

# **Funktionelle Charakterisierung XCR1-positiver dendritischer Zellen in der Maus und beim Menschen**

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

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

vorgelegt von  
Steffen Güttler  
aus Hamm

September 2011

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Immunologische Abwehrmechanismen am Robert Koch-Institut, Berlin von April 2007 bis September 2011 unter der Leitung von Prof. Dr. R. A. KroczeK angefertigt.

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

Disputation am 16.12.2011

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	I
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	VI
<b>Tabellenverzeichnis</b>	VII
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Das adaptive Immunsystem</b>	<b>1</b>
1.1.1 Antigenaufnahme und klassische Präsentation	1
1.1.2 Antigen-Kreuzpräsentation	3
<b>1.2 Dendritische Zellen der Maus</b>	<b>4</b>
1.2.1 Dendritische Zellen der lymphatischen Organe	4
1.2.2 Dendritische Zellen des murinen Darms	6
1.2.3 Antigen-Kreuzpräsentation von Subtypen muriner dendritischer Zellen	7
<b>1.3 Dendritische Zellen des Menschen</b>	<b>9</b>
1.3.1 Dendritische Zellen in humanem peripheren Blut	9
1.3.2 Funktionelle Eigenschaften humaner dendritischer Zellen	10
<b>1.4 Chemokine und Chemokinrezeptoren</b>	<b>10</b>
1.4.1 ATAC und XCR1	11
<b>1.5 Methoden der Zelldepletion</b>	<b>12</b>
1.5.1 Diphtherietoxin	13
<b>1.6 Zelldepletion in genetisch veränderten Mausstämmen</b>	<b>14</b>
<b>1.7 Depletion dendritischer Zellen der Maus</b>	<b>15</b>
<b>1.8 Herstellung genetisch veränderter Mausmodelle</b>	<b>16</b>
1.8.1 Herstellung von <i>knock in</i> -Mauslinien	16
1.8.2 Herstellung von (BAC-)transgenen Mäusen	17
<b>1.9 Zielsetzung</b>	<b>18</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Verwendete Chemikalien und Materialien</b>	<b>19</b>
<b>2.2 Verwendetes Probenmaterial</b>	<b>19</b>
2.2.1 Tiere	19
2.2.2 Humanes Probenmaterial	19
<b>2.3 Monoklonale Antikörper</b>	<b>20</b>

<b>2.4 Molekularbiologische Methoden</b>	<b>21</b>
2.4.1 Isolierung von RNA	21
2.4.1.1 Isolierung von RNA aus Zellen	21
2.4.2 Isolierung von DNA	22
2.4.2.1 Isolierung von DNA aus Mausschwänzen und Stammzellen	22
2.4.2.2 Isolierung von DNA aus Bakterien	22
2.4.3 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch Polymerasekettenreaktion	22
2.4.4 Klonierung von DNA Fragmenten	24
2.4.5 <i>Southern Blot</i> -Analyse	24
2.4.6 Transformation in <i>Escherichia coli</i> und Bakterienkultur	25
2.4.7 Gelelektrophoretische Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten	25
2.4.8 Quantitative <i>real-time</i> -PCR	26
<b>2.5 Histologie</b>	<b>27</b>
2.5.1 Detektion von $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in B6.XCR1:LacZ-Mäusen	27
<b>2.6 Zellbiologische Methoden</b>	<b>28</b>
2.6.1 Verwendete Zelllinien und Reagenzien	28
2.6.2 Zellkulturbedingungen	29
2.6.3 Bestimmung der Zellzahl in Suspensionen	29
2.6.4 Trypsinierung adhärenter Zellen	29
2.6.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen	29
2.6.6 Isolierung und Kultivierung von embryonalen Fibroblasten der Maus	30
2.6.7 Elektroporation von embryonalen Stammzellen	30
2.6.8 Picken von ESC-Kolonien nach Elektroporation und Selektion	31
2.6.9 Kultivierung humaner CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Klone	32
2.6.10 Herstellung von zellassoziertem Antigen für humane Kreuzpräsentationsassays	32
<b>2.7 Präparation primärer Zellen</b>	<b>33</b>
2.7.1 Präparation primärer Zellen der Maus	33
2.7.1.1 Isolierung dendritischer Zellen aus lymphatischen Organen	33
2.7.1.2 Isolierung mononukleärer Zellen aus Dünndarmgewebe	33
2.7.1.3 Anreicherung von murinen DCs durch Dichtegradientenzentrifugation	34
2.7.2 Präparation primärer Zellen aus humanem peripheren Blut	34

2.7.2.1 Präparation mononukleärer Zellen aus humanem peripheren Blut (PBMCs)	34
2.7.2.2 Voranreicherung humaner DC-Populationen aus peripherem Blut	34
<b>2.8 Herstellung humaner monozytengenerierte dendritischer Zellen</b>	<b>35</b>
<b>2.9 Durchflusszytometrie</b>	<b>35</b>
2.9.1 Verwendete Farbstoffe	35
2.9.2 Oberflächenfärbung von Antigenen	36
2.9.3 Durchflusszytometrische Messung und Sortierung von Zellsuspensionen	37
2.9.3.1 Durchflusszytometrische Isolierung humaner Zellen	38
<b>2.10 Kreuzpräsentationsassay</b>	<b>39</b>
<b>2.11 ELISA zur IFN-<math>\gamma</math>-Bestimmung</b>	<b>39</b>
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>40</b>
<b>3.1 Charakterisierung der Expression von XCR1 in der Maus</b>	<b>40</b>
3.1.1 Histologischer Nachweis von XCR1 in Geweben der Maus	40
3.1.2 Durchflusszytometrische Charakterisierung XCR1-tragender Zellen in lymphatischen Geweben	42
3.1.2.1 Durchflusszytometrische Analyse der XCR1-Expression in der Milz	42
3.1.2.2 Durchflusszytometrische Analyse der XCR1-Expression in mesenterialen Lymphknoten	45
3.1.2.3 Durchflusszytometrische Analyse der XCR1-Expression in Peyerschen Plaques	48
3.1.3 Analyse der antigenpräsentierenden Zellen des Dünndarms	49
3.1.3.1 Durchflusszytometrische Analyse der XCR1-Expression im Dünndarm	50
3.1.3.2 Analyse der XCR1-Expression im Dünndarm durch quantitative PCR	52
3.1.4 Einfluss eines inflammatorischen Stimulus auf XCR1-positive dendritische Zellen des mesenterialen Lymphknotens und des Darms	53
<b>3.2 Herstellung einer XCR1-Diphtherietoxin A-Mauslinie</b>	<b>56</b>
3.2.1 Herstellung des <i>targeting</i> -Vektors Version 1	58
3.2.2 Generierung und Analyse von XCR1:DTA-Stammzellklonen	59
3.2.3 Produktion und Verifizierung XCR1:DTA-chimärer Mäuse	61

3.2.4 Herstellung des <i>targeting</i> -Vektors Version 2, Generierung von Stammzellklonen und chimären Mäusen	63
<b>3.3 Herstellung von XCR1-BAC-transgenen Mäusen</b>	<b>66</b>
3.3.1 Herstellung einer BAC-transgenen XCR1:Cre-Rekombinase Maus	67
<b>3.4 Analyse XCR1-positiver dendritischer Zellen aus humanem peripheren Blut</b>	<b>70</b>
3.4.1 Identifikation und Isolierung von Subtypen dendritischer Zellen aus humanem peripheren Blut	70
3.4.2 Expression des Chemokinrezeptors XCR1 in humanem peripheren Blut	72
3.4.3 Nachweis der XCR1-Expression auf Proteinebene	74
3.4.4 Analyse der Antigen-Kreuzpräsentation der Subtypen dendritischer Zellen aus humanem Blut	75
<b>4 Diskussion</b>	
<b>4.1 XCR1 wird spezifisch auf kreuzpräsentierenden dendritischen Zellen exprimiert und ist besser zur Einteilung von Subtypen geeignet als klassische Marker</b>	<b>79</b>
<b>4.2 XCR1 definiert einen Subtyp dendritischer Zellen der lymphatischen und peripheren Organe des intestinalen Trakts</b>	<b>81</b>
<b>4.3 Migrationseigenschaften von XCR1-positiven dendritischen Zellen nach einem inflammatorischen Impuls</b>	<b>83</b>
<b>4.4 Ein Mausmodell zur spezifischen Depletion kreuzpräsentierender dendritischer Zellen</b>	<b>85</b>
<b>4.5 Der Versuch der Herstellung einer XCR1-spezifischen Diphtherietoxin <i>knock in</i>-Maus</b>	<b>86</b>
<b>4.6 BAC-transgene Mauslinien als Alternative zur <i>knock in</i>-Strategie</b>	<b>88</b>
<b>4.7 Anwendungsmöglichkeiten XCR1<sup>+</sup> DC-defizienter Mäuse</b>	<b>89</b>
<b>4.8 Selektive Expression des Chemokinrezeptors XCR1 auf humanen CD141-positiven dendritischen Zellen</b>	<b>90</b>
<b>4.9 CD141-positive dendritische Zellen sind die kreuzpräsentierenden Zellen des humanen Blutes</b>	<b>91</b>

<b>5 Zusammenfassung / Summary</b>	<b>93</b>
<b>5.1 Zusammenfassung</b>	<b>93</b>
<b>5.2 Summary</b>	<b>94</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>95</b>
<b>7 Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>116</b>
<b>8 Danksagung</b>	<b>119</b>
<b>9 Anhang</b>	<b>120</b>
Vektorkarten	120
Lebenslauf	121
Publikationen	122
Konferenzbeiträge / Vorträge	123
Bescheinigung	124

**Abbildungsverzeichnis**

<b>Abb. 1:</b>	Antigenpräsentation durch dendritische Zellen.	2
<b>Abb. 2:</b>	Genlokus von murinem und humanem XCR1.	12
<b>Abb. 3:</b>	Durchflusszytometrische Analyse.	38
<b>Abb. 4:</b>	Histologische Untersuchung der Expression von XCR1 in Geweben der Maus.	41
<b>Abb. 5:</b>	Durchflusszytometrische Analyse der XCR1-Expression von konventionellen dendritischen Zellen aus Milz im Vergleich zu klassischen DC-Markern.	43
<b>Abb. 6:</b>	Durchflusszytometrische Analyse der XCR1-Expression konventioneller dendritischer Zellen aus Milz im Vergleich zu CD103, CD205 und CX3CR1.	45
<b>Abb. 7:</b>	Subtypen konventioneller dendritischer Zellen im mesenterialen Lymphknoten.	47
<b>Abb. 8:</b>	Subtypen konventioneller dendritischer Zellen in Peyerschen Plaques.	49
<b>Abb. 9:</b>	Phänotyp der Subtypen antigenpräsentierender Zellen aus dem Dünndarm.	51
<b>Abb. 10:</b>	Quantitative Analyse der XCR1-mRNA in antigenpräsentierenden Zellen des Darms.	53
<b>Abb. 11:</b>	Einfluss eines inflammatorischen Stimulus auf konventionelle dendritische Zellen des mesenterialen Lymphknotens.	55
<b>Abb. 12.:</b>	Einfluss eines inflammatorischen Stimulus auf antigenpräsentierende Zellen des Dünndarms.	56
<b>Abb. 13:</b>	<i>Targeting</i> -Strategie 1 zur Herstellung einer XCR1:DTA- <i>knock in</i> -Mauslinie.	58
<b>Abb. 14:</b>	<i>Southern Blot</i> -Analyse zur Verifizierung XCR1:DTA-positiver Stammzellen.	61
<b>Abb. 15:</b>	Genotypisierung von putativ chimären B6.XCR1:DTA-Mäusen sowie deren Nachkommen nach Verpaarung mit B6 Tieren.	62
<b>Abb. 16:</b>	<i>Targeting</i> -Strategie 2 zur Herstellung einer XCR1:GFP/DTA- <i>knock in</i> -Mauslinie.	65
<b>Abb. 17:</b>	Strategie zur Herstellung einer BAC-transgenen XCR1:Cre-Mauslinie.	68
<b>Abb. 18:</b>	Definition humaner Subtypen dendritischer Zellen aus peripherem Blut.	71
<b>Abb. 19:</b>	Frequenzen dendritischer Zellpopulationen in humanem peripheren Blut.	71
<b>Abb. 20:</b>	Spezifische Expression des humanen Chemokinrezeptors XCR1.	74
<b>Abb. 21:</b>	Analyse der XCR1-Expression von konventionellen dendritischen Zellen aus humanem peripheren Blut auf Proteinebene.	75
<b>Abb. 22:</b>	Kreuzpräsentation von löslichem und zellassoziiertem Antigen durch Subtypen dendritischer Zellen aus humanem Blut.	78

**Tabellenverzeichnis**

<b>Tab. 1:</b>	Phänotyp und Lokalisation von Subtypen dendritischer Zellen der Maus.	5
<b>Tab. 2:</b>	Zur Depletion in Mausmodellen geeignete toxische Proteine.	13
<b>Tab. 3:</b>	Übersicht über die verwendeten monoklonalen Maus- und Human-spezifischen Antikörper.	20
<b>Tab. 4:</b>	Verwendete Puffer für molekularbiologische Methoden.	21
<b>Tab. 5.:</b>	Zur Klonierung, Southern Blot-Sonden-Generierung und Genotypisierung verwendete <i>primer</i> .	23
<b>Tab. 6:</b>	Übersicht der für die qPCR verwendeten Oligonukleotide.	27
<b>Tab. 7:</b>	Verwendete Puffer für zellbiologische Methoden.	28
<b>Tab. 8:</b>	Verwendete Zellkulturmedien.	28
<b>Tab. 9:</b>	Voranreicherung verschiedener Subtypen dendritischer Zellen aus PBMCs.	35
<b>Tab. 10:</b>	Optische Eigenschaften der genutzten Fluorochrome sowie Analysebedingungen.	36
<b>Tab. 11:</b>	Durchflusszytometrische Sortierung verschiedener Lymphozytenpopulationen aus humanem peripheren Blut.	38
<b>Tab. 12:</b>	Durchflusszytometrische Sortierung verschiedener Subtypen dendritischer Zellen aus humanem peripheren Blut nach Anreicherung.	72

## **1 Einleitung**

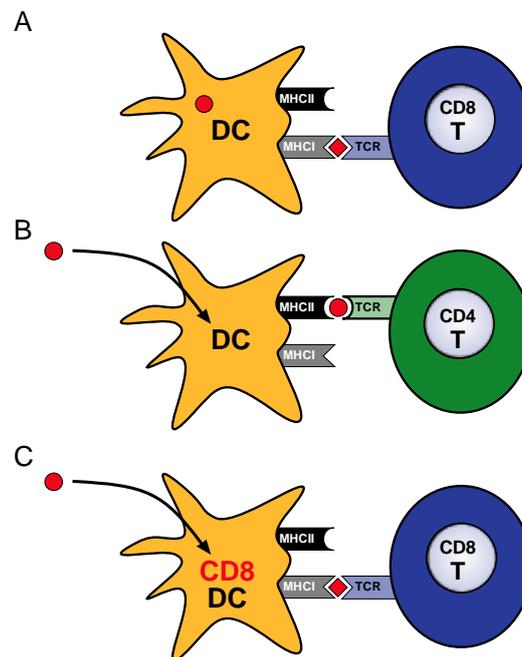
### **1.1 Das adaptive Immunsystem**

Das Immunsystem verhilft höheren Lebewesen zum Schutz vor Schädigungen durch Krankheitserreger und entartete körpereigene Zellen. Neben der angeborenen Immunität, welche die erste relativ ungerichtete Schutzfunktion darstellt, ist das adaptive Immunsystem in der Lage, spezifische Strukturen (Antigene) zu erkennen und eine gezielte Immunantwort auszulösen. Dabei spielen antigenpräsentierende Zellen (APCs) eine entscheidende Rolle. Von APCs präsentiertes Antigen kann die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen oder die Produktion spezifischer Antikörper induzieren, was zur Eliminierung der schädlichen Erreger oder Zellen führt.

#### **1.1.1 Antigenaufnahme und klassische Präsentation**

Die Präsentation von Antigenen auf der Oberfläche von APCs erfolgt im Kontext von Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHCs). In diesen MHCs werden prozessierte Fragmente aufgenommenen Antigens gebunden. Spezifische T-Zellen erkennen den Antigen-MHC-Komplex mittels ihres T-Zell-Rezeptors. Dies kann im Zusammenspiel mit anderen Faktoren zur Aktivierung der T-Zellen führen. Abhängig vom Antigen bestehen verschiedene Wege der Antigenpräsentation.

In der Zelle selbst synthetisiertes Protein akkumuliert im Zytoplasma und wird über den Ubiquitin-Proteasom-Weg degradiert. Dabei wird ein Teil der erhaltenen Peptide im Kontext von MHCI auf der Zelloberfläche präsentiert (Villadangos 2001; Rock 2005). Hierbei kann es sich sowohl um Proteine der Zelle als auch um Bestandteile von Bakterien oder Viren handeln, die die Zelle infiziert haben (Villadangos und Schnorrer 2007) (Abb. 1 A). Dieser Prozess der Präsentation zytosolischen Antigens findet in allen kernhaltigen Zellen des Organismus statt. Die Präsentation im Kontext von MHCI erlaubt antigenspezifischen zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen die Identifikation und Eliminierung von Zellen, welche körperfremde Proteine beispielsweise aufgrund einer Infektion exprimieren.



**Abb. 1: Antigenpräsentation durch dendritische Zellen.**

**A** Endogenes Antigen wird in dendritischen Zellen (DCs) synthetisiert, prozessiert und im Kontext von Haupthistokompatibilitätskomplex I (MHC I) präsentiert. Bindung dieses Komplexes durch einen antigenspezifischen T-Zell-Rezeptor führt im Zusammenwirken mit kostimulatorischen Faktoren zur zytotoxischen Immunantwort durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen. **B** Exogenes Antigen wird durch DCs aufgenommen, prozessiert und im Kontext von MHC II präsentiert. Bindung dieses Komplexes durch einen antigenspezifischen T-Zell-Rezeptor führt im Zusammenwirken mit kostimulatorischen Faktoren zur Aktivierung von CD4<sup>+</sup> Helfer-T-Zellen. **C** Antigen-Kreuzpräsentation: Exogenes Antigen wird durch CD8<sup>+</sup> DCs aufgenommen, prozessiert und im Kontext von MHC I präsentiert. Bindung dieses Komplexes durch einen antigenspezifischen T-Zell-Rezeptor führt im Zusammenwirken mit kostimulatorischen Faktoren zur zytotoxischen Immunantwort durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

Im Gegensatz zu intrazellulärem Antigen müssen extrazelluläre Bestandteile zuerst in die Zelle aufgenommen werden. Zur Aufnahme und Präsentation dienen APCs, zu denen neben Makrophagen und B-Zellen vor allem dendritische Zellen (DCs) als professionelle APCs zählen. Diese Zellen exprimieren MHC II Moleküle, welche dazu dienen Antigen in Form von Peptiden auf der Oberfläche zu präsentieren. Das Antigen kann wiederum der Zelle selbst entstammen, wie z.B. nicht zytosolische Proteine der Zellmembran oder Komponenten der Endosomen (Veerawamy *et al.*, 2003; Villadangos und Schnorrer 2007). Die hauptsächliche Funktion der MHC II-Moleküle liegt jedoch in der Präsentation von aufgenommenem extrazellulärem Antigen (Abb. 1 B).

Bei der Antigenaufnahme werden die Prozesse Phagozytose, Pinozytose und rezeptorvermittelte Endozytose unterschieden. Bei der Phagozytose und Pinozytose erfolgt eine unspezifische Aufnahme der Bestandteile der Umgebung, welche durch Vesikelausstülpung erreicht wird. Die rezeptorvermittelte Endozytose erfolgt durch Bindung von Antigen an spezifische Rezeptoren, welche auf der Zelloberfläche lokalisiert sind. Durch Bindung wird eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst, welche zur Bildung endozytotischer Vesikel und zur Aufnahme führt (z.B. Mannoserezeptoren und Fc-Rezeptoren; Wilson und Villadangos 2005).

Diese Prozesse befähigen insbesondere DCs zur Aufnahme und Prozessierung von Antigen, welches im Kontext von MHCII präsentiert wird. Bindung eines spezifischen T-Zell-Rezeptors sowie vermehrte Expression kostimulatorischer Moleküle führt zur Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen (Villadangos, 2001; Abb 1 B).

### **1.1.2 Antigen-Kreuzpräsentation**

Manche Infektionen sind auf nicht-Immunzellen beschränkt oder führen zu einer Unterbindung der Antigenpräsentation durch DCs. Um eine zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort gegen diese Art der Infektion auszulösen, muss extrazelluläres Antigen von DCs aufgenommen und im Kontext von MHCI präsentiert werden. Bevan *et al.* konnten zeigen, dass Antigen aus intravenös injizierten Zellen in den MHCI-Präsentationsprozess gekreuzt wird und zur Aktivierung zytotoxischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen führt (Bevan, 1976). Dieser Prozess wird als Kreuzpräsentation bezeichnet (Abb. 1 C). Kreuzpräsentation hat eine wichtige Rolle in der Induktion zytotoxischer T-Zell-Antworten gegen virale Infektionen sowie Tumorantigene (Sigal *et al.*, 1999; Heath und Carbone 2001; Wolfers *et al.*, 2001). Eine weitere Rolle spielt sie beim Aufbau von Toleranz im Thymus sowie peripheren Organen (Kurts *et al.*, 1997 und 2010; Merkenschlager *et al.*, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass lösliche Proteine, Immunkomplexe, intrazelluläre Bakterien, Parasiten und vor allem zellassozierte Proteine kreuzpräsentiert werden (Heath *et al.*, 2004).

Die *in vivo* maßgeblich kreuzpräsentierende Zellpopulation sind DCs (Heath *et al.*, 2004, Villadangos und Schnorrer 2007). In einem Mausmodell, in welchem CD11c<sup>+</sup> Zellen (hauptsächlich DCs) spezifisch depletiert wurden, wurde die Ausbildung einer zytotoxischen T-Zell-Antwort auf zellassoziertes Antigen verhindert (Jung *et al.*, 2002). Allerdings konnte festgestellt werden, dass im Fall einer Infektion zusätzlich zu DCs auch Makrophagen, B-Zellen, Neutrophile, Basophile sowie Mast- und Endothelzellen *in vivo* Antigen-kreuzpräsentieren können (Norbury *et al.*, 2002, Flinsenberger *et al.*, 2011).

## 1.2 Dendritische Zellen der Maus

### 1.2.1 Dendritische Zellen der lymphatischen Organe

Dendritische Zellen sind eine heterogene Gruppe antigenpräsentierender Zellen, die in primären und sekundären lymphatischen Organen sowie peripheren Geweben vorkommen.

Ein gemeinsames Merkmal von DCs ist die Aufnahme von Antigen im unreifen Stadium sowie Prozessierung und Präsentation nach erfolgter Reifung (Mellman und Steinman, 2001).

DCs können durch Unterschiede in Funktion und Phänotyp sowie Lokalisation im Gewebe und Abstammung von Vorläuferzellen in Subtypen unterteilt werden. In sekundär lymphatischen Organen der Maus unterscheidet man zwei Arten von DCs: Plasmazytoide DCs und konventionelle DCs. pDCs sekretieren große Mengen an Typ-I-Interferon als Antwort auf die Erkennung pathogener Partikel. pDCs unterscheiden sich von cDCs durch die Oberflächenmarker B220 und Ly-6C, sowie schwächere Expression von CD11c (Seguara und Villadangos, 2009; Tab. 1).

cDCs sind durch die hohe Expression von CD11c und MHCII charakterisiert und lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: Migratorische und residente cDCs. Migratorische DCs, wie z.B. Langerhanszellen und interstitielle Zellen der Haut oder DCs des Darms, durchwandern das Gewebe und nehmen kontinuierlich Antigen auf. Ein inflammatorischer Impuls (z.B. Aktivierung von *Toll-like* Rezeptoren (TLRs) durch Bestandteile von Pathogenen) löst einen Reifungsprozess der Zellen aus. Daraufhin wandern die DCs in die dränierenden Lymphknoten und präsentieren dort prozessierte Teile des aufgenommenen Antigens. Auch im Ruhezustand besteht ein ständiger Migrationsprozess von DCs der Peripherie zu den sekundär lymphatischen Organen.

Migratorische Zelltypen kommen nicht in der Milz vor. Sie lassen sich aufgrund von Oberflächenmarkern in CD11b DCs, CD103 DCs und CD207<sup>+</sup> Langerhanszellen unterteilen (Tab. 1). Residente DCs kommen in allen primären und sekundären lymphatischen Organen wie Thymus, Milz, Lymphknoten und Peyerschen Plaques vor. Bisher wurden die klassischen Oberflächenmarker CD4 und CD8 zur Einteilung residenter DCs in drei Gruppen verwendet: CD4<sup>+</sup> DCs, CD8<sup>+</sup> DCs und doppelt negative (DN) DCs (Tab 1; Vremec *et al.*, 2000; Shortman und Naik, 2007; Villadangos und Schnorrer, 2007). In der Milz sind CD8<sup>+</sup> DCs vor allem im Bereich der roten Pulpa sowie der Marginal- und T-Zell-Zone lokalisiert. CD4<sup>+</sup> und DN DCs liegen in der B-Zell-Zone der weißen Pulpa vor (McLellan *et al.*, 2002; Idoyaga *et al.*, 2009). CD8 war der erste zur Charakterisierung des DC-Subtyps verwendete Marker. Dabei handelt es

sich nicht um einen DC-spezifischen Marker, da die Expression auch auf T-Zellen und pDCs erfolgt (Shortman und Heath, 2010). Zusätzlich zu der bisher beschriebenen Einteilung von DCs durch die Marker CD4, CD8, CD11b und CD103 können weitere Oberflächenmarker zur Charakterisierung herangezogen werden. Eine Auswahl dieser Marker und ihre Expression auf Subtypen von DCs ist in Tabelle 1 zusammengefasst.

Ein weiterer Zelltyp, welcher DCs zugeordnet werden kann, sind monozytengenerierte DCs (MoDCs). Diese treten an Orten der Inflammation auf (z.B. *Leishmania major* infizierter Haut) und konnten bei systemischen Infektionen auch in der Milz nachgewiesen werden (Villadangos und Schnorrer, 2007).

**Tab. 1: Phänotyp und Lokalisation von Subtypen dendritischer Zellen der Maus.**

Lokalisation	Milz, LN <sup>1</sup>				LN <sup>1</sup> , weitere sek. lymphatische Organe, Peripherie			
Eigenschaft	resident				migratorisch			
Bezeichnung	CD8 <sup>+</sup> DCs	CD4 <sup>+</sup> DCs	DN DCs	pDCs <sup>2</sup>	CD11b <sup>+</sup> DCs	CD103 <sup>+</sup> DCs	Langerhans Zellen	monozyten- generierte DCs
CD8	++	-	-	-	+/-	+/-	+/-	-
CD11b	-	++	++	-	++	-	++	++
CD11c	++	++	++	+/-	++	++	++	+
CD24	++	+	+	?	?	?	?	?
CD103	+ <sup>3</sup>	-	-	-	- <sup>4</sup>	++	-	?
CD205	+	-	-	-	+	+	++	+/-
CD207	+	-	-	-	-	++	++	-
B220	-	-	-	++	-	-	-	-
Clec9a	+	-	-	+	?	?	+/-	?
Ep-Cam	-	-	-	-	-	+/-	+	-
Ly-6C	-	-	-	++	-	-	-	++
MHCII	+	+	+	+	++	++	++	?

DC-Subtypen werden unterschieden bezüglich ihres Vorkommens im Ruhezustand oder nach Inflammation sowie ihrer Lokalisation und ihrer Migrationseigenschaften. Den Subtypen sind spezifische Oberflächenmarker zugeordnet.

<sup>1</sup>LN, Lymphknoten. pDCs, plasmazytoide dendritische Zellen. <sup>3</sup>Es wird beschrieben, dass zwischen 10 und 100 % der CD8<sup>+</sup> DCs der Milz CD103 exprimieren (McLellan 2002, Sathe *et al.*, 2011, Qiu *et al.*, 2009) <sup>4</sup>Darm-assoziierte CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> DCs sind nicht aufgeführt, jedoch in Bezug auf beschriebene Marker vergleichbar mit CD103<sup>+</sup> DCs. (++) starke Expression, (+) mittlere Expression, (+/-) schwache Expression, (-) keine Expression, (?) nicht analysiert. Zusammengefasst aus Heath und Carbone, 2009; Segura und Villadangos, 2009; Villadangos und Schnorrer 2007; Caminschi *et al.*, 2008 und Sancho *et al.*, 2008.

### 1.2.2 Dendritische Zellen des murinen Darms

Der Gastrointestinaltrakt ist ein Organ, welches ständig verschiedenen Antigenen ausgesetzt ist. Es muss Toleranz gegenüber ungefährlichen Komponenten (Nahrungspartikel, Darmflora und körpereigene Zellen) und Immunität im Fall von Pathogenen vermittelt werden (Faria und Weiner, 2005). Die als darmassoziiertes lymphatisches Gewebe (GALT) bezeichneten Komponenten des intestinalen Immunsystems bestehen aus mesenterialen Lymphknoten (mesLN), Peyerschen Plaques und isolierten lymphoiden Follikeln (Hamada *et al.*, 2002; Tezuka und Ohteki, 2010).

DCs spielen bei der Aufnahme und Prozessierung von intestinalen Antigenen eine wichtige Rolle. In dem als Lamina Propria bezeichneten Teil der Darm-Mucosa sind CX3CR1<sup>+</sup> und CD103<sup>+</sup> Zellen mit der Kapazität zur Antigenaufnahme lokalisiert. CX3CR1<sup>+</sup> Zellen bilden Fortsätze aus, welche bis ins Darmlumen reichen. Im Fall einer Infektion nimmt die Zahl der Fortsätze deutlich zu (Chieppa *et al.*, 2006). CD103<sup>+</sup> Zellen sind weiter innerhalb der Lamina Propria angrenzend an die Epithelschicht lokalisiert und haben keinen direkten Kontakt zum Darmlumen (Niess *et al.*, 2005; Vallon-Eberhard *et al.*, 2006; Bogunovic *et al.*, 2009; Rescigno, 2009). Aus dem Lumen aufgenommenes Antigen wird von Zellen des Darms in die mesLN transportiert (Johansson-Lindbom *et al.*, 2005; Jang *et al.*, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass dieser Prozess gerichteter Migration von der Expression des Chemokinrezeptors CCR7 abhängig ist (Worbs *et al.*, 2006; Jang *et al.*, 2006). Gesteigerte Expression von CCR7 auf DCs und Subtypen von T-Zellen bewirkt eine Zellwanderung in die mesLNs, in denen die CCR7-Liganden CCL19 und CCL21 konstitutiv exprimiert werden. Durch Untersuchung der Lymphflüssigkeit sowie durch Charakterisierung CCR7-defizienter Mäuse konnte gezeigt werden, dass lediglich CD103<sup>+</sup> Zellen aus der Lamina Propria auswandern und zu den mesLNs migrieren, während CX3CR1<sup>+</sup> Zellen resident sind (Schulz *et al.*, 2009; Bogunovic *et al.*, 2009). CX3CR1<sup>+</sup> Zellen exprimieren neben DC-spezifischen Markern auch CD14 und F4/80, welche auf eine mögliche Verwandtschaft mit Makrophagen hindeuten (Schulz *et al.*, 2009). CD103<sup>+</sup> Zellen des Darms lassen sich weiter nach ihrer Expression von CD11b unterteilen. Es wurde vermutet, dass CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> DCs den Zellen entsprechen, welche aus dem Darm in die mesLN wandern. CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> DCs hingegen werden aufgrund ihrer zusätzlichen Expression von CD8 als residente Komponenten des GALT gewertet (Bogunovic *et al.*, 2009; Schulz *et al.* 2009).

Im Bereich des Ileums befinden sich lymphatische Anlagen, welche als Peyersche Plaques (PPs) bezeichnet werden. Diese Organe sind im Bereich der Lamina Propria und Submukosa lokalisiert und werden zum Darmlumen hin durch Follikel-assoziiertes Epithel begrenzt. In PPs sind

spezialisierte *microfold*-Zellen (M-Zellen) innerhalb des Epithels zum Darmlumen hin orientiert, die Antigen aufnehmen können. Unklar ist, inwieweit aufgenommenes Antigen prozessiert oder präsentiert wird. Es kommt jedoch zur Weitergabe von Antigen durch M-Zellen an DCs (Stagg *et al.*, 2003). In Untersuchungen an Mausmodellen ohne PPs konnte nachgewiesen werden, dass trotz der fehlenden M-Zellen eine Aufnahme und Präsentation von oral-appliziertem Antigen erfolgen kann (Spahn *et al.*, 2001 und 2002; Kraus *et al.*, 2005). Dies deutet darauf hin, dass neben den M-Zellen weitere Zellen zur Aufnahme und Weitergabe von Antigen befähigt sein müssen. In PPs sind CD8<sup>+</sup> DCs vor allem im Bereich der interfollikulären Region zusammen mit Makrophagen und T-Zellen lokalisiert. CD11b<sup>+</sup> DCs liegen im Bereich des Subepithelialen Doms vor (Coombes und Powrie, 2008).

### **1.2.3 Antigen-Kreuzpräsentation muriner DC-Subtypen**

Die DC-Subtypen unterscheiden sich in ihrer Kapazität zur Aufnahme, Prozessierung und Präsentation von Antigen. *In vivo* werden die Eigenschaften des jeweiligen DC-Subtyps noch durch die Lokalisation sowie Verfügbarkeit des Antigens und den Einfluss anderer Zellen und Pathogene bestimmt (Villadangos und Schnorrer 2007, McDonnell *et al.*, 2010b). Experimente, in welchen Mäuse mit zellassoziertem Antigen immunisiert oder durch Viren infiziert wurden, zeigten, dass isolierte CD8<sup>+</sup> DCs und nicht CD8<sup>-</sup> DCs der Milz entscheidend für die Ausbildung zytotoxischer CD8<sup>+</sup> T-Zell-Immunität sind (den Haan *et al.*, 2000; Wilson und Villadangos, 2005). Eine wesentliche Ursache dafür ist, dass CD8<sup>+</sup> DCs der Milz in der Aufnahme toter Zellen den anderen Subtypen überlegen sind (Iyoda *et al.*, 2002; Schulz und Reis e Sousa, 2002). Dabei scheint vor allem die Aufnahme toter Zellen mit diesem Zelltyp assoziiert zu sein, da die generelle Kapazität zur Aufnahme von Partikeln zwischen allen DC-Subtypen der Milz vergleichbar ist (Schnorrer *et al.*, 2006). Zu diesem Zweck dienen wahrscheinlich spezielle Rezeptoren auf der Oberfläche dieses DC-Subtyps, welche eine vorrangige Phagozytose bewirken könnten wie CD205, CD207, Clec9a (Villadangos und Schnorrer 2007; vergleiche Tab. 1). Jedoch konnte auch festgestellt werden, dass im Fall von rezeptorunabhängiger Aufnahme von systemisch appliziertem löslichem Antigen ausschließlich CD8<sup>+</sup> DCs kreuzpräsentieren (Pooley *et al.*, 2001). In Mausmodellen viraler Infektionen (Lymphozytäre-Choriomeningitis-Virus, Influenza, Vaccinia Virus) oder intrazellulärer Bakterien (*Listeria monocytogenes*) sind es vor allem CD8<sup>+</sup> DCs, welche zytotoxische Immunantworten durch Kreuzpräsentation vermitteln (Belz *et al.*, 2005).

Außer in der Milz wurde Kreuzpräsentation in einer Reihe von peripheren Organen und deren dränierenden Lymphknoten untersucht. In lokalen Infektionen mit Herpes Simplex Virus-1 wird Virusantigen in den dränierenden Lymphknoten ausschließlich durch CD8<sup>+</sup> DCs präsentiert (Allan *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2003). In tumordränierenden Lymphknoten hingegen sind CD8<sup>-</sup> DCs in gleichem Maße wie CD8<sup>+</sup> DCs zur Kreuzpräsentation von membrangebundenem Tumorantigen fähig (McDonnell *et al.*, 2010a). Neben CD8<sup>+</sup> DCs in sekundär lymphatischen Organen werden CD103<sup>+</sup>CD207<sup>+</sup> DCs der Haut als vorrangig kreuzpräsentierend beschrieben (Bedoui *et al.*, 2009; Henri *et al.*, 2010). In der Lunge wurde für CD103<sup>+</sup> DCs Kreuzpräsentation von intranasal verabreichtem Antigen (Ovalbumin) und Virusantigen (Influenza) beschrieben (Del Rio *et al.*, 2007; Kim und Braciale, 2009). Bei Infektion mit Respiratorischem Synzytial-Virus hingegen konnten gleiche Kreuzpräsentationseigenschaften für CD103<sup>+</sup> und CD103<sup>-</sup> DCs der Lunge festgestellt werden (Lukens *et al.*, 2009; Del Rio *et al.*, 2010). Über Kreuzpräsentation von DCs des Darms ist wenig bekannt. Jaensson *et al.* konnten zeigen, dass in den mesLNs sowohl CD103<sup>+</sup> als auch CD103<sup>-</sup> DCs systemisch appliziertes lösliches Antigen kreuzpräsentieren können. Oral appliziertes Antigen wird hingegen nur von CD103<sup>+</sup> DCs präsentiert, da sie die einzige Population darstellen, welche vom Ort der Antigenaufnahme im Darm zum mesLN migriert (Jaensson *et al.*, 2008; Schulz *et al.*, 2009). In Arbeiten von Chung *et al.* wurde lösliches Antigen oral und systemisch appliziert, was in beiden Fällen ausschließlich von CD8<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen der mesLNs kreuzpräsentiert wird (Chung *et al.*, 2005 und 2007). Etwa die Hälfte der CD8<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> DCs des mesLN exprimiert CD103 (Bogunovic *et al.*, 2009).

Anders als in der Milz scheint die Eigenschaft der Kreuzpräsentation von DCs in der Peripherie sowie angeschlossenen lymphatischen Organen weniger vom DC-Typ als mehr von der Art des Antigens und von Ort und Dauer einer Infektion anhängig zu sein.

### 1.3 Dendritische Zellen des Menschen

#### 1.3.1 Dendritische Zellen in humanem peripheren Blut

Im Menschen wurden DCs als professionell antigenpräsentierende Zellen zuerst in der Niere, dann in weiteren Organen wie Tonsille, Thymus, Leber, Knochenmark, Milz und peripherem Blut beschrieben.

Humane DCs können, ähnlich wie DCs der Maus, aufgrund ihres Phänotyps, ihrer Abstammung von spezifischen Vorläuferzellen sowie ihrer Lokalisation und Funktion unterschieden werden.

Eine Einteilung entsprechend der Funktion ist durch die beschränkte Verfügbarkeit von humanem Gewebe und Zellen erschwert, weshalb initiale Untersuchungen vor allem auf dem Phänotyp der DCs und ihrer Lokalisation in histologischen Gewebsschnitten basierten (Ju *et al.*, 2010). Da der regelmäßige Bezug von frischem lymphatischem Gewebe nicht in jedem Fall gewährleistet ist, wird häufig peripheres Blut als Bezugsquelle für Lymphozyten verwendet.

In humanem peripheren Blut können DCs durch Expression von Humanem Leukozyten Antigen DR (HLA-DR) und dem Fehlen spezifischer *lineage*-Marker charakterisiert werden. Als *lineage*-Marker gelten dabei CD3 (T-Zellen), CD14 (Monozyten, Neutrophile, Eosinophile), CD19 (B-Zellen) und CD56 (NK-Zellen). DCs aus peripherem Blut können in CD123<sup>+</sup>CD304<sup>+</sup> pDCs und CD11c<sup>+</sup> cDCs unterteilt werden (Dzionek *et al.*, 2000). cDCs können weiter anhand der Marker CD1c, CD16 und CD141 in Subtypen unterteilt werden (Dzionek *et al.*, 2000; MacDonald *et al.*, 2002; Piccioli *et al.*, 2007). Zusätzlich wurde eine HLA<sup>+</sup>DR<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>*lineage*<sup>-</sup> Population beschrieben, welche jedoch kein CD11c exprimiert und vermutlich Vorläufer von DCs oder Monozyten repräsentiert (MacDonald *et al.*, 2002; Piccioli *et al.*, 2007). Umfangreiche Genexpressionsanalysen von humanen DC-Subtypen im Vergleich zu DCs der Maus zeigten, dass Homologien zwischen pDCs aus Mensch und Maus bestehen. Die CD141<sup>+</sup> DCs des Menschen sind als ein mögliches Korrelat zu CD8<sup>+</sup> DCs der Maus beschrieben worden, während humane CD1c<sup>+</sup> DCs eher den murinen CD11b<sup>+</sup> DCs entsprechen (Robbins *et al.*, 2008). Auf eine Korrelation zwischen CD141<sup>+</sup> DCs und CD8<sup>+</sup> DCs deutet auch die Expression des Oberflächenmarkers *Nectin-like Protein 2* (Nectin2) und des C-Typ Lektin-verwandten Rezeptors Clec9a auf beiden Populationen hin (Galibert *et al.*, 2005; Caminschi *et al.*, 2008; Huysamen *et al.*, 2008; Sancho *et al.*, 2008). Bisher lagen jedoch keine Daten vor, die eine funktionelle Korrelation von murinen CD8<sup>+</sup> DCs und humanen CD141 DCs erlauben.

### 1.3.2 Funktionelle Eigenschaften humaner dendritischer Zellen

Humane pDCs entwickeln nach Aktivierung einen DC-typischen Phänotyp der mit vermehrter Expression kostimulatorischer Moleküle und HLA-DR verbunden ist (Villadangos und Young, 2008). Sie sind, vergleichbar den murinen pDCs, verantwortlich für die Produktion von Typ-I-Interferon als Antwort auf virale Infektionen oder bei autoimmunen Erkrankungen (Gilliet *et al.*, 2008; Cao, 2009). Humane pDCs sind weiterhin in der Lage, Antigen zu präsentieren und Immunität oder Selbsttoleranz zu induzieren. Unklar ist jedoch, in welchem Umfang dies im Vergleich zu cDC *in vivo* geschieht (Ochando *et al.*, 2006; Villadangos und Young 2008; Irla *et al.*, 2010). Experimente deuten darauf hin, dass endogenes Antigen durch pDCs in vergleichbarem Umfang wie von cDCs präsentiert wird, exogenes Antigen jedoch deutlich schwächer (Dalgaard *et al.*, 2005; Villadangos und Young, 2008).

cDCs werden als potente antigenpräsentierende Zellen charakterisiert, welche in der Lage sind nach Aufnahme von Fremd- oder Selbstantigen T-Zell-Immunität und Toleranz auszulösen.

Initiale Untersuchungen zur Antigen-Kreuzpräsentation humaner DCs wurden mit *in vitro*-generierten MoDCs durchgeführt (Fonteneau *et al.*, 2003). Untersuchungen zu primären Zellen zeigten jedoch, dass deutliche funktionelle Unterschiede zwischen MoDCs und primären humanen DCs bestehen (Osugi *et al.*, 2002), was auch durch Genexpressionsanalysen verschiedener primärer DC-Typen bestätigt werden konnte (Robbins *et al.*, 2008).

In bisherigen Arbeiten an primären Zellen wurde die Kreuzpräsentation nur wenig umfassend untersucht. Hoeffel *et al.*, 2007 und Di Pucchio *et al.* 2008 verglichen die Kreuzpräsentation von cDCs und pDCs und zeigten, dass Lipopeptide, zellassoziertes Antigen und virale Partikel von beiden DC-Typen in vergleichbarem Umfang präsentiert werden.

Im Gegensatz dazu fanden Schnurr *et al.*, 2005 durch Gegenüberstellung von pDCs und CD1c<sup>+</sup> DCs, dass letztere die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation besitzen, während pDCs nicht dazu fähig sind. Im Hinblick auf diese Arbeiten muss festgehalten werden, dass in keinem der Fälle CD141<sup>+</sup> DCs in die Untersuchungen miteinbezogen wurden und dass diese nicht aus Populationen der pDCs und CD1c<sup>+</sup> DCs entfernt wurden. Dadurch konnte bisher kein Vergleich der Kreuzpräsentation aller DC-Subtypen erfolgen.

## 1.4 Chemokine und Chemokinrezeptoren

Bei Chemokinen handelt es sich um 8 bis 14 kDa kleine sekretierte Proteine, die die Migration von Leukozyten zu Orten der Entzündung leiten (Zlotnik, 2000; Charo und Ransohoff 2006). Es existiert eine große Zahl verschiedener Chemokine, welche zum Teil starker Regulation unterliegen. Chemokine unterscheiden sich durch ihre Bindungsspezifitäten an Chemokinrezeptoren und Glukosaminoglykane (GAGs) (Allen *et al.*, 2007; Ransohoff 2009).

In Vertebraten sind etwa 50 Chemokine bekannt, die sich aufgrund ihrer Struktur und Funktion in vier Familien einteilen lassen. Dabei erfolgt eine systematische Einteilung entsprechend der Zahl und dem Abstand der konservierten N-terminalen Cysteinreste: CXC, CC, C und CX3C (Cystein = C; beliebige Aminosäure = X). Chemokinrezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Ein Chemokinrezeptor ist dabei in der Regel in der Lage, verschiedene Chemokine zu binden (Allen *et al.*, 2007).

