

Funktionelle Analyse professioneller antigenpräsentierender Zellen in der murinen Haut

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

im Promotionsfach biomedizinische Chemie
am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

vorgelegt von

Felix Melchior

geboren am 08.11.1982 in Mainz

Mainz, den 08.09.2020

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2020

VERSICHERUNG

für das Gesuch um Zulassung zur Promotion in dem Fachbereich 09

Hiermit versichere ich gemäß § 10 Abs. 3d der Promotionsordnung vom 24.07.2007

a) Ich habe die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit selbst angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel (Literatur, Apparaturen, Material) in der Arbeit angegeben.

b) Ich habe oder hatte die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht.*

~~Ich hatte die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit als Prüfungsarbeit für folgende Prüfungen eingereicht.*~~

(Bezeichnung der Prüfung)

(Bezeichnung und Ort der Prüfungsstelle)

c) Ich hatte weder die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit noch Teile davon bei einer anderen Fakultät bzw. einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht.*

~~Ich hatte die folgende Abhandlung mit nachstehendem Ergebnis als Dissertation eingereicht*:~~

(Titel der Abhandlung)

(Fakultät bzw. Fachbereich und Hochschule)

(Ergebnis bzw. Beurteilung)

* Nichtzutreffendes bitte streichen

Mainz, den 08.09.2020

Datum

Unterschrift

Es ist einfacher ein Atom zu zerstören, als ein Vorurteil.

Albert Einstein

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
4-OHT	4-Hydroxytamoxifen / 4OH-Tamoxifen
ACK	Ammonium-Chloride-Potassium
ALN	aurikulare Lymphknoten
APC	<i>antigen presenting cell</i>
AS	Aminosäure
B-Zellen	<i>bursa fabricii</i> -Zellen
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
BLN	brachiale Lymphknoten
BMC	<i>bone marrow chimera</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CCR	<i>C-C chemokine receptor type</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDC	<i>conventional DC</i>
CFSE	<i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>
CLIP	Class II-associated invariant chain peptide
CO ₂	Kohlendioxid
CTL	<i>cytotoxic T lymphocytes</i>
DC	<i>dendritic cells</i> (dendritische Zellen)
DDC	<i>dermal dendritic cells</i> (dermale dendritische Zellen)
DIETER	<i>dendritic cell specific inducible expression of t-cell epitopes after recombination</i>
dLN	drainierende Lymphknoten
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DNFB	1-Fluoro-2,4-dinitrobenzol)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DT	Diphtherie Toxin
EDTA	Ethylendiamidtetraessigsäure
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EpCAM	<i>epithelial cell-adhesion molecule</i>
ESL	E-Selektin Ligand
EtOH	Ethanol
FACS	Durchflusszytometrie (engl. <i>Fluorescence-activated cell sorting</i>)
FCS	<i>fetal calf serum</i>

fwd/F	<i>forward</i>
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GP	Glycoprotein
HBSS	Hanks` Balanced Salt Solution
hi	high
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILN	inguinale Lymphknoten
IMDM	Iscoe`s Modified Dulbecco`s Medium
INF	Interferon
int	intermediate
LC	<i>langerhans cells</i> (Langerhans-Zellen)
LCMV	<i>Lymphocytic Choriomeningitis Virus</i>
LPS	Lipopolysaccharide
lo	low
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
MBMC	<i>mixed bone marrow chimera</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
MLN	mesenteriale Lymphknoten
moDC	<i>monocyte-derived DC</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
ndLN	nicht drainierende Lymphknoten
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NLT	<i>non lymphatic tissue</i>
NP	Nucleoprotein
ns	not significant
OVA	Ovalbumin
PAMP	<i>pathogen associated molecular patterns</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pDC	<i>plasmacytoid DC</i>
pfu	<i>plaque-forming unit</i>
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
PSL	P-Selektin Ligand
qPCR	Real-Time-quantitative-PCR
rcf	<i>relative centrifugal force</i>

rev/R	<i>reverse</i>
RFP	<i>red fluorescence protein</i>
RFU	<i>relative fluorescence units</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s.s.	<i>skin scarification</i>
sdLN	Hautdrainierende Lymphknoten
SDQ	Swiss Dirty Quick
SLO	sekundäre lymphatische Organe
T-Zellen	Thymus-Zellen
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TAM	Tamoxifen
TBE	TRIS-Borat-EDTA
T _{CM} -Zellen	<i>central memory T-cells</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i>
T _{EF} -Zellen	<i>effector T cells</i>
T _{EM} -Zellen	<i>effector memory T-cells</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
T _{RM} -Zellen	<i>tissue-resident memory T-cells</i>
U	<i>Unit</i>
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
VE	voll entmineralisiert
VV	<i>Vaccinia Virus</i>
WT	Wildtyp

Zusammenfassung

Die Haut stellt eine der größten Barriere unseres Körpers gegen die Umwelt dar. Die Haut ist nicht nur eine physikalische Barriere, sondern ist mit zahlreichen Zellen des Immunsystems durchsetzt, die uns stetig vor Pathogenen wie Viren, Bakterien, Pilzen und Parasiten schützt.

Dendritische Zellen (DCs), die durch ihre einzigartige Fähigkeit der Induktion und Regulation der T-Zell Antwort als professionelle antigenpräsentierende Zellen (APCs) bezeichnet werden, bilden das Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität und sind mit fünf Subpopulationen in Epidermis und Dermis vertreten.

In dieser Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss einzelne Subtypen der dermalen DC (dDC) oder Keratinozyten hinsichtlich des Primings einer protektiven spezifischen T-Zell Antwort und der Induktion von hautresidenten Memory T-Zellen haben. Hierzu haben wir transgene Mausstämme verwendet, in denen einzelne Subtypen von DCs fehlen oder depletiert werden können, die mit unserem transgenen Mausmodell verpaart wurden, welches die selektive Präsentation eines MHC Klasse I restringierten Modell T-Zell Epitops auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen der Haut erlaubt. Außerdem bedienen wir uns eines weiteren Mausmodells, das die Expression des T-Zell Epitopes auf Keratinozyten (KCs) ermöglicht.

Wir konnten zeigen, dass sowohl konventionelle DCs (cDCs) als auch monozytäre DCs (moDCs) eine kräftige zytotoxische T-Zell Antwort induzieren können, die protektiv gegen eine lokale Virusinfektion der Haut ist. Außerdem haben wir ein System entwickelt, das durch die Expression der transgenen Antigene auf KCs, die Rolle der KCs bei der Induktion von zytotoxischen T-Zell Antwort zu untersuchen erlaubt.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass jeder einzelne Subtyp der dDCs und die KCs durch lokale Antigen Präsentation dazu in der Lage sind, die Entstehung und Retention von hautresidenten Memory (T_{RM}) $CD8^+$ T-Zellen positiv zu beeinflussen.

Abstract

The skin is the largest barrier of our body towards the environment. Besides being a physical boundary extensive numbers of immune cells are located in the skin, which protect us from pathogens such as virus, bacteria, fungi and parasites.

Dendritic cells (DCs) are professional antigen presenting cells (APCs) constitute the link between innate and adaptive immunity, by inducing and regulating T-cell responses. Based on surface marker expression, five different subpopulations of DC in the skin have been described.

In this work we investigated, which function the single subtypes of the dermal DCs (dDCs) or Keratinozytes (KCs) regarding priming a protective specific t-cell response and induction of skin resident memory t-cells have. Therefore, we crossed multiple knockout or depletable mouse lines to our transgenic mouse modell, which allows selective presentation of MHC class I restricted modell t-cell epitopes on professional antigen presenting cells in the skin. In addition, we used another mouse modell, which enables the expression of the t-cell epitopes on KCs.

We were able to show, that both conventional DCs (cDCs) and monocyte derived DCs (moDCs) have the ability for inducing a solid GP₃₃₋₄₁ specific t-cell response, that is protective for a local infection with *Vaccina Virus* GP₃₃₋₄₁. Also we established a system which allows us to examine the role of KCs in the induction of a cytotoxic t-cell response by expression of the transgen antigens on KCs.

Furthermore, we demonstrated that each single dDCs subtype and KCs, feature the ability to induce skin resident memory CD8⁺ t-cells and play a role in their retention by local presentation of the antigen.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	V
ZUSAMMENFASSUNG	VIII
ABSTRACT.....	IX
1. EINLEITUNG.....	1
1.1 DAS IMMUNSYSTEM	1
1.1.1 <i>Die Zellen des Immunsystems</i>	2
1.1.2 <i>Das angeborene Immunsystem</i>	3
1.1.3 <i>Das adaptive Immunsystem</i>	4
1.2 DENDRITISCHE ZELLEN	6
1.2.1. <i>Dendritische Zellen der Haut</i>	10
1.2.1.1 Langerhans Zellen (LCs).....	13
1.2.1.2 Konventionelle dendritische Zellen (cDCs).....	15
1.2.1.2.1 Konventionelle dendritische Zellen Typ I (cDC1s).....	15
1.2.1.2.2 Konventionelle dendritische Zellen Typ 2 (cDC2s).....	16
1.2.1.3 Monozytäre dendritische Zellen (moDCs)	17
1.2.1.4 Makrophagen.....	18
1.2.1.5 Plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs).....	18
1.3 KERATINOZYTEN.....	19
1.4 ANTIGEN-PROZESSIERUNG, -PRÄSENTATION UND KREUZPRÄSENTATION	22
1.4.1 <i>MHC-Klasse I und II-Moleküle</i>	22
1.4.2 <i>Cross-presentation</i>	23
1.5 T-ZELLEN	25
1.5.1 <i>Memory T-Zellen</i>	26
1.5.1.1 Hautresidente Memory CD8 ⁺ T-Zellen (T _{RM} S)	27
2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT	30
3. MATERIAL UND METHODE	32
3.1 MATERIAL	32
3.1.1 <i>Plastik- und Glaswaren</i>	32
3.1.2 <i>Geräte und Hilfsmittel</i>	33
3.1.3 <i>Chemikalien</i>	34
3.1.4 <i>Puffer</i>	36
3.1.5 <i>Medien</i>	37
3.1.6 <i>Medienzusätze</i>	37
3.1.7 <i>Medien für Zellkulturen</i>	38
3.1.8 <i>Enzyme</i>	38
3.1.9 <i>Kits</i>	39
3.1.10 <i>Oligonukleotide / Primer</i>	39

3.1.11 Antikörper	40
3.1.12 Zelllinien	43
3.1.13 Virus	43
3.1.14 Mausstämme	43
3.1.14.1 C57BL/6J (Wildtyp-Stamm)	43
3.1.14.2 C57BL/6J, Ly5.1 (B6.SJL-Ptprca ^a Pepcb ^b /BoyJ)	43
3.1.14.3 C57BL/6J, Thy1.1 (B6.PL-Thy1 ^a /CyJ)	44
3.1.14.4 CD11cCreER _T X ST33 (DIETER)	44
3.1.14.5 P14 (B6;D2-Tg(TcrLCMV)327Sdz/JDvsJ)	45
3.1.14.6 Nur77GFP (C57BL/6-Tg(Nr4a1-EGFP/cre)820Khog/J)	45
3.1.14.7 Langerin-DTR (B6.Cd207 ^{tm1(DTR/GFP)Bjec})	45
3.1.14.8 Batf3 ^{-/-} (B6.129S(C)-Batf3 ^{tm1Kmm} /J)	45
3.1.14.9 Flt3 ^{-/-} (B6.129-Flt3 ^{tm1Dgg} /J)	46
3.1.14.10 Ccr2 ^{-/-} (B6.129S4-Ccr2 ^{tm1ffc} /J)	46
3.1.15.11 Rosa26RFP (Gt(ROSA)26Sortm1Hjf)	46
3.1.14.12 H2-D ^{b/-} (B6.129P2-H2-Db ^{tm1} N12)	46
3.1.14.13 K14Cre (B6.Tg(K14-cre/ERT)61Gkl) X ST33 (K14-DIETER)	47
3.2 METHODE	48
3.2.1 Zellbiologische Methoden	48
3.2.1.1 Zellkultur	48
3.2.1.2 Auftauen von Zellen	48
3.2.1.3 Kultivieren von Zellen	48
3.2.1.4 Einfrieren von Zellen	49
3.2.1.5 Bestimmung der Lebendzellzahl	49
3.2.2 Molekularbiologische Methoden	50
3.2.2.1 Verdau von Gewebe für PCR	50
3.2.2.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)	50
3.2.2.3 DNA Agarosegelelektrophorese	52
3.2.2.4 Arbeiten mit Virus	52
3.2.2.4.1 Gewinnung großer Mengen des <i>Vaccinia Virus</i>	52
3.2.2.4.2 Virustiterbestimmung mittels Plaque Assay	53
3.2.2.4.3 Infektion der Tiere mit <i>Vaccinia Virus</i> via skin scarification (s.s.) "poking"	54
3.2.2.4.4 Virustiterbestimmung in der Haut	54
3.2.3 Isolation von Zellen und deren Aufarbeitung	54
3.2.3.1 Entnahme der Ohren und Verdau zur Isolation der T-Lymphozyten	54
3.2.3.2 Entnahme der Ohren und Verdau zur Isolation der dendritischen Zellen	55
3.2.3.3 Isolation der T-Lymphozyten und dendritischen Zellen aus Milz und Lymphknoten	56
3.2.3.4 Trennung von T-Zellen durch Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)	57
3.2.3.5 Färben der Zellen für die Durchflusszytometrie	58
3.2.4 Arbeiten mit Tieren	59
3.2.4.1 Blutentnahme bei Mäusen	59
3.2.4.2 Blutproben Aufarbeitung und Lyse der Erythrozyten	59

3.2.4.3 Genotypisierung der transgenen Mäuse und Validierung gemischter Knochenmarkschimäre im Blut	59
3.2.4.4 Generierung von Knochenmarkschimären	60
3.2.4.5 Betäuben von Mäusen mit Ketamin/Xylazin	61
3.2.4.6 Adoptiver T-Zell Transfer	61
3.2.4.7 Depletion von Langerin ⁺ Zellen mittels Diphtherie Toxin	61
3.2.4.8 Behandlungen mit 4OH-Tamoxifen (4-OHT), Tamoxifen (TAM), Injektion von anti-CD40 und Auftragung von DNFB	62
4. ERGEBNISSE	63
4.1 DIFFERENZIERUNG UND IDENTIFIKATION DER EINZELNEN DERMALEN DC SUBTYPEN MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE	63
4.2 ANTI-CD40 ERHÖHT DIE MOBILISIERUNG VON LANGERHANS ZELLEN UND DIE MIGRATION DER DERMALEN DENDRITISCHEN ZELLEN ZU DEN DRAINIERENDEN LYMPHKNOTEN BEI 4OH-TAMOXIFEN BEHANDELTEN MÄUSEN	66
4.3 VERGLEICH DER EFFIZIENZ DER CRE AKTIVIERUNG IN DERMALEN DC SUBSETS VON CD11cCreERT MÄUSEN NACH TOPISCHER ODER SYSTEMISCHER TAMOXIFEN-APPLIKATION	69
4.4 ETABLIERUNG EINES MODELLSYSTEMS ZUR FUNKTIONELLEN ANALYSE EINZELNER SUBPOPULATIONEN DERMALER DENDRITISCHER ZELLEN	73
4.5 IM DIETER MODELL KANN EINE KREUZPRÄSENTATION ZWISCHEN DCs AUSGESCHLOSSEN WERDEN..	79
4.6 CD207 ⁻ DERMAL DCs KÖNNEN <i>SKIN HOMING</i> CD8 ⁺ T-ZELLEN PRIMEN, WELCHE SICH BEI LOKALER ENTZÜNDUNG ZU HAUTRESIDENTEN MEMORY T-ZELLEN (T _{RMS}) ENTWICKELN	81
4.7 SOWOHL DERMAL KONVENTIONELLE ALS AUCH DERMAL MONOZYTÄRE DENDRITISCHE ZELLEN KÖNNEN EINE SPEZIFISCHE ZYTOTOXISCHE T-ZELL ANTWORT INDUZIEREN, DIE GEGEN EINE VIRUSINFEKTION DER HAUT PROTEKTIEREN	83
4.8 LOKALE ANTIGEN PRÄSENTATION IN DER HAUT VON moDCs ALLEINE IST AUSREICHEND FÜR DIE DIFFERENZIERUNG UND ERHALTUNG VON HAUTRESIDENTEN MEMORY T-ZELLEN (T _{RMS})	86
4.9 DIE EXPRESSION DES TRANSGENEN ANTIGENS AUF KERATINOZYTEN FÜHRT ZUM PRIMING GP ₃₃₋₄₁ SPEZIFISCHE CD8 ⁺ T-ZELLEN, DIESE VERMITTELN JEDOCH KEINE EFFIZIENTE PROTEKTION GEGEN REKOMBINANTES GP ₃₃₋₄₁ EXPRIMIERENDES <i>VACCINIA</i> (S.S.)	89
4.10 DIE ANTIGEN EXPRESSION AUF KERATINOZYTEN TRÄGT ZUR INDUKTION UND ERHALTUNG VON HAUTRESIDENTEN MEMORY T-ZELLEN (T _{RMS}) BEI	92
5. DISKUSSION	94
5.1 DIE TOPIKALE GABE VON 4-HYDROXYTAMOXIFEN INDUZIERT DIE PRÄSENTATION DER DIETER ANTIGENE AUSSCHLIEßLICH AUF DERMALEN DENDRITISCHEN ZELLEN	97
5.2 ALLE SUBTYPEN DER DERMALEN DENDRITISCHEN ZELLEN SIND IN DER LAGE, EINE PROTEKTIVE SPEZIFISCHE T-ZELL ANTWORT ZU INDUZIEREN	102
5.3 INDUKTION UND ERHALT HAUTRESIDENTER MEMORY CD8 ⁺ T-ZELLEN DURCH LOKALE ANTIGEN PRÄSENTATION DER DERMALEN DENDRITISCHEN ZELLEN	105

5.4 DER EINFLUSS DER ANTIGEN EXPRESSION IN KERATINOZYTEN AUF DAS PRIMING SPEZIFISCHER CD8 ⁺ T-ZELLEN SOWIE AUF DIE INDUKTION UND BEIBEHALTUNG VON HAUTRESIDENTEN MEMORY CD8 ⁺ T-ZELLEN	109
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	115
7. ANHANG.....	A
7.1 PUBLIKATIONEN.....	A

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem setzt sich aus dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem zusammen. Es dient als Schutz vor einer Vielzahl von Mikroorganismen, die uns in unserer Umwelt umgeben und in vier Klassen unterteilt werden - Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten. Verschiedene Effektorzellen und Moleküle des Immunsystems helfen uns ständigen Infektionen zu entgehen und schirmen uns gegenüber Krankheitserregern und den von diesen verursachten Schäden ab.

Überwindet ein Pathogen die erste Schutzbarriere des Körpers wird sofort eine zelluläre und humorale Immunantwort des angeborenen Immunsystems ausgelöst. Diese Immunreaktion wird auf zellulärer Ebene über Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen, Monozyten und NK-Zellen sowie auf humoraler Ebene durch das Komplementsystem, Interferone, Lysozyme und Defensine vermittelt. Gegen viele Pathogene leitet das angeborene Immunsystem eine sofortige und effiziente Immunantwort ein, welche jedoch unspezifisch ist (Janeway & Medzhitov, 2002; Lo et al., 1988). Das adaptive Immunsystem zeichnet sich im Vergleich dazu durch seine hohe Spezifität und große Diversität an Antigenrezeptoren aus (Cooper & Alder, 2006). Die adaptive Immunantwort benötigt 7-8 Tage für seine Entwicklung und ist an der Ausbildung des immunologischen Gedächtnisses beteiligt (Ochsenbein et al., 2002; Wherry et al., 2003). Zu den Effektorzellen des adaptiven Immunsystems gehören die T-Zellen und B-Zellen, den humoralen Teil bilden Antikörper und Zytokine.

Eine besondere Rolle der Zellen des Immunsystems nehmen die dendritischen Zellen ein, die als professionelle antigenpräsentierende Zellen das Bindeglied zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem darstellen.

1.1.1 Die Zellen des Immunsystems

Ursprung fast aller Zellen des Immunsystems sind die pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Diese differenzieren sich zu Erythrozyten, Thrombozyten und in die lymphoiden als auch myeloiden Vorläuferzellen (Orkin & Zon, 2008). Einzig die Langerhans-Zellen (LC) haben keinen hämatopoetischen Ursprung und entwickeln sich im Dottersack sowie in der fötalen Leber (Chorro et al., 2009).

Im Knochenmark entwickeln sich aus der gemeinsamen myeloiden Vorläuferzelle zum einen Granulozyten-Makrophagen-Vorläuferzellen, die im Blut zu neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten und unreife dendritische Zellen ausreifen. Außerdem entstehen im Blut aus Granulozyten-Makrophagen-Vorläuferzellen die Pre-Mastzellen und Pre-Monozyten, die sich zu gewebständigen Mastzellen und Monozyten entwickeln (Orkin & Zon, 2008). Zum anderen sind myeloide Vorläuferzellen im Knochenmark Ursprung der Megakaryocyten-Erythrozyten-Vorläuferzellen, die sich im Knochenmark zu Megakaryocyten und Erythroblasten entwickeln und anschließend im Blut zu Thrombozyten und Erythrozyten ausdifferenzieren (Orkin & Zon, 2008).

Auch die Lymphopoese startet aus einer oligopotenten lymphatischen Stammzelle im Knochenmark. Pro-B-Zellen reifen im Knochenmark zu B-Lymphozyten und wandern in die lymphatischen Organe ein oder zirkulieren im Blut. Auch Vorläufer der natürlichen Killerzellen (NK) verlassen nach ihrer Reifung zu NK Zellen das Knochenmark und zirkulieren im Blutkreislauf. Pro-T-Zellen wandern aus dem Knochenmark in den Thymus. Hier reifen und differenzieren sie zu T-Lymphozyten bevor sie in die sekundären lymphatischen Organe einwandern (Orkin & Zon, 2008). DCs können sich sowohl aus lymphoiden als auch aus myeloiden Vorläuferzellen entwickeln (Poltorak & Schraml, 2015). Eine *fate-mapping* Studie zeigte, dass circa 10% der DCs aus lymphatischen Stammzellen entstehen und circa 90% ihren Ursprung in myeloiden Vorläuferzellen haben (Schlenner et al., 2010).

1.1.2 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem leitet gegenüber Pathogenen, die das schützende Oberflächenepithel überwunden haben, eine erste wirksame und sofortige Abwehrreaktion ein. Es umfasst physikalische und chemische Barrieren sowie lösliche Stoffe (Akute-Phase-Proteine, Zytokine, Chemokine und das Komplementsystem) und Immunzellen.

Makrophagen, neutrophile Granulozyten und DCs erkennen mit ihren in der Keimbahn codierten *pattern recognition receptors* (PRR), Mikroorganismen anhand evolutionär konservierter Strukturen, die als *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) bezeichnet werden. Hierbei handelt es sich beispielsweise um DNA und RNA von Viren und Bakterien sowie um Lipid- und Proteinbestandteile verschiedener mikrobieller Oberflächenmoleküle. Die Zellen des angeborenen Immunsystems sind polyklonal, was dazu führt, dass die angeborene Immunität von einem begrenzten und nicht wandlungsfähigen Repertoire von Rezeptoren abhängig ist.

Die PPRs befinden sich entweder auf der Oberfläche der Membran wie *toll-like-* und *C-type lectin-*Rezeptoren (TLRs, CLRs) oder befinden sich im Cytoplasma wie *Nod-like-* und *RIG-I-like-*Rezeptoren (NLRs, RLRs) (Kumar, Kawai, & Akira, 2011). Die Familie der *toll-like-*Rezeptoren (TLR) ist eine große transmembrane Untergruppe der PPRs, die auf Makrophagen und anderen Immunzellen zu finden ist. So erkennt TLR2 unter anderem die Lipoproteine (LPSs) von grampositiven Bakterien und Mykoplasten, was zu einer Ausschüttung einer Reihe von Zytokinen führt. TLR4 wiederum bindet LPS von gramnegativen Bakterien (Takeuchi et al., 1999). Mannose-, Glucan-, Scavenger-Rezeptoren erkennen Kohlenhydratstrukturen die auf Zellwänden von Bakterien, Hefen und Pilzen zu finden sind (Hoving, Wilson, & Brown, 2014; Zani et al., 2015). Die beiden intrazellulären NOD-like-Rezeptoren (NLRs) NOD1 und NOD2 erkennen Peptidoglycane von grampositiven und -negativen Bakterien, welche nicht extrazellulär erkannt werden konnten und in die Zelle eingedrungen sind (Girardin et al., 2003). Mitglieder der NLR Familie sowie das Interferon induzierende Protein AIM2 sind auch an der Bildung von großen Caspase-1 aktivierenden Multiprotein Komplexen beteiligt, die als Inflammasomen bezeichnet werden (Schroder & Tschopp, 2010). Die Aktivierung der Caspase-1 führt zur Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-

1 β und IL-18, weshalb Inflammasomen eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunität spielen (Martinon, Burns, & Tschopp, 2002).

Wird ein Pathogen von einem PRR der antigenpräsentierenden Zellen (APCs) erkannt, können APCs mit diversen Mechanismen zur Verteidigung gegen das Pathogen beitragen. APCs können Pathogene durch Phagozytose und Opsonierung unschädlich machen. Durch die Ausschüttung von Zytokine, Chemokine und weiteren Mediatoren werden Effektorzellen in das Entzündungsgebiet rekrutiert oder bewirken die Differenzierung von Zellen des angeborenen Immunsystems, um den Eindringling zu eliminieren (Janeway & Medzhitov, 2002).

Eine entscheidende Rolle in der Verbindung zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem spielen die DCs. Sie sind als einzige Zellen des angeborenen Immunsystems dazu in der Lage, nach Aufnahme von Antigenen, in die sekundären lymphatischen Organe zu migrieren, wo sie durch Präsentation der Antigene naive T-Lymphozyten primen, die anschließend zu reifen Effektorzellen differenzieren (Steinman & Hemmi, 2006).

1.1.3 Das adaptive Immunsystem

Die adaptive Immunantwort zeichnet sich durch ihre große Anpassungsfähigkeit gegenüber neuen oder veränderten Krankheitserregern aus. Adaptive Immunität wird im Laufe des Lebens erworben und es kommt zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses. Dies führt zu einer schnellen und effektiven Immunantwort bei einer erneuten Infektion mit dem identischen Pathogen.

Das adaptive Immunsystem wird durch die T- und B-Zellen vermittelt und in die durch B-Zellen medierte humorale Immunität sowie die durch T-Zellen medierte zellvermittelte Immunität unterteilt. Die große Antigenpezifität und Diversität des adaptiven Immunsystems wird durch verschiedene Mechanismen in der Lymphozytenentwicklung generiert, die 7-8 Tage in Anspruch nimmt. Dabei durchlaufen Lymphozyten eine Rekombination vieler Gensegmente (*combinatorial diversity*) (Grawunder, West, & Lieber, 1998) und die *junctional diversity*, die den Ein- und Ausbau zusätzlicher Nukleotide beschreibt (Jeske, Jarvis, Milstein, & Capra, 1984). Bei B-Zellen kann es zusätzlich in der Keimzentrumsreaktion durch Mutationen

in den Genen der variablen Teile der Antikörper zu neuen Generationen von B-Zellen kommen – ein Prozess, der als somatische Hypermutation bezeichnet wird (Moran et al., 2007). Die so entstandenen Antigenrezeptoren des adaptiven Immunsystems bilden den wesentlichen Unterschied zum angeborenen Immunsystem, das bedingt durch die in der Keimbahn codierten PPRs nur über ein begrenztes Repertoire an Rezeptoren verfügt. Das adaptive Immunsystem erkennt Pathogene mittels Antigenrezeptoren, die hochspezifisch für eine einzige Struktur sind (Cooper & Alder, 2006). Nur Lymphozyten, die auf ein Antigen treffen für das ihr Rezeptor spezifisch ist und kostimulatorische Moleküle und Zytokine zugegen sind, werden aktiviert, um zu proliferieren und sich zu Effektor-Zellen zu differenzieren. Diese bekämpfen die Infektion sehr effektiv und gehen bis auf wenige Gedächtniszellen nach erfolgreicher Verteidigung des Organismus in Apoptose.

1.2 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen wurden erstmals Mitte der 1970er Jahre von Ralph Steinmann beschrieben, der in der murinen Milz eine Subpopulation von Zellen beobachtete, die eine auffällige verzweigte Form zeigten (Cohn & Steinman, 1973). Bereits 1868 entdeckte Paul Langerhans in der Epidermis ähnliche Zellen, die er als Langerhans Zellen (LCs) beschrieb (Langerhans, 1868).

Es wurde gezeigt, dass DCs aus hämatopoetischen Stammzellen entstehen und in allen lymphatischen sowie in den meisten nicht lymphatischen Geweben vorkommen. Dendritische Zellen können grob in zwei Klassen unterteilt werden: in die plasmazytoide DCs (pDCs) und die konventionellen DCs (cDCs), die wiederum in residente DCs in lymphatischen Geweben und in migratorische DCs in peripheren Geweben unterteilt werden (Merad et al., 2013). DCs nehmen eine zentrale Rolle im Immunsystem ein, indem sie die Schnittstelle zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort darstellen. Im Vergleich zu anderen antigenpräsentierenden Zellen (APCs), wie B-Zellen und Makrophagen, können DCs eine effektive und schützende adaptive Immunantwort durch Aktivierung naiver antigenspezifischer T-Lymphozyten einleiten und werden daher auch als professionelle APCs bezeichnet (Banchereau & Steinman, 1998).

Während der embryonalen Entwicklung und auch nach der Geburt wandern DC Vorläuferzellen aus dem Knochenmark über den Blutstrom und besiedeln die Haut, mukosale Oberflächen und die meisten Organe des Körpers. In peripheren Geweben und den lymphatischen Organen entwickeln sie sich zu unreifen DCs, die als Wächter des Immunsystems fungieren (Alvarez et al., 2008; Merad et al., 2013). In ihren Zielgeweben bilden die DCs ein dichtes zelluläres Netzwerk aus, was zu einer effizienten Erkennung von eindringenden Pathogenen führt (Mildner & Jung, 2014).

DCs können, ausgelöst durch verschiedene Stimuli, aktiviert werden und durchlaufen einen Prozess der als Maturation bezeichnet wird (Gallucci & Matzinger, 2001; Shi, Evans, & Rock, 2003). Diese Stimuli können PAMPs von Viren, Bakterien, Pilzen oder Parasiten sein, die unreife DCs mit Hilfe ihrer PRRs erkennen. Detektieren DCs Signale (z.B. CD40L) von anderen Zellen des Immunsystems, wie NK-Zellen (natural killer cells), NKT-Zellen (natural killer t cell) oder $\gamma\delta$ -T-Zellen (Sousa, 2004),

Immunkomplexe, die über deren Fc-Rezeptoren agieren, werden DCs durch nekrotische Zellen oder ein inflammatorisches Milieu in ihrer Umgebung beeinflusst, beginnt die Reifung und DCs nehmen exogene Proteine durch Phagozytose auf (Steinman 2008; Joffre et al. 2009). Die internalisierten Antigene werden prozessiert und als sezernierte Peptide auf den MHC-Molekülen der DCs präsentiert. In dem Prozess der Reifung wird die Mobilität der DCs durch Hochregulation des CC-Chemokin Rezeptors 7 (CCR7) gesteigert. CCR7 Expression auf migratorischen DCs führt durch Interaktion mit dem CC-Chemokin Ligand 21 (CCL21) dazu, dass diese über die Lymphgefäße mittels Haptotaxis aus der Peripherie zu den drainierenden Lymphknoten (dLN) und der Milz gelockt werden (Alvarez et al., 2008; Weber et al., 2013). Aktivierte DCs verlieren auf dem Weg aus der Peripherie die Fähigkeit der Phagozytose, was zur Folge hat, dass sie auf dem Weg zu den lymphatischen Organen keine weiteren Antigene aufnehmen können (Banchereau & Steinman, 1998). CD40, welches konstitutiv in geringen Mengen auf unreifen DCs exprimiert wird (Banchereau et al., 1994), wird nach Kontakt mit Pathogenen hochreguliert (Kawai & Akira, 2007). Der Ligand CD40L wird hauptsächlich auf aktivierten T-Zellen sowie aktivierten B-Zellen exprimiert, in der Inflammation sind aber auch monozytäre Zellen, NK-Zellen, Mastzellen und basophile Zellen dazu in der Lage (Carbone et al., 1997). Die Ligation von CD40 durch CD40L führt zur Zusammenlagerung von CD40 und leitet die Rekrutierung des TNF Receptor Associated Factor family of proteins (TRAFs) an die zytoplasmatische Domäne von CD40 ein (Bishop, Moore, Xie, Stunz, & Kraus, 2007). Die Rekrutierung der TRAFs startet eine Signalkaskade, die Gene aktiviert, welche die Zytokinproduktion beeinflussen (Pulendran et al., 2010; Spoerri et al., 2009; Weaver et al., 2007), aber auch die Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen wie CD80/CD86 und anderen Reifungsmarkern mit sich bringen (Kobayashi, Walsh, & Choi, 2004).

In den peripheren lymphatischen Organen interagieren die DCs über einen Zeitraum von wenigen Sekunden bis hin zu einigen Stunden mit T-Zellen, um diese zu aktivieren. Im Anschluss daran gehen die DCs in Apoptose (Bousso, 2008; Stoll et al., 2002). Für die Aktivierung naiver T-Zellen durch DCs ist die TCR MHC-Bindung die Grundvoraussetzung und wird als Signal 1 bezeichnet. Die Expression von kostimulatorischen Molekülen (z.B. CD80/CD86 und CD70) auf aktivierten DCs ist das

zweite wichtige Signal für die Einleitung einer funktionellen T-Zell Antwort (Alvarez et al., 2008; Heuzé et al., 2013; Schildknecht, 2007; Smith-Garvin, 2009; Steinman, 2012). Das von den DCs sezernierte Zytokinmilieu stellt das dritte Signal dar, welches das funktionelle Profil der T-Zelle beeinflusst (Pulendran et al., 2010; Spoerri et al., 2009; Weaver et al., 2007). Zur Aktivierung naiver CD8⁺ T-Zellen zu cytotoxischen T-Lymphozyten (CTL), die dann in der Lage sind infizierte Zellen, die das spezifische Antigen mittels MHC-Klasse I-Molekül präsentieren zu töten, benötigt es Typ-I-Interferone (INF- α/β) und die Interleukine IL-6, IL-12 und IL1 β . DCs produzieren dieses Zytokinmilieu nach Kontakt mit Viren, eukaryotischen Einzellern oder intrazellulären Bakterien (Cousens et al., 2002; Kolumam et al., 2005; Mescher et al., 2006; Parish & Kaech, 2009). Wird das Antigen über die MHC-Klasse II-Moleküle präsentiert, werden naive CD4⁺ T-Zellen aktiviert. Die Interleukine IL-12 und IL-6 induzieren eine T_{H1} Antwort, IL-23 und TGF- β eine T_{H17} Antwort und IL-4, IL-23 sowie TSLP (thymic stromal lymphopoietin) eine T_{H2} Antwort (Ahern et al., 2008; Farrar, Asnagli, & Murphy, 2002; Iwasaki & Medzhitov, 2015; Palm, Rosenstein, & Medzhitov, 2012; Saenz, Taylor, & Artis, 2008; Tait Wojno & Artis, 2012). Neben der Polarisierung durch Zytokinen der DCs, scheint aber auch der Ort der Aktivierung innerhalb der sekundären lymphatischen Organe einen wichtigen Teil zur Differenzierung der CD4⁺ T-Zellen beizutragen (Groom et al., 2012; León et al., 2012; Matloubian & Cyster, 2012; Randolph et al., 1999). So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass Tfh-Zellen innerhalb der interfollikulären Zone, dem schmalen Bereich zwischen B-Zell Follikeln, jedoch an der Grenze der B-Zell-Zone und nicht in der T-Zell-Zone aktiviert werden (Kerfoot et al., 2011).

Im *steady state* haben unreife gewebsständige DCs eine durchschnittliche Lebensdauer von circa 2 Tagen und migrieren zwischen Geweben und den lymphoiden Organen (Henri et al., 2001; Kamath et al., 2000). Während der Migration phagozytieren unreife DCs stetig Eigenantigene (Huang et al., 2000) sowie ungefährliche Fremdartigene (Vermaelen et al., 2001). Unreife DCs prozessieren und präsentieren Peptidfragmente der internalisierten Antigene auf ihren konstitutiv exprimierten MHC-Klasse I- und MHC-Klasse II-Molekülen an naive T-Zellen. Im Vergleich zu reifen DCs werden bei unreifen DCs jedoch keine oder nur geringe

Mengen an costimulatorischen Molekülen (Signal 2) auf ihrer Oberfläche exprimiert (Lee et al., 1993) oder pro-inflammatorische Moleküle sezerniert (Signal 3). Durch das Fehlen des Signals 2 werden naive T-Zellen nicht geprimt (Joffre et al., 2009). Stattdessen führt es zur Anergie oder sogar Apoptose der antigenspezifischen T-Zellen (Jenkins, Ashwell, & Schwartz, 1988; O'Hehir et al., 1991). Dies trägt zur Immuntoleranz von peripheren antigenspezifischen T-Zellen bei und zur Suppression potenziell autoreaktiver T-Zellen. Dies kann durch immunsuppressive Faktoren, wie IL-10 und TGF- β gesteigert werden (Vitali et al. 2012; Waithman et al. 2007; Hawiger et al. 2001; Probst et al. 2003; Steinman et al. 2003; Shortman & Y.-J. Liu 2002).

Somit erfüllen DCs zwei wichtige Funktionen im Immunsystem. Zum einen leiten sie eine effektive Immunantwort gegen Pathogene ein, zum anderen tragen sie im *steady state* zum Erhalt der immunologischen Toleranz bei (Lutz & Schuler, 2002).

1.2.1. Dendritische Zellen der Haut

Die Haut stellt das größte Organ des Menschen dar. Sie wird in drei Schichten von außen nach innen in Oberhaut (Epidermis), Lederhaut (Dermis und Corium) und Unterhaut (Subcutis) unterteilt, wobei Oberhaut und Lederhaut die Cutis bilden. Unter der Dermis liegt eine Schicht subkutanen Fettes, die die Haut von der Muskelschicht des Körpers trennt (McGrath & Uitto, 2010). Die Haut ist eine wichtige Barriere, welche uns vor zahlreichen physikalischen, chemischen und pathogenen Einflüssen schützt. Die Population der dermalen dendritischen Zellen (dDCs) weist eine große Heterogenität auf, die im Folgenden in der murinen Haut beschrieben wird. In Untersuchungen des Transkriptoms, der Funktion und der Oberflächenmoleküle (wobei die Oberflächenmoleküle zwischen Mensch und Maus variieren) konnte gezeigt werden, dass die unterschiedlichen Subtypen der dDCs aber auch der DC Populationen der anderen Organe zwischen Maus und Mensch nahezu identisch sind (Bachem et al., 2010; Guilliams et al., 2016; Haniffa et al., 2012; Poulin et al., 2012; Poulin et al., 2010).

In der Epidermis, die zu mehr als 90% aus Epithelzellen besteht, die als Keratinozyten bezeichnet werden, sind Langerhans Zellen (LCs), geweberesidente $CD8^+$ Memory T Zellen ($CD8^+ T_{RM}$) und $\gamma\delta$ T-Zellen zu finden. In der angrenzenden und durch die Basalmembran von der Epidermis getrennten, aus Fibroblasten und Kollagen- sowie Elastanfasern bestehenden Dermis befindet sich die heterogene Population der dermalen dendritischen Zellen (dDCs). Diese lassen sich in konventionelle DCs (cDCs) des Types 1 und 2 (cDC1s; cDC2), die doppelt negativen DCs (DN), die monozytären DCs (moDCs) sowie in die dermalen Makrophagen differenzieren (Tab. 1; Abb. 1).

Tabelle 1: Phänotypen der murinen dermalen dendritischen Zellen (Guilliams et al., 2016; Henri et al., 2010; Tamoutounour et al., 2013)

Organ	Population	Phänotyp (steady state)
Epidermis	LC	CD207 ⁺⁺ , CD11b ^{int} , CD103 ⁺ , EpCAM ⁺⁺ , CD24 ⁺ , Sirpα ⁺
	LC in transit	CD207 ⁺⁺ , CD11b ^{int} , CD103 ⁺ , EpCAM ⁺⁺ , CD24 ⁺ , Sirpα ⁺
Dermis	cDC1 (CD207 ⁺ CD11b ⁻)	CD207 ⁺ , CD11b ^{lo} , CD24 ⁺ , Sirpα ⁻ , XCR1 ⁺ , CD103 ⁺ und ⁻
	cDC2 (CD207 ⁻ CD11b ⁺)	CD207 ⁻ , CD11b ^{hi} , CD103 ⁻ , CD24 ⁻ , Sirpα ⁺ , XCR1 ⁻
	DN (CD207 ⁻ CD11b ⁻)	CD207 ⁻ , CD11b ^{-/lo} , CD103 ⁻ , EpCAM ⁻ , CD24 ⁻ , Sirpα ^{lo}
	Monozytäre DCs (moDCs)	CD11b ⁺ , CD64 ⁺ , Ccr2 ⁺ , Ly6C ^{lo} , CD24 ⁻ , MerTK ⁻
	dermale Makrophagen	CD11b ⁺ , CD64 ^{hi} , Ccr2 ^{lo} , Ly6C ^{lo} , CD24 ⁻ , MerTK ⁺

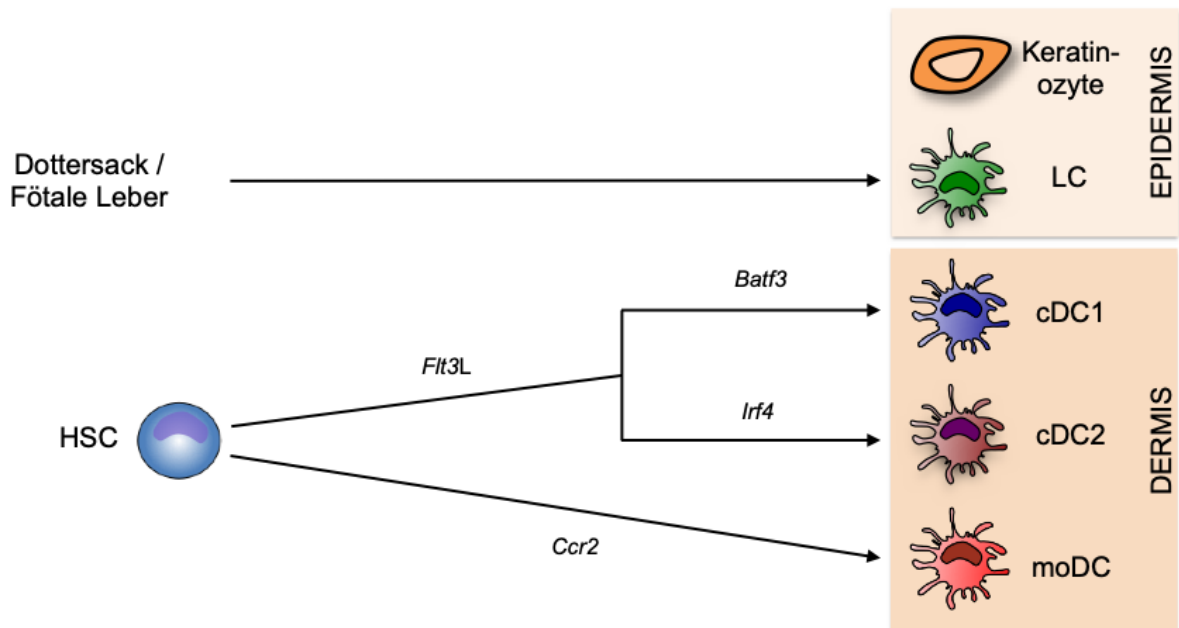


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Ontogenese der Langerhans und dendritischen Zellen der Haut

Die einzigen mononukleären Phagozyten in der Epidermis sind LCs. Diese exprimieren das C-type Lektin Langerin (CD207), CD24 und im Gegensatz zu allen anderen DC Populationen EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule). Murine DCs der Dermis (DDC, dermal DCs) werden durch die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle in *Irf4* (*IFN regulatory factor 4*) abhängige CD207⁻ (Langerin) CD11b⁺ (ITGAM) DCs, CD207⁺ CD103⁺ und CD103⁻ DCs, welche *Batf3* (*basic leucine zipper transcription factors, ATF-like3*) abhängig sind sowie für die beiden Marker CD11b und CD207 negative DCs unterschieden (Bajaña, Turner, Paul, Ainsua-Enrich, & Kovats, 2016; Bursch et al., 2007; Ginhoux et al., 2007; Henri et al., 2010; Hildner et al., 2008; Poulin et al., 2007) Weiterhin finden sich monozytär entwickelte DCs (moDC) und Makrophagen in der Haut (Tamoutounour et al., 2013). Dermale cDCs und moDCs besitzen eine kurze Lebensspanne und werden kontinuierlich aus Vorläuferzellen gebildet, die über Blutgefäße in das Gewebe eindringen (Geissmann et al., 2010). Konventionelle DCs werden aus pre-cDCs gebildet (Geissmann et al., 2010) und moDCs aus Ly6C⁺ Monozyten (Bain et al., 2013; Jakubzick et al., 2013; Tamoutounour et al., 2013). Alle dermalen DCs entwickeln sich *Flt3L* (*Fms-related tyrosine kinase ligand 3*) abhängig (Geissmann et al., 2010; K. Liu et al., 2007; Mackaretschian et al., 1995), während die Entwicklung von moDCs und einem Teil der Makrophagen vom Chemokinrezeptor *Ccr2* abhängig ist (Boring et al., 1997; Serbina & Pamer, 2006; Tamoutounour et al., 2013).

