

Phänotypische und funktionelle Charakterisierung XCR1-positiver dendritischer Zellen im Darm

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Martina Becker
aus Mosbach (Baden)

April 2015

Die vorliegende Arbeit wurde von Juli 2011 bis März 2015
unter der Leitung von Prof. Dr. R. A. Kroczek
in der Projektgruppe Immunologische Abwehrmechanismen
am Robert Koch-Institut, Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Richard A. Kroczek
2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am 23.06.2015

Inhaltsverzeichnis

1 Abstract/Zusammenfassung	1
1.1 Abstract.....	1
1.2 Zusammenfassung.....	3
2 Einleitung.....	5
2.1 Das Immunsystem des Gastrointestinaltrakts	5
2.2 Dendritische Zellen.....	6
2.2.1 Antigenpräsentation durch dendritische Zellen	7
2.2.2 Funktion dendritischer Zellen des Gastrointestinaltrakts.....	8
2.2.3 Klassifikation dendritischer Zellen des Gastrointestinaltrakts	9
2.2.4 XCR1-positive dendritische Zellen	11
2.3 Targeting – zielgerichtete Beladung kreuzpräsentierender cDCs	12
2.4 Ziel	13
3 Material und Methoden	15
3.1 Chemikalien und Plastikprodukte	15
3.2 Mäuse	15
3.3 Puffer	15
3.4 Tierexperimentelle Methoden	16
3.4.1 Flt3 Ligand Behandlung	16
3.4.2 LPS Behandlung.....	16
3.5 Zellbiologische Methoden.....	16
3.5.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus dem Dünndarm und den drainierenden mesenterialen Lymphknoten.....	16
3.5.2 Isolierung von Lymphozyten aus der Milz.....	17
3.5.3 Anreicherung dendritischer Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation	17
3.5.4 Magnetische Zellsortierung.....	17
3.6 Durchflusszytometrie	18
3.6.1 Färbung von Zelloberflächenantigenen	18
3.6.2 Durchflusszytometrische Analyse	18
3.6.3 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung.....	19
3.6.4 Antikörper	19
3.7 Funktionelle Analysen.....	20
3.7.1 Kreuzpräsentation löslichen Antigens durch dendritische Zellen	20
3.7.2 <i>In vivo</i> Zytotoxizität	21
3.8 Histologie	21

4 Ergebnisse	23
4.1 Der Chemokinrezeptor XCR1 ist nahezu auf allen intestinalen CD103 ⁺ CD11b ⁻ cDC exprimiert.....	23
4.2 Die Expression von XCR1 korreliert stark mit der Expression von CD8 α , Clec9A und CADM1.....	24
4.3 XCR1 weist eine deutliche Antikorrelation zu SIRP α auf.....	27
4.4 Intestinale XCR1 ⁺ cDCs sind in ihrer Entwicklung von dem Transkriptionsfaktor Batf3 abhängig.....	27
4.5 Die in Batf3-defizienten Mäusen verbleibenden XCR1 ⁺ cDCs weisen einen veränderten Phänotyp auf.....	29
4.6 Die Behandlung mit dem Wachstumsfaktor Flt3 Ligand führt zur Expansion aller – vor allem aber XCR1 ⁺ CD103 ⁻ – intestinalen cDCs.....	31
4.7 XCR1 ⁺ cDCs finden sich in den Zotten des Dünndarms und in den T-Zellzonen der Peyerschen Plaques und der MLN.....	32
4.8 Das Fehlen von XCR1 bzw. XCL1 beeinträchtigt die Zusammensetzung der intestinalen cDCs.....	33
4.9 LPS induziert die Wanderung XCR1 ⁺ Zellen von der Lamina propria des Dünndarms in die mesenterialen Lymphknoten.....	36
4.10 Das Expressionsniveau von CCR7 ist auf XCR1 ⁺ cDCs erhöht.....	38
4.11 Migratorische XCR1 ⁺ cDCs kreuzpräsentieren lösliches Antigen am besten.....	39
4.12 Die spezifische Beladung von cDCs über den Rezeptor XCR1 führt zu einer effektiven CD8 ⁺ T-Zellzytotoxizität <i>in vivo</i>	42
5 Diskussion	45
5.1 XCR1 ⁺ cDCs im Gastrointestinaltrakt.....	45
5.2 XCR1 kennzeichnet Batf3-abhängige cDCs.....	46
5.3 XCR1 ⁺ cDCs sind in der Nähe von T-Zellen lokalisiert.....	47
5.4 LPS induziert die Migration von intestinalen XCR1 ⁺ cDCs.....	48
5.5 Intestinale migratorische XCR1 ⁺ cDCs sind effektiv in der Kreuzpräsentation löslichen Antigens.....	49
5.6 Universelle Klassifikation der Subtypen konventioneller dendritischer Zellen mittels XCR1 und SIRP α	51
5.7 Zielgerichtete Beladung XCR1 ⁺ cDCs als neue Impfstrategie.....	52
6 Literaturverzeichnis	55
Abkürzungen	IX
Abbildungsverzeichnis	XI
Danksagung	XIII

Publikationen XV
Eidesstattliche Erklärung..... XVII

1 Abstract/Zusammenfassung

1.1 Abstract

Dendritic cells (DCs) continuously take up self or foreign antigens in various tissues, migrate to draining lymph nodes and present peptides of the antigens to naïve T cells, to induce their proliferation and differentiation. The gut lumen contains large amounts of foreign antigens, arising from commensal bacteria, food and sometimes from pathogenic microbiota as well. Antigen cross-presentation is a very important step in the activation of antigen-specific CD8⁺ T cells to induce immunity against intracellular pathogens but also to induce tolerance to harmless antigens like self-antigens. Discovering that XCR1⁺ conventional DCs (cDCs) of the spleen are Batf3-dependent in their development, allowed the assumption, that XCR1 is a lineage marker, which is only expressed on cross-presenting cDCs.

In the gastro-intestinal tract, the lack of lineage markers confounded the classification of cDCs and impeded a full understanding of the function and localization of cDC subsets. The present work demonstrates for the first time by phenotypical and functional analysis, that XCR1 is also a lineage marker for cross-presenting cDCs in the gastrointestinal tract, which allows a novel and consistent classification of conventional cDCs.

Thus phenotypical analysis showed for the first time, that XCR1⁺ cDCs of the lamina propria (LP) of the small intestine, the Peyer's patches (PP) and the mesenteric lymph nodes (MLN) are similar in their surface expression pattern to XCR1⁺ cDCs of the spleen, since they express CD8 α , Clec9A and CADM1 as well, but don't express SIRP α .

The analysis of Batf3-deficient mice revealed, that also intestinal XCR1⁺ cDCs selectively require the expression of the transcription factor Batf3 for their development.

The present work also identifies similarities to splenic XCR1⁺ cDCs concerning the positioning of intestinal XCR1⁺ cDCs. XCR1⁺ cDCs in PP and MLN are localized in the area of the T cell zones. In addition it was possible for the first time to show, that XCR1⁺ cDCs of the small intestine are exclusively located in the LP of the vili.

Regarding the function of XCR1⁺ cDCs this work demonstrates, that migratory XCR1⁺ cDCs of the MLN are most efficient in cross-presenting *in vivo* applied soluble antigen.

Beyond that, targeting antigen to XCR1⁺ cDCs induced an efficient CD8⁺ T cell cytotoxicity. Targeting of antigen was both with the antibody against XCR1 and the ligand XCL1 together with adjuvant highly efficient and specific. With the hereby proven efficiency of this system, together with the selective expression of XCR1 on cDCs, XCR1 turns out to be an ideal target for the development of novel vaccines.

1.2 Zusammenfassung

Dendritische Zellen (DCs) nehmen fortwährend Selbst- und Fremdantigene in verschiedenen Geweben des Körpers auf, migrieren zu den drainierenden Lymphknoten und präsentieren dort Peptide dieser Antigene naiven T-Zellen, um dadurch deren Proliferation und Differenzierung zu induzieren. Das Lumen des Darms enthält enorme Mengen an fremden Antigenen, die von kommensalen Bakterien, Nahrungsmitteln und mitunter pathogenen Mikroorganismen stammen. Die Kreuzpräsentation von Antigen ist ein wichtiger Schritt in der Aktivierung antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen zur Induktion von Immunität gegen intrazelluläre Pathogene, aber auch zur Induktion von Toleranz gegen harmlose Antigene, wie Selbstantigene. Mit der Entdeckung, dass XCR1⁺ konventionelle DCs (cDCs) in der Milz in ihrer Entwicklung von dem Transkriptionsfaktor Batf3 abhängig sind, wurde ein erster Hinweis dafür erbracht, dass es sich bei XCR1 um einen linienspezifischen Marker handelt, der nur auf kreuzpräsentierenden cDCs exprimiert wird.

Im Gastrointestinaltrakt erschwerte bisher das Fehlen linienspezifischer Marker das Treffen eindeutiger Aussagen über die Funktion sowie die Lokalisation einzelner cDC-Subtypen. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig durch phänotypische und funktionelle Analysen demonstriert werden, dass auch im Gastrointestinaltrakt XCR1 ein linienspezifischer Marker für kreuzpräsentierende cDCs darstellt, wodurch eine neue, konsistente Klassifikation konventioneller DCs möglich ist.

So zeigten die phänotypischen Analysen erstmals, dass XCR1⁺ cDCs der Lamina propria (LP) des Dünndarms, der Peyerschen Plaques (PP) und der mesenterialen Lymphknoten (MLN) in ihrem Oberflächenexpressionsprofil stark XCR1⁺ cDCs der Milz ähneln, da sie u. a. ebenfalls CD8 α , Clec9A und CADM1, jedoch kein SIRP α exprimieren.

Durch die Untersuchung Batf3-defizienter Mäuse wurde des Weiteren durch die Abwesenheit XCR1⁺ cDCs im Gastrointestinaltrakt deutlich, dass auch intestinale XCR1⁺ cDCs die Expression von Batf3 für ihre Entwicklung benötigen.

Auch hinsichtlich der Positionierung intestinaler XCR1⁺ cDCs fanden sich in der vorliegenden Arbeit Gemeinsamkeiten zu denen der Milz. So sind XCR1⁺ cDCs in den PP und den MLN im Bereich der T-Zellzonen lokalisiert. Über dies konnte hier erstmalig demonstriert werden, dass XCR1⁺ cDCs des Dünndarms ausschließlich in der LP der Zotten zu finden sind.

Bezüglich der Funktion konnte belegt werden, dass migratorische XCR1⁺ cDCs der MLN *in vivo* aufgenommenes lösliches Antigen am effektivsten kreuzpräsentieren.

Darüber hinaus induzierte die zielgerichtete Antigenbeladung XCR1⁺ cDCs eine effiziente CD8⁺ T-Zellzytotoxizität. Hierbei erwies sich die Antigenbeladung sowohl mit Hilfe des Antikörpers gegen XCR1 als auch mit dem Liganden XCL1 in Verbindung mit Adjuvans als hoch effektiv und spezifisch. Die hier belegte Effizienz des Systems, zusammen mit der selektiven Expression von XCR1 auf cDCs machen XCR1 zu einem idealen Ansatz für die Entwicklung neuartiger Impfstoffe.

2 Einleitung

Der Darm, als Teil des Gastrointestinaltrakts, ist Tag für Tag unzähligen fremden Antigenen ausgesetzt. Seine Hauptaufgabe besteht darin, Nährstoffe aus der Nahrung herauszufiltern, um die Energieversorgung des Körpers aufrecht zu erhalten. Im Lumen des Darmes finden sich jedoch neben Nahrungsmitteln auch kommensale Bakterien und mitunter pathogene Mikroorganismen. Dadurch sind effiziente Immunmechanismen unabdingbar, die einerseits schnell auf eindringende Pathogene reagieren, um sie zu eliminieren. Andererseits sollen Immunreaktionen auf Nahrungsmittelantigene und auf Antigene der kommensalen Mikrobiota unterdrückt werden (Toleranz), um eine Entzündung des Gewebes zu verhindern.

2.1 Das Immunsystem des Gastrointestinaltrakts

Zur Aufrechterhaltung der Abwehrmechanismen sowie der Toleranz sind Immunzellen über den gesamten Verdauungstrakt verteilt. Gleich am Eingang des Gastrointestinaltrakts – am Ende des Mundes – sind Immunzellen in großen Aggregaten lymphatischer Gewebe versammelt, die zusammen den Waldeyerschen Rachenring bilden (Rachen-, Tuben-, Gaumen- und Zungenmandeln). Diese Strukturen zählen zusammen mit den Peyerschen Plaques (PP) und den isolierten lymphoiden Follikeln zu den darmassoziierten lymphatischen Geweben (GALT; *gut-associated lymphoid tissues*).

Peyersche Plaques sind anatomisch unterteilte lymphatische Gebilde des Dünndarms, deren kuppelförmige Strukturen in das Lumen des Darmes ragen. Sie sind reich an keimzentrumstragenden B-Zellfollikeln mit dazwischen und darunterliegenden T-Zellzonen, den interfollikulären Zonen (IFR; *interfollicular region*). Die subepitheliale Kuppelregion (SED; *subepithelial dome*) ist hingegen ein stark heterogener Bereich, in dem sich neben T- und B-Zellen auch dendritische Zellen (DCs; *dendritic cells*) befinden (Abbildung 1).

Das follikelassoziierte Epithel (FAE) trennt lymphatische Gewebe wie Peyersche Plaques vom Darmlumen und besteht hauptsächlich aus konventionellen Darmepithelzellen (Enterozyten), die Verdauungsenzyme und Mukus sezernieren. Daneben enthält es eine kleine Anzahl an spezialisierten Epithelzellen, den M-Zellen (*microfold cells*). Diese stellen die Pforte dar, durch die Antigene aus dem Darmlumen in die Peyerschen Plaques gelangen. Des Weiteren sind zwischen den Enterozyten vereinzelt auch Lymphozyten und DCs zu finden (Abbildung 1).

Sowohl das Epithel abseits lymphatischer Organe als auch die Bindegewebsschicht unterhalb des Epithels – die Lamina propria (LP) – enthalten Effektorzellen der lokalen Immunantwort. Dabei befinden sich im Epithel hauptsächlich Lymphozyten: im Bereich des Dünndarms sind diese vorwiegend CD8⁺ T-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen. Die Lamina propria weist hingegen eine große Vielzahl an Immunzellen auf: hier finden sich neben CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen auch IgA-sezernierende Plasmazellen, Mastzellen, Makrophagen sowie DCs (Abbildung 1).

Die Peyersche Plaques sind über Lymphgefäße mit den größten Lymphknoten des Körpers verbunden, den mesenterialen Lymphknoten (MLN; *mesenteric lymph nodes*). Diese spielen

eine entscheidende Rolle in der Initiierung und Gestaltung von Immunantworten gegen intestinale Antigene.

Da der Gastrointestinaltrakt in ständigem Kontakt mit Nahrungsantigenen und einer Vielzahl kommensaler Mikroorganismen, aber auch verschiedenen Pathogenen steht, ist es wichtig, dass stetig eine Balance zwischen immunogenen und tolerogenen Immunantworten aufrecht erhalten wird. DCs nehmen dabei eine Schlüsselrolle in der Vermittlung von z. B. intestinaler Toleranz ein und gewährleisten somit, dass keine Entzündung im gesunden Darm entsteht (Scott *et al.*, 2011).

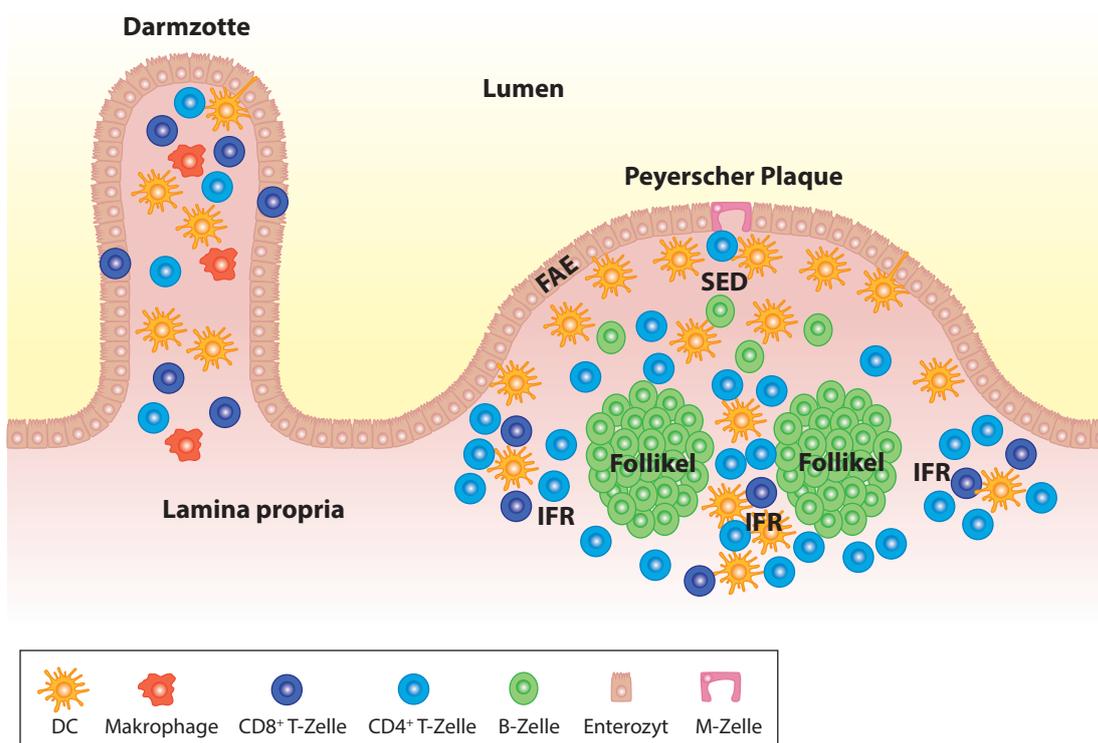


Abbildung 1 | Das Immunsystem des Darms. Eine einzelne Schicht aus Epithelzellen (Enterozyten) trennt die Lamina propria vom Inhalt des Darmlumens. Dabei finden sich innerhalb des Epithels Lymphozyten, wie CD8⁺ T-Zellen. Die Lamina propria weist hingegen neben CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen auch B-Zellen, sowie Makrophagen und DCs auf. Das follikelassoziierte Epithel (FAE) grenzt die Peyerschen Plaques vom Lumen ab und beherbergt M-Zellen. In der darunter liegenden subepithelialen Kuppelregion (SED) kommen neben DCs auch T- und B-Zellen vor. Zwischen den B-Zellfollikeln finden sich in den interfollikulären Zonen (IFR) hauptsächlich T-Zellen und einige DCs. Erstellt nach Eberl, 2005; Varol *et al.*, 2010; Muniz *et al.*, 2012.

2.2 Dendritische Zellen

DCs wurden erstmalig im Jahre 1973 beschrieben (Steinman und Cohn, 1973). Als professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APCs; *antigen presenting cells*) kommt DCs eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung des adaptiven Immunsystems zu. Zwar sind neben DCs auch Makrophagen und B-Zellen in der Lage Antigen aufzunehmen und mit Hilfe von sogenannten *pattern recognition* Rezeptoren (PRRs) den Typ der Immunantwort gegen eine Vielzahl von

Antigenen zu bestimmen. Doch DCs zeichnen sich zusätzlich durch ihre einzigartige Fähigkeit aus, primäre T-Zellantworten zu induzieren: die klonale Expansion und Differenzierung naiver T-Zellen zu Effektor-T-Zellen (Banchereau und Steinman, 1998).

Der „Aktivierungsstatus“ dendritischer Zellen entscheidet dabei darüber, ob eine effektive Immunantwort z. B. gegen Bakterien, oder eine Toleranz etwa gegenüber Nahrungsantigenen oder körpereigenen Antigenen induziert wird. Die zu den PPR gehörenden Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLRs; *Toll-like receptors*) erkennen im Falle einer Infektion pathogenassoziierte molekulare Muster und induzieren damit die Reifung von DCs. Dadurch exprimieren diese neben den pathogenen Peptiden (genauer zur Antigenpräsentation in Abschnitt 2.2.1) auch kostimulatorische Moleküle wie die Transmembranglykoproteine B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86). Die Bindung dieser kostimulatorischen Moleküle durch CD28-Moleküle auf der Oberfläche von T-Zellen führt nach dem Erkennen der pathogenen Peptide zu einem zweiten Signal (Sharpe und Freeman, 2002). Hierdurch werden naive T-Zellen aktiviert und eine adaptive Immunantwort eingeleitet.

Unreife DCs präsentieren ohne Entzündungsreiz im sogenannten Ruhezustand kontinuierlich eigene Antigene oder Antigene der Umgebung. Da hierbei keine TLRs stimuliert werden, fehlt das kostimulatorische Signal zur Entwicklung einer Immunantwort. Dadurch wird u. a. die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen induziert, die die Toleranz gegenüber dem präsentierten Antigen ermöglichen (Banchereau und Steinman, 1998).

2.2.1 Antigenpräsentation durch dendritische Zellen

Die Art und Weise, wie Antigene von DCs aufgenommen, prozessiert und schließlich präsentiert werden, bestimmt maßgeblich den Ausgang einer Immunantwort. So werden extrazelluläre Partikel mittels Phagozytose, Pinozytose oder rezeptorvermittelter Endozytose ins Zellinnere aufgenommen und in einen Prozessierungsweg eingeschleust, an dessen Ende die Präsentation des entsprechenden Antigens auf dem Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II (MHCII; *major histocompatibility complex class II*) steht. Dieser Komplex aus MHCII und präsentiertem Peptid kann von entsprechenden antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen erkannt werden, und zur Aktivierung dieser sogenannten T-Helferzellen führen (Abbildung 2, A; Villadangos, 2001; Wilson und Villadangos, 2005; Villadangos und Schnorrer, 2007). Dies resultiert wiederum in einer Aktivierung von B-Zellen und damit in der Induktion der Sezernierung von Antikörpern durch gereifte B-Zellen (Plasmazellen). Eine humorale Immunantwort ist entstanden, bei der Antikörper dazu beitragen, Pathogene aus dem Körper zu entfernen.

Intrazelluläre Antigene wie zelleigene Proteine, aber auch virale bzw. bakterielle Bestandteile, die durch eine Infektion in die APC gelangt sind, werden degradiert und die erhaltenen Peptide im Kontext von MHCI CD8⁺ T-Zellen präsentiert (Wilson und Villadangos, 2005; Villadangos und Schnorrer, 2007; Rock *et al.*, 2010). Dabei werden letztere aktiviert und differenzieren zu zytotoxischen T-Zellen, die in der Lage sind infizierte Zellen zu erkennen und zu eliminieren

(Abbildung 2, B). Die beiden beschriebenen Wege werden als klassische Antigenpräsentation bezeichnet.

Eine spezielle Form, die Mechanismen der klassischen Antigenpräsentationen vereint, nennt man Kreuzpräsentation (Bevan, 1976). In diesem Fall nehmen nicht infizierte DCs exogenes Antigen in Form von z. B. Partikeln toter infizierter Zellen auf, prozessieren diese zellgebundenen Antigene und präsentieren die entsprechenden Peptide nicht auf MHCII sondern auf MHCI. Das Erkennen dieses Komplexes durch $CD8^+$ T-Zellen führt wiederum zu deren Differenzierung in zytotoxische T-Zellen (Abbildung 2, C; Wilson und Villadangos, 2005; Villadangos und Schnorrer, 2007). Durch die Eliminierung infizierter bzw. entarteter Zellen wird die Ausbreitung des Pathogens verhindert, bzw. ein Tumorwachstum bekämpft.

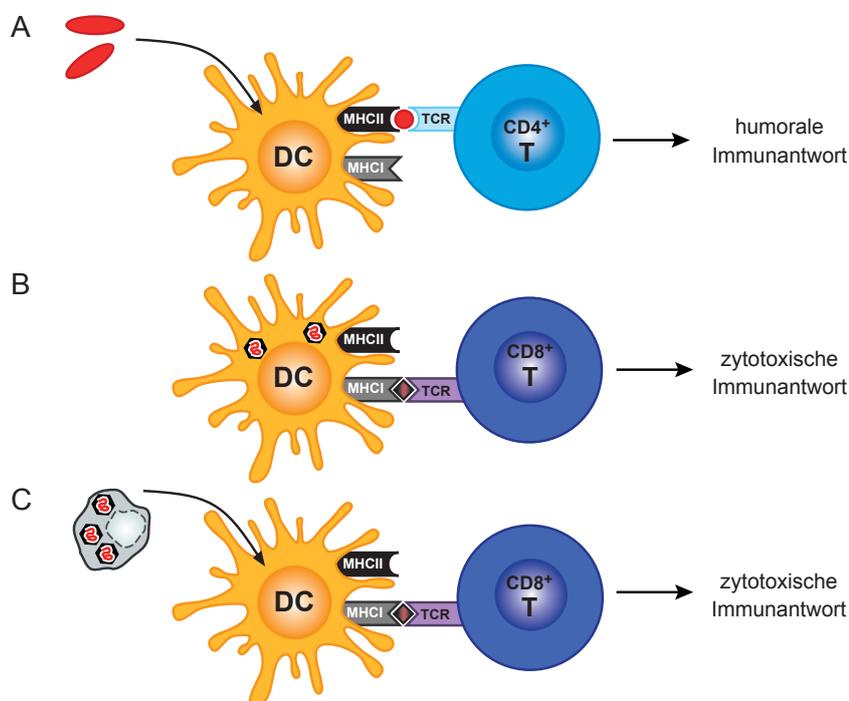


Abbildung 2 | Präsentation verschiedener Antigene durch dendritische Zellen. (A) DCs nehmen exogenes Antigen auf und präsentieren die Peptide auf MHCII an $CD4^+$ T-Zellen. Dadurch können B-Zellen zur Produktion antigenspezifischer Antikörper aktiviert werden. (B) Peptide endogener Antigene werden auf MHCI präsentiert, wo sie von $CD8^+$ T-Zellen erkannt werden. (C) Die Aufnahme exogener Antigene in Form von z. B. Partikeln infizierter toter Zellen durch DCs führt ebenfalls zur Präsentation der Peptide auf MHCI an $CD8^+$ T-Zellen. (B-C) Durch die Aktivierung antigenspezifischer $CD8^+$ T-Zellen wird eine zytotoxische Immunantwort induziert.

2.2.2 Funktion dendritischer Zellen des Gastrointestinaltrakts

Primäre T-Zellantworten gegen intestinale Antigene werden in den mesenterialen Lymphknoten und den Peyerschen Plaques generiert. Auf verschiedenen Wegen gelangen Bakterien bzw. bakterielle Bestandteile aus dem Darmlumen in Peyersche Plaques bzw. die Lamina propria und werden dort von DCs aufgenommen: z. B. Partikeltransport durch M-Zellen, Antigenaufnahme direkt aus dem Darmlumen durch Phagozyten, oder Transport von Immunglobulin-Antigen-Komplexen

durch den neonatalen Fc-Rezeptor (Schulz und Pabst, 2013). Die DCs transportieren die bakteriellen Antigene in die MLN (Macpherson und Uhr, 2004), wobei die Migration von der Expression des Chemokinrezeptors CCR7 abhängig ist (Johansson-Lindbom *et al.*, 2005; Worbs *et al.*, 2006; Jang *et al.*, 2006; Schulz *et al.*, 2009). Im MLN angekommen entscheidet der Aktivierungsstatus der DCs über das weitere Geschehen: ob eine Immunantwort gegen eindringende Pathogene erzeugt wird oder Toleranz z. B. gegenüber der kommensalen Mikrobiota entsteht (Scott *et al.*, 2011; Mann *et al.*, 2013). Durch die Produktion von Retinsäure (ein Vitamin A-Derivat) induzieren die DCs die sogenannten *gut-homing*-Fähigkeiten der T-Zellen: die Expression des Chemokinrezeptors CCR9 und des Integrins $\alpha_4\beta_7$ (Johansson-Lindbom *et al.*, 2005). Hierdurch sind die T-Zellen in der Lage, als Effektorzellen zum Darm zurückzukehren und lokale Immunantworten auszuführen.

Um Entzündungen zu vermeiden, erhalten die intestinalen DCs im Ruhezustand die Toleranz aufrecht, indem sie u. a. die Generierung von regulatorischen T-Zellen gegen Nahrungsantigene induzieren (Coombes und Powrie, 2008; Pabst und Mowat, 2012).

2.2.3 Klassifikation dendritischer Zellen des Gastrointestinaltrakts

Nach der Entdeckung der DCs stellte sich bald heraus, dass es sich hierbei um keine homogene Gruppe handelt. So teilen sich DCs zunächst in zwei große Gruppen auf, von denen sich die konventionellen DCs (cDCs; *conventional DCs*) durch ihre hohe Expression von MHCII und des Integrins CD11c von den plasmazytoiden DCs (pDCs) abgrenzen, die CD11c schwächer und zusätzlich die Tyrosinphosphatase CD45R/B220 sowie das Oberflächenglykoprotein Ly-6C exprimieren (Segura und Villadangos, 2009). Aufgrund funktioneller Unterschiede wurde klar, dass auch cDCs eine heterogene Gruppe darstellen. Obgleich DCs und somit auch cDCs seit über 40 Jahren intensiv studiert werden, gelang keine konsistente Einteilung in eindeutige cDC-Subtypen.

