationen normal entwickeln (Hildner, Edelson et al. 2008). In BATF3^{-/-}-DIETER Mäusen lässt sich die Expression der CTL-Epitope GP33-41, NP396 und β Gal497 auf Dendritischen Zellen durch die Injektion von Tamoxifen induzieren, gleichzeitig entwickeln sich keine CD8+ Dendritischen Zellen. Somit werden die induzierten Antigene in BATF3^{-/-}-DIETER Mäusen lediglich auf CD8- Dendritischen Zellen präsentiert.

3.4.1 Die Periphere Toleranz Induktion ist in Mäusen, welche defizient für CD8+ Dendritische Zellen sind, beeinträchtigt

Zur Untersuchung der Rolle CD8+ Dendritischer Zellen in der peripheren Toleranz Induktion wurden BATF3^{-/-}-DIETER Knochenmarkchimäre generiert. Hierzu wurden C57BL/6 Mäuse letal bestrahlt und mit BATF3^{-/-}-DIETER Knochenmark rekonstituiert. Als Kontrollen wurden Knochenmarkchimäre aus heterozygoten BATF3^{+/-}-DIETER Mäusen verwendet. 7 Wochen nach Rekonstitution der Chimäre wurde die Antigenpräsentation durch die Injektion von Tamoxifen induziert. Einige der Tiere wurden zusätzlich *i.v.* mit anti-CD40 monoklonalem Antikörper injiziert. Die Injektion des aktivierenden Stimulus Anti-CD40 in DIETER Mäuse löst eine funktionale CTL-Antwort gegen die induzierten Epitope aus (Probst, Lagnel et al. 2003). Eine weitere Gruppe wurde unbehandelt gelassen. 7 Tage nach Induktion der Antigenpräsentation wurden die zytotoxischen T-Zell Antworten gegen die CTL-Epitope GP33-41 und β Gal497-505 im Blut bestimmt. In heterozygoten BATF3^{+/-}-DIETER

Knochenmarkchimäre wurde nach Tamoxifen Injektion sowie in unbehandelten Kontrollen keine Expansion spezifischer CD8⁺ T-Zellen detektiert. Wenn zusätzlich Anti-CD40 appliziert wurde, expandierten spezifische zytotoxische T-Zellen (Abb. 26A+B). Die CTL-Antworten der BATF3^{-/-}DIETER Knochenmarkchimäre war mit den CTL-Antworten der heterozygoten Kontrollen vergleichbar. So lösten Anti-CD40 behandelte BATF3^{-/-}DIETER Knochenmarkchimäre nach Induktion der Antigenpräsentation eine spezifische CTL-Antwort aus. In BATF3^{-/-}DIETER Chimären, in welchen die Antigenpräsentation ohne aktivierenden Stimulus induziert wurde sowie in unbehandelten Kontrollen expandierten hingegen keine CD8⁺ T-Zellen (Abb. 26A+B). In DIETER Mäusen werden GP33 und NP396 spezifische CD8⁺ T-Zellen durch Induktion der Antigenpräsentation auf Dendritischen Zellen im immunologischen Steady State toleriert. Diese periphere Toleranz Induktion ist sehr robust und kann selbst durch eine Infektion mit LCMV nicht gebrochen werden (Probst, Lagnel et al. 2003). Um den Einfluss CD8⁺ Dendritischer Zellen auf die periphere Toleranz Induktion von CD8⁺ T-Zellen zu untersuchen, wurden die BATF3^{-/-}DIETER Knochenmarkchimäre 7 Tage nach Tamoxifen Injektion mit LCMV infiziert. 12 Tage nach Infektion wurde die Produktion von IFN γ nach Restimulation mit verschiedenen antigenspezifischem Peptiden aus LCMV in CD8⁺ T-Zellen aus der Milz bestimmt. Heterozygote BATF3^{+/-}DIETER Chimäre, in denen vor LCMV Infektion die Antigenpräsentation induziert wurde, wiesen nach Restimulation mit GP33 und NP396 signifikant weniger IFN γ produzierende CD8⁺ T-Zellen auf als unbehandelte BATF3^{+/-}DIETER Mäuse (Abb. 26C). Dies zeigt, dass GP33 und NP396 spezifische CD8⁺ T-Zellen toleriert worden waren. Die Antwort gegen das LCMV Epitop GP276, welches durch Tamoxifen Applikation nicht induziert wurde, war zwischen unbehandelten und Antigen induzierten BATF3^{+/-}DIETER Mäusen vergleichbar (Abb. 26D). Im Gegensatz dazu war die periphere CD8⁺ T-Zell Toleranz Induktion in BATF3^{-/-}DIETER Mäusen beeinträchtigt. So war die GP33 und NP396 spezifische CD8⁺ T-Zell Antwort in Tamoxifen behandelten BATF3^{-/-}DIETER Mäusen nicht reduziert, sondern es wurden nach Restimulation mit Pep33 und Pep396 vergleichbare Frequenzen an IFN γ produzierenden CD8⁺ T-Zellen gefunden wie in nicht induzierten BATF3^{-/-}DIETER Chimären (Abb. 26C). Die Antwort gegen das Epitop GP276 zwischen Antigen induzierten und nicht induzierten BATF3^{-/-}DIETER Chimären war vergleichbar (Abb. 26D). Die gesamte durch LCMV induzierte CTL-Antwort, die durch die Produktion von IFN γ nach polyklonaler Stimulation mit PMA/ Ionomycin messbar wird, unterschied sich nicht zwischen BATF3^{-/-}DIETER und BATF^{+/-}DIETER Chimären (Abb. 26E). Die Ergebnisse deuten somit auf eine entscheidende Rolle CD8⁺ Dendritischer Zellen in der peripheren Toleranz Induktion hin.

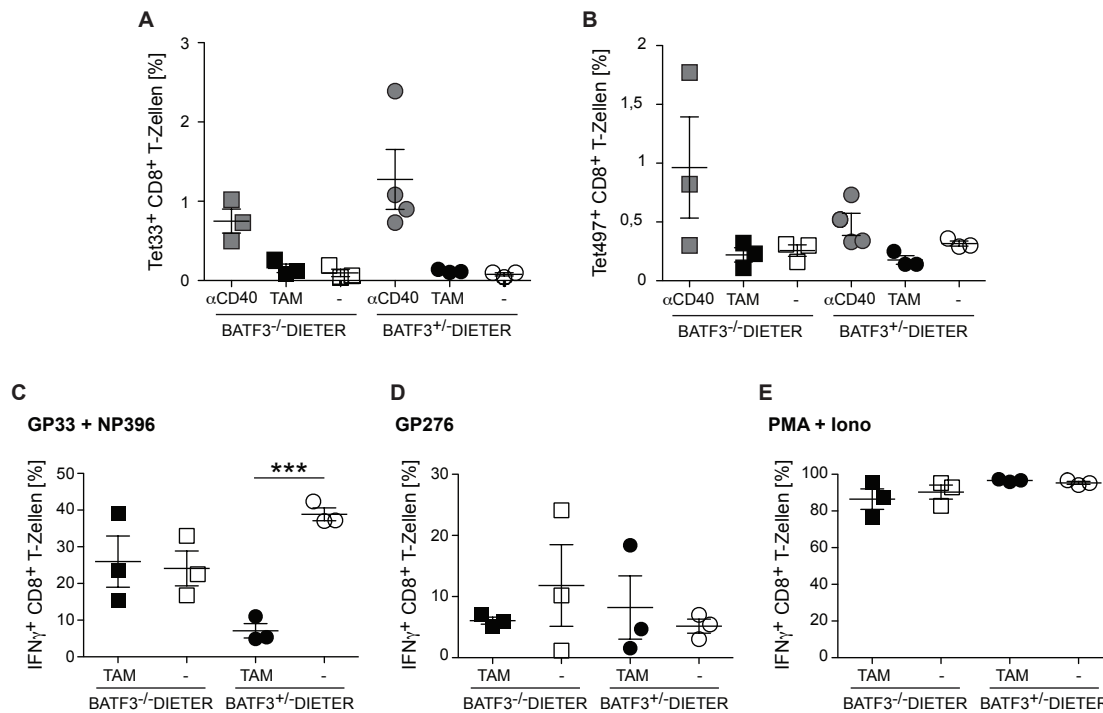


Abbildung 26. Die Periphere Toleranz Induktion ist in BATF3^{-/-}-DIETER Knochenmarkchimären beeinträchtigt.

Es wurden Knochenmarkchimären aus BATF3^{-/-}-DIETER (Quadrate) oder heterozygoten BATF^{+/-}-DIETER (Punkte) Mäusen generiert. An Tag 0 wurde die Antigenpräsentation auf Dendritischen Zellen durch die Injektion von 2 mg Tamoxifen *i.p.* induziert. Einige Mäuse erhielten an Tag 0 durch die Injektion von 30 μ g FGK45.1 *i.v.* zusätzlich den aktivierenden Stimulus Anti-CD40, eine weitere Gruppe wurde unbehandelt gelassen. An Tag 7 nach Antigen Induktion wurden die Tiere mit 200 pfu LCMV WE *i.p.* infiziert. **(A+B)** Die Expansion LCMV GP33-41 **(A)** und β Gal497-505 **(B)** spezifischer CD8+ T-Zellen wurde 7 Tage nach Tamoxifen Applikation im Blut mit MHC Klasse I Tetramer detektiert. **(C-E)** 12 Tage nach Infektion wurde die Milz der Mäuse entnommen und die Splenozyten für 6 Stunden mit den LCMV Peptiden GP33 **(C)**, NP396 **(C)** oder GP276 **(D)** oder mit PMA + Ionomycin **(E)** restimuliert und die IFN γ Produktion CD8+ T-Zellen bestimmt. Pro Gruppe wurden drei Mäuse verwendet. 1 Experiment von 4 Experimenten ist gezeigt.

Der genetische Hintergrund von BATF3^{-/-} Mäusen ist 129v, während der von DIETER Mäusen auf C57BL/6 basiert. BATF3^{-/-}-DIETER Mäuse sind eine F2 Generation aus beiden Stämmen und haben folglich einen undefinierten genetischen Hintergrund, der von Maus zu Maus variiert. Die Ergebnisse der oben beschriebenen Experimente (Abb. 26A-E) wurden in Knochenmarkchimären in vier unabhängigen Experimenten durchgeführt und repräsentieren daher die Resultate von vier BATF3^{-/-}-DIETER Mäusen, welche als Knochenmarks-Donoren für 40 BATF3^{-/-}-DIETER Chimären verwendet wurden. Um auszuschließen, dass die beeinträchtigte periphere Toleranz Induktion in BATF3^{-/-}-DIETER Mäusen nur ein Artefakt des genetischen Hintergrunds

der verwendeten BATF3^{-/-}-DIETER Mäusen war, wurden die Experimente zweimal in je 10 verschiedenen BATF3^{-/-}-DIETER Mäusen wiederholt. Als Kontrollen wurden je 10 BATF3^{+/-}-DIETER Mäuse eingesetzt. Die Antigenpräsentation wurde durch die Injektion von Tamoxifen induziert und spezifische zytotoxische T-Zellen 7 und 8 Tage später im Blut detektiert. In BATF3^{+/-}-DIETER Kontrolltieren expandierten GP33 spezifische CTLs nach Tamoxifen und Anti-CD40 Applikation, keine Expansion spezifischer CTLs wurde in Tamoxifen behandelten und unbehandelten Mäusen detektiert (Abb. 27A+B). Gleichzeitig wurden GP33 und NP396 spezifische CTLs durch Tamoxifen induzierte Antigenpräsentation toleriert (Abb. 27C). In BATF3^{-/-}-DIETER Mäusen hingegen löste die Antigenpräsentation auf aktivierten Dendritischen Zellen und Dendritischen Zellen im immunologischen Steady State eine CTL-Antwort aus (Abb. 27A+B). Ebenso wie in BATF3^{-/-}-DIETER Knochenmarkchimären (Abb. 26C) wurde in BATF3^{-/-}-DIETER Mäusen keine periphere CD8⁺ T-Zell Toleranz induziert (Abb. 27C). Die Ergebnisse verdeutlichen den entscheidenden Einfluss von CD8⁺ Dendritische Zellen auf die periphere Toleranz Induktion. Antigenpräsentation auf Dendritische Zellen im immunologischen Steady State induziert Toleranz in CD8⁺ T-Zellen (Probst, Lagnel et al. 2003). Fehlt Mäusen die CD8⁺ Subklasse Dendritischer Zellen, werden zytotoxische T-Zellen hingegen nicht toleriert (Abb. 26 und Abb. 27). Periphere CD8⁺ T-Zell Toleranz wird somit lediglich durch CD8⁺ Dendritische Zellen induziert, nicht aber durch CD8⁻ Dendritische Zellen.

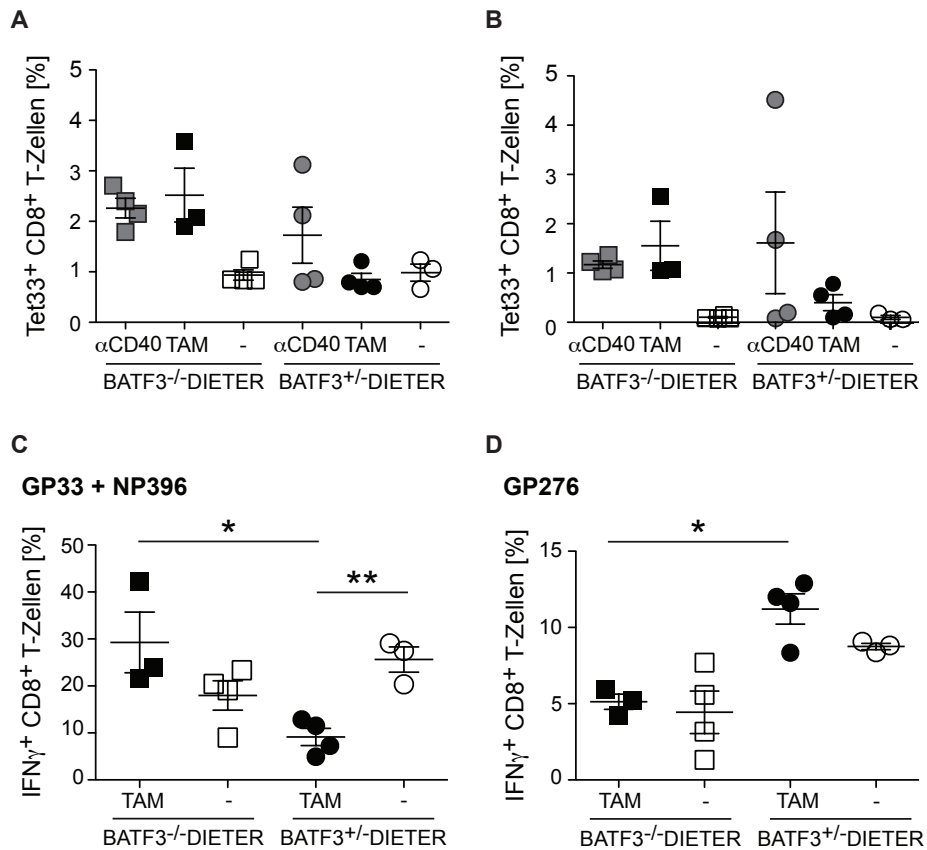


Abbildung 27. Die Periphere Toleranz Induktion ist in BATF3^{-/-}DIETER Mäusen beeinträchtigt.