1.2.1.1 Langerhans Zellen (LCs)

Langerhans Zellen (LCs), die von Paul Langerhans 1868 entdeckt und nach ihm benannt wurden (Langerhans, 1868), zählen zu den Leukozyten (Silberberg, 1973) und gehören zur Familie der dendritischen Zellen (DC), welche von Steinmann und Cohan 1973 entdeckt wurden. Wie die meisten DCs sind LCs potente APCs, in dem sie Pathogene aufnehmen, prozessieren und auf ihre MHC-Komplexe laden. Anschließend migrieren sie aus der Epidermis zu den hautdrainierenden Lymphknoten (sdLN), um dort kutane Antigene an T-Lymphozyten zu präsentieren (Merad et al., 2008; Romani, Clausen, & Stoitzner, 2010). Ungefähr 3-5% der Zellen der Epidermis sind LCs, die eine Verteilung von circa 700-1.000 LCs / mm² aufweisen (Valladeau & Saeland, 2005). LCs breiten ihre Dendriten zwischen den Keratinozyten aus und bilden ein dichtes Netzwerk, welches den gesamten Körper umspannt (Kubo, Nagao, & Amagai, 2013). Sobald pathogene Erreger erkannt werden, vermitteln LC gemäß der Mechanismen der angeborenen Immunantwort die Ausschüttung pro-inflammatorischer Signalmoleküle, welche als Gefahrensignal auf direkt umgebende Keratinozyten einwirken und die Sekretion von TNF- α induzieren (Villablanca, Russo, & Mora, 2008). Unter Einfluss dieser Zytokine wird E-cadherin auf ihrer Oberfläche herabreguliert, wodurch sie sich von den ihnen umgebenden Keratinozyten lösen. Die LCs können jetzt die Basalmembran zwischen Epidermis und Dermis durchqueren, um zu den hautdrainierenden Lymphknoten zu gelangen. Daher ist neben den LCs in der Epidermis eine kleine Population von Langerhans Zellen in transit in der Dermis zu finden (Henri, et al., 2010). Die durch eine Entzündung, Infektion oder Verwundung bedingte massive Auswanderung der LCs aus der Epidermis wird sofort von kurzlebigen aus zirkulierenden Gr-1^{hi} Monozyten gebildeten LCs aufgefangen (Ginhoux et al., 2006; Seré et al., 2012).

LCs unterscheiden sich von anderen dermalen DCs durch ihre einzigartige Ontogenese und homöostatische Eigenschaften (Merad et al., 2008). Zu Beginn der embryonalen Phase (Tag 18) entwickeln sich LCs aus einfachen im Dottersack gebildeten myeloiden Vorläuferzellen, die dann größtenteils durch Monozyten, welche in der fötalen Leber gebildet werden, ersetzt werden (Hoeffel et al., 2012; Kumaravelu et al., 2002). Diese LC Vorläuferzellen entwickeln sofort nach der Geburt morphologische und phänotypische Merkmale von DCs und präsentieren MHCII und

CD11c auf ihrer Oberfläche (Chang-Rodriguez et al., 2005; Chorro et al., 2009; Romani, Schuler, & Fritsch, 1986), die Expression von Langerin (CD207) hingegen erreicht erst drei Wochen nach der Geburt ihre volle Intensität (Tripp et al., 2004). Außerdem exprimieren alle LCs CD11b, CD24 und F4/80 und sind im Gegensatz zu den meisten DCs unabhängig von *Flt3* und *Flt3L* in ihrer Entwicklung, benötigen jedoch für diese wie die meisten Makrophagen im Gewebe den Rezeptor für den *colony stimulating factor-1* (Csf-1R) (Ginhoux et al., 2009, 2006; Kingston et al., 2009; Merad & Manz, 2009; Witmer-Pack et al., 1993). LCs exprimieren EpCam (Epithelial Cell Adhesion Molecule), welches insbesondere für die Differenzierung der LC von CD207⁺ dermalen DCs genutzt werden kann (Kissenpfennig et al., 2004; Valladeau & Saeland, 2005). LCs erhalten sich lebenslang *in situ* selbst und sind unabhängig von im Knochenmark gereiften Vorläuferzellen wie es bei DCs der Fall ist. Außerdem sind LCs strahlungsresistent, was dazu führt, dass LCs nach letaler Bestrahlung und Rekonstitution mit Donor Knochenmark weiterhin von dem Akzeptortier stammen (Katz et al., 1979; Merad et al., 2002).

Nach ihrer Aktivierung in der Haut durch die Erkennung von Pathogenen, schütten LCs pro-inflammatorische Zytokine aus und migrieren zu den hautdrainierenden Lymphknoten (sdLN) (Cumberbatch et al., 2003; Kubo et al., 2009; Nagao et al., 2009; Ouchi et al., 2011). LCs erreichen ihre maximale Anzahl in den sdLN etwas später als die dDCs und besiedeln unterschiedliche Bereiche der sdLN verglichen zu dDCs (Kissenpfennig et al., 2005; Tomura et al., 2014). Lange Zeit wurde angenommen, dass LCs zu den sdLN migrieren und eine Immunantwort durch Effektorzellen induzieren, neuste Studien legen jedoch nahe, dass LCs eher an der Bildung der peripheren Toleranz beteiligt sind. Durch Migration zu den sdLN vermitteln LCs Toleranz durch Deletion sowohl bei CD4⁺ (Shklovskaya et al., 2011), als auch bei CD8⁺ T-Zellen (Flacher et al., 2014). Sie induzieren regulatorische T-Zellen (T_{reg}S) (De Agüero et al., 2012) und fördern die Produktion von immunsuppressivem IL-10 (Shklovskaya et al., 2011). Die Depletion, von EpCAM auf LCs reduziert die Migrationsfähigkeit von LCs und hemmt die Induktion der Toleranz im Model der Kontakthypersensitivität (CHS) (Bobr et al., 2010; Gaiser et al., 2012). Die Depletion von LCs führt zu einem schwächeren Verlauf in der Infektion mit *Leishmania major* und einer Verringerung der regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) (Kautz-Neu et al., 2011).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass LCs auf ionisierte Strahlung mit einer Induktion der Expansion von T_{reg} Zellen reagieren (Price et al., 2015). Wird bei der *Candida albicans* Infektion die epidermale Barriere verletzt, sind LCs durch die Produktion von IL-6 dazu in der Lage eine T_H17-medierte zelluläre Antwort einzuleiten (Igyártó et al., 2011).

Die genaue Funktion von LCs konnte bis heute nicht vollständig geklärt werden, da unterschiedliche Mausmodelle teil widersprüchliche Vermutungen bezüglich ihrer Funktionalität zulassen.

1.2.1.2 Konventionelle dendritische Zellen (cDCs)

In allen Geweben existieren cDCs, die ihren Ursprung in pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen haben und ähnliche Funktionen erfüllen, die anhand ihrer Ontogenese in die zwei Subpopulationen Typ1 konventionelle DC (cDC1) und Typ2 konventionelle DC (cDC2) unterteilt werden (Guilliams et al., 2016, 2014; Mildner & Jung, 2014). Im *steady state* stellen die cDCs den größten Teil der dDCs dar und weisen die typische dendritische Morphologie auf (Guilliams et al., 2016; Henri et al., 2010; Tamoutounour et al., 2013). cDCs exprimieren das Integrin CD11c und MHC II (Metlay et al., 1990; Steinman, Kaplan, Witmer, & Cohn, 1979) und können anhand weiterer Oberflächenmoleküle differenziert werden (1.2.1.2.1; 1.2.1.2.2).

1.2.1.2.1 Konventionelle dendritische Zellen Typ I (cDC1s)

Die cDC1s der Haut sind Langerin⁺ dermale DCs, die sich in zwei ungefähr gleich große, CD103⁺ und CD103⁻, Populationen unterteilen lassen. cDC1 machen circa 6% der dermalen DCs aus (Henri et al., 2010). Außerdem exprimieren cDC1s XCR1 (XC-chemokine receptor1) auf ihrer Oberfläche und können so von cDC2s unterschieden werden (Bachem et al., 2012; Crozat et al., 2011; Guilliams et al., 2016; Yamazaki et al., 2010). Die Entwicklung von cDC1s ist *Batf3* (*basic leucine zipper transcription factors, ATF-like3*) abhängig. *Batf3* defiziente Mäuse entwickeln keine dermalen cDC1s (Edelson et al., 2011; Malissen et al., 2014; Murphy, Tussiwand, & Murphy, 2013; Tussiwand et al., 2012). Des Weiteren gibt es Mausmodelle in welchen Langerinpromotor-abhängig den *Diphtherie Toxin*-Rezeptor exprimieren und somit

durch *Diphtherie Toxin* von dermalen cDC1s depletiert werden können (Kissenpfennig et al., 2005).

Unterschiedliche Methoden in denen entweder cDC1s eliminiert oder depletiert wurden oder in welchen cDC1s explizit adressiert wurden, haben gezeigt, dass cDC1s die primäre Subpopulation der DCs sind, welche virale Antigene, exogene und Eigenantigene über ihre MHC-Klasse I-Komplexe an CD8⁺ T-Zellen kreuzpräsentieren können (Bedoui et al., 2009; Henri et al., 2010; Joffre, Segura, Savina, & Amigorena, 2012; Theisen & Murphy, 2017). So wurde zum Beispiel gezeigt, dass cDC1s Zellen für eine effiziente CD8⁺ T-Zell Antwort nach dermalen Infektion mit Vaccinia Virus (Seneschal, Jiang, & Kupper, 2014) und in der Leishmaniose Infektion benötigt werden (Kautz-Neu et al., 2011). Bei Abwesenheit dieser Subpopulation kann hingegen weiterhin eine T_{H2} medierte humorale Antwort und nach kutaner *C. albicans* Infektion eine T_{H1} Antwort ausgelöst werden (Igyártó et al., 2011).

1.2.1.2.2 Konventionelle dendritische Zellen Typ 2 (cDC2s)

Die CD207⁻ CD11b⁺ Sirp α ⁺ konventionellen dendritischen Zellen Typ 2 (cDC2s) sind mit 60-70% der dermalen DCs die am häufigsten vertretene Subpopulation in der Dermis (Guilliams et al., 2016; Henri et al., 2010). Durch die Abwesenheit der Oberflächenmoleküle Ly6C und CD64 lassen sie sich von moDCs und dermalen Makrophagen im *steady state* gut unterscheiden (Tamoutounour et al., 2013).

Die Entwicklung von cDC2 aus hämatopoetischen Stammzellen ist neben *Flt3* (FMS-like Tyrosin Kinase) (Mackarehtschian et al., 1995) auch von *Irf4* (*IFN regulatory factor 4*) abhängig (Bajaña et al., 2016).

Während für die cDC1 mit ihrer besonderen Fähigkeit zur Kreuzpräsentation eine besondere Rolle im Priming von CD8⁺ T Zell Antworten beschrieben wurde, wurden als Aufgabe der cDC2 hauptsächlich das Priming von CD4⁺ T Zellen und die Differenzierung der verschiedenen Arten von T Helferzellantworten beschrieben (Calabro et al., 2016; Pooley, Heath, & Shortman, 2001; Reuter et al., 2015). In Gegenwart von TSLP (thymic stromal lymphopoietin) lösen cDC2s eine TH2 Antwort aus (Kitajima & Ziegler, 2013). Außerdem produzieren cDC2s IL-23, welches die IL-17 und IL-22 Produktion von dermalen T-Zellen fördert und eine Rolle in der Psoriasis spielt (Wohn et al., 2013). Durch die Expression von *Aldh1a2* auf cDC2s, welches die

Retinaldehyde-Specific Dehydrogenase Type 2 kodiert, wird Vitamin A in Retinolsäure umwandelt und trägt letztendlich zur Entstehung von regulatorischen T- Zellen bei (Guilliams et al., 2010; Mucida et al., 2007).

1.2.1.3 Monozytäre dendritische Zellen (moDCs)

Dermale monozytäre dendritische Zellen (moDCs) und Makrophagen haben ihren Ursprung in Ly6C positiven Monozyten, welche aus dem Blut in das Gewebe einwandern (Jakubzick et al., 2013; Tamoutounour et al., 2013). Die Auswanderung von Ly6C⁺ Monozyten aus dem Knochenmark ist CCR2 abhängig (Domínguez & Ardavín, 2010; Serbina & Pamer, 2006). Um dermale moDCs und Makrophagen von cDCs zu diskriminieren, kann man sich der Oberflächenmolekülen CD64 und Ly6C bedienen. Eine Unterscheidung zwischen Makrophagen und moDCs ist über CCR2 und MerTk möglich, da moDCs im Gegensatz zu Makrophagen CCR2⁺ und MerTk⁻ sind (Tamoutounour et al., 2013). Auch wenn moDCs sich aus Monozyten entwickeln, konnte gezeigt werden, dass sie den Transkriptionsfaktor Zbtbb46 in geringem Maße exprimieren, der cDCs von anderen Immunzellen wie pDCs und Monozyten unterscheidet (Satpathy et al., 2012).

Ohne inflammatorische Stimuli besitzen moDCs im Vergleich zu anderen DCs nur geringe migratorische Eigenschaften (Dai et al., 2002; Tamoutounour et al., 2013). moDCs und Makrophagen exprimieren im *steady state* IL-10, weshalb diesen Zellen eine antiinflammatorische Funktion im *steady state* zugeschrieben wird. (Tamoutounour et al., 2013). In einer Entzündungsreaktion regulieren moDCs Ly6C herab und exprimieren verstärkt CD11c und MHC-Klasse II auf ihrer Oberfläche (Tamoutounour et al., 2013). Außerdem nimmt die Anzahl an moDCs in Folge einer Infektion der Haut signifikant zu (Tamoutounour et al., 2013). Allgemeine Untersuchungen zur Interaktion von moDCs mit T-Zellen und wie moDCs die T-Zell Antwort regulieren, kommen zu keinem eindeutigen Ergebnis. Während eine Studie das effiziente Priming von T-Zellen und deren Proliferation beobachtet (Cheong et al., 2010), kam eine weitere Studie zu dem Schluss, dass moDCs in diesem Zusammenhang überflüssig sind (Serbina et al., 2003) oder sogar unfähig dazu sind die Proliferation von T-Zellen zu induzieren (Rydström & Wick, 2007).

1.2.1.4 Makrophagen

Makrophagen in der Dermis sind wie moDCs von cDC2s durch die Expression der Oberflächenmarker CD64 und Ly6C zu unterscheiden. Da dermale Makrophagen $CCR2^-$ und $MerTK^+$ sind, können sie gut von moDCs differenziert werden. Dermale Makrophagen werden bereits in der Embryogenese im Dottersack und der fötalen Leber gebildet (Ginhoux & Guilliams, 2016). Im erwachsenen Alter werden dermale Makrophagen stetig aufgefüllt, die sich aus hämatopoetischen Stammzellen entwickeln (Baranska et al., 2018).

Makrophagen sind ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems (Hettinger et al., 2013) und an unterschiedlichen immunologischen Reaktionen beteiligt. Nach Aktivierung der Makrophagen durch proinflammatorischen Zytokine wie $INF-\gamma$ oder TNF produzieren sie große Mengen an reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) und reaktiven Stickstoff-Verbindungen (NOS) weitere proinflammatorische Zytokine und steigern ihre Fähigkeit der Phagozytose (Mosser & Edwards, 2008). IL-1, IL-6 und IL-23 von Makrophagen trägt zur Differenzierung von Th17 Zellen bei (Yang et al., 2008).

Bei Wundheilungsprozessen werden Makrophagen über IL-4 aktiviert, woraufhin sie Kollagenvorläufermoleküle produzieren, um die Bildung extrazellulärer Matrix zu unterstützen (Gratchev et al., 2001; Kreider, Anthony, Urban, & Gause, 2007). Außerdem können Makrophagen durch Ausschüttung von IL-10 und TGF- β antiinflammatorisch wirken (Lucas, Zhang, Prasanna, & Mosser, 2005). Was genau zur Stimulation des antiinflammatorischen Effektes führt ist noch nicht vollständig geklärt. Dieser Mechanismus trägt aber zur Beendigung von Entzündungsreaktionen bei und schützt unseren Körper vor überschießenden und autoimmunen Immunreaktionen (Mosser & Edwards, 2008).

1.2.1.5 Plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs)

Plasmazytoide DCs stellen die kleinste Population an DCs im gesamten Körper dar und sind in der gesunden Haut nicht nachweisbar. Sie werden hier ausschließlich der Vollständigkeit halber erwähnt. Ihren Namen tragen sie auf Grund ihrer „Plasmazellen“ ähnlichen Morphologie. Die pDCs können anhand ihrer Oberflächenmoleküle $CD11c^{int}$, $B220^+$, $PDCA-1^+$, $MHC-II^{-int}$ identifiziert werden. Im *steady state* sind pDCs

im Blut und in den sekundären lymphatischen Organen zu finden, sie fehlen jedoch in den meisten peripheren Geweben unter anderem auch in der Haut (Gilliet et al., 2004; Wollenberg et al., 2002). pDCs sind aber dazu in der Lage bei viralen Infektionen wie Varizella-Zoster-Virus (Gerlini et al., 2006), Humane Papillomviren (Vanbervliet et al., 2003) und Herpes-simplex-Viren (Donaghy et al., 2009) in die Haut einzuwandern. In Folge einer viralen Infektion produzieren pDCs große Mengen an $\text{INF-}\alpha$ (Vremec et al., 2007). Es konnte gezeigt werden, dass Type I INFs, die von pDCs produziert werden, hemmend auf die virale Replikation wirken und zur Induktion und Expansion einer antiviralen Immunantwort durch Aktivierung von Memory T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen beitragen (Gilliet, Cao, & Liu, 2008; Theofilopoulos, Baccala, Beutler, & Kono, 2005).

1.3 Keratinozyten

Der Keratinozyt ist der in der Epidermis (Oberhaut) mit über 90 Prozent hauptsächlich vorkommende Zelltyp (Kanitakis, 2002). Keratinozyten stammen von epidermalen Stammzellen ab, die sich im Bereich des *Stratum basale* oder aber im Bereich der äußeren Wurzelscheide der Haarfollikel befinden. Sie durchwandern, während sie von nachkommenden Zellen nach oben geschoben werden, mehrere Stadien der Entwicklung, bis sie im *Stratum corneum* eine Schicht aus abgeflachten, toten Korneozyten bilden, die einen undurchlässigen *cornified envelope* aus vernetzten Involucrin besitzen (Lynley & Dale, 1983; Rice & Green, 1977). Diese Schicht stellt die äußerste Schutzschicht der Haut und somit unseres Organismus dar (Kanitakis, 2002).

Die Zeit zwischen Differenzierung im *Stratum basale* und Abschilferung als Korneozyt im *Stratum disjunctum* beträgt etwa einen Monat, kann aber bei bestimmten Erkrankungen, z. B. bei Psoriasis, verkürzt sein.

Während dieser Differenzierung verändern Keratinozyten stetig ihre Form und geometrische Ausrichtung. Im *Stratum basale* entstehen die Keratinozyten aus epidermalen Stammzellen und besitzen eine ungefähr zylindrische Form. Im *Stratum spinosum* beginnt der Umbau der Zellen mit einer Volumenzunahme sowie einer

Änderung der Zellachse in eine eher horizontale Richtung und es werden Keratohyalinkörner gebildet. Anschließend kommt es zur Abplattung der Zellen, dem Verlust des Zellkernes, zur Schrumpfung aufgrund von Flüssigkeitsverlust sowie zur Verhornung. In dem folgenden *Stratum corneum* (Hornschicht) kann man keine Keratinozyten mehr nachweisen. Aus Keratinozyten wurden Korneozyten. Das *Stratum corneum* bildet eine Barriere, die Fremdkörper und Keime abhält und den Körper vor dem Austrocknen schützt.

Keratinozyten sind aktiv an der Immunantwort, an Entzündungsprozessen und bei der Wundheilung beteiligt. Sie tragen zum UV-Schutz bei, indem sie Melanosomen von Melanozyten aufnehmen. Das Melanin wird um den Zellkern gelagert und schützt diesen vor UV-bedingten Schäden. Sie können eine Vielzahl von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und sogar Komplementfaktoren produzieren. Viele dieser Mediatoren werden erst als Antwort auf stimulatorische Signale sezerniert. So reagieren Keratinozyten auf Stimuli wie UV-Strahlung, irritative Chemikalien oder Aufbringen eines Kontaktallergens mit der Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine sowie der Expression von Adhäsionsmolekülen. Bei vielen chronisch entzündlichen Hauterkrankungen werden insbesondere TNF- α und IL-1, aber auch viele andere Interleukine und Chemokine freigesetzt.

Die Komplementkomponente C3 wird von Keratinozyten produziert, was zu einer Anlockung von T-Zellen in die Haut bei der Generierung von C3a über spezifische Rezeptoren führen kann (Werfel et al., 2000). Die Einwanderung von T-Zellen in die Haut wird auch über die von Keratinozyten produzierten chemotaktischen Moleküle wie das „*Cutaneous T-Cell-Attracting Chemokine*“ (CCL27) (Homey et al., 2002) oder das „*Thymus and Activation Regulated Chemokine*“ (CCL17) (Vestergaard et al., 2000), gesteuert.

Ob KCs durch Antigen Präsentation naive T-Zellen direkt aktivieren können oder ob ihre Antigene mit Hilfe von LCs und dDCs an naive T-Zellen kreuz präsentiert werden müssen und somit indirekt zur Aktivierung beitragen, wird kontrovers in der Literatur diskutiert. So konnte Fan et al. zeigen, dass KCs die Fähigkeit besitzen, bei Entzündungen im Gewebe autoreaktive CD4⁺ T Zellen direkt zu aktivieren. In dieser Studie wurde vermutet, dass IL-1 oder TNF- α durch die Entzündung mobilisiert wurde, was den KCs die Fähigkeit von APCs durch hoch Regulation ihrer MHC Moleküle

verlieh (Fan et al., 2003). In diesem transgenen Modell waren jedoch LCs und dDCs zugegen, was eine indirekte Aktivierung der T-Zellen nicht ausschließen lässt. Kim et al., konnte in einem Graft-versus-Host-Modell zeigen, dass bei beta 2-microglobulin-deficient → K14-OVA X Lang-DTR Tg Chimären in welchen LCs als auch dDCs exkludiert wurden, die auf KCs präsentierte Modellantigen intradermal injizierte spezifische CD8⁺ T-Zellen aktivierten und eine GVH-Reaktion hervorriefen. Dies führte zu deren Hypothese, dass KCs direkt naive CD8⁺ T-Zellen primen können (Kim et al., 2009). Henri et al. hingegen zeigte, dass in dem von ihnen verwendeten Model eine Kreuzpräsentation der Antigene, die durch KCs exprimiert wurden durch cDC1s erforderlich ist (Henri et al., 2010).

Somit müssen weitere Untersuchungen zur Klärung der Frage der direkten oder indirekten Aktivierung von naive T-Zellen durch Keratinozyten unternommen werden.

1.4 Antigen-Prozessierung, -Präsentation und Kreuzpräsentation

1.4.1 MHC-Klasse I und II-Moleküle

Zur erfolgreichen Einleitung einer adaptiven Immunantwort müssen Antigene der Pathogene über antigenpräsentierende Zellen (APCs) an T-Lymphozyten präsentiert werden. Diese Präsentation erfolgt über den *major histocompatibility complex* (MHC), der in die zwei Untergruppen MHC-Klasse I- und MHC-Klasse II-Moleküle unterteilt wird. MHC-Klasse I-Moleküle sind für die Präsentation intrazellulärer Pathogene (z.B. Viren) verantwortlich (Rock et al., 1994), wohingegen MHC-Klasse II-Moleküle exogene Pathogene präsentieren (Rudensky et al., 1991).

MHC-Klasse I-Moleküle haben eine geschlossene Bindetasche in welcher Peptide einer Länge von 8-10 Aminosäuren (AS) nicht-kovalent über Wasserstoffbrücken und ionische Wechselwirkungen gebunden werden (Bouvier & Wiley, 1994). Die 8-10 AS langen Peptide können Abbauprodukte endogener Pathogene des Immunproteasoms durch Interferone stimulierter Zellen sein, die im Cytosol über Ubiquitin markiert werden (Aki et al., 1994; Boes et al., 1994). Aminopeptidasen im Cytosol trimmen die Peptide N-terminal und diese werden im Anschluss mittels TAP in das endoplasmatische Retikulum transportiert. Hier erfolgt ein weiteres N-terminales Trimming durch Aminopeptidasen, bevor die Peptide mit Hilfe von Tapasin und Calreticulin auf MHC-Klasse I-Moleküle geladen werden (Suh et al., 1994). Der so entstandene MHC-Peptid-Komplex dissoziiert vom Peptid Loading-Komplex ab und wird durch den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert (Williams et al., 2002). Auf der Zelloberfläche präsentieren die MHC-I-Moleküle das endogene Peptid, welches von TCRs der CD8⁺ T-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen erkannt wird und führen zu einer spezifischen CD8⁺ T-Zell Antwort (Rock et al., 1994; Williams et al., 2002).

Die MHC-Klasse II-Moleküle verfügen über eine offene Bindetasche, was es ihnen ermöglicht Peptide von 13-18 AS Länge zu binden (Saveanu, Fruci, & Van Endert, 2002). Exogene Antigene werden mittels Phagozytose in intrazelluläre Vesikel aufgenommen. In dem so entstandenen Endosom sinkt der anfangs neutrale pH-Wert nach der Verschmelzung mit dem Lysosom und aktiviert die endosomalen Proteasen.

Hierzu zählen Proteasen der Cathepsin-Familie (B, S, L, E) und Asparagin-spezifische Endopeptidase (AEP), die die Peptide des Antigen fragmentieren (Hsieh et al., 2002). MHC-Klasse II-Moleküle, die sich im Lysosomen befinden, werden mit Hilfe von Cathepsin S von ihrer schützenden invarianten Kette befreit, wobei einzig das CLIP Molekül in der Bindestelle zurück bleibt (Gregers et al., 2003; Pierre & Mellman, 1998). Nach Bindung eines HLA-DM-Moleküls an das MHC-Klasse II-Molekül, kommt es durch Entfernung des CLIP Moleküls zur Freilegung der Bindetasche und das Peptidfragment des Antigens wird in die Bindefurche eingelagert. Anschließend wandert der MHC-Peptid-Komplex an die Oberfläche der APCs und kann an naive CD4⁺ T-Zellen präsentiert werden (Banchereau & Steinman, 1998; van Lith et al., 2001).

1.4.2 Cross-presentation

1976 wurde erstmals beobachtet, dass Antigene eines allogenen Transplantates CD8⁺ T-Zellen stimulierten, welche das Antigen auf MHC-I-Molekülen des Rezipienten und nicht auf denen des Transplantates präsentiert bekamen - ein Phänomen, das als *cross-priming* bezeichnet wurde (Bevan, 1976). Die Entdeckung des cross-primings legte nahe, dass exogene Antigene von Tumoren, extrazellulären Pathogenen oder benachbarter infizierter Zellen auch über MHC-Klasse I-Moleküle präsentiert werden können - ein Prozess der als *cross-presentation* beschrieben wurde. Lange Zeit war die einzig bekannte Methode, dass Zellen exogene Antigene aufnehmen und präsentieren können, indem diese mit Peptiden der Antigene beladen wurden, welche auf MHC-Klasse I-Moleküle banden (Townsend et al., 1986). Erst 1990 konnte gezeigt werden, dass einige Zellen in den lymphoiden Organen auf ihren MHC-Klasse I-Moleküle Peptide von extrazellulären Proteinen präsentieren (Rock, Gamble, & Rothstein, 1990), welche sich als dendritische Zellen und Makrophagen herausstellten (Grant & Rock, 1993; Pooley et al., 2001; Shen et al., 1997). Die Kreuzpräsentation ist weitaus ineffizienter und produzierte weniger Peptid-MHC Komplexe im Vergleich zur Präsentation exogener Antigene auf MHC-II-Molekülen. Jedoch ist die Kreuzpräsentation vollkommen ausreichend um eine CD8 T-Zell Antwort einzuleiten (Sei et al., 2015).

Exogene lösliche Antigene, die über Pinozytose aufgenommen werden, werden sehr ineffizient über Kreuzpräsentation auf MHC-Klasse I-Moleküle geladen. Hierfür ist eine sehr hohe Konzentration an Antigen erforderlich (Kovacsovics-Bankowski et al., 1993; Rock et al., 1990). Im Gegensatz dazu, werden partikelförmige Antigene, die über Phagozytose oder Makropinozytose aufgenommen werden, sehr effizient auf MHC-Klasse I-Moleküle präsentiert (Kovacsovics-Bankowski et al., 1993; Norbury et al., 1995; Pfeifer et al., 1993). Aber auch lösliche Proteine, die jedoch über Rezeptor vermittelte Endozytose aufgenommen werden, können sehr gut kreuzpräsentiert werden. Vermutlich ist in beiden Fällen eine größere Menge an aufgenommenem Antigen der Grund der besseren Effizienz (Burgdorf, Lukacs-Kornek, & Kurts, 2006; Kamphorst et al., 2010; van Montfoort et al., 2012).

Eine besondere Rolle in der Kreuzpräsentation nehmen cDC1s ein. Untersuchungen ob unterschiedliche Subpopulationen von DCs der Milz die Fähigkeit der Kreuzpräsentation besitzen, ließen den Schluss zu, dass nur cDC1s diese Fähigkeit haben (Den Haan, Lehar, & Bevan, 2000). Anhand von *Batf3*^{-/-} Mäusen, in welchen die cDC1s fehlen, war es erstmal möglich die genaue Funktion dieser Population in der *cross-presentation in vivo* zu untersuchen. Die DCs der *Batf3*^{-/-} Mäuse waren nicht in der Lage Antigene Kreuz zu präsentieren und es konnte keine spezifische CD8⁺ T-Zellantwort bei einer Infektion mit West-Nil Virus beobachtet werden (Hildner et al., 2008). Bedoui et al. untersuchte die Beteiligung der cDC1s bei der Präsentation von Antigenen des HSV-1 und Eigenantigenen. Ihre Ergebnisse weisen darauf hin, dass cDC1s die wesentliche Population der migratorischen dDCs sind, die virale und eigene Antigene präsentieren können (Bedoui et al., 2009). Henri et al. konnte zeigen, dass die kleine Population der dermalen cDC1s die einzigartige Fähigkeit der Kreuzpräsentation von Antigenen die von Keratinozyten exprimiert werden besitzen, unabhängig der An- oder Abwesenheit von LCs (Henri et al., 2010).

1.5 T-Zellen

Alle T-Zellen haben ihren Ursprung in den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarkes. Anhand ihres aus einem Heterodimer zweier Ketten bestehenden T-Zellrezeptors (TCR) können sie in $\alpha\beta$ -TCR T-Zellen und die weitaus weniger vorkommenden $\gamma\delta$ -TCR T-Zellen unterschieden werden. T-Zellen, die einen $\alpha\beta$ -TCR aufweisen, werden in $CD4^+$ T-Helfer-Zellen und $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen unterteilt. Die T-Lymphozyten besitzen eine große Diversität, die sich während der Lymphozytenentwicklung durch Rekombination vieler Gensegmente (*combinatorial diversity*) (Grawunder et al., 1998) und dem Ein- und Ausbau zusätzlicher Nukleotide (*junctional diversity*) (Jeske et al., 1984) ergibt, was Millionen unterschiedliche Möglichkeiten an Antigenespezifitäten zur Folge hat.

Nachdem T-Zell-Vorläufer das Knochenmark verlassen haben, migrieren sie in den Thymus wo sie heranreifen und ein Rearrangement der TCR Gene stattfindet. T-Lymphozyten die einen funktionsfähigen TCR exprimieren, werden im Thymus selektioniert. Im ersten Schritt der Selektion, welche als positive Selektion bezeichnet wird, können nur T-Lymphozyten ausreifen, die mit MHC-Molekülen interagieren können (Zinkernagel, 1978; Zinkernagel & Doherty, 1974). Abhängig von ihrer Fähigkeit MHC-I- oder MHC-II-Moleküle zu erkennen, entwickeln sich T-Lymphozyten zu $CD8^+$ oder $CD4^+$ T-Zellen (Carpenter & Bosselut, 2010). In der Markregion (Medulla) des Thymus erfolgt die zweite Phase der Selektion. Binden Thymozyten körpereigene Antigene und deren MHC-Moleküle mit hoher Affinität, werden diese apoptotisch abgebaut. In diesem als negative Selektion bezeichnetem Prozess, werden autoreaktive T-Zellen eliminiert (Hengartner et al., 1988; Lo et al., 1988). T-Zellen, die beide Selektionsschritte überlebt haben, verlassen den Thymus als naive T-Zellen.

Durch Präsentation eines Antigens über den MHC-Peptid-Komplex der antigenpräsentierende Zellen (APCs), an welchen der TCR bindet und kostimulatorische Moleküle (CD80/CD86) sowie Cytokine zugegen sind, werden T-Zellen zu Effektor T-Zellen (T_{EF}) aktiviert und unterlaufen eine klonale Expansion (Burnet, 1976; Zinkernagel & Doherty, 1974). Erfolgt die Präsentation des Antigens über den MHC-II-Peptidkomplex, werden $CD4^+$ T-Zellen aktiviert und differenzieren zu T-Helferzellen die in T_H1 -, T_H2 , T_H17 -Zellen und induzierte regulatorische T-Zellen

(iTregs) unterteilt werden. Sie rekrutieren und aktivieren B-Zellen, Makrophagen, Neutrophile und CD8⁺ T-Zellen und regulieren so die adaptive Immunantwort. Im Gegensatz dazu werden CD8⁺ T-Zellen über den MHC-I-Peptid-Komplex aktiviert und differenzieren zu zytotoxischen T-Zellen (CTL) (Zinkernagel & Doherty, 1974). Bindet eine CTL mit ihrem spezifischen TCR an Zellen, die einen MHC-I-Peptid-Komplex präsentieren, kommt es zur Ausschüttung von zytotoxischen Substanzen wie Granzyme B und Perforin, welches die infizierte Zelle lysiert oder leitet über die Bindung des Fas Liganden an FAS exprimierende infizierte Zelle deren Apoptose ein. Außerdem kommt es zur Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen (z.B. IFN- γ , TNF- α und IL-2) durch die CTLs.

Wurde die Infektion effizient bekämpft kommt es nach ca. 14 Tagen zu einer Rückbildung der T_{EF}-Zellen. Während dieser Phase gehen 90-95% dieser Zellen in Apoptose. Die verbleibenden 5-10% differenzieren zu unterschiedlichen Typen von Memory T-Zellen aus (Kaech & Wherry, 2007; Shin & Wherry, 2007).

1.5.1 Memory T-Zellen

Memory T-Zellen leiten eine schnellere und effizientere Immunantwort bei einem erneuten Kontakt mit dem Pathogen ein (Sallusto, Geginat, & Lanzavecchia, 2004). Im Gegensatz zu T_{EF}-Zellen, welche in nahezu jedes Gewebe einwandern können, gibt es unterschiedliche Memory T-Zell Populationen, die durch Expression unterschiedlicher Oberflächenmoleküle in verschiedenen Kompartimenten des Körpers angesiedelt sind.

Ursprünglich waren zwei Arten von Memory T-Zellen bekannt. Diese wurden mit Hilfe der Expression des Chemokinrezeptors CCR7 und des Selektins CD62L in die CCR7⁺ CD62L⁺ Central Memory T (T_{CM}) Zellen und in die CCR7⁻ CD62L⁻ Effektor Memory T (T_{EM}) Zellen unterschieden (Sallusto et al., 1999). T_{CM}-Zellen sind bedingt durch ihre *homing* Faktoren CCR7 und CD62L in den sekundären lymphatischen Organen angesiedelt (Sallusto et al., et al., 1999). Nach erneuter Erkennung ihres spezifischen Antigens proliferieren diese schnell, differenzieren zu T_{EF}-Zellen und beseitigen die Infektion (Von Andrian & Mackay, 2000). T_{EM}-Zellen hingegen sind in den nicht lymphatischen Organen anzutreffen (Masopust, Vezys, Marzo, & Lefrançois, 2001;

Sallusto et al., 1999). Sie exprimieren auf ihrer Oberfläche andere Chemokinrezeptoren und Integrine, die es ihnen ermöglichen sich in periphere Gewebe anzusiedeln (Sallusto et al., 1999). Kommen die T_{EM}-Zellen in der Peripherie mit Antigen in Kontakt leiten sie die schnelle Produktion von Effektor Cytokinen ein, um eine Immunantwort zu generieren.

Allerdings wurde die Idee der zwei zirkulierenden Memory T-Zell Populationen überdacht, als in Geweben wie Darm, Gehirn und Haut nicht zirkulierende Memory T-Zellen, insbesondere an zuvor infizierten Geweben gefunden wurden. Diese Zellen unterschieden sich von den zirkulierenden Memory T-Zellen durch die fehlende Fähigkeit der Migration, wie parabiotisch und Transplantationsexperimente zeigten (Klonowski et al., 2004; Masopust et al., 2010; Reading et al., 2009; Wakim, Woodward-Davis, & Bevan, 2010). Diese gewebespezifische Population der nicht zirkulierenden T-Gedächtniszellen erhielt den Namen Tissue-Resident Memory T (T_{RM}) Zellen.

1.5.1.1 Hautresidente Memory CD8⁺ T-Zellen (T_{RMS})

Hautresidente Memory CD8⁺ T-Zellen (T_{RMS}) sind eine spezifische Population der Memory T-Zellen. Diese nicht zirkulierenden Zellen können in einer Vielzahl von Organen in deren epithelialen Barrieren gefunden werden. So konnte gezeigt werden, dass T_{RMS} in nicht lymphoiden Organen wie der Haut, dem zentralen Nervensystem, in sensorischen Ganglien, dem Darm, dem weiblichen Reproduktionstrakt, den Speicheldrüsen und in der Lunge ansässig sind (Carbone, 2015; Çuburu et al., 2012; Jiang et al., 2012; Reading et al., 2009; Wakim et al., 2010; Wakim et al., 2013).

Neben ihrer Lokalisation sind hautresidente T_{RM}-Zellen durch die Expression von Integrin αE (CD103) von T_{CM}-Zellen und T_{EM}-Zellen unterscheidbar (Lee et al., 2011; Mackay et al., 2012; Masopust et al., 2010; Reading et al., 2009; Wakim et al., 2010). Ein weiteres Molekül, welches auf T_{RM}-Zellen im Darm, der Lunge, der Haut etc. von Mäusen exprimiert wird, ist das transmembrane C-Typ Lektin CD69 (Klonowski et al., 2004; Lee et al., 2011; Reading et al., 2009; Wakim et al., 2010; Zammit et al., 2006). Beide Oberflächenmoleküle tragen dazu bei, dass sich T_{RMS} in der Haut ansiedeln und dort verbleiben. Die Beibehaltung und das Überleben der T_{RM}-Zellen in der Haut scheint von der Interaktion von E-cadherin der Epithelzellen und der alpha Untereinheit

des E β 7 (CD103) auf den hautresidenten Memory Zellen abhängig zu sein (Carbone et al., 2013).

Nach einer akuten Virusinfektion präsentieren APCs in den sekundären lymphatischen Organen (SLOs) auf ihrem MHC-I-Komplex Antigene an die naiven CD8⁺ T-Zellen. Die naiven CD8⁺ T-Zellen durchlaufen mehrere Runden der Zellteilung, was zur Entstehung einer großen Anzahl an antigenspezifischen T_{EF}-Zellen führt. Neben ihrer Differenzierung zu zytotoxischen T-Zellen verändert sich auch die Expression der Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche der Zellen. Dies ermöglicht es den T_{EF}-Zellen die SLOs zu verlassen und in das entzündete Gewebe zu migrieren, um die Infektion zu bekämpfen (Kaech, Wherry, & Ahmed, 2002; Williams & Bevan, 2007). In Folge der erfolgreichen Bekämpfung kommt es durch Apoptose zur Rückbildung um 90-95% der T_{EF}-Zellen und die übrigen Zellen differenzieren zu Memory-Zellen aus.

Die T_{RMS} in der Haut haben ein dendritisches Erscheinungsbild und wandern langsam auf der Suche nach ihrem spezifischen Antigen durch die Epidermis (Ariotti et al., 2012; Gebhardt & Mackay, 2012; Zaid et al., 2014). Bedingt durch ihre Lokalisation an Stellen, die eine hohe pathogene Konfrontation mit sich bringt, sind T_{RMS} in der Protektion gegen Infektionen wie *Vaccinia Virus*, *Listeria monocytogenes* und HSV (Herpes simplex virus) gegenüber T_{CMs} klar im Vorteil (Ariotti et al., 2014; Jiang et al., 2012; Reading et al., 2009; Schenkel et al., 2015; Sheridan et al., 2014). Wie alle immunologischen Komponenten, spielen T_{RM}-Zellen auch eine Rolle bei Autoimmunerkrankungen der Haut wie der Psoriasis und der allergischen Kontaktdermatitis (Clark et al., 2015; Gaide et al., 2015).

