

Spezifische Antigenbeladung kreuzpräsentierender dendritischer Zellen über den Chemokinrezeptor XCR1

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

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

vorgelegt von

Evelyn Hartung

aus Leipzig

Januar 2013

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 2008 bis Januar 2013 unter der Leitung von Prof. Dr. R. A. Kroczek in der Abteilung Immunologische Abwehrmechanismen am Robert Koch-Institut, Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Richard A. Kroczek

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am 26.04.2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Dendritische Zellen	1
1.2 Chemokine und Chemokinrezeptoren	8
1.3 Impfstoffe.....	9
1.4 Ziele.....	12
2 Material und Methoden.....	13
2.1 Verwendete Chemikalien und Materialien	13
2.2 Probenmaterial.....	13
2.2.1 Mäuse.....	13
2.2.2 Menschliche Proben.....	14
2.3 Tierexperimentelle Methoden	14
2.3.1 Adoptiver Transfer.....	14
2.3.2 Immunisierung.....	15
2.3.3 Serumpräparation.....	15
2.3.4 Proliferationsanalyse.....	15
2.3.5 Zellaufnahmeassay	15
2.3.6 Flt3-Ligand-Behandlung.....	15
2.3.7 Tumorinduktion	16
2.4 Zellbiologische Methoden.....	16
2.4.1 Verwendete Reagenzien und Zelllinien.....	16
2.4.2 Zellkulturbedingungen.....	17
2.4.3 Zellzahlbestimmung	17
2.4.4 Trypsinierung adhärenter Zelllinien	17
2.4.5 Präparation primärer Zellen	17
2.4.5.1 Isolierung von Zellen aus lymphatischen Organen.....	17
2.4.5.2 Präparation von Lungen.....	18
2.4.5.3 Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC).....	18
2.4.6 Anreicherung von murinen dendritischen Zellen.....	18
2.4.7 Magnetische Zellsortierung muriner dendritische Zellen	19
2.4.8 Sortierung humaner dendritischer Zellen.....	19
2.4.9 Hitzeschockbehandlung von Milzzellen und Bindung von XCL1.....	20
2.4.10 Chemotaxis im Transwell-System	21
2.5 Durchflusszytometrie.....	21
2.5.1 Fluorophore	21
2.5.2 Monoklonale Antikörper.....	22
2.5.3 Färbung von Oberflächenantigenen.....	24

2.5.4	Intrazelluläre Färbung von Molekülen.....	24
2.5.5	FDG-Färbung.....	25
2.5.6	Apoptosefärbung.....	25
2.5.7	Durchflusszytometrische Messung und Sortierung	26
2.6	Histologie	26
2.6.1	Präparation von Milzen und Anfertigung von Kryostatschnitten	26
2.6.2	Immunfluoreszenz	27
2.7	Generierung eines monoklonalen XCR1-spezifischen Antikörpers	27
2.7.1	Immunisierung.....	27
2.7.2	Fusion	28
2.7.3	Screening der Hybridome	29
2.7.4	Subklonierung der Hybridome.....	29
2.7.5	Reinigung des monoklonalen Antikörpers.....	29
2.8	Kopplung eines monoklonalen Antikörpers an Ovalbumin.....	30
2.9	Blockadeuntersuchung des XCR1-spezifischen Antikörpers.....	31
2.10	Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).....	31
2.10.1	Isotypbestimmung der monoklonalen Antikörper	31
2.10.2	Detektion OVA-spezifischer Antikörper	31
2.11	Statistische Analysen.....	32
3	Ergebnisse.....	33
3.1	Generierung und Charakterisierung eines XCR1-spezifischen monoklonalen Antikörpers	33
3.1.1	Generierung eines Hybridoms, das einen XCR1-spezifischen Antikörper (MARX10) sezerniert.....	33
3.1.2	MARX10 erkennt spezifisch einen Teil der CD8 ⁺ und CD8 ⁻ dendritischen Zellen in der Milz, aber keine anderen Zellpopulationen	35
3.1.3	MARX10 färbt in der Histologie CD8 ⁺ CD11c ⁺ Zellen in T-Zellzone, Marginalzone und roter Pulpa	38
3.1.4	MARX10 blockiert nicht die Bindung von XCL1 an XCR1	40
3.1.4.1	MARX10 blockiert nicht die Färbung von XCR1 in der Durchflusszytometrie	41
3.1.4.2	MARX10 blockiert nicht die Migration CD8 ⁺ DZ zu XCL1	42
3.2	XCR1-Expression in Lunge und mediastinalem Lymphknoten	43
3.2.1	XCR1-Expression in der Lunge korreliert mit CD103 und CD207, aber nicht mit CD11b und CX3CR1, und ist abhängig vom Transkriptionsfaktor Batf3.....	43
3.2.2	XCR1-Expression im mediastinalen Lymphknoten korreliert teilweise mit CD103 und CD8 und ist abhängig vom Transkriptionsfaktor Batf3	45
3.3	Die Wechselwirkung von XCR1 mit seinem Liganden XCL1 verstärkt die CD8⁺ T-Zellantwort	47
3.3.1	Zugabe von XCL1 bei einer Immunisierung mit Ovalbumin führt zu einer verstärkten T-Zellproliferation.....	47
3.3.2	Bindung von XCL1 an Zellen verstärkt die CD8 ⁺ T-Zellaktivierung.....	48
3.3.2.1	XCL1 bindet an nekrotische Splenozyten	48

3.3.2.2	Nekrotische Zellen, an die XCL1 gebunden ist, werden verstärkt von XCR1 ⁺ DZ aufgenommen.....	50
3.3.2.3	Nekrotische Zellen, an die XCL1 gebunden ist, induzieren eine verstärkte CD8 ⁺ T-Zellproliferation.....	52
3.4	Spezifische Antigenbeladung kreuzpräsentierender Zellen über XCR1.....	53
3.4.1	XCL1-OVA und MARX-OVA aktivieren ohne Adjuvans dendritische Zellen <i>in vivo</i> nicht.....	53
3.4.2	Immunisierungen mit XCL1-OVA und MARX-OVA aktivieren antigenspezifische CD8 ⁺ T-Zellen	54
3.4.3	Immunisierungen mit XCL1-OVA und MARX-OVA führen zur Bildung antigenspezifischer Antikörper.....	58
3.4.4	Immunisierung mit XCL1-OVA verhindert das Wachstum eines Tumors.....	59
3.5	XCR1-Expression im Menschen	60
3.5.1	XCR1 wird im menschlichen Blut nur auf CD141 ⁺ dendritischen Zellen exprimiert.....	61
3.5.2	Etablierung einer Strategie zum gleichzeitigen Sortieren aller Populationen der dendritischen Zellen aus humanem Blut	62
3.5.3	CD141 ⁺ dendritische Zellen migrieren als einzige Zellen zu XCL1	63
4	Diskussion	66
4.1	Generierung eines XCR1-spezifischen monoklonalen Antikörpers	66
4.2	XCR1-Expression.....	67
4.3	Interaktion von XCR1 und XCL1	70
4.4	Antigenbeladung kreuzpräsentierender dendritischer Zellen über XCR1.....	72
5	Zusammenfassung/Summary	78
5.1	Zusammenfassung.....	78
5.2	Summary.....	79
6	Literaturverzeichnis.....	80
7	Abkürzungsverzeichnis	93
8	Danksagung	95
9	Publikationen.....	96
9.1	Originalpublikationen	96
9.2	Kongressbeiträge und sonstige Vorträge	96

