

Funktionelle Charakterisierung
des
C-Klasse Chemokins ATAC *in*
vivo

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaft (Dr. rer. nat.)
eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Xuefei Zhou

aus Tianjin (China)

September 2009

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Immunologische Abwehrmechanismen am Robert Koch-Institut, Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. R. A. Kroczek angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Richard Kroczek
2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Thomas Blankenstein

Disputation am: 15 Februar 2010

VERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1	ÜBERBLICK ÜBER DAS IMMUNSYSTEM	1
1.2	DIE ANTIGEN-PRÄSENTIERENDEN ZELLEN: DENDRITISCHE ZELLEN.....	2
1.2.1	Kreuzpräsentation von Dendritischen Zellen	4
1.3	DIE CD8 ⁺ T-ZELL-VERMITTELTE IMMUNITÄT	6
1.3.1	Periphere Toleranz von CD8 ⁺ T-Zellen.....	7
1.3.2	CD8 ⁺ T-Zell-vermittelte Zytotoxizität	9
1.3.3	Die Aktivierungsmarker auf CD8 ⁺ T-Zellen	10
1.4	CHEMOKINE	12
1.4.1	C-Klasse Chemokin: ATAC.....	12
1.4.2	Spezifischer ATAC Rezeptor: XCR1	14
1.4.3	ATAC Funktionen.....	17
2.	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	20
3.	MATERIAL UND METHODEN	22
3.1	VERWENDETE GERÄTE, CHEMIKALIEN UND MATERIALIEN	22
3.1.1	Geräte	22
3.1.2	Chemikalien und Materialien.....	22
3.1.3	Puffer und Lösungen für SDS-Page.....	22
3.1.4	Lösungen für Western Blot und Detektion.....	23
3.1.5	Puffer für Affinitätschromatographie	24
3.1.6	Medien und Lösungen für die Bakterienkultur.....	24
3.1.7	Medien und Lösungen für die Zellkultur	25
3.1.8	Lösungen für die Zellisolierung und FACS.....	26
3.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	26
3.2.1	Quantitative Reverse-Transkriptions-PCR (qRT-PCR)	26
3.3	EXPRESSION VON REKOMBINANTEM ATAC	28
3.3.1	Generierung des Expressionsvektors	28
3.3.2	Affinitätsreinigung von ATAC.....	29
3.3.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	30
3.3.4	Western Blot.....	30
3.3.5	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	31
3.4	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	31
3.4.1	Kultivierung von permanenten Zelllinien.....	31
3.4.2	Isolation von murinen Splenozyten aus der Milz	32
3.4.3	Aktivierung von T-Zellen in vitro	32
3.4.4	Isolierung von murinen Zellen aus Lymphknoten.....	33
3.4.5	Isolierung von murinen Zellen aus Lebern.....	33
3.4.6	Isolierung von murinen Zellen aus Lungen.....	33
3.4.7	Isolierung von murinen Zellen aus dem Knochenmark	34
3.4.8	Anreicherung von T-Zellen mittels Nylonwolle	34
3.4.9	Gewinnung von Dendritischen Zellen aus Milzen.....	35
3.4.10	Anreicherung von Milzzellen durch magnetische Zellsortierung (MACS).....	35
3.4.11	Zellproliferations-Assay.....	36
3.4.12	Apoptose-Assay.....	37
3.5	DURCHFLUSSZYTOMETRIE	37

3.5.1	Zellmarkierung	37
3.5.2	Messung am Durchflusszytometer.....	41
3.5.3	Auswertung der Messung am Durchflusszytometer	43
3.6	TIEREXPERIMENTELLE METHODEN.....	43
3.6.1	Verwendete Tiere.....	43
3.6.2	Adoptiver Transfer von OT-I-Zellen	44
3.6.3	Immunisierung der Mäuse	44
3.6.4	Zytotoxischer Assay <i>in vivo</i>	44
3.6.5	Chemotaktische Untersuchung <i>in vivo</i>	45
4.	ERGEBNISSE	47
4.1	PRODUKTION VON MURINEM ATAC-PROTEIN MIT HILFE EINES SUMO-EXPRESSIONSSYSTEMS	47
4.2	EXPRESSION VON XCR1 IN DER MILZ	50
4.2.1	Expression von XCR1 mRNA in verschiedenen Zellpopulationen	50
4.3	ROLLE VON ATAC IN DER T-DZ-INTERAKTION <i>IN VITRO</i>	52
4.4	FUNKTIONELLE UNTERSUCHUNG VON ATAC <i>IN VIVO</i> DURCH EIN OVALBUMIN-SPEZIFISCHES OT-I-ZELL-SYSTEM.....	56
4.4.1	Kinetik der ATAC-Expression <i>in vivo</i>	56
4.4.2	Expression von XCR1 in naiven und aktivierten Milzzellen.....	60
4.4.3	ATAC ist ein wichtiger Regulator der T-DZ-Interaktion <i>in vivo</i>	62
4.4.4	Proliferation von ATAC KO und WT OT-I-Zellen nach Gabe von Ovalbumin <i>in vivo</i>	63
4.4.5	Proliferation und Apoptose von OT-I-Zellen nach Gabe von α DEC-205:OVA <i>in vivo</i>	64
4.4.6	Expansion von OT-I-Zellen 3 Tagen und 5 Tagen nach Aktivierung <i>in vivo</i>	66
4.4.7	Überleben von OT-I-Zellen 12 Tagen nach Aktivierung <i>in vivo</i>	69
4.4.8	Rolle von ATAC bei CD8 ⁺ T-Zell-vermittelter Zytotoxizität	73
4.5	ATAC IST EIN CHEMOKIN FÜR XCR1-TRAGENDE ZELLEN	77
4.6	DER PHÄNOTYP VON ATAC KO C57BL/6 MÄUSEN	80
4.6.1	T-Zell-Populationen in der Milz	80
4.6.2	Der Phänotyp von über ein Jahr alten ATAC KO C57BL/6 Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen.....	82
5.	DISKUSSION	89
5.1	IDENTIFIZIERUNG VON ATAC-TARGET-ZELLEN	89
5.2	DIE PUTATIVE ROLLE VON ATAC WÄHREND DER KREUZPRÄSENTATION	90
5.2.1	Die Rolle von ATAC während der T-DZ-Interaktionsphase.....	90
5.2.2	Die Rolle von ATAC während der Expansion von CD8 ⁺ T-Zellen	92
5.2.3	Die Rolle von ATAC für das Überleben von CD8 ⁺ T-Zellen nach Aktivierung.....	94
5.2	DER EINFLUSS VON ATAC AUF DIE CD8 ⁺ T-ZELL-VERMITTELTE ZYTOTOXIZITÄT	95
5.3	DIE CHEMOTAKTISCHE WIRKUNG VON ATAC <i>IN VIVO</i>	96
5.4	PHÄNOTYP VON NAIVEN ATAC-DEFIZIENTEN C57BL/6 MÄUSEN	97
6.	ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY	100
6.1	ZUSAMMENFASSUNG	100
6.2	SUMMARY.....	101
7.	DANKSAGUNG.....	102
8.	LITERATURVERZEICHNIS	104

9. ANHANG	123
9.1 BESCHEINIGUNG	123

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Prozentualer Anteil von DZ-Subpopulationen in Maus [Shortman et al., 2002]	2
Tabelle 2: Verwendete Geräte.....	22
Tabelle 3: Primer für XCR1 von Gesamt-RNA	27
Tabelle 4: Primer für XCR1 von Poly(A)-RNA	27
Tabelle 5: Die Aktivierung von verschiedenen reinen Zellpopulationen...	32
Tabelle 6: magnetische Partikeln für die Zellsortierung.....	36
Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Antikörper.	38
Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Antikörper für intrazelluläre Färbung	40
Tabelle 9: Fluorochrome und ihre Anregungs- und Emissionsmaxima sowie die Detektion in der Durchflusszytometrie	41
Tabelle 10: Die analysierten Zellpopulationen des Bauchraumes	45

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Antigen-Prozessierung zum MHC-Klasse-I:Peptid in Zytosol [Lin et al., 2008]	6
Abbildung 2: Modell CD8 ⁺ T-Zell-Toleranz [Redmond et al., 2005 b]	8
Abbildung 3: Die Konformationsänderung zwischen Ltn10 und Ltn40 [Tuinstra et al., 2008]	13
Abbildung 4: Aminosäure-Sequenz von ATAC in Maus und Mensch [Yoshida et al., 1995]	14
Abbildung 5: Ähnlichkeit der Aminosäure-Sequenz von ATAC zu C-C- und C-X-C-Chemokinen	14
Abbildung 6: Die XCR1 Aminosäure-Sequenz in der Maus und im Menschen [Yoshida et al., 1999].....	16
Abbildung 7: Die Ko-Sekretion von ATAC mit Typ-1 Chemokinen und IFN- γ in der <i>L.monocytogenes</i> Infektion [Dorner et al., 2002].....	18
Abbildung 8: Plasmid für die Expression von mATAC in <i>E.coli</i>	28
Abbildung 9: primäre Struktur des 6 \times His-SUMO-ATAC-Proteins	47
Abbildung 10: SDS-Page der Expression von TAGzyme-mATAC und pET-SUMO-mATAC in <i>E.coli</i>	48
Abbildung 11: SDS-Page der Aufreinigung von SUMO-ATAC-Protein durch Nickel-Sepharose-Säule.....	49

Abbildung 12: Coomassie Blau Färbung und Western Blot von aufgereinigtem ATAC	50
Abbildung 13: Expression der XCR1 mRNA in verschiedenen Zellpopulationen von Milzzellen in WT C57BL/6 Mäusen.....	52
Abbildung 14: Kinetik der ATAC-Sekretion <i>in vitro</i> nach Stimulation mit PMA/Ionomycin, OVA oder dem OVA-Peptid SIINFEKL.....	54
Abbildung 15: Expression von CD69 und 4-1BB auf OT-I-Zellen und Expression von CD86 sowie PD-L2 auf DZ nach Stimulation mit SIINFEKL <i>in vitro</i>	55
Abbildung 16: Kinetik der ATAC-Sekretion von OT-I-Zellen <i>in vivo</i>	57
Abbildung 17: Kinetik der Expression von ATAC und CD69 auf OT-I-Zellen.....	59
Abbildung 18: ATAC-Expression von Milzzellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Immunisierung	60
Abbildung 19: Kinetik der Expression von XCR1 mRNA in naiven und aktivierten Milzzellen	61
Abbildung 20: Aktivierung von der ATAC KO OT-I-Zellen im Vergleich zu WT OT-I-Zellen.....	62
Abbildung 21: Proliferation von ATAC KO OT-I-Zellen im Vergleich zu WT OT-I-Zellen.....	63
Abbildung 22: Proliferation von ATAC KO OT-I-Zellen 72 h nach Immunisierung mit DEC:OVA im Vergleich zu WT OT-I-Zellen	64
Abbildung 23: Proliferation und Apoptose von ATAC KO OT-I-Zellen 40 h nach Immunisierung im Vergleich zu WT OT-I-Zellen in verschiedenen Empfängermäusen.....	66
Abbildung 24: Frequenz und IFN- γ -Sekretion von OT-I-Zellen an Tag 3 und 5 nach Immunisierung	67
Abbildung 25: Frequenz von OT-I-Zellen in C57BL/6 Mäuse an Tag 12 nach Immunisierung	70
Abbildung 26: Zytokinsekretion der OT-I-Zellen nach Restimulation <i>in vitro</i>	71
Abbildung 27: Verhältnis von OT-I-Zellen zur PBS-Kontrolle in verschiedenen Organen an Tag 12 nach Immunisierung.....	72
Abbildung 28: Frequenz von OT-I-Zellen an Tag 40 nach Immunisierung.....	73
Abbildung 29: Frequenz und zytotoxische Aktivität von OT-I-Zellen an Tag 7	75
Abbildung 30: Frequenz und zytotoxische Aktivität von OT-I-Zellen an Tag 12.....	77

Abbildung 31: Subpopulationen von DZ nach ATAC-Applikation.....	78
Abbildung 32: prozentueller Anteil verschiedener Zellpopulationen im Bauchraum nach lokaler ATAC-Applikation	79
Abbildung 33: Anteil von Foxp3 ⁺ CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen in der Milz von naiven ATAC KO C57BL/6 Mäusen in verschiedenem Alter im Vergleich zu WT Mäusen.	81
Abbildung 34: Körpergewicht und Speicheldrüse in ATAC KO und WT C57BL/6 Mäusen	83
Abbildung 35: Infiltration von lymphatischen Zellen in die Speicheldrüse	84
Abbildung 36: Histologische Untersuchung verschiedener Zellpopulationen in der Milz.	85
Abbildung 37: Anteil der B- und T-Zellpopulationen sowie Expression wichtiger Marker und Zytokinsekretion von T-Zellen in den Milzen.....	87

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A647	Alexa Fluor 647
A700	Alexa Fluor 700
ACK	Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat
Ag	Antigen
AINR	<i>Activation-induced non-responsiveness</i>
AK	Antikörper
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
AS	Aminosäure
ATAC	<i>Activation-induced, T_H cell-derived, and chemokine-related cytokine</i>
B6	C57BL/6
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
BTLA	<i>B and T Lymphocyte Attenuator</i>
Cas Y	<i>Cascade Yellow</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CTL	zytotoxische T-Zellen
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFSE	5,6-Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dig	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase I	Desoxyribonuklease
DZ	Dendritische Zellen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat

Foxp3	<i>Forkhead box protein 3</i>
h	Stunde
h	human
HCl	Salzsäure
ICOS	<i>Inducible T-cell co-stimulator</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL-X	Interleukin-X
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
KO	Knock-out
Keq	Gleichgewichtskonstante
LK	Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharide
Ltn	<i>Lymphotactin</i>
m	murin
MACS	Magnetische Zellsortierung
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
min	Minute
MIP-1	<i>Macrophage inflammatory protein-1</i>
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
NFAT	Nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen
NK	Natürliche Killerzellen
NKT-Zellen	Natürliche Killer-T-Zellen
OT-I	B6PL/OT-I
OVA	Ovalbumin
Pac B/O	<i>Pacific Blue/ Orange</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PALS	periarterielle lymphatische Scheide
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

PE	Phycoerythrin
pDZ	plasmoide Dendritische Zellen
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
Pyr	Pyruvate
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
TZR	T-Zellrezeptor
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
Th1	T-Helper-1-Zellen
Th2	T-Helper-2-Zellen
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Treg	regulatorische T-Zellen
Tr1	Typ 1 regulatorische T-Zellen
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Überblick über das Immunsystem

Das Immunsystem schützt jeden Organismus vor dem Eindringen von infektiösen Erregern aus der Umgebung und beseitigt auch körpereigene entartete Zellen durch sowohl unspezifische angeborene als auch spezifische erworbene Immunität.

Die angeborene Immunität bildet die erste Verteidigungslinie gegen das Eindringen von Mikroorganismen. Makrophagen, Neutrophile, Natürliche Killerzellen sind die wichtigsten Zelltypen der angeborenen Immunreaktion.

Eine starke angeborene Reaktion kann die erworbene Antwort aktivieren. Die erworbene Immunreaktion wird durch die Aktivierung Antigen-spezifischer T-Zellen mittels Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) ausgelöst. Intrazelluläre Antigene, aber auch virale und bakterielle Antigene werden von allen kernhaltigen Körperzellen durch MHC-Klasse-I-Moleküle auf den Oberflächen präsentiert. Dagegen werden extrazelluläre Antigene ausschließlich von Dendritischen Zellen (DZ), Makrophagen und B-Zellen, welche mit der Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen auf den Oberflächen als professionelle APZ bezeichnet werden, präsentiert.

Das Immunsystem enthält zentrale und periphere Lymphorgane. Die zentralen Organe sind Thymus und Knochenmark, in denen die Generation und Entwicklung von Lymphozyten stattfinden.

Die peripheren Organe sind der Ort, an dem naive T-Zellen ihre spezifischen, von APZ präsentierten Antigene während ihrer Wanderung durch den Organismus treffen und sich zu Effektor-T-Zellen entwickeln. Ein wichtiges peripheres Lymphorgan ist die Milz, die Antigene direkt aus dem Blut aufnehmen kann. Die Milz besteht aus der roten Pulpa und der weißen Pulpa. Die weiße Pulpa bildet sich aus einer zentralen Arteriole und den umgebenden Splenozyten. Dort können eintretende Antigene durch APZ festgehalten und weiter in der T-Zell-Zone präsentiert werden. Auf diese Weise können die Antigene im Blut durch eine erworbene Immunreaktion schnell beseitigt werden. Ein anderes wichtiges Lymphorgan ist der Lymphknoten, der

als Filter der Lymphgefäße wirkt. Antigen-tragende APZ wandern vom Infektionsherd in die ableitenden Lymphknoten, um dort die naiven Antigen-spezifischen T-Zellen zu aktivieren. Diese Aktivierung löst eine Proliferation und Differenzierung zu Effektorzellen aus. Nach wenigen Tagen wandern die Effektorzellen zum Infektionsherd und nehmen an der Eliminierung der Krankheitserreger teil.

DZ als die wichtigsten professionellen APZ spielen eine zentrale Rolle bei der Aktivierung der erworbenen Immunität.

1.2 Die Antigen-präsentierenden Zellen: Dendritische Zellen

DZ wurden zuerst von Steinman und seinen Kollegen 1973 in Maus gefunden und nach ihren typischen verzweigten zytoplasmatischen Fortsätzen als Dendritische Zellen (DZ) benannt [Steinman et al., 1973]. DZ stammen von Vorläuferzellen im Knochenmark ab und entwickeln sich in verschiedene Subpopulationen in lymphatischen Geweben [Inaba et al., 1992 a und b; Inaba et al., 1993]. Eine hohe Expression von CD11c, MHC-Klasse-I und -II sind die charakteristischen Merkmale von DZ. Wie in Tab.1 beschrieben, werden DZ anhand der Expression von CD4, CD8, CD11b und CD205 (DEC-205) in fünf Subpopulationen eingeordnet [Vremec et al., 2000; Shortman et al., 2002]. Die Milz enthält hauptsächlich drei Subpopulationen: CD4⁺CD11b⁺CD8⁻CD205⁻ DZ, CD4⁻CD11b⁺CD8⁻CD205⁻ DZ und CD4⁻CD11b⁻CD8⁺CD205⁺ DZ. In Lymphknoten (LK) befinden sich noch zwei zusätzliche DZ-Populationen: CD4⁻CD11b⁺CD8^{niedrig}CD205^{hoch} DZ (Langerhans-DZ) und CD4⁻CD11b⁺CD8⁻CD205⁺ DZ (dermale DZ).

Tabelle 1: Prozentualer Anteil von DZ-Subpopulationen in Maus [Shortman et al., 2002]

Prozentsatz [%]	CD4 ⁺ CD11b ⁺ CD8 ⁻ CD205 ⁻	CD4 ⁻ CD11b ⁺ CD8 ⁻ CD205 ⁻	CD4 ⁻ CD11b ⁻ CD8 ⁺ CD205 ⁺	CD4 ⁻ CD11b ⁺ CD8 ^{niedrig} CD205 ^{hoch}	CD4 ⁻ CD11b ⁺ CD8 ⁻ CD205 ⁺
Milz	56	19	23	<1	<4
Thymus	-	-	70	-	-

Mesenteriale LK	4	37	19	<4	26
Haut-LK	4	17	17	33	20

Außer der unterschiedlichen Oberflächenmarker scheinen die Subpopulationen von DZ auch verschiedene Funktionen zu erfüllen.

In der Milz konzentrieren sich CD8⁺DEC-205⁺ DZ in der T-Zell-Zone [Shortman et al., 2002; McLellan et al., 2002]. Sie können extrazelluläre Antigene sowohl durch MHC-Klasse-II-Moleküle den CD4⁺ T-Zellen als auch gleichzeitig durch MHC-Klasse-I-Moleküle den CD8⁺ T-Zellen präsentieren. Letzteres wird als Kreuzpräsentation bezeichnet und in Kapitel 1.2.1 detaillierter beschrieben [Kurts et al., 1996; Belz et al., 2004; Lin et al., 2008]. Dagegen präsentieren die meisten CD8⁻DEC-205⁻ DZ extrazelluläre Antigene nur durch MHC-Klasse-II-Moleküle den CD4⁺ T-Zellen. Diese DZ bleiben normalerweise in der roten Pulpa und im Randbereich der Milz [Den Haan et al., 2000; McLellan et al., 2002].

Zur Aktivierung naiver CD4⁺ T-Zellen ist neben der Erkennung eines MHC:Peptid-Komplexes (Signal 1) noch ein zweites Signal nötig. Das zweite Signal kann durch die Kostimulationsmoleküle (B7.1, B7.2) auf reifen DZ bereitgestellt werden [Ding et al., 1994]. Die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen ist komplexer. Neben den zwei Signalen gibt es auch ein drittes Signal, welches z.B. eine zusätzliche Interaktion mit CD4⁺ T-Helfer-Zellen oder die Aktivierung eines Toll-like-Rezeptor (TLR) auf denselben DZ, an die die CD8⁺ T-Zellen gebunden sind, sein könnte. Die Ligation von CD40 oder eine Stimulation durch TLR induziert die Sekretion von IL-12 oder IFN- α/β durch DZ. Dadurch können CD8⁺ T-Zellen effektiv zu zytotoxischen Zellen stimuliert werden [Curtstinger et al., 2003 a, Curtstinger et al., 2005 a und b, Valenzuela et al., 2005].

Die unreifen DZ können Antigene entweder spezifisch über Oberflächen-Rezeptoren wie DEC-205, Lektin, Toll-like-Rezeptor, Komplement- und Fc-Rezeptor oder unspezifisch durch Makropinocytose aufnehmen. Danach

entwickeln sie sich zu reifen DZ mit der Expression von Kostimulationssignalen auf der Oberfläche [Steinman et al., 2003 a, b, c, d und e; Reis e Sousa et al., 2004]. Die reifen CD8⁻ DZ können die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen entweder zu Th1-Zellen für zelluläre Immunantwort oder zu Th2-Zellen für humorale Immunantwort induzieren. Sie unterscheiden sich jeweils im Zytokinprofil: Th1-Zellen sezernieren IFN- γ und IL-2, während Th2-Zellen TGF- β , IL-4 und IL-10 freisetzen. Die zwei Untergruppen von CD4⁺ T-Zellen hemmen sich gegenseitig durch ihre sezernierten Zytokine [Chow YH et al., 1998; De Jong et al., 2005].

Unter den CD4⁺ T-Zellen gibt es eine kleine Population, welche Foxp3 (*Forkhead box protein 3*) und CD25 (α -Kette des IL-2-Rezeptors) exprimieren, die regulatorische T-Zellen (Treg-Zellen) genannt werden [Groux et al., 1997; Sakaguchi et al., 2000].

Die Treg-Zellen können sowohl im Thymus (natürliche Treg-Zellen) als auch in der Peripherie (induzierte Treg-Zellen oder Tr1-Zellen) entstehen. Die Treg-Zellen haben einen negativen regulatorischen Effekt auf die Immunantwort durch die Sekretion von IL-10 und TGF- β . Sie sind einerseits wichtig für die Induktion von Selbsttoleranz und Selbstlimitierung nach erfolgter Immunantwort, andererseits können sie auch die Immunität gegenüber Tumoren und Virus-Infektion unterdrücken [Bach, 2003; Yamazaki et al., 2003; Horwitz et al., 2008; Shankar et al., 2008; Ziegler et al., 2009]. Daher ist ein ausgewogenes Verhältnis zwischen Effektor-T-Zellen und Treg-Zellen wichtig zur Erzielung der optimalen Abwehrleistung, welches von Ag-präsentierender DZ reguliert wird [Taams et al., 2005; Cools et al., 2007].

1.2.1 Kreuzpräsentation von Dendritischen Zellen

Alle kernhaltigen Zellen haben die Fähigkeit, Peptide aus endogenen Antigenen im Kontext mit MHC-Klasse-I-Molekülen den CD8⁺ T-Zellen zu präsentieren. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass nur DZ, pDZ, Makrophagen, B-Zellen und neutrophile Zellen extrazelluläre Antigene aufnehmen und über MHC-Klasse-I-Moleküle den CD8⁺ T-Zellen präsentieren [Shen et al., 2006 b]. Diesen ungewöhnlichen Präsentationsweg bezeichnet man als Kreuzpräsentation, welche wichtig ist für die Induktion von Tumor-Immunität, Virus-Abwehr und Selbsttoleranz. Unter den DZ-Populationen sind die CD8⁺ DZ

die wichtigste DZ-Population, die in der Milz zur Kreuzpräsentation fähig sind [Heath et al., 2004; Schnorrer et al., 2006; Shortman et al., 2007]. Dagegen präsentieren die zwei CD8⁻ DZ-Populationen Antigene bevorzugt den CD4⁺ T-Zellen [Bennett et al., 1997]. Außerdem wurde auch gezeigt, dass die zirkulierenden CD8⁻ DZ auch an der Kreuzpräsentation beteiligt sind, eventuell durch Transport von Antigenen zu den residenten CD8⁺ DZ [Heath et al., 2004].

Die kreuzpräsentierten Antigene können lösliche Proteine, Immunkomplexe, intrazelluläre Bakterien, Parasiten und Zell-assoziierte Antigene wie apoptotische oder nekrotische Zellen sein. Diese Antigene werden durch direkte Infektion oder *Cross-priming* von CD8⁺ DZ aufgenommen. Durch welchen Metabolismusweg diese Antigene nach Phagozytose zu Peptid:MHC-Klasse-I-Komplexen verarbeitet und präsentiert werden, ist bisher nicht klar. Die drei diskutierten Wege einer Ag-Prozessierung sind erstens der Phagosom-Proteasom-ER-Weg (Abb. 1 a) [Rodriguez et al., 1999; Delamarre et al., 2003; Cresswell et al., 2005], zweitens der Weg vom Phagosom direkt zum ER (Abb. 1 b) [Reis e Sousa et al., 1995; Rodriguez et al., 1999; Tsai et al., 2002; Ye et al., 2004; Lilley et al., 2004; Imai et al., 2005; Pierre et al., 2005] und drittens der Weg einer direkten ER-Phagosom-Fusion (Abb. 1 c) [Garin et al., 2001; Gagnon et al., 2002; Houde et al., 2003; Ackerman et al., 2003; Pierre et al., 2005]. Diese Wege sind in Abb. 1 dargestellt [Shen et al., 2006 b].

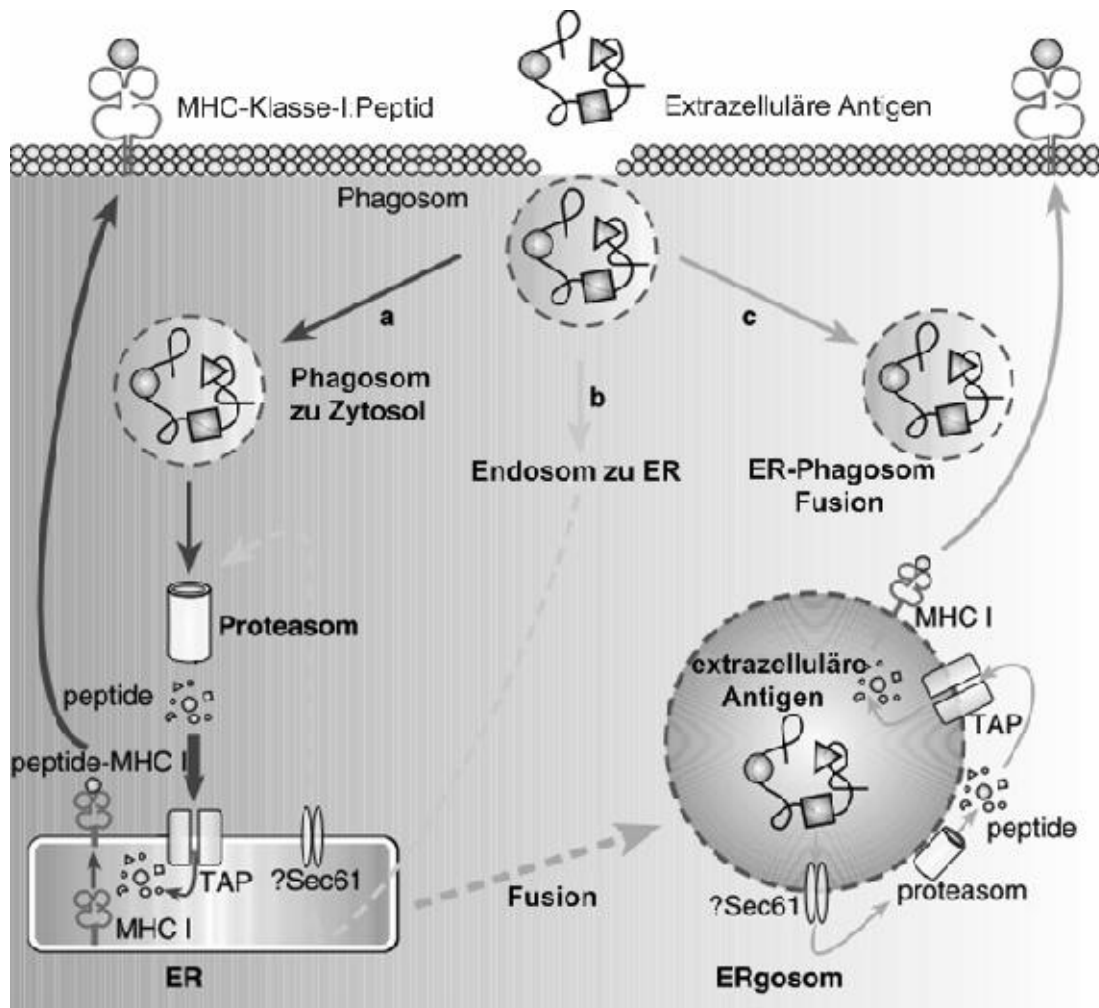


Abbildung 1: Antigen-Prozessierung zum MHC-Klasse-I:Peptid in Zytosol [Lin et al., 2008]

Nachdem die Antigene durch das Phagosom in DZ eingeschleust wurden, werden sie durch verschiedene mögliche Wege (a, b, c) in das Proteasom transportiert und zu kleinen Peptiden (8-9 AS) durch die Protease abgebaut. Diese Peptide werden anschließend durch den TAP-Komplex (transporters associated antigen processing: TAP-1 und TAP-2) in das Endoplasmatische Reticulum (ER) transportiert und auf MHC-Klasse-I-Moleküle (MHC I) geladen. Der MHC-Klasse-I:Peptid-Komplex wird schließlich auf der Zelloberfläche präsentiert.

Die Antigen-Prozessierung der Kreuzpräsentation wird intensiv erforscht wegen ihrer Bedeutung für die Entwicklung effektiver Impfstoffe gegen bestimmte Tumore oder Viren.

1.3 Die CD8⁺ T-Zell-vermittelte Immunität

Zytotoxische T-Zellen sind essentiell für die Beseitigung Virus-infizierter Zellen, intrazellulärer Pathogene sowie entarteter körpereigener Zellen.

Ein effektives Immunsystem muss körpereigene gesunde Zellen von pathogenen Keimen oder entarteten Körperzellen unterscheiden können. Das wird durch die zentrale und periphere Toleranz verwirklicht. Die zentrale Toleranz wird im Thymus durch eine negative Selektion sichergestellt. Dort werden die potenziell autoreaktiven T-Zellen nach der Erkennung von Autoantigenen durch Apoptose zerstört. Bei der Zentralen Toleranz werden jedoch nicht alle Autoantigene wie gewebsspezifische Antigene oder nützliche Proteine aus Lebensmitteln überprüft [Huang et al., 2000]. Deshalb ist eine periphere Toleranz erforderlich zur Vermeidung von Immunität gegenüber eigenen Geweben oder nützlichen Fremdmolekülen.

1.3.1 Periphere Toleranz von CD8⁺ T-Zellen

Die periphere Toleranz von CD8⁺ T-Zellen wird hauptsächlich durch zwei Mechanismen vermittelt: Anergie und Depletion. Wenn Antigene an einer CD8⁺ T-Zelle in Abwesenheit von ausreichendem Kostimulationssignal präsentiert werden, kann das zur Anergie (hohe Menge an Antigen) oder Depletion (niedrige Menge an Antigen) der Antigen-spezifischen T-Zelle führen (Abb. 2) [Rocha et al., 1995; Kundig et al., 1996; Mahnke et al., 2002; Redmond et al., 2005 a und b]. Außerdem kann wiederholte Antigenstimulation, wie z.B. bei chronischen Infektionen, die reaktiven T-Zellen durch auto- oder parakrine Apoptoseinduktion eliminieren [Dhein et al., 1995]. Die Depletion aktivierter T-Zellen wird durch FasL-exprimierende Makrophagen und DZ ermöglicht [Badley et al., 1996; Suss et al., 1996].

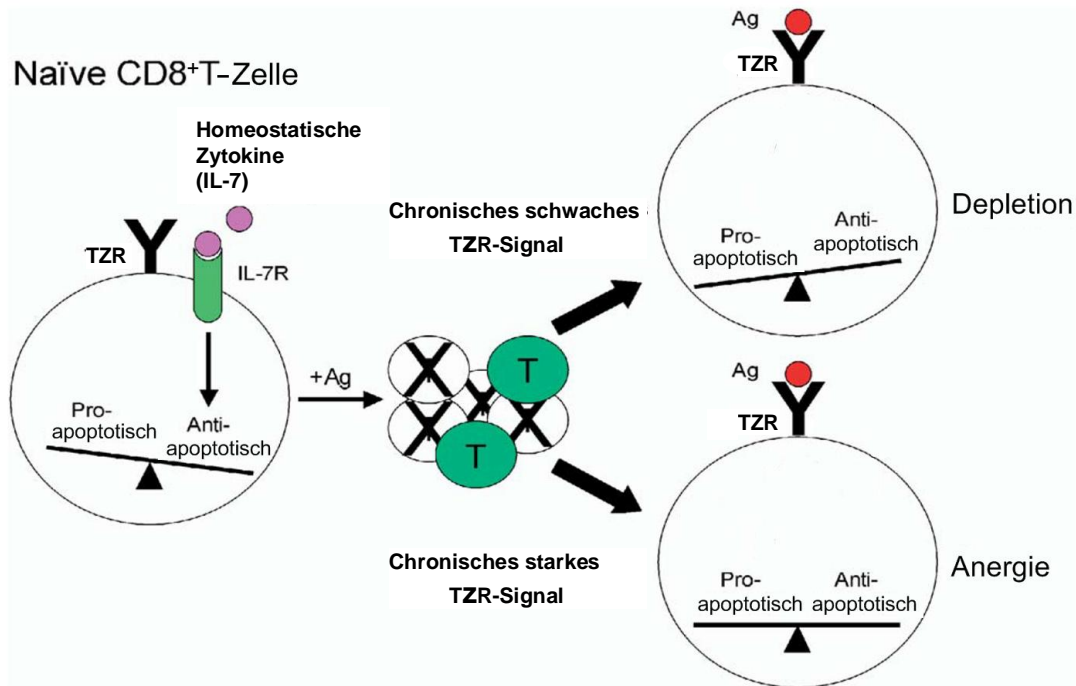


Abbildung 2: Modell $CD8^+$ T-Zell-Toleranz [Redmond et al., 2005 b]

Naive $CD8^+$ T-Zellen tragen den IL-7-Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche. Die Bindung von IL-7 induziert die Produktion von anti-apoptotischen Molekülen in den $CD8^+$ T-Zellen. Dadurch können die naiven $CD8^+$ T-Zellen weiter überleben.

IL-7R wird auf $CD8^+$ T-Zellen bei Toleranz herunterreguliert. Das Schicksal von $CD8^+$ T-Zellen in Toleranz ist von der Intensität des TZR-Signals abhängig. Schwäche TZR-Signale induzieren den Abbau von anti-apoptotischen Molekülen, daher lösen Sie die Apoptose von Zellen aus. Dagegen rufen starke TZR-Signale die Produktion von Anergie-Genen hervor.

Die Interaktion zwischen DZ und $CD4^+$ T-Helfer-Zellen als drittes Signal ist nötig für die Aktivierung von naiven $CD8^+$ T-Zellen [Albert et al., 2001]. In Abwesenheit dieses Signals kann trotz eines starken Kostimulationssignals Toleranz induziert werden.

Bisher wurde Anergie von $CD8^+$ T-Zellen noch nicht klar definiert. T-Zellen in diesem Zustand scheinen weniger IL-2 zu sezernieren, nicht weiter zu proliferieren sowie kein Gedächtnis zu generieren [Colombetti et al., 2002; Schwartz et al., 2003]. Zum anderen kann periphere Toleranz auch durch regulatorische $CD4^+CD25^+$ T-Zellen ($CD4^+$ Treg) vermittelt werden [Shevach et al., 2001]. $CD4^+$ Treg können die Immunantwort von aktivierten T-Zellen unterdrücken. Dies ist wichtig für die Selbstlimitierung der Immunreaktion nach

der Beseitigung von Pathogenen [Jonuleit et al., 2003]. Außerdem wurde ein *Activation-induced non-responsiveness* (AINR) nachgewiesen. Die AINR von CD8⁺T-Zellen kann durch andauernde Stimulation mit Antigenen sogar in Gegenwart des zweiten und dritten Signals induziert werden. Danach zeigen die aktiven T-Zellen eine Abnahme der Zellanzahl sowie der Funktion über die Zeit und verlieren die Fähigkeit IL-2 zu sezernieren. AINR von CD8⁺T-Zellen kann durch IL-2 von CD4⁺ TH1-Zellen aufgehoben werden. Diese Phänomene treten möglicherweise bei chronischen Virus-Infektionen, Tumor oder chronischen Autoimmunkrankheiten auf [Tham EL., 2002].

1.3.2 CD8⁺T-Zell-vermittelte Zytotoxizität

Bei Infektionen durch Viren oder bestimmte Bakterien entwickeln sich naive CD8⁺T-Zellen in zytotoxischen T-Zellen (CTL) und vermehren sich.

Die zytotoxische Wirkung beruht auf einer Kalzium-abhängigen Freisetzung von zytotoxischen Effektorproteinen, die bereits fertig in Granula vorliegen. Wenn CD8⁺T-Zellen die Antigen-tragenden Zellen treffen und erkennen, können sie die vorgeformten lytischen Granula schnell und effektiv in Richtung Zielzellen freisetzen. Diese Granula enthalten zwei Gruppen von Proteinen: Perforin und Granzyme. Perforin ist ein Enzym, das die Membran der Zielzelle perforiert. Daraufhin können Granzyme B durch die gebildeten Poren eindringen und eine Apoptose durch Aktivierung einer Enzymkaskade induzieren. Anschließend werden die apoptotischen Zellen schnell durch Phagozyten beseitigt. Eine CD8⁺T-Zelle kann durch wiederholte Auffüllung von lytischen Granula nacheinander zahlreiche Zielzellen vernichten. Mit diesem Perforin/Granzym-Mechanismus können CD8⁺T-Zellen sehr präzise Targetzellen vernichten ohne dabei gesunde normale Zellen zu beschädigen [Kagi et al., 1994; Shen et al., 2006 a].

Außerdem können aktivierte CD8⁺T-Zellen auch mittels Fas-Liganden an Fas der Zielzell-Membran binden. Dadurch werden Caspasen in der Zielzelle aktiviert und nachfolgend die Apoptose der Zielzelle ausgelöst. Dazu sezernieren zytotoxische T-Zellen IFN- γ , TNF- α/β und IL-2, um die Immunantwort zu verstärken [Liu et al., 1999; Kojima et al., 2002].