In lymphatischen Geweben wurden cDCs bisher anhand der Expression des CD8 α -Homodimers in CD8 α^+ cDCs und CD8 α^- cDCs unterschieden (Vremec *et al.*, 1992), wobei letztere teilweise in CD4 $^+$ und doppelt-negativ weiter unterteilt wurden (Abbildung 3; Shortman und Heath, 2010). Diese Einteilung wurde anhand funktioneller Unterschiede vorgenommen: CD8 α^+ cDCs sind im Gegensatz zu CD8 α^- cDCs in der Lage, Antigen CD8 $^+$ T-Zellen kreuzzu-präsentieren (Kurts *et al.*, 1996; den Haan, J M *et al.*, 2000; Pooley *et al.*, 2001). CD8 α^- cDCs zeigen hingegen eine bevorzugte Präsentation von löslichem Antigen an CD4 $^+$ T-Zellen (Pooley *et al.*, 2001). Neben CD8 α wurden weitere Oberflächenmoleküle, wie z. B. CD103, CD205 (DEC-205) oder Clec9A (DNGR-1) verwendet, um kreuzpräsentierende cDCs zu charakterisieren (Shortman und Heath, 2010).

In nicht-lymphatischen Geweben wie etwa der Haut oder der Lunge, in denen weder CD8 α noch CD4 detektierbar sind, erfolgte häufig eine Unterteilung der cDCs in CD103 $^+$ und CD11b $^+$ Subtypen. Aufgrund funktioneller Gemeinsamkeiten zu cDCs lymphatischer Organe,

wurden CD103⁺ cDCs oftmals als Equivalent CD8 α ⁺ cDCs gewertet (Abbildung 3; Mildner und Jung, 2014).

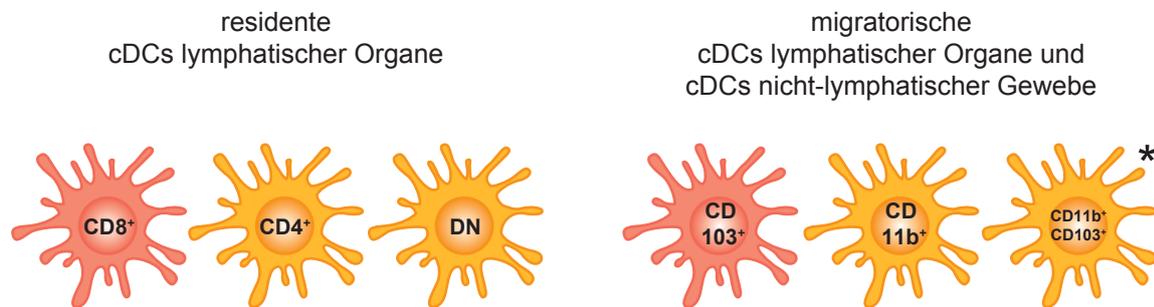


Abbildung 3 | Bisherige Klassifikation der Subtypen konventioneller dendritischer Zellen. cDCs lymphatischer Organe wurden bisher anhand der Oberflächenmoleküle CD8 α und CD4 unterteilt und cDCs nicht-lymphatischer Gewebe mittels CD103 und CD11b. Aufgrund funktioneller Gemeinsamkeiten gelten CD103⁺ cDCs peripherer Gewebe als Equivalent CD8 α ⁺ cDCs lymphatischer Organe (rot) und CD11b⁺ cDCs dementsprechend als Equivalent CD4⁺ und DN cDCs (gelb). *Vorkommen nur in wenigen Geweben belegt, wie z. B. Darm und Lunge (verändert nach Sathpathy *et al.*, 2012)

Im Gastrointestinaltrakt gestaltete sich die Einteilung der cDCs hingegen schwieriger: verschiedene Labore verwendeten bisher unterschiedliche Marker, um cDCs zu identifizieren. Einige Forschungsgruppen nutzten ausschließlich CD11c und MHCII um cDCs im Darmtrakt zu identifizieren. In der Darmmukosa finden sich jedoch neben cDCs viele weitere Zelltypen, die diese Moleküle exprimieren. Dadurch wurde z. B. über Jahre hinweg diskutiert, ob es sich bei den MHCII⁺ Zellen, die den Chemokinrezeptor CX₃CR1 exprimieren, um echte DCs handelt. Diese sind aufgrund der Expression von *tight-junction*-Proteinen in der Lage, CX₃CR1-abhängig Ausläufer durch das Epithel in das Darmlumen zu strecken (Niess *et al.*, 2005) und dadurch Salmonellen aufzunehmen, ohne die Epithelschicht zu zerstören (Rescigno *et al.*, 2001). Nachdem jedoch gezeigt werden konnte, dass diese phagozytischen Zellen von einem anderen Vorläufer ausgehen als DCs (Varol *et al.*, 2009), sie außerdem Makrophagen-ähnliche Vakuolensysteme aufweisen, sie kaum in der Lage sind naive T-Zellen zu stimulieren und sie nicht zu MLN migrieren können (Schulz *et al.*, 2009; Bogunovic *et al.*, 2009), werden sie heute im breiten Konsens zu den Makrophagen gezählt.

Darüber hinaus wurden die „cDCs“ (oftmals nur über die Expression von CD11c oder MHCII definiert) des Intestinaltraktes (LP, PP und MLN) in den verschiedenen Studien anhand ein bis zwei variierender Marker unterteilt, wie z. B. CD4, CD8 α , CD11b, CD103 oder SIRP α . Häufig untersuchte man dabei z. B. CD103⁺ im Vergleich mit CD103⁻ „cDCs“ (Johansson-Lindbom *et al.*, 2005; Jaensson *et al.*, 2008; Schulz *et al.*, 2009; Crozat *et al.*, 2011).

Einen Fortschritt in der Klassifizierung intestinaler cDC-Subtypen ergab sich durch die Einteilung anhand der zwei Integrine CD11b und CD103 (Ginhoux *et al.*, 2009; Bogunovic *et al.*, 2009; Edelson *et al.*, 2010; Cerovic *et al.*, 2013; Cerovic *et al.*, 2015). Diese Unterteilung erwies sich einerseits als vorteilhaft, da mittels CD11b und CD103 auch in anderen nicht-lymphatischen

Gewebe eine Aufschlüsselung der cDCs in zwei bis drei Subtypen möglich war (Ginhoux *et al.*, 2009). Andererseits zeigte sich damit, dass die bisweilen betrachteten Populationen nicht homogen sind. So sind beispielsweise CD103⁺ cDCs, die kein CD11b aufweisen im Gegensatz zu denen, die CD11b exprimieren in ihrer Entwicklung von den Transkriptionsfaktoren *inhibitor of DNA binding 2* (Id2), *interferon regulatory factor 8* (Irf8) und *basic leucine zipper ATF-like 3 transcription factor* (Batf3) abhängig (Bogunovic *et al.*, 2009; Edelson *et al.*, 2010); Transkriptionsfaktoren, die ebenfalls für die Entwicklung von CD8 α ⁺ cDCs der Milz benötigt werden (Hacker *et al.*, 2003; Hildner *et al.*, 2008; Edelson *et al.*, 2010).

2.2.4 XCR1-positive dendritische Zellen

Die Entdeckung, dass der Chemokinrezeptor XCR1 selektiv auf CD8 α ⁺ cDCs und einem kleinen Teil CD8 α ⁻ cDCs in der Milz, sowie auf CD8 α -ähnlichen cDCs peripherer Organe exprimiert wird (Dorner *et al.*, 2009; Crozat *et al.*, 2011; Bachem *et al.*, 2012), ermöglichte eine detailliertere Einteilung von cDCs. Bislang wurde angenommen, dass alle CD8 α ⁺ cDCs Batf3-abhängig seien und Antigen kreuzpräsentieren können (Hildner *et al.*, 2008). Es konnte jedoch in der Milz demonstriert werden, dass ausschließlich XCR1⁺ cDCs – unabhängig von ihrer CD8 α -Expression – Batf3-abhängig und zur Antigenkreuzpräsentation befähigt sind (Bachem *et al.*, 2012). Darüber hinaus zeigte sich in der murinen Milz, dass vor allem XCR1⁺ cDCs durch die Behandlung mit dem Wachstumsfaktor *Fms-related tyrosine kinase 3 ligand* (Flt3 Ligand) expandieren. Des Weiteren wurde deutlich, dass XCR1⁻CD8 α ⁺ cDCs eine eigene, pDC-verwandte DC-Population darstellen, die nicht zur Kreuzpräsentation fähig sind (Bar-On *et al.*, 2010; Bachem *et al.*, 2012). Somit zeigte sich in der Milz, dass XCR1⁺ cDCs, unabhängig von der CD8 α -Expression, eine eigene Abstammungslinie darstellen. Diese Arbeiten zeigten mit XCR1 erstmalig einen linienspezifischer Marker für kreuzpräsentierende Zellen in der Milz auf, der ausschließlich auf konventionellen DCs exprimiert wird. Ob dies auch für andere Gewebe und Organe zutrifft, war jedoch unklar.

Das einzige Molekül, das an den Chemokinrezeptor XCR1 bindet ist XCL1. Dieses Chemokin gehört als alleiniger Vertreter der Gruppe der C-Chemokin-Familie an und bindet *vice versa* ausschließlich an XCR1. XCL1 wurde etwa zeitgleich von unterschiedlichen Laboren unter verschiedenen Namen identifiziert: als ATAC (*activation-induced, T cell derived and chemokine-related molecule*; Müller *et al.*, 1995), SCM-1 (*single cystein motif-1*; Yoshida *et al.*, 1995) und *lymphotactin* (Kelner *et al.*, 1994; Kennedy *et al.*, 1995). Das Chemokin wird neben NK-Zellen auch von Th1-polarisierten CD4⁺ T-Zellen, $\gamma\delta$ T-Zellen sowie aktivierten CD8⁺ T-Zellen sezerniert (Dorner *et al.*, 2002; Dorner *et al.*, 2004) und induziert die chemotaktische Migration XCR1⁺ cDCs (Dorner *et al.*, 2009). Darüber hinaus unterstützt XCL1 die Persistenz antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen und deren Kapazität zur Sekretion des Zytokins IFN γ (Dorner *et al.*, 2009), das eine entscheidende Rolle in der adaptiven Immunantwort gegen virale und bakterielle Infektionen spielt.

2.3 Targeting – zielgerichtete Beladung kreuzpräsentierender cDCs

Im Gegensatz zu dem linienspezifischen Marker XCR1, der ausschließlich auf cDCs exprimiert wird, wurden bisher Moleküle zur Charakterisierung kreuzpräsentierender cDCs verwendet, die auch auf anderen Zelltypen vorkommen. So findet sich beispielsweise Clec9A neben cDCs auch auf pDCs (Sancho *et al.*, 2008; Caminschi *et al.*, 2008), CD205 auf B-Zellen, Langerhans-Zellen sowie Epithelzellen (Kraal *et al.*, 1986; Witmer-Pack *et al.*, 1995; Inaba *et al.*, 1995) und CD103 auf T-Zellen, Makrophagen und Mastzellen (Kilshaw und Murant, 1990; Smith *et al.*, 1994; Tiisala *et al.*, 1995). Diese Moleküle wurden bisher als Zielstrukturen zur Antigenbeladung von cDCs verwendet, um eine antigenspezifische CD8⁺ T-Zellimmunantwort zu induzieren. Dabei wurde Antigen an einen Antikörper gekoppelt, der das jeweilige Oberflächenmolekül, also z. B. Clec9A, CD205 oder CD103, erkennt. So induziert die Beladung von cDCs über Clec9A neben einer zytotoxischen T-Zellantwort (Sancho *et al.*, 2008) auch eine starke humorale Immunantwort, bei der antigenspezifische Antikörper produziert werden (Caminschi *et al.*, 2008; Lahoud *et al.*, 2011). Ebenso konnte eine Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen durch die Beladung kreuzpräsentierender cDCs über CD205 (Bonifaz *et al.*, 2002; Dudziak *et al.*, 2007) und CD103 (Semmrich *et al.*, 2012) erreicht werden.

Da XCR1 nur auf cDCs exprimiert wird, hätte eine Beladung kreuzpräsentierender cDCs über XCR1 gegenüber den genannten Molekülen den Vorteil, dass somit Antigen nur von diesen Zellen aufgenommen würde und von keinem anderen Zelltyp, wie etwa B-Zellen, T-Zellen oder Makrophagen. Außerdem ermöglicht die Tatsache, dass XCL1 der einzige Ligand von XCR1 und umgekehrt XCL1 nur an XCR1 bindet, die zielgerichtete Antigenbeladung XCR1⁺ cDCs mithilfe des natürlichen Liganden XCL1.

Um eine zytotoxische Immunantwort zu induzieren, bedarf es jedoch nicht nur des Antigens, da dies alleine zu einer Toleranzsituation führt (Bonifaz *et al.*, 2002), in der nach erneuter Antigenstimulation keine Reaktion von Effektorzellen mehr hervorgerufen wird. Daher werden Adjuvanzien benötigt, die durch das Binden an PRRs, wie z. B. TLRs, die Reifung von cDCs und somit die Aktivierung von T-Zellen induzieren. Diese Adjuvanzien bestehen z. B. aus Bakterienbestandteilen wie LPS (TLR4 Ligand; Poltorak *et al.*, 1998) oder basieren auf synthetisch hergestellten TLR-Liganden wie poly I:C (TLR3 Ligand; Alexopoulou *et al.*, 2001) oder CpG ODN (TLR9 Ligand; Hemmi *et al.*, 2000).

2.4 Ziel

Die Expression von XCR1 konnte bisher auf cDCs lymphatischer Organe und einiger nicht-lymphatischer Gewebe nachgewiesen werden. In der Milz wurde gezeigt, dass XCR1 ein linienspezifischer Marker ist, der nur auf kreuzpräsentierenden cDCs exprimiert wird.

Ziel dieser Arbeit war es zu prüfen, ob XCR1 nicht nur in lymphatischen Organen wie der Milz, sondern auch in nicht-lymphatischen Geweben ein linienspezifischer Marker für kreuzpräsentierende cDCs darstellt, und somit eine konsistente Klassifizierung zu etablieren. Dazu sollten in dieser Arbeit cDCs des Gastrointestinaltrakts untersucht werden.

Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob eine zielgerichtete Antigenbeladung kreuzpräsentierender cDCs über XCR1 möglich ist, um damit eine effektive zytotoxische Immunantwort zu induzieren.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Plastikprodukte

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien der Qualität p. A. der Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Merck Chemicals (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) verwendet. Steriles Plastikeinwegmaterial wurde von Greiner GmbH (Frickenhausen), Nunc (Roskilde, Dänemark), Sarstedt (Nümbrecht) sowie BD Biosciences (Heidelberg) bezogen.

3.2 Mäuse

Weibliche C57BL/6 Mäuse, CX₃CR1^{GFP} Mäuse (Jung *et al.*, 2000; zur Verfügung gestellt von M. Gunzer, Molekulare Immunologie, Universität Magdeburg), Langerin^{EGFP} Mäuse (Kissentpennig *et al.*, 2005; zur Verfügung gestellt von P. Stoitzner, Universitätsklinik für Dermatologie und Venerologie, Innsbruck, Österreich), B6.XCR1-lacZ^{+/+} Mäuse (The Jackson Laboratories, Bar Harbor, USA), B6.XCL1^{-/-} Mäuse (Dorner *et al.*, 2009), Batf3^{-/-} Mäuse (Hildner *et al.*, 2008; zur Verfügung gestellt von H.C. Probst, Institut für Immunologie, Universität Mainz) wurden zur Zellisolation verwendet. OT-I (Hogquist *et al.*, 1994) TCR (*T cell receptor*; T-Zell-Rezeptor) transgene Mäuse wurden mit B6.PL Mäusen gekreuzt, um eine Identifikation spezifischer CD8⁺ T-Zellen über den Rezeptor CD90.1 zu ermöglichen.

C57BL/6, B6.XCR1-lacZ^{+/+} und B6.XCR1-lacZ^{+/+} Tiere wurden für histologische Analysen verwendet. Bei B6.XCR1-lacZ Mäusen wird durch einen *knock in* der bakterielle β -Galaktosidase diese unter der Kontrolle des endogenen XCR1-Promotors exprimiert (Sanes *et al.*, 1986). Die β -Galaktosidase ist in der Lage zugeführtes X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) zu Galactose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl (5-Brom-4-chlor-3-hydroxyindol) zu hydrolysieren, das dadurch vom Sauerstoff der Luft zu dem blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidiert wird.

Alle Stämme wurden mindestens 10-mal auf C57BL/6 Hintergrund zurückgekreuzt und unter speziellen pathogenfreien Bedingungen (SPF) in den Anlagen des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) gehalten. Im Alter von 8-12 Wochen wurden die Mäuse für Experimente verwendet, die in Übereinstimmung mit dem Deutschen Tierschutzgesetz (BGBl. I S. 1206, 1313; 2006) erfolgten und vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo) genehmigt waren.

3.3 Puffer

PBS: 136,89 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 1,47 mM KH₂PO₄, 8,05 mM Na₂HPO₄,
pH 7,3
Waschpuffer: PBS, 2 % FCS (wenig Endotoxin, Biochrom, Berlin), 1 mM EDTA
MACS-PBS: PBS, 0,5 % BSA (Endotoxingehalt < 1 EU/mg, PAA Laboratories, Cölbe)
FACS-PBS: PBS, 2,5 % FCS, 01 % NaN₃
ACK Puffer: 0,15 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM Na₂EDTA, pH 7,2

3.4 Tierexperimentelle Methoden

3.4.1 Flt3 Ligand Behandlung

Jeweils 1×10^6 Zellen der Flt3 Ligand-exprimierenden Zelllinie B16 (Mach *et al.*, 2000) wurden in 100 μ l PBS C57BL/6 Mäusen subcutan (s. c.) injiziert. Nach 9 d wurden die Mäuse getötet und die Zusammensetzung der cDCs in der LP und den PP des Dünndarms sowie der MLN durchflusszytometrisch analysiert.

3.4.2 LPS Behandlung

C57BL/6, B6.XCR1-lacZ^{+/+}, B6.XCR1-lacZ^{-/-} und B6.XCL1^{-/-} Mäusen wurden jeweils 30 μ g LPS in 100 μ l PBS intraperitoneal (i. p.) injiziert. 14 h später wurden die Mäuse getötet und die cDCs aus LP, PP und MLN der C57BL/6, B6.XCR1-lacZ^{+/+} und B6.XCL1^{-/-} Mäuse analysiert. Des Weiteren wurden aus C57BL/6, B6.XCR1-lacZ^{+/+} und B6.XCR1-lacZ^{-/-} Mäusen die MLN, sowie Gewebestücke aus den drei Teilen des Dünndarms (Duodenum, Jejunum und Ileum), inklusive PP, für histologische Untersuchungen entnommen.

3.5 Zellbiologische Methoden

3.5.1 Isolierung mononukleärer Zellen aus dem Dünndarm und den drainierenden mesenterialen Lymphknoten

Zur Isolierung mononukleärer Zellen aus der LP des Dünndarms, wurde der Dünndarm zunächst von Fett und PP befreit und der Länge nach aufgeschnitten. Durch mehrmaliges Waschen in Waschpuffer wurde der Darm gereinigt und anschließend in 1 cm große Stücke geschnitten. Die Gewebestücke wurden unter Zugabe von 1 mM DL-Dithiothreitol (DTT) zum Waschpuffer für 7 min bei 37°C unter ständigem Rühren inkubiert. Nach einer weiteren Inkubation unter den gleichen Bedingungen ohne DTT wurden die im Überstand befindlichen Epithelzellen verworfen, die Gewebestücke in PBS, 2 % FCS zweimal gewaschen und in kleine Stücke geschnitten. Der Verdau dieser Stücke erfolgte durch eine Inkubation bei 37°C in RPMI 1640, 2 % FCS, 500 μ g/ml Collagenase VIII und 20 μ g/ml DNase I (Roche Applied Science, Mannheim) für 30 min unter ständigem Rühren. Im Anschluss wurde die Zellsuspension unter Zugabe des Waschpuffers durch ein 70 μ m Nylon-Zellsieb gegeben.

Zur Isolierung mononukleärer Zellen aus MLN und PP wurden diese jeweils mittels Feinpinzetten zerrissen und die Gewebestücke zum Verdau bei 37°C in RPMI 1640, 2 % FCS, 500 μ g/ml Collagenase D und 20 μ g/ml DNase I (beide letzteren von Roche Applied Science, Mannheim) bei gelegentlichem Schütteln für 15 min inkubiert. Nach weiteren 5 min Inkubation unter Zugabe von 10 mM EDTA wurden die Zellen durch ein 70 μ m Nylon-Zellsieb gedrückt und mit MACS-PBS gewaschen.

3.5.2 Isolierung von Lymphozyten aus der Milz

Die Isolierung von Lymphozyten aus der Milz erfolgte durch das Zerschneiden der Milz in Stücke, gefolgt von einem Durchdrücken dieser durch ein 70 µm Nylon-Zellsieb unter Zugabe von PBS. Nach der Pelletierung der Zellen wurden die Erythrozyten durch ACK-Puffer lysiert und die Zellen nach anschließendem Waschen mit PBS in MACS-PBS aufgenommen.

3.5.3 Anreicherung dendritischer Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation

Zur Anreicherung von DCs aus den gewonnenen Zellsuspensionen von LP, PP und MLN wurden die Zellen in PBS aufgenommen und auf eine 1,073 g/ml Nycodenz-Lösung (1,077 g/ml Nycoprep, Axis-Shield, Heidelberg; 1,01 g/ml PBS, PAA Laboratories, Cölbe) geschichtet. Nach der anschließenden ungebremsten Zentrifugation (1700 g, 4 °C, 10 min) wurde die Interphase abgenommen und die Zellen mit MACS-PBS gewaschen.

3.5.4 Magnetische Zellsortierung

Die magnetische Zellsortierung (MACS; *magnetic activated cell sorting*; Miltenyi *et al.*, 1990) muriner Zellen erfolgte nach Angaben des Herstellers (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach). Zur Sortierung von DCs wurden die mittels Dichtezentrifugation angereicherten Zellen aus LP und MLN bei einer Zelldichte von 2×10^8 Zellen/ml mit optimal titrierten anti-CD11c-Magnetpartikeln (anti-CD11c MicroBeads; Miltenyi Biotec) in Anwesenheit von Fc-Block (anti-CD16/CD32; 20 µg/ml; zur Sättigung der Fc-Rezeptoren) in MACS-PBS inkubiert. Für die Anreicherung von CD8⁺ T-Zellen aus Milzen von OT-I-transgenen Mäusen wurden die Splenozyten bei einer Zelldichte von 1×10^8 Zellen/ml mit der jeweils optimalen Konzentration folgender biotinylierter monoklonaler Antikörper (mAk) in MACS-PBS inkubiert, um die entsprechenden Zellen depletieren zu können: anti-CD4 (Klon GK1.5), anti-CD11b, anti-CD11c, anti-B220, und anti-NK1.1 (Klon und Herkunft siehe unter Antikörper, Abschnitt 3.6.4). Nach anschließendem Waschen der Zellen wurden diese bei 2×10^8 Zellen/ml mit anti-Biotin-Magnetpartikeln (anti-Biotin MicroBeads; Miltenyi Biotec) unter Verwendung von Fc-Block in MACS-PBS inkubiert.

Die Separation der Zellen erfolgte, indem die Zellsuspensionen auf Säulen mit ferromagnetischen Kugeln (MACS LS Säulen; Miltenyi Biotec) gegeben wurden, die sich in einem magnetischen Feld (MidiMACS Separator; Miltenyi Biotec) befanden. Zum Erhalt CD8⁺ OT-I-Splenozyten wurde der Durchlauf der unmarkierten Zellen aufgefangen und deren Reinheit mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Zur Gewinnung der DCs aus LP und MLN wurde hingegen der Durchlauf verworfen und die markierten Zellen außerhalb des Magnetfeldes eluiert.

3.6 Durchflusszytometrie

3.6.1 Färbung von Zelloberflächenantigenen

Für die Färbung von Zelloberflächenantigenen wurden alle Schritte – sofern nicht anders angegeben – auf Eis durchgeführt. Dazu wurden jeweils 0,5 bis 5×10^6 Zellen zunächst mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Fc-Block in FACS-PBS für 5 min vorinkubiert, woraufhin eine Färbung entweder direkt mit Fluorophor-konjugierten Antikörpern oder indirekt mit Biotin- beziehungsweise DIG (Dioxigenin)-gekoppelten Antikörpern für 20 min erfolgte (mAk gegen Clec9A sowie CCR7 wurden für 30 min bei 37°C gefärbt). Die Detektion biotinylierter mAk erfolgte mit Hilfe an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppeltem Streptavidin bei einer Inkubationszeit von 5 min, wohingegen die Erkennung von DIG-gekoppelten mAk durch eine 20-minütige Inkubation der Zellen mit anti-DIG mAk ermöglicht wurde. Alle hierzu verwendeten Antikörper sind in Abschnitt 3.6.4 aufgeführt und wurden zuvor für eine optimale Signaltrennung titriert. Unspezifische Hintergrundfärbungen wurden mittels an die entsprechenden Fluorophore gekoppelte unspezifische Antikörper des gleichen Isotyps bzw. durch die alleinige Färbung mit Sekundärreagenzien (Streptavidin bzw. anti-DIG mAk) ausgeschlossen.

3.6.2 Durchflusszytometrische Analyse

Um tote Zellen von der Analyse ausschließen zu können, wurde der Fluoreszenzfarbstoff 4',6'-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI; 0,33 $\mu\text{g/ml}$; Roche Applied Science, Mannheim) unmittelbar vor der Analyse zur Zellsuspension hinzugegeben. Die Proben wurden an dem Durchflusszytometer LSRFortessa mit Hilfe der Software FACSDIVA (BD Biosciences) aufgenommen, woraufhin die Analyse der Daten mittels der Software FlowJo (Treestar, Ashland, OR, USA) erfolgte. Die Ergebnisse wurden als Histogramme oder *Contour Plots* dargestellt, wobei die Zahlen innerhalb der *Gates* dem prozentualen Anteil der darin enthaltenen Zellen entsprechen.

Die standardmäßige Eingrenzung (*Gating*; Abbildung 4) der zu analysierenden Zellen erfolgte dabei wie folgt: Eingrenzung von Leukozyten ausgehend von ihrer Größe und Granularität im Vorwärts- (FSC; *Forward Scatter*) bzw. Seitwärts-*scatter* (SSC; *Side Scatter*); Ausschluss von Dubletten anhand der Höhe (H; *height*) und Fläche (A; *area*) jeweils im Vorwärts- als auch Seitwärts-*scatter*. Im Falle von Zellen aus LP und PP wurden zusätzlich CD45-negative Zellen ausgegrenzt [dies ist bei Zellen der MLN nicht nötig, da hier beinahe alle Zellen (> 99%) CD45⁺ sind]. Tote Zellen wurden durch die Aufnahme des Farbstoffs DAPI und autofluoreszente Zellen anhand ihrer Eigenfluoreszenz ausgeschlossen. Zur Analyse von DCs wurden durch die Oberflächenmoleküle F4/80, CD3 und B220 (beide letzteren zusammen bezeichnet als linienspezifische Marker; Lin) Makrophagen, sowie T- und B-Zellen ausgegrenzt. Daran anschließend wurden in LP und PP cDCs als CD11c⁺MHCII⁺ definiert. In den MLN wurde eine weitere Unterteilung der cDCs anhand ihres MHCII-Expressionsniveaus in migratorische cDCs, die MHCII hoch (high) exprimieren (MHCII^{high}) und residente cDCs, die eine intermediäre MHCII-Expression

aufweisen (MHCII^{int}), vorgenommen (Ruedl *et al.*, 2000; Henri *et al.*, 2001). Zur Analyse von CD8⁺ OT-I T-Zellen wurden nach Ausschluss autofluoreszenter Zellen CD4⁻CD8⁺ und anschließend MHCII⁻Thy1.1⁺ Zellen eingegrenzt.

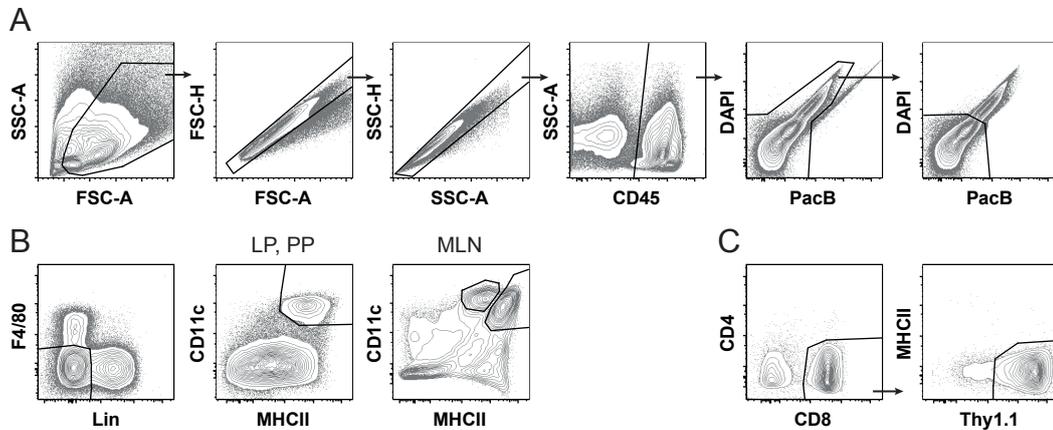


Abbildung 4 | Exemplarische Gatingstrategie zur Identifikation von cDCs und CD8⁺ OT-I T-Zellen. (A) Nach der Identifikation von Leukozyten entsprechend ihrer Größe (FSC-A) und Granularität (SSC-A) und Ausgrenzung von Dubletten (Plots 2 und 3) wurden bei Zellen aus LP und PP zusätzlich CD45⁺ Zellen definiert. In allen Fällen wurden tote (DAPI⁺) und autofluoreszente Zellen (Plots 5 und 6) ausgegrenzt. (B) Zur Identifikation von cDCs wurden daran anschließend F4/80⁻Lin⁻ Zellen eingegrenzt und daraus cDCs in LP und PP anhand der hohen Expression von CD11c und MHCII (CD11c⁺MHCII⁺) definiert. Im MLN wurden diese zusätzlich in migratorische (MHCII^{high}) und residente (MHCII^{int}) cDCs unterteilt. (C) CD8⁺ OT-I T-Zellen wurden nach Ausschluss toter und autofluoreszenter Zellen als CD4⁻CD8⁺ sowie MHCII⁻Thy1.1 (CD90.1)⁺ identifiziert.