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Antigenpräsentation durch dendritische Zellen.....	2
Abb. 2:	Durchflusszytometrische Analyse.....	26
Abb. 3:	Anreicherung von XCR1 ⁺ DZ durch Behandlung von C57BL/6 Mäusen mit einer Flt3-Ligand exprimierenden Zelllinie.....	34
Abb. 4:	MARX10 färbt einen Teil der konventionellen dendritischen Zellen der Milz an.....	36
Abb. 5:	MARX10 färbt keine T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, plasmazytoide dendritische Zellen, Granulozyten und Makrophagen an.....	36
Abb. 6:	MARX10, XCL1-Reagenz und FDG in B6.XCR1:LacZ Mäusen färben dieselben Zellen.....	37
Abb. 7:	XCR1 ⁺ DZ sind in der T-Zellzone und der roten Pulpa lokalisiert, aber nicht in B-Zellzonen.....	39
Abb. 8:	Auf Milzschnitten sind XCR1 und CD8 kolokalisiert.....	40
Abb. 9:	MARX10 blockiert nicht die Bindung von XCL1 an XCR1 und XCL1 nicht die Bindung von MARX10.....	41
Abb. 10:	MARX10 blockiert nicht die Chemotaxis von CD8 ⁺ DZ zu XCL1.....	42
Abb. 11:	Die XCR1-Expression in der Lunge korreliert mit CD103 und CD207, aber nicht mit CD11b und CX3CR1.....	44
Abb. 12:	Die XCR1-Expression in der Lunge von 129 WT Mäusen korreliert stark mit CD103 und ist Batf3-abhängig.....	45
Abb. 13:	Die XCR1-Expression im mediastinalen Lymphknoten korreliert mit CD8 auf den residenten und teilweise mit CD103 auf den migratorischen dendritischen Zellen und ist Batf3-abhängig.....	46
Abb. 14:	Die Zugabe von XCL1 zu OVA bei der Immunisierung verstärkt die Proliferation der antigenspezifischen CD8 ⁺ T-Zellen.....	48
Abb. 15:	XCL1 bindet an nekrotische Zellen.....	49
Abb. 16:	Nekrotische Zellen, an die XCL1 gebunden ist, werden verstärkt von XCR1 ⁺ DZ aufgenommen.....	51
Abb. 17:	Nekrotische Zellen, an die XCL1 gebunden ist, induzieren eine verstärkte CD8 ⁺ T-Zellproliferation.....	52
Abb. 18:	XCL1-OVA und MARX-OVA aktivieren dendritische Zellen <i>in vivo</i> nicht.....	54
Abb. 19:	Immunisierung mit XCL1-OVA oder MARX-OVA führt zur Proliferation antigenspezifischer CD8 ⁺ T-Zellen.....	55
Abb. 20:	Immunisierung mit XCL1-OVA oder MARX-OVA führt in XCR1-defizienten Mäusen nicht zur Proliferation antigenspezifischer CD8 ⁺ T-Zellen.....	56
Abb. 21:	Immunisierung mit XCL1-OVA oder MARX-OVA führt zur Aktivierung antigenspezifischer CD8 ⁺ T-Zellen nach 24 h.....	57
Abb. 22:	Immunisierung mit XCL1-OVA oder MARX-OVA führt zur Bildung antigenspezifischer Antikörper.....	59
Abb. 23:	Immunisierung mit XCL1-OVA verhindert das Wachstum eines Tumors.....	60
Abb. 24:	XCR1 wird nur auf der Oberfläche der CD141 ⁺ dendritische Zellen exprimiert.....	61
Abb. 25:	Strategie zur Sortierung humaner dendritischer Zellen.....	62
Abb. 26:	Nur CD141 ⁺ DZ, aber keine anderen Zellpopulationen migrieren zu XCL1.....	64
Abb. 27:	Die Bindung von XCL1 an nekrotische Zellen führt zur Aufnahme dieser Zellen und zur Kreuzpräsentation zellulärer Antigene.....	72

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Übersicht über bisherige Studien zur Antigenbeladung von dendritischen Zellen <i>in vivo</i>	11
Tab. 2:	Verwendete Puffer und Lösungen für zellbiologische Methoden	16
Tab. 3:	Verwendete Zelllinien und Kulturmedien	16
Tab. 4:	Anreicherung verschiedener Subtypen dendritischer Zellen aus PBMC.....	20
Tab. 5:	Strategien zur durchflusszytometrischen Sortierung verschiedener Zellpopulationen aus humanem Blut.....	20
Tab. 6:	Optische Eigenschaften der genutzten Fluorophore und Analysebedingungen am Durchflusszytometer	22
Tab. 7:	Verwendete monoklonale Antikörper gegen humane Zielmoleküle	22
Tab. 8:	Verwendete monoklonale Antikörper gegen murine Zielmoleküle	23
Tab. 9:	Immunisierungsstrategien zur Generierung eines XCR1-spezifischen monoklonalen Antikörpers.....	28
Tab. 10:	Immunisierungsstrategien und resultierende Hybridome.....	35

1 Einleitung

1.1 Dendritische Zellen

1.1.1 Funktion der dendritischen Zellen

Dendritische Zellen (DZ) spielen eine entscheidende Rolle bei der Initiierung einer adaptiven Immunantwort. DZ sitzen in allen Geweben, wo sie kontinuierlich Moleküle (Antigene) aufnehmen, die sie nach Einwanderung in Lymphknoten T-Zellen präsentieren. Damit gehören sie neben den B-Zellen und Makrophagen zu den professionellen antigenpräsentierenden Zellen (Trombetta und Mellman, 2005). Besonders wichtig für eine Immunantwort ist die Positionierung der DZ in Geweben, die eindringenden Pathogenen ausgesetzt sind, wie z. B. Darm, Haut oder Lunge. Aber auch in Lymphknoten und Milz gibt es DZ, die Antigene aus Lymphe oder Blut aufnehmen (Steinman und Banchereau, 2007).