T_{RMS} sind insbesondere in der Hautregion, in welcher eine Infektion oder Vakzinierung von CD8 T-Zellen bekämpft wurde zu finden (Ely, Cookenham, Roberts, & Woodland, 2014; Khan et al., 2016; Masopust, Jiang, Shen, & Lefrançois, 2001; Muschaweckh et al., 2016; Ray et al., 2004). Khan et al. konnte zeigen, dass aktivierte CD8⁺ T-Zellen Antigen unabhängig in die *Vaccinia* infizierte Haut einwandern und dort zu CD8⁺ T_{RMS} differenzieren. Die Anzahl an CD8⁺ T_{RMS} war jedoch an der Stelle der Infektion massiv erhöht, was für eine effizientere Differenzierung von CD8⁺ T_{RMS} in der Gegenwart von Antigen spricht (Khan et al., 2016). Die lokale Zusammensetzung der T_{RMS} in der Haut wird durch „Kreuz-Kompetition“ von lokalen Antigenen, also einer Antigen abgängigen Kompetetion beeinflusst (Muschaweckh et al., 2016).

Werden T_{RMS} erneut mit dem gleichen Antigen konfrontiert, stellen T_{RM} -Zellen die erste Welle der adaptiven zellulären Antwort dar und tragen erheblich zur Protektion gegenüber lokaler Reinfektion bei (Butler, Nolz, & Harty, 2011; Ray et al., 2004; Wu et al., 2014) (Khan et al., 2016). T_{RMS} besitzen die Fähigkeit nach ihrer spezifischen Reaktivierung durch die Ausschüttung des Effektor-Zytokinen $INF-\gamma$ andere Immunzellen (NK Zellen, T-Zellen) zu rekrutieren und lösen eine Entzündungsreaktion aus (Schenkel & Masopust, 2014).

Haben T_{RMS} ihre Nische gefunden, bleiben sie auch nach Reinfektion in diesem Gewebe. Bilden sich in der Reinfektion neue T_{RMS} aus, verdrängen diese die alten T_{RMS} nicht, sondern beide Populationen bleiben im Gewebe erhalten (Park, 2018).

Allerdings bleibt die Frage offen, welche Subtypen der dermalen dendritischen Zellen lokal Antigen präsentieren müssen, um zur Differenzierung und dem Erhalt von hautresidenten Memory $CD8^+$ T-Zellen beizutragen.

2. Zielsetzung der Arbeit

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der funktionellen *in vivo* Analyse der heterogenen Subpopulationen der dermalen dendritischen Zellen (dDCs) und der Keratinozyten.

Zunächst galt es die Auswirkungen der Applikation von aCD40, das in den folgenden Experimenten zur Aktivierung der antigenpräsentierenden Zellen genutzt werden sollte, auf die Migration von DCs zu untersuchen.

Frühere Experimente unseres Labors zeigten, dass die topische Expression von 4OH-Tamoxifen insbesondere bei konventionellen DCs Typ 1 (cDC1s) eine erhöhte CreERT Aktivität hervorrief (Hain et al., 2019). Ziel war es nun festzustellen, ob die Ursache hierfür zellintrinsisch ist oder mit deren Lokalisation in der Dermis in Verbindung steht.

Außerdem wurde bereits im DIETER Mausmodell gezeigt, dass CD207⁻ dDCs eine spezifische CD8⁺ T-Zellen induzieren können, die einen „*skin homing*“ Phänotyp aufwiesen. Diese zytotoxische T-Zell Antwort (CTL) protektierte gegen die Challenge mit rekombinatem *Vaccinia Virus* (Hain et al., 2019). Zum einen sollte geklärt werden, welche Rolle cDC2s oder monozytären DCs (moDCs), die in CD207⁻ dDCs zusammengefasst sind, im Einzelnen in diesem Zusammenhang spielen. Zum anderen wurde sich mit der Frage befasst, ob diese spezifischen CD8⁺ T-Zellen zu hautresidenten Memory Zellen (T_{RMS}) ausreifen.

Da die lokale Antigen Präsentation nicht die Einwanderung geprimter Zellen fördert, sondern deren Retention und Differenzierung zu T_{RMS} erhöht (Khan et al., 2016; Muschaweckh et al., 2016), galt es zu ermitteln, welche der dDC Subtypen lokal Antigen präsentieren müssen, um diesen Effekt auszulösen.

Zur Klärung dieser Fragen wurde das DIETER Mausmodell, welches die selektive Expression und Präsentation eines Antigen auf DCs erlaubt (Probst et al., 2003) zu Hilfe genommen. Dieses Mausmodell wurde auf Mauslinien gekreuzt, die defizient für unterschiedliche dDCs sind. Das tatsächliche Fehlen der jeweiligen dDC Zelltypen in

der Haut galt es in dieser Arbeit zu belegen. Um sicher zu gehen, dass Antigene ausschließlich auf DCs präsentiert werden, in denen sie exprimiert werden, musste eine Kreuzpräsentation von DC zu DC ausgeschlossen werden können.

Außerdem wurde neben der funktionellen Analyse der dDCs auch die Rolle der in der Epidermis angesiedelten Keratinozyten hinsichtlich der eben beschriebenen Punkte untersucht.

3. Material und Methode

3.1 Material

3.1.1 Plastik- und Glaswaren

Artikel	Dimension	Hersteller	Art. No.
Abdeckplatten (steril)		Greiner	656161
Brand® UV Küvetten		Sigma-Aldrich	7592 10
Blutlanzetten	2,9 mm	B.Barun	6182003
Cryo´s	2,0 mL	Greiner	122280
Einmal Handschuhe		Sempercare	3780872
Eppendorfgefäß	1,5 mL	Greiner	616 201
	2,0 mL		623 201
FACS-Röhrchen	5 mL	Sarstedt	551.579
Kanülen	27G ½"	B.Barun	466 5406
MACS Säule		Miltenyi Biotec	130-042-401
Pasteurpipetten	5 mL	Greiner	606 180
	10 mL	nerbe plus	12-461-9108
	25 mL	Greiner	760 180
PCR Tubes + Deckel	0,2 mL	peqlab	82-0776-A
Petrischalen	100x10 mm	Capitol Scientific	172958
Pipettenspitzen (steril + gestopft)	10 µL	nerbe plus	07-613-7300
	20 µL		07-622-7300
	200 µL		07-662-7300
	1000 µL		07-693-7300
qPCR-Platten	96-Well	Axon	28242
Ultraklare qPCR-Deckelstreifen	8-Well	Axon	28277
Reaktionsgefäße	15 mL	Greiner	188 271
	50 mL		227 261
Spritzen	1 mL	B.Braun	9166017V
Spritzenfilter	0,22 µm	Roth	P668.1

Well-Platten	6-Well		657 160
	24-Well	Greiner	662 160
	96-Well		651 101
Zellkulturflaschen	175 cm ²	Greiner	661 175
	75 cm ²		658 175

3.1.2 Geräte und Hilfsmittel

Artikel	Hersteller	Typ
Analysewaage	Mettler	AE100
Durchflusszytometer		FACSCanto
	Becton Dickinson	LSR II
		FACSymphony
Einfrierbox	Nalge Nunc International	Nalgene® Cryo 1 °C „Mr. Frosty“ Freezing Container
Feinwaage	Sartorius	LP2200P
Geldokumentation	Bio-Rad	Gel Doc XR System
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad	
Homogenisator	neo-Lab	Wheaton-Gewebe
		Handhomogenisator
Inkubator	Sanyo	CO ₂ Incubator
	Thermo Scientific	HERACELL 150i
Kurzhaarschneider	Aesculap®	GT420 Isis
Laborrührwerk	VWR	VOS 16
Lichtmikroskop (Z)	Olympus	CKX31
Mehrkanal-Pipetten	eppendorf	
PCR-Cycler	peqLab	peqStar
pH Meter	WTW	pH 537
Photometer	Eppendorf	Biophotometer 6131
Pinzetten	FST	Optikerpinzette 11271-30
		gerade Pinzette 91100-12
Pipetten	Eppendorf	1 µL – 1000 µL
Pipettierhilfe	Integra Biosciences	
Plattformschüttler	Heidolph	Titramax 100
qPCT Cycler	Bio-Rad	MyiQ
Rasierer	Braun	190s-1

Scheren	FST	Hautschere 14060-10 Fellschere 91401-12 Organschere 91460-11
Spannungsquelle	amersham pharmacia Biotech	EPS 3501 XL
Sterilbank	Thermo	MSC-Advantage
Thermoschüttler	peqlab HTA-BioTec	TS-100 HTM
Tischzentrifuge	ependorf	Centrifuge 5415 D
Ultraschall- Homogenisator	Hielscher	VialTweeter
Vortexer	Bender&Hobein AG	Vortex Genie 2
Zählkammer	Assistant	Neubauer-Zählkammer Improved
Zellseparationssystem	Miltenyi Biotec	MACS Magnet
Zentrifuge	Thermo Scientific	Heraeus Multifuge 3L-R Heraeus Multifuge 3L

3.1.3 Chemikalien

Artikel	Hersteller	Art. No.
1-Fluoro-2,4-dinitrobenzol (≥ 99%) (DNFB)	Sigma Aldrich	D1529
4-Hydroxytamoxifen (≥ 70% Z Isomer)	Sigma-Aldrich	H6278-10MG
Aceton	Aceton	KK40.1
Agarose	AppliChem	A2114
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Roth	K298.2
BORGAL Lösung 24%	Virbac	19400456
Borsäure	Roth	6943.2
BW245C	Cayman Chemicals	12050
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Roth	CN93
Chloroform/Isoamyl- (24:1)	alkohol Roth	X984.2
Dibuthylphtalath	Sigma Aldrich	D2270
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth	A994.1

Diphtherie Toxin	Merck Millipore	322326
dNTPs (100 mM)	Thermo Scientific	R0182
Essigsäure	Sigma-Adrich	6755.2
Ethanol (EtOH) 96%	Roth	T171.4
Ethidiumbromid	Roth	7870.2
Ethylendiamintetra- essigsäure (EDTA)	Roth	8040.2
EvaGreen®	Axon	27490
Forene (Isofluran)	Abott	B506
Formaldehyd 37%	Roth	4979.1
Hepes	Roth	9105.3
Isopropanol	Roth	AE73.1
Kaliumchlorid (KCl)	Roth	6781.1
Kaliumhydrogen- carbonat (KHCO ₃)	Merck	4854
Ketamin	ratiopharm	7538837
	Inresa	26671.00.00
Kristallviolett	Roth	123.1
Maisöl	Sigma-Aldrich	C8267
Magnesiumchlorid (25 mM)	Promega	A351H
Natrium-Azid (Na-Azid)	Roth	K305.1
Natrium-Dihydrogen- -Phosphat (NaH ₂ PO ₄)	Roth	2370.1
Natriumchlorid (NaCl)	Roth	9265.2
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma	221465
Nonidet P-40	Sigma	NP40S
Optiprep	Sigma	D1556
Roti®-Histofix 4%	Roth	P087.3
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl)	Roth	9090.3
Trypanblau	Sigma-Aldrich	T6146
Tween-20	Roth	9127.2
Xylazin	Bayer	1320422
Xylene Cyanole FF	Sigma	X-2751

3.1.4 Puffer

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

Puffer	Zusammensetzung
ACK-Puffer	0,1 mM EDTA 150 mM NH ₄ Cl 1 mM KHCO ₃ (pH 7,3)
DNA-Blau-Lösung	500 mg Xylene Cyanole FF in 1 L H ₂ O
FACS Puffer	PBS 1 % BSA 20 mM EDTA 0,02 % Na-Azid
Kristallviolett-Färbelösung	5 g Kristallviolett 50 mL 37% Formaldehyd 8 g NaCl 450 mL ddH ₂ O 500 mL EtOH 96%
MACS Puffer	PBS 0,5% BSA 5 mM EDTA
10x PBS	1,4 M NaCl 0,1 M NaH ₂ PO ₄ in H ₂ O pH 7,2
Proteinase K Aktivierungspuffer	3 mM CaCl 10 mM Tris 50 mM Kaliumchlorid; pH 8
SDQ-Puffer	50 mM KCl 10 mM Tris-HCl, pH 9,0 0,45% Nonidet P-40 0,45% Tween-20 0,1 mg/mL Proteinase K

Permeabilisierungspuffer	HBSS 2mM EDTA 0,5% BSA 0,1% Saponin
50x TAE-Puffer	2 M Tris-HCl 1 M Essigsäure 50 mM EDTA
10x TBE-Puffer	108 g Tris Base 55 g Borsäure 50 mM EDTA
Trypanblau Lösung	0,05 % (w/v) Trypanblau 140 mM NaCl 10 mM NaH ₂ PO ₄

3.1.5 Medien

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

3.1.6 Medienzusätze

Bezeichnung	Hersteller	Art. No.
Bovines Serum Albumin (BSA)	PAA	K45-001

Fetales Bovines Serum (FBS)	Gibco	10270
L-Glutamin	Sigma-Aldrich	G7513-100ML
Natriumpyruvat (100 mM)	Gibco	11360
Penicillin / Streptomycin	Sigma-Aldrich	P4333

3.1.7 Medien für Zellkulturen

Bezeichnung	Zusammensetzung
DMEM 10%	10% FCS 1% Na-Pyruvat 1% L-Glutamin 1% Penicillin / Streptomycin
RPMI-1640 10%	10% FCS 1% Na-Pyruvat 1% L-Glutamin 1% Penicillin / Streptomycin
Gefriermedium	90% FCS 10% DMSO

3.1.8 Enzyme

Artikel	Hersteller	Art. No.
Collagenase IV	Worthington	CLSS-4
Collagenase A	Roche	10103586001
DNase I	Sigma-Aldrich	DN25-100MG
Dispase II	Sigma-Aldrich	4942078001
Go Taq® Polymerase	Promega	M7806
Proteinase K (aus <i>Tritirachium album</i>)	Serva	33752
10X Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich	T4174

3.1.9 Kits

Artikel	Hersteller	Art. No.
CD8 T Cell Isolation Kit, mouse	Miltenyi Biotec	130-104-075
EasySep Mouse CD8a Positive Selection Kit II	StemCell	18953
Go Taq G2 Flexi	Promega	M7806

3.1.10 Oligonukleotide / Primer

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

Genotypisierung	Sequenz 5'-3'
<i>Batf3</i> ^{-/-}	Common F: TGCTATGCACAAACCACAAACC Mut R: GATACAGGCTGCTGATCTGAG WT R: GTTGTGAGTCGAAACCACGC
<i>Ccr2</i> ^{-/-}	Common: CCACAGAATCAAAGGAAATGG Mut F: CCTTCTATCGCCTTCTTGACG WT R: CACAGCATGAACAATAGCCAAG
Cre	F: GGACATGTTCAAGGATCGCCAGGCG R: GCATAACCAGTGAAACAGCATTGCTG
<i>Flt3</i> ^{-/-}	F: TCCACGTTGTTCCCTCTACC WT R: TATGTGGGCAATTTGGCTCT MUT R: TGATCTCGTCGTGACCCAT
LangDTR	WT F: GAATGACAGATCTGGCCTGAGCTCG Common R: GTAGCTTTTATATGGTCAGCCAAGG Mut F: TTCCAGCAGCTAGCCCTCTCCGAA
Rosa26-RFP	Mut F: AAGACCGCGAAGAGTTTGTC Common F: AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT WT R: GGAGCGGGAGAAATGGATATG
ST33	F: CCTCACATCATTGATGAGG R: CACGCGGGCGTACATGG

3.1.11 Antikörper

Spezifität	Conjugate	Klon	Verdünnug	Isotyp	Hersteller
BV510 Bio	BV510		1:4000		BioLegend
Fixable Viability Dye	eFluor780		1:1000		eBioscienc e BD
H2-D ^b	Biotin	28-14-8	1:500	Mouse C3H	Pharminge n
Humanes IgG Fc	FITC	nicht mehr verfügbar	1:500		Acris
mB220	PE/Cy5	RA3-6B2	1:500	Rat IgG2a, κ	BioLegend
mCCR2	APC	475301	1:100	Rat IgG2b	R&D System
mCD103	BV510	2E7	1:200	Armenian Hamster IgG	BioLegend
	BV711	M290	1:150	Rat LOU	BD Horizon
	BV421	2E7	1:100	Armenian Hamster IgG	BioLegend
	BV421	M290	1:100	Rat LOU	BD Horizon
mCD11b	BV650	M1/70	1:2000	Rat IgG2b, κ	BioLegend
	PE/Cy5	M1/70	1:1000	Rat IgG2b, κ	BioLegend
	BV605	M1/70	1:2000	Rat IgG2b, κ	BioLegend
	PE	M1/70	1:4000	Rat IgG2b, κ	BioLegend
mCD11c	APCR700	N418	1:200	Armenian Hamster IgG ₂	BD Horizon
	PE-Cy7	N418	1:500	Armenian Hamster IgG	BioLegend
	BV605	N418	1:500	Armenian Hamster IgG	BioLegend
mCD127	BV605	A7R34	1:250	Rat IgG2a, κ	BioLegend
mCD172a	PE-Cy7	P84	1:300	Rat IgG1, κ	BioLegend
	PE	P84	1:500	Rat IgG1, κ	BioLegend
	PerCP/Cy5.5	P84	1:300	Rat IgG1, κ	BioLegend
mCD19	PE/Cy5	6D5	1:500	Rat IgG2a, κ	BioLegend

mCD207	APC	929F3.01	1:400	Rat IgG2a	Dendritics
mCD24	FITC	M1/69	1:2000	Rat IgG2b, κ	BioLegend
	PE	M1/69	1:2000	Rat IgG2b, κ	BioLegend
	APC	30-F1	1:2000	Rat IgG2c, κ	BioLegend
mCD26	FITC	H194-112	1:500	Rat IgG2a, κ	BioLegend
mCD3	PE/Cy5	145-2C11	1:500	Armenian Hamster IgG	BioLegend
mCD4	PE/Cy5	RM4-5	1:400	Rat IgG2a, κ	BioLegend
	APC	GK1.5	1:500	Rat IgG2b, κ	BioLegend
mCD44	BV605	IM7	1:250	Rat IgG2b, κ	BioLegend
	APC	IM7	1:400	Rat IgG2b, κ	BioLegend
mCD45.1	PB	A20	1:500	Mouse IgG2a, κ	BioLegend
	FITC	A20	1:500	Mouse IgG2a, κ	BioLegend
	PE-Cy7	A20	1:400	Mouse IgG2a, κ	BioLegend
	APC	A20	1:500	Mouse IgG2a, κ	BioLegend
	BV421	A20	1:500	Mouse I gG2a, κ	BioLegend
mCD45pan	BV421	30-F11	1:1000	Rat IgG2b, κ	BioLegend
	BV785	30-F11	1:1000	Rat IgG2b, κ	BioLegend
mCD62L	APC	MEL-14	1:1000	Rat IgG2a, κ	BioLegend
	PE-Cy7	MEL-14	1:400	Rat IgG2a, κ	BioLegend
mCD64	PE	X54-5/7.1	1:250	Mouse IgG1, κ	BioLegend
	PerCP/Cy5.5	X54-5/7.1	1:250	Mouse IgG1, κ	BioLegend
	BV421	X54-5/7.1	1:250	Mouse IgG1, κ	BioLegend
mCD69	APC	H1.2F3	1:400	Armenian Hamster IgG	BioLegend
mCD8	BV711	53-6.7	1:500	Rat IgG2a, κ	BioLegend
	APC	53-6.7	1:500	Rat IgG2a, κ	BioLegend
	PE	53-6.7	1:500	Rat IgG2a, κ	eBioscienc e
	PB	53-6.7	1:500	Rat IgG2a, κ	BioLegend
	BV785	53-6.7	1:500	Rat IgG2a, κ	BioLegend

mCD90.1	BV711	OX-7	1:1000	Mouse IgG1, κ	BioLegend
	FITC	HS51	1:10.000	Mouse IgG2a, κ	eBioscience
mEpCAM	APC	G8.8	1:3000	Rat IgG2a, κ	BioLegend
mF4/80	PerCP/Cy5.5	BM8	1:250	Rat IgG2a, κ	eBioscience
mKLRG1	APC	2F1/KLRG1	1:1000	Syrian hamster IgG	BioLegend
mLy6C	BV605	AL-21	1:250	Rat IgM, κ	BD Horizon
mMerTK	PE-Cy7	DS5MMER	1:1000	Rat IgG2a, κ	eBioscience
	Biotin	BAF591	1:333	Goat IgG	R&D System
mMHC II	APC	M5/114.15.2	1:1000	Rat IgG2b, κ	BioLegend
	PE/Cy5	M5/114.15.2	1:1000	Rat IgG2b, κ	BioLegend
	BV510	M5/114.15.2	1:2000	Rat IgG2b, κ	BioLegend
	BV605	M5/114.15.2	1:2000	Rat IgG2b, κ	BioLegend
mNK1.1	PE/Cy5	PK136	1:500	Mouse IgG2a, κ	BioLegend
mVα 2	PE	B20.1	1:500	Rat IgG2a, λ	BioLegend
mXCR1	BV650	ZET	1:500	Mouse IgG2b, κ	BioLegend
rek. Maus E-Selection / CD62E Chimera Protein	Fc		1:500	Human IgG ₁	R&D System
rek. Maus P-Selection / CD62P Chimera Protein	Fc		1:500	Human IgG ₁	R&D System

Streptavidin	PE	1:500	eBio- science
--------------	----	-------	------------------

3.1.12 Zelllinien

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

3.1.13 Virus

Vaccinia Virus G2 (VV G2) Rekombinanter *Vaccinia* Virus, welcher das G2 Glycoprotein von LCMV beinhaltet (Hany et al., 1989). Der Virus wurde von HC Probst zur Verfügung gestellt und auf BSC-40 Zellen produziert.

Vaccinia Virus OVA (VV OVA) Rekombinanter *Vaccinia* Virus, welcher das OVA Gen exprimiert. Der Virus wurde von HC Probst zur Verfügung gestellt und auf BSC-40 Zellen produziert.

3.1.14 Mausstämme

3.1.14.1 C57BL/6J (Wildtyp-Stamm)

Die Wildtyp Mäuse wurden von Janvier Labs oder The Jackson Laboratory bezogen. Der genetische Hintergrund aller verwendeter Mäuse war C57BL/6J, mit dem MHC-Haplotyp H-2^b.

3.1.14.2 C57BL/6J, Ly5.1 (B6.SJL-Ptprc^a Pepc^b/BoyJ)

Der Stamm unterscheidet sich von C57BL/6 und BALB/c Mäusen durch eine Punktmutation im CD45 Gen (Ptprc_a). Während Wildtyp Mäuse des Stammes C57BL/6 und BALB/c CD45.2 (Ly5.2) Allele exprimieren, exprimieren Ly5.1 Mäuse das CD45.1 Gen. Aus diesem Grund werden die Mäuse häufig in Transplantationsstudien verwendet (Ratajczak et al., 2001).

3.1.14.3 C57BL/6J, Thy1.1 (B6.PL-Thy1^a/CyJ)

Dieser congenetische C57BL/6J Stamm trägt das T-Lymphozyten-spezifische Allel Thy1.1. Somit sind adoptiv transferierte T-Zellen leicht von T-Zellen des Rezipienten zu unterscheiden (Trowbridge & Mazauskas, 1976).

3.1.14.4 CD11cCreERT X ST33 (DIETER)

DIETER (*dendritic cell specific inducible expression of t-cell epitopes after recombination*) Mäuse tragen zwei Transgene: CD11c-CreERT und ST33.396. Nach Applikation von Tamoxifen exprimieren ca. 5% aller dendritischen Zellen zwei CTL-Epitope von LCMV und ein CTL-Epitop der E. coli β -Galaktosidase (Probst et al., 2003). Ein Transgen kodiert für eine Cre-Rekombinase unter dem CD11c-Promotor, wodurch nur CD11c⁺ Zellen (DCs) die Cre-Rekombinase exprimieren. Die Cre-Rekombinase wird als Fusionsprotein mit der mutierten Form der Bindedomäne des Estrogen-Rezeptors exprimiert. Tamoxifen, bzw. sein aktiver Metabolit 4OH-Tamoxifen, der gegenüber dem Estrogen-Rezeptor eine höhere Affinität besitzt, (Jordan & Dix, 1979) stellen die Liganden gegenüber der mutierten Bindedomäne dar. Bindet einer der beiden Liganden an die Bindedomäne des Estrogen-Rezeptors, kommt es zu einer Translokation der Cre-Rekombinase in den Nukleus und deletiert loxP-flankierte Nukleotide. Das zweite Transgen ST33.396 kodiert für zwei CTL-Epitope aus LCMV (GP₃₃₋₄₁/D^b und NP₃₉₆₋₄₀₄/D^b) und ein CTL-Epitop der β -Galaktosidase (β -Gal₄₉₇₋₅₀₅/K^b). Diese CTL-Epitope werden unter dem ubiquitären β -Aktin Promotor als Fusionsprotein mit dem *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) exprimiert. Eine loxP-flankierte STOP-Kassette trennt den Promotor und das Transgen, wodurch das Transgen nicht exprimiert wird. Durch die Gabe von Tamoxifen oder 4-OHT kommt es zur Translokation der Cre-Rekombinase, was eine Deletion der loxP-flankierten STOP-Sequenz zur Folge hat. Dies führt dazu, dass CD11c⁺ Zellen die ST33-kodierten CTL-Epitope exprimieren (Probst et al., 2003).

3.1.14.5 P14 (B6;D2-Tg(TcrLCMV)327Sdz/JDvsJ)

TCR327 transgene Mäuse wurden durch die Nutzung der vom CTL Klon P14 isolierten α - und β - Kette generiert. Dieser transgene T-Zell-Rezeptor erkennt das Epitop 33-41 aus dem *Lymphocytic Choriomeningitis Virus* (LCMV) Glycoprotein (GP₃₃₋₄₁) im Kontext von MHC-Klasse I H-2D^b (Pircher et al., 1990).

3.1.14.6 Nur77GFP (C57BL/6-Tg(Nr4a1-EGFP/cre)820Khog/J)

Nur77eGFP transgene Mäuse exprimieren das *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) unter der Kontrolle der Nr4a1 (Nur77) Promotor/Enhancer Regionen innerhalb des Bacterial Artificial Chromosome (BAC) RP24-366J14 Transgens. In T- und B-Zellen werden niedrige Level an GFP beobachtet. Bei Stimulation des Antigenrezeptors wird GFP in Nur77-GFPCre BAC transgenen Mäusen hochreguliert, im Gegensatz jedoch zum CD69 Marker der T-Zell Aktivierung, wird GFP nicht durch entzündliche Stimuli ausgelöst. Außerdem reflektiert die Menge an exprimiertem GFP während der akuten Aktivierung die spezifische Stimulation des T-Zell Rezeptors (TCR), während hingegen das niedrige Level an GFP in naiven T-Zellen von der stetigen Interaktion mit MHC hervorgerufen wird.

Da die Expressionsmenge an GFP in Korrelation zur Bindungsstärke des Antigenrezeptors bei Nur77eGFP transgenen Mäusen steht, sind diese Mäuse nützlich zur Untersuchung der positiven und negativen Selektion im Thymus sowie der Aktivierung von Lymphozyten (Moran et al., 2011).

3.1.14.7 Langerin-DTR (B6.Cd207^{tm1(DTR/GFP)}Bjec)

Diese Mäuse exprimieren den humanen *Diphtherie Toxin* Rezeptor (DTR) unter der Kontrolle des Langerin-Promotors, der die Depletion aller Langerin-tragender Zellen durch die Injektion von *Diphtherie Toxin* (DT) ermöglicht (Bennett et al., 2005; Kissenpfennig et al., 2005).

3.1.14.8 Batf3^{-/-} (B6.129S(C)-Batf3^{tm1Kmm}/J)

Mäuse dieses Stammes tragen eine Mutation des Exon 1 und 2 des Transkriptionsfaktors *BATF3* (*basic leucine zipper transcription factors, ATF-like3*), welches die Expression von *BATF3* verhindert (Hildner et al., 2008). *BATF3*

defizienten Mäusen fehlen konstitutiv CD207⁺ CD103⁺ dermale dendritische Zellen (Edelson et al., 2011; Tussiwand et al., 2012) - diese Zellen werden auch als cDC1s bezeichnet (Guilliams et al., 2016).

Diese Mäuse wurden über mindestens 12 Generationen auf C57BL/6 zurück gekreuzt, da sie ursprünglich den genetischen Hintergrund 129SvEv besitzen.

3.1.14.9 *Flt3*^{-/-} (B6.129-*Flt3*^{tm1Dgg}/J)

Flt3^{-/-} transgene Mäuse sind genetisch veränderte Mäuse, die keine FMS-like Tyrosin Kinase (*Flt3*) besitzen. *Flt3* spielt eine entscheidende Rolle in der frühen Phase der Entwicklung der hämatopoetischen Stammzellen. Das Fehlen von *Flt3* führt zu einer Verminderung von DCs die sich aus der myeloiden und lymphoiden Linie entwickeln. Conventionelle DCs (cDCs) werden in Mäusen dieses Stammes nicht gebildet, wohingegen die Entwicklung von moDCs nicht beeinflusst werden (Mackarehtschian et al., 1995).

3.1.14.10 *Ccr2*^{-/-} (B6.129S4-*Ccr2*^{tm1ffc}/J)

Durch den Knock-out des Genes *Ccr2* in diesen Mäusen fehlt der C-C Chemokinrezeptors Type 2 (*CCR2* oder CD192). Aus diesem Grund ist es Monozyten nicht möglich das Knochenmark zu verlassen und somit haben sie auch nicht die Möglichkeit, sich als moDCs im Gewebe anzusiedeln. Mäuse dieser Linie entwickeln bis auf die fehlenden moDCs ein normales dermales DC Subpopulation Umfeld (Boring et al., 1997).

3.1.15.11 *Rosa26RFP* (Gt(*ROSA*)26Sortm1Hjf)

Mäuse dieses Stammes tragen das Reportergeren Red Fluorescence Protein (RFP) im Rosa26 Locus, dem eine loxP flankierte STOP Sequenz vorangeht. Nach Aktivierung der Cre-Rekombinase exprimieren Zellen dieses Reportergeren. Die Mäuse besitzen den C57BL/6 Hintergrund (Luche et al., 2007).

3.1.14.12 *H2-D^b*^{-/-} (B6.129P2-*H2-Db*^{tm1} N12)

Mäusen dieses Stammes fehlen auf Grund einer genetischen Mutation die H2-D^b Moleküle (Pascolo et al., 1997; Pérarnau et al., 1999).

3.1.14.13 K14Cre (B6.Tg(K14-cre/ERT)61Gkl) X ST33 (K14-DIETER)

K14Cre Mäuse exprimieren eine Tamoxifen induzierbare Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Keratin 14 Promotors, der selektiv in Keratinozyten aktiv ist. K14-DIETER Mäuse verhalten sich analog zu den in 3.1.14.4 beschriebenen DIETER Mäusen. Nach Applikation von Tamoxifen oder 4-OHT exprimieren die Keratinozyten die transgenen CTL Epitope (Vasioukhin et al. 2002).

3.2 Methode

3.2.1 Zellbiologische Methoden

3.2.1.1 Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zellen wurden an einer sterilen Werkbank durchgeführt und im Inkubator (37 °C, 5% CO₂, 100% Luftfeuchtigkeit) kultiviert.

3.2.1.2 Auftauen von Zellen

Die bei –196 °C in Stickstoff gelagerten und in Gefriermedium (90% FCS, 10% DMSO) eingefrorenen BSC-40 Zellen wurden bei RT vorsichtig aufgetaut. Sobald keine Eiskristalle im 2 mL Cryo-Röhrchen mehr zu erkennen waren wurden die Zellen mit einer Pipette in einen 50 mL Falcon überführt in welchem sich 10 mL auf 37 °C vorgewärmtes DMEM 10% befanden. Die Zellen wurden in einem Waschschrift bei 400 rcf, 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, um sie vom zytotoxischen DMSO zu befreien. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 2 mL DMEM 10% aufgenommen. Eine Hälfte der Zellsuspension wurde in einer 175 cm² Zellkulturflasche ausgesät, in die bereits 20 mL DMEM 10% vorgelegt wurden. Der zweite Milliliter wurde zu 4 mL Medium in eine Vertiefung einer 6-Well-Platte gegeben, resuspendiert und 1 mL dieser Zellsuspension in das zweite Well der Platte überführt. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis in allen 6 Vertiefungen eine Verdünnungsreihe entstand. Sowohl die Zellkulturflasche als auch die 6-Well-Platte wurde unter Zellkulturbedingungen kultiviert.

3.2.1.3 Kultivieren von Zellen

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

Zellsuspension in einen 50 mL Falcon überführt und für 5 Minuten, 400 rcf und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt und verworfen. Nach einem weiteren Waschschrift wurde das Zellpellet mit DMEM 10% auf die gewünschte Zellzahl eingestellt und 1 mL der Lösung in eine oder mehrere neue Zellkulturflaschen überführt, die bereits 25 mL DMEM 10% enthielten.

3.2.1.4 Einfrieren von Zellen

Die BSC-40-Zellen einer halbkonfluenten 175 cm² Zellkulturflasche wurden mit 10 mL Trypsin-EDTA-Lösung vom Gefäßboden gelöst, das Trypsin mit 20 mL DMEM 10% inaktiviert und die Zellsuspension bei 400 rcf für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen, das Zellpellet in 1 mL Gefriermedium (90% FCS, 10% DMSO) aufgenommen. Je 500 µL wurde in ein 2 mL Cryo-Röhrchen überführt und die gefüllten Gefäße in einen auf 4 °C gekühlten Nalgene® Cryo 1 °C “Mr. Frosty” Freezing Container, mit einer Kühlrate von 1 °C/Minute gestellt und bei –80 °C gelagert. Am folgenden Tag wurden die Zellen für eine dauerhafte Lagerung in flüssigem Stickstoff weggefroren.

3.2.1.5 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der lebenden Zellen einer Zellsuspension wurde ein Aliquot dieser Suspension entnommen und mit Trypanblau-Lösung verdünnt. 10 µL der Verdünnung wurde auf eine Neubauer Zählkammer pipettiert und ausschließlich die farblosen, lebenden Zellen in einem oder mehr Quadraten der Zählkammer ausgezählt. Durch Multiplikation der lebenden gezählten Zellen pro Quadrat (N), dem Verdünnungsfaktor (V) und dem Kammerfaktor (10⁴) wurde die Lebendzellzahl je Milliliter ermittelt.

$$\text{gezählte Zellen (N) x Verdünnungsfaktor (V) x Kammerfaktor (10}^4\text{) = Zellzahl / mL}$$

3.2.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.2.1 Verdau von Gewebe für PCR

Für die Genotypisierung der Mäuse wurde den Tieren 2–3mm der Schwanzspitze mit einer Schere entfernt. Die Biopsie wurde in 500 µL Proteinase K aufgenommen. Die Proben wurden bei 65 °C für 2 Stunden auf dem Thermoschüttler bei 900 rpm vollständig verdaut. Anschließend wurden die Proteinase K bei 95 °C für 20 Minuten inaktiviert. Die Proben wurden zusätzlich mit 500 µL DNA-Blau-Lösung versehen. Unverdauliche Bestandteile der Probe, wie Haare, wurden durch eine Zentrifugation von 30 Sekunden bei 13.500 rpm auf dem Gefäßboden sedimentiert. Die Proben wurden im Anschluss bei 4 °C gelagert und 0,6 µL je Probe wurden für die PCR verwendet.

3.2.2.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

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

Komponente	Volumen	Finale Konzentration
5x Green GoTaq Flexi Puffer	2 µL	1x
MgCl ₂ Lösung (25 mM)	1,2 µL	1.5 mM
PCR Nucleotid Mix (10 mM je Nucleotid)	0,4 µL je 0,1 µL	0.2 mM pro Nucleotid 0,5 µM je Primer
Primer (je 100 µM)		
GoTaq DNA Polymerase (5 U/µL)	0,1 µL	1.25 U
DNA Template	0,6 µL	
Nuclease freies Wasser	bis 20 µL auffüllen	

Transgen	Primer	PCR Programm	Amplifikate
CD11cCreER _T	Cre fwd Cre rev	94 °C 30 Sek 60 °C 30 Sek 72 °C 30 Sek 35x 72 °C 5 min	Transgen: 350 bp WT: keins
ST33	ST33 fwd ST33 rev	94 °C 30 Sek 60 °C 30 Sek 72 °C 30 Sek 35x 72 °C 5 min	Transgen: 250 bp WT: keins
LangDTR	LangDTR WT fwd LangDTR Common rev LangDTR Mut fwd	94 °C 30 Sek 60 °C 60 Sek 72 °C 120 Sek 35x 72 °C 5 min	Transgen: 866 bp WT: 329bp
<i>Batf3</i> ^{-/-}	<i>Batf3</i> ^{-/-} Common fwd <i>Batf3</i> ^{-/-} Mut rev <i>Batf3</i> ^{-/-} WT rev	94 °C 30 Sek 59 °C 60 Sek 72 °C 60 Sek 35x 72 °C 5 min	Transgen: 750 bp WT: 288bp
<i>Ccr2</i> ^{-/-}	<i>Ccr2</i> ^{-/-} Common <i>Ccr2</i> ^{-/-} Mut fwd <i>Ccr2</i> ^{-/-} WT rev	94 °C 30 Sek 59 °C 30 Sek 72 °C 30 Sek 35x 72 °C 5 min	Transgen: 390 bp WT: 494 bp
<i>Flt3</i> ^{-/-}	<i>Flt3</i> ^{-/-} fwd <i>Flt3</i> ^{-/-} WT rev <i>Flt3</i> ^{-/-} Mut rev	94 °C 30 Sek 59 °C 30 Sek 72 °C 30 Sek 35x 72 °C 5 min	Transgen: 500 bp WT: 163 bp

Rosa.RFP	Rosa mut	94 °C 30 Sek	Transgen: 320 bp
	Rosa common	58 °C 60 Sek	WT: 600 bp
	WT rev	72 °C 60 Sek	
		35x	
		72 °C 5 min	

3.2.2.3 DNA Agarosegelelektrophorese

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

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

3.2.2.4 Arbeiten mit Virus

3.2.2.4.1 Gewinnung großer Mengen des *Vaccinia Virus*

Hierfür wurden BSC-40 Zellen in 175 cm² Kulturflaschen bis zu einer Dichte von 10⁷ Zellen pro Flasche kultiviert. Mit einer Pasteurpipette wurde das DMEM 10% abgesaugt und 5*10⁵ pfu des rekombinanten VV G2 (MOI=0,05) bzw. VV-OVA in 5 mL DMEM 10% zugegeben. Um eine gute Verteilung des Virus auf den Zellen zu gewährleisten, wurden die Zellkulturflaschen bei RT über einen Zeitraum von einer Stunde alle 5 Minuten für 1 Minute auf dem Plattformschüttler (250 rpm) geschwenkt. Im Anschluss wurden 30 mL DMEM 10% zugefügt und im Inkubator bei 37 °C für 36-

48 Stunden bis zur Ablösung aller Zellen vom Flaschenboden inkubiert. Medium und Zellen wurde mit einer Pasteurpipette in einen 50 mL Falcon überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt (400 rcf und 4 °C für 5 min) wurde der Überstand bis auf 2 mL abgesaugt. Im restlichen Überstand wurden die Zellen vorsichtig resuspendiert und zu je 1 mL in 2 mL Eppendorfgefäße überführt und im Kühlhaus bei 4 °C 3-6 mal für 10 Sekunden mit dem Ultraschall-Homogenisator sonifiziert, bis eine trübe Suspension entstand und zu 100 µL in PCR Tubes aliquotiert. Der neu gewonnene Virus wurde bei -80°C gelagert. Der Virustiter des neu gewonnenen Virus, wurde anhand eines zuvor auf -80°C gekühlten Aliquots mittels Plaque Assay ermittelt.

3.2.2.4.2 Virustiterbestimmung mittels Plaque Assay

Zur Bestimmung des Virustiters des VV wurden 100 µL Virus mit 900 µL DMEM 10% verdünnt und je 200 µL in zwei Wells in die erste Reihe einer 96-Well Platte gegeben. Für die Virustiterbestimmung infizierter Mäuse wurden infizierte Ohren in 1 mL Medium gegeben und das Gewebe mit einem elektrischen Pistill 30 Sekunden aufgeschlossen (Pottern) (3.2.2.4.4). Je 200 µL wurden anschließend in zwei Wells der ersten Reihe einer 96-Well Platte gegeben.

In die weiteren Vertiefungen 2 bis 11 der genutzten Spalten der 96-Well-Platte, wurden 130 µL DMEM 10% vorgelegt. Mit einer Mehrkanalpipette wurden die Proben der ersten Reihe resuspendiert und 60 µL in die zweite Reihe überführt, hier erneut resuspendiert und 60 µL dieser in die dritte Reihe überführt. Nach jeweils vier Reihen wurden die Pipettenspitzen gewechselt. Auf diese Weise entstanden in den Vertiefungen 1, 3, 5, 7, 9 und 11 der jeweiligen Spalte die Verdünnungen 1, 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000 und 1:100.000. Je 100 µL einer Verdünnung der zwei identischen Virusproben wurden vereint und in eine Vertiefung einer 24-Well-Platte gegeben. In jede dieser Vertiefungen wurden am Vortag $1-2 \cdot 10^5$ BSC-40 Zellen gesät und für 24 Stunden unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Der dichte BSC-40 Zellrasen wurde durch Ausschlagen vom Medium befreit und 200 µL der jeweiligen Virusverdünnung hinzugegeben. Um eine gute Verteilung des Virus auf den Zellen zu gewährleisten, wurden die 24-Well-Platten bei RT über einen Zeitraum von einer Stunde alle 5 Minuten für 1 Minute auf dem Plattformschüttler (250 rpm) geschwenkt. Im Anschluss wurden 1 mL DMEM 10% hinzugefügt und der Assay im Inkubator bei

37 °C für 24-48 Stunden inkubiert. Nach diesem Zeitraum waren unter dem Lichtmikroskop deutliche Plaques im Zellrasen zu erkennen. Das Medium wurde durch vorsichtiges Ausschlagen in einer Biosicherheitssterilbank entfernt und jede der Vertiefungen mit 300 µL Kristallviolettlösung für 10 min inkubiert. Die Platten wurden durch ausschlagen vom Kristallviolett befreit und mehrfach vorsichtig mit Wasser gespült. Die durch den Virus entstandenen farblosen Plaques im violett gefärbten Zellrasen, wurden über einem Lichttisch gezählt. Die gezählten Plaques wurden mit dem Verdünnungsfaktor des entsprechenden Wells multipliziert um die pfu/mL zu ermitteln.

3.2.2.4.3 Infektion der Tiere mit *Vaccinia Virus* via skin scarification (s.s.) “poking”

Zur Infektion wurden die Mäuse mit Ketamin/Xylazin betäubt. Das zu infizierende Ohr der Tiere wurde auf eine Petrischale gelegt und mit einer Ohrmacherpinzette aufgespannt. Mit einer 27G ½“ Einmal-Injektions-Kanüle (B.Braun) wurde 15 mal in das Ohr gestochen. Im Anschluss wurden $2 \cdot 10^6$ pfu des jeweiligen Virus auf das Ohr aufgetragen, über die komplette Ohrfläche mit einer Pipettenspitze verteilt und erneut 15 mal mit einer 27G ½“ Einmal-Injektions-Kanüle durch Stechen eine Verletzung der Haut hervorgerufen.

3.2.2.4.4 Virustiterbestimmung in der Haut

Die Ohren, der zuvor infizierten Mäuse, wurden mit einer Schere entfernt und in 1 mL DMEM 10% bei -80 °C eingefroren oder bei 4 °C kurzfristig gelagert. Zur Homogenisierung der Ohren wurden die Ohren in aufgetautem Zustand mit Hilfe von Pottern zerrieben und die Suspension bei 7.000 rcf für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde für einen Plaque Assay wie unter (3.2.2.4.2) verwendet.