In BATF3^{-/-}DIETER (Quadrate) oder heterozygoten BATF^{+/-}DIETER (Punkte) Mäusen wurde an Tag 0 die Antigenpräsentation auf Dendritischen Zellen durch die Injektion von 2 mg Tamoxifen *i.p.* induziert. Einige Mäuse erhielten an Tag 0 durch die Injektion von 30 μ g FGK45.1 *i.v.* zusätzlich den aktivierenden Stimulus Anti-CD40, eine weitere Gruppe wurde unbehandelt gelassen. An Tag 8 nach Antigen Induktion wurden die Tiere mit 200 pfu LCMV WE *i.p.* infiziert. **(A+B)** Die Expansion LCMV GP33-41 spezifischer CD8+ T-Zellen wurde 7 Tage **(A)** und 8 Tage **(B)** nach Tamoxifen Applikation im Blut mit MHC Klasse I Tetramer detektiert. **(C+D)** 12 Tage nach LCMV Infektion wurde die Milz der Mäuse entnommen und die Splenozyten für 6 Stunden mit den LCMV Peptiden GP33 **(C)**, NP396 **(C)** oder GP276 **(D)** restimuliert und die IFN γ Produktion CD8+ T-Zellen bestimmt. Pro Gruppe wurden drei bzw. vier Mäuse verwendet. 1 Experiment von 2 Experimenten ist gezeigt.

Die bisher durchgeführten Experimente zur Analyse der Rolle CD8+ Dendritischer Zellen in der peripheren Toleranz Induktion wurden in Mäusen durchgeführt, welche in allen Zellen oder in allen hämatopoetischen Zellen BATF3 defizient waren. Um sicherzustellen, dass die beeinträchtigte periphere Toleranz Induktion in BATF3^{-/-} Mäusen nicht ein sekundärer Effekt des vollständigen Fehlens CD8+ Dendritischer Zellen war, wurden die Experimente in gemischten Knochenmarkchimären, welche zur Hälfte WT Zellen und somit CD8+ Dendritische Zellen besaßen, wiederholt. Dazu wurden letal bestrahlte C57BL/6 Mäuse mit gleichen Teilen Knochenmarkszellen aus

BATF3^{-/-}-DIETER und Wildtyp (CD45.1) Mäusen rekonstituiert. In BATF3^{-/-}-DIETER I WT gemischten Chimären rekonstituiert die Hälfte der Zellen aus Wildtyp Knochenmark, sodass die Chimäre im Unterschied zu BATF3^{-/-}-DIETER Mäusen CD8⁺ Dendritische Zellen entwickeln können. Die Präsentation der transgenen CTL-Epitope erfolgt hingegen nur auf CD8⁺ Dendritischen Zellen, da die induzierbaren Dendritischen Zellen aus BATF3^{-/-}-DIETER Knochenmark rekonstituieren. Als Kontrollen wurden gemischte Knochenmarkchimäre aus heterozygoten BATF^{+/-}-DIETER und Wildtyp Knochenmark generiert. 7 Wochen nach Rekonstitution wurde die Entwicklung der unterschiedlichen Subklassen Dendritischer Zellen in der Milz (Abb. 28) und Lymphknoten (nicht gezeigt) überprüft. BATF3^{-/-}-DIETER I WT gemischte Chimäre entwickelten neben CD11b⁺ Dendritische Zellen eine Population CD8⁺ Dendritischer Zellen. Während in BATF3^{-/-}-DIETER I WT Chimären CD8⁺ Dendritische Zellen ausschließlich aus WT Knochenmark rekonstituierten, entwickelten sich die CD11b⁺ Dendritischen Zellen zu gleichen Teilen aus BATF3^{-/-}-DIETER und WT Knochenmark (Abb. 28).

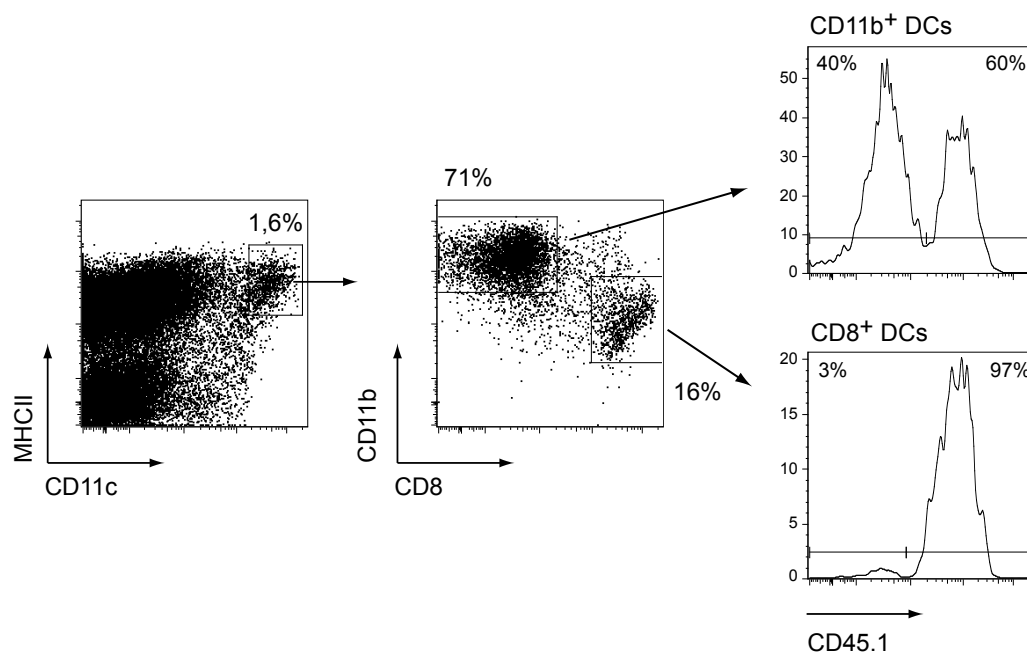


Abbildung 28. In BATF3^{-/-}-DIETER I WT gemischten Chimären entwickeln sich CD8⁺ Dendritische Zellen aus WT Knochenmarkszellen.

Es wurden BATF3^{-/-}-DIETER I WT gemischte Knochenmarkchimäre generiert. 6 Wochen nach Rekonstitution wurden Dendritische Zellen aus der Milz isoliert und im Durchflusszytometer analysiert. Dabei wurde die Population Dendritischer Zellen an Hand CD11c und MHCII Expression identifiziert. Der Anteil CD11b⁺ und CD8⁺ Dendritischer Zellen, sowie das Verhältnis an WT (CD45.1⁺) und BATF3^{-/-} (CD45.1⁻) Dendritischen Zellen wurde bestimmt.

In rekonstituierten BATF3^{-/-}DIETER I WT und Chimären und in heterozygoten Kontrollen wurde die Antigenpräsentation durch Tamoxifen Injektion auf ruhenden DCs und durch Tamoxifen und Anti-CD40 Applikation auf aktivierten DCs induziert. 7 und 8 Tage später wurden GP33 spezifische CTLs im Blut detektiert. Wie in den Experimenten zuvor (Abb. 26 und Abb. 27) expandierten in BATF3^{-/-}DIETER I WT und heterozygote Kontrollen nach Tamoxifen und Anti-C40 Applikation GP33 spezifische zytotoxische T-Zellen (Abb. 29A+B). Keine Expansion GP33 spezifischer CTLs wurde nach Tamoxifen Applikation sowie in unbehandelten Tieren detektiert (Abb. 29A+B). Die periphere Toleranz Induktion zytotoxischer T-Zellen war auch in BATF3^{-/-}DIETER I WT Chimären beeinträchtigt. 12 Tage nach LCMV Infektion produzierten CTLs von unbehandelten und Antigen induzierten BATF3^{-/-}DIETER I WT Chimären nach Restimulation mit Pep33 und Pep396 vergleichbare Frequenzen an IFN γ , während in den heterozygoten Kontroll-Chimären die CTL-Antworten gegen die induzierten Epitope signifikant reduziert war (Abb. 29C). Die Antwort gegen das nicht transgen kodierte LCMV Epitop 276 war wie in den Experimenten zuvor zwischen den jeweiligen unbehandelten und Tamoxifen behandelten Gruppen vergleichbar (Abb. 29D). 50-70% aller CD8⁺ T-Zellen der unterschiedlichen Gruppen exprimierten IFN γ nach unspezifischer Stimulation durch PMA und Ionomycin (Abb. 29E). Die Ergebnisse verdeutlichen noch einmal, dass die Antigenpräsentation auf CD8- Dendritischen Zellen im immunologischen Steady State nicht ausreichend ist, um periphere Toleranz in CD8⁺ T-Zellen zu induzieren. Dabei ist die beeinträchtigte periphere Toleranz Induktion zytotoxischer T-Zellen in BATF3^{-/-}DIETER Mäusen direkte Folge fehlender Antigenpräsentation auf CD8⁺ Dendritischen Zellen.

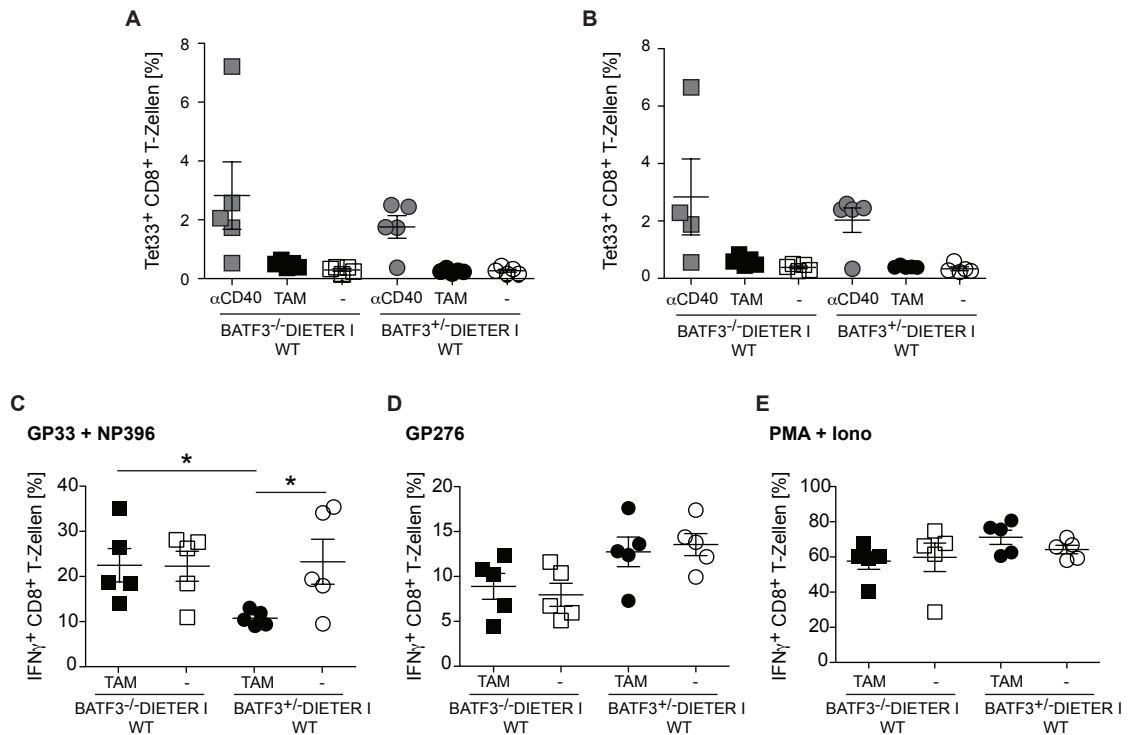


Abbildung 29. Eine funktionale periphere Toleranz Induktion zytotoxischer T-Zellen erfordert die Antigenpräsentation auf CD8+ Dendritischen Zellen.

Es wurden gemischte Knochenmarkchimäre aus BATF3^{-/-}-DIETER und WT (CD45.1) Mäusen (Quadrate) oder heterozygoten BATF^{+/-}-DIETER (Punkte) und WT (CD45.1) Mäusen generiert. An Tag 0 wurde die Antigenpräsentation auf Dendritischen Zellen durch die Injektion von 2 mg Tamoxifen *i.p.* induziert. Einige Mäuse erhielten an Tag 0 durch die Injektion von 30 µg FGK45.1 *i.v.* zusätzlich den aktivierenden Stimulus Anti-CD40, eine weitere Gruppe wurde unbehandelt gelassen. An Tag 8 nach Antigen Induktion wurden die Tiere mit 200 pfu LCMV WE *i.p.* infiziert. **(A+B)** Die Expansion LCMV GP33-41 und spezifischer CD8⁺ T-Zellen wurde 7 Tage **(A)** und 8 Tage **(B)** nach Tamoxifen Applikation im Blut mit MHC Klasse I Tetramer detektiert. **(C-E)** 12 Tage nach Infektion wurde die Milz der Mäuse entnommen und die Splenozyten für 6 Stunden mit den LCMV Peptiden Peptid 33 **(C)**, Peptid 396 **(C)** oder Peptid 276 **(D)** oder mit PMA + Ionomycin **(E)** restimuliert und die IFN γ Produktion CD8⁺ T-Zellen bestimmt. Pro Gruppe wurden fünf Mäuse verwendet. 1 Experiment von 3 Experimenten ist gezeigt.