Antigene werden auf der Oberfläche der DZ im Zusammenhang mit Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHC) präsentiert. Der Antigen-MHC-Komplex wird von antigenspezifischen T-Zellen über ihren T-Zellrezeptor (TZR) erkannt. Je nach Art der Antigene werden sie auf verschiedenen Wegen präsentiert (Abb. 1): (i) Exogene Proteine von Bakterien, Viren oder anderen Zellen werden durch Phagozytose, Pinozytose oder rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen (Wilson und Villadangos, 2005). Dabei gelangen sie in die Endosomen und werden dort verdaut. Die entstandenen Peptide werden auf MHC II geladen und $CD4^+$ T-Zellen präsentiert (Abb. 1 A). (ii) Neben exogenen Proteinen können auch endogene Proteine als Antigen präsentiert werden. Diese sind zelleigene Proteine oder stammen von Pathogenen, welche die Zelle infiziert haben. Endogene Proteine werden durch das Proteasom im Zytosol verdaut und als Peptide über MHC I auf der Oberfläche präsentiert (Villadangos und Schnorrer, 2007), wo sie von antigenspezifischen $CD8^+$ T-Zellen erkannt werden können (Abb. 1 B). Endogene Proteine können aber auch in Endosomen gelangen und daraufhin im Kontext von MHC II $CD4^+$ T-Zellen präsentiert werden (Villadangos und Schnorrer, 2007). (iii) Einige antigenpräsentierende Zellen besitzen noch einen zusätzlichen Mechanismus der Antigenpräsentation. Ihnen ist es möglich, exogene Proteine, z. B. Zellbestandteile, über MHC I-Moleküle zu präsentieren (Bevan *et al.*, 1976) (Abb. 1 C). Diese sogenannte Kreuzpräsentation ist nötig, um zytotoxische T-Zellen gegen Erreger zu aktivieren, welche

nicht direkt die DZ infizieren. Daher spielt die Kreuzpräsentation eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von intrazellulären Bakterien, Viren und Tumoren (Kurts *et al.*, 2010).

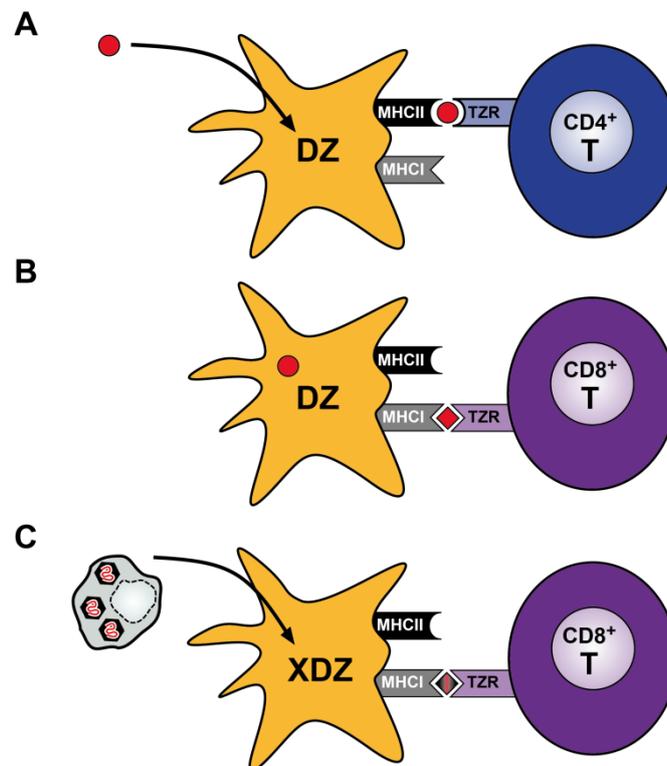


Abb. 1: Antigenpräsentation durch dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DZ) können auf verschiedene Arten Antigen T-Zellen (T) präsentieren. A) Exogene Antigene werden von allen DZ aufgenommen, prozessiert und über MHC II CD4⁺ T-Zellen präsentiert. B) Endogene Antigene, die von der Zelle selbst synthetisiert wurden (z. B. Virusbestandteile nach Infektion der Zelle), können von allen DZ auf MHC I-Moleküle geladen und CD8⁺ T-Zellen präsentiert werden. C) Die Kreuzpräsentation von exogenen, meist zellassozierten Antigenen ist nur einigen DZ (XDZ) möglich. Dabei wird exogenes Antigen über MHC I präsentiert und kann zytotoxische CD8⁺ T-Zellen aktivieren. TZR: T-Zellrezeptor

Die Kreuzpräsentation ist besonders wichtig bei der Präsentation von Antigenen aus infizierten Wirtszellen, welche nur durch zytotoxische T-Zellen und nicht durch Antikörper erkannt werden können. Daher sind kreuzpräsentierende DZ u. a. darauf spezialisiert, sterbende Zellen aufzunehmen. Sie besitzen verschiedene Mechanismen, um sterbende Zellen zu erkennen. Bei sterbenden Zellen kommt es zu einer Veränderung der Oberflächenstruktur (Poon *et al.*, 2010). So werden z. B. sonst nicht nach außen sichtbare Phosphatidylserine umgelagert und gelangen an die Oberfläche. DZ exprimieren einige Rezeptoren, die die veränderten Strukturen sterbender Zellen erkennen können und ihnen so die Aufnahme

ermöglichen. Zu diesen Rezeptoren gehören u. a. CD36 (Albert *et al.*, 1998), CD205 (DEC-205) (Shrimpton *et al.*, 2009) und Clec9A (DNDR-1) (Caminschi *et al.*, 2008; Sancho *et al.*, 2008). CD205 ist aktiv an der Aufnahme von Antigen beteiligt (Jiang *et al.*, 1995) und bindet auch an Liganden, die auf sterbenden Zellen exprimiert werden (Shrimpton *et al.*, 2009). Für Clec9A wurde kürzlich gezeigt, dass es filamentöses Aktin aus sterbenden Zellen erkennt (Ahrens *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012) und die aufgenommenen Zellbestandteile in den Kreuzpräsentationsweg überführt (Iborra *et al.*, 2012; Zelenay *et al.*, 2012).

Die Aufnahme und Präsentation von Antigenen führt nicht zwangsweise zur Induktion einer Immunantwort, sondern kann auch in der Aufrechterhaltung von Toleranz resultieren. Entscheidend hierfür ist der Aktivierungsstatus der DZ. Erst das Erkennen bestimmter Strukturen von Pathogenen (DAMP; *danger associated molecular patterns*) über *pattern-recognition*-Rezeptoren (PRR) führt zur Aktivierung der DZ (Poon *et al.*, 2010; Thacker und Janssen, 2012). Zu den wichtigsten PRR gehören die *toll-like*-Rezeptoren (TLR). Es gibt verschiedene TLR, die jeweils andere Bestandteile von Pathogenen, wie z. B. bakterielle DNA oder virale doppelsträngige RNA, erkennen können. Andererseits können auch körpereigene Strukturen als DAMP dienen, die von PRR erkannt werden und damit eine Aktivierung der DZ bewirken. Solche Strukturen werden u. a. von sterbenden Zellen, die ihre Membranintegrität verloren haben, freigesetzt. Dabei handelt es sich um Substanzen, die meist in der Zelle andere Aufgaben ausführen, z. B. DNA-bindende Proteine wie HMGB-1, Eisen-bindende Proteine wie Lactoferrin oder Hitzeschockproteine (Poon *et al.*, 2010).