3.6.3 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung

Durch Dichtezentrifugation und MACS angereicherte DCs aus LP und MLN wurden wie unter Abschnitt 3.6.1 beschrieben gefärbt, mit der Ausnahme, dass anstelle von FACS-PBS MACS-PBS – welches kein NaN₃ enthält – verwendet wurde. Die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS; *fluorescence-activated cell sorting*) erfolgte am FACSARIAII (BD Biosciences) mit einer 85 µm Zerstäuberdüse (*Nozzle*). Die Sortierungsstrategie folgte dabei dem in Abbildung 4 gezeigten Gatingschema zur Eingrenzung von cDCs, wobei durch die Zugabe von DAPI ebenfalls tote Zellen ausgeschlossen wurden. Daran anschließend wurden residente (MHCII^{int}) cDCs und migratorische (MHCII^{high}) cDCs des MLN, sowie cDCs der LP anhand der Oberflächenmoleküle XCR1 und CD103 zu hochreinen Populationen sortiert. Im Anschluss wurde die Reinheit der sortierten Populationen am FACSARIAII bestimmt.

3.6.4 Antikörper

Die durchflusszytometrische Analyse von Einzelzellsuspensionen erfolgte mittels monoklonaler Antikörper, welche an folgende Detektionsmoleküle gekoppelt waren: Biotin, DIG, FITC (Fluorescein Isothiocyanat), PE (Phycoerythrin), PE-Cy7 (Phycoerythrin-Cyanin Dye 7), A647 (Alexa Fluor 647), APC (Allophycocyanin), A700 (Alexa Fluor 700), APC-Cy7

(Allophycocyanin-Cyanin Dye 7), PacB (Pacific Blue), BV650 (Brilliant Violet 650) und BV785 (Brilliant Violet 785).

Monoklonale Antikörper-produzierende Hybridome gegen CD4 (Klon YTS 191.1), CD8 α (53-6.72), CD11b (5C6), CD11c (N418), CD16/32 (2.4G2), CD24 (M1/69.16.11.HL), CD45R/B220 (RA3-6B2), DCIR2 (33D1), MHCII (M5/114.15.2), NK1.1 (PK136) und anti-SIINFEKL-H-2K^b (25-D1.16) wurden von American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA) bezogen, für CD90.1 (OX-7) von European Cell Culture Collection (ECACC; Salisbury, UK). Monoklonale Antikörper gegen CD103 (M290), CD172a/SIRP α (P84) und CD11c (HL3) waren von BD Biosciences, gegen CD69 (H1.2F3), CD45 (30F11) und CCR7 (4B12) von eBioscience (San Diego, CA, USA) und gegen CD3 (17A2), F4/80 (BM8) und CD45R/B220 (RA3-6B2) von BioLegend (London, UK). Des Weiteren wurden der anti-XCR1 (MARX10; Bachem *et al.*, 2012) und anti-Clec9A/DNGR-1 (24/04-10B4; Caminschi *et al.*, 2008) Antikörper eingesetzt. Anti-CD3 (KT3) wurde großzügiger Weise durch H. Savelkoul zur Verfügung gestellt, anti-CD25 (2E4) durch E. Shevach, und anti-DEC-205 (NLDC-145, CD205) durch G. Kraal.

3.7 Funktionelle Analysen

3.7.1 Kreuzpräsentation löslichen Antigens durch dendritische Zellen

C57BL/6 Mäusen wurden jeweils 25 mg Ovalbumin (OVA) in 500 μ l PBS per Schlundsonde verabreicht. Nach 17 h wurden die Mäuse getötet und die cDCs aus MLN und LP durch Dichtezentrifugation (Abschnitt 3.5.3) und MACS (Abschnitt 3.5.4) angereichert und mittels FACS zu drei bzw. fünf hochreinen Subpopulationen sortiert (Abschnitt 3.6.3). Ruhende (CD25⁻, CD69⁻), angereicherte CD8⁺ OT-I T-Zellen (Abschnitt 3.5.4) wurden bei einer Zelldichte von 5×10^7 Zellen/ml für 15 min bei 37°C mit 5 μ M 5-(and 6)-Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) in MACS-PBS markiert. Da die Succinimidylgruppen kovalent an innere Zellmoleküle binden, bleibt der Farbstoff in der Zelle und wird bei einer Zellteilung auf die Tochterzellen aufgeteilt. Anhand des dadurch schwächer werdenden CFSE-Signals kann die Proliferation der Zellen bestimmt werden. 1×10^5 CFSE-markierte CD8⁺ OT-I T-Zellen wurden mit einer titrierten Anzahl an cDC-Subtypen (3.750 bis 30.000 cDCs) in insgesamt 200 μ l RPMI 1640, 10 % FCS, 50 μ M 2-Mercaptoethanol, 1 mM Natriumpyruvat, Nicht-essentielle Aminosäuren (*non-essential amino acids*, NEAA), 100 μ g/ml Penicillin/Streptomycin pro Vertiefung (*well*) einer 96-well Rundbodenplatte für 2,5 d kokultiviert. Die Proliferation der T-Zellen wurde anhand der CFSE-Verdünnung der CD11c⁻MHCII⁻CD90.1⁺CD8⁺ Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Als Negativkontrolle wurden T-Zellen, die nicht mit cDCs kokultiviert wurden, herangezogen. Als Positivkontrolle dienten CFSE-markierte CD8⁺ OT-I T-Zellen, kokultiviert unter den gleichen

Bedingungen mit sortierten cDCs, die mit 1 μM OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid (SIINFEKL; GenScript, Piscataway, NJ, USA) inkubiert wurden.

3.7.2 *In vivo* Zytotoxizität

C57BL/6 und B6.XCR1-lacZ^{+/+} Mäusen wurden titrierte Mengen OVA, rekombinantes XCL1-OVA (Hartung *et al.*, 2014) oder rekombinanter mAk MARX10-OVA (Hartung *et al.*, 2014) zusammen mit 3 μg LPS oder poly I:C in 200 μl PBS intravenös (i. v.) injiziert. Mäuse, die nur PBS i. v. injiziert bekamen, dienten als Kontrolle. Zur Messung der Zytotoxizität endogener CD8⁺ T-Zellen in immunisierten Mäusen wurden 6 d nach Immunisierung syngene Splenozyten unbehandelter Mäuse für 2 h bei 37°C mit 10 μM SIINFEKL in RPMI 1640, 10 % FCS beladen (Zielzellen) und ein gleicher Anteil Splenozyten bei gleichen Bedingungen ohne SIINFEKL inkubiert (Nicht-Zielzellen). Die erfolgreiche Beladung der Zielzellen wurde durchflusszytometrisch mittels des anti-SIINFEKL-H-2K^b-Antikörpers (25-D1.16) kontrolliert. Im Anschluss wurden die Zielzellen wie unter Abschnitt 3.7.1 beschrieben mit 10 μM CFSE und die Nicht-Zielzellen mit 1 μM CFSE in PBS, 0,1 % BSA markiert, wodurch anhand der Heligkeitsdifferenz eine Unterscheidung der Populationen möglich wurde. Pro immunisierte Maus wurden 1x10⁷ Zielzellen (CFSE^{high}) und 1x10⁷ Nicht-Zielzellen (CFSE^{low}; CFSE^{niedrig}) in insgesamt 200 μl PBS i. v. injiziert. 18 h später wurden die Mäuse getötet und die CFSE-markierten Zellen innerhalb der Milz mittels Durchflusszytometrie analysiert. Ausgehend von dem Verhältnis der Zielzellen zu Nicht-Zielzellen wurde die Zytotoxizität (spezifische Lyse) im Anschluss wie folgt berechnet:

$$\text{Spezifische Lyse [\%]} = 100 - \frac{\frac{\text{CFSE}^{\text{high}}}{\text{CFSE}^{\text{low}}} (\text{immunisierte Mäuse})}{\frac{\text{CFSE}^{\text{high}}}{\text{CFSE}^{\text{low}}} (\text{Kontroll-Mäuse})} \times 100$$

3.8 Histologie

Zur histologischen Analyse XCR1⁺ Zellen im Darm und den drainierenden Lymphknoten wurden homozygote und heterozygote B6.XCR1-lacZ Mäuse, sowie zur Kontrolle C57BL/6 Mäuse untersucht. Gewebestücke aus den drei Teilen des Dünndarms (Duodenum, Jejunum und Ileum) inklusive PP sowie die MLN der jeweiligen Tiere wurden entnommen, von Fäkalien und Fett befreit und für 1,5 h bei sanftem Schütteln bei 4°C in PBS, 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Danach erfolgte die Überführung in PBS, 10 % Sucrose für eine Inkubation bei sanftem Schütteln bei 4°C über Nacht. Anschließend fand eine Einbettung der Gewebe in Tissue-Tek (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, USA) statt und deren Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff, bevor sie bei -70°C gelagert wurden. Von den gefrorenen Geweben wurden am Kryostat Leica CM 1950 (Leica Biosystems, Wetzlar) 15 μm dicke

Kryostatschnitte angefertigt, auf 2 % Aminopropyltriethoxysilan-beschichtete Objektträger übertragen und bei 22°C über Nacht getrocknet. Die Schnitte wurden mit einem hydrophoben Wachsstift (ImmEdge Pen; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) umrandet und mit jeweils 100 µl X-Gal-Färbelösung [PBS, 5 mM $K_3Fe(CN)_6$, 5 mM $K_4Fe(CN)_6$, 2 mM $MgCl_2$, 0,01 % $NaC_{25}H_{39}O_4$, 0,02 % NP-40, 1 mg/ml X-Gal] benetzt. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C in einer feuchten Kammer wurden die Objektträger mit PBS gewaschen, die Schnitte für 30 sec in PBS, 0,5 % Neutralrot gegengefärbt und schließlich in Kaisers Glycerin-gelatine eingedeckelt. Die Analyse und Aufnahme der Schnitte erfolgte mittels des Mikroskops Axioskop 2 (Zeiss, Oberkochen).

4 Ergebnisse

4.1 Der Chemokinrezeptor XCR1 ist nahezu auf allen intestinalen CD103⁺CD11b⁻ cDC exprimiert

Um die Expression des Chemokinrezeptors XCR1 im Ruhezustand auf intestinalen DCs zu untersuchen, wurden Zellen aus LP, PP und den MLN von C57BL/6 Mäusen mittels Verdau isoliert und DCs mit Hilfe der Dichtezentrifugation angereichert. Entsprechend Abbildung 4 wurden bei der durchflusszytometrischen Analyse cDCs der LP und PP als CD45⁺ Lin⁻F4/80⁻CD11c⁺MHCII⁺, sowie migratorische und residente DCs der MLN als Lin⁻F4/80⁻CD11c⁺MHCII^{high} bzw. Lin⁻F4/80⁻CD11c⁺MHCII^{int} definiert. Ausgehend von dieser Eingrenzungsstrategie der cDCs – die auch für alle folgenden Analysen Anwendung fand – erfolgte die Untersuchung der Expression von XCR1 auf intestinalen cDCs. Diese wurden hierzu anhand der bis dahin verwendeten Marker CD103 und CD11b (Annacker *et al.*, 2005; Edelson *et al.*, 2010) in drei bis vier Subtypen unterteilt (Abbildung 5). Dabei zeigte sich, dass in der LP des Dünndarms nahezu alle CD103⁺CD11b⁻ cDCs XCR1 exprimierten, wohingegen CD103⁺CD11b⁺ und CD103⁻CD11b⁺ cDCs XCR1⁻ waren. Auch die in der LP gering vertretene CD103⁻CD11b⁻ cDCs wiesen einen Anteil von etwa 10 % XCR1⁺ cDCs auf. In den PP war diese Subpopulation deutlich stärker vertreten, wies jedoch – wie auch die CD103⁺CD11b⁺ und CD103⁻CD11b⁺ cDCs – keine Expression von XCR1 auf. Im Gegensatz zu LP und MLN gab es bei den CD103⁺CD11b⁻ cDCs der PP 15 bis 20 % die XCR1 nicht exprimierten. Die migratorischen cDCs des MLN spiegelten im Grunde das Bild der LP wider. Ausnahme war hierbei nur die leicht größere Population an CD103⁻CD11b⁻ cDCs, die kaum XCR1⁺ cDCs enthielt. Diese Population erwies sich innerhalb der residenten cDCs der MLN mit rund 50 % als stärkste Population und beinhaltete 20 % XCR1-exprimierende Zellen. Eine CD103⁺CD11b⁺ Population war in den residenten cDCs der MLN nicht vorzufinden und der kleine Teil CD103⁻CD11b⁺ cDCs wies 10 bis 15 % XCR1⁺ cDCs auf.

In den untersuchten Geweben wird der Chemokinrezeptor XCR1 also auf nahezu allen CD103⁺ cDCs, die kein CD11b aufweisen exprimiert, jedoch nicht auf denen, die CD11b⁺ sind. Damit bestätigte sich die Annahme, dass es sich bei den intestinalen CD103⁺ cDCs um keine homogene Population handelt.

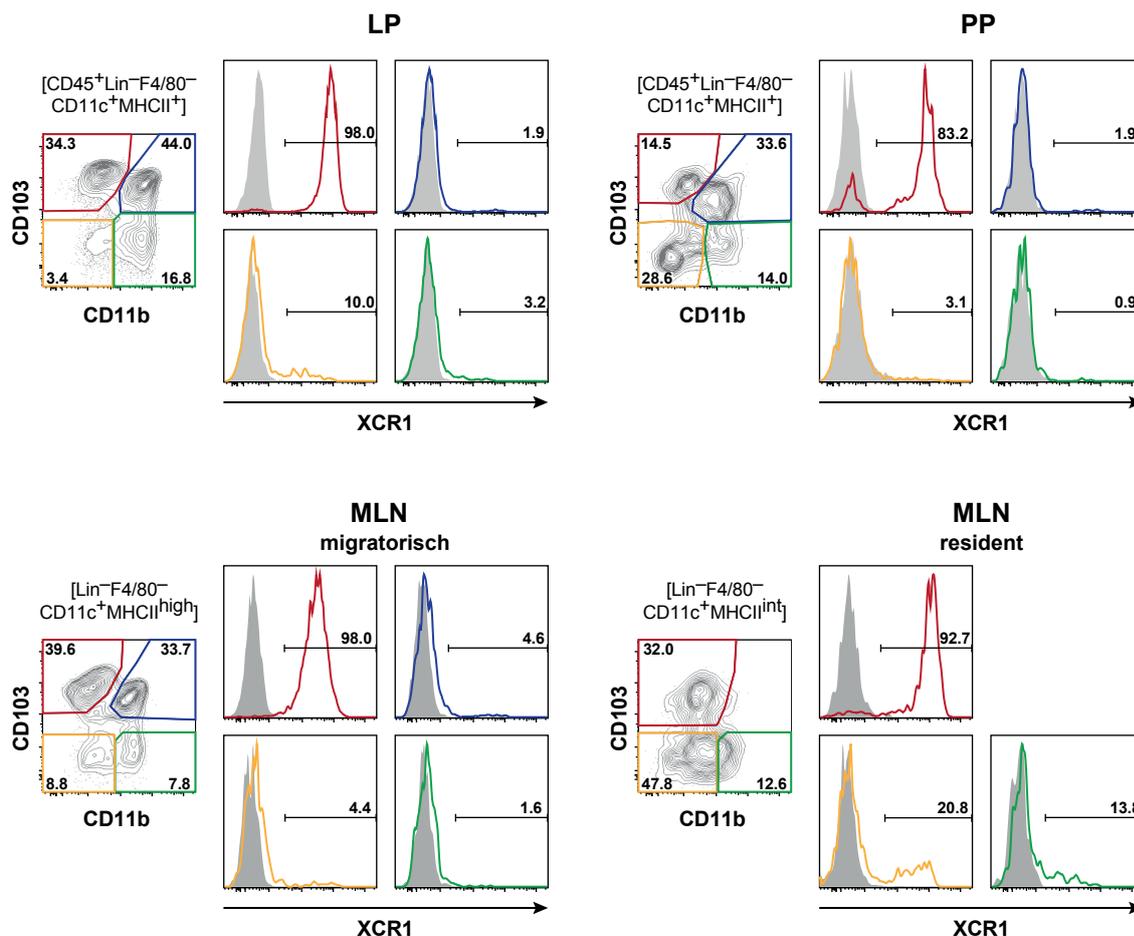


Abbildung 5 | Expression von XCR1 auf cDCs der Lamina propria und der Peyerschen Plaques sowie der mesenterialen Lymphknoten. DCs aus LP, PP und den MLN wurden durch Verdau isoliert und mittels Dichtezentrifugation angereichert. Bei der durchflusszytometrischen Analyse wurden die cDCs der verschiedenen Gewebe mit Hilfe der Oberflächenmarker CD11b und CD103 unterteilt und deren Expression von XCR1 analysiert. Der Hintergrund wurde mit XCR1-defizienten B6.XCR1-lacZ^{+/+} Mäusen ermittelt. Die Expression von XCR1 ist in den farbkodierten Subpopulationen dargestellt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

4.2 Die Expression von XCR1 korreliert stark mit der Expression von CD8 α , Clec9A und CADM1

Um XCR1⁺ cDCs des Darmtrakts phänotypisch zu charakterisieren, wurde die Expression verschiedener Moleküle, von denen bekannt ist, dass sie auf DCs exprimiert werden, auf diesen Zellen im Ruhezustand untersucht. Einige der untersuchten Moleküle wiesen eine bevorzugte Expression auf XCR1⁺ cDCs auf (Abbildung 6). Abgesehen von kleinen Populationen – innerhalb der residenten cDCs der MLN war diese Population etwas größer – war die Expression von CD8 α ausschließlich auf XCR1⁺ cDCs der LP, PP und MLN beschränkt. Eine ebenfalls deutliche Korrelation zeigten Clec9A und CADM1, wobei Clec9A auf den cDCs der LP kaum detektierbar war. Die Expression von CD205 war auf XCR1⁺ Zellen der residenten cDCs der MLN und der cDCs der LP und PP begrenzt, wohingegen die migratorischen cDCs der

MLN zusätzlich CD205⁺ cDCs aufwiesen, die kein XCR1 exprimierten. Itga8 war mit XCR1 auf den cDCs der PP und MLN korreliert, nicht jedoch auf cDCs der LP feststellbar. Die durchflusszytometrische Analyse von cDCs heterozygoter Langerin^{EGFP} (CD207) Mäuse ergab, dass CD207 nicht auf cDCs der LP und PP, sowie den migratorischen cDCs der MLN exprimiert wurde. Auf den residenten cDCs war eine Expression jedoch detektierbar, die ausschließlich auf XCR1⁺ cDCs beschränkt war, wobei nicht alle XCR1⁺ cDCs CD207 exprimierten.

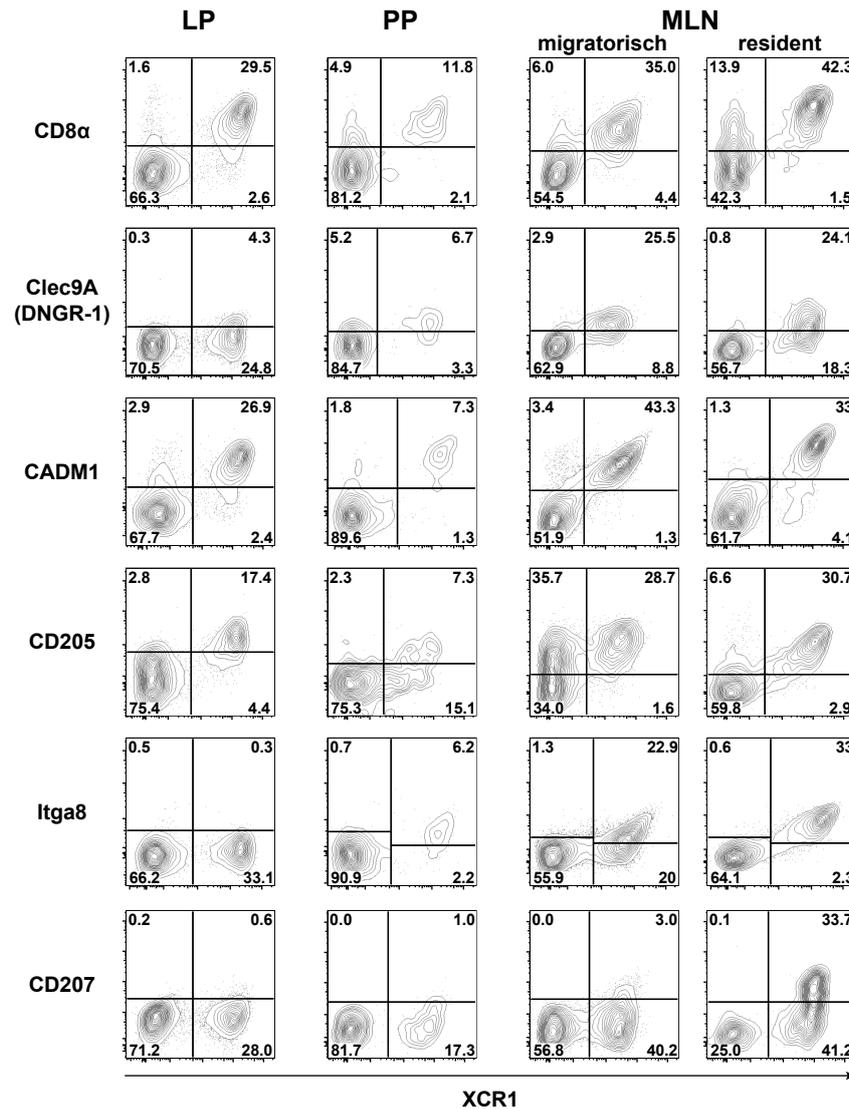


Abbildung 6 | Die Expression von XCR1 auf cDCs der LP, PP und der MLN korreliert mit verschiedenen DC-Markern. DCs aus LP, PP und den MLN von C57BL/6 WT Mäusen und heterozygoten Langerin^{EGFP} (CD207) Mäusen wurden durch Verdau isoliert und mittels Dichtezentrifugation angereichert. Zur durchflusszytometrischen Analyse der Expression von XCR1 und der angegebenen Oberflächenmoleküle wurden die cDCs aus LP und PP als CD45⁺Lin⁻F4/80⁻CD11c⁺MHCII^{high} und aus MLN als Lin⁻F4/80⁻CD11c⁺MHCII⁺ definiert. Die cDCs der MLN wurden des Weiteren anhand ihres MHCII-Expressionsniveaus in migratorisch (MHCII^{high}) und resident (MHCII^{int}) unterteilt. Die gezeigten Resultate sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Des Weiteren konnten Moleküle identifiziert werden, die in ihrer Expression nicht auf XCR1⁺ cDCs beschränkt waren (Abbildung 7). Die durchflusszytometrische Analyse von CD24 ergab, dass zwar alle XCR1⁺ cDCs auch positiv für CD24 waren, es jedoch auch in allen Fällen XCR1⁻CD24⁺, sowie doppelt-negative cDCs gab. Die Kofärbung mit dem anti-CD103 mAk ergab bei den cDCs der LP, PP sowie der migratorischen cDC der MLN ein ähnliches Bild, mit dem Unterschied, dass die einzelnen Subpopulationen klarer voneinander trennbar waren. Die Ausnahme bildeten hierbei die residenten cDCs der MLN, die neben XCR1⁺CD103⁺ cDCs auch XCR1⁺CD103⁻ cDCs aufwiesen. Die Expression des Fractalkine Rezeptors (CX₃CR1) wurde ausgehend von cDCs aus heterozygoten CX₃CR1^{GFP} Mäusen analysiert. Hierbei wiesen XCR1⁺ cDCs der PP und XCR1⁺ migratorische cDCs der MLN keine Expression von CX₃CR1 auf. Die XCR1⁺ cDCs der LP, sowie der residenten cDCs der MLN schienen nicht völlig negativ, als vielmehr niedrig CX₃CR1-exprimierend zu sein. In allen untersuchten cDCs war, abgesehen von den residenten cDCs der MLN, eine klare XCR1⁻CX₃CR1⁻ Population erkennbar.

Wie in der Milz (Bachem *et al.*, 2012) korrelieren somit die Oberflächenmoleküle CD8α, Clec9A, CADM1 und CD205 deutlich mit der Expression von XCR1 auf intestinalen cDCs. Im Gegensatz dazu sind Itga8 und CD207 nicht in allen Geweben detektierbar. CD103 wird zwar in der Milz deutlich schwächer exprimiert als auf intestinalen cDCs, dennoch sind in beiden Fällen XCR1⁺CD103⁺ cDCs auszumachen. Die Expression von CX₃CR1 ist hingegen auf cDCs der Milz und cDCs des Darmtrakts in gleicher Weise vorzufinden.

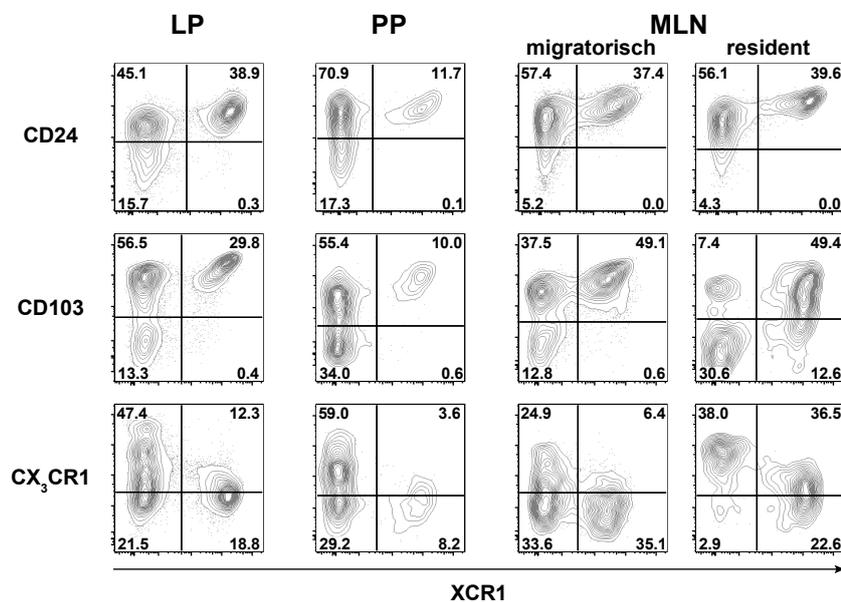


Abbildung 7 | Die Expression von CD24, CD103 und CX₃CR1 ist nicht auf XCR1-positive cDCs der LP, PP und der MLN beschränkt. DCs aus LP, PP und den MLN von C57BL/6 WT Mäusen und heterozygoten CX₃CR1^{GFP} Mäusen wurden durch Verdau isoliert und mittels Dichtezentrifugation angereichert. Zur durchflusszytometrischen Analyse der Expression von XCR1 und der angegebenen Oberflächenmoleküle wurden die cDCs aus LP und PP als CD45⁺Lin⁻F4/80⁻CD11c⁺MHCII^{high} und aus MLN als Lin⁻F4/80⁻CD11c⁺MHCII⁺ definiert. Die cDCs der MLN wurden des Weiteren anhand ihres MHCII-Expressionsniveaus in migratorisch (MHCII^{high}) und resident (MHCII^{int}) unterteilt. Die gezeigten Resultate sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

4.3 XCR1 weist eine deutliche Antikorrelation zu SIRP α auf

Bei der systematischen Suche nach antikorrelierenden Markern wurden Moleküle gefunden, die nicht auf XCR1⁺ cDCs exprimiert sind (Abbildung 8). So war die schwache Expression von 33D1 (DCIR2) eindeutig nur auf den XCR1⁻ cDCs der MLN detektierbar. CD11b war mit Ausnahme eines kleinen Anteils residenter cDCs der MLN ebenfalls nicht auf XCR1-tragenden cDCs exprimiert und in allen untersuchten Kompartimenten waren doppelt-negative cDCs auszumachen. Die durchflusszytometrische Analyse der Expression von SIRP α wies hingegen in allen Geweben eine vollständige Antikorrelation mit der Expression von XCR1 auf.

Die Expression von DCIR2 auf cDCs war somit nur in den MLN vergleichbar mit der aus der Milz. Im Gegensatz dazu wurden CD11b und SIRP α sowohl in den lymphatischen (PP, MLN) als auch in den nicht-lymphatischen Geweben (LP) in gleicher Weise wie in der Milz auf cDCs exprimiert.