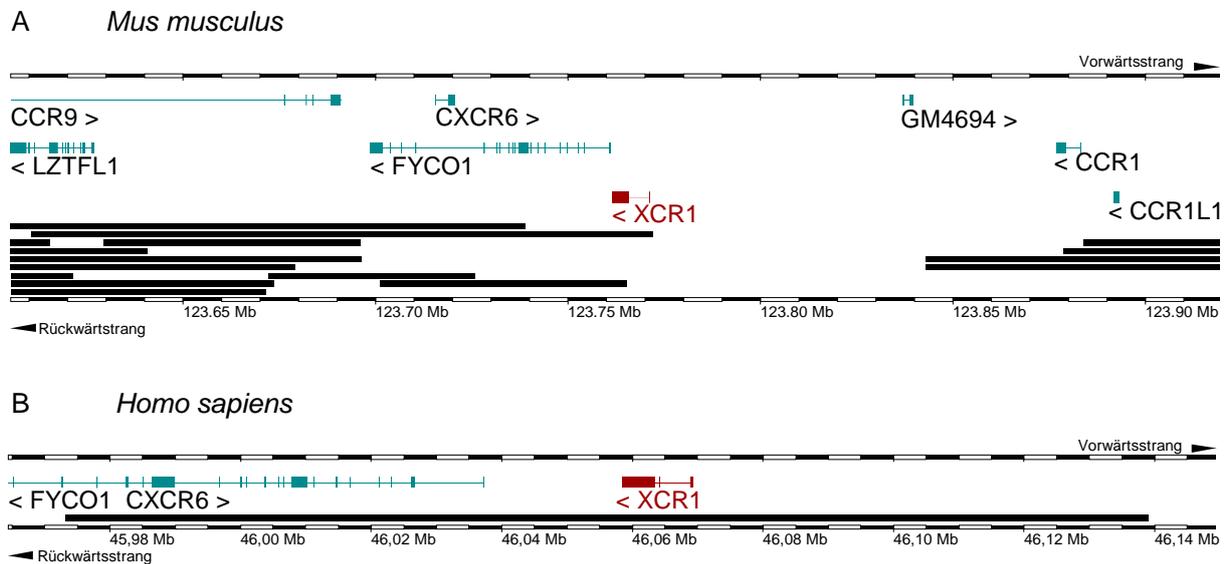
### 1.4.1 ATAC und XCR1

ATAC ist das einzige Mitglied der C Klasse von Chemokinen, welches auch als XCL1 bezeichnet wird. Es wurde ursprünglich identifiziert als vermehrt exprimiertes Gen in humanen T-Zellen nach Stimulation mit Phorbol 12-Myristat-13-Azetat (PMA) und einem Kalziumionophor (Müller *et al.*, 1995). Gleichzeitig wurde das murine Homolog als Lymphotactin (Kelner *et al.*, 1994; Kennedy *et al.*, 1995) oder SCM-1 (*single cysteine motif-1*) (Yoshida *et al.*, 1998) beschrieben.

ATAC wird als Vorläuferprotein translatiert, daraufhin N-terminal prozessiert und sekretiert (Dorner *et al.*, 1997). Die Expression von ATAC wurde für eine Reihe von Lymphozyten beschrieben, darunter CD8<sup>+</sup> T-Zellen, Th1-polarisierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen,  $\gamma\delta$ -T-Zellen und NK-Zellen (Kelner *et al.*, 1994; Yoshida *et al.*, 1999; Dorner *et al.*, 2002; Dorner *et al.*, 2004). Weiterhin sekretieren aktivierte Mastzellen sowie Epithelzellen des Thymus (mTECs) ATAC, letztere jedoch in einem deutlich geringeren Umfang (Rumsaeng *et al.*, 1997; Lei *et al.*, 2011).

XCR1 wurde als orphan-Rezeptor GPR5 kloniert und ist der einzig bekannte Rezeptor für ATAC (Heiber *et al.*, 1995; Yoshida *et al.*, 1998). Der murine Locus liegt auf Chromosom 9 in der F4-Region in der Nähe des Telomers. Er besteht aus zwei Exons: Die kodierende Sequenz ist für einen Bereich in Exon 2 beschrieben, jedoch ist ein weiteres Startkodon innerhalb des Leserasters 5' in Exon 1 vorhanden (Abb. 2 A). Der humane XCR1-Locus ist auf Chromosom 3 lokalisiert

und besteht aus drei Exons, wobei die kodierende Sequenz auf Exon 3 beschränkt ist. Es sind zwei Isoformen beschrieben (Abb. 2 B).



**Abb. 2: Genlocus von murinem und humanem XCR1.**

**A** Das murine XCR1-Gen besteht aus 2 Exons und ist auf Chromosom 9 in der Region F4 lokalisiert **B** Das humane XCR1-Gen besteht aus 3 Exons und ist auf Chromosom 3 lokalisiert. Unmittelbar benachbarte Genloci sind CXCR6 und FYCO1. Verfügbare bakterielle artifizielle Chromosomen (BACs) sind als schwarze Balken dargestellt.

Funktionell konnte im humanen und murinen System gezeigt werden, dass ATAC eine chemotaktische Wirkung auf XCR1-Transfektanten hat (Yoshida *et al.*, 1998 und 1999). In der Publikation von Dorner *et al.* konnte erstmals eindeutig gezeigt werden, dass die chemotaktische Wirkung von ATAC auf primäre Zellen der Milz ausschließlich auf XCR1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> DCs beschränkt ist. Die Interaktion von ATAC und XCR1 fördert weiterhin die Expansion und Differenzierung zytotoxischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Dorner *et al.*, 2009).

## 1.5 Methoden der Zelldepletion

Um die Funktion eines bestimmten Zelltyps *in vivo* zu untersuchen, ist die Entfernung dieser Zellen aus dem Organismus ein wichtiges experimentelles Mittel. Zur spezifischen Depletion steht eine Reihe von Methoden zur Verfügung. Zellen können aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften abgetötet oder mit spezifischen Antikörpern markiert und durch Effektorzellen eliminiert werden (Miller und Selverston, 1979; Chan und Carter, 2010). Eine effektive Methode ist auch die Expression von Toxingenen innerhalb der Zelle. Voraussetzung für ein geeignetes toxisches Protein ist, dass dieses autonom wirken kann und einen zellulären Prozess auslöst oder unterbindet, welcher ein schnelles Absterben der Zielzelle bewirkt. Weiterhin sollte die Depletion auf den Zelltyp beschränkt bleiben, ohne dass benachbarte Zellen beeinflusst werden.

Zur Expression in Mausmodellen geeignete toxische Proteine sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

**Tab. 2: Zur Depletion in Mausmodellen geeignete toxische Proteine.**

Bezeichnung des Toxins	Quelle	Wirkungsweise	Referenz
Barnase	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Hydrolyse zellulärer RNA durch RNase-Aktivität	Leuchtenberger <i>et al.</i> , 2001
Diphtherietoxin Untereinheit A (DTA)	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Komplexierung von Elongationsfaktor eEF2; Inhibition der Translation	Palmiter <i>et al.</i> , 1987 ; Breitman <i>et al.</i> , 1987
Exotoxin A	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Komplexierung von Elongationsfaktor eEF2; Inhibition der Translation	Kobayashi <i>et al.</i> , 1995
Nitroreductase	<i>Escherichia coli</i>	Kreuzvernetzung von DNA nach	Clark <i>et al.</i> , 1997
Ricin	<i>Ricinus communis</i>	Ribosomeninaktivierung; Inhibition der Translation	Landel <i>et al.</i> , 1988
Saporin	<i>Saponaria officinalis</i>	Ribosomeninaktivierung; Inhibition der Translation	Truitt und Coolen, 2002
Thymidine Kinase	<i>Herpes simplex Virus 1</i>	Umsetzung von Nukleotidanaloga zu zytotoxischen DNA-Inhibitoren	Borrelli <i>et al.</i> , 1988

### 1.5.1 Diphtherietoxin

Natürliches Diphtherietoxin (DT) wird von *Corynebacterium diphtheriae* gebildet und besteht aus zwei Untereinheiten, welche drei funktionelle Domänen beinhalten:

Untereinheit B enthält eine R-Domäne, welche für die Bindung an einen spezifischen Rezeptor verantwortlich ist sowie eine T-Domäne, welche die Translokation ins Zytosol der Zielzelle

bewirkt. Untereinheit A besteht aus der als C-Domäne bezeichneten ADP-Ribosyl-Transferase, welche ADP-Ribose auf den Elongationsfaktor eEF2 überträgt und somit die Translation der Zelle verhindert (Palmiter *et al.*, 1987; Bennett *et al.*, 1994).

Zur Depletion eukaryotischer Zellen in genetisch veränderten Organismen wird häufig die Sequenz der DT-Untereinheit A (DTA) verwendet (Tab. 2). Der Grund dafür ist die leichte Klonierbarkeit des Gens sowie die hohe Effizienz der Toxinwirkung. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression weniger Moleküle im Zytoplasma für den Tod bestimmter Zelllinien ausreicht (Yamaizumi *et al.*, 1972). Auch wenn dies nicht auf alle Zelllinien und Primärzellen zutrifft, sorgt eine niedrige Konzentrationen an DTA für eine irreversible Inhibition der Translation, was die Überlebensfähigkeit der Zellen erheblich begrenzt (Falnes *et al.*, 2000). Nach dem Zelltod freierwerdendes DTA hat keinen Einfluss auf benachbarte Zellen, da durch die fehlende Untereinheit B keine Möglichkeit der Aufnahme ins Zytoplasma besteht.

Das vollständige DT (Untereinheit A und B) kann in eukaryotischen Zellen durch den membranständigen Vorläufer des heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) aufgenommen werden, welcher als DT-Rezeptor (DTR) fungiert (Naglich *et al.* 1992). Artsspezifisch bestehen deutliche Unterschiede in der Affinität des DTR. Der DTR der Primaten besitzt eine hohe Affinität zu DT, sodass bereits geringe Mengen an DT aufgenommen werden und zum Zelltod führen während der DTR der Maus  $1 \times 10^5$ -fach schwächer an den Rezeptor bindet (Naglich *et al.*, 1992; Mitamura *et al.*, 1995).

### **1.6 Zelledepletion in genetisch veränderten Mausstämmen**

Um eines der in Tabelle 2 dargestellten toxischen Proteine *in vivo* zur Zelledepletion einzusetzen, muss ein genetisch veränderter Tierstamm produziert werden. Methoden zur Herstellung genetisch veränderter Mauslinien sind unter 1.8 zusammengefasst. Auf genetischer Ebene muss dabei die Expression eines Toxingens unter der Kontrolle eines zelltypspezifischen Promotors erfolgen. Zellen, welche Promotoraktivität zeigen, exprimieren das Toxin und sterben. Je nach Promotor kann dabei eine Expression bereits in Embryonalstadien erfolgen, was eine Entwicklung des Tieres stören oder komplett verhindern kann. Um die Funktion des depletierten Zelltyps trotzdem untersuchen zu können, muss in diesem Fall die Expression des Toxins auf das adulte Tier beschränkt werden. Um die Toxinexpression zeitlich oder gewebsspezifisch einzuschränken, kann eine zusätzliche Regulationskomponente eingebracht werden. Auf genetischer Ebene kann dies durch ein binäres System erfolgen. Dabei wird die Expression eines

Toxingens durch ein entfernbares Element wie beispielsweise eine Polyadenylierungssequenz (Stoppelement) verhindert. Durch Verpaarung mit einem anderen Tierstamm, welcher ein Enzym zur Exzision dieses Stoppelements exprimiert, wird der Locus freigegeben. Daraufhin kann die Expression des Toxins unter Kontrolle des spezifischen Promotors erfolgen (Lewandoski, 2001). Eines der effizientesten binären Systeme basiert auf der Rekombinase Cre des Bakteriophagen P1 (Rajewsky *et al.*, 1996). Dieses Enzym gehört zur Klasse der Topoisomerasen und kann zwischen als *loxP*-Stellen bezeichneten Sequenzen spezifische Rekombinationen induzieren (Akagi *et al.*, 1997). Wird das zuvor beschriebene Stoppelement im Genom von zwei *loxP*-Stellen in gleicher Orientierung flankiert, so kann die Cre-Rekombinase eine Exzision bewirken, was die Expression des Toxins wieder unter die Kontrolle des stromaufwärts gelegenen Promotors stellt (Lakso *et al.* 1992). Ein System, welches vergleichbar dem Cre-*loxP*-System auf der spezifischen Deletion genetischer Elemente beruht, ist das FRT/Flp-System aus *Saccharomyces cerevisiae*. Dabei katalysiert ein *Flippase recombination enzyme* (Flp) die Exzision zwischen *Flp recognition targets* (FRTs) (Schlake und Bode, 1994). Aufgrund der Sequenzunterschiede zwischen *loxP*- und FRT-Stellen können beide Systeme auch in demselben Mausmodell verwendet werden.

Zur Zelldepletion in einem binären System kann der Mausstamm mit der Toxinexpression unter einem durch ein Stoppelement blockierten Promotor mit einem Stamm verpaart werden, in welchem Cre durch einen gewebsspezifischen Promotor exprimiert wird. Weiterhin können Mausstämme zur Verpaarung verwendet werden, bei denen die Aktivität von Cre durch Injektion von Agenzien (Typ-I-Interferon, Tetracyclin oder Tamoxifen) induziert werden kann (Lewandoski, 2001; Branda und Dymecki, 2004). Somit kann eine zeitlich versetzte Expression des Toxins (z.B. erst im adulten Tier) erreicht werden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Effektivität der Cre-Expression davon abhängt, wie gut das jeweilige Agens in das Gewebe eindringen kann und welche Konzentration für die Induktion der Expression notwendig ist (Schmidt-Supprian und Rajewsky, 2007).

### **1.7 Depletion dendritischer Zellen der Maus**

Zur Untersuchung der Funktion von DCs wurde in der Vergangenheit eine Reihe von Mauslinien generiert, in welchen eine Depletion dieser Zellen erfolgt.

Eine Depletion der gesamten cDCs der Maus gelang durch Expression von DTR unter der Kontrolle des CD11c-Promotors. Injektion von DT führte zur Depletion eines Großteils der

cDCs, wobei jedoch auch weitere CD11c<sup>+</sup> Zellen wie Monozyten, Makrophagen, Neutrophile und einige B-Zellen beeinflusst wurden (Jung *et al.*, 2002; Probst *et al.*, 2005). Neben der Expression von DTR wurde in zwei unabhängigen Untersuchungen ein binäres System aus CD11c-getriebener Cre-Rekombinase und induzierbarer DTA-Expression hergestellt (Birnberg *et al.*, 2008; Ohnmacht *et al.*, 2009). Interessanterweise sterben Mäuse im Ansatz von Ohnmacht *et al.* innerhalb von 2 Monaten, während Birnberg *et al.* einen myeloproliferativen Phänotyp, jedoch keine Lethalität nachweisen konnten. Eine Depletion von DC-Subtypen gelang in verschiedenen Modellen in denen DTA bzw. DTR unter der Kontrolle des humanen oder murinen CD207-Promotors exprimiert wird. Hierbei konnten deutliche Unterschiede in der Effizienz der Depletion beobachtet werden. Während Langerhanszellen mit starker CD207-Expression in jedem Modell getötet werden, erfolgt Depletion dermalen Zellen mit mittlerer CD207-Expression nur zum Teil (Kaplan, 2010).

## **1.8 Herstellung genetisch veränderter Mausmodelle**

### **1.8.1 Herstellung von *knock in*-Mauslinien**

Eine Möglichkeit der Herstellung genetisch veränderter Mauslinien basiert auf der homologen Rekombination in Stammzellen, bei welcher ein Bereich des Genoms spezifisch durch ein künstlich eingebrachtes Element ersetzt wird. Homologe Rekombination tritt als Prozess der Mitose und DNA-Reparatur in fast allen eukaryotischen Zellen auf und kann *in vitro* in Stammzelllinien durch Injektion von DNA-Fragmenten induziert werden. Dazu wird ein *targeting*-Vektor benötigt, der homologe Sequenzen (Homologiearme) zur Rekombination enthält, welche zu dem zu veränderten Locus im Genom identisch sind. Diese Homologiearme flankieren ein beliebiges genetisches Element wie beispielsweise ein Toxin, welches an die Stelle der kodierenden Sequenz des wildtypischen Gens gesetzt wird (Joyner, 2000).

Stammzellen mit erfolgter Rekombination werden selektiert und in die Blastozyste eines Embryos injiziert. Es entstehen Nachkommen, deren Gewebe zum Teil aus den veränderten Stammzellen differenziert ist (Chimären). Für den Fall, dass die Geschlechtszellen von dieser Stammzelle abstammen, sind die Nachkommen dieser Tiere heterozygot für den veränderten Locus. Dieser als Keimbahntransmission bezeichnete Vorgang führt dazu, dass eine stabile Linie genetisch veränderter Tiere entsteht (Nagy, 2003).

In den ersten mit dieser Technik hergestellten Mauslinien wurde ein Teil des zu verändernden Locus lediglich durch eine Resistenzkassette zur Selektion auf Stammzebene ersetzt. Im homozygoten Zustand sind diese Tiere defizient für das veränderte Gen, was als *knock out* bezeichnet wird (Thomas und Capecchi, 1987; Mansour *et al.*, 1988). Alternativ zu *knock out*-Mauslinien können auch zusätzliche Gene wie z.B. Toxingene in das Genom eingebracht werden, welche daraufhin unter der Kontrolle der wildtypischen Promotorelemente stehen (*knock in*-Mauslinien).

### 1.8.2 Herstellung von (BAC-)transgenen Mäusen

Bei der unter 1.8.1 beschriebenen Technik zum Erhalt von *knock in*-Mauslinien werden wildtypische Gene gezielt durch artifizielle Genelemente ersetzt. Eine alternative Methode kann dazu benutzt werden, ein Gen unter Kontrolle eines spezifischen Promotors zusätzlich zu den wildtypischen Komponenten zu exprimieren. Hierzu wird ein DNA-Vektor aus Promotor und artifiziell Gen in den Pronukleus einer befruchteten Eizelle injiziert. Dabei kommt es zur mehrfachen unspezifischen Integration ins Genom. Aus der befruchteten Eizelle entstehen transgene Nachkommen, welche das eingebrachte Gen unter Kontrolle des Promotors exprimieren. Bei dieser Technik besteht die Gefahr, dass die Chromatinstrukturen an den Integrationsorten eine Expression verhindern. Da die verwendeten DNA-Vektoren in der Regel nur über wenige Kilobasen (kb) der Promotorregion verfügen, sind weiter entfernt gelegene regulatorische Elemente nicht enthalten. Dies kann zu ausbleibender oder unspezifischer Expression führen (Wilson *et al.*, 1990). Ein weiteres Problem ist, dass die Integration kurzer DNA-Fragmente in der Regel in Konkatemeren erfolgt, was eine Methylierung der Sequenzen auslöst und damit die Expression verhindern kann (Giraldo und Montoliu, 2001; Sparwasser und Eberl, 2007).

Um diese Probleme zu umgehen, können deutlich größere DNA-Vektoren verwendet werden, welche neben den wenige kb stromaufwärts gelegenen Promotorelementen auch cis- und trans-regulatorische Elemente wie *enhancer*, *silencer* und *Lokus-Kontroll-Regionen* (LCRs) enthalten. Diese tragen zur spezifischen und Integrationsort-unabhängigen Expression des Gens bei (Dillon und Grosveld, 1993). Am besten für diese Technik geeignete Vektoren sind 100 bis 300 kb große bakterielle artifizielle Chromosomen (BACs). Aus Genombanken können entsprechende BAC-Klone für fast jeden murinen und humanen Genlocus gefunden und nach Modifizierung zur Generierung BAC-transgener Mäuse verwendet werden (Yang *et al.*, 1997;

Sparwasser und Eberl, 2007). Während die Herstellung BAC-transgener Linien im Vergleich zur *knock in*-Technologie einfacher und weniger zeitaufwändig ist, müssen alle der als *founder*-Tiere bezeichneten BAC-transgenen Nachkommen untersucht werden. Dabei muss sichergestellt werden, dass das gewünschte Gen spezifisch exprimiert wird und dass keine Nebeneffekte durch unspezifische Insertion in andere Genloci auftreten. Bei *knock in*-Mauslinien hingegen besteht diese Gefahr nicht, da lediglich ein spezifischer Genlocus verändert wurde.

### **1.9 Zielsetzung**

Der Ausgangspunkt der Arbeiten war die Beobachtung, dass der Chemokinrezeptor XCR1 selektiv auf kreuzpräsentierenden CD8<sup>+</sup> dendritischen Zellen (DCs) der murinen Milz exprimiert wird. Darüber hinaus lagen Befunde vor, dass der XCR1-Ligand ATAC auf die XCR1<sup>+</sup> DCs chemotaktisch wirkt. Die anatomische Lokalisation von XCR1<sup>+</sup> DCs außerhalb der Milz, wie auch die spezifische Funktion der XCR1<sup>+</sup> DCs als Teilpopulation von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen waren jedoch unbekannt. Auch war unklar, ob im humanen Immunsystem XCR1<sup>+</sup> DCs existieren.

Daraus ergaben sich folgende Zielsetzungen für die vorliegende Arbeit:

1. Bestimmung der Lokalisation, des Phänotyps, sowie der Migrationseigenschaften von XCR1<sup>+</sup> DCs in lymphatischen und nicht-lymphatischen Organen der Maus.
2. Generierung einer Mauslinie mit spezifischer Deletion von XCR1<sup>+</sup> DCs zur Charakterisierung der Funktion dieses Zelltyps im Ruhezustand wie auch in Infektionsmodellen.
3. Suche nach XCR1<sup>+</sup> DCs beim Menschen sowie (im positiven Fall) deren funktionelle Charakterisierung.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Chemikalien und Materialien

Alle verwendete Chemikalien waren von der Qualität p.A. und wurden von den folgenden Firmen bezogen: Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Merck Chemicals (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen). Steriles Plastikeinwegmaterial wurde von den Firmen Greiner GmbH (Frickenhausen), Nunc (Roskilde, Dänemark) und Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

### 2.2 Verwendetes Probenmaterial

#### 2.2.1 Tiere

Alle Tiere stammten aus einer *specific pathogen free* (SPF)-Zucht und wurden kurzzeitig in einem konventionellen Tierstall des Robert Koch-Institutes gehalten. Die Mäuse waren 8-12 Wochen alt. Alle Tierexperimente erfolgten in Übereinstimmung mit dem Deutschen Tierschutzgesetz (BGBI. I S. 1206, 1313; 2006).

Es wurden folgende Stämme verwendet:

**C57BL/6**, Substamm C57BL/6NCrl bezogen vom Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin;  
**B6.XCR1:LacZ**, hergestellt durch Deltagen, Inc., San Carlos, USA (unveröffentlicht); bezogen von Jackson Laboratories, Bar Harbor, USA, ein Mausstamm auf dem C57BL/6 Hintergrund, bei dem die bakterielle  $\beta$ -Galaktosidase unter der Kontrolle des endogenen XCR1-Promotors exprimiert wird;

**B6.CX3CR1:eGFP** (Jung *et al.*, 2000); bezogen von Jackson Laboratories, Bar Harbor, USA, ein Mausstamm auf dem C57BL/6 Hintergrund, bei dem grün fluoreszierendes Protein (eGFP) unter Kontrolle des endogenen CX3CR1-Promotors exprimiert wird;

**B6.CD207:eGFP** (Kissenpfennig *et al.*, 2005), ein Mausstamm auf dem C57BL/6 Hintergrund, bei dem eGFP unter Kontrolle des endogenen CD207-Promotors exprimiert wird.

#### 2.2.2 Humanes Probenmaterial

Zur Isolierung humaner Zellen wurden Leukozytenpräparate aus peripherem Blut gesunder Spender (*buffy coats*) sowie Leukapheresepräparate verwendet. Das Einverständnis der zuständigen Ethikkommission lag vor.

## 2.3 Monoklonale Antikörper

**Tab. 3: Übersicht über die verwendeten monoklonalen Maus- und Human-spezifischen Antikörper.**

### A Maus-sepezifische Antikörper

Antigenspezifität	Klonbezeichnung	Quelle	Referenz/Hersteller
CD3	KT3	Hybridom <sup>1</sup>	Tomonari <i>et al.</i> , 1988
CD4	GK1.5	Hybridom <sup>1</sup>	ATCC <sup>2</sup> : TIB 207
CD4	YTS 191.1	Hybridom <sup>1</sup>	ECACC <sup>3</sup> :87072282
CD8	53-6.72	Hybridom <sup>1</sup>	ATCC <sup>2</sup> : TIB 105
CD11b	5C6	Hybridom <sup>1</sup>	ATCC <sup>2</sup> : CRL-1969
CD11c	N418	Hybridom <sup>1</sup>	ATCC <sup>2</sup> : HB-224
CD11c	HL3	kommerziell	BD Biosciences
CD19	1D3	Hybridom <sup>1</sup>	ATCC <sup>2</sup> : HB-305
CD45R (B220)	RA3-6B2	Hybridom <sup>1</sup>	Coffman <i>et al.</i> , 1982
CD103	M290	kommerziell	BD Biosciences
CD205 (DEC-205)	NLDC-145	Hybridom <sup>1</sup>	Kraal <i>et al.</i> , 1986
CCR7 (CD197)	4B12	kommerziell	eBioscience
Ly-6G/C	RB6-8C5	Hybridom <sup>1</sup>	Fleming <i>et al.</i> , 1993
MHCII	M5/114.15.2	Hybridom <sup>1</sup>	ATCC <sup>2</sup> : TIB 120

### B Human-spezifische Antikörper

Antigenspezifität	Klonbezeichnung	Quelle	Referenz/Hersteller
CD1c	AD5-8E7	kommerziell	Miltenyi Biotec
CD3	OKT3	Hybridom <sup>1</sup>	ATCC <sup>2</sup> : CRL-8001
CD11c	Bu15	kommerziell	BioLegend
CD14	63D3	Hybridom <sup>1</sup>	Ugolini <i>et al.</i> , 1980
CD15	W6D3	kommerziell	BioLegend
CD16	B73.1	Hybridom <sup>1</sup>	Perussia <i>et al.</i> , 1983
CD19	BU12	Hybridom <sup>1</sup>	Flavell <i>et al.</i> , 1995
CD45	HI30	kommerziell	BioLegend
CD56	HCD56	kommerziell	BioLegend
CD141	AD5-14H12	kommerziell	Miltenyi Biotec
CD304	AD5-17F6	kommerziell	Miltenyi Biotec
HCMV pp65	CH12	kommerziell	Santa Cruz Biotechnology
HLA-A2	BB7.2	kommerziell	BioLegend
HLA-DR	L243	kommerziell	BioLegend

<sup>1</sup>Hybridom: laboreigene Hybridome, aus deren Kulturüberstand die Antikörper aufgereinigt wurden; <sup>2</sup>ATCC: American Type Culture Collection; <sup>3</sup>ECACC: European Collection of Cell Cultures

## 2.4 Molekularbiologische Methoden

**Tab. 4: Verwendete Puffer für molekularbiologische Methoden.**

Bezeichnung	Zusammensetzung
20X SSC	0,3 M Natriumcitrat, 3 M NaCl, pH 7,0
ddH <sub>2</sub> O	zweifach deionisiertes Wasser (Millipore, Eschborn)
DNA-Probenpuffer, 10X	95 % Glycerin, 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol FF, in TAE Laufpuffer
ESC-Lysepuffer	10 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 0,5 % SDS, 0,4 mg/ml Proteinase K, pH 8,0
LB Agar	1% Bacto-Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl, 1,5 % Agar, pH 7,0
LB Medium	1% Bacto-Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl, pH 7,0
<i>stripping</i> -Lösung	0,2 M NaOH, 0,1 % SDS
PBS	136,89 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 1,47 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 8,05 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7,3
SOC-Medium	2 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 M MgSO <sub>4</sub> , 1 mM Glukose, pH 6,8
TAE Laufpuffer, 50X	2 M Tris/HCl, 50 mM EDTA, 17,5 % C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> , pH 8,0
TSE Puffer	10 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0,4 % SDS, 0,2 mg/ml Proteinase K, pH 8,0
Waschpuffer	0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, 0,3 % Tween 20, pH 7,5
X-gal Färbepuffer	1 mg/ml X-gal, 5 mM K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> , 5 mM K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> , 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,02 % NP-40, 0,01 % Na-deoxycholat in PBS

### 2.4.1 Isolierung von RNA

#### 2.4.1.1 Isolierung von RNA aus Zellen

Die Isolierung von RNA aus Zellen erfolgte unter Verwendung des *High Pure RNA Isolierung Kit* (Roche Applied Science, Mannheim) nach Angaben des Herstellers. Die Integrität der RNA wurde mit einem Agilent 2100 Bioanalytiker (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) bestimmt. Dazu wurden RNA 6000 Nano oder Pico Kits desselben Herstellers verwendet und mit der Software 2100 Expert ausgewertet. Alle in dieser Arbeit verwendeten Gesamt-RNA-Proben hatten eine *RNA Integrity Number* (RIN) zwischen 7 und 10, was guter bis sehr guter RNA-Integrität entspricht.

## 2.4.2 Isolierung von DNA

### 2.4.2.1 Isolierung von DNA aus Mausschwänzen und Stammzellen

Zur Isolierung von DNA wurden Schwanzbiopsien oder  $1 \times 10^7$  embryonale Stammzellen (ESCs) für 12 Stunden bei 55 °C in 600 µl TSE Puffer inkubiert und für 3 Minuten bei 14.000 g zentrifugiert. Danach wurden 400 µl des Überstandes abgenommen und die Proteinase K für zehn Minuten bei 100 °C hitzeinaktiviert. Für Genotypisierungs-PCRs wurde der erhaltene Überstand direkt eingesetzt. Bei ESC-DNA erfolgte eine Fällung mit 1 ml 95 % Ethanol. Die DNA wurde mit einer gebogenen Pasteurpipette aus dem Gefäß gezogen, zum Waschen in 70 % Ethanol eingetaucht und dann in ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

Zur DNA-Isolierung aus ESC-Klonen im 96-*well*-Plattenformat wurden ESC-Klone bis zur Konfluenz kultiviert, mit PBS gewaschen und 50 µl ESC-Lysepuffer pro Vertiefung pipettiert. Die Platten wurden mit Folie verschlossen und für 12 Stunden bei 55 °C inkubiert. Nach Abkühlen der Platte erfolgte Fällung der DNA mit 100 µl 95 % Ethanol pro Vertiefung für 2 Stunden unter leichtem Schütteln. Durch Invertieren der Platte wurde der Überstand dekantiert und mit 100 µl 70 % Ethanol pro Vertiefung gewaschen. Im Anschluss wurde die DNA getrocknet und in ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 2.4.2.2 Isolierung von DNA aus Bakterien

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien im größeren Maßstab wurde das *Qiagen Plasmid Maxi Kit* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben verwendet. Plasmidpräparationen im kleineren Maßstab erfolgten mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Hilden). Eine Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte durch photometrische Messung mit einem Nanodrop 1000 (Fisher Scientific, Schwerte).

## 2.4.3 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch Polymerasekettenreaktion

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte durch Verwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR). Als Polymerasen kamen die *Taq-DNA-Polymerase* (Roche Applied Science, Mannheim) für Genotypisierungen und Sondenproduktion sowie die *Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase* (Fisher Scientific, Schwerte) zum Einsatz. Die PCR-Ansätze wurden nach Herstellerangaben in Volumina von 20 bis 50 µl pipettiert. Die verwendeten *primer* sind in Tabelle 5 aufgeführt. Die *annealing*-Temperatur wurde durch Verwendung des Web-

Tools *primer-blast* (NCBI) berechnet. Die Dauer des Elongationsschrittes wurde nach Ermittlung der erwarteten Fragmentgrösse entsprechend den Herstellerangaben festgelegt.

**Tab 5.:** Zur Klonierung, *Southern Blot*-Sonden-Generierung und Genotypisierung verwendete *primer*.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Restriktions-schnittstelle(n)	Beschreibung
5'AH_for	<b>GTTT</b> <sup>^</sup> AAACTTTTTTCCTGTA GAAAGACTTTCTCAACCAAG GACACACATTG	PmeI	Amplifikation des 5'-Homologiearms für pACN-TV-XCR1
5'AH_rev	<b>TTAAT</b> <sup>^</sup> TAACCTCAAATATTT GAGAACAATTTCTAACAGTA AGCTCTGCCTCCCTTTCAGGG G	PacI	
ZS_for	<b>GG</b> <sup>^</sup> CGCGCGCGAT <sup>^</sup> CGCG GGATACTGAGAGGATCTGAA ATGATAGACATGTTGGGTTTA AATCCAC	AscI, AsiSI	Amplifikation des endogenen Intron-Exon-Übergangs des XCR1-Lokus für pACN-TV-XCR1
ZS_rev	<b>A</b> <sup>^</sup> CGCGT <b>G</b> <sup>^</sup> AATTCAAATGT TCCTTAATGACTTTATGTAGT AGCCCAATTCTC	MluI, EcoRI	
3'AH_for	<b>GG</b> <sup>^</sup> CGCGCCAAATATCCTCT TCTTGACACTGAAACCTGGAC CAAAGGAAAATG	AscI	Amplifikation des 3'-Homologiearms für pACN-TV-XCR1
3'AH_rev	<b>GCGAT</b> <sup>^</sup> CGCTACTGAGAGGA GAGGATGGGCACATGGAGAT GACTATGGGAGGTAAAGG	AsiSI	
DTA_for	<b>GCGAT</b> <sup>^</sup> CGCTCACACCACAG AAGTAAGGTTTCCTTC	AsiSI	Amplifikation des Diphtherietoxin A-Gens für pACN-TV-XCR1
DTA_rev	<b>GCGAT</b> <sup>^</sup> CGCAGCCACCATGG ACCCTGATGATGTTG	AsiSI	
GT1_wt_for	CTTGGCCTCAGTCTACCAGC	-	Genotypisierung von Stammzellklonen, chimären Mäusen und Nachkommen chimärer Mäuse nach Keimbahntransmission
GT1_wt_tg_rev	TCCCCATGGGTATCATGTCT	-	
GT1_tg_for	TGTAGTGCTCAGCCTTCCCT	-	
GT2_wt_tg_rev	ACGAAGTGTGCTTTGGCTT	-	
GT2_tg_for	TGTAGTGCTCAGCCTTCCCT	-	
GT2_wt_for	ATCTTCGGCATCAGCCTCTA	-	
XCR1_probe_5_for	GTTGGTTAGACCAAAAGACC CCCAA	-	Amplifikation der Sequenz zur Synthese der 5'-Sonde für den XCR1:DTA- <i>knock in</i>
XCR1_probe_5_rev	AAT CTG AGA CTC AGA GGC AAG CC	-	
Xcr1_probe_3_for	GGGAACATAAAGACACAAA ACAGTATGG	-	Amplifikation der Sequenz zur Synthese der 3'-Sonde für den XCR1:DTA- <i>knock in</i>
Xcr1_probe_3_rev	GCTAAATGTACATCTAGTCAT ACC	-	

Restriktionsschnittstellen in der Sequenz sind fett gedruckt.

#### 2.4.4 Klonierung von DNA Fragmenten

Durch PCR amplifizierte oder durch Restriktionsverdau erhaltenen DNA-Fragmente wurden durch Subklonierung in die Plasmide pJet1.1 bzw. pJet1.2 unter Verwendung des *CloneJET PCR Cloning Kits* (Fermentas, St. Leon-Rot) kloniert. Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde die *T4 DNA Ligase* (Invitrogen, Darmstadt) verwendet. Alle Restriktionsenzyme zur Klonierung von DNA-Fragmenten und zur *Southern Blot* Analyse wurden von New England Biolabs GmbH, Frankfurt bezogen.

#### 2.4.5 Southern Blot -Analyse

Zum nicht-radioaktiven Nachweis von DNA Fragmenten bei der *Southern Blot*-Analyse wurden Digoxigenin-(DIG-)markierte Sonden verwendet, welche durch einen anti-DIG-Alkalische Phosphatase-Antikörper und das Substrat CSPD ( $C_{18}H_{20}ClO_7PN_2$ ) nachgewiesen werden können. Zur Herstellung der Sonden wurden die für Sonden ausgewählten Sequenzen subkloniert und unter Verwendung des *DIG PCR-Labeling Kit* (Roche Applied Science, Mannheim) in DIG-markierte Sonden umgeschrieben. Die erhaltenen 5'-Sonden (448 bp) und 3'-Sonden (501 bp) zur Analyse von Stammzellklonen wurden durch *Southern Blot*-Analysen auf Spezifität getestet. Die Sonden wurden dabei 1 zu 500 in *DIG Easy Hyb* (Roche Applied Science, Mannheim) gelöst.

Die *Southern Blot*-Analyse erfolgte basierend auf dem Protokoll von Southern, 1975. Die zu analysierende DNA (10 µg oder Stammzell-DNA isoliert aus einer Vertiefung einer 96-well-Platte) wurde mit einem Restriktionsenzym geschnitten und gelelektrophoretisch in 0,7 % Agarose aufgetrennt. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurde die DIG-markierte DNA-Leiter *Molecular Weight Marker II* (Roche Applied Science, Mannheim) aufgetragen. Das DNA-Gel wurde für 5 Minuten in 0,25 M HCl-Lösung bei 25 °C depuriniert, in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und zweimal in Neutralisierungslösung für 15 Minuten bei 25 °C gewaschen. Zur Equilibrierung wurde das Gel in 20X SSC überführt und durch Verwendung einer Vakuum-Blotting-Apparatur (Pharmacia, Uppsala) auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche Applied Science, Mannheim) für 4 Stunden bei 60 mmH<sub>2</sub>O Unterdruck geblottet. Die Membran mit den übertragenen DNA-Fragmenten wurde in ddH<sub>2</sub>O gewaschen und zur Quervernetzung 120 mJ UV-Licht ausgesetzt (Stratalinker, Stratagene, La Jolla, USA). Nach erneutem Waschen in ddH<sub>2</sub>O erfolgte die Prähybridisierung der Blots in je 5 ml *DIG Easy Hyb* (Roche Applied Science, Mannheim) in rotierenden Hybridisierungsröhrchen für 30 Minuten bei 50 °C. Danach

wurde der Hybridisierungspuffer durch die jeweilige Sonde ersetzt und bei 50 °C im Rollinkubator für 12 Stunden inkubiert. Nun erfolgte Stringenzwaschen der Membran zweifach in 2X SSC + 0,5 % SDS bei 22 °C für je 5 Minuten und im Anschluss zweifach in 0,5X SSC + 0,1 % SDS bei 65 °C für je 15 Minuten im Schüttelwasserbad. Zur Detektion der Sonde wurde die Membran für 30 Minuten bei 22 °C in Blockierungspuffer schüttelnd inkubiert und in Blockierungspuffer unter Zugabe von anti-DIG-Alkalische Phosphatase (Roche Applied Science, Mannheim, 1:10.000) für 30 Minuten bei 22 °C schüttelnd inkubiert. Das Entfernen von unspezifisch gebundenen Antikörpern erfolgte durch zweifaches Schütteln in Waschpuffer für je 15 Minuten bei 22 °C. Dann wurde die Membran für 3 Minuten in Detektionspuffer transferiert und im Anschluss mit CSPD-Lösung (Roche Applied Science, Mannheim) benetzt. Nach kurzer Inkubation erfolgte ein Einschweißen der Membran in Polyethylenfolie und anschließende Detektion des Signals mittel des *Bio-Imaging*-Systems (Peqlab, Erlangen). Um DNA-Fragmente mit verschiedenen Sonden zu detektieren wurde ein *stripping* der Membran durchgeführt. Dazu wurde die Membran zweifach in *stripping*-Lösung für 15 Minuten bei 37 °C schüttelnd inkubiert, kurz mit 2X SSC gewaschen, erneut prähybridisiert und mit der zweiten Sonde hybridisiert.

#### **2.4.6 Transformation in *Escherichia coli* und Bakterienkultur**

Zur Vermehrung der rekombinanten DNA wurden *Escherichia coli* XL-1 *blue* bzw. *E. coli* XL-10 *gold* durch Hitzeschock nach Standardmethoden mit Plasmiden transformiert (Sambrook *et al.*, 1989; Hanahan 1983; Hanahan *et al.*, 1991). Anzucht der Bakterien erfolgte auf LB-Agarplatten. Zur Selektion auf Resistenzgene wurden Ampicillin (100 µg/ml) und/oder Kanamycin (50 µg/ml) zugesetzt. Schüttelkultur von *E. coli* erfolgte in LB-Medium unter Zugabe der entsprechenden Antibiotika.

#### **2.4.7 Gelelektrophoretische Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten**

Zur Auftrennung linearer DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe erfolgte eine Aufnahme in 1X DNA-Probenpuffer und Analyse in Agarosegelen (1X TAE-Laufpuffer, 0,7-2 % Agarose). Zur Abschätzung der Fragmentgrößen wurde jeweils eine DNA-Leiter (z.B. *100 bp DNA ladder*, Invitrogen, Darmstadt) mitgeführt. Falls eine Dokumentation der DNA-Banden erfolgen sollte, wurde Ethidiumbromid zu Laufpuffer und Gel in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml gegeben. DNA zur Klonierung oder aus Genotypisierungs-PCRs wurde in Minigelkammern bei 70 V (8 V/cm) aufgetrennt. Zur Isolierung von DNA aus Gelfragmenten wurde das *QIAquick Gel*

*Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) verwendet. DNA-Fragmente zur *Southern Blot*-Analyse wurden in 10 x 15 cm Gelkammern mit 15-Zahn-Kamm bei 80 V (10 V/cm) für 3 Stunden aufgetrennt. Der Nachweis der DNA-Banden erfolgte auf einem Transilluminator bei 312 nm.

#### 2.4.8 Quantitative *real-time*-PCR

Zur Bestimmung der Kopienzahl von XCR1-mRNA in Zellen aus Maus und Mensch wurde die quantitative *real-time*-PCR mit TaqMan-Sonden (qPCR) durchgeführt. Nach Isolierung und Integritätsbestimmung der RNA erfolgte eine reverse Transkription von 100 ng RNA mit dem *AMV Reverse Transcription System* (Promega, Madison, USA) unter Verwendung von *random hexamer-primern*. Die anschließende qPCR erfolgte mit den in Tabelle 6 angegebenen *primern* und Sonden. Die TaqMan-Sonden waren am 5'-Ende mit dem *reporter*-Fluoreszenzfarbstoff FAM (6-Carboxy-Fluorescein) und am 3'-Ende mit dem *quencher* TAMRA (6-Carboxy-tetramethylrhodamin) oder MGB (*minor groove binder*) gekoppelt.

Ansatz (20 µl): 1× Absolute QPCR low ROX Mix (Fisher Scientific, Schwerte);  
300 nM jedes *primers*; 150 nM Sonde; 1/10 der cDNA

Die qPCR wurde in Doppelbestimmungen am ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA) mit folgendem Programm durchgeführt: Enzymaktivierung für 15 Minuten bei 95 °C, 40 Zyklen (95 °C, 15 Sekunden; 60 °C, 1 Minute). Die Berechnung der Kopienzahl erfolgte anhand eines mitgeführten Standards, welcher aus einer bis 10<sup>8</sup> Kopien eines XCR1-cDNA-enthaltenden Plasmids bestand. Das *primer*-Sonde-Set zum Nachweis von murinem und humanem XCR1 wurde so gewählt, dass ein exonüberspannendes Fragment des XCR1-Transkripts detektiert wird, was Verfälschungen der Ergebnisse durch Verunreinigungen mit genomischer DNA ausschließt. Zusätzlich zur XCR1-qPCR wurde die cDNA für eine Analyse mit einem *primer*-Sonde-Set gegen das Haushaltsgen β2-Mikroglobulin (mubMG bzw. hubMG) eingesetzt.

**Tab. 6: Übersicht der für die qPCR verwendeten Oligonukleotide.**

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	PCR
muXCR1 F1	CCTACGTGAAACTCTAGCACTGG	Murines XCR1 Set 1
muXCR1 R1	AAGGCTGTAGAGGACTCCATCTG	
muXCR1 S1	FAM-TACAGACTTGAAACCC-MGB	
mubMG F	ATTCACCCCCACTGAGACTGA	Murines $\beta$ 2-Microglobulin
mubMG R	CTCGATCCCAGTAGACGGTC	
mubMG-Sonde	FAM-TGCAGAGTTAAGCATGCCAGTATGGCCG-TAMRA	
huXCR1 F1	TCAAGACGCATGTAAAGAGGTGTAG	Humanes XCR1 Set 1
huXCR1 R1	GTTGCCTGAGGACTCCATCTG	
huXCR1 S1	FAM-TGCTCTAAACGTCCCTGCCATCTGGT-TAMRA	
huXCR1 F2	TTGCCTGTGTGGATCTCCC	Humanes XCR1 Set 2
huXCR1 R2	CGGTGGATGGTCATGATGG	
huXCR1 S2	FAM-CATCAGCCTCTACAGCAGCATCTTCTTCCT-TAMRA	
hubMG F	GCCGTGTGAACCATGTGACT	Humanes $\beta$ 2-Microglobulin
hubMG R	CGGCATCTTCAAACCTCCA	
hubMG-Sonde	FAM-TAAGTGGGATCGAGACATGTAAGCAGCATC-TAMR	

## 2.5 Histologie

### 2.5.1 Detektion von $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in B6.XCR1:LacZ-Mäusen

Zur Analyse der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität zum Nachweis von XCR1 wurden Gewebe wie Milz, Lymphknoten, Peyersche Plaques oder Dünndarm aus homozygoten B6.XCR1:LacZ-Mäusen präpariert und für 4 Stunden durch Eintauchen in 4 % Paraformaldehyd in PBS bei 4 °C fixiert. Das Gewebe wurde in PBS gewaschen und in 10 % Sucrose in PBS bei 4 °C über Nacht inkubiert. Milz und Dünndarmproben wurden in 0,9 % Natriumchloridlösung schockgefroren während Lymphknoten und Peyersche Plaques in Tissue-Tek (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, USA) eingebettet und schockgefroren wurden. Es wurden 12  $\mu$ m Gefrierschnitte angefertigt, auf 2 % Aminopropyltriethoxysilan-beschichtete Objektträger übertragen und für 12 Stunden bei 22 °C getrocknet. Zum Nachweis der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität wurden die Schnitte mit hydrophobem Wachsstift umrandet und mit 100  $\mu$ l XGal-Färbelösung für 8 bis 12 Stunden bei 37 °C in einer humiden Kammer inkubiert. Dann wurden die Objektträger dreimal für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Die Gegenfärbung erfolgte für 30 Sekunden in 1 % Neutralrotlösung, anschließend wurden die Schnitte erneut mit PBS gewaschen und in Kaisers Glyceringelatine eingedeckelt.