4. Diskussion

Dendritische Zellen sind professionelle Antigenpräsentierende Zellen und können als solche naive T-Zellen direkt aktivieren und eine Effektor T-Zell Antwort auslösen. Neben der Aktivierung naiver T-Zellen, dem sogenannten Priming, haben Dendritische Zellen zusätzlich eine bedeutende Funktion in der Induktion von T-Zell Toleranz in der Peripherie. Ob Dendritische Zellen naive T-Zellen aktivieren oder periphere Toleranz induzieren, hängt vom Aktivierungszustand der Dendritischen Zelle ab. Im immunologischen Steady State, das heißt in Abwesenheit von Infektionen oder Entzündungen, befinden sich Dendritische Zellen in einem ruhenden Zustand (Steinman, Hawiger et al. 2003). Antigenpräsentation auf Dendritischen Zellen im immunologischen Steady State induziert periphere T-Zell Toleranz in spezifischen CD4+ T-Zellen (Hawiger, Inaba et al. 2001) und CD8+ T-Zellen (Bonifaz, Bonnyay et al. 2002; Probst, Lagnel et al. 2003). In Gegenwart inflammatorischer Stimuli zeigen Dendritische Zellen hingegen einen aktivierten Phänotyp und lösen funktionale T-Zell Antworten aus, anstatt periphere Toleranz zu induzieren (Banchereau and Steinman 1998). Die Aktivierung von Dendritischen Zellen kann durch die direkte Erkennung konservierter Muster unterschiedlicher Pathogene (PAMPs) erfolgen (Janeway and Medzhitov 2002) oder durch indirekte Signale, sogenannte „Danger Signals“, die als Folge einer Infektion, zellulären Stress oder Nekrose produziert werden (Gallucci and Matzinger 2001). Unklar ist, welchen Einfluss die unterschiedlichen Mechanismen auf die Aktivierung Dendritischer Zellen nehmen und welche Zellen die Signalmoleküle produzieren. Die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen, das heißt die direkte oder indirekte Aktivierung Dendritischer Zellen um eine funktionale T-Zell Antwort auszulösen, wird in Abwesenheit von einer Inflammation durch regulatorische T-Zellen unterdrückt (Schildknecht, Brauer et al. 2010). Das bedeutet, dass Dendritische Zellen zu jedem Zeitpunkt sowohl aktivierenden als auch suppressiven Signalen ausgesetzt sind. In dieser Arbeit wurden die inhibierenden und aktivierenden Mechanismen untersucht, die auf die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen in Abwesenheit von Infektionen Einfluss nehmen. Ein weiterer Teil dieser Arbeit analysiert funktionelle Unterschiede in Priming und peripherer Toleranz Induktion durch unterschiedliche Subtypen Dendritischer Zellen.

4.1 Suppression von Dendritischen Zellen im immunologischen Steady State

FoxP3⁺ regulatorische T-Zellen spielen die zentrale Rolle im dominanten Mechanismus peripherer T-Zell Toleranz und supprimieren aktiv das Priming autoreaktiver Lymphozyten (Sakaguchi, Yamaguchi et al. 2008). Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass ein wichtiger Suppressions-Mechanismus regulatorischer T-Zellen die Suppression von Dendritischen Zellen ist. Verschiedene Experimente *in vitro*, in denen regulatorische T-Zellen mit Dendritischen Zellen kokultiviert wurden, zeigen, dass regulatorische T-Zellen die Aktivierung Dendritischer Zellen inhibieren können (Cederbom, Hall et al. 2000; Serra, Amrani et al. 2003). Darüber hinaus verdeutlichen unsere Ergebnisse, dass die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen im immunologischen Steady State *in vivo* durch FoxP3⁺ T-Zellen supprimiert wird. So löst die Präsentation von CD8⁺ T-Zell Epitopen auf steady-state DCs in Abwesenheit von regulatorischen T-Zellen eine funktionelle CD8⁺ T-Zell Antwort aus, anstatt periphere CD8⁺ T-Zell Toleranz zu induzieren. Gleichzeitig zeigen Dendritische Zellen einen aktivierten Phänotyp (Schildknecht, Brauer et al. 2010; Muth, Schütze et al. 2012). Nicht geklärt war bislang die Frage, ob die Suppression Dendritischer Zellen im immunologischen Steady State durch regulatorische T-Zellen die direkte Interaktion zwischen regulatorischen T-Zellen und DCs erfordert. Mäuse, deren regulatorische T-Zellen depletiert werden, entwickeln spontane Autoimmunität (Kim, Rasmussen et al. 2007; Lahl, Loddenkemper et al. 2007). Somit könnte die beobachtete Aktivierung der DCs in Treg depletierten Mäusen und die daraus resultierende beeinträchtigte periphere Toleranz Induktion nur Folge der entstehenden Autoimmunität in Treg depletierten Mäusen sein. Verschiedene Studien zu Mechanismen Treg medierter Suppression zeigen gleichzeitig, dass regulatorische T-Zellen direkt mit Dendritischen Zellen interagieren, was eine direkte Suppression der Dendritischen Zellen ermöglicht (Oderup, Cederbom et al. 2006; Liang, Workman et al. 2008; Sarris, Andersen et al. 2008). Zudem veranschaulichen Live-Aufnahmen von Zwei-Photonen Laser-Scan Mikroskopen erstmals die direkte Interaktion zwischen regulatorischen T-Zellen und Dendritischen Zellen *in vivo*. In einem Mausmodell für Diabetes konnte gezeigt werden, dass antigenspezifische regulatorische T-Zellen im Pankreas drainierenden Lymphknoten lange Kontakte mit Autoantigen präsentierenden Dendritischen Zellen eingehen (Tang, Adams et al. 2006). Beobachtungen mittels konfokaler Mikroskopie von Kokulturen Fluoreszenz markierter regulatorischer T-Zellen und Dendritischen Zellen *in vitro* demonstrieren ebenfalls, dass regulatorische T-Zellen Aggregate mit Dendritischen Zellen bilden (Onishi, Fehervari et al. 2008). Aus dieser Literatur ist bekannt, dass die Treg medierte Suppression von DCs *in vitro* durch direkte

Interaktion erfolgen kann und dass auch *in vivo* direkte Interaktionen zwischen den beiden Zelltypen stattfinden. Wir konnten nun *in vivo* zeigen, dass die direkte Interaktion zwischen regulatorischen T-Zellen und DCs auf der Erkennung von MHCII Molekülen auf DCs durch den T-Zell-Rezeptor (TCR) regulatorischer T-Zellen basiert und die direkte MHCII-TCR Interaktion zwischen DCs und Tregs funktionell relevant für die periphere Toleranz Induktion ist. Antigenpräsentation auf Dendritischen Zellen im immunologischen Steady State, welche defizient für die Expression MHC-Klasse-II Molekülen sind und daher nicht direkt mit regulatorischen T-Zellen interagieren können, lösen eine funktionale CTL-Antwort aus, anstatt periphere Toleranz zu induzieren (Muth, Schütze et al. 2012). Widergespiegelt wird die beeinträchtigte periphere Toleranz Induktion MHCII defizienter Dendritischer Zellen ferner durch den aktivierten Phänotyp MHCII defizienter Dendritischer Zellen (Muth, Schütze et al. 2012). Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass Tregs direkt die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen im immunologischen Steady State supprimieren.

Die Notwendigkeit der MHCII-TCR Interaktion zwischen regulatorischen T-Zellen und Dendritischen Zellen für die Induktion der CD8⁺ T-Zell Toleranz wirft die Frage nach der TCR-Spezifität der regulatorischen T-Zellen auf. Bekannt ist, dass die Antigenpräsentation CD4⁺ T-Zell Epitope auf MHC Klasse II Molekülen auf ruhenden Dendritischen Zellen FoxP3⁺ CD4⁺ T-Zellen induziert (Kretschmer, Apostolou et al. 2005). Das DIETER Mausmodell kodiert neben den zwei CTL-Epitopen GP33-41, NP396-404 aus LCMV und dem CTL-Epitop GP497-505 der β Galaktosidase auch das immundominante I-A^b restringierte LCMV CD4⁺ T-Zell Epitop GP61-81 (Probst, Lagnel et al. 2003). Die Präsentation des MHCII restringierten T-Zell Epitops GP61-81 auf Dendritischen Zellen könnte daher die Suppression durch GP61-81 spezifische regulatorische T-Zellen induzieren. Tatsächlich jedoch zeigen Experimente in DIETER Mäusen keine Proliferation adoptiv transferierter GP61-81 spezifischer T-Zellen nach Induktion der Antigenpräsentation auf aktivierten Dendritischen Zellen, wohl aber nach Infektion mit LCMV. Dies deutet daraufhin, dass das transgen kodierte CD4⁺ T-Zell Epitop GP61-81 in DIETER Mäusen nicht präsentiert wird und somit die Suppression durch induzierte GP61-81 spezifischer regulatorischer T-Zellen ausgeschlossen werden kann (Muth, Schütze et al. 2012). Vielmehr ist davon auszugehen, dass regulatorische T-Zellen Selbst-Peptide, welche auf MHC Klasse II Molekülen steady-state Dendritischer Zellen präsentiert werden, erkennen. Unterschiedliche Studien stützen die Hypothese, dass regulatorische T-Zellen kontinuierlich Selbst-Antigene in der Peripherie erkennen. Frühe Experimente in Ratten verdeutlichen die Notwendigkeit der Erkennung von peripherem spezifischen Autoantigen für die Funktionalität regulatorischer T-Zellen (Seddon and Mason 1999). Analysen zur Spezifität des TCR

Repertoires von regulatorischen T-Zellen und konventionellen CD4⁺ T-Zellen ergaben, dass der Großteil regulatorischer T-Zellen in der Peripherie Selbst-Peptid-MHCII Komplexe erkennt (Hsieh, Liang et al. 2004; Hsieh, Zheng et al. 2006). Die TCR-Selbst-Peptid-MHCII Bindung regulatorischer T-Zellen erfolgte dabei mit einer höheren Affinität als bei konventionellen CD4⁺ T-Zellen. So expandierten in lymphopenischen Mäusen adoptiv transferierte naive CD4⁺ T-Zellen, welche mit einem TCR von regulatorischen T-Zellen transduziert wurden, sehr viel effizienter und verursachten stärkeren Gewichtsverlust als CD4⁺ T-Zellen, die mit einem TCR von konventionellen CD4⁺ T-Zellen transduziert wurden (Hsieh, Liang et al. 2004). Dem gegenüber stehen Ergebnisse von Pacholczyk *et al.*, welche zeigen konnten, dass der von Hsieh *et al.* beobachtete Gewichtsverlust in lymphopenischen Mäusen nach adoptiven Transfer Treg-TCR transduzierter CD4⁺ T-Zellen auf der Erkennung von Fremd-Antigenen beruht (Pacholczyk, Kern et al. 2007). Die Analyse hunderter TCRs von regulatorischen T-Zellen gab zudem keine Hinweise darauf, dass Tregs bevorzugt Selbst-Antigene erkennen. Vielmehr erkannten regulatorische T-Zellen fremde MHC-Peptid Komplexe mit der gleichen Häufigkeit wie konventionelle CD4⁺ T-Zellen (Pacholczyk, Kern et al. 2007). Die Autoren schlossen aus diesen Ergebnissen, dass regulatorische T-Zellen ebenso wie konventionelle CD4⁺ T-Zellen in der Peripherie vorrangig Fremd-Antigene erkennen und die Erkennung von Selbst-Antigenen eher selten ist (Corthay 2009). Obwohl unsere Ergebnisse nicht ausschließen, dass regulatorische T-Zellen Fremd-Antigene erkennen können, legt die Tatsache, dass in unseren Experimenten MHCII defiziente DC in allen von uns untersuchten Organen einen aktivierten Phänotyp zeigten und nicht nur an den Epithelien im direkten Kontakt mit der Außenwelt stehen, nahe, dass die Suppression von DCs durch Tregs vornehmlich auf der Erkennung von Selbst-Antigenen beruht.

Regulatorische T-Zellen können an vielen Punkten inhibierend auf Immunantworten einwirken. So können regulatorische T-Zellen die Funktion von naiven und Effektor T-Zellen, von Dendritischen Zellen, aber auch von NK- und NKT-Zellen, Makrophagen und B-Zellen inhibieren (reviewed in (Sakaguchi, Yamaguchi et al. 2008)). Dabei sind die Mechanismen der Treg mediierten Suppression vielseitig und umfassen sowohl Zellkontakt-unabhängige als auch Zellkontakt-abhängige Mechanismen. Während regulatorische T-Zellen *in vitro* die Proliferation konventioneller T-Zellen nur bei direktem Zellkontakt supprimieren (Takahashi, Kuniyasu et al. 1998; Thornton and Shevach 1998), spielen *in vivo* Kontakt-unabhängige Mechanismen wie die Sekretion der anti-inflammatorischen Cytokine IL-10 (Asseman, Mauze et al. 1999), TGF β (Read, Malmstrom et al. 2000) und IL-35 (Collison, Workman et al. 2007) insbesondere an den mukosalen Oberflächen eine große Rolle. Andere Suppressions-Mechanismen

benötigen, wenn nicht direkten Zellkontakt so doch zumindest räumliche Nähe zwischen regulatorischer T-Zelle und Zielzelle. So können regulatorische T-Zellen durch den Verbrauch an Cytokinen wie IL-2 indirekt die Suppression von Effektor T-Zellen erzielen (Pandiyani, Zheng et al. 2007). Ein weiterer Mechanismus, der räumlicher Nähe bedarf, ist die Produktion von perizellulärem Adenosin durch das Zusammenspiel der beiden Ektoenzyme CD39 und CD73. Dabei hemmt Adenosin durch die Bindung an seinen Rezeptor A2A die Funktion der entsprechenden Zielzellen (Deaglio, Dwyer et al. 2007).