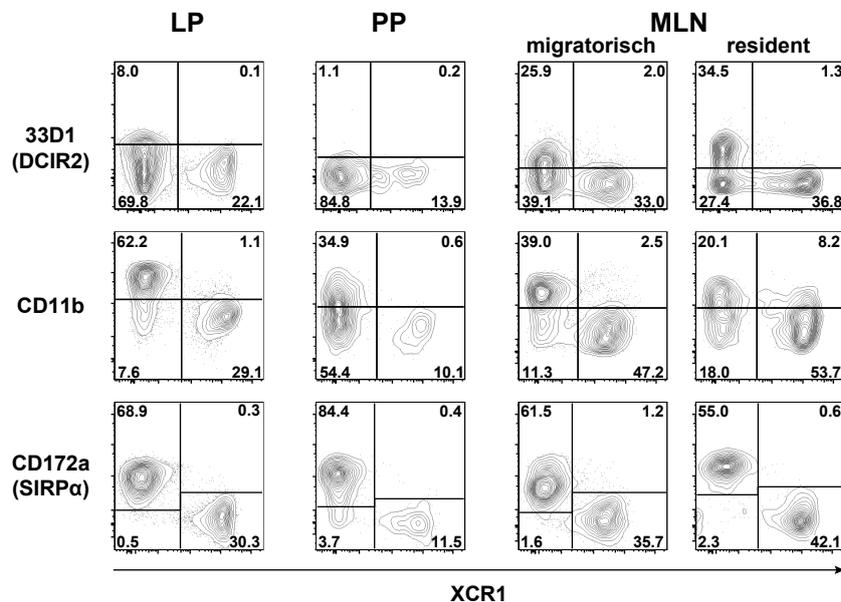


Abbildung 8 | Die Expression von 33D1, CD11b und SIRP α korreliert nicht mit der Expression von XCR1 auf cDCs der LP, PP und der MLN. DCs aus LP, PP und den MLN von C57BL/6 WT Mäusen wurden durch Verdau isoliert und mittels Dichtezentrifugation angereichert. Zur durchflusszytometrischen Analyse der Expression von XCR1 und der angegebenen Oberflächenmoleküle wurden die cDCs aus LP und PP als CD45⁺Lin⁻F4/80⁻CD11c⁺MHCII^{high} und aus MLN als Lin⁻F4/80⁻CD11c⁺MHCII⁺ definiert. Die cDCs der MLN wurden des Weiteren anhand ihres MHCII-Expressionsniveaus in migratorisch (MHCII^{high}) und resident (MHCII^{int}) unterteilt. Die gezeigten Resultate sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

4.4 Intestinale XCR1⁺ cDCs sind in ihrer Entwicklung von dem Transkriptionsfaktor Batf3 abhängig

In der Milz, sowie in verschiedenen peripheren lymphatischen und nicht-lymphatischen Geweben konnte gezeigt werden, dass CD8 α ⁺ cDCs und CD103⁺ cDCs (Haut und Lunge) bzw. CD103⁺CD11b⁻ cDCs (Darm) in ihrer Entwicklung von dem Transkriptionsfaktor Batf3

abhängig sind (Hildner *et al.*, 2008; Bar-On *et al.*, 2010; Edelson *et al.*, 2010). Es verdeutlichte sich jedoch bald darauf, dass es selektiv XCR1⁺ cDCs sind, die in Batf3-defizienten Mäusen fehlen und XCR1 somit einen linienspezifischen Marker darstellt (Bachem *et al.*, 2012). Um der Frage nachzugehen, ob auch XCR1⁺ cDCs des Gastrointestinaltrakts in ihrer Entwicklung von dem Transkriptionsfaktor Batf3 abhängig sind, wurden cDCs aus LP, PP und MLN von Batf3^{-/-} Mäusen im Vergleich mit C57BL/6 Wildtyp (WT) Mäusen im Ruhezustand untersucht. Die durchflusszytometrische Analyse (Abbildung 9, links) ergab dabei, dass in Batf3^{-/-} Mäusen XCR1⁺ cDCs in allen Geweben weitgehend abwesend waren, jedoch nur in den PP gänzlich fehlten. Die Balkendiagramme in Abbildung 9 verdeutlichen die starke Reduktion XCR1⁺ Zellen und zeigen gleichzeitig auf, dass in den verschiedenen Geweben andere cDC-Subpopulationen dieses Fehlen kompensierten. So war die Anzahl der XCR1⁻CD103⁺ cDCs in der LP, sowie

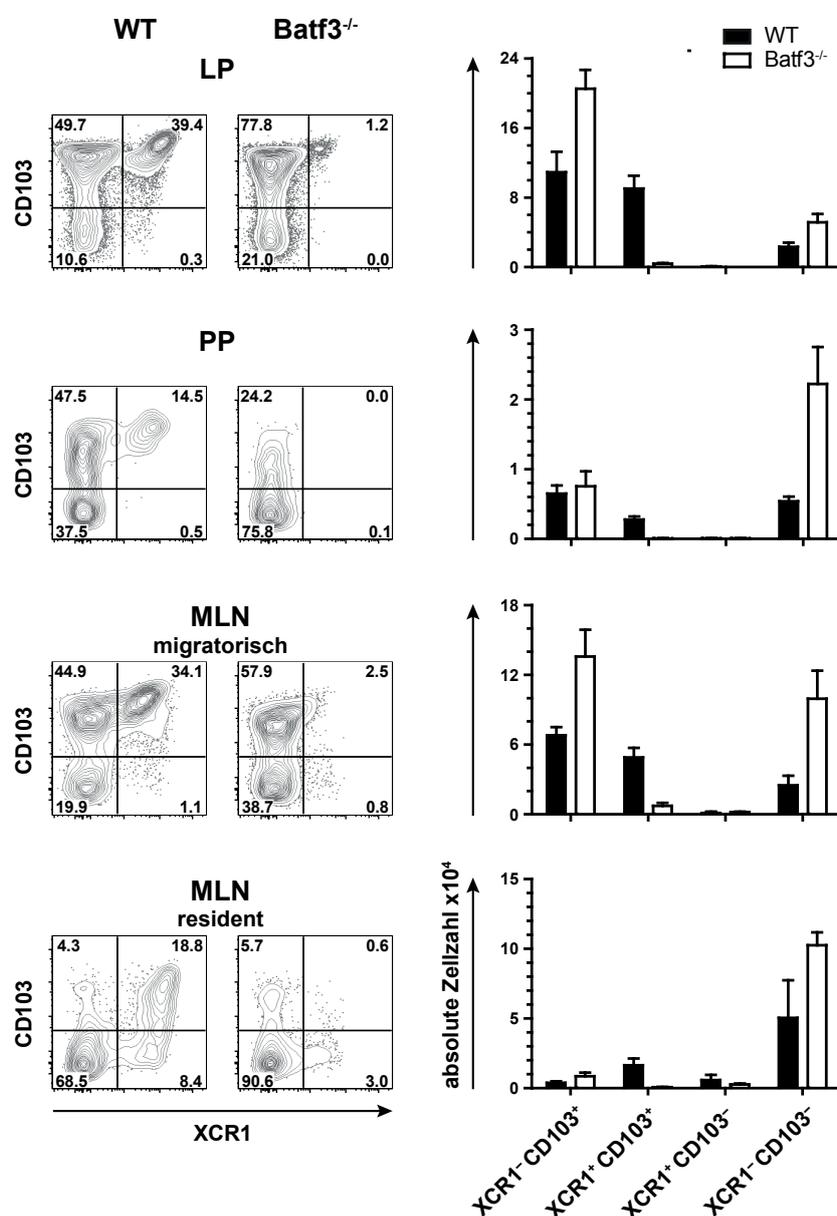


Abbildung 9 | Intestinale cDCs sind in ihrer Entwicklung von dem Transkriptionsfaktor Batf3 abhängig. DCs aus LP, PP und den MLN von C57BL/6 WT und Batf3^{-/-} Mäusen wurden durch Verdau isoliert und mittels Dichtezentrifugation angereichert. Die auf der linken Seite dargestellte durchflusszytometrische Analyse zeigt die Einteilung der cDCs in den jeweiligen Geweben nach XCR1 und CD103. cDCs aus LP und PP sind hierbei als CD45⁺ Lin⁻ F4/80⁻CD11c⁺MHCII^{high} und aus MLN als Lin⁻F4/80⁻CD11c⁺MHCII⁺ definiert. Die cDCs der MLN wurden darüber hinaus in migratorisch (MHCII^{high}) und resident (MHCII^{int}) unterteilt. Die dazugehörigen ermittelten Gesamtzellzahlen der angegebenen cDC Subtypen aus WT (schwarze Balken) und Batf3-defizienten Mäusen (weiße Balken) sind rechts dargestellt. Die Resultate sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente (mean ± SEM; in jedem Experiment n = 3).

auch unter den migratorischen cDCs der MLN im Vergleich zum WT erhöht. Sowohl innerhalb der migratorischen, als auch der residenten cDCs der MLN (und am deutlichsten innerhalb der PP) war die Population der XCR1⁻CD103⁻ cDCs im Vergleich zum WT vergrößert.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch intestinale XCR1⁺ cDCs von dem Transkriptionsfaktor Batf3 abhängig sind und somit eine distinkte cDC-Subpopulation darstellen.

4.5 Die in Batf3-defizienten Mäusen verbleibenden XCR1⁺ cDCs weisen einen veränderten Phänotyp auf

Da in den Batf3^{-/-} Mäusen XCR1⁺ cDCs in LP und MLN nicht vollständig fehlten, stellte sich die Frage, ob die verbleibenden Zellen XCR1⁺ cDCs entsprechen, die auch in WT Tieren zu finden sind. Um diese Frage zu klären, wurde der Phänotyp dieser Zellen anhand ausgewählter DC-Marker durchflusszytometrisch analysiert. Dabei fiel zunächst auf, dass das Expressionsniveau von XCR1 sowohl auf den cDCs der LP, als auch der MLN (Abbildung 10) im Vergleich zum WT (Abbildung 6) reduziert war. Darüber hinaus zeigte sich bei den zusätzlich untersuchten Markern eine zum WT (Abbildung 6) veränderte Expression. So war das Expressionsniveau von CD8 α ebenfalls deutlich gesenkt (Abbildung 10), und in der LP war im Gegensatz zum WT (Abbildung 6) eine verstärkte XCR1⁺CD8 α ⁻ Population erkennbar, die von rund 8 % im WT auf ca. 40 % aller XCR1⁺ cDCs durch den KO (Abbildung 10) angewachsen war. Bedingt durch die generell sehr schwache Expression von Clec9A auf intestinalen cDCs, kombiniert mit der alterierten XCR1-Expression, ist über die Korrelation dieser Moleküle in den untersuchten Batf3^{-/-} Mäusen eine konkrete Aussage nicht möglich. Die in den WT Tieren gezeigten Korrelationen von CADM1 und XCR1 sowie Itga8 und XCR1 (Abbildung 6) waren nicht mehr sichtbar (Abbildung 10). In allen drei Kompartimenten zeigte sich hingegen in beiden Fällen eine untypische XCR1-einzel-positive Population. CD205 schien hingegen weiterhin – wenn auch schwach – auf XCR1⁺ cDCs exprimiert zu sein. Die Expression von CD103 wies auf den cDCs der LP, sowie der migratorischen cDCs der MLN keine starke Veränderung auf (Abbildung 10). Bei letzteren war jedoch zusätzlich eine XCR1⁺CD103⁻ Population zu erkennen, die in WT Mäusen nicht detektierbar war (Abbildung 7). Im Gegensatz zu den WT Mäusen fehlten hingegen XCR1⁺CD103⁺ residente cDCs und stattdessen waren XCR1⁺CD103⁻ Zellen deutlich sichtbar. Auch anhand des im WT nicht korrelierenden Markers CD11b (Abbildung 8) waren Veränderungen zu detektieren, indem hier nun XCR1⁺ Zellen zu finden waren, die CD11b exprimierten (Abbildung 10). Die im WT klare Antikorrelation von XCR1 mit SIRP α (Abbildung 8) blieb auch in den Batf3-defizienten Mäusen bestehen, wenngleich innerhalb der residenten cDCs der MLN eine leichte Verschiebung der SIRP α ⁺ hin zur XCR1-Expression zu erkennen war.

Die alterierte XCR1-Expression, sowie die im Vergleich zum WT veränderte Expression der untersuchten Oberflächenmarker auf den verbleibenden XCR1⁺ cDCs, weist daraufhin, dass es sich hierbei um „nicht-natürliche“ Zellen handelt.

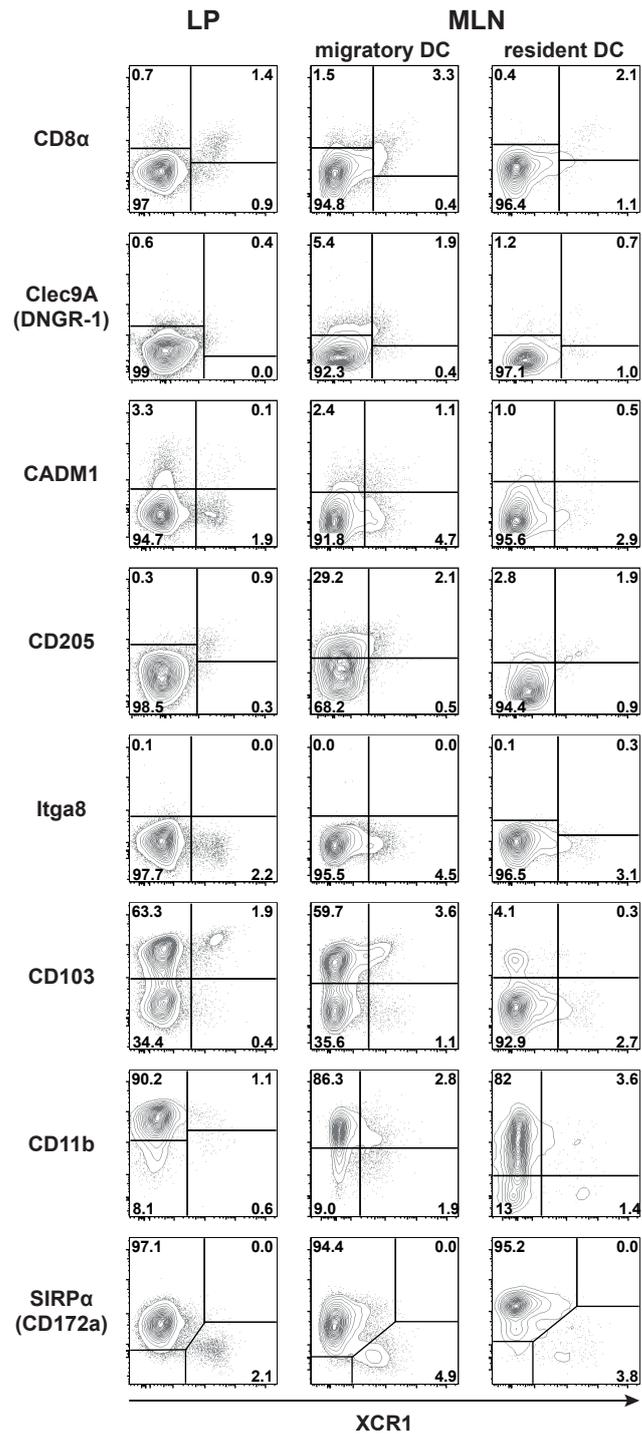


Abbildung 10 | Die verbleibenden XCR1-positiven cDCs aus LP und MLN Batf3-defizienter Mäuse zeigen einen veränderten Phänotyp. DCs aus LP und den MLN von Batf3-defizienten Mäusen wurden durch Verdau isoliert und mittels Dichtezentrifugation angereichert. Zur durchflusszytometrischen Analyse der Expression von XCR1 und der angegebenen Oberflächenmoleküle wurden die cDCs aus LP als CD45⁺Lin⁻F4/80⁻CD11c⁺MHCII^{high} und aus MLN als Lin⁻F4/80⁻CD11c⁺MHCII⁺ definiert. Die cDCs der MLN wurden des Weiteren anhand ihres MHCII-Expressionsniveaus in migratorisch (MHCII^{high}) und resident (MHCII^{int}) unterteilt.

4.6 Die Behandlung mit dem Wachstumsfaktor Flt3 Ligand führt zur Expansion aller – vor allem aber XCR1⁺CD103⁻ – intestinalen cDCs

Flt3 Ligand ist ein Faktor, der nicht nur die Entwicklung einzelner cDC-Subtypen, sondern aller cDCs beeinflusst (McKenna *et al.*, 2000; Waskow *et al.*, 2008). Ein Überschuss an Flt3 Ligand führt zu einer Zunahme von cDCs, wie es bisher in der Milz und anderen lymphatischen Organen, sowie auch nicht-lymphatischen Geweben gezeigt werden konnte (Maraskovsky *et al.*, 1996; Waskow *et al.*, 2008; Bachem *et al.*, 2012). Da in der Milz von solch einer Flt3 Ligand-induzierten Expansion vor allem XCR1⁺ cDCs (Bachem *et al.*, 2012) betroffen sind, wurde im Folgenden der Einfluss dieses Wachstumsfaktors auf intestinale cDCs untersucht. Dazu wurden cDCs aus LP, PP und MLN von Flt3 Ligand-behandelten C57BL/6 Mäusen im Vergleich zu unbehandelten Mäusen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Das Verhältnis der ermittelten Zellzahlen der jeweiligen cDC-Subtypen in Flt3 Ligand-behandelten zu denen

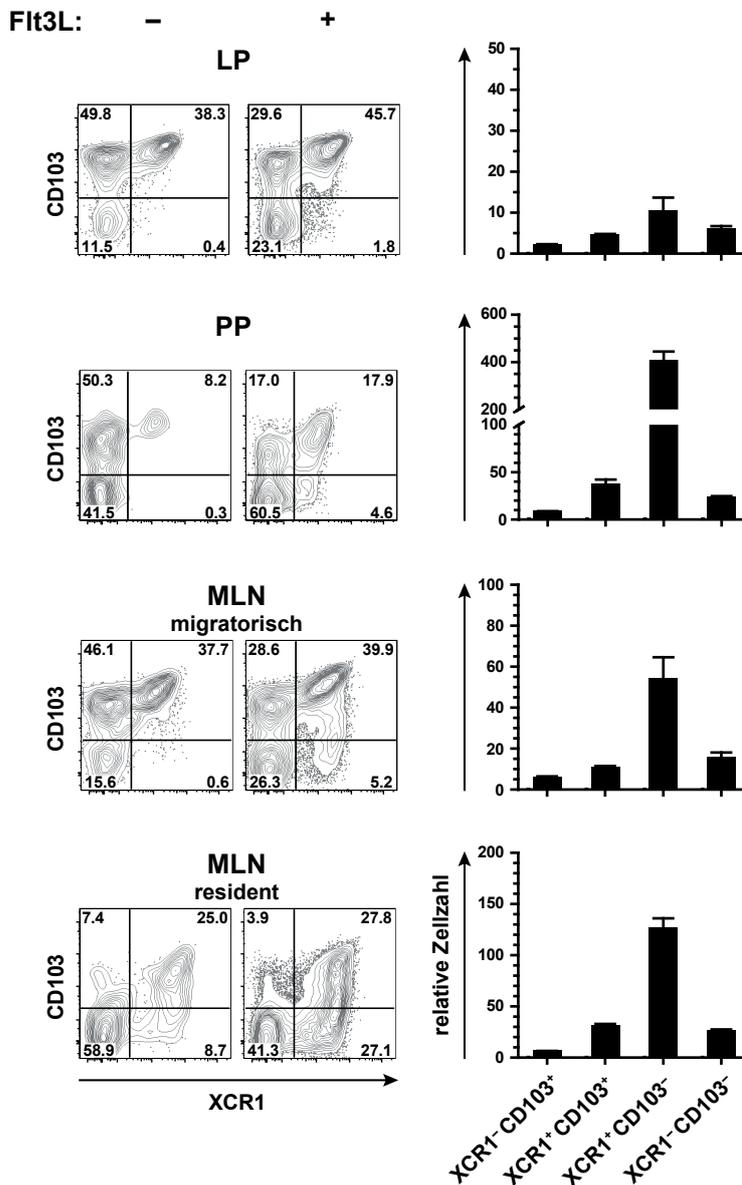


Abbildung 11 | Die Behandlung mit dem Wachstumsfaktor Flt3 Ligand führt im Darm und den drainierenden Lymphknoten zu einer massiven Expansion der cDCs, allen voran der XCR1⁺CD103⁻ cDCs. 1x10⁶ Flt3 Ligand-produzierende B16 Zellen wurden C57BL/6 Mäusen s. c. injiziert. Nach 9 d wurden DCs aus LP, PP und MLN von sowohl behandelten als auch unbehandelten Mäusen durch Verdau isoliert und mittels Dichtezentrifugation angereichert. Auf der linken Seite ist die durchflusszytometrische Analyse gezeigt, bei der die cDCs der jeweiligen Gewebe nach XCR1 und CD103 eingeteilt wurden. cDCs aus LP und PP sind als CD45⁺Lin⁻F4/80⁻CD11c⁺MHCII^{high} und aus MLN als Lin⁻F4/80⁻CD11c⁺MHCII⁺ definiert. Die cDCs der MLN wurden darüber hinaus in migratorisch (MHCII^{high}) und resident (MHCII^{int}) unterteilt. Die Balkendiagramme auf der rechten Seite veranschaulichen das Verhältnis der Gesamtzellzahl der angegebenen cDC-Subtypen der behandelten, zu denen unbehandelter Mäuse. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente (mean ± SEM; in jedem Experiment n = 3).

in unbehandelten Mäusen (Abbildung 11, rechts) zeigt, dass in den untersuchten Geweben eine starke Zunahme aller cDC-Subtypen induziert wurde. Die Expansion fällt dabei in den verschiedenen Geweben unterschiedlich stark aus und ist bei den cDCs der LP am wenigsten ausgeprägt. Ein selektiver Zuwachs aller XCR1⁺ cDCs ist weder in LP, PP noch in den MLN zu beobachten, wobei jedoch auffällig ist, dass in allen Fällen XCR1⁺ cDCs, die kein CD103 exprimieren, die stärkste Expansion aufweisen.

4.7 XCR1⁺ cDCs finden sich in den Zotten des Dünndarms und in den T-Zellzonen der Peyerschen Plaques und der MLN

Wenngleich cDCs des Darms sowie der darmassoziierten Gewebe in der Durchflusszytometrie bisweilen anhand verschiedener Marker wie CD11b, CD103, CX₃CR1 oder CD8 α eingeteilt wurden, konnte technisch bedingt ein konkreter Nachweis der Lokalisation einzelner Subtypen bisher nicht erfolgen. In der Durchflusszytometrie sind seit vielen Jahren Viel-Farben-Analysen möglich, die eine genaue Definition einzelner Populationen erlaubt. Histologische Analyseverfahren sind im Gegensatz dazu auf eine deutlich kleinere Kombinationsmöglichkeit beschränkt. Viele Aussagen über die Lokalisation spezieller cDCs beruhen auf histologischen Untersuchungen, bei denen zwei bis maximal drei Moleküle angefärbt wurden (Iwasaki und Kelsall, 2000; Johansson-Lindbom *et al.*, 2005; Jang *et al.*, 2006; Jaensson *et al.*, 2008; Schulz *et al.*, 2009). Da sowohl MHCII, als auch CD11c, CD11b, CD103 und CD8 α in ihrer Expression nicht auf DCs beschränkt sind, ist anhand der alleinigen Betrachtung der Positionierung dieser Moleküle eine genaue Aussage etwa über die Lokalisation XCR1⁺ (CD103⁺CD11b⁻) cDCs schwierig.

Um die Lokalisation XCR1⁺ cDCs zu bestimmen wurde der mAk anti-XCR1 (MARX10) auch in histologischen Untersuchungen eingesetzt. Im Darm machten jedoch starke Hintergrundsignale eine eindeutige Detektion der Signale unmöglich.. Daher wurden im Folgenden zur Klärung der Lokalisation XCR1⁺ cDCs B6.XCR1-lacZ^{+/+} Mäuse verwendet, in denen beide *xcr1*-Gene durch *lacZ*-Reportergene ersetzt sind. Dabei können XCR1⁺ Zellen detektiert werden, in dem die unter der Kontrolle des endogenen XCR1-Promotors exprimierte bakterielle β -Galaktosidase das chromogene Substrat X-Gal in einen blauen Farbstoff umsetzt.

Bei der Untersuchung zeigte sich in allen Abschnitten des Dünndarms (Duodenum, Jejunum und Ileum) in gleicher Weise eine Aktivität der β -Galaktosidase in der LP der Zotten (Abbildung 12, beispielhaft für alle Abschnitte ist das Duodenum gezeigt). In den PP kamen XCR1⁺ cDCs ausschließlich in den T-zellreichen interfollikulären Regionen (IFR) vor (Abbildung 12, beispielhaft für alle Abschnitte ist ein PP aus dem Duodenum gezeigt). Auch im MLN zeigte sich, dass XCR1⁺ cDCs in den T-Zellbereichen, nicht jedoch in den B-Zellzonen zu finden sind (Abbildung 12). Um auszuschließen, dass das Fehlen von XCR1 einen Einfluss auf die Lokalisation der Zellen hat, wurden auch heterozygote B6.XCR1-lacZ (B6.XCR1-lacZ^{+/+}) Mäuse untersucht. Hierbei konnten ebenfalls im Dünndarm XCR1⁺ cDCs in der

LP der Zotten sowie in den IFR der PP detektiert werden. Darüber hinaus zeigten sich, wie in den homozygoten Tieren, positive Signale in den T-Zellbereichen der MLN. Die Kontrolle mit Geweben aus C57BL/6 Mäusen verdeutlichte, dass es sich bei den detektierten Signalen in den Geweben der B6.XCR1-lacZ Mäuse um eine echte Expression der β -Galaktosidase handelte.

Die histologische Analyse gibt somit einen Aufschluss über die Positionierung XCR1⁺ cDCs: sie finden sich unabhängig von der Expression des Rezeptors XCR1 in der LP der Zotten des Dünndarms, den IFR der PP, sowie in den T-Zellbereichen der MLN.

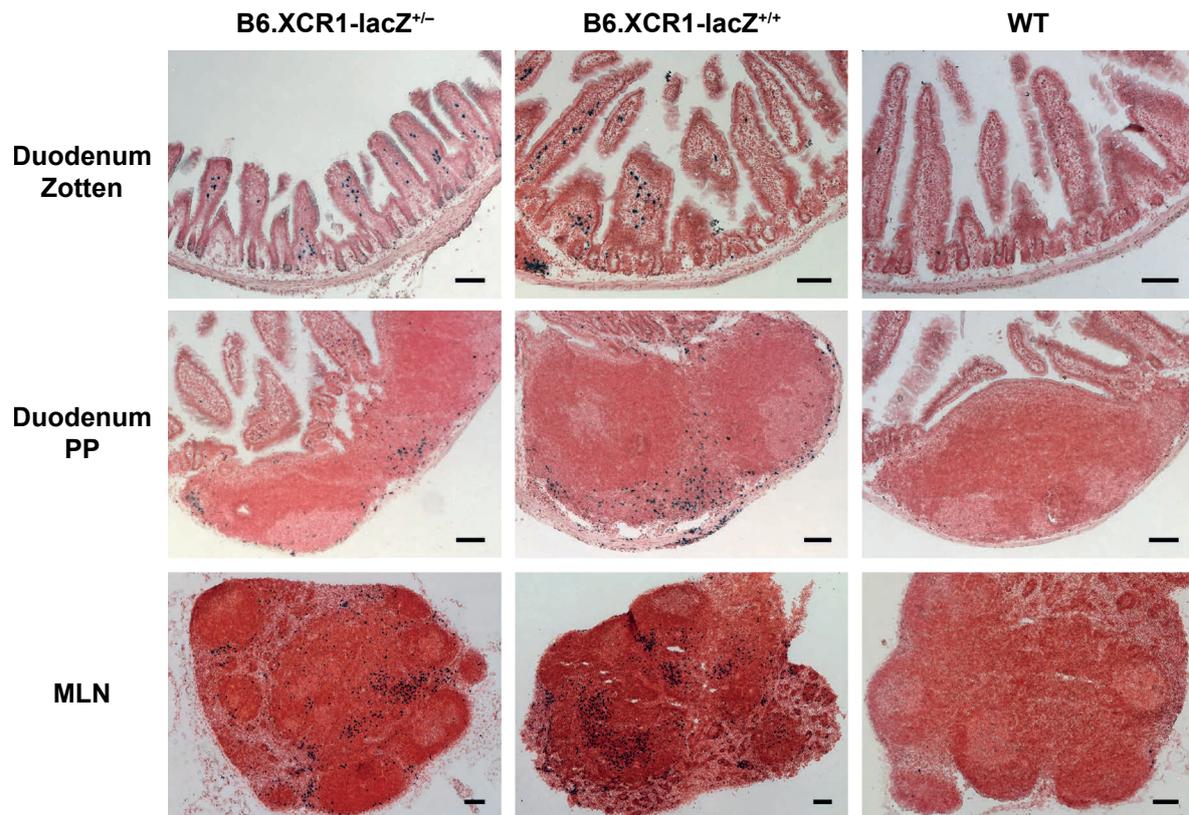


Abbildung 12 | Positionierung XCR1-exprimierender Zellen im Dünndarm und den mesenterialen Lymphknoten. Gewebe aus heterozygoten und homozygoten B6.XCR1-lacZ Reportermäusen wurden fixiert und die Expression von XCR1 in den angefertigten Dünnschnitten mittels X-Gal, ein chromogenes Substrat der β -Galaktosidase, nachgewiesen. Daran anschließend erfolgte eine Gegenfärbung mit Neutralrot. Für die Positionierung XCR1-exprimierender Zellen im Dünndarm sind beispielhaft Schnitte des Duodenums gezeigt. Zur Kontrolle unspezifischer Färbungen wurden auch Dünnschnitte von fixierten Geweben aus C57BL/6 Mäusen untersucht. Die Balken entsprechen 100 μ m. Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

4.8 Das Fehlen von XCR1 bzw. XCL1 beeinträchtigt die Zusammensetzung der intestinalen cDCs

Auch wenn zwischen heterozygoten und homozygoten B6.XCR1-lacZ Mäusen kein Unterschied hinsichtlich der Positionierung XCR1-tragender cDCs in den intestinalen Geweben festgestellt werden konnte, stellte sich dennoch die Frage, ob XCR1 bzw. dessen Ligand XCL1 die Anzahl XCR1⁺ Zellen in diesen Geweben beeinflussen. Zur Beantwortung der Frage und um zu

untersuchen, ob XCR1 bzw. XCL1 für die durch Inflammation-induzierte Migration von cDCs aus der LP zum MLN (MacPherson *et al.*, 1995; Turnbull *et al.*, 2005) benötigt wird, wurden cDCs aus PP, LP und MLN im Ruhezustand, wie auch bei Inflammation durchflusszytometrisch analysiert. Dazu wurden C57BL/6 (WT), B6.XCR1-lacZ^{+/+} (XCR1 knock out; XCR1 KO) und B6.XCL1^{-/-} (XCL1 KO) Mäusen 14 h vor der Analyse 30 µg LPS i. p. injiziert bzw. Mäuse derselben Stämme unbehandelt belassen. Um die Analyse in den drei Mausstämmen vergleichen zu können, wurden die cDCs nicht in XCR1⁺ und XCR1⁻, sondern – ausgehend von der hohen Korrelation von XCR1 und CD8α – in CD8α⁺ und CD8α⁻ eingeteilt (Abbildung 13).