Eine effektive CD8⁺T-Zell-vermittelte Zytotoxizität ist von Bedeutung für die Bekämpfung von Vireninfektion sowie die Beseitigung von Tumorzellen. Eine kompromittierte Zytotoxizität erhöht die Anfälligkeit für virale Infektionen, chronische Inflammationen nach Infektionen sowie Tumoren. Das wurde in alten Mäusen und Menschen, die eine erniedrigte Frequenz sowie Aktivität zytotoxischer CD8⁺T-Zellen besitzen, gezeigt [Brander et al., 2000; Zhang et al., 2002; Fuller et al., 2003].

1.3.3 Die Aktivierungsmarker auf CD8⁺T-Zellen

Sowohl bei Toleranz als auch bei Immunität exprimieren CD8⁺T-Zellen nach Aktivierung vielfältige Moleküle auf ihrer Oberfläche, um die T-DZ-Interaktion sowie die spätere Proliferation zu regulieren.

CD69 ist der erste Marker, der nach Aktivierung auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiert wird (bereits nach 1-2 h). Die Expression von CD69 wird durch die Sekretion von IFN- α/β induziert und verhindert die Migration der T-Zellen aus den lymphoiden Organen [Cyster et al., 2006]. CD69 wirkt auch als Kostimulator für die T-Zell-Aktivierung und induziert eine IFN- γ -Sekretion. Auf diese Weise reguliert CD69 die Proliferation von T-Zellen [Testi et al., 1994; De Maria et al., 1994]. Kürzlich wurde entdeckt, dass CD69-defiziente Mäuse eine verstärkte Anti-Tumor-Immunität aufwiesen, jedoch die Entwicklung von Kollagen-induzierter Arthritis verhindert wird [Esplugues et al., 2003; Sancho et al., 2003]. Weiterhin vermittelt CD69 die Produktion von TGF- β durch aktivierte T-Zellen und wirkt daher möglicherweise auch als negativer Regulator [Ziegler et al., 1994; Sancho et al., 2003].

4-1BB, ein Mitglied der TNF-Rezeptor-Familie, ist ein wichtiges kostimulatorisches Molekül für die CD8⁺T-Zell-Aktivierung. 4-1BB wird zwischen 12 h und 48 h nach Aktivierung exprimiert. Die Kostimulation durch 4-1BB erhöht die Expression von anti-apoptotischen Genen, wie Bcl-xL, Bcl-2 und Bfl-1, in diesen CD8⁺T-Zellen [Lee et al., 2009]. Damit wird die Überlebenszeit von aktivierten CD8⁺T-Zellen bei Immunantwort verlängert [Lee et al., 2002].

CD25 ist die α -Kette des IL-2-Rezeptors und kann zusammen mit CD122 einen Rezeptor für IL-2 mit hoher Affinität bilden. CD25 wird auf CD8⁺T-Zellen ca.

12 h nach Aktivierung hochreguliert. Die Bindung von IL-2 induziert die Proliferation von T-Zellen [Taniguchi et al., 1993; Sugamura et al., 1995].

CD27, ein anderes Mitglied von TNF-Rezeptor-Familie, wird konstitutiv auf naiven CD8⁺T-Zell-Oberflächen exprimiert und auf aktivierten CD8⁺T-Zellen hochreguliert. Seine Funktion ist noch nicht klar definiert. CD27 ist als Kostimulationssignal wahrscheinlich an der Teilung und klonalen Expansion von CD8⁺T-Zellen zu Beginn der Immunantwort beteiligt [Croft, 2003]. Die CD27/CD70-Interaktion ist auch wichtig für das Überleben von CD8⁺T-Zellen während der späteren Immunantwort [Croft, 2009 a].

ICOS (*inducible T-cell co-stimulator*) wird auch von aktivierten CD8⁺T-Zellen exprimiert. Es fungiert als Kostimulationssignal und verstärkt die Expansion der aktivierten CD8⁺T-Zellen [Hutloff et al., 1999; McAdam et al., 2001; Dong et al., 2001; Croft et al., 2003; Watanabe et al., 2005].

OX40 gehört zur TNF-Rezeptor-Familie und wird zwischen 12 h und 3 d von aktivierten CD8⁺T-Zellen exprimiert. Als späteres Kostimulationssignal unterstützt es die Proliferation, das Überleben so wie die Erhaltung des Immungedächtnisses von aktivierten T-Zellen [Bansal-Pakala et al., 2004; Salek-Ardak et al., 2008; Croft et al., 2009 b].

PD-1 (*programmed death-1*) wird von CD8⁺T-Zellen nach Aktivierung exprimiert. Es vermittelt ein negatives Signal in die T-Zellen nach Ligation mit PD-L1/2 (B7-H1/B7-DC) [Haspot et al., 2008; Lukens et al., 2008; Keir et al., 2008].

BTLA (*B and T Lymphocyte Attenuator*) wird auch von CD8⁺T-Zellen nach Aktivierung exprimiert. Es wirkt als Inhibitor für die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen während der Immunantwort [Watanabe et al., 2003; Carreno et al., 2003; Zeng et al., 2005; Gavrieli et al., 2006; Trautermann et al., 2006; Okazaki et al., 2006]. Die Funktion von BTLA wurde noch nicht definitiv *in vivo* charakterisiert.

Die Aktivierung und die Differenzierung von Ag-spezifischen CD8⁺T-Zellen werden von diesen Oberflächenmolekülen sowie den durch sie induzierten löslichen Faktoren gemeinsam reguliert.

1.4 Chemokine

Zur effektiven Koordinierung und Regulation des Immunsystems, sind extrazelluläre Botenstoffe, wie z.B. Zytokine, erforderlich. Zytokine sind eine Familie von kleinen glykosylierten Proteinen. Sie werden nach ihrer Funktion in fünf Untergruppen eingeteilt und als Interferone, Interleukine, Koloniestimulierende Faktoren, Tumornekrosefaktoren und Chemokine bezeichnet.

Chemokine wirken als wichtiges Signal für Migration von Immunzellen. Die Immunzellen können durch entsprechende Rezeptoren entlang eines Konzentrationsgradienten der Chemokine wandern und damit effektiv an den Entzündungsherd gelangen.

Anhand der Anzahl und Position der Cysteinreste am N-Terminus werden Chemokine in vier Unterfamilien eingeordnet: CC-Familie, CXC-Familie, CX3C-Familie und C-Familie [Zlotnik et al., 2000]. Bisher zeigen viele Daten, dass einige Chemokine neben der chemotaktischen Wirkung auch die Aktivierung sowie die Entwicklung von Immunzellen beeinflussen können [Fernandez et al., 2002].

1.4.1 C-Klasse Chemokin: ATAC

Activation-induced, T_H cell-derived, and chemokine-related cytokine (ATAC) ist das einzige Mitglied der C-Familie. Es wurde von unserer Gruppe und zwei anderen Gruppen unabhängig voneinander identifiziert [Kelner et al., 1994; Müller et al., 1995; Yoshida et al., 1995].

Das immature ATAC ist ein Protein von 114 Aminosäuren. Nach Abspaltung des Signalpeptids wird ATAC als ein Protein von 93 Aminosäuren (Val22 bis Gly114) sezerniert. Davon bleiben 60% ohne Modifizierung mit einem Molekulargewicht von 10,27 kDa, 40% werden glykosyliert. Die Sequenz am N-Terminus ist essentiell für die Funktion von ATAC [Dorner et al., 1997]. Humanes ATAC liegt in zwei verschiedenen Konformationen vor, die sich bei normalen physiologischen Bedingungen (37°C, 150 mM NaCl) im Gleichgewicht befinden. Eine Konformation, die als Hauptform bei 10°C und 200 mM NaCl auftritt, wird als Ltn10 bezeichnet. Die andere ist der dominante Zustand bei

40°C und 0 mM NaCl, sie wird deshalb als Ltn40 bezeichnet [Tuinstra et al., 2008].

Abb. 3 zeigt die tertiäre Struktur von Ltn10 und Ltn40. Ltn10 hat eine völlig andere Struktur als Ltn40, ist aber sehr ähnlich zu klassischen Chemokinen. Die zwei Formen von ATAC scheinen auch unterschiedliche Funktionen zu erfüllen. Während Ltn10 eine hohe Affinität zu XCR1 besitzt, bindet Ltn40 sehr stark an Heparin. Bei 40°C werden die Interaktionen mit XCR1 wahrscheinlich durch das dominierende Ltn40 verhindert [Tuinstra et al., 2008].

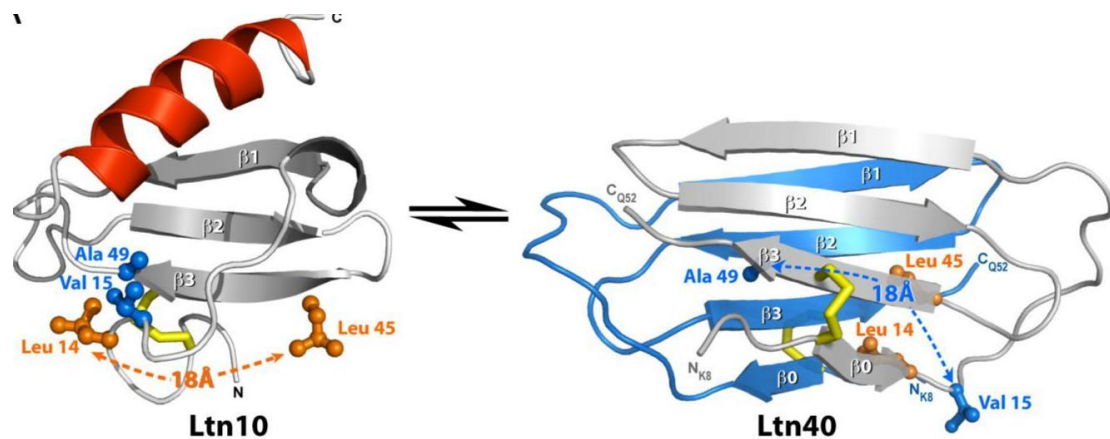


Abbildung 3: Die Konformationsänderung zwischen Ltn10 und Ltn40 [Tuinstra et al., 2008]

Ltn10 besitzt drei β -Ketten und einen C-Terminus mit einer α -Helix und funktioniert in Form eines Monomers. In Ltn40 wird die α -Helix zur β -Kette umgewandelt, Ltn40 bildet ein Dimer.

ATAC weist einen deutlich längeren C-Terminus auf als gewöhnliche Chemokine und bildet nur eine Disulfid-Brücke zwischen zweiten und vierten konservierten Cysteinen aus [Kelner et al., 1995].

Ein anderer Unterschied von ATAC zu CC- und CXC- Chemokinen ist, dass ATAC bei Menschen auf Chromosom 1q23 und nicht auf Chromosom 17 kodiert wird. Die ATAC-Proteine in der Maus (mATAC) und dem Menschen (hATAC) haben die gleiche Länge und 60,5% Identität in der Aminosäure-Sequenz (Abb. 4).

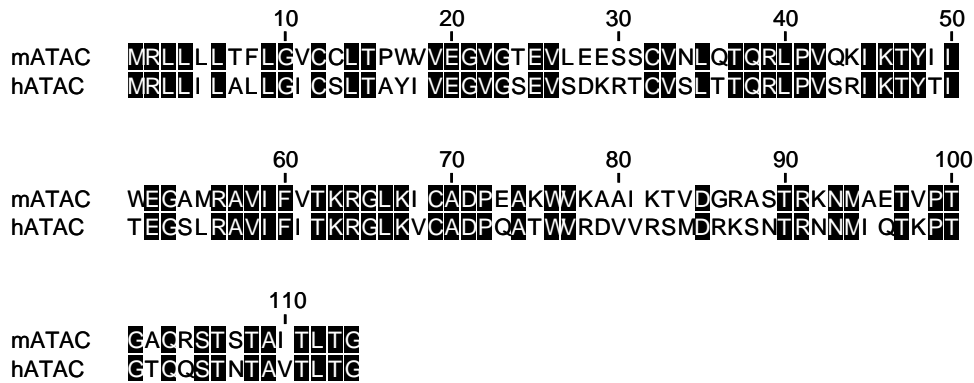


Abbildung 4: Aminosäure-Sequenz von ATAC in Maus und Mensch [Yoshida et al., 1995]

Die Aminosäure-Sequenzen von ATAC der Maus (mATAC) und die des Menschen (hATAC) sind vergleichend dargestellt. Der schwarze Hintergrund markiert konservierte Aminosäuren.

ATAC besitzt eine hohe Ähnlichkeit zu den C-C-Familien-Zytokinen MCP2 (37%), MIP-1 β (35%), MIP-1 α (33%) und Rantes (43%), jedoch wenige Ähnlichkeit zu Chemokinen der C-X-C Familie (z.B. nur 25% zu IL-8) [Müller et al., 1995; Yoshida et al., 1995] (Abb. 5).

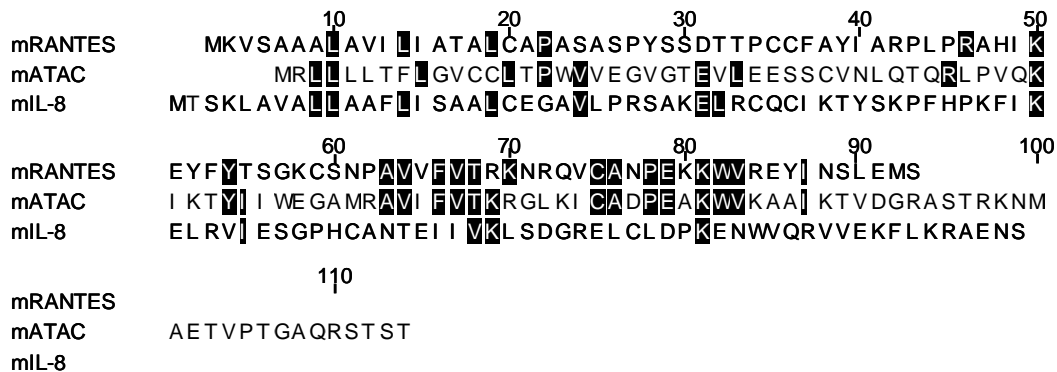


Abbildung 5: Ähnlichkeit der Aminosäure-Sequenz von ATAC zu C-C- und C-X-C-Chemokinen

mRantes steht stellvertretend für C-C-Chemokine, mATAC ist murines C-Chemokin, mIL-8 vertritt die C-X-C-Chemokine. Der schwarze Hintergrund markiert konservierte Aminosäuren.

1.4.2 Spezifischer ATAC Rezeptor: XCR1

Der einzige spezifische ATAC-Rezeptor wurde von Yoshida et al. 1998 zuerst in humanem Gewebe gefunden und nach der Chemokin-Rezeptor-Nomenklatur als XCR1 benannt [Yoshida et al., 1998].

Mittels Northern-Blot-Detektion wurde eine starke Expression des hXCR1-Proteins in der Plazenta, eine schwache Expression in der Milz und im Thymus

nachgewiesen [Yoshida et al., 1998]. Es wurde kein nachweisbares Signal von XCR1 in Blut, Herz, Gehirn, Lunge, Leber, Muskel, Niere, Darm, Eierstock und Bauchspeicheldrüse gefunden [Yoshida et al. 1998].

Kurze Zeit später wurde das murine XCR-1-Homolog (mXCR1) von Yoshida et al. identifiziert. Die chemotaktische Wirkung von ATAC wurde mit mXCR1-Transfektanten nachgewiesen [Yoshida et al., 1998].

mXCR1 besteht aus sieben transmembranen Regionen mit 71% Identität zu humanem XCR1 (hXCR1) und hat keine N-Glykosylierungsstellen (Abb. 6). Die beiden XCR1-Proteine enthalten einen hoch konservierten Bereich, HRYLSVV, der eine Variante des DRY-Motivs darstellt. Das DRY-Motiv ist ein konserviertes Motiv der Transmembrandomäne-III und an der Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren beteiligt. Der Austausch des DRY-Motiv durch HRYLSVV könnte daher die Aktivierung des G-Protein-gekoppeltes Rezeptors sowie die anschließende Signaltransduktion beeinträchtigen [Wilbanks et al., 2002].

```

                                          TM1
mXCR1  MES-----STAF--YDYHDKLSLLCENNVIFFSTISTIVL
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
hXCR1  MESSGNPESTTFYFDLQSQ---PCENQAWVFATLATTVL

                                          TM2
mXCR1  YSLVFLLSLVGNSLVLVWLVVKYENLESNTNIFILNLCLSD
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
hXCR1  YCLVFLLSLVGNSLVLVWLVKYESLESNTNIFILNLCLSD

                                          TM3
mXCR1  LMFSCLLPVLISAQW-SWFLGDFFCFFNMIFGISLYSSI
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
hXCR1  LVFACLLPVWISPYHWGWVLGDFLCKLLNMIFSISLYSSI

                                          TM4
mXCR1  FFLTIMTIHRYLSVVSPISTLGIHTLRCRVLVTSCVWAAS
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
hXCR1  FFLTIMTIHRYLSVVSPLSTLRVPTLRCRVLVTMAVWVAS

                                          TM5
mXCR1  ILFSIPDAVFHKVISLNCKYSEHHGFLASVYQHNIFLLS
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
hXCR1  ILSSILDITIFHKVLSSGCDYSELTWYLTSVYQHNLFFLLS

                                          TM6
mXCR1  MGIILFCYVQILRTLFRTRSRQRHRTVRLIFTVVVAYFLS
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
hXCR1  LGIILFCYVEILRTLFRSRSRKRRHRTVKLIFAIVVAYFLS

                                          TM7
mXCR1  WAPYNLTLFLKTGIIQQ---SCESLQQLDIAMIICRHLAF
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
hXCR1  WGPYNFTLFLQTLFRTQIIRSCEAKQQLEYALLICRNLAF

mXCR1  SHCCFNPVLYVFGVGIKFRRLKHLFQQVWLCR---KTSST
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
hXCR1  SHCCFNPVLYVFGVVKFRTHLKHVLRQFWFCRLQAPSPAS

mXCR1  VPCSPGTFTYEGPSFY
      : : : : : : : : : :
hXCR1  IPHSPGAFAYEGASFY

```

Abbildung 6: Die XCR1 Aminosäure-Sequenz in der Maus und im Menschen [Yoshida et al., 1999]

„TM1-7“ steht für transmembrane Fragmente und das Zeichen „-“ für fehlende Aminosäuren von mXCR1 im Vergleich zu hXCR1.

Mittels Northern Blot-Detektion wurde eine schwache Expression von mXCR1 in der Milz und Lunge, aber kein mXCR1-Signal in Herz, Gehirn, Leber, Nieren, Hoden und Muskeln nachgewiesen. In der Milz wurde durch RT-PCR eine starke mXCR1-Expression in CD8⁺ Zellen, ein schwaches Signal in

NK1.1⁺CD3⁺ Zellen, jedoch keine Expression in CD4⁺ Zellen, B-Zellen und Makrophagen beobachtet [Yoshida et al., 1998]. Später wurde die Expression von mXCR1 in T-Zellen, B-Zellen und Neutrophilen, aber nicht in DZ und Monozyten mittels RT-PCR von Cairns et al. nachgewiesen [Cairns et al., 2001; Huang et al., 2001]. Unsere Arbeitsgruppe zeigte ein eindeutiges XCR1-Signal mittels RT-PCR ausschließlich in den CD8⁺ DZ der Milz [Dorner und Opitz unpublizierte Daten]. Die Daten über XCR1-tragende Zellpopulationen scheinen zwischen verschiedenen Arbeitsgruppen widersprüchlich zu sein.

1.4.3 ATAC Funktionen

ATAC wird von aktivierten CD8⁺ T-Zellen, Th1-polarisierten CD4⁺ T-Zellen, $\gamma\delta$ T-Zellen, NK-Zellen und Mast-Zellen sezerniert [Kelner et al., 1994; Kennedy et al., 1995; Boismenu et al., 1996; Hautamaa et al., 1997; Hedrick et al., 1997].

Die genaue Funktion von ATAC ist bis jetzt noch unbekannt.

Zuerst fand Kelner et al., dass hATAC eine Chemotaxis von CD4⁻CD8⁻ Thymozyten *in vitro* induziert [Kelner et al., 1994]. Dagegen beobachtete unsere Gruppe keine chemotaktische Wirkung von rekombinantem, natürlichem, sowie chemisch synthetisiertem ATAC auf Zellen aus dem Thymus und T-Zellen aus dem Blut [Dorner et al., 1997]. Außerdem konnte unsere Gruppe eine Chemotaxis ausschließlich von CD8⁺ DZ, nicht von CD8⁻ DZ aus der Milz mittels chemisch synthetisiertes mATACs *in vitro* nachweisen [Opitz unpublizierte Daten].

Nach intensiver Untersuchung der chemotaktischen Wirkung von ATAC für verschiedene Lymphozyten-Populationen *in vitro* und *in vivo* waren die Ergebnisse allerdings kontrovers [Kelner et al., 1994; Kennedy et al., 1995; Müller et al., 1995; Giancarlo et al., 1996; Hedrick et al., 1996; Dorner et al., 1997; Yoshida et al., 1998; Kurt et al., 2001; Huang et al., 2001].

Außer der Chemotaxis-Prüfung wurde die ATAC-Expression in verschiedenen bakteriellen und viralen Maus-Infektionsmodellen untersucht [Vester et al., 1999].

Eine Studie mit *Listeria monocytogenes*-Infektion hat gezeigt, dass ATAC zusammen mit IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β und Rantes von NK-Zellen sezerniert wird und als Typ-1 Chemokin an der angeborenen Immunantwort beteiligt ist

(Abb. 7) [Dorner et al., 2002]. Die ATAC-Sekretion von NK-Zellen beginnt am ersten Tag und erreicht das Maximum am zweiten Tag. Vom dritten bis zum siebten Tag nach intraperitonealer Applikation von 4×10^3 cfu *Listeria* in BALB/c Mäuse nimmt die ATAC-Sekretion von NK-Zellen schnell ab [Dorner et al., 2002].

Im Rahmen der erworbenen Immunantwort werden ATAC und IFN- γ von $CD8^+$ T-Zellen sowie $CD4^+$ Th1-Zellen sezerniert (Abb. 7).

In vitro Stimulation mit PMA und Ionomycin zeigte eine ähnliche Korrelation zwischen ATAC und diesen Typ-1 Chemokinen in NK-Zellen, $CD8^+$ T-Zellen und $CD4^+$ Th1-Zellen [Dorner et al., 2002].

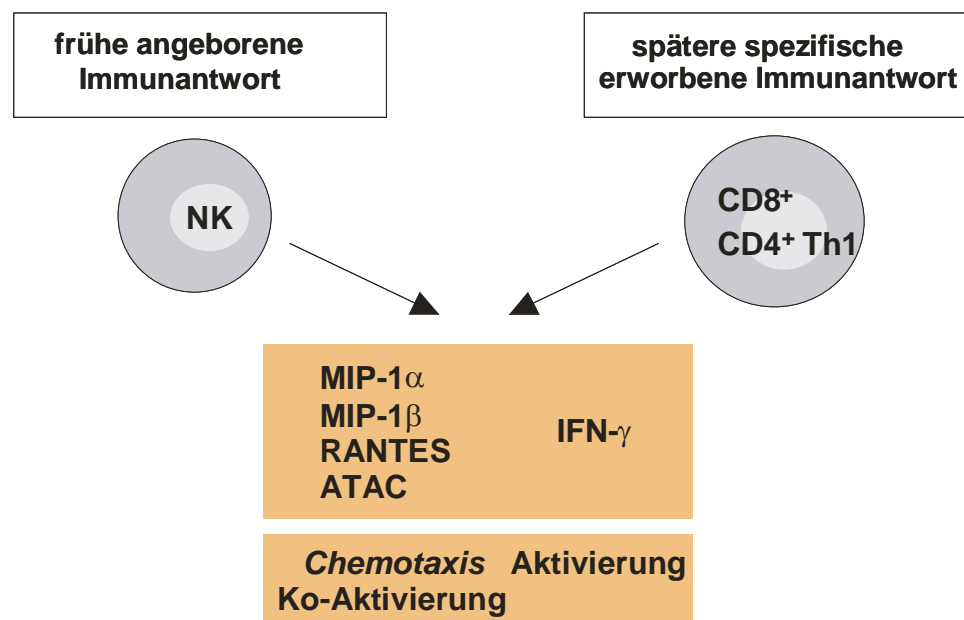


Abbildung 7: Die Ko-Sekretion von ATAC mit Typ-1 Chemokinen und IFN- γ in der *L.monocytogenes* Infektion [Dorner et al., 2002]

ATAC wird zusammen mit MIP-1 α/β , Rantes sowie IFN- γ sowohl von NK-Zellen (angeborene Immunantwort) als auch von aktivierten $CD8^+$ T-Zellen und einigen $CD4^+$ Th1-Zellen (erworbene Immunantwort) sezerniert.

Eine verstärkte ATAC-Expression wurde auch bei verschiedenen Autoimmunkrankheiten wie Morbus Crohn und Rheumatoide Arthritis beobachtet [Middel et al., 2001; Blaschke et al., 2003]. In einem Tumormodell führt die Ko-Injektion von ATAC-exprimierenden Fibroblasten und Tumorzellen zu einem reduzierten Tumorstadium [Cairns et al., 2001].

Da bisher die XCR1-tragende Zellpopulation nicht eindeutig definiert werden konnte, blieb die Funktion von ATAC unklar.

2. Zielsetzung der Arbeit

Die Funktion von ATAC *in vivo* war bisher unbekannt, bezüglich der XCR1-exprimierenden Zellpopulationen lagen in der Literatur widersprüchlichen Daten vor. Zu Beginn der Arbeit gab es in unserem Labor starke Hinweise, dass XCR1 ausschließlich in dendritischen Zellen exprimiert wird, welche auf ATAC chemotaktisch migrieren.

In der vorliegenden Promotionsarbeit sollte die folgende Hypothese geprüft werden:

„Das Chemokin ATAC stellt die Kommunikation zwischen aktivierten CD8⁺ T-Zellen und XCR1⁺ dendritischen Zellen her“.

Diese Hypothese sollte mit folgenden Arbeitsschritten geprüft werden:

1. Identifizierung aller XCR1-tragenden Zellpopulationen in der Milz
2. Analyse der Aktivierung und Differenzierung von ATAC-kompetenten und ATAC-defizienten CD8⁺ T-Zellen nach Antigenerkennung unter tolerisierenden und immunisierenden Bedingungen *in vivo*
3. Analyse der chemotaktischen Wirkung von ATAC *in vivo*
4. Umfassende Charakterisierung des Phänotyps von ATAC-defizienten Mäusen

3. Material und Methoden

3.1 Verwendete Geräte, Chemikalien und Materialien

3.1.1 Geräte

Tabelle 2: Verwendete Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Durchflusszytometer, LSRII	BD Biosciences
Zell-Sorter, Ariall	BD Biosciences
Guava PCA	Guava Technologies
Gelelektrophorese	BioRad, München
Laborzentrifuge	Heraeus, Hanau
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technology, Palo Alto, USA
Binokulares Mikroskop, Stemi 2000-C	Carl Zeiss, Jena
Nanodrop ND-1000 Spektrometer	NanoDrop Technologies, Wilmington, USA
Inkubator, BBD6220	Heraeus, Hanau
Pumpe P-1	Pharmacia Biotech

3.1.2 Chemikalien und Materialien

3.1.3 Puffer und Lösungen für SDS-Page

1×Laufpuffer: 25 mM Tris
 192 mM Glyzin
 0,1% SDS

Sammelgel: 4% Polyacrylamid (Biorad)
 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8
 0,1% SDS

Trenngel (14%): 14% Polyacrylamid (Biorad)

0,375 M Tris-HCl, pH 8,8

0,1% SDS

Färbelösung:

0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250 (w/v)

40% Methanol

10% Essigsäure

in MilliQ H₂O

Coomassie-Entfärbelösung:

40% Methanol

10% Essigsäure

in MilliQ H₂O

3.1.4 Lösungen für Western Blot und Detektion

1×PBST-Puffer:

136,89 mM NaCl

2,68 mM KCl

1,47 mM KH₂PO₄

8,05 mM Na₂HPO₄

0,1% Tween 20

pH 7,3

1×Blotting-Puffer:

48 mM Tris

39 mM Glyzin

0,037% SDS

20% Methanol

Blockierlösung:

2% Magermilch (w/v) in 1×PBST

Assay-Puffer:

0,1 M Diethanolamin

1 mM MgCl₂

CDP-Star Western Blot Detektion-Substrat für alkalische Phosphatase wurde von Perkin Elmer/ Applied Biosystem bezogen.

3.1.5 Puffer für Affinitätschromatographie

Bindungspuffer: 10 mM NaH₂PO₄
 10 mM Na₂HPO₄
 500 mM NaCl
 20 mM Imidazol
 pH 7,4

Waschpuffer: 10 mM NaH₂PO₄
 10 mM Na₂HPO₄
 500 mM NaCl
 20 mM-100 mM Imidazol
 pH 7,4

Elutionspuffer: 10 mM NaH₂PO₄
 10 mM Na₂HPO₄
 500 mM NaCl
 300 mM-500 mM Imidazol
 pH 7,4

3.1.6 Medien und Lösungen für die Bakterienkultur

LB Medium: (Luria Broth Base, GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland)

10 g Bacto-Trypton
5 g Bacto-Hefeextrakt
1 g NaCl
mit ddH₂O auf 1 L auffüllen
pH 7,0 (mit NaOH einstellen)
autoklavieren und bei 4°C lagern

SOB Medium: (Luria Broth Base, GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland)

20 g Bacto-Trypton
5 g Bacto-Hefeextrakt

1 g NaCl
mit ddH₂O auf 1 L auffüllen
pH 7,0 (mit NaOH einstellen)
autoklavieren
2,5 mM KCl und 10 mM MgCl₂ zugeben
bei 4°C lagern

Agarplatten: (Luria Broth Base/Select Agar, GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland)

10 g Bacto-Trypton
5 g Hefeextrakt
12 g Bacto-Agar
1 g NaCl
mit ddH₂O auf 1 L auffüllen
autoklavieren
Selektions-Antibiotikum zugeben
bei 4°C lagern

Die Selektion der Bakterienzellen erfolgte durch Zusatz von 25 µg/ml Kanamycin oder 100 µg/ml Ampicillin (Merck, Darmstadt, Deutschland).

3.1.7 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Kulturmedium für WT-300-19 Zellen (R10F⁺/β-ME/AS/Pyr):

10% fötales Kälberserum (FCS, Biochrom)
100 µg/ml Penicillin-Streptomycin
(Gibco/Invitrogen)
1 mM Natrium-Pyruvat (Gibco/Invitrogen)
1 mM nicht essentielle Aminosäuren
(Gibco/Invitrogen)
50 µM β-Mercaptoethanol
in RPMI 1640 (Biochrom KG, Berlin)

Kulturmedium für OVA-300-19 Zellen:

1 mg/ml G418 in R10F⁺/β-ME/AS/Pyr-Medium

3.1.8 Lösungen für die Zellisolierung und FACS

ACK-Erythrozyten-Lysepuffer:	0,155 M NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 0,1 mM EDTA pH 7,2-7,4 bei 4°C lagern
FACS-PBS:	2,5% (v/v) FCS 0,1% (v/v) NaN ₃ in PBS
50×Fc-Block:	1 mg/ml anti-CD16/CD32 (Klon 2.4G2) 0,5 mg/ml Ratten IgG (Nordic, Tilburg) in PBS
1×Saponin-FACS-PBS:	0,5% Saponin (w/v) in FACS-PBS
MACS-PBS:	2 mM EDTA 0,5% BSA (Fraktion V, Endotoxingehalt <1 EU/mg, PAA Laboratories GmbH, Cölbe) In PBS
DAPI-Lösung:	100 µM für FACS-Analyse

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den folgenden Firmen bezogen:

Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), GIBCO BRL (Eggenstein, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roche (Mannheim, Deutschland) und Biomol (Hamburg, Deutschland).

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Quantitative Reverse-Transkriptions-PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Mages durchgeführt. Für die Isolierung von RNA wurden bis zu 4×10^6 Zellen in 200 µl DEPC-PBS resuspendiert und mit 400 µl Lysepuffer (Roche) versetzt. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C

aufbewahrt. Die Präparation der RNA erfolgte nach Herstellerangaben mit dem High Pure RNA Isolation Kit (Roche) unter Verwendung von RNase-freien Spitzen und Eppendorfgefäßen. Die Konzentration und Reinheit von RNA wurde mit dem Nanodrop ND-1000 Spektrometer (Peqlab) ermittelt. Die Messung der RNA-Integrität erfolgte mittels des Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies).

Für die Expressionsanalyse von XCR1 wurde zuerst cDNA aus jeweils 1 µg RNA mit Hilfe von Hexamer Primern und dem AMV-Reverse-Transkriptions-System (Promega) hergestellt. Die cDNA wurde mit Hilfe der quantitativen RT-PCR (qRT-PCR) analysiert. Dafür wurden zwei unterschiedliche Primersätze verwendet, welche entweder Exon 1 und 2 von XCR1 (für Gesamt-RNA, Tab. 3) oder nur Exon 2 (für Poly(A)-mRNA, Tab. 4) amplifizieren.

Tabelle 3: Primer für XCR1 von Gesamt-RNA

Primer	Sequenz (5'-3')
Xcr-1 F1	CCTACGTGAAACTCTAGCACTGG
Xcr-1 R1	AAGGCTGTAGAGGACTCCATCTG
Xcr-1 Probe, P1	FAM-TACAGACTTGAAACCC -MGB

Tabelle 4: Primer für XCR1 von Poly(A)-RNA

Primer	Sequenz (5'-3')
Xcr-1 F2	TGCCTGTGTTGATCTCAGCAC
Xcr-1 R2	CGGTGGATGGTCATGATGG
Xcr-1 Probe, P2	FAM-CATCAGCCTCTACAGCAGCATCTTCTTCTTCCT-TAMRA

Zur Generation eines Standards für die Quantifikation wurde das spezifische Fragment von XCR1 amplifiziert und in pJET 1.2 einkloniert mittels CloneJET PCR cloning Kit (Fermantas)

Die qPCR erfolgte mit einem Stratagene Mx3000P QPCR-System (Stratagene) durch zuerst eine Enzyme-Aktivierung für 15 min bei 95°C und anschließend

40 Zyklen (15 s 95°C und 1 min 60°C). Die Analyse wurde mit der SDS Software v2.1 (Applied Biosystems) vorgenommen.

3.3 Expression von rekombinantem ATAC

Die Kultur von *E.coli*, Herstellung hitzekompetenter *E.coli* und Hitzeschock-Transformation von *E.coli* erfolgte nach Standardanleitungen von Sambrook et al., 1989. Die Aufreinigung von Plasmid-DNA in größerem Maßstab (Maxiprep) erfolgte mit dem Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers.

3.3.1 Generierung des Expressionsvektors

Zur Expression von ATAC wurden zwei Vektoren verwendet: pET-SUMO-mATAC (Abb. 8 A.) und TAGzyme-mATAC (Abb. 8 B.), die von Dr. Hans-Werner Mages und Steffen Güttler nach Standardprotokollen kloniert wurden.

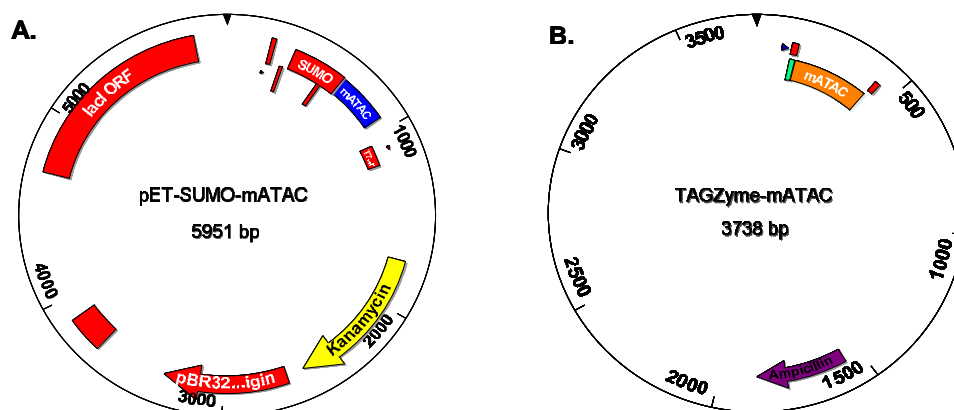


Abbildung 8: Plasmid für die Expression von mATAC in *E.coli*

- A. pET-SUMO-mATAC
- B. TAGzyme-mATAC

Der *E.coli*-Stamm BL21 wurde mit dem Plasmid pET-SUMO-mATAC transformiert. Damit wurden ATAC-Proteine mit N-terminalem Hexa-His-Tag in *E.coli* produziert. Aus einer Vorkultur wurden 200 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin angeimpft (1:50) und weiter über Nacht bei 37°C, 250 U/min schüttelnd inkubiert. Die Übernachtskultur wurde anschließend in eine 2 Liter Kultur mit entsprechendem Selektions-Antibiotikum (50 µg/ml Kanamycin) überführt, die bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8–1,0 inkubiert wurde. Die Induktion der

SUMO-ATAC-Expression erfolgte durch Zugabe von 2 mM Isopropylthiogalaktosid (IPTG) (Biomol, Hamburg). Danach wurde 3 h weiter inkubiert. Abschließend wurde die Bakterienkultur zentrifugiert (4000×g, 20 min), die Bakterienpellets gewogen und bis zum Zellaufschluss bei -70°C gelagert.

Alternativ wurden das Plasmid TAGzyme-mATAC in den *E.coli*-Stamm M15 zur ATAC-Expression transformiert. Die Bakterien wurden mit Selektions-Antibiotikum (100 µg/ml Ampicilin) in LB-Medium kultiviert.

Die Expression von ATAC-Proteinen wurde durch SDS-Polyacrylamidgel (SDS-Page) kontrolliert.

3.3.2 Affinitätsreinigung von ATAC

Nach der Kontrolle der induzierten Proteinexpression durch SDS-Page wurden die pET-SUMO-mATAC kodierten Proteine weiter aufgereinigt.

Die Reinigung erfolgte durch Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie [Hochuli, 1990] mit einer 1 ml Nickel-Sepharose-Säule nach den Angaben des Herstellers (GE Healthcare).

Die Bakterien einer 400 ml Kultur (aus 3.3.1) wurden in 20 ml Bindungspuffer mit 1 mg/ml Lysozym und 10% Glycerol resuspendiert. Nachfolgend wurden die Bakterien in flüssigem Stickstoff eingefroren und schnell bei 37°C aufgetaut. Danach wurde das Lysat zweimal zentrifugiert (12000×g, 15 min, 4°C). Währenddessen wurde die Nickel-Sepharose-Säule an einer Pumpe (P-1, Pharmacia Biotech) angeschlossen und durch Äquilibrieren in 10 ml Bindungspuffer vorbereitet. Nach Filtration durch einen 0,45 µm Filter wurde der Überstand mit 1-2 ml/min über die Säule geführt. Nachfolgend wurde die Säule mit einem Imidazol-Gradient (40 mM-100 mM) gewaschen. Die Elution von Hexa-Histin-SUMO-ATAC erfolgte durch 300 mM Imidazol sowie 500 mM Imidazol. Dabei wurden 1 ml große Fraktionen gesammelt und die Proteinkonzentration über OD₂₈₀ im Photometer bestimmt. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden mittels 14%iger SDS-Page untersucht.

Der Imidazol-haltige Puffer wurde mit Hilfe von PD10-Säulen gegen einen SUMO-Protease Puffer ausgetauscht. Die Spaltung von SUMO-ATAC erfolgte mittels spezifischer SUMO-Protease (Invitrogen) (100-150 Einheiten SUMO-

Protease/1 mg SUMO-ATAC-Protein, 30°C, 18 h). SUMO, SUMO-ATAC und die SUMO-Protease wurden durch Bindung an Ni-NTA-Matrix entfernt. Nach Zentrifugation des Durchlaufs (500×g, 5 min) befanden sich die ATAC-Proteine in dem Überstand. Die Probe wurde mittels Western Blot mit anti-mATAC- und anti-Hefe-SUMO-Antikörper analysiert.