## 2.6 Zellbiologische Methoden

### 2.6.1 Verwendete Zelllinien und Reagenzien

**Stammzelllinie ESCArt**; Passage 27; Erhalten von Marc Schmidt-Supprian, Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried;

**HeLa**, American Type Culture Collection CCL-2

**Tab. 7: Verwendete Puffer für zellbiologische Methoden.**

Bezeichnung	Zusammensetzung
ACK Puffer zur Erythrozytenlyse	0,15 mM NH <sub>4</sub> Cl, 10 mM KHCO <sub>3</sub> , 0,1 mM Na <sub>2</sub> EDTA, pH 7,2
PBS	136,89 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 1,47 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 8,05 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7,3
FACS-PBS	PBS, 2,5 % FCS, 0,1 % NaN <sub>3</sub>
MACS-PBS	PBS, 0,5 % BSA (Fraktion V, Endotoxingehalt <1 EU/mg, PAA Laboratories, Cölbe)
Trypsin-Lösung	PBS 0,025 % Trypsin
2X-Trypsin-Lösung	PBS, 0,05 % Trypsin, 0,04 % EDTA
Einfriermedium	FCS, 20 % DMSO
Transfektionspuffer	20 mM Hepes, 137 mM NaCl, 15 mM KCl 0,7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 6 mM Glukose, 0,1 mM β-Mercaptoethanol
Viacount Reagenz	2,5 µg/ml LDS-751, 1 µg/ml Propidiumiodid, 5 mM EDTA, 0,05 % NaN <sub>3</sub> , in PBS, pH 7,3
Waschpuffer	0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, 0,3 % Tween 20, pH 7,5
Detektionslösung	0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH 9,5

**Tab. 8: Verwendete Zellkulturmedien.**

Bezeichnung	Zusammensetzung
ESC-Medium	DMEM/high glucose, 20 % fötales Kälberserum (FCS, Pan Biotech, Aidenbach), 2 mM Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 0,1 mM Nicht-essentielle Aminosäuren (Invitrogen, Darmstadt), 0,1 mM β-Mercaptoethanol, 2000 U/ml ESGRO ( <i>Leukaemia inhibitory factor</i> , Millipore, Bedford, USA)
MEF-Medium	DMEM/high glucose, 10 % FCS (Invitrogen, Darmstadt), 2 mM Glutamin
MMC-Medium	Zellkulturmedium, 1 % Mitomycin C
R10F <sup>+</sup>	RPMI 1640 (Biochrom AG, Berlin), 10 % FCS (Biochrom AG, Berlin), 2 mM Glutamin (Invitrogen, Darmstadt), 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin (Invitrogen, Darmstadt)

Das FCS wurde vor Verwendung hitzeinaktiviert (45 Minuten bei 55 °C).

### **2.6.2 Zellkulturbedingungen**

Die Kultivierung erfolgte in Zellkulturflaschen verschiedener Größe (25, 75 und 175 cm<sup>2</sup>) und in Zellkulturplatten (6-, 24- oder 96-*well*). Einfrieren von Zellen erfolgte in Kryogefäßen oder 96-*well*-Platten. Die Kultivierung von murinen und humanen Zellen erfolgte in Begasungsbrutschränken mit gesättigter Wasserdampfatmosphäre bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

### **2.6.3 Bestimmung der Zellzahl in Suspensionen**

Die Bestimmung der Zahl primärer Zellen oder Zelllinien erfolgte entweder unter Verwendung des Guava PCA (Guava Technologies, Hayward, USA) oder in Neubauer-Zählkammern. Zur Messung mit dem Guava PCA wurden die Zellen in Viacount Reagenz verdünnt und die Anzahl lebender, nukleärer Zellen durch die ViaCount Software (Guava Technologies, Hayward, USA) ermittelt. Zur Bestimmung mittels Zählkammer erfolgte eine Färbung in 0,001 % Trypanblaulösung und anschließende Ermittlung der Zahl lebendiger Zellen.

### **2.6.4 Trypsinierung adhärenter Zellen**

Zum Ablösen adhärenter Zelllinien wurde die Kulturflasche mit PBS gewaschen mit 2 bis 5 ml Trypsinlösung für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Durch leichtes Klopfen wurden die gesamten Zellen abgelöst und die Reaktion durch Zugabe von 10 ml Medium gestoppt. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation bei 280 g für 5 Minuten bei 22 °C. Die Zellen wurden in Medium aufgenommen und verwendet oder weiter kultiviert.

### **2.6.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Adhärente Zellen wurden bis zur Konfluenz, Suspensionszellen bis zur nötigen Dichte in Medium kultiviert, für 6 Minuten bei 22 °C und 380 g zentrifugiert und 5x10<sup>6</sup> Zellen in 0,5 ml des entsprechenden Zellmediums aufgenommen. Dann erfolgte der Transfer in Einfriergefäße und die tropfenweise Zugabe von 0,5 ml Einfriermedium unter Schütteln des Gefäßes. Die Zellen wurden in einer isolierten Box auf -70 °C heruntergekühlt und in flüssigem Stickstoff gelagert. Beim Einfrieren von Zellen im 96-*well*-Format erfolgte eine Trypsinierung der Zellen in 30 µl Trypsin-Lösung sowie ein Abstoppen mit 30 µl FCS. Dann wurden 60 µl Einfriermedium pro Vertiefung zugegeben und die Zellen resuspendiert. Durch Überschichten mit 80 µl Mineralöl erfolgte ein Versiegeln der Platte. Die 96-*well*-Platten wurden in Aluminiumfolie gewickelt und in einer isolierten Box bei -70 °C eingefroren.

Zum Auftauen von Zellen wurde das Einfriergefäß bei 37 °C im Wasserbad erwärmt und die Zellen in 20 ml Medium überführt. Im Folgenden wurden die Zellen bei 280 g für 5 Minuten bei 22 °C zentrifugiert und in geeignetem Volumen an Medium aufgenommen und in das Kulturgefäß überführt. Auftauen einzelner Klone aus 96-*well*-Platten erfolgte durch Erwärmen der Platte bei 37 °C, Entnahme der entsprechenden Klone und Transfer in 48-*well*-Platten.

### **2.6.6 Isolierung und Kultivierung von embryonalen Fibroblasten der Maus**

Embryonen eines neomycinresistenten Mausstamms wurden im Stadium E13,5 isoliert und in PBS gewaschen. Innere Organe der Embryos wurden entfernt, die Überreste zerteilt und erneut in PBS gewaschen. Embryogewebe wurde im Folgenden in 50 ml Trypsin-Lösung überführt und für 30 Minuten inkubiert, wobei das Gewebe alle 5 Minuten gemischt wurde. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von 50 ml MEF-Medium gestoppt. Der Überstand wurde abgenommen und für 5 Minuten bei 280 g und 22 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 ml MEF-Medium aufgenommen und jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen per 10 cm-Kulturschale ausgesät. Nach Erreichen der Konfluenz wurde die Zellen durch Trypsinierung geerntet und Aliquots von  $5 \times 10^6$  Zellen entsprechend des Protokolls eingefroren.

Zur Kultur einer embryonalen Stammzelllinie (ESC) wurden embryonale Fibroblasten der Maus (MEFs) als *feeder*-Zellen präpariert und in Kulturschalen mit MEF-Medium kultiviert. Diese Zellen wachsen adhärent und ermöglichen Zell-Zell-Kontakte zu den ESCs, was Wachstum und Teilung begünstigt, ohne dass es zur Differenzierung kommt.

Um ein Wachstum der ESCs auf konfluenten MEFs zur ermöglichen erfolgte eine Behandlung der MEFs mit Mitomycin C, was Zellteilung und somit weiteres Wachstum der MEFs verhindert. Dazu wurde das MEF-Medium durch MMC-Medium ersetzt und die Zellen für 2 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden zweifach mit PBS gewaschen, trypsinisiert, für 5 Minuten bei 280 g und 22 °C zentrifugiert und mit MEF-Medium auf frische Kulturschalen plattiert.

### **2.6.7 Elektroporation von embryonalen Stammzellen**

Zur Generierung genetisch veränderter Mauslinien wurden ESCs der Linie C57BL/6Art verwendet. Zur Elektroporation dieser ESCs wurden Zellen in der frühen Wachstumsphase verwendet, welche gleichmäßig rund geformte Kolonien bilden. Zwei Stunden vor Elektroporation wurde frisches ESC-Medium auf die Zellen pipettiert und  $1 \times 10^7$  ESCs nach Waschen in PBS in 700 µl Elektroporationspuffer aufgenommen. Die Zellen wurden zusammen

mit 30 µg linearisierter Plasmid-DNA in 100 µl PBS in eine 0,1 cm-Küvette überführt und nach Durchmischen mit dem *Gene Pulser* (Biorad, München) bei 500 µF, 240 V transfiziert. Danach wurden die Zellen kurz resuspendiert, für 10 Minuten bei 22 °C inkubiert und in 30 ml ESC-Medium überführt. Die transfizierten Zellen wurden auf vier 10 cm-Kulturschalen mit konfluenten MMC-behandelten MEFs plattiert. Das Medium wurde nach 12 Stunden gewechselt und ab 48 Stunden erfolgte die Positivselektion.

Stammzellklone, bei welchen eine unspezifische Integration des linearisierten Vektors ins Genom stattgefunden hat, wurden durch die im *targeting*-Vektor außerhalb der Homologiearme enthaltene PGK-DTA-Kassette deletiert (Negativselektion). Um Stammzellen ohne erfolgte Integration des Konstrukts abzutöten wurde das Medium der elektroporierten ESCs nach 48 Stunden durch ESC-Medium + 200 µg/ml G418 (Geneticin, Invitrogen, Darmstadt, 75 % Aktivität) ersetzt. Zellen mit erfolgter Integration überleben die Behandlung auf Grund der enthaltenen Neomycinresistenzkassette (Positivselektion; Colbère-Garapin *et al.*, 1981). Mediumwechsel erfolgte täglich mit ESC-Medium + 200 µg/ml G418 bis Koloniewachstum feststellbar war.

#### **2.6.8 Picken von ESC-Kolonien nach Elektroporation und Selektion**

Sechs Tage nach erfolgter Selektion konnten Kolonien einzelner Klone auf den Platten festgestellt werden, welche verschieden schnelles Wachstum zeigten. Es erfolgte ein Picken der Klone an 3 aufeinanderfolgenden Tagen. Dazu wurde das Selektionsmedium der ESC-Kolonien durch PBS bei 4 °C ersetzt und jeder einzelne Klon mit einer 200 µl-Pipettenspitze zusammen mit 50 µl PBS aufgenommen und in eine 96-*well*-Rundbodenplatte überführt. Nach Picken aller Kolonien entsprechender Größe wurde in jede der Vertiefungen 50 µl 2X Trypsin-Lösung gegeben, 8 mal resuspendiert und für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Folgenden wurden 150 µl ESC-Medium + 200 µg/ml G418 zugegeben und jede 96-*well*-Platte auf drei 96-*well*-Flachbodenplatten aufgeteilt, auf denen zuvor MEFs plattiert wurden. Dabei wurde die Position des jeweiligen Klons auf den Platten beibehalten.

Nach erfolgtem Picken wurden die ESCs in den 96-*well*-Platten unter täglichem Mediumwechsel bis zur Konfluenz kultiviert. Im Anschluss wurden alle ESC-Klone trypsiniert und auf drei 96-*well*-Platten aufgeteilt. Dabei waren zuvor auf zwei der Platten MMC-behandelte MEFs kultiviert worden, während in die dritte Platte die ESC-Klone ohne MEFs transferiert wurden. Eine der Platten wurde kultiviert bis die ersten Klone optimales Koloniewachstum zeigten und

dann eingefroren. Eine weitere Platte wurde länger kultiviert, bis auch die langsamer wachsenden Klone geeignetes Koloniewachstum zeigten. Die Klone der dritten, MEF-freien Platte wurden kultiviert und zur Isolierung der DNA verwendet (siehe 2.4.2.1).

Durch die *Southern Blot*-Analyse als positiv charakterisierte Klone wurden aus der bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagerten 96-*well*-Platte aufgetaut und in 48-*well*-Platten mit MMC-behandelten MEFs für 2 bis 3 Tage unter täglichem Mediumwechsel expandiert. Danach wurden die Zellen trypsiniert und in 6-*well*-Platten mit MMC-behandelten MEFs transferiert. 6-*well*-Platten wurden nach 2 Tagen 1:4 aufgeteilt und einzelne Klone in Aliquots eingefroren.

### **2.6.9 Kultivierung humaner CD8<sup>+</sup> T-Zell-Klone**

Für Kreuzpräsentationsexperimente mit humanen dendritischen Zellen wurden die Humanes Cytomegalie Virus (HCMV) pp65<sub>495-503</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Klone 10 und 61 verwendet (Fonteneau *et al.*, 2001). Diese Klone erkennen pp65-Peptid, welches im Kontext von HLA-A\*0201 präsentiert wird. Die Klone wurden von Dr. Frédéric Ebstein erhalten und unter Verwendung einer Epstein Barr Virus-B-Zell-Linie ( $2 \times 10^4$  pro Vertiefung) und mononukleären Zellen aus peripherem Blut (PBMCs) ( $2 \times 10^5$  pro Vertiefung) (beide bestrahlt mit 43 Gy) als *feeder*-Zellen, 1  $\mu\text{g/ml}$  Leucoagglutinin PHA-L (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) und 150 U/ml rekombinantem IL-2 in R10F<sup>+</sup> expandiert. Diese Experimente wurden zusammen mit Dr. Frédéric Ebstein, Institut für Biochemie, Charité, Berlin durchgeführt.

### **2.6.10 Herstellung von zellassoziertem Antigen für humane Kreuzpräsentationsassays**

HCMV pp65 cDNA wurde in den Vektor pcDNA3.1/myc-His kloniert, 24  $\mu\text{g}$  dieser Vektor-DNA mit 24  $\mu\text{l}$  Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Darmstadt) in 3 ml Opti-MEM Medium (Invitrogen, Darmstadt) überführt und zur Transfektion von  $2 \times 10^6$  HeLa Zellen verwendet. Transfizierte Zellen wurden trypsiniert und in R10F<sup>+</sup> aufgenommen. Nach Waschen in PBS erfolgte ein vierfaches Einfrieren und Wiederauftauen zur Fragmentierung des Zellmaterials. Die Transfektionseffizienz wurde durch Western Blot-Analysen von 5  $\mu\text{g}$  des Zelllysates unter Verwendung eines pp65-spezifischen monoklonalen Antikörpers kontrolliert (Tab. 3). Diese Arbeiten wurden zusammen mit Dr. Frédéric Ebstein, Institut für Biochemie, Charité, Berlin durchgeführt.

## **2.7 Präparation primärer Zellen**

### **2.7.1 Präparation primärer Zellen der Maus**

#### **2.7.1.1 Isolierung dendritischer Zellen aus lymphatischen Organen**

Isolierung von Zellen aus Milzen erfolgte durch Zerkleinern der Organe und Pressen durch ein 70 µm Nylon-Zellsieb (BD Biosciences, Heidelberg). Erythrozyten in der Zellsuspension wurden durch einminütige Inkubation in ACK-Puffer bei 22 °C lysiert. Danach wurden die Zellen in 50 ml PBS gewaschen und erneut über 70 µm Nylon-Zellsiebe gegeben. Dann erfolgte Zentrifugation für 8 Minuten bei 380 g und 4 °C. Das Zellpellet wurde in FACS-PBS aufgenommen, die Zellen gezählt und zur durchflusszytometrischen Analyse gefärbt.

Zur Isolierung von Zellen aus Lymphknoten und Peyerschen Plaques wurden die Gewebe von Fett befreit, in kleine Fragmente zerrissen und in 1 ml R10F<sup>+</sup>, 0,5 mg/ml Collagenase D (Roche Applied Science, Mannheim), 20 µg/ml DNase I (Roche Applied Science, Mannheim) für 10 Minuten bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von EDTA (Endkonzentration 10 mM) gestoppt und das Gewebe durch ein 70 µm Nylon-Zellsieb gedrückt. Zur Anreicherung von dendritischen Zellen (DCs) erfolgte eine unter 2.7.1.3 beschriebenen Dichtegradientenzentrifugation.

#### **2.7.1.2 Isolierung mononukleärer Zellen aus Dünndarmgewebe**

Zur Isolierung mononukleärer Zellen aus dem Dünndarm wurde der gesamte Dünndarm einer Maus präpariert und die Peyerschen Plaques entfernt. Daraufhin wurde der Darm längst aufgeschnitten und mehrfach in PBS gewaschen. Das Gewebe wurde in 1 cm lange Fragmente zerschnitten und für 8 Minuten in PBS, 2 % FCS, 1 mM EDTA, 1 mM DTT schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wurde entfernt und das Gewebe für weitere 8 Minuten bei gleichen Bedingungen in PBS, 2 % FCS, 1 mM EDTA inkubiert. Nach Entfernen des Überstands wurde das Gewebe homogenisiert und für 45 Minuten in R10F<sup>+</sup> unter Zugabe von 0,5 mg/ml Collagenase VIII (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) und 20 µg/ml DNase I (Roche Applied Science, Mannheim) schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension durch ein 70 µm Nylon-Zellsieb gegeben und mit FACS-PBS gewaschen. Zur Voranreicherung von DCs erfolgte eine unter 2.7.1.3 beschriebenen Dichtegradientenzentrifugation.

### **2.7.1.3 Anreicherung von murinen DCs durch Dichtegradientenzentrifugation**

Zur Anreicherung von murinen DCs aus lymphatischen Geweben und mononukleären Zellen aus dem Dünndarm wurden maximal  $5 \times 10^8$  Zellen aus Gewebepräparationen (2.7.1.1 und 2.7.1.2) zweifach in 50 ml PBS gewaschen und in 10 ml Nycodenz-Lösung mit einer Dichte von 1.073 g/ml (9,4 ml Nycoprep, Axis Shield, Heidelberg, 1.077 g/ml + 0,6 ml PBS, 1,01 g/ml, PAA, Cölbe) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf 5 ml derselben Nycodenz-Lösung in einem 50 ml-Röhrchen überschichtet. Im Folgenden wurde zusätzlich mit 4 ml R10F<sup>+</sup> überschichtet und für 10 Minuten bei 4 °C und 1700 g (ungebremst) zentrifugiert. Der Überstand inklusive der Interphase wurde danach abgenommen, in 30 ml MACS-PBS gewaschen und für 8 Minuten bei 380 g und 4 °C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in geeignetem Volumen R10F<sup>+</sup> oder MACS-PBS aufgenommen.

## **2.7.2 Präparation primärer Zellen aus humanem peripheren Blut**

### **2.7.2.1 Präparation mononukleärer Zellen aus humanem peripheren Blut (PBMCs)**

Zur Isolierung von PBMCs wurden *buffy coats* oder Leukapheresepreparate verwendet. Ein *buffy coat* wurde in zwei 50 ml-Röhrchen überführt und bei 400 g für 30 Minuten bei 18 °C zentrifugiert (Bremse 1). Die Interphase wurde abgenommen und mit PBS auf 70 ml aufgefüllt. Es erfolgte eine Überschichtung von 15 ml *Biocoll Separating Solution* (Biochrom, Berlin; 1,077 g/ml) mit jeweils 35 ml der Zellsuspension und Zentrifugation bei 400 g für 30 Minuten bei 18 °C (Bremse 1). Die Interphase wurde abgenommen und die Zellen wurden zweifach in PBS gewaschen und das Zellpellet in MACS-PBS aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

### **2.7.2.2 Voranreicherung humaner DC-Populationen aus peripherem Blut**

Zur Isolierung von humanen DCs war eine Voranreicherung aus PBMCs nötig. Für funktionelle Analysen wurden jeweils alle DC-Populationen aus dem Blut desselben Spenders isoliert. Eine Voranreicherung erfolgte durch Verwendung von Kits zur magnetischen Zellsortierung (MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach) nach Angaben des Herstellers (Tab. 9). Die Anreicherung von CD1c<sup>+</sup> DCs basierte auf einer Entfernung von CD1c<sup>+</sup> B-Zellen und der anschließenden positiven Sortierung von DCs mit dem Oberflächenmarker CD1c. CD16<sup>+</sup> DCs wurden durch Entfernung der CD15<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> Granulozyten sowie der CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK-Zellen und positiver Sortierung mittels des Oberflächenmarkers CD16 angereichert. Eine Aufreinigung von

CD141<sup>+</sup> DCs erfolgte durch direkte positive Sortierung mittels CD141-gekoppelter paramagnetischer Partikel. Zur Anreicherung von plasmazytoider DCs (pDC) wurde ein Kit verwendet, welches nicht-pDCs aus der Zellsuspension abreichert. Im Anschluss an die Voranreicherung erfolgte eine durchflusszytometrische Sortierung aller Populationen anhand von spezifischen Oberflächenmarkern.

**Tab. 9: Voranreicherung verschiedener Subtypen dendritischer Zellen aus PBMCs.**

Zellpopulation	Anreicherung durch magnetische Sortierung	Spezifische Oberflächenmarker für die Durchflusszytometrie
CD1c <sup>+</sup> DC	CD1c (BDCA-1) <sup>+</sup> <i>Dendritic Cell Isolation Kit</i>	CD1c, CD11c, HLA-DR
CD 16 <sup>+</sup> DC	CD16 <sup>+</sup> <i>Monocyte Isolation Kit</i>	CD11c, CD16, HLA-DR
CD141 <sup>+</sup> DC	CD141 (BDCA-3) <i>MicroBead Kit</i>	CD11c, CD141, HLA-DR
pDC	<i>Plasmacytoid Dendritic Cell Isolation Kit</i>	CD304, HLA-DR

## 2.8 Herstellung humaner monozytengenerierte dendritischer Zellen

Zur Herstellung monozytengenerierter DCs (MoDCs) wurden CD14<sup>+</sup> Zellen magnetisch aus 1x10<sup>8</sup> PBMCs isoliert (CD14 *Micro Beads*, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach) und für 5 Tage in R10F<sup>+</sup>, 100 U/ml IL-4 kultiviert. Erhaltene Zellen wurden durchflusszytometrisch auf Viabilität und Verlust der Monozyten-spezifischen CD14-Expression getestet.

## 2.9 Durchflusszytometrie

### 2.9.1 Verwendete Farbstoffe

Zur durchflusszytometrischen Anfärbung von zellspezifischen Markern wurden fluorophorgekoppelte monoklonale Antikörper (mAbs) verwendet. Analyse und Zellsortierung erfolgten mit den Durchflusszytometern LSR II (BD Biosciences, Heidelberg) oder FACSAria II (BD Biosciences, Heidelberg). Die verwendeten Fluorochrome und Detektionsfilter sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

**Tab. 10: Optische Eigenschaften der genutzten Fluorochrome sowie Analysebedingungen.**

Fluorochrom	Anregungs- wellenlänge (nm)	Emissions- maximum (nm)	BP <sup>1</sup> Filter (LSRII)	BP <sup>1</sup> Filter (FACSAria II)
FITC	488	525	530/30	530/30
PE	488	575	585/42	585/42
PerCP	488	675/695	685/40	685/40
PE-Cy7	488	767	780/60	780/60
A647/Cy5/APC	633	665/667/660	670/14	620/20
A700	633	723	720/30	720/30
APC-Cy7	633	767	780/60	780/60
Pacific Blue/DAPI	405	451/460	440/40	450/40
Cascade Yellow/ DAPI	405	558/460	562/40	562/40
Pacific Orange	405	551	562/40	652/40

Angabe der Wellenlänge der Laser zur Anregung der Fluorochrome sowie der zur Detektion im jeweiligen Durchflusszytometer (LSRII und FACSAria II) verwendeten Filter. <sup>1</sup>BP, Bandpassfilter. Emissionsmaxima wurden zusammengestellt mit Daten von BD und Molecular Probes.

### 2.9.2 Oberflächenfärbung von Antigenen

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich, die Expression von Oberflächenmolekülen auf Einzelzellebene zu untersuchen (Radbruch, 2000).

Zur durchflusszytometrischen Analyse wurden bis zu  $2,5 \times 10^6$  Zellen pro Vertiefung in einer 96-well-Rundbodenplatten (Nunc) für 5 Minuten auf Eis mit anti-CD16/CD32 (Klon 2.4G2; 100 µg/ml) und Ratten IgG (Nordic; 50 µg/ml) im Fall von murinen Zellen und mit 2 mg/ml Endobulin (Baxter Hyland-Immuno Division) im Fall von humanen Zellen in FACS-PBS inkubiert. Dadurch wurden unspezifische Antikörperbindungen an Fc-Rezeptoren minimiert. Danach wurden die Zellen mit fluorphorgekoppelten Antikörpern in FACS-PBS für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Die optimale Konzentration des jeweiligen Antikörperkonjugates wurde zuvor durch eine Titration bestimmt.

Neben direkt an Fluorophore gekoppelten Antikörpern wurden auch Biotin- und Digoxigenin (DIG)-gekoppelte mAbs verwendet. Die Detektion der Biotin- bzw. DIG-gekoppelten Primäantikörper erfolgte mit fluoreszenzfarbstoffgekoppeltem Streptavidin bzw. anti-DIG Antikörpern für 5 bzw. 20 Minuten auf Eis. Die für Oberflächenfärbungen verwendeten Antikörper sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Die Färbung von CCR7 erfolgte für 2 Stunden

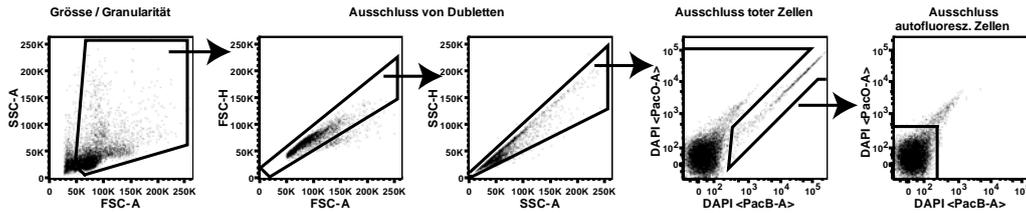
auf Eis.

Zum Nachweis von XCR1 auf der Zelloberfläche wurden 0,1 µg/ml des *Strep-tag*-konjugierten Liganden ATAC (ATAC-*Strep-tag*; exprimiert von Dr. Hans-Werner Mages) mit 7,5 µg/ml eines fluorophorgekoppeltem Sekundärreagenz (*Strep-Tactin*, IBA, Göttingen) in MACS-PBS für 20 Minuten auf Eis vorinkubiert und dann zusammen mit den fluorophorgekoppelten Antikörpern zur Färbung eingesetzt.

Da tote Zellen unspezifisch Antikörper binden, erfolgte eine Detektion dieser Zellen durch den DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffe DAPI (4',6'-Diamidino-2-Phenylindol; 0,33 µg/ml; Roche Applied Science, Mannheim). Bei lebenden Zellen wird dabei durch die Zellmembran ein Eindringen des Farbstoffes verhindert. Tote Zellen hingegen verlieren ihre Membranintegrität und sind in der späteren Analyse als DAPI<sup>+</sup> erkennbar.

### **2.9.3 Durchflusszytometrische Messung und Sortierung von Zellsuspensionen**

Zur Analyse wurden die Zellpopulationen am Durchflusszytometer gemessen. Zur aktiven Sortierung von Zellpopulationen wurde ein *gating*-Schema am FACSaria II erstellt und die Zellen entsprechend der gewünschten Oberflächenmarker sortiert. Zur Auswertung der Daten wurde die Software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, USA) verwendet. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Histogramm, *Dot Plot* oder in Falschfarben, wobei die Zahlen den prozentualen Anteil der in den *gates* enthaltenen Zellen angeben. Die standardmäßig durchgeführte Analysestrategie ist in Abbildung 3 dargestellt. Es wurde eine geeignete Eingrenzung der Zellen im Vorwärts- und Seitwärts-*scatter* sowie ein Ausschluss der toten Zellen über DAPI vorgenommen. Autofluoreszente Zellen wurden zur Analyse der Lymphozytenpopulationen ebenfalls ausgeschlossen. Zusätzlich wurden Dubletten in der Höhe und Fläche der Vorwärts- und Seitwärts-*scatters* für die weitere Analyse ausgeschlossen. Dieses Vorgehen war für alle Experimente gleich und wird in späteren Abbildungen nicht mehr gezeigt.



**Abb. 3: Durchflusszytometrische Analyse.**

Im Durchflusszytometer gemessene Zellen wurden im Vorwärts (FSC)- und Seitwärts-scatter (SSC) eingegrenzt. Anschließend erfolgte die Ausgrenzung der Zelldubletten, deren Größe bezüglich der Höhe (-H) und Fläche (-A) der Seitwärts- und Vorwärts-scatter-signale nicht proportional zunahm. Weiterhin wurden tote Zellen (DAPI<sup>+</sup>), sowie autofluoreszente Zellen ausgeschlossen. DAPI (4',6-Diamidine-2-phenylindole) wurde sowohl über die Detektoren für PacB (*Pacific Blue*) als auch PacO (*Pacific Orange*) detektiert.

**2.9.3.1 Durchflusszytometrische Isolierung humaner Zellen**

Humane Zellpopulationen, welche keiner magnetischen Voranreicherung bedurften, wurden direkt aus PBMCs oder Vollblut nach Erythrozytenlyse durchflusszytometrisch sortiert. Die verwendeten Oberflächenmarker sind in Tabelle 11 aufgeführt. Anschließend wurde die Reinheit der jeweils sortierten Population durchflusszytometrisch ermittelt.

**Tab. 11: Durchflusszytometrische Sortierung verschiedener Lymphozytenpopulationen aus humanem peripheren Blut.**

Zellpopulation	Aufreinigung	Spezifische Oberflächenmarker	Marker zum Ausschluss anderer Zellpopulationen	Erzielte Reinheit [%]
T Zellen	Dichtegradienten-zentrifugation	CD3	CD19, CD141	≥99,4
B Zellen	Dichtegradienten-zentrifugation	CD19, HLA-DR	CD3, CD141	≥99,4
NK-Zellen	Dichtegradienten-zentrifugation	CD16, CD56	CD3, CD141, HLA-DR	≥99,4
Monozyten	Dichtegradienten-zentrifugation	CD14, CD16	CD3, CD19, CD141	≥99,4
Granulozyten	Erythrozytenlyse	CD15, CD45	CD3, CD14, CD19, CD141	99,7

## 2.10 Kreuzpräsentationsassay

Für Kreuzpräsentationsassays mit löslichem Antigen wurde rekombinantes *Humanes Cytomegalie Virus*- (HCMV-) pp65 Protein in 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 4 M Harnstoff (niedriger Endotoxingehalt, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach) verwendet. Als Negativkontrolle wurde rekombinantes Ovalbumin (OVA) in 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 4 M Harnstoff (LPS-befreit durch *EndoTrap red*, Hyglos Sigma-Aldrich, Deisenhofen) eingesetzt. Es wurden 4x10<sup>4</sup> DCs und 4x10<sup>4</sup> T-Zellen des Klons 10 mit 3 µg/ml rekombinatem pp65-Antigen oder OVA in einem Gesamtvolumen von 100 µl R10F<sup>+</sup> für 20 bis 36 Stunden kokultiviert. Als Positivkontrolle wurde das pp65<sub>495-503</sub> Peptid in einer Konzentration von 1 µg/ml verwendet. Für Kokulturen mit zellassoziertem Antigen wurden 5x10<sup>4</sup> T-Zellen des Klons 61 mit DCs im Verhältniss von 1:1 bis 16:1 in 100 µl R10F<sup>+</sup> aufgenommen und mit 50 µl des pp65-Zelllysates aus 2.6.10 für 24 oder 36 Stunden inkubiert. Als Negativkontrolle diente das MART-1<sub>27-35</sub> Peptid in einer Konzentration von 1 µg/ml. Für zusätzliche Negativkontrollen wurden DCs und T-Zellen alleine inkubiert. Nach erfolgten Kokulturen wurde IFN-γ im Überstand bestimmt (2.11). Die Zellen wurden im Anschluss durchflusszytometrisch gefärbt und auf ihre Viabilität hin untersucht. Dadurch wurde sichergestellt, dass ein vergleichbarer Anteil der jeweiligen DC-Population überlebt hat.

## 2.11 ELISA zur IFN-γ-Bestimmung

Zur Bestimmung der IFN-γ-Sekretion im Überstand des CD8<sup>+</sup> T-Zell-Klons wurde das *OptEIA Human IFN-γ ELISA Set* (BD Biosciences, Heidelberg) verwendet. Die Messung der Absorption erfolgte bei 450 nm mit einem DynatechMR5000 (Dynatech Laboratories, Chantilly, USA). Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der Software Revelation (Version 4.21; Dynex Technologies, Denkendorf). Für die Erstellung der Standardkurven wurde der Akima-Algorithmus (Akima, 1970) verwendet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung der Expression von XCR1 in der Maus

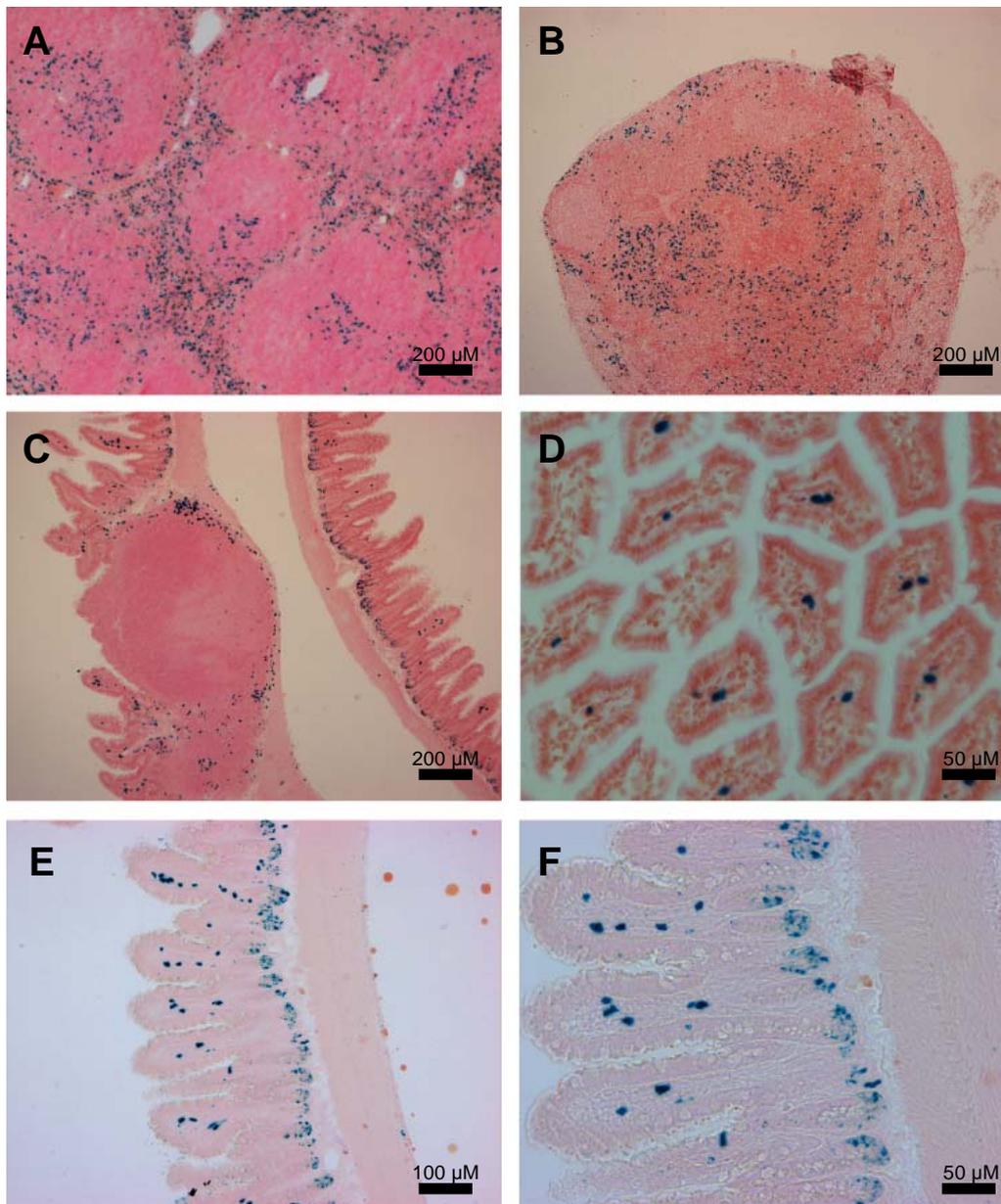
Bisherige Untersuchungen zur Expression von XCR1 in der Maus bestanden aus qPCR-Analysen von lymphatischen Zellpopulationen der Milz. Dabei konnten CD8<sup>+</sup> dendritische Zellen (DCs) als einzige XCR1-exprimierende Population (neben wenigen DN DCs) identifiziert werden.

##### 3.1.1 Histologischer Nachweis von XCR1 in Geweben der Maus

Um die Lokalisation der XCR1<sup>+</sup> DCs zu analysieren, wurden histologische Untersuchungen an Gewebsdünnschnitten der Milz und weiterer Organe durchgeführt. Da kein monoklonaler Antikörper oder geeignetes Antiserum gegen XCR1 zur Verfügung steht, erfolgte ein gewebsspezifischer Nachweis durch Verwendung von B6.XCR1:LacZ-Reportermausen. In dieser von Deltagen, USA generierten Maus steht das bakterielle LacZ-Gen unter Kontrolle des XCR1-Promotors was zur zellspezifischen Expression der  $\beta$ -Galaktosidase führt. Das Substrat X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) wird dabei auf dem Gewebeschnitt durch die  $\beta$ -Galaktosidase hydrolysiert und zu einem blauen Präzipitat umgesetzt, welches eine Detektion XCR1<sup>+</sup> Zellen erlaubt (Sanes *et al.*, 1986).

Abbildung 4 zeigt die Expression von XCR1 in den sekundär lymphatischen Organen Milz, mesenterialen Lymphknoten (mesLN) und Peyerschen Plaques (PPs) sowie im Bereich des Dünndarms. In der Milz konnten Signale für XCR1 in der roten Pulpa, der Marginalzone und der T-Zell-Zone detektiert werden (Abb. 4 A). Dies entspricht den Bereichen, an welchen auch CD8<sup>+</sup>CD205<sup>+</sup> bzw. CD103<sup>+</sup> DCs lokalisiert sind (McLellan *et al.*, 2002; Idoyaga *et al.*, 2009). Axilläre sowie mesenteriale Lymphknoten enthalten XCR1<sup>+</sup> Zellen im Bereich des subkapsulären Sinus und des Paracortex (Abb. 4 B). Auch hier korreliert XCR1-Expression mit der Lokalisation von DCs und T-Zellen (Steinman *et al.*, 1997; Katakai *et al.*, 2004). In den PPs ist eine Expression im Bereich der interfollikulären Region sowie angrenzend an das follikelassoziierte Epithel erkennbar (Abb. 4 C). In diesen Bereichen sind CD8<sup>+</sup> DCs mit T-Zellen kolokalisiert (Iwasaki und Kelsall, 2000). Im Dünndarm sind Zellen positiv für XCR1 im Bereich der Mucosa lokalisiert, insbesondere im Bereich der Lieberkühnschen Krypten sowie der Lamina Propria der Villi (Abb. 4 E, F). Expression von XCR1 konnte im Bereich des Ileums, des Jejunums als auch des Duodenums festgestellt werden (Abb. 4 E, F und nicht gezeigt).

Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass in allen untersuchten lymphatischen Organen sowie dem Dünndarm ein durchgängiges Vorkommen XCR1<sup>+</sup> Zellen festzustellen ist und dass diese in Bereichen vorkommen, in welchen vorwiegend DCs und T-Zellen lokalisiert sind.



**Abb. 4: Histologische Untersuchung der Expression von XCR1 in Geweben der Maus.**

Gewebe aus homozygoten B6.XCR1:LacZ-Mäusen wurde immersionsfixiert und XCR1 in Dünnschnitten durch Verwendung des Substrates X-Gal nachgewiesen. Gegenfärbung erfolgte mit Neutralrot. **A** Milz. **B** Mesenterialer Lymphknoten. **C** Peyerscher Plaque und Darmwand im Bereich des Ileums. **D** Villi im Bereich des Ileums, Querschnitt. **E**, **F** Darmwand im Bereich des Jejunum. Zur Kontrolle auf unspezifische Färbung wurde Gewebe von C57BL/6 Mäusen verwendet und für negativ befunden (nicht gezeigt).

### 3.1.2 Durchflusszytometrische Charakterisierung XCR1-tragender Zellen in lymphatischen Geweben

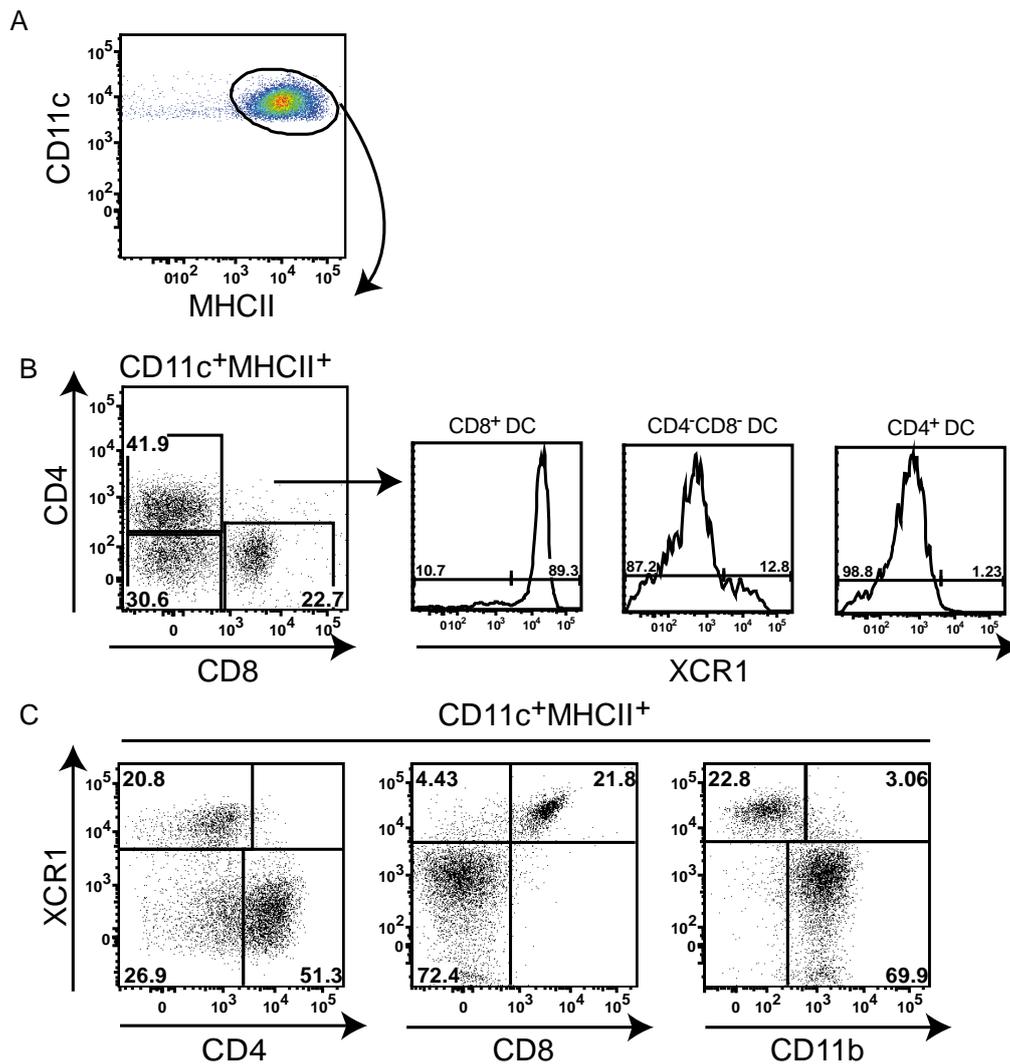
Ausgehend von den histologischen Befunden aus 3.1.1 sollten die DCs der verschiedenen Organe durchflusszytometrisch auf die Expression von XCR1 und anderer DC-assoziiierter Marker hin untersucht werden. Dazu wurden Zellen aus Milz, mesLN und PPs isoliert und für die Analyse mit DC-spezifischen Oberflächenmarkern gefärbt, wobei konventionelle DCs (cDCs) als  $CD11c^+MHCII^+CD3^-B220^-$  definiert wurden (in der Milz zusätzlich  $Ly-6G/C^-$ ). Da bisher kein monoklonaler Antikörper gegen XCR1 zur Verfügung steht, musste ein alternativer Nachweis erfolgen. Dies gelang durch XCR1-spezifische Bindung eines Komplexes aus dem *Strep-tag*-konjugiertem Liganden ATAC und einem fluorophorgekoppeltem Sekundärreagenz. Als Negativkontrolle der XCR1-Färbung wurden Zellen aus XCR1-defizienten homozygoten B6.XCR1:LacZ-Mäusen isoliert und gefärbt.