Die Aktivierung von DZ führt zu ihrer Maturierung, wobei mehr MHC-Komplexe für eine verstärkte Antigenpräsentation auf der Oberfläche exprimiert werden. Außerdem werden diverse kostimulatorische Moleküle stärker exprimiert, die eine optimale T-Zellaktivierung gewährleisten (Steinman und Banchereau, 2007). Dazu gehören z. B. die Moleküle CD80 und CD86, die mit CD28 auf den T-Zellen interagieren (Sharpe und Freeman, 2002). Werden allerdings keine Aktivierungssignale an die DZ geliefert, z. B. bei der Aufnahme sterbender Zellen, die noch nicht ihre Membranintegrität verloren haben, maturieren die DZ nicht. Die unter diesen Umständen präsentierten Antigene resultieren in einer Toleranzreaktion der antigenspezifischen T-Zellen (Caminschi *et al.*, 2012). Dies verhindert eine Autoimmunreaktion gegen körpereigene Substanzen.

Die Interaktion der DZ mit den naiven T-Zellen findet in den T-Zellzonen der lymphatischen Organe statt. Erkennen die T-Zellen über ihren TZR den MHC-Peptid-Komplex, welcher von den DZ präsentiert wird, können sie aktiviert werden. Die Aktivierung der T-Zellen ist dabei

abhängig von den durch die DZ exprimierten kostimulatorischen Molekülen und sezernierten Zytokinen. Aktivierte T-Zellen expandieren klonal und wandern teilweise in Gewebe aus, um dort ihre jeweilige Funktion auszuüben. Naive antigenspezifische CD4⁺ T-Zellen werden nach Aktivierung zu verschiedenen CD4⁺ Helfer-T-Zellen, die wiederum antigenspezifische B-Zellen aktivieren und damit die humorale Immunantwort induzieren. Andererseits bilden sich aus naiven CD8⁺ T-Zellen nach Antigenerkennung und durch kostimulatorische Signale zytotoxische Effektor-T-Zellen. Diese können infizierte körpereigene Zellen erkennen, eliminieren und den Erreger dadurch an der Verbreitung hindern.

Die zentrale Rolle der DZ für die Initiierung einer adaptiven Immunantwort wird besonders deutlich, wenn diese Zellen *in vivo* künstlich depletiert werden. Fehlen die DZ, kommt keine Immunantwort in Folge einer Infektion durch z. B. Listerien oder Plasmodien zustande (Jung *et al.*, 2002).

1.1.2 Subtypen muriner dendritischer Zellen in der Milz

DZ lassen sich in plasmazytoide und konventionelle DZ einteilen. Die plasmazytoiden DZ (pDZ) exprimieren wenig CD11c und MHC II auf ihrer Oberfläche und können anhand der Expression von CD317 identifiziert werden (Blasius *et al.*, 2006). Sie sezernieren nach Aktivierung sehr schnell große Mengen an Typ-I-Interferonen, wodurch sie Zellen der angeborenen und adaptiven Immunantwort aktivieren können. Allerdings ist ihre Rolle bei der Antigenpräsentation eher gering (Villadangos und Young, 2008). Die konventionellen DZ exprimieren im Gegensatz zu pDZ viel CD11c und MHC II auf ihrer Oberfläche und können daher durch Kombination beider Moleküle identifiziert werden (Segura und Villadangos, 2009). Die konventionellen DZ der Milz werden in CD4⁻CD8⁺, CD4⁺CD8⁻ und CD4⁻CD8⁻ DZ unterteilt (Vremec *et al.*, 2000). Die CD8⁺ DZ exprimieren CD103, CD205, CD207 (Langerin) und Clec9A (Shortman und Heath, 2010). Den anderen DZ-Populationen sind sie deutlich in der Aufnahme von toten Zellen überlegen (Iyoda *et al.*, 2002; Schulz *et al.*, 2002). Sie zeichnen sich außerdem durch ihre Fähigkeit zur Kreuzpräsentation aus (den Haan *et al.*, 2000; Pooley *et al.*, 2001). Die CD8⁻ DZ sind dagegen nicht bzw. nur unter bestimmten Umständen in der Lage zur Antigenkreuzpräsentation (den Haan *et al.*, 2000; Pooley *et al.*, 2001; Caminschi *et al.*, 2012), dafür aber effizienter bei der Präsentation von löslichem Antigen über MHC II (Pooley *et al.*, 2001; Dudziak *et al.*, 2007; Kamphorst *et al.*, 2010). Aktuelle Publikationen zeigen jedoch, dass CD8 kein guter Marker für DZ ist. So gibt es

bisher keine funktionellen Daten zur Expression von CD8 auf DZ (Shortman und Heath, 2010). Außerdem konnte gezeigt werden, dass nicht alle CD8⁺ DZ kreuzpräsentieren können (Lin *et al.*, 2008; Qiu *et al.*, 2009) und nur die CD8⁺CD103⁺CD207⁺ DZ zur Kreuzpräsentation fähig sind. Die Expression von CD103 auf CD8⁺ DZ in der Milz unterliegt aber starken Schwankungen und wird durch verschiedene Zytokine beeinflusst (Sathe *et al.*, 2011). Die Verwendung von CD207 als Marker dieser DZ ist schwierig, da es in den DZ der Milz in C57BL/6 Mäusen nur intrazellulär exprimiert wird (Qiu *et al.*, 2009). Außerdem werden beide Moleküle auch auf anderen Zellen exprimiert. Bisher war noch kein Oberflächenmolekül bekannt, durch welches die kreuzpräsentierenden DZ eindeutig identifiziert werden konnten.

1.1.3 Subtypen muriner dendritischer Zellen in Lunge und mediastinalem Lymphknoten

Die Lunge ist, wie die Haut und der Darm, ständig verschiedenen Reizen wie eindringenden Pathogenen oder eingeatmeten Substanzen ausgesetzt, auf die das Immunsystem reagieren muss. Pathogene müssen erkannt und antigenspezifische T-Zellen aktiviert werden. Andererseits werden auch harmlose Substanzen eingeatmet, gegen die eine Immunreaktion verhindert werden soll, um z. B. keine Allergien zu induzieren. Diese Aufgaben übernehmen die DZ der Lunge. Die DZ der Lunge werden nach ihrer Oberflächenexpression von CD103 und CD11b unterteilt (Sung *et al.*, 2006). Neben den beiden dominierenden einzelpositiven Populationen gibt es auch eine kleine Population DZ, welche beide Oberflächenmoleküle gleichzeitig exprimiert (Sung *et al.*, 2006). Sowohl die CD103⁺ als auch die CD11b⁺ DZ gehören zu den migratorischen DZ und wandern nach Antigenaufnahme in der Lunge in den lungendränierenden (mediastinalen) Lymphknoten ein (Kim *et al.*, 2009). Dort sind es die CD103⁺ DZ, welche das Antigen kreuzpräsentieren und CD8⁺ T-Zellen aktivieren (del Rio *et al.*, 2007; GeurtsvanKessel *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009). Neben den migratorischen DZ gibt es im mediastinalen Lymphknoten auch residente DZ, die sich, wie in der Milz, anhand ihrer CD8-Expression einteilen lassen. Von ihnen sind die CD8⁺ DZ an der Kreuzpräsentation von Antigen aus der Lunge beteiligt (Belz *et al.*, 2004). Da die Migration von der Lunge in den Lymphknoten CCR7-abhängig ist, können migratorische DZ im Lymphknoten anhand ihrer CCR7-Expression identifiziert werden (Hintzen *et al.*, 2006). Außerdem weisen die migratorischen DZ im Ruhezustand einen höheren Reifegrad als die residenten DZ auf und