3.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Expression von ATAC wurde durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) [Laemmli, 1970], untersucht. Die Elektrophorese erfolgte in Mini Protean II-Kammern (BioRad). Die Proteinproben wurden in Protein-Probenpuffer aufgenommen und vor dem Auftragen 5 min bei 95°C erhitzt. Die Proteine wurden im Sammelgel bei 100 V und dann im 14%igem Trenngel bei 140 V aufgetrennt. Für die Größenbestimmung wurde ein Proteinstandard verwendet. Die aufgetrennten Proteine wurden durch Coomassie Blau gefärbt. Die Acrylamid-Gele wurden für ca. 30 min in Färbelösung geschwenkt und der überschüssige Farbstoff anschließend durch Waschen in Entfärbelösung entfernt.

3.3.4 Western Blot

Beim Blotten wurden die Proteine eines SDS-Pages auf eine Nitrocellulosemembran transferiert, analog der von Towbin [Towbin et al., 1979] beschriebenen Methode. Das Blotten wurde in einer Semi-Dry-Blot-Apparatur (Biorad) mit 0.8 mA/cm² für 1 h durchgeführt. Nach dem Blotten wurde die Membran 1 h in 4% Magermilch/PBS-Lösung inkubiert, um die restlichen Proteinbindungsstellen abzusättigen. Danach wurde die Membran über Nacht mit primärem Antikörper bei 4°C inkubiert. Nach drei-maligem 15 min Waschen in PBST, wurde die Membran weiter mit Biotin-gekoppeltem sekundärem Antikörper für 1 h (verdünnt in 4% Magermilch/PBST Lösung) inkubiert. Nach weiteren Waschschritten mit PBST wurde die Membran 30 min mit alkalische Phosphatase-gekoppelten anti-Biotin-Antikörpern inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBST und zwei-maligem 5 min Waschen in Reaktionspuffer erfolgte der Nachweis durch eine Chemilumineszenzreaktion mit dem Substrat CDP-Star (PerkinElmer) (5 min, RT).

3.3.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

3.3.5.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur schnellen Bestimmung der Proteinmenge wurde die Färbung nach Bradford verwendet [Bradford, 1976]. Die Färbung beruht auf einer Farbveränderung von Coomassie Brilliant Blue G250 in Richtung Blau nach Bindung an Proteine. Die Bradford-Stammlösung (BioRad Protein Assay) wurde 1:5 in Wasser verdünnt. 10 µl dieser Bradford-Arbeitslösung und 50 µl der zu testenden Proteinlösung wurden in einer 96er-Rundbodenplatte gemischt. Die Messung erfolgte photometrisch bei 595 nm im Konzentrationsbereich 10–200 µg/ml unter Zuhilfenahme einer Kalibriergeraden von BSA bekannter Konzentration. Auf diese Weise konnte die Proteinkonzentration bestimmt werden.

3.3.5.2 Proteinbestimmung durch Messung der Absorption bei 280 nm

Zur genauen Bestimmung der Proteinkonzentration wurde im Photometer die Absorption bei 280 nm gemessen. Durch Messung bei 260 nm konnten Verunreinigungen durch Nukleinsäuren ausgeschlossen werden. Die Proteinkonzentration von ATAC berechnete sich nach folgender Formel:

$$[1 \text{ OD}_{280} = 0,77 \text{ mg/ml ATAC}]$$

3.4 Zellbiologische Methoden

3.4.1 Kultivierung von permanenten Zelllinien

Die Kultivierung von Zelllinien WT-300-19 und OVA-300-19 erfolgte im Begasungsbrutschrank in gesättigter Wasserdampf-atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂. Als Zellkulturmedien wurde R10F⁺/β-ME/AS/Pyr für WT-300-19 und R10F⁺/β-ME/AS/Pyr mit 1 mg/ml G418 für OVA-300-19 verwendet. Das FCS wurde vor der Verwendung 45 min bei 56°C hitzeinaktiviert. Für die Kultivierung wurde Zellkulturflaschen (Greiner) verwendet. Die Zellzahl wurde nach Färbung mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zur Aufbewahrung wurden Zellen in der Log-Phase mit 40% FCS/10% DMSO langsam auf -70°C abgekühlt und danach in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.4.2 Isolation von murinen Splenozyten aus der Milz

Einzelne Milzen wurden mit dem Stempel einer 2 ml Spritze (Braun, Melsungen) durch ein 70 µm Sieb in PBS gedrückt. Nachfolgend wurde die Zellsuspension zentrifugiert (380×g, 4°C, 8 min). Zur Lyse der Erythrozyten wurde das Zellpellet in 5 ml ACK-Puffer bei RT resuspendiert. Exakt nach 1 min wurde die Lyse durch Zugabe von 45 ml PBS gestoppt. Die Zellen wurden nach Zentrifugation je nach Versuch in PBS oder in Medium R10F⁺/β-ME resuspendiert.

Die Anzahl der Zellen wurde mittels des Zellzählgeräts Guava[®] PCA bestimmt. Die Zellen wurden vor der Messung mit Viacount Reagenz (2,5 µg/ml LDS-751, 1 µg/ml Propidiumiodid, 5 mM EDTA, 0,05% NaN₃ in PBS, pH 7,2) für 3-5 min inkubiert. Anschließend wurde die Anzahl lebender, nukleärer Zellen gemessen und durch ViaCount Software ermittelt.

3.4.3 Aktivierung von T-Zellen *in vitro*

Zur Aktivierung von OT-I-Zellen wurden 2×10⁶ Milzzellen/ml mit 50 ng/ml OVA-Peptid (OVA₂₅₇₋₂₆₄) in Medium R10F⁺/β-ME in einer 6-Loch-Platte bei 37°C inkubiert. Zur Bestimmung der Produktion von Zytokinen wurde zusätzlich 5 µM Brefeldin A zugegeben, welches den Transport von produzierten Proteinen aus Zellen blockiert.

Die OT-I-Zellen oder endogene T-Zellen von C57BL/6 Mäusen wurden alternativ mit 200 ng/ml PMA und 2 µM Ionomycin bei 37°C für 4,5 h stimuliert.

Für RNA-Isolierungen wurden Milzzellen von C57BL/6 Mäusen nach FACS-Sortierung mit verschiedenen Reagenzien stimuliert. Die Stimulationsbedingungen werden in Tab. 5 beschrieben.

Tabelle 5: Die Aktivierung von verschiedenen reinen Zellpopulationen

B-Zellen (2×10 ⁶ /ml)	10 µg/ml anti-mCD40 (Klon FGK) und 5 µg/ml LPS für 48 h
CD4 ⁺ T-Zellen (1×10 ⁶ /ml)	0,5 µg/ml anti-mCD3 (mAb145-2C11) und 4 µg/ml anti-CD28 (mAb37.51) für 3 Tage

CD8 ⁺ T-Zellen (1×10 ⁶ /ml)	wie bei CD4 ⁺ T-Zellen
NK-Zellen (0,32×10 ⁶ /ml)	1600 U/ml mL-2 für 48 h

Die Stimulation erfolgte im Begasungsbrutschrank in gesättigter Wasserdampf-atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂.

3.4.4 Isolierung von murinen Zellen aus Lymphknoten

Die Lymphknoten wurden nach Entnahme immer auf Eis gelagert. Die Organe wurden durch ein 70 µm Nylon-Zell-Sieb in 2 ml MACS-PBS, das zusätzlich 20 µg/ml DNaseI enthielt, gedrückt. Die Lymphknotenzellen wurden nach Zentrifugation (380×g, 8 min bei 4°C) in 500 µl FACS-PBS resuspendiert, nochmals durch ein 70 µm Sieb gefiltert, und dann mit 1 ml FACS-PBS gespült. Die Zellzahl wurde wie für Milzzellen mit dem Guava[®] PCA bestimmt.

3.4.5 Isolierung von murinen Zellen aus Lebern

Die Leber wurde nach Entnahme zerkleinert und nachfolgend in 5 ml RPMI 1640 mit 2% FCS, 250 µg/ml Kollagenase D und 20 µg/ml DNaseI bei 37°C für 25 min schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden nach Zugabe von 10 mM EDTA für weitere 5 min bei 37°C inkubiert. Die Stücke der Leber wurden durch ein 70 µm Nylon-Zell-Sieb in PBS gedrückt und zentrifugiert (380×g, 8 min bei 4°C). Der Überstand wurde durch eine Pipette mit Vorsicht abgenommen. Die Leberzellen im Pellet wurden in einem Gemisch bestehend aus 6 ml R10F⁺ und 3 ml Percoll (GE Healthcare) resuspendiert und zentrifugiert (778×g, 4°C ohne Bremse). Das Pellet wurde mit 20 ml MACS-PBS mit 2 mM EDTA einmal gewaschen. Nachfolgend wurde das Zellpellet zur Lyse der Erythrozyten in 5 ml ACK-Puffer für 1 min bei RT gut resuspendiert, mit 45 ml PBS gestoppt und zentrifugiert. Die Anzahl der Zellen wurde mittels Guava[®] PCA ermittelt.

3.4.6 Isolierung von murinen Zellen aus Lungen

Lungen wurden zu Brei zerkleinert und in 3 ml RPMI 1640 mit 0,5% BSA, 500 µg/ml Kollagenase D und 20 µg/ml DNaseI für 25 min bei 37°C schüttelnd inkubiert. Nach Zugabe von 10 mM EDTA wurden die Zellen 5 min weiter bei 37°C inkubiert und anschließend durch ein 70 µm Nylon-Zell-Sieb in PBS gedrückt und zentrifugiert. Nach 1 min Lyse der Erythrozyten in 4 ml ACK-

Puffer bei RT wurden die Zellen zentrifugiert und in 4 ml FACS-PBS resuspendiert. Die Zellzählung wurde mittels Guava[®] PCA in einer Verdünnung von 1:20 durchgeführt.

3.4.7 Isolierung von murinen Zellen aus dem Knochenmark

Das Knochenmark wurde mit 5-10 ml PBS aus zwei hinteren Oberschenkelknochen von Mäusen ausgespült. Nach Zentrifugation wurden die Knochenmarkszellen 30 s in 4 ml ACK-Puffer bei RT resuspendiert, danach werden 46 ml PBS zum Abstoppen zugegeben und zentrifugiert (380×g, 8 min bei 4°C). Danach wurden die Zellen in 2 ml PBS resuspendiert und mittels Guava[®] PCA gezählt.

3.4.8 Anreicherung von T-Zellen mittels Nylonwolle

Während B-Zellen und Monozyten bei 37°C und in FCS-haltigem Medium fest an Nylonwolle hafteten, binden T-Zellen nicht an Nylonwolle. Damit wurden die T-Zellen aus Milzzellen angereichert [Eisen et al., 1972].

Die Nylonwolle (PolySciences, Nylon wool Fibre) wurde vorher in 0,1 M HCl gewaschen und anschließend mit destilliertem Wasser gründlich gespült. Für eine Nylonwoll-Säule, welche maximal 600×10^6 Milzzellen filtern kann, wurde 3 g trockene Nylonwolle mit Bürsten aufgelockert und in eine 50 ml Plastikspritze (BD, Bedford USA) bis zu 20 ml-Höhe gestopft und anschließend autoklaviert. Zur Anreicherung der T-Zellen wurde ein 2-Wege Sperrhahn an die Spitze der Säule angebaut. Die Säule wurde zuerst mit PBS und anschließend mit 37°C vorgewärmtem R10F⁺/β-ME/AS/Pyr Medium equilibriert. Nachfolgend wurden die Milzzellen in 10 ml R10F⁺/β-ME/AS/Pyr Medium auf die Säule gegeben und mit einer Geschwindigkeit von 1 Tropfen/s über die Säule geführt. Danach wurden wieder 6 ml R10F⁺/β-ME/AS/Pyr auf die Säule gegeben und in Säule einlaufen lassen. Danach wurde die Säule verschlossen, mit zusätzlich 4 ml R10F⁺/β-ME/AS/Pyr überschichtet und bei 37°C für 45 min inkubiert. Zur Elution wurde 90 ml 37°C warmes R10F⁺/β-ME/AS/Pyr Medium durch die Säule gespült, an die vorher eine stumpfe 21 G Kanüle angebracht wurde. Der Durchlauf wurde als T-Zellen-enthaltende Suspension gesammelt und nach einer 1:5 Verdünnung die Zellzahl bestimmt. Der Prozentsatz von T-Zellen war abhängig von der Ausgangsfrequenz an

Milzzellen. Normalerweise wurde die Frequenz von T-Zellen durch diese Prozedur verdoppelt, da die B-Zellen entfernt wurden.

3.4.9 Gewinnung von Dendritischen Zellen aus Milzen

DZ sind eine kleine Population (1-2%) der Milzzellen. Um die Ausbeute von DZ zu erhöhen, wurde die Milz mit Kollagenase verdaut. Zuerst wurden 10 Milzen in 1-2 mm Stücke zerkleinert und dann in 20 ml RPMI 1640 mit 2% FCS, 500 µg/ml Kollagenase D und 20 µg/ml DNase I pro Milz bei 37°C für 25 min in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 10 mM EDTA wurde für weitere 5 min inkubiert. Danach wurden die Stücke der Milz durch ein 212 µm Metall-Sieb in PBS gedrückt und dann, wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben, die Erythrozyten lysiert und die Zellen nach Zentrifugation in 5 ml MACS-PBS resuspendiert. 20 ml Nycodenz-Lösung (17,5 ml NycoPrep 1,077 g/ml plus 2,5 ml PBS) mit einer Dicht von 1,096 g/ml wurde mit dieser Zellsuspension überschichtet. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (762×g, 4°C, 20 min, ohne Bremse). Nach Ausbildung des Gradienten wurde die Oberschicht und Interphase mit Vorsicht abgenommen und mit 80 ml MACS-PBS gewaschen. Nach Nycodenz-Anreicherung war der prozentuale Anteil der DZ bis auf 6-10% angestiegen. Die weitere Anreicherung von DZ erfolgte durch magnetische Sortierung mit anti-CD11c-Magnetpartikeln. Danach lag die Reinheit der CD11c⁺ DZ bei 90%.

3.4.10 Anreicherung von Milzzellen durch magnetische Zellsortierung (MACS)

Die MACS-Technik basiert auf die Markierung von Zellpopulationen mittels Antikörper-gekoppelten magnetischen Partikeln. Sie ermöglicht, die Ziel-Zellpopulation mit einem Magneten zu sortieren [Miltenyi et al., 1990].

Die Zellsuspension wurde nach den Herstellerangaben (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) mit den Antikörper-gekoppelten magnetischen Partikeln inkubiert. Die Markierung von 200×10^6 Zellen erfolgte in 800 µl MACS-PBS plus 100 µl 10×Fc-Block und 100 µl magnetische Partikel (Tab.6). Alternativ wurde auch die indirekte Markierung anhand Biotin-markierter Antikörper und anschließender Inkubation mit anti-Biotin-Magnetpartikeln durchgeführt. Nach der Äquillibrierung mit PBS wurden die Zellen über eine magnetisierte Säule (LS-Säule, Miltenyi Biotec) gegeben. Dadurch blieben die mit Magnetpartikeln

markierten Zellen an der Säule haften und die anderen Zellpopulationen wurden ausgewaschen. Nach dreimaligem Waschen mit jeweils 3 ml MACS-PBS wurden unspezifisch gebundene Zellen entfernt. Danach wurde die Säule aus dem Magneten entnommen und mit 5 ml MACS-PBS die spezifisch gebundenen Zellen eluiert. Die Reinheit der sortierten Zielzellen wurde in der Durchflusszytometrie überprüft.

Neben der positiven Sortierung wurden die Zellen durch negative Sortierung angereichert. Hierbei wurden einige Zellpopulationen mit Hilfe von magnetischen Partikeln entfernt. Die Zellen wurden in Durchlauf angereichert.

Die eingesetzten Antikörper-gekoppelten magnetischen Partikeln (Miltenyi Biotec) werden in der folgenden Tabelle beschrieben.

Tabelle 6: magnetische Partikeln für die Zellsortierung

gereinigte Zellpopulation	Antikörper-gekoppelte magnetische Partikeln (beads)	Klon
B-Zellen	anti-CD19-Biotin + anti-Biotin-beads	1D3
Dendritische Zellen	anti-CD11c-beads	N418
NK-Zellen	anti-CD49b-beads	DX5
T-Zellen	anti-CD3-beads	KT3

3.4.11 Zellproliferations-Assay

Mit Hilfe von 5,6-Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester (CFSE, Invitrogen), einem fluoreszierenden Farbstoff, welcher Zellmembranen leicht durchdringen kann, wurden die zu transferierenden Zellen markiert. Innerhalb der Zelle werden die lipophilen Gruppen des CFSE-Moleküls von unspezifischen Esterasen abgespalten. Der entstandene 5,6-Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester kann die Zelle nur noch sehr langsam verlassen und wird bei der Zellteilung zu gleichen Teilen an die Tochterzellen weitergegeben. Die Färbung der Zellen erfolgte in einer 5 µM CFSE-Lösung

(5×10^7 Zellen/ml in PBS + 0,1% BSA) für 10 min bei 37°C. Die Analyse erfolgte am BD LSRII Durchflusszytometer. Durch die kontinuierliche Abnahme des CFSE-Signals konnten bis zu 7 Proliferationszyklen nachvollzogen werden.

3.4.12 Apoptose-Assay

Früh-apoptotische Zellen tragen das Molekül Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche und lassen sich noch nicht mit DAPI anfärben [Vermes et al., 1995]. Früh-apoptotische Zellen können deswegen durch Anfärben mit Annexin-V unter Ausschluss DAPI-positiver Zellen detektiert werden.

Aufgrund der Ca^{2+} -Abhängigkeit der Bindung wurde die Inkubation mit Annexin-V-Cy5 oder -PE (BD Biosciences bzw. Invitrogen) nach der Oberflächenfärbung in 10 mM HEPES (140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2 , 0,01% NaN_3 , pH 7,4) bei RT vorgenommen. Die $\text{DAPI}^{\text{niedrig}}\text{Annexin-V}^{\text{hoch}}$ Zellen wurden in die Analyse miteinbezogen.

3.5 Durchflusszytometrie

Die Messung der Zellen im Durchflusszytometer beruht darauf, dass die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Zellen von einem Laserstrahl erfasst werden. Es bietet die Möglichkeit die Proteinexpression sowohl auf der Zelloberfläche als auch intrazellulär auf Einzelzellebene zu analysieren [Radbruch, 2000]. Außerdem lässt sich, unabhängig von den gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen, eine Aussage über die Größe und Granularität der Zelle treffen.

Eine durchflusszytometrische Messung umfasst Zellmarkierung, Kompensation und Messung der Proben im Durchflusszytometer sowie Auswertung der Messergebnisse mittels FlowJo-Software (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA).

3.5.1 Zellmarkierung

Die zu untersuchenden Zellen wurden sowohl auf der Oberfläche als auch intrazellulär markiert. Die spezifische Markierung erfolgte entweder mit direkt markierten Antikörpern (direkte Markierung) oder mit unmarkierten Primärantikörpern und markierten Sekundärantikörpern (indirekte Markierung).

3.5.1.1 Markierung von Oberflächenantigenen

Die verschiedenen Zellpopulationen, z.B. aus der Milz wurden durch mehrere Antikörper typisiert. Die Zellen wurden, wie in Abschnitten 3.4.2-10 beschrieben, vorbereitet. Für die Färbung wurden $0,3-1 \times 10^6$ Zellen in einer 96er-Rundbodenplatte (Nunc) zentrifugiert ($360 \times g$, 5 min bei $4^\circ C$). Zum Absättigen unspezifischer Bindungen wurden die Zellen mit $1 \times Fc$ -Block inkubiert (5 min, $4^\circ C$). Anschließend wurden die Zellen mit in FACS-PBS verdünnten Antikörpern für 20 min auf Eis inkubiert. Nach Inkubation mit den primären Antikörpern waren die Zellen nach 2-maligem Waschen mit $200 \mu l$ FACS-PBS zur Messung im Durchflusszytometer bereit. Wenn Antikörper mit Biotin oder Digoxigenin (Dig) gekoppelt waren, wurden die Zellen nach dem Waschen mit in FACS-PBS verdünnten anti-Biotin (5 min) oder anti-Dig (10 min) auf Eis inkubiert und anschließend zweimal in FACS-PBS gewaschen.

In dieser Arbeit verwendeten Antikörper zur Oberflächenmarkierung sind in Tab. 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Antikörper

Antigen	Klon	Quelle	Referenz
CD3	KT3	Hybridom	Tomonari, 1988
CD4	GK1.5	Hybridom	Dialynas et al., 1983
CD4	YTS 191.1	Hybridom	ECACC:87072282
CD8	53-6.72	Hybridom	Ledbetter et al., 1980
CD11b	5C6	Hybridom	Rosen et al., 1987
CD11c	N418	Hybridom	Metlay et al., 1990
CD19	1D3	Hybridom	Krop et al., 1996
CD25	2E4	Hybridom	Ortega et al., 1984
CD27	LG.7F9	eBiosciences	Gravestain LA et al., 1995
CD28	37.51	Hybridom	Gross et al., 1992
CD40	FGK	Hybridom	Rolink et al., 1996
CD44	IM7.8.1	Hybridom	ATCC:HB-132
CD45R (B220)	RA3-6B2	Hybridom	Coffman, 1982
CD62L	MEL-14	Hybridom	Gallatin et al., 1983

CD69	H1.2F3	eBiosciences	Yokoyama et al., 1988
CD70 (CD27L)	FR70	eBiosciences	Oshima et al., 1998
CD80	16-10A1	Hybridom	Razi-Wolf et al., 1992
CD86	GL1	Hybridom	Hathcock et al., 1993
CD90.1	OX-7	Hybridom	Lorber et al., 1983
CD95	15A7	eBiosciences	Yonehara et al., 1999
CD103	2E7	eBiosciences	Lefrancois et al., 1994
CD137 (4-1BB)	17B5	eBiosciences	eBiosciences
CD137L(4-1BBL)	TKS-1	eBiosciences	Akiba et al., 2000
CD154 (CD40L)	MR1	BD Biosciences	BD Biosciences
CD205	NLDC-145	Hybridom	Kraal et al., 1986
SIINFEKL-H-2K ^b	25-D1.16	Hybridom	Porgador et al., 1997
Vα2-TZR	B20.1	eBiosciences	Gregoire et al., 1981
Vβ5-TZR	MR9-4	BD Biosciences	Kanagawa et al., 1991
Ly6G/C (Gr-1)	RB6-8C5	Hybridom	Fleming et al., 1993
MHCII	M5/114.15.2	Hybridom	Bhattacharya et al., 1981
F4/80	F4/80	Hybridom	Austyn et al., 1981
NK1.1	PK136	Hybridom/eBiosciences	Koo et al., 1984
DX5 (CD49b)	DX5	eBiosciences	Hussel et al., 1998
PDCA-1 (CD137)	eBio927	eBiosciences	Blasius et al., 2006
CCR7 (CD197)	4B12	eBiosciences	Ritter et al., 2004
PD-1 (CD279)	J43	eBiosciences	Agata et al., 1996
PD-L1	MIH5	eBiosciences	Dong et al., 1999
PD-L2	TY25	eBiosciences	Latchman et al., 2001
BTLA	mBT-1622	Hybridom	Gurka, unpublizierte Daten
ICOS	MIC-2043	Hybridom	Burmeister et al., 2008
HVEM	mHV-1411	Hybridom	Worbs, unpublizierte Daten

Die Angabe „Hybridom“ steht für laboreigene Hybridome, aus deren Kulturüberstand die Antikörper aufgereinigt wurden. Die Angabe „eBiosciences“/„BD Biosciences“ stehen für die kommerziell verwendeten Antikörper von den entsprechenden Firmen.

3.5.1.2 Markierung von intrazellulären Antigenen

Die Messung von intrazellulären Proteinen erfolgte durch intrazelluläre Durchflusszytometrie (iFACS) [Suni et al., 1998; Annunziato et al., 2000; Dorner et al., 2003]. Für die intrazelluläre Zytokinfärbung wurden die Zellen für 3-5 h mit 5 µg/ml Brefeldin A (Sigma-Aldrich) inkubiert [Klausner et al., 1992; Dinter et al., 1998]. $0,5-6 \times 10^6$ Zellen wurden zuerst an ihrer Oberfläche, wie in Abschnitt 3.5.1.1 beschrieben, markiert. Nach Waschen mit PBS erfolgte die Markierung von toten Zellen durch Inkubation mit 0,67 µM Pacific Orange Succinimidyl Ester (Invitrogen, P-30253) (25 min auf Eis). Nach Zentrifugation wurden die Zellen in PBS resuspendiert und anschließend in 2% Formaldehyd in PBS (20 min, RT) fixiert. Danach wurden die Zellen in FACS-PBS mit 0,5% Saponin und den jeweiligen Antikörpern (20 min, auf Eis) inkubiert, mit 0,5% Saponin in FACS-PBS gewaschen und bis zur Färbung in FACS-PBS bei 4°C gelagert. Die verwendeten Antikörper zur Intrazellulären Markierung sind in Tab. 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Antikörper für intrazelluläre Färbung

Antigen	Klon	Quelle	Referenz
ATAC	MTAC-311	Hybridom	Opitz, unpublizierte Daten
IFN-γ	AN18.17.24	Hybridom	Prat et al., 2003
TNF-α	MP6-XT22	BD Biosciences	Hunter, 1994
IL-2	JES6-5H4	Hybridom	Abrams, 1992
Bcl-2	3F11	BD Biosciences	BD Biosciences

Das intrazelluläre FoxP3 wurde nach Permeabilisierung und Fixierung der Zellen nach Herstellerangaben (mFoxP3-Kit, eBiosciences, San Diego, CA, USA) mit anti-FoxP3-APC gefärbt und gemessen.

3.5.2 Messung am Durchflusszytometer

Zur Analyse der Proteine in der Durchflusszytometrie wurden tote Zellen ausgeschlossen, da tote Zellen unspezifisch Antikörper binden können. Zur Identifizierung der toten Zellen wurde 0,33 µg/ml 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) (Roche) kurz vor der Analyse im Durchflusszytometer zugesetzt. Für intrazelluläre Färbung wurden die Zellen, wie in Abschnitt 3.5.1.2 beschrieben, mit Pacific Orange Succinimidyl Ester markiert.

Vor der Messung der Proben wurde ein Kompensationsvorgang durchgeführt, wobei Zellen jeweils mit einzigem Fluorochrom markiert wurden. In den meisten Fällen wurde anti-CD19, anti-CD3 oder anti-CD4 für die Kompensationseinstellungen verwendet. Die verwendeten Fluorochrome sowie ihre Anregungs- und Emissionsmaxima werden in Tab. 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Fluorochrome und ihre Anregungs- und Emissionsmaxima sowie die Detektion in der Durchflusszytometrie

Fluorochrom	Anregungs- maximum (nm)	Laser für Anregung	Emissions- maximum (nm)	Filter zur Detektion
FITC	495	488 (blau)	520	BP530±15

PE	496,564	488 (blau)	573	BP585±21
PerCP	488	488 (blau)	675	BP695±20
Tandem PE-Cy5.5	496,564	488 (blau)	694	BP695±20
Tandem PE-Cy7	496,564	488 (blau)	(573), 767	BP780±30
Alexa Fluor 647	647	633 (rot)	668	BP660±10
Cy5	649	633 (rot)	670	BP660±10
APC	650	633 (rot)	660	BP660±10
Tandem APC-Cy7	625-650	633 (rot)	767	BP780±30
Cascade Yellow	400	405 (violett)	552	BP525±25
Pacific Blue	405	405 (violett)	455	BP440±20
DAPI	358	405 (violett)	460	BP440±20 oder 525±25

Abkürzung: BP-Bandpassfilter, Anregungs- und Emissionsmaxima zusammengestellt mit Daten von BD Biosciences, Zeiss und Molecular Probes.

Nach dem Berechnen der Kompensationen wurden die Proben bei der Messung automatisch kompensiert. Die Analyse erfolgte am LSRII-Durchflusszytometer unter Verwendung der Software BD FACSDiva (BD Biosciences).

3.5.3 Auswertung der Messung am Durchflusszytometer

Zur Auswertung der Messung am Durchflusszytometer wurde die Software FlowJo 8.8.5 (Tree Star Inc.) verwendet. Die DAPI⁺ Zellen oder Pacific Orange Succinimidyl Ester⁺-Zellen wurden von der Auswertung der Zellpopulationen ausgeschlossen.

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Histogramm, *Pseudocolor Plot* oder *Dot Plot*. Die Auswertung erfolgte durch die Angabe des prozentualen Anteils positiver Zellen für ein bestimmtes Antigen oder über die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) als Maß für die Expressionsstärke eines Antigens.

3.6 Tierexperimentelle Methoden

3.6.1 Verwendete Tiere

3.6.1.1 C57BL/6 WT Maus:

Die Tiere wurden vom Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin bezogen.

3.6.1.2 C57BL/6 ATAC KO Maus:

In den ATAC-defizienten Tieren wurden Exon 2 und 3 des ATAC-Gens mit Hilfe homologer Rekombination durch eine Neomycin-Resistenzkassette ersetzt. Dadurch blieb lediglich Exon 1 erhalten, welches für das Signalpeptid von ATAC kodiert. Somit kann in diesen Tieren kein funktionelles ATAC exprimiert werden. Die ATAC-defizienten Tiere waren nach der Herstellung auf einem gemischten 129SV/C57BL/6-Hintergrund und wurden im Folgenden für 10 Generationen auf C57BL/6 rückgekreuzt [Dörner unpublizierte Daten].

3.6.1.3 B6.PL.OT-I WT Maus:

Die OT-I-Mäuse exprimieren transgene CD8⁺T-Zell-Rezeptoren, die ein Ovalbuminpeptid (OVA₂₅₇₋₂₆₄) im Kontext von MHC-Klasse-I-Molekülen erkennen. Die Tiere wurden für mindestens 10 Generationen auf C57BL/6

rückgekreuzt. Danach wurde in die Tiere durch weitere Kreuzung mit B6.PL-Mäusen (Jackson Labor) der genetische Marker CD90.1 (Thy1.1) eingebracht. Dadurch können die OT-I-Zellen nach adoptivem Transfer in den Rezipienten verfolgt werden.

3.6.1.4 B6.PL.OT-I ATAC KO Maus:

Die Mäuse wurden durch Kreuzung von B6.PL. OT-I WT mit ATAC-defizienten C57BL/6 Mäusen erzeugt [Dorner, unpublizierte Daten].

3.6.2 Adoptiver Transfer von OT-I-Zellen

Für alle Antigen-spezifischen Transferexperimente wurden Splenozyten von OVA-TZR-transgenen OT-I-Mäusen isoliert. Jeweils 2×10^6 OT-I-Zellen enthaltende Milzzellen wurden intravenös in C57BL/6 Mäuse injiziert. 24 h nach dem Transfer der OT-I-Zellen wurden die Mäuse intravenös immunisiert.

3.6.3 Immunisierung der Mäuse

In dieser Arbeit wurde OVA-Protein, welches an anti-DEC-205-Antikörper gekoppelt wurde, als Antigen zur Aktivierung der OT-I-Zellen verwendet (DEC:OVA). Damit wurde das OVA-Protein gerichtet an die CD8⁺ DZ der Milz appliziert [Bonifaz et al., 2004]. Nach Titration wurden 100 ng DEC:OVA als optimale Menge festgelegt und in den weiteren Experimenten intravenös appliziert. Als Adjuvans wurden 6 µg anti-CD40-Antikörper oder 4 µg LPS intravenös injiziert. Danach wurden die OT-I-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert.

3.6.4 Zytotoxischer Assay *in vivo*

In diesen Experimenten wurden 1×10^6 OT-I-Zellen, wie in Abschnitt 3.6.2 beschrieben, in C57BL/6 Mäuse übertragen und anschließend mit 3×10^6 OVA-300-19 Zellen intravenös immunisiert. Zur Bestimmung der zytotoxischen Aktivität von CD8⁺ T-Zellen wurden die Milzzellen aus Wildtyp C57BL/6 Mäusen *in vitro* mit SIINFEKL-Peptid (1-2 h, 37°C) beladen. Die Beladung wurde mittels anti-SIINFEKL-H-2K^b-Antikörper, die SIINFEKL im Kontext mit MHC-Klasse-I-Molekülen erkennt, kontrolliert und die Zellen wurden nachfolgend mit 50 µM CFSE markiert. Als Kontrolle wurden parallel die Milzzellen ohne SIINFEKL-Beladung mit 10 µM CFSE markiert. Für jede Empfängermaus wurden 10×10^6

CFSE^{hoch}SIINFEKL-Milzzellen sowie 10×10⁶ CFSE^{niedrig}-Milzzellen ohne SIINFEKL intravenös in C57BL/6 Mäusen injiziert. 18 h nach dem Transfer wurden die Milzzellen isoliert und mittels Durchflusszytometrie die CFSE-markierten Zellen analysiert.

Die zytotoxische Aktivität wurde entsprechend der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Zytotoxische Aktivität [\%]} = \frac{\frac{CFSE^{hoch}}{CFSE^{niedrig}} \text{ in } \cdot \text{immunisierten} \cdot M_{\text{Mäusen}}}{\frac{CFSE^{hoch}}{CFSE^{niedrig}} \text{ in } \cdot \text{Kontroll} - M_{\text{Mäusen}}} \times 100$$

3.6.5 Chemotaktische Untersuchung *in vivo*

Zur Untersuchung der chemotaktischen Wirkung von ATAC wurde chemisch synthetisiertes ATAC (Dictagene, Lausanne, Schweiz) verwendet.

Die ATAC-Proteine wurden in PBS mit 10% Maus-Serum in einer Konzentration von 5 µg/ml angesetzt.

Um die ATAC-induzierte Zellmigration zu beobachten, wurde entweder 1 µg ATAC oder nur PBS (negative Kontrolle) in den Bauchraum einer ATAC KO C57BL/6 Maus injiziert. Nach 2 h wurden die Mäuse getötet. Die peritonealen Zellen der Mäuse wurden durch ca. 6 ml PBS mit 4% Heparin ausgespült und gesammelt. Danach wurden die Anzahl der Zellen bestimmt und im Durchflusszytometer die Zellzusammensetzung analysiert.

Die analysierten Zellpopulationen werden in Tab.10 beschrieben.

Tabelle 10: Die analysierten Zellpopulationen des Bauchraumes

Zelltyp	Definition
T-Zellen	CD3 ⁺ CD19 ⁻
CD8 ⁺ T-Zellen	CD8 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁻
CD4 ⁺ T-Zellen	CD4 ⁺ CD3 ⁺ CD19 ⁻
B-Zellen	CD19 ⁺ CD3 ⁻
Granulozyten	Ly6G/C ⁺ CD11b ⁺
Makrophagen	F4/80 ⁺ CD11b ⁻
NK-Zellen	NK1.1 ⁺ CD3 ⁻

DZ	CD11c ⁺ MHCII ⁺ B220 ⁻
CD8 ⁺ DZ	CD11c ⁺ MHCII ⁺ B220 ⁻ CD8 ⁺ CD11b ⁻ CD4 ⁻
CD11b ⁺ DZ	CD11c ⁺ MHCII ⁺ B220 ⁻ CD8 ⁻ CD11b ⁺
CD11b ^{niedrig} DZ	CD11c ⁺ MHCII ⁺ B220 ⁻ CD8 ⁻ CD11b ^{niedrig}

4. Ergebnisse

4.1 Produktion von murinem ATAC-Protein mit Hilfe eines SUMO-Expressionssystems

Um die Funktion von murinem ATAC zu analysieren, werden große Mengen des ATAC-Proteins benötigt. Daher wurde versucht, ein optimales Expressionssystem zur Darstellung des murinen ATAC zu etablieren. Eine cDNA, welche für murines ATAC ohne N-terminales Signalpeptid kodiert, wurde von Dr. Hans-Werner Mages und Steffen Güttler in zwei Expressionsvektoren inkloniert: pET-SUMO-mATAC und TAGzyme-mATAC. Die beiden Expressionssysteme wurden vergleichend analysiert.

Durch das SUMO-Expressionssystem werden SUMO-ATAC-Proteine mit N-terminalem Hexa-His-Tag (N-6×His-SUMO-mATAC[Val22-Gly114]-C) produziert (Abb. 9). SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) ist ein 12 kDa kleines Protein. Durch die Fusion von SUMO wird die Expression und Löslichkeit von rekombinantem ATAC-Protein erhöht. Die SUMO-ATAC-Proteine können aufgrund ihres His-Tags mittels einer Nickel-Sepharose-Säule aufgereinigt werden.

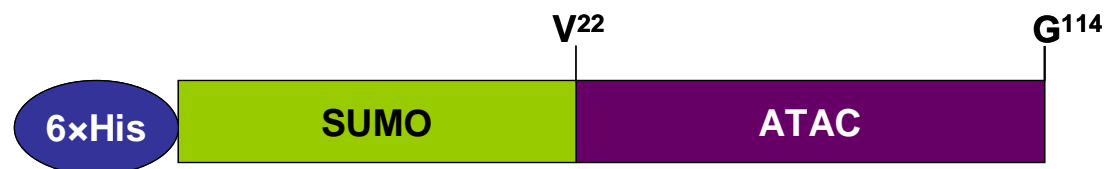


Abbildung 9: primäre Struktur des 6×His-SUMO-ATAC-Proteins

6×His steht für N-terminales Hexa-His-Tag, SUMO für SUMO-Protein aus Hefe und ATAC für murin ATAC-Protein [Val22-Gly114].

Mit pET-SUMO-mATAC transformierte *E.coli* BL21-Zellen exprimierten nach IPTG-Induktion ein Protein, welches im SDS-Polyacrylamidgel (SDS-Page) einer Masse von etwa 30 kDa entspricht (Abb. 10 A). Die errechnete Größe des SUMO-ATAC-Proteins beträgt 22 kDa.

Durch das TAGzyme-mATAC-Expressionssystem soll ATAC-Protein mit Hexa-His-Tag am N-Terminus (rund 15 kDa) exprimiert werden. Mit TAGzyme-mATAC

transformierte *E.coli* M15-Zellen exprimierten hingegen zwei etwa 15 und 24 kDa große Proteine (Abb. 10 B).