Um die Korrelation zwischen XCR1-Expression und der Expression des Chemokinrezeptors CX3CR1 und des Oberflächenmoleküls CD207 zu untersuchen, wurden Zellen aus B6.CX3CR1:eGFP- bzw. B6.CD207:eGFP-Reportertermäusen verwendet. In diesen Mauslinien wird grün fluoreszierendes Protein (GFP/eGFP) unter Kontrolle des CX3CR1- bzw. CD207-Promotors exprimiert, was eine durchflusszytometrische Detektion der Zellen erlaubt.

Zur Untersuchung der Expression von XCR1 auf nicht-DCs, wurde XCR1 mit den Markern für T-Zellen, NKT-Zellen,  $\gamma\delta$ -T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen korreliert. Auf keinem der Zelltypen konnte Expression von XCR1 nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

#### 3.1.2.1 Durchflusszytometrische Analyse der XCR1-Expression in der Milz

In der Milz wurden zuerst die Marker zur klassischen Definition von cDCs mit XCR1 korreliert. Dabei konnte festgestellt werden, dass 75-95 % der  $CD8^+$  DCs XCR1 exprimieren. Weiterhin sind 5-15 % der DN DCs positiv für XCR1. Die Gesamtheit der  $CD4^+$  DCs exprimiert kein XCR1 (Abb. 5 B). In der Korrelation zu CD11b (welches als Marker für  $CD4^+$  DCs als auch DN DCs gilt) sind 3-15 % der DCs positiv für XCR1, was einem Teil der DN DCs entspricht (Abb. 5 C).

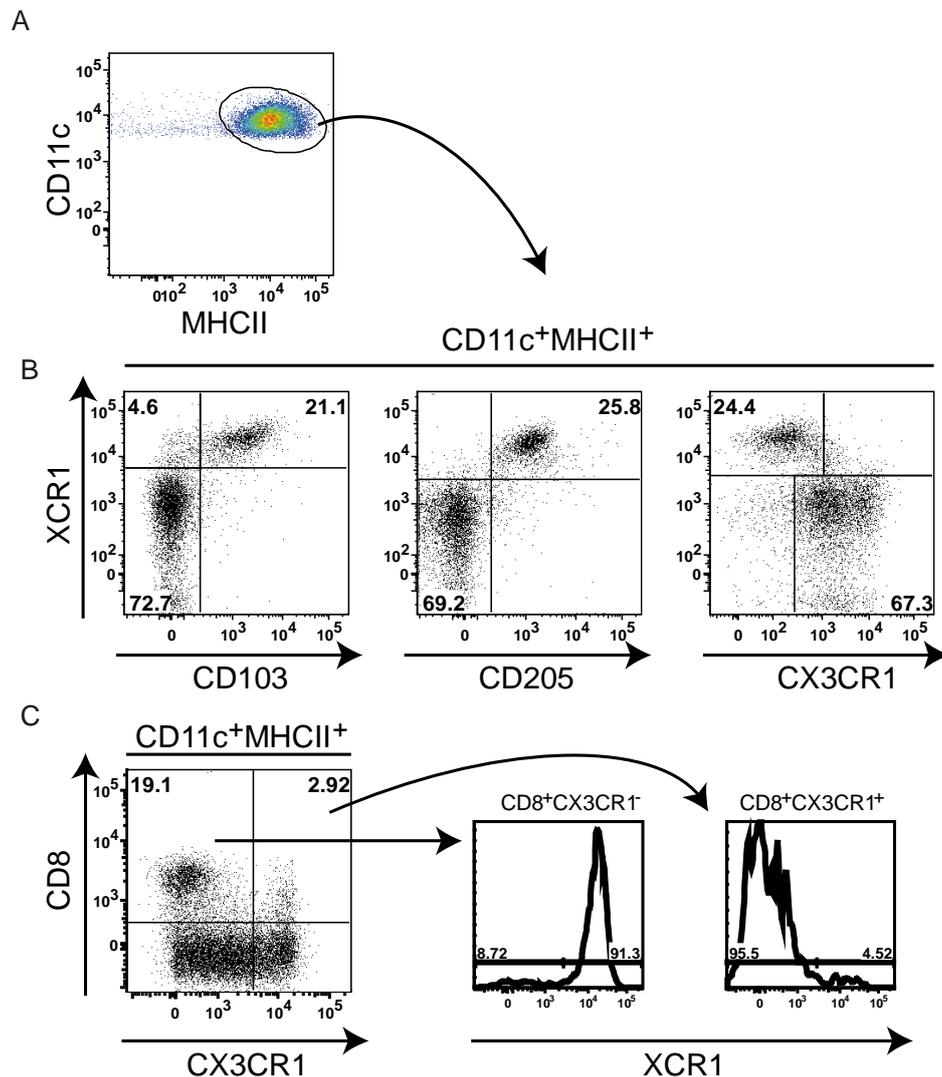


**Abb. 5: Durchflusszytometrische Analyse der XCR1-Expression von konventionellen dendritischen Zellen der Milz im Vergleich zu klassischen DC-Markern.**

**A** Gesamtsplenozyten aus C57BL/6 wurden isoliert und konventionelle dendritische Zellen (cDCs) als CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>Ly-6G/C<sup>-</sup> definiert. **B** Gating der klassischen cDC-Subtypen CD4<sup>+</sup> DCs, CD8<sup>+</sup> DCs und DN DCs sowie Expression von XCR1. **C** Korrelation der XCR1-Expression mit CD4, CD8 und CD11b. Zahlen entsprechen dem Anteil der Zellen in dem jeweiligen gate in Prozent.

Um über die klassische Einteilung von cDCs hinaus Korrelationen mit weiteren in der Literatur beschriebenen DC-Markern zu untersuchen, wurde die Expression von XCR1 mit den Oberflächenmarkern CD103, CD205 und CX3CR1 verglichen (Shortman und Naik, 2007; Villadangos und Schnorrer, 2007; Bar-On *et al.*, 2011). In der Milz besteht eine Korrelation zwischen der Expression von XCR1 und CD103: Während alle CD103<sup>+</sup> Zellen XCR1 exprimieren, tragen bis zu 20 % der XCR1<sup>+</sup> DCs kein CD103. Für CD205 besteht eine höhere

Korrelation: Nahezu alle XCR1<sup>+</sup> Zellen exprimieren auch CD205. Fast alle CD205<sup>+</sup> cDCs tragen XCR1. In Bezug auf CX3CR1 besteht eine weitgehende Antikorrelation zu XCR1: Die meisten XCR1<sup>+</sup> cDC sind negativ für CX3CR1, während XCR1<sup>-</sup> Zellen CX3CR1 exprimieren (Abb. 6 B). Durch Analyse der Expression von CD8 im Vergleich zu CX3CR1 konnte festgestellt werden, dass ein Teil der CD8<sup>+</sup> DCs auch CX3CR1 exprimiert. Dieser Anteil von 5-20 % exprimiert kein XCR1, während die CD8<sup>+</sup>CX3CR1<sup>-</sup> Population positiv für XCR1 ist (Abb. 6C). Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die Marker CD8, CD103 und CD205 in der Milz mit XCR1 korrelieren, während CD4, CD11b und CX3CR1 XCR1<sup>-</sup> DCs markieren. Der Subtyp der CD8<sup>+</sup> DCs ist nicht homogen, sondern kann durch XCR1 und CX3CR1 in zwei distinkte Populationen unterteilt werden.



**Abb. 6: Durchflusszytometrische Analyse der XCR1-Expression konventioneller dendritischer Zellen aus Milz im Vergleich zu CD103, CD205 und CX3CR1.**

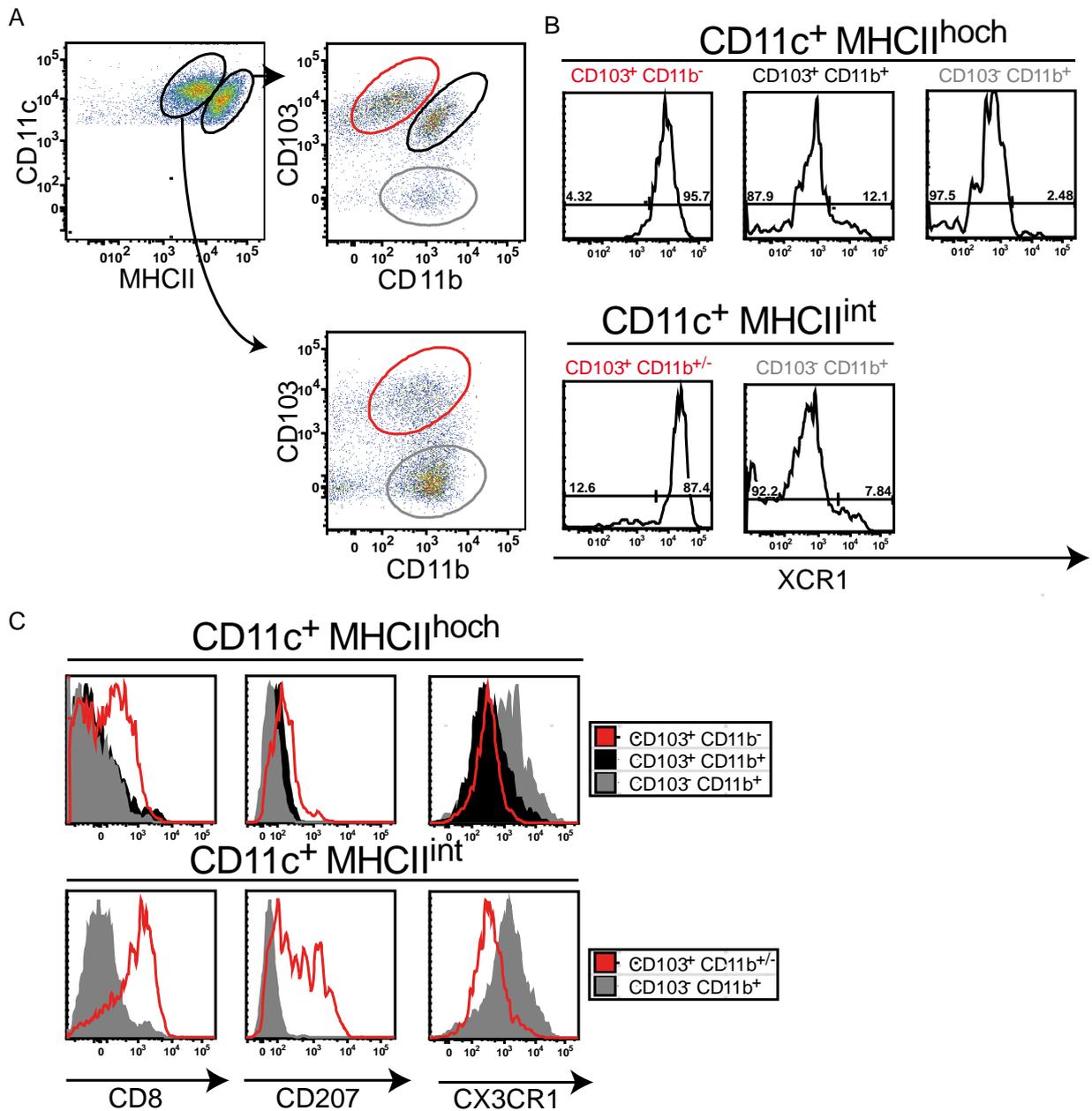
**A** Gesamtsplenozyten aus C57BL/6 oder heterozygoten B6.CX3CR1:eGFP Mäusen wurden isoliert und konventionelle dendritische Zellen (cDCs) als CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>Ly-6G/C<sup>-</sup> definiert. **B** Korrelation zwischen der Expression von XCR1 mit CD103, CD205 und CX3CR1. **C** Aufteilung von CD8<sup>+</sup> DCs in CD8<sup>+</sup>CX3CR1<sup>-</sup> und CD8<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup> DCs sowie ihre spezifische Expression von XCR1. CX3CR1 wurde durch Detektion von eGFP Mäusen nachgewiesen. Zahlen entsprechen dem Anteil der Zellen in dem jeweiligen *gate* in Prozent.

### 3.1.2.2 Durchflusszytometrische Analyse der XCR1-Expression in mesenterialen Lymphknoten

cDCs in mesLNs können in eine Population hoher MHCII-Expression und eine Population intermediärer MHCII-Expression unterteilt werden (Abb. 7). Diese Populationen wurden als

"migratorisch" (hohe Expression) bzw. "resident" (intermediäre Expression) beschrieben (siehe Einleitung 1.2.1; Banchereau und Steinman, 1998; Johansson-Lindbom, 2005; Belz *et al.*, 2004a; Allenspach *et al.*, 2008). Entsprechend dieser Einteilung erfolgte eine weitere Charakterisierung der DC-Subtypen durch die in anderen Arbeiten verwendeten Marker CD11b und CD103 (Bimczok *et al.*, 2005; Bogunovic *et al.*, 2009). DCs mit hoher MHCII-Expression lassen sich in drei Kategorien einteilen: CD103<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>, CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> und CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>. Für DCs mit intermediärer MHCII-Expression ist eine Einteilung in die Kategorien CD103<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> und CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>int</sup> möglich, wobei der Expressionsunterschied von CD11b zwischen beiden Populationen relativ gering ist. (Abb. 7 A).

Die beschriebenen DC-Typen wurden im Folgenden auf Expression von XCR1 hin untersucht. Alle MHCII<sup>hoch</sup>CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> DCs sind positiv für XCR1 während 10-15 % der MHCII<sup>hoch</sup>CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> DCs ebenfalls XCR1 tragen (Abb. 7 B). Bei den MHCII<sup>int</sup> DCs kann die Expression von XCR1 auf allen CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>int</sup> DCs sowie bis zu 10 % der CD103<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> DCs festgestellt werden (Abb. 7 B). Das Expressionsniveau von XCR1 auf MHCII<sup>int</sup> DCs ist insgesamt höher als auf MHCII<sup>hoch</sup> DCs (Abb. 7 B). Die Färbung des Oberflächenmoleküls CD8 auf DCs der mesLN korreliert mit der von XCR1: Eine Expression ist auf CD103<sup>+</sup> DCs beschränkt, wobei, anders als für XCR1, nur ein Teil der MHCII<sup>hoch</sup>CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> DCs CD8 exprimiert (Abb. 7 C). Eine Expression von CD207 konnte lediglich in MHCII<sup>int</sup> DCs beobachtet werden, wobei auch hier nur CD103<sup>+</sup> Zellen CD207 tragen (Abb. 7 B). Das Expressionsniveau von CX3CR1 auf DCs des mesLN ist insgesamt niedrig (Bogunovic *et al.*, 2009). Jedoch ist eine schwache Expression feststellbar, welche auf CD103<sup>-</sup> DCs beschränkt und somit zu XCR1, CD8 und CD207 antikorreliert ist (Abb. 7 C).

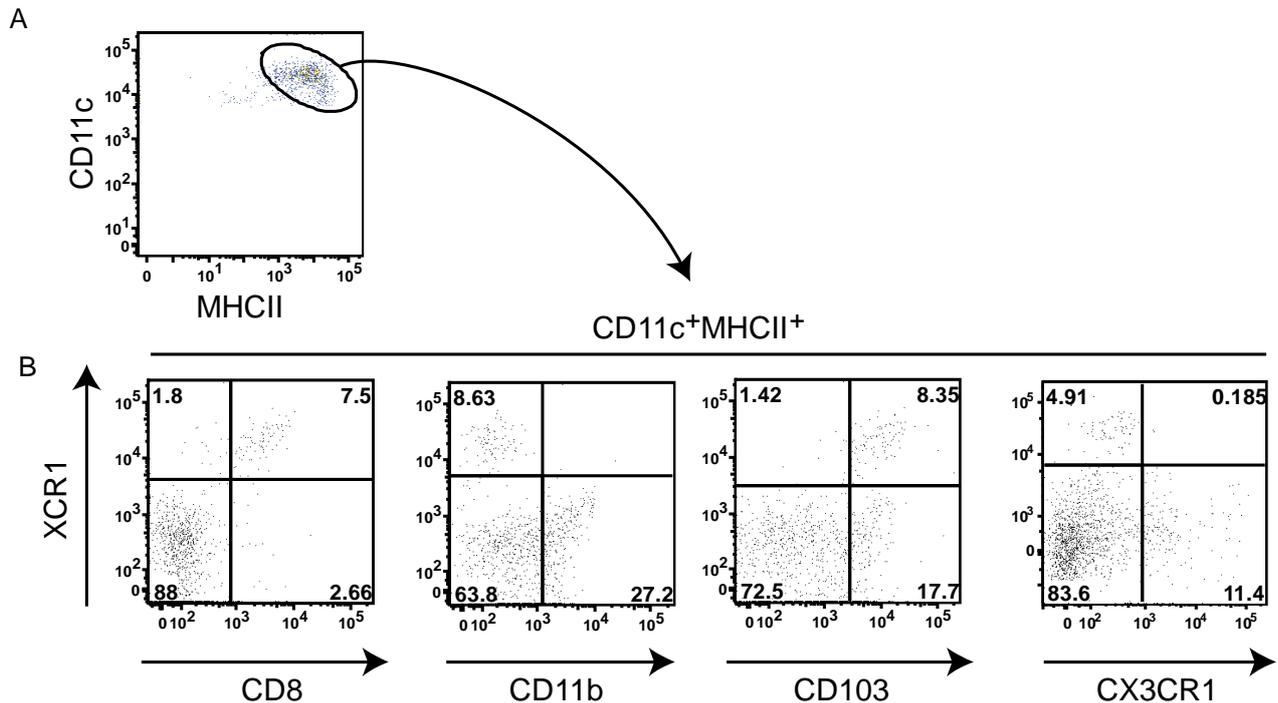


**Abb. 7: Subtypen konventioneller dendritischer Zellen im mesenterialen Lymphknoten.**

**A** Lymphozyten aus mesenterialen Lymphknoten (mesLN) von C57BL/6, heterozygoten B6.CD207:eGFP oder B6.CX3CR1:eGFP Mäusen wurden präpariert, angereichert und konventionelle dendritische Zellen (cDCs) als CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>int</sup> bzw. MHCII<sup>hoch</sup> und CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup> definiert. Residente CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>int</sup> sowie migratorische CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>hoch</sup> DCs wurden entsprechend der Marker CD11b und CD103 in Subpopulationen unterteilt. **B** Expression von XCR1 auf den DC-Subpopulationen beschrieben in A. **C** Expression der Marker CD8, CD207 und CX3CR1 in Bezug auf die DC-Subpopulationen beschrieben in A.

### 3.1.2.3 Durchflusszytometrische Analyse der XCR1-Expression in Peyerschen Plaques

Neben den mesLN stellen die PPs einen wichtigen Bestandteil des lymphatischen Systems des Darms dar. DCs der PPs wurden in bisherigen Arbeiten aufgrund ihrer Oberflächenmarker CD8 und CD11b definiert (Iwasaki und Kelsall, 2000 und 2001). Dabei wurden drei Subtypen beschrieben, welche sich histologisch durch ihre Lokalisation unterscheiden: CD8<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>, CD8<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> und CD8<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup> DCs. Zusätzlich wurden auch die Oberflächenmoleküle CD103 und CX3CR1 als Marker zur Einteilung von cDCs in PPs vorgeschlagen (Salazar-Gonzalez *et al.*, 2006; Fink und Frokiaer, 2008). In einer durchflusszytometrischen Analyse der beschriebenen Marker im Vergleich zur Expression von XCR1 konnte festgestellt werden, dass CD8 mit XCR1 weitgehend korreliert (Abb. 8 B). XCR1 und CD103 korrelieren ebenfalls in ihrer Expression, wobei alle XCR1<sup>+</sup> Zellen CD103 exprimieren, jedoch auch XCR1<sup>-</sup>CD103<sup>+</sup> DCs vorliegen. Zwischen XCR1 und CD11b besteht eine Antikorrelation insofern, dass alle CD11b<sup>+</sup> DCs kein XCR1 exprimieren. CX3CR1 verhält sich zu XCR1 ebenfalls antikorrelierend (Abb. 8 B). Auffällig ist, dass einige Zellen ein deutlich stärkeres CX3CR1-Signal aufweisen als die Mehrheit der DCs. Dies könnte auf Zellen zurückzuführen sein, welche aus dem Bereich der Lamina Propria stammen und bei der Präparation der PPs nicht entfernt werden konnten.



**Abb. 8: Subtypen konventioneller dendritischer Zellen in Peyerschen Plaques.**

**A** Lymphozyten aus Peyerschen Plaques (PPs) von C57BL/6 oder heterozygoten B6.CX3CR1:eGFP Mäusen wurden präpariert, angereichert und konventionelle dendritische Zellen (cDCs) als CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup> definiert. **B** Die XCR1-Expression auf cDCs wurde mit den Markern CD8, CD11b, CD103 und CX3CR1 korreliert. Zahlen entsprechen dem jeweiligen Anteil der Zellen im *gate* in Prozent.

### 3.1.3 Analyse der antigenpräsentierenden Zellen des Dünndarms

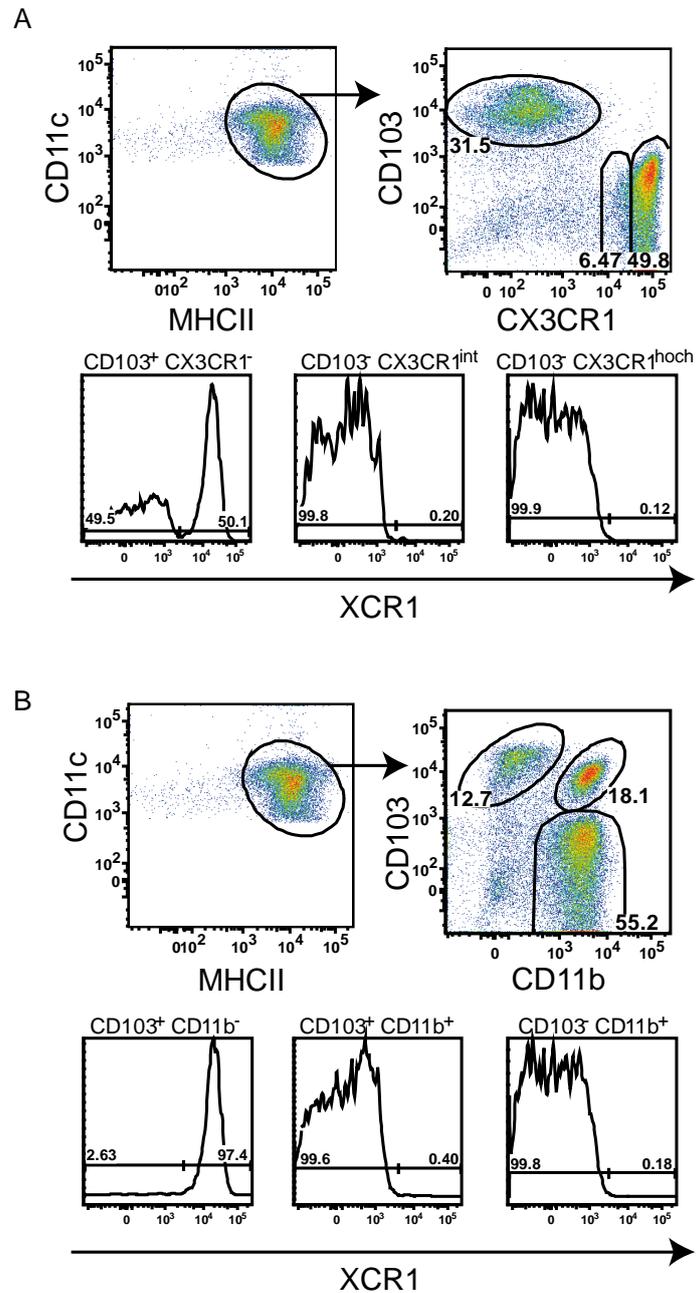
Aufgrund der histologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Expression von XCR1 ubiquitär in Bereichen des Dünndarms erfolgt (Abb. 4 C-F).

Zur näheren Charakterisierung wurden mononukleäre Zellen aus dem Dünndarm isoliert und auf Expression von XCR1 analysiert. Durch die Isolierung wurden vor allem Zellen der Lamina Propria angereichert. Ein Teil dieser Zellen ist durch die Expression von CD11c und MHCII charakterisiert, welche als antigenpräsentierende Zellen (APC) bezeichnet werden. Eine genauere Einteilung kann durch Verwendung der Marker CD11b, CD103 und CX3CR1 erfolgen (Bogunovic *et al.*, 2009; Varol *et al.*, 2009; Ginhoux *et al.*, 2009). Dabei sind die Marker CD103 und CX3CR1 besonders geeignet, da sie im Gegensatz zu CD11b keiner starken Regulation unterliegen (Schulz *et al.*, 2009). Durch Kombination der Marker lassen sich vier Populationen von APCs definieren (Bogunovic *et al.*, 2009; Varol *et al.*, 2009; Schulz *et al.*, 2009). Das Expressionsniveau von CX3CR1 im Dünndarm ist deutlich höher als in der Milz oder den

mesLNs, sodass eine Einteilung intermediärer und hoher Expression erfolgen kann: CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>, CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>, CD103<sup>-</sup>CX3CR1<sup>int</sup> und CD103<sup>-</sup>CX3CR1<sup>hoch</sup> APCs. Aufgrund ihrer Antigenpräsentationseigenschaften und Migrationseigenschaften werden die beiden CD103<sup>+</sup> Populationen als DCs bezeichnet (Schulz *et al.*, 2009; Pabst und Günter, 2010).

### **3.1.3.1 Durchflusszytometrische Analyse der XCR1-Expression im Dünndarm**

Bei der Analyse der CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> Zellfraktion konnte festgestellt werden, dass lediglich CD103<sup>+</sup> Zellen, nicht jedoch CX3CR1<sup>+</sup> Zellen XCR1 exprimieren. Der Anteil der XCR1<sup>+</sup> Zellen an den CD103-exprimierenden Zellen liegt bei 40-60 % (Abb. 9 A). In Bezug auf die Expression von CD11b konnte festgestellt werden, dass bei Zellen des Dünndarms eine klare Antikorrelation zwischen XCR1 und CD11b besteht: CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> Zellen exprimieren XCR1, während CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> und CD103<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen kein XCR1 auf der Oberfläche tragen (Abb. 9 A, B).



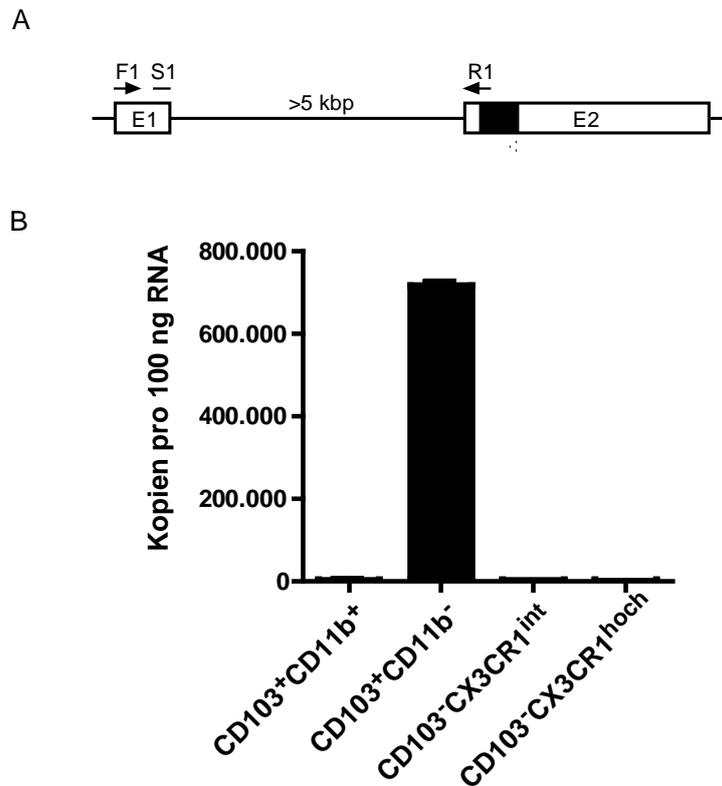
**Abb. 9: Phänotyp der Subtypen antigenpräsentierender Zellen aus dem Dünndarm.**

Mononukleäre Zellen aus dem Dünndarm von heterozygoten B6.CX3CR1:eGFP Mäusen wurden präpariert, angereichert und antigenpräsentierende Zellen (APCs) als  $CD11c^+MHCII^+CD3^+B220^-$  charakterisiert. **A** Einteilung der Subtypen nach Expression von CD103 und CX3CR1 sowie Korrelation zur Expression von XCR1. **B** Einteilung der Subtypen nach Expression von CD103 und CD11b sowie Korrelation zur Expression von XCR1. Zahlenangaben entsprechen dem Anteil der Zellen in dem jeweiligen *gate* in Prozent.

### 3.1.3.2 Analyse der XCR1-Expression im Dünndarm durch quantitative PCR

Die Isolierung mononukleärer Zellen aus dem Darm ist mit umfangreichem Gewebeaufschluss verbunden (siehe Material und Methoden, 2.7.1.2). Dabei kommt unter anderem Kollagenase VIII zum Einsatz, welche durch Proteolyse bestimmte Oberflächenmoleküle verändern kann, so dass keine Bindung von Liganden oder Antikörpern mehr erfolgen kann (z.B. Cheong *et al.*, 2010). Um sicherzugehen, dass kein proteolytischer Effekt eine Detektion von XCR1 im Fall einzelner DC-Typen verhindert, wurde eine quantitative PCR-Analyse zum Nachweis der XCR1-mRNA durchgeführt. Dazu wurden die unter 3.1.3 beschriebenen APC-Subtypen von Elisa Mazzini (*European Institute of Oncology*, Mailand, Italien) sortiert. Die erhaltenen Zellen wurden im Zuge dieser Arbeit zur Isolation von Gesamt-RNA verwendet und in cDNA umgeschrieben. Im Anschluss erfolgte eine qPCR-Analyse mit einer für murines XCR1-spezifischen Taqmansonde (Abb. 10 A).

Die qPCR-Analyse ergab, dass als einzige Zellpopulation  $CD103^+CD11b^-$  DCs ein starkes Signal für XCR1 zeigten, während die drei anderen Populationen keine detektierbare Expression aufwiesen (Abb. 10 B). Durch Vergleich der qPCR-Ergebnisse mit einem mitgeführten Standardplasmid konnte die Zahl der XCR1-mRNA-Kopien auf etwa 700.000 pro 100 ng RNA bestimmt werden.



**Abb. 10: Quantitative Analyse der XCR1-mRNA in antigenpräsentierenden Zellen des Darms.**

**A** Muriner Lokus des XCR1 Gens (E1, Exon 1; E2, Exon 2). Die kodierende Region ist in schwarz dargestellt, *primer* und Sonden der qPCR-Analysen sind angegeben (F1, R1, S1) **B** qPCR Analyse von cDNA aus Gesamt-RNA hochrein sortierter CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> Zellpopulationen aus Dünndarm der Maus: CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>, CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>, CD103<sup>-</sup>CX3CR1<sup>int</sup> sowie CD103<sup>-</sup>CX3CR1<sup>hoch</sup>. Die Analyse erfolgte mit dem *primer*-Sonde-Set 1 (F1, R1 und Sonde S1) dargestellt in **A**. Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung.

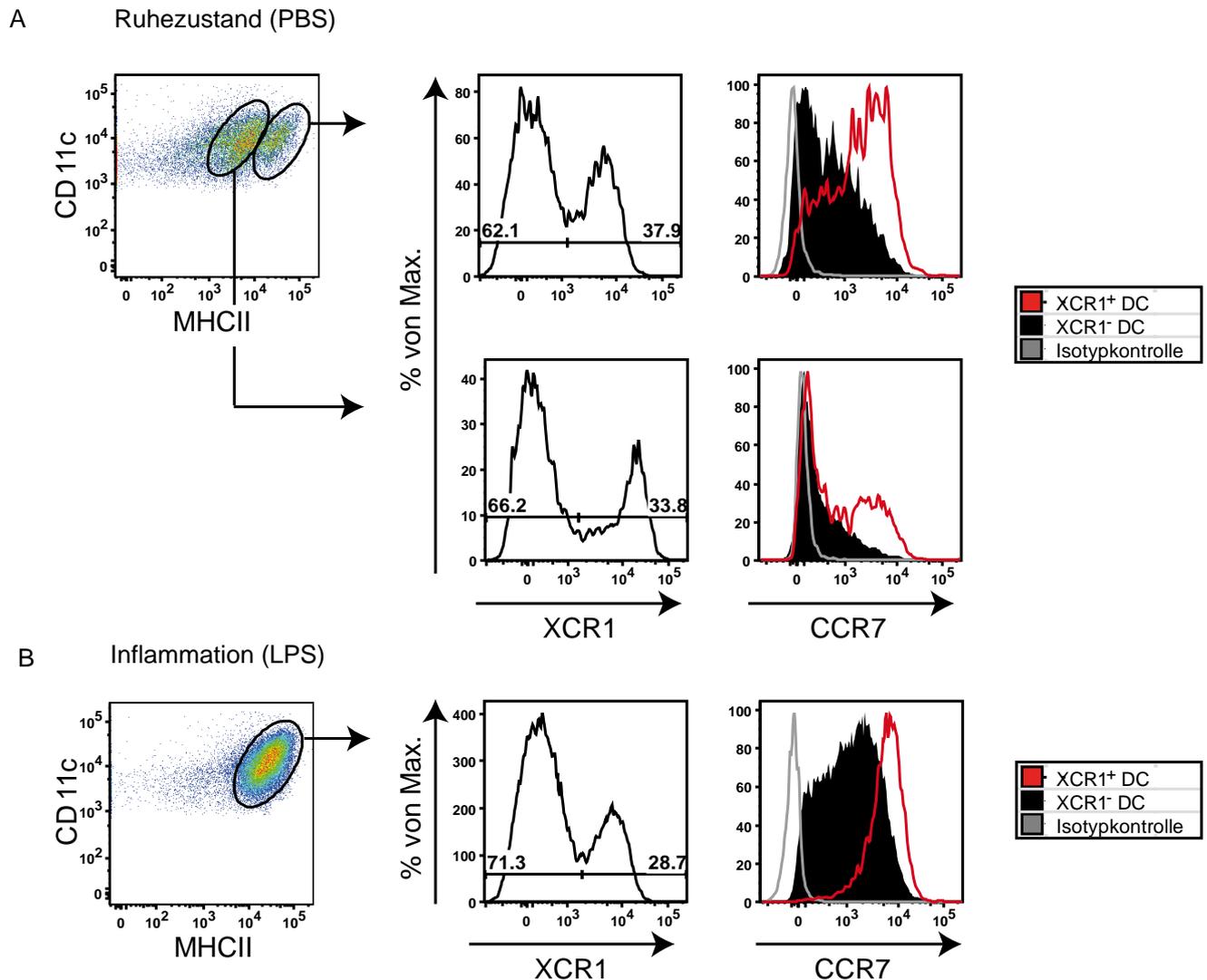
### 3.1.4 Einfluss eines inflammatorischen Stimulus auf XCR1-positive dendritische Zellen des mesenterialen Lymphknotens und des Darms

Untersuchungen des Dünndarms und insbesondere der Lamina Propria haben gezeigt, dass CX3CR1<sup>+</sup> mononukleäre Zellen Fortsätze in das Darmlumen ausbilden. CD103<sup>+</sup> mononukleäre Zellen sind mehr innerhalb der Lamina Propria angrenzend an die Epithelschicht lokalisiert und haben keinen direkten Kontakt zum Darmlumen (Rescigno *et al.*, 2001; Niess *et al.*, 2005; Bogunovic *et al.*, 2009; Rescigno, 2009). Aus dem Lumen aufgenommenes Antigen wird von Zellen des Darms in einem CCR7-abhängigen Migrationsprozess in die mesLN transportiert (Johansson-Lindbom *et al.*, 2005; Jang *et al.*, 2006).

Durch die Analyse der Zellen des Dünndarms konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> DCs XCR1 exprimieren, während CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> DCs sowie CX3CR1<sup>+</sup> Zellen

negativ für XCR1 sind (Abb. 9). In der Literatur ist beschrieben, dass lediglich die CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> DCs des Dünndarms in die mesLN wandern. Die CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> DCs sind als lymphatische Population des darmassoziierten lymphoiden Gewebes (GALT) charakterisiert und verlassen, wie die CX3CR1<sup>+</sup> Zellen, den Darm nicht (Bogunovic *et al.* 2009; Schulz *et al.*, 2009). Um zu klären, ob XCR1<sup>+</sup> Zellen migratorische Eigenschaften besitzen, wurden APCs des Dünndarms sowie der mesLN unter Einfluss eines inflammatorischen Stimulus analysiert, welcher Migration von DCs in die mesLN auslöst (Turnbull *et al.*, 2005). Zu diesem Zweck wurde LPS intraperitoneal (i.p.) injiziert und die Zellen aus mesLN und Dünndarm nach 12 Stunden isoliert. Um festzustellen, inwieweit XCR1 als Marker für migratorische DCs dient, wurden die isolierten Zellen bezüglich ihrer Expression von XCR1 und CCR7 charakterisiert. Es erfolgte ein Vergleich zwischen inflammatorischem Zustand (Injektion von LPS) und Ruhezustand (Injektion von PBS).

In den mesLN führt eine Injektion von LPS zu einer Hochregulation von MHCII auf allen cDCs, sodass eine homogene Population von CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>hoch</sup> Zellen vorliegt (Abb 11 B). Im Ruhezustand sind 30-50 % aller cDCs positiv für XCR1. Der XCR1<sup>+</sup> Teil der CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>hoch</sup> Zellen exprimiert im Vergleich zum XCR1<sup>-</sup> Teil signifikant mehr CCR7 (Abb. 11 A). Es exprimieren deutlich weniger CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>int</sup> Zellen CCR7. Die CCR7<sup>+</sup> Zellen sind zugleich positiv für XCR1 (Abb. 11 A). Nach Gabe von LPS ist eine vermehrte Expression von CCR7 auf XCR1<sup>-</sup> und XCR1<sup>+</sup> Zellen feststellbar. Die mittlere Fluoreszenzintensität der CCR7-Färbung ist auf XCR1<sup>+</sup> Zellen deutlich höher als auf XCR1<sup>-</sup> Zellen (Abb. 11 B). Die CCR7-Expression ist auf allen XCR1<sup>+</sup> Zellen homogen verteilt (Abb. 11 B). Im Verhältnis XCR1<sup>+</sup> DCs zu XCR1<sup>-</sup> DCs konnte keine signifikante Veränderung festgestellt werden (Abb. 11 A, B und nicht gezeigt). Die Frequenz der XCR1<sup>+</sup> sowie XCR1<sup>-</sup> DCs ist im Verhältnis zu allen lebendigen Zellen nach LPS-Gabe erhöht (Abb. 11 B und nicht gezeigt).



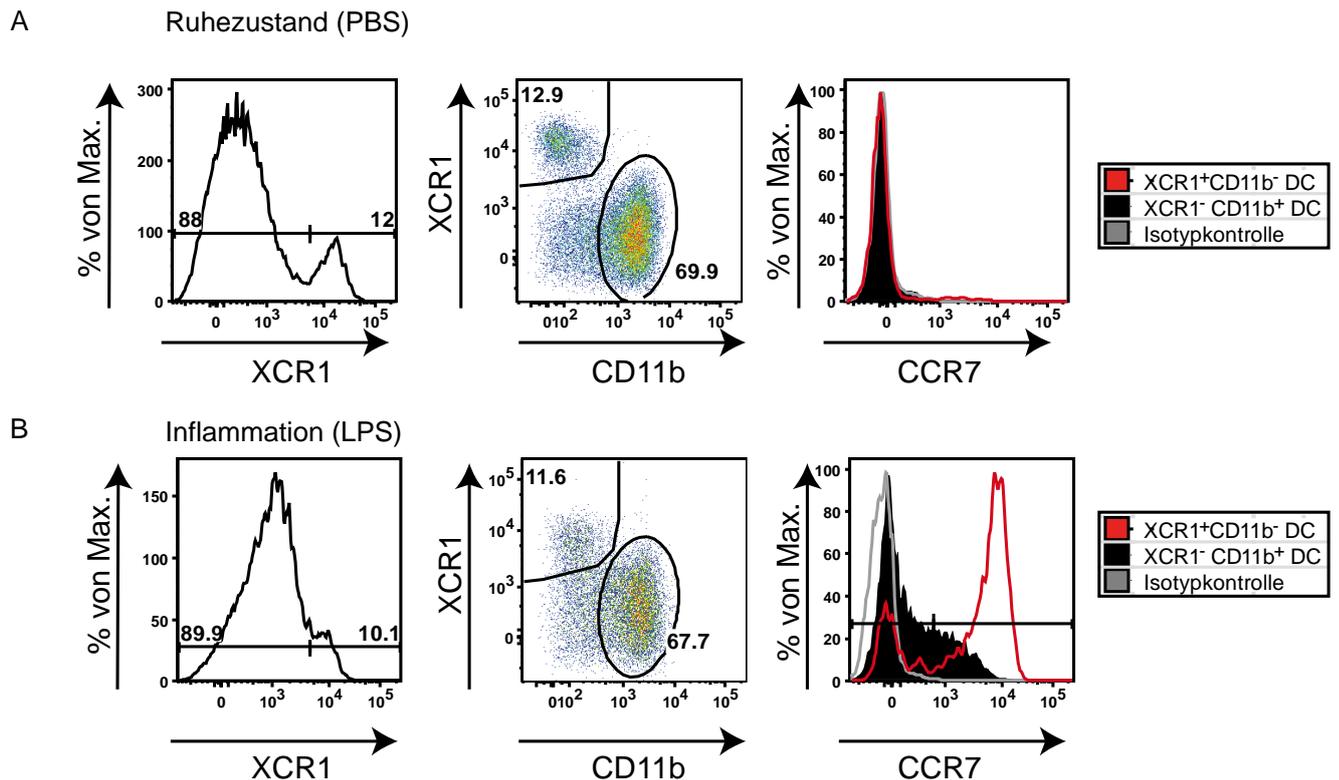
**Abb. 11: Einfluss eines inflammatorischen Stimulus auf konventionelle dendritische Zellen des mesenterialen Lymphknotens.**

C57BL/6 Mäusen wurde PBS (**A**) oder 50 µg LPS (**B**) intraperitoneal injiziert. Nach 12 Stunden wurden die Zellen des mesenterialen Lymphknoten (mesLN) isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Konventionelle dendritische Zellen (cDCs) wurden als CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>int</sup>/MHCII<sup>hoch</sup>CD3<sup>-</sup>B220<sup>-</sup> definiert. **A** cDCs im Ruhezustand wurden in XCR1<sup>+</sup> und XCR1<sup>-</sup> Populationen unterteilt und die Expression von CCR7 im Vergleich zur Isotypkontrolle bestimmt. **B** cDCs nach inflammatorischem Stimulus (LPS) wurden in XCR1<sup>+</sup> und XCR1<sup>-</sup> Populationen unterteilt und die Expression von CCR7 im Vergleich zur Isotypkontrolle bestimmt. Zahlen entsprechen dem Anteil der Zellen im jeweiligen gate in Prozent.

Im Dünndarm führt die Injektion von LPS zu einer Herunterregulation von XCR1 (Abb. 12 B). Im Ruhezustand kann hier keine Expression von CCR7 festgestellt werden (Abb. 12 A). Injektion

von LPS führt zu einer vermehrten Expression von CCR7 vor allem auf  $XCR1^+$  Zellen (Abb. 12 B).

Das Verhältnis  $XCR1^+$  APCs zu  $XCR1^-$  Zellen wird durch LPS-Gabe nicht deutlich verändert (Abb. 12 A, B und nicht gezeigt). Die Gesamtzahl an APCs, die pro Dünndarm einer Maus erhalten wurde, war nach LPS-Injektion signifikant verringert (Abb. 12 B und nicht gezeigt).