3.2.3 Isolation von Zellen und deren Aufarbeitung

3.2.3.1 Entnahme der Ohren und Verdau zur Isolation der T-Lymphozyten

Die Ohren, der durch zervikale Dislokation getöteten Mäuse, wurden mit Hilfe einer Schere knapp oberhalb des Haaransatzes der Mausohren entfernt und mit

Optikerpinzetten an der Schnittkante vorsichtig aufgespalten. Nach erfolgreicher Auftrennung wurde die subdermale Seite von überflüssigem Fett- und Knorpelgewebe durch abschaben mit Pinzetten befreit. Im Folgenden wurden die Ohren in ein 2 mL Eppendorfgefäß überführt, in dem 200 µL RPMI-1640, 10% FCS vorgelegt waren. Die aufgespaltenen Ohren wurden mit Hilfe einer Schere kleinstmöglich zerschnitten und im Anschluss wurde das 2 mL Eppendorfgefäß bis auf 1,8 mL mit Verdaulösung (RPMI-1640, 10% FCS, 10 mM HEPES, 50 U/mL DNase I und 800 U/mL Collagenase A) aufgefüllt. Die Hautfragmente wurden 90 Minuten bei 900 rpm und 37 °C auf dem Thermoschüttler mit der Verdaulösung inkubiert. Danach wurden 40 µL 0,5 M EDTA zugegeben und für weitere 10 Minuten bei 37 °C auf dem Thermoschüttler inkubiert. Mit Hilfe einer 1000 µL Pipette und gestopften Spitzen wurden die angedauten Hautfragmente und die Lösung mehrfach resuspendiert und dann über ein 70 µm Sieb in ein 50 mL Falcon gegeben. Die Hautfragmente auf dem Sieb wurden mit 10 ml Waschpuffer (HBSS + 2 mM EDTA + 0,5% BSA) gespült. Die auf diesem Weg gewonnenen Hautzellen wurden für 10 Minuten bei 400 rcf und 4 °C zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Die Zellpellets wurden in 100 µL Waschpuffer mit Fc-Block (1:100) aufgenommen, in eine 96-well Rundbodenplatte überführt und für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert bevor die Antikörperfärbung folgte.

3.2.3.2 Entnahme der Ohren und Verdau zur Isolation der dendritischen Zellen

Die Ohren wurden mit einer Schere abgetrennt und mit einer Optikerpinzette an der Schnittkante aufgespalten. Nach erfolgreicher Auftrennung wurde die subdermale Seite von überflüssigem Fett- und Knorpelgewebe durch abschaben mit Pinzetten befreit. Die aufgeklappten Ohren wurden auf der dermalen Seite in einer 6-Well Platte gelagert, die zuvor mit 4 mL PBS je Well beladen wurde, bis alle Ohren des Versuches aufgespalten waren. Im Anschluss wurde das PBS abgesaugt, verworfen und je Well die Ohrfragmente mit 3 mL einer Dispase II-Lösung (2,5 mg/mL Dispase II, 50 U/mL DNase I in PBS) unterschichtet. Über Nacht wurde die Haut bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Hautfragmente mit der dermalen Seite auf eine Petrischale gelegt und die Epidermis mit Hilfe einer Optikerpinzette vorsichtig von der Dermis geschoben. Epidermis und Dermis wurden auf einer sterilen Unterlage abgetupft und

in getrennte 2 mL Eppendorfgefäße überführt, in die zuvor 200 µL DMEM 10% vorgelegt wurden. Mit einer Hautschere wurden die unterschiedlichen Gewebe der Haut klein geschnitten und mit Collagenase IV-Lösung (800 U/mL Collagenase IV, 50 U/mL DNase I in DMEM 10%) bis auf 1,8 mL aufgefüllt. Die Proben wurden auf dem Thermoschüttler 90 min bei 37 °C und 900 rpm inkubiert. Danach wurden 40 µL 0,5 M EDTA zugegeben und für weitere 10 min bei 37 °C auf dem Thermoschüttler inkubiert. Mit Hilfe einer 1000 µL Pipette und gestopften Spitzen wurden die angedauten Hautfragmente und die Lösung mehrfach resuspendiert und dann über ein 70 µm Sieb in ein 50 mL Falcon gegeben. Die Hautfragmente auf dem Sieb wurden mit 10 ml Waschpuffer (HBSS + 2 mM EDTA + 0,5% BSA) gespült. Nach Zentrifugation bei 400 rcf und 4 °C für 10 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 100 µL Waschpuffer mit Fc-Block (1:100) aufgenommen, in eine 96-Well Rundbodenplatte überführt und für 10 min bei 4 °C inkubiert bevor die Antikörperfärbung folgte.

3.2.3.3 Isolation der T-Lymphozyten und dendritischen Zellen aus Milz und Lymphknoten

Die Mäuse wurden durch CO₂ getötet. Anschließend wurde ihr Fell mit 70%-igem EtOH gereinigt und das Fell durch einen ventralen Schnitt von der Bauchhaut getrennt. Mit einer sterilen Optikerpinzette wurden Milz, inguinale (ILN), brachiale (BLN) und mesenterialen (MLN) Lymphknoten entnommen, in 1,5 mL Eppendorfgefäße überführt, welche mit 500 µL PBS versehen waren und auf Eis gelagert.

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

Für die Isolation von dendritischen Zellen wurden die Organe mit einer Schere zerkleinert und in Collagenase IV Lösung (800 U/mL Collagenase IV, 50 U/mL DNase I in DMEM 10%) für 90 min auf einem Thermoschüttler bei 37°C und 900 rpm inkubiert. Anschließend wurden 40 µL 0,5 M EDTA zugegeben und für weitere 10 min bei 37 °C auf dem Thermoschüttler inkubiert. Mit Hilfe einer 1000 µL Pipette und

gestopften Spitzen wurden die Lösung mehrfach resuspendiert und dann über ein 70 µm Sieb in ein 50 mL Falcon gegeben. Nach Zentrifugation bei 400 rcf für 5 min bei 4 °C wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100 µL FACS Puffer mit Fc-Block (1:100) aufgenommen und für 10 min bei 4 °C inkubiert und mit der Antikörperfärbung fortgefahren.

3.2.3.4 Trennung von T-Zellen durch Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)

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

Die Milz einer Maus wurde entnommen und mit Zuhilfenahme eines sterilen Spritzenstempels über ein 70 µm Siebe in 5 mL DMEM 10% in ein 50 mL Falcon zerdrückt und anschließend wurde das Sieb mit 10 mL DMEM 10% gewaschen. Die Zellsuspension wurde für 5 Minuten bei 400 rcf und 4 °C zentrifugiert und der Überstand wurde abgesaugt. Auf das Zellpellet wurde 1 mL MACS-Puffer mit Fc-Block (1:100) gegeben und bei 4 °C für 10 Minuten auf der Wippe inkubiert. Im Anschluss wurden aCD8-Beads (1:40) hinzugefügt, gut resuspendiert und für weitere 15 Minuten bei 4 °C auf einer Wippe inkubiert. Danach wurde mit MACS-Puffer auf 25 mL aufgefüllt und 5 Minuten bei 400 rcf 4 °C zentrifugiert. Der Waschvorgang wurde wiederholt. Anschließend wurden die Zellen in 5 mL entgastem MACS-Puffer aufgenommen und auf Eis gelagert.

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

3.2.3.5 Färben der Zellen für die Durchflusszytometrie

Um die Zellen für die Durchflusszytometrie anzufärben, wurden die Zellen 5-10 Minuten in 50 – 100 µL FACS-Puffer mit Fc-Block (1:100) bei 4 °C inkubiert. Bei Zellen, die aus den Ohren isoliert wurden, wurde HBSS + 2 mM EDTA + 0,5% BSA statt FACS- Puffer genutzt. Dann wurden 50 µL des Antikörper-Stains zugegeben und für weitere 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Auch dieser wurde in FACS-Puffer oder in HBSS angesetzt. Die verwendeten Antikörper und deren Verdünnungen sind im Materialteil 3.1.11 aufgeführt. Abschließend wurden überschüssige Antikörper in zwei Waschschritten mit den jeweiligen Puffern entfernt. Hierzu wurden 100 µL Puffer zu den Zellen gegeben und für 2 Minuten bei 570 rcf und 4 °C zentrifugiert. Zwischen den Zentrifugationsschritten wurden die Zellpellets durch Vortexen der 5 mL FACS-Röhrchen oder durch Schütteln der 96-Well-Platte aufgelockert. Abschließend wurden die Zellen in 150 µL des entsprechenden Puffers aufgenommen, in 5 mL FACS-Röhrchen überführt und am Durchflusszytometer gemessen.

Wurden die Zellen mit einem Zweitantikörper gefärbt, wurde die oben beschriebene Prozedur ab der Auftragung des Antikörper-Stains ein weiteres Mal wiederholt.

Zur Fixierung von Proben wurden die Zellen im Anschluss an die Waschschriffe des ersten Färbeschrittes mit 75 µL Roti®-Histofix 4% und PBS (1:1) für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert und anschließend 3 Waschschriffen mit FCAS-Puffer unterzogen bevor sie durchflusszytometrisch untersucht werden konnten.

Für intrazelluläre Färbungen wurden die Zellen nach Auftragen und den Waschschriffen des ersten Antikörper-Stains mit 75 µL Roti®-Histofix 4% und PBS (1:1) fixiert. Hierzu inkubierten die Zellen für 10 Minuten bei 4 °C. Anschließend wurden zu den 75 µL Fixans 75 µL Permeabilisierungspuffer hinzugefügt und weitere 5 Minuten bei 4 °C inkubiert. Es folgten drei Waschschriffe mit Permeabilisierungspuffer (570 rcf, 2 Minuten, 4 °C), bevor 50 µL des intrazellulären Antikörper-Stains für 20 Minuten bei 4 °C zur Inkubation auf die Zellen gegeben wurde, welcher in Permeabilisierungspuffer angesetzt wurde. Im Anschluss wurde erneut dreimal mit Permeabilisierungspuffer gewaschen, bevor die Zellen in 150 µL FACS-Puffer aufgenommen und am Durchflusszytometer analysiert werden konnten.

3.2.4 Arbeiten mit Tieren

3.2.4.1 Blutentnahme bei Mäusen

Zur Blutentnahme wurden die Mäuse entweder mit Isofluran (Furene) kurzzeitig betäubt und mit einer sterilen Glaskapillare (Roth) aus deren Augenschwamm (retroorbital) das Blut gewonnen oder ohne Betäubung durch Punktion mittels Lanzette der Vene Mandibulae. Das in der Kapillare aufgefangene Blut wurde in 5 mL FACS-Puffer in 15 mL Falcon überführt, das Blut der Punktion direkt in den vorgelegten FACS-Puffer getropft und bei 4 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

3.2.4.2 Blutproben Aufarbeitung und Lyse der Erythrozyten

Zur Durchführung der Analyse des Blutes mittels Durchflusszytometrie wurden die Lymphozyten des entnommenen Vollblutes isoliert. Hierzu wurden die Blutproben mit FACS-Puffer auf 5 mL aufgefüllt und bei 400 rcf für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und verworfen. Die Pellets wurden aufgeschüttelt und mit 10 mL ACK-Puffer versehen, erneut aufgeschüttelt und zur Lyse der Erythrozyten bei RT für 5 Minuten auf dem Plattformschüttler (900 rpm) inkubiert. Durch Zugabe von 5 mL FACS-Puffer wurde die Reaktion gestoppt und die Lymphozyten durch Zentrifugieren für 5 Minuten bei 4 °C bei 400 rcf sedimentiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellpellets einem weiteren Waschschrift mit FACS-Puffer unterzogen. Die Pellets wurden in 100 µL FACS-Puffer mit Fc-Block (1:100) aufgenommen und für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurde mit der Antikörperfärbung fortgefahren.

3.2.4.3 Genotypisierung der transgenen Mäuse und Validierung gemischter Knochenmarkschimäre im Blut

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

Nur77eGFP transgene Mäuse exprimieren das enhanced Green Fluorescent Protein (eGFP) unter der Kontrolle der Nr4a1 (Nur77) Promotor/Enhancer Regionen innerhalb des Bacterial Artificial Chromosome (BAC) RP24-366J14 Transgens. Aus diesem Grund weisen Mäuse, die auf dieses Transgen positiv sind, GFP positive T-Zellen auf, die per Durchflusszytometer im FITC-Kanal detektiert wurden.

Die Lymphozyten der TCR327 (P14) Mäuse wurden mit CD8 (APC) und V α 2 (PE) gefärbt. Mäuse, die auf das Transgen TCR327 positiv sind, exprimieren zu 90% die V α 2-Kette, im Vergleich zu 8% beim Wildtyp.

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

Thy1.1 Mäuse wurden mit den spezifischen Antikörpern CD8 (PE) und CD90.1 (BV711) gefärbt. Wildtyp Mäuse des Stammes C57BL/6 und BALB/c exprimieren die CD90.2 (Thy1.2) Allele. Mäuse, die auf das Transgen Thy1.1 positiv waren, wurden anhand von CD90.1 positiven CD8⁺-Zellen durchflusszytometrisch ermittelt.

Mäuse des Stammes H2-D^{b-/-}, denen der MHC Haplotyp H2-D^b fehlt, wurden mit den spezifischen Antikörpern CD8 (PB), H2-D^b (Biotin) und Streptavidin (PE) gefärbt. Wildtyp Mäuse des Stammes C57BL/6 exprimieren H2-D^b. Mäuse, die den MHC Haplotyp nicht besitzen, wurden anhand der fehlenden H2-D^b positiven Zellen durchflusszytometrisch ermittelt.

Zur Validierung der Rekonstitution gemischter Knochenmarkschimäre 8 Wochen nach Knochenmarkstransplantation, wurde das Blut der Tiere mit den spezifischen Antikörpern CD8 (PE), CD45pan (BV785) und CD45.1 (APC) gefärbt. Somit konnte das Verhältnis von CD45.1 und CD45.2 Expression auf T-Lymphozyten durchflusszytometrisch ermittelt werden.

3.2.4.4 Generierung von Knochenmarkschimären

Zur Generierung von Knochenmarkschimären wurden die Empfänger-Mäuse letal mit 9,5 Gy einer ¹³⁷Cs Quelle bestrahlt. Zur Rekonstitution der Mäuse wurden mindestens 2*10⁶ Zellen, die zuvor aus dem Knochenmark von Donor Mäusen isoliert wurden und in entsprechenden Verhältnissen gemischt wurden, i.v. appliziert. Die Tiere erhielten in

den folgenden 8 Wochen nach der Knochenmarkstransplantation Trinkwasser welches mit Borgal (1:500) versetzt war. Bevor die gemischten Knochenmarkschimäre in Experimenten verwendet wurden, wurde mittels Durchflusszytometrie das Verhältnis von CD45.1 und CD45.2 Expression auf T-Lymphozyten im Blut bestimmt.

3.2.4.5 Betäuben von Mäusen mit Ketamin/Xylazin

Um Mäuse für einen längeren Zeitraum (1-2 Stunden) zu betäuben wurden 200 µL einer Ketamin/Xylazin Lösung intraperitoneal (i.p.) injiziert. Die Lösung wurde zuvor aus Ketamin (50 mg/mL) und Xylazin (Rompun, 20 mg/mL) hergestellt und 1:5 in PBS verdünnt.

3.2.4.6 Adoptiver T-Zell Transfer

Die P14 oder Nur77eGFP-P14 Zellen, die mittels MACS aus der Milz einer Maus isoliert wurden, wurden sterilem HBSS auf auf $1 \cdot 10^5$ Zellen/mL eingestellt und auf Eis gelagert. Zur intravenösen (i.v.) Gabe der Zellen wurden die Rezipientenmäuse unter einer Wärmelampe bestrahlt, um die Kaudalvene besser sichtbar zu machen. 200 µL der Zellsuspension wurden mit einer 1 mL Injekt F Spritze (B.Braun) und einer 27G ½“ Einmal-Injektions-Kanüle (B.Braun) in die Kaudalvene luftblasenfrei injiziert (L. Liu, Fuhlbrigge, Karibian, Tian, & Kupper, 2006).

3.2.4.7 Depletion von Langerin⁺ Zellen mittels Diphtherie Toxin

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

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

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

3.2.4.8 Behandlungen mit 4OH-Tamoxifen (4-OHT), Tamoxifen (TAM), Injektion von anti-CD40 und Auftragung von DNFB

Tamoxifen wurde in 10% des Endvolumens in 100%-igem EtOH vorgelöst und dann mit Maisöl unter gelegentlichem Schütteln bei 37 °C aufgelöst, wodurch eine Endkonzentration der Stocklösung von 20 mg/mL erhalten wurde. Mäuse, die mit Tamoxifen behandelt wurden, bekamen 100 µL (2 mg) einmalig intraperitoneal (i.p.) injiziert.

4OH-Tamoxifen (4-OHT), der aktive Metabolit des Tamoxifens, wurde in DMSO zu einer Konzentration von 50 mg/mL gelöst, aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt. Zur Auftragung von 4-OHT wurden die Tiere mit Ketamin/Xylazin betäubt. Die Vorderpfoten wurden mit Klebeband für die Behandlungszeit fixiert, um eine orale Aufnahme des 4-OHT durch Fellpflege zu verhindern. Mit einer Pipette wurden insgesamt 20 µL 4-OHT Lösung (2% 4-OHT Stocklösung, 15% DMSO, 35% H₂O und 48% 100%-iger EtOH) mit einer Konzentration von 20 µg/20 µL auf den zuvor rasierten Rücken aufgetragen. Die Prozedur wurde am folgenden Tag wiederholt. Für Auftragung am Ohr wurden 20 µg in 10 µl je Ohr auf Innen- und Außenseite mit einer Pipette aufgetragen. Die Mäuse wurden für eine Inkubation von 4 Stunden in einzelnen Käfigen gehalten, um eine orale Aufnahme der Lösung zu verhindern. Nach der Inkubation wurden der Rücken bzw. die Ohren erst mit 100%-igem EtOH, dann mit H₂O und abschließend mit einem trockenen Tuch gereinigt.

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

Um eine lokale Entzündungsreaktion zu induzieren wurde 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzol (≥ 99%) (DNFB) zu 0,5% einer 4:1 Aceton/Maisöl Lösung hinzugegeben und 15 µL der Lösung pro Ohr mit einer Pipettenspitze aufgetragen und verrieben.

4. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde das DIETER Mausmodell verwendet, welches systemisch mit Tamoxifen oder lokal mit 4OH-Tamoxifen (4-OHT), die induzierbare Expression und Präsentation des Antigens GP₃₃₋₄₁ auf dendritischen Zellen erlaubt (Hain et al., 2019; Probst et al., 2003).

In vorangegangenen Arbeiten unseres Labors konnte bereits gezeigt werden, dass die selektive Antigen Präsentation auf dermalen DCs, die nach Aktivierung in die drainierenden Lymphknoten migrieren, eine kräftige, antigenspezifische zytotoxische T-Zell Antwort (CTL) induzieren. Die CTL wies einen „*skin homing*“ Phänotyp auf und waren in der Lage eine Protektion gegenüber einer lokalen Infektion mit GP₃₃₋₄₁ exprimierendem rekombinanten *Vaccinia Virus* zu vermitteln (Hain et al., 2019). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass zumindest für Antigene, die nicht kreuzpräsentationsabhängig sind, cDC1 defiziente Mäuse eine „*skin homing*“ CTL Antwort, welche gegen eine lokale virale Infektion protektiv ist, zu induzieren (Hain et al., 2019). Außerdem wurde festgestellt, dass durch lokale Antigen Präsentation der dermalen DCs, diese die Fähigkeit besitzen hautresidente Memory CD8⁺ T-Zellen zu reaktivieren (Hain et al., 2019).

4.1 Differenzierung und Identifikation der einzelnen dermalen DC Subtypen mittels Durchflusszytometrie

Um die folgenden Fragestellungen dieser Arbeit zu klären, war es erforderlich die einzelnen DC Subtypen der unterschiedlichen Organe mittels Durchflusszytometrie klar differenzieren und identifizieren zu können, damit bei depletierbaren (LangDTR) und KO (*Ccr2*^{-/-}; *Batf3*^{-/-}; *Flt3*^{-/-}) DIETER Tieren der jeweils entsprechend fehlende Zelltyp belegt werden konnte. Die Verpaarung der depletierbaren und KO Mauslinien mit DIETER Tieren hat zur Folge, dass nur einzelne Subpopulationen der dermalen DCs die DIETER Antigene präsentieren können. Hierzu wurden LCs aus Epidermis und DCs aus Dermis, Lymphknoten und Milz isoliert und je nach Mausmodell mit

Gating Strategien nach Henri (Henri et al 2010), Tamoutounour (Tamoutounour et al. 2013) und Guilliams (Guilliams et al. 2016) analysiert.

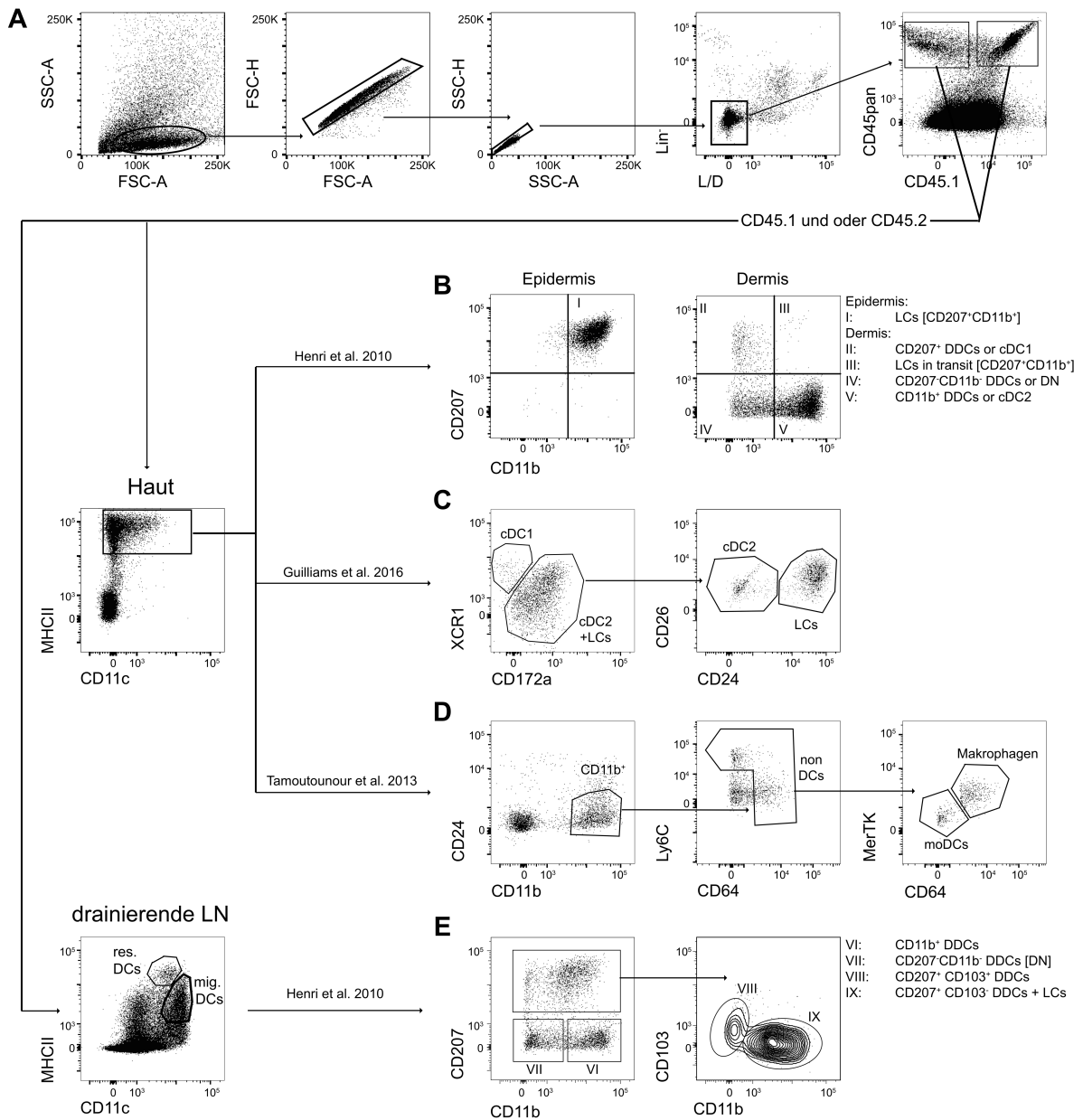


Abbildung 2: Identifikation der einzelnen dermalen DC Subtypen mittels Durchflusszytometrie

(A) Gating Strategien zur Analyse der DC Subtypen in der Haut nach Henri (Henri et al. 2010) (B), Guilliams (Guilliams et al., 2016) (C) und Tamoutounour (Tamoutounour et al. 2013) (D) und der migratorischen DC Subpopulationen der drainierenden Lymphknoten nach Henri (Henri et al. 2010) (E). Bei gemischten Knochenmarkchimäre (MBMC) aus 1:1 gemischtem Knochenmark von WT (Ly5.1) Mäusen und KO DIETER Mäusen (Ly5.2) wurde zwischen CD45.1⁺ und CD45.2⁺ DC Subtypen unterschieden. Gezeigt sind Daten von 3-5 gepoolten Tieren, wobei alle Proben einzeln gefärbt und vor dem Poolen einzeln am Durchflusszytometer eingemessen wurden.

4.2 Anti-CD40 erhöht die Mobilisierung von Langerhans Zellen und die Migration der dermalen dendritischen Zellen zu den drainierenden Lymphknoten bei 4OH-Tamoxifen behandelten Mäusen

Zur Untersuchung der dermalen dendritischen Zellen (dDCs) und Keratinozyten (KCs) in den folgenden Experimenten sollen diese mittels anti-CD40 (aCD40) aktiviert werden. Zunächst wurde der Einfluss von aCD40 auf die Migration der dDCs und die Mobilisierung von Langerhans Zellen (LCs) zu den drainierenden Lymphknoten (dLN) untersucht.

Hierzu wurden bei DIETER Mäuse an zwei aufeinander folgenden Tagen durch die topikale Gabe von 4-OHT die lokale Antigen Präsentation von GP₃₃₋₄₁ induziert. Außerdem wurde einer Gruppe am ersten Tag aCD40 i.v. injiziert, um eine Maturation der DCs einzuleiten. Drei Tage nach Behandlung wurden DCs aus Epidermis, Dermis, drainierende LN und Milz isoliert und am Durchflusszytometer untersucht.

Aus einem unbehandelten Ohr konnten im Mittel 5000 LCs isoliert werden. Während die topische Behandlung mit 4-OHT keinen signifikanten Einfluss auf die Zahl der LCs in der Epidermis des Ohrs hatte, führte die systemische Gabe von aCD40 zu einer nahezu vollständigen Emigration der LCs (Abb. 3A).

In der Dermis wurden die Zellzahlen der Subpopulationen der DCs anhand der Gating Strategie nach Henri (Henri et al. 2010) (Abb. 2B) ermittelt. Nach Gabe von 4-OHT und aCD40 waren fast alle CD207⁺ dDCs aus der Dermis migriert. Die Anzahl der CD207⁺ dDCs der mit 4-OHT behandelten Gruppe lag zwischen Kontrollgruppe und der Zellzahl der mit 4-OHT und aCD40 behandelten Gruppe. Diese Beobachtung konnte auch bei den DN dDCs gemacht werden. Während bei der Kontrollgruppe circa 4500 CD11b⁺ dDCs in der Dermis detektiert wurde, waren es nach Gabe von 4-OHT nur noch 3500 und bei der Gruppe 4-OHT und aCD40 Gruppe weniger als 3000 Zellen (Abb. 3B). In den hautdrainierenden LN (sdLN) wurde anhand der Expression von MHCII und CD11c Molekülen zwischen migratorischen (MHCII^{high}; CD11c^{inter}) und residenten (MHCII^{inter}; CD11c^{high}) DCs unterschieden (Abb. 2E). Hier zeigte die Gruppe, welche neben 4-OHT mit aCD40 behandelt wurde, prozentual nahezu dreimal so viele migratorische DCs verglichen zu der 4-OHT- und der Kontroll-Gruppe,

zwischen welchen kein Unterschied zu erkennen war (Abb. 3C). Die prozentuale Analyse der Subpopulationen der migratorischen DCs in den sdLN zeigte, dass Tiere, die 4-OHT und aCD40 erhielten, doppelt so viele CD207⁺, nahezu doppelt so viele DN und mehr als dreimal so viele CD11b⁺ der migratorischen DCs im Vergleich zur 4-OHT- und Kontroll-Gruppe aufwiesen. Die 4-OHT- und Kontroll-Gruppe zeigte bei prozentualer Betrachtung der einzelnen Subpopulationen der migratorischen DCs in den sdLN keine Unterschiede (Abb. 3D).

Die zusätzliche Behandlung mit aCD40 neben topikaler 4-OHT Applikation führt in diesem Modell zu einer massiven Migration der LCs aus der Epidermis und einer gesteigerten Auswanderung der dermalen DC Subtypen zu den hautdrainierenden LN.

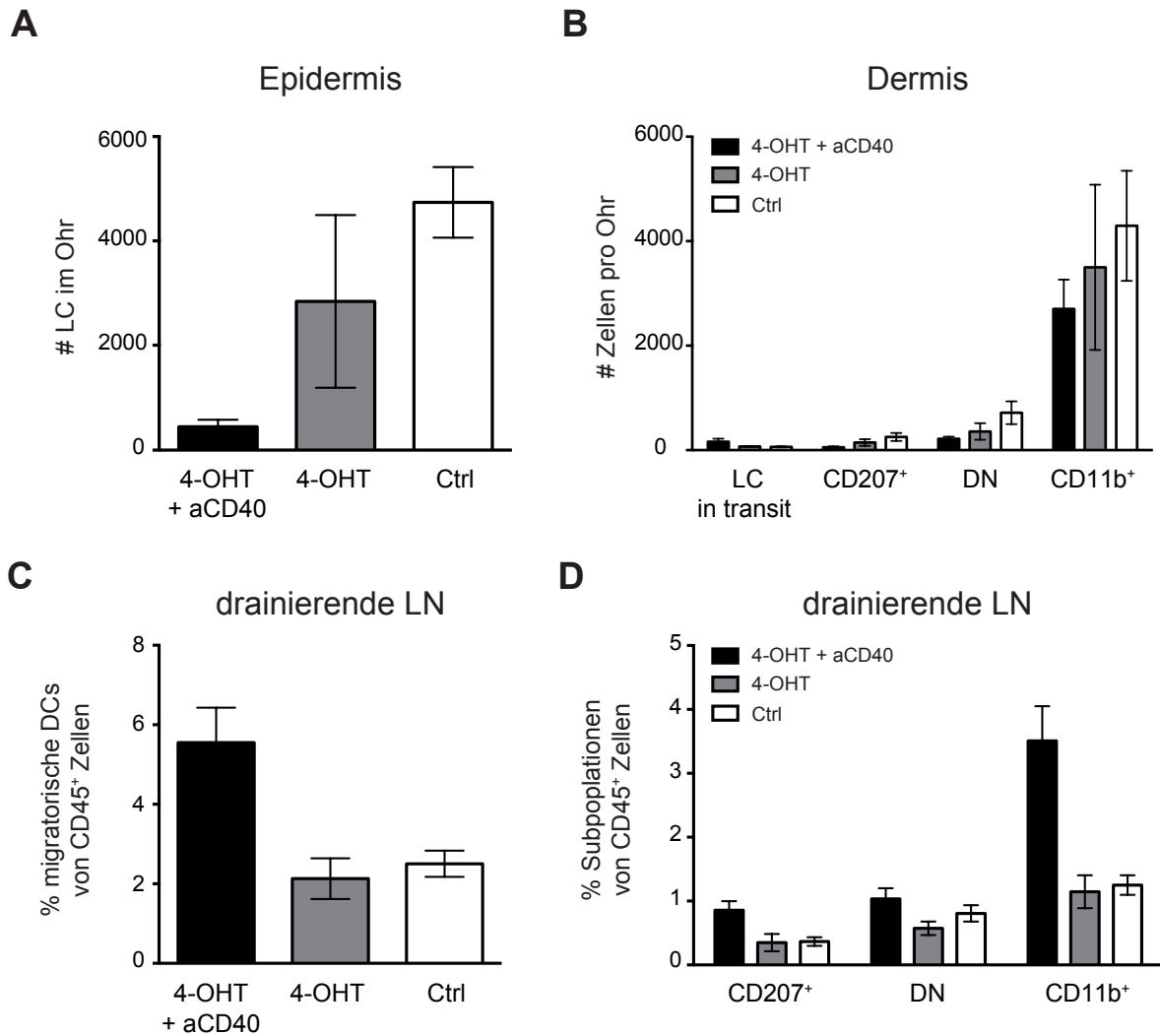


Abbildung 3: Die Behandlung mit 4-OHT alleine ist nicht so effizient um LCs und dermale DCs zur Migration zu den hautdrainierenden LN anzuregen, wie mit der Gabe von aCD40.

DIETER Mäuse wurden auf den Ohren mit 4-OHT (4-OHT+aCD40, 4-OHT) oder Vehikel (Ctrl) an zwei aufeinanderfolgenden Tagen behandelt. Außerdem wurde den Mäusen der Gruppe 4-OHT+aCD40 am ersten Tag der 4-OHT Behandlung aCD40 i.v. injiziert. 3 Tage nach der ersten 4-OHT Behandlung wurden die Anzahl an LCs in der Epidermis (A), den DC Subtypen in der Dermis (B) die prozentuale Anzahl der migratorischen DCs in den hautdrainierenden Lymphknoten (C) und die prozentuale Verteilung der Subpopulationen der migratorischen DCs in den hautdrainierenden Lymphknoten (D) mittels Durchflusszytometrie untersucht. n=3

4.3 Vergleich der Effizienz der Cre Aktivierung in dermalen DC Subsets von CD11cCreERT_T Mäusen nach topischer oder systemischer Tamoxifen-Applikation

Wir haben beobachtet, dass die topische Applikation mit 4OH-Tamoxifen (4-OHT) bei CD11cCreERT Mäusen die Cre Aktivität in konventionellen DCs Typ 1 (cDC1s) effizienter induziert, als in anderen Subpopulationen dermalen DCs (Hain et al., 2019). Ob dieser Effekt auf einer höheren Empfänglichkeit der dermalen cDC1s auf Grund ihrer Lokalisation in der Dermis oder auf eine höhere Expression an Cre zurückzuführen ist, sollte im Folgenden untersucht werden.

Hierzu bedienten wir uns des CD11cCreERT⁺ Rosa26RFP^{+/+} Reportermausmodells. Mäuse dieses Stammes tragen das Reporter-gen Red Fluorescence Protein (RFP) im Rosa26 Locus, dem eine loxP flankierte STOP Sequenz vorangeht. Nach Aktivierung der Cre-Rekombinase exprimieren Zellen RFP (Luche et al., 2007). Ein Teil der Mäuse wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit 4OH-Tamoxifen auf den Ohren behandelt, um festzustellen ob die Lokalisation der cDC1s Ursache der erhöhten Cre Aktivität ist. Einer weiteren Gruppe wurde einmalig Tamoxifen (TAM) i.p. injiziert. Eine weitere Gruppe, welche mit Vehikel behandelt wurde, diente als Kontrolle. Außerdem bekamen alle Mäuse zur Aktivierung der DCs am ersten Tag der Behandlung aCD40 i.v. verabreicht. Nach drei Tagen wurden die DCs der Ohren, der drainierenden Lymphknoten (dLN) und der Milz isolierten und die DC Subpopulationen am Durchflusszytometer auf ihre Cre Aktivität untersucht.

In der Epidermis konnte ausschließlich eine Cre Aktivität der LCs bei Mäusen, die mit 4-OHT behandelt wurden, detektiert werden (Abb. 4A).

Die DCs aus der Dermis der Mäuse wurde in die vier Subpopulationen cDC1s, cDC2s, doppelt negative dDCs (DN) und LCs in transit unterteilt und deren RFP Expression analysiert (Abb. 4B). LCs in transit sind der Vollständigkeit halber aufgeführt, auf Grund der geringen Zellzahlen und möglichen Kontaminationen durch cDC1s und cDC2s, wurde diese Population jedoch nicht genauer analysiert. Die DCs der drainierenden Lymphknoten (dLN) wurden anhand der Expression von MHC-Klasse II und CD11c Molekülen in migratorische (MHCII^{high}; CD11c^{inter}) und residente (MHCII^{inter}; CD11c^{high})

DCs separiert (Abb. 4C). Bei DCs der Milz konnte nur bei Mäusen, die systemisch das transgene Antigen präsentierten eine Cre Aktivität festgestellt werden (Abb. 4D).

In Einklang mit früheren Daten (Hain et al., 2019) konnte gezeigt werden, dass die topische Applikation von 4-OHT Cre mediierte Rekombination ausschließlich DCs in der Dermis und LCs, die in die dLN wandern, induziert, nicht aber dLN residente DCs oder DCs in der Milz. Cre mediierte Rekombination war in allen DC Subtypen in der Haut nachweisbar, cDC1 wurden jedoch effizienter erreicht als andere Subpopulationen. cDC1 werden auch durch systemische Gabe von TAM effizienter erreicht, was dafür spricht, dass eher zellintrinsische Effekte wie z.B. eine erhöhte Expression des CreER_T Proteins als anatomische Unterschiede wie die Lokalisierung der Zellen innerhalb der Dermis hierfür verantwortlich sind. Interessant ist auch, dass die systemische Gabe von TAM keine Cre Aktivität in LCs hervorruft.

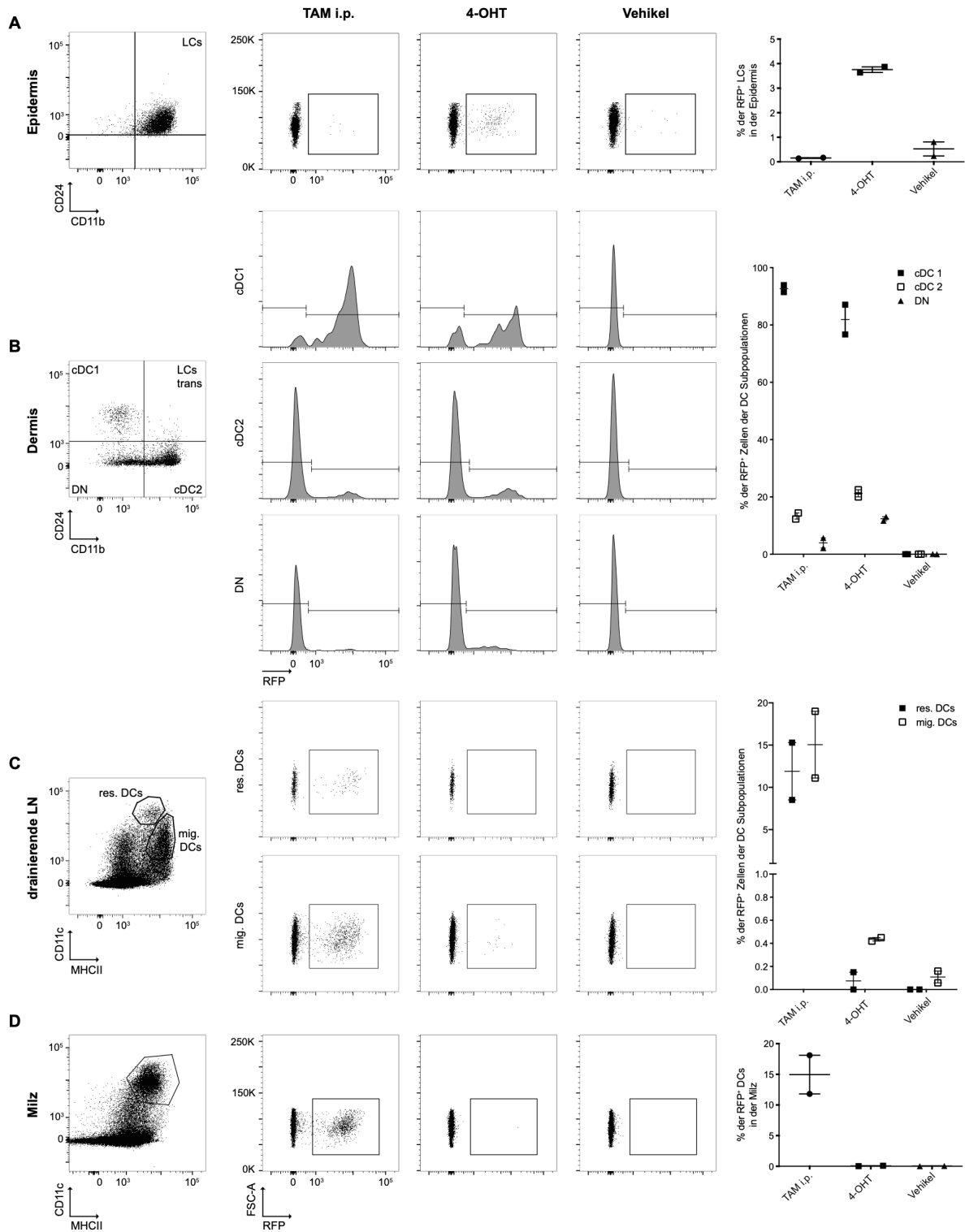


Abbildung 4: Die topische Behandlung der Haut mit 4-OHT induziert Cre Aktivität besonders effizient in dermalen cDC1s

CD11c-CreER⁺ Rosa26-RFP⁺ Mäuse wurden mit 4-OHT auf den Ohren an zwei aufeinanderfolgenden Tagen behandelt oder bekamen einmalig TAM oder PBS i.p. injiziert. Alle Gruppen wurden am ersten

Tag mit aCD40 (i.v.) behandelt. Drei Tage später wurde die Haut der Ohren, die auricularen Lymphknoten und die Milz entnommen. Epidermis (**A**) und Dermis (**B**) wurden durch einen Dispase II Verdau voneinander getrennt, sodass LCs und die Subtypen der dermalen DCs (cDC1s, cDC2s, LCs trans, DN) separat untersucht werden konnten. (**C**) In den drainierenden Lymphknoten (LN) wurde zwischen residenten und migratorischen DCs unterschieden. (**D**) In der Milz wurden wie in den anderen Organen die RFP Expression der DCs durchflusszytometrisch bestimmt. n=2

4.4 Etablierung eines Modellsystems zur funktionellen Analyse einzelner Subpopulationen dermalen dendritischer Zellen

Dermale dendritische Zellen sind sehr heterogen und können anhand ihrer Oberflächenmoleküle in verschiedene Subtypen unterteilt werden. Hinzukommen die Langerhans Zellen, welche sich in der Epidermis befinden (Guilliams et al., 2016; Henri et al., 2010; Tamoutounour et al., 2013) (Abb. 1 und 5). In vorherigen Arbeiten unseres Labors konnte im DIETER Mausmodell gezeigt werden, dass CD207⁻ dermalen DCs alleine dazu in der Lage sind, eine protektive *skin homing* T-Zell Antwort zu induzieren (Hain et al., 2019).

Um die weiteren Subpopulationen auf ihre Fähigkeit, eine protektiven T-Zell Antwort auszulösen, untersuchen zu können, bedienen wir uns verschiedener Mausmodelle, welche wir auf DIETER Mäuse züchteten und zum Teil als gemischte Knochenmarkschimären (MBMC) verwendeten (Abb. 5). Außerdem wurde mit diesem Modellsystem untersucht, welche Subtypen der dermalen DCs lokal Antigen präsentieren müssen, um zur Differenzierung von hautresidenten Memory T-Zellen (T_{RMS}) beizutragen und deren Retention in der Haut beeinflussen.