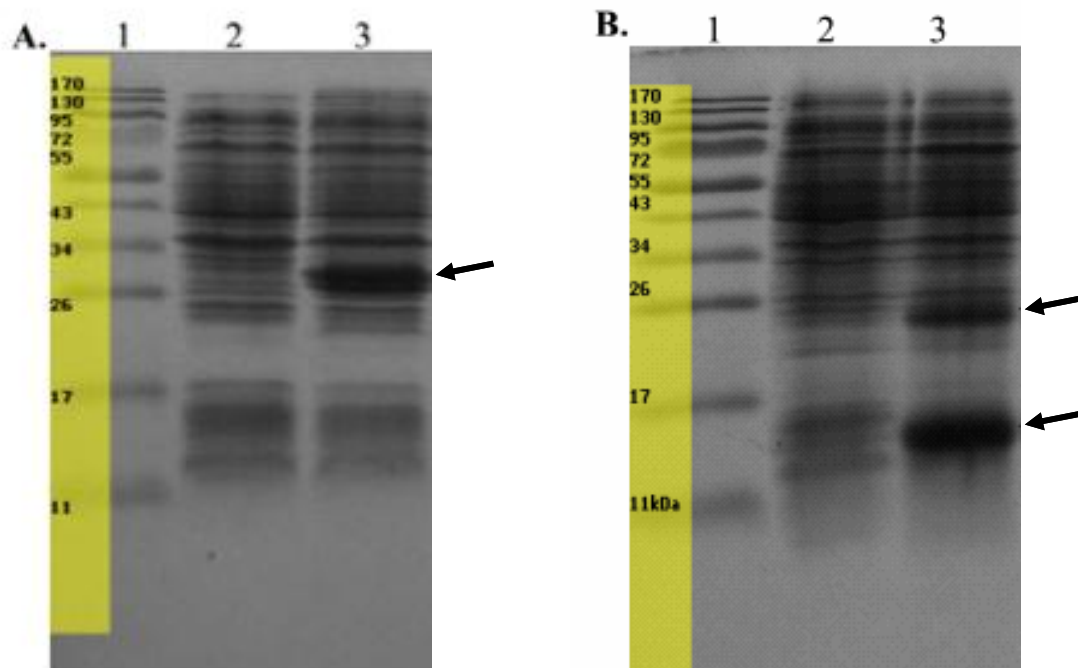


Abbildung 10: SDS-Page der Expression von TAGzyme-mATAC und pET-SUMO-mATAC in *E.coli*

A. pET-SUMO-mATAC in *E.coli* BL21-Zellen

B. TAGzyme-mATAC in *E.coli* M15-Zellen

Spur 1: Proteinstandard

Spur 2: Zell-Lysat vor Induktion

Spur 3: Zell-Lysat nach 3 h Induktion mit 2 mM IPTG

Die Pfeile kennzeichnen die induzierten Proteine.

Da mit pET-SUMO-mATAC transformierte *E. coli* ein einziges induziertes Protein exprimierten, wurde das SUMO-Expressionssystem im Folgenden zur Produktion rekombinanter ATAC-Proteine verwendet.

Nach Aufreinigung über eine Nickel-Sepharose-Säule erfolgte die Elution von SUMO-ATAC-Proteinen mit unterschiedlichen Imidazol-Konzentrationen. Das aufgereinigte SUMO-ATAC-Protein zeigt in einem SDS-Page eine Größe von etwa 30 kDa (Abb. 11).

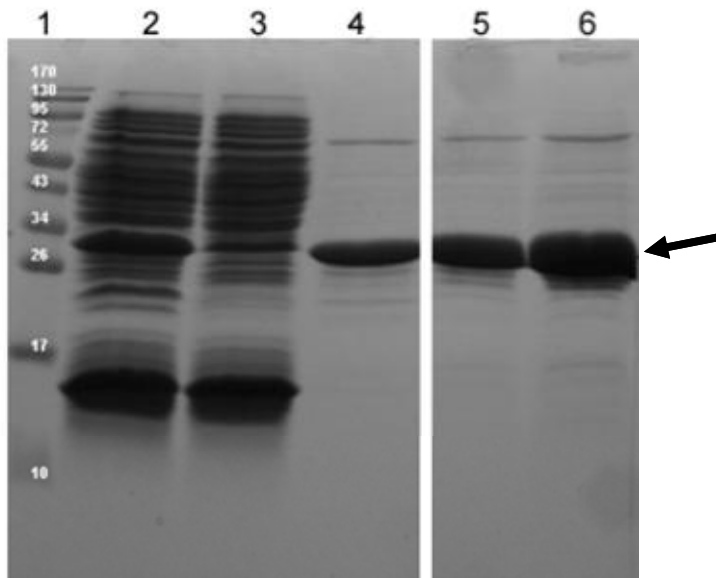


Abbildung 11: SDS-Page der Aufreinigung von SUMO-ATAC-Protein durch Nickel-Sepharose-Säule

Spur 1: Proteinstandard

Spur 2: Zelllysat

Spur 3: Durchlauf

Spur 4: Eluat 300 mM Imidazol

Spur 5: Eluat 500 mM Imidazol Fraktion 2

Spur 6: Eluat 500 mM Imidazol Fraktion 3

Mehrere Fraktionen der 500 mM Imidazol-Euate wurden aufgefangen. Das Protein befand sich hauptsächlich in der zweiten und dritten Fraktion.

Aus einer 200 ml Kultur ($OD_{600} = 1$) wurden 2-3 mg SUMO-ATAC-Protein aufgereinigt. Die Protein-Konzentration wurde durch die Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt.

Das reine SUMO-ATAC-Protein (Abb. 11, Spuren 5 und 6) wurde im Folgenden mit der SUMO-Protease (Lifesensors, Inc.) geschnitten. Diese Protease führt zur Abspaltung des Hexa-His-Tags samt SUMO-Protein und somit zur Freisetzung des ATAC-Proteins.

Anschließend erfolgte eine erneute Aufreinigung über die Ni-NTA-Matrix (Qiagen). SUMO-ATAC-Protein, freies SUMO-Protein sowie SUMO-Protease wurden von der Ni-NTA-Matrix durch ihren Hexa-His-Tag gebunden. Somit wurde im Durchlauf reines ATAC gewonnen (Abb. 12 A, B und C, Spur 4).

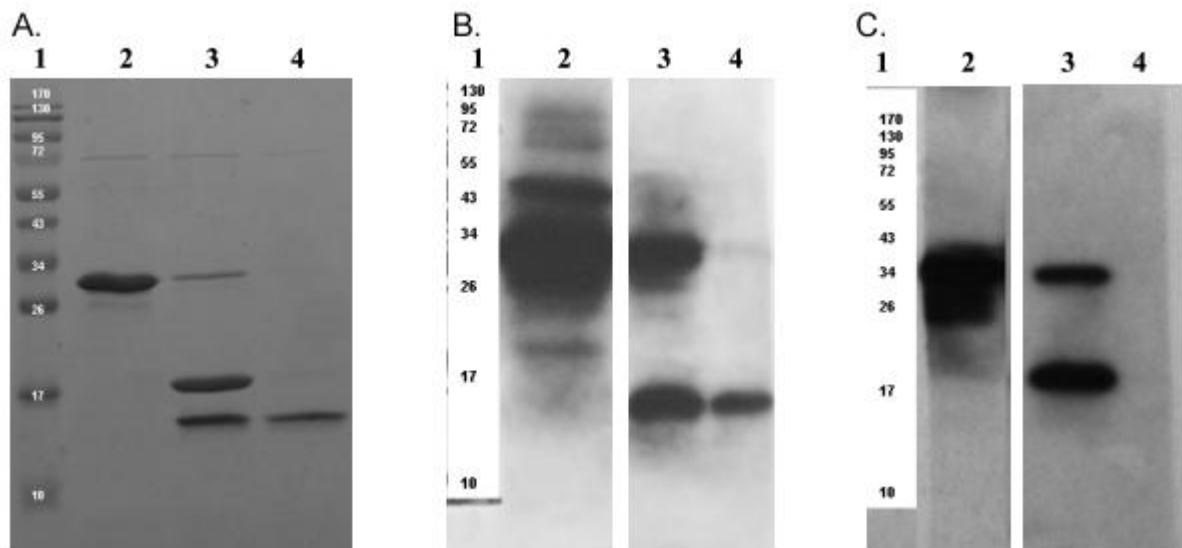


Abbildung 12: Coomassie Blau Färbung und Western Blot von aufgereinigtem ATAC

- A. SDS-Page mit Coomassie Blau Färbung
- B. Western Blot mit anti-mATAC (polyklonales Serum)
- C. Western Blot mit anti-Hefe-SUMO (monoklonaler Antikörper)

Spur 1: Proteinstandard; Spur 2: SUMO-ATAC vor Protease-Verdau; Spur 3: SUMO-ATAC nach Protease-Verdau; Spur 4: aufgereinigtes ATAC

Mittels massenspektroskopischer Analyse (MS) von Dr. Schweck wurde ein Molekulargewicht des gereinigten ATAC-Proteins in Übereinstimmung mit der errechneten Größe des ATAC-Proteins mit 93 Aminosäuren (10120,7 Da) ermittelt. Nach dem Reinigungsprozess wurde aus 200 ml Kultur (2,1 g Zellpellet; 2-3 mg SUMO-ATAC-Proteinkomplex) 100-200 µg ATAC-Protein gewonnen. Damit wurde eine Methode zur Aufreinigung des murinen ATAC etabliert.

4.2 Expression von XCR1 in der Milz

4.2.1 Expression von XCR1 mRNA in verschiedenen Zellpopulationen

Zur Definition der Zielzellen von ATAC wurden Granulozyten, CD8⁺ DZ, B-, T- und NK-Zellen in der Milz von C57BL/6 Mäusen auf das Vorhandensein von XCR1 (ATAC-Rezeptor) mittels RT-PCR vorher bereits von Dr. Martin Dorner untersucht. Das XCR1-Signal von Poly-A-mRNA wurde in CD8⁺ DZ aber nicht in anderen Zellpopulationen nachgewiesen. Diese Daten standen jedoch im Gegensatz zu publizierten Daten zur XCR1-Expression sowie zur

chemotaktischen Wirkung von ATAC auf B-, NK- und T-Zellen [Legler et al., 1998; Yoshida et al., 1999; Huang et al., 2001; Kurt et al., 2001; Cairns et al., 2001; Reif et al., 2004; Morris et al., 2004; Colvin et al., 2004; Huang et al., 2005].

Um diesen Widerspruch aufzuklären, wurde jede Zellpopulation sowohl im Ruhezustand als auch nach Aktivierung auf das Vorhandensein von XCR1 erneut untersucht. Hierzu wurde eine PCR etabliert, welche spezifische Primer verwendet, die sowohl auf dem bekannten Exon 2 als auch auf dem neu beschriebenen Exon 1 binden. Somit wird ausschließlich cDNA des XCR1-Transkripts amplifiziert und ein Nachweis genomischer DNA ausgeschlossen.

Die zu untersuchenden Zellpopulationen wurden zuerst mittels FACS sortiert, anschließend wurde die RNA isoliert. Die Gesamt-RNA von jeder Zellpopulation wurde mittels quantitativer RT-PCR auf die Expression von XCR1 (Exon 1 und 2) hin analysiert. Die RT-PCR-Analyse wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Mages durchgeführt.

CD8⁺ DZ waren die einzige Population mit eindeutiger XCR1-Expression in der Milz. Darüber hinaus exprimierten CD11b⁺ DZ XCR1 auf sehr niedrigem Niveau (Abb. 13), wobei eine Kontamination mit CD8⁺ DZ nicht ausgeschlossen werden konnte. Alternativ konnte eine kleine Population von CD11b⁺ DZ XCR1 exprimieren.

Andere Zellpopulationen exprimierten sowohl im ruhenden Zustand als auch nach Aktivierung keine XCR1 mRNA.

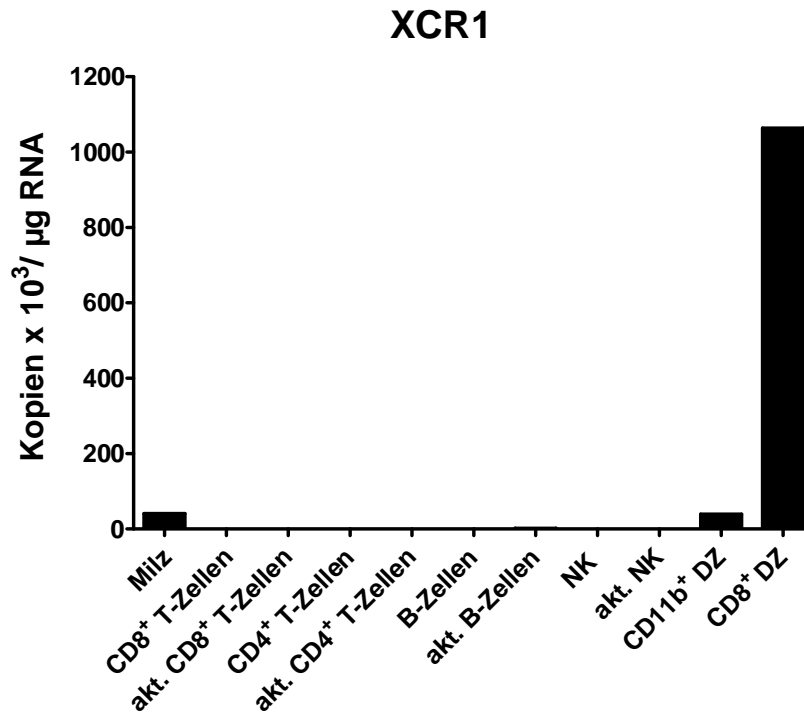


Abbildung 13: Expression der XCR1 mRNA in verschiedenen Zellpopulationen von Milzzellen in WT C57BL/6 Mäusen

RNA wurde aus FACS-sortierten Zellpopulationen isoliert. Jeweils 1 µg RNA wurde durch quantitative RT-PCR mit Primern für Exon 1 und 2 (Abschnitt 3.2.1 Tab. 3) analysiert.

Um unsere RT-PCR-Daten mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen vergleichen zu können, wurde die XCR1-Expression zusätzlich in BALB/c- und SV129-Mäusen untersucht. Diese Experimente bestätigten, dass XCR1 mRNA stark nur in CD8⁺DZ und geringfügig in CD11b⁺DZ exprimiert wird. Andere Populationen zeigten kein XCR1-Signal (Daten nicht gezeigt).

4.3 Rolle von ATAC in der T-DZ-Interaktion *in vitro*

Wir konnten so zeigen, dass XCR1 ausschließlich auf DZ, besonders auf CD8⁺ DZ in der Milz, exprimiert wird. Das führte zu der Annahme, dass ATAC sehr wahrscheinlich eine Rolle in der T-DZ-Interaktion spielt. Diese Hypothese wurde zuerst durch Stimulation Ag-spezifische CD8⁺T-Zellen *in vitro* in Gegenwart/Abwesenheit von ATAC untersucht.

Bevor der Einfluss von ATAC in der T-DZ-Interaktion untersucht wurde, sollte die maximale Expression von ATAC Ag-spezifischen CD8⁺ T-Zellen zuerst *in vitro* bestimmt werden. Dafür wurden TZR-transgene OVA-spezifische OT-I-Zellen als

Ag-spezifische CD8⁺ T-Zellen verwendet, welche spezifisch SIINFEKL (ein Peptid₂₅₇₋₂₆₄ von Ovalbumin) im Kontext von MHC-Klasse-I-Molekül erkennen. Die Stimulation von OT-I-Zellen erfolgte durch Inkubation entweder mit PMA/Ionomycin oder mit spezifischen Antigenen wie Ovalbumin und OVA-Peptid (SIINFEKL). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die ATAC-Expression durch intrazelluläre Färbung mittels Durchflusszytometrie detektiert. Nach der unspezifischen Stimulation mit PMA und Ionomycin wurde ATAC von fast 80% der OT-I-Zellen produziert (Abb. 14 A). Nach einer Stimulation mit dem OT-I-Zell-spezifischen Antigen Ovalbumin sezernierten weniger als 20% der Zellen ATAC (Abb. 14 B). Die stärkste Stimulation konnte mit dem OT-I-Zell-spezifischen SIINFEKL erreicht werden: Hier sezernierten nach 6-stündiger Stimulation annähernd 90% der OT-I-Zellen ATAC (Abb. 14 C).

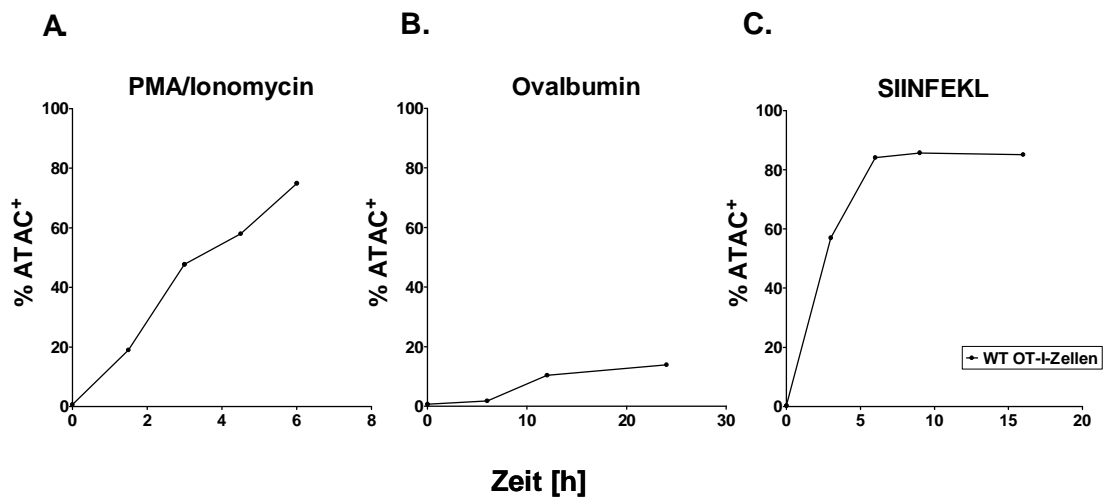


Abbildung 14: Kinetik der ATAC-Sekretion *in vitro* nach Stimulation mit PMA/Ionomycin, OVA oder dem OVA-Peptid SIINFEKL

2×10^6 Milzzellen von OT-I-Mäusen pro ml R10F⁺ wurden (A) mit 200 ng/ml PMA und 2 μ M Ionomycin für 1,5 h, 3 h, 4,5 h und 6 h in Gegenwart von Brefeldin A, (B) mit Ovalbumin (100 μ g/ml) für 6 h, 12 h und 24 h, jeweils die letzten 3 h mit Brefeldin A, oder (C) mit 50 ng/ml OVA-Peptid (257-264) SIINFEKL für 3 h, 6 h, 9 h und 16 h, jeweils die letzten 3 h mit Brefeldin A, stimuliert. Die Messung von ATAC erfolgte mittels intrazellulärer Färbung in der Durchflusszytometrie.

In weiteren Experimenten wurden OT-I-Zellen mit 50 ng/ml bis 1000 ng/ml SIINFEKL stimuliert, um den Titer für die optimale Stimulation der ATAC-Sekretion zu bestimmen. Die Kinetik der ATAC-Sekretion war bei allen Dosierungen annähernd gleich (Daten nicht gezeigt), weshalb in den folgenden Versuchen 50 ng/ml SIINFEKL eingesetzt wurde.

Zur funktionellen Untersuchung von ATAC in CD8⁺ T/DZ-Interaktion wurden die Milzzellen aus ATAC-kompetenten (WT) oder -defizienten (ATAC KO) OT-I-Mäusen isoliert. Die Milzzellen aus ATAC KO und WT OT-I-Mäusen enthielten vergleichbare Frequenzen von DZ, die ein gleiches Expressionsniveau an Aktivierungsmarkern vor der Stimulation zeigten (Daten nicht gezeigt).

Diese Milzzellen wurden mit SIINFEKL alleine oder zusätzlich mit chemisch synthetisiertem ATAC für 3 h bis 14 h stimuliert. Die Aktivierung von OT-I-Zellen und die Reifung von Dendritischen Zellen (DZ) wurden in Gegenwart und Abwesenheit von ATAC mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Expressionskinetiken von CD69 und 4-1BB auf OT-I-Zellen, sowie die Expressionskinetiken von CD86 und PD-L2 auf DZ sind in Abb.15 dargestellt.

Sowohl die Expression von CD69 und 4-1BB auf OT-I-Zellen (Abb. 15 A) als auch die Expression von CD86 und PD-L2 auf DZ (Abb. 15 B) waren sehr ähnlich bei WT und ATAC KO Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten.

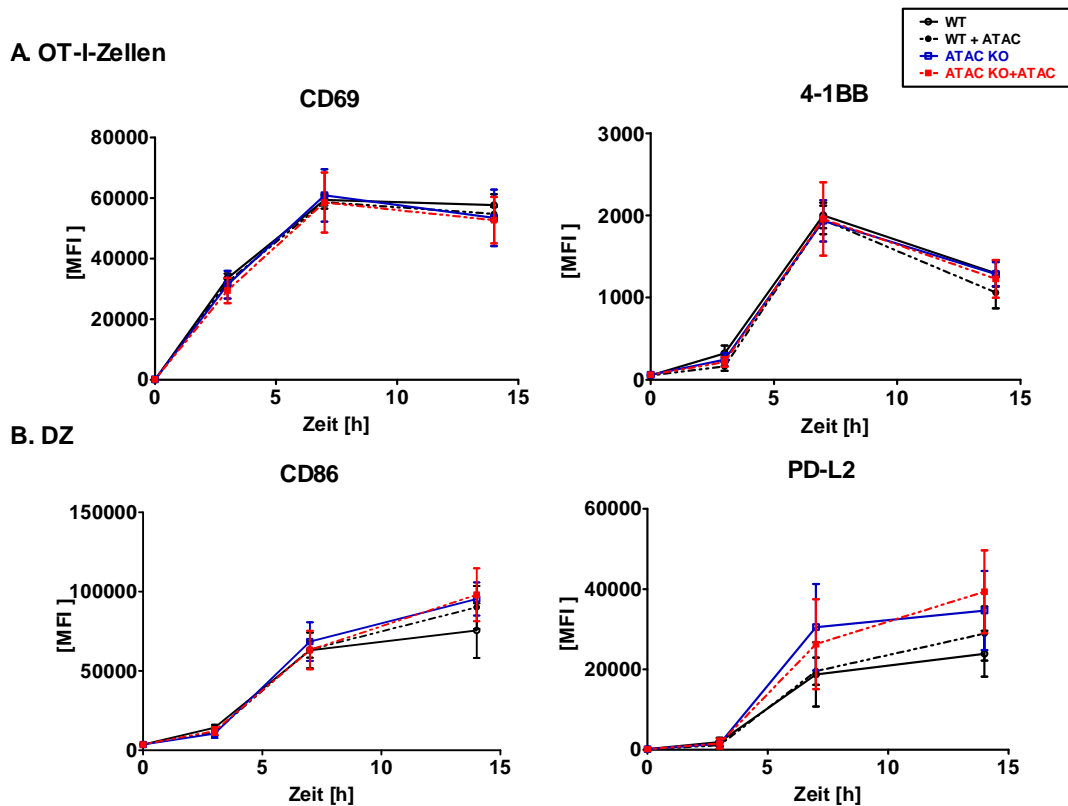


Abbildung 15: Expression von CD69 und 4-1BB auf OT-I-Zellen und Expression von CD86 sowie PD-L2 auf DZ nach Stimulation mit SIINFELK *in vitro*

2×10^6 /ml OT-I-Milzzellen von WT oder ATAC KO OT-I-Mäusen wurden mit 50 ng/ml SIINFELK in Gegenwart oder Abwesenheit von 100 ng/ml chemisch synthetisiertem ATAC für 0 h, 3 h, 7 h, 14 h bei 37°C inkubiert. Die Expression der Aktivierungsmarker (CD69 und 4-1BB) auf OT-I-Zellen ($CD8^+CD90.1^+MHCII^-$) (A) und die Hochregulation von kostimulatorischen Liganden (CD86 und PD-L2) auf DZ ($CD11^+MHCII^+$) (B) wurden in der Durchflusszytometrie analysiert. Die schwarze Kurve stellt WT Zellen und die blaue und rote Linie ATAC KO Zellen dar. Die rote und schwarze Strichlinie stehen für die Anwesenheit von chemisch synthetisiertem ATAC.

Neben diesen Markern wurden auch CD25, CD27, ICOS, BTLA, OX40 und PD-1 für die Aktivierung von OT-I-Zellen, sowie CD80 und PD-L1 für die Reifung von DZ analysiert. Weder die Aktivierung von OT-I-Zellen, noch die Reifung von DZ wurden von einem Überschuss oder Mangel an ATAC beeinflusst.

Ein Einfluss von ATAC auf die Aktivierung von DZ und OT-I-Zellen konnte nicht beobachtet werden. Daher spielt ATAC wahrscheinlich keine entscheidende Rolle für die T-DZ-Interaktion *in vitro*.

4.4 Funktionelle Untersuchung von ATAC *in vivo* durch ein Ovalbumin-spezifisches OT-I-Zell-System

Zur Aufklärung der ATAC-Funktion war die systematische Untersuchung *in vivo* erforderlich. Die Frequenz der endogenen T-Zellen, welche spezifisch ein bestimmtes Antigen erkennen, ist zu niedrig in C57BL/6 Mäusen nachzuweisen. Deshalb wurde ein Modellsystem mit OT-I-Zellen in diesen Experimenten verwendet. Weiterhin können die hier verwendeten OT-I-Zellen durch ihre Expression von CD90.1 von endogenen CD8⁺T-Zellen (CD90.2⁺CD90.1⁻) unterschieden werden. Der Transfer von OT-I-Zellen ermöglicht eine Erhöhung der Frequenz und damit eine genaue Definition dieser Antigen-spezifischen T-Zellen.

In der Milz korreliert die Expression von DEC-205 mit CD8⁺DZ. Deshalb wurde α DEC-205:OVA (DEC:OVA) als Antigen zur Beobachtung der spezifischen CD8⁺T-CD8⁺DZ-Interaktion verwendet. Die Kopplung mit anti-DEC-205-Antikörpern führt zu einer gerichteten Internalisierung von OVA durch CD8⁺DZ.

Die Kombination von DEC:OVA mit anti-CD40-Antikörper stellt ein vereinfachtes Entzündungsmodell *in vivo* dar. Dabei dient ein anti-CD40-Antikörper als Kostimulationssignal, entsprechend dem Signal von CD4⁺T-Helfer-Zellen, und induziert die vollständige Aktivierung von CD8⁺DZ. LPS als Komponente Gram-negativer Bakterien kann von Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) auf der DZ-Oberfläche gebunden werden. Das führt zur Aktivierung der DZ.

4.4.1 Kinetik der ATAC-Expression *in vivo*

Zur Bestimmung der Kinetik der ATAC-Expression wurden 2×10^6 WT OT-I-Zellen intravenös in WT C57BL/6 Mäuse transferiert. Nach 24 h wurden diese Mäuse

entweder mit DEC:OVA oder mit DEC:OVA plus anti-CD40-Antikörper oder plus LPS immunisiert. Um den künstlichen Effekt einer zu starken Immunreaktion zu vermeiden, wurde hier nach Titration nur 6 µg anti-CD40-Antikörper oder 4 µg LPS als Adjuvans verwendet. Die transferierten OT-I-Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie auf ATAC-Sekretion zu verschiedenen Zeitpunkten (3 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h) nach Immunisierung analysiert.

Die Ergebnisse zeigten, dass die ATAC-Sekretion von OT-I-Zellen nach 6 h beginnt und bis 40 h andauert (Abb. 16). Anti-CD40 und DEC:OVA zusammen induzierten die stärkste Expression von ATAC, wobei über 70% der OT-I-Zellen ATAC 12 h nach Stimulation sezernierten (Abb. 16 A und C).

Dagegen induzierte DEC:OVA plus LPS eine niedrigere ATAC-Sekretion (nur 40% von OT-I-Zellen zu 24 h) als DEC:OVA alleine (Abb. 16 B und D).

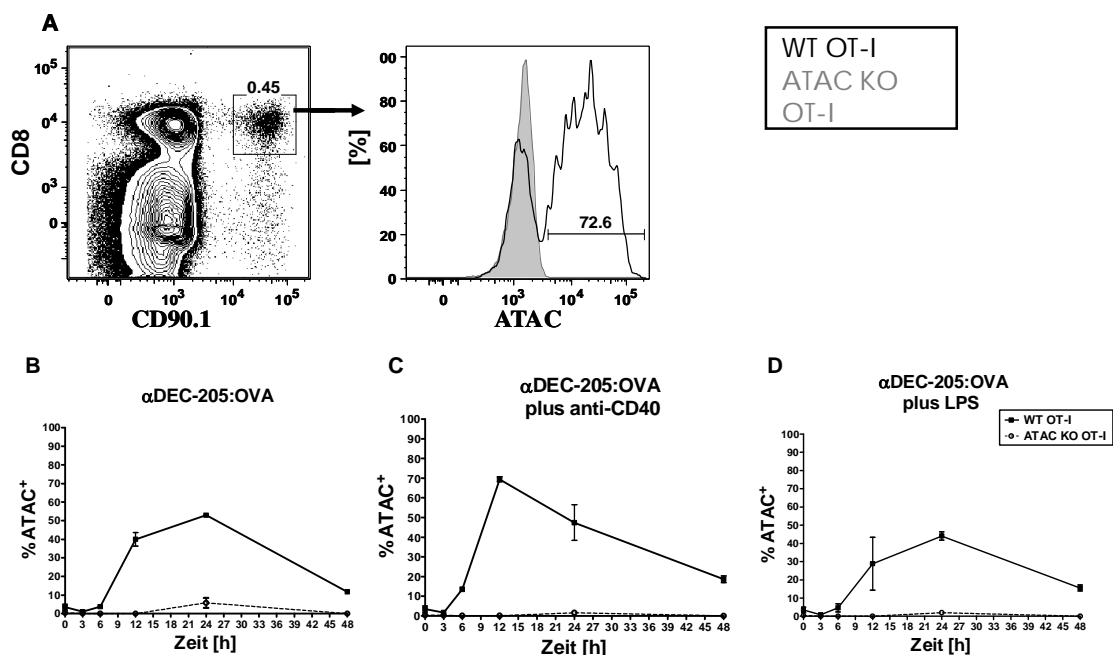


Abbildung 16: Kinetik der ATAC-Sekretion von OT-I-Zellen *in vivo*

2×10⁶ ATAC KO oder WT OT-I-Zellen wurden intravenös in WT C57BL/6 Mäuse transferiert. OT-I-Zellen wurde als CD90.1⁺CD8⁺ definiert (A). 24 h später wurden die Empfängermäuse intravenös jeweils mit 100 ng DEC:OVA (B), oder DEC:OVA plus 6 µg anti-CD40-Antikörper (C), oder plus 4 µg LPS (D) immunisiert. Die ATAC-Expression der OT-I-Zellen wurden bei 3 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h nach 3 h *in vitro* Inkubation mit Brefeldin A in der Durchflusszytometrie analysiert. Das Gate für das ATAC-Signal von WT Zellen (schwarz) wurde anhand der Lage der ATAC KO OT-I-Zellen (grau) gesetzt (A). Die schwarzen Linien stellen die ATAC-Expression in WT OT-I-Zellen, die Strichlinien das Hintergrundsignal von ATAC-KO OT-I-Zellen dar (B, C und D).

DEC:OVA kombiniert mit anti-CD40-Antikörper induzierte eine stärkere und schnellere Expression von ATAC als DEC:OVA alleine (Abb. 16 B und C). Dagegen wurde durch LPS die ATAC-Sekretion unterdrückt (Abb. 16 D).

In weiteren Versuchen wurde die Kinetik der ATAC-Sekretion mit der Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 verglichen (Abb. 17).

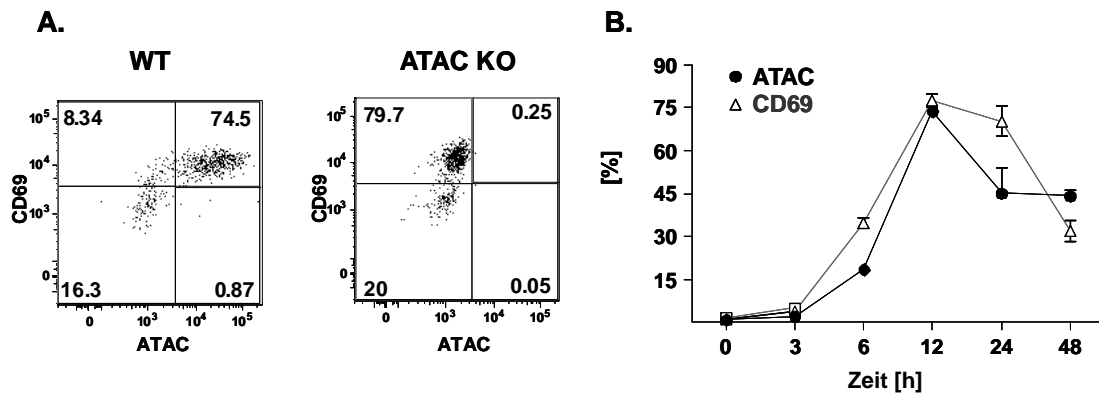


Abbildung 17: Kinetik der Expression von ATAC und CD69 auf OT-I-Zellen

2×10^6 ATAC KO und WT OT-I-Zellen wurden intravenös in WT C57BL/6 Mäuse transferiert. 24 h später wurden die Empfängermäuse intravenös mit 100 ng DEC:OVA plus 6 μ g anti-CD40 immunisiert. Die Expression von ATAC und CD69 durch OT-I-Zellen wurde nach 3 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h und anschließender *in vitro* Inkubation für 3 h mit Brefeldin A in der Durchflusszytometrie untersucht. Die dargestellten Gates zeigen die Expression von ATAC und CD69 12 h nach Immunisierung (A). Die Kinetik der ATAC (schwarze Linien) und CD69-Expression (graue Linien) von OT-I-Zellen ist dargestellt (B).

Nach Stimulation mit DEC:OVA plus anti-CD40-Antikörper erreichten beide Marker die maximale Expression nach 12 h, wobei jeweils etwa 75% der OT-I-Zellen ein positives Signal lieferten.

Gleichzeitig wurde das ATAC-Signal auch mittels RT-PCR in diesen Milzzellen analysiert (Abb. 18). In PBS Kontroll-Mäusen fand sich niedriges ATAC-Signal, unabhängig davon ob WT oder ATAC KO OT-I-Zellen transferiert wurden (Abb. 18 A). Nach Transfer von ATAC KO OT-I-Zellen konnte zu keinem Zeitpunkt und keinen Bedingungen eine signifikant erhöhte ATAC-Expression beobachtet werden. Nach Transfer von WT OT-I-Zellen und Immunisierung mit DEC:OVA nimmt das ATAC-Signal mit der Zeit zu und erreichte das Maximum nach etwa 12 h (Abb. 18 B). DEC:OVA plus anti-CD40-Antikörper induzierten ein früheres (6 h) und stärkeres Signal von ATAC, welches mit der Zeit wieder abnahm (Abb. 18 C). Immunisierung mit DEC:OVA plus LPS führt zu einer maximalen Induktion von ATAC-Sekretion schon nach 3 h. Nach 6 h war die ATAC-Expression wieder deutlich verringert und fiel auf die Basisexpression zurück (Abb. 18 D). Der Effekt von LPS wurde in einem weiteren Experiment näher untersucht. LPS allein induzierte nach 3 h eine starke ATAC-Expression in NK- und NKT-Zellen, aber nicht in T-Zellen [Daten nicht gezeigt]. Diese Daten aus der PCR-Analyse stimmen mit den Ergebnissen aus der intrazellulären

Durchflusszytometrie überein, wenn man die Zeit für die Translation der RNA zu Protein berücksichtigt.

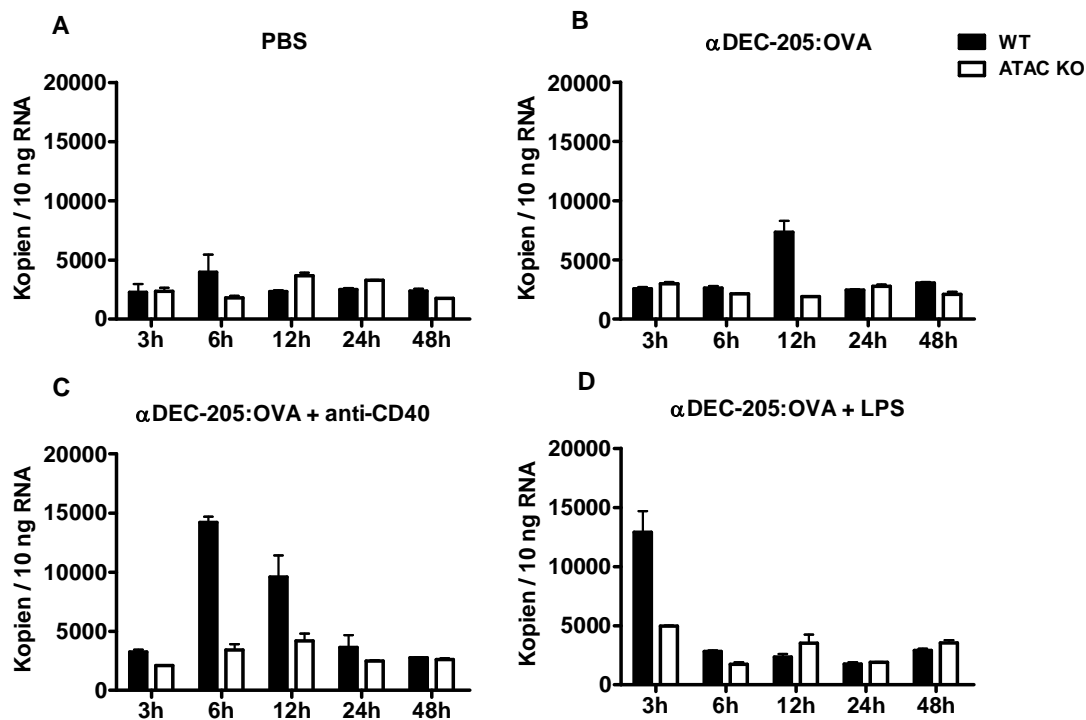


Abbildung 18: ATAC-Expression von Milzzellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Immunisierung

2×10^6 WT oder ATAC KO OT-I-Zellen wurden intravenös in WT C57BL/6 Mäuse transferiert. 24 h später wurden die Mäuse mit PBS (negative Kontrolle) (A) oder mit 100 ng DEC:OVA (B) oder mit 100 ng DEC:OVA plus 6 μ g anti-CD40-Antikörper (C) oder plus 4 μ g LPS (D) immunisiert. RNA wurde nach Immunisierung zu verschiedenen Zeitpunkten aus den Milzzellen isoliert und die Expression von ATAC mittels quantitativer RT-PCR analysiert.

Das deutet darauf hin, dass ATAC zu den frühesten Aktivierungssignalen gehört und schon ab 6 h nach Immunisierung an der Immunreaktion teilnimmt.

4.4.2 Expression von XCR1 in naiven und aktivierten Milzzellen

Es stellte sich die Frage, ob die Expression von XCR1 in $CD8^+$ DZ durch die Interaktion mit $CD8^+$ T-Zellen reguliert wird. Dies wurde durch Analyse der XCR1-Expression vor und nach Aktivierung von Ag-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen in der Milz untersucht. In diesen Experimenten wurden WT oder ATAC KO OT-I-Zellen intravenös in WT C57BL/6 Mäuse transferiert. 24 h später wurden die Mäuse entweder mit DEC:OVA oder DEC:OVA plus anti-CD40-Antikörper oder

plus LPS immunisiert. Die Expression von XCR1 und ATAC in Milzzellen zu verschiedenen Zeitpunkten wurde mittels quantitativer RT-PCR untersucht.

Die XCR1-Expression in PBS-Kontroll-Tieren schwankte deutlich zwischen verschiedenen Zeitpunkten. Durchschnittlich exprimierten ATAC KO OT-I-Zell-transferierten Zellen ein etwas höheres XCR1-Signal als WT OT-I-Zell-transferierten Zellen in PBS-Kontroll-Tieren (Abb. 19 A). Nach Immunisierung mit DEC:OVA alleine oder plus anti-CD40-Antikörper war die Expression von XCR1 kaum erhöht, sowohl nach Transfer von WT als auch ATAC KO OT-I-Zellen (Abb. 19 B und C). Nach Immunisierung in Gegenwart von LPS war bereits nach 3 h, unabhängig von den transferierten Zellen, kein XCR1-Signal mehr detektiert (Abb.19 D).