lassen sich daher von den residenten DZ durch eine höhere Expression von MHC II auf ihrer Oberfläche unterscheiden (Vermaelen *et al.*, 2001).

1.1.4 Faktoren für die Entwicklung der murinen DZ-Subtypen

Die Entwicklung der DZ hängt u. a. von dem Wachstumsfaktor Flt3-Ligand ab. Während in Flt3-Ligand-defizienten Mäusen deutlich weniger DZ gebildet werden (McKenna *et al.*, 2000; Waskow *et al.*, 2008), bewirkt die Gabe von Flt3-Ligand eine Anreicherung von DZ (Maraskovsky *et al.*, 1996). Der Transkriptionsfaktor Batf3 wird von CD8⁺ und CD8⁻ DZ produziert, aber Batf3-Defizienz verhindert nur die Entwicklung der CD8⁺ DZ (Hildner *et al.*, 2008). Neben Batf3 sind auch die Transkriptionsfaktoren Irf8 und Id2 für die Entwicklung der kreuzpräsentierenden CD8⁺ DZ verantwortlich. Fehlen diese Transkriptionsfaktoren in defizienten Mäusen, sind keine kreuzpräsentierenden CD8⁺ DZ in der Milz und CD103⁺ DZ in der Peripherie detektierbar (Schiavoni *et al.*, 2002; Aliberti *et al.*, 2003; Hacker *et al.*, 2003; Edelson *et al.*, 2010). Für die Entwicklung der CD8⁻ DZ sind die Transkriptionsfaktoren RelB und Irf4 von Bedeutung. In RelB- oder Irf4-defizienten Mäusen sind die CD8⁻ DZ drastisch reduziert (Wu *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 2004). Diese beiden Faktoren haben jedoch keinen Einfluss auf die Entwicklung der kreuzpräsentierenden CD8⁺ oder CD103⁺ DZ.

1.1.5 Humane dendritische Zellen

DZ des Menschen weisen in der Expression von Oberflächenmolekülen deutliche Unterschiede zu DZ der Maus auf. Sie exprimieren zwar CD4, aber nicht CD8 (O'Doherty *et al.*, 1993). Daher ist es nicht möglich, die Einteilung der murinen DZ auf die humanen DZ direkt zu übertragen. Am zugänglichsten ist peripheres Blut, weshalb die DZ aus mononukleären Zellen des Blutes (PBMC, *peripheral blood mononuclear cells*) bisher am besten charakterisiert werden konnten. Alle DZ exprimieren das humane Leukozytenantigen DR (HLA-DR, ein MHC II-Molekül). DZ werden von anderen Zellen durch das Fehlen von linienspezifischen Molekülen für T-Zellen (CD3), B-Zellen (CD19), Monozyten (CD14), Granulozyten (CD15) und NK-Zellen (CD56) unterschieden (MacDonald *et al.*, 2002). Die DZ unterteilen sich in CD11c⁺ konventionelle DZ und CD11c⁻CD123⁺CD303⁺CD304⁺ pDZ (Robinson *et al.*, 1999; Dzionek *et al.*, 2000). Die konventionellen DZ werden weiterhin in

drei Subtypen eingeteilt: CD1c⁺, CD16⁺ und CD141⁺ DZ (Dzionic *et al.*, 2000; MacDonald *et al.*, 2002). MacDonald *et al.* beschrieben die CD34⁺ DZ als weiteren Subtyp. Bei den CD34⁺ DZ handelt es sich aber wahrscheinlich um Vorläuferzellen, die noch nicht vollständig zu DZ ausdifferenziert sind (Piccioli *et al.*, 2007).

Aufgrund der schlechten Verfügbarkeit von humanem Probenmaterial gibt es deutlich weniger funktionelle Untersuchungen der verschiedenen humanen DZ-Subtypen als von murinen DZ. Die meisten Studien erfolgten mit DZ, die aus Monozyten oder CD34⁺ Vorläufern aus PBMC generiert worden sind. Diese unterscheiden sich jedoch sehr stark von *ex vivo* isolierten DZ (Osugi *et al.*, 2002; Robbins *et al.*, 2008). Die aus Blut isolierten konventionellen DZ können effektiver Partikel wie Zymosan oder FITC-Dextran aufnehmen als pDZ (Robinson *et al.*, 1999). Alle DZ stimulieren allogene T-Zellen in gemischten Lymphozytenreaktionen, wobei die konventionellen DZ kompetenter sind als pDZ (Robinson *et al.*, 1999). Die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation der einzelnen Subtypen wurde noch nicht umfassend untersucht. Einige Daten zeigen, dass CD1c⁺ DZ kreuzpräsentieren können (Schnurr *et al.*, 2005; Hoeffel *et al.*, 2007; Di Pucchio *et al.*, 2008). Dabei wurden auch pDZ untersucht, die allerdings widersprüchliche Daten zur Kreuzpräsentation lieferten. Jedoch wurden in allen bisherigen Vergleichen die CD141⁺ DZ nicht berücksichtigt und auch nicht ausgeschlossen. Das bedeutet, dass die CD141⁺ DZ auch die anderen DZ-Populationen teilweise kontaminiert haben und damit zu einer Verfälschung der Ergebnisse geführt haben könnten. Die CD141⁺ DZ stellen einen so geringen Anteil an PBMC dar, dass ihre Zahl für funktionelle Studien meist nicht ausreichte.