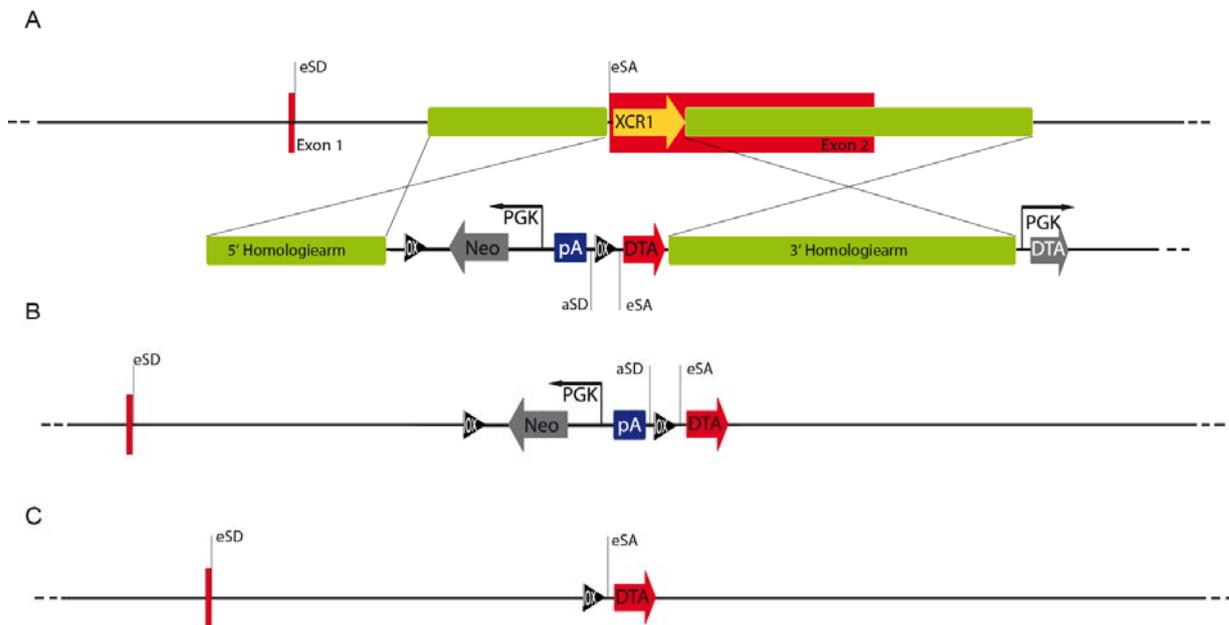


**Abb. 12.: Einfluss eines inflammatorischen Stimulus auf antigenpräsentierende Zellen des Dünndarms.** C57BL/6 Mäusen wurde PBS (**A**) oder 50  $\mu$ g LPS (**B**) intraperitoneal injiziert. Nach 12 Stunden wurden die Zellen des Darms isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Antigenpräsentierende Zellen (APCs) wurden als  $CD11c^+MHCII^+CD3^+B220^-$  definiert. **A**  $CD11c^+MHCII^+$  Zellen im Ruhezustand wurden in  $XCR1^+$  und  $XCR1^-$  Populationen unterteilt und die Expression von CCR7 im Vergleich zur Isotypkontrolle bestimmt. **B**  $CD11c^+MHCII^+$  Zellen nach inflammatorischem Stimulus (LPS) wurden in  $XCR1^+$  und  $XCR1^-$  Populationen unterteilt und die Expression von CCR7 im Vergleich zur Isotypkontrolle bestimmt. Zahlen entsprechen dem Anteil der Zellen im jeweiligen *gate* in Prozent.

### 3.2 Herstellung einer XCR1-Diphtherietoxin A-Mauslinie

Um die Funktion XCR1<sup>+</sup>DCs für den gesamten Organismus zu untersuchen, sollte ein Mausmodell produziert werden, in welchem diese Zellen spezifisch depletiert sind. Dazu kam die als *knock in* bezeichnete Methode der genetischen Manipulation zum Einsatz. In Abbildung 13 sind die einzelnen Schritte zur Herstellung der XCR1-DTA-Mauslinie dargestellt. Dabei wurde an die Stelle der kodierenden Sequenz von XCR1 im Genom eine Kasette bestehend aus einem *loxP*-flankierten Stoppelement sowie der Sequenz des Diphtherietoxin A (DTA) gesetzt (Abb. 13 A). DTA ist die Untereinheit des Exotoxins DT aus *Corynebacterium diphtheriae* und hemmt die Translationsmaschinerie, sobald es im Zytoplasma einer Zelle vorliegt. Die Expression weniger Moleküle führt dabei zum zeitnahen Zelltod (Yamaizumi *et al.*, 1978) (siehe Einleitung, 1.5.1).

Die Mauslinie, welche im ersten Schritt erhalten wird, verhält sich wie ein XCR1-*knock out*, in welchem die kodierende Sequenz des XCR1-Gens deletiert ist (Abb. 13 B). Zellen, in denen der XCR1-Promotor aktiv ist, werden noch nicht depletiert, da die enthaltene Stoppkasette eine Expression des DTA verhindert. Erst nach Verpaarung mit einer Mauslinie, welche die Rekombinase Cre ubiquitär exprimiert (*Cre-deleter*), kommt es zur Exzision der Stoppkasette und zur Expression des Toxins und somit zum Tod der Zelle (Abb. 13 C).



**Abb. 13: Targeting-Strategie 1 zur Herstellung einer XCR1:DTA-knock in-Mauslinie.**

**A** Genlocus des murinen XCR1 bestehend aus Exon 1 und Exon 2 (rot), dem endogenen Spleiß-Donor (eSD), dem endogenen Spleiß-Akzeptor (eSA) sowie der kodierenden Sequenz von XCR1 (gelber Pfeil). Das *targeting* erfolgte mit dem linearisierten Vektor pACN-TV-XCR1. Der *targeting*-Vektor enthält eine *loxP*-flankierte Stoppkassette bestehend aus einem invers angeordneten Neomycinresistenzgen (Neo) unter Kontrolle eines PGK-Promotors, einer SV40-Polyadenylierungssequenz (pA) sowie einem artifiziellen Spleißdonor (aSD). 3' der Stoppkassette ist der endogene Spleißdonor gefolgt von der Sequenz der Diphtherietoxin Untereinheit A (DTA) angeordnet. Die 5'- und 3'-Homologiearme ermöglichen eine Rekombination zwischen linearisiertem Vektor und den homologen Sequenzen im wildtypischen Locus. Im Fall einer unspezifischen Integration des linearisierten Vektors erfolgt eine Expression des außerhalb der Homologiearme lokalisierten DTA unter Kontrolle des PGK-Promotors und eine Deletion des Stammzellklons. **B** Genlocus von XCR1 nach erfolgter homologer Rekombination mit pACN-TV-XCR1. In Zellen mit aktivem XCR1-Promotor erfolgt keine Expression des DTA, da die Stoppkassette die Transkription des Toxingens verhindert. **C** Genlocus von XCR1 nach erfolgter Rekombination und Verpaarung mit einer Cre-Rekombinase-exprimierenden Mauslinie. Durch die Exzision der *loxP*-flankierten Stoppkassette erfolgt eine Expression von DTA in Zellen mit aktivem XCR1-Promotor.

### 3.2.1 Herstellung des *targeting*-Vektors Version 1

Zur Herstellung der XCR1:DTA-Mauslinie wurde zuerst ein *targeting*-Vektor kloniert, welcher die zur Rekombination notwendigen Homologiearme enthält (siehe Abb. 13 A und Anhang). Dazu wurde das Vektorrückgrat des Plasmids pACN-Stopp (erhalten von Dr. Marc Schmidt-Suppryan, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) verwendet, welches den zur Replikation in *E. coli* notwendigen Replikationsursprung sowie ein Kanamycinresistenzgen besitzt. Weiterhin verfügt das Plasmid über eine durch *loxP*-Sequenzen flankierte Stoppkassette,

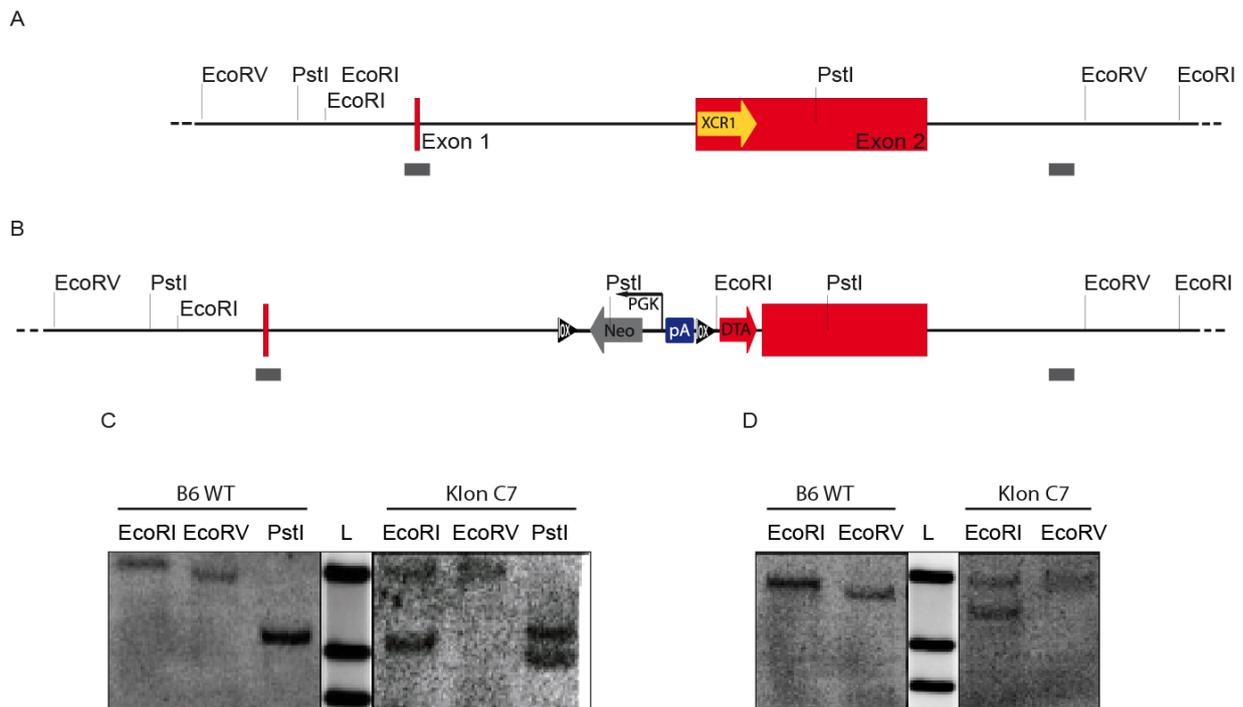
welche aus einer Simianvirus 40 (SV40)-Polyadenylierungssequenz und einem PGK-Promotor getriebenen Neomycinresistenzgen besteht. Dieses Resistenzgen dient zur positiven Selektion der Stammzellklone. Des Weiteren ist ein Element enthalten, welches aus einem Startcodon und einem artifiziellen Spleißdonor besteht (ATG-GTAAGT). Für den Fall, dass die Transkription über die Polyadenylierungssequenz hinweg läuft, wird die entstehende mRNA entsprechend an den endogenen Akzeptor gespleißt. Im Fall einer Translation ausgehend vom Startcodon in der Stoppkassette erfolgt eine Termination aufgrund eines enthaltenen Stoppkodons, bevor es zur Translation des DTA kommt (Lakso *et al.*, 1992). Zur negativen Selektion ist eine PGK-Promotor getriebene DTA-Sequenz enthalten. Als 5'-Homologiearm konnte ein 3140 bp großes Fragment aus C57BL/6-DNA amplifiziert werden, welches einen Teil der Sequenz 5' von XCR1 enthält. Dieses Fragment wurde subkloniert und über Restriktionschnittstellen in den Bereich 5' der Stoppkassette des vorbereiteten Vektors pACN-Stopp kloniert.

Um sicherzustellen, dass die spätere Expression von DTA spezifisch mit der von XCR1 übereinstimmt, wurde die natürliche Spleißstelle zwischen Intron und Exon 2 beibehalten und in ein 206 bp großes Zwischenstück subkloniert. Als 3'-Homologiearm konnte ein 6013 bp großes Fragment amplifiziert werden, welches die Sequenz 3' von XCR1 enthält. Diese Sequenz wurde über Restriktionsschnittstellen in das subklonierte Zwischenstück ligiert. Das erhaltene Element aus Zwischenstück und 3'-Homologiearm wurde über die Schnittstelle in den 5'-Homologiearm enthaltenden pACN-Stopp kloniert, sodass sich die Stoppkassette des Vektors zwischen 5'-Homologiearm und dem Intron-Exon-Übergang des XCR1-Lokus und dem 3'-Homologiearm befand. Im letzten Schritt wurde die Sequenz der Diphtherietoxin Untereinheit A aus dem Plasmid pKODT amplifiziert. Unter Einfügen einer optimalen Kozak-Sequenz (Kozak, 1987 und 1991) wurde DTA hinter den Intron-Exon-Übergang des klonierten *targeting*-Vektors kloniert. Der erhaltene pACN-TV-XCR1 wurde durch vollständige Sequenzierung validiert und im Weiteren für die Elektroporation von C57BL/6Art-Stammzellen verwendet.

### **3.2.2 Generierung und Analyse von XCR1:DTA-Stammzellklonen**

Der unter 3.2.1. beschriebene *targeting*-Vektor wurde in Kooperation mit Dr. Marc Schmidt-Supprian (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) zur Mutation des XCR1-Genlokus verwendet. Hierzu erfolgte eine Linearisierung des Plasmids durch Verwendung des Restriktionsenzym Pacl sowie die Elektroporation von C57BL/6-Art-Stammzellen. Im Anschluss erfolgten Positiv- und Negativselektion, wobei 72 positive Stammzellklone isoliert

werden konnten (siehe Material und Methoden, 2.6.8). Da die Zahl der erhaltenen Klone im Vergleich zu anderen Transfektionen relativ niedrig war, wurde eine zweite Transfektion durchgeführt, aus der 384 zusätzliche Klone erhalten wurden. Die insgesamt erhaltenen 456 Klone wurden expandiert und aufgeteilt. Der eine Teil wurde zur späteren Isolierung verifizierter Klone eingefroren. Aus dem anderen Teil wurde genomische DNA isoliert, mit dem Restriktionsenzym PstI geschnitten und für die *Southern Blot*-Analyse verwendet. Der wildtypische Locus führt nach Behandlung mit PstI zu einem Fragment von 9,5 kb, welches von der verwendeten 5'-Sonde detektiert wird (Abb. 14 A). Hat eine homologe Rekombination mit dem *targeting*-Vektor stattgefunden, so führt eine zusätzliche PstI-Schnittstelle innerhalb der Stoppkassette dazu, dass ein Fragment von 7,7 kb detektiert wird (Abb. 14 B). Da die homologe Rekombination mit hoher Wahrscheinlichkeit nur auf einem der beiden Chromosomen des Stammzellklons erfolgte, ist davon auszugehen, dass die verwendete 5'-Sonde in der *Southern Blot*-Analyse sowohl das Fragment nach Rekombination als auch das wildtypische Fragment detektiert. Aus 251 der beschriebenen 456 Klone konnte eine für die *Southern Blot*-Analyse ausreichende Menge an DNA isoliert werden. Von diesen Klonen konnte ein Klon (C7) identifiziert werden, welcher beide zu erwartende Fragmente enthielt (Abb. 14 C). Zur Analyse der Integrität des Klons wurden weitere *Southern Blot*-Analysen unter Verwendung der 5'-Sonde als auch der 3'-Sonde durchgeführt (Abb. 14 A, B). Eine Restriktion mit den Enzymen EcoRI, EcoRV und PstI lieferte mit den 5'- und 3'-Sonden Fragmente, welche durch Restriktionskartierung des Locus zu erwarten waren (Abb. 14 C, D).



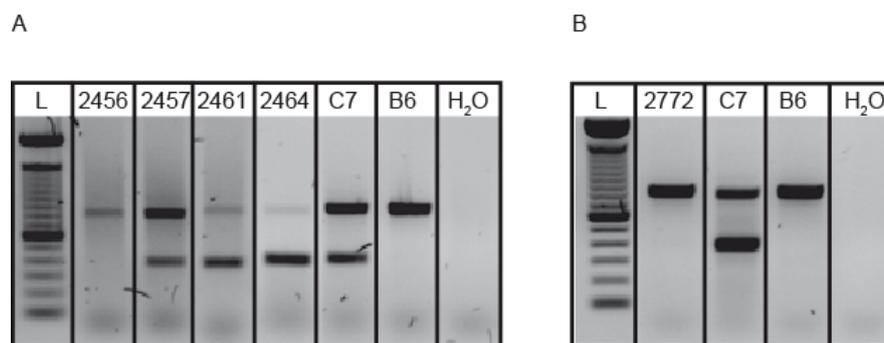
**Abb. 14: Southern Blot-Analyse zur Verifizierung XCR1:DTA-positiver Stammzellen.**

**A** XCR1-Lokus in wildtypischen C57BL/6Art-Stammzellen (B6WT). Dargestellt sind Exon 1 und 2 (rot) sowie die kodierende Sequenz von XCR1 (gelber Pfeil). Bindungssequenzen der *Southern Blot*-Sonden (graue Rechtecke) sowie Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet. **B** XCR1-Lokus im Stammzellklon C7 nach *targeting* mit pACN-TV-XCR1. Dargestellt sind Exon 1, die Stoppkassette bestehend aus *loxP*-flankierter Neomycinresistenzkassette (PGK-Neo) und Polyadenylierungssequenz (pA), das Gen der Diphtherietoxin Untereinheit A (DTA), sowie der verkürzte Teil von Exon 2. Bindungssequenzen der *Southern Blot*-Sonden (graue Rechtecke) sowie Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet. **C** Ergebnisse der *Southern Blot*-Analyse mit der 5'-Sonde. DNA aus wildtypischen C57BL/6Art-Stammzellen (B6WT) sowie aus Stammzellklon C7 (Klon C7) wurden mit EcoRI, EcoRV bzw. PstI restringiert und einer *Southern Blot*-Analyse unterzogen. **D** Ergebnisse der *Southern Blot*-Analyse mit der 3'-Sonde. DNA aus wildtypischen C57BL/6Art-Stammzellen (B6WT) sowie aus Stammzellklon C7 (Klon C7) wurden mit EcoRI und EcoRV restringiert und einer *Southern Blot*-Analyse unterzogen. Die Fragmente der DNA-Leiter (L) entsprechen 23,1 kb, 9,4 kb sowie 6,6 kb.

### 3.2.3 Produktion und Verifizierung XCR1:DTA-chimärer Mäuse

Klon C7 wurde im Folgenden für die Herstellung chimärer Mäuse verwendet. Die Prozedur wurde in Kooperation mit Marc Schmidt-Supprian durch die *Core-Facility* des Max-Planck-Instituts für Biochemie, Martinsried durchgeführt. Dabei erfolgte eine Injektion in eine Blastozyste des Stammes C57BL/6, welche einer scheinträchtigen Amme implantiert wurde. Aus der Blastozyste entsteht ein chimärer Organismus, dessen Gewebe zum Teil das Erbgut der veränderten Stammzelle und zum Teil das des Spenderembryos enthält. Aus den durchgeführten

Injektionen wurden 21 Nachkommen erhalten, einige davon als Totgeburten. Weitere Tiere zeichneten sich durch Kleinwüchsigkeit aus und starben wenige Tage nach der Geburt. Von den übrigen Mäusen wurden Schwanzbiopsien entnommen, welche nach DNA-Aufbereitung für vier unabhängige Genotypisierungs-PCRs verwendet wurden. Dies ermöglichte eine Unterscheidung zwischen wildtypischem C57BL/6-Lokus und durch Rekombination verändertem Lokus. Die PCRs führten zur Identifizierung von drei chimären Tieren, deren Genom ein Signal sowohl für den wildtypischen als auch für den veränderten Lokus lieferte (2457, 2461 und 2464; Abb. 15 A). Eine Beurteilung des Grades des Chimärismus durch die Fellfärbung konnte nicht erfolgen, da C57BL/6 Stammzellen in C57BL/6 Rezipienten mit jeweils schwarzer Fellfarbe injiziert wurden. Die erhaltenen Chimären wurden mit C57BL/6 Tieren verpaart. Aus den Verpaarungen wurden insgesamt 69 Nachkommen erhalten, welche zur Überprüfung der Keimbahntransmission mit vier unabhängigen PCRs genotypisiert wurden. Im Fall erfolgreicher Keimbahntransmission (d.h. Vorkommen des veränderten Genlokus im Genom der Keimzellen) werden heterozygote Nachkommen erwartet. Jedoch konnte in keinem Fall Heterozygotie nachgewiesen werden (in Abb. 15 B ist als Beispiel das Ergebnis der Genotypisierung von Maus 2772 dargestellt).



**Abb. 15: Genotypisierung von putativ chimären B6.XCR1:DTA-Mäusen sowie deren Nachkommen nach Verpaarung mit B6 Tieren.**

**A** Ergebnisse der Genotypisierung zum Nachweis chimärer Nachkommen nach der Injektion des C7-Stammzellklons in C57BL/6-Embryos (PCR mit *primern* GT2). 2456: Beispiel eines Nachkommen mit wildtypischen Genom; 2457, 2461, 2464: Nachkommen mit chimärem Genom. C7: Kontroll-DNA aus C7-Stammzellklon; B6: Kontroll-DNA aus wildtypischen C57BL/6 Stammzellen; H<sub>2</sub>O: PCR-Kontrolle ohne *template* DNA.; L, DNA-Leiter (100 bp DNA ladder, Invitrogen). **B** Ergebnisse der PCR GT2 zum Nachweis von Keimbahntransmission nach Verpaarung chimärer Tiere mit C57BL/6 Tieren. 2772: Beispiel eines Nachkommen mit wildtypischem Genom. Die Abbildung wurde aus Gründen der Übersicht aus mehreren Gelfotos zusammengestellt.

Da aus den Nachkommen der ersten Injektion keine Tiere mit erfolgter Keimbahntransmission erhalten werden konnten, wurde eine zweite Injektion mit Stammzellen des Klons C7

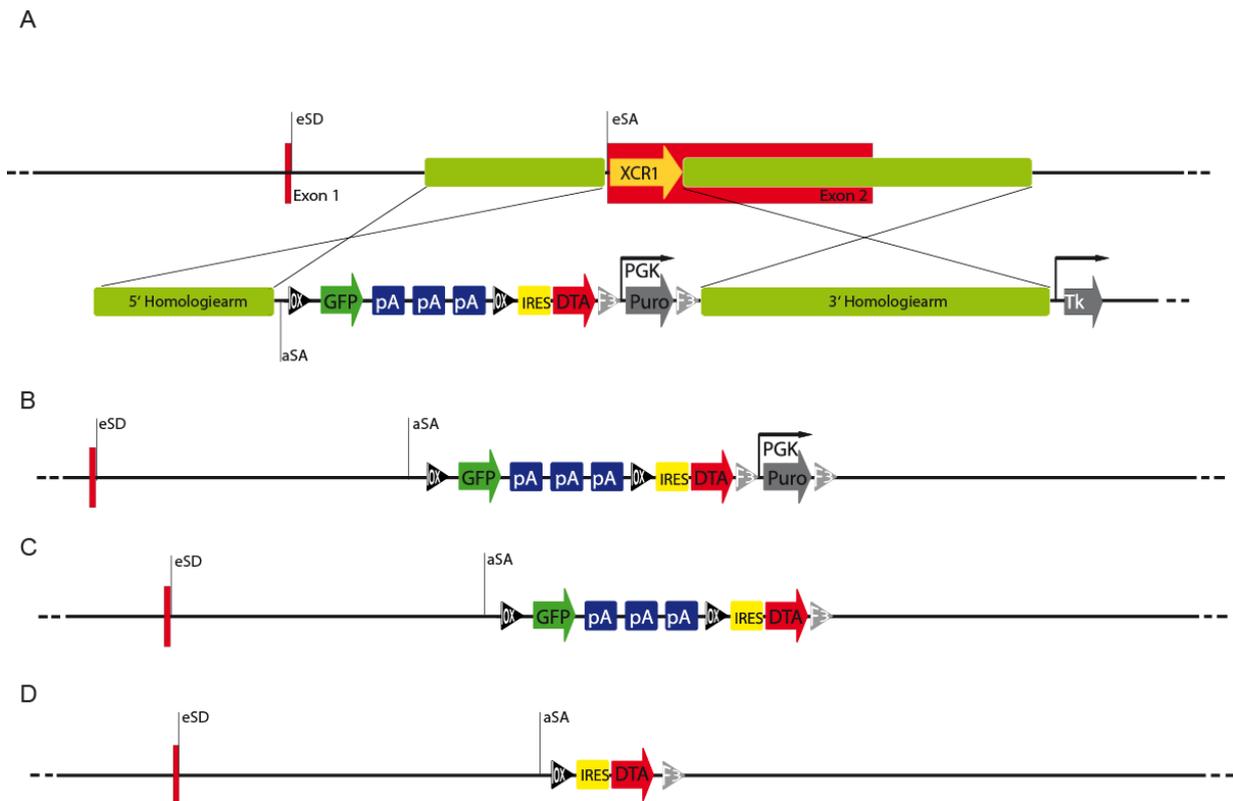
durchgeführt. Bei den erhaltenen Würfen musste erneut festgestellt werden, dass ein Teil der Mäuse wenige Tage nach der Geburt verstarb und somit nicht für Genotypisierung und weitere Verpaarung eingesetzt werden konnte. Lebendige Tiere, welche aufgrund von PCR-Ergebnissen als chimär eingestuft wurden, lieferten wiederum in keinem Fall Nachkommen, in welchen der veränderte XCR1-Lokus nachweisbar war (nicht gezeigt). Der genaue Grund für die auftretende Lethalität sowie die ausbleibende Keimbahntransmission konnte nicht geklärt werden. Möglicherweise kam es zu einer Expression des Toxins über die Stoppkassette hinweg, was die Entwicklung eines Embryos verhindert hat.

### **3.2.4 Herstellung des *targeting*-Vektors Version 2, Generierung von Stammzellklonen und chimären Mäusen**

Aufgrund der vergeblichen Versuche, eine stabile Linie nach erfolgter Keimbahntransmission aus dem ersten Anlauf zu erhalten (3.2.3), wurde die Strategie zur Herstellung der gewünschten Mauslinie verändert. Erstens wurde eine erweiterte Stoppkassette verwendet, in welcher, nicht wie bisher eine, sondern drei hintereinander angeordneten SV 40 Polyadenylierungssequenzen die Expression des Toxins verhindern sollten, was bereits in anderen Konstrukten erfolgreich demonstriert worden ist (Srinivas *et al.*, 2001) (Abb. 16 B). Zweitens wurde das Neomycinresistenzgen samt PGK-Promotor aus der Stoppkassette entfernt und stattdessen ein durch einen PGK-Promotor getriebenes Puromycinresistenzgen 3' vor dem DTA-Gen platziert. Die Neomycinresistenz samt PGK-Promotor war zwar in umgekehrter Richtung zum DTA-Gen orientiert, Untersuchungen belegen jedoch, dass PGK-Promotoren unidirektional aktiv sein können (Johnson und Friedman, 1990). Somit sollte ein möglicher Einfluss des PGK-Promotors auf die Expression des Toxins verhindert werden (Abb. 16 B). Drittens wurden neben der Stoppkassette auch Veränderungen am Toxingen durchgeführt. Unter 1.4.1 ist beschrieben, dass neben dem in der NCBI-Datenbank (Version 37.2) vorgeschlagenen Translationsstart von XCR1 ein weiteres mögliches Startkodon 5' innerhalb des Leserahmens liegt. Eine durchgeführte Analyse der Translationsinitiation lieferte höhere Wahrscheinlichkeiten für das zweite Startkodon (Rogozin *et al.*, 2001; Software ATG\_EVALUATOR, *Institute for Biomedical Technologies*, Mailand, Italien). Würde dennoch ein Translationsstart vom ersten Startkodon erfolgen, könnte in der bisherigen *knock in*-Strategie keine Expression des Toxins erfolgen. Um eine Toxinexpression nach Entfernen der Stoppkassette sicherzustellen, wurde das DTA hinter eine interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES) gesetzt (Abb. 16 B). Dadurch kann eine

Translationsinitiation unabhängig vom tatsächlichen Startkodon erfolgen (Pacheco und Martinez-Salas, 2010). Dasselbe IRES-Element wurde bereits erfolgreich bei der Herstellung von B6.XCR1:LacZ-Mäusen verwendet.

Zusätzlich wurde ein Gen für GFP im 5'-Bereich der Stoppkassette integriert (Abb. 16 A). In der erhaltenen Mauslinie sollen zuerst Zellen mit XCR1-Promotoraktivität GFP anstatt von XCR1 exprimieren. Dies würde eine histologische sowie durchflusszytometrische Detektion dieser Zellen ermöglichen. Eine Expression von DTA wird durch die noch enthaltene Stoppkassette verhindert (Abb. 16 B). Eine Verpaarung mit einer Mauslinie mit ubiquitärer Flp-Rekombinaseexpression (*Flp-deleter*) soll die zur Selektion der Stammzellen enthaltene F3-flankierte Puromycinresistenzkassette entfernen (Abb. 16 C). Damit können mögliche epigenetische Effekte der Resistenzkassette bzw. des enthaltenen PGK-Promotors ausgeschlossen werden. Im nächsten Verpaarungsschritt mit einer *Cre-deleter*-Mauslinie kann die Deletion der Stoppkassette erfolgen, was in Zellen mit aktivem XCR1-Promotor zur Expression von DTA und somit zum Zelltod führen sollte (Abb. 16 D).



**Abb. 16: Targeting-Strategie 2 zur Herstellung einer XCR1:GFP/DTA-knock in-Mauslinie.**

**A** Genlocus des murinen XCR1 bestehend aus Exon 1 und Exon 2 (rot), dem endogenen Spleißdonor (eSD), dem endogenen Spleißakzeptor (eSA) sowie der kodierenden Sequenz von XCR1 (gelber Pfeil). Das *targeting* erfolgte mit dem linearisierten Vektor pXCR1-2. Der *targeting*-Vektor enthält einen artifiziellen Spleißakzeptor (aSA) sowie eine *loxP*-flankierte Stoppkassette bestehend aus dem Gen für grün fluoreszierendes Protein (GFP) und drei Polyadenylierungsstellen (pA). 3' der Stoppkassette ist die Sequenz der Diphtherietoxin Untereinheit A hinter einer internen Ribosomeneintrittsstelle (IRES) angeordnet. 3' davon ist eine Puromycinresistenzkassette (Puro) unter Kontrolle des PGK-Promotor (PGK) zur Positivselektion angeordnet. Die 5'- und 3'-Homologiearme ermöglichen eine Rekombination zwischen linearisiertem Vektor und den homologen Sequenzen im wildtypischen Locus. Im Fall einer unspezifischen Integration des linearisierten Vektors erfolgt eine Expression der außerhalb der Homologiearme lokalisierten Thymidinkinase (Tk), was zur Negativselektion verwendet wird. **B** Genlocus von XCR1 nach erfolgter homologer Rekombination mit pXCR1-2. In Zellen mit aktivem XCR1-Promotor erfolgt keine Expression des DTA, da die Stoppkassette die Transkription des Toxingens verhindert. Stattdessen erfolgt XCR1-spezifische Expression von GFP. **C** Genlocus von XCR1 nach erfolgter Verpaarung mit einer Flp-Rekombinase-exprimierenden Mauslinie. Die F3-flankierte Puromycinresistenzkassette wurde ausgeschnitten. **D** Genlocus von XCR1 nach erfolgter Verpaarung mit einer Cre-Rekombinase-exprimierenden Mauslinie. Die Exzision der *loxP*-flankierten Stoppkassette führt zur Expression von DTA in Zellen mit aktivem XCR1-Promotor.

Die Konzeption und Herstellung des zweiten *targeting*-Vektors pXCR1-2 erfolgte in gemeinsamer Arbeit mit der Firma TaconicArtemis, Köln. Die Generierung der Mauslinie wurde aus Gründen der Zeitersparnis von TaconicArtemis durchgeführt.

Es konnten aus 188 erhaltenen Klonen sechs positive Klone bestimmt werden. Injektionen von drei dieser Klone führten zu Nachkommen mit verschiedenen Graden an Chimärismus. Verpaarung mit C57BL/6 Mäusen lieferte jedoch in keinem Fall Tiere mit verändertem XCR1-Lokus. Alternativ wurden Verpaarungen mit *Flp-deleter* sowie *Cre-deleter*-Mäusen durchgeführt, jedoch konnte auch in diesem Fall keine Keimbahntransmission festgestellt werden.

### 3.3 Herstellung von XCR1-BAC-transgenen Mäusen

Als alternative Strategie zur Depletion bzw. Markierung XCR1-exprimierender Zellen wurde die Technik der BAC-transgenen-Manipulation verwendet. Diese Technologie ermöglicht es, ein Wunschgen unter den Einfluss der Promotorelemente von XCR1 zu stellen und somit eine spezifische Expression zu erzielen.

Da die genaue Promotorregion in der Regel unbekannt ist, verwendet man Vektoren von 100 bis 200 kb Größe (sog. bakterielle artifizielle Chromosomen, BACs), welche regulatorische 5'- und 3'-Sequenzen enthalten. In diesem BAC wird die kodierende Region des zu untersuchenden Gens durch das gewünschte Konstrukt ersetzt. Im Folgenden wird die BAC-DNA in den Pronukleus eines Embryos eingebracht und integriert unspezifisch ins Genom des Tieres. Der eigentliche Lokus des zu untersuchenden Gens wird dabei nicht verändert.

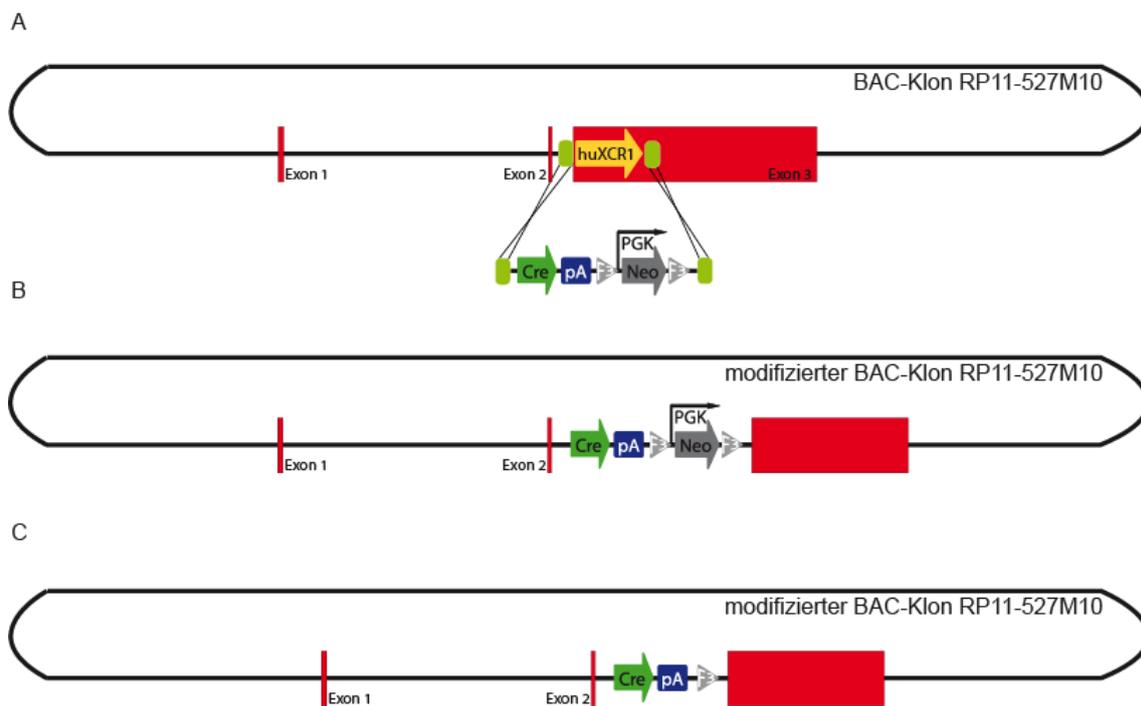
Zur Herstellung einer XCR1-BAC-transgenen Mauslinie wurde zuerst ein geeigneter BAC-Klon gesucht, welcher den XCR1-Genlokus sowie die 5'- und 3'-regulatorischen Elemente von XCR1 enthält. Der Genlokus von XCR1 in der Maus liegt in einem Bereich des Telomers des neunten Chromosoms (Abb. 2). In den verfügbaren Genomdatenbanken (z.B. NCBI, ENSEMBL) sind zwar beide Exons von XCR1 kartiert, jedoch enthält die Region 5' von Exon 1 eine etwa 100 kb große Lücke, welche bisher nicht durch Sequenzierungsdaten geschlossen wurde. Aus diesem Grund können keine BAC-Klone annotiert werden, welche den vollständigen XCR1-Lokus abdecken (Abb. 2). Die Suche nach geeigneten BAC-Klonen in Datenbanken anderer Mausstämmen blieb erfolglos.

Eine weitere Möglichkeit zur Herstellung einer BAC-transgenen Maus ist die Verwendung eines humanen BAC-Klons. Regulatorische Regionen von Genen des Menschen wurden bereits

erfolgreich in Mäusen zur gewebsspezifischen Expression von Zielgenen eingesetzt (Feng *et al.*, 2001; Kaplan *et al.*, 2005). Der humane Locus von XCR1 ist durch mehrere überlappende BAC-Klone abgedeckt (Abb. 2). Der BAC-Klon RP11-527M10 aus der RPCI-11 BAC Bibliothek (hergestellt am *Roswell Park Cancer Institute*, Buffalo, USA) wurde als geeignet ausgewählt, da er bei einer Größe von etwa 174 kb den Genlocus von XCR1 mittig enthält (Abb. 17).

### **3.3.1 Herstellung einer BAC-transgenen XCR1:Cre-Rekombinase Maus**

In einer BAC-transgenen XCR1:Cre Maus soll die Rekombinase Cre unter Kontrolle des humanen XCR1-Promotors exprimiert werden. Durch Verpaarung mit Mauslinien, welche *loxP*-flankierte Elemente enthalten, kann eine gewebsspezifische Deletion der *loxP*-flankierten Elemente erreicht werden, was zur Expression des nachfolgenden Gens führt. Die Herstellung der Konstrukte erfolgte durch Dr. Konstantinos Anastasiadis, Biotechnologisches Zentrum der Technischen Universität Dresden. Die Pronukleusinjektion wurde an der *Transgenic Core Facility* des Max-Planck-Institut für Molekulare Zellbiologie und Genetik, Dresden durchgeführt.



**Abb. 17: Strategie zur Herstellung einer BAC-transgenen XCR1:Cre-Mauslinie.**

**A** BAC-Klon RP11-527M10 mit dem Genlocus des humanen XCR1 bestehend aus Exon 1, Exon 2 und Exon 3 (rot). Die kodierende Sequenz von XCR1 (gelber Pfeil) wurde durch Rekombination über Homologiearme (grün) ersetzt. Die Rekombinationskassette enthält die Rekombinase Cre (Cre), eine SV40 Polyadenylierungssequenz (pA) sowie ein F3-flankiertes Neomycinresistenzgen (Neo) unter Kontrolle des PGK-Promotors (PGK). **B** Im modifizierten BAC-Klon steht die Rekombinase Cre unter der Kontrolle der regulatorischen Elemente des humanen XCR1. **C** Durch Flippase-vermittelte Rekombination wurde das Neomycinresistenzgen aus dem Konstrukt entfernt. Der modifizierte BAC-Klon wurde nach Linearisierung in Pronuklei injiziert.

Das Cre-*loxP*-System zeichnet sich durch universelle Verwendbarkeit aus, da Verpaarungsmöglichkeiten mit einer Vielzahl freiverfügbarer Mauslinien bestehen (Johansson *et al.*, 2010). Zum Einen kann eine Verpaarung mit ROSA26:DTA-Mäusen erfolgen, welche die Diphtherietoxin Untereinheit A unter der Kontrolle eines *loxP*-flankierten Stoppelements im ubiquitär exprimierenden ROSA26-Lokus enthalten (Brockschnieder *et al.*, 2004; Voehringer *et al.*, 2008, Ohnmacht *et al.*, 2009). In diesem Fall führt die Aktivität des XCR1-Promotors in den entsprechenden Zellen zur Expression der Rekombinase Cre, welche das Stoppelement aus dem ROSA26-Lokus entfernt und zur Expression des Diphtherietoxins und somit zum Zelltod führt.

Eine weitere Möglichkeit ist die Verpaarung mit induzierbaren Reportermauslinien, bei welchen die Expression eines Fluorophors im ROSA26-Lokus durch ein *loxP*-flankiertes Stoppelement

verhindert wird (Reporterlinien). Hier führt Aktivität des XCR1-Promotors zur spezifischen Fluoreszenzmarkierung der Zellen (Srinivas *et al.*, 2001; Luche *et al.*, 2007).

Zur Herstellung BAC-transgener XCR1:Cre-Mäuse wurde die kodierende Sequenz des humanen XCR1 in BAC-Klon RP11-527M10 durch das Gen der Cre Rekombinase ersetzt (Abb. 17 A, B). Im Folgenden wurde die Selektionskassette entfernt (Abb. 17 C). Der erhaltene modifizierte BAC-Klon wurde linearisiert und in C57BL/6-Pronuklei injiziert. Aus den Pronuklei entwickelte Zweizeller wurden in scheinchwangere Ammen transferiert. Aus 57 Nachkommen konnten über PCR-Analysen 7 Tiere identifiziert werden, welche den veränderten BAC-Klon im Genom tragen. Weitere Verpaarung dieser *founder*-Tiere mit C57BL/6 Mäusen wird zeigen, ob stabile Linien erhalten werden, welche sich zur Verpaarung mit ROSA26:DTA- bzw. ROSA26-Reporterlinien eignen.

### 3.4 Analyse XCR1-positiver dendritischer Zellen aus humanem peripheren Blut

In der Maus konnte XCR1 spezifisch auf einem Subtyp von DCs festgestellt werden. Da die DC-Subtypen des Menschen weitgehend uncharakterisiert waren, sollten diese im Hinblick auf Expression von XCR1 hin untersucht werden.

#### 3.4.1 Identifikation und Isolierung von Subtypen dendritischer Zellen aus humanem peripheren Blut

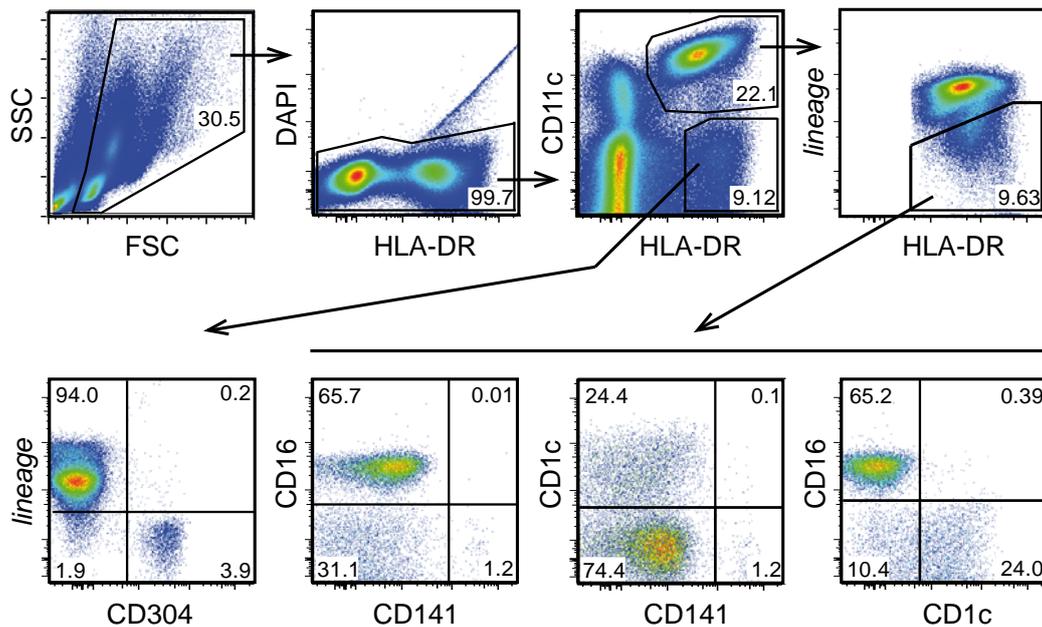
Um DC-Subtypen des Menschen zu charakterisieren wurden leukozytenangereicherte Blutpräparate (*buffy coats*) und Leukapheresematerial verwendet, wie bereits von anderen Gruppen in der Vergangenheit.

In einem ersten Schritt wurden periphere mononukleäre Zellen (PBMCs) aus den Blutpräparaten isoliert und unter Verwendung spezifischer Oberflächenmarker in folgende Typen eingeteilt: T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Monozyten, Granulozyten und DCs.

Eine weitere Unterteilung von DCs in Subtypen erfolgte entsprechend den Angaben aus der Literatur: Plasmazytoide DCs (pDCs) des Blutes sind in ihrem Phänotyp charakterisiert durch Expression der Oberflächenmarker CD123, CD304 und HLA-DR und negativ für die als *lineage*-Marker bezeichneten Antigene CD3, CD14, CD19 und CD56. Weiterhin sind pDCs negativ für CD11c (Robinson *et al.*, 1999; Dzionek *et al.*, 2000).

cDCs können durch die Expression von CD11c und HLA-DR sowie fehlende Expression der *lineage*-Marker charakterisiert werden. In dieser Arbeit erfolgte eine Einteilung basierend auf der Publikation von Piccioli *et al.* 2007, wonach sich cDCs im Blut anhand von Oberflächenmarkern in drei Subtypen einteilen lassen: CD1c<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> und CD141<sup>+</sup> DCs. CD34<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup> Zellen wurden dabei nicht als DCs gewertet (Dzionek *et al.*, 2000; MacDonald *et al.*, 2002; Piccioli *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009; Autissier *et al.*, 2010; Ju *et al.*, 2010; siehe Einleitung 1.3).

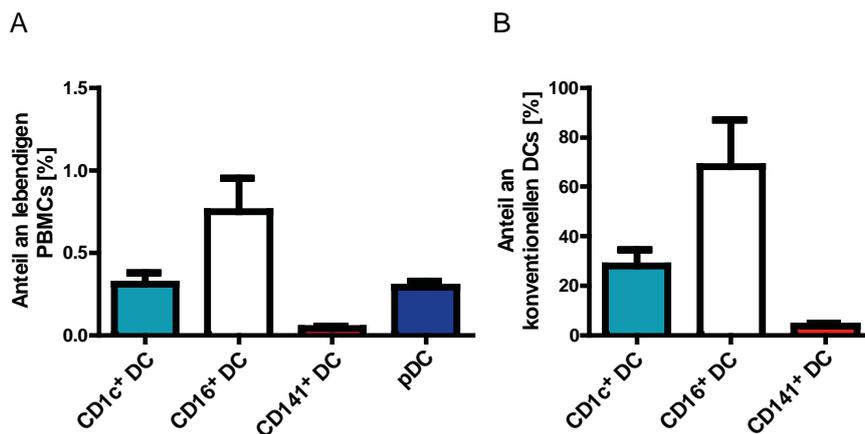
Zur Charakterisierung der DC-Subtypen wurden PBMCs unter Anfärbung der beschriebenen Oberflächenmarker durchflusszytometrisch untersucht. In Abbildung 18 ist die *gating*-Strategie dargestellt.