Langerin-DTR Mäuse exprimieren den humanen *Diphtherie Toxin* Rezeptor (DTR) unter der Kontrolle des Langerin-Promotors, der die Depletion aller Langerin-tragender Zellen durch die Injektion von *Diphtherie Toxin* (DT) ermöglicht (Bennett et al., 2005; Kissenpfennig et al., 2005).

Batf3^{-/-} Mäuse tragen eine Mutation des Exon 1 und 2 des Transkriptionsfaktors *BATF3* (basic leucine zipper transcription factors, ATF-like3), welches die Expression von *Batf3* verhindert (Hildner et al., 2008). *Batf3* defizienten Mäusen fehlen konstitutiv CD207⁺ CD103⁺ dermale dendritische Zellen (Edelson et al., 2011; Tussiwand et al., 2012). Diese Zellen werden auch als cDC1s bezeichnet (Guilliams et al., 2016).

Durch den Knock-out des Gens *Ccr2* in *Ccr2*^{-/-} Mäusen kommt es zum Fehlen des C-C Chemokinrezeptors Type 2 (*CCR2* oder CD192). Aus diesem Grund ist es Monozyten nicht möglich das Knochenmark zu verlassen und somit fehlt ihnen auch die Möglichkeit sich als moDCs im Gewebe anzusiedeln. Mäuse dieser Linie

entwickeln bis auf die fehlenden moDCs ein normales dermales DC Subpopulation Umfeld (Boring et al., 1997).

Flt3^{-/-} Mäuse sind genetisch veränderte Mäuse, die keine FMS-like Tyrosin Kinase (*Flt3*) besitzen. *Flt3* spielt eine entscheidende Rolle in der frühen Phase der Entwicklung der hämatopoetischen Stammzellen. Das Fehlen von *Flt3* führt zu einer Verminderung von DCs die sich aus der myeloiden und lymphoiden Linie entwickeln. Konventionelle DCs (cDCs) werden in Mäusen dieses Stammes nicht gebildet, wohingegen die Entwicklung von moDCs nicht beeinflusst wird (Mackarechtschian et al., 1995).

K14-DIETER Mäuse verhalten sich analog zu den in 3.1.14.4 beschriebenen DIETER Mäusen. Nach Applikation von Tamoxifen oder 4-OHT exprimieren die Keratinozyten, anstelle der CD11c^{high} Zellen die transgenen CTL Epitope (Vasioukhin et al., 2002).

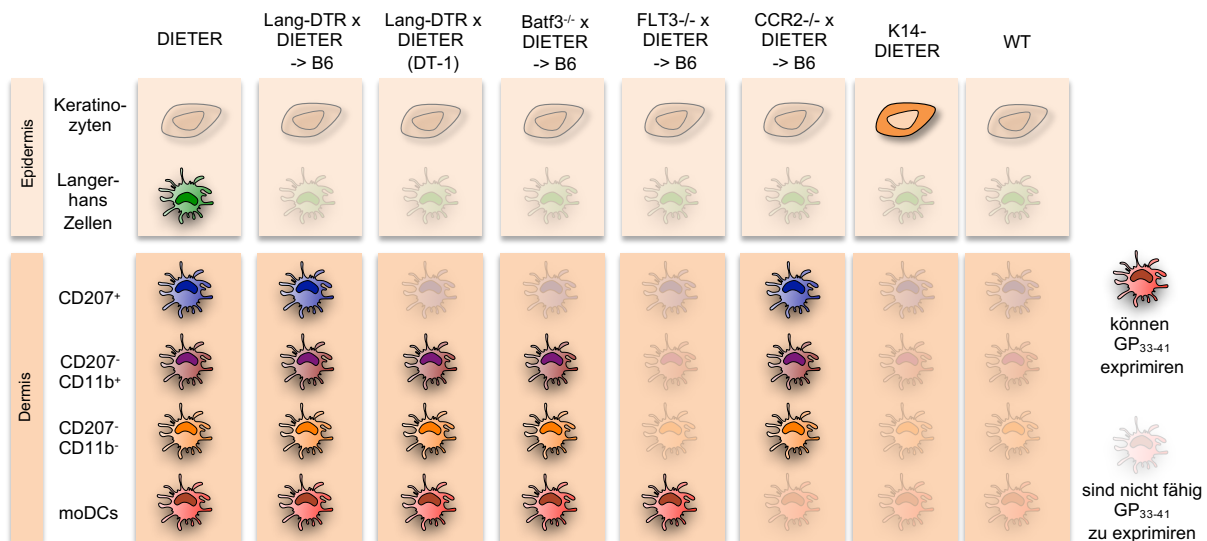


Abbildung 5: Schematische Darstellung der unterschiedlichen DIETER I Modelle

Schematische Darstellung der unterschiedlichen DIETER I Modelle, farbige Zellen sind in der Lage GP₃₃₋₄₁ zu exprimieren, wohingegen die transparenten Zellen dies nicht können.

Um zu beweisen, dass in den verschiedenen Mausmodellen der jeweilige Zelltyp tatsächlich fehlt, wurden die DCs aus Ohren isolierten und mit der für den entsprechenden Zelltyp passenden FACS Strategie untersucht.

Lang-DTR X DIETER (DT-1) Mäuse wurde *Diphtherie Toxin* (DT) i.v. injiziert, um alle CD207⁺ dermalen DCs zu depletieren. Nach Henri (Henri et al. 2010) (Abb. 2B) wurden Epidermis und Dermis auf die Subtypen der dermalen DCs (dDCs) im Vergleich zu C57BL/6J (WT) Mäusen untersucht. Lang-DTR X DIETER (DT-1) wiesen in der Epidermis keine Langerhans Zellen auf, wohingegen bei WT Mäusen eine deutliche Population der MHCII⁺ CD11c⁺ Zellen Langerhans Zellen (CD207⁺ CD11b⁺) zu erkennen waren. Im Vergleich zu WT Mäusen konnten bei Lang-DTR X DIETER Mäusen keine MHCII⁺ Zellen CD207⁺ dDCs in der Dermis detektiert werden. Somit konnte gezeigt werden, dass die Depletion der Langerin⁺ Zellen in der Haut effizient funktioniert (Abb. 6A)

Das konstitutive Fehlen der konventionellen DCs Typ 1 (cDC1s) in der Dermis von *Batf3*^{-/-} Mäusen wurde in MBMC nach Guilliams et al. 2016 (Abb. 2C) untersucht (Guilliams et al., 2016). Durch *Batf3*^{-/-} X DIETER + Ly5.1 → B6 MBMC konnte der direkte Vergleich zwischen *Batf3*^{-/-} X DIETER (Ly5.2) und wildtypischem Ly5.1 gezogen werden, 4,77% der CD45.1⁺ MHCII⁺ Zellen waren cDC1s und 92,4% cDC2s. Die CD45.2⁺ MHCII⁺ Zellen, welche *Batf3*^{-/-} X DIETER anzurechnen sind, konnten keine XCR1⁺ cDC1s gemessen werden (Abb. 6B).

Der Einfluss der konventionellen DCs (cDCs) wurde anhand von *Ccr2*^{-/-} X DIETER + Ly5.1 → B6 MBMC nach Tamoutounour (Tamoutounour et al. 2013) ermittelt. Der Anteil von CD11b⁺ dDCs an den CD45.1⁺ MHCII⁺ Zellen der Dermis, also unter den Zellen die aus dem Wildtyp, CD45.1⁺ Knochenmark abstammen, lag bei 37,2%, welcher zur Hälfte aus so genannten nonDCs bestand, die sich wiederum in MerTK⁻ monozytäre DCs (moDCs) und MerTK⁺ Makrophagen unterteilten. Unter den CD45.2⁺ MHCII⁺ Zellen, die aus dem *Ccr2*^{-/-} X DIETER Knochenmark abstammen, war der Anteil der CD11b⁺ Zellen stark reduziert. Dies war auf das nahezu vollständige Fehlen der CD11b⁺ non DC unter den *CCR2*^{-/-} (CD45.2⁺) Zellen zurückzuführen. Weder moDCs noch Makrophagen vom *CCR2*^{-/-} Ursprung konnten gefunden werden (Tamoutounour et al., 2013). Auf Grund der massiven Reduktion der nonDCs konnte festgestellt werden, dass die Hinderung der monozytären Zellen das Knochenmark zu verlassen, die Dermis in zu erwartendem Maße beeinflusst (Abb. 6C).

Um zu untersuchen, welche Rolle monozytäre DCs (moDCs) auf Priming, Protektion und Induktion von hautresidenten Memory T-Zellen (T_{RMS}) haben, bedienten wir uns

des *Flt3*^{-/-} Mausmodelles, welches anhand von *Flt3*^{-/-} X DIETER + Ly5.1 → B6 MBMC nach Henri (Henri et al. 2010) analysiert wurde (Abb. 2B). Der Anteil von CD45.2⁺ MHCII⁺ CD207⁺ dDCs ist im Vergleich zu CD45.1⁺ MHCII⁺ CD207⁺ dDCs stark reduziert. Auch der Anteil an DN dDCs ist bei *Flt3*^{-/-} drastisch reduziert. Im CD11b⁺ MHCII⁺ Kompartiment kann in dieser Analyse keine Reduktion festgestellt werden, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass in der hier gewählten Färbestrategie nicht zwischen cDC2, moDC und dermalen Macrophagen unterschieden werden kann. Da die Entwicklung von cDC1s und cDC2s von *Flt3* (FMS-like Tyrosin Kinase) (Mackarehtschian et al., 1995) abhängig ist und der prozentuale Anteil der CD45.2⁺ MHCII⁺ CD207⁺ dDCs (cDC1s) stark reduziert ist, kann davon ausgegangen werden, dass auch die cDC2s vermindert sind. Die CD45.2⁺ Zellen im CD11b⁺ MHCII⁺ Kompartimente sollten moDC und Makrophagen sein, die von der *Flt3* Defizienz nicht betroffen sind (Abb. 6D). Um die These der fehlenden cDC2s bei *Flt3*^{-/-} Mäusen zu untermauern, werden zukünftig weitere Untersuchungen mit verbesserten Gating Strategien durchgeführt.

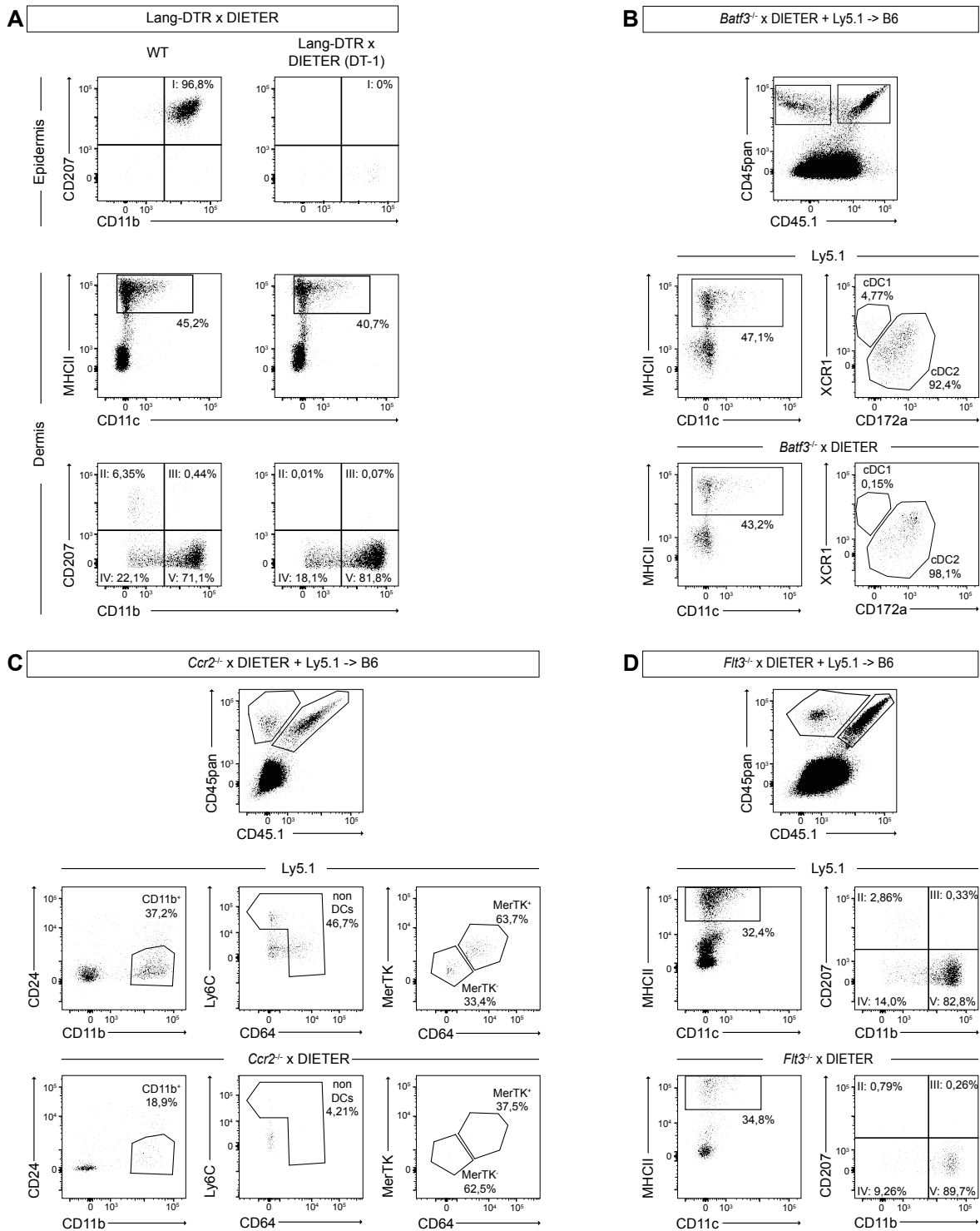


Abbildung 6: Entwicklung eines Modellsystems zur funktionellen Analyse der Subpopulationen der dermalen dendritischen Zellen

(A) LangDTR X DIETER Mäusen wurde am Tag vor der Analyse *Diphtherie Toxin* (DT) i.v. injiziert. Am Durchflusszytometer wurde die Epidermis und Dermis auf LCs und DC Subtypen hin untersucht. (B, C, D) Bei gemischten Knochenmarkchimäre (MBMC) aus 1:1 gemischtem Knochenmark von WT (Ly5.1)

Mäusen und den angegebenen Mausstämmen (*Batf3*^{-/-} X DIETER, *Ccr2*^{-/-} X DIETER, *Flt3*^{-/-} X DIETER), wurden DC Subtypen in der Haut im Durchflusszytometer analysiert. Gezeigt sind cumulative Daten von 3-5 Tieren, wobei alle Proben einzeln gefärbt, einzeln am Durchflusszytometer eingemessen und erst bei der Analyse zusammengeführt wurden.

4.5 Im DIETER Modell kann eine Kreuzpräsentation zwischen DCs ausgeschlossen werden

Damit das System der verschiedenen KO DIETER (Abb. 5) funktioniert, muss sichergestellt sein, dass die Antigene tatsächlich nur auf der DC Population präsentiert werden, in der sie auch exprimiert werden kann. Um dies zu untersuchen wurden die DIETER Mäuse auf H2-D^{b-/-} Mäuse gekreuzt. Mit DIETER X H2-D^{b-/-} und WT Mäusen wurden gemischte Knochenmarkchimäre (MBMC) generiert. In diesen MBMC werden die DIETER Antigene auf K^b direkt, auf D^b aber nur kreuzpräsentiert. Als Kontrolle dienten DIETER X Ly5.1 + H2-D^{b-/-} → B6, in denen die DIETER Antigene D^b als auch K^b direkt präsentiert werden.

Hierzu wurde die Antigen Expression durch topikale Applikation von 4-OHT oder i.p. Injektion von TAM induziert und die Maturation der DCs durch die i.v. Injektion von aCD40 eingeleitet. Am 10. Tag nach der Behandlung wurde das Blut mit Hilfe des Durchflusszytometers auf GP₃₃₋₄₁ Tetramer⁺ (GP₃₃₋₄₁/D^b) und LacZ (β-Gal₄₉₇₋₅₀₄/K^b) Tetramer⁺ CD8⁺ T-Zellen untersucht.

Sowohl DIETER X H2-D^{b-/-} Ly5.1 → B6 als auch DIETER X Ly5.1 + H2-D^{b-/-} → B6 MBMCs zeigten nach lokaler oder systemischer Antigen Präsentation vergleichbare prozentuale Anteile an β-Gal₄₉₇₋₅₀₄/K^b spezifischen CD8⁺ T-Zellen (Abb. 7A).

Eine GP₃₃₋₄₁/D^b spezifische CD8⁺ T-Zell Antwort konnte hingegen nur in der auch DIETER X Ly5.1 + H2-D^{b-/-} → B6 Kontrollgruppe, nicht aber in der DIETER X H2-D^{b-/-} Ly5.1 → B6 Gruppe, in der eine direkte Präsentation der Antigene ausgeschlossen ist, gefunden werden (Abb. 7B).

Somit konnte gezeigt werden, dass im DIETER Modell nur die Antigene auf DCs präsentiert werden, welche das Transgen exprimieren, was eine Kreuzpräsentation zwischen den DCs ausschließen lässt.

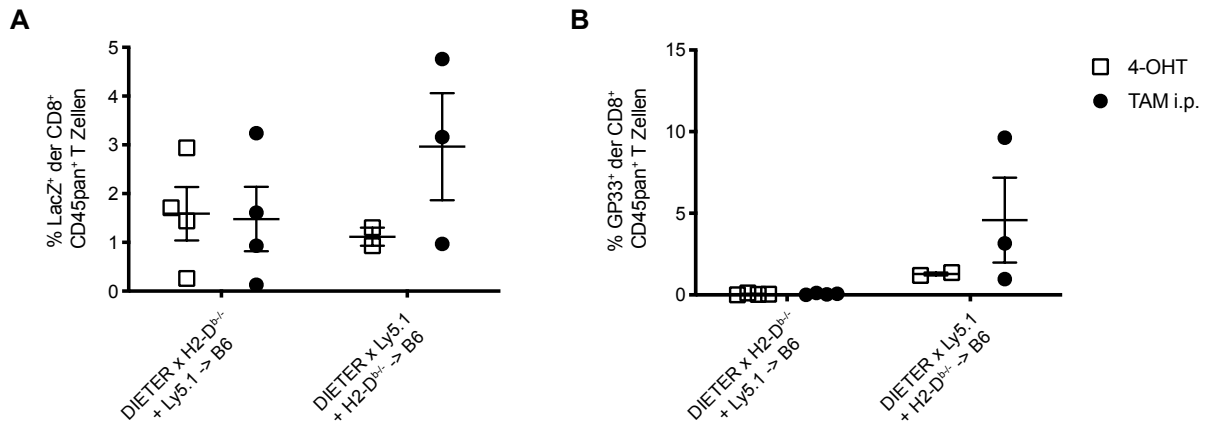


Abbildung 7: Im DIETER Modell können nur Antigene auf DCs präsentiert werden, welche das Transgen exprimieren

Gemischte Knochenmarkchimäre DIETER X H2-D^{b/-} + Ly5.1 → B6 und DIETER X Ly5.1 + H2-D^{b/-} → B6 wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit 4-OHT am Rücken behandelt oder erhielten einmalig eine Injektion von TAM (i.p.). Allen Mäusen wurde am ersten Behandlungstag aCD40 (i.v.) injiziert. Nach 10 Tagen wurde die Anzahl an **(A)** LacZ und **(B)** GP₃₃₋₄₁ spezifischen CD8⁺ T-Zellen im Blut mittels Tetramer Färbung ermittelt. Gezeigt sind die Mittelwerte (±SD) aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit n=2-4.

4.6 CD207⁻ dermale DCs können *skin homing* CD8⁺ T-Zellen primen, welche sich bei lokaler Entzündung zu hautresidenten Memory T-Zellen (T_{RM}s) entwickeln

In vorangegangenen Untersuchungen unseres Labors konnte gezeigt werden, dass CD207⁻ dDCs eine „*skin homing*“ CD8⁺ T-Zell Antwort auslösen können, die protektiv gegen eine Challenge Infektion ist (Hain et al., 2019).

Um herauszufinden, ob diese Zellen zu hautresidenten Memory T-Zellen (T_{RM}s) ausreifen, wurden gemischte Knochenmarkschimäre (MBMC) LangDTR X DIETER + Ly5.1 → B6 mit P14⁺ T-Zellen (Thy1.1) adoptiv transferiert. Bevor die P14⁺ T-Zellen mittels 4-OHT Behandlung der Rückenhaut und aCD40 Applikation geprimt wurden, wurde der Gruppe LangDTR X DIETER + Ly5.1 → B6 (DT-1) *Diphtherie Toxin* (DT) i.v. injiziert, um alle CD207⁺ dermalen DCs zu depletieren (Abb. 5 und 6A). Am 6. Tag nach 4-OHT Applikation wurden die Mäuse mit DNFB auf beiden Ohren behandelt, um eine lokale Infektion hervorzurufen (Mackay et al., 2012). 40 Tage nach der 4-OHT Behandlung wurde die Anzahl an P14⁺ CD8⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt und auf ihre CD69 und CD103 Expression im Vergleich zu naiven CD8⁺ T-Zellen einer Milz untersucht.

Die Anzahl an CD69⁺ CD103⁺ P14⁺ T_{RM}-Zellen (Thy1.1) wiesen bei LangDTR X DIETER + Ly5.1 → B6 MBMCs (alle dermalen DCs können Antigen präsentieren) und LangDTR X DIETER + Ly5.1 → B6 MBMCs (DT-1) (nur CD207⁻ dermale DCs können Antigen präsentieren) keinen signifikanten Unterschied auf (Abb. 8A und B).

Diese Daten zeigen, dass CD207⁻ dermale dendritische Zellen in unserem Modell die Fähigkeit besitzen spezifische CD8⁺ T-Zellen zu induzieren, welche sich zu hautresidenten Memory T-Zellen entwickeln (Hain et al., 2019).

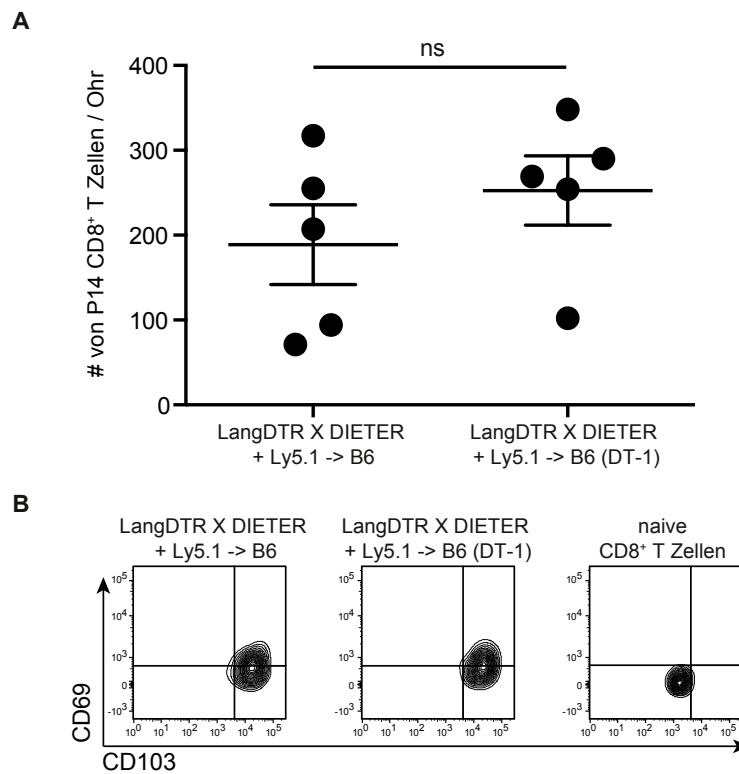


Abbildung 8: CD207⁻ dermale DCs (cDC2s) können skin homing CD8⁺ T-Zellen primen, welche bei lokaler Entzündung Gewebe-Residente-Memory T-Zellen (T_{RM}S) in der Haut hervorbringen.

Gemischte Knochenmarkschimäre (MBCM) LangDTR X DIETER + Ly5.1 → B6 wurden mit 5×10^4 P14⁺ CD8⁺ T-Zellen (Thy1.1) adoptiv transferiert (i.v.). Die LangDTR X DIETER + Ly5.1 → B6 MBCMs (DT-1) wurden mit je 1 µg *Diphtherie Toxin* (DT) an Tag 6 (i.v.) und Tag 1 (i.p.) vor und an Tag 1 (i.p.) nach der ersten 4-OHT Auftragung behandelt. Den Mäusen wurde an Tag 0 und 1 4-OHT auf den zuvor rasierten Rücken aufgetragen und an Tag 0 aCD40 i.v. verabreicht. An Tag 6 nach der 4-OHT Applikation wurden die Mäuse mit DNFB auf beiden Ohren behandelt, um eine lokale Infektion hervorzurufen. 40 Tage nach 4-OHT Behandlung wurde **(A)** die Anzahl an P14⁺ CD8⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. **(B)** Die P14⁺ CD8⁺ T-Zellen wurden durchflusszytometrisch auf ihre CD69 und CD103 Expression im Vergleich zu naiven CD8⁺ T-Zellen einer Milz untersucht (ns $p > 0,05$; ungepaarter t-Test).

4.7 Sowohl dermale konventionelle als auch dermale monozytäre dendritische Zellen können eine spezifische zytotoxische T-Zell Antwort induzieren, die gegen eine Virusinfektion der Haut protektieren

In vorangegangene Arbeiten in unserem Labor konnte im DIETER Mausmodell gezeigt werden, dass CD207⁻ dermale dendritische Zellen (dDCs) GP₃₃₋₄₁ spezifische „*skin homing*“ CD8⁺ T-Zellen induzieren, die gegen eine Infektion mit rekombinanten GP₃₃₋₄₁ *Vaccinia Virus* protektieren (Hain et al., 2019). Die Population der CD207⁻ dDC setzt sich zusammen aus dermalen cDC2 und dermalen monozytären DCs. Welche Rolle konventionelle DCs (cDCs) oder monozytären DCs (moDCs) alleine in diesem Zusammenhang spielen ist noch weitestgehend unklar.

Um mögliche immunologische Nebeneffekte durch die Abwesenheit kompletter dDCs Subpopulationen zu verhindern, wurden C57BL/6J (WT) letal bestrahlt und mit 50% DIETER, *Ccr2*^{-/-} X DIETER oder *Flt3*^{-/-} X DIETER (Ly5.2) und 50% Wildtyp (Ly5.1) Knochenmark rekonstituiert. In DIETER + Ly5.1 → B6 gemischten Knochenmarkschimären (MBMC) sind alle dDCs dazu in der Lage nach Behandlung mit 4OH-Tamoxifen (4-OHT) GP₃₃₋₄₁ zu exprimieren. Dies gilt jedoch bei MBMCs nicht für Langerhans Zellen (LCs), da diese auf Grund ihrer Strahlungsresistenz vom Knochenmarksrezipienten stammen (Katz, Tamaki, 1979; Merad et al., 2002) (Abb. 5). In *Ccr2*^{-/-} X DIETER + Ly5.1 → B6 MBMCs entwickelt sich aus *Ccr2*^{-/-} X DIETER Knochenmark beide Subpopulationen der klassischen DCs, nicht aber moDCs (Abb. 5, 6C) (Boring et al., 1997). Somit können ausschließlich die konventionellen DCs Typ 1 (cDC1s) und die konventionellen DCs Typ 2 (cDCs) nach Behandlung mit 4-OHT die transgenen CTL-Epitope exprimieren (Abb. 5 und 6C). Im Gegensatz dazu ist davon auszugehen, dass sich in *Flt3*^{-/-} X DIETER + Ly5.1 → B6 MBMCs keine klassischen DCs aus dem *Flt3*^{-/-} X DIETER entwickeln und somit nur moDCs dazu in der Lage sind, die transgenen CTL Epitope zu exprimieren (Abb. 5 und 6D).

Die Antigen Expression wurde durch topische 4-OHT Behandlung induziert und die DC Maturation durch aCD40 eingeleitet. Daraufhin wurde die Frequenz der spezifischen Zellen im Blut bestimmt. Obwohl bei *Ccr2*^{-/-} X DIETER + Ly5.1 → B6

MBMCs, sowie *Flt3^{-/-}* X DIETER + Ly5.1 → B6 MBMCs verglichen zu DIETER + Ly5.1 → B6 MBMCs prozentual nur weniger als die Hälfte an spezifischen CD8⁺ T-Zellen geprint wurden (Abb. 9A), waren diese dazu in der Lage gegen die Herausforderung einer VV-G2 Infektion effektiv zu protektieren (Abb. 9B).

Dieses Experiment legt nahe, dass sowohl cDCs als auch moDCs alleine die Fähigkeit besitzen eine spezifische T-Zell Antwort zu induzieren, die gegen die Infektion mit VV-G2 protektiert.

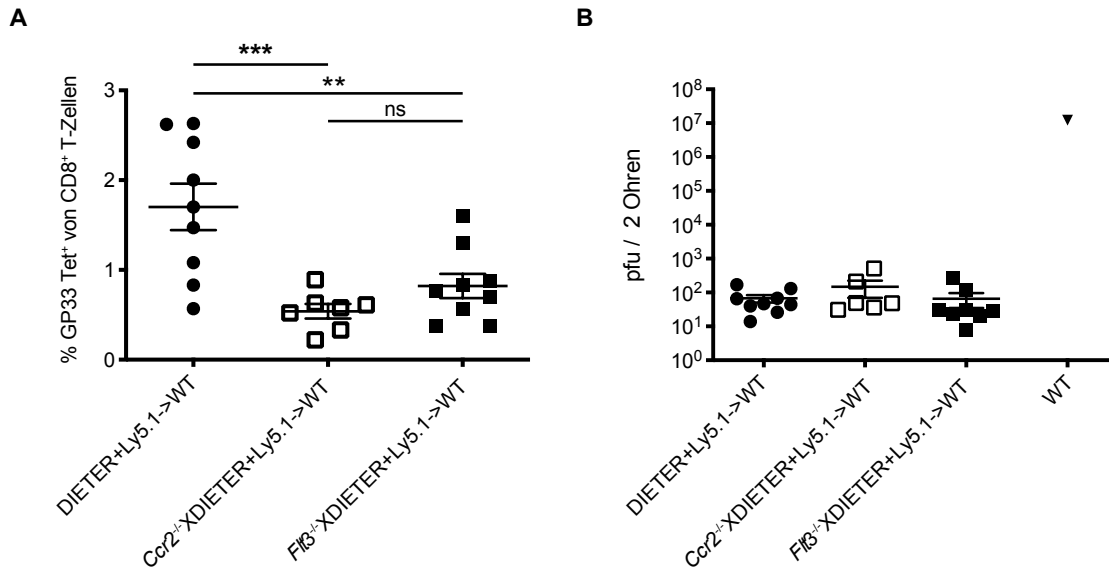


Abbildung 9: Nur dermale konventionelle als auch monozytäre DCs alleine können GP₃₃₋₄₁ spezifische CD8⁺ T-Zellen induzieren, die gegen rekombinantes GP₃₃₋₄₁ exprimierendes *Vaccinia* (s.s.) protektieren

Gemischte Knochenmarkchimäre aus 1:1 gemischtem Knochenmark von WT (Ly5.1) Mäusen, den angegebenen Mausstämmen (DIETER, *Ccr2*^{-/-} X DIETER, *Fli3*^{-/-} X DIETER) und WT Mäuse wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit 4-OHT am Rücken behandelt und erhielten einmalig anti-CD40 (i.v.). **(A)** Nach 10 Tagen wurde die Anzahl an GP₃₃₋₄₁ spezifischen CD8⁺ T-Zellen im Blut mittels Tetramer Färbung ermittelt. **(B)** An Tag 11 wurden die Mäuse mit 2x10⁶ pfu VV-G2 an beiden Ohren durch s.s. infiziert und 8 Tage später der Virustiter in den Geweben mittels Plaque Assay ermittelt. Gezeigt sind die Mittelwerte (±SD) aus einem Experiment mit n=7-9; ***p ≤ 0,001; **p ≤ 0,01; *p ≤ 0,05; ns = nicht signifikant; ANOVA Tukey's multiple comparisons test.

4.8 Lokale Antigen Präsentation in der Haut von moDCs alleine ist ausreichend für die Differenzierung und Erhaltung von hautresidenten Memory T-Zellen (T_{RMS})

Zur Entstehung hautresidenter Memory T-Zellen (T_{RMS}) benötigt es eigentlich kein lokales Antigen, was bereits in 4.6 gezeigt werden konnte (Hain et al., 2019; Mackay et al., 2012). Aktuelle Studien konnten jedoch zeigen, dass die lokale Antigen Präsentation im Zielorgan zwar nicht die Einwanderung geprimter Zellen erhöht, jedoch dass deren Retention oder Differenzierung zu T_{RMS} deutlich verstärkt wird (Khan et al., 2016; Muschaweckh et al., 2016).

Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, welche dDC Subtypen lokal Antigen präsentieren müssen, damit es zur verstärkten Differenzierung und Erhaltung von T_{RMS} kommt. Hierfür wurden DIETER, DIETER + Ly5.1 \rightarrow B6, LangDTR X DIETER + Ly5.1 \rightarrow B6, *Ccr2*^{-/-} X DIETER + Ly5.1 \rightarrow B6 und *Flt3*^{-/-} X DIETER + Ly5.1 \rightarrow B6 Mäuse 2 Tage vor der Infektion mit GP₃₃₋₄₁ spezifischen CD8⁺ T-Zellen (Thy1.1) adoptiv transferiert. Zur Infektion wurde den Mäusen VV-GP₃₃₋₄₁ i.p. verabreicht, um GP₃₃₋₄₁ spezifische Zellen zu primen und an beiden Ohren mittels *poking* VV-OVA eintätowiert, um eine Inflammation auszulösen. Einen Tag vor sowie am 1. und 3. Tag nach der Infektion, wurde das eine Ohr der Mäuse mit 4OH-Tamoxifen (4-OHT), das andere mit Vehikel behandelt, um zu untersuchen ob mehr T_{RMS} durch die lokale GP₃₃₋₄₁ Präsentation der einzelnen dDCs Subtypen induziert werden. Außerdem wurden CD207⁺ dDCs der gemischten Knochenmarkschimäre (MBMCs) LangDTR X DIETER + Ly5.1 \rightarrow B6 mit *Diphtherie Toxin* depletiert (Abb. 5 und 6A). Nach Erreichen der Memory Phase wurden die T-Zellen der Ohren isoliert und die Anzahl der spezifischen T_{RMS} anhand der Marker CD69 und CD103 sowie auf deren Spezifität gegenüber den Tetrameren GP₃₃₋₄₁ und SIINFEKL mittels Durchflusszytometer bestimmt (Abb. 10A und B).

DIETER Mäuse in denen alle dDCs, als auch die Langerhans-Zellen das Antigen nach 4-OHT Behandlung präsentieren können (Abb. 5), hatten dreimal so viele spezifische T_{RMS} in den mit 4-OHT behandelten Ohren, gegenüber den mit Vehikel behandelten

Ohren. DIETER + Ly5.1 → B6 MBMCs, bei denen Langerhans-Zellen nicht in der Lage sind die LCMV CTL-Epitope zu präsentieren (Abb. 5), wiesen auch ungefähr dreimal so viele GP₃₃₋₄₁ spezifische T_{RM}S in den behandelten Ohren auf. Dies gilt auch für 4-OHT behandelten Ohren von LangDTR X DIETER + Ly5.1 → B6 MBMCs (DT-1). Diese MBMCs exprimieren nach 4-OHT Behandlung auf allen dDCs außer den CD207⁺ GP₃₃₋₄₁ (Abb. 5). Konnten nur konventionelle dDCs GP₃₃₋₄₁ auf ihrer Oberfläche exprimieren (*Ccr2*^{-/-} X DIETER + Ly5.1 → B6 (Abb. 5 und 6C)), wurden ungefähr viermal so viele spezifische T_{RM}S in mit 4-OHT behandelten Ohren im Vergleich zu in unbehandelten Ohren gefunden. Bei *Flt3*^{-/-} X DIETER + Ly5.1 → B6 MBMCs war das Verhältnis von spezifischen T_{RM}-Zellen der Ohren in denen GP₃₃₋₄₁ präsentiert wurde, im Vergleich zu Vehikel behandelten Ohren, um das dreifache erhöht. Bei *Flt3*^{-/-} X DIETER + Ly5.1 → B6 MBMCs ist davon auszugehen, dass sie ausschließlich monozytäre DCs besitzen, die durch eine 4-OHT Behandlung angesprochen werden (Abb 5 und 6D) (Abb. 10C).

Somit konnte gezeigt werden, dass in unserem Mausmodell konventionelle DCs sowie moDCs jeweils alleine dazu in der Lage sind hautresidente Memory Zellen zu induzieren und zu deren Erhaltung beitragen.

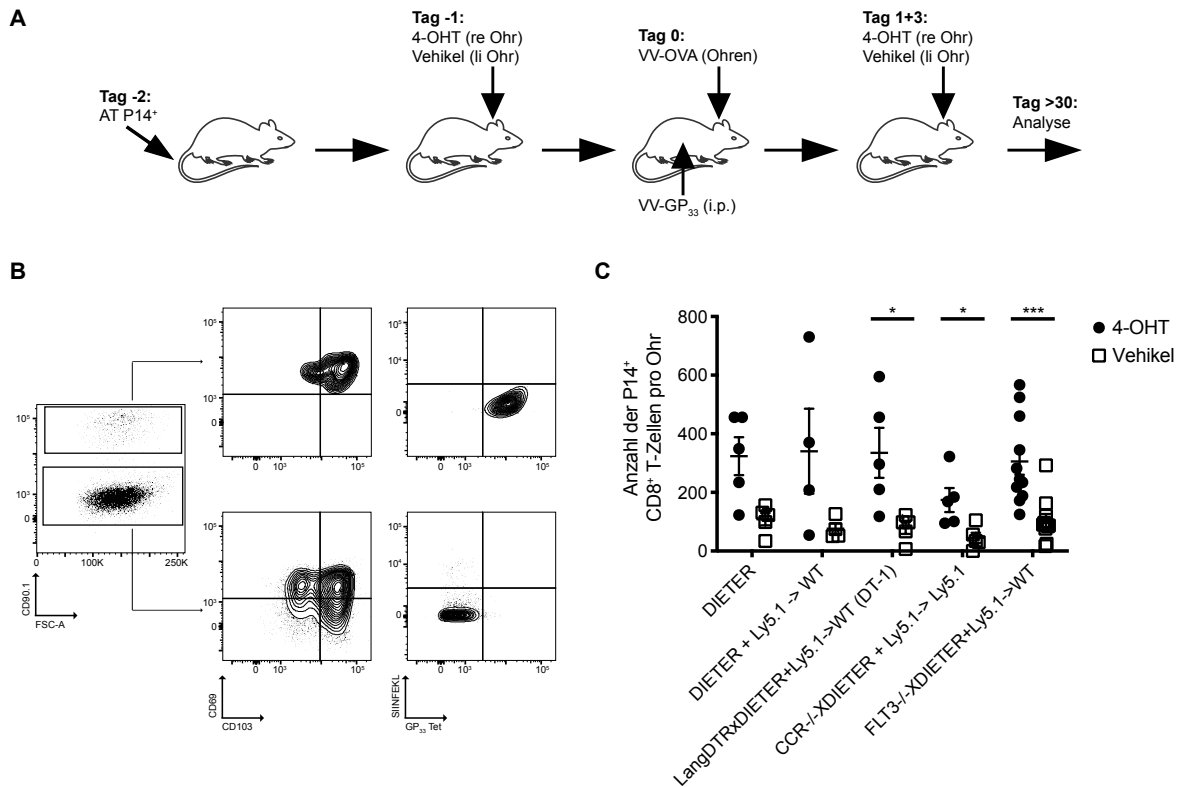


Abbildung 10: Lokale Antigen Präsentation von dermalen moDCs alleine ist ausreichend für die Erhaltung von Tissue-Resident-Memory T-Zellen (T_{RM}s)

(A) DIETER Mäuse und gemischte Knochenmarkchimäre (MBMC) aus 1:1 gemischtem Knochenmark von WT (Ly5.1) Mäusen und den angegebenen Mausstämmen (DIETER, LangDTR X DIETER, *Ccr2*^{-/-} X DIETER, *Flt3*^{-/-} X DIETER) wurden mit $5 \cdot 10^4$ P14⁺ T-Zellen (Thy1.1) adoptiv transferiert (i.v.). An Tag -1, 1 und 3 wurden die Mäuse an ihrem rechten Ohr mit 4-OHT und an ihrem linken Ohr mit Vehikel behandelt. LangDTR X DIETER + Ly5.1 → B6 MBMCs erhielten zur Depletion der cDC1s an Tag -4, -2, 0, 2 und 4 *Diphtherie Toxin* (DT) i.p. verabreicht. An Tag 0 wurden die Mäuse mit VV-OVA an beiden Ohren mittels *poking* und mit VV-GP₃₃₋₄₁ i.p. infiziert. Nach Erreichen der Memory-Phase (Tag > 30) wurden die T_{RM}s aus den Ohren isoliert und deren Anzahl durchflusszytometrisch bestimmt. (B) Anhand der Gating Strategie wurden endogene (CD90.2) und adoptiv transferierte (CD90.1) CD8⁺ T-Zellen auf die Expression der Memory Marker CD69 und CD103 sowie auf ihre Spezifität gegenüber den Tetrameren GP₃₃₋₄₁ und SIINFEKEL untersucht. (C) Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde die Anzahl von P14⁺ T-Zellen in den Ohren bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte (±SD) aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit n=4-10; *p ≤ 0,05 und ***p ≤ 0,001; ungepaarter t-Test.

4.9 Die Expression des transgenen Antigens auf Keratinozyten führt zum priming GP₃₃₋₄₁ spezifische CD8⁺ T-Zellen, diese vermitteln jedoch keine effiziente Protektion gegen rekombinantes GP₃₃₋₄₁ exprimierendes *Vaccinia* (s.s.)

Um zu untersuchen, welchen Einfluss Keratinozyten (KCs) auf die Aktivierung von spezifischer CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu Langerhans Zellen und dermalen dendritischen Zellen (dDCs) haben, wurden K14Cre Mäuse mit ST33 Mäusen verpaart. Dies ermöglichte es uns, dass in K14Cre X ST33 (K14-DIETER) Mäusen die KCs nach Applikation von Tamoxifen oder 4OH-Tamoxifen (4-OHT) anstelle der CD11c^{high} Zellen (DIETER Modell) die transgenen CTL Epitope exprimieren (Vasioukhin et al., 2002) (Abb. 5).

Hierfür wurden K14-DIETER, DIETER und C57BL/6 (WT) Mäuse mit P14⁺ T-Zellen (Thy1.1) adoptiv transferiert. An zwei aufeinanderfolgenden Tagen wurde durch die topikale Applikation von 4-OHT die Antigen Präsentation induziert und mittels aCD40 die Maturation von DCs unterstützt. Nach 10 Tagen wurde das Blut auf spezifische P14⁺ CD8⁺ T-Zellen sowie auf endogene GP₃₃₋₄₁ Tetramer (Tet)⁺ und LacZ Tet⁺ CD8⁺ T-Zellen mit Hilfe des Durchflusszytometers untersucht. Am darauffolgenden Tag wurden die Tiere an den Ohren mit rekombinanten *Vaccinia Virus* GP₃₃₋₄₁ infiziert und 8 Tage nach Infektion ermittelt, ob diese Zellen in der Lage waren gegen die Virus Challenge zu protektieren.

Im Blut der K14-DIETER Mäuse konnte im Vergleich zu DIETER Mäusen eine gering reduzierte Anzahl an adoptiv transferierten spezifischen CD90.1⁺ CD8⁺ P14⁺ T-Zellen beobachtet werden (Abb. 11A).