Aufgrund der fehlenden funktionellen Unterscheidung und des unterschiedlichen Phänotyps der humanen DZ und der murinen DZ konnten bisher keine Homologien zwischen konventionellen DZ aus Maus und Mensch abgeleitet werden. Erste Hinweise auf Gemeinsamkeiten zwischen CD8⁺ DZ der Maus und den humanen CD141⁺ DZ lieferten Galibert *et al.* (2005). Sie zeigten, dass beide Subtypen *Necl2* exprimieren. Auch lieferte die Entdeckung von *Clec9A* auf diesen DZ in der Maus und im Menschen einen weiteren Anhaltspunkt für die Homologie zwischen CD8⁺ DZ der Maus und CD141⁺ DZ des Menschen (Caminschi *et al.*, 2008; Huysamen *et al.*, 2008; Sancho *et al.*, 2008). Durch umfassende Genexpressionsanalysen konnten Robbins *et al.* (2008) zeigen, dass murine CD8⁺ DZ und humane CD141⁺ DZ große Ähnlichkeiten in ihrem Genexpressionsprofil aufweisen. Die CD1c⁺ DZ scheinen eher den CD8⁻ DZ der Maus zu entsprechen. Einen funktionellen Beweis der Homologie der CD141⁺ DZ und CD8⁺ DZ gab es noch nicht.

1.2 Chemokine und Chemokinrezeptoren

Chemokine sind eine Gruppe kleiner Proteine (8-14 kDa), die die Migration lymphatischer Zellen steuern. Sie sind wichtig für die Homöostase des Immunsystems, aber auch für die Ausbildung einer Immunantwort (Zlotnik und Yoshie, 2000). Chemokine werden anhand der Position ihrer beiden konservierten N-terminalen Cysteine in vier Klassen eingeteilt (Murphy *et al.*, 2000). In der CC-Familie liegen die Cysteine direkt nebeneinander, während in der CXC- und der CX3C-Familie jeweils eine bzw. drei Aminosäuren zwischen beiden Cysteinen liegen. In der vierten Familie, der C-Familie, fehlt das zweite Cystein (Zlotnik und Yoshie, 2000).

Chemokine binden an einen oder mehrere Chemokinrezeptoren. Dabei handelt es sich um Sieben-Transmembran-Rezeptoren, die an ein G-Protein gekoppelt sind. Zusätzlich können Chemokine an Glykosaminoglykane (GAG) binden. Solche Kohlenhydratstrukturen finden sich auf allen Zelloberflächen und der extrazellulären Matrix. GAG sind sehr heterogen und werden daher von verschiedenen Chemokinen unterschiedlich erkannt (Allen *et al.*, 2007). Proudfoot *et al.* (2003) konnten zeigen, dass GAG wichtig sind für die Migration von Leukozyten *in vivo*. Sie verhindern die Diffusion der Chemokine und halten sie am Ort der Sekretion. Damit dienen sie zur Ausbildung eines stabilen Chemokingradienten.

1.2.1 XCL1 und XCR1

Das Chemokin XCL1 ist der einzige Vertreter der C-Chemokin-Familie. Es hat eine Größe von 10,3 kDa (Dorner *et al.*, 1997). XCL1 wurde von mehreren Gruppen unabhängig kloniert. Kelner *et al.* (1994) identifizierten es als Lymphotactin in murinen Thymozyten und Kennedy *et al.* (1995) in humanen T-Zellen. Müller *et al.* (1995) klonierten es als ATAC aus stimulierten humanen T-Zellen und Yoshida *et al.* (1995) als SCM-1 aus humanen stimulierten PBMC. Im Menschen wurde auch SCM-1 β (XCL2) gefunden, welches sich nur in zwei Aminosäuren von XCL1 unterscheidet und nicht in der Maus vorkommt (Yoshida *et al.*, 1996). XCL1 wird von aktivierten NK-Zellen, CD8⁺ T-Zellen, $\gamma\delta$ -T-Zellen und TH1-polarisierten CD4⁺ T-Zellen sezerniert (Dorner *et al.*, 2002).

Der einzige Rezeptor für XCL1 ist XCR1, welcher ursprünglich als Rezeptor GPR5 kloniert wurde (Yoshida *et al.*, 1998; Shan *et al.*, 2000). Aufgrund eines fehlenden Antikörpers gegen XCR1 konnte seine Expression ausschließlich auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Diese

wurde mittels quantitativer PCR nur in den CD8⁺ und mit einem schwachen Signal in den CD8⁻ der konventionellen DZ und nicht in anderen Zellpopulationen nachgewiesen (Dorner *et al.*, 2009). In einer LacZ-Reportermaus für XCR1 konnten diese Expressionsdaten bestätigt werden (Dorner *et al.*, 2009). In funktionellen Studien wurde gezeigt, dass nur die CD8⁺ DZ zu XCL1 *ex vivo* wandern (Dorner *et al.*, 2009). In XCL1-defizienten Mäusen gibt es 12 Tage nach Immunisierung deutlich geringerer Zahlen an antigenspezifischen transferierten CD8⁺ T-Zellen als in Wildtyp-Mäusen (Dorner *et al.*, 2009). Die Interaktion von CD8⁺ DZ, die XCR1 exprimieren, mit XCL1 hat demnach Auswirkungen auf die Expansion oder das Überleben antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen.

1.3 Impfstoffe

Die ersten Impfstoffe wurden von Louis Pasteur gegen Cholera (1879) und gegen Tollwut (1885) entwickelt. Sie basierten auf der Impfung mit attenuierten Mikroben, die einen langanhaltenden Schutz vor Infektionen erzeugen (Steinman, 2008). Der Schutz wird dabei v. a. durch die Bildung von neutralisierenden Antikörpern aufgebaut (Plotkin, 2008). Viele der heutigen Impfstoffe basieren auf diesem Prinzip. Einige Infektionen können jedoch nicht allein durch neutralisierende Antikörper eliminiert werden. Daher gibt es noch keine effektiven Impfstoffe gegen Pathogene, für deren Bekämpfung eine starke zytotoxische T-Zellantwort benötigt wird, wie z. B. HIV, Influenza, Malaria oder Tuberkulose (Pulendran und Ahmed, 2011). Nur zytotoxische T-Zellen sind während der adaptiven Immunantwort in der Lage, infizierte Zellen über spezifische Antigene zu erkennen und zu eliminieren. Damit verhindern sie die Vermehrung von Erregern, die in Wirtszellen vor neutralisierenden Antikörpern geschützt sind, wie z. B. *Plasmodium malariae* oder *Mycobacterium tuberculosis*. Viren wie z. B. HIV oder Influenza-Viren entziehen sich der Erkennung durch Antikörper, indem sie oft und schnell ihre Oberflächenproteine verändern. Infizieren sie jedoch eine Zelle, so werden dabei auch konservierte Kernproteine dieser Viren über MHC I auf der Oberfläche präsentiert. Zur Bekämpfung solcher Viren hilft die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen, die spezifisch konservierte virale Strukturen erkennen (Rappuoli, 2007). Eine Aktivierung zytotoxischer T-Zellen kann auch die Bekämpfung von Tumoren bewirken. Dabei besteht allerdings nicht nur die Schwierigkeit in der Induktion tumorspezifischer zytotoxischer T-Zellen, sondern auch in der Überwindung der immunsuppressiven Umgebung eines Tumors (Steinman und Banachereau, 2007).