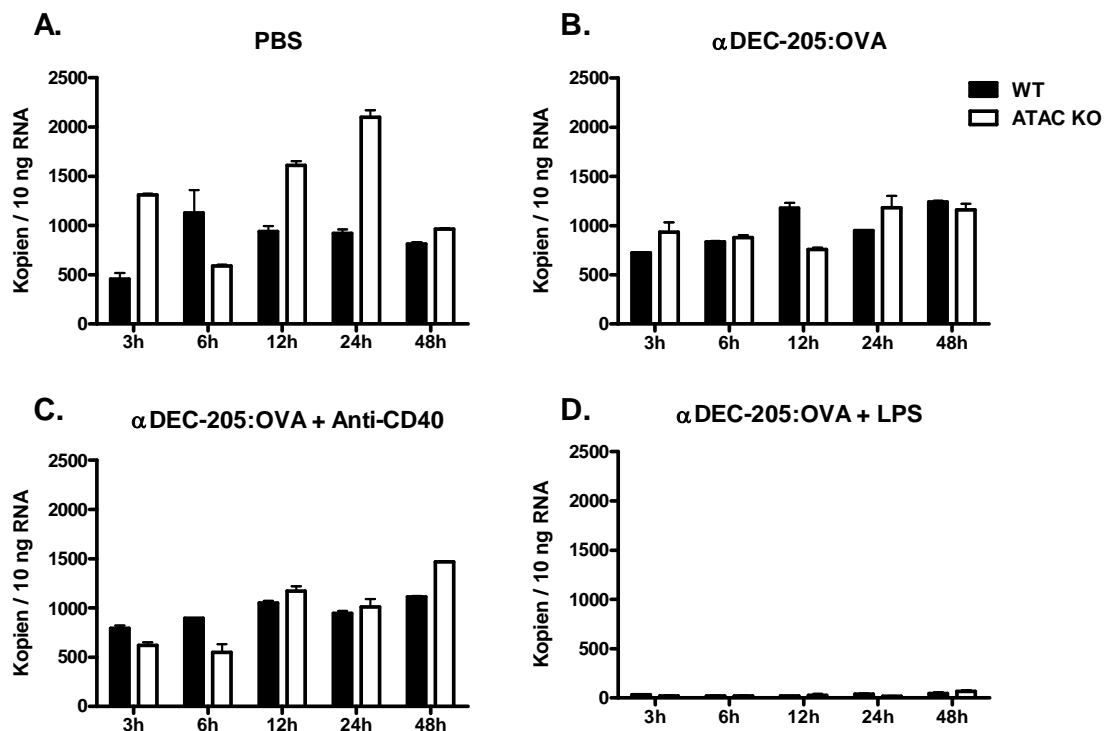


Abbildung 19: Kinetik der Expression von XCR1 mRNA in naiven und aktivierten Milzzellen

2×10^6 WT oder ATAC KO OT-I-Zellen wurden intravenös in WT C57BL/6 Mäuse transferiert. 24 h später wurden die Mäuse mit PBS (negative Kontrolle) (A) oder mit 100 ng DEC:OVA (B) oder mit 100 ng DEC:OVA plus 6 μ g anti-CD40-Antikörper (C) oder plus 4 μ g LPS (D) immunisiert. Die RNA wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Immunisierung aus 4×10^6 Milzzellen isoliert. XCR1 wurde mit Hilfe quantitativer RT-PCR-Analyse nachgewiesen.

4.4.3 ATAC ist ein wichtiger Regulator der T-DZ-Interaktion *in vivo*

Der stabile Kontakt zwischen DZ und T-Zellen erfolgt zwischen 12-18 h nach Antigen-Applikation [Stoll et al., 2002]. Die Frage, ob ATAC KO OT-I-Zellen genauso wie WT OT-I-Zellen in diesem Prozess reagieren können, wurde im Folgenden untersucht.

Die aktivierten OT-I-Zellen zeichnen sich einerseits durch Veränderung in der Expression von Oberflächenmolekülen, andererseits durch die Sekretion von verschiedenen Zytokinen aus.

In dieser Arbeit wurden sowohl stimulatorische Rezeptoren (CD69, CD25, ICOS, 4-1BB, CD27 und OX40) als auch inhibitorische Zelloberflächenmoleküle wie PD-1 und BTLA auf OT-I-Zellen analysiert. Zusätzlich erfolgte der Nachweis von Zytokinen (ATAC, IFN- γ , IL-2 und TNF- α) durch intrazelluläre Färbung.

Die ATAC KO OT-I-Zellen exprimierten deutlich mehr CD69 und 4-1BB 18 h nach Stimulation im Vergleich zu WT OT-I-Zellen. Es zeigten sich keine signifikante Unterschiede in der Expression von CD25, CD27, ICOS, PD-1, OX40 und BTLA zwischen ATAC KO und WT OT-I-Zellen zu den verschiedenen Zeitpunkten (Abb. 20).

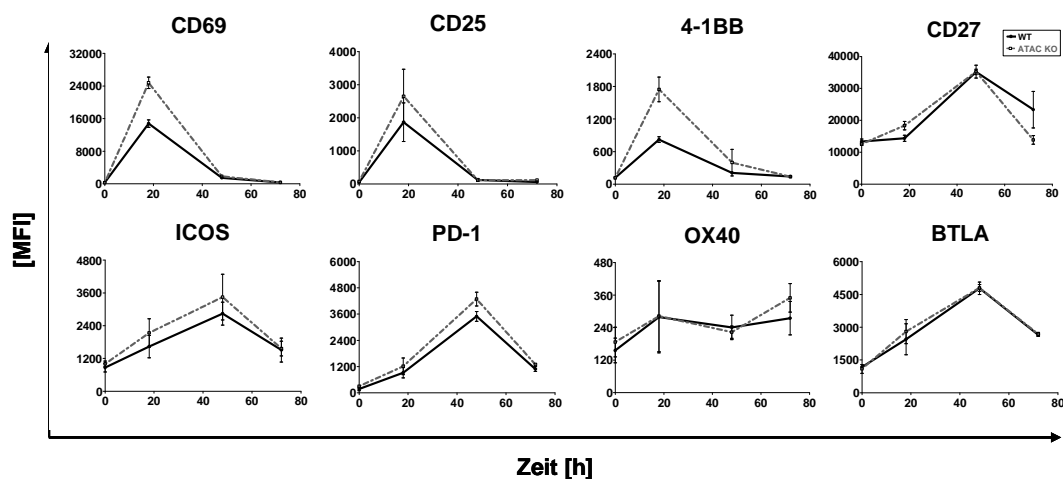


Abbildung 20: Aktivierung von der ATAC KO OT-I-Zellen im Vergleich zu WT OT-I-Zellen

2×10^6 ATAC WT und KO OT-I-Zellen wurden in WT C57BL/6 Mäuse intravenös transferiert. 24 h später wurden die Mäuse mit 100 ng DEC:OVA immunisiert. Nach 18 h, 48 h und 72 h wurden verschiedene Aktivierungsmarker mittels Durchflusszytometrie auf den OT-I-Zellen analysiert.

Die verstärkte Expression von CD69 und 4-1BB auf ATAC KO OT-I-Zellen wurde auch 20 h nach Immunisierung mit DEC:OVA plus anti-CD40-Antikörper

beobachtet (Daten nicht gezeigt). Der Unterschied in CD69- und 4-1BB-Expression zwischen WT und ATAC KO OT-I-Zellen nimmt mit steigender Menge von OVA zu (Daten nicht gezeigt).

4.4.4 Proliferation von ATAC KO und WT OT-I-Zellen nach Gabe von Ovalbumin *in vivo*

In einem nächsten Schritt sollte die Frage beantwortet werden, ob ATAC KO OT-I-Zellen *in vivo* eine andere Proliferationsrate als WT Zellen aufweisen.

Dafür wurden die ATAC KO und WT OT-I-Zellen im Verhältnis 1:1 in Empfängermäuse transferiert. Jeweils eine der beiden Zellpopulationen wurde dabei mit CFSE markiert um die Proliferationsrate zu bestimmen. Nach 24 h wurden die Zellen entweder mit Ovalbumin (OVA) oder mit OVA plus anti-CD40 stimuliert. Um die maximale Wirkung des Adjuvans zu beobachten, wurde 100 µg anti-CD40-Antikörper in diesem Experiment verwendet. 40 h nach der Stimulation sowohl mit OVA als auch mit OVA plus anti-CD40-Antikörper waren die Zellfrequenz sowie Anzahl der erfolgten Zellteilungen zwischen WT und ATAC KO OT-I-Zellen vergleichbar (Abb. 21).

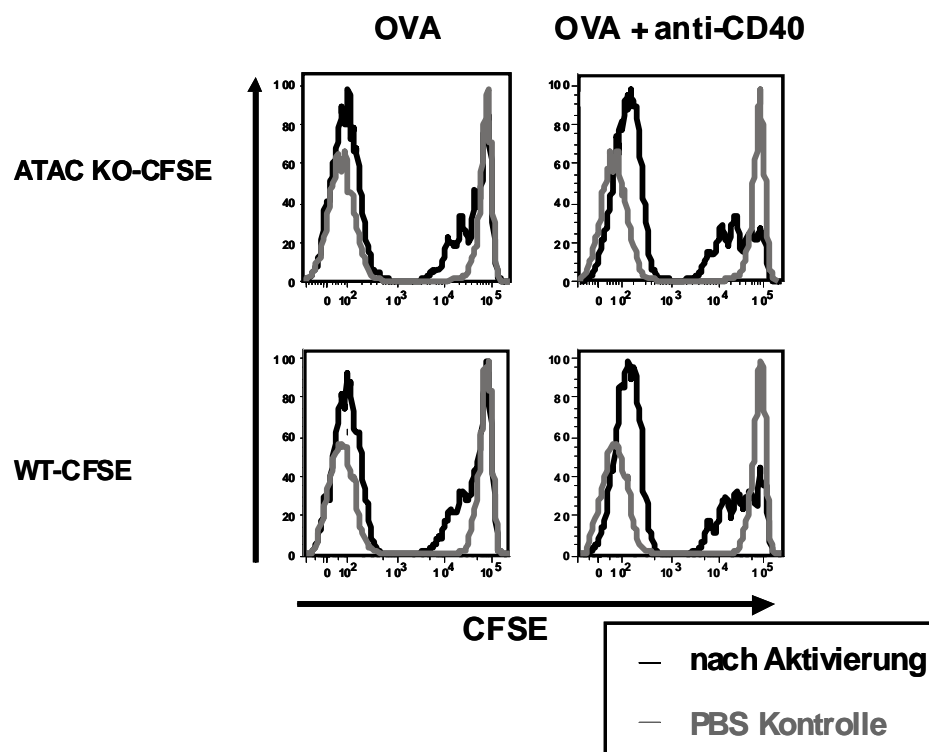


Abbildung 21: Proliferation von ATAC KO OT-I-Zellen im Vergleich zu WT OT-I-Zellen

4×10⁶ ATAC KO OT-I-Zellen mit CFSE-Markierung plus 4×10⁶ WT OT-I-Zellen ohne Markierung (ATAC KO-CFSE) oder 4×10⁶ WT OT-I-Zellen mit CFSE-Markierung plus 4×10⁶ ATAC KO OT-I-Zellen

ohne Markierung (WT-CFSE) wurden in WT C57BL/6 Mäuse intravenös transferiert. 24 h später wurden die Mäuse mit 10 µg OVA oder 10 µg OVA plus 100 µg anti-CD40-Antikörper immunisiert. Nach 40 h wurde die Abnahme des CFSE-Signals von markierten OT-I-Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Es zeigte sich, dass stimulierte ATAC KO OT-I-Zellen zu frühen Zeitpunkten genauso expandieren wie WT Zellen.

4.4.5 Proliferation und Apoptose von OT-I-Zellen nach Gabe von αDEC-205:OVA *in vivo*

Es wurde keine Veränderung der Proliferation der Ag-spezifischen ATAC KO CD8⁺T-Zellen nach Immunisierung mit OVA beobachtet. Um den Einfluss von anderen DZ-Subpopulationen auszuschalten, wurde in den weiteren Versuchen DEC:OVA als Antigen verwendet, welches spezifisch gegen CD8⁺DZ in der Milz gerichtet ist. Auf diese Weise konnte die durch CD8⁺DZ/CD8⁺T-Zell-Interaktion induzierte Proliferation von CD8⁺T-Zellen beobachtet werden. Zur Bestimmung des Einflusses der Antigenmenge auf die Proliferation wurden die Abnahme des CFSE-Signals von ATAC KO und WT OT-I-Zellen 72 h nach Immunisierung mit verschiedenen Mengen von DEC:OVA analysiert. Die Proliferation der OT-I-Zellen begann schon bei 6,25 ng DEC:OVA, stieg mit zunehmender Antigen-Dosis und erreichte ein Maximum mit 100 ng DEC:OVA. Sowohl der Prozentsatz als auch die Anzahl der Zellteilungen von ATAC KO OT-I-Zellen waren vergleichbar zu WT Zellen bei jeder Antigen-Dosis nach 72 h (Abb. 22).

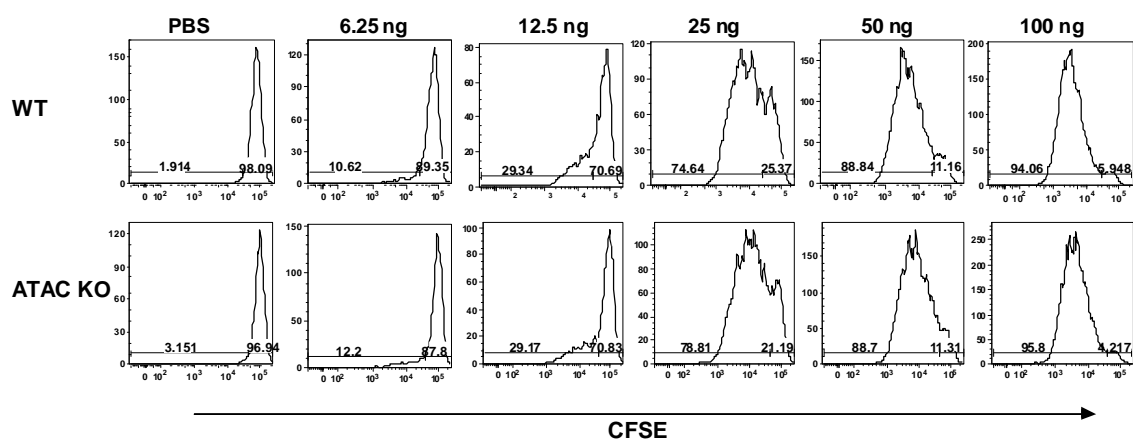


Abbildung 22: Proliferation von ATAC KO OT-I-Zellen 72 h nach Immunisierung mit DEC:OVA im Vergleich zu WT OT-I-Zellen

2×10^6 ATAC KO oder WT OT-I-Zellen wurden in WT C57BL/6 Mäuse intravenös transferiert. 24 h später wurden die Mäuse mit 6,25 ng, 12,5 ng, 25 ng, 50 ng oder 100 ng DEC:OVA immunisiert.

Nach 72 h wurde die Abnahme des CFSE-Signals bei OT-I-Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Um den Einfluss der anti-CD40-Antikörper auf die Zell-Proliferation nachzuweisen, wurde die Teilung von ATAC KO OT-I-Zellen nach Immunisierung mit DEC:OVA plus anti-CD40-Antikörper im Vergleich zu WT Zellen bei 40 h untersucht. Zum Nachweis des Einflusses von endogenem ATAC wurden ATAC KO und WT OT-I-Zellen jeweils sowohl in WT als auch in ATAC KO C57BL/6 Mäuse transferiert. Die Apoptose wurde mittels Annexin-V-Färbung detektiert.

40 h nach Immunisierung war die Frequenz der transferierten OT-I-Zellen generell höher in ATAC KO Empfängermäusen, unabhängig von der Art der transferierten Zellen (WT bzw. ATAC KO). Zwischen ATAC KO und WT OT-I-Zellen zeigte sich kein Unterschied, wenn sie in gleiche Empfängermäuse transferiert wurden (Abb.23 C). ATAC KO OT-I-Zellen sowohl in ATAC KO als auch in WT Empfängermäusen proliferierten geringfügig stärker im Vergleich zu WT OT-I-Zellen, obwohl die Anzahl der Teilungen vergleichbar war (Abb. 23 A). Die Annexin-V-Färbung zeigte annähernd identische Apoptoseraten der OT-I-Zellen unter allen Bedingungen (Abb. 23 D).

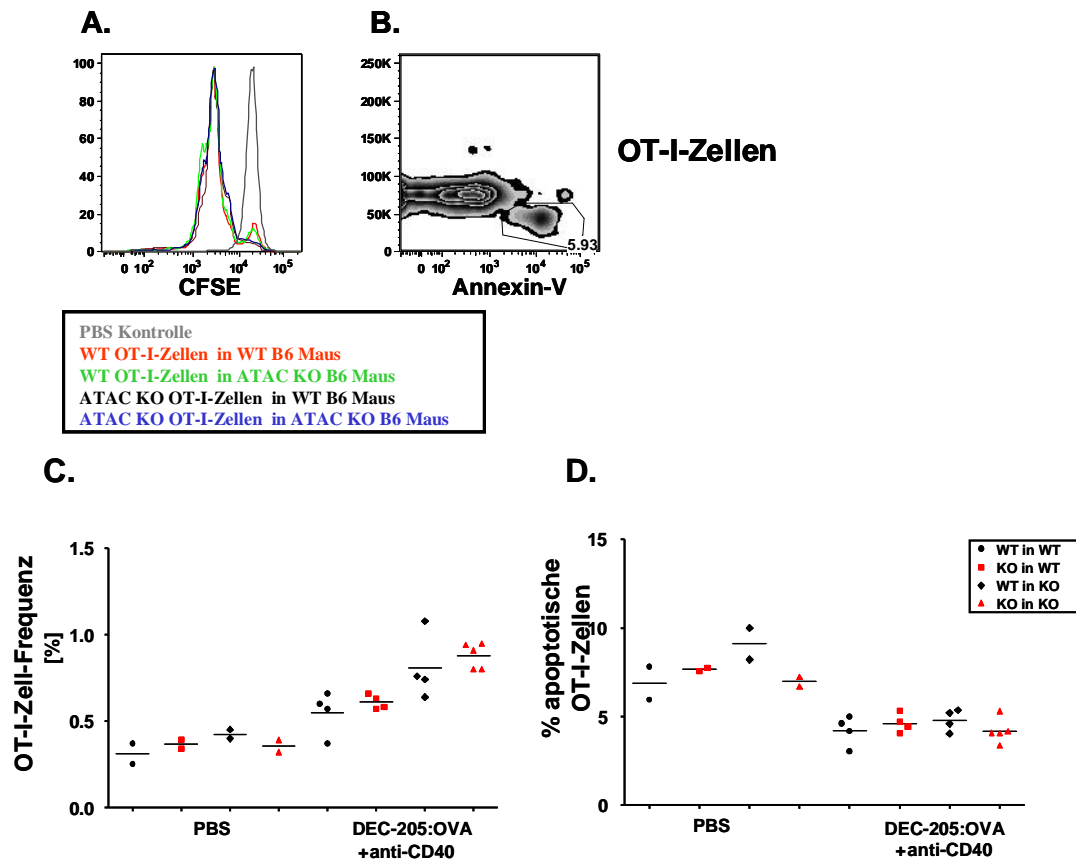


Abbildung 23: Proliferation und Apoptose von ATAC KO OT-I-Zellen 40 h nach Immunisierung im Vergleich zu WT OT-I-Zellen in verschiedenen Empfängermäusen.

2×10^6 ATAC KO oder WT OT-I-Zellen wurden in WT und ATAC KO C57BL/6 Mäuse intravenös transferiert. 24 h später wurden die Mäuse mit 100 ng DEC:OVA plus 6 μ g anti-CD40-Antikörper immunisiert. Nach 40 h wurde die Proliferation der OT-I-Zellen anhand der Abnahme des CFSE-Signals (A) sowie der OT-I-Zellfrequenz im Bezug auf CD8⁺MHCII⁺-Zellen (C) und die Apoptoserate (D) anhand einer Annexin-V-Färbung (B) mittels Durchflusszytometrie analysiert.

4.4.6 Expansion von OT-I-Zellen 3 Tagen und 5 Tagen nach Aktivierung *in vivo*

Obwohl keine deutliche Veränderung in der Proliferation und Apoptose von ATAC-defizienten Zellen nachgewiesen wurde, konnte eine Störung der daraus resultierender Expansion der Antigen-spezifischen CD8⁺T-Zellen nicht ausgeschlossen werden. Dafür wurden die Expansion der Antigen-spezifischen CD8⁺T-Zellen an Tag 3 und Tag 5 nach Stimulation untersucht. Zur Vermeidung des Einflusses von endogenem ATAC auf ATAC KO Zellen wurden hier ATAC KO OT-I-Zellen in ATAC KO C57BL/6 Mäuse und WT OT-I-Zellen in WT C57BL/6 Mäuse intravenös transferiert. Die Immunisierung erfolgte mit intravenöser Injektion von DEC:OVA oder DEC:OVA plus anti-CD40-Antikörper 24 h nach Transfer von OT-I-Zellen. Die Frequenz von OT-I-Zellen an Tag 3 und

Tag 5 nach Immunisierung wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Weiterhin erfolgte die Bestimmung der IFN- γ -Sekretion nach Restimulation *in vitro* mittels intrazellulärer Färbung.

Es zeigte sich eine deutliche Reduktion der Frequenz von ATAC KO OT-I-Zellen bezogen auf die gesamten Milzzellen an Tag 3 nach Immunisierung mit DEC:OVA plus anti-CD40-Antikörper im Vergleich zur WT Gruppe (Abb. 24 A). An Tag 5 waren diese Unterschiede in geringerem Maße feststellbar (Abb. 24 C). Die ATAC KO OT-I-Zellen unterschieden sich von WT Zellen nicht nur in der Expansion, sondern auch in der Fähigkeit zur Zytokinsekretion nach Immunisierung mit anti-CD40-Antikörper an Tag 3. Die ATAC KO OT-I-Zellen produzierten deutlich weniger IFN- γ an Tag 3 und Tag 5 nach Restimulation *in vitro* als WT Zellen nach Immunisierung mit zusätzlicher Gabe von anti-CD40-Antikörper (Abb. 24 B und D).

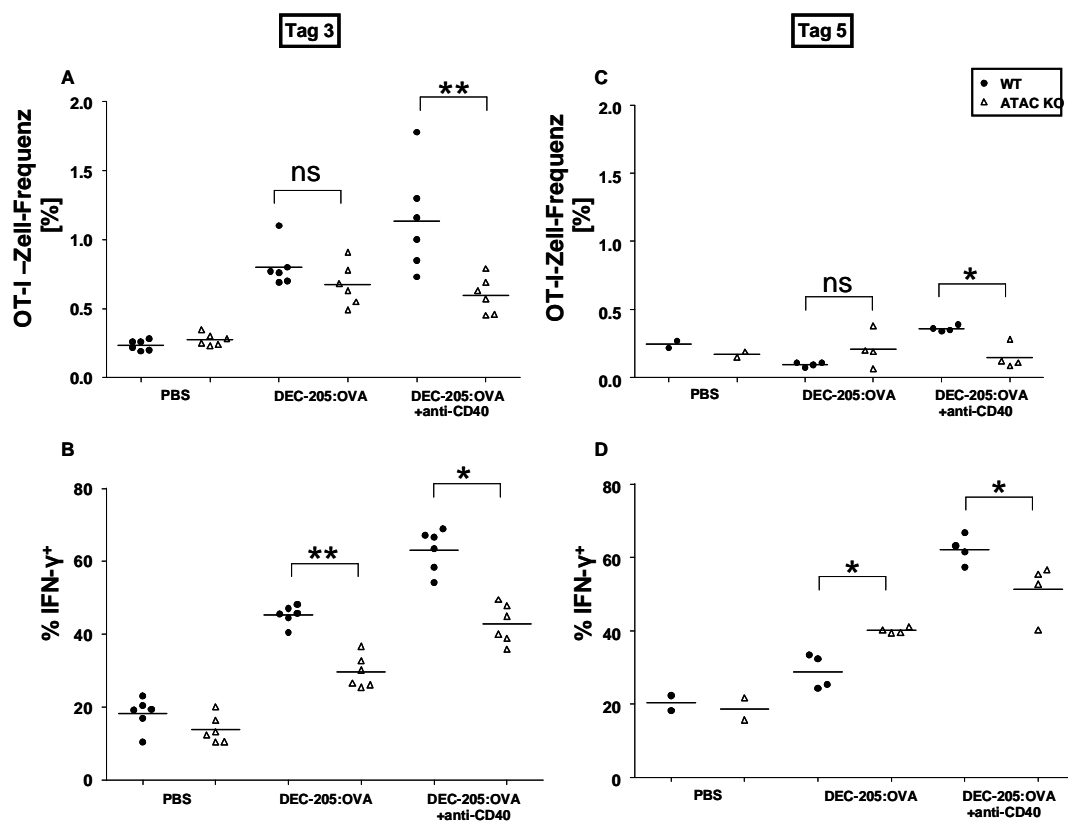


Abbildung 24: Frequenz und IFN- γ -Sekretion von OT-I-Zellen an Tag 3 und 5 nach Immunisierung

2×10^6 ATAC KO OT-I-Zellen wurden in ATAC KO C57BL/6 Mäusen und 2×10^6 WT OT-I-Zellen in WT C57BL/6 Mäuse intravenös transferiert. 24 h später wurden die Mäuse mit 100 ng DEC:OVA oder 100 ng DEC:OVA plus 6 μ g anti-CD40-Antikörper immunisiert. Nach 3 Tagen und 5 Tagen

wurden die Frequenzen der OT-I-Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert (A und C). Die Messung von IFN- γ -Sekretion erfolgt durch intrazelluläre Färbung nach *in vitro* Restimulation (5 h mit 50 ng/ml SIINFEKL in Gegenwart von Brefeldin A) (B und D).

Die Ursache der reduzierten Frequenz von ATAC KO OT-I-Zellen ist bisher unklar, weshalb in weiteren Versuchen die Expansion und Apoptose von ATAC KO OT-I-Zellen an Tag 3,5 und 6,5 im Vergleich zu WT Zellen untersucht wurden.

Diese Experimente zeigten ebenfalls die schwächere Expansion von ATAC KO OT-I-Zellen im Vergleich zu WT Zellen an Tag 3,5 und keinen Unterschied in der Apoptoserate zwischen ATAC KO und WT OT-I-Zellen an Tag 3,5 und Tag 6,5 (Daten nicht gezeigt).

ATAC scheint keinen starken Einfluss auf die Apoptose von CD8⁺ T-Zellen an Tag 3 und 5 nach Aktivierung zu haben. Die Abwesenheit von ATAC beeinträchtigte das maximale Ausmaß der Expansion und die Fähigkeit zur IFN- γ -Sekretion besonders an Tag 3 nach Immunisierung.

4.4.7 Überleben von OT-I-Zellen 12 Tagen nach Aktivierung *in vivo*

Ein anderer wichtiger Parameter zur Bewertung der Effektivität von CD8⁺ T-Zell-vermittelter Immunität ist die Generation des Immungedächtnisses nach Stimulation. Das Aufbauen eines effektiven Immungedächtnisses ist abhängig von langfristig überlebenden Antigen-spezifischen T-Zellen nach Aktivierung. Ungefähr an Tag 12 beginnt die Bildung von Immungedächtniszellen. Diese Phase wurde im Folgenden näher untersucht.

Um den Einfluss von ATAC auf das Zellüberleben nachzuweisen, wurden adoptiv transferierte OT-I-Zellen an Tag 12 nach Stimulation analysiert. In diesen Experimenten wurden ATAC KO OT-I-Zellen in ATAC KO C57BL/6 Mäuse und WT OT-I-Zellen in WT C57BL/6 Mäuse intravenös transferiert. Nach Immunisierung entweder mit DEC:OVA oder DEC:OVA plus anti-CD40-Antikörper wurden die Frequenzen von OT-I-Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Außerdem wurde die Zytokinsekretion der OT-I-Zellen nach Restimulation *in vitro* durch intrazelluläre Färbung nachgewiesen.

4.4.7.1 Rolle von ATAC für das Überleben von aktivierten OT-I-Zellen in der Milz

Zuerst wurden die transferierten OT-I-Zellen mit Fokus auf die Milz untersucht. Nach 12 Tagen entsprachen in der PBS-Kontrolle die Frequenzen von ATAC KO und WT OT-I-Zellen rund 0,2% der gesamten Milzzellen. Nach Immunisierung mit DEC:OVA war die Frequenz sowohl von ATAC KO als auch von WT OT-I-Zellen deutlich erniedrigt (nur 0,01% der gesamten lebenden Milzzellen) im Vergleich zu den Frequenzen der PBS-Kontrolle. Bei der Immunisierung mit zusätzlichen anti-CD40-Antikörpern entsprach die Frequenz der WT OT-I-Zellen der Zahl in der PBS-Kontrolle. Im Gegenzug zeigten ATAC KO OT-I-Zellen nach Immunisierung mit DEC:OVA plus anti-CD40-Antikörpern eine deutlich erniedrigte Frequenz im Vergleich zu PBS-Kontrolle und der WT Gruppe (Abb. 25).

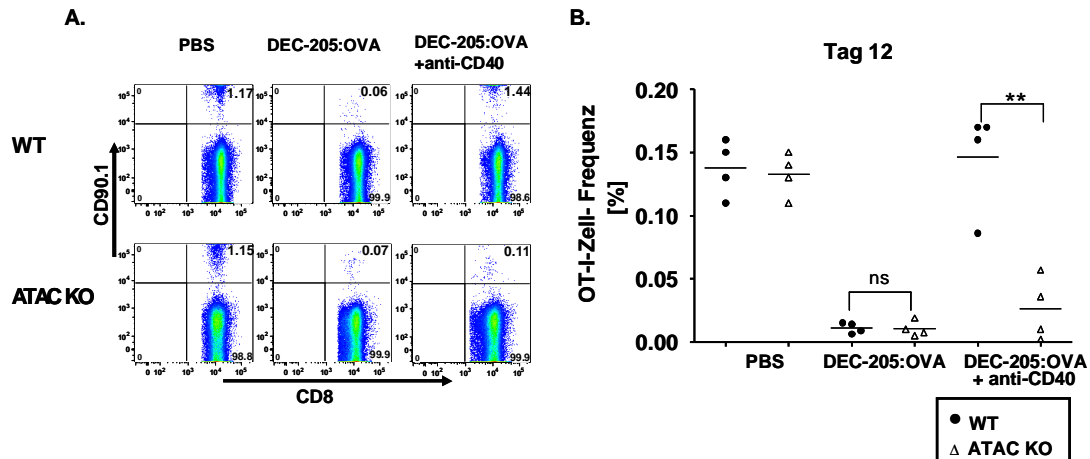


Abbildung 25: Frequenz von OT-I-Zellen in C57BL/6 Mäuse an Tag 12 nach Immunisierung

2×10^6 ATAC KO OT-I-Zellen wurden in ATAC KO C57BL/6 Mäuse und 2×10^6 WT OT-I-Zellen in WT C57BL/6 Mäuse intravenös transferiert. 24 h später wurden die Mäuse mit 100 ng DEC:OVA oder 100 ng DEC:OVA plus 6 μ g anti-CD40-Antikörper immunisiert. An Tag 12 nach Immunisierung wurden die Frequenzen der OT-I-Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Gezeigt sind die Gates der OT-I-Zellen ($CD8^+CD90.1^+$) ausgehend von $DAPI^+MHCII^-CD8^+$ Zellen (A) und Frequenzen der OT-I-Zellen bezogen auf die gesamten lebenden Zellen (B).

Außerdem wurde die Zytokinsekretion von OT-I-Zellen nach Restimulation durch intrazelluläre Färbung gemessen.

Die ATAC KO und WT OT-I-Zellen in den PBS-Kontroll-Mäusen sezernierten eine vergleichbare Menge von IFN- γ , TNF- α und IL-2 nach *in vitro* Restimulation mit SIINFEKL (Abb. 26 B). Die DEC:OVA stimulierten OT-I-Zellen produzierten deutlich weniger Zytokine (ATAC, IL-2 und TNF- α) als die Zellen der PBS-Kontrolle. ATAC KO und WT OT-I-Zellen zeigten keine signifikante Unterschiede in der Sekretion von IFN- γ , IL-2 und TNF- α nach Immunisierung mit DEC:OVA alleine und anschließender Restimulation *in vitro* (Abb. 26 C). Die mit DEC:OVA plus anti-CD40-Antikörper immunisierten WT OT-I-Zellen sezernierten vergleichbare Mengen ATAC und IL-2, mehr IFN- γ bzw. weniger TNF- α als die Zellen der PBS-Kontrolle. Im Vergleich zu WT Zellen produzierten ATAC KO OT-I-Zellen 2-fach weniger TNF- α und IL-2 sowie ein Viertel weniger IFN- γ nach *in vitro* Restimulation (Abb. 26 D).

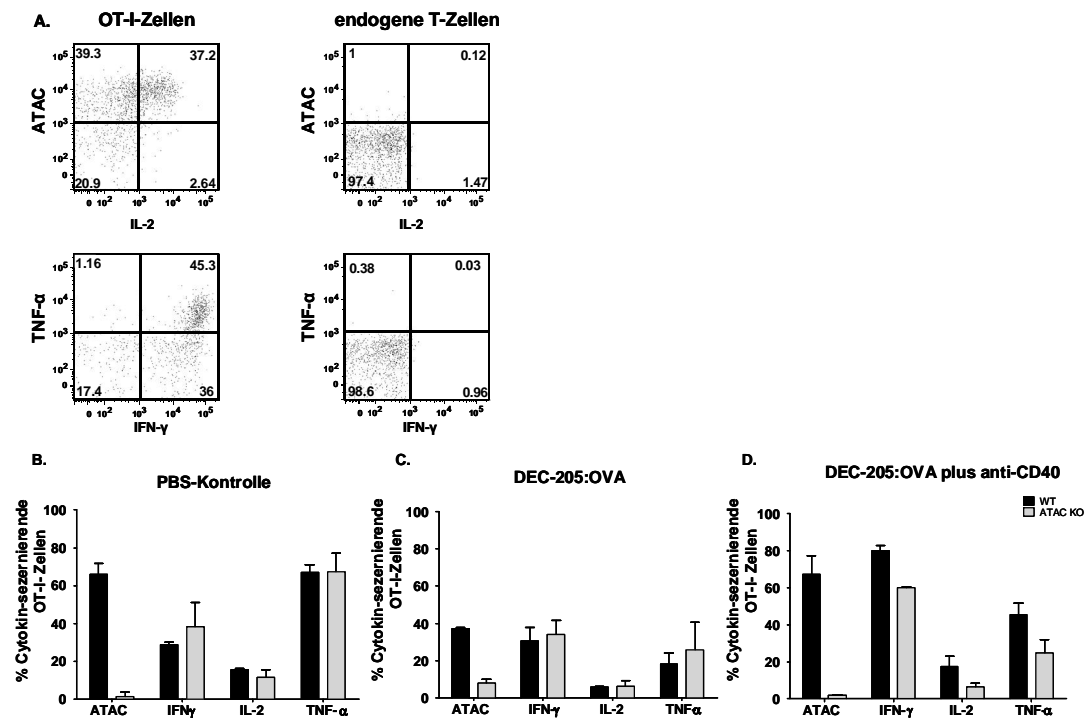


Abbildung 26: Zytokinsekretion der OT-I-Zellen nach Restimulation *in vitro*

2×10^6 ATAC KO OT-I-Zellen wurden in ATAC KO C57BL/6 Mäuse und 2×10^6 WT OT-I-Zellen in WT C57BL/6 Mäuse intravenös transferiert. 24 h später wurden die Mäuse mit PBS (B) oder mit 100 ng DEC:OVA (C) oder plus $6 \mu\text{g}$ anti-CD40-Antikörper (D) immunisiert. Nach 12 Tagen wurde die Zytokinsekretion der OT-I-Zellen nach Restimulation mit 50 ng/ml SIINFEKL für 5 h *in vitro* in Gegenwart von Brefeldin A mittels intrazellulärer Färbung in der Durchflusszytometrie analysiert. Die Gates für die Zytokinsignale wurden anhand endogener CD8⁺ T-Zellen gesetzt (A).

4.4.7.2 Rolle von ATAC für das Überleben von aktivierten OT-I-Zellen in verschiedenen Organen

Die erniedrigte Frequenz von ATAC KO OT-I-Zellen in der Milz konnte einerseits auf eine erhöhte Apoptose, jedoch auch auf eine veränderte Verteilung der Zellen in den Organen des gesamten Körpers zurückzuführen sein. Um die zweite Möglichkeit zu untersuchen, wurde die OT-I-Zell-Frequenz in verschiedenen Organen an Tag 12 nach Immunisierung analysiert. Neben der Milz wurden auch Lymphknoten, Lunge, Leber und Knochenmark untersucht.

In PBS Kontroll-Mäusen waren die Frequenz von ATAC KO OT-I-Zellen in jedem der geprüften Organe vergleichbar zur Frequenz der WT Zellen. Die Frequenz der ATAC KO OT-I-Zellen nach Immunisierung mit DEC:OVA und anti-CD40-Antikörper im Vergleich zur WT Zellen war in jedem der untersuchten Organe wesentlich verringert (Abb. 27).

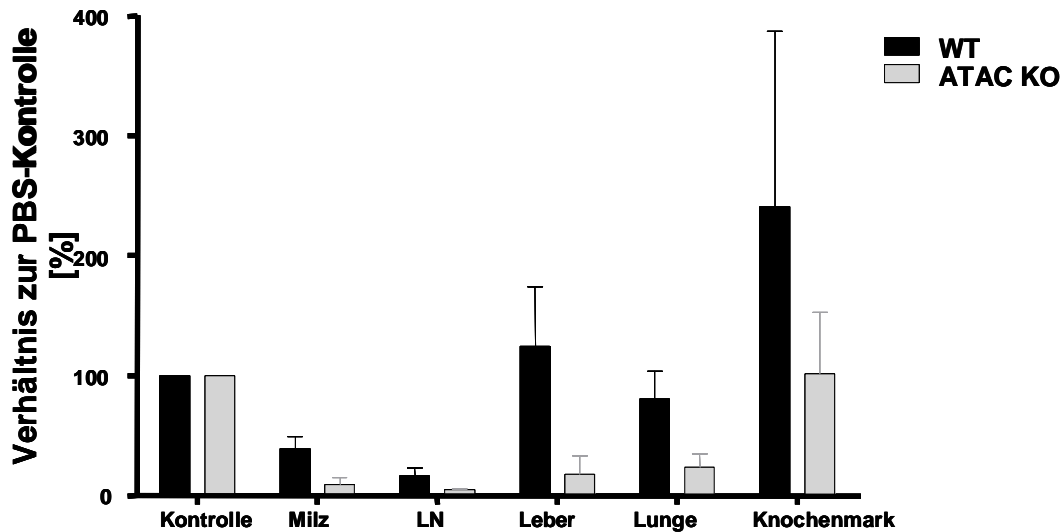


Abbildung 27: Verhältnis von OT-I-Zellen zur PBS-Kontrolle in verschiedenen Organen an Tag 12 nach Immunisierung

2×10^6 ATAC KO OT-I-Zellen wurden in ATAC KO C57BL/6 Mäuse und 2×10^6 WT OT-I-Zellen in WT C57BL/6 Mäuse intravenös transferiert. 24 h später wurden die Mäuse mit 100 ng DEC:OVA plus 6 μ g anti-CD40-Antikörper immunisiert. An Tag 12 wurden die Frequenzen der OT-I-Zellen in verschiedenen Organen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Frequenz in den PBS-Kontrollen entsprechen 100%. Das Verhältnis zur PBS-Kontrolle wurde nach folgender Formel berechnet: (Frequenz der OT-I-Zellen in immunisierter Maus/die Mittelwert der OT-I-Zell-Frequenz in PBS Kontroll-Mäuse) \times 100.