Im Ruhezustand (Abbildung 13, A) war dabei zu erkennen, dass es keine deutlichen Unterschiede zwischen den cDCs in LP und MLN der verschiedenen Mausstämmen gab, wenngleich die Frequenz der CD8α⁺ cDCs in den XCR1 KO Mäusen leicht verringert zu sein schien. Ein sichtlicher Unterschied war jedoch in der Zusammensetzung der cDCs der PP auszumachen, da hier in beiden KO Stämmen die Frequenz der CD8α⁺ cDCs im Vergleich zum WT um die Hälfte reduziert war. Für die Zusammensetzung der cDCs in den PP bei Inflammation (Abbildung 13, B) schien hierbei das Fehlen von XCR1 bzw. XCL1 jedoch keine Rolle zu spielen, da keine Veränderung im Vergleich zum Ruhezustand erkennbar war. Hier waren in gleicher Weise CD8α⁺ cDCs in den KO Mäusen im Vergleich zum WT um die Hälfte verringert. Anhand der Zellzahlen (Abbildung 13, C) war in den PP trotz geringerer Frequenz CD8α⁺ cDCs in den KO Mäusen kaum ein Unterschied im Ruhezustand zu den WT Tieren auszumachen. Des Weiteren hatte der inflammatorische Stimulus in diesem Kompartiment in allen Mäusen nahezu keinen Einfluss auf die Anzahl der CD8α⁺ cDCs.

In der LP führte das Fehlen von XCR1 bei Inflammation zu einer deutlich geringeren Frequenz der CD8α⁺ cDCs im Vergleich zum WT und XCL1 KO (Abbildung 13, B), was sich ebenfalls in den absoluten Zellzahlen niederschlug (Abbildung 13, C): im Vergleich zum WT waren die CD8α⁺ cDCs der XCR1 KO Mäuse um 78 % reduziert.

Die durch LPS induzierte Aktivierung der cDCs führte zur Hochregulierung von MHCII, wodurch im MLN eine Unterscheidung zwischen resident und migratorisch nicht mehr möglich war (Abbildung 13, B). Auf die Frequenz der CD8α⁺ cDCs im MLN hatte das Fehlen von XCR1 oder XCL1 bei Inflammation kaum einen Einfluss. Anhand der absoluten Zellzahlen (Abbildung 13, C) war hingegen im Vergleich zum WT eine Abnahme der CD8α⁺ cDCs um etwa 28 % in beiden KO Stämmen zu beobachten.

Die absoluten Zahlen (Abbildung 13, C) verdeutlichten insgesamt den durch LPS verursachten drastischen Rückgang CD8α⁺ cDCs in der LP der untersuchten Mäuse, allen voran in den XCR1 KO Mäusen: in WT und XCL1 KO Mäusen um 78 bzw. 76 % und in XCR1 KO Mäusen um 90,1 %. Anhand der Zellzahlen wurde im MLN hingegen deutlich, dass durch die Behandlung mit LPS eine massive Zunahme CD8α⁺ cDCs induziert wurde: in WT Mäusen vergrößerte sich die CD8α⁺ cDC-Population (resident und migratorisch) um das 2,7-fache und sowohl in XCR1 KO als auch in XCL1 KO Mäusen um das 3,2-fache gegenüber dem Ruhezustand.

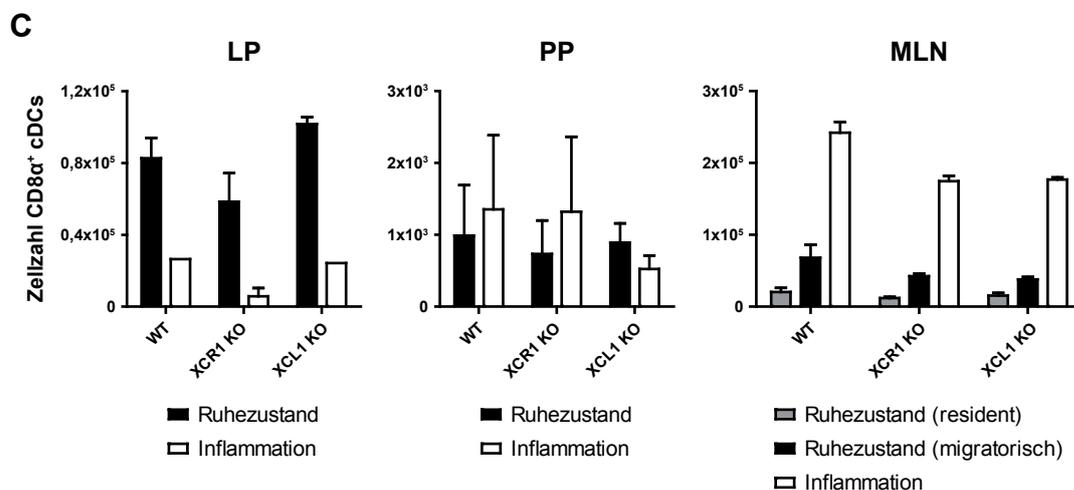
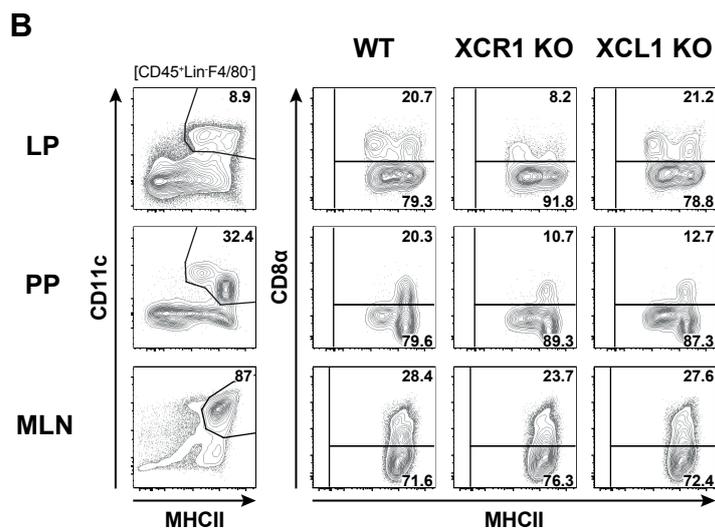
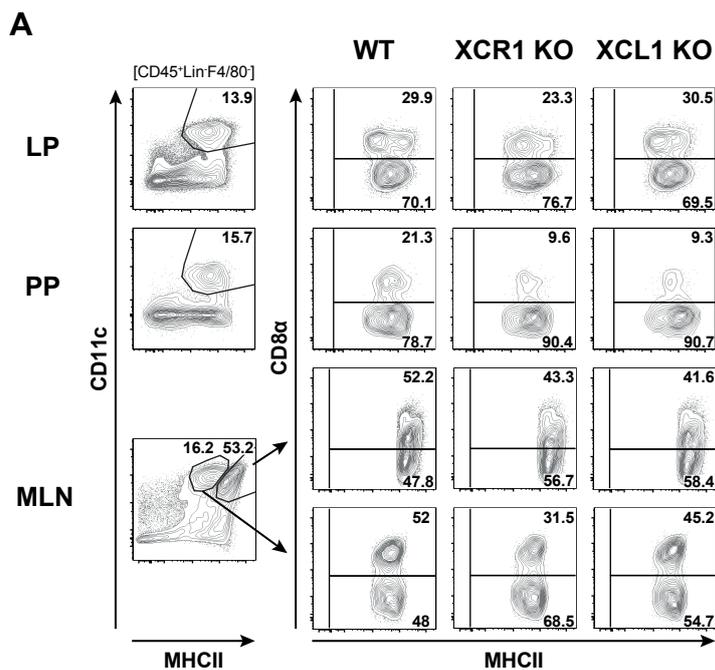


Abbildung 13 | Auswirkungen eines inflammatorischen Stimulus auf die Zusammensetzung intestinaler cDCs. DCs aus LP, PP und MLN von C57BL/6 WT, B6.XCR1-lacZ^{+/+} (XCR1 KO) und B6.XCL1^{-/-} (XCL1 KO) Mäusen, (A) unbehandelt oder (B) 14 h nach i. p. Injektion von 30 µg LPS, wurden durch Verdauung isoliert und mittels Dichtezentrifugation angereichert. Bei der durchflusszytometrischen Analyse wurde die Expression von CD8α auf den cDCs der verschiedenen Gewebe untersucht. (C) Gesamtzellzahl der CD8α⁺ cDCs in den analysierten Geweben. Die cDCs der MLN wurden dabei im Ruhezustand anhand ihres MHCII-Expressionsniveaus in migratorisch (MHCII^{high}) und resident (MHCII^{int}) aufgeteilt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente (in jedem Experiment n = 2-3).

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass durch LPS $CD8\alpha^+$ cDCs aus der LP verschwinden und umgekehrt $CD8\alpha^+$ massiv in den MLN zunehmen. Die Inflammation hat dabei keinen Einfluss auf $CD8\alpha^+$ cDCs der PP. Das Fehlen von XCR1 oder XCL1 bewirkt dort jedoch im Gegensatz zu LP und MLN eine veränderte Zusammensetzung der cDCs im Ruhezustand. Darüber hinaus führt die Abwesenheit von XCR1, nicht jedoch von XCL1, bei Inflammation zu einem Verlust $CD8\alpha^+$ cDCs in der LP.

4.9 LPS induziert die Wanderung XCR1⁺ Zellen von der Lamina propria des Dünndarms in die mesenterialen Lymphknoten.

Um auch histologisch den Einfluss einer Inflammation auf XCR1⁺ Zellen zu untersuchen, wurden auf gleiche Weise behandelte bzw. unbehandelte B6.XCR1-lacZ^{+/+} und – zur Hintergrundkontrolle – C57BL/6 Mäusen Dünndarmabschnitte sowie MLN entnommen und die Aktivität der β -Galaktosidase in den daraus angefertigten Gefrierschnitten analysiert (Abbildung 14). Da sich in den Zotten sowie in den PP des Dünndarms in allen Abschnitten (Duodenum, Jejunum und Ileum) das gleiche Bild zeigte, sind hier nur beispielhaft Schnitte aus dem Bereich des Jejunums gezeigt. Im Ruhezustand sind dabei in der LP des Dünndarms XCR1⁺ Zellen zu erkennen, die durch den inflammatorischen Stimulus deutlich reduziert sind. Durch die Inflammation scheint in den PP die Positionierung XCR1⁺ cDCs nicht beeinträchtigt zu sein. In den MLN ergibt sich nach der Behandlung mit LPS ein heterogenes Bild: dabei ähneln manche Abschnitte eines MLN (nicht gezeigt) aufgrund der geringen Anzahl XCR1⁺ cDCs eines MLN im Ruhezustand, wobei in anderen MLN-Abschnitten (wie im Bild zu sehen) XCR1⁺ Zellen massiv in den T-Zellzonen akkumulieren.

Die histologischen Befunde erlauben eine Interpretation der Ergebnisse der Durchflusszytometrie (Abschnitt 4.8): Durch die Behandlung mit LPS wandern XCR1⁺ cDCs aus der LP aus und es kommt zu einer starken Akkumulation XCR1⁺ cDCs im MLN. Dabei führt das Fehlen des Chemokinrezeptors XCR1 in der LP von B6.XCR1-lacZ^{+/+} Mäusen nicht nur zu einer Reduktion sondern zu einer nahezu kompletten Abwesenheit XCR1-tragender Zellen.

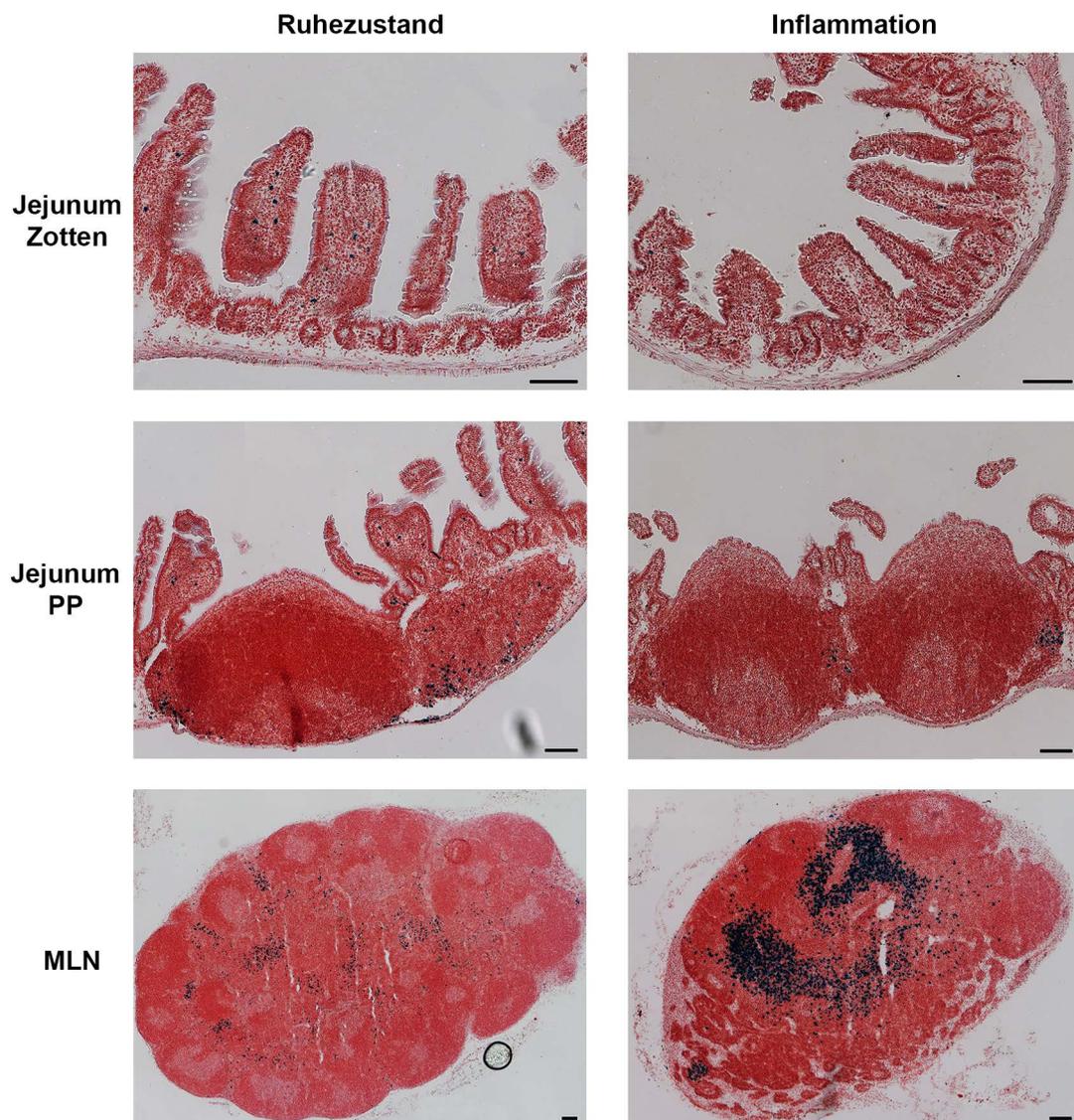


Abbildung 14 | Ein inflammatorischer Stimulus beeinträchtigt die Positionierung XCR1-exprimierender Zellen in der Lamina propria des Dünndarms, nicht jedoch in den Peyerschen Plaques. Gewebe aus homozygoten B6.XCR1-lacZ Reporter-mäusen (unbehandelt oder 14 h nach i. p. Injektion von 30 µg LPS) wurden fixiert und die Expression von XCR1 in den angefertigten Dünnschnitten mittels X-Gal nachgewiesen. Daran anschließend erfolgte eine Gegenfärbung mit Neutralrot. Für die Positionierung XCR1-exprimierender Zellen im Dünndarm sind beispielhaft Schnitte des Jejunums gezeigt. Die Balken entsprechen 100 µm. Zur Kontrolle unspezifischer Färbungen wurden auch jeweils Dünnschnitte von fixierten Geweben aus C57BL/6 WT Mäusen untersucht (nicht gezeigt).

4.10 Das Expressionsniveau von CCR7 ist auf XCR1⁺ cDCs erhöht

Worbs *et al.* zeigten anhand von CCR7^{-/-} Mäusen, dass CCR7 im Ruhezustand zwar für die Migration von DCs in die MLN benötigt wird, jedoch keinen Einfluss auf das Vorkommen von DCs in der LP des Dünndarms hat (Worbs *et al.*, 2006). Des Weiteren ist bekannt, dass die LPS-induzierte Migration von DCs aus der LP des Dünndarms über die Lymphe zu den MLN CCR7-abhängig ist (Turnbull *et al.*, 2005; Schulz *et al.*, 2009), weshalb im Folgenden untersucht wurde, in wie weit XCR1⁺ cDCs den Chemokinrezeptor CCR7 exprimieren (Abbildung 15). Da sich – wie bereits in Abbildung 13 zu sehen war – durch einen inflammatorischen Stimulus die MHCII-Expression auf den cDCs verändert, wurden zur Analyse der Expression von CCR7 die cDCs in allen Geweben bei Inflammation, wie auch im Ruhezustand anhand ihres MHCII- und XCR1-Expressionsniveaus unterteilt. Dabei war zu erkennen, dass XCR1⁺ cDCs der LP sowohl im Ruhezustand, als auch nach LPS-Behandlung in Subpopulationen mit hoher (MHCII^{high}) und intermediärer MHCII-Expression (MHCII^{int}) unterschieden werden konnten. Für XCR1⁻ LP cDCs ergab sich eine klare Trennung nur nach inflammatorischem Stimulus. Die cDCs der PP stellten sich im Ruhezustand hingegen als homogene XCR1⁻ und XCR1⁺ Populationen dar, von denen sich die XCR1⁻ cDCs durch den Einfluss von LPS in eine MHCII^{high}- und eine MHCII^{int}-Subpopulation auftrennten. Im MLN zeigte sich im Ruhezustand das gewohnte Bild von migratorischen (MHCII^{high}) und residenten (MHCII^{int}) cDCs, die jeweils in XCR1⁻ und XCR1⁺ unterteilt werden konnten. Durch die Inflammation waren hier schließlich nur noch zwei Populationen (XCR1⁻ und XCR1⁺) mit einem hohen MHCII-Niveau zu detektieren.

Im Ruhezustand war auf den cDCs der LP nur eine sehr geringe CCR7-Expression nachweisbar, die auf die MHCII^{high} XCR1⁺ Subpopulation beschränkt war. In den PP waren nochmals deutlich weniger CCR7⁺ Zellen zu erkennen. Alle migratorischen cDCs der MLN exprimierten den Chemokinrezeptor CCR7, wobei auffiel, dass XCR1⁺ cDCs ein höheres CCR7-Expressionsniveau aufwiesen als XCR1⁻ cDCs. Auch in den residenten cDCs, die als CCR7-negativ definiert sind, zeigte sich – beschränkt auf die XCR1⁺ Subpopulation – eine leichte Verschiebung in der CCR7-Expression im Vergleich zur Hintergrundkontrolle. Nach der Behandlung mit LPS war zu erkennen, dass die Expression von CCR7 in allen untersuchten Geweben auf cDCs mit hohem MHCII-Expressionsniveau beschränkt war. Des Weiteren wurde deutlich, dass dabei die XCR1⁺ cDCs ein höheres CCR7-Expressionsniveau aufwiesen, als die entsprechenden XCR1⁻ cDCs.

Der inflammatorische Stimulus bewirkt also neben der gesteigerten Expression von MHCII in allen untersuchten Kompartimenten eine erhöhte CCR7-Expression, die bei XCR1⁺ cDCs besonders ausgeprägt ist.

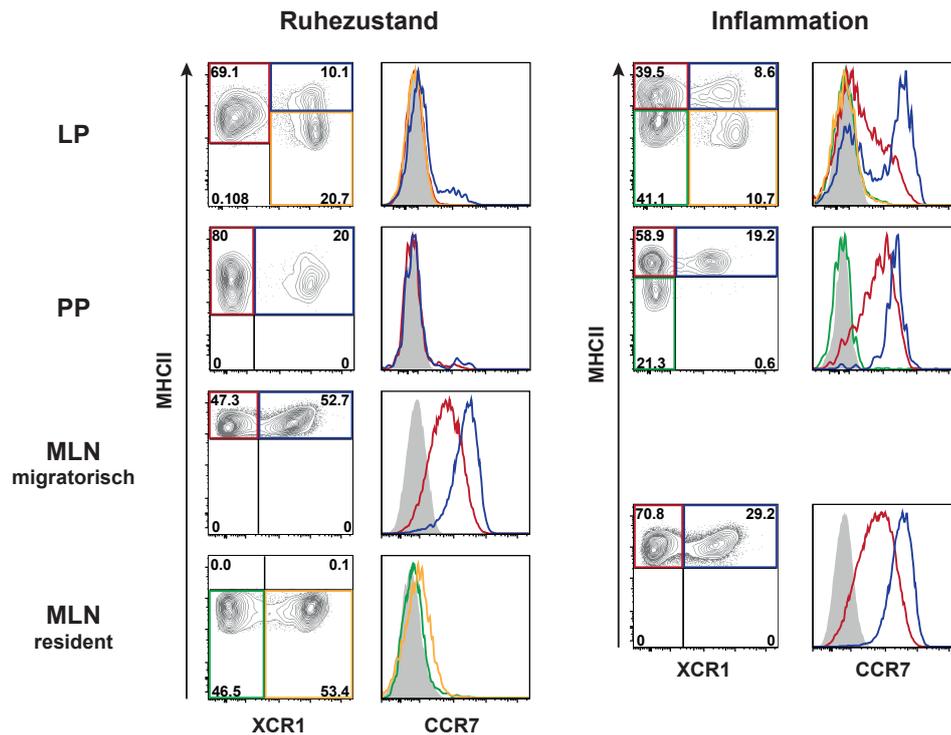
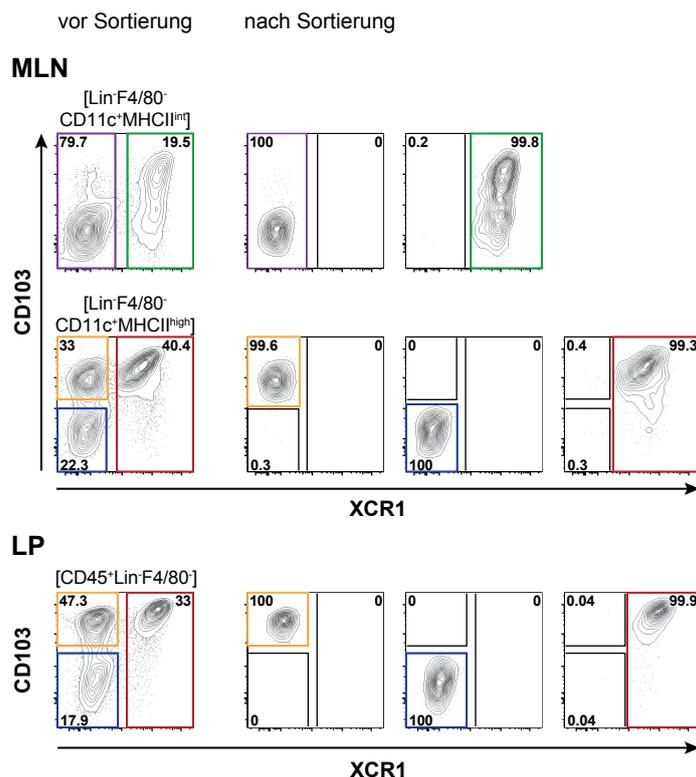


Abbildung 15 | Die Expression des Chemokinrezeptors CCR7 ist nach inflammatorischem Stimulus – abhängig vom MHCII-Expressionsniveau – auf intestinalen XCR1⁺ cDCs erhöht. DCs aus LP, PP und MLN von C57BL/6 WT Mäusen (unbehandelt oder 14 h nach i. p. Injektion von 30 µg LPS) wurden durch Verdau isoliert und mittels Dichtezentrifugation angereichert. Bei der durchflusszytometrischen Analyse wurden die cDCs der verschiedenen Gewebe anhand der Oberflächenmarker XCR1 und MHCII unterteilt und deren Vermögen zur Expression von CCR7 ermittelt. cDCs aus LP und PP sind hierbei als CD45⁺Lin⁻F4/80⁻CD11c⁺MHCII^{high} und aus MLN als Lin⁻F4/80⁻CD11c⁺MHCII⁺ definiert. Die cDCs der MLN wurden darüber hinaus im Ruhezustand in migratorisch (MHCII^{high}) und resident (MHCII^{int}) unterteilt. Der Hintergrund wurde mit gesamt cDCs ermittelt, die nicht mit biotinyliertem CCR7, sondern nur mit dem Sekundärreagenz gefärbt wurden. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente (in jedem Experiment n = 2-3).

4.11 Migratorische XCR1⁺ cDCs kreuzpräsentieren lösliches Antigen am besten

Da bis hierhin gezeigt werden konnte, dass intestinale XCR1⁺ cDCs nicht nur phänotypische Gemeinsamkeiten zu XCR1⁺ cDCs der Milz aufweisen, sondern in gleicher Weise auch Batf3-abhängig sind, galt es die Hypothese zu prüfen, dass auch intestinale XCR1⁺ cDCs in der Lage wären, exogenes Antigen aufzunehmen und CD8⁺ T-Zellen zu präsentieren. Um dies zu beantworten, wurden Mäuse mit jeweils 25 mg löslichem OVA gefüttert, um anschließend die Kapazität der cDCs aus MLN und LP zur Präsentation des von OVA stammenden Peptids SIINFEKL an CD8⁺ T-Zellen zu analysieren. Dazu wurden 17 h später cDCs aus MLN und LP wie unter Material und Methoden beschrieben isoliert (Abschnitt 3.5.1), angereichert (Abschnitt 3.5.3 und Abschnitt 3.5.4) und zu hochreinen Subpopulationen sortiert (Abschnitt 3.6.3), die in Abbildung 16 zu sehen sind.

Abbildung 16 | Strategie zur Sortierung von cDC-Subpopulationen der mesenterialen Lymphknoten und der Lamina Propria des Dünndarms. DCs aus LP und MLN von C57BL/6 WT Mäusen wurden durch Verdau isoliert und mittels Dichtezentrifugation und anschließender CD11c-magnetischen Zellsortierung angereichert. Gezeigt ist jeweils die Strategie der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung und die daraus erhaltenen, hochreinen getrennten cDC-Subpopulationen. Die abgebildeten Resultate sind repräsentativ für vier unabhängige Experimente.



Nach der Kokultivierung mit CD8⁺ OT-I T-Zellen (Abschnitt 3.7.1) wurde die Kreuzpräsentationsfähigkeit der jeweiligen cDC-Subtypen anhand der T-Zellproliferation durchflusszytometrisch analysiert.

Dabei zeigte sich in allen durchgeführten Experimenten, dass – im Gegensatz zur LP – im MLN alle cDC-Subpopulationen in der Lage waren lösliches Antigen kreuzzupräsentieren, wobei sich die migratorischen XCR1⁺ cDCs als am effektivsten erwiesen. Hierbei induzierten beispielsweise 7.500 migratorische XCR1⁺ cDCs eine vergleichbare T-Zellproliferation wie 30.000 migratorische cDCs ohne XCR1. Migratorische XCR1⁺ cDCs waren somit 4-fach effektiver in der Kreuzpräsentation löslichen Antigens als XCR1⁻ cDCs.

Wenngleich cDCs der LP nicht in der Lage waren *in vivo* aufgenommenes Antigen effektiv kreuzzupräsentieren, zeigte die *in vitro* Beladung mit SIINFEKL, dass sie per se die Möglichkeit haben CD8⁺ OT-I T-Zellen zu aktivieren, da hierbei eine starke Proliferation detekrierbar war. Dass das Unvermögen der LP cDCs kreuzzupräsentieren durch einen zu späten Analysezeitpunkt bedingt sei – antigenbeladene cDCs sich also schon längst gänzlich im MLN befinden würden – konnte widerlegt werden, da auch bereits 4 h nach Fütterung keine Kreuzpräsentation durch LP cDCs festzustellen war (nicht gezeigte Daten).

XCR1⁺ cDCs des MLN sind also in der Lage lösliches Antigen kreuzzupräsentieren, wobei migratorische XCR1⁺ cDCs deutlich effektiver sind als residente XCR1⁺ cDCs. Im Gegensatz dazu induzieren in diesem Model XCR1⁺ cDCs, sowie auch alle anderen cDCs der LP keine Proliferation der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen.