Im Gegensatz zu diesen Mechanismen, welche keinen direkten Zell-Zell-Kontakt zwischen regulatorischer T-Zelle und Zielzelle benötigen, sind zahlreiche Suppressions-Mechanismen beschrieben, die einen solchen direkten Zellkontakt erfordern. So besitzen regulatorische T-Zellen zelllytische Aktivität und können Zielzellen über einen Granzyme B und Perforin abhängigen Mechanismus direkt lysieren (Gondek, Lu et al. 2005; Cao, Cai et al. 2007). Die Bindung von Treg exprimierten Galectin-1 an verschiedene Glykoproteine hat supprimierende Effekte auf die entsprechenden Zielzellen, wie die Induktion von Apoptose, die Suppression der Produktion pro-inflammatorischer Cytokine sowie die Inhibierung der Proliferation (Garin, Chu et al. 2007). Die Zellkontakt-Abhängigkeit der Suppression bedeutet jedoch nicht, dass regulatorische T-Zellen direkt mit den zu inhibierenden Effektor-Zellen interagieren müssen. Vielmehr kann die Inhibition auch über die Suppression einer akzessorischen Zelle erfolgen. So können T-Zellantworten durch die Suppression von Dendritischen Zellen inhibiert werden. Der Suppression der DC kommt wegen ihrer zentralen Funktion in der Kontrolle von Immunantworten eine Schlüsselrolle unter den Mechanismen Treg medierter Suppression zu. Es konnte für einige Suppressions-Mechanismen gezeigt werden, dass sie die funktionelle Modifikation Dendritischer Zellen durch direkte Rezeptor-Ligand Interaktion erzielen. Eine Schlüsselfunktion übernimmt dabei das inhibitorische Molekül CTLA-4. Dies wird insbesondere an Mäusen deutlich, deren regulatorische T-Zellen CTLA-4 defizient sind. Diese entwickeln eine systemische Proliferation der Lymphozyten sowie spontane Autoimmunität und zeigen gleichzeitig eine erhöhte Expression von CD80 und CD86 auf Dendritischen Zellen (Wing, Onishi et al. 2008). Weitere *in vitro* Experimente zeigen ebenfalls, dass regulatorische T-Zellen die Expression von CD80 und CD86 auf Dendritischen Zellen durch CTLA-4 herunterregulieren (Oderup, Cederbom et al. 2006; Onishi, Fehervari et al. 2008). Wir konnten zudem *in vivo* zeigen, dass die Blockade von CTLA-4 durch einen monoklonalen Antikörper die Expression kostimulatorischer Moleküle auf Dendritischen Zellen induziert (Schildknecht, Brauer et al. 2010). Eine neuere Studie mittels konfokaler Mikroskopie schlägt vor, dass die CTLA-4 abhängige

verminderte Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf Dendritischen Zellen via Trans-Endocytose mediiert wird. In Mäusen, deren APCs Fluoreszenz-markiertes CD86 (CD86-GFP) exprimierten, internalisierten antigenspezifische CTLA-4 exprimierende CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen das markierte CD86 und zeigten GFP Fluoreszenz in endosomalen Kompartimenten, nicht aber CTLA-4 defiziente regulatorische T-Zellen (Qureshi, Zheng et al. 2011). Neben der Modifikation der kostimulatorischen Moleküle CD80/ CD86 auf Dendritischen Zellen, induziert ein hohes Expressionslevel an CTLA-4 auf regulatorischen T-Zellen durch Interaktion mit CD80 und CD86 auf DCs die Expression von Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) in Dendritischen Zellen (Grohmann, Orabona et al. 2002). IDO oxidiert Tryptophan zu N-Formylkynurenin. Da Tryptophan eine essentielle Aminosäure ist, supprimiert die Depletion von Tryptophan in der Umgebung der Dendritischen Zelle die T-Zell Proliferation. Gleichzeitig ist Kynurenin toxisch und induziert Apoptose in den umgebenden Zielzellen. CTLA-4-CD80/86 Ligations führt außerdem zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Foxo-3, der in DCs die Produktion inflammatorischer Cytokine inhibiert (Dejean, Beisner et al. 2009). Neben CTLA-4 konnte für das Lymphozyten-Aktivations-Gen-3 (LAG-3) ein weiterer Kontakt-abhängiger Mechanismus Treg medierter Suppression identifiziert werden, der die Funktion von Dendritischen Zellen modifiziert. Das hauptsächlich von Tregs exprimierte Zelloberflächenprotein LAG-3 ist ein CD4 Homolog, welches MHCII Klasse II Moleküle mit hoher Affinität bindet und für die maximale suppressive Funktion regulatorischer T-Zellen nötig ist (Huang, Workman et al. 2004). Die Bindung von LAG-3 an MHCII Moleküle auf Dendritischen Zellen induziert einen ITAM mediierten inhibitorischen Signalweg, welcher die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen inhibiert (Liang, Workman et al. 2008). Neuropilin-1 wird von den meisten regulatorischen T-Zellen, nicht aber von naiven T-Zellen exprimiert und unterstützt lang andauernde Interaktionen zwischen Tregs und unreifen DCs, wodurch die Sensitivität regulatorischer T-Zellen gegenüber in geringen Mengen vorkommenden Antigen erhöht wird (Sarris, Andersen et al. 2008). Zudem konnte gezeigt werden, dass regulatorische T-Zellen via Gap Junctions direkt mit Dendritischen Zellen kommunizieren. So stieg in DCs die intrazelluläre Konzentration an cAMP innerhalb weniger Stunden nach Kokultivierung mit regulatorischen T-Zellen an, was zu einer verminderten Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf Dendritischen Zellen führte (Fassbender, Gerlitzki et al. 2010). Eine weitere Studie zeigt, dass regulatorische T-Zellen die Aktivierung Dendritischer Zellen durch extrazelluläres ATP supprimieren, indem das von Tregs exprimierte Ektoenzym CD39 die Hydrolyse von ATP zu AMP katalysiert (Borsellino, Kleinewietfeld et al. 2007). In einem Tumor-Mausmodell wurde außerdem gezeigt, dass Dendritische Zellen in Tumor

umgebenden Lymphknoten antigenspezifisch und Perforin abhängig von regulatorischen T-Zellen getötet werden und somit das Priming von CD8⁺ T-Zellen verhindert wird (Boissonnas, Scholer-Dahirel et al. 2010).

Diese Studien zeigen, dass Dendritische Zellen primäre Zielzellen in unterschiedlichen Mechanismen regulatorischer T-Zell medierter Suppression sind. Da viele der Studien entweder *in vitro* durchgeführt wurden oder *in vivo* in Modellsystemen, in denen der immunologische Steady State beeinträchtigt ist, ist nicht ganz klar, welchen Einfluss bestimmte Mechanismen in der Treg mediierten Suppression von Dendritischen Zellen haben. Wir haben in dieser Arbeit ein Modellsystem entwickelt, welches es uns ermöglicht, *in vivo* die Rolle der unterschiedlichen Mechanismen in der Suppression Toleranz induzierender Dendritischer Zellen im ungestörten immunologischen Steady State zu untersuchen. Mit diesem Modellsystem konnten wir zeigen, dass regulatorische T-Zellen CTLA-4 und LFA-1 exprimieren müssen, um die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen im immunologischen Steady State zu inhibieren. Diese Ergebnisse unterstützen Beobachtungen *in vitro*, in denen regulatorische T-Zellen mit Dendritischen Zellen und konventionellen T-Zellen kokultiviert wurden. In den Experimenten aggregierten hauptsächlich regulatorische T-Zellen mit DCs und regulierten CTLA-4 abhängig die Expression von CD80 und CD86 auf Dendritischen Zellen herunter. Dabei war die dominante Treg-DC Interaktion und die CTLA-4 mediierte Suppression der DCs abhängig von Treg exprimierten LFA-1 (Onishi, Fehervari et al. 2008). Die Expression von LFA-1 ist demnach für die suppressive Funktion regulatorischer T-Zellen in der peripheren Toleranz Induktion essentiell. Im Gegensatz zu CTLA-4 und LFA-1 geben unsere Daten keinen Hinweis auf eine Relevanz von IL-10 in der Treg mediierten Suppression von Toleranz induzierenden DCs. Während an den mukosalen Oberflächen von Darm und Lunge Treg produziertes IL-10 die Entstehung von spontaner Autoimmunität verhindert (Rubtsov, Rasmussen et al. 2008), hat IL-10 in einem Modellsystem für Gastritis ebenfalls keinen Einfluss auf die Treg mediierte Suppression (Suri-Payer and Cantor 2001). Dies verdeutlicht, dass die Mechanismen Treg medierter Suppression abhängig von der Lokalisation und der Umgebung der regulatorischen T-Zellen variieren.

Einen klaren Hinweis darauf, dass verschiedene Mechanismen der Treg medierten Suppression in der peripheren Toleranz Induktion primär über direkte Suppression Dendritischer Zellen funktionieren, geben weitere Experimente aus dieser Arbeit. So regulierten MHCII defiziente Dendritische Zellen, welche keine direkte Interaktion mit regulatorischen T-Zellen ausbilden können, die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD70 herauf (Muth, Schütze et al. 2012). Gleichzeitig ist CD70 ein funktionelles Effektor-Molekül Dendritischer Zellen. So hemmt die Blockade von CD70

auf aktivierten Dendritischen Zellen selbst in Anwesenheit einer Infektion das Priming CD8⁺ T-Zellen (Schildknecht, Miescher et al. 2007). Zugleich verhindert die konstitutive Expression von CD70 auf Dendritischen Zellen die Induktion peripherer T-Toleranz im immunologischen Steady State. Stattdessen primen konstitutiv CD70 exprimierende steady-state Dendritische Zellen eine funktionale T-Zell Antwort (Keller, Schildknecht et al. 2008). In diesem Zusammenhang konnten wir in dieser Arbeit zeigen, dass das Priming funktionaler CD8⁺ T-Zellen im immunologischen Steady State in Abwesenheit von regulatorischen T-Zellen durch die Blockade von CD70 inhibiert wird. Demnach supprimiert die direkte Treg-DC Interaktion die Expression des funktionalen Effektor-Moleküls CD70 auf Dendritischen Zellen und gewährleistet somit die periphere Toleranz Induktion durch Dendritische Zellen im immunologischen Steady State. Diese Daten sowie die absolute Notwendigkeit der direkten Interaktion zwischen DCs und Tregs für die Induktion peripherer T-Zell Toleranz (Muth, Schütze et al. 2012) deuten daraufhin, dass die primären Zielzellen regulatorischer T-Zellen in der peripheren Toleranz Induktion Dendritische Zellen sind. Unterstützt wird diese Annahme durch *in vivo* Beobachtungen mittels 2-Photonen Laser Scan Mikroskopie, mit denen lange Kontakte zwischen Tregs und Dendritischen Zellen nachgewiesen werden konnten, jedoch keine stabilen Treg-T-Zell Interaktionen (Tadokoro, Shakhar et al. 2006; Tang, Adams et al. 2006). Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass die Suppression von T-Zellen in der peripheren Toleranz Induktion durch direkte Treg-T-Zell Interaktion möglich ist, welche durch Bindung beider T-Zell Populationen an die gleiche Dendritische Zelle entstehen können. So ist gezeigt worden, dass regulatorische T-Zellen via Zell-Kontakt abhängige Gap Junctions cAMP in CD4⁺ T-Zellen transferieren und so die Expression von IL-2 in den Zielzellen inhibieren (Bopp, Becker et al. 2007). Da Tregs die Proliferation von B7 defizienten CD4⁺ T-Zellen *in vitro* nicht inhibieren können und der adoptive Transfer von B7 defizienten CD4⁺ T-Zellen in lymphopenische Mäuse trotz Anwesenheit von regulatorischen T-Zellen Gewichtsverlust verursacht, wurde zudem vorgeschlagen, dass Treg exprimiertes CTLA-4 an CD80 und CD86 auf aktivierten T-Zellen bindet, wodurch die Funktion der Effektor T-Zellen supprimiert wird (Paust, Lu et al. 2004). Möglicherweise erfordern weitere Mechanismen, in denen Tregs die direkte Suppression von T-Zellen medieren, die gleichzeitige Interaktion von Tregs und T-Zellen mit derselben Dendritischen Zelle zur Induktion peripherer Toleranz. Das in dieser Arbeit entwickelte Modellsystem ermöglicht uns, verschiedene zelluläre Mechanismen Treg medierter Suppression im ungestörten Steady State zu analysieren und hilft somit bei der Identifizierung der Treg Effektor-Mechanismen, welche die periphere Toleranz Induktion durch Dendritische Zellen gewährleisten.

4.2 Funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen im immunologischen Steady State in Abwesenheit von regulatorischen T-Zellen

Dendritische Zellen im immunologischen Steady State haben einen unreifen Phänotyp und induzieren periphere T-Zell Toleranz (Hawiger, Inaba et al. 2001; Bonifaz, Bonnyay et al. 2002; Probst, Lagnel et al. 2003). In Abwesenheit regulatorischer T-Zellen ist die Funktion Toleranz induzierender DCs beeinträchtigt (Schildknecht, Brauer et al. 2010; Muth, Schütze et al. 2012). Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass regulatorische T-Zellen die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen im immunologischen Steady State durch direkte Treg-DC Interaktion supprimieren. Dendritische Zellen, die nicht direkt mit Tregs interagieren können, zeigen einen aktivierten Phänotyp und lösen eine funktionelle CTL-Antwort aus, anstatt periphere CD8+ T-Zell Toleranz zu induzieren, was letztendlich in CTL medierter Autoimmunität resultiert (Muth, Schütze et al. 2012). Diese Tatsache wirft die Frage nach den Signalmolekülen und Mechanismen auf, welche die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen im immunologischen Steady State in Abwesenheit von regulatorischen T-Zellen erzielen. Dendritische Zellen exprimieren eine Reihe von Pathogen Erkennungs-Rezeptoren, darunter unterschiedliche TLRs und können daher konservierte Muster verschiedener Pathogene direkt erkennen und aktiviert werden. In Abwesenheit der suppressiven Funktion regulatorischer T-Zellen induzieren daher möglicherweise kommensale Bakterien, welche in Abwesenheit von Infektionen die hauptsächlichen Donoren von TLR-Liganden sind, die direkte Aktivierung Dendritischer Zellen. Dagegen sprechen indes Experimente in keimfreien Mäusen, die ebenso wie konventionelle Mäuse nach Depletion regulatorischer T-Zellen spontane Autoimmunität entwickeln (Kim, Rasmussen et al. 2007; Chinen, Volchkov et al. 2010). Im Gegensatz zu konventionellen Mäusen trat die Entzündung des Dünndarms in Treg depletierten keimfreien Mäusen jedoch verspätet ein, gleichzeitig war die Autoimmunität im exokrinen Pankreas deutlich verstärkt (Chinen, Volchkov et al. 2010). Dies verdeutlicht, dass zumindest in peripheren Geweben und Organen, die nicht im direkten Kontakt mit der Außenwelt stehen, die Entstehung von Autoimmunität in Treg depletierten Mäusen nicht durch kommensale Bakterien verursacht wird, sondern möglicherweise durch endogene pro-inflammatorische Signale im Steady State. Hingegen supprimieren Tregs an den mukosalen Oberflächen des Darms wahrscheinlich die Aktivierung von Immunantworten durch kommensale Bakterien, wodurch in keimfreien Mäusen die Entzündung des Dünndarms nach Treg Depletion verspätet eintritt (Chinen, Volchkov et al. 2010). Diese Annahme findet Unterstützung durch eine neuere Studie von Rivas

et al. (Rivas, Koh et al. 2012). Die Arbeitsgruppe konnte in FoxP3 und MyD88 doppelt defizienten Mäusen zeigen, dass der Knockout des gemeinsamen TLR Adapterproteins MyD88 die Autoimmunität an den epitheliären Grenzflächen wie Haut, Lunge und Darm in FoxP3 defizienten Mäusen verhindert. Im Gegensatz dazu war die massive Lymphoproliferation, welche ebenfalls in FoxP3 defizienten Mäusen entsteht (Fontenot, Gavin et al. 2003), von der MyD88 Defizienz unbeeinflusst (Rivas, Koh et al. 2012). Aus diesen Ergebnissen lässt sich auf die kritische Funktion regulatorischer T-Zellen in der Suppression von tonischen MyD88 abhängigen inflammatorischen Signalen an den Epithelien, die im direkten Kontakt mit der Außenwelt stehen, schließen (Rivas, Koh et al. 2012). Im Gegensatz zu den epitheliären Grenzflächen scheint die Aktivierung durch direkte TLR-Ligation in FoxP3 defizienten Mäusen keinen Einfluss auf die systemische Aktivierung autoreaktiver T-Zellen zu haben. In Übereinstimmung mit diesen Daten zeigen auch Experimente aus dieser Arbeit, dass die funktionelle Aktivierung steady-state Dendritischer Zellen in Abwesenheit regulatorischer T-Zellen unabhängig von MyD88 und somit unabhängig von der direkten Aktivierung durch TLR-Ligation erfolgt. So löste die Antigenpräsentation auf MyD88 defizienten Dendritischen Zellen ebenso wie auf MyD88 kompetenten DCs nach Depletion suppressiver CD4⁺ T-Zellen das Priming spezifischer CD8⁺ T-Zellen aus. Allerdings muss die Funktionalität der durch MyD88 defiziente DCs aktivierten CD8⁺ T-Zellen in weiteren Experimenten noch charakterisiert werden. Denn Studien von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen zeigen, dass die indirekte Aktivierung Dendritischer Zellen zwar ausreichend ist, um die Proliferation CD4⁺ T-Zellen zu induzieren, jedoch ist die Effektor-Funktion in den so aktivierten CD4⁺ T-Zellen beeinträchtigt (Sporri and Reis e Sousa 2005; Hou, Reizis et al. 2008). Kürzlich konnte dies auch für die Effektor-Funktion von CD8⁺ T-Zellen, welche von MyD88 defizienten DCs aktiviert wurden, gezeigt werden. So induzierte die indirekte Aktivierung MyD88 defizienter DCs zwar die Proliferation spezifischer CD8⁺ T-Zellen, diese waren jedoch nicht funktional und konnten Tumore im Gegensatz zu CD8⁺ T-Zellen, die von MyD88 kompetenten DCs aktiviert wurden, nicht abstoßen (Kratky, Reis e Sousa et al. 2011). Die Tatsache, dass in keimfreien Mäusen nach Depletion regulatorischer T-Zellen ebenfalls autoreaktive Lymphozyten aktiviert werden (Chinen, Volchkov et al. 2010), lässt allerdings auf die funktionelle Aktivierung steady-state Dendritischer Zellen in Abwesenheit regulatorischer T-Zellen durch indirekte Signale schließen.