Die allgemein niedrigeren Frequenzen von ATAC KO OT-I-Zellen in verschiedenen Organen deuten darauf hin, dass dieses Phänomen nicht durch verändertes Migrationsverhalten sondern durch reduziertes Überleben von ATAC KO OT-I-Zellen hervorgerufen wurde. ATAC scheint somit ein wichtiges Signal für das langzeitige Überleben von aktivierten CD8⁺ T-Zellen zu sein. Die Überlebenden OT-I-Zellen exprimierten CD44 auf ihre Oberflächen an Tag 12 nach Aktivierung (Daten nicht gezeigt). Die CD44⁺ T-Zellen wurden in Publikationen als Gedächtnis-T-Zellen bezeichnet [Howie et al., 1994; Yamada et al., 2001; Wong et al., 2009].

4.4.7.3 Rolle von ATAC für das Überleben von aktivierten OT-I-Zellen nach 40 Tagen

Wie bereits in der Literatur beschrieben, können Gedächtnis-Zellen antigenfrei über 40 Tage nach Aktivierung überleben [Madakamutil et al., 2004; Bachmann et al., 2005]. Um die Rolle von ATAC für die Generierung des Immungedächtnisses eingehend zu untersuchen, wurden Frequenzen von OT-

I-Zellen weiterhin nach Aktivierung über 40 Tage verfolgt. Zum Nachweis des Effekts von Empfängeremäusen wurden WT OT-I-Zellen sowohl in WT als auch in ATAC KO C57BL/6 Mäuse und ATAC KO OT-I-Zellen in ATAC KO C57BL/6 Mäuse transferiert. Die Immunisierung erfolgte intravenös mittels DEC:OVA oder DEC:OVA plus anti-CD40-Antikörper 24 h nach der Injektion der OT-I-Zellen. An Tag 40 nach Immunisierung wurden OT-I-Zellen mit Hilfe des Markers CD90.1 in der Milz detektiert.

Es zeigte sich, dass in der Milz OT-I-Zellen an Tag 40 nach Immunisierung mit DEC:OVA kaum überleben. Während die mit DEC:OVA plus anti-CD40-Antikörper stimulierten ATAC KO OT-I-Zellen kaum mehr nachweisbar waren, überlebten rund 30% (in ATAC KO C57BL/6 Maus) bis 40% (in WT C57BL/6 Maus) der WT OT-I-Zellen im Vergleich zur PBS-Kontrolle (Abb. 28).

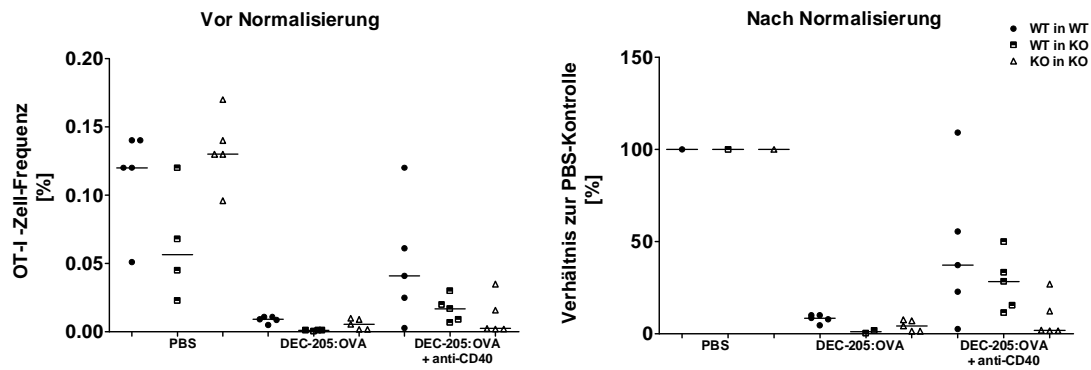


Abbildung 28: Frequenz von OT-I-Zellen an Tag 40 nach Immunisierung.

2×10^6 ATAC KO OT-I-Zellen wurden in ATAC KO C57BL/6 Mäuse und 2×10^6 WT OT-I-Zellen in WT oder ATAC KO C57BL/6 Mäuse intravenös transferiert. 24 h später wurden die Mäuse mit 100 ng DEC:OVA alleine oder plus $6 \mu\text{g}$ anti-CD40-Antikörper immunisiert. An Tag 40 wurden die Frequenzen der OT-I-Zellen in der Milz mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Frequenz (vor Normalisierung) sowie das Verhältnis zur PBS-Kontrolle (nach Normalisierung) sind dargestellt.

Das Abwesenheit des ATAC-Signals führte zu einer wesentlich reduzierten Überlebensrate von Ag-spezifischen CD8^+ T-Zellen nach Aktivierung mit DEC:OVA plus anti-CD40-Antikörper, welche eine entscheidende Rolle von ATAC bei der Generation des Immungedächtnisses nahe legt.

4.4.8 Rolle von ATAC bei CD8^+ T-Zell-vermittelter Zytotoxizität

Die bisherigen Untersuchungen zeigten, dass ATAC als wichtiges Signal während der Aktivierung, Expansion sowie dem Langzeitüberleben von Ag-

spezifischen CD8⁺ T-Zellen wirkte. Um die funktionelle Bedeutung dieses Effekts aufzuklären, wurde die zytotoxische Aktivität von Ag-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in einem Mausmodell analysiert. In dem Modell wurden WT OT-I-Zellen in WT C57BL/6 Mäuse und ATAC KO OT-I-Zellen in ATAC KO C57BL/6 Mäuse intravenös transferiert. 24 h später wurden die Mäuse entweder mit WT-300-19-Zellen (negative Kontrolle) oder mit OVA-300-19-Zellen intravenös immunisiert. Nach 7 Tagen wurden mit SIINFEKL-beladenen naiven syngenischen C57BL/6-Milzzellen (CFSE^{hoch}) sowie Milzzellen ohne SIINFEKL-Beladung (CFSE^{niedrig}) im Verhältnis 1:1 in jede Maus injiziert. 18 h später wurde die Zytotoxizität der OT-I-Zellen anhand des Verhältnisses der CFSE^{hoch} Population zu CFSE^{niedrig} Population errechnet. Der Nachweis der CFSE-markierten Zellen sowie der transferierten OT-I-Zellen erfolgt mittels der Durchflusszytometrie (Abb. 29 A).

Die OT-I-Zellen in den Negativkontrollen besaßen annähernd identische Frequenzen bezogen auf die gesamten Milzzellen.

Die Frequenz der ATAC KO OT-I-Zellen war nach Immunisierung mit OVA-300-19-Zellen im Vergleich zu WT OT-I-Zellen deutlich erniedrigt (Abb. 29 B). Gleichzeitig wiesen diese ATAC KO OT-I-Zellen eine deutlich niedrigere zytotoxische Aktivität (etwa 70%) als die WT Zellen (über 90%) auf (Abb. 29 C).

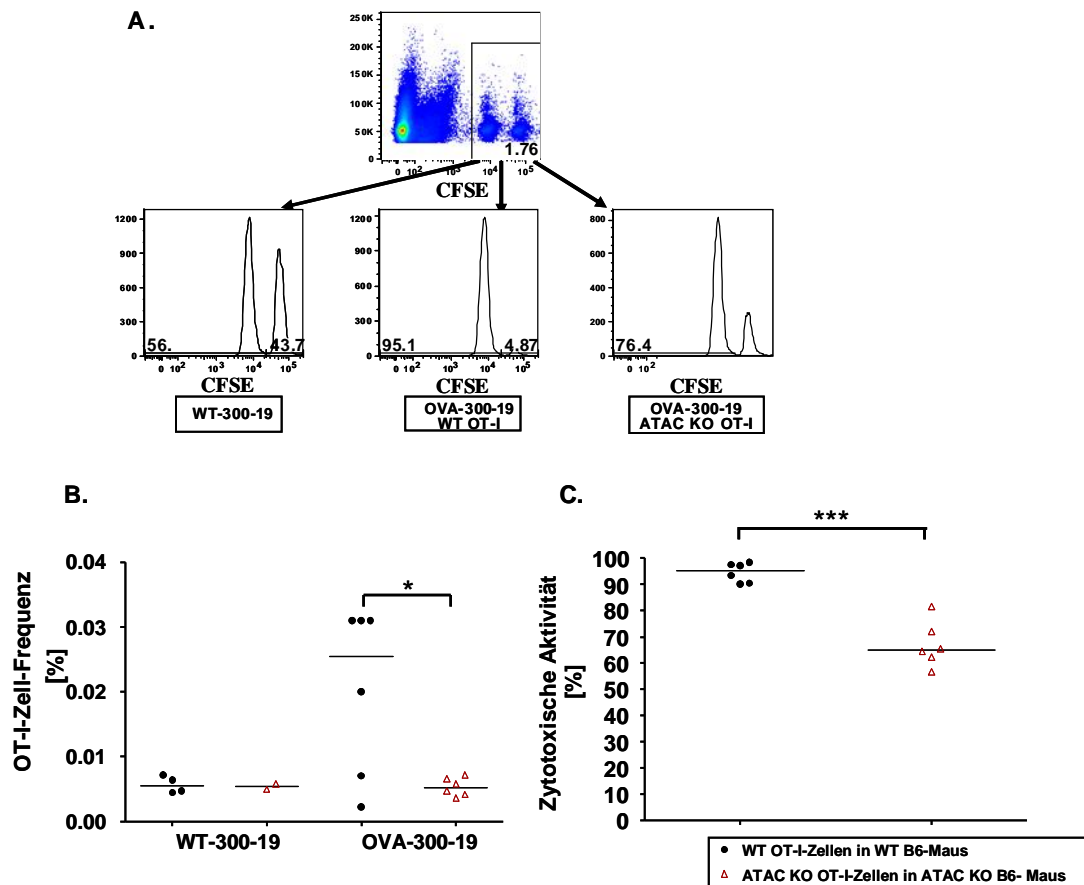


Abbildung 29: Frequenz und zytotoxische Aktivität von OT-I-Zellen an Tag 7

1×10^6 ATAC KO OT-I-Zellen wurden in ATAC KO C57BL/6 Mäuse und 1×10^6 WT OT-I-Zellen in WT C57BL/6 Mäuse intravenös transferiert. 24 h später wurden die Mäuse mit 3×10^6 WT-300-19-Zellen als negative Kontrolle oder mit 3×10^6 OVA-300-19-Zellen immunisiert. An Tag 6 wurden die Mäuse mit C57BL/6-Milzzellen ohne SIINFEKL (schwache CFSE-Markierung) plus C57BL/6-Milzzellen mit SIINFEKL-Beladung (helle CFSE-Markierung) reimmunisiert. 18 h später wurden die Frequenzen der OT-I-Zellen und die zytotoxische Aktivität in der Milz mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Gates zeigen die Detektion von CFSE-positiven Zellen (A). Die statistische Auswertung von den Frequenzen der OT-I-Zellen bezogen auf gesamten Milzzellen ist in (B) und die zytotoxische Aktivität in (C) dargestellt.

Bisher wurden immer gesamte Milzzellen aus OT-I-Mäusen für den Transfer in C57BL/6 Mäuse verwendet und erst anschließend die Zellen stimuliert. Somit wurden die Antigene von gemischten DZ aus C57BL/6 und (zu einem kleinen Anteil) von DZ der transgenen OT-I-Mäusen aufgenommen und präsentiert. Um die Antigene nur von DZ der C57BL/6 Mäuse zu präsentieren, wurden die Zellen (WT-300-19 oder OVA-300-19) bereits 14 h vor Transfer der OT-I-Zellen intravenös in C57BL/6 Mäuse injiziert. Nach der Aufnahme der Antigene wurden OT-I-Zellen wie immer in diese C57BL/6 Mäuse transferiert. An Tag 6 wurden die Mäuse auf gleiche Weise reimmunisiert und 18 h später wurde die

zytotoxische Aktivität analysiert. Auch unter diesen Bedingungen wiesen ATAC KO OT-I-Zellen eine verringerte Frequenz und zytotoxische Aktivität auf (Daten nicht gezeigt).

Zum Nachweis des Einflusses von ATAC auf die Zytotoxizität zu späteren Zeitpunkten wurde ein ähnliches Experiment an Tag 12 durchgeführt (in der Zusammenarbeit mit Ahmed Mora). In diesem Experiment wurden die Empfängermäuse ebenso 14 h vor dem Transfer der OT-I-Zellen mit WT-300-19 und OVA-300-19 immunisiert und anschließend WT OT-I-Zellen in WT C57BL/6 Mäuse und ATAC KO OT-I-Zellen in ATAC KO C57BL/6 Mäuse intravenös transferiert. Um den Einfluss der Empfängermäuse zu bewerten wurden ATAC KO OT-I-Zellen zusätzlich auch in WT C57BL/6 Mäuse transferiert. 12 Tage später wurde ein *in vivo* Zytotoxizitätsassay, wie oben beschrieben, durchgeführt, die OT-I-Zellen wurden mit Marker CD90.1 detektiert.

Nach Immunisierung mit OVA-300-19-Zellen zeigten die ATAC KO OT-I-Zellen am Tag 12 eine erniedrigte Frequenz bezogen auf die gesamten Milzzellen im Vergleich zu WT Zellen (Abb. 30 A.). Gleichzeitig übten die ATAC KO OT-I-Zellen eine reduzierte Zytotoxizität im Vergleich zur WT OT-I-Zellen aus. Während WT OT-I-Zellen über 90% der SIINFEKL-beladenen Zellen beseitigten, lysierten ATAC KO OT-I-Zellen nur 30% (nach Transfer in ATAC KO C57BL/6 Mäuse) bis 50% (nach Transfer in WT C57BL/6 Mäuse) der SIINFEKL-beladenen Zellen (Abb. 30 B).

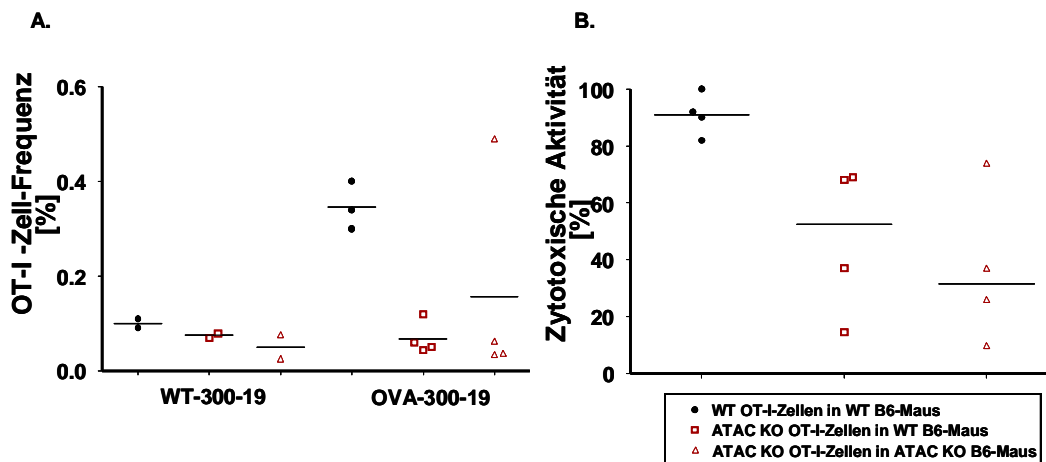


Abbildung 30: Frequenz und zytotoxische Aktivität von OT-I-Zellen an Tag 12

14 h vor Transfer wurden die Mäuse mit 3×10^6 WT-300-19-Zellen als negative Kontrolle oder 3×10^6 OVA-300-19-Zellen immunisiert. Dann wurden 1×10^6 ATAC KO OT-I-Zellen entweder in WT oder ATAC KO C57BL/6 Mäuse und 1×10^6 WT OT-I-Zellen in WT C57BL/6 Mäuse intravenös transferiert. An Tag 12 wurden die Mäuse mit C57BL/6-Milzzellen ohne SIINFEKL (schwache CFSE-Markierung) plus C57BL/6-Milzzellen mit SIINFEKL-Beladung (helle CFSE-Markierung) reimmunisiert. 18 h später wurden die Frequenzen der OT-I-Zellen in der Milz (A) und die zytotoxische Aktivität (B) mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Die ATAC KO OT-I-Zellen weisen eine deutliche Reduktion zytotoxischer Aktivität im Vergleich zu WT OT-I-Zellen an Tag 7 und noch deutlicher an Tag 12 auf. Die Abnahme der zytotoxischen Aktivität von ATAC KO OT-I-Zellen korrelierte mit einer niedrigeren Überlebensrate zu einem späterem Zeitpunkt nach Aktivierung.

Daher spielt ATAC vermutlich eine wichtige Rolle in der $CD8^+$ T-Zell-vermittelten Zytotoxizität durch die Regulation der Frequenz Ag-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen.

4.5 ATAC ist ein Chemokin für XCR1-tragende Zellen

Unsere Gruppe hatte gezeigt, dass ATAC *in vitro* eine chemotaktische Wirkung auf XCR1-tragende $CD8^+$ DZ ausübt [Opitz, unpublizierten Daten]. Der eindeutige Nachweis einer *in vivo* Chemotaxis konnte jedoch noch nicht erbracht werden.

Um die chemotaktische Wirkung von ATAC *in vivo* zu prüfen, wurde ein einfaches Chemotaxis-Modell im Maussystem aufgebaut. Dazu wurde

chemisch synthetisiertes ATAC oder nur PBS (negative Kontrolle) in den Bauchraum naiver ATAC KO C57BL/6 Mäuse injiziert. 2 h später wurden die Zellen aus dem Bauchraum gewaschen und der Anteil von verschiedenen Zellpopulationen in der Durchflusszytometrie analysiert.

Die Daten zeigten, dass die DZ aus PBS-Kontrolltieren über 80% $CD11b^{hoch}CD8^{-}$ DZ, 10% $CD11b^{niedrig}CD8^{-}$ DZ und nur 1% $CD8^{+}$ DZ enthielten (Abb. 31 PBS). Nach der Applikation von ATAC traten deutlich mehr $CD11b^{niedrig}CD8^{-}$ DZ (28% von DZ) und etwas mehr $CD11b^{-}CD8^{+}$ DZ (4,7% der DZ) im Bauchraum auf (Abb. 31. ATAC). Beide DZ-Populationen exprimierten CD205 auf der Oberfläche. Die $CD11b^{+}$ DZ waren dagegen CD205 negativ. Die absolute Anzahl der Gesamtzellen sowie der DZ wurde nicht wesentlich durch lokale ATAC-Applikation verändert.

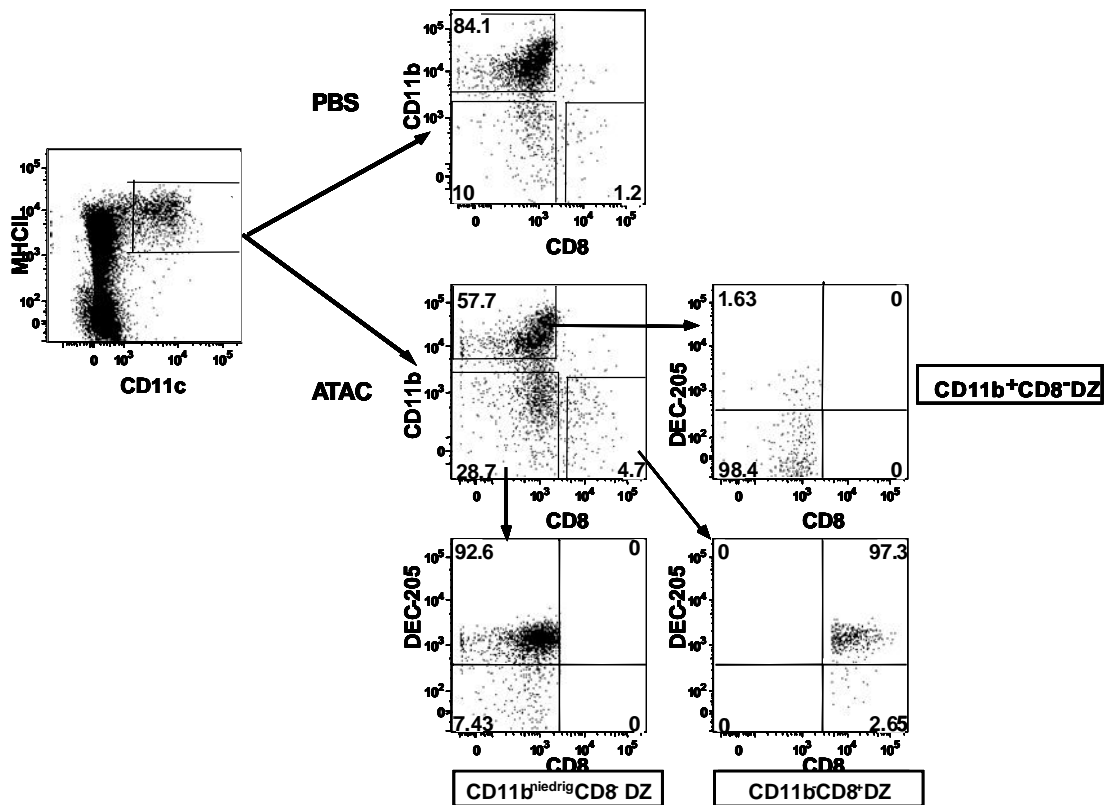


Abbildung 31: Subpopulationen von DZ nach ATAC-Applikation

200 μ l PBS (PBS) oder 1 μ g chemisch synthetisiertes ATAC (ATAC) wurde in den Bauchraum von ATAC KO C57BL/6 Mäusen injiziert. 2 h später wurden die Zellen aus den Bauchraum ausgewaschen und in der Durchflusszytometrie analysiert. Die DZ wurden als $CD11c^{+}MHCII^{-}B220^{-}$ definiert. Die DZ wurden weiter durch die Expression von CD11b und CD8 in $CD11b^{+}CD8^{-}$, $CD11b^{niedrig}CD8^{-}$ und $CD11b^{-}CD8^{+}$ DZ in drei Subpopulationen eingeteilt. Die Expression von CD205 wurde bei allen DZ-Subpopulationen bestimmt.

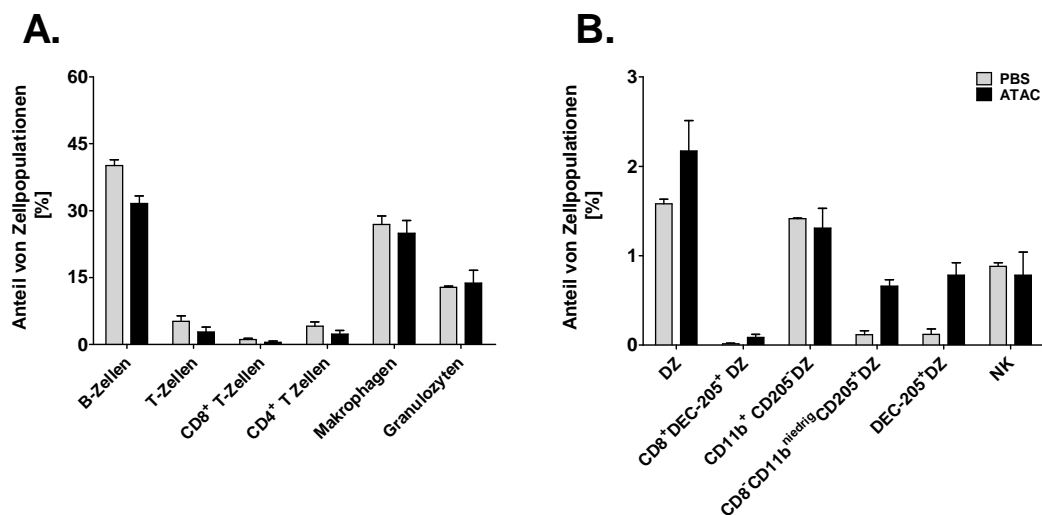


Abbildung 32: prozentueller Anteil verschiedener Zellpopulationen im Bauchraum nach lokaler ATAC-Applikation

200 μ l PBS oder 1 μ g chemisch synthetisiertes ATAC wurde in den Bauchraum von ATAC KO C57BL/6 Mäusen injiziert. 2 h später wurden die Zellen aus dem Bauchraum ausgewaschen und in der Durchflusszytometrie analysiert. Die prozentuellen Anteile von B-Zellen, T-Zellen, Makrophagen und Granulozyten (A) auch von NK-Zellen, DZ sowie DZ-Subpopulationen (B) wurden bezogen auf Gesamtzellen statistisch dargestellt.

Der Anteil der beiden CD205⁺ DZ-Populationen (CD11b^{niedrig}CD8⁻ DZ und CD11b⁺CD8⁺ DZ) stieg um das 4-8 fache im Bauchraum an während der Anteil der CD11b⁺ DZ hingegen unverändert blieben (Abb. 32 B). Außerdem wurden der Anteil der T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, Granulozyten und NK-Zellen nicht durch lokale ATAC-Applikation verändert (Abb. 32 A und B). In weiterer Untersuchung wurde die Wirkung von ATAC auf die Entwicklung von CD11b⁺CD8⁻ DZ in CD11b^{niedrig}CD8⁻ DZ im Peritonealraum ausgeschlossen (Daten nicht gezeigt). ATAC scheint spezifisch CD205⁺ DZ anlocken zu können.

4.6 Der Phänotyp von ATAC KO C57BL/6 Mäusen

ATAC wird z. T. konstitutiv von NK-Zellen, NKT-Zellen sowie γ/δ T-Zellen im Ruhezustand freigesetzt (Hartung, unpublizierte Daten). Insofern stellt sich die Frage, welche Rolle ATAC bei der Entwicklung des murinen Immunsystems in naivem Zustand spielt. Daher wurde der Phänotyp von ATAC KO C57BL/6 Mäusen ohne Immunisierung im Vergleich zu WT Mäusen charakterisiert.

4.6.1 T-Zell-Populationen in der Milz

Zuerst wurden die Zellpopulationen in der Milz von naiven ATAC KO C57BL/6 Mäusen im Vergleich zu WT Tieren analysiert. In 6-8 Wochen alten Mäusen traten keine ausgeprägten Veränderungen außer einem erhöhten Anteil von $CD4^+$ regulatorischen T-Zellen (Treg) auf (Abb. 33 A). Der erhöhte Anteil von $CD4^+$ Treg wurde in der Milz von ATAC KO C57BL/6 Mäusen bei jedem Alter nachgewiesen. Besonders in der Milz aus über 1 Jahr alten Mäusen waren über 40% der $CD4^+$ T-Zellen Foxp3 positiv (Abb. 33 A). Dagegen nahm der Anteil der $CD8^+$ T-Zellen in 10 bzw. 13 Monate alten ATAC KO Mäusen ab, während ihr Anteil mit steigendem Alter in den WT Mäusen relativ stabil blieb (Abb. 33 B). Die Gesamt-Zellzahl in der Milz war allerdings in über 10 Monate alten ATAC KO C57BL/6 Mäusen deutlich erhöht (Abb. 33 C). Daher blieb die absolute Anzahl der ATAC KO $CD8^+$ T-Zellen stets vergleichbar mit WT Zellen (Abb. 33 D).

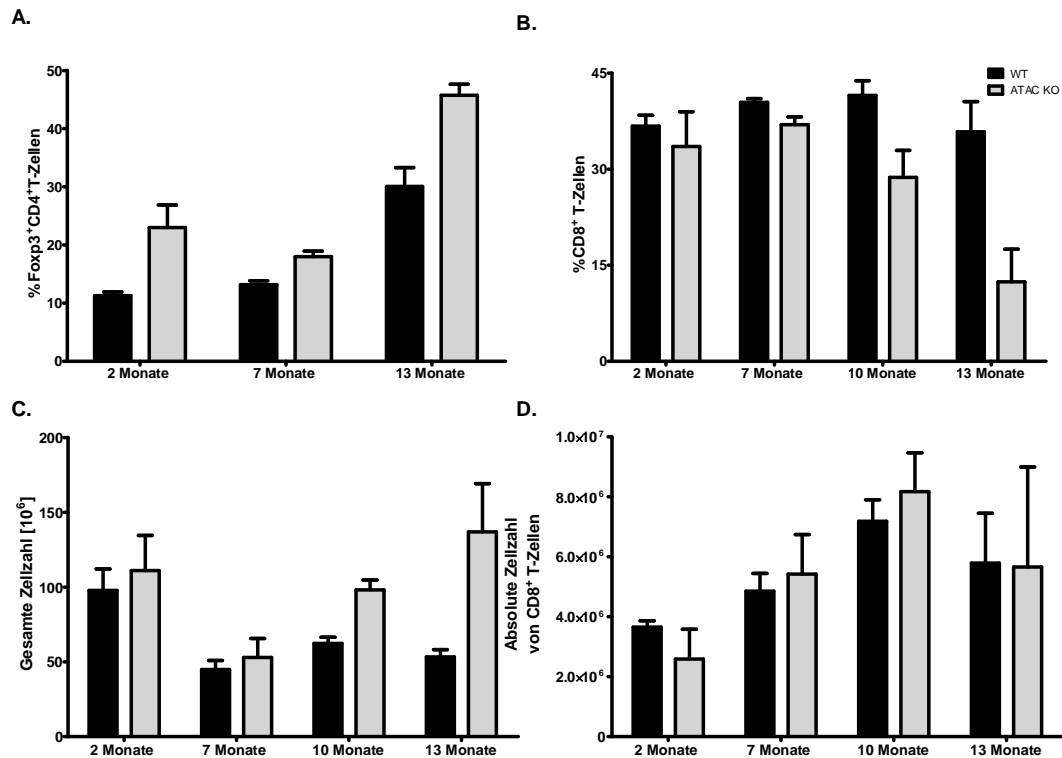


Abbildung 33: Anteil von Foxp3⁺CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der Milz von naiven ATAC KO C57BL/6 Mäusen in verschiedenem Alter im Vergleich zu WT Mäusen.

Milzzellen wurden von 2 bis 13 Monate alten ATAC KO und WT C57BL/6 Mäusen isoliert. Die prozentuellen Anteile der T-Zellpopulationen bezogen auf gesamte CD3⁺ T-Zellpopulation wurden in der Durchflusszytometrie untersucht (A und B). Die absolute Milzzellzahl (C) sowie die Zellzahl von CD8⁺ T-Zellen in der Milz (D) sind statistisch dargestellt.

Die Abwesenheit ATAC-Signals erhöhte den Anteil von CD4⁺Foxp3⁺Treg sowohl in jungen Mäusen als auch in alten Mäusen. In alten ATAC KO Mäusen (über 10 Monate alt) steigerte Zellzahl in der Milz im Vergleich zu alten WT Mäusen. Die absolute Zellzahl von CD8⁺ T-Zellen war relativ stabil in der ATAC-defizienten Milz im Vergleich mit WT C57BL/6 Mäusen. Daher wurde der Anteil von CD8⁺ T-Zellen durch die Expansion von anderen Zellpopulationen in über 10 Monate alten ATAC KO Mäusen erniedrigt. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass ATAC auch an der Kontrolle der unspezifischen Expansion von einigen Zellpopulationen in der Milz beteiligt ist.

4.6.2 Der Phänotyp von über ein Jahr alten ATAC KO C57BL/6 Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen

Um die ausgeprägte Veränderung der T-Zell-Populationen in 13 Monate alten ATAC KO C57BL/6 Mäusen aufzuklären, wurden diese Mäuse weiterhin systematisch pathologisch untersucht.

Die ATAC KO C57BL/6 Mäuse, die älter als 1 Jahr waren, zeigten nicht das typische Aussehen von alten Mäusen (Haarausfall, gebogener Rücken). Sie besaßen ein vergleichbares Körpergewicht (Abb. 34 A) und ähnliche Lebendigkeit wie entsprechend alte WT Mäuse.

Überraschenderweise wiesen alte ATAC KO C57BL/6 Mäuse eine erheblich vergrößerte Milz und vergrößerte Speicheldrüsen auf (Abb. 34 B).

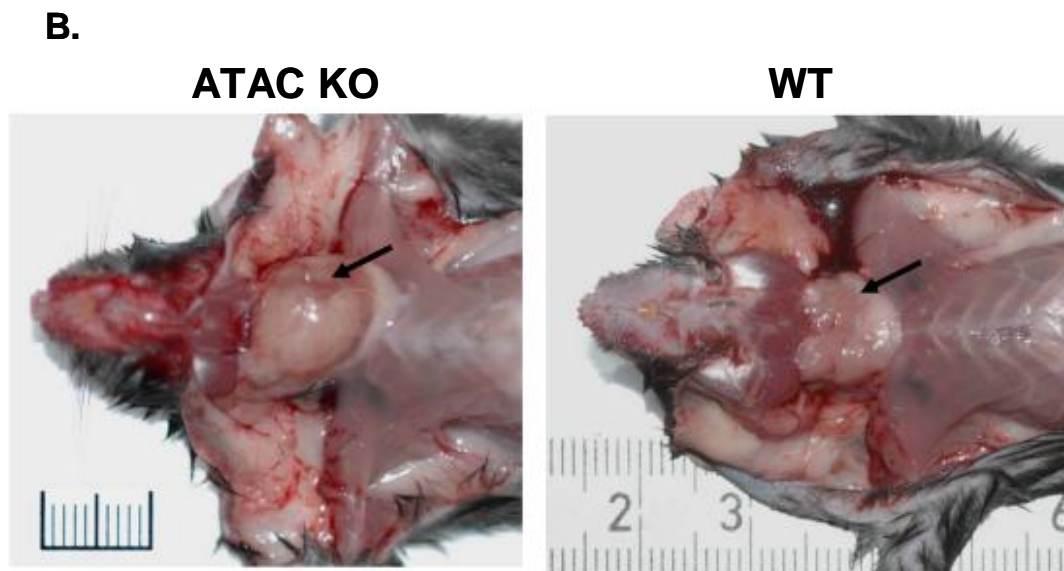
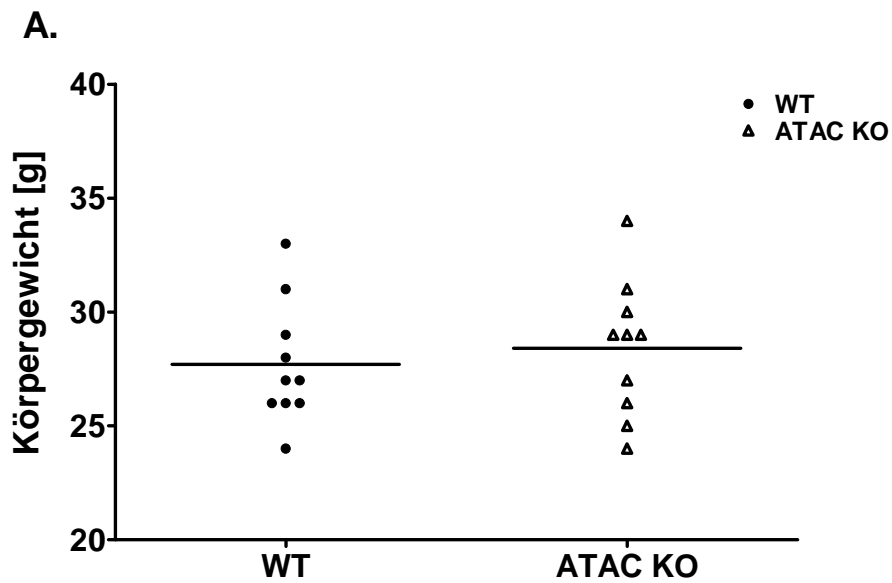


Abbildung 34: Körpergewicht und Speicheldrüse in ATAC KO und WT C57BL/6 Mäusen

Bei 13 Monate alten ATAC KO und WT C57BL/6 Mäuse wurde das Körpergewicht bestimmt (A). Der Pfeil zeigt die Speicheldrüse in einer ATAC KO C57BL/6 Maus (links) und in einer WT Maus (rechts) (B).

Die Speicheldrüse ist normalerweise ein Gewebe mit lappiger Struktur und weich-elastischer Konsistenz. In alten ATAC KO Mäusen wies sie eine deutliche Vergrößerung auf und verlor die lappige Struktur.

Die pathologische Untersuchung von Dr. Kershaw (Freie Universität Berlin) zeigte die Vermehrung von lymphoblastischen Populationen in der

Speicheldrüse, wobei die Infiltration in erster Linie durch die arteriellen Gefäße erfolgte (Abb. 35).

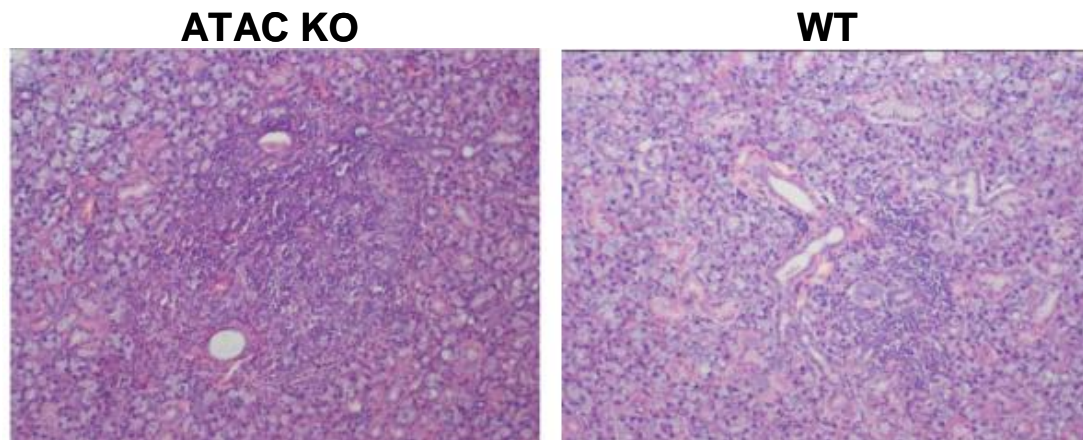


Abbildung 35: Infiltration von lymphatischen Zellen in die Speicheldrüse

Die Gewebe aus ATAC KO oder WT C57BL/6 Mäusen wurden in 5% Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) angefärbt (100-fache Vergrößerung).

Die Milzen von ATAC KO Mäusen enthielten bei unveränderter Milzstruktur mehr Zellen (B-Zellen, T-Zellen und Makrophagen), wobei die Mehrheit eine blastische Zellmorphologie im Bereich der folliculären Zonen aufwies (Abb. 36). Darüber hinaus zeigte sich im geringen Grad eine extramedulläre Hämatopoese und Hämosiderose, sowie Melanose der trabekulären Anteile. Weiterhin waren zahlreiche Plasmazellen und „mott cells“ (multifokal überalterte Plasmazellen) auffällig. Außerdem wiesen untersuchte Lymphknoten (*subiliaci*, *popliteus*, *iliaci*) ähnliche Veränderungen auf. Im umgebenden Fettgewebe der Lymphknoten traten multifokal Infiltrationen durch lymphoide Zellen auf. Der Thymus hatte eine normale Struktur, enthielt aber mehr infiltrierte Zellen. In Lunge und Leber zeigten sich ähnliche, Gefäß-assoziierte Einwanderungen von lymphoide Zellen, aber keine Struktur-Beschädigung (Daten nicht gezeigt).