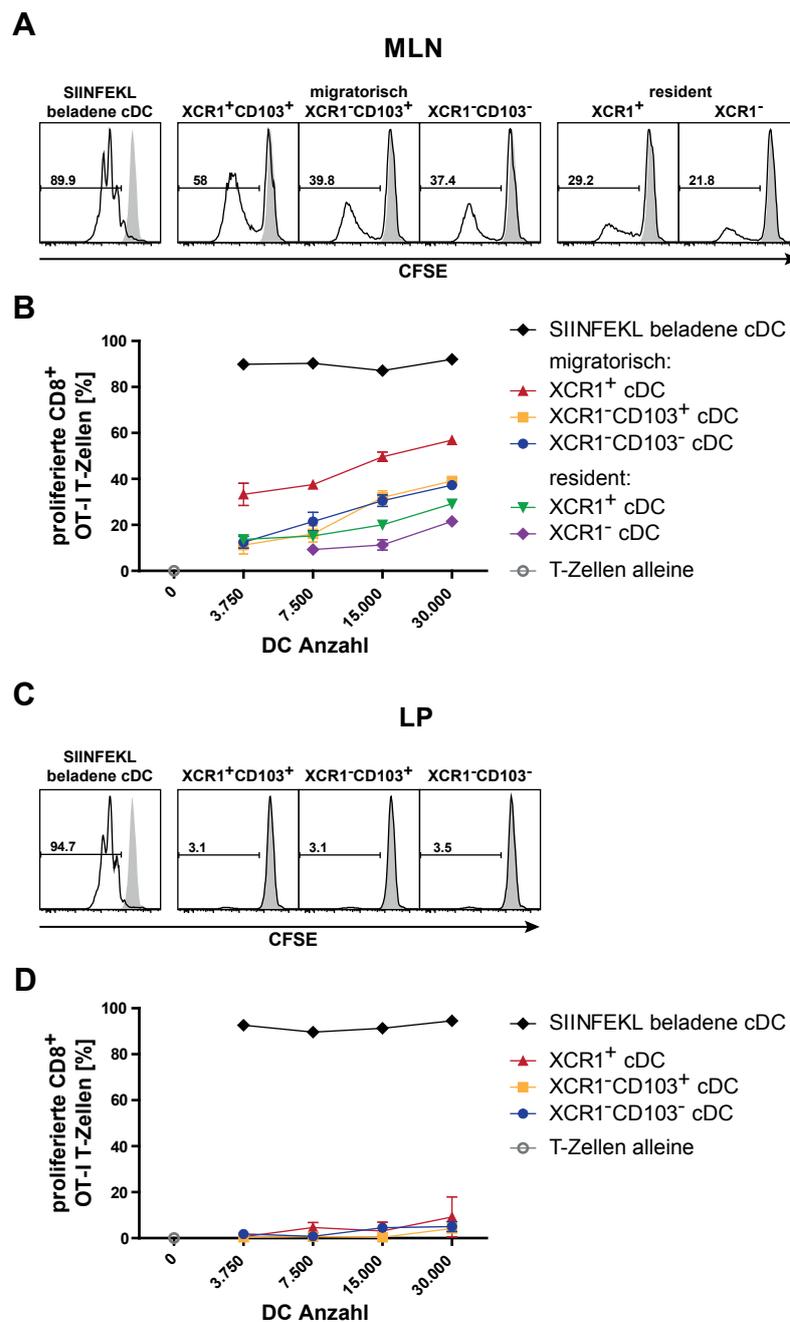


Abbildung 17 | XCR1-positive cDCs der mesenterialen Lymphknoten kreuzpräsentieren lösliches Antigen am besten. C57BL/6 WT Mäusen wurde jeweils 25 mg lösliches OVA oral verabreicht. Nach 17 h wurden DCs aus LP und MLN durch Verdau isoliert und mittels Dichtezentrifugation und CD11c-magnetischer Zellsortierung angereichert. Nach der anschließenden durchflusszytometrischen Zellsortierung wurden die hochreinen cDC-Subpopulationen für 2,5 d mit CFSE-markierten CD8⁺ OT-I T-Zellen kokultiviert. Als Positivkontrolle dienten mit OVA₂₅₇₋₂₆₄-Peptid (SIINFEKL) beladene cDCs. (**A**, **C**) Die Histogramme zeigen beispielhafte Proliferationsprofile der CD8⁺ OT-I T-Zellen, stimuliert durch den angegebenen cDC-Subtyp (schwarze Linie) im Vergleich zu unstimulierten T-Zellen (grau gefüllt). (**B**, **D**) Anhand des CFSE-Signals wurde der Anteil an proliferierten CD8⁺ OT-I T-Zellen (CFSE^{low}) ermittelt. Die gezeigten Resultate sind repräsentativ für vier unabhängige Experimente.

4.12 Die spezifische Beladung von cDCs über den Rezeptor XCR1 führt zu einer effektiven CD8⁺ T-Zellzytotoxizität *in vivo*

Da XCR1 im Gegensatz zu allen anderen bisher bekannten DC-Markern ausschließlich auf cDCs exprimiert wird, eröffnet dies die Möglichkeit eine Vakzine zu entwickeln, die Antigen selektiv in XCR1⁺ cDCs einschleust, um dadurch eine spezifische Immunantwort zu induzieren. Bis hierhin konnte demonstriert werden, dass XCR1⁺ cDCs im Gastrointestinaltrakt nicht nur den gleichen Phänotyp (CD8 α ⁺, Clec9a⁺, CADM1⁺, SIRP α ⁻) wie XCR1⁺ Zellen in lymphatischen Organen wie der Milz aufweisen, sondern in gleicher Weise Batf3-abhängig sind und ebenfalls eine erhöhte Fähigkeit zur Kreuzpräsentation besitzen. Aufgrund dieser Gemeinsamkeiten wurde eine Vakzinierungsstrategie zunächst nur in der Milz getestet.

Dazu wurden sowohl der rekombinante Antikörper gegen XCR1 (MARX10) als auch der rekombinante Ligand XCL1 – fusioniert mit dem Modellantigen OVA – verwendet. Um die Beladung XCR1⁺ cDCs mit dem Antigen nachzuweisen, wurde die Induktion der endogenen CD8⁺ T-Zellzytotoxizität in naiven Mäusen getestet. Hierzu erfolgte eine Immunisierung von C57BL/6 Mäusen mit verschiedenen Mengen reinen Proteins (OVA) bzw. mit den rekombinanten Fusionsproteinen MARX10-OVA resp. XCL1-OVA zusammen mit LPS. Nach 7 d wurde anhand des Verhältnisses von 18 h zuvor injizierten Zielzellen zu nicht-Zielzellen die Zytotoxizität *in vivo* ermittelt. Die injizierten Zielzellen imitieren in diesem Model infizierte bzw. entartete Zellen. Um die Spezifität der Beladung zu kontrollieren, wurden außerdem XCR1-defiziente B6.XCR1-lacZ^{+/+} Mäuse auf gleiche Weise behandelt und analysiert. Da diese Mäuse kein XCR1 exprimieren, sollte eine Beladung von cDCs mittels XCL1-OVA bzw. MARX10-OVA nicht möglich sein und somit keine Zytotoxizität induziert werden können.

In Abbildung 18 (A) ist beispielhaft aus jeder Immunisierungsgruppe der WT Mäuse ein CFSE-Profil der Zielzellen (CFSE^{high}) und Nicht-Zielzellen (CFSE^{low}) dargestellt. In der mit PBS immunisierten Maus (Kontrolle) war deutlich ein ausgewogenes Verhältnis von Nicht-Zielzellen zu Zielzellen zu erkennen. Die Immunisierung mit XCL1-OVA (Abbildung 18, B) führte zu einer deutlichen Reduktion der Zielzellen und somit zu einer errechneten spezifischen Lyse von im Mittel bis zu 80 %. Diese Wirksamkeit wurde durch die Immunisierung mit MARX10-OVA noch übertroffen (Abbildung 18, B), da hier mit deutlich weniger Antigen eine spezifische Lyse von bis zu 95 % erreicht wurde. Bei einem direkten Vergleich zeigte sich, dass MARX10-OVA etwa 14-fach effektiver war als XCL1-OVA. So induzierten 23,5 pmol XCL1-OVA eine 80-prozentige spezifische Lyse, wobei von MARX10-OVA zum Erreichen des gleichen Wertes nur 1,7 pmol benötigt wurden.

In beiden Fällen zeigte die Kontrolle in den XCR1-defizienten Mäusen (Abbildung 18, C), dass die Beladung der cDCs über den Rezeptor XCR1 sowohl mit XCL1-OVA, als auch mit MARX10-OVA spezifisch war. Durch die fehlende Expression von XCR1 wurde das Antigen nicht effektiv in kreuzpräsentierende cDCs aufgenommen, wodurch eine Induktion der Zytotoxizität ausblieb.

Die Potenz der zielgerichteten Beladung wurde anhand der Immunisierung mit dem ungekoppelten Protein OVA sichtbar (Abbildung 18, B). Hierbei induzierten selbst großen Mengen (70.000 pmol) des löslichen Proteins nur eine mäßige spezifische Lyse (~ 40 %). Ausgehend von den Mengen der Targetingreagenzien, die eine annähernd geringe Zytotoxizität induzierten (7,5 pmol XCL1-OVA bzw. 0,52 pmol MARX10-OVA) zeigte sich, dass die spezifische Beladung mittels XCL1-OVA etwa 10.000-fach und mittels MARX10-OVA mehr 100.000-fach effektiver war als die Applikation des ungekoppelten Proteins.

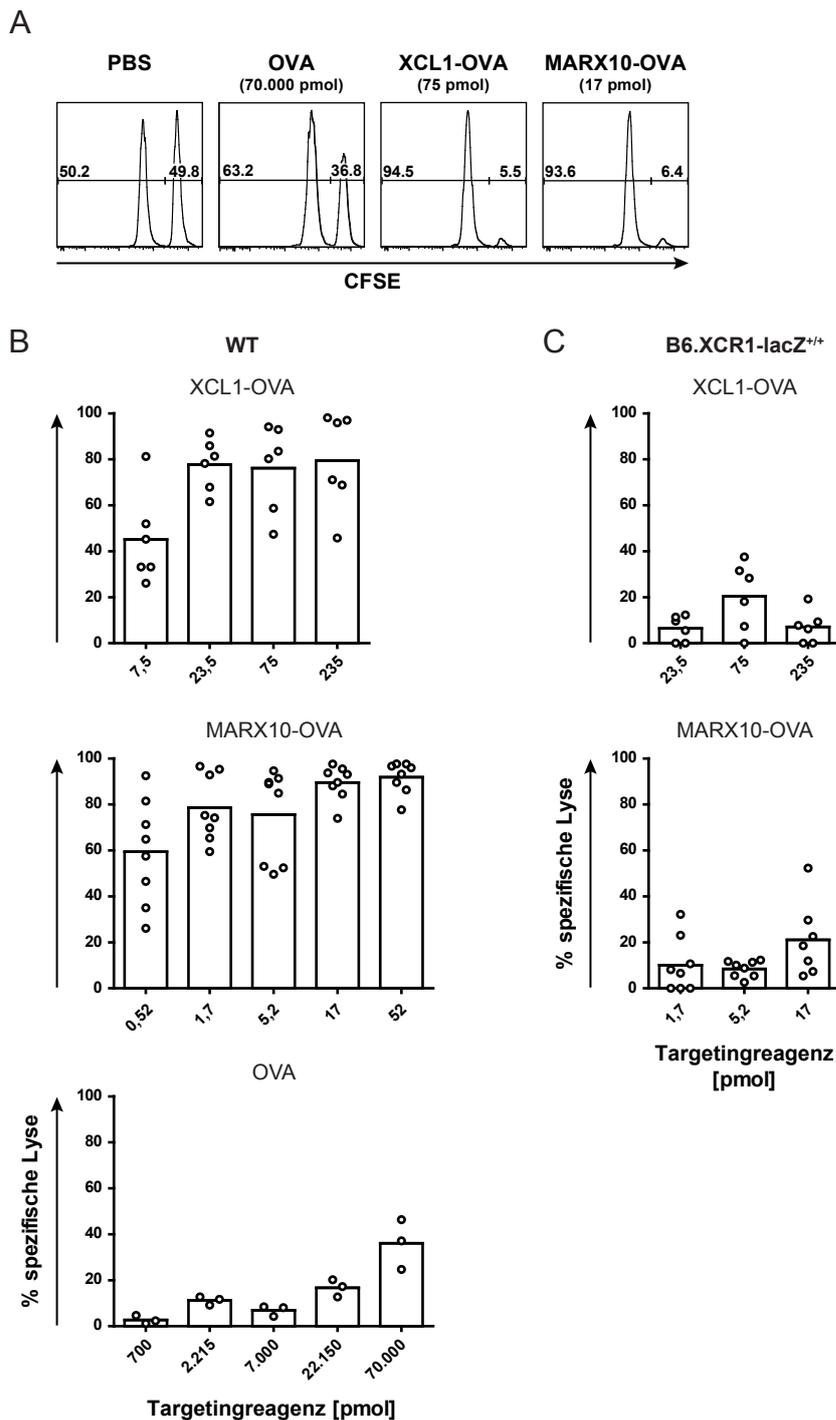


Abbildung 18 | MARX10-OVA und XCL1-OVA induzieren eine spezifische und effektive endogene CD8⁺ T-Zellzytotoxizität *in vivo*. Naive Mäuse wurden mit titrierten Mengen von XCL1-OVA, MARX10-OVA oder OVA zusammen mit 3 µg LPS i. v. immunisiert. Nach 6 d wurden syngene CFSE-markierte Zielzellen (CFSE^{high}) und Nicht-Zielzellen (CFSE^{low}) zu gleichen Teilen in die immunisierten Tiere transferiert. 18 h später erfolgte die Analyse der spezifischen Lyse ausgehend von dem Verhältnis der Zielzellen zu Nicht-Zielzellen. (A) CFSE-Profile von immunisierten bzw. Kontroll (PBS) Mäusen. Ergebnis der Immunisierung von C57BL/6 Mäusen (B) und zur Kontrolle der Spezifität von B6.XCR1-lacZ^{+/+} Mäusen (C). Gesammelte Daten aus drei unabhängigen Experimenten (B-E).

Im Gegensatz zu Mäusen reagieren Menschen deutlich sensitiver auf LPS. Beim Menschen reichen bezogen auf ein kg Körpergewicht deutlich geringere Mengen aus um Symptome wie plötzliches Fieber, Kopfschmerzen, Störung der Blutgerinnung bis hin zum Multiorganversagen mit Schock auszulösen. Um die Vakzinierungsstrategie zugänglicher für die Translation in das humane System zu machen, wurde daher mit poly I:C ein weiteres Adjuvans getestet, das für den Menschen verträglicher ist. Im Zusammenspiel mit XCL1-OVA bzw. MARX10-OVA induzierte poly I:C ebenfalls eine hoch potente Zytotoxizität (Abbildung 19). Bei dieser Kombination waren in beiden Fällen geringere Mengen an Antigen nötig um eine ähnlich hohe spezifische Lyse wie mit LPS zu induzieren: so konnte beispielsweise XCL1-OVA um die Hälfte und MARX10-OVA sogar um 2/3 der Menge reduziert werden.

Des Weiteren führte die Verabreichung der Reagenzien ohne Adjuvans zu einem völligen Ausbleiben der Zytotoxizität (Abbildung 19). Ohne einen inflammatorischen Stimulus kam es nicht zur Reifung der cDCs, wodurch das nötige zweite Signal zur T-Zellaktivierung ausblieb. Dabei induzierte selbst die drei- bis vierfache Menge MARX10-OVA bzw. XCL1-OVA keine effektive spezifische Lyse ohne Adjuvans.

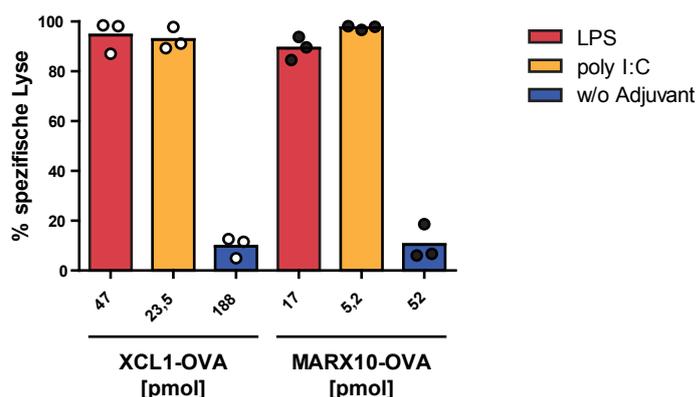


Abbildung 19 | Ohne Adjuvans wird keine effektive endogene CD8⁺ T-Zellzytotoxizität *in vivo* induziert. Naive C57BL/6 Mäuse wurden mit XCL1-OVA oder MARX10-OVA zusammen mit 3 µg LPS, 3 µg poly I:C oder ohne Adjuvans i. v. immunisiert. Nach 6 d wurden syngene CFSE-markierte Zielzellen (CFSE^{high}) und Nicht-Zielzellen (CFSE^{low}) zu gleichen Teilen in die immunisierten Tiere transferiert. 18 h später erfolgte die Analyse der spezifischen Lyse ausgehend von dem Verhältnis der Zielzellen zu Nicht-Zielzellen. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente (in jedem Experiment n = 3).

Durch die gezielte Beladung XCR1⁺ cDCs mittels XCL1 oder MARX10 kann somit die Menge des applizierten Antigens um ein Vielfaches reduziert werden. Dabei führt die Applikation geringer Mengen Antigens (z. B. 23,5 pmol XCL1-OVA oder 1,7 pmol MARX10-OVA) zusammen mit einem Adjuvans zur Aktivierung einer kleinen Anzahl endogener antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen. Die Aktivierung dieser T-Zellen ist dabei so effektiv, dass die dadurch entstehenden zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen in der Lage sind eine Vielzahl an Zielzellen (~1x10⁷) zu eliminieren. Da es sich bei dem verwendeten Antigen um ein Modelantigen handelt, sind weiterführende Versuche mit z. B. Virus- oder Tumorantigenen in den entsprechenden Modellen nötig, um die Wirksamkeit dieses Systems zu bestätigen.

5 Diskussion

Die Kreuzpräsentation von Antigenen ist ein wichtiger Mechanismus in der Induktion zytotoxischer CD8⁺ T-Zellantworten, um infizierte bzw. entartete Zellen zu eliminieren. Darüber hinaus spielt sie eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber harmlosen Antigenen, wie z. B. Selbstantigenen (Bedoui *et al.*, 2009). Im Mausmodell wurden bislang verschiedene Marker wie CD8 α , Clec9A, CD205 oder CD103 verwendet, um kreuzpräsentierende cDCs zu charakterisieren. Neuere Untersuchungen konventioneller DCs der Milz zeigten, dass XCR1 ein linienspezifischer Marker für kreuzpräsentierende cDCs ist, der auf keinem anderen Zelltyp exprimiert wird (Bachem *et al.*, 2012). Da die Expression von XCR1 auch auf weiteren Geweben der Maus nachgewiesen werden konnte, galt es zu untersuchen, ob XCR1 nicht nur in lymphatischen Organen wie der Milz, sondern auch in nicht-lymphatischen Geweben, wie dem Darm, ein Marker für kreuzpräsentierende cDCs darstellt.

Durch die unterschiedliche Kategorisierung intestinaler cDCs in verschiedenen Forschungsgruppen war eine eindeutige Zuweisung von Funktionen zu einzelnen cDC-Subtypen kaum möglich und dadurch ein Vergleich zu cDCs lymphatischer Organe beeinträchtigt. Eine Klassifizierung dendritischer Zellen mittels Marker, die in allen Organen/Geweben gleichermaßen exprimiert werden, würde einen Vergleich von cDCs über Organe bzw. Gewebe hinweg ermöglichen.

5.1 XCR1⁺ cDCs im Gastrointestinaltrakt

In dieser Arbeit ist es mit der systematischen Ausgrenzung von Makrophagen (F4/80⁺) sowie T- und B-Zellen (CD3⁺/B220⁺) gelungen cDCs ohne Verunreinigungen mit diesen Zelltypen, die sowohl CD11c als auch MHCII exprimieren können, zu analysieren. Wie wichtig es ist, dass einzelne Zelltypen in Untersuchungen klar definiert sind, verdeutlicht die jahrelange Diskussion um antigenaufnehmende CX₃CR1⁺ Zellen des Darmtrakts (Niess *et al.*, 2005; Schulz *et al.*, 2009). Mit der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Isolationsmethode ist es darüber hinaus gelungen, sowohl in der LP, als auch in den PP des Dünndarms deutlich vier Populationen (CD103⁻CD11b⁻; CD103⁺CD11b⁻; CD103⁺CD11b⁺ und CD103⁻CD11b⁺) zu isolieren. In der LP bildeten dabei die CD103⁺CD11b⁻ cDCs mit einem Drittel aller cDCs die zweitgrößte Subpopulation. Somit widerspricht dieser Befund Vermutungen, bei dieser Subpopulation handele es sich um PP cDCs (Bogunovic *et al.*, 2009; Ginhoux *et al.*, 2009). Dieser Schluss beruhte auf der Tatsache, dass in diesen Studien nur sehr wenige CD103⁺CD11b⁻ DCs detektiert wurden und man so davon ausging, diese Zellen würden aus „Verunreinigungen“ mit PP DCs entstammen. Allerdings weisen beide Publikationen ein klares Defizit in der Isolation aller CD11b⁻ DCs auf.

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, die Expression von XCR1 auf cDCs in allen untersuchten Kompartimenten (LP, PP und MLN) nachzuweisen. Wenngleich dabei der größte Teil der XCR1-Expression auf CD103⁺CD11b⁻ cDCs entfiel, waren XCR1⁺ cDCs nicht auf diese

Population beschränkt, sondern auch in geringem Maße innerhalb der CD103⁻CD11b⁻ (LP, migratorische und residente cDC des MLN) sowie der CD103⁻CD11b⁺ cDCs (residente cDCs des MLN) zu finden. Um zu untersuchen, ob sich CD103⁺ cDCs, die XCR1 exprimieren von denen unterscheiden, die kein XCR1 aufweisen und um zu untersuchen, ob es auch Unterschiede innerhalb der XCR1⁻ cDCs gibt, wurden die folgenden Analysen durch die Einteilung der cDCs anhand der Oberflächenmoleküle XCR1 und CD103 durchgeführt.

5.2 XCR1 kennzeichnet Batf3-abhängige cDCs

Bei den Untersuchungen zur phänotypischen und funktionellen Charakterisierung intestinaler XCR1⁺ cDCs zeigte sich, dass XCR1 nicht nur in der Milz (Bachem *et al.*, 2012), sondern auch im Darmtrakt eine eigenständige Subpopulation von cDCs markiert. Wie auch in der Milz ist eine Abhängigkeit intestinaler XCR1⁺ cDCs von dem Transkriptionsfaktor Batf3 feststellbar. Dabei kamen in den PP der Batf3-defizienten Mäuse XCR1⁺ cDCs nicht vor, wohingegen in LP und MLN kleine Restpopulationen verblieben. Ein Vergleich der phänotypischen Untersuchung XCR1⁺ cDCs im WT und der verbleibenden XCR1⁺ cDCs in Batf3 KO Mäusen weist jedoch darauf hin, dass es sich hierbei um veränderte Zellen handelt, die so im WT nicht zu finden sind. So waren in Batf3^{-/-} Mäusen im Gegensatz zu WT Mäusen z. B. XCR1⁺ cDCs zu detektieren, die weder CD8 α noch CADM1 oder Itga8, dafür jedoch CD11b exprimierten. Dass die in Batf3^{-/-} Mäusen verbleibenden XCR1⁺ cDCs „verändert/unnatürlich“ sind, wird durch Befunde von Hildner *et al.* bestätigt, da CD8 α ⁺ cDCs in Batf3 KO Mäusen nicht durch Flt3 Ligand expandieren und auch die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation dieser Population beeinträchtigt ist (Hildner *et al.*, 2008).

Die erhaltenen Resultate ergänzen und konkretisieren somit die bisherigen Befunde, dass CD103⁺CD11b⁻ cDCs der LP Batf3-abhängig sind (Edelson *et al.*, 2010). Da die Expression von XCR1 im Darmtrakt vergleichbar wie in der Milz mit dem Oberflächenmolekül CD8 α korreliert, können die Ergebnisse mit Resultaten aus der Literatur zu lymphatischen Organen verglichen werden. Es bestätigt sich damit, dass nicht alle CD8 α ⁺ cDCs (Hildner *et al.*, 2008), nämlich nicht CD8 α ⁺CX₃CR1⁺ cDCs (Bar-On *et al.*, 2010), sondern nur XCR1⁺ cDCs (Bachem *et al.*, 2012), von dem Transkriptionsfaktor Batf3 abhängig sind.

Darüber hinaus zeigten sich bei der phänotypischen Analyse Gemeinsamkeiten zu XCR1⁺ cDCs lymphatischer, als auch nicht-lymphatischer Organe (Gurka *et al.*, 2014), in dem intestinale XCR1⁺ cDCs ebenfalls CD205, Clec9A, CADM1 und CD103 exprimieren. Wie auch in der Milz (Bachem *et al.*, 2012) sind auf XCR1⁺ cDCs aus LP, PP und MLN weder DCIR2 noch SIRP α vorhanden.

Wenngleich intestinale cDCs bis hierhin deutliche Gemeinsamkeiten mit cDCs aus der Milz aufweisen, ist hinsichtlich der Expansion XCR1⁺ cDCs durch den Wachstumsfaktor Flt3 Ligand ein Unterschied erkennbar. Bislang war bekannt, dass durch die Behandlung mit Flt3 Ligand alle cDCs expandieren (Maraskovsky *et al.*, 1996; Waskow *et al.*, 2008). In der Milz konnte jedoch

demonstriert werden, dass diese Vermehrung nahezu ausschließlich auf XCR1⁺ cDCs (Bachem *et al.*, 2012) und nicht auf CD8 α ⁺CX₃CR1⁺ cDCs (Bar-On *et al.*, 2010) zurückzuführen ist. Innerhalb der intestinalen cDCs expandierten hingegen alle Subtypen nach der Behandlung mit dem Wachstumsfaktor, wobei sowohl in LP, als auch in PP und MLN XCR1⁺CD103⁻ cDCs die wachstumsstärkste Subpopulation darstellten. Da diese Zellen in der unbehandelten Maus kaum zu finden sind, legt dies die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um Vorläuferzellen handelt, die sich beispielsweise in intestinale XCR1⁺CD103⁺ cDCs entwickeln.

Somit konnte erstmalig demonstriert werden, dass XCR1⁺ cDCs des Intestinaltraktes eine eigenständige Subpopulation darstellen, die von dem Wachstumsfaktor Flt3 Ligand und selektiv von dem Transkriptionsfaktor Batf3 abhängig sind.

5.3 XCR1⁺ cDCs sind in der Nähe von T-Zellen lokalisiert

Der Befund, dass XCR1⁺ Zellen in den PP weder in der subepithelialen Kuppelregion (SED) noch im Bereich der B-Zellfollikel, sondern in den interfollikulären Regionen (IFR) zu finden sind, ergänzt bisherige Erkenntnisse: Kelsall und Strober konnten CD11c⁺ Zellen sowohl im SED als auch in den IFR detektieren (Kelsall und Strober, 1996). Außerdem wurden Signale von CD205⁺ Zellen vorwiegend und von CD8 α ⁺ Zellen ausschließlich in den IFR detektiert. Im SED detektierte man neben CD11c⁺ Zellen auch Signale von MHCII und CD11b, wobei eine Expression durch T- und B-Zellen ausgeschlossen werden konnte. Durch Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen zeigte die gleiche Gruppe später auf, dass CD11c⁺CD11b⁺ Zellen nur im SED und CD11c⁺CD8 α ⁺ bzw. CD11c⁺CD205⁺ Zellen teilweise im SED, aber vor allem in den T-zellreichen IFR zu finden sind (Iwasaki und Kelsall, 2000). Da XCR1⁺ Zellen in der vorliegenden Arbeit nicht im SED nachgewiesen werden konnten, könnte es sich bei den gefundenen CD11c⁺CD8 α ⁺ Zellen im SED um CD8 α ⁺ cDCs handeln, die kein XCR1 exprimieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte darüber hinaus erstmalig gezeigt werden, dass XCR1⁺ cDCs des Dünndarm ausschließlich in der LP der Zotten lokalisiert sind. An gleicher Position konnten bislang nur CD11c⁺CD103⁺ Zellen (Johansson-Lindbom *et al.*, 2005; Schulz *et al.*, 2009) und CD11c⁺MHCII⁺CD103⁺ Zellen (Jaensson *et al.*, 2008), sowie CD11c⁺CD11b⁻ Zellen (Jang *et al.*, 2006) detektiert werden.

Im Gegensatz zu SIRP α ⁺ Zellen, die sich vorwiegend in B-Zellbereichen der MLN aufhalten (Turnbull *et al.*, 2005), waren XCR1⁺ Zellen – ähnlich wie in der Milz (Dorner *et al.*, 2009; Bachem *et al.*, 2012) – im Bereich der T-Zellzonen zu finden.

In den PP scheint es, als ob die Positionierung XCR1⁺ cDCs durch die XCR1-XCL1-Achse unterstützt würde. Sowohl in den XCR1-defizienten, als auch in den XCL1-defizienten Mäusen, war der Anteil CD8 α ⁺ cDCs an allen cDCs im Vergleich zu WT Mäusen halbiert. Dass dieser Zustand in der Histologie nicht auffällt, könnte darauf zurückzuführen sein, dass dieses Ungleichgewicht durch eine insgesamt erhöhte Zellzahl in den defizienten Mäusen in dem entsprechenden Kompartiment kompensiert wird. Weder auf die Positionierung XCR1⁺ cDCs in

der LP noch in den MLN hat das Fehlen von XCR1 im Ruhezustand einen Einfluss, wie der histologische Vergleich heterozygoter und homozygoter B6.XCR1-lacZ Mäuse verdeutlichte. Dieses Ergebnis wird auch durch die durchflusszytometrische Analyse bestätigt, da hier in beiden KO Stämmen kein deutlicher Unterschied in der Zusammensetzung der cDCs im Vergleich zum WT feststellbar war.