Signale, welche die indirekte Aktivierung Dendritischer Zellen induzieren, werden unter dem Begriff „Danger Signals“ zusammengefasst. Danger Signals werden als Folge von Infektionen, zellulären Stress oder Nekrose produziert. Zu ihnen zählen neben Hitze-Schock-Proteinen, Nukleotiden, reaktive Sauerstoffverbindungen, Abbauprodukten der

extrazellulären Matrix und Neuromediatoren auch inflammatorische Cytokine wie die Typ I Interferone (reviewed in (Gallucci and Matzinger 2001)). Typ I Interferone werden in großen Mengen als Folge viraler Infektionen produziert und haben pleiotrope Effekte auf viele unterschiedliche Immunzellen. Neben der bedeutenden Funktion des Cytokins in der angeborenen Immunität, werden auch in der Abwesenheit von Infektionen stets geringe Mengen an Typ I Interferonen produziert (Belardelli, Gessani et al. 1987; Tovey, Streuli et al. 1987; Lienenklaus, Cornitescu et al. 2009). Diese geringen Mengen an Typ I Interferonen sind für verschiedene biologische Funktionen notwendig (Gough, Messina et al. 2012). Dabei wurde auch vorgeschlagen, dass tonische Level an Typ I Interferonen im immunologischen Steady State die basale Aktivierung von Immunzellen über einen bestimmten Schwellenwert erzielen, um eine schnelle und starke Antwort dieser Immunzellen auf weitere pro-inflammatorische Stimuli zu gewährleisten (Taniguchi and Takaoka 2001; Gough, Messina et al. 2012). Demnach ist der immunologischen Steady State durch tonische Signale von Typ I Interferonen definiert, die eine basale Aktivierung verursachen. Die vollständige Aktivierung von Immunzellen erfordert somit die Aktivierung über diese basalen Level hinaus. Tatsächlich konnten wir in dieser Arbeit zeigen, dass das generelle Aktivierungsniveau IFNR defizienter Dendritischer Zellen im immunologischen Steady State im Vergleich zu WT Dendritischen Zellen niedriger war. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass Typ I Interferone für die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen durch Anti-CD40 ebenfalls zwingend erforderlich sind. Selbst kombinierte Anti-CD40 und TLR-Ligation ist in Abwesenheit von Typ I Interferonen nicht ausreichend, um Dendritische Zellen funktionell zu aktivieren. So wurde in Experimenten mit IFNR^{-/-} Mäusen gezeigt, dass die vollständige Aktivierung Dendritischer Zellen für eine CD8⁺ T-Zell Antwort durch alle TLR-Liganden, mit Ausnahme der Liganden für den TLR2 und den TLR6, abhängig von Typ I Interferonen war (Ahonen, Doxsee et al. 2004). Dies legt nahe, dass die Sekretion von Typ I Interferonen ein wichtiger Mechanismus der funktionellen Aktivierung von Dendritischen Zellen ist. Dabei ist allerdings nicht geklärt, ob tonische Typ I Interferone nötig sind, um die DC durch TLR-Liganden aktivierbar zu machen, oder ob die Induktion von Typ I Interferonen ein wichtiger Teil des Wirkungs-Mechanismus von TLR- Liganden ist. Während einerseits tonische Signale von Typ I Interferonen die Sensitivität Dendritischer Zellen gegenüber anderen aktivierenden Signalen erhöhen, verhindern gleichzeitig regulatorische T-Zellen die funktionelle Aktivierung steady-state Dendritischer Zellen durch die basalen Level an Typ I Interferonen. So konnten wir in dieser Arbeit zeigen, dass die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen in Abwesenheit von suppressiven CD4⁺ T-Zellen von Typ I Interferonen abhängt. Im Vergleich zu IFN-Rezeptor kompetenten DCs war das

Priming spezifischer zytotoxischer T-Zellen durch IFN-Rezeptor defiziente Dendritische Zellen nach der Depletion suppressiver CD4⁺ T-Zellen beeinträchtigt. Dabei konnten wir ausschließen, dass in Abwesenheit von suppressiven CD4⁺ T-Zellen verstärkt Typ I Interferone produziert werden. Folglich sind tatsächlich tonische Typ I Interferone für die funktionelle Aktivierung steady-state Dendritischer Zellen in Abwesenheit regulatorischer T-Zellen verantwortlich. Typ I Interferone können von fast allen Zelltypen produziert werden, darunter Leukozyten, Fibroblasten und Endothelzellen (Gonzalez-Navajas, Lee et al. 2012). Nicht ganz klar ist allerdings, welche Zelltypen konstitutive Level an Typ I Interferonen im immunologischen Steady State exprimieren. Erste Experimente in Interferon- β Reporter Mäusen zeigen indes, dass Thymus-Epithelzellen die Hauptproduzenten von Typ I Interferon- β in Abwesenheit von Infektionen sind (Lienenklaus, Cornitescu et al. 2009). Da in diesen Experimenten nicht ausgeschlossen werden konnte, dass kommensale Bakterien oder andere Mikroorganismen mit geringer Pathogenität die Typ I Interferon Produktion induzieren, sind zusätzliche Experimente in keimfreien Mäusen nötig, um weitere Zelltypen zu identifizieren, die Typ I Interferone unter nicht inflammatorischen Bedingungen produzieren.

Zwar war das Aktivierungsniveau IFNR defizienter Dendritischer Zellen im immunologischen Steady State im Vergleich zu WT DCs generell niedriger, jedoch ließ sich die Aktivierung IFNR defizienter DCs in Abwesenheit suppressiver CD4⁺ T-Zellen zumindest für CD80 noch induzieren. Demnach sind neben Typ I Interferonen noch weitere Signale vorhanden, welche die Aktivierung Dendritischer Zellen im immunologischen Steady State durch suppressive CD4⁺ T-Zellen medieren. Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass die funktionelle Aktivierung steady-state Dendritischer Zellen neben Typ I Interferonen entscheidend von CD40 Signalen abhängt. So induzierte die Antigenpräsentation auf CD40 defizienten Dendritischen Zellen im Gegensatz zu CD40 kompetenten DCs in Abwesenheit suppressiver CD4⁺ T-Zellen keine Proliferation spezifischer CD8⁺ T-Zellen und protektierten daher nicht vor einer Infektion mit LCMV. Wichtige Funktion von CD40 in der funktionellen Aktivierung Dendritischer Zellen in Abwesenheit regulatorischer T-Zellen könnte die Regulation der CD70 Expression sein. In diesem Zusammenhang konnten wir in DIETER Mäusen ebenfalls zeigen, dass das Priming spezifischer CD8⁺ T-Zellen nach der Depletion suppressiver CD4⁺ T-Zellen durch CD70 Blockade aufgehoben wird. Dies ist im Einklang mit Studien, in denen gezeigt wurde, dass das Priming zytotoxischer T-Zellen nach CD40 Ligation von CD70 abhängt (Taraban, Rowley et al. 2004). Interessanterweise waren CD40 defiziente DCs ebenso wie zuvor bei IFNR defizienten DCs beobachtet, zumindest für CD80 noch aktivierbar. Im Gegensatz zu

Typ I Interferonen hatten CD40 Signale jedoch keinen Effekt auf das Expressionsniveau der Oberflächenmarker im Steady State. Die Expression von CD80 und CD86 wird gemeinhin als Maß für die Aktivierung Dendritischer Zellen verwendet. Obwohl das Priming von T-Zellen entscheidend von CD80 und CD86 Signalen abhängt (reviewed in (Keir and Sharpe 2005)), deuten unsere Daten daraufhin, dass die Expression von aktivierenden Oberflächenmarkern nur bedingt Rückschlüsse auf die Immunogenizität der Dendritischen Zellen, das heißt die Fähigkeit der Dendritischen Zelle eine CTL-Antwort auszulösen, zulässt. So finden wir insbesondere bei CD40 defizienten DCs die gleiche Expression an Aktivierungsmarker wie bei WT Dendritischen Zellen, jedoch einen kompletten Verlust der Immunogenizität der DC. Die essentielle Funktion von CD40 Signalen in der funktionellen Aktivierung Dendritischer Zellen wirft die Frage nach den Zelltypen auf, welche die funktionelle Aktivierung steady-state Dendritischer Zellen durch CD40 Signale induzieren. CD154, der Ligand für CD40, wird hauptsächlich von aktivierten CD4+ T-Zellen exprimiert, aber auch auf aktivierten CD8+ T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, NKT, Monozyten und Dendritischen Zellen konnte eine geringe Expression von CD154 nachgewiesen werden (reviewed in (Schonbeck and Libby 2001)). Eine entscheidende Funktion von CD154 auf aktivierten CD4+ T-Zellen ist das sogenannte „Licensing“ Dendritischer Zellen, das heißt, die durch CD4+ T-Zell Hilfe induzierte Aktivierung der Dendritischen Zelle um eine funktionale CTL-Antwort auszulösen (Bennett, Carbone et al. 1998; Ridge, Di Rosa et al. 1998; Schoenberger, Toes et al. 1998). In unseren Experimenten wurden jedoch alle CD4+ T-Zellen depletiert, wodurch diese Zellpopulation in unserem System keinen Einfluss auf die funktionelle Aktivierung steady-state Dendritischer Zellen nehmen kann. Da aktivierte CD8+ T-Zellen ebenfalls den Ligand für CD40 exprimieren, wäre es möglich, dass spezifische CD8+ T-Zellen selbst die Dendritischen Zellen über CD40 Signale aktivieren und so ihre eigene Antwort durch eine positive Feedback-Schleife verstärken. Hinweise darauf geben Experimente von Hernandez *et al.*, die zeigen konnten, dass in Abwesenheit von CD4+ T-Zell Hilfe die Expression des CD40 Liganden auf spezifischen CD8+ T-Zellen eine maximale CTL-Antwort gewährleistet. So proliferierten adoptiv transferierte CD40L defiziente CD8+ T-Zellen *in vivo* schwächer, als CD40L kompetente CD8+ T-Zellen (Hernandez, Shen et al. 2007). Vorgeschlagen wurde auch eine Rolle für die CD40 Ligand Expression auf Dendritischen Zellen, um in Abwesenheit von CD4+ T-Zellen eine funktionelle zytotoxische T-Zell Antwort auszulösen (Johnson, Zhan et al. 2009). Im Gegensatz zu den Experimenten von Hernandez *et al.* zeigt diese Studie, dass CD40 Ligand defiziente CD8+ T-Zellen in gemischten Lymphozyten Reaktionen ebenso wie WT CD8+ T-Zellen proliferieren und auch *in vivo* zu funktionellen Effektor T-Zellen aktiviert

werden. Hingegen waren CD40 Ligand defiziente Dendritische Zellen verantwortlich für ein reduziertes CTL Priming in Abwesenheit CD4⁺ T-Zellen. Die Autoren schlossen daraus, dass CD40 Ligand Expression auf Dendritischen Zellen und CD40 auf CD8⁺ T-Zellen benötigt wird, um naive CD8⁺ T-Zellen bestmöglich zu aktivieren (Johnson, Zhan et al. 2009). Unsere Experimente schließen jedoch aus, dass DC exprimiertes CD154 essentiell für die funktionelle Aktivierung steady-state Dendritischer Zellen in Abwesenheit von suppressiven CD4⁺ T-Zellen ist. Stattdessen zeigen unsere Daten eine wichtige Funktion adaptiver Immunzellen in der funktionellen Aktivierung steady-state DCs durch CD40 Signale. So konnten wir in einem Modellsystem, in dem ausschließlich adaptive Immunzellen defizient für den CD40 Ligand waren, zeigen, dass die Expansion spezifischer CD8⁺ T-Zellen nach Depletion suppressiver CD4⁺ T-Zellen im Gegensatz zu Mäusen, in denen adaptive Immunzellen CD40L kompetent waren, massiv reduziert war. Folglich mediierten adaptive Immunzellen die funktionelle Aktivierung steady-state Dendritischer Zellen durch CD40 Ligation. Mögliche Donoren von CD40 Signalen im Steady State, welche die Proliferation spezifischer zytotoxischer T-Zellen nach CD4⁺ T-Zell Depletion induzieren, könnten demnach tatsächlich wie von Hernandez *et al.* vorgeschlagen die spezifischen CD8⁺ T-Zellen selbst sein. In Frage kommen neben CD8⁺ T-Zellen auch Natürliche Killer T-Zellen (NKT-Zellen). Unterstützung findet diese Annahme durch Studien, in denen durch das Glycolipid α -Galactosylceramid (α GalCer) aktivierte NKT-Zellen das Priming zytotoxischer T-Zellen mediierten. Dabei induziert α GalCer die Expression von CD40Ligand auf NKT-Zellen, wodurch die funktionelle Aktivierung Dendritischer Zellen durch NKT-Zellen über CD40-CD40Ligand Interaktion ermöglicht wird (Hermans, Silk et al. 2003; Fujii, Liu et al. 2004). Ferner konnte gezeigt werden, dass α GalCer die Expression von CD70 auf Dendritischen Zellen induziert, wobei die Expression von CD70 abhängig von CD40 Signalen war. Gleichzeitig war die CD70 Expression für die durch α GalCer mediierte CD8⁺ T-Zell Antwort essentiell (Taraban, Martin et al. 2008). Vermutlich induzieren α GalCer aktivierte NKT-Zellen über CD40 Signale die CD70 Expression auf Dendritischen Zellen, sodass eine funktionale CTL-Antwort ausgelöst wird. Da sowohl CD8⁺ T-Zellen als auch NKT-Zellen Dendritische Zellen über CD40-CD40Ligand Interaktion aktivieren können, sind zusätzliche Experimente nötig, um die adaptiven Immunzellen zu identifizieren, welche die funktionelle Aktivierung steady-state Dendritischer Zellen durch CD40 Signale in Abwesenheit suppressiver CD4⁺ T-Zellen mediierten.