Die Untersuchung der endogenen CD90.2⁺ T-Zellen zwischen K14-DIETER und DIETER Mäusen die GP₃₃₋₄₁ Tet⁺ und LacZ Tet⁺ waren, zeigten keine Unterschiede. (Abb. 11B und C).

Die funktionelle Analyse der GP₃₃₋₄₁ spezifischen CD8⁺ T-Zellen mit Hilfe des Plaque Assays ergab bei K14-DIETER Mäusen $1,3 \cdot 10^6$ pfu/2Ohren, wohingegen bei DIETER Mäuse keine Viruslast in den Ohren (1,5 pfu/2Ohren) festgestellt werden konnte (Abb. 11D).

Die Expression des transgenen Antigens in KCs führt zu einem Priming von GP₃₃₋₄₁ spezifische CD8⁺ T-Zellen, wobei jedoch in weiteren Versuchen untersucht werden muss, ob dies durch Kreuzpräsentation auf DCs vermittelt ist. Die fehlende Protektion gegen rekombinantes *Vaccinia* bedarf ebenfalls weiterer Untersuchungen.

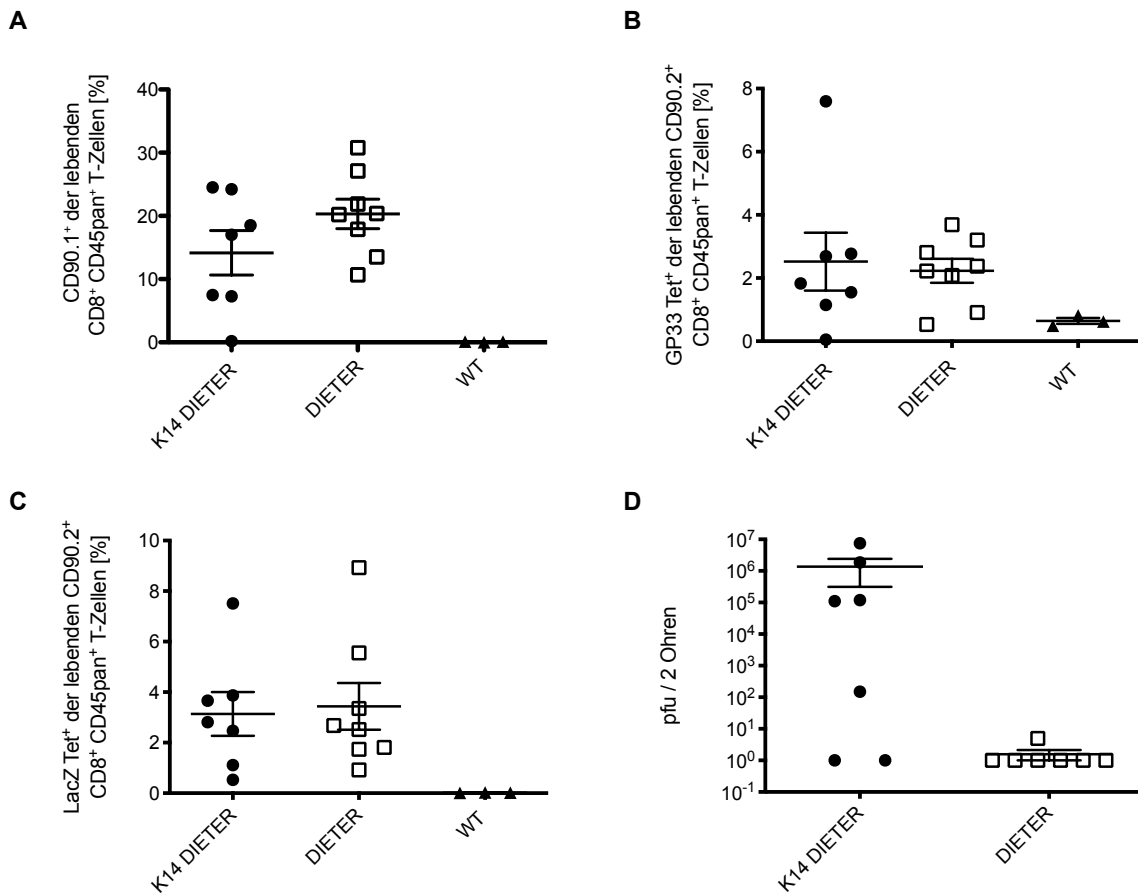


Abbildung 11: Antigen Expression in Keratinozyten induziert GP₃₃₋₄₁ spezifische CD8⁺ T-Zellen, die jedoch keine effiziente Protektion gegen rekombinantes GP₃₃₋₄₁ exprimierendes *Vaccinia* (s.s.) aufweisen

K14-DIETER, DIETER und C57BL/B6 (WT) Mäuse wurden mit $5 \cdot 10^4$ P14⁺ T-Zellen (Thy1.1) adoptiv transferiert (i.v.). Die Mäuse wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit 4-OHT am Rücken behandelt und erhielten einmalig anti-CD40 (i.v.). **(A+B+C)** Nach 10 Tagen wurde die Anzahl an P14⁺ T-Zellen im Blut bestimmt sowie der GP₃₃₋₄₁ und LacZ spezifischen CD90.2⁺ CD8⁺ T-Zellen im Blut mittels Tetramer Färbung ermittelt. **(D)** An Tag 11 wurden die Mäuse mit $2 \cdot 10^6$ pfu VV-G2 an beiden Ohren durch s.s. infiziert und 8 Tage später der Virustiter in den Geweben mittels Plaque Assay ermittelt.

4.10 Die Antigen Expression auf Keratinozyten trägt zur Induktion und Erhaltung von hautresidenten Memory T-Zellen (T_{RMS}) bei

Aktuelle Studien lassen vermuten, dass auch TCR Signale in infizierten nicht lymphatischen Geweben zur Bildung von T_{RMS} beitragen. Daher sollte untersucht werden, ob Keratinozyten (KCs), welche nach Applikation von 4OH-Tamoxifen lokal das transgene Antigen exprimieren, ebenso effizient zur T_{RMS} Differenzierung und Retention beitragen können, wie es bei dermalen dendritischen Zellen der Fall ist. Hierfür wurden DIETER, K14-DIETER und C57BL/B6 (WT) Mäuse 2 Tage vor der Infektion mit GP₃₃₋₄₁ spezifischen CD8⁺ T-Zellen (Thy1.1) adoptiv transferiert. Um GP₃₃₋₄₁ spezifische Zellen zu primen, wurde den Mäusen VV-GP₃₃₋₄₁ i.p. verabreicht und mittels *poking* von VV-OVA eine lokale Inflammation an beiden Ohren hervorgerufen. Einen Tag vor sowie am 1. und 3. Tag nach der Infektion wurde ein Ohr der Mäuse mit 4OH-Tamoxifen (4-OHT) zur lokalen GP₃₃₋₄₁ Präsentation und das andere Ohr mit Vehikel behandelt. Nach 40 Tagen wurden die Ohren der Mäuse entnommen und die Anzahl der spezifischen T_{RMS} wurden anhand der Marker CD69 und CD103 sowie auf deren Spezifität gegenüber den Tetrameren GP₃₃₋₄₁ und SIINFEEKL mittels Durchflusszytometer bestimmt (Abb. 10A und B).

Sowohl DIETER als auch K14-DIETER Mäuse wiesen 4-5 Mal so viele GP₃₃₋₄₁ spezifische hautresidente Memory T-Zellen in Ohren auf, in denen lokal GP₃₃₋₄₁ präsentiert wurde, im Vergleich zu den mit Vehikel behandelten Ohren. Bei C57BL/B6 Mäusen konnte kein Unterschied zwischen lokaler Antigen Präsentation und Vehikel behandelten Ohren in Bezug auf spezifischen T_{RMS} festgestellt werden (Abb. 12).

Somit konnte gezeigt werden, dass KCs zur Induktion und Erhaltung von T_{RM} -Zellen durch Antigen Präsentation beitragen. Wie im vorangegangenen Kapitel bereits erwähnt, gilt es jedoch zu klären, ob die von KCs exprimierten Antigene durch DCs kreuzpräsentiert werden, welche dann zur Induktion und Retention von T_{RM} -Zellen beitragen oder ob KCs selbst dazu in der Lage sind.

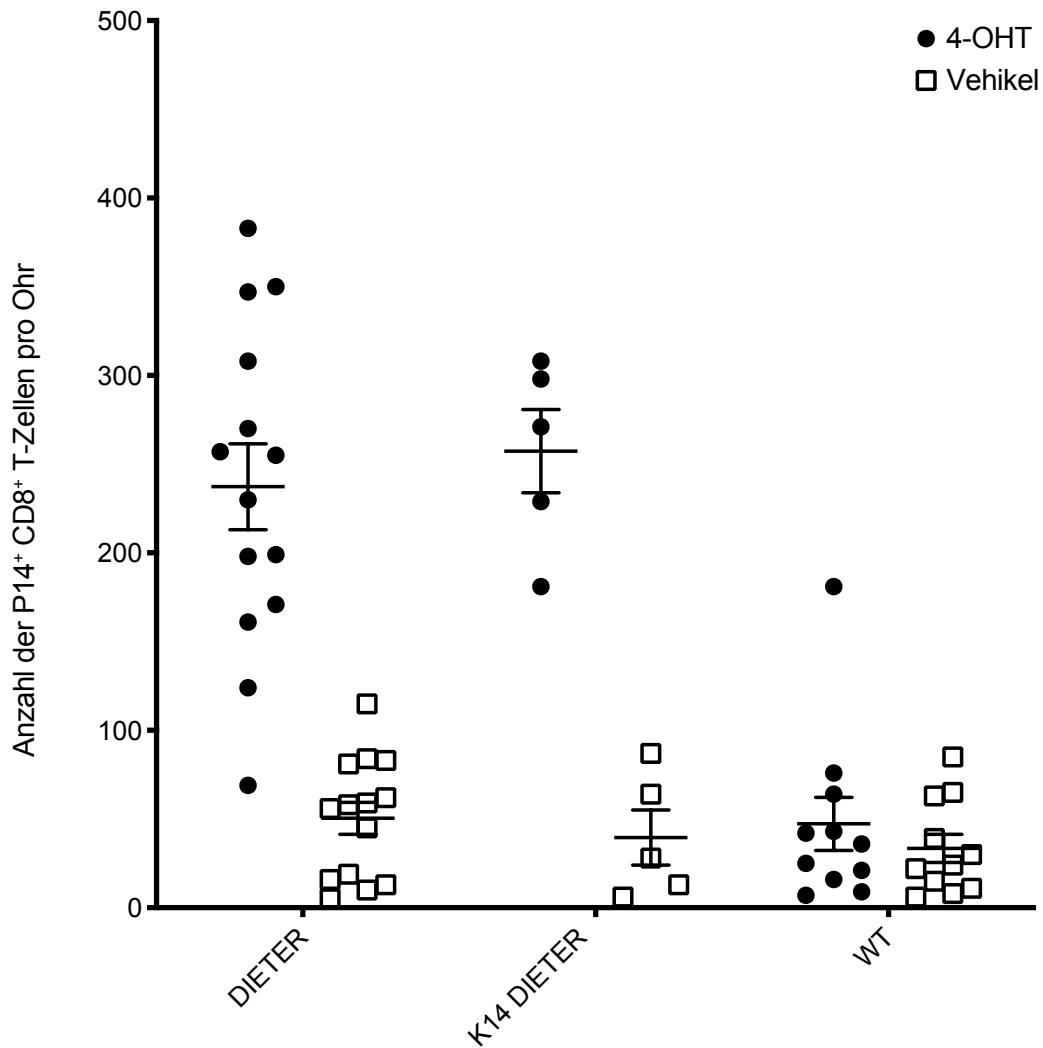


Abbildung 12: Antigen Expression durch Kerationozyten trägt zur Erhaltung von Tissue-Resident-Memory T-Zellen (T_{RMS}) bei

DIETER, K14-DIETER und WT Mäuse wurden mit $5 \cdot 10^4$ P14⁺ T-Zellen (Thy1.1) adoptiv transferiert (i.v.). An Tag -1, 1 und 3 wurden die Mäuse an ihrem rechten Ohr mit 4-OHT und an ihrem linken Ohr mit Vehikel behandelt. An Tag 0 wurden die Mäuse mit VV-OVA an beiden Ohren mittels skin scarificatin (s.s.) und mit VV-GP₃₃₋₄₁ i.p. infiziert. Nach Erreichen der Memory-Phase (Tag > 30) wurden die T_{RMS} aus den Ohren isoliert und deren Anzahl durchflusszytometrisch bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte (\pm SD) aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten mit n=5-14;

5. Diskussion

Dendritische Zellen (DCs) fungieren in ihrer Rolle als professionelle antigenpräsentierende Zellen (pAPCs) als das Bindeglied zwischen der angeborenen und adaptiven Immunität (Banchereau & Steinman, 1998). Als Wächter patrouillieren DCs durch lymphatische und nicht-lymphatische Gewebe. Im unreifen Status sind DCs nicht dazu in der Lage naïve T-Zellen zu primen, stattdessen tolerisieren *steady state* DCs periphere antigenspezifische CD4 und CD8 T-Zellen und supprimieren somit potenziell autoreaktive T-Zellen (Vitali et al. 2012; Waithman et al. 2007; Hawiger et al. 2001; Probst et al. 2003; Steinman et al. 2003; Shortman & Y.-J. Liu 2002). Kommen unreife DCs in Kontakt mit Pathogenen anhand von PAMPs wie LPS etc., die sie mittels ihrer PRR wie TLRs erkennen (Diebold, 2009), mit inflammatorischen Zytokinen oder werden sie durch z.B. nekrotische Zellen beeinflusst, beginnen sie einen Differenzierungsprozess der als Maturation bezeichnet wird (Gallucci & Matzinger, 2001; Shi et al., 2003). Durch Hochregulation des Chemokin Rezeptors CCR7 migrieren die aktivierten DCs zu den drainierenden Lymphknoten (dLN) oder der Milz (Alvarez et al., 2008). Hier präsentieren sie das aufgenommene und prozessierte Antigen mittels ihrer MHC-Komplexe an naïve T-Zellen (Heuzé et al., 2013). Des Weiteren exprimieren aktivierte DCs große Mengen an den kostimulatorischen Molekülen CD80/86 sowie CD70, die zur effektiven Differenzierung naïver T-Zellen in Effektor T-Zellen (T_{EF}) führen (Alvarez et al., 2008; Heuzé et al., 2013; Schildknecht et al., 2007; Smith-Garvin et al., 2009; Steinman, 2012). Nach erfolgreicher Eliminierung der immunologischen Herausforderung gehen 90% der T_{EF} in Apoptose und es bilden sich Memory T-Zellen aus (Kaech, & Wherry, 2007; Shin & Wherry, 2007). Memory T-Zellen leiten bei erneutem Kontakt mit dem Pathogen eine schnellere und effizientere Immunantwort ein (Sallusto et al., 2004). Somit sind DCs auf der einen Seite Wächterzellen, die zur Einleitung einer T-Zellantwort gegenüber Pathogenen führen, auf der anderen Seite sind sie jedoch auch für den Erhalt der immunologischen Toleranz verantwortlich (Banchereau & Steinman, 1998).

Die Haut stellt eine unserer größten Barrieren zu unserer Umwelt dar, die uns stetig vor Viren, Bakterien, Pilzen und Parasiten schützt. Somit ist die Präsenz von DCs in der Epidermis und der Dermis eine grundlegende Überlebensfunktion unseres Körpers. Dermale DCs (dDCs) können in fünf Subtypen untergliedert werden. In der Epidermis befinden sich die strahlungsresistenten Langerhans Zellen (LCs), die ihre Dendriten auf der Suche nach Pathogenen zwischen den Keratinozyten ausstrecken (Katz et al., 1979; Langerhans, 1868; Merad et al., 2002). Nach Aktivierung der LCs durch Kontakt mit Pathogenen migrieren sie durch die Dermis zu den hautdrainierenden Lymphknoten (sdLN), um dort die zuvor aufgenommenen Antigene an T-Lymphozyten zu präsentieren (Merad et al., 2008; Romani et al., 2010).

In der Dermis erfüllen diese Funktion die konventionellen DCs (cDCs) Typ 1 (cDC1s) und Typ 2 (cDC2s), monozytäre DCs (moDCs), dermale Makrophagen sowie die doppelt negativen dDCs (DNDCs). Die $CD207^+ XCR1^+$ cDC1s, welche außerdem in eine $CD103^+$ und $CD103^-$ Population unterteilt werden können (Bachem et al., 2012; Crozat et al., 2011; Guilliams et al., 2016; Yamazaki et al., 2010), die $CD11b^+ Sirp\alpha^+$ cDC2s (Guilliams et al., 2016; Henri et al., 2010), als auch die DNDCs haben ihren Ursprung in pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen (Guilliams et al., 2016; Tamoutounour et al., 2013). Dermale monozytäre dendritische Zellen (moDCs) und Makrophagen haben ihren Ursprung in $Ly6C^+$ Monozyten, welche aus dem Blut in das Gewebe einwandern (Tamoutounour et al., 2013). Diese Zellen können anhand der Expression der Oberflächenmoleküle MerTk und CCR2 differenziert werden (Tamoutounour et al., 2013) (Abb. 1, 2 und 6).

In dieser Arbeit wurden anhand des DIETER Mausmodells, welches durch Applikation von Tamoxifen (systemisch) bzw. 4OH-Tamoxifen (lokal) MHC-Klasse I Peptid-Komplexe auf seinen DCs präsentiert, funktionelle *in vivo* Analysen der dDCs durchgeführt. Insbesondere wurde sich mit der Rolle der einzelnen Subtypen der dDCs in der Induktion einer protektiven GP_{33-41} spezifischen T-Zell Antwort und welche dDC Subpopulation dazu in der Lage sind hautresidente Memory T-Zellen (T_{RMS}) zu generieren und zu deren Aufrechterhaltung beizutragen, beschäftigt. Hierfür wurden DIETER Mäuse auf Mausmodelle gekreuzt, die entweder depletierbar oder defizient

für einzelne Subtypen der dDCs sind. Weiterhin wurde mittels K14-DIETER Mäusen untersucht, welchen Einfluss Keratinozyten in diesem Zusammenhang haben (Abb. 5).

5.1 Die topikale Gabe von 4-Hydroxytamoxifen induziert die Präsentation der DIETER Antigene ausschließlich auf dermalen dendritischen Zellen

Langerhans Zellen (LCs) und dermale dendritische Zellen (dDCs) migrieren nach der Aufnahme von kutanen Antigenen zu den drainierenden Lymphknoten (dLN), um hier das prozessierte Antigen auf ihren MHC-Komplexen an naive T-Zellen zu präsentieren und diese zu aktivieren (Henri, Williams, et al., 2010). Ziel unserer Experimente war es, das DIETER Mausmodell (Probst et al., 2003), welches topikal mit 4OH-Tamoxifen (4-OHT) behandelt wurde hinsichtlich der lokalen Präsentation der Antigene auf migratorischen DCs, der an der Präsentation beteiligten dDCs Subtypen, der Wirkung von aCD40 auf unser System und der Frage, ob eine Kreuzpräsentation von DC zu DC stattfindet, zu untersuchen.

In dieser Arbeit kann gezeigt werden, dass ausschließlich in die hautdrainierenden Lymphknoten (sdLN) migrierenden dDCs von DIETER Mäusen nach Behandlung der Haut mit 4-OHT GP₃₃₋₄₁ präsentieren und residente DCs in den sdLN nicht von der Behandlung mit 4-OHT angesprochen werden. Diese Ergebnisse untermauern die früheren Erkenntnisse unserer Gruppe (Hain et al., 2019), dass die Behandlung mit 4-OHT ausschließlich lokal wirkt und migratorische DCs aus der Peripherie in die sdLN einwandern müssen, um dort GP₃₃₋₄₁ zu präsentieren.

Die lokale Wirkung der 4-OHT Behandlung bestätigte sich auch in Experimenten mit CD11cCreERT X Rosa26-RFP Mäusen, deren CD11c⁺ Zellen nach Applikation von 4-OHT oder Tamoxifen (TAM) das *red fluorescence protein* (RFP) exprimieren. Dabei wiesen cDC1s cDC2s und CD11b⁻ CD207⁻ dDCs (DN) nach topikaler Behandlung mit 4-OHT eine besonders hohe Cre Aktivität auf (Abb. 4B). Außerdem konnte in den dLN nur bei migratorischen DCs und nicht bei den in dLN lokalisierten residenten DCs eine Cre Aktivität beobachtet werden (Abb. 4C). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit vorangegangenen Experimenten unserer Gruppe (Hain et al., 2019).

Die hohe Cre Aktivität der cDC1s in der Dermis kann unterschiedliche Ursachen haben. Ein möglicher Grund hierfür könnte die Lokalisation der cDC1s in der Dermis nahe zur Epidermis sein. Über cDC1s ist bekannt, dass sie häufig in der Nähe von

Haarfolikeln zu finden sind (Bursch et al., 2007; Poulin et al., 2007), in seltenen Fällen sogar in die Haarfollikel umgebende Epidermis hineinragen (Bursch et al., 2007).

Somit bestünde die Möglichkeit, dass nach topikaler Auftragung von 4-OHT, die cDC1s der höchsten Konzentration des Wirkstoffes ausgesetzt sind (Abb. 4B). Gegen dieses Argument spricht jedoch, dass zum einen in diesem Zusammenhang LCs auf Grund ihrer Lokalisation einer ebenso hohen, wenn nicht höheren Dosis an 4-OHT ausgesetzt wären, bei LCs jedoch eine sehr geringe Cre Aktivität in unseren Experimenten beobachtet wurde (Abb. 4A). Zum anderen wurde auch nach systemischer Aktivierung der Cre-Rekombinase mit TAM die mit Abstand höchste Cre Aktivität unter den dermalen DC in dermalen cDC1s beobachtet (Abb. 4B).

Daher ist eher davon auszugehen, dass es sich um einen zellintrinsischen Effekt handelt, der z.B. durch eine stärkere Aktivität des CD11c Promotors in cDC1 und einer damit einhergehenden erhöhten Expression des CreERT Proteins zu erklären wäre. Um diese Frage abschließend klären zu können, wäre eine Transkriptom Untersuchung, speziell der CD11c Expression der einzelnen dDC Subtypen unseres Modelles hilfreich.

Ein weiteres interessantes Ergebnis konnte bei LCs der CD11cCreERT X Rosa26-RFP Mäusen beobachtet werden. Während die topische Behandlung mit 4-OHT eine Cre Aktivität bei LCs induzierte, konnten wir dies nach Gabe von TAM nicht beobachten. Ursache hierfür könnte die Lokalisation der LCs in der gefäßfreien Epidermis sein. Die Epidermis wird zwar über den subepidermalen Gefäßplexus mit Blut versorgt, es besteht jedoch die Möglichkeit, dass LCs dadurch keine Interaktion mit dem in der Leber verstoffwechseltem Tamoxifen haben (Abb. 4A).

Abschließend ist zu sagen, dass die CD11cCreERT X Rosa26-RFP Reportermäuse ausschließlich eine Aussage über die Aktivität der Cre-Rekombinase anhand der RFP Expression zulassen. Sie vermitteln uns ein Bild davon, welche Subtypen der dDCs vermutlich das meiste Antigen präsentieren würden, wobei eine Korrelation zwischen Cre Aktivität und Expression von GP₃₃₋₄₁ auf DCs nicht gegeben sein muss. Unabhängig davon bleibt festzuhalten, dass keine Cre-Rekombinase Aktivität auf residenten DCs beobachtet werden konnte.

Aktuelle Studien legen nahe, dass für eine effektive T-Zell Antwort der Transfer von Antigenen von migratorischen dDCs an die in den dLN ansässigen residenten DCs erforderlich ist. Der genaue Mechanismus und die Rolle der Antigenübertragung ist noch kaum verstanden, jedoch werden verschiedene Übertragungswege diskutiert. Eine Möglichkeit wäre, dass migratorische DCs in den dLN in Apoptose gehen und von residenten DCs aufgenommen werden (Blachère, Darnell, & Albert, 2005) oder dass migratorische DCs Exosomen ausbilden (Théry et al., 2002). Des Weiteren wird diskutiert, ob infizierte DCs lösliche Antigene segregieren (Srivastava & Ernst, 2014) oder MHC-Klasse I-Peptidkomplexe zwischen den migratorischen und residenten DCs transferiert werden - ein Prozess der als cross-dressing beschrieben wird (Wakim & Bevan, 2011). Gurevich et al. geht durch Untersuchungen in *in vivo* Modellen davon aus, dass lebende aus der Peripherie kommende migratorische DCs aktiv Antigen in den dLN verbreiten. Dieses wird dann von residenten DCs aufgenommen und auf deren Oberfläche präsentiert. Die Präsentation des Antigens auf residenten DCs könnte wiederum zu einer längeren Verweildauer der T-Zellen in den dLN führen, was die Chance des Primings der naiven T-Zellen erhöht und eine effizientere T-Zell-Antwort zur Folge hätte (Gurevich et al., 2017).

Die Frage der Übertragung des Antigens von migratorischen DCs an residente DCs konnte anhand der Detektion von GP₃₃₋₄₁ spezifischen T-Zellen in Versuchen des DIETER Mausmodells nach topikaler Applikation 4-OHT nicht bestimmt werden. Hier waren ausschließlich Aussagen darüber zu treffen, dass eine Präsentation des Antigens durch migratorische DCs stattfand - ob residente DCs an der Präsentation an naive T-Zellen beteiligt waren, blieb unbeantwortet. In Experimenten unserer Gruppe mit migratorischen und residenten DCs der sdLN, welche nach Applikation von 4-OHT gesortet und mit spezifischen Nur77eGFP P14⁺ T-Zellen kokultiviert wurden, konnten wir jedoch zeigen, dass nur migratorische DCs die DIETER Antigene präsentierten und eine eGFP Expression detektiert wurde (Hain et al., 2019).

Damit die Kreuzpräsentation der induzierbaren transgenen Antigene von DC zu DC in dem für diese Arbeit verwendeten DIETER Mausmodell nach topischer Applikation von 4-OHT ausgeschlossen werden konnte, wurden gemischte Knochenmarkchimäre (MBMC) generiert, in welchen die DIETER Antigene auf K^b direkt, auf D^b aber nur

kreuzpräsentiert werden konnten. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigten, dass weder die systemische, noch die lokale Induktion der Antigen Expression auf dDCs dazu in der Lage war, eine GP₃₃₋₄₁/D^b spezifische T-Zell Antwort zu primen. Somit ist davon auszugehen, dass die Kreuzpräsentation von DC zu DC in unserem Modell ausgeschlossen werden kann (Abb. 7). Neben der direkten und der Kreuzpräsentation wurde ein weiterer Mechanismus der Präsentation von MHC-Klasse I gebundenen Antigenen an CD8⁺ T-Zellen durch APCs beschrieben. Beim sogenannten cross-dressing kommt es zum Transfer von MHC-Klasse I-Peptidkomplexe zwischen den migratorischen und residenten DCs (Wakim & Bevan, 2011). Dies kann in den von uns verwendeten MBMCs nicht ausgeschlossen werden. Jedoch zeigten Muth et al., bereits 2014, dass in gemischten Knochenmarkchimären (MBMC) die mit einer Mischung aus Knochenmark von CD40-defizienten DIETER und Knochenmark aus WT Mäusen rekonstituiert worden waren, kein CTL Priming nach Applikation von TAM stattfand. Dies lässt sich auf die Abwesenheit von CD40 auf den DC die das DIETER Transgen tragen zurückführen und obwohl diese in gleicher Anzahl vorhandenen DC des WT Ursprungs, CD40 normal exprimierten. Das Fehlen von T-Zell Aktivierung in dieser Situation lässt darauf schließen, dass ein Transfer von Antigen zwischen dendritischen Zellen, zumindest in funktionell relevantem Ausmaß, im DIETER Mausmodell nicht stattfindet. (Muth et al., 2014).

Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Applikation von aCD40 einen positiven Effekt auf die Mobilisierung von Langerhans Zellen (LCs) und Migration der dDCs aus der Haut zu den dLN hat (Abb. 3).

Dies steht im Einklang mit früheren Studien, welche vermuten lassen, dass aCD40 DCs zu effizienteren APCs macht, in dem es MHC Klasse II und die kostimulatorischen Molekülen CD80/86 Hochregulation sowie Signalkaskaden initiiert, die Gene aktiviert, die in der Zytokin Produktion beteiligt sind (Caux, 1994; Pinchuk et al., 1994; Sallusto & Lanzavecchia, 1994). Außerdem ist bekannt, dass die Ligation von aCD40 mit CD40 auf DCs unter anderem den NF κ B Signalweg aktiviert, dessen Moleküle essentiell für die Zelldifferenzierung und Aktivierung sind. Daher spielen die Moleküle des NF κ B Signalweg eine Schlüsselfunktion in der Maturation von DCs (Garceau et al., 2000), was letztendlich zur Migration der dDCs aus der Peripherie zu den SLO führt.

Allerdings werfen die Ergebnisse dieser Arbeit die Frage auf, ob die bisher verwendete experimentelle Prozedur - die Gabe von aCD40 zwischen den zwei topischen Applikationen von 4-OHT - überdacht werden sollte. Grund für diese Überlegung ist, dass aCD40 zu einer massiven Migration von LCs und dDCs zu den dLN führt und so bei der zweiten 4-OHT Behandlung die Zielzellen möglicherweise bereits die Haut verlassen haben, was eine zweite Behandlung 4-OHT Gabe überflüssig machen würde. Eine Kinetik der Migration von LCs und dDCs könnte Aufschluss darüber geben, zu welchem Zeitpunkt nach aCD40 Gabe diese Zellen überhaupt noch in Epidermis und Dermis zugegen sind. Außerdem sollte untersucht werden, ob die Gabe von aCD40 nach der zweiten 4-OHT Applikation zu einer höheren Anzahl an spezifischer CD8⁺ T-Zellen führt oder eine einmalige Behandlung mit 4-OHT den gleichen Effekt erzielt und somit ausreichend wäre.

5.2 Alle Subtypen der dermalen dendritischen Zellen sind in der Lage, eine protektive spezifische T-Zell Antwort zu induzieren

In früheren Experimenten unserer Gruppe konnte gezeigt werden, dass CD207⁻ dermale DCs (dDCs) dazu in der Lage sind funktionale *skin homing* CTLs zu induzieren (Hain et al., 2019). Die Population der CD207⁻ dDCs setzt sich aus konventionellen DCs Typ 2 (cDC2s), monozytären DCs (moDCs) und dermalen Makrophagen zusammen (Abb. 2). Mit Hilfe von CD11cCreERT X Rosa26-RFP Mäusen konnte bereits gezeigt werden, dass LCs sowie die dDCs jedoch nicht die dermalen Makrophagen nach topischer Behandlung mit 4-OHT eine Cre Aktivität aufweisen (Hain et al., 2019). Um die Funktionen der einzelnen Subtypen der dDCs zu untersuchen, bietet sich das kreuzpräsentationsunabhängige DIETER Mausmodell an, das sich durch die endogene Produktion von GP₃₃₋₄₁ in DCs auszeichnet (Probst et al., 2003).

Um zu untersuchen, welchen Beitrag cDCs und moDCs für die Induktion einer CD8⁺ T-Zell Antwort leisten, wurden gemischte Knochenmarkschimäre (MBMC) in Kombination des DIETER Mausmodells mit *CCR2*^{-/-} (Boring et al., 1997) und *FLT3*^{-/-} (Mackarehtschian et al., 1995) Mäusen genutzt (Abb. 5 und 6C+D). Die mögliche Kreuzpräsentation zwischen den funktionalen dDCs der KO X DIETER Mauslinien und wildtypischen dDCs in den von uns verwendeten MBMCs, konnten wir anhand der Ergebnisse der Experimente mit DIETER X H2-D^{b/-} + Ly5.1 -> WT MBMC ausschließen. Wir konnten hierbei zeigen, dass ausschließlich die direkte Präsentation der DIETER Antigene zum Priming einer spezifischen CD8⁺ T-Zell Antwort führt (Abb. 7).

Dermale moDCs haben ihren Ursprung in Ly6C positiven Monozyten, welche aus dem Blut in das Gewebe einwandern (Jakubzick et al., 2013; Tamoutounour et al., 2013), wobei deren Auswanderung aus dem Knochenmark *CCR2* abhängig ist (Domínguez & Ardavín, 2010; Serbina & Pamer, 2006). In Übereinstimmung mit Untersuchungen der Haut von *CCR2* defizienten Mäusen von Tamoutounour et al. konnten wir in unseren Analysen der Dermis von *Ccr2*^{-/-} X DIETER + Ly5.1 → B6 MBMCs eine massive Reduktion der moDCs und der dermalen Makrophagen nachweisen

(Tamoutounour et al., 2013) (Abb. 6C). Auf Grund der Strahlungsresistenz der LCs die dazu führt, dass LCs nach letaler Bestrahlung und Rekonstitution mit Donor Knochenmark weiterhin von dem Akzeptortier stammen (Katz, Tamaki, 1979; Merad et al., 2002), waren lediglich cDCs dazu in der Lage die induzierbaren DIETER transgenen Antigene zu präsentieren (Abb. 5). Unsere Analysen der *Ccr2*^{-/-} X DIETER + Ly5.1 → B6 MBMCs zeigen, dass cDCs alleine eine spezifische T-Zell Antwort induzieren können, die gegenüber einer lokalen Infektion protektieren können (Abb 9). In Kombination mit Ergebnissen von Hain et al. die zeigen, dass cDC1s nicht zwingend für die Induktion einer CD8⁺ T-Zell Antwort im DIETER Modell erforderlich sind, könnte man die These aufstellen, dass cDC2s alleine dazu in der Lage sind. Um diese Annahme zu untermauern, würden sich Untersuchungen an LangDTR X *Ccr2*^{-/-} X DIETER + Ly5.1 → B6 MBMCs anbieten. In diesen MBMCs können cDC1s durch die Gabe von DT depletiert werden (LangDTR) (Bennett et al., 2005; Kissenpfennig et al., 2005) und moDCs fehlen konstitutiv (*Ccr2*^{-/-}) (Boring et al., 1997), daher würde die GP₃₃₋₄₁ Expression ausschließlich auf cDC2s induziert werden.

Zur Untersuchung der dermalen moDCs kombinierten wir das DIETER Mausmodell mit *FLT3* defizienten Mäusen. Konventionelle DCs (cDCs) werden in Mäusen dieses Stammes nicht gebildet, wohingegen die Entwicklung von moDCs nicht beeinflusst wird (Mackaretschian et al., 1995) (Abb. 6D).

Bei den von uns generierten *Flt3*^{-/-} X DIETER + Ly5.1 → B6 MBMC ist davon auszugehen, dass ausschließlich auf moDCs die DIETER Antigene präsentiert werden (Abb. 5). In den von uns gezeigten Strategien der durchflusszytometrischen Untersuchung von *Flt3*^{-/-} X DIETER + Ly5.1 → B6 MBMC nach Henri (Henri et al. 2010) ist zu erkennen, dass eine starke Reduktion des CD45.2⁺ CD11c⁺ MHCII⁺ Kompartiments (*Flt3*^{-/-} X DIETER) verglichen zum CD45.1⁺ Kompartiments (WT) zu erkennen ist. Da die Entwicklung von cDC1s und cDC2s von *Flt3* abhängig ist (Mackaretschian et al., 1995) und der prozentuale Anteil der CD45.2⁺ MHCII⁺ CD207⁺ dDCs (cDC1s) stark reduziert ist, sind wir davon ausgegangen, dass auch die cDC2s vermindert sind. Die CD45.2⁺ Zellen im CD11b⁺ MHCII⁺ Kompartiment sollten moDC und Makrophagen sein, die von der *FLT3* Defizienz nicht betroffen sind. Um die These

der fehlenden cDC2s zu untermauern, werden zukünftig weitere Untersuchungen mit komplexeren Gating Strategien durchgeführt (Abb. 6D).

Ohne lokale Inflammation stellen die moDCs verglichen zu cDC2s eine kleine Population der CD11b⁺ dDCs dar (Tamoutounour et al., 2013), deren Anzahl allerdings in Gegenwart einer Entzündung oder Infektion massiv zunimmt (León, López-Bravo, & Ardavín, 2007; Serbina et al., 2003). Ob in unseren Experimenten eine Inflammation stattfand, die dann zur Einwanderung von moDCs in die Haut führte, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, da die Rasur des Rückens bereits eine Irritation der Haut darstellt. Generell wird die Rolle der moDCs in Bezug auf Interaktion mit und Regulation der T-Zell Antwort in der Literatur kontrovers diskutiert. So legen Ergebnisse von Cheong et al. nahe, dass moDCs dazu in der Lage sind T-Zellen zu primen und beobachteten die Proliferation dieser (Cheong et al., 2010). Dem gegenüber stehen Ergebnisse, die vermuten lassen, dass moDCs für das Priming von T-Zellen überflüssig sind (Serbina et al., 2003) bzw. sogar nicht die Fähigkeit besitzen, eine T-Zell Proliferation zu induzieren (Rydström & Wick, 2007). Die von uns gewonnenen Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass im DIETER Mausmodell auch moDCs alleine dazu in der Lage sind, eine gegen lokale Infektion protektive spezifische T-Zell Antwort einzuleiten (Abb. 9).

Zwar ist der prozentuale Anteil geprimter spezifischer CD8⁺ T-Zellen bei fehlender Antigen Präsentation von cDCs und moDCs verglichen zur Situation, dass alle dDCs die transgenen Antigene präsentieren können geringer, die Protektion gegenüber einer kutanen Infektion besitzt jedoch die identische Effizienz. Grund für das geringere Priming spezifischer Zellen könnte bei *Flt3*^{-/-} X DIETER + Ly5.1 → B6 und *Ccr2*^{-/-} X DIETER + Ly5.1 → B6 MBMCs jeweils das Fehlen der entsprechenden funktionalen dDC Populationen der verwendeten KO Mauslinien sein. Dies würde dafürsprechen, dass unter Einbezug vorheriger Untersuchungen unserer Gruppe, im DIETER Mausmodells jeder dDC Subtyp eine protektive antigenspezifische T-Zell Antwort induzieren kann. Wäre eine oder mehrere dDC Populationen hierzu nicht in der Lage, sollte die Abwesenheit des funktionellen Subtypes keinen Einfluss auf den prozentualen Anteil der induzierten spezifischen CD8⁺ T-Zellen haben.

5.3 Induktion und Erhalt hautresidenter Memory CD8⁺ T-Zellen durch lokale Antigen Präsentation der dermalen dendritischen Zellen

Ursprünglich wurden zytotoxische Gedächtnis T-Zellen in zwei Kategorien unterschieden – die Effektor Memory und die Central Memory T-Zellen (T_{EM} und T_{CM}) (Sallusto et al., 1999). Nachdem festgestellt wurde, dass ein Teil der Memory T-Zellen nicht dazu in der Lage ist, aus der Peripherie zurück in das Blut zu gelangen und dort zu zirkulieren, war klar, dass es eine weitere Population von Memory T-Zellen existieren muss. Dieser dritte Subtyp von Memory T-Zellen wurde wegen seiner einzigartigen Fähigkeit sich in peripheren Geweben anzusiedeln und dort zu verweilen als *tissue-resident memory T cells* (T_{RM}) beschrieben (Masopust et al., 2010; Reading et al., 2009; Wakim et al., 2008). Im Vergleich zu zirkulierenden T_{EM} und T_{CM} bieten T_{RM} s eine bessere lokale Überwachung und schnelle Protektion gegenüber Pathogenen in der Peripherie (Gebhardt & Mackay, 2012; Schenkel & Masopust, 2014). Außerdem lassen Untersuchungen von Schenkel et al. vermuten, dass T_{RM} -Zellen nicht nur über die Eliminierung infizierter Zellen zur Bekämpfung des spezifischen Pathogens beitragen. Werden T_{RM} -Zellen durch Erkennung ihres spezifischen Antigens reaktiviert, schütten diese proinflammatorische Zytokine aus, die einerseits zur schnellen Rekrutierung der T_{CM} und anderer Immunzellen führt (Schenkel, Fraser, Vezys, & Masopust, 2013), aber auch einen generellen Alarmzustand gegenüber Pathogenen im Gewebe hervorruft, welcher zu einem lokalen Schutz vor unspezifischen Pathogenen beiträgt (Ariotti et al., 2014; Schenkel et al., 2015).

Daher besteht großes Interesse darin Impfungen zu entwickeln, die zur Optimierung der Generierung und Beibehaltung von T_{RM} -Zellen in nicht lymphoiden Geweben beitragen. Die so entstehenden CD8⁺ T_{RM} -Zellen könnten eine wichtige Rolle bei der Protektion gegenüber für den Menschen gefährlichen Pathogenen, die Infektionen in nicht lymphoiden Geweben verursachen, spielen. Obwohl die Funktion der T_{RM} -Zellen in der Immunprotektion bei lokalen Infektionen gut verstanden sind, bleibt die Frage offen, welche Mechanismen für die Entstehung und Aufrechterhaltung der peripheren Gedächtnis T-Zellen verantwortlich sind. Aus diesem Grund beschäftigen sich eine Vielzahl aktueller Studien damit, diese Mechanismen zu untersuchen.

In den von uns durchgeführten Experimenten widmeten wir uns der Frage, welche Subpopulation der dermalen dendritischen Zellen (dDCs) mittels lokaler Antigen Präsentation dazu in der Lage ist, $CD8^+$ T_{RM} -Zellen zu induzieren und zu deren Erhalt beitragen.

Mackay et al. zeigten, dass T_{EF} -Zellen die durch eine mittels topical aufgetragenem DNFB hervorgerufene Inflammation in die Haut eingewandert waren, einen T_{RM} -Zellen Phänotyp entwickelten, wobei dies nicht die Anwesenheit von lokalem Antigen erforderte (Mackay et al., 2012). Diese Daten stehen im Kontrast zu Untersuchungen anderer Organe und Geweben, wie dem zentralen und peripheren Nervensystem, die zeigten, dass die Anwesenheit von lokalem Antigen hier essenziell für die Reifung von T_{EF} -Zellen zu T_{RM} -Zellen ist (Casey et al., 2012; Mackay et al., 2012, 2015; Skon et al., 2013; Wakim et al., 2010).

Nachdem unsere Gruppe zeigen konnte, dass $CD207^-$ dDCs eine „*skin homing*“ $CD8^+$ T-Zell Antwort auslösen können, die protektiv gegen eine Challenge Infektion ist (Hain et al., 2019), stellten wir uns die Frage, ob diese Zellen in Gegenwart einer durch DNFB Behandlung lokalen Infektion zu $CD8^+$ T_{RM} -Zellen ausreifen können. Trotz Depletion der $CD207^+$ Zellen der Dermis in LangDTR X DIETER + Ly5.1 → B6 MBCM wurde die gleiche Anzahl an spezifischen $CD8^+$ T_{RM} -Zellen, verglichen zu nicht depletierten LCs und cDC1s nach lokaler Antigen Präsentation und lokaler Infektion in den Ohren, beobachtet (Abb. 8). Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass in die lokale Antigen Expression auf $CD207^-$ dDCs bei lokalen Infektionen ausreicht, um spezifische $CD8^+$ T-Zellen zu induzieren, die sich dann zu $CD8^+$ T_{RM} -Zellen differenzieren (Hain et al., 2019) und stehen im Einklang mit den Daten von Mackay et al..