5.4 LPS induziert die Migration von intestinalen XCR1⁺ cDCs

Durch den inflammatorischen Stimulus LPS zeigte sich in den PP in der Frequenz der CD8 α ⁺ cDCs ein unverändertes Bild in allen Mausstämmen im Vergleich zu den unbehandelten Mäusen. Dieser Befund bestätigt die Entdeckung von Anjuère *et al.*, die zeigen konnten, dass DCs der PP im Gegensatz zu DCs aus LP und MLN unempfindlich gegenüber einem inflammatorischem Stimulus sind (Anjuère *et al.*, 2004). Des Weiteren stellten auch Turnbull *et al.*, keine Veränderung der PP DCs nach einer i. v. Injektion von LPS fest (Turnbull *et al.*, 2005).

Durch die Inflammation kam es in der LP von XCR1 KO Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen zu einer erhöhten Reduktion CD8 α ⁺ cDCs, die nicht nur anhand der Frequenz und Zellzahl, sondern auch an der Abwesenheit XCR1⁺ Zellen in den Zotten des Dünndarms erkennbar ist. Das Fehlen von XCL1 hatte im Vergleich zum WT hingegen in der LP keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der cDCs.

In allen analysierten Mausstämmen zeigte sich insgesamt ein deutlicher Rückgang CD8 α ⁺ cDCs durch die Behandlung mit LPS und gleichzeitig eine starke Zunahme CD8 α ⁺ cDCs in den MLN. Dies unterstützt bisherige Befunde, in denen gezeigt werden konnte, dass DCs auf einen inflammatorischen Stimulus hin von der LP über die Lymphe zu MLN migrieren (MacPherson *et al.*, 1995; Anjuère *et al.*, 2004; Turnbull *et al.*, 2005; Schulz *et al.*, 2009). Im MLN beruht die Zunahme CD8 α ⁺ cDCs auf der Akkumulation XCR1⁺ Zellen in den T-Zellzonen, was Turnbull *et al.*, als Ansammlung MHCII⁺ Zellen zeigten (Turnbull *et al.*, 2005).

Verschiedene Arbeiten wiesen bereits darauf hin, dass die Expression des Chemokinrezeptors CCR7 für die Migration der DCs aus LP zu den MLN essentiell ist (Johansson-Lindbom *et al.*, 2005; Worbs *et al.*, 2006; Schulz *et al.*, 2009). Wenngleich Jang *et al.* eine deutliche CCR7 Expression auf mRNA Ebene in LP DCs nachweisen konnten, entspricht die von ihnen detektierte schwache Proteinexpression (Jang *et al.*, 2006) im Wesentlichen den in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnissen. Dabei zeigte sich, dass die geringe CCR7-Expression auf den cDCs der LP auf XCR1⁺ cDCs beschränkt war. Verglichen mit den Ergebnissen von Worbs *et al.*, die anhand von CCR7 KO Mäusen demonstrierten, dass CCR7 nicht für die Ansässigkeit von DCs in der LP benötigt wird (Worbs *et al.*, 2006), lässt sich vermuten, dass es sich bei den CCR7⁺XCR1⁺ LP cDCs um einen migratorischen Typ handelt. Diese brauchen zwar kein CCR7, um in die LP einzuwandern, stellen aber evtl. migratorische cDCs dar, die zur Toleranzvermittlung im Ruhezustand CCR7 zur Auswanderung aus der LP benötigen. Die kaum vorhandene CCR7-Expression auf cDCs der PP widerspricht hingegen der Detektion

von CCR7 im Bereich der IFR durch Iwasaki und Kelsall (2000). Die hohe Expression von CCR7 auf XCR1⁺ cDCs im MLN im Ruhezustand, aber auch auf LP, PP und MLN nach Inflammation, unterstützt die Theorie eines bevorzugt migratorischen Typs XCR1⁺ cDCs. Beim Vergleich der cDCs der LP und der PP nach Inflammation werden neben der beiderseits bevorzugt auf MHCII^{high} cDCs auftretenden CCR7-Expression auch Unterschiede deutlich: Im Gegensatz zu den cDCs der PP, bei denen ausgenommen der MHCII^{int}-Population alle Zellen CCR7 exprimierten, war die Expression in der LP nur auf einen Teil der MHCII^{high}XCR1⁺ und MHCII^{high}XCR1⁻ cDCs beschränkt. Wenngleich in verschiedenen Publikationen vermutet wird, dass die zu den MLN migrierenden DCs aus der LP stammen, stützen diese Befunde hingegen eher die Annahme von Macpherson und Uhr, dass DCs nicht aus der LP, sondern von den PP zu den MLN migrieren (Macpherson und Uhr, 2004). Unterstützend kommt hinzu, dass das CCR7-Expressionsmuster der PP cDCs bei Inflammation dem der MLN cDCs entsprach, wobei die MHCII^{int} CCR7⁻ Population einen residenten Zelltyp wie im Ruhezustand der MLN darstellen mag. Ob die im MLN akkumulierenden cDCs aus der LP oder den PP stammen, könnte letztendlich nur anhand von Mäusen geklärt werden, die keine PP entwickeln.

Unabhängig von der Frage, woher die antigentransportierenden cDCs letztendlich stammen, konnte bisher demonstriert werden, dass CCR7 und seine Liganden benötigt werden, um Toleranz in den MLN zu induzieren (Worbs *et al.*, 2006). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass CD103⁺ cDCs der MLN für die Differenzierung CD4⁺ T-Zellen in regulatorische T-Zellen verantwortlich sind (Annacker *et al.*, 2005; Coombes *et al.*, 2007). In wie weit unterschiedliche intestinale cDC-Subpopulationen hingegen in der Lage sind *in vivo* aufgenommenes Antigen kreuzpräsentieren, wurde bislang kaum analysiert.

5.5 Intestinale migratorische XCR1⁺ cDCs sind effektiv in der Kreuzpräsentation löslichen Antigens

Da bis hierhin gezeigt werden konnte, dass intestinale XCR1⁺ cDCs in vielerlei Hinsicht mit XCR1⁺ cDCs der Milz vergleichbar sind, lag die Annahme nicht fern, dass dies auch für die Funktion gelten könnte. XCR1⁺ cDCs der Milz zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, lösliches sowie zellgebundenes Antigen effektiv kreuzpräsentieren (Bachem *et al.*, 2012).

Mit der vorliegenden Arbeit wird deutlich, dass auch intestinale XCR1⁺ cDCs in der Lage sind lösliches Antigen kreuzpräsentieren. Diese Fähigkeit konnte nur bei cDCs des MLN, nicht jedoch derer der LP festgestellt werden. Dabei war die Kreuzpräsentation löslichen Antigens nicht auf XCR1⁺ cDCs der MLN beschränkt. Migratorische XCR1⁺ cDCs waren hierbei zwar am effektivsten, dennoch waren auch alle anderen cDCs der MLN in der Lage, lösliches Antigen CD8⁺ T-Zellen zu präsentieren. Damit widersprechen die Befunde denen von Jaensson *et al.* Hier wurde demonstriert, dass ausschließlich CD103⁺ cDCs der MLN, nicht jedoch CD103⁻ cDCs, in der Lage sind oral appliziertes lösliches Antigen kreuzpräsentieren, wobei nicht zwischen migratorischen und residenten cDCs unterschieden wurde (Jaensson *et al.*, 2008).

In der Milz gibt es zwischen den cDC-Subtypen nur einen leichten Unterschied in der Kreuzpräsentation löslichen Antigens, wohingegen zellassoziertes Antigen deutlich ausschließlich von XCR1⁺ cDCs kreuzpräsentiert wird (Bachem *et al.*, 2012). Dass es sich mit intestinalen cDCs ähnlich verhält, kann anhand der hier gezeigten Kreuzpräsentation löslichen Antigens und kürzlich publizierter Daten über die Präsentation zellassozierten Antigens geschlossen werden: die Präsentation zellassozierten Antigens an CD8⁺ T-Zellen ist ausschließlich beschränkt auf intestinale migratorische CD103⁺CD11b⁻ cDCs, die XCR1 exprimieren (Cerovic *et al.*, 2015).

Die Fähigkeit der CD8 α ⁺ (XCR1⁺) cDCs zur Kreuzpräsentation von zellassoziertem Antigen wird in der Milz durch ihre Möglichkeit sterbende Zellen aufzunehmen begründet (Iyoda *et al.*, 2002; Schulz und Reis e Sousa, 2002). Förderlich wirkt sich dabei die Expression des Phagozytorezeptors DEC-205 (CD205) sowie des C-Typ Lectins Clec9A (DNDR-1) auf XCR1⁺ cDCs aus. Von letzterem wurde beispielsweise belegt, dass es an Actinfilamente bindet, die von apoptotischen und nekrotischen Zellen exponiert werden (Zhang *et al.*, 2012; Ahrens *et al.*, 2012).

Übertragen auf intestinale cDCs kann dieser Befund erklären, warum sich bei den cDCs der LP keine Kreuzpräsentationskapazität feststellen ließ. Im Gegensatz zu cDCs aus PP und MLN war eine Expression von Clec9A kaum nachweisbar. Zwar handelt es sich bei dem applizierten Antigen nicht um zellassoziertes Antigen, weshalb eine Clec9A-Expression nicht zwingend erforderlich wäre. Dennoch könnte die Expression dieses Lectinrezeptors nötig sein, um Antigen aufzunehmen. So konnte im Darm der Maus belegt werden, dass nicht CD103⁺ cDCs lösliches Antigen aufnehmen, sondern CX₃CR1⁺ Phagozyten. Die Präsentation des Antigens im MLN erfolgt jedoch nicht durch CX₃CR1⁺ Phagozyten, sondern durch CD103⁺ cDCs (Schulz *et al.*, 2009). Für die bisweilen nicht belegte Übertragung des Antigens von CX₃CR1⁺ Zellen auf kreuzpräsentierende cDCs könnte somit die Expression von Clec9A von Vorteil sein.

Andererseits konnten Cerovic *et al.* kürzlich zeigen, dass neben migratorischen CD103⁺CD11b⁻ cDCs der MLN auch CD103⁺CD11b⁻ cDCs der LP in der Lage sind, zellassoziertes Antigen kreuzupräsentieren (Cerovic *et al.*, 2015). Darüber hinaus stellten sie fest, dass CD103⁺CD11b⁻ cDCs aus der Darmlymphe ebenfalls effizient zellassoziertes Antigen kreuzpräsentieren. Dabei geht man davon aus, dass cDCs, die in der Darmlymphe gefunden werden, der LP entstammen. Die Kapazität solcher aus der Darmlymphe stammenden cDCs zur Aufnahme zellassozierten Antigens konnte auch in Ratten demonstriert werden (Huang *et al.*, 2000). Hierbei wurden die cDCs in SIRP α ⁺ und SIRP α ⁻ unterteilt und es zeigte sich, dass nur SIRP α ⁻ cDCs Einschlüsse apoptotischer intraepithelialer Zellen aufwiesen. In der vorliegenden Arbeit stellte sich durch die phänotypische Untersuchung muriner intestinaler cDCs heraus, dass SIRP α ⁺ cDCs kein XCR1 exprimieren und *vice versa* XCR1⁺ cDCs keine SIRP α -Expression aufweisen. Aufgrund dieser Erkenntnis kann darauf geschlossen werden, dass es sich bei den von Huang *et al.* in Ratten entdeckten SIRP α ⁻ cDCs um das entsprechende Pendant zu murinen XCR1⁺ cDCs handelt.

5.6 Universelle Klassifikation der Subtypen konventioneller dendritischer Zellen mittels XCR1 und SIRP α

Die von Huang *et al.* detektierten Einschlüsse apoptotischer intraepithelialer Zellen waren neben den cDCs der Darmlympe auch in cDCs der LP, PP und MLN zu finden (Huang *et al.*, 2000). Zusammen mit dem Nachweis über die Kreuzpräsentationsfähigkeit zellgebundenen Antigens durch CD103⁺CD11b⁻ cDCs der LP (Cerovic *et al.*, 2015), lässt sich damit schlussfolgern, dass auch XCR1⁺ cDCs nicht-lymphatischer Gewebe kreuzpräsentierende Zellen darstellen. Dadurch ist es möglich, XCR1 universell in der Maus als Marker kreuzpräsentierender Zellen einzusetzen und nicht-kreuzpräsentierende cDCs über die Expression von SIRP α zu definieren.

Eine neue Klassifikation von cDC-Subtypen anhand der Oberflächenmoleküle XCR1 und SIRP α (Abbildung 20) erweist sich in vielerlei Hinsicht als vorteilhaft gegenüber der bisher verwendeten: i) XCR1 und SIRP α werden sowohl in lymphatischen Organen, wie Thymus, Milz und Lymphknoten, als auch in nicht-lymphatischen Geweben, wie Darm und Lunge, unabhängig von ihrem Aktivierungsstatus exprimiert (Gurka *et al.*, 2015). ii) Im Gegensatz dazu ist CD8 α nicht auf cDCs der Lunge, des Dickdarm oder der migratorischen cDCs des mediastinalen Lymphknotens zu detektieren (Gurka *et al.*, 2014). iii) CD103 erweist sich ebenfalls nicht als idealer Marker, da es durch verschiedenen Zytokine, wie etwa GM-CSF dynamisch reguliert wird (Edelson *et al.*, 2011). iv) Eine allgemeine Unterteilung cDCs nicht-lymphatischer Gewebe in CD103⁺ und CD11b⁺ scheitert darüber hinaus an Geweben wie z. B. Darm und Lunge, in denen CD11b⁺ cDCs zu finden sind, die CD103 exprimieren (Edelson *et al.*, 2010).

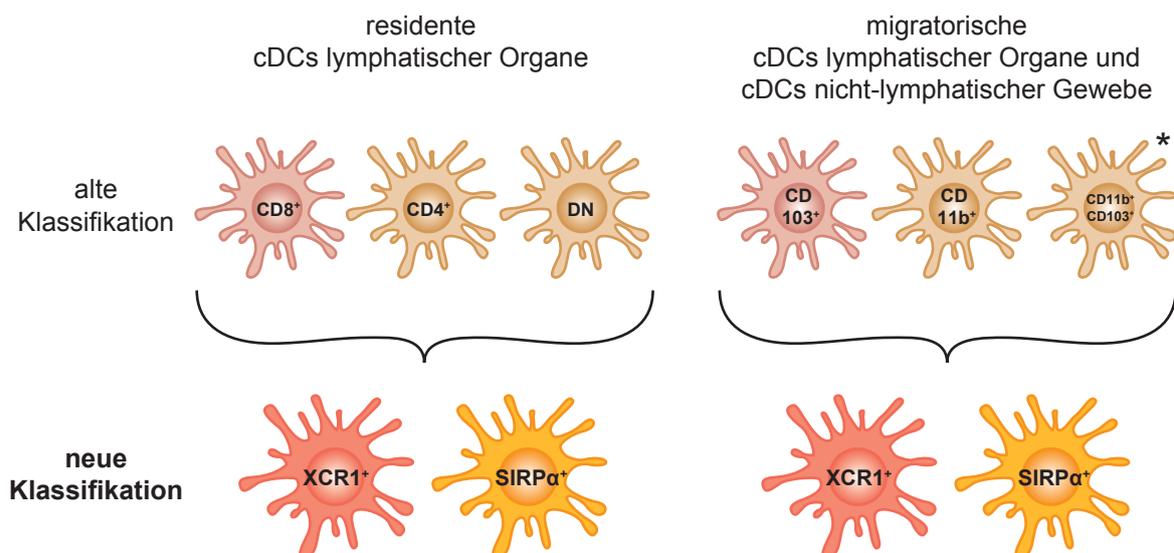


Abbildung 20 | Vorschlag zur Klassifizierung der Subtypen konventioneller dendritischer Zellen. Sowohl in lymphatischen Organen als auch in nicht-lymphatischen Geweben sind XCR1⁺ cDCs deutlich von SIRP α ⁺ cDCs trennbar. Neben phänotypischen Unterschieden grenzen sich XCR1⁺ cDCs auch durch ihre Batf3-Abhängigkeit, sowie die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation klar von SIRP α ⁺ cDCs ab. Eine neue Klassifizierung von cDC-Subtypen anhand der Oberflächenmoleküle XCR1 und SIRP α ist universell gültig und somit von Vorteil gegenüber der bisherigen Klassifikation. * Vorkommen nur in wenigen Geweben belegt, wie z. B. Darm und Lunge.

Die Unterteilung von cDCs anhand der Moleküle XCR1 und SIRP α erweist sich dabei nicht nur in der Maus als sinnvoll. Sowohl XCR1 als auch SIRP α sind des Weiteren in anderen Säugtieren wie in Schafen und in Menschen zu finden (Crozat *et al.*, 2010; Contreras *et al.*, 2010). Neben der Expression von XCR1 und SIRP α auf cDCs des humanen peripheren Blutes, konnte deren Expression auch auf humanen intestinalen cDCs nachgewiesen werden (Watchmaker *et al.*, 2014). Darüber hinaus gilt XCR1 auch in Schaf und Mensch als Marker kreuzpräsentierender cDCs (Crozat *et al.*, 2010; Bachem *et al.*, 2010).

In dieser Arbeit konnte zum ersten mal gezeigt werden, dass XCR1⁺ cDCs durch einen inflammatorischen Stimulus vom Dünndarm in die T-Zellzonen des MLN migrieren. Darüber hinaus verdeutlichte sich, dass XCR1 ein linienspezifischer Marker für kreuzpräsentierende cDCs darstellt und somit eine neue universelle Klassifikation von cDCs-Subtypen ermöglicht.

5.7 Zielgerichtete Beladung XCR1⁺ cDCs als neue Impfstrategie

Die Wirkung bislang verwendeter präventiver Impfungen beruht auf der Bildung spezifischer Antikörper und B-Gedächtniszellen, wodurch die Verbreitung von Infektionen verhindert wird (Pulendran und Ahmed, 2011). Gegen viele Krankheiten konnten allerdings bis heute noch keine effektiven Vakzinen entwickelt werden. Ist eine Krankheit ausgebrochen, kommen im besten Fall noch therapeutische Impfungen zum Einsatz, um die Ursache der Krankheit zu eliminieren. Doch auch hierbei stößt die Medizin bisweilen bei einigen Erkrankungen an ihre Grenzen, wie z. B. Malaria, HIV oder Tumorerkrankungen. Zur Bekämpfung solcher Krankheiten ist die Entwicklung antigenspezifischer zytotoxischer T-Zellen notwendig, die in der Lage sind, infizierte bzw. entartete Zellen zu erkennen und zu eliminieren. DCs spielen dabei in der Aktivierung solcher zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen eine entscheidende Rolle, weshalb sie in der Vergangenheit immer häufiger Ziel für Vakzinierungen gegen Tumore und intrazelluläre Pathogene wurden (Apostolopoulos *et al.*, 2013). Im Gegensatz zur *ex vivo* Generierung und Antigenbeladung von DCs (Palucka und Banchereau, 2012), erwies sich die zielgerichtete Beladung von DCs *in vivo* als deutlich kostengünstiger und effektiver (Tacke und Figdor, 2011; Trumpfeller *et al.*, 2012).

Die selektive Expression von XCR1 auf kreuzpräsentierenden cDCs (Ergebnisse dieser Arbeit und Dorner *et al.*, 2009; Crozat *et al.*, 2010; Bachem *et al.*, 2012), macht XCR1 zu einem idealen Ziel für eine spezifische Antigenbeladung selbiger. In der vorliegenden Arbeit konnte erfolgreich demonstriert werden, dass sowohl mittels des spezifischen Antikörpers gegen XCR1 (MARX10), als auch mit Hilfe des natürlichen Liganden von XCR1 (XCL1) eine zielgerichtete spezifische Beladung kreuzpräsentierender cDCs möglich ist. Geringe Mengen des Antigens reichten aus, um mit Hilfe der kreuzpräsentierenden Zellen ein sehr kleines Reservoir an antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen zu aktivieren und damit eine effiziente zytotoxische Immunantwort zu induzieren. Dabei erwies sich die Immunisierung mit XCL1-OVA etwa 10.000-fach und mit MARX10-OVA mehr als 100.000-fach effektiver als die Injektion des ungekoppelten

Proteins OVA. Das Ausbleiben einer zytotoxischen Immunantwort in XCR1-defizienten Mäusen verdeutlicht überdies, dass sowohl MARX10-OVA, als auch XCL1-OVA nur von XCR1-tragenden cDCs aufgenommen und effektiv CD8⁺ T-Zellen präsentiert wird.

Zwar konnte bisher auch beispielsweise über Clec9A (Caminschi *et al.*, 2008; Sancho *et al.*, 2008; Lahoud *et al.*, 2011), CD205 (Bonifaz *et al.*, 2002; Dudziak *et al.*, 2007) oder CD103 (Semmrich *et al.*, 2012) eine Antigenbeladung kreuzpräsentierender cDCs erreicht werden, die zu einer effektiven Immunantwort führt. Doch können durch die nicht selektive Expression dieser Oberflächenmoleküle auf kreuzpräsentierenden cDCs hierbei unerwünschte Nebeneffekte nicht ausgeschlossen werden. So kann z. B. eine erhöhte Applikation des Antigens notwendig sein, da andere Zellen, die das gleiche Molekül exprimieren, das Antigen unerwünscht abfangen. Darüber hinaus könnten etwa B-Zellen, die ebenfalls CD205 exprimieren, solche zielgerichteten Antigene aufnehmen und eine Toleranz induzieren, wodurch die Effektivität der Vakzinierung herab gesetzt würde.

Im Gegensatz zu einer Antigenbeladung kreuzpräsentierender cDCs mittels Antikörper gegen Clec9A, bei der auch ohne Adjuvans eine humorale Immunantwort induziert wird (Li *et al.*, 2014), bedarf es bei der Beladung über XCR1 solch eines Stimulus. Weder XCL1 noch der mAk anti-XCR1 bewirken per se eine Aktivierung XCR1⁺ cDCs (Hartung *et al.*, 2014). Das macht die Zugabe eines Adjuvans erforderlich, um die entsprechenden cDCs zu aktivieren und dadurch eine zytotoxische T-Zellantwort zu induzieren. Die Tatsachen, dass poly I:C in gleicher Weise wie LPS eine effektive Immunantwort fördert und XCR1 auch auf humanen cDCs exprimiert wird, eröffnet die Möglichkeit, diese Strategie der zielgerichteten Beladung kreuzpräsentierender cDCs auf das System des Menschen zu übertragen.

In Abwesenheit von Adjuvanzen sind cDCs befähigt, durch die Aktivierung von regulatorischen T-Zellen Toleranz zu induzieren (Yamazaki *et al.*, 2003). Diese Fähigkeit wurde neben CD8⁺CD205⁺ cDCs der Milz (Yamazaki *et al.*, 2008) auch bei intestinalen CD103⁺ cDCs entdeckt (Annacker *et al.*, 2005). Damit ergäbe sich durch die gezielte Beladung XCR1⁺ cDCs zusammen mit Adjuvanzen nicht nur die Möglichkeit Impfstoffe gegen intrazelluläre Pathogene wie HIV und Malaria oder gar gegen Tumore zu entwickeln. Darüber hinaus könnte getestet werden, in wie weit eine gezielte Antigenbeladung XCR1⁺ cDCs ohne Adjuvans eine Toleranz induziert, um somit Autoimmunerkrankungen wie etwa chronisch entzündliche Darmerkrankungen zu behandeln.

6 Literaturverzeichnis

- Ahrens S, Zelenay S, Sancho D, Hanč P, Kjær S, Feest C, Fletcher G, Durkin C, Postigo A, Skelhel M, Batista F, Thompson B, Way M, Reis e Sousa C, Schulz O (2012) F-actin is an evolutionarily conserved damage-associated molecular pattern recognized by DNCR-1, a receptor for dead cells. *Immunity* **36** (4), 635–645.
- Alexopoulou L, Holt A C, Medzhitov R, Flavell R A (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature* **413** (6857), 732–738.
- Anjuère F, Luci C, Lebens M, Rousseau D, Hervouet C, Milon G, Holmgren J, Ardavin C, Czerkinsky C (2004) *In vivo* adjuvant-induced mobilization and maturation of gut dendritic cells after oral administration of cholera toxin. *J. Immunol.* **173** (8), 5103–5111.
- Annacker O, Coombes J L, Malmstrom V, Uhlig H H, Bourne T, Johansson-Lindbom B, Agace W W, Parker C M, Powrie F (2005) Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis. *J. Exp. Med.* **202** (8), 1051–1061.
- Apostolopoulos V, Thalhammer T, Tzakos A G, Stojanovska L (2013) Targeting antigens to dendritic cell receptors for vaccine development. *J. Drug. Deliv.* **2013**, 869718.
- Bachem A, Güttler S, Hartung E, Ebstein F, Schaefer M, Tannert A, Salama A, Movassaghi K, Opitz C, Mages H W, Henn V, Kloetzel P-M, Gurka S, Kroczeck R A (2010) Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c⁺CD141⁺ cells as homologues of mouse CD8⁺ dendritic cells. *J. Exp. Med.* **207** (6), 1273–1281.
- Bachem A, Hartung E, Güttler S, Mora A, Zhou X, Hegemann A, Plantinga M, Mazzini E, Stoitzner P, Gurka S, Henn V, Mages H W, Kroczeck R A (2012) Expression of XCR1 characterizes the Batf3-dependent lineage of dendritic cells capable of antigen cross-presentation. *Front. Immunol.* **3**, 214.
- Banchereau J, Steinman R M (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392** (6673), 245–252.
- Bar-On L, Birnberg T, Lewis K L, Edelson B T, Bruder D, Hildner K, Buer J, Murphy K M, Reizis B, Jung S (2010) CX₃CR1⁺ CD8 α ⁺ dendritic cells are a steady-state population related to plasmacytoid dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107** (33), 14745–14750.
- Bedoui S, Whitney P G, Waithman J, Eidsmo L, Wakim L, Caminschi I, Allan R S, Wojtasiak M, Shortman K, Carbone F R, Brooks A G, Heath W R (2009) Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103⁺ dendritic cells. *Nat. Immunol.* **10** (5), 488–495.

- Bevan M J (1976) Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J. Exp. Med.* **143** (5), 1283–1288.
- Bogunovic M, Ginhoux F, Helft J, Shang L, Hashimoto D, Greter M, Liu K, Jakubzick C, Ingersoll M A, Leboeuf M, Stanley E R, Nussenzweig M, Lira S A, Randolph G J, Merad M (2009) Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity* **31** (3), 513–525.
- Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig M C, Steinman R M (2002) Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8⁺ T cell tolerance. *J. Exp. Med.* **196** (12), 1627–1638.
- Caminschi I, Proietto A I, Ahmet F, Kitsoulis S, Shin Teh J, Lo, Jennifer C Y, Rizzitelli A, Wu L, Vremec D, van Dommelen, Serani L H, Campbell I K, Maraskovsky E, Braley H, Davey G M, Mottram P, van de Velde, Nicholas, Jensen K, Lew A M, Wright M D, Heath W R, Shortman K, Lahoud M H (2008) The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement. *Blood* **112** (8), 3264–3273.
- Cerovic V, Houston S A, Scott C L, Aumeunier A, Yrlid U, Mowat A M, Milling, S W F (2013) Intestinal CD103⁺ dendritic cells migrate in lymph and prime effector T cells. *Mucosal Immunol.* **6** (1), 104–113.
- Cerovic V, Houston S A, Westlund J, Utraiainen L, Davison E S, Scott C L, Bain C C, Joeris T, Agace W W, Kroczeck R A, Mowat A M, Yrlid U, Milling S W (2015) Lymph-borne CD8 α ⁺ dendritic cells are uniquely able to cross-prime CD8⁺ T cells with antigen acquired from intestinal epithelial cells. *Mucosal Immunol.* **8** (1), 38–48.
- Contreras V, Urien C, Guiton R, Alexandre Y, Vu Manh T-P, Andrieu T, Crozat K, Jouneau L, Bertho N, Eparaud M, Hope J, Savina A, Amigorena S, Bonneau M, Dalod M, Schwartz-Cornil I (2010) Existence of CD8 α -like dendritic cells with a conserved functional specialization and a common molecular signature in distant mammalian species. *J. Immunol.* **185** (6), 3313–3325.
- Coombes J L, Siddiqui, Karima R R, Arancibia-Cárcamo C V, Hall J, Sun C-M, Belkaid Y, Powrie F (2007) A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces Foxp3⁺ regulatory T cells via a TGF- β and retinoic acid-dependent mechanism. *J. Exp. Med.* **204** (8), 1757–1764.
- Coombes J L, Powrie F (2008) Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.* **8** (6), 435–446.