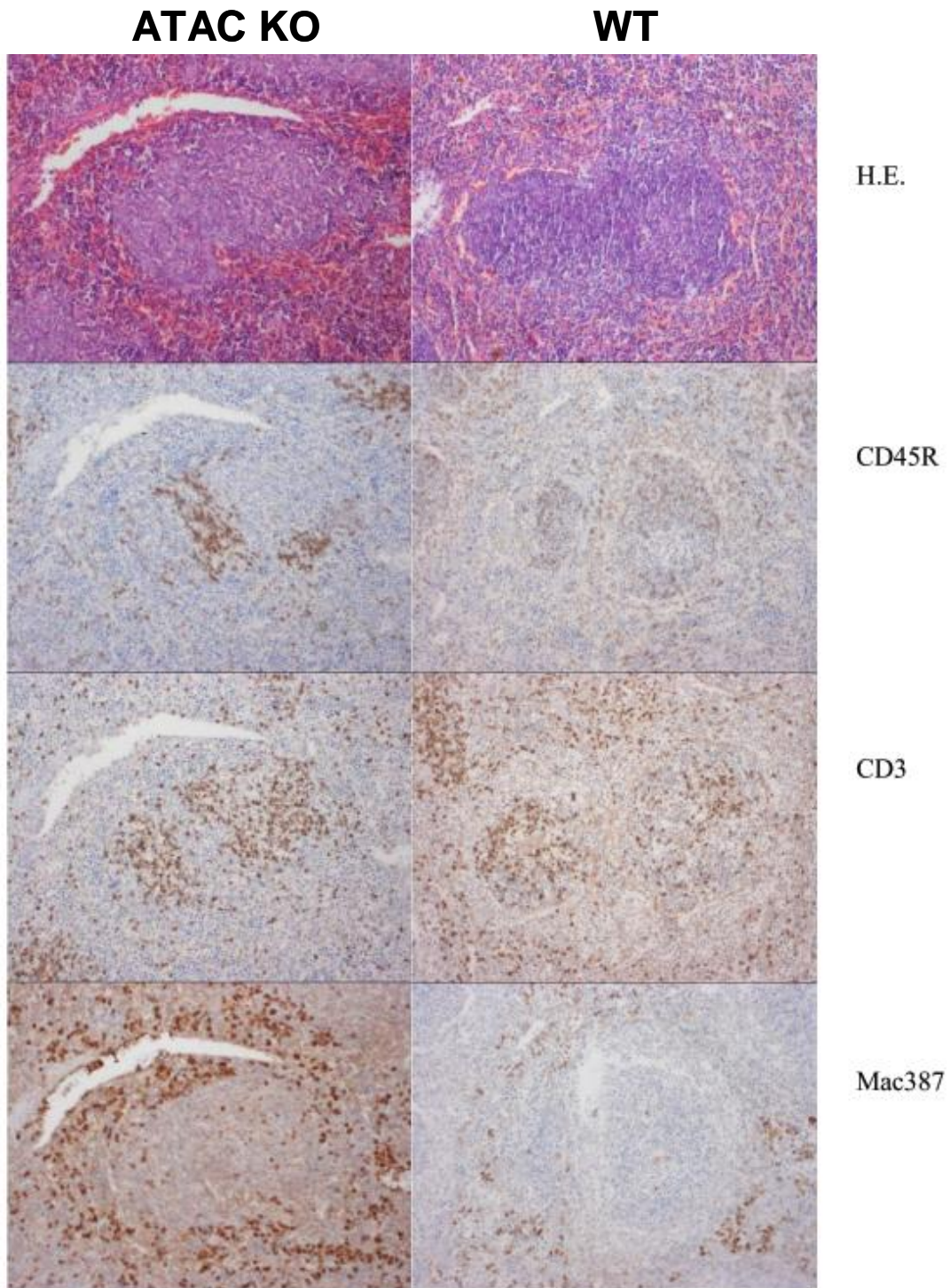


Abbildung 36: Histologische Untersuchung verschiedener Zellpopulationen in der Milz.

Die Schnitte von Milz wurden sowohl mit HE-Färbung als auch mit spezifischen Antikörpern angefärbt. Die B-Zellen wurden mit anti-CD45R-Antikörpern, T-Zellen mit anti-CD3-Antikörpern und Makrophagen mit anti-Mac387-Antikörpern angefärbt (100-fache Vergrößerung).

Durch die histologische Färbung fiel die allgemeine verstärkte Infiltration von Zellen in der Milz von ATAC KO C57BL/6 Mäusen auf (Abb. 35 und Abb. 36).

Gleichzeitig wurden die Zellen dieser Milzen mittels Durchflusszytometrie auf die Expression von Aktivierungsmarkern sowie Zytokinsekretion nach *in vitro* Stimulation untersucht, um den Zustand der Milzzellen zu bewerten.

Wie in 4.5.1 bereits gezeigt, war die absolute Zellzahl von CD8⁺ T-Zellen vergleichbar in der ATAC KO und WT C57BL/6-Milz. Hingegen waren die absolute Zellzahl von B-Zellen, CD4⁺ und regulatorischen CD4⁺ T-Zellen sowie Granulozyten wesentlich höher in der ATAC KO Milz im Vergleich mit den WT Milzzellen (Abb. 37 A). Die statistischen Daten zeigten eine vergleichbare Frequenz von T- und B-Zellen bezogen auf gesamte Milzzellen bei ATAC KO und WT C57BL/6 Mäusen auf (Abb. 37 B). Die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im ATAC KO Tier zeigten eine deutliche Aktivierung. Besonders bei CD4⁺ T-Zellen waren über 90% der Zellen CD44^{hoch}CD62L^{niedrig} (Teffm) (Abb. 37 B). Sowohl die Aktivierungssignale CD69, ICOS und OX40 als auch das Inhibitor-Signal PD-1 waren auf ATAC KO T-Zellen hochreguliert (Abb. 37 C, D und E). Nach Stimulation *in vitro* mit PMA/Ionomycin sezernierten ATAC KO T-Zellen mehr IFN- γ , IL-10 und IL-4, aber die gleiche Menge an IL-2 im Vergleich zu WT Zellen (Abb. 37 F und G).

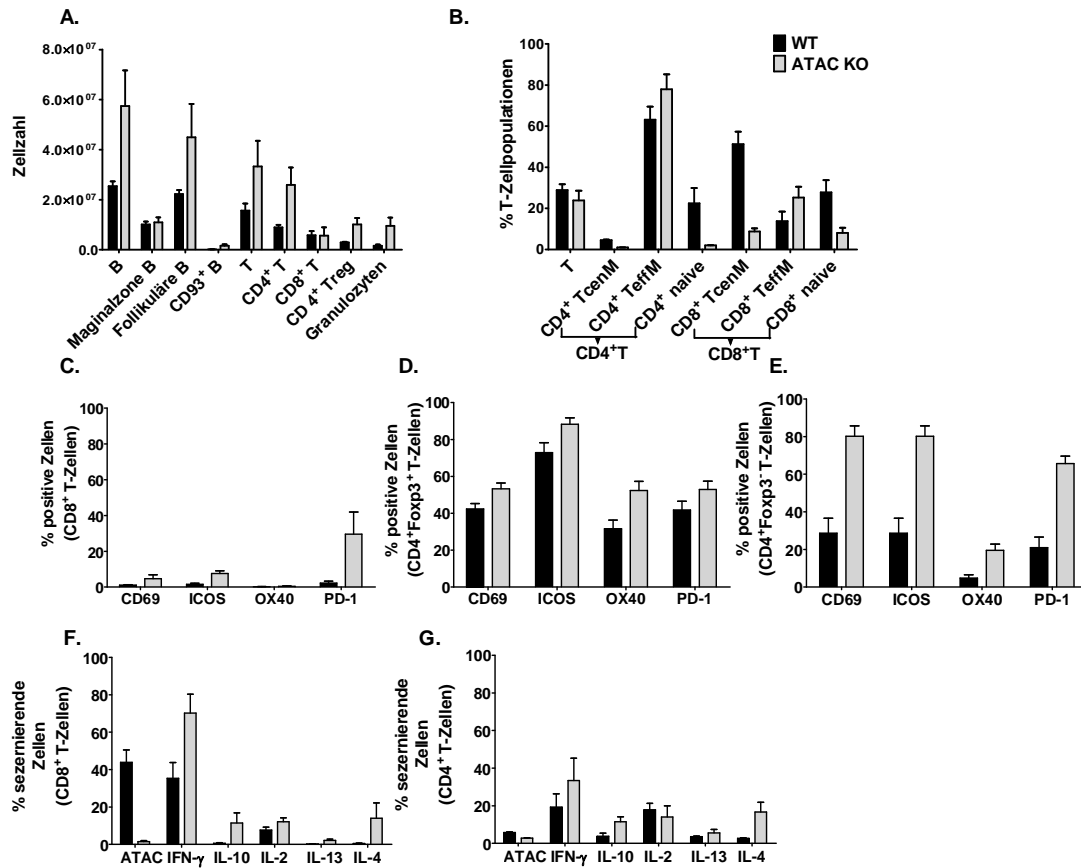


Abbildung 37: Anteil der B- und T-Zellpopulationen sowie Expression wichtiger Marker und Zytokinsekretion von T-Zellen in den Milzen

Die Milzzellen wurden hinsichtlich ihrer B- und T-Zellpopulationen (A), ihrer T-Zell-Subpopulationen (B) ihrer Expression der Aktivierungsmarker auf CD8⁺ T-Zellen (C), CD4⁺ Foxp3⁺ T-Zellen (D) und CD4⁺ Foxp3⁻ T-Zellen (E) in der Durchflusszytometrie analysiert.

Die Zytokinsekretion von CD8⁺ (F) und CD4⁺ (G) T-Zellen wurde nach Stimulation mit PMA plus Ionomycin für 4,5 h mit Brefeldin A mittels intrazellulärer Färbung und Durchflusszytometrie untersucht.

Die Abwesenheit des ATAC-Signals verursachte eine starke Expansion und nachfolgende Infiltration von Lymphozyten in der Milz, Speicheldrüse und anderen Lymphorganen in über ein Jahr alten C57BL/6 Mäusen. In der Milz von ATAC-defizienten Mäusen fand sich eine starke Aktivierung und Expansion besonders von CD4⁺ T-Zellen, follikulären B-Zellen und Granulozyten. Die CD8⁺ T-Zellen waren zwar ebenfalls aktiviert, eine Expansion konnte jedoch nicht beobachtet werden.

5. Diskussion

5.1 Identifizierung von ATAC-Target-Zellen

Zur Klärung der ATAC-Funktion sollten ATAC-Rezeptor-tragende Zellen (XCR1-tragende Zellen) zuerst identifiziert werden. Wegen des Fehlens von anti-XCR1-Antikörpern konnte die Expression von XCR1 nur mittels RT-PCR detektiert werden.

Die Expression des ATAC-Rezeptors (XCR1) wurde bereits von vielen Gruppen in T-, B- und NK-Zellen beschrieben. Die Daten waren aber zwischen verschiedenen Gruppen widersprüchlich [Kelner et al., 1994; Kennedy et al., 1995, Müller et al., 1995; Giancarlo et al., 1996; Hedrick et al., 1996; Dorner et al., 1997; Yoshida et al., 1998; Kurt et al., 2001; Huang et al., 2001]. Unsere Gruppe hat das XCR1-Signal eindeutig nur auf CD8⁺ DZ in der Milz mittels RT-PCR nachgewiesen und konnte nicht die publizierten Daten reproduzieren [Dorner unpublizierte Daten]. Diese RT-PCR-Studien wurden mit Primern durchgeführt, die spezifisch für das Exon 2 von XCR1 waren. Exon 1 von XCR1 wurde erst später identifiziert [Genbank NC-000075].

In dieser Arbeit wurde das XCR1-Signal in Zellpopulationen nicht nur im ruhenden Zustand, sondern auch nach Aktivierung von Milzzellen von C57BL/6, BALB/c und SV129 Mäusen untersucht. Mittels der RT-PCR-Analyse wurde sowohl Gesamt-RNA (Exon 1 und 2) als auch Poly-A-mRNA (nur Exon 2) von verschiedenen Zellpopulationen analysiert. Durch die Verwendung von für Exon 1 und 2 spezifischen Primern wurde das Risiko, falsch positive Ergebnisse durch Amplifikation genomischer DNA zu erhalten, eliminiert. Diese Versuche bestätigten, dass in der Milz XCR1 nur von CD8⁺ DZ exprimiert wird und alle anderen Zell-Populationen sowohl im ruhenden Zustand als auch nach Aktivierung kein XCR1-Signal aufweisen.

Dieses Ergebnis stimmt auch mit *in vitro* Chemotaxis-Daten von Corinna Opitz überein, welche eine ATAC-induzierte Wanderung von CD8⁺ DZ, aber nicht von CD8⁻ DZ zeigten.

Die quantitative RT-PCR-Analyse zeigte eine stabile Expression von XCR1 in Milzzellen vor und nach Immunisierung mit α DEC-205:OVA (DEC:OVA) +/- anti-CD40-Antikörpern zwischen 6 h und 48 h. Damit wurde eine reziproke Modulation von ATAC und XCR1 ausgeschlossen.

5.2 Die putative Rolle von ATAC während der Kreuzpräsentation

Aufgrund von *in vitro* Chemotaxis-Daten von Corinna Opitz wurde angenommen, dass ATAC durch Attraktion von CD8⁺DZ an der Kreuzpräsentation beteiligt ist. Mit dieser Arbeit ist es das erste Mal gelungen, die Wirkung von ATAC *in vivo* systematisch in einem Kreuzpräsentations-Mausmodell zu beobachten.

5.2.1 Die Rolle von ATAC während der T-DZ-Interaktionsphase

Mit in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde beobachtet, dass CD8⁺ T-Zellen ATAC sehr früh (ab 6 h), stark (über 80% von Ag-spezifischen CD8⁺ T-Zellen gegen 12 h-24 h) und sehr lang (bis 48 h nach Aktivierung) freisetzen. Sowohl in der „Toleranz“ (DEC:OVA allein) als auch in der „Entzündung“ (DEC:OVA plus anti-CD40-Antikörper oder LPS) wurde ATAC in großen Mengen von aktivierten CD8⁺ T-Zellen freigesetzt. Das impliziert, dass ATAC als ein wichtiger Faktor an diesen Immunreaktionen beteiligt ist.

In der Literatur wurde beschrieben, dass sich reife DZ in zufällige Richtungen bewegen [Stoll et al., 2002]. Durch den Gradienten von ATAC werden CD8⁺ DZ, die Hauptzielpopulation von ATAC in der Milz, effektiv in den Bereich von aktivierten T-Zellen geführt. Damit könnten CD8⁺ T-Zellen mit mehreren Ag-präsentierenden CD8⁺ DZ Kontakt aufnehmen. Dieser vorübergehende Kontakt ist entscheidend für die Induktion einer Toleranz oder einer anschließenden stationären Interaktion zur Aktivierung von T-Zellen in Gegenwart von Adjuvantien [Hugues et.al., 2004; Mempel et al., 2004].

Für die stationäre Interaktion zwischen DZ und T-Zellen ist die Expression von ICAM-1 auf DZ notwendig [Scholer et al., 2008]. Die Hochregulation von ICAM-1 auf DZ beginnt ungefähr 20 h nach Immunisierung mit DEC:OVA plus anti-CD40-Antikörpern und nimmt nach 30 h bis 48 h ab [Scholer et al., 2008]. Der Zeitpunkt der ICAM-1-Expression korreliert mit der ATAC-Produktion, welche nach rund 12 h ihr Maximum erreicht und nach 30 h bis 48 h abnimmt.

In weiteren Versuchen soll die ICAM-1-Expression in ATAC KO und WT Ag-spezifischen CD8⁺ T-Zellen vergleichend analysiert werden, um die Wirkung von ATAC auf stationäre T-DZ-Interaktionen detailliert aufzuklären. Die ICAM-1-defizienten Mäuse zeigten eine erniedrigte Frequenz von transferierten OT-I-Zellen in Lymphknoten 12 Tage nach Immunisierung mit DEC:OVA plus anti-CD40-Antikörpern. Daher ist eine effektive stationäre Interaktion mit DZ für das Überleben von Antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen nach Immunisierung notwendig [Scholer et al., 2008]. Das fehlende ATAC-Signal reduziert auch das Überleben von Antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen 12 Tage nach Immunisierung. Das stützt die Hypothese, dass ATAC eine wichtige Rolle für die Bildung stationärer T-DZ-Interaktionen spielt.

Die Hypothese, ATAC sei ein entscheidender Faktor für die Bildung stationärer CD8⁺ T-Zell/ CD8⁺ DZ-Interaktionen, kann nur mit der Hilfe von *in vivo* Video-Analysen unter dem Mikroskop bestätigt werden. Wegen technischer Limitationen wird diese Analyse zurzeit meist in Lymphknoten (LK) und nicht möglich in der Milz durchgeführt werden. Dabei müssen der Unterschied der XCR1-tragenen DZ-Populationen zwischen Milz und LK (neben CD8⁺ DZ exprimierten auch 10% der CD8⁻ DZ XCR1 im LK), sowie möglicherweise andere funktionelle Aspekte im LK unbedingt berücksichtigt werden.

ATAC-defiziente CD8⁺ T-Zellen zeigen eine höhere Expression von CD69 und 4-1BB als WT Zellen rund 20 h nach Immunisierung mit DEC:OVA („Toleranz“) sowie DEC:OVA plus anti-CD40-Antikörpern („Entzündung“). Durch wiederholte Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten wurde bestätigt, dass der Unterschied in der Expression von CD69 und 4-1BB zwischen ATAC KO und WT Zellen nicht durch eine Verschiebung der Kinetik verursacht wurde. Die höhere Expression von CD69 und 4-1BB scheint eine Konsequenz des fehlenden ATAC-Signals zu sein.

CD69 und 4-1BB sind wichtige Regulator-Signale für aktivierte CD8⁺ T-Zellen, wie im Abschnitt 1.3.2 bereits erwähnt. Die Expression von CD69 ist abhängig von der Aktivierung der Protein-Kinase-C (PKC). CD69 fungiert als ein vielseitiges Molekül während der Immunantwort. Es kann sowohl die Aktivierung von Makrophagen durch die Bindung an CD69L verstärken als auch die Aktivierung von DZ sowie von T-Zellen durch Induktion der TGF-β-

Produktion limitieren [Sancho et al., 2005]. 4-1BB kann als ein Kostimulationssignal die Proliferation und das Überleben von CD8⁺ T-Zellen steigern [Cannons et al., 2001; Lee et al., 2002]. Wegen der Komplexität und undefinierten Funktionen von Oberflächenmolekülen ist es sehr schwierig, die Wirkung von ATAC alleine auf den Unterschied in der Expression von CD69 und 4-1BB zurückzuführen. Deshalb ist eine weitere Analyse einer breiten Palette von relevanten Faktoren in ATAC KO und WT Ag-spezifischen CD8⁺ T-Zellen mittels Mikroarray erforderlich, um die präzisen Wirkungsmechanismen von ATAC auf CD8⁺ T-Zellen zu zeigen.

Die ATAC KO Ag-spezifischen CD8⁺ T-Zellen zeigten keine nachweisbare Veränderung in der Zytokinsekretion (IL-2, IFN- γ und TNF- α) während der frühen Phase (6 h bis 48 h) bei Aktivierung mit DEC:OVA alleine oder plus anti-CD40-Antikörpern. Insgesamt schien ATAC keine deutliche Wirkung auf die frühe Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen auszuüben.

5.2.2 Die Rolle von ATAC während der Expansion von CD8⁺ T-Zellen

Nach der T/DZ-Interaktion proliferieren die aktivierten CD8⁺ T-Zellen und differenzieren zu zytotoxischen Zellen. Bei der durch DEC:OVA induzierten „Toleranz“ vermehren sich die CD8⁺ T-Zellen auch rund 3-4 fach 3 Tage nach Immunisierung. Das stimmt mit einigen Publikationen überein, in denen CD8⁺ T-Zellen bei Toleranz in Gegenwart von genügend Antigen und Kostimulationssignalen proliferieren konnten [Curtsinger et al., 2003 b].

In unserem Modell der „Toleranz“ zeigte sich keine auffällige Veränderung in der Expansion und der Zytokinsekretion nach *in vitro* Restimulation von ATAC KO Ag-spezifischen CD8⁺ T-Zellen an Tag 3 und 5 nach Immunisierung. Unter inflammatorischen Bedingungen wurden dagegen die Expansion sowie die Zytokinsekretion von Ag-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in Abwesenheit von ATAC stark reduziert. Die Proliferation und die Fähigkeit zur Zytokinsekretion von Ag-spezifischen CD8⁺ T-Zellen spiegelt die Effektivität der CD8⁺ T-Zell-vermittelten Immunität wider. Es lässt sich vermuten, dass das fehlende ATAC-Signal die Entwicklung Ag-spezifischer CD8⁺ T-Zellen nach Aktivierung deutlich beeinträchtigt.

Um die Ursachen der geringen Expansion von ATAC KO OT-I-Zellen aufzuklären, wurden die Apoptoserate mittels Annexin-V Färbung und die Proliferation mittels CFSE-Markierung von OT-I-Zellen verfolgt. Dabei wurde keine nachweisbare Veränderung in der Apoptoserate von ATAC KO OT-I-Zellen 3,5 und 6,5 Tage nach Aktivierung festgestellt. Die Expression von Überlebensfaktoren wie Bcl-2 und Bcl-xL sowie Apoptosesignale wie Fas (CD95) von ATAC KO OT-I-Zellen war vergleichbar mit WT Zellen zu gleichen Zeitpunkten (Daten nicht gezeigt). Das deutet darauf hin, dass ATAC keinen starken Einfluss auf die Aktivierungs-induzierte Apoptose hat. Die Analyse durch CFSE-Markierung zeigte, dass die OT-I-Zellen nach Immunisierung sowohl mit DEC:OVA allein oder in Gegenwart von anti-CD40-Antikörper sehr stark und schnell proliferierten, ohne dass einzelne Generation klar abgrenzbar waren. Daher ist es sehr schwer, den Prozentansatz in jedem Zyklus der Teilung 40 h nach Immunisierung zu vergleichen.

Bei Transfer von ATAC KO OT-I-Zellen in entweder ATAC KO oder WT C57BL/6 Mäuse wiesen die Zellen in ATAC KO Empfängermäuse eine stärkere Reduktion ihrer Expansion auf (Daten nicht gezeigt). WT OT-I-Zellen, die in ATAC KO C57BL/6 Mäuse transferiert wurden, zeigten auch eine geringere Expansion als in WT C57BL/6 Mäusen (Daten nicht gezeigt).

Das impliziert, dass auch der Rezipient die Expansion von Ag-spezifischen CD8⁺T-Zellen beeinflusst. Die Milzzellen in ATAC KO C57BL/6 Mäusen weisen einen etwas höheren Prozentsatz von regulatorischen CD4⁺Foxp3⁺T-Zellen (Treg-Zellen) auf als WT C57BL/6 Mäuse. Die Treg-Zellen könnten die Aktivierung von CD8⁺T-Zellen in ATAC KO C57BL/6 Mäusen unterdrücken. Obwohl keine Auffälligkeiten in Frequenz und Expression von Aktivierungsmarkern wie CD86, CD80, PDL-1 und PDL-2 von DZ in ATAC KO C57BL/6 Mäusen nachgewiesen wurden, kann eine Veränderung in der Kompetenz oder des Zustandes der DZ, vor allen von CD8⁺DZ durch das fehlende konstitutive ATAC-Signal nicht ausgeschlossen werden. Dafür wäre eine genaue Analyse der Genexpression von DZ im ruhenden und aktivierten Zustand mit Hilfe der Mikro-Array-Methode notwendig.

5.2.3 Die Rolle von ATAC für das Überleben von CD8⁺ T-Zellen nach Aktivierung

12 Tage nach Immunisierung mit DEC:OVA wiesen die Milz und andere Organe (Leber, Lunge, Knochenmark und Lymphknoten) extrem niedrige Frequenzen von transferierten WT und ATAC KO OT-I-Zellen auf. Das zeigt, dass die Abwesenheit von ATAC nicht die Induktion von „Toleranz“ verhindern kann. Bei Entzündung zeigten ATAC KO OT-I-Zellen ein geringeres Überleben an Tag 12 bzw. Tag 40 nach Aktivierung, während deutlich mehr WT OT-I-Zellen mit hochregulierter Expression von CD44 in der Milz vorhanden waren. Außerdem sezernierten unter „inflammatorischen“ Bedingungen ATAC KO OT-I-Zellen auch ein geringeres Niveau an Zytokinen nach *in vitro* Restimulation. Dies deutet darauf hin, dass ATAC als ein Regulator bei der Bildung des Immungedächtnisses mitwirkt.

In diesen Experimenten wurden nur 6 µg anti-CD40-Antikörper zur Induktion einer Immunreaktion verwendet: Dieses Signal war wahrscheinlich zu schwach, um eine Immunreaktion des ATAC-defizienten Immunsystems zu induzieren. Eine hohe Dosis von anti-CD40-Antikörper (10-25 µg) verursachte eine vergrößerte und blutige Milz durch starke Inflammation. Dabei erfolgte eine sehr starke Expansion von Ag-spezifischen CD8⁺ T-Zellen an Tag 3 (Daten nicht gezeigt). Aber bei so starker Inflammation waren die Frequenz von OT-I-Zellen sehr hoch (10-fach mehr als PBS-Kontrolle) an Tag 12 und es wurde kein deutlicher Unterschied in der Zellfrequenz zwischen WT und ATAC KO OT-I-Zellen nachgewiesen [Daten nicht gezeigt]. Das deutet darauf hin, dass bei einer starken Immunreaktion die fehlende ATAC-Wirkung durch andere Faktoren ersetzt wird. ATAC ist möglicherweise entscheidend für die Induktion von Entzündung in Gegenwart eines schwachen dritten Signals aus Th1-CD4⁺ T-Zellen.

Gedächtniszellen lassen sich in Effektor- und Zentrale Gedächtniszellen unterscheiden. Die Effektorgedächtniszellen mit CD44^{hoch}CD62L^{niedrig} sind im ganzen Körper verteilt, während die Zentralen Gedächtniszellen mit CD44^{hoch}CD62L^{hoch} meist in den sekundären Lymphorganen bleiben. Frühere Arbeiten zeigten, dass Effektorgedächtniszellen nur kurzzeitig überleben oder sich weiter zu Zentralen Gedächtniszellen entwickeln. Dagegen sind Zentrale

Gedächtniszellen die Hauptzellen zur Erhaltung eines langlebigen Immungedächtnisses [Sallusto et al., 2004]. Die langlebigen Zellen exprimieren mehr Bcl-2 und Bcl-xl als naive T-Zellen, wodurch sie Apoptose verhindern. Trotzdem nehmen diese Zellen mit der Zeit durch zufallsabhängigen Zellverlust ab [Cush et al., 2007]. Diese Arbeit zeigte, dass die langlebigen Ag-spezifischen CD8⁺T-Zellen aus 40-50% Zentraler Gedächtniszellen und 50-60% Effektorgedächtniszellen bestehen. An Tag 12 nach Antigengabe gab es keinen Unterschied im Anteil von zentralen Gedächtniszellen zwischen WT und ATAC KO OT-I-Zellen auf (Daten nicht gezeigt).

Die Dauer und der Umfang des Immungedächtnisses sind auch abhängig von der Antigen-Dosis und der davon stimulierten Expansion. Nur 5-15% der expandierten Zellen exprimieren den IL-7-Rezeptor, produzieren anti-apoptotische Moleküle und können weiter überleben [Hamilton et al., 2006; Cush et al., 2007]. Bei einer natürlichen Infektion entwickeln sich heterogene Gedächtniszellen mit Spezifität für verschiedene Epitope von Pathogenen. Somit wird das immunologische Gedächtnis ständig erweitert. Im verwendeten Mausmodell sind die transgenen OT-I-Zellen nur für ein Epitop von Ovalbumin spezifisch. Das ist wahrscheinlich der Grund, weswegen so wenige Gedächtniszellen in unseren Versuchen nach 40 Tagen in der Milz vorhanden waren.

Dies lässt vermuten, dass ATAC nur die Stärke der Expansion jedoch nicht das Gleichgewicht der Gedächtniszellen steuert.

Eine effektive Induktion des langzeitigen immunologischen Gedächtnisses ist ein wichtiges Ziel bei der Entwicklung von Impfstoffen. Die Wirkung von ATAC auf die Bildung der CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen eröffnet neue Konzepte für Vakzine, welche mit Hilfe von ATAC in Kombination mit Antigen gegen Tumor oder Virusinfektionen verwendet werden könnten.

5.2 Der Einfluss von ATAC auf die CD8⁺ T-Zell-vermittelte Zytotoxizität

Durch diese Arbeit wurden u.a. gezeigt, dass ATAC KO OT-I-Zellen eine reduzierte zytotoxische Aktivität 7 und 12 Tage nach Immunisierung mit OVA-300-19-Zellen aufwiesen. Dabei korrelierte die Zytotoxizität sehr gut mit der OT-

I-Zell-Frequenz in der Milz. Mäuse, welche eine niedrige OT-I-Zell-Frequenz in der Milz aufwiesen, besaßen auch eine niedrigere zytotoxische Aktivität.

Das deutet daraufhin, dass die zytotoxische Aktivität einer ATAC-defizienten CD8⁺T-Zell-Population durch eine verringerte Expansion und geringes Überleben beeinträchtigt wird.

Obwohl 12 Tage nach Immunisierung deutlich weniger WT OT-I-Zellen in der Milz als nach 7 Tagen vorhanden waren, erzielten sie eine vergleichbare Zytotoxizität von rund 90% wie an Tag 7. Dagegen betrug die zytotoxische Aktivität von ATAC KO OT-I-Zellen 12 Tage nach Immunisierung nur noch 30% bis 50%, welche deutlich niedriger als die von ATAC KO OT-I-Zellen an Tag 7 (60-70%) war. ATAC KO OT-I-Zellen wiesen auch eine erniedrigte Frequenz in der Milz 12 Tage nach Immunisierung mit OVA-300-19-Zellen auf. Daher schien das verminderte Überleben von Ag-spezifischen ATAC KO CD8⁺T-Zellen unabhängig von einem bestimmten Immunisierungsmodell zu sein.

100 ng DEC:OVA plus 6 µg anti-CD40-Antikörper können nur eine sehr schwache Zytotoxizität (10-15%) der OT-I-Zellen 7 Tage nach Stimulation induzieren [unpublizierte Daten unserer Gruppe]. Das liegt wahrscheinlich an der geringen Menge der anti-CD40-Antikörper. Es wurde bereits gezeigt, dass lösliches Ovalbumin-Protein mit 50 µg anti-CD40-Antikörpern auch eine starke Zytotoxizität von transferierten OT-I-Zellen auslöst [Bonifaz et al., 2004].

Insgesamt spielt ATAC eine wichtige Rolle bei der CD8⁺T-Zell-vermittelten Zytotoxizität. Die Abwesenheit von ATAC beeinträchtigt die zytotoxische Aktivität schon zu frühen Zeitpunkten (Tag 7). Dieser Effekt ist in späteren Phasen viel ausgeprägter (Tag 12), weil zusätzlich die Frequenz der Ag-spezifischen CD8⁺T-Zellen durch das Fehlen des ATAC-Signals deutlich verringert ist.

5.3 Die chemotaktische Wirkung von ATAC *in vivo*

Für ATAC als Chemokin der C-Familie wurde erstmals eine eindeutige chemotaktische Wirkung *in vivo* durch diese Arbeit nachgewiesen. Die zuvor in der Literatur berichtete chemotaktische Wirkung von ATAC auf verschiedene Zellpopulationen des Menschen und der Maus wie T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen und Neutrophile *in vitro* konnte nicht unter gleichen

Bedingungen reproduziert werden [Bleul et al., 1996; Dorner et al., 1997; Yoshida et al., 1998]. Corinna Opitz (aus unserer Gruppe) hatte durch ein Transwell-Chemotaxissystem eine spezifische chemotaktische Wirkung von ATAC auf murine CD8⁺ DZ *in vitro* nachgewiesen. Dieses Ergebnis stimmt mit der Expression von XCR1 aus unseren Daten sehr gut überein.

Mit dieser Arbeit wurde *in vivo* die Migration von verschiedenen Zellpopulationen in ATAC KO C57BL/6 Mäusen untersucht. Nach lokaler Applikation von ATAC wurden kein erhöhtes prozentuales Verhältnis sowie keine erhöhte absolute Zellzahl von T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Makrophagen oder Granulozyten beobachtet. Jedoch traten mehr CD8⁺ DZ und CD8⁻ CD11b^{niedrig} DZ im Bauchraum 2 h nach lokaler Injektion von ATAC auf. Die beiden DZ-Populationen exprimieren DEC-205 auf ihren Zelloberflächen, welches wichtig für die Aufnahme von Zell-assoziierten Antigenen und zur Induktion von Selbst-Toleranz ist [Shrimpton et al., 2009].

Die Quelle der CD8⁻CD11b^{niedrig} DEC-205⁺ DZ im Bauchraum ist noch nicht geklärt. Durch diese Arbeit wurde gezeigt, dass die CD11b^{niedrig}CD8⁻ CD205⁺ DZ nach Zugabe von ATAC aus der Umgebung einwanderten, und sich nicht aus CD11b⁺CD8⁻ DZ entwickelten. Dies deutet darauf hin, dass ATAC als Chemokin spezifisch für bestimmte DZ-Subpopulationen ist.

5.4 Phänotyp von naiven ATAC-defizienten C57BL/6 Mäusen

Junge ATAC KO C57BL/6 Mäuse wiesen keine auffällige Veränderung in Körpergewicht, Lebendigkeit und Fortpflanzungsfähigkeit auf. Jedoch enthielten sie einen etwas erhöhten Prozentsatz von Foxp3⁺CD4⁺ T-Zellen in der Milz. Foxp3⁺CD4⁺ T-Zellen regulieren die T-Zell-Aktivität und können sie unterdrücken. Die erhöhte Zahl an Foxp3⁺CD4⁺ T-Zellen steigert das Risiko für Tumore und chronische Infektionen. Weiterhin soll man untersuchen, ob die Vermehrung von Foxp3⁺CD4⁺ T-Zellen in ATAC KO C57BL/6 Mäusen aus einer veränderten Homöostase von T-Zellpopulationen in Thymus oder durch Induktion einer stärkeren Aktivierung in der Milz verursacht wird. Deshalb ist eine weitere Untersuchung der T-Zell-Entwicklung in Knochenmark und Thymus erforderlich.

Die 10-13 Monate alten ATAC KO C57BL/6 Mäusen haben eine vergrößerte Milz und Speicheldrüse. Die pathologischen Ergebnisse zeigten unspezifische Expansion und Infiltration von Lymphozyten in zahlreichen Organen, jedoch ohne Veränderung der Organstruktur. Daher wurde eine Autoimmunität ausgeschlossen, da gewöhnliche Autoimmunerkrankungen eine Schädigung der Gewebestruktur der betroffenen Organe durch die autoreaktiven T-Zellen verursachen. Überraschend ist, dass die ATAC KO Mäuse keine typischen Alterungserscheinungen von C57BL/6 Mäusen, wie Haarausfall und gebogene Rücken, zeigten. Die Mäuse besitzen auch ein vergleichbares Körpergewicht und Lebendigkeit wie gleich alte gesunde WT C57BL/6 Mäuse. Offensichtlich waren die ATAC-KO C57BL/6 Mäuse nicht an einer Infektion erkrankt. Kranke Mäuse zeigen eine verschlechterte Lebendigkeit und verlieren Körpergewicht. Solches Zeichen konnte bei ATAC KO Mäusen nicht nachgewiesen werden. Die starke Expansion von lymphatischen Zellen scheint eine Störung der Homöostase der Lymphozyten in diesen alten ATAC KO Mäusen zu sein. Normalerweise werden täglich 2 Millionen neue T-Zellen aus dem Thymus in den Kreislauf abgegeben. Eine relative stabile T-Zell-Anzahl erfordert einen effektiven Homöostase-Kontroll-Mechanismus, um die alten Zellen rechtzeitig zu beseitigen. In der Literatur wurde berichtet, dass die Transplantation von mehreren Thymi nicht die T-Zell-Anzahl in Mäusen mit funktionierender Homöostase-Kontrolle erhöhen konnte. Das bewies, dass das Immunsystem normalerweise über ausreichende Kompetenz verfügt, eine stabile T-Zell-Anzahl zu behalten. Trotz erhöhter Lymphozytenzahl blieb das Verhältnis zwischen B- und T-Zellen in alten Mäusen vergleichbar zu jungen Mäusen. Innerhalb der T-Zellen war jedoch der Anteil an CD8⁺T-Zellen mit höherem Alter stärker reduziert. Aber die absolute Zellzahl von CD8⁺T-Zellen bleibt gleich in die ATAC KO C57BL/6-Milz wie in die WT Milz. Der geringere Anteil von CD8⁺T-Zellen bezogen auf T-Zellen wurde durch geringere Expansion von CD8⁺T-Zellen als von CD4⁺T-Zellen verursacht. Die vermehrten ATAC KO T-Zellen enthielten über 95% aktivierte T-Zellen, welche sowohl Stimulator-Moleküle wie CD69, OX40 und ICOS als auch Inhibitor-Moleküle wie PD-1 exprimierten. Das könnte durch eine gestörte Homöostase-Kontrolle für aktivierte T-Zellen verursacht werden. Daher könnten die naiven T-Zellen wegen limitierter Überlebenssignale wie IL-15 und IL-7 immer mehr sterben

[Mahajan et al., 2005; Bourgeois et al., 2006]. Zur Aufklärung müssen die Expression anti-apoptotischer Faktoren wie Bcl-2, Bcl-xL sowie die Sekretion von IL-15 und IL-7 von vermehrten Zellen analysiert werden. Die verdichteten Zellen könnten auch durch intensiven Zell-Zell-Kontakt, beispielsweise durch Kontakt mit aktivierten Makrophagen, unspezifisch aktiviert werden. Insofern ist es schwer, eine klare Aussage zu treffen. Dafür ist eine systematische Untersuchung der T- und B-Zell-Entwicklung in alten ATAC KO und WT C57BL/6 Mäusen erforderlich.

6. Zusammenfassung/Summary

6.1 Zusammenfassung

ATAC ist ein Mitglied der Chemokin-Familie, welches hauptsächlich von aktivierten CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen freigesetzt wird. Das Expressionsmuster des ATAC-Rezeptors XCR1 war jedoch umstritten, weshalb die physiologische Funktion von ATAC bislang unklar blieb. In dieser Arbeit wurde die Rolle von ATAC und XCR1 im murinen System untersucht. Um die XCR1-exprimierenden Zellen in der Milz zu definieren, wurden ruhende und aktivierte Milzzellen aus unterschiedlichen Mausstämmen isoliert und durch quantitative RT-PCR analysiert. XCR1 konnte eindeutig in CD8⁺ dendritischen Zellen (DZ), geringfügig in CD8⁻ DZ, aber nicht in den anderen Zellpopulationen nachgewiesen werden. Der Einfluss von ATAC auf die antigen-spezifische Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen wurde untersucht, indem WT oder ATAC KO OT-I-Zellen adoptiv transferiert und CD8⁺ DZ der syngenen Rezipienten über das Molekül DEC-205 selektiv mit Antigen (DEC205:OVA) beladen wurden. In diesem Modell wurde eine sehr frühe (ab 6 h) und dauerhafte (bis 48 h) ATAC-Sekretion in WT OT-I-Zellen beobachtet. In Abwesenheit des ATAC-Signals erhöhte sich die Expression von CD69 und 4-1BB auf transferierten OT-I-Zellen 18-24 h nach Stimulation, aber ein deutlicher Einfluss auf die Proliferation und Apoptose der transferierten OT-I-Zellen 2-6 Tage nach Stimulation konnte nicht festgestellt werden. Dies galt sowohl für eine Stimulation mit DEC:OVA alleine („Toleranz“) als auch für DEC:OVA plus anti-CD40-Antikörper („Entzündung“). Jedoch wiesen transferierte ATAC KO OT-I-Zellen eine deutlich verringerte Populationsgröße 12 und 40 Tage nach Stimulation mit DEC:OVA plus anti-CD40-Antikörper auf. Funktionell zeigten diese ATAC KO OT-I-Zellen eine beeinträchtigte zytotoxische Aktivität an den Tagen 7 und 12. Weiterhin konnte *in vivo* eine chemotaktische Wirkung von ATAC nachgewiesen werden. Nach Injektion in den Peritonealraum wanderten bestimmte DZ-Subpopulationen (CD8⁺CD205⁺CD11b⁻CD4⁻ DZ und CD8⁻CD205⁺CD11b^{niedrig}CD4⁻ DZ) ein. Bei der Untersuchung von alten ATAC KO C57BL/6 Mäusen fiel darüber hinaus auf, dass Speicheldrüse und Milz deutlich vergrößert waren, ohne dass ein Verlust von Körpergewicht und eine Schädigung der Organstruktur feststellbar waren. Dies ging mit der Aktivierung

und Expansion vieler Immunzellen, insbesondere von CD4⁺ T-Zellen, folliculären B-Zellen und Granulozyten einher.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass ATAC die Kooperation von Antigen-erkennenden CD8⁺ T-Zellen mit XCR1-tragenden DZ optimiert und so die Poolgröße und zytotoxische Kapazität dieser CD8⁺ T-Zellen erhöht. Zusammen mit der bereits früher nachgewiesenen chemotaktischen Aktivität von ATAC auf XCR1⁺ DZ ergeben diese funktionellen Daten zum ersten Mal ein Konzept der physiologischen Wirkung von ATAC.