Die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen bei einer Impfung kann nur durch kreuzpräsentierende DZ erfolgen. Daher wird bei der Entwicklung neuartiger Impfstoffe ein besonderer Fokus auf DZ gelegt. In ersten Ansätzen wurden DZ *ex vivo* mit Antigen beladen und wieder zurück in den Patienten gespritzt. Diese Art der Immunisierung war allerdings wenig erfolgreich (Steinman und Banchereau, 2007). Dies lag wahrscheinlich u. a. daran, dass injizierte DZ v. a. an der Injektionsstelle verblieben und nur rund 2 % in die dränierenden lymphatischen Gewebe einwanderten, wo sie antigenspezifische T-Zellen aktivieren konnten (de Vries *et al.*, 2003). Diese Methode ist zu dem sehr zeitaufwändig und kostenintensiv (Tacken und Figdor, 2011).

Eine vielversprechende Methode ist die Antigenbeladung von DZ *in vivo*. Dazu wird Antigen an einen Antikörper gegen Oberflächenmoleküle von DZ gekoppelt und injiziert. Je nach Expression der Oberflächenmoleküle werden verschiedene DZ-Subtypen beladen (Tab. 1). Antigenbeladung von CD8⁻ DZ über z. B. DCIR-2 (33D1) führte mit geringen Antigenmengen zu einer deutlichen Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen, aber nicht von CD8⁺ T-Zellen (Dudziak *et al.*, 2007). Dagegen induzierte die Beladung von kreuzpräsentierenden CD8⁺ DZ über CD205 v. a. die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen (Bonifaz *et al.*, 2002; Dudziak *et al.*, 2007). Weiterhin konnten die kreuzpräsentierenden DZ auch erfolgreich über Clec9A beladen werden. Dies führte zu einer effizienten zytotoxischen T-Zellantwort, welche tumorprotektiv und -abstoßend wirkte (Sancho *et al.*, 2008). Andererseits konnte bei einer Beladung über Clec9A eine sehr potente Antikörperantwort induziert werden, welche vor allem auf der Aktivierung von folliculären T-Helferzellen basierte (Caminschi *et al.*, 2008; Lahoud *et al.*, 2011). Auch CD103 und CD207 konnten zur Beladung von kreuzpräsentierenden Zellen genutzt werden und induzierten dabei zytotoxische T-Zellen (Idoyaga *et al.*, 2008; Semmrich *et al.*, 2012). Eine Zusammenstellung bisher durchgeführter Beladungsstudien ist in Tab. 1 gezeigt.

Tab. 1: Übersicht über bisherige Studien zur Antigenbeladung von dendritischen Zellen *in vivo*

Ziel-molekül	Immunantwort	Zellen, die dieses Molekül exprimieren
CD11c	Zytotoxizität, Antikörper (Wang <i>et al.</i> , 2000; Castro <i>et al.</i> , 2008; Wei <i>et al.</i> , 2009)	CD8 ⁺ DZ, CD8 ⁻ DZ, pDZ, Makrophagen, Monozyten, aktivierte T-, B- und NK-Zellen (Hashimoto <i>et al.</i> , 2011)
CD103	Zytotoxizität, Antikörper (Semmrich <i>et al.</i> , 2012)	CD8 ⁺ DZ, CD8 ⁻ DZ, T-Zellen, Makrophagen, aktivierte Mastzellen (Kilshaw <i>et al.</i> , 1990; Smith <i>et al.</i> , 1994; Tiisala <i>et al.</i> , 1995; McLellan <i>et al.</i> , 2002; Qiu <i>et al.</i> , 2009)
CD205/ DEC-205	Zytotoxizität, Antikörper (Bonifaz <i>et al.</i> , 2002; Boscardin <i>et al.</i> , 2006)	CD8 ⁺ DZ, CD8 ⁻ DZ, Langerhans-Zellen, B-Zellen, verschiedene Epithelzellen (Kraal <i>et al.</i> , 1986; Inaba <i>et al.</i> , 1995; Witmer-Pack <i>et al.</i> , 1995; Idoyaga <i>et al.</i> , 2009)
CD207/ Langerin	CD8 ⁺ und CD4 ⁺ T-Zell-proliferation (Idoyaga <i>et al.</i> , 2008)	CD8 ⁺ DZ, CD8 ⁻ DZ, Langerhans-Zellen (Valladeau <i>et al.</i> , 2000; Cheong <i>et al.</i> , 2007; Qiu <i>et al.</i> , 2009)
CIRE	Antikörper (Corbett <i>et al.</i> , 2005)	CD8 ⁻ DZ, pDZ (Caminschi <i>et al.</i> , 2001; Corbett <i>et al.</i> , 2005)
Clec9A/ DNGR-1	Zytotoxizität, Antikörper (Caminschi <i>et al.</i> , 2008; Sancho <i>et al.</i> , 2008)	CD8 ⁺ DZ, CD8 ⁻ DZ, pDZ, B-Zellen (Sancho <i>et al.</i> , 2008, Caminschi <i>et al.</i> , 2008)
Clec12A	Zytotoxizität, Antikörper (Lahoud <i>et al.</i> , 2009)	CD8 ⁺ DZ, CD8 ⁻ DZ, pDZ, Monozyten, Makrophagen, B-Zellen (Lahoud <i>et al.</i> , 2009)
DCIR-2/ 33D1	CD4 ⁺ T-Zellantwort (Dudziak <i>et al.</i> , 2007)	CD8 ⁻ DZ (Crowley <i>et al.</i> , 1989; Vremec <i>et al.</i> , 1992, Dudziak <i>et al.</i> , 2007)
FIRE	Antikörper (Corbett <i>et al.</i> , 2005)	CD8 ⁻ DZ, Monozyten, Makrophagen (Caminschi <i>et al.</i> , 2001)

DZ: dendritische Zellen; pDZ: plasmazytoide DZ

Alle bisher genutzten Moleküle sind jedoch nicht spezifisch für kreuzpräsentierende DZ (Tab. 1). CD205 wird u. a. auch von B-Zellen exprimiert, Clec9A befindet sich auch auf plasmazytoiden DZ, CD207 ist v. a. für seine Expression auf Langerhans-Zellen bekannt und CD103 wird auch von T-Zellen und Makrophagen exprimiert.

Voraussetzung für die Induktion einer zytotoxischen T-Zellantwort bei allen Beladungsstudien war die zusätzliche Gabe von Adjuvanzen. Adjuvanzen sind Substanzen, die eine Immunantwort verstärken. Sie variieren in ihrer chemischen Zusammensetzung und ihrer Wirkungsweise. Als Adjuvanzen können Öl-Emulsionen (z. B. Freund's Adjuvans), mineralische Komponenten (z. B. Alum), Bestandteile von Bakterien (z. B.