- Crozat K, Guiton R, Contreras V, Feuillet V, Dutertre C-A, Ventre E, Vu Manh T-P, Baranek T, Storset A K, Marvel J, Boudinot P, Hosmalin A, Schwartz-Cornil I, Dalod M (2010) The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8 α ⁺ dendritic cells. *J. Exp. Med.* **207** (6), 1283–1292.
- Crozat K, Tamoutounour S, Vu Manh T-P, Fossum E, Luche H, Ardouin L, Williams M, Azukizawa H, Bogen B, Malissen B, Henri S, Dalod M (2011) Cutting edge: expression of XCR1 defines mouse lymphoid-tissue resident and migratory dendritic cells of the CD8 α ⁺ type. *J. Immunol.* **187** (9), 4411–4415.
- del Rio M-L, Rodriguez-Barbosa J-I, Kremmer E, Förster R (2007) CD103⁻ and CD103⁺ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J. Immunol.* **178** (11), 6861–6866.
- den Haan, J M, Lehar S M, Bevan M J (2000) CD8⁺ but not CD8⁻ dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J. Exp. Med.* **192** (12), 1685–1696.
- Dorner B G, Scheffold A, Rolph M S, Huser M B, Kaufmann, Stefan H E, Radbruch A, Flesch, Inge E A, Kroczeck R A (2002) MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, and ATAC/lymphotactin function together with IFN- γ as type 1 cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99** (9), 6181–6186.
- Dorner B G, Smith, Hamish R C, French A R, Kim S, Poursine-Laurent J, Beckman D L, Pingel J T, Kroczeck R A, Yokoyama W M (2004) Coordinate expression of cytokines and chemokines by NK cells during murine cytomegalovirus infection. *J. Immunol.* **172** (5), 3119–3131.
- Dorner B G, Dorner M B, Zhou X, Opitz C, Mora A, Güttler S, Hutloff A, Mages H W, Ranke K, Schaefer M, Jack R S, Henn V, Kroczeck R A (2009) Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8⁺ T cells. *Immunity* **31** (5), 823–833.
- Dudziak D, Kamphorst A O, Heidkamp G F, Buchholz V R, Trumfheller C, Yamazaki S, Cheong C, Liu K, Lee H-W, Park C G, Steinman R M, Nussenzweig M C (2007) Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* **315** (5808), 107–111.
- Eberl G (2005) Inducible lymphoid tissues in the adult gut: recapitulation of a fetal developmental pathway? *Nat. Rev. Immunol.* **5** (5), 413–420.
- Edelson B T, KC W, Juang R, Kohyama M, Benoit L A, Klekotka P A, Moon C, Albring J C, Ise W, Michael D G, Bhattacharya D, Stappenbeck T S, Holtzman M J, Sung S-S J, Murphy T L, Hildner K, Murphy K M (2010) Peripheral CD103⁺ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8 α ⁺ conventional dendritic cells. *J. Exp. Med.* **207** (4), 823–836.

- Edelson B T, Bradstreet T R, KC W, Hildner K, Herzog J W, Sim J, Russell J H, Murphy T L, Unanue E R, 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.
- Ginhoux F, Liu K, Helft J, Bogunovic M, Greter M, Hashimoto D, Price J, Yin N, Bromberg J, Lira S A, Stanley E R, Nussenzweig M, Merad M (2009) The origin and development of nonlymphoid tissue CD103⁺ DCs. *J. Exp. Med.* **206** (13), 3115–3130.
- Gurka S, Hartung E, Becker M, Kroczeck R A (2014) Mouse conventional dendritic cells can be universally classified based on the mutually exclusive expression of XCR1 and SIRP α . *bioRxiv*.
- Gurka S, Hartung E, Becker M, Kroczeck R A (2015) Mouse conventional dendritic cells can be universally classified based on the mutually exclusive expression of XCR1 and SIRP α . *Front. Immunol.* **6**.
- Hacker C, Kirsch R D, Ju X-S, Hieronymus T, Gust T C, Kuhl C, Jorgas T, Kurz S M, Rose-John S, Yokota Y, Zenke M (2003) Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development. *Nat. Immunol.* **4** (4), 380–386.
- Hartung E, Becker M, Bachem A, Reeg N, Jäkel A, Hutloff A, Weber H, Weise C, Giesecke C, Henn V, Gurka S, Anastassiadis K, Mages H W, Kroczeck R A (2014) Induction of potent CD8 T cell cytotoxicity by specific targeting of antigen to cross-presenting dendritic cells *in vivo* via murine or human XCR1. *J. Immunol.*
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408** (6813), 740–745.
- Henri S, Vremec D, Kamath A, Waithman J, Williams S, Benoist C, Burnham K, Saeland S, Handman E, Shortman K (2001) The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. *J. Immunol.* **167** (2), 741–748.
- Hildner K, Edelson B T, Purtha W E, Diamond M, Matsushita H, Kohyama M, Calderon B, Schraml B, Unanue E R, Diamond M S, Schreiber R D, Murphy T L, Murphy K M (2008) Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8 α ⁺ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* **322** (5904), 1097–1100.
- Hogquist K A, Jameson S C, Heath W R, Howard J L, Bevan M J, Carbone F R (1994) T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* **76** (1), 17–27.

- 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. *J. Exp. Med.* **191** (3), 435–444.
- Inaba K, Swiggard W J, Inaba M, Meltzer J, Mirza A, Sasagawa T, Nussenzweig M C, Steinman R M (1995) Tissue distribution of the DEC-205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145. I. Expression on dendritic cells and other subsets of mouse leukocytes. *Cell. Immunol.* **163** (1), 148–156.
- Iwasaki A, Kelsall B L (2000) Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3 α , MIP-3 β , and secondary lymphoid organ chemokine. *J. Exp. Med.* **191** (8), 1381–1394.
- Iyoda T, Shimoyama S, Liu K, Omatsu Y, Akiyama Y, Maeda Y, Takahara K, Steinman R M, Inaba K (2002) The CD8⁺ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J. Exp. Med.* **195** (10), 1289–1302.
- Jaensson E, Uronen-Hansson H, Pabst O, Eksteen B, Tian J, Coombes J L, Berg P-L, Davidsson T, Powrie F, Johansson-Lindbom B, Agace W W (2008) Small intestinal CD103⁺ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *J. Exp. Med.* **205** (9), 2139–2149.
- Jang M H, Sougawa N, Tanaka T, Hirata T, Hiroi T, Tohya K, Guo Z, Umemoto E, Ebisuno Y, Yang B-G, Seoh J-Y, Lipp M, Kiyono H, Miyasaka M (2006) CCR7 is critically important for migration of dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes. *J. Immunol.* **176** (2), 803–810.
- Johansson-Lindbom B, Svensson M, Pabst O, Palmqvist C, Marquez G, Förster R, Agace W W (2005) Functional specialization of gut CD103⁺ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing. *J. Exp. Med.* **202** (8), 1063–1073.
- Jung S, Aliberti J, Graemmel P, Sunshine M J, Kreutzberg G W, Sher A, Littman D R (2000) Analysis of fractalkine receptor CX₃CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol. Cell. Biol.* **20** (11), 4106–4114.
- Kelner G S, Kennedy J, Bacon K B, Kleyensteuber S, Largaespada D A, Jenkins N A, Copeland N G, Bazan J F, Moore K W, Schall T J (1994) Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* **266** (5189), 1395–1399.
- Kelsall B L, Strober W (1996) Distinct populations of dendritic cells are present in the subepithelial dome and T cell regions of the murine Peyer's patch. *J. Exp. Med.* **183** (1), 237–247.

- Kennedy J, Kelner G S, Kleyensteuber S, Schall T J, Weiss M C, Yssel H, Schneider P V, Cocks B G, Bacon K B, Zlotnik A (1995) Molecular cloning and functional characterization of human lymphotactin. *J. Immunol.* **155** (1), 203–209.
- Kilshaw P J, Murant S J (1990) A new surface antigen on intraepithelial lymphocytes in the intestine. *Eur. J. Immunol.* **20** (10), 2201–2207.
- Kissenpfennig A, Henri S, Dubois B, Laplace-Builhé C, Perrin P, Romani N, Tripp C H, Douillard P, Leserman L, Kaiserlian D, Saeland S, Davoust J, 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.
- Kraal G, Breel M, Janse M, Bruin G (1986) Langerhans' cells, veiled cells, and interdigitating cells in the mouse recognized by a monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* **163** (4), 981–997.
- Kurts C, Heath W R, Carbone F R, Allison J, Miller J F, Kosaka H (1996) Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens *in vivo*. *J. Exp. Med.* **184** (3), 923–930.
- Lahoud M H, Ahmet F, Kitsoulis S, Wan S S, Vremec D, Lee C-N, Phipson B, Shi W, Smyth G K, Lew A M, Kato Y, Mueller S N, Davey G M, Heath W R, Shortman K, Caminschi I (2011) Targeting antigen to mouse dendritic cells via Clec9A induces potent CD4 T cell responses biased toward a follicular helper phenotype. *J. Immunol.* **187** (2), 842–850.
- Li J, Ahmet F, Sullivan L C, Brooks A G, Kent S J, Rose R de, Salazar A M, Reis e Sousa C, Shortman K, Lahoud M H, Heath W R, Caminschi I (2014) Antibodies targeting Clec9A promote strong humoral immunity without adjuvant in mice and non-human primates. *Eur. J. Immunol.*
- Mach N, Gillessen S, Wilson S B, Sheehan C, Mihm M, Dranoff G (2000) Differences in dendritic cells stimulated *in vivo* by tumors engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or Flt3-ligand. *Cancer Res.* **60** (12), 3239–3246.
- Macpherson A J, Uhr T (2004) Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* **303** (5664), 1662–1665.
- MacPherson G G, Jenkins C D, Stein M J, Edwards C (1995) Endotoxin-mediated dendritic cell release from the intestine. Characterization of released dendritic cells and TNF dependence. *J. Immunol.* **154** (3), 1317–1322.
- Mann E R, Landy J D, Bernardo D, Peake, Simon T C, Hart A L, Al-Hassi H O, Knight S C (2013) Intestinal dendritic cells: their role in intestinal inflammation, manipulation by the gut microbiota and differences between mice and men. *Immunol. Lett.* **150** (1-2), 30–40.

- Maraskovsky E, Brasel K, Teepe M, Roux E R, Lyman S D, Shortman K, McKenna H J (1996) Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J. Exp. Med.* **184** (5), 1953–1962.
- Maric I, Holt P G, Perdue M H, Bienenstock J (1996) Class II MHC antigen (Ia)-bearing dendritic cells in the epithelium of the rat intestine. *J. Immunol.* **156** (4), 1408–1414.
- McKenna H J, Stocking K L, Miller R E, Brasel K, Smedt T de, Maraskovsky E, Maliszewski C R, Lynch D H, Smith J, Pulendran B, Roux E R, Teepe M, Lyman S D, Peschon J J (2000) Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* **95** (11), 3489–3497.
- Mildner A, Jung S (2014). Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity* **40** (5), 642–656.
- Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A (1990) High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* **11** (2), 231–238.
- Müller S, Dorner B, Korthäuer U, Mages H W, D’Apuzzo M, Senger G, Kroczeck R A (1995) Cloning of ATAC, an activation-induced, chemokine-related molecule exclusively expressed in CD8⁺ T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **25** (6), 1744–1748.
- Muniz L R, Knosp C, Yeretssian G (2012) Intestinal antimicrobial peptides during homeostasis, infection, and disease. *Front. Immunol.* **3**, 310.
- Niess J H, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick B A, Vyas J M, Boes M, Ploegh H L, Fox J G, Littman D R, Reinecker H-C (2005) CX₃CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* **307** (5707), 254–258.
- Pabst O, Mowat A M (2012) Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunol.* **5** (3), 232–239.
- Palucka K, Banchereau J (2012) Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat. Rev. Cancer* **12** (4), 265–277.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu M Y, van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282** (5396), 2085–2088.
- 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. *J. Immunol.* **166** (9), 5327–5330.

- Pulendran B, Ahmed R (2011) Immunological mechanisms of vaccination. *Nat. Immunol.* **12** (6), 509–517.
- Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl J P, Ricciardi-Castagnoli P (2001) Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.* **2** (4), 361–367.
- Rock K L, Farfán-Arribas D J, Shen L (2010) Proteases in MHC class I presentation and cross-presentation. *J. Immunol.* **184** (1), 9–15.
- Ruedl C, Koebel P, Bachmann M, Hess M, Karjalainen K (2000) Anatomical origin of dendritic cells determines their life span in peripheral lymph nodes. *J. Immunol.* **165** (9), 4910–4916.
- Sancho D, Mourão-Sá D, Joffre O P, Schulz O, Rogers N C, Pennington D J, Carlyle J R, Reis e Sousa C (2008) Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin. *J. Clin. Invest.* **118** (6), 2098–2110.
- Sanes J R, Rubenstein J L, Nicolas J F (1986) Use of a recombinant retrovirus to study post-implantation cell lineage in mouse embryos. *EMBO J.* **5** (12), 3133–3142.
- Satpathy A T, Wu X, Albring J C, Murphy K M (2012) Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nat. Immunol.* **13** (12), 1145–1154. DOI: 10.1038/ni.2467.
- Schulz O, Reis e Sousa C (2002) Cross-presentation of cell-associated antigens by CD8 α ⁺ dendritic cells is attributable to their ability to internalize dead cells. *Immunology* **107** (2), 183–189.
- Schulz O, Jaensson E, Persson E K, Liu X, Worbs T, Agace W W, Pabst O (2009) Intestinal CD103⁺, but not CX₃CR1⁺, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *J. Exp. Med.* **206** (13), 3101–3114.
- Schulz O, Pabst O (2013) Antigen sampling in the small intestine. *Trends Immunol.* **34** (4), 155–161.
- Scott C L, Aumeunier A M, Mowat A M (2011) Intestinal CD103⁺ dendritic cells: master regulators of tolerance? *Trends Immunol.* **32** (9), 412–419.
- Segura E, Villadangos J A (2009) Antigen presentation by dendritic cells *in vivo*. *Curr. Opin. Immunol.* **21** (1), 105–110.
- Semrich M, Plantinga M, Svensson-Frej M, Uronen-Hansson H, Gustafsson T, Mowat A M, Yrlid U, Lambrecht B N, Agace W W (2012) Directed antigen targeting *in vivo* identifies a role for CD103⁺ dendritic cells in both tolerogenic and immunogenic T-cell responses. *Mucosal Immunol.* **5** (2), 150–160.

- Sharpe A H, Freeman G J (2002) The B7-CD28 superfamily. *Nat. Rev. Immunol.* **2** (2), 116–126.
- Shortman K, Heath W R (2010) The CD8⁺ dendritic cell subset. *Immunol. Rev.* **234** (1), 18–31.
- Smith T J, Ducharme L A, Shaw S K, Parker C M, Brenner M B, Kilshaw P J, Weis J H (1994) Murine M290 integrin expression modulated by mast cell activation. *Immunity* **1** (5), 393–403.
- Steinman R M, Cohn Z A (1973) Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* **137** (5), 1142–1162.
- Tacke P J, Figdor C G (2011) Targeted antigen delivery and activation of dendritic cells *in vivo*: steps towards cost effective vaccines. *Semin. Immunol.* **23** (1), 12–20.
- Tiisala S, Paavonen T, Renkonen R (1995) $\alpha_E\beta_7$ and $\alpha_4\beta_7$ integrins associated with intraepithelial and mucosal homing, are expressed on macrophages. *Eur. J. Immunol.* **25** (2), 411–417.
- Trumpfheller C, Longhi M P, Caskey M, Idoyaga J, Bozzacco L, Keler T, Schlesinger S J, Steinman R M (2012) Dendritic cell-targeted protein vaccines: a novel approach to induce T-cell immunity. *J. Intern. Med.* **271** (2), 183–192.
- Turnbull E L, Yrlid U, Jenkins C D, Macpherson G G (2005) Intestinal dendritic cell subsets: differential effects of systemic TLR4 stimulation on migratory fate and activation *in vivo*. *J. Immunol.* **174** (3), 1374–1384.
- Varol C, Vallon-Eberhard A, Elinav E, Aychek T, Shapira Y, Luche H, Fehling H J, Hardt W-D, Shakhar G, Jung S (2009) Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions. *Immunity* **31** (3), 502–512.
- Varol C, Zigmund E, Jung S (2010) Securing the immune tightrope: mononuclear phagocytes in the intestinal lamina propria. *Nat. Rev. Immunol.* **10** (6), 415–426.
- Villadangos J A (2001) Presentation of antigens by MHC class II molecules: getting the most out of them. *Mol. Immunol.* **38** (5), 329–346.
- Villadangos J A, Schnorrer P (2007) Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets *in vivo*. *Nat. Rev. Immunol.* **7** (7), 543–555.
- Vremec D, Zorbas M, Scollay R, Saunders D J, Ardavin C F, Wu L, Shortman K (1992) The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *J. Exp. Med.* **176** (1), 47–58.

- Waskow C, Liu K, Darrasse-Jèze G, Guermonprez P, Ginhoux F, Merad M, Shengelia T, Yao K, Nussenzweig M (2008) The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. *Nat. Immunol.* **9** (6), 676–683.
- Watchmaker P B, Lahl K, Lee M, Baumjohann D, Morton J, Kim S J, Zeng R, Dent A, Ansel K M, Diamond B, Hadeiba H, Butcher E C (2014) Comparative transcriptional and functional profiling defines conserved programs of intestinal DC differentiation in humans and mice. *Nat. Immunol.* **15** (1), 98–108.
- Wilson N S, Villadangos J A (2005) Regulation of antigen presentation and cross-presentation in the dendritic cell network: facts, hypothesis, and immunological implications. *Adv. Immunol.* **86**, 241–305.
- Witmer-Pack M D, Swiggard W J, Mirza A, Inaba K, Steinman R M (1995) Tissue distribution of the DEC-205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145. II. Expression *in situ* in lymphoid and nonlymphoid tissues. *Cell. Immunol.* **163** (1), 157–162.
- Worbs T, Bode U, Yan S, Hoffmann M W, Hintzen G, Bernhardt G, Förster R, Pabst O (2006) Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J. Exp. Med.* **203** (3), 519–527.
- Yamazaki S, Iyoda T, Tarbell K, Olson K, Velinzon K, Inaba K, Steinman R M (2003) Direct expansion of functional CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J. Exp. Med.* **198** (2), 235–247.
- Yamazaki S, Dudziak D, Heidkamp G F, Fiorese C, Bonito A J, Inaba K, Nussenzweig M C, Steinman R M (2008) CD8⁺ CD205⁺ splenic dendritic cells are specialized to induce Foxp3⁺ regulatory T cells. *J. Immunol.* **181** (10), 6923–6933.
- Yoshida T, Imai T, Kakizaki M, Nishimura M, Yoshie O (1995) Molecular cloning of a novel C or gamma type chemokine, SCM-1. *FEBS Lett.* **360** (2), 155–159.
- Zhang J-G, Czabotar P E, Policheni A N, Caminschi I, Wan S S, Kitsoulis S, Tullett K M, Robin A Y, Brammananth R, van Delft, Mark F, Lu J, O'Reilly L A, Josefsson E C, Kile B T, Chin W J, Mintern J D, Olshina M A, Wong W, Baum J, Wright M D, Huang, David C S, Mohandas N, Coppel R L, Colman P M, Nicola N A, Shortman K, Lahoud M H (2012) The dendritic cell receptor Clec9A binds damaged cells via exposed actin filaments. *Immunity* **36** (4), 646–657.

Abkürzungen

A	<i>area</i>
A647	Alexa Fluor 647
A700	Alexa Fluor 700
ACK	Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat
APC	Allophycocyanin
APC	<i>antigen presenting cell</i> ; antigenpräsentierende Zelle
APC-Cy7	Allophycocyanin-Cyanin Dye 7
ATAC	<i>activation induced, T cell derived and chemokine-like molecule</i>
Batf3	<i>basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 3</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i> ; Rinderserumalbumin
BV650	Brilliant Violet 650
BV785	Brilliant Violet 785
CADM1	<i>cell adhesion molecule 1</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i> ; Unterscheidungsgruppen
cDC	<i>conventional dendritic cell</i> ; konventionelle dendritische Zelle
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidylester
Clec9A	<i>C-type lectin domain family 9A</i>
CpG ODN	CpG-Oligodesoxynukleotide
DAPI	4', 6'-Diamidino-3-Phenylindol
DCIR2	<i>dendritic cell inhibitory receptor 2</i>
DC	<i>dendritic cell</i> ; dendritische Zelle
DIG	Digoxigenin
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	DL-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
FACS	fluorescence activated cell sorting
FAE	Follikel-assoziiertes Epithel
FCS	<i>fetal calf serum</i> ; fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
Flt3	<i>Fms-related tyrosine kinase 3</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
GALT	<i>gut-associated lymphoid tissues</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i> ; grün fluoreszierende Protein
H	<i>height</i>
i. p.	intraperitoneal
i. v.	intravenös

Id2	<i>inhibitor of DNA binding 2</i>
IFN γ	Interferon γ
IFR	<i>interfollicular region</i> ; interfollikuläre Region(en)
Ig	Immunoglobulin
int	intermediär
Irf8	<i>interferon regulatory factor 8</i>
Itga8	Integrin alpha-8
KO	<i>knock out</i>
Lin	Linien-spezifischer Marker
LP	Lamina propria
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
mAk	monoklonaler Antikörper
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> ; Hauthistokompatibilitätskomplex
MLN	<i>mesenteric lymphnode(s)</i> ; mesenteriale(r) Lymphknoten
M-Zellen	<i>microfold cells</i>
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
OVA	Ovalbumin
p. A.	<i>pro analysi</i>
PacB	Pacific Blue
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pDC	<i>plasmacytoid dendritic cell</i> ; plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cyanin Dye 7
PFA	Paraformaldehyd
poly I:C	Komplex aus Polyribonucleinsäure und Polyribocytidylsäure
PP	Peyersche(r) Plaques
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
s. c.	<i>subcutaneous</i> ; subkutan
SCM-1	<i>single-cysteine motif 1</i>
SED	<i>subepithelial dome</i> ; subepitheliale Kuppelregion
SIRP α	<i>signal-regulatory protein alpha</i>
SSC	<i>side scatter</i>
TCR	<i>T cell receptor</i> ; T-Zellrezeptor
Th1	Typ 1 Helfer
TLR	<i>toll-like receptor</i> ; Toll-ähnlicher Rezeptor
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Das Immunsystem des Darms.....	6
Abbildung 2	Präsentation verschiedener Antigene durch dendritische Zellen	8
Abbildung 3	Bisherige Klassifikation der Subtypen konventioneller dendritischer Zellen .	10
Abbildung 4	Exemplarische Gatingstrategie zur Identifikation von cDCs und CD8 ⁺ OT-I T-Zellen.....	19
Abbildung 5	Expression von XCR1 auf cDCs der Lamina propria und der Peyerschen Plaques sowie der mesenterialen Lymphknoten.....	24
Abbildung 6	Die Expression von XCR1 auf cDCs der LP, PP und der MLN korreliert mit verschiedenen DC-Markern	25
Abbildung 7	Die Expression von CD24, CD103 und CX ₃ CR1 ist nicht auf XCR1-positive cDCs der LP, PP und der MLN beschränkt.....	26
Abbildung 8	Die Expression von 33D1, CD11b und SIRP α korreliert nicht mit der Expression von XCR1 auf cDCs der LP, PP und der MLN	27
Abbildung 9	Intestinale cDCs sind in ihrer Entwicklung von dem Transkriptionsfaktor Batf3 abhängig.....	28
Abbildung 10	Die verbleibenden XCR1-positiven cDCs aus LP und MLN Batf3-defizienter Mäuse zeigen einen veränderten Phänotyp.....	30
Abbildung 11	Die Behandlung mit dem Wachstumsfaktor Flt3 Ligand führt im Darm und den drainierenden Lymphknoten zu einer massiven Expansion der cDCs, allen voran der XCR1 ⁺ CD103 ⁻ cDCs	31
Abbildung 12	Positionierung XCR1-exprimierender Zellen im Dünndarm und den mesenterialen Lymphknoten	33
Abbildung 13	Auswirkungen eines inflammatorischen Stimulus auf die Zusammensetzung intestinaler cDCs	35
Abbildung 14	Ein inflammatorischer Stimulus beeinträchtigt die Positionierung XCR1-exprimierender Zellen in der Lamina propria des Dünndarms, nicht jedoch in den Peyerschen Plaques	37
Abbildung 15	Die Expression des Chemokinrezeptors CCR7 ist nach inflammatorischem Stimulus – abhängig vom MHCII-Expressionsniveau – auf intestinalen XCR1 ⁺ cDCs erhöht	39
Abbildung 16	Strategie zur Sortierung von cDC-Subpopulationen der mesenterialen Lymphknoten und der Lamina Propria des Dünndarms	40
Abbildung 17	XCR1-positive cDCs der mesenterialen Lymphknoten kreuzpräsentieren lösliches Antigen am besten	41
Abbildung 18	MARX10-OVA und XCL1-OVA induzieren eine spezifische und effektive endogene CD8 ⁺ T-Zellzytotoxizität <i>in vivo</i>	43

Abbildung 19	Ohne Adjuvans wird keine effektive endogene CD8 ⁺ T-Zellzytotoxizität <i>in vivo</i> induziert.....	44
Abbildung 20	Vorschlag zur Klassifizierung der Subtypen konventioneller dendritischer Zellen	51

Danksagung

Während der Erstellung meiner Doktorarbeit haben mich viele Menschen begleitet und unterstützt, denen ich hiermit meinen Dank aussprechen möchte.

Zunächst bedanke ich mich bei Prof. Dr. Richard A. Kroczek für die Möglichkeit dieses interessante Thema in seiner Arbeitsgruppe am Robert Koch-Institut zu bearbeiten und für die damit verbundene Betreuung und Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel danke ich für die freundliche Bereitschaft seitens der FU Berlin diese Arbeit zu begutachten.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitgliedern und Ehemaligen von P1 für die tolle Zeit während meiner Arbeit bedanken. Großer Dank gilt Steffen Güttler, der mich mit viel Begeisterung in das Gebiet der mukosalen Immunologie eingearbeitet hat und Annabell Bachem, die mit viel Enthusiasmus geholfen hat, das Projekt richtig zu starten. Ein ganz besonderes Dankeschön gilt Stephanie Gurka, Evelyn Hartung und Nele Reeg, die mich bei der Aufarbeitung der Organe unterstützt haben. Stephanie Gurke danke ich speziell für die viele Geduld bei allen Fragen rund um die Durchflusszytometrie und für die anregenden und durchaus kritischen Diskussionen. Darüber hinaus danke ich Stephanie und Evelyn für das lehrreiche Korrekturlesen dieser Arbeit. Im Übrigen möchte ich mich bei Hans-Werner Mages für sämtliche arbeitstechnischen Hinweise, aber vor allem für die montäglichen Diskussionen über Fußball bedanken - obwohl er Bayern-Fan ist.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mich zu dem Menschen gemacht haben, der ich heute bin und mich stets in meiner Laufbahn unterstützt haben. Bei meiner Schwester Kerstin möchte ich mich für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken, auch wenn sie eigentlich nur Bahnhof verstanden hat und hin und wieder von den Mäusen irritiert war.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meinem Mann Jan, der mich in allem unterstützt und in vielem ermutigt hat. Danke ebenfalls für das Korrekturlesen und nein, Mäuse werden nun mal nur „getötet“ und nicht „wissenschaftlich um die Ecke gebracht“.

Auf diesem Wege hoffe ich auch, dass mir sämtliche Versuchstiere im Mäusehimmel verzeihen mögen. Ihr seid nicht umsonst gestorben!

Publikationen

Originalpublikationen

Becker M*, Güttler S*, Bachem A, Hartung E, Mora A, Jäkel A, Hutloff A, Henn V, Mages H W, Gurka S, Kroczeck R A (2014) Ontogenic, phenotypic, and functional characterization of XCR1⁺ dendritic cells leads to a consistent classification of intestinal dendritic cells based on the expression of XCR1 and SIRP α . *Front. Immunol.* **5**, 326.

Gurka S*, Hartung E*, **Becker M***, Kroczeck R A (2015) Mouse conventional dendritic cells can be universally classified based on the mutually exclusive expression of XCR1 and SIRP α . *Front. Immunol.* **6**, 35.

Hartung E*, **Becker M***, Bachem A, Reeg N, Jäkel A, Hutloff A, Weber H, Weise C, Giesecke C, Henn V, Gurka S, Anastassiadis K, Mages H W, Kroczeck R A (2014) Induction of potent CD8 T cell cytotoxicity by specific targeting of antigen to cross-presenting dendritic cells in vivo via murine or human XCR1. *J. Immunol.*, **194** (3), 1069-1079.

Montagna G N, Beigier-Bompadre M, **Becker M**, Kroczeck R A, Kaufmann, Stefan H E, Matuschewski K (2014) Antigen export during liver infection of the malaria parasite augments protective immunity. *MBio* **5** (4), e01321-14.

***Autoren leisteten gleichen Beitrag**

Kongressbeiträge

Workshop-Vorträge

Becker M, Hartung E, Bachem A, Kroczeck R A. Targeting of antigen via murine or human XCR1, the lineage marker for cross-presenting dendritic cells, elicits potent CD8 T cell cytotoxicity. 13th International Symposium on Dendritic Cells (DC 2014), Tours, 09/2014

Hartung E, **Becker M**, Bachem A, Reeg N, Yang Y, Jäkel A, Weber H, Henn V, Mages H W, Kroczeck R A. Targeting of antigen via XCR1, the lineage marker for cross-presenting dendritic cells, elicits potent CD8 cytotoxicity in vivo. 15th International Congress of Immunology (ICI), Mailand, 08/2013

Hartung E, **Becker M**, Bachem A, Weber H, Gurka S, Henn V, Mages H W, Kroczeck R A. Targeting of antigen via XCR1, the lineage marker for cross-presenting dendritic cells, elicits potent CD8 cytotoxicity in vivo. 3rd European Congress of Immunology, Glasgow, 09/2012

Poster

Becker M, Güttler S, Bachem A, Hartung E, Henn V, Mages H W, Gurka S, KroczeK R A. Ontogenic, phenotypic, and functional characterization of XCR1+ dendritic cells allows a consistent classification of intestinal dendritic cells based on the expression of XCR1 and SIRP α . 13th International Symposium on Dendritic Cells (DC 2014), Tours, 09/2014

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Martina Becker, an Eides statt, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und alle verwendeten Hilfsmittel und Quellen als solche ausgewiesen zu haben.

Des Weiteren versichere ich, dass die vorliegende Arbeit nie in dieser oder anderer Form Gegenstand eines früheren Promotionsverfahrens war.

Unterschrift