Um den Einfluss der heterogenen Population der $CD207^-$ dDCs genauer zu untersuchen, verwendeten wir ein Modell in dem spezifische $CD8^+$ T-Zellen adoptiv transferiert und durch eine i.p. Infektion mit VV-GP₃₃₋₄₁ geprimt wurden. In den Ohren wurde mittels Infektion von VV-OVA Virus eine lokale unspezifische Inflammation ausgelöst. Die Behandlung eines der beiden Ohren mit 4OH-Tamoxifen (4-OHT) führte, je nach Mausmodell, zur lokalen Antigen Expressionen auf verschiedenen Subpopulationen der dDCs (Abb. 5 und 10A). Ohren, in welchen durch 4-OHT die lokale Antigen Expression eingeschaltet wurde, verfügten über die 3-4 fache Menge

an spezifischen T_{RM}-Zellen gegenüber unbehandelten Ohren. Hierbei konnten wir feststellen, dass es unerheblich ist, welche der einzelnen dDC Subtypen die Fähigkeit besitzen das Antigen zu präsentieren (Abb. 10C).

Einzig bei MBMCs, in welchen die moDCs nicht dazu in der Lage waren GP₃₃₋₄₁ zu präsentieren (*Ccr2*^{-/-} X DIETER + Ly5.1 → B6), wurden geringere Zahlen an spezifischen T_{RM}-Zellen beobachtet. Dies gilt sowohl für das untersuchte Gewebe, in welchem eine Antigen Präsentation induziert wurde, als auch für die Gewebe, in welchen dies nicht der Fall war. Jedoch war die Anzahl der spezifischen T_{RM}-Zellen zwischen Ohren, in welchen das Antigen präsentiert wurde und unbehandelten Ohren, wie bei allen dDC Subtypen, um das 4-fache erhöht. Grund hierfür könnte sein, dass moDCs im *steady state* eine sehr kleine Population der dDCs darstellen (Tamoutounour et al., 2013). In Folge einer Infektion kommt es allerdings zur massiven Zunahme dieser Zellen in den entzündeten Geweben (León et al., 2007; Serbina et al., 2003). Die von uns durchgeführte Infektion der Ohren mit VV-OVA könnte zu einer massiven Einwanderung von moDCs in das infizierte Gewebe führen und somit eine Vielzahl von moDCs generieren, die Antigen präsentieren können.

Unsere Ergebnisse bezüglich der Antigen abhängigen Induktion und Retention von T_{RM}-Zellen stehen im Einklang zu den Daten von Khan et al. und Muschaweckh et al.. Khan et al. untersuchten, ob nach Infektion mit VV die Gegenwart von Antigen in nicht lymphoiden Geweben einen Effekt auf die Ausbildung von T_{RM}-Zellen hat. Dabei stellten sie fest, dass die lokale Antigen Präsentation die Bildung von T_{RM}-Zellen signifikant verbessert. Außerdem führte die Anreicherung der antigenspezifischen CD8⁺ T_{RM}-Zellen in der Haut, die sich in Folge einer VV Infektion gebildet hatten, zu einer erhöhten inflammatorischen Antwort, wenn das zuvor infizierte Gewebe zu einem späteren Zeitpunkt mit Antigen lokal herausgefordert wurde. Hieraus wurde gefolgert, dass CD8⁺ T_{RM}-Zellen eine antigenspezifische inflammatorische Immunantwort effizienter einleiten, als zirkulierende T_{CM} Zellen und, dass die lokale Präsentation von Antigen deren Entstehung begünstigt. Abschließend kamen sie zu dem Ergebnis, dass zur optimalen Ausbildung von funktionalen CD8⁺ T_{RM}-Zellen sowohl eine Rekrutierung der Zellen durch eine Entzündung in das Gewebe, als auch die nachträgliche lokale Stimulation mit Antigen benötigt wird (Khan et al., 2016). Die von Khan et al. beschriebene Funktionalität der T_{RM}-Zellen konnte bei den in unserem Modell

entstandenen T_{RM} -Zellen, bedingt durch die experimentelle Prozedur, nicht geklärt werden und sind nicht Teil dieser Arbeit.

Die Untersuchungen von Muschaweckh et al. eines Infektionsmodells mit MVA Virus (einem nicht replikativen VV) besagen, dass die Produktion von Antigen während der lokalen Hautinfektion für die Rekrutierung von virusspezifischen Zellen, die zuvor adoptiv transferiert wurden, während der akuten Phase nicht benötigt wird. Dies deutet darauf hin, dass Effektor $CD8^+$ T-Zellen bei lokaler Infektion der Haut alleine durch die Inflammation zur Einwanderung gebracht werden. Experimentelle Untersuchungen zur lokalen Induktion von T_{RM} -Zellen zeigten aber, dass die Anwesenheit von Antigen in der MVA infizierten Haut zu einer effizienteren Induktion von T_{RM} -Zellen führt. Diese Ergebnisse liefern eine gut fundierte Erklärung für das vermehrte Auftreten von T_{RM} -Zellen im Bereich der vorangegangenen Infektion (Muschaweckh et al., 2016). Auch diese Erkenntnisse decken sich mit den von uns gewonnenen Daten.

Wie wichtig es ist die genauen Prozesse in der Entstehung von T_{RM} -Zellen zu verstehen, zeigte sich in einer weiteren aktuellen Studie von Park et al.. T_{RM} -Zellen, die einmal nach lokaler Reinfektion im Gewebe hervorgerufen wurden, waren nicht nur selbst dazu in der Lage die erneute Infektion effizient zu bekämpfen, sondern rekrutierten auch T_{CM} -Zellen, welche die Effizienz der Protektion steigerten. Außerdem wurde die Bildung neuer T_{RM} -Zellen beobachtet, welche jedoch nicht die bereits vorhandenen T_{RM} -Zellen ersetzen, sondern zu einer Coexistenz der bereits angesiedelten als auch neu gebildete T_{RM} -Zellen im Gewebe führte (Park et al., 2018). Somit ist davon auszugehen, dass einmal gebildete T_{RM} -Zellen zu einem dauerhaften Schutz gegen ihr Pathogen führen, ohne durch neu entstehende T_{RM} -Zellen ersetzt zu werden. Die Beibehaltung der „alten“ T_{RM} -Zellen lässt diese Population der Gedächtniszellen zu einem noch interessanteren Ziel für Impfungen gegen Pathogene, die Infektionen in nicht lymphoiden Organen hervorrufen, werden.

Zusammenfassend stehen unsere Ergebnisse bezüglich Entstehung und Beibehaltung von einer soliden T_{RM} Population im Einklang mit aktuellen Studien und lassen den Schluss zu, dass die lokale Antigen Präsentation jedes einzelnen Subtyps der dDCs zu einer effizienteren $CD8^+$ T_{RM} -Zellen Population beiträgt.

5.4 Der Einfluss der Antigen Expression in Keratinozyten auf das Priming spezifischer CD8⁺ T-Zellen sowie auf die Induktion und Beibehaltung von hautresidenten Memory CD8⁺ T-Zellen

Die oberste Schicht der Haut, die Epidermis, stellt die erste Verteidigungslinie gegen Pathogene dar. Früher wurde angenommen, dass Keratinozyten (KCs), die 95% aller epidermalen Zellen ausmachen, einzig dem Erhalt der Struktur der Epidermis durch die Produktion von Cytokeratin dienen und die physikalische Barriere gegen exogene Mikroorganismen bilden. Dies musste jedoch überdacht werden, nachdem beobachtet wurde, dass KCs Toll-like Rezeptoren (TLRs) exprimieren, eine potente Quelle für Zytokine, Chemokine und antimikrobielle Peptide sind sowie die Fähigkeit besitzen, MHC-Klasse II Antigene zu exprimieren. Allerdings ist bis heute wenig bekannt darüber, welche Rolle die epidermalen KCs bei der Aktivierung oder Suppression von T-Zell Effektor Funktionen spielen. Aktuell beschäftigen sich Untersuchungen der KCs damit, ob sie als APCs Antigene direkt an naive T-Zellen präsentieren können und so eine T-Zell Antwort einleiten oder ob eine Kreuzpräsentation der KC exprimierten Antigene durch LCs und oder dDCs hierfür erforderlich ist.

Grundsätzlich stellt sich die Frage, wo die direkte Präsentation der Antigene von KCs an naive T-Zellen stattfinden sollte. Alferink et al. konnten zeigen, dass CD8⁺ T-Zellen die einen MHC-Klasse I K^b spezifischen TCR besaßen tolerogen wurden, nachdem sie direkten Kontakt mit K^b Antigenen hatten, welche auf KCs expremiert wurden (Alferink et al., 1998). Allerdings fand der direkte Kontakt zwischen T-Zellen und Keratinozyten hauptsächlich bei neugeborenen Mäusen statt, was sich durch die starke Migrationsfähigkeit der T-Zellen durch alle Gewebe und sogar der Haut in diesem Entwicklungsstadium erklären lässt (Kimpton et al., 1995). Die Migration von T-Zellen in die gesunde adulte Haut ist jedoch massiv eingeschränkt (Mackay, 1993) und findet nur in entzündetes Gewebe statt (Hou & Doherty, 1993; Tietz et al., 1998; Wang et al., 2010). So konnte von Fan et al. gezeigt werden, dass KCs bei Entzündungen im Gewebe direkt autoreaktive CD4⁺ T-Zellen aktivieren können (Fan et al., 2003). Als Ursache hierfür vermuteten Fan et al., dass die Entzündung IL-1 und

oder TNF- α mobilisiert und dadurch die MHC Moleküle auf der Oberfläche von KCs hochreguliert werden und ihnen somit die Fähigkeit verleiht, als APCs zu fungieren. Hier wäre der Kontakt der autoreaktiven CD4⁺ T-Zellen mit KCs durch deren Einwanderung in die entzündete Haut zu erklären. Eine weitere Studie befasste sich mit der Präsentation von Antigenen wie Ovalbumin (OVA) auf KCs, was zur Proliferation OVA spezifischer CD4⁺ T-Zellen führte und die Symptome einer inflammatorischen Dermatitis hervorrief (Rosenblum et al., 2011). Allerdings wurden in diesem transgenen System die OVA Peptide auch von pAPCs in den hautdrainierenden Lymphknoten präsentiert, was es unmöglich macht zu identifizieren, welchen Beitrag die Antigen Präsentation auf KCs alleine zur resultierenden T-Zell Antwort leistet. In einer ähnlichen Studie von Kim et al. 2009 entwickelten Mäuse, die auf KCs ein Modellantigen präsentierten, eine Graft-versus-Host-Reaktion, nachdem ihnen spezifische CD8⁺ T-Zellen intradermal injiziert wurden (Kim et al., 2009). Durch die Verwendung von K14-OVA X LandDTR Tg Mäusen und beta 2-microglobulin-deficient \rightarrow K14-OVA X Lang-DTR Tg Chimären waren Kim et al. dazu in der Lage LCs als auch dDCs zu exkludieren, was zu deren Hypothese führte, dass KCs direkt naive CD8⁺ T-Zellen primen können (Kim et al., 2009). Allerdings muss bei dieser Studie beachtet werden, dass spezifische naive CD8⁺ T-Zellen intradermal appliziert wurden, was einen direkten Kontakt der KCs und T-Zellen ermöglicht, ohne dass KCs in den sdLN migrieren müssen, um dort das Antigen zu präsentieren. Eine weitere Studie beschäftigte sich mit der Frage, ob KCs in Abwesenheit von pAPCs costimulatorische Signale an naive T-Zellen präsentieren können. In in vitro Experimenten mit humanen KCs, die zuvor mit IFN- γ behandelt wurden, konnte beobachtet werden, dass die KCs dazu in der Lage waren naive T-Zellen mit Hilfe der costimulatorischen Moleküle CD58/Cd2 und CD54/LFA-1 zu aktivieren, welche in folgedessen zu Th1 und Th17 T-Zellen differenzierten (Orlik et al., 2019).

Die Ergebnisse von Henri et al. 2010 lassen wiederum vermuten, dass eine Kreuzpräsentation der Antigene die durch Keratinozyten exprimiert werden erforderlich ist, wobei LCs hier keine Rolle, sondern cDC1s die dominanten migratorischen dDCs sind (Henri et al., 2010). Dies würde generell für eine Kreuzpräsentation der cDC1s von KCs exprimierten Antigenen sprechen. Die

Kreuzpräsentation der Antigene durch cDC1s überrascht insofern, dass LCs in die KCs eingebettet sind (Kissenpfennig et al., 2005) und man davon ausging, dass migratorische LCs OVA, welches auf KCs exprimiert wurde, kreuzpräsentieren können. Durch Verwendung von Lang-DTREGFP X B6 K5.mOVA Mäusen konnte Henri et al. zeigen, dass die Depletion von LCs alleine keinen, jedoch die Depletion von LCs und cDC1s einen dramatischen Einfluss auf die Proliferation CFSE gelabelter OT-I T-Zellen hat und somit auch auf die Kreuzpräsentation von Antigenen, die ausschließlich von KCs exprimiert werden. Diese Fähigkeit der cDC1s gegenüber anderen dDCs könnte sich anhand zwei Besonderheiten dieser DC Subpopulation erklären lassen. Zum einen konnten Hildner et al. zeigen, dass *Batf3* defiziente Mäuse eine verringerte Antigen Kreuzpräsentation, eine geringere CTL Antwort gegen Virusinfektionen und eine negativ beeinträchtigte Immunantwort auf Tumorerkrankungen aufwiesen (Hildner et al., 2008). Wobei *Batf3* eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung von cDC1s spielt (Edelson et al., 2011; Tussiwand et al., 2012). Die von Hildner et al. gezeigten Daten legen nahe, dass cDC1s die einzigen effizienten kreuzpräsentierenden Zellen sind (Hildner et al., 2008). Zum anderen besitzen cDC1s in der Dermis im Vergleich zu anderen dDCs eine besondere Lokalisation. Häufig sind sie in der Nähe von Haarfollikeln zu finden (Bursch et al., 2007; Poulin et al., 2007) oder ragen in seltenen Fällen sogar in die Haarfollikel umgebende Epidermis (Bursch et al., 2007), was ihnen einen Vorteil in der Erkennung von Antigenen die auf KCs exprimiert werden, verschaffen könnte.

Um den Einfluss der Keratinozyten (KCs) auf die Aktivierung von spezifischer CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu Langerhans Zellen und dermalen dendritischen Zellen (dDCs) in unserem Modell zu untersuchen, nutzen wir K14-DIETER Mäusen. Bei Mäusen dieser Linie exprimieren die KCs nach Applikation von Tamoxifen oder 4OH-Tamoxifen (4-OHT) anstelle der CD11c^{high} Zellen (DIETER Modell) die transgenen CTL Epitope (Vasioukhin et al., 2002). Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Expression des transgenen Antigens auf Keratinozyten ein ebenso effizientes Priming spezifischer CD8⁺ T-Zellen hervorruft, wie es bei der Expression auf dDCs zu beobachten ist. Allerdings bleibt die Frage offen, ob KCs die Antigene direkt an naive T-Zellen präsentieren oder ob diese Antigene von LCs und oder dDCs an die naiven CD8⁺ T-

Zellen kreuzpräsentiert werden. Auf Grund des fehlenden direkten Kontakts zwischen KCs und T-Zellen in den von uns durchgeführten Experimenten ist davon auszugehen, dass die Kreuzpräsentation mittels LCs und oder dDCs stattfindet.

Um in unserem Modell die Möglichkeit der Kreuzpräsentation von KCs exprimierten transgenen CTL Epitopen durch LCs und cDC1s ausschließen zu können, wären Lang-DTR X K14-DIETER Mäuse von Nutzen. Durch Depletion von cDC1s und LCs oder nur LCs mittels DT Injektion könnten wir mit Hilfe dieser Tiere untersuchen, ob KCs spezifische CD8⁺ T-Zellen direkt primen können. Des Weiteren bieten sich CD11cDTR X K14-DIETER Mäuse an, bei denen nach Applikation von DT alle CD11c⁺ Zellen depletiert werden (Jung et al., 2002). Falls eine Aktivierung der spezifischen CD8⁺ T-Zellen bei LCs und cDC1s depletierten Lang-DTR X K14-DIETER Mäuse stattfindet, könnte mit Hilfe dieser Mäuse ausgeschlossen werden, dass keine andere Subpopulation der dermalen CD11c⁺ Zellen an der Kreuzpräsentation der KC exprimierten Antigene beteiligt ist. Sollte so gezeigt werden, dass KCs direkt spezifischen CD8⁺ T-Zellen primen könnten, bedarf es genaueren Untersuchungen, wie und insbesondere wo diese Aktivierung stattfindet.

Festzuhalten bleibt, dass Mäusen, welche die DIETER Antigene auf KCs exprimieren, eine vergleichbare Anzahl an spezifischen CD8⁺ T-Zellen aufwiesen, diese jedoch bei lokaler Infektion mit VV-GP₃₃₋₄₁ eine weitaus geringere Protektion zeigten. Somit ist davon auszugehen, dass die spezifischen CD8⁺ T-Zellen, die durch cross priming hervorgerufen wurden, in ihrer Funktionalität eingeschränkt sind. Eine Ursache für die fehlende Funktionalität der spezifischen CD8⁺ T-Zellen könnte eine bereits zuvor erwähnte Kreuzpräsentation der auf KCs exprimierten Antigene durch dDCs, insbesondere cDC1s, sein (Henri et al., 2010). Die Expression des Antigens auf KCs, welches dann durch aCD40 aktivierte dDCs in den sdLN an naive T-Zellen kreuzpräsentieren wird, würde die von uns beobachteten spezifischen CD8⁺ T-Zellen erklären. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass in unserem Modell in Folge der Kreuzpräsentation des Antigens durch dDCs geringere Mengen an costimulatorischen Molekülen von den dDCs produziert werden oder die dDCs beispielsweise ein verändertes Zytokinmilieu ausschütten, was letztendlich zur Funktionslosigkeit der spezifischen CD8⁺ T-Zellen führen könnte (Abb. 11).

Neben der Untersuchung des Primings von spezifischen CD8⁺ T-Zellen durch Expression der transgenen CTL Epitope auf KCs, sollte ermittelt werden, ob die lokale Expression der transgenen Antigene auf KCs ebenso effizient zur T_{RM} Differenzierung und Retention aus T_{EF}-Zellen beitragen können, wie es bei dermalen dendritischen Zellen der Fall ist.

Mackay et al. konnten zeigen, dass T_{EF}-Zellen, welche durch eine Inflammation in die Haut eingewandert sind, einen T_{RM} Phänotyp entwickelten, wobei dies nicht die Anwesenheit von lokalen Antigenen erforderte (Mackay et al., 2012). Khan et al. zeigte jedoch, dass die Anwesenheit von Antigen bei einer Infektion mit VV zu einer effizienteren T_{RM} Bildung beitrug (Khan et al., 2016) und es konnte gezeigt werden, dass die T_{RM} Bildung durch die Konkurrenz von lokalen Antigenen beeinflusst wird (Muschawekch et al., 2016).

Im Einklang mit diesen Daten konnten wir beobachten, dass die lokale Expression der transgenen Antigene auf KCs zu einer vermehrten Bildung und Beibehaltung von T_{RM}-Zellen verglichen zu Bereichen, in denen KCs diese Antigene nicht exprimieren, führte (Abb. 12). Im Verhältnis ist die lokal effizientere Bildung von T_{RM}s bei Antigen Expression auf KCs nahezu identisch zu der Expression der transgenen Antigene auf DCs. Jedoch bleibt auch hier die Frage der direkten Präsentation des Antigenes oder der Kreuzpräsentation über LCs und dDCs unbeantwortet. Durch die experimentelle Prozedur einer lokalen Infektion mit VV-OVA und der systemischen Infektion mit VV-GP₃₃₋₄₁ besteht die Möglichkeit, dass spezifische CD8⁺ T_{EF}-Zellen in die entzündeten Gewebe eingewandert sind und hier die transgenen Antigene von KCs direkt präsentiert bekamen. Die bereits beim Priming beschriebenen LangDTR X K14-DIETER Mäuse könnten auch hier bei der Klärung der Frage der direkten Antigen Präsentation der KCs oder der Kreuzpräsentation durch LCs und oder cDC1s hilfreich sein.

Park et al. zeigten, dass T_{RM}-Zellen, die einmal nach lokaler Infektion im Gewebe hervorgerufen wurden, nicht nur selbst dazu in der Lage waren, die erneute Infektion effizient zu bekämpfen, sondern auch T_{CM}-Zellen rekrutierten, welche die Effektivität der Protektion steigerten (Park et al., 2018). Diese Funktion der T_{RM}-Zellen konnte auf Grund unseres Experimenten Designs nicht untersucht werden.

Es bleibt festzuhalten, dass die Expression der transgenen CTL Epitope auf KCs zu einer Aktivierung von spezifischen CD8⁺ T-Zellen führte, die jedoch nicht protektiv gegen eine Infektion mit VV-GP₃₃₋₄₁ waren. Desweiteren haben bei lokaler Infektion KCs, die die transgenen Antigene exprimieren, einen positiven Effekt auf die Ausbildung von T_{RM}-Zellen. Die Art der Antigen Präsentation, sprich eine direkte Präsentation oder eine Kreuzpräsentation über LCs und oder dDCs, bleibt in beiden Versuchen allerdings ungeklärt.

6. Literaturverzeichnis

- Ahern, P. P., Izcue, A., Maloy, K. J., & Powrie, F. (2008). The Interleukin-23 / Interleukin-17 axis in intestinal inflammation. *Journal of Internal Medicine*, 263(6), 584–590. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2008.01950.x>
- Aki, M., Shimbara, N., Akiyama, K., Kagawa, S., Tamura, T., Tanahashi, N., ... Tanaka, K. (1994). Interferon- γ Induces Different Subunit Organizations and Functional, 269, 257–269.
- Alferink, J., Tafuri, A., Vestweber, D., Hallmann, R., Hämmerling, G. J., & Arnold, B. (1998). Control of neonatal tolerance to tissue antigens by peripheral T cell trafficking. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.282.5392.1338>
- Alvarez, D., Vollmann, E. H., & von Andrian, U. H. (2008). Mechanisms and Consequences of Dendritic Cell Migration. *Immunity*, 29(3), 325–342. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.08.006>
- Ariotti, Hogenbirk, M. A., Dijkgraaf, F. E., Visser, L. L., Hoekstra, M. E., Song, J.-Y., ... Jacobs, H. (2014). Skin-resident memory CD8⁺ T cells trigger a state of tissue-wide pathogen alert. *Science*, 346(6205), 101–105. <https://doi.org/10.1126/science.1254803>
- Ariotti, S., Beltman, J. B., Chodaczek, G., Hoekstra, M. E., van Beek, A. E., Gomez-Eerland, R., ... Schumacher, T. N. (2012). Tissue-resident memory CD8⁺ T cells continuously patrol skin epithelia to quickly recognize local antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208927109>
- Ariotti, Silvia, Hogenbirk, M. A., Dijkgraaf, F. E., Visser, L. L., Hoekstra, M. E., Song, J. Y., ... Schumacher, T. N. (2014). Skin-resident memory CD8⁺ T cells trigger a state of tissue-wide pathogen alert. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1254803>
- Bachem, A., Güttler, S., Hartung, E., Ebstein, F., Schaefer, M., Tannert, A., ... Kroczeck, R. A. (2010). Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c + CD141 + cells as homologues of mouse CD8 + dendritic cells . *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20100348>
- Bachem, A., Hartung, E., Güttler, S., Mora, A., Zhou, X., Hegemann, A., ... Kroczeck, R. A. (2012). Expression of XCR1 characterizes the Batf3-dependent lineage of dendritic cells capable of antigen cross-presentation. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00214>
- Bain, C. C., Scott, C. L., Uronen-Hansson, H., Gudjonsson, S., Jansson, O., Grip, O., ... Mowat, A. M. I. (2013). Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6C^{hi} monocyte precursors. *Mucosal Immunology*. <https://doi.org/10.1038/mi.2012.89>
- Bajaña, S., Turner, S., Paul, J., Ainsua-Enrich, E., & Kovats, S. (2016). IRF4 and IRF8 Act in CD11c⁺ Cells To Regulate Terminal Differentiation of Lung Tissue Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, 196(4), 1666–1677. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501870>

- Banchereau, J., Bazan, F., Blanchard, D., Briè, F., Galizzi, J. P., van Kooten, C., ... Saeland, S. (1994). The CD40 Antigen and its Ligand. *Annual Review of Immunology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.12.040194.004313>
- Banchereau, J., & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. [Review] [103 refs]. *Nature*, 392(6673), 245–252.
- Banchereau, Jacques, & Steinman, R. M. (1998). <Dendritic cells and the control of immunology.pdf>, 392(March), 245–252. <https://doi.org/10.1038/32588>
- Baranska, A., Shawket, A., Jouve, M., Baratin, M., Malosse, C., Voluzan, O., ... Malissen, B. (2018). Unveiling skin macrophage dynamics explains both tattoo persistence and strenuous removal. *Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20171608>
- Bedoui, S., Whitney, P. G., Waithman, J., Eidsmo, L., Wakim, L., Caminschi, I., ... Heath, W. R. (2009). Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/ni.1724>
- Bennett, C. L., Rijn, E. Van, Jung, S., Inaba, K., Steinman, R. M., & Kapsenberg, M. L. (2005). Inducible ablation of mouse Langerhans cells diminishes but fails to abrogate contact hypersensitivity, 169(4), 569–576. <https://doi.org/10.1083/jcb.200501071>
- Bevan, M. J. (1976). Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.143.5.1283>
- Bishop, G. A., Moore, C. R., Xie, P., Stunz, L. L., & Kraus, Z. J. (2007). TRAF proteins in CD40 signaling. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. https://doi.org/10.1007/978-0-387-70630-6_11
- Blachère, N. E., Darnell, R. B., & Albert, M. L. (2005). Apoptotic cells deliver processed antigen to dendritic cells for cross-presentation. *PLoS Biology*. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030185>
- Bobr, A., Olvera-Gomez, I., Igyarto, B. Z., Haley, K. M., Hogquist, K. A., & Kaplan, D. H. (2010). Acute Ablation of Langerhans Cells Enhances Skin Immune Responses. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001802>
- Boes, B. B., Hengel, H., Ruppert, T., Multhaup, G., Koszinowski, U. H., & Kloetzel, P. (1994). From the "Zentrum für Molekulare Biologie; and the r Heidelberg, 69120 Heidelberg, Germany of Virology, University of. *Pharmacia*, 179(March).
- Boring, L., Gosling, J., Chensue, S. W., Kunkel, S. L., Farese, R. V., Broxmeyer, H. E., & Charo, I. F. (1997). Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *Journal of Clinical Investigation*, 100(10), 2552–2561. <https://doi.org/10.1172/JCI119798>
- Bouso, P. (2008). T-cell activation by dendritic cells in the lymph node: Lessons from the movies. *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri2379>
- Bouvier, M., & Wiley, D. C. (1994). Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class I molecules. *Science*, 265(5170), 398–402. <https://doi.org/10.1126/science.8023162>

- Burgdorf, S., Lukacs-Kornek, V., & Kurts, C. (2006). The Mannose Receptor Mediates Uptake of Soluble but Not of Cell-Associated Antigen for Cross-Presentation. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.11.6770>
- Burnet, F. M. (1976). A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 26(2), 119–121. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/816431>
- Bursch, L. S., Wang, L., Igyarto, B., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Kaplan, D. H., & Hogquist, K. A. (2007). Identification of a novel population of Langerin + dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20071966>
- Butler, N. S., Nolz, J. C., & Harty, J. T. (2011). Immunologic considerations for generating memory CD8 T cells through vaccination. *Cellular Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01594.x>
- Calabro, S., Liu, D., Gallman, A., Nascimento, M. S. L., Yu, Z., Zhang, T. ting, ... Eisenbarth, S. C. (2016). Differential Intrasplenic Migration of Dendritic Cell Subsets Tailors Adaptive Immunity. *Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.076>
- Carbone, E., Ruggiero, G., Terrazzano, G., Palomba, C., Manzo, C., Fontana, S., ... Zappacosta, S. (1997). A new mechanism of NK cell cytotoxicity activation: The CD40-CD40 ligand interaction. *Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.185.12.2053>
- Carbone, F. R. (2015). Tissue-Resident Memory T Cells and Fixed Immune Surveillance in Nonlymphoid Organs. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500515>
- Carbone, F. R., Mackay, L. K., Heath, W. R., & Gebhardt, T. (2013). Distinct resident and recirculating memory T cell subsets in non-lymphoid tissues. *Current Opinion in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2013.05.007>
- Carpenter, A. C., & Bosselut, R. (2010). Decision checkpoints in the thymus. *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/ni.1887>
- Casey, K. A., Fraser, K. A., Schenkel, J. M., Moran, A., Abt, M. C., Beura, L. K., ... Masopust, D. (2012). Antigen-Independent Differentiation and Maintenance of Effector-like Resident Memory T Cells in Tissues. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200402>
- Caux, C. (1994). Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.180.4.1263>
- Chang-Rodriguez, S., Hoetzenecker, W., Schwärzler, C., Biedermann, T., Saeland, S., & Elbe-Bürger, A. (2005). Fetal and neonatal murine skin harbors Langerhans cell precursors. *Journal of Leukocyte Biology*. <https://doi.org/10.1189/jlb.1004584>
- Cheong, C., Matos, I., Choi, J. H., Dandamudi, D. B., Shrestha, E., Longhi, M. P., ... Steinman, R. M. (2010). Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209 + dendritic cells for immune T cell areas. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.09.039>

- Chorro, L., Sarde, A., Li, M., Woollard, K. J., Chambon, P., Malissen, B., ... Geissmann, F. (2009). Langerhans cell (LC) proliferation mediates neonatal development, homeostasis, and inflammation-associated expansion of the epidermal LC network. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(13), 3089–3100. <https://doi.org/10.1084/jem.20091586>
- Clark, R. A. (2015). Resident memory T cells in human health and disease. *Science Translational Medicine*. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3010641>
- Cohn, Z., & Steinman, R. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *J Exp Med*.
- Cooper, M. D., & Alder, M. N. (2006). The evolution of adaptive immune systems. *Cell*, 124(4), 815–822. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.001>
- Cousens, L. P., Peterson, R., Hsu, S., Dorner, A., Altman, J. D., Ahmed, R., & Biron, C. A. (2002). Two Roads Diverged: Interferon α/β - and Interleukin 12-mediated Pathways in Promoting T Cell Interferon γ Responses during Viral Infection. *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.189.8.1315>
- Crozat, K., Tamoutounour, S., Vu Manh, T.-P., Fossum, E., Luche, H., Ardouin, L., ... Dalod, M. (2011). Cutting Edge: Expression of XCR1 Defines Mouse Lymphoid-Tissue Resident and Migratory Dendritic Cells of the CD8+ Type. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101717>
- Çuburu, N., Graham, B. S., Buck, C. B., Kines, R. C., Pang, Y. Y. S., Day, P. M., ... Schiller, J. T. (2012). Intravaginal immunization with HPV vectors induces tissue-resident CD8+ T cell responses. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI63287>
- Cumberbatch, M., Bhushan, M., Dearman, R. J., Kimber, I., & Griffiths, C. E. M. (2003). IL-1 β -induced Langerhans' cell migration and TNF- α production in human skin: Regulation by lactoferrin. *Clinical and Experimental Immunology*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2003.02146.x>
- Dai, X. M., Ryan, G. R., Hapel, A. J., Dominguez, M. G., Russell, R. G., Kapp, S., ... Stanley, E. R. (2002). Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.1.111>
- David Farrar, J., Asnagli, H., & Murphy, K. M. (2002). T helper subset development: Roles of instruction, selection, and transcription. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI200215093>
- De Agüero, M. G., Vocanson, M., Hacini-Rachinel, F., Taillardet, M., Sparwasser, T., Kissenpfennig, A., ... Dubois, B. (2012). Langerhans cells protect from allergic contact dermatitis in mice by tolerizing CD8+ T cells and activating Foxp3+ regulatory T cells. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI59725>
- Den Haan, J. M. M., Lehar, S. M., & Bevan, M. J. (2000). CD8+ but not CD8- dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.192.12.1685>

- Diebold, S. S. (2009). Activation of dendritic cells by toll-like receptors and C-type lectins. *Handbook of Experimental Pharmacology*. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-71029-5-1>
- Domínguez, P. M., & Ardavín, C. (2010). Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation. *Immunological Reviews*. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2009.00876.x>
- Donaghy, H., Bosnjak, L., Harman, A. N., Marsden, V., Tyring, S. K., Meng, T.-C., & Cunningham, A. L. (2009). Role for Plasmacytoid Dendritic Cells in the Immune Control of Recurrent Human Herpes Simplex Virus Infection. *Journal of Virology*. <https://doi.org/10.1128/jvi.01578-08>
- Edelson, B. T., Bradstreet, T. R., Kc, W., Hildner, K., Herzog, J. W., Sim, J., ... Murphy, K. M. (2011). Batf3-dependent cd11b low/- peripheral dendritic cells are gm-csf-independent and are not required for th cell priming after subcutaneous immunization. *PLoS ONE*, 6(10), e25660. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025660>
- Ely, K. H., Cookenham, T., Roberts, A. D., & Woodland, D. L. (2014). Memory T Cell Populations in the Lung Airways Are Maintained by Continual Recruitment. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.1.537>
- Fan et al. (2003). Antigen presentation by keratinocytes directs autoimmune skin disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0437899100>
- Flacher, V., Tripp, C. H., Mairhofer, D. G., Steinman, R. M., Stoitzner, P., Idoyaga, J., & Romani, N. (2014). Murine Langerin+ dermal dendritic cells prime CD8+ T cells while Langerhans cells induce cross-tolerance. *EMBO Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.15252/emmm.201303283>
- Gaide, O., Emerson, R. O., Jiang, X., Gulati, N., Nizza, S., Desmarais, C., ... Kupper, T. S. (2015). Common clonal origin of central and resident memory T cells following skin immunization. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm.3860>
- Gaiser, M. R., Lämmermann, T., Feng, X., Igyarto, B. Z., Kaplan, D. H., Tessarollo, L., ... Udey, M. C. (2012). Cancer-associated epithelial cell adhesion molecule (EpCAM; CD326) enables epidermal Langerhans cell motility and migration in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117674109>
- Gallucci, S., & Matzinger, P. (2001). Danger signals: SOS to the immune system. *Current Opinion in Immunology*, 13(1), 114–119. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11154927>
- Garceau, N., Kosaka, Y., Masters, S., Hambor, J., Shinkura, R., Honjo, T., & Noelle, R. J. (2000). Lineage-restricted function of nuclear factor ??B-inducing kinase (NIK) in transducing signals via CD40. *Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.191.2.381>
- Gebhardt, T., & Mackay, L. K. (2012). Local immunity by tissue-resident CD8+ memory T cells. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00340>
- Geissmann, F., Manz, M. G., Jung, S., Sieweke, M. H., Merad, M., & Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1178331>

- Gerlini et al. (2006). Massive recruitment of type I interferon producing plasmacytoid dendritic cells in varicella skin lesions [2]. *Journal of Investigative Dermatology*. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700052>
- Gilliet, M., Cao, W., & Liu, Y. J. (2008). Plasmacytoid dendritic cells: Sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri2358>
- Gilliet, M., Conrad, C., Geiges, M., Cozzio, A., Thürlimann, W., Burg, G., ... Dummer, R. (2004). Psoriasis triggered by toll-like receptor 7 agonist imiquimod in the presence of dermal plasmacytoid dendritic cell precursors. *Archives of Dermatology*. <https://doi.org/10.1001/archderm.140.12.1490>
- Ginhoux, F., Collin, M. P., Bogunovic, M., Abel, M., Leboeuf, M., Helft, J., ... Merad, M. (2007). Blood-derived dermal langerin + dendritic cells survey the skin in the steady state. *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20071733>
- Ginhoux, F., & Williams, M. (2016). Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.024>
- Ginhoux, F., Liu, K., Helft, J., Bogunovic, M., Greter, M., Hashimoto, D., ... Merad, M. (2009). The origin and development of nonlymphoid tissue CD103 + DCs. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(13), 3115–3130. <https://doi.org/10.1084/jem.20091756>
- Ginhoux, F., Tacke, F., Angeli, V., Bogunovic, M., Loubreau, M., Dai, X. M., ... Merad, M. (2006). Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nature Immunology*, 7(3), 265–273. <https://doi.org/10.1038/ni1307>
- Girardin, S. E., Travassos, L. H., Hervé, M., Blanot, D., Boneca, I. G., Philpott, D. J., ... Mengin-Lecreulx, D. (2003). Peptidoglycan Molecular Requirements Allowing Detection by Nod1 and Nod2. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307198200>
- Grant, E. P., & Rock, K. L. (1993). Characterization of antigen-presenting cells that present exogenous antigens in association with class I MHC molecules. *Journal of Immunology*, 150(2), 438–446.
- Gratchev, A., Guillot, P., Hakiy, N., Politz, O., Orfanos, C. E., Schledzewski, K., & Goerdts, S. (2001). Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein β IG-H3. *Scandinavian Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.2001.00885.x>
- Grawunder, U., West, R. B., & Lieber, M. R. (1998). Antigen receptor gene rearrangement. *Current Opinion in Immunology*. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(98\)80246-X](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(98)80246-X)
- Gregers, T. F., Nordeng, T. W., Birkeland, H. C. G., Sandlie, I., & Bakke, O. (2003). The cytoplasmic tail of invariant chain modulates antigen processing and presentation. *European Journal of Immunology*, 33(2), 277–286. <https://doi.org/10.1002/immu.200310001>
- Groom, J. R., Richmond, J., Murooka, T. T., Sorensen, E. W., Sung, J. H., Bankert, K., ... Luster, A. D. (2012). CXCR3 Chemokine Receptor-Ligand Interactions in the Lymph Node Optimize CD4 + T Helper 1 Cell Differentiation. *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.08.016>

- Guilliams, M., Crozat, K., Henri, S., Tamoutounour, S., Grenot, P., Devilard, E., ... Malissen, B. (2010). Skin-draining lymph nodes contain dermis-derived CD103- dendritic cells that constitutively produce retinoic acid and induce Foxp3 + regulatory T cells. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-09-245274>
- Guilliams, M., Dutertre, C. A., Scott, C. L., McGovern, N., Sichien, D., Chakarov, S., ... Ginhoux, F. (2016). Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species. *Immunity*, *45*(3), 669–684. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.08.015>
- Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S. H., Onai, N., Schraml, B. U., ... Yona, S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: A unified nomenclature based on ontogeny. *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri3712>
- Gurevich, I., Feferman, T., Milo, I., Tal, O., Golani, O., Drexler, I., & Shakhar, G. (2017). Active dissemination of cellular antigens by DCs facilitates CD8+ T-cell priming in lymph nodes. *European Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.1002/eji.201747042>
- Hain, T., Melchior, F., Kamenjarin, N., Muth, S., Weslati, H., Clausen, B. E., ... Probst, H. C. (2019). Dermal CD207-Negative Migratory Dendritic Cells Are Fully Competent to Prime Protective, Skin Homing Cytotoxic T-Lymphocyte Responses. *Journal of Investigative Dermatology*, *139*(2), 422–429. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.08.022>
- Haniffa, M., Shin, A., Bigley, V., McGovern, N., Teo, P., See, P., ... Ginhoux, F. (2012). Human Tissues Contain CD141 hi Cross-Presenting Dendritic Cells with Functional Homology to Mouse CD103 + Nonlymphoid Dendritic Cells. *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.04.012>
- Hany, M., Oehen, S., Schulz, M., Hengartner, H., Mackett, M., Bishop, D. H. L., ... Zinkernagel, R. M. (1989). Anti-viral protection and prevention of lymphocytic choriomeningitis or of the local footpad swelling reaction in mice by immunization with vaccinia-recombinant virus expressing LCMV-WE nucleoprotein or glycoprotein. *European Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.1002/eji.1830190302>
- Hengartner, H., Odermat, B., Schneider, R., Schreyer, M., Wälle, G., MacDonald, H. R., & Zinkernagel, R. M. (1988). Deletion of self-reactive T cells before entry into the thymus medulla. *Nature*, *336*(6197), 388–390. <https://doi.org/10.1038/336388a0>
- Henri, S., Guilliams, M., Poulin, L. F., Tamoutounour, S., Ardouin, L., Dalod, M., & Malissen, B. (2010). Disentangling the complexity of the skin dendritic cell network. *Immunology and Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/icb.2010.34>
- Henri, S., Poulin, L. F., Tamoutounour, S., Ardouin, L., Guilliams, M., de Bovis, B., ... Malissen, B. (2010). CD207+ CD103+ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *207*(1), 189–206. <https://doi.org/10.1084/jem.20091964>
- Henri, S., Vremec, D., Kamath, A., Waithman, J., Williams, S., Benoist, C., ... Shortman, K. (2001). The Dendritic Cell Populations of Mouse Lymph Nodes. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.2.741>

- Hettinger, J., Richards, D. M., Hansson, J., Barra, M. M., Joschko, A. C., Krijgsveld, J., & Feuerer, M. (2013). Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/ni.2638>
- Heuzé, M. L., Vargas, P., Chabaud, M., Le Berre, M., Liu, Y. J., Collin, O., ... Lennon-Duménil, A. M. (2013). Migration of dendritic cells: Physical principles, molecular mechanisms, and functional implications. *Immunological Reviews*. <https://doi.org/10.1111/imr.12108>
- Hildner, K., Edelson, B. T., Purtha, W. E., Diamond, M., Matsushita, H., Kohyama, M., ... Murphy, K. M. (2008). Supporting Online Material for Batf3 Deficiency Reveals a Critical Role for CD8 α + Dendritic Cells in Cytotoxic T Cell Immunity. *Published Science*, 322(5904), 1097–1100. <https://doi.org/10.1126/science.1164206>
- Hoeffel, G., Wang, Y., Greter, M., See, P., Teo, P., Malleret, B., ... Ginhoux, F. (2012). Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac–derived macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*, 209(6), 1167–1181. <https://doi.org/10.1084/jem.20120340>
- Homey, B., Alenius, H., Müller, A., Soto, H., Bowman, E. P., Yuan, W., ... Zlotnik, A. (2002). CCL27-CCR10 interactions regulate T cell-mediated skin inflammation. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm0202-157>
- Hou, S., & Doherty, P. C. (1993). Partitioning of responder CD8+ T cells in lymph node and lung of mice with Sendai virus pneumonia by LECAM-1 and CD45RB phenotype. *Journal of Immunology*.
- Hoving, J. C., Wilson, G. J., & Brown, G. D. (2014). Signalling C-type lectin receptors, microbial recognition and immunity. *Cellular Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/cmi.12249>
- Hsieh, C.-S., DeRoos, P., Honey, K., Beers, C., & Rudensky, A. Y. (2002). A Role for Cathepsin L and Cathepsin S in Peptide Generation for MHC Class II Presentation. *The Journal of Immunology*, 168(6), 2618–2625. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.6.2618>
- Huang, F. P., Platt, N., Wykes, M., Major, J. R., Powell, T. J., Jenkins, C. D., & MacPherson, G. G. (2000). A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.191.3.435>
- Igyártó, B. Z., Haley, K., Ortner, D., Bobr, A., Gerami-Nejad, M., Edelson, B. T., ... Kaplan, D. H. (2011). Skin-Resident Murine Dendritic Cell Subsets Promote Distinct and Opposing Antigen-Specific T Helper Cell Responses. *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.06.005>
- Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/ni.3123>
- Jakubzick, C., Gautier, E. L., Gibbings, S. L., Sojka, D. K., Schlitzer, A., Johnson, T. E., ... Randolph, G. J. (2013). Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.007>
- Janeway, C. A., & Medzhitov, R. (2002). Innate Immune Recognition. *Annu. Rev. Immunol.*