4.3 Subtypen Dendritischer Zellen in der Peripheren Toleranz Induktion und der Aktivierung von T-Zell Immunantworten

Als professionelle Antigenpräsentierende Zellen sind Dendritische Zellen darauf spezialisiert, Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und die Peptide via MHC Klasse I und II Moleküle auf ihrer Zelloberfläche zu präsentieren. Während die Antigenpräsentation auf ruhenden Dendritischen Zellen periphere Toleranz in den Antigen-spezifischen T-Zellen induziert (Hawiger, Inaba et al. 2001; Bonifaz, Bonnyay et al. 2002; Probst, Lagnel et al. 2003), löst die Antigenpräsentation auf aktivierten DCs eine funktionale Effektor T-Zell Antwort aus. Durch ihre Fähigkeit naive T-Zellen zu primen, dienen DCs als Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität. Gleichzeitig trägt die zentrale Funktion der DC in der Induktion peripherer T-Zell Toleranz dazu bei, autoreaktive T-Zellen, welche während der negativen Selektion im Thymus nicht eliminiert wurden, zu kontrollieren und verhindern somit die Entstehung von Autoimmunität. Die Population Dendritischer Zellen ist heterogen und es können verschiedene Subtypen anhand der Expression unterschiedlicher Oberflächenmarker definiert werden (Shortman and Liu 2002). Dabei ist bisher nicht vollständig geklärt, welche Rolle die unterschiedlichen DC Subtypen in der peripheren Toleranz Induktion sowie der Immunität spielen. Verschiedene Studien zeigen hinsichtlich der Antigenpräsentation Unterschiede zwischen den verschiedenen DC Subtypen (reviewed in (Segura and Villadangos 2009)). So wurde gezeigt, dass Kreuzpräsentation, das heißt die Präsentation von Peptiden extrazellulärer Antigene auf MHC Klasse I Molekülen, hauptsächlich durch CD8+ Dendritische Zellen erfolgt (den Haan, Lehar et al. 2000; Pooley, Heath et al. 2001). Experimente von Schnorrer *et al.* zeigen, dass die einzigartige Fähigkeit CD8+ DCs extrazelluläre Antigene via MHC Klasse I zu präsentieren nicht auf einem Unterschied in der Antigenaufnahme beruht, sondern vielmehr auf die spezifische Expression spezialisierter Komponenten zurückzuführen ist, welche die Kreuzpräsentation der aufgenommenen Antigene gewährleisten. So kreuzpräsentierten ausschließlich CD8+ Dendritische Zellen lösliche und Bead-assoziierte Antigene, obwohl CD8- DCs gleiche Mengen an Antigen endozytiert hatten. Im Gegensatz dazu waren CD8+ DCs weniger effizient im Priming transgener CD4+ T-Zellen als CD8- DCs (Schnorrer, Behrens et al. 2006). Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch Experimente von Dudziak *et al.*, welche ebenfalls zeigen, dass CD8+ Dendritische Zellen besonders effizient in der Präsentation extrazellulärer Antigene auf MHC Klasse I sind. Im Gegensatz dazu zeigten sich CD8- DCs effizienter in der Präsentation auf MHC Klasse II. Expressionsanalysen zu den Proteinen, welche an der MHC Klasse I beziehungsweise MHC Klasse II Prozessierung beteiligt sind, ergaben, dass CD8+ DCs Komponenten des MHC Klasse

I Prozessierungsweg stärker als CD8- DCs exprimieren, während die Expression MHC Klasse II assoziierter Proteine verstärkt in CD8- Dendritischen Zellen erfolgt (Dudziak, Kamphorst et al. 2007). Demnach besitzen tatsächlich nur CD8+ DCs die mechanistischen Komponenten, welche die Restriktion extrazellulärer Antigene gemäß des MHC I Klasse I Prozessierungswegs ermöglichen und somit die Fähigkeit CD8+ DCs zur Kreuzpräsentation gewährleisten. Kürzlich ist es gelungen, einen für die Entwicklung von CD8+ DCs essentiellen Transkriptionsfaktor zu identifizieren. Die Deletion des Transkriptionsfaktors BATF3 verhindert die Entwicklung von CD8+ Dendritischen Zellen, während die übrigen residenten DC Subtypen von dem Knockout unbeeinflusst bleiben (Hildner, Edelson et al. 2008). Dabei konnten Experimente in BATF3 defizienten Mäusen die wichtige Funktion CD8+ DCs in der Kreuzpräsentation und der damit verbundenen Induktion zytotoxischer T-Zell Antworten während viraler Infektionen und der Immunität gegenüber Tumoren unterstreichen. So waren Dendritische Zellen von BATF3 defizienten Mäusen nicht in der Lage, zelluläre Antigene aufzunehmen und CD8+ T-Zellen via Kreuzpräsentation zu primen. Als Folge dessen war die CTL-Antwort gegen eine West-Nil-Virus Infektion dramatisch reduziert, zudem war die Abstoßung von immunogenen Tumoren beeinträchtigt (Hildner, Edelson et al. 2008). Neben den Unterschieden zwischen den DC Subtypen in der Antigenpräsentation sowie der Expression der an der Antigenprozessierung beteiligten Proteine, konnte kürzlich nachgewiesen werden, dass die Expression des Chemokinrezeptors XCR1 ausschließlich auf CD8+ Dendritischen Zellen erfolgt (Dorner, Dorner et al. 2009). Ferner konnte gezeigt werden, dass XCL1, der Ligand von XCR1, die effiziente und spezifische Chemoattraktion CD8+ Dendritischer Zellen gewährleistet und in großen Mengen von CD8+ T-Zellen kurz nach Antigenbindung auf CD8+ DCs produziert wird. Dabei war die Proliferation und Zytotoxizität XCL1 defizienter transgener CD8+ T-Zellen, welche spezifisch für ein kreuzpräsentiertes Antigen waren, beeinträchtigt (Dorner, Dorner et al. 2009). Die selektive Chemoattraktion von CD8+ T-Zellen produziertem XCL1 auf XCR1 exprimierende CD8+ DCs sowie die Notwendigkeit von XCL für die Aktivierung CD8+ T-Zellen lässt auf die entscheidende Rolle CD8+ DCs in der Induktion funktioneller zytotoxischer Immunantworten schließen. Kreuzpräsentation spielt nicht nur eine entscheidende Rolle in der Immunität, das heißt im Kreuzpriming zytotoxischer T-Zell Antworten, sondern ebenfalls in der peripheren Toleranz Induktion. Die konstitutive Kreuzpräsentation gewebespezifischer Antigene durch Dendritische Zellen im immunologischen Steady State stellt dabei einen wichtigen Mechanismus peripherer CD8+ T-Zell Toleranz dar. Dies wurde insbesondere durch Experimente in transgenen Mäusen deutlich, die unter dem Insulin-Promotor konstitutiv Ovalbumin (OVA)

exprimierten, das als gewebespezifisches Autoantigen diente. Die Kreuzpräsentation von exogenem OVA auf MHC Klasse I Molekülen Dendritischer Zellen resultierte dabei in der Deletion adoptiv transferierter OVA spezifischer CD8⁺ T-Zellen (Kurts, Kosaka et al. 1997; Kurts, Cannarile et al. 2001). Ferner zeigen die gleichen transgenen Mäuse, in denen Dendritische Zellen zusätzlich keine gewebespezifischen Antigene kreuzpräsentieren können, eine beeinträchtigte Kreuztoleranz endogener CD8⁺ T-Zellen. Als Folge dessen akkumulieren autoreaktive CD8⁺ T-Zellen in der peripheren lymphatischen Organen (Luckashenak, Schroeder et al. 2008). Die bedeutende Funktion CD8⁺ Dendritischer Zellen im Kreuzpriming zytotoxischer T-Zell Antworten (Hildner, Edelson et al. 2008), sowie die Tatsache, dass ausschließlich CD8⁺ Dendritische Zellen die mechanistischen Voraussetzungen für die Kreuzpräsentation aufweisen (Schnorrer, Behrens et al. 2006; Dudziak, Kamphorst et al. 2007) und den Rezeptor für das von CD8⁺ T-Zellen produziertem Chemokin XCL exprimieren (Dorner, Dorner et al. 2009), lässt vermuten, dass CD8⁺ DCs in der Kreuztoleranz ebenfalls eine wichtige Funktion übernehmen. Experimente von Dudziak *et al.* zeigen, dass sich CD8⁺ DCs von CD8⁻ DC sowohl in der Aktivierung einer Immunantwort unterschieden als auch in der Induktion peripherer T-Zell Toleranz. So primten CD8⁺ DCs in Gegenwart des aktivierenden Stimulus Anti-CD40 primär zytotoxische T-Zellen, im Gegensatz dazu aktivierten CD8⁻ DCs vornehmlich CD4⁺ T-Zellen. Weiterhin tolerisierten CD8⁺ DCs vorwiegend MHC Klasse I restringierte OVA spezifische CD8⁺ T-Zellen, während CD8⁻ Dendritische Zellen hauptsächlich MHC Klasse II restringierte OVA spezifische CD4⁺ T-Zell Toleranz induzierten (Dudziak, Kamphorst et al. 2007). Daten aus dieser Arbeit konnten nun verdeutlichen, dass CD8⁺ Dendritische Zellen tatsächlich essentiell für die periphere Toleranz Induktion CD8⁺ T-Zellen sind. In transgenen Mäusen, in denen DIETER Mäuse mit BATF3 defizienten Mäusen, welche keine CD8⁺ DC Subpopulation entwickeln (Hildner, Edelson et al. 2008), kombiniert wurden, konnten wir zeigen, dass die Antigenpräsentation der transgen kodierten CTL-Epitope auf aktivierten CD8⁻ DC eine spezifische CTL-Antwort induziert. Im Gegensatz dazu war die Antigenpräsentation auf ruhenden CD8⁻ Dendritischen Zellen im immunologischen Steady State nicht in der Lage, periphere T-Zell Toleranz zu induzieren. Diesen Ergebnissen zufolge wird periphere T-Zell Toleranz lediglich durch CD8⁺ Dendritische Zellen induziert, nicht aber durch CD8⁻ Dendritische Zellen. Unterdessen sind die mechanistischen Voraussetzungen, welche es CD8⁺ Dendritischen Zellen gegenüber CD8⁻ DCs ermöglichen, periphere T-Zell Toleranz zu induzieren, völlig unklar. Da in DIETER Mäusen endogen exprimierte CD8⁺ T-Zell Epitope präsentiert werden und CD8⁻ Dendritische Zellen nach Anti-CD40 Stimulation spezifische CTLs primen, können mechanistische Unterschiede im Antigen

Prozessierungsweg und der Antigenpräsentation ausgeschlossen werden. Abzuklären bleiben hingegen intrinsische Effekte des Transkriptionsfaktors BATF3 in der CD8+ T-Zell Toleranz. Weitere Studien sind nötig, um die Gründe für die einzigartige Rolle der CD8+ Dendritischen Zellen in der Induktion peripherer T-Zell Toleranz zu identifizieren.

5. Literaturverzeichnis

Adachi, O., T. Kawai, K. Takeda, M. Matsumoto, H. Tsutsui, M. Sakagami, K. Nakanishi and S. Akira (1998). "Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function." Immunity **9**(1): 143-50.

Ahonen, C. L., C. L. Doxsee, S. M. McGurran, T. R. Riter, W. F. Wade, R. J. Barth, J. P. Vasilakos, R. J. Noelle and R. M. Kedl (2004). "Combined TLR and CD40 triggering induces potent CD8+ T cell expansion with variable dependence on type I IFN." J Exp Med **199**(6): 775-84.

Akira, S., S. Uematsu and O. Takeuchi (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." Cell **124**(4): 783-801.

Alvarez, D., E. H. Vollmann and U. H. von Andrian (2008). "Mechanisms and consequences of dendritic cell migration." Immunity **29**(3): 325-42.

Asseman, C., S. Mauze, M. W. Leach, R. L. Coffman and F. Powrie (1999). "An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation." J Exp Med **190**(7): 995-1004.

Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature **392**(6673): 245-52.

Bar-On, L. and S. Jung (2010). "Defining dendritic cells by conditional and constitutive cell ablation." Immunol Rev **234**(1): 76-89.

Belardelli, F., S. Gessani, E. Proietti, C. Locardi, P. Borghi, Y. Watanabe, Y. Kawade and I. Gresser (1987). "Studies on the expression of spontaneous and induced interferons in mouse peritoneal macrophages by means of monoclonal antibodies to mouse interferons." J Gen Virol **68 (Pt 8)**: 2203-12.

Benard, A., R. Ceredig and A. G. Rolink (2006). "Regulatory T cells control autoimmunity following syngeneic bone marrow transplantation." Eur J Immunol **36**(9): 2324-35.

Bennett, S. R., F. R. Carbone, F. Karamalis, R. A. Flavell, J. F. Miller and W. R. Heath (1998). "Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling." Nature **393**(6684): 478-80.

Berlin-Rufenach, C., F. Otto, M. Mathies, J. Westermann, M. J. Owen, A. Hamann and N. Hogg (1999). "Lymphocyte migration in lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1-deficient mice." J Exp Med **189**(9): 1467-78.

Biron, C. A., K. B. Nguyen, G. C. Pien, L. P. Cousens and T. P. Salazar-Mather (1999). "Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines." Annu Rev Immunol **17**: 189-220.

Boissonnas, A., A. Scholer-Dahirel, V. Simon-Blancal, L. Pace, F. Valet, A. Kissenpfennig, T. Sparwasser, B. Malissen, L. Fetler and S. Amigorena (2010). "Foxp3+ T cells induce perforin-dependent dendritic cell death in tumor-draining lymph nodes." Immunity **32**(2): 266-78.

Bonifaz, L., D. Bonnyay, K. Mahnke, M. Rivera, M. C. Nussenzweig and R. M. Steinman (2002). "Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility

complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance." J Exp Med **196**(12): 1627-38.