6.2 Summary

ATAC, a member of the chemokine family of molecules, is secreted mostly by activated CD8⁺ T cells and NK cells. Mainly due to the disputed expression pattern of its receptor XCR1, the physiological function of ATAC remained elusive to date.

In this work, the role of ATAC and XCR1 was investigated in the murine system. To identify the XCR1-expressing cells, the splenic cell populations were sorted from different mouse strains and analysed in both steady and activated states through quantitative RT-PCR. The results showed that XCR1 is essentially expressed on CD8⁺ dendritic cells (DC) and to a small extent on CD8⁻ DC cells, but not on other cell types. Furthermore, the influence of ATAC on the antigen-specific activation of CD8⁺ T cells was examined by adoptive transfer of WT or ATAC KO OT-I cells and selective application of antigen into the CD8⁺ DC of recipient mice with the help of an DEC-205-specific antibody coupled to the antigen ovalbumin (DEC:OVA). In this model, WT OT-I T cells continued to secrete ATAC from an early time point (6 h) for up to 48 h. The absence of ATAC enhanced the expression of CD69 and 4-1BB on the transferred OT-I T cells 18-24 h after stimulation, but did not overtly influence their proliferation or apoptosis in the 2-6 days following stimulation with DEC:OVA alone ("tolerization") or DEC:OVA plus anti-CD40 ("immunization"). However, the pool size of transferred ATAC KO OT-I cells was substantially reduced on days 12 and 40 upon application of DEC:OVA in combination with anti-CD40. Functionally, ATAC KO OT-I cells exhibited a reduced cytotoxicity on days 7 and 12 after antigen delivery. Further, a chemotactic activity of ATAC could be demonstrated *in vivo*: after i.p. injection of ATAC,

certain DC subsets ($CD8^+CD205^+CD11b^-CD4^-$ DC and $CD8^-CD205^+CD11b^{low}CD4^-$ DC) migrated into the peritoneal cavity. The analysis of old ATAC KO C57BL/6 mice revealed enlarged salivary glands and spleens, but no reduction of body weight or any visible damage in organ structure. However, immune cell populations were substantially expanded in these mice, especially $CD4^+$ T cells, follicular B cells, and granulocytes.

In summary, we could demonstrate that ATAC optimizes the cooperation between antigen-recognizing $CD8^+$ T cells and XCR1-expressing DC, which resulted in an increased pool size and cytotoxic capacity of these $CD8^+$ T cells. Together with the previously observed *in vitro* chemotactic activity of ATAC on XCR1⁺ DC, this work provides for the first time a concept for the physiological function of ATAC.

7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Richard Kroczeck für die Überlassung des Themas, die motivierende Unterstützung und die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen am Institut, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich möchte mich auch herzlichst bedanken bei Herrn Prof. Dr. Thomas Blankenstein für seine Bereitschaft, sich in das Thema einzuarbeiten und die Arbeit zu begutachten.

Ein ganz großer Dank geht an Herrn Dr. Volker Henn für seine ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit, Diskussionsbereitschaft, wertvollen Ratschläge und seine großzügige Unterstützung zu jeder Zeit.

Ich bedanke mich auch herzlich bei Herrn Dr. Hans-Werner Mages und unserem ATAC-Projekt-Team für die Mühe beim Korrekturlesen dieser Arbeit und die schöne Zeit bei der Zusammenarbeit.

Natürlich sage ich auch allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, die meinen Weg begleiteten und mir hilfreich zur Seite standen: Danke!

8. Literaturverzeichnis

- Ackerman, A. L., C. Kyritsis, et al. (2003). Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(22): 12889-94.
- Albert, M. L., M. Jegathesan, et al. (2001). Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8⁺ T cells. *Nat Immunol* 2(11): 1010-7.
- Amakawa, R., A. Hakem, et al. (1996). Impaired negative selection of T cells in Hodgkin's disease antigen CD30-deficient mice. *Cell* 84(4): 551-62.
- Bach, J. F. (2003). Regulatory T cells under scrutiny. *Nat Rev Immunol* 3(3): 189-98.
- Bachmann, M. F., E. Sebzda, et al. (1996). T cell responses are governed by avidity and co-stimulatory thresholds. *Eur J Immunol* 26(9): 2017-22.
- Bachmann, M. F., P. Wolint, et al. (2005). Recall proliferation potential of memory CD8⁺ T cells and antiviral protection. *J Immunol* 175(7): 4677-85.
- Badley, A. D., J. A. McElhinny, et al. (1996). Upregulation of Fas ligand expression by human immunodeficiency virus in human macrophages mediates apoptosis of uninfected T lymphocytes. *J Virol* 70(1): 199-206.
- Bansal-Pakala, P., B. S. Halteman, et al. (2004). Costimulation of CD8 T cell responses by OX40. *J Immunol* 172(8): 4821-5.
- Barber, D. L., E. J. Wherry, et al. (2003). Cutting edge: rapid in vivo killing by memory CD8 T cells. *J Immunol* 171(1): 27-31.
- Belz, G. T., C. M. Smith, et al. (2004). Cutting edge: conventional CD8 alpha⁺ dendritic cells are generally involved in priming CTL immunity to viruses. *J Immunol* 172(4): 1996-2000.
- Bennett, S. R., F. R. Carbone, et al. (1997). Induction of a CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4⁺ T cell help. *J Exp Med* 186(1): 65-70.
- Bickham, K., K. Goodman, et al. (2003). Dendritic cells initiate immune control of epstein-barr virus transformation of B lymphocytes in vitro. *J Exp Med* 198(11): 1653-63.

Blachere, N. E., H. K. Morris, et al. (2006). IL-2 is required for the activation of memory CD8⁺ T cells via antigen cross-presentation. *J Immunol* 176(12): 7288-300.

Boismenu, R., L. Feng, et al. (1996). Chemokine expression by intraepithelial gamma delta T cells. Implications for the recruitment of inflammatory cells to damaged epithelia. *J Immunol* 157(3): 985-92.

Bonifaz, L. C., D. P. Bonnyay, et al. (2004). In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J Exp Med* 199(6): 815-24.

Borst, J., C. Sluysers, et al. (1989). Alternative molecular form of human T cell-specific antigen CD27 expressed upon T cell activation. *Eur J Immunol* 19(2): 357-64.

Bourgeois, C. and B. Stockinger (2006). T cell homeostasis in steady state and lymphopenic conditions. *Immunol Lett* 107(2): 89-92.

Bourges, D., Y. Zhan, et al. (2007). Targeting the gut vascular endothelium induces gut effector CD8 T cell responses via cross-presentation by dendritic cells. *J Immunol* 179(9): 5678-85.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54.

Brander, C., T. Suscovich, et al. (2000). Impaired CTL recognition of cells latently infected with Kaposi's sarcoma-associated herpes virus. *J Immunol* 165(4): 2077-83.

Brimnes, M. K., L. Bonifaz, et al. (2003). Influenza virus-induced dendritic cell maturation is associated with the induction of strong T cell immunity to a coadministered, normally nonimmunogenic protein. *J Exp Med* 198(1): 133-44.

Cairns, C. M., J. R. Gordon, et al. (2001). Lymphotactin expression by engineered myeloma cells drives tumor regression: mediation by CD4⁺ and CD8⁺ T cells and neutrophils expressing XCR1 receptor. *J Immunol* 167(1): 57-65.

- Cannons, J. L., P. Lau, et al. (2001). 4-1BB ligand induces cell division, sustains survival, and enhances effector function of CD4 and CD8 T cells with similar efficacy. *J Immunol* 167(3): 1313-24.
- Carreno, B. M. and M. Collins (2003). BTLA: a new inhibitory receptor with a B7-like ligand. *Trends Immunol* 24(10): 524-7.
- Carrio, R., C. E. Rolle, et al. (2007). Non-redundant role for IL-7R signaling for the survival of CD8+ memory T cells. *Eur J Immunol* 37(11): 3078-88.
- Chaouat, G., E. Menu, et al. (1996). The emerging role of IL-10 in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 35(4): 325-9.
- Chiu, B. C., V. R. Stolberg, et al. (2007). Increased Foxp3 (+) Treg cell activity reduces dendritic cell co-stimulatory molecule expression in aged mice. *Mech Ageing Dev* 128(11-12): 618-27.
- Chow YH et al. (1998). Development of Th1 and Th2 populations and the nature of immune responses to Hepatitis B virus DNA vaccines can be modulated by codelivery of various cytokine genes. *the journal of immunology* 160: 10.
- Colombetti, S., F. Benigni, et al. (2002). Clonal anergy is maintained independently of T cell proliferation. *J Immunol* 169(11): 6178-86.
- Cools, N., P. Ponsaerts, et al. (2007). Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. *J Leukoc Biol* 82(6): 1365-74.
- Cresswell, P., A. L. Ackerman, et al. (2005). Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. *Immunol Rev* 207: 145-57.
- Croft, M. (2003). Costimulation of T cells by OX40, 4-1BB, and CD27. *Cytokine Growth Factor Rev* 14(3-4): 265-73.
- Croft, M. (2009 a). The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nat Rev Immunol* 9(4): 271-85.
- Croft, M., T. So, et al. (2009 b). The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease. *Immunol Rev* 229(1): 173-91.

Curtsinger, J. M., C. M. Johnson, et al. (2003 a). CD8 T cell clonal expansion and development of effector function require prolonged exposure to antigen, costimulation, and signal 3 cytokine. *J Immunol* 171(10): 5165-71.

Curtsinger, J. M., D. C. Lins, et al. (2003 b). Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function. *J Exp Med* 197(9): 1141-51.

Curtsinger, J. M., D. C. Lins, et al. (2005 a). Signal 3 tolerant CD8 T cells degranulate in response to antigen but lack granzyme B to mediate cytotoxicity. *J Immunol* 175(7): 4392-9.

Curtsinger, J. M., J. O. Valenzuela, et al. (2005 b). Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation. *J Immunol* 174(8): 4465-9.

Cush, S. S., K. M. Anderson, et al. (2007). Memory generation and maintenance of CD8⁺ T cell function during viral persistence. *J Immunol* 179(1): 141-53.

de Jong, E. C., H. H. Smits, et al. (2005). Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Semin Immunopathol* 26(3): 289-307.

De Maria, R., M. G. Cifone, et al. (1994). Triggering of human monocyte activation through CD69, a member of the natural killer cell gene complex family of signal transducing receptors. *J Exp Med* 180(5): 1999-2004.

Delamarre, L., H. Holcombe, et al. (2003). Presentation of exogenous antigens on major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II molecules is differentially regulated during dendritic cell maturation. *J Exp Med* 198(1): 111-22.

den Haan, J. M. and M. J. Bevan (2001). Antigen presentation to CD8⁺ T cells: cross-priming in infectious diseases. *Curr Opin Immunol* 13(4): 437-41.

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

Dhein, J., H. Walczak, et al. (1995). Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* 373(6513): 438-41.

Dieu-Nosjean, M. C., C. Massacrier, et al. (2000). Macrophage inflammatory protein 3alpha is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. *J Exp Med* 192(5): 705-18.

Ding, L. and E. M. Shevach (1994). Activation of CD4+ T cells by delivery of the B7 costimulatory signal on bystander antigen-presenting cells (trans-costimulation). *Eur J Immunol* 24(4): 859-66.

Dinter, A. and E. G. Berger (1998). Golgi-disturbing agents. *Histochem Cell Biol* 109(5-6): 571-90.

Dong, C., A. E. Juedes, et al. (2001). ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature* 409(6816): 97-101.

Dorner, B., S. Muller, et al. (1997). Purification, structural analysis, and function of natural ATAC, a cytokine secreted by CD8(+) T cells. *J Biol Chem* 272(13): 8817-23.

Dorner, B. G., A. Scheffold, et al. (2002). MIP-1alpha, MIP-1beta, RANTES, and ATAC/lymphotactin function together with IFN-gamma as type 1 cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(9): 6181-6.

Dorner, B. G., S. Steinbach, et al. (2003). Single-cell analysis of the murine chemokines MIP-1alpha, MIP-1beta, RANTES and ATAC/lymphotactin by flow cytometry. *J Immunol Meth* 274(1-2): 83-91.

Dudziak, D. (2007). Differential Antigen Processing by Dendritic Cell Subsets in Vivo *Science* 315(5808): 4.

Eisen, S. A., H. J. Wedner, et al. (1972). Isolation of pure human peripheral blood T-lymphocytes using nylon wool columns. *Immunol Commun* 1(6): 571-7.

Esplugues, E., D. Sancho, et al. (2003). Enhanced antitumor immunity in mice deficient in CD69. *J Exp Med* 197(9): 1093-106.

Fernandez, E. J. and E. Lolis (2002). Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42: 469-99.

Fiebig, E., D. F. Hirschorn, et al. (2000). Assessment of donor T-cell function in cellular blood components by the CD69 induction assay: effects of storage, gamma radiation, and photochemical treatment. *Transfusion* 40(7): 761-70.

Fuller, M. J. and A. J. Zajac (2003). Ablation of CD8 and CD4 T cell responses by high viral loads. *J Immunol* 170(1): 477-86.

Gagnon, E., S. Duclos, et al. (2002). Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* 110(1): 119-31.

Garin, J., R. Diez, et al. (2001). The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J Cell Biol* 152(1): 165-80.

Gavrieli, M., J. Sedy, et al. (2006). BTLA and HVEM cross talk regulates inhibition and costimulation. *Adv Immunol* 92: 157-85.

Giancarlo, B., S. Silvano, et al. (1996). Migratory response of human natural killer cells to lymphotactin. *Eur J Immunol* 26(12): 3238-41.

Groux, H., A. O'Garra, et al. (1997). A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389(6652): 737-42.

Hamilton, S. E., M. C. Wolkers, et al. (2006). The generation of protective memory-like CD8⁺ T cells during homeostatic proliferation requires CD4⁺ T cells. *Nat Immunol* 7(5): 475-81.

Han, G. M., B. Zhao, et al. (2009). Age-associated parallel increase of Foxp3⁽⁺⁾CD4⁽⁺⁾ regulatory and CD44⁽⁺⁾CD4⁽⁺⁾ memory T cells in SJL/J mice. *Cell Immunol* 258(2):188-196.

Haspot, F., T. Fehr, et al. (2008). Peripheral deletional tolerance of alloreactive CD8 but not CD4 T cells is dependent on the PD-1/PD-L1 pathway. *Blood* 112(5): 2149-55.

Hautamaa, D., R. Merica, et al. (1997). Murine lymphotactin: gene structure, post-translational modification and inhibition of expression by CD28 costimulation. *Cytokine* 9(6): 375-82.

Heath, W. R., G. T. Belz, et al. (2004). Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev* 199: 9-26.

Heath, W. R. and F. R. Carbone (2005). Coupling and cross-presentation. *Nature* 434(7029): 27-8.

Hedrick, J. A., V. Saylor, et al. (1997). Lymphotactin is produced by NK cells and attracts both NK cells and T cells in vivo. *J Immunol* 158(4): 1533-40.

Hernandez, J., S. Aung, et al. (2001). Phenotypic and functional analysis of CD8 (+) T cells undergoing peripheral deletion in response to cross-presentation of self-antigen. *J Exp Med* 194(6): 707-17.

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

Hochuli, E. (1990). Purification of recombinant proteins with metal chelate adsorbent. *Genet Eng (N Y)* 12: 87-98.

Horwitz, D. A., S. G. Zheng, et al. (2008). Critical role of IL-2 and TGF-beta in generation, function and stabilization of Foxp3+CD4+ Treg. *Eur J Immunol* 38(4): 912-5.

Houde, M., S. Bertholet, et al. (2003). Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425(6956): 402-6.

Howie, S. E., A. J. Sommerfield, et al. (1994). Peripheral T lymphocyte depletion by apoptosis after CD4 ligation in vivo: selective loss of CD44- and 'activating' memory T cells. *Clin Exp Immunol* 95(1): 195-200.

Huang, F. P., N. Platt, et al. (2000). A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J Exp Med* 191(3): 435-44.

Huang, H., F. Li, et al. (2001). Neutrophils and B cells express XCR1 receptor and chemotactically respond to lymphotactin. *Biochem Biophys Res Commun* 281(2): 378-82.

Huang, H., S. Hao, et al. (2007). CD4+ Th1 cells promote CD8+ Tc1 cell survival, memory response, tumor localization and therapy by targeted delivery of interleukin 2 via acquired pMHC I complexes. *Immunology* 120(2): 148-59.

Hugues, S., L. Fetler, et al. (2004). Distinct T cell dynamics in lymph nodes during the induction of tolerance and immunity. *Nat Immunol* 5(12): 1235-42.

Hutchinson, P., L. A. Divola, et al. (1999). Mitogen-induced T-cell CD69 expression is a less sensitive measure of T-cell function than [(3)H]-thymidine uptake. *Cytometry* 38(5): 244-9.

Hutloff, A., A. M. Dittrich, et al. (1999). ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397(6716): 263-6.

Imai, J., H. Hasegawa, et al. (2005). Exogenous antigens are processed through the endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) in cross-presentation by dendritic cells. *Int Immunol* 17(1): 45-53.

Inaba, K., M. Inaba, et al. (1992 a). Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 176(6): 1693-702.

Inaba, K., R. M. Steinman, et al. (1992 b). Identification of proliferating dendritic cell precursors in mouse blood. *J Exp Med* 175(5): 1157-67.

Inaba, K., M. Inaba, et al. (1993). Granulocytes, macrophages, and dendritic cells arise from a common major histocompatibility complex class II-negative progenitor in mouse bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(7): 3038-42.

Janeway, C. A., Jr. (2002). *Immunologie*. 5. Auflage

Jonuleit, H. and E. Schmitt (2003). The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol* 171(12): 6323-7.

Kagi, D., B. Ledermann, et al. (1994). CD8+ T cell-mediated protection against an intracellular bacterium by perforin-dependent cytotoxicity. *Eur J Immunol* 24(12): 3068-72.

Keir, M. E., M. J. Butte, et al. (2008). PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 26: 677-704.

Kelner, G. S., J. Kennedy, et al. (1994). Lymphotoxin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 266(5189): 1395-9.

Ken Shortman, Y.-J. L. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2(3): 11.

Kennedy, J., G. S. Kelner, et al. (1995). Molecular cloning and functional characterization of human lymphotoxin. *J Immunol* 155(1): 203-9.

Kim, J. Y., H. J. Kim, et al. (2007). Functional and genomic analyses of FOXP3-transduced Jurkat-T cells as regulatory T (Treg)-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 362(1): 44-50.

Klausner, R. D., J. G. Donaldson, et al. (1992). Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol* 116(5): 1071-80.

Kojima, Y., A. Kawasaki-Koyanagi, et al. (2002). Localization of Fas ligand in cytoplasmic granules of CD8+ cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells: participation of Fas ligand in granule exocytosis model of cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 296(2): 328-36.

Kundig, T. M., A. Shahinian, et al. (1996). Duration of TCR stimulation determines costimulatory requirement of T cells. *Immunity* 5(1): 41-52.

Kurt, R. A., M. Bauck, et al. (2001). Role of C chemokine lymphotactin in mediating recruitment of antigen-specific CD62L (lo) cells in vitro and in vivo. *Cell Immunol* 209(2): 83-88.

Kurts, C., W. R. Heath, et al. (1996). Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo. *J Exp Med* 184(3): 923-30.

Kurts, C., F. R. Carbone, et al. (1997 a). CD4+ T cell help impairs CD8+ T cell deletion induced by cross-presentation of self-antigens and favors autoimmunity. *J Exp Med* 186(12): 2057-62.

Kurts, C., H. Kosaka, et al. (1997 b). Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *J Exp Med* 186(2): 239-45.

Kurts, C., W. R. Heath, et al. (1998 a). Cross-presentation of self antigens to CD8+ T cells: the balance between tolerance and autoimmunity. *Novartis Found Symp* 215: 172-81; discussion 181-90.

Kurts, C., W. R. Heath, et al. (1998 b). The peripheral deletion of autoreactive CD8+ T cells induced by cross-presentation of self-antigens involves signaling through CD95 (Fas, Apo-1). *J Exp Med* 188(2): 415-20.

Kurts, C., R. M. Sutherland, et al. (1999). CD8 T cell ignorance or tolerance to islet antigens depends on antigen dose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(22): 12703-7.

Kurts, C. (2000). Cross-presentation: inducing CD8 T cell immunity and tolerance. *J Mol Med* 78(6): 326-32.

Kuss, I., A. D. Donnenberg, et al. (2003). Effector CD8⁺CD45RO⁻CD27⁻T cells have signalling defects in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cancer* 88(2): 223-30.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-5.

Lee, H. W., S. J. Park, et al. (2002). 4-1BB promotes the survival of CD8⁺ T lymphocytes by increasing expression of Bcl-xL and Bfl-1. *J Immunol* 169(9): 4882-8.

Lee, S. M., B. Gao, et al. (2008). FoxP3 maintains Treg unresponsiveness by selectively inhibiting the promoter DNA-binding activity of AP-1. *Blood* 111(7): 3599-606.

Lee, S. W., S. Salek-Ardakani, et al. (2009). Hypercostimulation through 4-1BB distorts homeostasis of immune cells. *J Immunol* 182(11): 6753-62.

Lilley, B. N. and H. L. Ploegh (2004). A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature* 429(6994): 834-40.

Limmer, A., J. Ohl, et al. (2005). Cross-presentation of oral antigens by liver sinusoidal endothelial cells leads to CD8 T cell tolerance. *Eur J Immunol* 35(10): 2970-81.

Lin, M. L., Y. Zhan, et al. (2008). The cell biology of cross-presentation and the role of dendritic cell subsets. *Immunol Cell Biol* 86(4): 353-62.

Liu, A. N., A. Z. Mohammed, et al. (1999). Perforin-independent CD8(+) T-cell-mediated cytotoxicity of alveolar epithelial cells is preferentially mediated by tumor necrosis factor-alpha: relative insensitivity to Fas ligand. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20(5): 849-58.

- Lukens, J. R., M. W. Cruise, et al. (2008). Blockade of PD-1/B7-H1 interaction restores effector CD8⁺ T cell responses in a hepatitis C virus core murine model. *J Immunol* 180(7): 4875-84.
- Albert, M.L., M. Jegathesan, et al. (2001). Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8⁺ T cells. *Nat Immunol* 2(1010): 1010-17.
- Madakamutil, L. T., U. Christen, et al. (2004). CD8 α mediated survival and differentiation of CD8 memory T cell precursors. *Science* 304(5670): 590-93.
- Maghazachi, A. A., B. S. Skalhegg, et al. (1997). Interferon-inducible protein-10 and lymphotactin induce the chemotaxis and mobilization of intracellular calcium in natural killer cells through pertussis toxin-sensitive and -insensitive heterotrimeric G-proteins. *FASEB J* 11(10): 765-74.
- Mahajan, V. S., I. B. Leskov, et al. (2005). Homeostasis of T cell diversity. *Cell Mol Immunol* 2(1): 1-10.
- Mahnke, K., E. Schmitt, et al. (2002). Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 80(5): 477-83.
- Mandron, M., H. Martin, et al. (2008). Dendritic cell-induced apoptosis of human cytomegalovirus-infected fibroblasts promotes cross-presentation of pp65 to CD8⁺ T cells. *J Gen Virol* 89(Pt 1): 78-86.
- Marzio, R., E. Jirillo, et al. (1997). Expression and function of the early activation antigen CD69 in murine macrophages. *J Leukoc Biol* 62(3): 349-55.
- Marzio, R., J. Mael, et al. (1999). CD69 and regulation of the immune function. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 21(3): 565-82.
- McAdam, A. J., T. T. Chang, et al. (2000). Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4⁺ T cells. *J Immunol* 165(9): 5035-40.
- McAdam, A. J., R. J. Greenwald, et al. (2001). ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature* 409(6816): 102-5.

McLellan, A. D., M. Kapp, et al. (2002). Anatomic location and T-cell stimulatory functions of mouse dendritic cell subsets defined by CD4 and CD8 expression. *Blood* 99(6): 2084-93.

Mempel, T. R., S. E. Henrickson, et al. (2004). T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* 427(6970): 154-9.

Miller, J. F., C. Kurts, et al. (1998). Induction of peripheral CD8+ T-cell tolerance by cross-presentation of self antigens. *Immunol Rev* 165: 267-77.

Miltenyi, S., W. Muller, et al. (1990). High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11(2): 231-8.

Mittrucker, H. W., A. Shahinian, et al. (1996). Induction of unresponsiveness and impaired T cell expansion by staphylococcal enterotoxin B in CD28-deficient mice. *J Exp Med* 183(6): 2481-8.

Morimoto, J., X. Tan, et al. (2007). Induction of tolerance in CD8+ T cells to a transgenic autoantigen expressed in the liver does not require cross-presentation. *J Immunol* 178(11): 6849-60.

Muller, S., B. Dorner, et al. (1995). Cloning of ATAC, an activation-induced, chemokine-related molecule exclusively expressed in CD8+ T lymphocytes. *Eur J Immunol* 25(6): 1744-8.

Novy, P., M. Quigley, et al. (2007). CD4 T cells are required for CD8 T cell survival during both primary and memory recall responses. *J Immunol* 179(12): 8243-51.

Oizumi, S., N. Strbo, et al. (2007). Molecular and cellular requirements for enhanced antigen cross-presentation to CD8 cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 179(4): 2310-7.

Okazaki, T. and T. Honjo (2006). The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends Immunol* 27(4): 195-201.

Otahal, P., S. C. Hutchinson, et al. (2005). Inefficient cross-presentation limits the CD8+ T cell response to a subdominant tumor antigen epitope. *J Immunol* 175(2): 700-12.

- Palucka, A. K., M. V. Dhodapkar, et al. (2003). Single injection of CD34+ progenitor-derived dendritic cell vaccine can lead to induction of T-cell immunity in patients with stage IV melanoma. *J Immunother* 26(5): 432-9.
- Perfetto, S. P., T. E. Hickey, et al. (1997). Measurement of CD69 induction in the assessment of immune function in asymptomatic HIV-infected individuals. *Cytometry* 30(1): 1-9.
- Pierre, P. (2005). Dendritic cells, DRiPs, and DALIS in the control of antigen processing. *Immunol Rev* 207: 184-90.
- Pihlgren, M., C. Arpin, et al. (1999). Memory CD44(int) CD8 T cells show increased proliferative responses and IFN-gamma production following antigenic challenge in vitro. *Int Immunol* 11(5): 699-706.
- Pisegna, S., A. Zingoni, et al. (2002). Src-dependent Syk activation controls CD69-mediated signaling and function on human NK cells. *J Immunol* 169(1): 68-74.
- Radstake, T. R., L. van Bon, et al. (2009). Increased frequency and compromised function of T regulatory cells in systemic sclerosis (SSc) is related to a diminished CD69 and TGFbeta expression. *PLoS One* 4(6): e5981.
- Anjuere, F. A., P. Martin, et al. (1999). Definition of dendritic cell subpopulations present in the spleen, Peyer's Patches, lymph nodes, and skin of the mouse. *Blood* 93(2): 590-98.
- Redmond, W. L., B. C. Marincek, et al. (2005 a). Distinct requirements for deletion versus anergy during CD8 T cell peripheral tolerance in vivo. *J Immunol* 174(4): 2046-53.
- Redmond, W. L. and L. A. Sherman (2005 b). Peripheral tolerance of CD8 T lymphocytes. *Immunity* 22(3): 275-84.
- Reis e Sousa, C. (2004). Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Semin. Immunol.* 16: 7.
- Rocha, B., A. Grandien, et al. (1995). Anergy and exhaustion are independent mechanisms of peripheral T cell tolerance. *J Exp Med* 181(3): 993-1003.

Rodriguez, A., A. Regnault, et al. (1999). Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat Cell Biol* 1(6): 362-8.

Romagnani, P., F. Annunziato, et al. (2000). Cytokines and chemokines in T lymphopoiesis and T-cell effector function. *Immunol Today* 21(9): 416-8.

Rotta, G., E. W. Edwards, et al. (2003). Lipopolysaccharide or whole bacteria block the conversion of inflammatory monocytes into dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 198(8): 1253-63.

Sakaguchi, S. and N. Sakaguchi (2000). Role of genetic factors in organ-specific autoimmune diseases induced by manipulating the thymus or T cells, and not self-antigens. *Rev Immunogenet* 2(1): 147-53.

Salek-Ardakani, S., M. Moutaftsi, et al. (2008). OX40 drives protective vaccinia virus-specific CD8 T cells. *J Immunol* 181(11): 7969-76.

Sallusto, F., J. Geginat, et al. (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 22: 745-63.

Sambrook, J. and M. J. Gething (1989). Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* 342(6247): 224-5.

Sanchez-Mateos, P. and F. Sanchez-Madrid (1991). Structure-function relationship and immunochemical mapping of external and intracellular antigenic sites on the lymphocyte activation inducer molecule, AIM/CD69. *Eur J Immunol* 21(10): 2317-25.

Sancho, D., M. Gomez, et al. (2003). CD69 downregulates autoimmune reactivity through active transforming growth factor-beta production in collagen-induced arthritis. *J Clin Invest* 112(6): 872-82.

Sancho, D., M. Gomez, et al. (2005). CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol* 26(3): 136-40.

Scheffold, A., M. Assenmacher, et al. (2000). High-sensitivity immunofluorescence for detection of the pro- and anti-inflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-10 on the surface of cytokine-secreting cells. *Nat Med* 6(1): 107-10.

- Schmits, R., T. M. Kundig, et al. (1996). LFA-1-deficient mice show normal CTL responses to virus but fail to reject immunogenic tumor. *J Exp Med* 183(4): 1415-26.
- Schnorrer, P., G. M. Behrens, et al. (2006). The dominant role of CD8⁺ dendritic cells in cross-presentation is not dictated by antigen capture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(28): 10729-34.
- Scholer, A., S. Hugues, et al. (2008). Intercellular adhesion molecule-1-dependent stable interactions between T cells and dendritic cells determine CD8⁺ T cell memory. *Immunity* 28(2): 258-70.
- Schuler, G., B. Schuler-Thurner, et al. (2003). The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 15(2): 138-47.
- Schwartz, R. H. (2003). T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 21: 305-34.
- Sebzda, E., T. M. Kundig, et al. (1996). Mature T cell reactivity altered by peptide agonist that induces positive selection. *J Exp Med* 183(3): 1093-104.
- Shankar, E. M., R. Vignesh, et al. (2008). Does CD4⁺CD25⁺foxp3⁺ cell (Treg) and IL-10 profile determine susceptibility to immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS) in HIV disease? *J Inflamm (Lond.)* 5: 2.
- Shen, D. T., J. S. Ma, et al. (2006 a). Activation of primary T lymphocytes results in lysosome development and polarized granule exocytosis in CD4⁺ and CD8⁺ subsets, whereas expression of lytic molecules confers cytotoxicity to CD8⁺ T cells. *J Leukoc Biol* 80(4): 827-37.
- Shen, L. and K. L. Rock (2006 b). Priming of T cells by exogenous antigen cross-presented on MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol* 18(1): 85-91.
- Shevach, E. M., R. S. McHugh, et al. (2001). Control of T-cell activation by CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells. *Immunol Rev* 182: 58-67.
- Shiow, L. R., D. B. Rosen, et al. (2006). CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature* 440(7083): 540-4.
- Shortman, K., and Y. Liu (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2(3): 151-61.

Shortman, K. and S. H. Naik (2007). Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* 7(1): 19-30.

Shrimpton, R. E., M. Butler, et al. (2009). CD205 (DEC-205): a recognition receptor for apoptotic and necrotic self. *Mol Immunol* 46(6): 1229-39.

Steinman, R. M. and Z. A. Cohn (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137(5): 1142-62.

Steinman, R. M., M. Witmer-Pack, et al. (1993). Dendritic cells: antigen presentation, accessory function and clinical relevance. *Adv Exp Med Biol* 329: 1-9.

Steinman, R. M. (2003 a). The control of immunity and tolerance by dendritic cell. *Pathol Biol (Paris)* 51(2): 59-60.

Steinman, R. M. (2003 b). Some interfaces of dendritic cell biology. *APMIS* 111(7-8): 675-97.

Steinman, R. M., A. Granelli-Piperno, et al. (2003 c). The interaction of immunodeficiency viruses with dendritic cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 276: 1-30.

Steinman, R. M., D. Hawiger, et al. (2003 d). Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Ann N Y Acad Sci* 987: 15-25.

Steinman, R. M., D. Hawiger, et al. (2003 e). Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21: 685-711.

Stoll, S., J. Delon, et al. (2002). Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science* 296(5574): 1873-6.

Sugamura, K., H. Asao, et al. (1995). The common gamma-chain for multiple cytokine receptors. *Adv Immunol* 59: 225-77.

Suni, M. A., L. J. Picker, et al. (1998). Detection of antigen-specific T cell cytokine expression in whole blood by flow cytometry. *J Immunol Methods* 212(1): 89-98.

Suss, G. and K. Shortman (1996). A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J Exp Med* 183(4): 1789-96.

Belz G. T. , G.M. Behrens, et al. (2002). The CD8a+ dendritic cell is responsible for inducing peripheral self-tolerance to tissue-associated Antigens. *J. Exp.Med.* 196(8): 1099-104.

Taams, L. S. and A. N. Akbar (2005). Peripheral generation and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 293: 115-31.

Taniguchi, T. and Y. Minami (1993). The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview. *Cell* 73(1): 5-8.

Tesselaar, K., R. Arens, et al. (2003). Lethal T cell immunodeficiency induced by chronic costimulation via CD27-CD70 interactions. *Nat Immunol* 4(1): 49-54.

Testi, R., D. D'Ambrosio, et al. (1994). The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol Today* 15(10): 479-83.

Tham, E. L. and M. F. Mescher (2002). The poststimulation program of CD4 versus CD8 T cells (death versus activation-induced nonresponsiveness). *J Immunol* 169(4): 1822-8.

Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9): 4350-4.

Trautmann, L., L. Janbazian, et al. (2006). Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med* 12(10): 1198-202.

Tsai, B., Y. Ye, et al. (2002). Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(4): 246-55.

Tuinstra, R. L., F. C. Peterson, et al. (2008). Interconversion between two unrelated protein folds in the lymphotactin native state. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(13): 5057-62.

Valenzuela, J. O., C. D. Hammerbeck, et al. (2005). Cutting edge: Bcl-3 up-regulation by signal 3 cytokine (IL-12) prolongs survival of antigen-activated CD8 T cells. *J Immunol* 174(2): 600-4.

Vermes, I., C. Haanen, et al. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Meth* 184(1): 39-51.

Vester, B., K. Muller, et al. (1999). Early gene expression of NK cell-activating chemokines in mice resistant to *Leishmania major*. *Infect Immun* 67(6): 3155-9.

Vicari, A. P., S. Ait-Yahia, et al. (2000). Antitumor effects of the mouse chemokine 6Ckine/SLC through angiostatic and immunological mechanisms. *J Immunol* 165(4): 1992-2000.

Vremec, D., J. Pooley, et al. (2000). CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol* 164(6): 2978-86.

Walzer, T., C. Arpin, et al. (2002). Differential in vivo persistence of two subsets of memory phenotype CD8 T cells defined by CD44 and CD122 expression levels. *J Immunol* 168(6): 2704-11.

Wang, W., H. Soto, et al. (2000). Identification of a novel chemokine (CCL28), which binds CCR10 (GPR2). *J Biol Chem* 275(29): 22313-23.

Watanabe, M., Y. Hara, et al. (2005). A distinct role for ICOS-mediated co-stimulatory signaling in CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets. *Int Immunol* 17(3): 269-78.

Watanabe, N., M. Gavrieli, et al. (2003). BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nat Immunol* 4(7): 670-9.

Wei, C. H. and L. A. Sherman (2007). N-terminal trimer extension of nominal CD8 T cell epitopes is sufficient to promote cross-presentation to cognate CD8 T cells in vivo. *J Immunol* 179(12): 8280-6.

Wilbanks, A. M., S. A. Laporte, et al. (2002). Apparent loss-of-function mutant GPCRs revealed as constitutively desensitized receptors. *Biochemistry* 41(40): 11981-9.

Wong, K. L., L. F. Tang, et al. (2009). CD44 (high) memory CD8 T cells synergize with CpG DNA to activate dendritic cell IL-12p70 production. *J Immunol* 183(1): 41-50.

- Yamada, H., G. Matsuzaki, et al. (2001). Reevaluation of the origin of CD44 (high) "memory phenotype" CD8 T cells: comparison between memory CD8 T cells and thymus-independent CD8 T cells. *Eur J Immunol* 31(6): 1917-26.
- Yamazaki, S., T. Iyoda, et al. (2003). Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med* 198(2): 235-47.
- Ye, Y., Y. Shibata, et al. (2004). A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* 429(6994): 841-7.
- Yoshida, T., T. Imai, et al. (1995). Molecular cloning of a novel C or gamma type chemokine, SCM-1. *FEBS Lett* 360(2): 155-9.
- Yoshida, T., T. Imai, et al. (1998). Identification of single C motif-1/lymphotactin receptor XCR1. *J Biol Chem* 273(26): 16551-4.
- Zeng, C., T. Wu, et al. (2005). BTLA, a new inhibitory B7 family receptor with a TNFR family ligand. *Cell Mol Immunol* 2(6): 427-32.
- Zhang, H., H. Hong, et al. (2009). Comparing pooled peptides with intact protein for accessing cross-presentation pathways for protective CD8+ and CD4+ T cells. *J Biol Chem* 284(14): 9184-91.
- Zhang, Y., Y. Wang, et al. (2002). An aged mouse model for RSV infection and diminished CD8(+) CTL responses. *Exp Biol Med (Maywood)* 227(2): 133-40.
- Ziegler, S. F., F. Ramsdell, et al. (1994). The activation antigen CD69. *Stem Cells* 12(5): 456-65.
- Ziegler, S. F. and J. H. Buckner (2009). FOXP3 and the regulation of Treg/Th17 differentiation. *Microbes Infect* 11(5): 594-8.
- Zlotnik, A. and O. Yoshie (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12(2): 121-7.

9. Anhang

9.1 Bescheinigung

Gemäß § 5 Abs. 4 der Promotionsordnung vom 02.11.2001 und § 7 Abs. 4 der Promotionsordnung vom 04.09.2007 des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie. Hierdurch versichere ich, dass die vorliegende Arbeit mit dem Titel „ Funktionelle Charakterisierung des C-Klasse Chemokins ATAC *in vivo*“ ohne fremde Hilfe selbständig von mir verfasst und nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet wurden.

Xuefei Zhou

Berlin, den 09.09.2009.