**Abb. 18: Definition humaner Subtypen dendritischer Zellen aus peripherem Blut.**

Mononukleäre Zellen aus humanem peripherem Blut (PBMCs) wurden durch Dichtegradientenzentrifugation angereichert und zur durchflusszytometrischen Analyse für die dargestellten Oberflächenmarker gefärbt. Die Zahlenangaben entsprechen dem prozentualen Anteil der Zellen im jeweiligen *gate*. Zum Ausschluss von nicht-DCs wurden die Marker CD3, CD14, CD19 und CD56 verwendet (*lineage*). FSC, *forward scatter*; SSC, *side scatter*.

Die Frequenz der Gesamt-DCs aus PBMCs betrug je nach Spender 0,75-1,5 % der gesamten lebenden Zellen. Die Anteile der DC-Subtypen sind in Abbildung 19 dargestellt.



**Abb. 19: Frequenzen dendritischer Zellpopulationen in humanem peripherem Blut.**

**A** Anteil von CD1c<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> und CD141<sup>+</sup> dendritischen Zellen (DCs) sowie plasmazytoiden DCs an der Gesamtzahl mononukleärer Zellen aus humanen peripheren Blut (PBMCs) in Prozent. **B** Anteil von CD1c<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> und CD141<sup>+</sup> DCs an konventionellen DCs in Prozent. Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung.

Die niedrigen Frequenzen der DC-Subtypen erschweren eine direkte durchflusszytometrische Sortierung, da das Erreichen einer großen Zellzahl hoher Reinheit sehr zeitaufwändig ist, worunter die Viabilität der Zellen leidet. Insbesondere der Subtyp der CD141<sup>+</sup> DCs stellt mit durchschnittlich 0,04 % an den Gesamt-PBMCs eine außerordentlich kleine Population dar (Abb. 19).

Um die Ausgangsfrequenz zur durchflusszytometrischen Sortierung zu erhöhen, wurde die magnetische Zellsortierung verwendet (siehe Material und Methoden, 2.7.2.2 und Tab. 9).

Bei Verwendung von humanem Probenmaterial tritt eine hohe Varianz zwischen verschiedenen Spendern auf (bspw. demonstriert durch Variationen in Genexpressionssanalysen unterschiedlicher Blutproben; Whitney *et al.*, 2003). Aus diesem Grund wurden für nachfolgende funktionelle Experimente die magnetischen Anreicherungsschritte so kombiniert, dass die Isolierung aller DC-Subtypen aus einem *buffy coat* bzw. einem Leukapheresepreparat möglich war. Dabei erfolgte zuerst die Isolierung der CD141<sup>+</sup> DCs, während aus dem CD141<sup>-</sup> Zelldurchfluss die anderen DC-Subtypen isoliert wurden. Im Anschluss an die magnetische Voranreicherung erfolgte eine durchflusszytometrische Sortierung sowie die Bestimmung der Reinheit (Tabelle 12). Da der Prozess der Zellsortierung extrem arbeitsaufwendig ist, wurden derartige Experimente zusammen mit Annabell Bachem und Evelyn Hartung durchgeführt.

**Tab. 12: Durchflusszytometrische Sortierung verschiedener Subtypen dendritischer Zellen aus humanem peripheren Blut nach Anreicherung.**

Zellpopulation	Anreicherung	Spezifische Oberflächenmarker für Durchflusszytometrie	Marker zum Ausschluss anderer Zellpopulationen	Erzielte Reinheit [%]
CD1c <sup>+</sup> DC	Dichtegradienten-zentrifugation und	CD1c, CD11c, HLA-DR	CD16, CD141, <i>lineage</i>	≥99,5
CD16 <sup>+</sup> DC		CD11c, CD16, HLA-DR	CD1c, CD141, <i>lineage</i>	≥99,2
CD141 <sup>+</sup> DC	Magnetische Zellsortierung	CD11c, CD141, HLA-DR	CD1c, CD16, <i>lineage</i>	≥97,5
pDC		CD304, HLA-DR	CD11c, CD141, <i>lineage</i>	≥99,9

### 3.4.2 Expression des Chemokinrezeptors XCR1 in humanem peripheren Blut

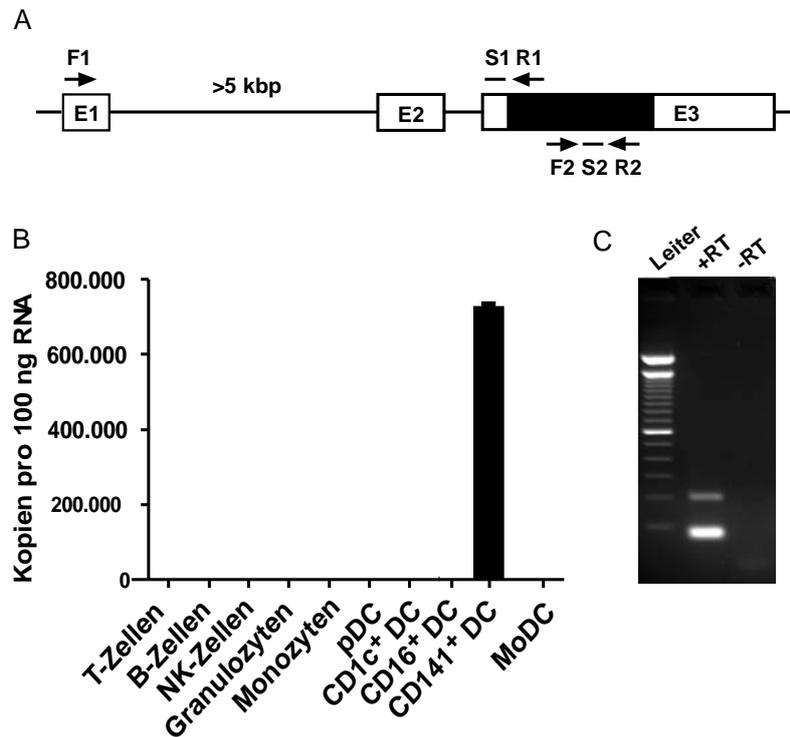
Zur Bestimmung der XCR1-Expression der Zellpopulationen aus humanem peripheren Blut wurde die Methode der quantitativen PCR (qPCR) verwendet. Dazu wurde Gesamt-RNA aus den

sortierten Zellpopulationen aus 3.4.1 in cDNA umgeschrieben und XCR1-mRNA durch ein spezifisches *primer*-Sonde-Set quantifiziert.

Der anschließende Nachweis erfolgte mit einem *primer*-Sonde-Set, welches ein Exon-überspannendes Fragment des XCR1-Transkripts detektiert (Abb. 20 A). Dadurch werden gegebenenfalls vorhandene Verunreinigungen durch genomische DNA nicht detektiert und eine Verfälschung der Ergebnisse ausgeschlossen. Mit der Analyse wurden die beiden für humanes XCR1 beschriebenen Isoformen nachgewiesen (Abb. 20 C; Einleitung 1.4.1). Zur Verifizierung der Daten wurde ein weiteres XCR1-spezifisches *primer*-Sonde-Set verwendet, welches lediglich ein Fragment aus der kodierenden Sequenz in Exon 2 amplifiziert (Abb. 20 A).

Da für bisherige Untersuchungen humaner DCs häufig monozytengenerierte DCs (MoDCs) verwendet wurden (Strunk *et al.*, 1996), erfolgte auch eine qPCR-Analyse mit Gesamt-RNA dieser Zellen.

In Abbildung 20 B sind die Ergebnisse der qPCR-Analyse der sortierten Zelltypen unter Verwendung des exonüberspannenden *primer*-Sonde-Sets dargestellt. Von allen getesteten Populationen exprimieren ausschließlich CD141<sup>+</sup> DCs mRNA für XCR1. T-, B- und NK-Zellen, Granulozyten, Monozyten sowie die anderen DC-Subtypen sind negativ für XCR1-mRNA. In generierten MoDCs konnte ebenfalls keine XCR1-mRNA nachgewiesen werden. Durch Vergleich der qPCR-Ergebnisse mit dem mitgeführten Plasmidstandard konnte eine Zahl von etwa 722.000 Kopien XCR1 pro 100 ng RNA aus CD141<sup>+</sup> DCs bestimmt werden. Die Verwendung des nicht-exonüberspannenden *primer*-Sonde-Sets lieferte vergleichbare Ergebnisse (nicht gezeigt). Weiterhin wurde eine qPCR-Analyse mit einem *primer*-Sonde-Set zum Nachweis des beta-2-Mikroglubulin (B2MG)-Gens durchgeführt. Dieses Gen ist als Bestandteil des MHC-I-Komplexes auf allen zu analysierenden Zellen exprimiert und diente als interner Standard (Cluzel-Tailhardat *et al.* 2007). Alle getesteten Zelltypen wiesen eine vergleichbare Kopienzahl für B2MG auf (nicht gezeigt).



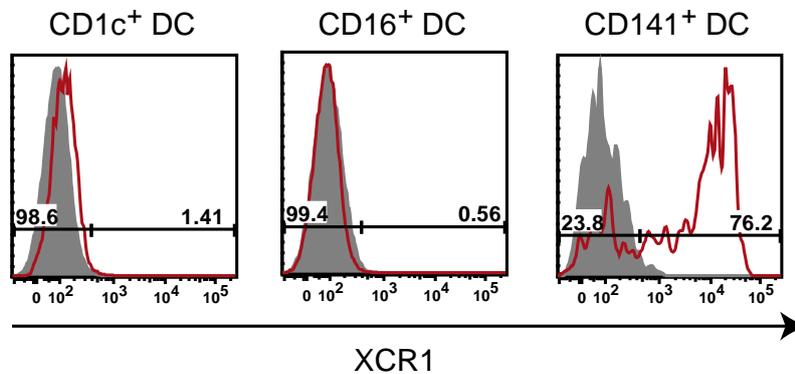
**Abb. 20: Spezifische Expression des humanen Chemokinrezeptors XCR1.**

**A** Humaner Lokus des XCR1 Gens (E1, Exon 1; E2, Exon 2; E3, Exon 3). Die kodierende Region ist in schwarz dargestellt. *Primer* und Sonden der quantitativen PCR-Analysen (qPCR) sind angegeben. **B** qPCR-Analyse von cDNA aus Gesamt-RNA hochrein sortierter T-, B-, und NK-Zellen sowie Granulozyten, Monozyten, plasmazytoide DCs (pDCs), CD1c<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> und CD141<sup>+</sup> DCs aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs). Monozytengenerierte DCs (MoDCs) wurden ebenfalls getestet. Die Analyse erfolgte mit dem *primer*-Sonde-Set 1 (F1, R1 und Sonde S1) dargestellt in A. Mit dem *primer*-Sonde-Set 2 (F2, R2 und Sonde S2) wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt (nicht dargestellt). **C** Gelelektrophoretische Auftrennung der amplifizierten Fragmente des *primer*-Sonde-Set 1 mit cDNA von CD141<sup>+</sup> DCs (+RT) bzw. der Kontrolle ohne Verwendung der Reversen Transkriptase bei der cDNA-Synthese (-RT). Die Fragmente entsprechen den beiden Isoformen des Gens (E1+E3 & E1+E2+E3). Alle qPCR-Analysen wurden mit Zelltypen aus mindestens zwei unterschiedlichen Donoren durchgeführt. Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung.

### 3.4.3 Nachweis der XCR1-Expression auf Proteinebene

Um den erzielten Nachweis von XCR1 auf Proteinebene zu erbringen, wurde eine durchflusszytometrische Analyse von PBMCs durchgeführt. Hierzu wurde zusätzlich zu den fluorophorgekoppelten Antikörpern gegen die DC-Oberflächenmarker eine Färbung von XCR1 basierend auf der Bindung des *Strep-tag*-konjugiertem Liganden ATAC und einem fluorophorgekoppeltem Sekundärreagenz durchgeführt. Durch diese Färbung auf Proteinebene konnte bestätigt werden, dass CD141<sup>+</sup> DCs als einzige Population in humanem Blut XCR1

exprimieren, während  $CD1c^+$  DCs und  $CD16^+$  DCs negativ sind (Abb. 21). Weiterhin ergab die Untersuchung, dass etwa 60-80 % der  $CD141^+$  DCs positiv für XCR1 sind (Abb. 21).



**Abb. 21: Analyse der XCR1-Expression von konventionellen dendritischen Zellen aus humanem peripheren Blut auf Proteinebene.**

Aus humanem peripheren Blut wurden mononukleäre Zellen (PBMCs) mittels Dichtegradientenzentrifugation angereichert und durchflusszytometrisch auf die Expression von XCR1 hin untersucht. Konventionelle dendritische Zellen (cDCs) wurden als  $CD11c^+HLA-DR^+$  charakterisiert und entsprechend der Oberflächenmarker  $CD1c$ ,  $CD16$  und  $CD141$  in Subtypen unterteilt. Die rote Linie repräsentiert die Färbung von XCR1 durch einen Komplex aus *Strep-tag*-konjugiertem Liganden ATAC und einem fluorophorgekoppeltem Sekundärreagenz; in grau ist die Hintergrundfärbung des Sekundärreagenz dargestellt. Die Zahlenangaben entsprechen dem Anteil der Zellen in Prozent.

#### 3.4.4 Analyse der Kreuzpräsentation der Subtypen dendritischer Zellen aus humanem Blut

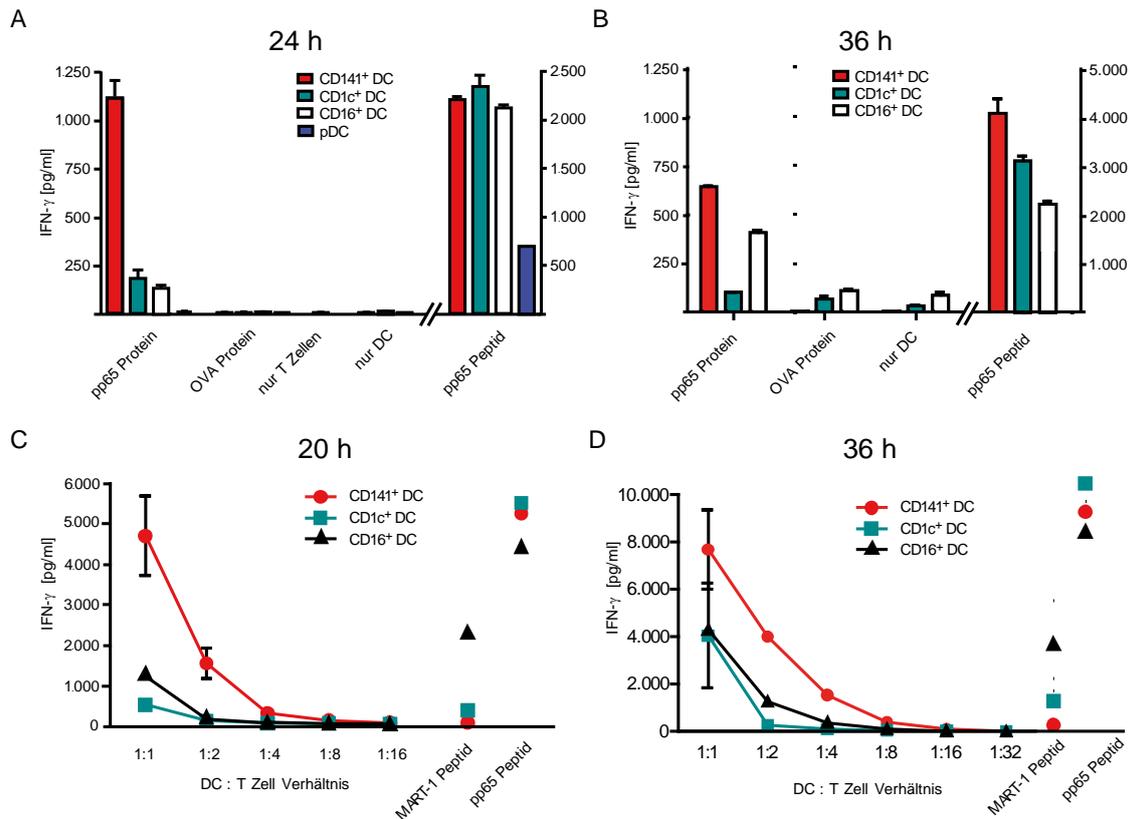
Bisher wurde gezeigt, dass in  $CD141^+$  DCs XCR1-mRNA vorliegt und eine Subpopulation dieser Zellen XCR1 als Protein exprimiert. In der Maus wurde gezeigt, dass die  $CD8^+$  DCs der Milz, von denen etwa 75 %  $XCR1^+$  sind, in ihrer Fähigkeit zur Antigen-Kreuzpräsentation die anderen DC-Subtypen übertreffen (den Haan *et al.*, 2000; Pooley *et al.* 2001). Aus diesem Grund wurden im Folgenden die  $CD141^+$  DCs mit den anderen DC-Subtypen auf ihre Fähigkeit zur Antigen-Kreuzpräsentation hin verglichen.

Hierzu wurden DCs wie in 3.4.1 beschrieben aus HLA-A\*0201-positiven Spendern sortiert und mit rekombinantem pp65-Protein des humanen Cytomegalievirus (HCMV) und einem pp65-spezifischen  $CD8^+$  T-Zell-Klon für 20-36 Stunden kokultiviert. Dieser Klon erkennt das HCMV Peptid NLVPMVATV (pp65<sub>495-503</sub>), wenn es im Kontext von HLA-A\*0201 präsentiert wird (Fonteneau *et al.*, 2001). DCs und T-Zell-Klon wurden im Verhältnis 1:1 eingesetzt. Wird das pp65-Protein von DCs aufgenommen, prozessiert und kreuzpräsentiert, führt dies zur

Aktivierung des CD8<sup>+</sup> T-Zell-Klons, welcher daraufhin Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) sekretiert. Dieses kann im Kulturüberstand mittels IFN- $\gamma$ -spezifischem ELISA nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle wurde der gleiche Ansatz mit löslichen Ovalbumin (OVA) in gleichen molaren Mengen wie pp65-Protein verwendet, wobei die Degradationsprodukte von OVA nicht vom CD8<sup>+</sup> T-Zell-Klon erkannt werden. Um die prinzipielle Aktivierbarkeit des Klons zu kontrollieren, wurde zu einer parallel angesetzten Kokultur aus DCs und T-Zell-Klon pp65-Peptid zugegeben, welches zur Aktivierung führt, ohne dass eine Prozessierung durch die DCs notwendig ist.

Die Zugabe von löslichem rekombinantem pp65-Protein zu Kokulturen mit CD141<sup>+</sup> DCs induzierte eine starke Sekretion von IFN- $\gamma$  durch den T-Zell-Klon nach 24 und 36 Stunden. Dies deutet auf eine erhöhte Aufnahme, Prozessierung und Präsentation des NLVPMVATV-Peptids durch diesen Zelltyp hin (Abb. 22 A, B). pp65-Protein in Kokulturen mit CD1c<sup>+</sup> und CD16<sup>+</sup> DCs führte zu deutlich schwächerer IFN- $\gamma$ -Sekretion nach 24 Stunden Kokultur während pDCs sogar nur eine minimale Sekretion auslösten (Abb. 22 A). Nach 36 Stunden war eine erhöhte IFN- $\gamma$ -Sekretion auch in den Kokulturen von CD16<sup>+</sup> DCs und T-Zell-Klon feststellbar (Abb. 22 B). Zugabe von OVA führte in allen vier Ansätzen nur zu minimalem Hintergrundsignal nach 24 Stunden, während die Zugabe von pp65-Peptid für alle cDCs ein starkes IFN- $\gamma$ -Signal induzierte (Abb. 22 A). pDCs in Kokultur mit dem T-Zell-Klon und dem pp65-Peptid führten zu einem im Vergleich zu den anderen cDC-Kokulturen geringem IFN- $\gamma$ -Signal. Kultur von DCs oder T-Zell-Klon alleine führte nach 24 Stunden zu keiner nachweisbaren Menge an IFN- $\gamma$ . Nach 36 Stunden war für die Kokulturen der Negativkontrolle (Zugabe von OVA oder DCs alleine) ein im Vergleich zum 24 Stunden-Zeitpunkt höheres Hintergrundsignal feststellbar (Abb. 22 B). pp65-Peptid führte in der Kokultur von CD16<sup>+</sup> DCs und T-Zell-Klon nur zu einer relativ geringen IFN- $\gamma$ -Produktion. Durch Zellviabilitätsmessung konnte gezeigt werden, dass 60-70 % der DCs in allen Ansätzen zum Ende der Kokultur noch lebendig waren (nicht gezeigt). Kreuzpräsentation spielt eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von toten Zellen bzw. Zelltrümmern (Iyoda *et al.*, 2002; Schulz und Reis e Sousa, 2002; Fonteneau *et al.*, 2003). Aus diesem Grund wurden weitere Kokulturen aus sortierten DCs und CD8<sup>+</sup> T-Zell-Klon unter Zugabe von zellgebundenem pp65-Antigen durchgeführt. Zellgebundenes Antigen wurde durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen einer HCMV pp65-transfizierten Zelllinie erhalten. Um den Einfluss der Interaktion zwischen DCs und T-Zell-Klon zu charakterisieren, wurde ihr Zahlenverhältnis zwischen 1:1 und 1:16 variiert. Die Analysen ergaben ein starkes IFN- $\gamma$ -Signal

für Kokulturen von 20 und 36 Stunden mit CD141<sup>+</sup> DCs, während CD1c<sup>+</sup> DCs und CD16<sup>+</sup> DCs nur minimale Aktivierung des T-Zell-Klons auslösten (Abb. 22 C, D). Weiterhin wurde festgestellt, dass die Menge an produziertem IFN- $\gamma$  mit der Zahl der DCs im Verhältnis zur T-Zelle in der Kokultur abnimmt. Ab einem DC-zu-T-Zell-Verhältnis von 1:8 war praktisch kein IFN- $\gamma$  mehr detektierbar (Abb. 22 C, D). Das als Positivkontrolle verwendete pp65-Peptid führte auch in diesem Ansatz zu starker Aktivierung des T-Zell-Klons, unabhängig vom DC-Subtyp in der Kokultur. Ein als Negativkontrolle verwendetes MART-1<sub>27-35</sub>-Peptid, das nicht vom T-Zell-Klon erkannt wird, führte in den Kokulturen mit CD1c<sup>+</sup> DCs und CD141<sup>+</sup> DCs zu einem sehr schwachen Hintergrundsignal, während im Ansatz mit CD16<sup>+</sup> DCs ein höheres Hintergrundsignal für beide Zeitpunkte festzustellen war (Abb. 22 C, D). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass CD141<sup>+</sup> DCs am besten zur Antigen-Kreuzpräsentation befähigt sind, vorallem bei zellassoziertem Antigen.



**Abb. 22: Kreuzpräsentation von löslichem und zellassoziertem Antigen durch Subtypen dendritischer Zellen aus humanem Blut.**

**A** Kokultur sortierter Dendritischer Zellen (DC) zusammen mit dem CD8<sup>+</sup> T-Zell-Klon 10 spezifisch für HCMV pp65 Peptid NLVPMVATV (pp65<sub>495-503</sub>) im Kontext von HLA-A\*0201. CD1c<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> und CD141<sup>+</sup> konventionelle DCs (cDCs) oder plasmazytoide DCs (pDCs) aus HLA-A\*0201<sup>+</sup>-Blutpräparaten wurden mit dem T-Zell-Klon in Anwesenheit von 3 µg/ml rekombinantem pp65 Protein inkubiert. Aktivierung des T-Zell-Klons wurde durch Messung von IFN-γ im Überstand nach 20 Stunden Kokultur bestimmt. Als Negativkontrolle wurde Ovalbumin (OVA) in gleichen molaren Mengen zugegeben. Zugabe von 1 µg/ml pp65<sub>495-503</sub> Peptid zur Kokultur diente als Positivkontrolle (pp65 Peptid). Alle sortierten DC-Subtypen entstammten demselben Blutpräparat. Dargestellt ist ein repräsentatives von neun unabhängig durchgeführten Experimenten. **B** Der Versuchsablauf entspricht dem unter A beschriebenen, jedoch wurde die Kokultur für 36 Stunden durchgeführt. **C** Kokultur sortierter DCs zusammen mit dem CD8<sup>+</sup> T-Zell-Klon 61 spezifisch für das HCMV pp65 Peptid im Kontext von HLA-A\*0201. Sortierte CD1c<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> und CD141<sup>+</sup> cDCs aus HLA-A\*0201<sup>+</sup>-Blutpräparaten wurden mit dem T-Zell-Klon im Verhältnis 1:1 bis 1:16 inkubiert. Die gesamte Kokultur erfolgte in Anwesenheit von zellassoziertem pp65-Antigen. Die Aktivierung des T-Zell-Klons wurde durch Bestimmung von IFN-γ im Überstand nach 24 Stunden Kokultur ermittelt. Als Negativkontrolle diente 1 µg/ml irrelevantes MART-1<sub>27-35</sub>-Peptid. Zugabe von 1 µg/ml pp65<sub>495-503</sub> Peptid zur Kokultur diente als Positivkontrolle. **D** Der Versuchsablauf entspricht dem unter C beschriebenen, jedoch wurde die Kokultur für 36 Stunden durchgeführt. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives von drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die Fehlerbalken entsprechen der mittleren Standardabweichung.

## 4 Diskussion

### 4.1 XCR1 wird spezifisch auf kreuzpräsentierenden dendritischen Zellen exprimiert und ist besser zur Einteilung von Subtypen geeignet als klassische Marker

Der Chemokinrezeptor XCR1 wurde 1995 durch Heiber *et al.* kloniert und 1998 durch Yoshida *et al.* als einziger Rezeptor des Chemokins ATAC erkannt. Angaben zur Expression dieses Transmembranproteins waren lange unzureichend. XCR1-Expression wurde unter anderem für T-, B- und NK-Zellen sowie Neutrophile der Maus beschrieben, wobei die veröffentlichten Daten zum großen Teil widersprüchlich waren (Yoshida *et al.*, 1999; Shan *et al.*, 2000; Cairns *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2001 und 2005). Dabei wurde bei einigen auf PCR basierenden Untersuchungen nicht auf Kontamination durch genomische DNA oder andere Zellpopulationen geachtet.

Mit Beginn dieser Arbeit wurde eine quantitative PCR-Analyse mit exonübergreifenden *primern* an cDNA aus Zellpopulationen hoher Reinheit durchgeführt. Es konnte von unserer Arbeitsgruppe erstmals gezeigt werden, dass in muriner Milz XCR1-mRNA fast ausschließlich von CD8<sup>+</sup> dendritische Zellen (DCs) exprimiert wird (Dorner *et al.*, 2009).

Die weiterführende Charakterisierung der XCR1-exprimierenden DCs war Teil dieser Arbeit. Es wurde die Lokalisation XCR1<sup>+</sup> DCs in lymphatischen Organen sowie dem Dünndarm untersucht. Zusätzlich konnte XCR1 auf Proteinebene nachgewiesen und mit anderen DC-spezifischen Markern verglichen werden.

Da kein monoklonaler Antikörper zur Detektion von XCR1 zur Verfügung stand, erfolgte ein histologischer Nachweis in B6.XCR1:LacZ-Reportermäusen. Färbungen von Dünnschnitten der Milz ergaben ein XCR1-Signal in Bereichen der roten Pulpa, der Marginalzone sowie der T-Zell-Zone (Abb. 4 A). Diese Lokalisation deckt sich mit immunhistologischen Nachweisen der Oberflächenmoleküle CD205 und CD207, welche in der Milz als Marker für CD8<sup>+</sup> DCs beschrieben sind (siehe Einleitung, 1.2.1; McLellan *et al.*, 2002; Idoyaga *et al.*, 2009). In diesen Bereichen der Milz tritt Kolokalisation mit T-Zellen auf, was auf einen Zellkontakt zwischen DCs und T-Zellen hindeutet.

Zur genaueren Charakterisierung wurden die klassischen DC-Marker CD4, CD8 und CD11b durchflusszytometrisch mit der Expression von XCR1 verglichen. Dabei konnte eine Korrelation von XCR1 und CD8 festgestellt werden, wobei jedoch nur etwa 75-95 % der CD8<sup>+</sup> DCs XCR1 exprimierten (Abb. 5). XCR1<sup>+</sup> DCs exprimierten kein CD4, während etwa 3-5 % der

CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (DN) DCs den Chemokinrezeptor trugen. Neben den klassischen DC-Markern erfolgte eine Analyse weiterer DC-spezifischer Oberflächenmarker. Durch Kofärbung von CD103 und CD205 konnte festgestellt werden, dass vor allem CD205 eine höhere Korrelation zu XCR1 aufwies als CD8. Zusätzlich wurde die Expression von XCR1 mit der des Chemokinrezeptors CX3CR1 verglichen. Dabei wurde festgestellt, dass innerhalb der CD8<sup>+</sup> DCs nur die CD8<sup>+</sup>XCR1<sup>-</sup>DCs positiv für CX3CR1 waren (Abb. 6). Die Expression von XCR1 und CX3CR1 unterteilt somit die CD8<sup>+</sup> DCs in zwei distinkte Populationen. Durch Genexpressionsanalysen konnten Bar-On *et al.* zeigen, dass CD8<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup> DCs mehr Übereinstimmungen mit plasmazytoiden DCs (pDCs) als mit konventionellen DCs (cDCs) aufweisen. Weiterhin produzieren diese Zellen kein IL-12, was als klassische Funktion von CD8<sup>+</sup> DCs gilt (Reis e Sousa *et al.*, 1997; Bar-On *et al.*, 2011).

Es ist festzustellen, dass die in bisherigen Experimenten CD8<sup>+</sup> DCs zugeschriebenen Antigenpräsentationseigenschaften wahrscheinlich auf den Subtyp CD8<sup>+</sup>XCR1<sup>+</sup> DCs zurückzuführen sind. Die CD8<sup>+</sup>XCR1<sup>-</sup> DCs hatten aufgrund des geringen Anteils an Gesamt-CD8<sup>+</sup> DCs vermutlich keinen Einfluss auf die erhaltenen Ergebnisse. Initiale Experimente unserer Arbeitsgruppe konnten bestätigen, dass XCR1<sup>+</sup> DCs in der Tat die eigentliche Population kreuzpräsentierender DCs repräsentieren (nicht gezeigt).

Für die Verwendung von XCR1 und CX3CR1 als Marker zur Einteilung von cDCs spricht weiterhin, dass es sich in beiden Fällen um Chemokinrezeptoren handelt. Dies lässt eine funktionelle Bedeutung für die Migration der DCs in Anwesenheit der Liganden zu. Für Marker wie CD4 und CD8 konnte bisher keine Funktion auf DCs festgestellt werden. Auch exprimieren DCs des Menschen kein CD8.

In zwei Arbeiten wurde bereits eine Unterteilung der CD8<sup>+</sup> DC-Population vorgeschlagen. Farrand *et al.* definierten eine Population von CD8<sup>+</sup>CD207<sup>+</sup> DCs der Milz, welche deutlich stärker kreuzpräsentierte als CD8<sup>+</sup>CD207<sup>-</sup> oder CD8<sup>-</sup> DCs (Farrand *et al.*, 2009). Untersuchungen zur Expression von CD103 of DCs der Milz zeigten, dass dieser Marker ebenfalls eine CD8<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> gegen eine CD8<sup>+</sup>CD103<sup>-</sup> Population abgrenzt, wobei die erste deutlich besser kreuzpräsentiert (Qiu *et al.*, 2009).

Sowohl CD207 als auch CD103 sind zur Definition von cDC-Subtypen weniger geeignet als XCR1. CD207 ist in der Milz von Mäusen des Stamms C57BL/6 nicht auf der Oberfläche exprimiert, was einen Nachweis erschwert (Cheong *et al.*, 2007; Idoyaga *et al.*, 2009). CD103 ist neben DCs auch auf T-Zellen und Makrophagen exprimiert (Cerf-Bensussan *et al.*, 1987;

Tiisala *et al.*, 1995; Lehmann *et al.*, 2002). Angaben zur CD103-Expression durch CD8<sup>+</sup> DCs variieren. Darüber hinaus ist die CD103-Expression abhängig vom Aktivierungszustand der DCs (siehe Tab. 1 sowie Sathe *et al.*, 2011; Zhan *et al.*, 2011). Die Klassifizierung von cDCs durch die Marker CD4, CD8 und CD11b ist aufgrund der vorliegenden Daten nicht ausreichend. Eine Reihe von Oberflächenmolekülen ist dabei dem Marker CD8 zur funktionellen Einteilung von DCs vorzuziehen. XCR1 ist durch seine selektive Expression besonders für die Markierung kreuzpräsentierender DCs der Milz geeignet. Weiterhin sind korrespondierende cDC-Subtypen in anderen lymphatischen und nicht-lymphatischen Organen durch XCR1-Expression charakterisiert.

#### **4.2 XCR1 definiert einen Subtyp dendritischer Zellen der lymphatischen und peripheren Organe des intestinalen Trakts**

Ein Fokus dieser Arbeit lag in der Analyse intestinaler Organe. Deshalb wurden mesenteriale Lymphknoten (mesLNs) und Peyersche Plaques (PPs) als intestinal-lymphatische Organe histologisch untersucht. In mesLNs konnten XCR1<sup>+</sup> Zellen im Bereich des subkapsulären Sinus und den parakortikalen Bereichen festgestellt werden (Abb. 4 B). Diese Beobachtung deckt sich mit Analysen zur Lokalisation CD207<sup>+</sup> DCs in hautdränierenden LNs (Kissenpennig *et al.*, 2005) sowie mit Färbungen von DCs in dränierenden LNs des Magens (Scheinecker *et al.*, 2002). Dies lässt vermuten, dass XCR1<sup>+</sup> DCs auch in mesLNs mit T-Zellen assoziiert sind.

Zur weiteren Charakterisierung wurden Zellen aus mesLNs isoliert und durchflusszytometrisch auf die Expression von XCR1 hin getestet. XCR1 konnte ausschließlich auf cDCs nachgewiesen werden. In mesLNs konnten im Ruhezustand migratorische und residente cDCs aufgrund der Oberflächenexpression von MHCII unterschieden werden (siehe Einleitung, 1.2.1). Residente DCs konnten in dieser Arbeit durch Färbung der Marker CD11b und CD103 in zwei Populationen unterteilt werden (Abb. 7 A, B). CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>int</sup> DCs exprimierten zu 80-90 % XCR1, während nur wenige Prozent der CD103<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> DCs den Rezeptor trugen. Kofärbungen zeigten, dass die XCR1<sup>+</sup> Zellen auch die Marker CD8 und CD207 exprimierten. Demnach lassen sich die residenten XCR1<sup>+</sup> Zellen des mesLN dem klassischen Subtyp der CD8<sup>+</sup> DCs zuordnen.

Migratorische DCs der mesLNs konnten aufgrund der Marker CD11b und CD103 in drei Subtypen unterteilt werden (Abb. 7 A, B). Dabei exprimierten nahezu alle CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> DCs XCR1 auf der Oberfläche. CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> DCs exprimierten zu maximal 15 % XCR1 und

CD103<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> Zellen waren negativ für den Chemokinrezeptor. Mit MHCII<sup>hoch</sup>CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> DCs konnte somit eine zweite migratorische XCR1<sup>+</sup> Population der mesLNs detektiert werden. Kofärbungen mit CD8 und CD207 zeigten, dass ein Teil dieser Population CD8 exprimiert. Für CD207 konnte eine minimale Expression festgestellt werden, welche sich nur unwesentlich von den XCR1<sup>-</sup> Populationen unterschied (Abb. 7 C).

In histologischen Färbungen von PPs konnte eine Lokalisation XCR1<sup>+</sup> Zellen im Bereich der interfollikulären Region sowie angrenzend an das follikelassoziierte Epithel festgestellt werden. In diesen T-Zell-reichen Regionen ist vor allem eine als CD8<sup>+</sup> charakterisierte DC-Population lokalisiert (Iwasaki *et al.*, 2000; Fleeton *et al.*, 2004). Für diese DCs wurde ein Modell vorgeschlagen, wonach sie Antigen von den zum Lumen hin gerichteten *microfold*-Zellen (M-Zellen) übernehmen und dieses in Bereichen der T-Zell-Zone der PPs den T-Zellen präsentieren (Neutra *et al.*, 1996). Eine andere Population CD8<sup>-</sup> DCs ist im Bereich des subepithelialen Doms lokalisiert und exprimiert kein XCR1 (Iwasaki *et al.*, 2000). Durchflusszytometrisch konnte gezeigt werden, dass XCR1<sup>+</sup> DCs der PPs den Marker CD8 exprimieren und eine Korrelation mit CD103 besteht (Abb. 8).

Neben den lymphatischen Organen wurde der Dünndarm als peripheres Organ histologisch untersucht. XCR1<sup>+</sup> Zellen konnten im gesamten Bereich der Mucosa von Ileum, Jejunums und Duodenums festgestellt werden (Abb. 4 C-D). Die Expression ist insbesondere im Bereich der Lieberkühnschen Krypten sowie der Lamina Propria der Villi feststellbar. XCR1<sup>+</sup> Zellen entsprechen in ihrer Lokalisation CD103<sup>+</sup> DCs, welche in Bereichen der Lamina Propria weiter vom Darmepithel entfernt vorliegen. CX3CR1<sup>+</sup> antigenpräsentierende Zellen (APCs) grenzen hingegen direkt an das Darmepithel (Niess *et al.*, 2005; Schulz *et al.*, 2009). Für eine genauere Zuordnung wären histologische Färbungen mit anderen Marken wie CD11b, CD103 und CX3CR1 notwendig.

Durch diese Untersuchung konnte die Expression von XCR1 erstmalig außerhalb lymphatischer Organe beschrieben werden. Zur genaueren Charakterisierung dieser XCR1<sup>+</sup> Zellen wurden mononukleäre Zellen aus der Lamina propria isoliert und durchflusszytometrisch untersucht. In der Literatur sind zwei alternative Strategien zur Einteilungen von CD11c<sup>+</sup> APCs des Dünndarms beschrieben: Eine Aufteilung von Subtypen basiert auf den Markern CD11b und CD103 (Bimczok *et al.*, 2005). Eine zweite Einteilung ist durch die Marker CD103 und CX3CR1 möglich (Birnborg *et al.*, 2008; Bogunovic *et al.* 2009). In dieser Arbeit wurden beide Strategien verwendet und die XCR1-Expression der Subtypen bestimmt.

Es konnte festgestellt werden, dass CX3CR1<sup>+</sup> APCs generell kein XCR1-exprimieren (Abb. 9 A). Etwa die Hälfte der CD103<sup>+</sup> Zellen exprimiert hingegen XCR1. Durch Verwendung der Marker CD11b und CD103 konnte gezeigt werden, dass der CD11b<sup>-</sup> Anteil der CD103<sup>+</sup> APCs homogen XCR1 exprimiert (Abb. 9 B). Durch diese Untersuchung konnte die XCR1-Expression demnach spezifisch mit einer APC-Population des Dünndarms assoziiert werden, welche CD103-exprimiert und negativ für die Marker CD11b und CX3CR1 ist.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass XCR1 in lymphatischen Organen des Intestinaltrakts eine Zellpopulation markiert, welche aufgrund ihrer Kolo-kalisation mit T-Zellen und der Expression von CD8 und CD207 dem Subtyp kreuzpräsentierender CD8<sup>+</sup> DCs zugeordnet werden kann. Eine weitere XCR1<sup>+</sup> DC-Population konnte in den mesLNs und im Bereich des Dünndarms detektiert werden, was den ersten Nachweis von XCR1 in einem peripheren Organ darstellt. In den mesLNs ist diese DC-Population durch ein hohes Expressionsniveau von MHCII gekennzeichnet, was darauf hindeutet, dass diese Zellen aus dem Darm eingewandert sind.

#### **4.3 Migrationseigenschaften von XCR1-positiven dendritischen Zellen nach einem inflammatorischen Impuls**

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass XCR1-Expression in den mesLNs auf CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> DCs erfolgt. Ein Teil dieser DCs exprimiert dabei CD8 und CD207 und hat eine mittlere Expression von MHCII auf der Oberfläche. Dies deutet darauf hin, dass diese Zellen resident in mesLNs vorliegen. Der andere Teil der XCR1<sup>+</sup> DCs exprimiert kein CD207 und trägt deutlich mehr MHCII-Moleküle auf der Oberfläche. Es ist denkbar, dass es sich bei diesen DCs um Zellen handelt, welche aus dem Darm nach Antigenaufnahme in die mesLNs eingewandert sind. Dafür spricht, dass eine Population mit vergleichbarem Besatz an Oberflächenmarkern in Präparationen der Lamina Propria nachgewiesen wurde. Schulz *et al.* konnten durch Analyse der Lymphflüssigkeit zeigen, dass CD103<sup>+</sup> DCs des Darms in einem CCR7-abhängigen Prozess in die mesLNs einwandern und dort oral aufgenommenes Antigen präsentieren (Schulz *et al.*, 2009). Für CX3CR1<sup>+</sup> APCs konnte gezeigt werden, dass diese resident im Darm verbleiben. Fraglich ist, ob alle CD103<sup>+</sup> Zellen des Darms migratorische Eigenschaften besitzen oder ob dies nur für einen Teil zutrifft. In der Arbeit von Bogunovic *et al.* wurden die CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> DCs mit CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> DCs aus Präparationen des Darms verglichen. CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> DCs, welche in der vorliegenden Arbeit als XCR1<sup>+</sup> identifiziert wurden, sind Bogunovic *et al.* zu Folge residenter Bestandteil sekundär lymphatischer Organe wie den PPs, welche als Verunreinigung in

Präparationen der Lamina Propria enthalten sind (Bogunovic *et al.*, 2009). Deshalb wurde vorgeschlagen, dass ausschließlich die  $CD103^+CD11b^+$  DCs vom Darm in die mesLN einwandern. Als Hinweis für den lymphatischen Charakter der  $CD103^+CD11b^-XCR1^+$  DCs wird aufgeführt, dass im Vergleich zu  $CD103^+CD11b^+$  DCs eine höhere Expression von CD8 vorliegt und eine Batf3-abhängige Entwicklung erfolgt (Bogunovic *et al.* 2009; Schulz *et al.*, 2009; Edelson *et al.*, 2010). Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse widersprechen dieser Annahme, da die Lokalisation  $XCR1^+$  Zellen nicht auf lymphatische Organe beschränkt ist, sondern eindeutig im gesamten Bereich des Dünndarms nachweisbar ist.

Um zu klären, ob  $XCR1^+$  Zellen migratorische Eigenschaften besitzen, wurden APCs des Dünndarms sowie der mesLNs unter Einfluss eines inflammatorischen Stimulus analysiert. Turnbull *et al.* konnten in einem Rattenmodell zeigen, dass Injektion des Adjuvans LPS verstärkte Migration von DCs des Darms in die mesLNs auslöst (Turnbull *et al.*, 2005). Der Prozess ist dabei abhängig vom Chemokinrezeptor CCR7, dessen Expression auf DCs durch das Adjuvans induziert wird. CCR7 bewirkt eine Migration in die mesLNs, in welchen eine konstitutive Expression der Liganden CCL19 und CCL21 erfolgt (Jang *et al.*, 2006). Um festzustellen, ob sich die in dieser Arbeit beschriebenen DC-Subtypen in ihrer CCR7-Expression unterscheiden, wurde LPS i.p. injiziert und die Zellen aus mesLNs und Dünndarm nach 12 Stunden isoliert. Parallel wurde einer Kontrollgruppe PBS injiziert. APCs des Darms exprimierten im Ruhezustand kein CCR7 (Abb. 12 A). Nach LPS-Injektion exprimierten etwa zwei Drittel der  $XCR1^+$  DCs hohe Mengen an CCR7 auf der Oberfläche, während bei  $XCR1^-$  Zellen nur ein leichter Anstieg der CCR7-Expression feststellbar war (Abb. 12 B). Weiterhin konnten nach LPS-Gabe deutlich weniger APCs aus dem Dünndarm einer Maus isoliert werden. Das Verhältnis  $XCR1^+$  Zellen zu  $XCR1^-$  Zellen verkleinerte sich jedoch nicht signifikant.

Im Gegensatz zur verringerten Zahl der APCs im Darm führte LPS zu einer deutlich erhöhten Menge an DCs in den mesLNs. Auch hier war die Zahl  $XCR1^+$  DCs und  $XCR1^-$  DCs erhöht.  $XCR1^+$  DCs des mesLN exprimierten bereits im Ruhezustand mehr CCR7 als  $XCR1^-$  Zellen (Abb. 11 A). Dabei konnte festgestellt werden, dass auch residente DCs CCR7 exprimieren. Nach inflammatorischem Stimulus exprimierten alle DCs des mesLN MHCII auf hohem Niveau, was mit einer allgemeinen Aktivierung und vermehrter Antigenpräsentation der Zellen erklärt werden kann (Sallusto *et al.*, 1998; Reis e Sousa, 2004). Auch das Expressionsniveau von CCR7 steigerte

sich bei allen DCs der mesLNs, wobei XCR1<sup>+</sup> DCs weiterhin deutlich mehr CCR7 auf der Oberfläche trugen (Abb. 11 B).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass LPS eine erhöhte Migration von DCs aus dem Darm in die mesLNs bewirkt. Dabei exprimieren XCR1<sup>+</sup> DCs besonders hohe Mengen des migrationsassoziierten Rezeptors CCR7. Letztlich konnte nicht abschließend geklärt werden, welchen Anteil XCR1<sup>+</sup> DCs an migratorischen DCs des Darms im Ruhezustand und nach Inflammation haben. Zur Klärung dieser Fragestellung wäre eine Analyse der in der Lymphflüssigkeit enthaltenen DC-Populationen sinnvoll. Dabei sollte neben CD103 auch die Expression der Marker XCR1 und CD11b untersucht werden. Weiterhin könnte ein Mausmodell mit spezifisch depletierten XCR1<sup>+</sup> DCs Aufschluss über die Funktion dieser Zellen im intestinalen System geben (siehe 4.4).