Bopp, T., C. Becker, M. Klein, S. Klein-Hessling, A. Palmetshofer, E. Serfling, V. Heib, M. Becker, J. Kubach, S. Schmitt, S. Stoll, H. Schild, M. S. Staeger, M. Stassen, H. Jonuleit and E. Schmitt (2007). "Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression." J Exp Med **204**(6): 1303-10.

Borsellino, G., M. Kleinewietfeld, D. Di Mitri, A. Sternjak, A. Diamantini, R. Giometto, S. Hopner, D. Centonze, G. Bernardi, M. L. Dell'Acqua, P. M. Rossini, L. Battistini, O. Rotzschke and K. Falk (2007). "Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression." Blood **110**(4): 1225-32.

Bullock, T. N. and H. Yagita (2005). "Induction of CD70 on dendritic cells through CD40 or TLR stimulation contributes to the development of CD8+ T cell responses in the absence of CD4+ T cells." J Immunol **174**(2): 710-7.

Cao, X., S. F. Cai, T. A. Fehniger, J. Song, L. I. Collins, D. R. Piwnica-Worms and T. J. Ley (2007). "Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance." Immunity **27**(4): 635-46.

Carpenter, A. C. and R. Bosselut (2010). "Decision checkpoints in the thymus." Nat Immunol **11**(8): 666-73.

Cederbom, L., H. Hall and F. Ivars (2000). "CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells." Eur J Immunol **30**(6): 1538-43.

Chinen, T., P. Y. Volchkov, A. V. Chervonsky and A. Y. Rudensky (2010). "A critical role for regulatory T cell-mediated control of inflammation in the absence of commensal microbiota." J Exp Med **207**(11): 2323-30.

Collison, L. W., C. J. Workman, T. T. Kuo, K. Boyd, Y. Wang, K. M. Vignali, R. Cross, D. Sehy, R. S. Blumberg and D. A. Vignali (2007). "The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function." Nature **450**(7169): 566-9.

Cooper, M. D. and M. N. Alder (2006). "The evolution of adaptive immune systems." Cell **124**(4): 815-22.

Corthay, A. (2009). "How do regulatory T cells work?" Scand J Immunol **70**(4): 326-36.

Deaglio, S., K. M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J. F. Chen, K. Enjoji, J. Linden, M. Oukka, V. K. Kuchroo, T. B. Strom and S. C. Robson (2007). "Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression." J Exp Med **204**(6): 1257-65.

Dejean, A. S., D. R. Beisner, I. L. Ch'en, Y. M. Kerdiles, A. Babour, K. C. Arden, D. H. Castrillon, R. A. DePinho and S. M. Hedrick (2009). "Transcription factor Foxo3 controls the magnitude of T cell immune responses by modulating the function of dendritic cells." Nat Immunol **10**(5): 504-13.

Delves, P. J. and I. M. Roitt (2000). "The immune system. First of two parts." N Engl J Med **343**(1): 37-49.

den Haan, J. M., S. M. Lehar and M. J. Bevan (2000). "CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo." J Exp Med **192**(12): 1685-96.

- Dorner, B. G., M. B. Dorner, X. Zhou, C. Opitz, A. Mora, S. Guttler, A. Hutloff, H. W. Mages, K. Ranke, M. Schaefer, R. S. Jack, V. Henn and R. A. Kroczek (2009). "Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8⁺ T cells." Immunity **31**(5): 823-33.
- Dudziak, D., A. O. Kamphorst, G. F. Heidkamp, V. R. Buchholz, C. Trumpheller, S. Yamazaki, C. Cheong, K. Liu, H. W. Lee, C. G. Park, R. M. Steinman and M. C. Nussenzweig (2007). "Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo." Science **315**(5808): 107-11.
- Fahlen, L., S. Read, L. Gorelik, S. D. Hurst, R. L. Coffman, R. A. Flavell and F. Powrie (2005). "T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ regulatory T cells." J Exp Med **201**(5): 737-46.
- Fassbender, M., B. Gerlitzki, N. Ullrich, C. Lupp, M. Klein, M. P. Radsak, E. Schmitt, T. Bopp and H. Schild (2010). "Cyclic adenosine monophosphate and IL-10 coordinately contribute to nTreg cell-mediated suppression of dendritic cell activation." Cell Immunol **265**(2): 91-6.
- Feil, R., J. Brocard, B. Mascrez, M. LeMeur, D. Metzger and P. Chambon (1996). "Ligand-activated site-specific recombination in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(20): 10887-90.
- Fontenot, J. D., M. A. Gavin and A. Y. Rudensky (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells." Nat Immunol **4**(4): 330-6.
- Fujii, S., K. Liu, C. Smith, A. J. Bonito and R. M. Steinman (2004). "The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation." J Exp Med **199**(12): 1607-18.
- Gallucci, S. and P. Matzinger (2001). "Danger signals: SOS to the immune system." Curr Opin Immunol **13**(1): 114-9.
- Garin, M. I., C. C. Chu, D. Golshayan, E. Cernuda-Morollon, R. Wait and R. I. Lechler (2007). "Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4⁺CD25⁺ T cells." Blood **109**(5): 2058-65.
- Gondek, D. C., L. F. Lu, S. A. Quezada, S. Sakaguchi and R. J. Noelle (2005). "Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism." J Immunol **174**(4): 1783-6.
- Gonzalez-Navajas, J. M., J. Lee, M. David and E. Raz (2012). "Immunomodulatory functions of type I interferons." Nat Rev Immunol **12**(2): 125-35.
- Gough, D. J., N. L. Messina, C. J. Clarke, R. W. Johnstone and D. E. Levy (2012). "Constitutive type I interferon modulates homeostatic balance through tonic signaling." Immunity **36**(2): 166-74.
- Green, D. R., N. Droin and M. Pinkoski (2003). "Activation-induced cell death in T cells." Immunol Rev **193**: 70-81.
- Grohmann, U., C. Orabona, F. Fallarino, C. Vacca, F. Calcinaro, A. Falorni, P. Candeloro, M. L. Belladonna, R. Bianchi, M. C. Fioretti and P. Puccetti (2002). "CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo." Nat Immunol **3**(11): 1097-101.

Hashimoto, D., J. Miller and M. Merad (2011). "Dendritic cell and macrophage heterogeneity in vivo." Immunity **35**(3): 323-35.

Hawiger, D., K. Inaba, Y. Dorsett, M. Guo, K. Mahnke, M. Rivera, J. V. Ravetch, R. M. Steinman and M. C. Nussenzweig (2001). "Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo." J Exp Med **194**(6): 769-79.

Hendriks, J., Y. Xiao and J. Borst (2003). "CD27 promotes survival of activated T cells and complements CD28 in generation and establishment of the effector T cell pool." J Exp Med **198**(9): 1369-80.

Hermans, I. F., J. D. Silk, U. Gileadi, M. Salio, B. Mathew, G. Ritter, R. Schmidt, A. L. Harris, L. Old and V. Cerundolo (2003). "NKT cells enhance CD4+ and CD8+ T cell responses to soluble antigen in vivo through direct interaction with dendritic cells." J Immunol **171**(10): 5140-7.

Hernandez, M. G., L. Shen and K. L. Rock (2007). "CD40-CD40 ligand interaction between dendritic cells and CD8+ T cells is needed to stimulate maximal T cell responses in the absence of CD4+ T cell help." J Immunol **178**(5): 2844-52.

Hildner, K., B. T. Edelson, W. E. Purtha, M. Diamond, H. Matsushita, M. Kohyama, B. Calderon, B. U. Schraml, E. R. Unanue, M. S. Diamond, R. D. Schreiber, T. L. Murphy and K. M. Murphy (2008). "Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity." Science **322**(5904): 1097-100.

Hoffmann, J. A., F. C. Kafatos, C. A. Janeway and R. A. Ezekowitz (1999). "Phylogenetic perspectives in innate immunity." Science **284**(5418): 1313-8.

Hou, B., B. Reizis and A. L. DeFranco (2008). "Toll-like receptors activate innate and adaptive immunity by using dendritic cell-intrinsic and -extrinsic mechanisms." Immunity **29**(2): 272-82.

Hsieh, C. S., Y. Liang, A. J. Tzysnik, S. G. Self, D. Liggitt and A. Y. Rudensky (2004). "Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors." Immunity **21**(2): 267-77.

Hsieh, C. S., Y. Zheng, Y. Liang, J. D. Fontenot and A. Y. Rudensky (2006). "An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires." Nat Immunol **7**(4): 401-10.

Huang, C. T., C. J. Workman, D. Flies, X. Pan, A. L. Marson, G. Zhou, E. L. Hipkiss, S. Ravi, J. Kowalski, H. I. Levitsky, J. D. Powell, D. M. Pardoll, C. G. Drake and D. A. Vignali (2004). "Role of LAG-3 in regulatory T cells." Immunity **21**(4): 503-13.

Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov (2002). "Innate immune recognition." Annu Rev Immunol **20**: 197-216.

Joffre, O., M. A. Nolte, R. Sporri and C. Reis e Sousa (2009). "Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity." Immunol Rev **227**(1): 234-47.

Johnson, S., Y. Zhan, R. M. Sutherland, A. M. Mount, S. Bedoui, J. L. Brady, E. M. Carrington, L. E. Brown, G. T. Belz, W. R. Heath and A. M. Lew (2009). "Selected Toll-like receptor ligands and viruses promote helper-independent cytotoxic T cell priming by upregulating CD40L on dendritic cells." Immunity **30**(2): 218-27.

- Josefowicz, S. Z., L. F. Lu and A. Y. Rudensky (2012). "Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function." Annu Rev Immunol **30**: 531-64.
- Jung, S., D. Unutmaz, P. Wong, G. Sano, K. De los Santos, T. Sparwasser, S. Wu, S. Vuthoori, K. Ko, F. Zavala, E. G. Pamer, D. R. Littman and R. A. Lang (2002). "In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens." Immunity **17**(2): 211-20.
- Kawabe, T., T. Naka, K. Yoshida, T. Tanaka, H. Fujiwara, S. Suematsu, N. Yoshida, T. Kishimoto and H. Kikutani (1994). "The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation." Immunity **1**(3): 167-78.
- Kawai, T. and S. Akira (2010). "The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors." Nat Immunol **11**(5): 373-84.
- Keir, M. E. and A. H. Sharpe (2005). "The B7/CD28 costimulatory family in autoimmunity." Immunol Rev **204**: 128-43.
- Keller, A. M., A. Schildknecht, Y. Xiao, M. van den Broek and J. Borst (2008). "Expression of costimulatory ligand CD70 on steady-state dendritic cells breaks CD8+ T cell tolerance and permits effective immunity." Immunity **29**(6): 934-46.
- Kim, J. M., J. P. Rasmussen and A. Y. Rudensky (2007). "Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice." Nat Immunol **8**(2): 191-7.
- Kontgen, F., G. Suss, C. Stewart, M. Steinmetz and H. Bluethmann (1993). "Targeted disruption of the MHC class II Aa gene in C57BL/6 mice." Int Immunol **5**(8): 957-64.
- Kratky, W., C. Reis e Sousa, A. Oxenius and R. Sporri (2011). "Direct activation of antigen-presenting cells is required for CD8+ T-cell priming and tumor vaccination." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(42): 17414-9.
- Kretschmer, K., I. Apostolou, D. Hawiger, K. Khazaie, M. C. Nussenzweig and H. von Boehmer (2005). "Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen." Nat Immunol **6**(12): 1219-27.
- Kuhn, R., J. Lohler, D. Rennick, K. Rajewsky and W. Muller (1993). "Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis." Cell **75**(2): 263-74.
- Kurts, C., M. Cannarile, I. Klebba and T. Brocker (2001). "Dendritic cells are sufficient to cross-present self-antigens to CD8 T cells in vivo." J Immunol **166**(3): 1439-42.
- Kurts, C., H. Kosaka, F. R. Carbone, J. F. Miller and W. R. Heath (1997). "Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells." J Exp Med **186**(2): 239-45.
- Kurts, C., B. W. Robinson and P. A. Knolle (2010). "Cross-priming in health and disease." Nat Rev Immunol **10**(6): 403-14.
- Lahl, K., C. Loddenkemper, C. Drouin, J. Freyer, J. Arnason, G. Eberl, A. Hamann, H. Wagner, J. Huehn and T. Sparwasser (2007). "Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease." J Exp Med **204**(1): 57-63.
- Le Bon, A. and D. F. Tough (2002). "Links between innate and adaptive immunity via type I interferon." Curr Opin Immunol **14**(4): 432-6.

Li, M. O., Y. Y. Wan and R. A. Flavell (2007). "T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation." Immunity **26**(5): 579-91.

Liang, B., C. Workman, J. Lee, C. Chew, B. M. Dale, L. Colonna, M. Flores, N. Li, E. Schweighoffer, S. Greenberg, V. Tybulewicz, D. Vignali and R. Clynes (2008). "Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II." J Immunol **180**(9): 5916-26.

Lienenklaus, S., M. Cornitescu, N. Zietara, M. Lyszkiewicz, N. Gekara, J. Jablonska, F. Edenhofer, K. Rajewsky, D. Bruder, M. Hafner, P. Staeheli and S. Weiss (2009). "Novel reporter mouse reveals constitutive and inflammatory expression of IFN-beta in vivo." J Immunol **183**(5): 3229-36.

Luckashenak, N., S. Schroeder, K. Endt, D. Schmidt, K. Mahnke, M. F. Bachmann, P. Marconi, C. A. Deeg and T. Brocker (2008). "Constitutive crosspresentation of tissue antigens by dendritic cells controls CD8+ T cell tolerance in vivo." Immunity **28**(4): 521-32.

Merad, M. and M. G. Manz (2009). "Dendritic cell homeostasis." Blood **113**(15): 3418-27.

Mombaerts, P., J. Iacomini, R. S. Johnson, K. Herrup, S. Tonegawa and V. E. Papaioannou (1992). "RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes." Cell **68**(5): 869-77.

Moran, A. E., K. L. Holzapfel, Y. Xing, N. R. Cunningham, J. S. Maltzman, J. Punt and K. A. Hogquist (2011). "T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse." J Exp Med **208**(6): 1279-89.

Muth, S., K. Schütze, H. Schild and H. C. Probst (2012). "Release of dendritic cells from cognate CD4+ T-cell recognition results in impaired peripheral tolerance and fatal cytotoxic T-cell mediated autoimmunity." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(23): 9059-64.

Oderup, C., L. Cederbom, A. Makowska, C. M. Cilio and F. Ivars (2006). "Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression." Immunology **118**(2): 240-9.

Ohashi, P. S., S. Oehen, K. Buerki, H. Pircher, C. T. Ohashi, B. Odermatt, B. Malissen, R. M. Zinkernagel and H. Hengartner (1991). "Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice." Cell **65**(2): 305-17.

Onishi, Y., Z. Fehervari, T. Yamaguchi and S. Sakaguchi (2008). "Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(29): 10113-8.