- Jenkins, M. K., Ashwell, J. D., & Schwartz, R. H. (1988). Allogeneic non-T spleen cells restore the responsiveness of normal T cell clones stimulated with antigen and chemically modified antigen-presenting cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*.
- Jeske, D. J., Jarvis, J., Milstein, C., & Capra, J. D. (1984). Junctional diversity is essential to antibody activity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*.
- Jiang, X., Clark, R. A., Liu, L., Wagers, A. J., Fuhlbrigge, R. C., & Kupper, T. S. (2012). Skin infection generates non-migratory memory CD8 + T RM cells providing global skin immunity. *Nature*, 483(7388), 227–231. <https://doi.org/10.1038/nature10851>
- Joffre, O. P., Segura, E., Savina, A., & Amigorena, S. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. *Nature Reviews Immunology*, 12(8), 557–569. <https://doi.org/10.1038/nri3254>
- Jordan, V. C., & Dix, C. J. (1979). Effect of oestradiol benzoate, tamoxifen and monohydroxytamoxifen on immature rat uterine progesterone receptor synthesis and endometrial cell division. *Journal of Steroid Biochemistry*. [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(79\)90310-8](https://doi.org/10.1016/0022-4731(79)90310-8)
- Jung, S., Unutmaz, D., Wong, P., Sano, G. I., De Los Santos, K., Sparwasser, T., ... Lang, R. A. (2002). In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity*. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00365-5](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00365-5)
- Kaech, S. M., & Wherry, E. J. (2007). Heterogeneity and Cell-Fate Decisions in Effector and Memory CD8+ T Cell Differentiation during Viral Infection. *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.08.007>
- Kaech, S. M., Wherry, E. J., & Ahmed, R. (2002). Effector and memory T-cell differentiation: Implications for vaccine development. *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri778>
- Kaech, S. M., Wherry, E. J., S.M., K., E.J., W., Kaech, S. M., & Wherry, E. J. (2007). Heterogeneity and Cell-Fate Decisions in Effector and Memory CD8+ T Cell Differentiation during Viral Infection. *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.08.007>
- Kamath, A. T., Pooley, J., O'Keeffe, M. A., Vremec, D., Zhan, Y., Lew, A. M., ... Shortman, K. (2000). The Development, Maturation, and Turnover Rate of Mouse Spleen Dendritic Cell Populations. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.12.6762>
- Kamphorst, A. O., Guermonprez, P., Dudziak, D., & Nussenzweig, M. C. (2010). Route of Antigen Uptake Differentially Impacts Presentation by Dendritic Cells and Activated Monocytes. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001205>
- Kanitakis, J. (2002). Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *European Journal of Dermatology*.
- Katz SI, Tamaki K, S. D. (1979). (1979). epidermal LCs are derived from cells originating in BM.pdf, 282(November), 460324–460326.
- Kautz-Neu, K., Noordegraaf, M., Dinges, S., Bennett, C. L., John, D., Clausen, B. E., & von Stebut, E. (2011). Langerhans cells are negative regulators of the anti- Leishmania response . *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20102318>

- Kawai, T., & Akira, S. (2007). Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors. *Trends in Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.09.002>
- Kerfoot, S. M., Yaari, G., Patel, J. R., Johnson, K. L., Gonzalez, D. G., Kleinstein, S. H., & Haberman, A. M. (2011). Germinal Center B Cell and T Follicular Helper Cell Development Initiates in the Interfollicular Zone. *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.024>
- Khan, T. N., Mooster, J. L., Kilgore, A. M., Osborn, J. F., & Nolz, J. C. (2016). Local antigen in nonlymphoid tissue promotes resident memory CD8 + T cell formation during viral infection . *The Journal of Experimental Medicine*, 213(6), 951–966. <https://doi.org/10.1084/jem.20151855>
- Kim, B. S., Miyagawa, F., Cho, Y. H., Bennett, C. L., Clausen, B. E., & Katz, S. I. (2009). Keratinocytes function as accessory cells for presentation of endogenous antigen expressed in the epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.176>
- Kimpton, W. G., Washington, E. A., & Cahill, R. N. P. (1995). Virgin $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ t cells recirculate extensively through peripheral tissues and skin during normal development of the fetal immune system. *International Immunology*. <https://doi.org/10.1093/intimm/7.10.1567>
- Kingston, D., Schmid, M. A., Onai, N., Obata-Onai, A., Baumjohann, D., & Manz, M. G. (2009). The concerted action of GM-CSF and Flt3-ligand on in vivo dendritic cell homeostasis. *Blood*, 114(4), 835–843. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-206318>
- Kissenpfennig, A., Ait-Yahia, S., Clair-Moninot, V., Stossel, H., Badell, E., Bordat, Y., ... Douillard, P. (2004). Disruption of the langerin/CD207 Gene Abolishes Birbeck Granules without a Marked Loss of Langerhans Cell Function. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.25.1.88-99.2005>
- Kissenpfennig, Adrien, Ait-yahia, S., Stössel, H., Badell, E., Bordat, Y., Pooley, J. L., ... Sto, H. (2005). Disruption of the langerin / CD207 Gene Abolishes Birbeck Granules without a Marked Loss of Langerhans Cell Function Disruption of the langerin / CD207 Gene Abolishes Birbeck Granules without a Marked Loss of Langerhans Cell Function. *Journal of Biological Chemistry*, 13(5), 637–643. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.1.88>
- Kissenpfennig, Adrien, Henri, S., Dubois, B., Laplace-Builh??, C., Perrin, P., Romani, N., ... Malissen, B. (2005). Dynamics and function of langerhans cells in vivo: Dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating langerhans cells. *Immunity*, 22(5), 643–654. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.04.004>
- Kitajima, M., & Ziegler, S. F. (2013). Cutting Edge: Identification of the Thymic Stromal Lymphopoietin-Responsive Dendritic Cell Subset Critical for Initiation of Type 2 Contact Hypersensitivity. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302175>
- Klonowski, K. D., Williams, K. J., Marzo, A. L., Blair, D. A., Lingenheld, E. G., & Lefrançois, L. (2004). Dynamics of blood-borne CD8 memory T cell migration in vivo. *Immunity*, 20(5), 551–562. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(04\)00103-7](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(04)00103-7)
- Kobayashi, T., Walsh, M. C., & Choi, Y. (2004). The role of TRAF6 in signal transduction and the immune response. *Microbes and Infection*. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.09.001>

- Kolumam, G. A., Thomas, S., Thompson, L. J., Sprent, J., & Murali-Krishna, K. (2005). Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20050821>
- Kovacsovics-Bankowski, M., Clark, K., Benacerraf, B., & Rock, K. L. (1993). Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *90*(11), 4942–4946. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.11.4942>
- Kreider, T., Anthony, R. M., Urban, J. F., & Gause, W. C. (2007). Alternatively activated macrophages in helminth infections. *Current Opinion in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.07.002>
- Kubo, A., Nagao, K., & Amagai, M. (2013). 3D visualization of epidermal langerhans cells. *Methods in Molecular Biology*. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-227-8_5
- Kubo, A., Nagao, K., Yokouchi, M., Sasaki, H., & Amagai, M. (2009). External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20091527>
- Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology*. <https://doi.org/10.3109/08830185.2010.529976>
- Kumaravelu, P., Hook, L., Morrison, A. M., Ure, J., Zhao, S., Zuyev, S., ... Medvinsky, A. (2002). Quantitative developmental anatomy of definitive haematopoietic stem cells/long-term repopulating units (HSC/RUs): role of the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region and the yolk sac in colonisation of the mouse embryonic liver. *Development (Cambridge, England)*, *129*(21), 4891–4899. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12397098>
- Langerhans, P. (1868). Ueber die Nerven der menschlichen Haut. *Archiv Für Pathologische Anatomie Und Physiologie Und Für Klinische Medicin*. <https://doi.org/10.1007/bf01959006>
- Lee, M. G., Borkowski, T. A., & Udey, M. C. (1993). Regulation of expression of B7 by murine langerhans cells: A direct relationship between B7 mRNA levels and the level of surface expression of B7 by Langerhans cells. *Journal of Investigative Dermatology*. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12371712>
- Lee, Y.-T., Suarez-Ramirez, J. E., Wu, T., Redman, J. M., Bouchard, K., Hadley, G. A., & Cauley, L. S. (2011). Environmental and Antigen Receptor-Derived Signals Support Sustained Surveillance of the Lungs by Pathogen-Specific Cytotoxic T Lymphocytes. *Journal of Virology*, *85*(9), 4085–4094. <https://doi.org/10.1128/JVI.02493-10>
- León, B., Ballesteros-Tato, A., Browning, J. L., Dunn, R., Randall, T. D., & Lund, F. E. (2012). Regulation of T H2 development by CXCR5 + dendritic cells and lymphotoxin-expressing B cells. *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/ni.2309>
- León, B., López-Bravo, M., & Ardavín, C. (2007). Monocyte-Derived Dendritic Cells Formed at the Infection Site Control the Induction of Protective T Helper 1 Responses against Leishmania. *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.01.017>

- Liu, K., Waskow, C., Liu, X., Yao, K., Hoh, J., & Nussenzweig, M. (2007). Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice. *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/ni1462>
- Liu, L., Fuhlbrigge, R. C., Karibian, K., Tian, T., & Kupper, T. S. (2006). Dynamic programming of CD8+ T cell trafficking after live viral immunization. *Immunity*, 25(3), 511–520. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.06.019>
- Lo, D., Ron, Y., Sprent, J., Matis, L. A., Heckford, S. E., Longo, D. L., ... Zinkernagel, R. M. (1988). Influence of bone marrow-derived Ia-bearing cells on the selection of the T-cell repertoire. *Immunologic Research*, 336(4), 329–338. <https://doi.org/10.1007/BF02935537>
- Lucas, M., Zhang, X., Prasanna, V., & Mosser, D. M. (2005). ERK activation following macrophage FcγR ligation leads to chromatin modifications at the IL-10 locus. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*.
- Luche, H., Weber, O., Rao, T. N., Blum, C., & Fehling, H. J. (2007). Faithful activation of an extra-bright red fluorescent protein in “knock-in” Cre-reporter mice ideally suited for lineage tracing studies. *European Journal of Immunology*, 37(1), 43–53. <https://doi.org/10.1002/eji.200636745>
- Lutz, M. B., & Schuler, G. (2002). Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: Which signals induce tolerance or immunity? *Trends in Immunology*. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(02\)02281-0](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(02)02281-0)
- Lynley, A. M., & Dale, B. A. (1983). The characterization of human epidermal filaggrin. A histidine-rich, keratin filament-aggregating protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular*. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(83\)90336-9](https://doi.org/10.1016/0167-4838(83)90336-9)
- Mackarehtschian, K., Hardin, J. D., Moore, K. A., Boast, S., Goff, S. P., & Lemischka, I. R. (1995). Targeted disruption of the flk2/flt3 gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Immunity*, 3(1), 147–161. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90167-1](https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90167-1)
- Mackay, C. R. (1993). Homing of naive, memory and effector lymphocytes. *Current Opinion in Immunology*. [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(93\)90063-X](https://doi.org/10.1016/0952-7915(93)90063-X)
- Mackay, L. K., Stock, A. T., Ma, J. Z., Jones, C. M., Kent, S. J., Mueller, S. N., ... Gebhardt, T. (2012). Long-lived epithelial immunity by tissue-resident memory T (TRM) cells in the absence of persisting local antigen presentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(18), 7037–7042. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202288109>
- Mackay, Laura K., Stock, A. T., Ma, J. Z., Jones, C. M., Kent, S. J., Mueller, S. N., ... Gebhardt, T. (2012). Long-lived epithelial immunity by tissue-resident memory T (TRM) cells in the absence of persisting local antigen presentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202288109>
- Mackay, Laura K., Wynne-Jones, E., Freestone, D., Pellicci, D. G., Mielke, L. A., Newman, D. M., ... Carbone, F. R. (2015). T-box Transcription Factors Combine with the Cytokines TGF-β and IL-15 to Control Tissue-Resident Memory T Cell Fate. *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.11.008>

- Malissen, B., Tamoutounour, S., Henri, S., Tomura, M., Hata, A., Matsuoka, S., ... Malissen, B. (2014). The origins and functions of dendritic cells and macrophages in the skin. *Nature Reviews Immunology*, 14(5), 417–428. <https://doi.org/10.1038/nri3683>
- Martinon, F., Burns, K., & Tschopp, J. (2002). The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- β . *Molecular Cell*. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00599-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00599-3)
- Masopust, D, Jiang, J., Shen, H., & Lefrançois, L. (2001). Direct analysis of the dynamics of the intestinal mucosa CD8 T cell response to systemic virus infection. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*.
- Masopust, David, Choo, D., Vezys, V., Wherry, E. J., Duraiswamy, J., Akondy, R., ... Ahmed, R. (2010). Dynamic T cell migration program provides resident memory within intestinal epithelium. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(3), 553–564. <https://doi.org/10.1084/jem.20090858>
- Masopust, David, Vezys, V., Marzo, A. L., & Lefrançois, L. (2001). Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Journal of Immunology*, 192(3), 845–849. <https://doi.org/10.1126/science.1058867>
- Matloubian, M., & Cyster, J. G. (2012). Th1 Cell Induction in Lymph Nodes According to a Red-Blue Chemokine Map. *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.11.007>
- McGrath, J. A., & Uitto, J. (2010). Anatomy and Organization of Human Skin. In *Rook's Textbook of Dermatology: Eighth Edition*. <https://doi.org/10.1002/9781444317633.ch3>
- Merad, M., Ginhoux, F., & Collin, M. (2008). Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), 935–947. <https://doi.org/10.1038/nri2455>
- Merad, M., & Manz, M. G. (2009). Review article Dendritic cell homeostasis. *Cell*, 113(15), 3418–3427. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-12-180646>.The
- Merad, M., Manz, M. G., Karsunky, H., Wagers, A., Peters, W., Charo, I., ... Engleman, E. G. (2002). Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nature Immunology*, 3(12), 1135–1141. <https://doi.org/10.1038/ni852>
- Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., & Mortha, A. (2013). The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annual Review of Immunology*, 31(1), 563–604. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074950>
- Mescher, M. F., Curtsinger, J. M., Agarwal, P., Casey, K. A., Gerner, M., Hammerbeck, C. D., ... Xiao, Z. (2006). Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunological Reviews*. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00382.x>
- Metlay, J. P., Witmer-Pack, M. D., Agger, R., Crowley, M. T., Lawless, D. S., & Steinman, R. M. (1990). The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. *Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.171.5.1753>

- Mildner, A., & Jung, S. (2014). Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.04.016>
- Moran, A. E., Holzapfel, K. L., Xing, Y., Cunningham, N. R., Maltzman, J. S., Punt, J., ... Dlx, C. J. (2007). Immunoglobulin Somatic Hypermutation. *The Journal of Experimental Medicine*, 285–291. <https://doi.org/10.1084/jem.20110308>
- Moran, A. E., Holzapfel, K. L., Xing, Y., Cunningham, N. R., Maltzman, J. S., Punt, J., & Hogquist, K. A. (2011). T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse. *The Journal of Experimental Medicine*, 208(6), 1279–1289. <https://doi.org/10.1084/jem.20110308>
- Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri2448>
- Mucida, D., Park, Y., Kim, G., Turovskaya, O., Scott, I., Kronenberg, M., & Cheroutre, H. (2007). Reciprocal T H 17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1145697>
- Murphy, T. L., Tussiwand, R., & Murphy, K. M. (2013). Specificity through cooperation: BATF-IRF interactions control immune-regulatory networks. *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri3470>
- Muschaweckh, A., Buchholz, V. R., Fellenzer, A., Hessel, C., König, P.-A., Tao, S., ... Gasteiger, G. (2016). Antigen-dependent competition shapes the local repertoire of tissue-resident memory CD8 + T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, jem.20160888. <https://doi.org/10.1084/jem.20160888>
- Muth, S., Schütze, K., Hain, T., Yagita, H., Schild, H., & Probst, H. C. (2014). A CD40/CD40L feedback loop drives the breakdown of CD8+ T-cell tolerance following depletion of suppressive CD4+ T cells. *European Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.1002/eji.201343738>
- Nagao, K., Ginhoux, F., Leitner, W. W., Motegi, S.-I., Bennett, C. L., Clausen, B. E., ... Udey, M. C. (2009). Murine epidermal Langerhans cells and langerin-expressing dermal dendritic cells are unrelated and exhibit distinct functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807126106>
- Norbury, C. C., Hewlett, L. J., Prescott, A. R., Shastri, N., & Watts, C. (1995). Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages. *Immunity*, 3(6), 783–791. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90067-5](https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90067-5)
- O'Hehir, R. E., Yssel, H., Verma, S., De Vries, J. E., Spits, H., & Lamb, J. R. (1991). Clonal analysis of differential lymphokine production in peptide and superantigen induced t cell energy. *International Immunology*. <https://doi.org/10.1093/intimm/3.8.819>

- Ochsenbein, A. F., Pinschewer, D. D., Sierro, S., Horvath, E., Hengartner, H., & Zinkernagel, R. M. (2002). Protective long-term antibody memory by antigen-driven and T help-dependent differentiation of long-lived memory B cells to short-lived plasma cells independent of secondary lymphoid organs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.230417497>
- Orkin, S. H., & Zon, L. I. (2008). Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*, *132*(4), 631–644. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.025>
- Orlik, C., Deibel, D., Küblbeck, J., Balta, E., Ganskih, S., Habicht, J., ... Samstag, Y. (2019). Keratinocytes costimulate naive human T cells via CD2: a potential target to prevent the development of proinflammatory Th1 cells in the skin. *Cellular and Molecular Immunology*, (March). <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0261-x>
- Ouchi, T., Kubo, A., Yokouchi, M., Adachi, T., Kobayashi, T., Kitashima, D. Y., ... Nagao, K. (2011). Langerhans cell antigen capture through tight junctions confers preemptive immunity in experimental staphylococcal scalded skin syndrome. *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20111718>
- Palm, N. W., Rosenstein, R. K., & Medzhitov, R. (2012). Allergic host defences. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature11047>
- Parish, I. A., & Kaech, S. M. (2009). Diversity in CD8+ T cell differentiation. *Current Opinion in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.05.008>
- Park, S. L. (2018). Local proliferation maintains a stable pool of tissue-resident memory T cells after antiviral recall responses. *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/s41590-017-0027-5>
- Park, S. L., Zaid, A., Hor, J. L., Christo, S. N., Prier, J. E., Davies, B., ... MacKay, L. K. (2018). Local proliferation maintains a stable pool of tissue-resident memory T cells after antiviral recall responses. *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/s41590-017-0027-5>
- Pascolo, S., Bervas, N., Ure, J. M., Smith, A. G., Lemonnier, F. A., & Pérarnau, B. (1997). HLA-A2.1–restricted Education and Cytolytic Activity of CD8. *Journal of Experimental Medicine*, *185*(12), 2043–2205.
- Pérarnau, B., Saron, M. F., Reina San Martin, B., Bervas, N., Ong, H., Soloski, M. J., ... Lemonnier, F. A. (1999). Single H2Kb, H2Db and double H2KbDb knockout mice: Peripheral CD8+ T cell repertoire and antilymphocytic choriomeningitis virus cytolytic responses. *European Journal of Immunology*, *29*(4), 1243–1252. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199904\)29:04<1243::AID-IMMU1243>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199904)29:04<1243::AID-IMMU1243>3.0.CO;2-A)
- Pfeifer, J. D., MJ, W., RL, R., K, F., SJ, N., & CV., H. (1993). Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature*, *361*(6410), 359–362.
- Pierre, P., & Mellman, I. (1998). Chain Proteolysis Controls MHC Class II Trafficking in Mouse Dendritic Cells. *Cell*, *93*(7), 1135–1145.

- Pinchuk, L. M., Polacino, P. S., Agy, M. B., Klaus, S. J., & Clark, E. A. (1994). The role of CD40 and CD80 accessory cell molecules in dendritic cell-dependent HIV-1 infection. *Immunity*. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(94\)90083-3](https://doi.org/10.1016/1074-7613(94)90083-3)
- Pircher, H., Moskophidis, D., Rohrer, U., Bürki, K., Hengartner, H., & Zinkernagel, R. M. (1990). Viral escape by selection of cytotoxic T cell-resistant virus variants in vivo. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/346629a0>
- Poltorak, M. P., & Schraml, B. U. (2015). Fate mapping of dendritic cells. *Frontiers in Immunology*, 6(MAY), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00199>
- Pooley, J. L., Heath, W. R., & Shortman, K. (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. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.9.5327>
- Poulin, Lionel F., Rey, Y., Uronen-Hansson, H., Schraml, B. U., Sancho, D., Murphy, K. M., ... Reis E Sousa, C. (2012). DNGR-1 is a specific and universal marker of mouse and human Batf3-dependent dendritic cells in lymphoid and nonlymphoid tissues. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-406967>
- Poulin, Lionel Franz, Henri, S., De Bovis, B., Devilard, E., Kissenpfennig, A., & Malissen, B. (2007). The dermis contains langerin+ dendritic cells that develop and function independently of epidermal Langerhans cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(13), 3119–3131. <https://doi.org/10.1084/jem.20071724>
- Poulin, Lionel Franz, Salio, M., Griessinger, E., Anjos-Afonso, F., Craciun, L., Chen, J.-L., ... Reis e Sousa, C. (2010). Characterization of human DNGR-1 + BDCA3 + leukocytes as putative equivalents of mouse CD8 α + dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20092618>
- Price, J. G., Idoyaga, J., Salmon, H., Hogstad, B., Bigarella, C. L., Ghaffari, S., ... Merad, M. (2015). CDKN1A regulates Langerhans cell survival and promotes treg cell generation upon exposure to ionizing irradiation. *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/ni.3270>
- Probst, H. C., Lagnel, J., Kollias, G., Broek, M. Van Den, & Zu, C.-. (2003). Resting Dendritic Cells as Potent Inducers of CD8 γ T Cell Tolerance, 18, 713–720.
- Pulendran, B., Tang, H., & Manicassamy, S. (2010). Programming dendritic cells to induce T H 2 and tolerogenic responses. *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/ni.1894>
- Randolph, D. A., Huang, G., Carruthers, C. J. L., Bromley, L. E., & Chaplin, D. D. (1999). The role of CCR7 in T(H)1 and T(H)2 cell localization and delivery of B cell help in vivo. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.286.5447.2159>
- Ratajczak, M. Z., Janowska-Wieczorek, A., Majka, M., Kijowski, J., Baj-Krzyworzeka, M., Reza, R., ... Kowalska, M. A. (2001). Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. *Blood*, 98(10), 3143–3149.

- Ray, S. J., Franki, S. N., Pierce, R. H., Dimitrova, S., Koteliansky, V., Sprague, A. G., ... Topham, D. J. (2004). The Collagen Binding $\alpha 1\beta 1$ Integrin VLA-1 Regulates CD8 T Cell-Mediated Immune Protection against Heterologous Influenza Infection. *Immunity*. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(04\)00021-4](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(04)00021-4)
- Reading, P. C., Eidsmo, L., Wakim, L. M., Heath, W. R., Gebhardt, T., & Carbone, F. R. (2009). Memory T cells in nonlymphoid tissue that provide enhanced local immunity during infection with herpes simplex virus. *Nature Immunology*, *10*(5), 524–530. <https://doi.org/10.1038/ni.1718>
- Reis E Sousa, C. (2004). Activation of dendritic cells: Translating innate into adaptive immunity. *Current Opinion in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2003.11.007>
- Reuter, A., Panozza, S. E., Macri, C., Dumont, C., Li, J., Liu, H., ... Mintern, J. D. (2015). Criteria for Dendritic Cell Receptor Selection for Efficient Antibody-Targeted Vaccination. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402535>
- Rice, R. H., & Green, H. (1977). The cornified envelope of terminally differentiated human epidermal keratinocytes consists of cross-linked protein. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(77\)90059-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(77)90059-9)
- Rock, K. L., Gamble, S., & Rothstein, L. (1990). Presentation of exogenous antigen with class I major histocompatibility complex molecules. *Science*, *249*(4971), 918–921. <https://doi.org/10.1126/science.2392683>
- Rock, K. L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., ... Goldberg, A. L. (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*, *78*(5), 761–771. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(94\)90462-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(94)90462-6)
- Romani, N., Clausen, B. E., & Stoitzner, P. (2010). Langerhans cells and more: Langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. *Immunological Reviews*, *234*(1), 120–141. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2009.00886.x>
- Romani, N., Schuler, G., & Fritsch, P. (1986). Ontogeny of Ia-positive and Thy-1-positive leukocytes of murine epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12284135>
- Rosenblum, M. D., Gratz, I. K., Paw, J. S., Lee, K., Marshak-Rothstein, A., & Abbas, A. K. (2011). Response to self antigen imprints regulatory memory in tissues. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature10664>
- Rudensky, A. Y., Preston-Hurlburt, P., Hong, S. C., Barlow, A., & Janeway, C. A. (1991). Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature*, *353*(6345), 622–627. <https://doi.org/10.1038/353622a0>
- Rydström, A., & Wick, M. J. (2007). Monocyte Recruitment, Activation, and Function in the Gut-Associated Lymphoid Tissue during Oral Salmonella Infection. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.9.5789>

- Saenz, S. A., Taylor, B. C., & Artis, D. (2008). Welcome to the neighborhood: Epithelial cell-derived cytokines license innate and adaptive immune responses at mucosal sites. *Immunological Reviews*. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00713.x>
- Sallusto, F., & Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *The Journal of Experimental Medicine*.
- Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., & Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, *401*(6754), 708–712.
- Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., Lanzavecchia, A., Förster, R., ... Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions [see comments]. *Nature*, *401*(6754), 708–712. <https://doi.org/10.1038/44385>
- Sallusto, Federica, Geginat, J., & Lanzavecchia, A. (2004). Central Memory and Effector Memory T Cell Subsets: Function, Generation, and Maintenance. *Annual Review of Immunology*, *22*(1), 745–763. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702>
- Samira Tamoutounour, Martin Guilliams, Frédéric Montanana Sanchis, Hong Liu, Dorothea Terhorst, Camille Malosse, Emeline Pollet, Laurence Ardouin, Hervé Luche, Cindy Sanchez, Marc Dalod Bernard Malissen, and S. H. (2013). Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity*, *39*(5), 925–938. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.004>
- Satpathy, A. T., KC, W., Albring, J. C., Edelson, B. T., Kretzer, N. M., Bhattacharya, D., ... Murphy, K. M. (2012). Zbtb46 expression distinguishes classical dendritic cells and their committed progenitors from other immune lineages. *The Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20120030>
- Saveanu, L., Fruci, D., & Van Endert, P. M. (2002). Beyond the proteasome: Trimming, degradation and generation of MHC class I ligands by auxiliary proteases. *Molecular Immunology*, *39*(3–4), 203–215. [https://doi.org/10.1016/S0161-5890\(02\)00102-5](https://doi.org/10.1016/S0161-5890(02)00102-5)
- Schaupp, L., Muth, S., Rogell, L., Kofoed-Branzk, M., Melchior, F., Lienenklaus, S., ... Probst, H. C. (2020). Microbiota-Induced Type I Interferons Instruct a Poised Basal State of Dendritic Cells. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.022>
- Schenkel, J. M., Fraser, K. A., Beura, L. K., Pauken, K. E., & Masopust, D. (2015). Resident memory CD8 T cells trigger protective innate and adaptive immune responses. *Science*, *346*(6205), 98–101. <https://doi.org/10.1126/science.1254536.Resident>
- Schenkel, J. M., Fraser, K. A., Vezys, V., & Masopust, D. (2013). Sensing and alarm function of resident memory CD8+ T cells. *Nature Immunology*, *14*(5). <https://doi.org/10.1038/ni.2568>
- Schenkel, J. M., & Masopust, D. (2014). Tissue-resident memory T cells. *Immunity*, *41*(6), 886–897. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.007>

- Schildknecht, A. (2007). Priming of CD8⁺ cell responses by pathogens typically depends on CD70-mediated interactions with dendritic cells. *European Journal of Immunology*, 37(3), 716–728. <https://doi.org/10.1002/eji.200636824>
- Schlenner, S. M., Madan, V., Busch, K., Tietz, A., Läuble, C., Costa, C., ... Rodewald, H. R. (2010). Fate Mapping Reveals Separate Origins of T Cells and Myeloid Lineages in the Thymus. *Immunity*, 32(3), 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.03.005>
- Schroder, K., & Tschopp, J. (2010). The Inflammasomes. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.040>
- Sei, J. J., Haskett, S., Kaminsky, L. W., Lin, E., Truckenmiller, M. E., Bellone, C. J., ... Norbury, C. C. (2015). Peptide-MHC-I from Endogenous Antigen Outnumber Those from Exogenous Antigen, Irrespective of APC Phenotype or Activation. *PLoS Pathogens*. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004941>
- Seneschal, J., Jiang, X., & Kupper, T. S. (2014). Langerin⁺ dermal DC, but not Langerhans cells, are required for effective CD8-mediated immune responses after skin scarification with vaccinia virus. *The Journal of Investigative Dermatology*, 134(3), 686–694. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.418>
- Serbina, N. V., & Pamer, E. G. (2006). Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/ni1309>
- Serbina, N. V., Salazar-Mather, T. P., Biron, C. A., Kuziel, W. A., & Pamer, E. G. (2003). TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity*. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(03\)00171-7](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(03)00171-7)
- Seré, K., Baek, J. H., Ober-Blobbaum, J., Müller-Newen, G., Tacke, F., Yokota, Y., ... Hieronymus, T. (2012). Two Distinct Types of Langerhans Cells Populate the Skin during Steady State and Inflammation. *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.07.019>
- Shen, Z., Reznikoff, G., Dranoff, G., & Rock, K. L. (1997). Cloned dendritic cells can present exogenous antigens on both MHC class I and class II molecules. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*.
- Sheridan, B. S., Pham, Q. M., Lee, Y. T., Cauley, L. S., Puddington, L., & Lefrançois, L. (2014). Oral infection drives a distinct population of intestinal resident memory cd8⁺ t cells with enhanced protective function. *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.03.007>
- Shi, Y., Evans, J. E., & Rock, K. L. (2003). Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*, 425(6957), 516–521. <https://doi.org/10.1038/nature01991>
- Shin, H., & Wherry, E. J. (2007). CD8 T cell dysfunction during chronic viral infection. *Current Opinion in Immunology*, 19(4), 408–415. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.06.004>
- Shklovskaya, E., O'Sullivan, B. J., Ng, L. G., Roediger, B., Thomas, R., Weninger, W., ... Fazekas De St. Groth, B. (2011). Langerhans cells are precommitted to immune tolerance induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(44), 18049–18054. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110076108>

- Silberberg, I. (1973). Apposition of mononuclear cells to langerhans cells in contact allergic reactions. An ultrastructural study. *Acta Derm Venereol.*, 1–12.
- Skon, C. N., Lee, J. Y., Anderson, K. G., Masopust, D., Hogquist, K. A., & Jameson, S. C. (2013). Transcriptional downregulation of S1pr1 is required for the establishment of resident memory CD8+ T cells. *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/ni.2745>
- Smith-Garvin, J. (2009). T cell activation. *Annual Review of ...* <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132706>
- Spoerri, R., Reis e Sousa, C., Nolte, M. ., & Joffre, O. (2009). Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunological Reviews*, 227(1), 234–247. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00718.x>
- Srivastava, S., & Ernst, J. D. (2014). Cell-to-cell transfer of M. tuberculosis antigens optimizes CD4 T cell priming. *Cell Host and Microbe*, 15(6), 741–752. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.05.007>
- Steinman. (2012). Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annual Review of Immunology*. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-100311-102839>
- Steinman, R. M., & Hemmi, H. (2006). Dendritic Cells: Translating Innate to Adaptive Immunity. In *From Innate Immunity to Immunological Memory*. https://doi.org/10.1007/3-540-32636-7_2
- Steinman, Ralph M., Kaplan, G., Witmer, M. D., & Cohn, Z. A. (1979). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice: V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro*. *Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.149.1.1>
- Stoll, S., Delon, J., Brotz, T. M., & Germain, R. N. (2002). Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1071065>
- Suh, A. W., Cohen-doyle, M. F., Fruh, K., Wang, K., Per, A., Williams, D. B., ... Peterson, P. A. (1994). Processing Class I Molecules with the of MHC Interaction Associated with Antigen Processing Transporter. *Advancement Of Science*, 264(May).
- Tait Wojno, E. D., & Artis, D. (2012). Innate lymphoid cells: Balancing immunity, inflammation, and tissue repair in the intestine. *Cell Host and Microbe*. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.10.003>
- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., ... Akira, S. (1999). Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80119-3](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80119-3)
- Tamoutounour, S., Guilliams, M., MontananaSanchis, F., Liu, H., Terhorst, D., Malosse, C., ... Henri, S. (2013). Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity*, 39(5), 925–938. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.004>
- Theisen, D., & Murphy, K. (2017). The role of cDC1s in vivo: CD8 T cell priming through cross-presentation. *F1000Research*, 6(0), 98. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9997.1>

- Theofilopoulos, A. N., Baccala, R., Beutler, B., & Kono, D. H. (2005). TYPE I INTERFERONS (α/β) IN IMMUNITY AND AUTOIMMUNITY. *Annual Review of Immunology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115843>
- Théry, C., Duban, L., Segura, E., Væron, P., Lantz, O., & Amigorena, S. (2002). Indirect activation of naïve CD4⁺ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/ni854>
- Tietz, W., Allemand, Y., Borges, E., von Laer, D., Hallmann, R., Vestweber, D., & Hamann, A. (1998). CD4⁺ T cells migrate into inflamed skin only if they express ligands for E- and P-selectin. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*.
- Tomura, M., Hata, A., Matsuoka, S., Shand, F. H. W., Nakanishi, Y., Ikebuchi, R., ... Kanagawa, O. (2014). Tracking and quantification of dendritic cell migration and antigen trafficking between the skin and lymph nodes. *Scientific Reports*, 4, 6030. <https://doi.org/10.1038/srep06030>
- Townsend, A. R. M., Rothbard, J., Gotch, F. M., Bahadur, G., Wraith, D., & McMichael, A. J. (1986). The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90019-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90019-X)
- Tripp, C. H., Chang-Rodriguez, S., Stoitzner, P., Holzmann, S., Stössel, H., Douillard, P., ... Romani, N. (2004). Ontogeny of langerin/CD207 expression in the epidermis of mice. *Journal of Investigative Dermatology*, 122(3), 670–672. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.22337.x>
- Trowbridge, I. S., & Mazauskas, C. (1976). Immunological properties of murine thymus-dependent lymphocyte surface glycoproteins. *European Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.1002/eji.1830060806>
- Tussiwand, R., Lee, W. L., Murphy, T. L., Mashayekhi, M., Kc, W., Albring, J. C., ... Murphy, K. M. (2012). Compensatory dendritic cell development mediated by BATF-IRF interactions. *Nature*, 490(7421), 502–507. <https://doi.org/10.1038/nature11531>
- Valladeau, J., & Saeland, S. (2005). Cutaneous dendritic cells. *Seminars in Immunology*, 17(4), 273–283. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2005.05.009>
- van Lith, M., van Ham, M., Griekspoor, A., Tjin, E., Verwoerd, D., Calafat, J., ... Neefjes, J. (2001). Regulation of MHC Class II Antigen Presentation by Sorting of Recycling HLA-DM/DO and Class II within the Multivesicular Body. *The Journal of Immunology*, 167(2), 884–892. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.2.884>
- van Montfoort, N., Mangsbo, S. M., Camps, M. G. M., van Maren, W. W. C., Verhaart, I. E. C., Waisman, A., ... Ossendorp, F. (2012). Circulating specific antibodies enhance systemic cross-priming by delivery of complexed antigen to dendritic cells in vivo. *European Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.1002/eji.201141613>
- Vanbervliet, B., Bendriss-Vermare, N., Massacrier, C., Homey, B., De Bouteiller, O., Brière, F., ... Caux, C. (2003). The inducible CXCR3 ligands control plasmacytoid dendritic cell responsiveness to the constitutive chemokine stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)/CXCL12. *Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20020437>

- Vasioukhin, V., Degenstein, L., Wise, B., & Fuchs, E. (2002). The magical touch: Genome targeting in epidermal stem cells induced by tamoxifen application to mouse skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(15), 8551–8556. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.15.8551>
- Vermaelen, K. Y., Carro-Muino, I., Lambrecht, B. N., & Pauwels, R. A. (2001). Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes. *Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.193.1.51>
- Vestergaard, C., Bang, K., Gesser, B., Yoneyama, H., Matsushima, K., & Larsen, C. G. (2000). A Th2 chemokine, TARC, produced by keratinocytes may recruit CLA+CCR4+ lymphocytes into lesional atopic dermatitis skin. *Journal of Investigative Dermatology*. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00115.x>
- Villablanca, E. J., Russo, V., & Rodrigo Mora, J. (2008). Dendritic cell migration and lymphocyte homing imprinting. *Histology and Histopathology*. <https://doi.org/10.14670/HH-23.897>
- Von Andrian, U. H., & Mackay, C. R. (2000). T-cell function and migration: Two sides of the same coin. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJM200010053431407>
- Vremec, D., O'Keeffe, M., Hochrein, H., Fuchsberger, M., Caminschi, I., Lahoud, M., & Shortman, K. (2007). Production of interferons by dendritic cells, plasmacytoid cells, natural killer cells, and interferon-producing killer dendritic cells. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-015354>
- Wakim, & Bevan. (2011). Cross-dressed dendritic cells drive memory CD8+ T-cell activation after viral infection. *Nature*, 471(7340), 629–631. <https://doi.org/10.1038/nature09863>
- Wakim, L. M., Woodward-Davis, A., & Bevan, M. J. (2010). Memory T cells persisting within the brain after local infection show functional adaptations to their tissue of residence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(42), 17872–17879. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010201107>
- Wakim, Linda M., Gupta, N., Mintern, J. D., & Villadangos, J. A. (2013). Enhanced survival of lung tissue-resident memory CD8 + T cells during infection with influenza virus due to selective expression of IFITM3. *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/ni.2525>
- Wakim, Linda M., Waithman, J., Van Rooijen, N., Heath, W. R., & Carbone, F. R. (2008). Dendritic cell-induced memory T cell activation in nonlymphoid tissues. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1151869>
- Wang, X., Fujita, M., Prado, R., Tousson, A., Hsu, H. C., Schottelius, A., ... Edwards, C. K. (2010). Visualizing CD4 T-cell migration into inflamed skin and its inhibition by CCR4/CCR10 blockades using in vivo imaging model. *British Journal of Dermatology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2009.09552.x>
- Weaver, C. T., Hatton, R. D., Mangan, P. R., & Harrington, L. E. (2007). IL-17 Family Cytokines and the Expanding Diversity of Effector T Cell Lineages. *Annual Review of Immunology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141557>
- Weber, M., Hauschild, R., Schwarz, J., Moussion, C., De Vries, I., Legler, D. F., ... Sixt, M. (2013). Interstitial dendritic cell guidance by haptotactic chemokine gradients. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1228456>

- Werfel, T., Kirchhoff, K., Wittmann, M., Begemann, G., Kapp, A., Heidenreich, F., ... Zwirner, J. (2000). Activated Human T Lymphocytes Express a Functional C3a Receptor. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.11.6599>
- Wherry, E. J., Teichgräber, V., Becker, T. C., Masopust, D., Kaech, S. M., Antia, R., ... Ahmed, R. (2003). Lineage relationship and protective immunity of memory CD8T cell subsets. *Nature Immunology*, 4(3), 225–234. <https://doi.org/10.1038/ni889>
- Williams, A., Peh, C. A., & Elliott, T. (2002). The cell biology of MHC class I antigen presentation. *Tissue Antigens*, 59(1), 3–17. <https://doi.org/10.1034/j.1399-0039.2002.590103.x>
- Williams, M. A., & Bevan, M. J. (2007). Effector and Memory CTL Differentiation. *Annual Review of Immunology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141548>
- Witmer-Pack, M. D., Hughes, D. A., Schuler, G., Lawson, L., McWilliam, A., Inaba, K., ... Gordon, S. (1993). Identification of macrophages and dendritic cells in the osteopetrotic (op/op) mouse. *Journal of Cell Science*, 104(4), 1021–1029. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.18.8264>
- Wohn, C., Ober-Blobaum, J. L., Haak, S., Pantelyushin, S., Cheong, C., Zahner, S. P., ... Clausen, B. E. (2013). Langerin^{neg} conventional dendritic cells produce IL-23 to drive psoriatic plaque formation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307569110>
- Wollenberg, A., Wagner, M., Günther, S., Towarowski, A., Tuma, E., Moderer, M., ... Hartmann, G. (2002). Plasmacytoid dendritic cells: A new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases. *Journal of Investigative Dermatology*. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2002.19515.x>
- Wu, T., Hu, Y., Lee, Y.-T., Bouchard, K. R., Benechet, A., Khanna, K., & Cauley, L. S. (2014). Lung-resident memory CD8 T cells (T_{RM}) are indispensable for optimal cross-protection against pulmonary virus infection. *Journal of Leukocyte Biology*. <https://doi.org/10.1189/jlb.0313180>
- Yamazaki, C., Miyamoto, R., Hoshino, K., Fukuda, Y., Sasaki, I., Saito, M., ... Kaisho, T. (2010). Conservation of a chemokine system, XCR1 and its ligand, XCL1, between human and mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.06.029>
- Yang, X. O., Pappu, B. P., Nurieva, R., Akimzhanov, A., Kang, H. S., Chung, Y., ... Dong, C. (2008). T Helper 17 Lineage Differentiation Is Programmed by Orphan Nuclear Receptors ROR α and ROR γ . *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.11.016>
- Zaid, A., Mackay, L. K., Rahimpour, A., Braun, A., Veldhoen, M., Carbone, F. R., ... Mueller, S. N. (2014). Persistence of skin-resident memory T cells within an epidermal niche. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(14), 5307–5312. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322292111>
- Zammit, D. J., Turner, D. L., Klonowski, K. D., Lefrançois, L., & Cauley, L. S. (2006). Residual Antigen Presentation after Influenza Virus Infection Affects CD8 T Cell Activation and Migration. *Immunity*, 24(4), 439–449. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178059>

- Zani, I., Stephen, S., Mughal, N., Russell, D., Homer-Vanniasinkam, S., Wheatcroft, S., & Ponnambalam, S. (2015). Scavenger Receptor Structure and Function in Health and Disease. *Cells*. <https://doi.org/10.3390/cells4020178>
- Zinkernagel, R. M. (1978). On the thymus in the differentiation of "H-2 self-recognition" by T cells: evidence for dual recognition? *Journal of Experimental Medicine*, 147(3), 882–896. <https://doi.org/10.1084/jem.147.3.882>
- Zinkernagel, R. M., & Doherty, P. C. (1974). Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*, 248(5450), 701–702. <https://doi.org/10.1038/248701a0>

7. Anhang

7.1 Publikationen

Hain, Tobias, Melchior, Felix et al. 2019. "Dermal CD207-Negative Migratory Dendritic Cells Are Fully Competent to Prime Protective, Skin Homing Cytotoxic T-Lymphocyte Responses." *Journal of Investigative Dermatology* 139(2): 422–29.

Silva-Vilches, Cinthia et al. 2019. "Production of Extracellular Adenosine by CD73 + Dendritic Cells Is Crucial for Induction of Tolerance in Contact Hypersensitivity Reactions." *Journal of Investigative Dermatology* 139(3): 541-551.

Haub, Jessica et al. 2019. "Intervention of Inflammatory Monocyte Activity Limits Dermal Fibrosis." *Journal of Investigative Dermatology* 139(10): 2144-2153.

Schaupp, Laura, Muth, Sabine, Rogell, Lief et al. 2020. "Microbiota-Induced Type I Interferons Instruct a Poised Basal State of Dendritic Cells." *Cell* 181(5): 1080-1096.