#### **4.4 Ein Mausmodell zur spezifischen Depletion kreuzpräsentierender dendritischer Zellen**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass XCR1 selektiv auf kreuzpräsentierenden CD8<sup>+</sup> DCs der Maus exprimiert wird. In grundlegenden Experimenten wurde der Prozess der Kreuzpräsentation mit löslichem und zellassoziertem Antigen demonstriert (den Haan *et al.*, 2000; Pooley *et al.*, 2001). Insbesondere von Interesse ist jedoch die Frage, welche Funktion die Kreuzpräsentation im Fall viraler oder bakterieller Infektionen erfüllt (Flinsenberg *et al.*, 2011). Um diese Fragestellung *in vivo* zu untersuchen, werden Tiermodelle benötigt, in welchen die Population kreuzpräsentierender Zellen gezielt depletiert ist.

In bisherigen Arbeiten gelang die Depletion der gesamten konventionellen DCs (cDCs) durch toxinvermittelte Abtötung von CD11c<sup>+</sup> Zellen. Dieses Modell ist für die Untersuchung der Kreuzpräsentation ungeeignet, da auch nicht-kreuzpräsentierende DCs sowie eine Reihe weiterer CD11c<sup>+</sup> Zellen wie Makrophagen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen beeinträchtigt werden (Jung *et al.*, 2002; Probst *et al.*, 2005).

In Mausmodellen, in welchen bestimmte Transkriptionsfaktoren ausgeschaltet wurden, konnte das Fehlen von DC-Subtypen beobachtet werden. In *Irf8*, *Batf3* und *Nfil3 knock out*-Mauslinien sind keine CD8<sup>+</sup> DCs vorhanden (Aliberti *et al.*, 2003; Zenke und Hieronymus, 2006; Hildner *et al.*, 2008; Edelson *et al.*, 2010; Kashiwada *et al.*, 2011). Die beschriebenen Transkriptionsfaktoren werden jedoch in einer Vielzahl von Zelltypen exprimiert, was neben der Abwesenheit von DCs Auswirkungen auf ihren Phänotyp hat. *Irf8*-defizienten Mäusen fehlen neben CD8<sup>+</sup> DCs auch pDCs und ein Teil der CD8<sup>-</sup> DCs reagiert verändert auf mikrobielle

Stimulation (Aliberti *et al.*, 2003). Die Mäuse können allgemein als immunsupprimiert bezeichnet werden, was nicht mit dem alleinigen Fehlen von cDCs (z.B. wie in CD11c-Depletionmodellen) erklärt werden kann (Murphy, Konferenzbeitrag Lugano, 2010). Batf3 und Nfil3 sind Bestandteil des gleichen Signalwegs und sind neben Regulation der CD8<sup>+</sup> DC-Entwicklung mitverantwortlich für die Repression des Transkriptionsfaktors AP-1. Der AP-1 Signalweg ist wiederum an der Regulation der Genexpression einer Reihe von Zytokinen und Wachstumsfaktoren beteiligt (Iacobelli *et al.*, 2000; Schraml *et al.*, 2009). Dazu gehören unter anderem IL-2 und apoptoserelevante Faktoren (Brandt *et al.*, 2010). In Nfil3-defizienten Mäusen sind weiterhin keine NK-Zellen vorhanden (Kashiwada *et al.*, 2011). Eine alleinige Untersuchung des kreuzpräsentierenden DC-Subtyps ist demnach in diesen Mausmodellen nicht möglich.

In der Literatur wurden in der Vergangenheit einige CD8<sup>+</sup> DC-spezifische Marker diskutiert und Depletionsmodelle vorgeschlagen. Bisher wurden jedoch ausschließlich Marker identifiziert, welche neben CD8<sup>+</sup> DCs auch auf weiteren nicht-cDC-Populationen exprimiert sind. Der Oberflächenrezeptor Clec9a wird zusätzlich auf pDCs und einem B-Zell-Subtyp exprimiert (Caminshi *et al.*, 2008; Hysamen *et al.*, 2008; Sancho *et al.*, 2008). CD205-Expression ist abseits der Milz auf den meisten cDC-Subtypen sowie auf B-, T- und Epithelzellen feststellbar (Inaba *et al.*, 1995; Witmer-Pack *et al.*, 1995; Vremec und Shortman, 1997). CD103 ist neben CD8<sup>+</sup> DCs auch auf T-Zellen und Makrophagen exprimiert und unterliegt vermutlich einer zytokinabhängigen Regulation (Russell *et al.*, 1994; Tiisala *et al.*, 1994; Sathe *et al.*, 2011; Zhan *et al.*, 2011). Diese Marker sind demnach nicht zur spezifischen Depletion kreuzpräsentierender DCs ohne Beeinflussung anderer Zelltypen geeignet.

XCR1 ist der einzige bekannte Marker, welcher ausschließlich auf kreuzpräsentierenden CD8<sup>+</sup> DCs exprimiert wird. Ein Depletionsmodell, basierend auf XCR1-abhängiger Toxinexpression, ist aus diesen Gründen sehr attraktiv.

#### **4.5 Der Versuch der Herstellung einer XCR1-spezifischen Diphtherietoxin *knock in*-Maus**

Ziel war die Herstellung einer Mauslinie mit spezifisch depletierten kreuzpräsentierenden DCs. Dazu wurde die Methode des *knock in* verwendet, um die Diphtherietoxin Untereinheit A (DTA) unter der Kontrolle des XCR1-Promotors zu exprimieren. Die bisherigen Untersuchungen zur XCR1-Expression beschränkten sich auf adulte Mäuse. Es ist nicht ausgeschlossen, dass während der Embryonalentwicklung eine Expression in nicht-DCs erfolgt. Würden für die Entwicklung

relevante Zellen depletiert, wäre der Erhalt einer XCR1-DC-defizienten Mauslinie nicht möglich. Aus diesem Grund wurde ein genetisch binäres System verwendet, bei welchem die Expression des Toxins erst nach Entfernung einer Stoppkassette erfolgen sollte (Einleitung, 1.6). Für den Fall, dass Exzision der Stoppkassette zu embryonaler Lethalität oder Infertilität führt, könnte durch alternative Verpaarung ein späteres Entfernen der Stoppkassette erfolgen. Dadurch wäre der Nutzen der Mauslinie weiterhin gegeben.

Zur Herstellung der Mauslinie konnte ein für den *knock in* notwendiger *targeting*-Vektor konstruiert werden. Nach etablierter Stammzellkultur konnte dieser Vektor zum *targeting* von Stammzellen eingesetzt werden. Die folgende Selektion führte zum Erhalt eines rekombinierten Stammzellklons. Nach umfangreicher Genotypisierung des Klons konnte dieser in Embryos injiziert werden, was zum Erhalt chimärer Mäuse führte. Einige der putativ chimären Nachkommen waren Totgeburten, weitere Tiere zeichneten sich durch vermindertes Wachstum aus und verstarben innerhalb von 3 Wochen nach der Geburt. Verpaarung der überlebenden chimären Nachkommen führte in keinem Fall zur Keimbahntransmission. Dies ist wahrscheinlich auf einen niedrigen Grad an Chimärismus mit wildtypischen Keimzellen zurückzuführen. Der Grund für das Versterben eines Teils der chimären Tiere ist unklar. Folgende Feststellungen können jedoch gemacht werden: Die verwendete Stammzelllinie kann prinzipiell zur Keimbahntransmission führen, was in anderen parallel durchgeführten *knock in*-Projekten gezeigt wurde (Korrespondenz, Dr. Marc Schmidt-Supprian). Die alleinige Veränderung des XCR1-Lokus ist wahrscheinlich nicht der Auslöser der Lethalität sowie ausbleibender Keimbahntransmission, da der Locus bereits einmal erfolgreich durch ein *knock in* verändert wurde (B6.XCR1:LacZ-Mauslinie, *Deltagen*, San Mateo, USA). Aus diesen Gründen muss vermutet werden, dass es zu einer Expression von DTA trotz enthaltener Stoppkassette gekommen ist. Mäuse mit hohem Grad an Chimärismus waren demnach von der Toxinwirkung besonders betroffen. Es ist davon auszugehen, dass das Toxin unspezifisch oder neben DCs in weiteren entwicklungsrelevanten Zellen exprimiert wurde. Ein Hinweis dafür ist, dass die alleinige Depletion von Gesamt-DCs durch CD11c-abhängige DTA-Expression zu lebensfähigen Tieren führt (Birnberg *et al.*, 2008; Ohnmacht *et al.*, 2009).

Deshalb wurde angenommen, dass die auftretenden Probleme auf eine unzureichende Stoppkassette zurückzuführen sind. In einem vergleichbaren Mausmodell wurde die Expression von DTA im ubiquitär aktiven ROSA26-Lokus ebenfalls durch eine Stoppkassette verhindert (Brockschneider *et al.*, 2004). In diesem System traten bei homozygoten Tieren degenerative

Erscheinungen auf, die mit der Durchlässigkeit der Stoppkassette erklärt wurden. Durch Einsatz einer verbesserten Stoppkassette konnte ein Mausmodell ohne degenerative Effekte generiert werden (Brockschnieder *et al.*, 2006).

Die Verbesserung der Stoppkassette wurde im Folgenden als sinnvolles Mittel zur Vermeidung der bisher auftretenden Lethalität angesehen. Es wurden die unter 3.2.4 beschriebenen Veränderungen eingeführt.

Die Herstellung der Mauslinie mit verändertem *targeting*-Vektor (durchgeführt durch die Firma TaconicArtemis, Köln) verlief planmäßig bis zur Generierung chimärer Mäuse. Anders als im Fall der ersten *knock in*-Strategie traten bei den durchgeführten Injektionen deutlich weniger Totgeburten auf. Die als positiv für den veränderten Locus genotypisierten Nachkommen zeigten keinerlei Anzeichen von Degeneration. Dennoch konnte nach Verpaarung mit C57BL/6-Tieren in keinem Fall eine Keimbahntransmission festgestellt werden. Verpaarung mit Flp-*deleter* Mäusen (ubiquitäre Flippaseexpression) zur Entfernung der Puromycinresistenzkassette oder Cre-*deleter* Mäusen zur Entfernung der Stoppkassette war ebenfalls erfolglos.

An diesem Punkt konnte keine plausible Erklärung für das erneute Misslingen der Strategie gefunden werden. Aus diesem Grund wurde die Herstellung von *knock in*-Mäusen verworfen und alternativ mit der Herstellung BAC-transgener Mauslinien begonnen.

#### **4.6 BAC-transgene Mauslinien als Alternative zur *knock in*-Strategie**

In der neuen Strategie soll die Rekombinase Cre unter der Kontrolle der regulatorischen Elemente von XCR1 erfolgen. Die Methode wurde zuvor nicht angewandt, da kein geeigneter muriner BAC-Klon zur Verfügung stand (Abb. 2). Stattdessen wurde die Verwendung eines humanen BAC-Klons beschlossen. Ob die humane Promotorregion von XCR1 in der Maus eine vergleichbar selektive Expression bewirkt, ist nicht sicher. Als positives Indiz kann jedoch gewertet werden, dass die Aminosäuresequenzen von XCR1 in Maus und Mensch eine Homologie von >70 % aufweist (NCBI BLAST). Humaner und muriner XCR1-Lokus sind weiterhin jeweils von verwandten Genen wie FYCO1 und CXCR6 umgeben (Abb. 2). Die Funktion humaner regulatorischer Sequenzen in der Maus konnte bereits in anderen BAC-transgenen Mauslinien bewiesen werden. Ein humaner BAC-Klon mit regulatorischen Sequenzen von CD207 wurde beispielsweise erfolgreich zur Expression von DTA in Langerhanszellen genutzt (Kaplan *et al.* 2005). Um die direkte Expression eines Toxins und das damit verbundene Risiko einer unzureichenden Stoppkassette zu umgehen, sollte stattdessen die Rekombinase Cre

unter Kontrolle des XCR1-Promotors exprimiert werden. Diese XCR1:Cre-Mäuse sollen im Folgenden mit Mauslinien verpaart werden, welche nach Cre-Rekombination zelltypspezifisch DTA exprimieren, was eine spezifische Depletion bewirkt (Brockschnieder *et al.*, 2006). Möglicherweise ist die Depletionseffizienz dabei niedriger als in den zuvor geplanten *knock in*-Mäusen, da die Aktivität der Rekombinase Cre von der Stärke des Promotors abhängig ist (Schmidt-Supprian und Rajewsky 2007).

Die Herstellung der BAC-transgenen Linie verläuft bisher erfolgreich. Aus den injizierten Pronulei konnten sieben hemizygoten *founder*-Tiere erhalten werden. In den nächsten Verpaarungsschritten muss durch Genotypisierung festgestellt werden, ob das Transgen stabil im Genom inseriert ist und welche Kopienzahl vorliegt.

#### **4.7 Anwendungsmöglichkeiten XCR1<sup>+</sup> DC-defizienter Mäuse**

Neben der Präsentation von systemisch appliziertem Antigen ist vor allem interessant, ob es im Fall von viralen oder bakteriellen Infektionen zur Antigen-Kreuzpräsentation kommt und durch welchen Zelltyp diese vermittelt wird. Untersuchungen hierzu wurden bereits mit zytolytischen Viren wie HSV Typ 1, Influenza und Vaccinia Virus sowie dem nicht-zytolytischen Lymphozytäre Choriomeningitis Virus (LCMV) durchgeführt (Belz *et al.*, 2005). Dabei konnte CD8<sup>+</sup> DCs eine dominante Rolle bei der MHCII-vermittelten Induktion zytotoxischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen zugeordnet werden (Smith *et al.*, 2003; Belz *et al.*, 2004b und 2005). Für Infektionen mit intrazellulären *Listeria monocytogenes* konnten ebenfalls CD8<sup>+</sup> DCs als Zelltyp der Aktivierung spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen identifiziert werden, wobei dieser DC-Subtyp auch als erster infiziert wird (Belz *et al.* 2005; Neuenhahn *et al.*, 2006). Diese Untersuchungen erfolgten jedoch ausschließlich mit *ex vivo* Analysen. Um *in vivo* die Funktion kreuzpräsentierender Zellen zu untersuchen, ist das in dieser Arbeit konzipierte Depletionssystem hilfreich. Infektionen XCR1-DC-depletierter Mäuse im Vergleich zu wildtypischen Tieren können den Einfluss dieser Zellen auf die Abwehr der Erreger aufzeigen. Bei intrazellulären Infektionen kann untersucht werden, ob die Infektion nur in Anwesenheit kreuzpräsentierender Zellen unterdrückt werden kann. Weiterhin kann festgestellt werden, ob andere Zellpopulationen die Aufgaben der depletierten DCs übernehmen.

In den unter 4.4 beschriebenen Batf3-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Abwehr von Infektionen mit West Nil Virus (WNV) sowie murinem Cytomegalie Virus (MCMV) deutlich schwächer erfolgt, als in wildtypischen Tieren (Hildner *et al.*, 2008;

Torti *et al.*, 2011). Allerdings müssen bei diesen Daten die unter 4.4 beschriebenen DC-unabhängigen Einflüsse der Batf3-Defizienz berücksichtigt werden.

Neben der Analyse der Induktion adaptiver Immunantworten kann in entsprechenden Modellen auch die Funktion XCR1<sup>+</sup> DCs bei der Induktion angeborener Immunantworten untersucht werden. Da neben CD8<sup>+</sup> T-Zellen auch NK-Zellen nach Aktivierung den XCR1-Liganden ATAC sezernieren, ist eine Interaktion beider Zelltypen denkbar. In MCMV-Infektionen wurde beispielsweise die Interaktion von DCs und NK-Zellen analysiert (Andrews *et al.*, 2003).

Die universelle Verwendbarkeit einer B6.XCR1:Cre-Mauslinie könnte weiterhin zur Studie von *in vivo*-Interaktionen genutzt werden. Durch Verpaarung mit einer Reportermauslinie könnten XCR1<sup>+</sup> Zellen in ihrer Interaktion mit fluoreszenzmarkierten T- und NK-Zellen durch *in vivo*-Mikroskopie untersucht werden (Kastenmüller *et al.*, 2010).

#### **4.8 Selektive Expression des Chemokinrezeptors XCR1 auf humanen CD141-positiven dendritischen Zellen**

Der Befund der spezifischen XCR1-Expression in der Maus ließ die Vermutung zu, dass im Menschen eine ähnlich selektive Expression vorliegen könnte. Besonders die Tatsache, dass humane DC-Subtypen zwar beschrieben, jedoch kaum in ihrer Antigenpräsentationsfähigkeit untersucht wurden, machte die Analyse interessant (siehe Einleitung, 1.3.2). Zur initialen Charakterisierung wurden lymphatische Zellpopulationen aus peripherem Blut zu hoher Reinheit sortiert. cDCs wurden aufgrund der Oberflächenmarker CD1c, CD16 und CD141 in Subtypen unterteilt. Durch quantitative PCR-Analyse konnten CD141<sup>+</sup> DCs als die einzige XCR1-exprimierende Population identifiziert werden. Der Befund der PCR-Daten wurde bestätigt, indem XCR1-Protein durchflusszytometrisch auf der Oberfläche von CD141<sup>+</sup> DCs nachgewiesen wurde. Dabei exprimieren etwa 60-80 % der CD141<sup>+</sup> DCs XCR1. In initialen Analysen konnte XCR1 auf DCs aus Tonsillen und Thymus nachgewiesen werden. Ein Versuch, XCR1<sup>+</sup> DCs histologisch in Tonsillen durch Anfärbung von CD141 nachzuweisen, scheiterte an der hohen Zahl CD141<sup>+</sup> Endothelzellen (Maruno *et al.*, 1994; Adams und Huntington, 2006).

Die Einteilung von cDCs anhand der Marker CD1c, CD16 und CD141 ist im Blut und in der Milz des Menschen möglich (Galibert *et al.*, 2005; Caminschi *et al.*, 2008). In anderen lymphatischen Organen werden diese Marker zum Teil jedoch überschneidend exprimiert, weshalb andere Marker zur Charakterisierung vorgeschlagen wurden (Summers *et al.*, 2001; Vandenabeele *et al.*, 2001; eigene Untersuchungen). XCR1 könnte aus diesem Grund durch seine

spezifischere Expression besser zur Definition humaner DC-Subtypen geeignet sein als beispielsweise CD141. CD141 bindet an Thrombin und ist neben DCs vor allem auf Endothelzellen exprimiert, wo es eine wichtige Rolle bei der Antikoagulation spielt (Adams und Huntington, 2006). Eine Funktion auf DCs ist bislang nicht bekannt. Weiterhin kann die CD141-Expression durch *in vitro*-Kultur mit IL-3 auch auf CD11c<sup>-</sup> Zellen induziert werden (Dzionek *et al.*, 2000). Der Korezeptor CD8, welcher bisher zur Charakterisierung von DCs der Maus Verwendung findet, wird nicht auf DCs des Menschen exprimiert (Dzionek *et al.*, 2000). Eine Funktion von CD8 auf murinen DCs ist ebenfalls nicht bekannt (Shortman und Heath, 2010).

Damit wurde gezeigt, dass XCR1 nicht nur in der Maus, sondern auch beim Menschen als spezifischer Marker eines DC-Subtyps dient und selektiv auf einer Subpopulation von CD141<sup>+</sup> DCs exprimiert ist.

Neben der Expression von XCR1 konnte in weiteren Untersuchungen gezeigt werden, dass XCR1 als funktioneller Chemokinrezeptor wirkt. Humanes ATAC als Ligand von XCR1 bewirkt einen Kalziuminflux in CD141<sup>+</sup> DCs, was eine intrazelluläre Signalweiterleitung nach Ligandenbindung belegt. In einem *Transwell*-System induziert ATAC selektiv die Migration von CD141<sup>+</sup> DCs, während alle anderen DC-Subtypen und Lymphozyten keine Chemotaxis zeigten (Bachem *et al.*, 2010).

#### **4.9 CD141-positive dendritische Zellen sind die kreuzpräsentierenden Zellen des humanen Blutes**

In der Maus wurde gezeigt, dass CD8<sup>+</sup>XCR1<sup>+</sup> DCs effizienter als die anderen Subtypen der Milz Antigen kreuzpräsentieren. Humane DCs wurden in ihrer Eigenschaft zur Kreuzpräsentation bisher nur unzureichend untersucht. Insbesondere die Population der CD141<sup>+</sup> DCs, welche nur 3-4 % der cDCs ausmacht, konnte bisher nicht aufgereinigt und in ihrer Funktion mit den anderen Populationen verglichen werden (Piccioli *et al.*, 2007). In dieser Arbeit gelang die Isolierung aller humaner DC-Subtypen durch Etablierung einer aufwendigen Anreicherungs- und Sortierungsstrategie (Abb. 18). Die besondere Herausforderung lag dabei in dem Anspruch, die Sortierung der CD1c<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup> und CD141<sup>+</sup> cDCs sowie pDCs aus derselben Blutspende durchzuführen. Dadurch konnten spenderabhängige Variationen ausgeschlossen werden.

Durch Kokultur dieser Subtypen mit einem antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Klon konnte erstmals gezeigt werden, dass CD141<sup>+</sup> DCs die anderen DC-Typen in ihrer Kapazität zur

Kreuzpräsentation übertreffen (Abb. 22). Dies konnte sowohl mit löslichem, wie auch mit zellassoziertem Antigen gezeigt werden. Durch Analyse der Kokulturüberstände zu verschiedenen Zeitpunkten wurde deutlich, dass CD141<sup>+</sup> DCs in ihrer Kreuzpräsentationskapazität nicht zu einem späteren Zeitpunkt durch andere DC-Subtypen übertroffen werden. Die Viabilität der einzelnen DC-Subtypen nach erfolgter Kokultur war jeweils vergleichbar. Dadurch kann ausgeschlossen werden, dass die erhobenen Daten allein auf das längere Überleben und damit eine verbundene längere Antigen-Kreuzpräsentation einer DC-Population zurückzuführen sind. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass CD141<sup>+</sup> DCs das funktionelle Äquivalent zu kreuzpräsentierenden CD8<sup>+</sup>XCR1<sup>+</sup> DCs der Maus darstellen.

In anderen Arbeiten wurde jeweils nicht das Vorhandensein von CD141 in den experimentellen Ansätzen berücksichtigt (Schurr *et al.*, 2005; Hoeffel *et al.*, 2007; Di Pucchio *et al.*, 2008). Auch unterscheidet sich Art und Dauer der jeweiligen Experimente: Di Pucchio *et al.* konnten vergleichbare Kreuzpräsentation von pDCs und CD1c<sup>+</sup> DCs nach sechstägiger Kokultur mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachweisen (Di Pucchio *et al.*, 2008). In der vorliegenden Arbeit wurden deutlich kürzere Zeiträume der Kokultur verwendet, in welchen die Viabilität jeder DC-Population sichergestellt war. In Experimenten von Schnurr *et al.* wurden isolierte CD1c<sup>+</sup> DCs mit Granulozyten-/Makrophagen-Kolonie stimulierenden Faktor (GM-CSF) und pDCs mit IL-3 vor Analyse der Kreuzpräsentation präinkubiert (Schnurr *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde bewusst auf zusätzliche Agenzien verzichtet. Kürzlich konnte beispielsweise gezeigt werden, dass GM-CSF in murinen *in vitro* Kulturen Kreuzpräsentation induzieren kann (Sathe *et al.*, 2011).

Zeitgleich mit der Veröffentlichung dieser Daten konnten Jongbloed *et al.* ebenfalls die vorrangige Kreuzpräsentation von CD141<sup>+</sup> DCs darstellen (Jongbloed *et al.*, 2010). Unterschiede in der Kreuzpräsentation von löslichem Antigen zwischen den cDC-Subtypen konnte in diesem Fall jedoch nur in Gegenwart von Adjuvans (*Poly I:C*) festgestellt werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass CD141<sup>+</sup> DCs vergleichbar mit murinen CD8<sup>+</sup> DCs andere DC-Subtypen in der Aufnahme toter Zellen übertreffen. Eine zweite Gruppe veröffentlichte zeitgleich Daten, welche ebenfalls die Expression von XCR1 auf CD141<sup>+</sup> DCs des Menschen belegen (Crozat *et al.*, 2010). Diese Untersuchungen sind konsistent mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit, in der CD141<sup>+</sup>XCR1<sup>+</sup> DCs des Menschen als funktionelles Homolog zu CD8<sup>+</sup>XCR1<sup>+</sup> DCs der Maus identifiziert wurden.

## 5.1 Zusammenfassung

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Beobachtung einer selektiven Expression des Chemokinrezeptors XCR1 auf CD8<sup>+</sup> dendritischen Zellen (DCs) der murinen Milz. CD8<sup>+</sup> DCs sind auf die Kreuzpräsentation von extrazellulärem Antigen spezialisiert, was für die Induktion einer zytotoxischen T-Zell-Antwort, insbesondere gegen virale Infektionen und Tumorzellen, von essenzieller Bedeutung ist. Während bekannt war, dass der XCR1-Ligand ATAC Chemotaxis dieses DC-Subtyps induziert, waren die Verteilung und Funktion der XCR1<sup>+</sup> DCs außerhalb der Milz ungeklärt.

Daher wurde zuerst die Lokalisation XCR1<sup>+</sup> DCs mittels einer LacZ-Reportermaus untersucht, wobei ein Fokus auf den intestinalen Trakt gelegt wurde. Es konnte festgestellt werden, dass XCR1<sup>+</sup> DCs in den untersuchten lymphatischen Organen mit T-Zellen kolokalisieren und auch im Gewebe des Dünndarms ubiquitär auftreten. Phänotypisch sind XCR1<sup>+</sup> DCs durch Koexpression von Oberflächenproteinen gekennzeichnet, welche in der Literatur als Marker kreuzpräsentierender DCs beschrieben sind (CD8, CD103, CD205 und CD207). Für die Organe des Darms konnte weiterhin gezeigt werden, dass nach einem inflammatorischen Stimulus vor allem XCR1<sup>+</sup> DCs einen migratorischen Charakter annehmen. Diesen Erkenntnissen zufolge definiert XCR1 einen DC-Subtyp, welcher in lymphatischen Organen und in der Peripherie eine phänotypische und funktionelle Einheit bildet. Es ist davon auszugehen, dass die Gesamtheit der XCR1<sup>+</sup> DCs, vergleichbar den CD8<sup>+</sup>XCR1<sup>+</sup> DCs der Milz, insbesondere zur Antigenkreuzpräsentation und zur Aktivierung zytotoxischer T-Zellen befähigt ist. XCR1-negative DCs zeichneten sich durch Expression des Chemokinrezeptors CX3CR1 sowie des Integrins CD11b aus. XCR1 und CX3CR1 definieren somit funktionell distinkte, sich nicht überlappende DC-Population.

Um die Funktion der XCR1<sup>+</sup> DCs *in vivo* zu untersuchen, sollte ein Mausmodell generiert werden, in welchem dieser DC-Subtyp spezifisch depletiert ist. Dieses Modell sollte die Rolle von XCR1<sup>+</sup> DCs im Ruhezustand sowie in Infektionsstudien aufzeigen. Durch die Technik des *knock in* konnte keine gewünschte Mauslinie erhalten werden, sodass alternativ mit der Herstellung einer BAC-transgenen Mauslinie mit vergleichbarer Funktion begonnen wurde.

Im menschlichen Immunsystem gelang es, XCR1<sup>+</sup> DCs im peripheren Blut zu identifizieren, wobei die XCR1-Expression ausschließlich auf CD141<sup>+</sup> DCs beschränkt war. Kokulturerperimente mit einem zytotoxischen T-Zell-Klon ergaben, dass CD141<sup>+</sup>XCR1<sup>+</sup> DCs die anderen humanen DC-Subtypen in ihrer Kapazität zur Kreuzpräsentation von löslichem und zellassoziertem Antigen deutlich übertreffen. Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass

CD141<sup>+</sup>XCR1<sup>+</sup> DCs des Menschen das funktionelle Homolog zu kreuzpräsentierenden CD8<sup>+</sup>XCR1<sup>+</sup> DCs der Maus darstellen.

## 5.2 Summary

The background for this study was the observation of selective expression of the chemokine receptor XCR1 on CD8<sup>+</sup> Dendritic cells (DCs) of the murine spleen. CD8<sup>+</sup> DCs are specialized in cross-presentation of extracellular antigen which is essential for the induction of cytotoxic T-cell-responses against viral infections and tumor cells. While it was known previously that the XCR1-ligand ATAC induces chemotaxis of this DC-subtype, the distribution and function of XCR1<sup>+</sup> DCs outside of the spleen remained elusive.

We analyzed the localization of XCR1<sup>+</sup> DCs using a LacZ-reporter mouse and focusing mainly on the intestinal system. We found that XCR1<sup>+</sup> DCs in the tested lymphatic organs co-localize with T-cells and occur in the small intestine abundantly. Phenotypically, XCR1<sup>+</sup> DCs co-express surface proteins referred to in the literature as markers of cross-presenting DCs (CD8, CD103, CD205 and CD207). Upon an inflammatory stimulus the XCR1<sup>+</sup> subset gains a migratory character in the intestinal organs. These results show that XCR1 defines a DC-subtype in lymphatic organs and the periphery that represents a phenotypic and functional unity. It can be assumed that the entirety of XCR1<sup>+</sup> DCs, like the XCR1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> of the spleen, is superior in cross-presentation of antigen and in the activation of cytotoxic T-cells. XCR1-negative DCs are characterized by the expression of the chemokine receptor CX3CR1 and the integrin CD11b. XCR1 and CX3CR1 define functional distinct and non-overlapping DC-populations.

To further characterize the function of XCR1<sup>+</sup> DCs *in vivo*, we propose the production of a mouse-line with specific depletion of this DC-subset. This model will enable the demonstration of the role of XCR1<sup>+</sup> DCs in the steady state and in infectious studies. However, using the knock-in technique, no suitable mouse-line could be obtained. As an alternative approach, we started the generation of BAC-transgenic mice allowing comparable analyses.

In humans XCR1<sup>+</sup> DCs were identified in the peripheral blood, whereas XCR1-expression was limited to the subset of CD141<sup>+</sup> DCs. Co-culture-experiments with a cytotoxic T-cell-clone revealed that CD141<sup>+</sup>XCR1<sup>+</sup> DCs excel in their capacity for cross-presentation of soluble and cell-associated antigen compared to the other DC-subsets. Summarizing these results show that human CD141<sup>+</sup>XCR1<sup>+</sup> DCs are the functional homologue of cross-presenting CD8<sup>+</sup>XCR1<sup>+</sup> DCs in the mouse.

## 6. Literaturverzeichnis

Adams, T.E., and Huntington, J.A. (2006). Thrombin-cofactor interactions: structural insights into regulatory mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 1738-1745.

Akagi, K., Sandig, V., Vooijs, M., Van der Valk, M., Giovannini, M., Strauss, M., and Berns, A. (1997). Cre-mediated somatic site-specific recombination in mice. *Nucleic Acids Res* 25, 1766-1773.

Akima, H. (1970). A New Method of Interpolation and Smooth Curve Fitting Based on Local Procedures. *JACM* 17, 589-602.

Aliberti, J., Schulz, O., Pennington, D.J., Tsujimura, H., Reis e Sousa, C., Ozato, K., and Sher, A. (2003). Essential role for ICSBP in the in vivo development of murine CD8alpha<sup>+</sup> dendritic cells. *Blood* 101, 305-310.

Allan, R.S., Smith, C.M., Belz, G.T., van Lint, A.L., Wakim, L.M., Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2003). Epidermal viral immunity induced by CD8alpha<sup>+</sup> dendritic cells but not by Langerhans cells. *Science* 301, 1925-1928.

Allen, S.J., Crown, S.E., and Handel, T.M. (2007). Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol* 25, 787-820.

Andrews, D.M., Scalzo, A.A., Yokoyama, W.M., Smyth, M.J., and Degli-Esposti, M.A. (2003). Functional interactions between dendritic cells and NK cells during viral infection. *Nat Immunol* 4, 175-181.

Autissier, P., Soulas, C., Burdo, T.H., and Williams, K.C. (2010). Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans. *Cytometry A* 77, 410-419.

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. and Kroczek R.A. (2010). Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c<sup>+</sup>CD141<sup>+</sup> cells as homologues of mouse CD8<sup>+</sup> dendritic cells. *J Exp Med* 207, 1273-1281.

Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.

Bar-On, L., Birnberg, T., Lewis, K.L., Edelson, B.T., Bruder, D., Hildner, K., Buer, J., Murphy, K.M., Reizis, B., and Jung, S. (2010). CX3CR1<sup>+</sup> CD8{alpha}<sup>+</sup> dendritic cells are a steady-state population related to plasmacytoid dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 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., and Heath, W.R. (2009). Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103<sup>+</sup> dendritic cells. *Nat Immunol* 10, 488-495.
- Belz, G.T., Shortman, K., Bevan, M.J., and Heath, W.R. (2005). CD8alpha<sup>+</sup> dendritic cells selectively present MHC class I-restricted noncytolytic viral and intracellular bacterial antigens in vivo. *J Immunol* 175, 196-200.
- Belz, G.T., Smith, C.M., Kleinert, L., Reading, P., Brooks, A., Shortman, K., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (2004a). Distinct migrating and nonmigrating dendritic cell populations are involved in MHC class I-restricted antigen presentation after lung infection with virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 8670-8675.
- Belz, G.T., Smith, C.M., Eichner, D., Shortman, K., Karupiah, G., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (2004b). Cutting edge: conventional CD8 alpha<sup>+</sup> dendritic cells are generally involved in priming CTL immunity to viruses. *J Immunol* 172, 1996-2000.
- Bennett, M.J., Choe, S., and Eisenberg, D. (1994). Refined structure of dimeric diphtheria toxin at 2.0 Å resolution. *Protein Sci* 3, 1444-1463.
- 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, 1283-1288.
- Bimczok, D., Sowa, E.N., Faber-Zuschratter, H., Pabst, R., and Rothkotter, H.J. (2005). Site-specific expression of CD11b and SIRPalpha (CD172a) on dendritic cells: implications for their migration patterns in the gut immune system. *Eur J Immunol* 35, 1418-1427.
- Birnberg, T., Bar-On, L., Sapoznikov, A., Caton, M.L., Cervantes-Barragan, L., Makia, D., Krauthgamer, R., Brenner, O., Ludewig, B., Brockschneider, D., Riethmacher D., Reizis, B., and Jung, S. (2008). Lack of conventional dendritic cells is compatible with normal development and T cell homeostasis, but causes myeloid proliferative syndrome. *Immunity* 29, 986-997.
- 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., and Merad, M. (2009). Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity* 31, 513-525.
- Borrelli, E., Heyman, R., Hsi, M., and Evans, R.M. (1988). Targeting of an inducible toxic phenotype in animal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 7572-7576.

Branda, C.S., and Dymecki, S.M. (2004). Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Dev Cell* 6, 7-28.

Brandt, B., Abou-Eladab, E.F., Tiedge, M., and Walzel, H. (2010). Role of the JNK/c-Jun/AP-1 signaling pathway in galectin-1-induced T-cell death. *Cell Death and Dis* 1, e23.

Breitman, M.L., Clapoff, S., Rossant, J., Tsui, L.C., Glode, L.M., Maxwell, I.H., and Bernstein, A. (1987). Genetic ablation: targeted expression of a toxin gene causes microphthalmia in transgenic mice. *Science* 238, 1563-1565.

Breitman, M.L., Rombola, H., Maxwell, I.H., Klintworth, G.K., and Bernstein, A. (1990). Genetic ablation in transgenic mice with an attenuated diphtheria toxin A gene. *Mol Cell Biol* 10, 474-479.

Brockschneider, D., Lappe-Siefke, C., Goebbels, S., Boesl, M.R., Nave, K.A., and Riethmacher, D. (2004). Cell depletion due to diphtheria toxin fragment A after Cre-mediated recombination. *Mol Cell Biol* 24, 7636-7642.

Brockschneider, D., Pechmann, Y., Sonnenberg-Riethmacher, E., and Riethmacher, D. (2006). An improved mouse line for Cre-induced cell ablation due to diphtheria toxin A, expressed from the Rosa26 locus. *Genesis* 44, 322-327.

Cairns, C.M., Gordon, J.R., Li, F., Baca-Estrada, M.E., Moyana, T., and Xiang, J. (2001). Lymphotactin expression by engineered myeloma cells drives tumor regression: mediation by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells and neutrophils expressing XCR1 receptor. *J Immunol* 167, 57-65.

Caminschi, I., Proietto, A.I., Ahmet, F., Kitsoulis, S., Shin Teh, J., Lo, J.C., Rizzitelli, A., Wu, L., Vremec, D., van Dommelen, S.L., Campbell, I.K., Maraskovsky, E., Braley, H., Davey, G.M., Mottram, P., van de Velde, N., Jensen, K., Lew, A.M., Wright, M.D., Heath, W.R., Shortman, K., and Lahoud, M.H. (2008). The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement. *Blood* 112, 3264-3273.

Cao, W. (2009). Molecular characterization of human plasmacytoid dendritic cells. *J Clin Immunol* 29, 257-264.

Cerf-Bensussan, N., Jarry, A., Brousse, N., Lisowska-Grospierre, B., Guy-Grand, D., and Griscelli, C. (1987). A monoclonal antibody (HML-1) defining a novel membrane molecule present on human intestinal lymphocytes. *Eur J Immunol* 17, 1279-1285.

Chan, A.C., and Carter, P.J. (2010). Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. *Nat Rev Immunol* 10, 301-316.

Charo, I.F., and Ransohoff, R.M. (2006). The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 354, 610-621.

Cheong, C., Matos, I., Choi, J.H., Schauer, J.D., Dandamudi, D.B., Shrestha, E., Makeyeva, J.A., Li, X., Li, P., Steinman, R.M., and Park, C.G. (2010). New monoclonal anti-mouse DC-SIGN antibodies reactive with acetone-fixed cells. *J Immunol Methods* 360, 66-75.

Chieppa, M., Rescigno, M., Huang, A.Y., and Germain, R.N. (2006). Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement. *J Exp Med* 203, 2841-2852.

Chung, Y., Chang, J.H., Kim, B.S., Lee, J.M., Kim, H.Y., and Kang, C.Y. (2007). Anatomic location defines antigen presentation by dendritic cells to T cells in response to intravenous soluble antigens. *Eur J Immunol* 37, 1453-1462.

Chung, Y., Chang, J.H., Kweon, M.N., Rennert, P.D., and Kang, C.Y. (2005). CD8alpha-11b<sup>+</sup> dendritic cells but not CD8alpha<sup>+</sup> dendritic cells mediate cross-tolerance toward intestinal antigens. *Blood* 106, 201-206.

Clark, A.J., Iwobi, M., Cui, W., Crompton, M., Harold, G., Hobbs, S., Kamalati, T., Knox, R., Neil, C., Yull, F., and Gusterson, B. (1997). Selective cell ablation in transgenic mice expression E. coli nitroreductase. *Gene Ther* 4, 101-110.

Cluzel-Tailhardat, M., Bonnet-Duquennoy, M., Abaibou, H., Pelle De Queral, D., Vocanson, M., Lazou, K., Kurfurst, R., Courtellemont, P., and Le Varlet, B. (2007). Which house-keeping genes for dendritic cell transcriptomic studies? *Eur J Dermatol* 17, 457-459.

Coffman, R.L. (1983). Surface Antigen Expression and Immunoglobulin Gene Rearrangement During Mouse pre B Cell Development. *Immunol Rev* 69, 5-23.

Coombes, J.L., and Powrie, F. (2008). Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat Rev Immunol* 8, 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., and Dalod, M.. (2010). The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8<sup>+</sup> dendritic cells. *J Exp Med* 207, 1283-1292.

Dalgaard, J., Beckstrom, K.J., Jahnsen, F.L., and Brinchmann, J.E. (2005). Differential capability for phagocytosis of apoptotic and necrotic leukemia cells by human peripheral blood dendritic cell subsets. *J Leukoc Biol* 77, 689-698.

del Rio, M.L., Bernhardt, G., Rodriguez-Barbosa, J.I., and Forster, R. (2010). Development and functional specialization of CD103<sup>+</sup> dendritic cells. *Immunol Rev* 234, 268-281.

- del Rio, M.L., Rodriguez-Barbosa, J.I., Kremmer, E., and Forster, R. (2007). CD103<sup>-</sup> and CD103<sup>+</sup> bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 178, 6861-6866.
- den Haan, J.M., Lehar, S.M., and Bevan, M.J. (2000). CD8<sup>(+)</sup> but not CD8<sup>(-)</sup> dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med* 192, 1685-1696.
- Di Pucchio, T., Chatterjee, B., Smed-Sorensen, A., Clayton, S., Palazzo, A., Montes, M., Xue, Y., Mellman, I., Banchereau, J., and Connolly, J.E. (2008). Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I. *Nat Immunol* 9, 551-557.
- Dillon, N., and Grosveld, F. (1993). Transcriptional regulation of multigene loci: multilevel control. *Trends Genet* 9, 134-137.
- Dorner, B., Müller, S., Entschladen, F., Schroder, J.M., Franke, P., Kraft, R., Friedl, P., Clark-Lewis, I., and Kroczeck, R.A. (1997). Purification, structural analysis, and function of natural ATAC, a cytokine secreted by CD8<sup>(+)</sup> T cells. *J Biol Chem* 272, 8817-8823.
- 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., and Kroczeck, R.A. (2009). Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8<sup>+</sup> T cells. *Immunity* 31, 823-833.
- Dorner, B.G., Scheffold, A., Rolph, M.S., Huser, M.B., Kaufmann, S.H., Radbruch, A., Flesch, I.E., and Kroczeck, R.A. (2002). MIP-1alpha, MIP-1beta, RANTES, and ATAC/lymphotactin function together with IFN-gamma as type 1 cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 6181-6186.
- Dorner, B.G., Smith, H.R.C., French, A.R., Kim, S., Poursine-Laurent, J., Beckman, D.L., Pingel, J.T., Kroczeck, R.A., and Yokoyama, W.M. (2004). Coordinate Expression of Cytokines and Chemokines by NK Cells during Murine Cytomegalovirus Infection. *J Immunol*, 172, 3119-3131.
- Dzionic, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D.W., and Schmitz, J. (2000). BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* 165, 6037-6046.
- 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., Murphy, T.L., Hildner, K., and Murphy, K.M. (2010). Peripheral CD103<sup>+</sup> dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8alpha<sup>+</sup> conventional dendritic cells. *J Exp Med* 207, 823-836.

- Falnes, P.O., Ariansen, S., Sandvig, K., and Olsnes, S. (2000). Requirement for prolonged action in the cytosol for optimal protein synthesis inhibition by diphtheria toxin. *J Biol Chem* 275, 4363-4368.
- Faria, A.M., and Weiner, H.L. (2005). Oral tolerance. *Immunol Rev* 206, 232-259.
- Farrand, K.J., Dickgreber, N., Stoitzner, P., Ronchese, F., Petersen, T.R., and Hermans, I.F. (2009). Langerin<sup>+</sup> CD8alpha<sup>+</sup> dendritic cells are critical for cross-priming and IL-12 production in response to systemic antigens. *J Immunol* 183, 7732-7742.
- Feng, D.X., Liu, D.P., Huang, Y., Wu, L., Li, T.C., Wu, M., Tang, X.B., and Liang, C.C. (2001). The expression of human alpha-like globin genes in transgenic mice mediated by bacterial artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 15073-15077.
- Fink, L.N., and Frokiaer, H. (2008). Dendritic cells from Peyer's patches and mesenteric lymph nodes differ from spleen dendritic cells in their response to commensal gut bacteria. *Scand J Immunol* 68, 270-279.
- Flavell, D.J., Flavell, S.U., Boehm, D.A., Emery, L., Noss, A., Ling, N.R., Richardson, P.R., Hardie, D., and Wright, D.H. (1995). Preclinical studies with the anti-CD19-saporin immunotoxin BU12-SAPORIN for the treatment of human-B-cell tumours. *Br J Cancer* 72, 1373-1379.
- Fleeton, M.N., Contractor, N., Leon, F., Wetzel, J.D., Dermody, T.S., and Kelsall, B.L. (2004). Peyer's patch dendritic cells process viral antigen from apoptotic epithelial cells in the intestine of reovirus-infected mice. *J Exp Med* 200, 235-245.
- Fleming, T., Fleming, M., and Malek, T. (1993). Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *J Immunol* 151, 2399.
- Flinsenberg, T.W.H., Compeer, E.B., Boelens, J.J., and Boes, M. (2011). Antigen cross-presentation: extending recent laboratory findings to therapeutic intervention. *Clin Exp Immunol* 165, 8-18.
- Fonteneau, J.F., Kavanagh, D.G., Lirvall, M., Sanders, C., Cover, T.L., Bhardwaj, N., and Larsson, M. (2003). Characterization of the MHC class I cross-presentation pathway for cell-associated antigens by human dendritic cells. *Blood* 102, 4448-4455.
- Fonteneau, J.F., Larsson, M., Somersan, S., Sanders, C., Munz, C., Kwok, W.W., Bhardwaj, N., and Jotereau, F. (2001). Generation of high quantities of viral and tumor-specific human CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell clones using peptide pulsed mature dendritic cells. *J Immunol Methods* 258, 111-126.