Pacholczyk, R., J. Kern, N. Singh, M. Iwashima, P. Kraj and L. Ignatowicz (2007). "Nonself-antigens are the cognate specificities of Foxp3+ regulatory T cells." Immunity **27**(3): 493-504.

Pandiyan, P., L. Zheng, S. Ishihara, J. Reed and M. J. Lenardo (2007). "CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells." Nat Immunol **8**(12): 1353-62.

- Parkin, J. and B. Cohen (2001). "An overview of the immune system." Lancet **357**(9270): 1777-89.
- Paust, S., L. Lu, N. McCarty and H. Cantor (2004). "Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(28): 10398-403.
- Pircher, H., P. Ohashi, G. Miescher, R. Lang, A. Zikopoulos, K. Burki, T. W. Mak, H. R. MacDonald and H. Hengartner (1990). "T cell receptor (TcR) beta chain transgenic mice: studies on allelic exclusion and on the TcR+ gamma/delta population." Eur J Immunol **20**(2): 417-24.
- Pooley, J. L., W. R. Heath and K. Shortman (2001). "Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells." J Immunol **166**(9): 5327-30.
- Pribila, J. T., A. C. Quale, K. L. Mueller and Y. Shimizu (2004). "Integrins and T cell-mediated immunity." Annu Rev Immunol **22**: 157-80.
- Probst, H. C., J. Lagnel, G. Kollias and M. van den Broek (2003). "Inducible transgenic mice reveal resting dendritic cells as potent inducers of CD8+ T cell tolerance." Immunity **18**(5): 713-20.
- Qureshi, O. S., Y. Zheng, K. Nakamura, K. Attridge, C. Manzotti, E. M. Schmidt, J. Baker, L. E. Jeffery, S. Kaur, Z. Briggs, T. Z. Hou, C. E. Futter, G. Anderson, L. S. Walker and D. M. Sansom (2011). "Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4." Science **332**(6029): 600-3.
- Read, S., V. Malmstrom and F. Powrie (2000). "Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation." J Exp Med **192**(2): 295-302.
- Renshaw, B. R., W. C. Fanslow, 3rd, R. J. Armitage, K. A. Campbell, D. Liggitt, B. Wright, B. L. Davison and C. R. Maliszewski (1994). "Humoral immune responses in CD40 ligand-deficient mice." J Exp Med **180**(5): 1889-900.
- Ridge, J. P., F. Di Rosa and P. Matzinger (1998). "A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell." Nature **393**(6684): 474-8.
- Rivas, M. N., Y. T. Koh, A. Chen, A. Nguyen, Y. H. Lee, G. Lawson and T. A. Chatila (2012). "MyD88 is critically involved in immune tolerance breakdown at environmental interfaces of Foxp3-deficient mice." J Clin Invest **122**(5): 1933-47.
- Rosenthal, A. S. and E. M. Shevach (1973). "Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. I. Requirement for histocompatible macrophages and lymphocytes." J Exp Med **138**(5): 1194-212.
- Rubtsov, Y. P., J. P. Rasmussen, E. Y. Chi, J. Fontenot, L. Castelli, X. Ye, P. Treuting, L. Siewe, A. Roers, W. R. Henderson, Jr., W. Muller and A. Y. Rudensky (2008). "Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces." Immunity **28**(4): 546-58.
- Sakaguchi, S., T. Yamaguchi, T. Nomura and M. Ono (2008). "Regulatory T cells and immune tolerance." Cell **133**(5): 775-87.

- Sallusto, F., J. Geginat and A. Lanzavecchia (2004). "Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance." Annu Rev Immunol **22**: 745-63.
- Sanchez, P. J., J. A. McWilliams, C. Haluszczak, H. Yagita and R. M. Kedl (2007). "Combined TLR/CD40 stimulation mediates potent cellular immunity by regulating dendritic cell expression of CD70 in vivo." J Immunol **178**(3): 1564-72.
- Sarris, M., K. G. Andersen, F. Randow, L. Mayr and A. G. Betz (2008). "Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition." Immunity **28**(3): 402-13.
- Schildknecht, A., S. Brauer, C. Brenner, K. Lahl, H. Schild, T. Sparwasser, H. C. Probst and M. van den Broek (2010). "FoxP3+ regulatory T cells essentially contribute to peripheral CD8+ T-cell tolerance induced by steady-state dendritic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(1): 199-203.
- Schildknecht, A., I. Miescher, H. Yagita and M. van den Broek (2007). "Priming of CD8+ T cell responses by pathogens typically depends on CD70-mediated interactions with dendritic cells." Eur J Immunol **37**(3): 716-28.
- Schnorrer, P., G. M. Behrens, N. S. Wilson, J. L. Pooley, C. M. Smith, D. El-Sukkari, G. Davey, F. Kupresanin, M. Li, E. Maraskovsky, G. T. Belz, F. R. Carbone, K. Shortman, W. R. Heath and J. A. Villadangos (2006). "The dominant role of CD8+ dendritic cells in cross-presentation is not dictated by antigen capture." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(28): 10729-34.
- Schoenberger, S. P., R. E. Toes, E. I. van der Voort, R. Offringa and C. J. Melief (1998). "T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions." Nature **393**(6684): 480-3.
- Schonbeck, U. and P. Libby (2001). "The CD40/CD154 receptor/ligand dyad." Cell Mol Life Sci **58**(1): 4-43.
- Schwartz, R. H. (2003). "T cell anergy." Annu Rev Immunol **21**: 305-34.
- Seddon, B. and D. Mason (1999). "Peripheral autoantigen induces regulatory T cells that prevent autoimmunity." J Exp Med **189**(5): 877-82.
- Segura, E. and J. A. Villadangos (2009). "Antigen presentation by dendritic cells in vivo." Curr Opin Immunol **21**(1): 105-10.
- Serra, P., A. Amrani, J. Yamanouchi, B. Han, S. Thiessen, T. Utsugi, J. Verdaguer and P. Santamaria (2003). "CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4+CD25+ T cells." Immunity **19**(6): 877-89.
- Shevach, E. M. (2009). "Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression." Immunity **30**(5): 636-45.
- Shi, Y., J. E. Evans and K. L. Rock (2003). "Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells." Nature **425**(6957): 516-21.
- Shortman, K. and Y. J. Liu (2002). "Mouse and human dendritic cell subtypes." Nat Rev Immunol **2**(3): 151-61.
- Smith-Garvin, J. E., G. A. Koretzky and M. S. Jordan (2009). "T cell activation." Annu Rev Immunol **27**: 591-619.

- Sporri, R. and C. Reis e Sousa (2005). "Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4⁺ T cell populations lacking helper function." Nat Immunol **6**(2): 163-70.
- Steinman, R. M. (2012). "Decisions about dendritic cells: past, present, and future." Annu Rev Immunol **30**: 1-22.
- Steinman, R. M. and Z. A. Cohn (1973). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution." J Exp Med **137**(5): 1142-62.
- Steinman, R. M. and Z. A. Cohn (1974). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro." J Exp Med **139**(2): 380-97.
- Steinman, R. M., D. Hawiger and M. C. Nussenzweig (2003). "Tolerogenic dendritic cells." Annu Rev Immunol **21**: 685-711.
- Suffner, J., K. Hochweller, M. C. Kuhnle, X. Li, R. A. Kroczeck, N. Garbi and G. J. Hammerling (2010). "Dendritic cells support homeostatic expansion of Foxp3⁺ regulatory T cells in Foxp3.LuciDTR mice." J Immunol **184**(4): 1810-20.
- Suri-Payer, E. and H. Cantor (2001). "Differential cytokine requirements for regulation of autoimmune gastritis and colitis by CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ T cells." J Autoimmun **16**(2): 115-23.
- Swiecki, M. and M. Colonna (2010). "Unraveling the functions of plasmacytoid dendritic cells during viral infections, autoimmunity, and tolerance." Immunol Rev **234**(1): 142-62.
- Tadokoro, C. E., G. Shakhar, S. Shen, Y. Ding, A. C. Lino, A. Maraver, J. J. Lafaille and M. L. Dustin (2006). "Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4⁺ T cells and dendritic cells in vivo." J Exp Med **203**(3): 505-11.
- Takahashi, T., Y. Kuniyasu, M. Toda, N. Sakaguchi, M. Itoh, M. Iwata, J. Shimizu and S. Sakaguchi (1998). "Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state." Int Immunol **10**(12): 1969-80.
- Tang, Q., J. Y. Adams, A. J. Tooley, M. Bi, B. T. Fife, P. Serra, P. Santamaria, R. M. Locksley, M. F. Krummel and J. A. Bluestone (2006). "Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice." Nat Immunol **7**(1): 83-92.
- Taniguchi, T. and A. Takaoka (2001). "A weak signal for strong responses: interferon-alpha/beta revisited." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(5): 378-86.
- Taraban, V. Y., S. Martin, K. E. Attfield, M. J. Glennie, T. Elliott, D. Elewaut, S. Van Calenbergh, B. Linclau and A. Al-Shamkhani (2008). "Invariant NKT cells promote CD8⁺ cytotoxic T cell responses by inducing CD70 expression on dendritic cells." J Immunol **180**(7): 4615-20.
- Taraban, V. Y., T. F. Rowley and A. Al-Shamkhani (2004). "Cutting edge: a critical role for CD70 in CD8 T cell priming by CD40-licensed APCs." J Immunol **173**(11): 6542-6.
- Thornton, A. M. and E. M. Shevach (1998). "CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production." J Exp Med **188**(2): 287-96.

Tivol, E. A., F. Borriello, A. N. Schweitzer, W. P. Lynch, J. A. Bluestone and A. H. Sharpe (1995). "Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4." Immunity **3**(5): 541-7.

Tovey, M. G., M. Streuli, I. Gresser, J. Gugenheim, B. Blanchard, J. Guymarho, F. Vignaux and M. Gigou (1987). "Interferon messenger RNA is produced constitutively in the organs of normal individuals." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(14): 5038-42.

Travis, M. A., B. Reizis, A. C. Melton, E. Masteller, Q. Tang, J. M. Proctor, Y. Wang, X. Bernstein, X. Huang, L. F. Reichardt, J. A. Bluestone and D. Sheppard (2007). "Loss of integrin alpha(v)beta8 on dendritic cells causes autoimmunity and colitis in mice." Nature **449**(7160): 361-5.

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

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

Waterhouse, P., J. M. Penninger, E. Timms, A. Wakeham, A. Shahinian, K. P. Lee, C. B. Thompson, H. Griesser and T. W. Mak (1995). "Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4-4." Science **270**(5238): 985-8.

Wing, K., Y. Onishi, P. Prieto-Martin, T. Yamaguchi, M. Miyara, Z. Fehervari, T. Nomura and S. Sakaguchi (2008). "CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function." Science **322**(5899): 271-5.

Zhu, J. and W. E. Paul (2010). "Heterogeneity and plasticity of T helper cells." Cell Res **20**(1): 4-12.

Zhu, J., H. Yamane and W. E. Paul (2010). "Differentiation of effector CD4 T cell populations (*)." Annu Rev Immunol **28**: 445-89.

Zinkernagel, R. M. and P. C. Doherty (1974). "Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system." Nature **248**(450): 701-2.

6. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AIRE	Autoimmune-Regulator
AMP	Adenosinmonophosphat
APC	Antigenpräsentierende Zellen
ATP	Adenosintriphosphat
α GalCer	α -Galactosylceramid
BATF	Basic leucine zipper transcription factor ATF-like
BSA	Rinderserum Albumin
β Gal	β -Galaktosidase
β Gal497	Aminosäuren 497-505 der β -Galaktosidase aus <i>E. coli</i>
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of differentiation
CTL	Zytotoxische T-Zelle
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
DC	Dendritische Zelle
DERERG	Depletion of regulatory T cells
DIETER	Dendritic cell specific inducible expression of t-cell epitopes after recombination
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DT	Diphtherie Toxin
DTR	Diphtherie Toxin Rezeptor
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	Fötales Kälberserum
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
GFP	Green fluorescent protein
GP33	Aminosäuren 33-41 des Glykoproteins von LCMV
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
HE	Hämatoxylin-Eosin
IDO	Indolamin 2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
IFNR	Interferon Rezeptor
IL-10	Interleukin-10

<i>i.p.</i>	intraperitoneal
iTregs	Induzierte regulatorische T-Zellen
<i>i.v.</i>	intravenös
LAG-3	Lymphozyten-Aktivations-Gen-3
LCMV	Lymphozytäre Choriomeningitis Virus
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
LN	Lymphknoten
MACS	Magnetic-activated cell sorting
MDA5	Melanoma Differentiation-Associated protein 5
MHC	Major histocompatibility complex
MyD88	Myeloiden Differenzierungs Faktor 88
NOD	Nucleotide Oligomerization Domain
NP396	Aminosäuren 396-404 aus dem Nukleoprotein von LCMV
nTregs	Natürliche regulatorische T-Zellen
OVA	Ovalbumin
PAMP	Pathogen Associated Molecular Patterns
pDCs	Plasmazytoide Dendritische Zellen
pfu	Plaque forming units
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PRR	Pathogen Recognition Receptor
RAG	Recombinase-Activating Gene
RIG1	Retinoic acid inducible gene 1
RNA	Ribonukleinsäure
TAM	Tamoxifen
TGF β	Transforming Growth Factor β
TIR	Toll-Interleukin-1 Rezeptor
TLR	Toll-like Rezeptor
Tregs	Regulatorische T-Zellen
TRIF	TIR-domian-containing adaptor inducin IFN- β Protein
TZR	T-Zell Rezeptor
WT	Wildtyp

7. Anhang

7.1 Eidesstattliche Erklärung

7.2 Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Muth S, Schütze K, Schild H, Probst HC „Release of dendritic cells from cognate CD4+ T-cell recognition results in impaired peripheral tolerance and fatal cytotoxic T-cell mediated autoimmunity“

Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Jun 5;109(23):9059-64

Publikationen, die während der Doktorarbeit angefertigt wurden:

Gupta A, Probst HC, Vuong V, Landshammer A, Muth S, Yagita H, Schwendener R, Pruschy M, Knuth A, van den Broek M. „Radiotherapy Promotes Tumor-Specific Effector CD8+ T Cells via Dendritic Cell Activation“

J Immunol. 2012 Jul 15;189(2):558-66

Schildknecht A, Brauer S, Brenner C, Lahl K, Schild H, Sparwasser T, Probst HC, van den Broek M. „FoxP3+ regulatory T cells essentially contribute to peripheral CD8+ T-cell tolerance induced by steady-state dendritic cells“.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Jan 5;107(1):199-203

Weitere Publikationen

Muth S, Fries A, Gimpl G. „Cholesterol-induced conformational changes in the oxytocin receptor“

Biochem J. 2011 Aug 1;437(3):541-53

Gimpl G, Reitz J, Brauer S, Trossen C. „Oxytocin receptors: ligand binding, signalling and cholesterol dependence“

Prog Brain Res. 2008;170:193-204. Review.

7.3 Lebenslauf

Danksagung