Galibert, L., Diemer, G.S., Liu, Z., Johnson, R.S., Smith, J.L., Walzer, T., Comeau, M.R., Rauch, C.T., Wolfson, M.F., Sorensen, R.A., Van der Vuurst de Vries, A.R., Branstetter, D.G., Koelling, R.M., Scholler, J., Fanslow, W.C., Baum, P.R., Derry, J.M., and Yan, W. (2005). Nectin-like protein 2 defines a subset of T-cell zone dendritic cells and is a ligand for class-I-restricted T-cell-associated molecule. *J Biol Chem* 280, 21955-21964.

Gilliet, M., Cao, W., and Liu, Y.J. (2008). Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 8, 594-606.

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., and Merad, M. (2009). The origin and development of nonlymphoid tissue CD103<sup>+</sup> DCs. *J Exp Med* 206, 3115-3130.

Giraldo, P., and Montoliu, L. (2001). Size matters: use of YACs, BACs and PACs in transgenic animals. *Transgenic Res* 10, 83-103.

Hamada, H., Hiroi, T., Nishiyama, Y., Takahashi, H., Masunaga, Y., Hachimura, S., Kaminogawa, S., Takahashi-Iwanaga, H., Iwanaga, T., Kiyono, H., Yamamoto, H., and Ishikawa, H. (2002). Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. *J Immunol* 168, 57-64.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.

Hanahan, D., Jessee, J., and Bloom, F.R. (1991). Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol* 204, 63-113.

Heath, W.R., Belz, G.T., Behrens, G.M., Smith, C.M., Forehan, S.P., Parish, I.A., Davey, G.M., Wilson, N.S., Carbone, F.R., and Villadangos, J.A. (2004). Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev* 199, 9-26.

Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2001). Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat Rev Immunol* 1, 126-134.

Heiber, M., Docherty, J.M., Shah, G., Nguyen, T., Cheng, R., Heng, H.H., Marchese, A., Tsui, L.C., Shi, X., George, S.R., and O'Dowd, B.F. (1995). Isolation of three novel human genes encoding G protein-coupled receptors. *DNA Cell Biol* 14, 25-35.

Henri, S., Poulin, L.F., Tamoutounour, S., Ardouin, L., Guillems, M., de Bovis, B., Devilard, E., Viret, C., Azukizawa, H., Kissenpfennig, A., and Malissen, B. (2010). CD207<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells. *J Exp Med* 207, 189-206.

Hildner, K., Edelson, B.T., Purtha, W.E., Diamond, M., Matsushita, H., Kohyama, M., Calderon, B., Schraml, B.U., Unanue, E.R., Diamond, M.S., Schreiber, R.D., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2008). Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha<sup>+</sup> dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* 322, 1097-1100.

Hoeffel, G., Ripoche, A.-C., Matheoud, D., Nascimbeni, M., Escriou, N., Lebon, P., Heshmati, F., Guillet, J.-G., Gannagé, M., Caillat-Zucman, S., Casartelli, N., Schwartz, O., De la Salle, H., Hanau, D., Hosmalin, A., and Marañón, C. (2007). Antigen Crosspresentation by Human Plasmacytoid Dendritic Cells. *Immunity* 27, 481-492.

Huang, H., Bi, X.G., Yuan, J.Y., Xu, S.L., Guo, X.L., and Xiang, J. (2005). Combined CD4<sup>+</sup> Th1 effect and lymphotactin transgene expression enhance CD8<sup>+</sup> Tc1 tumor localization and therapy. *Gene Ther* 12, 999-1010.

Huang, H., Li, F., Cairns, C.M., Gordon, J.R., and Xiang, J. (2001). Neutrophils and B cells express XCR1 receptor and chemotactically respond to lymphotactin. *Biochem Biophys Res Commun* 281, 378-382.

Huysamen, C., Willment, J.A., Dennehy, K.M., and Brown, G.D. (2008). CLEC9A is a novel activation C-type lectin-like receptor expressed on BDCA3<sup>+</sup> dendritic cells and a subset of monocytes. *J Biol Chem* 283, 16693-16701.

Iacobelli, M., Wachsman, W., and McGuire, K.L. (2000). Repression of IL-2 promoter activity by the novel basic leucine zipper p21SNFT protein. *J Immunol* 165, 860-868.

Idoyaga, J., Suda, N., Suda, K., Park, C.G., and Steinman, R.M. (2009). Antibody to Langerin/CD207 localizes large numbers of CD8alpha<sup>+</sup> dendritic cells to the marginal zone of mouse spleen. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 1524-1529.

Inaba, K., Swiggard, W.J., Inaba, M., Meltzer, J., Mirza, A., Sasagawa, T., Nussenzweig, M.C., and 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, 148-156.

Irla, M., Kupfer, N., Suter, T., Lissilaa, R., Benkhoucha, M., Skupsky, J., Lalive, P.H., Fontana, A., Reith, W., and Hugues, S. (2010). MHC class II-restricted antigen presentation by plasmacytoid dendritic cells inhibits T cell-mediated autoimmunity. *J Exp Med* 207, 1891-1905.

Iwasaki, A., and Kelsall, B.L. (2000). Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3alpha, MIP-3beta, and secondary lymphoid organ chemokine. *J Exp Med* 191, 1381-1394.

Iwasaki, A., and Kelsall, B.L. (2001). Unique functions of CD11b<sup>+</sup>, CD8 alpha<sup>+</sup>, and double-negative Peyer's patch dendritic cells. *J Immunol* 166, 4884-4890.

- Iyoda, T., Shimoyama, S., Liu, K., Omatsu, Y., Akiyama, Y., Maeda, Y., Takahara, K., Steinman, R.M., and Inaba, K. (2002). The CD8<sup>+</sup> dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J Exp Med* 195, 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., and Agace, W.W. (2008). Small intestinal CD103<sup>+</sup> dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *J Exp Med* 205, 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., and Miyasaka, M. (2006). CCR7 is critically important for migration of dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes. *J Immunol* 176, 803-810.
- Johansson, T., Broll, I., Frenz, T., Hemmers, S., Becher, B., Zeilhofer, H.U., and Buch, T. (2010). Building a zoo of mice for genetic analyses: a comprehensive protocol for the rapid generation of BAC transgenic mice. *Genesis* 48, 264-280.
- Johansson-Lindbom, B., Svensson, M., Pabst, O., Palmqvist, C., Marquez, G., Forster, R., and Agace, W.W. (2005). Functional specialization of gut CD103<sup>+</sup> dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing. *J Exp Med* 202, 1063-1073.
- Johnson, P., and Friedmann, T. (1990). Limited bidirectional activity of two housekeeping gene promoters: human HPRT and PGK. *Gene* 88, 207-213.
- Jongbloed, S.L., Kassianos, A.J., McDonald, K.J., Clark, G.J., Ju, X., Angel, C.E., Chen, C.-J.J., Dunbar, P.R., Wadley, R.B., Jeet, V., Vulink, A.J., Hart, D.N., and Radford, K.J. (2010). Human CD141<sup>+</sup> (BDCA-3)<sup>+</sup> dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J Exp Med* 207, 1247-1260.
- Joyner, A.L. (2000). *Gene targeting: a practical approach* (Oxford University Press).
- Ju, X., Clark, G., and Hart, D.N. (2010). Review of human DC subtypes. *Methods Mol Biol* 595, 3-20.
- Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M.J., Kreuzberg, G.W., Sher, A., and Littman, D.R. (2000). Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol* 20, 4106-4114.

Jung, S., Unutmaz, D., Wong, P., Sano, G., De los Santos, K., Sparwasser, T., Wu, S., Vuthoori, S., Ko, K., Zavala, F., Pamer, E.G., Littman, D.R., and Lang, R.A. (2002). In vivo depletion of CD11c<sup>+</sup> dendritic cells abrogates priming of CD8<sup>+</sup> T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 17, 211-220.

Kaplan, D.H. (2010). In vivo function of Langerhans cells and dermal dendritic cells. *Trends Immunol* 31, 446-451.

Kaplan, D.H., Jenison, M.C., Saeland, S., Shlomchik, W.D., and Shlomchik, M.J. (2005). Epidermal langerhans cell-deficient mice develop enhanced contact hypersensitivity. *Immunity* 23, 611-620.

Kashiwada, M., Pham, N.L., Pewe, L.L., Harty, J.T., and Rothman, P.B. (2011). NFIL3/E4BP4 is a key transcription factor for CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cell development. *Blood* 117, 6193-6197.

Kastenmüller, W., Gerner, M.Y., and Germain, R.N. (2010). The in situ dynamics of dendritic cell interactions. *Eur J Immunol*, 40, 2103-2106.

Katakai, T., Hara, T., Lee, J.-H., Gonda, H., Sugai, M., and Shimizu, A. (2004). A novel reticular stromal structure in lymph node cortex: an immuno-platform for interactions among dendritic cells, T cells and B cells. *Int Immunol* 16, 1133-1142.

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., and Zlotnik, A. (1994). Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 266, 1395-1399.

Kennedy, J., Kelner, G.S., Kleyensteuber, S., Schall, T.J., Weiss, M.C., Yssel, H., Schneider, P.V., Cocks, B.G., Bacon, K.B., and Zlotnik, A. (1995). Molecular cloning and functional characterization of human lymphotactin. *J Immunol* 155, 203-209.

Kim, T.S., and Braciale, T.J. (2009). Respiratory dendritic cell subsets differ in their capacity to support the induction of virus-specific cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cell responses. *PLoS One* 4, e4204.

Kissenpfennig, A., Henri, S., Dubois, B., Laplace-Builhe, C., Perrin, P., Romani, N., Tripp, C.H., Douillard, P., Leserman, L., Kaiserlian, D., Saeland, S., Davoust, J., and 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, 643-654.

Kobayashi, K., Morita, S., Sawada, H., Mizuguchi, T., Yamada, K., Nagatsu, I., Fujita, K., Kreitman, R.J., Pastan, I., and Nagatsu, T. (1995). Immunotoxin-mediated conditional disruption of specific neurons in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 1132-1136.

- Kozak, M. (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 15, 8125-8148.
- Kozak, M. (1991). Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J Biol Chem* 266, 19867-19870.
- Kraal, G., Breel, M., Janse, M., and Bruin, G. (1986). Langerhans' cells, veiled cells, and interdigitating cells in the mouse recognized by a monoclonal antibody. *J Exp Med* 163, 981-997.
- Kraus, T.A., Brimnes, J., Muong, C., Liu, J.H., Moran, T.M., Tappenden, K.A., Boros, P., and Mayer, L. (2005). Induction of mucosal tolerance in Peyer's patch-deficient, ligated small bowel loops. *J Clin Invest* 115, 2234-2243.
- Kurts, C., Kosaka, H., Carbone, F.R., Miller, J.F., and Heath, W.R. (1997). Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8<sup>(+)</sup> T cells. *J Exp Med* 186, 239-245.
- Kurts, C., Robinson, B.W., and Knolle, P.A. (2010). Cross-priming in health and disease. *Nat Rev Immunol* 10, 403-414.
- Lakso, M., Sauer, B., Mosinger, B., Jr., Lee, E.J., Manning, R.W., Yu, S.H., Mulder, K.L., and Westphal, H. (1992). Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 6232-6236.
- Landel, C.P., Zhao, J., Bok, D., and Evans, G.A. (1988). Lens-specific expression of recombinant ricin induces developmental defects in the eyes of transgenic mice. *Genes Dev* 2, 1168-1178.
- Lehmann, J., Huehn, J., de la Rosa, M., Maszyra, F., Kretschmer, U., Krenn, V., Brunner, M., Scheffold, A., and Hamann, A. (2002). Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies unique subsets of CD25<sup>+</sup> as well as CD25-regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 13031-13036.
- Lei, Y., Ripen, A.M., Ishimaru, N., Ohigashi, I., Nagasawa, T., Jeker, L.T., Bösl, M.R., Holländer, G.A., Hayashi, Y., de Waal Malefyt, R., Nitta, T., and Takahama, Y. (2011). Aire-dependent production of XCL1 mediates medullary accumulation of thymic dendritic cells and contributes to regulatory T cell development. *J Exp Med* 208, 383-394.
- Leuchtenberger, S., Perz, A., Gatz, C., and Bartsch, J.W. (2001). Conditional cell ablation by stringent tetracycline-dependent regulation of barnase in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 29, E76.

- Lewandoski, M. (2001). Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat Rev Genet* 2, 743-755.
- Lin, M.L., Zhan, Y., Proietto, A.I., Prato, S., Wu, L., Heath, W.R., Villadangos, J.A., and Lew, A.M. (2008). Selective suicide of cross-presenting CD8<sup>+</sup> dendritic cells by cytochrome c injection shows functional heterogeneity within this subset. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 3029-3034.
- Luche, H., Weber, O., Nageswara Rao, T., Blum, C., and Fehling, H.J. (2007). Faithful activation of an extra-bright red fluorescent protein in "knock-in" Cre-reporter mice ideally suited for lineage tracing studies. *Eur J Immunol* 37, 43-53.
- Lukens, M.V., Kruijssen, D., Coenjaerts, F.E., Kimpen, J.L., and van Bleek, G.M. (2009). Respiratory syncytial virus-induced activation and migration of respiratory dendritic cells and subsequent antigen presentation in the lung-draining lymph node. *J Virol* 83, 7235-7243.
- MacDonald, K.P., Munster, D.J., Clark, G.J., Dzionek, A., Schmitz, J., and Hart, D.N. (2002). Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* 100, 4512-4520.
- Mansour, S.L., Thomas, K.R., and Capecchi, M.R. (1988). Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* 336, 348-352.
- Maruno, M., Yoshimine, T., Isaka, T., Kuroda, R., Ishii, H., and Hayakawa, T. (1994). Expression of thrombomodulin in astrocytomas of various malignancy and in gliotic and normal brains. *J Neurooncol* 19, 155-160.
- McDonnell, A.M., Prosser, A.C., van Bruggen, I., Robinson, B.W., and Currie, A.J. (2010). CD8alpha<sup>+</sup> DC are not the sole subset cross-presenting cell-associated tumor antigens from a solid tumor. *Eur J Immunol* 40, 1617-1627.
- McDonnell, A.M., Robinson, B.W., and Currie, A.J. (2010). Tumor antigen cross-presentation and the dendritic cell: where it all begins? *Clin Dev Immunol* 2010, 539519.
- McLellan, A.D., Kapp, M., Eggert, A., Linden, C., Bomhardt, U., Brocker, E.B., Kammerer, U., and Kampgen, E. (2002). Anatomic location and T-cell stimulatory functions of mouse dendritic cell subsets defined by CD4 and CD8 expression. *Blood* 99, 2084-2093.
- Mellman, I., and Steinman, R.M. (2001). Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106, 255-258.

- Merkenschlager, M., Power, M.O., Pircher, H., and Fisher, A.G. (1999). Intrathymic deletion of MHC class I-restricted cytotoxic T cell precursors by constitutive cross-presentation of exogenous antigen. *Eur J Immunol* 29, 1477-1486.
- Miller, J.P., and Selverston, A. (1979). Rapid killing of single neurons by irradiation of intracellularly injected dye. *Science* 206, 702-704.
- Mitamura, T., Higashiyama, S., Taniguchi, N., Klagsbrun, M., and Mekada, E. (1995). Diphtheria toxin binds to the epidermal growth factor (EGF)-like domain of human heparin-binding EGF-like growth factor/diphtheria toxin receptor and inhibits specifically its mitogenic activity. *J Biol Chem* 270, 1015-1019.
- Muller, S., Dorner, B., Korthauer, U., Mages, H.W., D'Apuzzo, M., Senger, G., and Kroczek, R.A. (1995). Cloning of ATAC, an activation-induced, chemokine-related molecule exclusively expressed in CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *Eur J Immunol* 25, 1744-1748.
- Naglich, J.G., Metherall, J.E., Russell, D.W., and Eidels, L. (1992). Expression cloning of a diphtheria toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like growth factor precursor. *Cell* 69, 1051-1061.
- Nagy, A. (2003). *Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Neuenhahn, M., Kerksiek, K.M., Nauerth, M., Suhre, M.H., Schiemann, M., Gebhardt, F.E., Stemberger, C., Panthel, K., Schroder, S., Chakraborty, T., Jung, S., Hochrein, H., Rüssmann, H., Brocker, T., and Busch, D.H. (2006). CD8alpha<sup>+</sup> dendritic cells are required for efficient entry of *Listeria monocytogenes* into the spleen. *Immunity* 25, 619-630.
- Neutra, M.R., Pringault, E., and Kraehenbuhl, J.P. (1996). Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annu Rev Immunol* 14, 275-300.
- 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., and Reinecker, H.C. (2005). CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 307, 254-258.
- Norbury, C.C., Malide, D., Gibbs, J.S., Bennink, J.R., and Yewdell, J.W. (2002). Visualizing priming of virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells by infected dendritic cells in vivo. *Nat Immunol* 3, 265-271.
- Ochando, J.C., Homma, C., Yang, Y., Hidalgo, A., Garin, A., Tacke, F., Angeli, V., Li, Y., Boros, P., Ding, Y., Jessberger, R., Trinchieri, G., Lira, S.A., Randolph, G.J., and Bromberg, J.S. (2006). Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat Immunol* 7, 652-662.

Ohnmacht, C., Pullner, A., King, S.B., Drexler, I., Meier, S., Brocker, T., and Voehringer, D. (2009). Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *J Exp Med* 206, 549-559.

Osugi, Y., Vuckovic, S., and Hart, D.N. (2002). Myeloid blood CD11c<sup>+</sup> dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells differ in their ability to stimulate T lymphocytes. *Blood* 100, 2858-2866.

Pabst, O., and Bernhardt, G. (2010). The puzzle of intestinal lamina propria dendritic cells and macrophages. *Eur J Immunol* 40, 2107-2111.

Pacheco, A., and Martinez-Salas, E. (2010). Insights into the biology of IRES elements through riboproteomic approaches. *J Biomed Biotechnol* 2010, 458927.

Palmiter, R.D., Behringer, R.R., Quaipe, C.J., Maxwell, F., Maxwell, I.H., and Brinster, R.L. (1987). Cell lineage ablation in transgenic mice by cell-specific expression of a toxin gene. *Cell* 50, 435-443.

Perussia, B., Acuto, O., Terhorst, C., Faust, J., Lazarus, R., Fanning, V., and Trinchieri, G. (1983). Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. II. Studies of B73.1 antibody-antigen interaction on the lymphocyte membrane. *J Immunol* 130, 2142-2148.

Piccioli, D., Tavarini, S., Borgogni, E., Steri, V., Nuti, S., Sammiceli, C., Bardelli, M., Montagna, D., Locatelli, F., and Wack, A. (2007). Functional specialization of human circulating CD16 and CD1c myeloid dendritic-cell subsets. *Blood* 109, 5371-5379.

Pooley, J.L., Heath, W.R., and Shortman, K. (2001). Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8<sup>-</sup> dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8<sup>+</sup> dendritic cells. *J Immunol* 166, 5327-5330.

Probst, H.C., Tschannen, K., Odermatt, B., Schwendener, R., Zinkernagel, R.M., and Van Den Broek, M. (2005). Histological analysis of CD11c-DTR/GFP mice after in vivo depletion of dendritic cells. *Clin Exp Immunol* 141, 398-404.

Qiu, C.H., Miyake, Y., Kaise, H., Kitamura, H., Ohara, O., and Tanaka, M. (2009). Novel subset of CD8<sup>+</sup> dendritic cells localized in the marginal zone is responsible for tolerance to cell-associated antigens. *J Immunol* 182, 4127-4136.

Radbruch, A. (2000). *Flow Cytometry and Cell Sorting*. Springer-Verlag, 2nd Edition.

Rajewsky, K., Gu, H., Kuhn, R., Betz, U.A., Muller, W., Roes, J., and Schwenk, F. (1996). Conditional gene targeting. *J Clin Invest* 98, 600-603.

Ransohoff, R.M. (2009). Chemokines and Chemokine Receptors: Standing at the Crossroads of Immunobiology and Neurobiology. *Immunity* 31, 711-721.

Reis e Sousa, C. (2004). Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Semin Immunol* 16, 27-34.

Reis e Sousa, C., Hieny, S., Scharton-Kersten, T., Jankovic, D., Charest, H., Germain, R.N., and Sher, A. (1997). In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. *J Exp Med* 186, 1819-1829.

Rescigno, M. (2009). Before they were gut dendritic cells. *Immunity* 31, 454-456.

Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J.P., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2, 361-367.

Robbins, S.H., Walzer, T., Dembele, D., Thibault, C., Defays, A., Bessou, G., Xu, H., Vivier, E., Sellars, M., Pierre, P., Sharp, F.R., Chan, S., Kastner, P., and Dalod, M. (2008). Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome Biol* 9, R17.

Robinson, S.P., Patterson, S., English, N., Davies, D., Knight, S.C., and Reid, C.D.L. (1999). Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur J Immunol* 29, 2769-2778.

Rock, K.L., and Shen, L. (2005). Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol Rev* 207, 166-183.

Rogozin, I.B., Kochetov, A.V., Kondrashov, F.A., Koonin, E.V., and Milanesi, L. (2001). Presence of ATG triplets in 5' untranslated regions of eukaryotic cDNAs correlates with a 'weak' context of the start codon. *Bioinformatics* 17, 890-900.

Rumsaeng, V., Vliagoftis, H., Oh, C.K., and Metcalfe, D.D. (1997). Lymphotactin gene expression in mast cells following Fc(epsilon) receptor I aggregation: modulation by TGF-beta, IL-4, dexamethasone, and cyclosporin A. *J Immunol* 158, 1353-1360.

Russell, G.J., Parker, C.M., Cepek, K.L., Mandelbrot, D.A., Sood, A., Mizoguchi, E., Ebert, E.C., Brenner, M.B., and Bhan, A.K. (1994). Distinct structural and functional epitopes of the alpha E beta 7 integrin. *Eur J Immunol* 24, 2832-2841.

Salazar-Gonzalez, R.M., Niess, J.H., Zammit, D.J., Ravindran, R., Srinivasan, A., Maxwell, J.R., Stoklasek, T., Yadav, R., Williams, I.R., Gu, X., McCormick, B.A., Pazos, M.A., Vella, A.T., Lefrancois, L., Reinecker, H.C., and McSorley, S.J. (2006). CCR6-mediated dendritic cell activation of pathogen-specific T cells in Peyer's patches. *Immunity* 24, 623-632.

Sallusto, F., Schaerli, P., Loetscher, P., Schaniel, C., Lenig, D., Mackay, C.R., Qin, S., and Lanzavecchia, A. (1998). Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 28, 2760-2769.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edition.

Sancho, D., Mourao-Sa, D., Joffre, O.P., Schulz, O., Rogers, N.C., Pennington, D.J., Carlyle, J.R., and Reis e Sousa, C. (2008). Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin. *J Clin Invest* 118, 2098-2110.

Sanes, J.R., Rubenstein, J.L., and Nicolas, J.F. (1986). Use of a recombinant retrovirus to study post-implantation cell lineage in mouse embryos. *EMBO J* 5, 3133-3142.

Sathe, P., Pooley, J., Vremec, D., Mintern, J., Jin, J.O., Wu, L., Kwak, J.Y., Villadangos, J.A., and Shortman, K. (2011). The Acquisition of Antigen Cross-Presentation Function by Newly Formed Dendritic Cells. *J Immunol* 186, 5184-5192

Scheinecker, C., McHugh, R., Shevach, E.M., and Germain, R.N. (2002). Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node. *J Exp Med* 196, 1079-1090.

Schlake, T., and Bode, J. (1994). Use of Mutated FLP Recognition Target (FRT) Sites for the Exchange of Expression Cassettes at Defined Chromosomal Loci. *Biochem* 33, 12746-12751.

Schmidt-Supprian, M., and Rajewsky, K. (2007). Vagaries of conditional gene targeting. *Nat Immunol* 8, 665-668.

Schnorrer, P., Behrens, G.M., Wilson, N.S., Pooley, J.L., Smith, C.M., El-Sukkari, D., Davey, G., Kupresanin, F., Li, M., Maraskovsky, E., Belz, G.T., Carbone, F.R., Shortman, K., Heath, W.R., and Villadangos, J.A. (2006). The dominant role of CD8<sup>+</sup> dendritic cells in cross-presentation is not dictated by antigen capture.

Proc Natl Acad Sci USA 103, 10729-10734.

Schnurr, M., Chen, Q., Shin, A., Chen, W., Toy, T., Jenderek, C., Green, S., Miloradovic, L., Drane, D., Davis, I.D., Villadangos, J., Shortman, K., Maraskovsky, E., and Cebon, J. (2005). Tumor antigen processing and presentation depend critically on dendritic cell type and the mode of antigen delivery. *Blood* 105, 2465-2472.

Schraml, B.U., Hildner, K., Ise, W., Lee, W.-L., Smith, W.A.E., Solomon, B., Sahota, G., Sim, J., Mukasa, R., Cemerski, S., Hatton, R.D., Stormo, G.D., Weaver, C.T., Russell, J.H., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2009). The AP-1 transcription factor Batf controls TH17 differentiation. *Nature* 460, 405-409.

Schulz, O., Jaensson, E., Persson, E.K., Liu, X., Worbs, T., Agace, W.W., and Pabst, O. (2009). Intestinal CD103<sup>+</sup>, but not CX3CR1<sup>+</sup>, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *J Exp Med* 206, 3101-3114.

Schulz, O., and Reis e Sousa, C. (2002). Cross-presentation of cell-associated antigens by CD8alpha<sup>+</sup> dendritic cells is attributable to their ability to internalize dead cells. *Immunology* 107, 183-189.

Segura, E., and Villadangos, J.A. (2009). Antigen presentation by dendritic cells in vivo. *Curr Opin Immunol* 21, 105-110.

Shan, L., Qiao, X., Oldham, E., Catron, D., Kaminski, H., Lundell, D., Zlotnik, A., Gustafson, E., and Hedrick, J.A. (2000). Identification of viral macrophage inflammatory protein (vMIP)-II as a ligand for GPR5/XCR1. *Biochem Biophys Res Commun* 268, 938-941.

Shortman, K., and Heath, W.R. (2010). The CD8<sup>+</sup> dendritic cell subset. *Immunol Rev* 234, 18-31.

Shortman, K., and Naik, S.H. (2007). Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* 7, 19-30.

Sigal, L.J., Crotty, S., Andino, R., and Rock, K.L. (1999). Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature* 398, 77-80.

Smith, C.M., Belz, G.T., Wilson, N.S., Villadangos, J.A., Shortman, K., Carbone, F.R., and Heath, W.R. (2003). Cutting edge: conventional CD8 alpha<sup>+</sup> dendritic cells are preferentially involved in CTL priming after footpad infection with herpes simplex virus-1. *J Immunol* 170, 4437-4440.

Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98, 503-517.

Spahn, T.W., Fontana, A., Faria, A.M., Slavin, A.J., Eugster, H.P., Zhang, X., Koni, P.A., Ruddle, N.H., Flavell, R.A., Rennert, P.D., and Weiner, H.L. (2001). Induction of oral tolerance to cellular immune responses in the absence of Peyer's patches. *Eur J Immunol* 31, 1278-1287.

Spahn, T.W., Weiner, H.L., Rennert, P.D., Lugering, N., Fontana, A., Domschke, W., and Kucharzik, T. (2002). Mesenteric lymph nodes are critical for the induction of high-dose oral tolerance in the absence of Peyer's patches. *Eur J Immunol* 32, 1109-1113.

Sparwasser, T., and Eberl, G. (2007). BAC to immunology--bacterial artificial chromosome-mediated transgenesis for targeting of immune cells. *Immunology* 121, 308-313.

Srinivas, S., Watanabe, T., Lin, C.S., William, C.M., Tanabe, Y., Jessell, T.M., and Costantini, F. (2001). Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev Biol* 1, 4.

Stagg, A.J., Hart, A.L., Knight, S.C., and Kamm, M.A. (2003). The dendritic cell: its role in intestinal inflammation and relationship with gut bacteria. *Gut* 52, 1522-1529.

Steinman, R.M., Pack, M., and Inaba, K. (1997). Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. *Immunol Rev* 156, 25-37.

Strunk, D., Rappersberger, K., Egger, C., Strobl, H., Kromer, E., Elbe, A., Maurer, D., and Stingl, G. (1996). Generation of human dendritic cells/Langerhans cells from circulating CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells. *Blood* 87, 1292-1302.

Summers, K.L., Hock, B.D., McKenzie, J.L., and Hart, D.N. (2001). Phenotypic characterization of five dendritic cell subsets in human tonsils. *Am J Pathol* 159, 285-295.

Tezuka, H., and Ohteki, T. (2010). Regulation of intestinal homeostasis by dendritic cells. *Immunol Rev* 234, 247-258.

Thomas, K.R., and Capecchi, M.R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51, 503-512.

Tiisala, S., Paavonen, T., and 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, 411-417.

- Tomonari, K. (1988). A rat antibody against a structure functionally related to the mouse T-cell receptor/T3 complex. *Immunogenetics* 28, 455-458.
- Torti, N., Walton, S.M., Murphy, K.M., and Oxenius, A. (2011). Batf3 transcription factor-dependent DC subsets in murine CMV infection: differential impact on T cell priming and memory inflation. *Eur J Immunol* 41, 2612-2618
- Truitt, W.A., and Coolen, L.M. (2002). Identification of a potential ejaculation generator in the spinal cord. *Science* 297, 1566-1569.
- Turnbull, E.L., Yrlid, U., Jenkins, C.D., and Macpherson, G.G. (2005). Intestinal dendritic cell subsets: differential effects of systemic TLR4 stimulation on migratory fate and activation in vivo. *J Immunol* 174, 1374-1384.
- Ugolini, V., Nunez, G., Smith, R.G., Stastny, P., and Capra, J.D. (1980). Initial characterization of monoclonal antibodies against human monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 6764-6768.
- Vandenabeele, S., Hochrein, H., Mavaddat, N., Winkel, K., and Shortman, K. (2001). Human thymus contains 2 distinct dendritic cell populations. *Blood* 97, 1733-1741.
- Varol, C., Vallon-Eberhard, A., Elinav, E., Aychek, T., Shapira, Y., Luche, H., Fehling, H.J., Hardt, W.D., Shakhar, G., and Jung, S. (2009). Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions. *Immunity* 31, 502-512.
- Veeraswamy, R.K., Cella, M., Colonna, M., and Unanue, E.R. (2003). Dendritic cells process and present antigens across a range of maturation states. *J Immunol* 170, 5367-5372.
- Villadangos, J.A. (2001). Presentation of antigens by MHC class II molecules: getting the most out of them. *Mol Immunol* 38, 329-346.
- Villadangos, J.A., and Schnorrer, P. (2007). Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol* 7, 543-555.
- Villadangos, J.A., and Young, L. (2008). Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 29, 352-361.
- Voehringer, D., Liang, H.E., and Locksley, R.M. (2008). Homeostasis and effector function of lymphopenia-induced "memory-like" T cells in constitutively T cell-depleted mice. *J Immunol* 180, 4742-4753.

- Vremec, D., and Shortman, K. (1997). Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *J Immunol* 159, 565-573.
- Vremec, D., Pooley, J., Hochrein, H., Wu, L., and Shortman, K. (2000). CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol* 164, 2978-2986.
- Wang, J.C., Kobie, J.J., Zhang, L., Cochran, M., Mosmann, T.R., Ritchlin, C.T., and Quataert, S.A. (2009). An 11-color flow cytometric assay for identifying, phenotyping, and assessing endocytic ability of peripheral blood dendritic cell subsets in a single platform. *J Immunol Methods* 341, 106-116.
- Wilson, C., Bellen, H.J., and Gehring, W.J. (1990). Position effects on eukaryotic gene expression. *Annu Rev Cell Biol* 6, 679-714.
- Wilson, N.S., and 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., and 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, 157-162.
- Worbs, T., Bode, U., Yan, S., Hoffmann, M.W., Hintzen, G., Bernhardt, G., Forster, R., and Pabst, O. (2006). Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. *J Exp Med* 203, 519-527.
- Yamaizumi, M., Mekada, E., Uchida, T., and Okada, Y. (1978). One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell. *Cell* 15, 245-250.
- Yang, X.W., Model, P., and Heintz, N. (1997). Homologous recombination based modification in *Escherichia coli* and germline transmission in transgenic mice of a bacterial artificial chromosome. *Nat Biotechnol* 15, 859-865.
- Yoshida, T., Imai, T., Kakizaki, M., Nishimura, M., Takagi, S., and Yoshie, O. (1998). Identification of single C motif-1/lymphotactin receptor XCR1. *J Biol Chem* 273, 16551-16554.
- Yoshida, T., Izawa, D., Nakayama, T., Nakahara, K., Kakizaki, M., Imai, T., Suzuki, R., Miyasaka, M., and Yoshie, O. (1999). Molecular cloning of mXCR1, the murine SCM-1/lymphotactin receptor. *FEBS letters* 458, 37-40.

Zenke, M., and Hieronymus, T. (2006). Towards an understanding of the transcription factor network of dendritic cell development. *Trends Immunol* 27, 140-145.

Zhan, Y., Carrington, E.M., van Nieuwenhuijze, A., Bedoui, S., Seah, S., Xu, Y., Wang, N., Mintern, J.D., Villadangos, J.A., Wicks, I.P., and Lew, A.M. (2011). GM-CSF increases cross presentation and CD103 expression by mouse CD8<sup>+</sup> spleen dendritic cells. *Eur J Immunol* 41, 2585-2595

Zlotnik, A., and Yoshie, O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12, 121-127.

**Abkürzungsverzeichnis**

APC	<i>antigen-presenting cell</i> , antigenpräsentierende Zelle
ATAC	<i>activation-induced, T cell-derived and chemokine-related molecule</i>
B6	C57BL/6
Batf3	<i>basic leucine zipper transcription factor 3</i>
BSA	<i>bovine serum albumine</i> , Rinder-Serumalbumin
B2MG	beta-2-Mikroglubulin
BAC	bakterielles artifizielles Chromosom
BP	Bandpassfilter
CD	<i>cluster of differentiation</i> , Unterscheidungsgruppe
cDC	<i>conventional DC</i> , konventionelle DC
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CSPD	$C_{18}H_{20}ClO_7PNa_2$
Clec9a	<i>C-type lectin domain family 9A</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DC	<i>Dendritic Cell</i> , dendritische Zelle
DIG	Digoxigenin
ddH <sub>2</sub> O	zweifach deionisiertes Wasser
DN DC	CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> DC
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNAse	<i>deoxyribonuclease</i> , Desoxyribonuklease
DT	Diphtherietoxin
DTA	Diphtherietoxin Untereinheit A
DTR	Diphtherietoxinrezeptor
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay</i> , enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
Ep-Cam	<i>epithelial cell adhesion molecule</i>
ESC	<i>embryonic stem cell</i> , embryonale Stammzelle
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FAM	6-Carboxy-Fluorescein
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
Flp	<i>Flippase recombination enzyme</i>
Flt3L	<i>Fms-related tyrosine kinase 3 ligand</i>
FRT	<i>Flp recognition target</i>
FSC	<i>forward scatter</i> ; Vorwärtsscatteer
GAG	Glykosaminoglykan

GALT	<i>gut-associated lymphoid tissue</i> , darmassoziiertes lymphatisches Gewebe
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HCMV	Humanes Cytomegalie Virus
HLA	<i>human leukocyte antigen</i> , humanes Leukozytenantigen
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IRF8	<i>Interferon regulatory factor 8</i>
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis Virus
LCR	<i>locus control region</i> , Lokuskontrollregion
LN	<i>lymph node</i> , Lymphknoten
LP	Lamina propria
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
mAk	monoklonaler Antikörper
MCMV	murines Cytomegalie Virus
MEF	<i>murine embryonic fibroblast</i> , muriner embryonaler Fibroblast
mesLN	<i>mesenteric LN</i> , mesenteraler LN
MGB	<i>minor groove binder</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
MHCI	MHC-Klasse-I
MHCII	MHC-Klasse-II
MMC	Mitomycin c
MoDC	monozytengenerierte DC
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
M-Zelle	<i>microfold-Zelle</i>
Necl2	<i>nectin-like molecule 2</i>
NK-Zelle	<i>natural killer cell</i> , Natürliche Killerzelle
NKT-Zelle	<i>natural killer T cell</i> , Natürliche Killer-T-Zelle
OVA	Ovalbumin
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i> , mononukleäre Zellen aus peripherem Blut
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
RIN	<i>RNA Integrity Number</i>
pDC	<i>plasmacytoid DC</i> , plasmazytoide DC
PE	Phycoerythrin

pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Ionenkonzentration
PMA	Phorbol 12-Myristat-13-Azetat
PP	Peyerscher Plaque
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RT-PCR	<i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
SCM-1	<i>single cysteine motif-1</i>
SSC	<i>sidescatter</i> , Seitwärts-scatter oder <i>saline-sodium citrate buffer</i> , Natriumcitratpuffer
TAMRA	6-Carboxy-tetramethylrhodamin
Th1	T-Helferzelle Typ 1
TLR	<i>Toll like receptor</i> , Toll-ähnlicher Rezeptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Richard A. Kroczek danke ich für die Überlassung des interessanten Themas sowie die Betreuung und bereitwillige Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Rupert Mutzel danke ich für die freundliche Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten.

Ich danke Prof. Maria Rescigno und Elisa Mazzini für den netten Aufenthalt in Mailand und besonders Dr. Marc Schmidt-Supprian für die Betreuung und schöne Zeit in München.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung P21 möchte ich meinen herzlichen Dank für Hilfe, Rat und Freundschaft ausdrücken – ohne euch wär' das alles nicht möglich gewesen:

Maysun Al Baz, Martina Becker, Yvonne Burmeister, Vivienne Engelschalt, Randi Franke, Franziska Fuhrmann, Stephanie Gurka, Anika Hegemann, Volker Henn, Andreas Hutloff, Monika Jaensch, Petra Jahn, Ewa Kowalczyk, Timo Lischke, Hans-Werner Mages, Elisabeth Mettke, Ahmed Mora, Katja Ranke, Dana Vu Van, Traudy Wandersleben, Jan Weber und Xuefei Zhou.

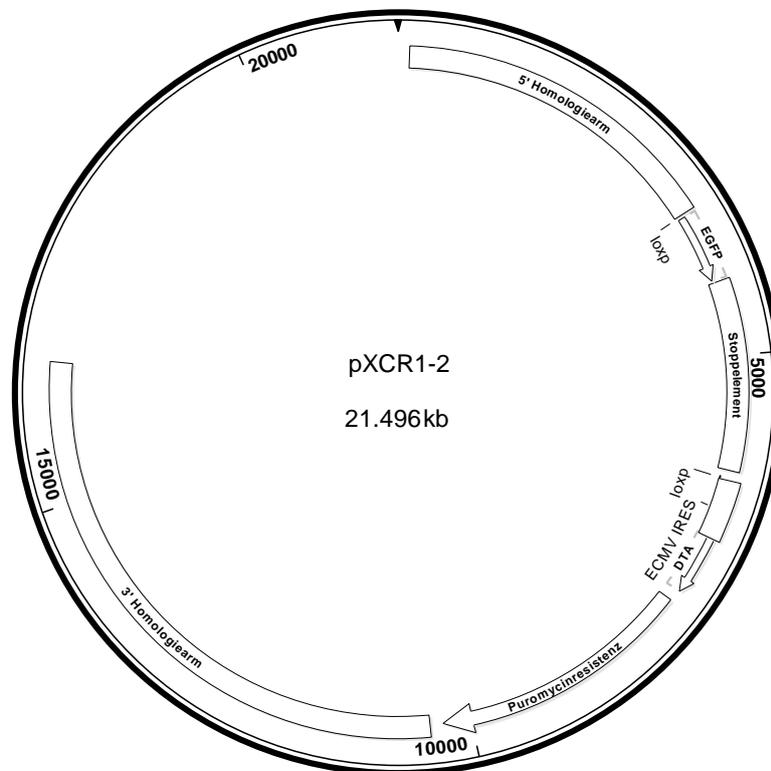
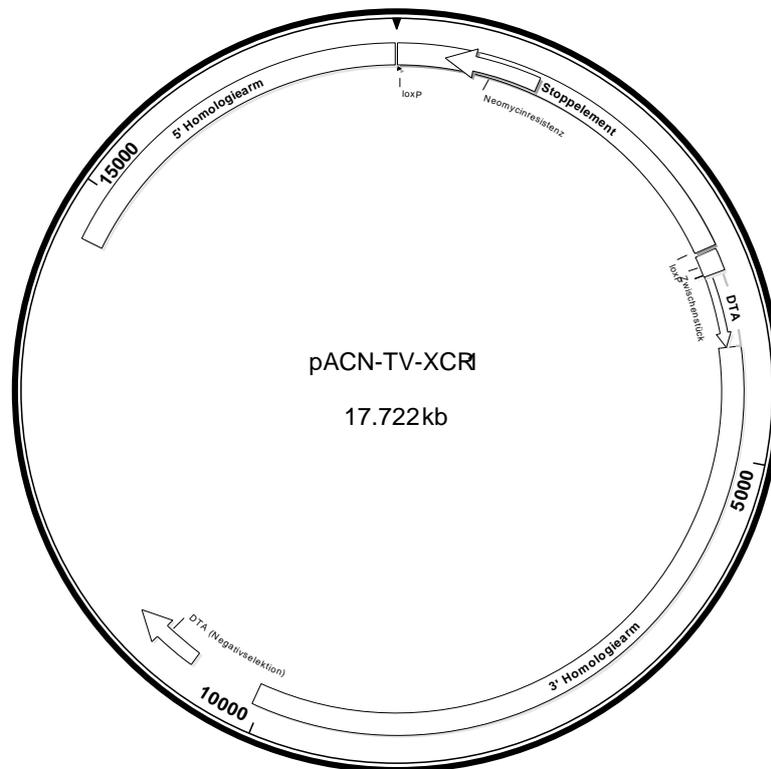
Auch meinen Dank an die Tierpfleger sowie Petra Matzk und Emine Temür.

Annabell Bachem und Evelyn Hartung vom A-Team danke ich dafür, die besten Kolleginnen der Welt gewesen zu sein.

Dann noch liebsten Dank an Dinah für alles, an meine Familie sowie Maja und Shah und auch Susanne und Eva fürs Korrigieren.



Vektorkarten



**Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der  
Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

### Publikationen

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., and Kroczeck, R.A. (2009). Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8<sup>+</sup> T cells. *Immunity* 31, 823-833.

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., and Kroczeck, R.A. (2010). Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c<sup>+</sup>CD141<sup>+</sup> cells as homologues of mouse CD8<sup>+</sup> dendritic cells. *J Exp Med* 207, 1273-1281.

Bachem, A.\*, **Güttler, S.\***, Hartung, E.\*, Mages, H.W., Henn, V., P.M., Gurka, S., and Kroczeck, R.A. (2012). XCR1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> but not CX3CR1 CD8<sup>+</sup> are the antigen cross-presenting dendritic cells in the spleen. Publikation in Vorbereitung

\* Autoren leisteten gleichen Beitrag zur Arbeit

## **Konferenzbeiträge**

### Poster:

Zhou X., Mora A., **Güttler S.**, Mages H.W., Henn V., and KroczeK R.A.; Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on CD8<sup>+</sup> dendritic cells determines cooperation with CD8<sup>+</sup> T cells. 2nd European Congress of Immunology, 13.-16. September 2009, Berlin

### Workshop-Vortrag:

**Güttler, S.**, Bachem, A., Hartung, E., Ebstein, F., Schaefer, M., Tannert, A., Salama, A., Movassaghi, K., Opitz, C., Mages, H.W., Henn, V., Kloetzel, P.M., Gurka, S., and KroczeK, R.A. Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11C<sup>+</sup>CD141<sup>+</sup> cells as homologous of murine CD8<sup>+</sup> dendritic cells. 40th Annual Meeting German Society for Immunology, 22.-25. September 2010, Leipzig

### Poster:

Bachem, A., **Güttler, S.**, Hartung, E., Henn, V., Gurka, Hegemann, A., Mages, H.W., Weber, H., and KroczeK, R.A.

Phenotypic and functional analysis of XCR1-expressing, antigen cross-presenting DC in the mouse and the human. 11th International Symposium on Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology, 26.-30. September 2010, Lugano, Schweiz

### Workshop-Vortrag:

Bachem, A., **Güttler, S.**, Hartung, E., Plantinga, M., Lambrecht, B.N., Stoitzner, P., Romani, N., Mazzini, E., Rescigno, M., and KroczeK, R.A.

Tight correlation between XCR1 expression and antigen cross-presentation changes functional classification of splenic dendritic cells. Joint Annual Meeting SIICA – Dgfi, 28. September – 1. Oktober 2011, Riccione, Italien

## **weitere Vorträge**

### **Güttler, S.**

The functional role of the chemokine XCL1 and its receptor XCR1 in the immune system.

Vortrag in der Arbeitsgruppe von Maria Rescigno, European Institute of Oncology, Department of Experimental Oncology, November 2011, Mailand, Italien

**Bescheinigung**

Gemäß § 7 Abs. 4 der Promotionsordnung vom 04.09.2007 des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Titel „Funktionelle Charakterisierung XCR1-positiver dendritischer Zellen in der Maus und beim Menschen“ selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe.

Steffen Güttler

Berlin, den 22.09.2011