Lipopolysaccharid, LPS) oder synthetisch hergestellte TLR-Liganden wie poly I:C dienen (Gupta *et al.*, 1993; Tacke und Figdor, 2011). Diese ahmen DAMPS während einer Infektion nach und führen damit u. a. zur Reifung von DZ (siehe Kap. 1.1.1). LPS als natürlicher Bestandteil von gram-negativen Bakterien wird von TLR4 erkannt (Poltorak *et al.*, 1998). Als Pendant zu einer viralen Infektion dient poly I:C, welches ein synthetisches Analogon zu doppelsträngiger RNA aus Viren darstellt und über TLR3 erkannt wird (Alexopoulou *et al.*, 2001). Nur mit Hilfe von Adjuvantien konnten die CD8⁺ T-Zellen ausreichend für die Induktion einer zytotoxischen Antwort aktiviert werden (Bonifaz *et al.*, 2002). Ohne Adjuvans wurde eine tolerogene Situation geschaffen, in der die CD8⁺ T-Zellen keine Effektorfunktion mehr nach erneuter Antigenstimulation zeigten (Bonifaz *et al.*, 2002, Semmrich *et al.*, 2012).

Die Übertragung der Antigenbeladung *in vivo* auf den Menschen setzt voraus, dass die genutzten Oberflächenmoleküle eine ähnliche Expression im Menschen aufweisen wie in der Maus. So wird z. B. CD205 im Menschen von allen DZ-Subtypen exprimiert (MacDonald *et al.*, 2002) und zusätzlich von Monozyten, NK-Zellen, pDZ, B- und T-Zellen (Kato *et al.*, 2006). Bis vor kurzem war das menschliche Homolog zu den kreuzpräsentierenden DZ der Maus nicht bekannt, wodurch die Übertragung der Beladungsstudien kreuzpräsentierender DZ von der Maus auf den Menschen nicht möglich war.

1.4 Ziele

Die bisher bekannten Daten zeigten eine selektive Expression der XCR1-mRNA in kreuzpräsentierenden CD8⁺ DZ in der Milz. Die Oberflächenexpression von XCR1 auf DZ in der Milz und in peripheren Organen war allerdings nicht bekannt. Deswegen wurden folgende Ziele für diese Arbeit gesetzt:

- 1) Generierung eines für murines XCR1 spezifischen monoklonalen Antikörpers
- 2) Analyse der XCR1-Expression in der Lunge als Beispiel eines nicht-lymphatischen Organs
- 3) Untersuchung des Einflusses des Liganden XCL1 auf die Kreuzpräsentation *in vivo*
- 4) Beladung der kreuzpräsentierenden DZ mit Antigen über XCR1, durch Kopplung des Antigens an XCL1 und den XCR1-spezifischen monoklonalen Antikörper
- 5) Untersuchung der XCR1-Expression und Funktion auf humanen DZ

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Chemikalien und Materialien

Die verwendeten Chemikalien waren von der Qualität p.A. und wurden von den Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Merck Chemicals (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen. Steriles Plastikeinwegmaterial stammte von den Firmen Greiner GmbH (Frickenhäusen), Nunc (Roskilde, Dänemark) und Sarstedt (Nümbrecht).

2.2 Probenmaterial

2.2.1 Mäuse

Alle Tiere stammten aus einer Spezifiziert-Pathogen-Freien Zucht und wurden kurzzeitig in einem konventionellen Tierstall des Robert Koch-Institutes gehalten. Die Mäuse waren 8-12 Wochen alt. Alle Tierexperimente erfolgten in Übereinstimmung mit dem Deutschen Tierschutzgesetz (BGBl. I S. 1206, 1313; 2006). Es wurden folgende Stämme verwendet:

Balb/c, Substamm BALB/cAnNCrl bezogen von Charles River Laboratories (Wilmington, USA)

C57BL/6, Substamm C57BL/6NCrl bezogen vom Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin
B6.OT-I, CD8⁺ T-Zellen dieser Mäuse tragen einen Ovalbumin (OVA)-spezifischen transgenen T-Zellrezeptor (TZR) (Hogquist *et al.*, 1994); gekreuzt mit B6.PL Mäusen zur Expression des transgenen Markers CD90.1; bezogen vom Bundesinstitut für Risikobewertung (Berlin)

B6.OVA^{tg}, unter Kontrolle des Chicken β -Actin-Promotors gekoppelt an den *CMV immediately-early enhancer* wird OVA exprimiert, aber nicht sezerniert (Ehst *et al.*, 2003); bezogen von Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA)

B6.XCR1:LacZ, unter der Kontrolle des endogenen XCR1-Promotors wird die bakterielle β -Galaktosidase exprimiert; homozygote B6.XCR1:LacZ Mäuse wurden in dieser Arbeit v. a. als XCR1-defiziente Mäuse zur Kontrolle verwendet; hergestellt durch Deltagen, Inc., San Carlos, USA (unveröffentlicht); bezogen von Jackson Laboratories (Bar Harbor, USA)

CX3CR1^{GFP}, ein Mausstamm auf dem C57BL/6 Hintergrund, bei dem grün fluoreszierendes Protein (eGFP) unter der Kontrolle des endogenen CX3CR1-Promotors exprimiert wird (Jung

et al., 2000); zur Verfügung gestellt von M. Gunzer, Molekulare Immunologie, Universität Magdeburg, Magdeburg

Lang-EGFP, ein Mausstamm auf dem C57BL/6 Hintergrund, bei dem eGFP unter der Kontrolle des endogenen CD207-Promotors (Kissenpfennig *et al.*, 2005) exprimiert wird; zur Verfügung gestellt von P. Stoitzner, Universitätsklinik für Dermatologie und Venerologie, Innsbruck, Österreich

129/SvPasCrl, hier **129 WT** genannt; bezogen von Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA)

129/Sv.Batf3 KO, hier **Batf3 KO** genannt; ein Mausstamm auf 129/Sv Hintergrund, bei dem die Exons eins bis zwei des Transkriptionsfaktors *basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 3* (Batf3) deletiert sind und diese Tiere dadurch kein Batf3-Protein exprimieren (Hildner *et al.*, 2008); zur Verfügung gestellt von H.C. Probst, Institut für Immunologie, Universität Mainz, Mainz

2.2.2 Menschliche Proben

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

2.3 Tierexperimentelle Methoden

2.3.1 Adoptiver Transfer

Um antigenspezifische T-Zellen untersuchen zu können, wurden TZR-transgene OT-I-T-Zellen in syngene Mäuse transferiert. Dafür wurden Milzzellen aus B6.OT-I-Mäusen isoliert und die Frequenz der transgenen CD8⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Es wurden Milzzellen, die 2 x 10⁶ transgene CD8⁺ T-Zellen enthielten, in PBS intravenös (i.v.) in die Schwanzvene der Rezipienten-Mäuse injiziert. Zur Analyse der Zellproliferation wurden die OT-I-Zellen vor Injektion mit CFSE markiert (siehe Kap. 2.3.4).

2.3.2 Immunisierung

Die Immunisierung erfolgte bei adoptivem Transfer 18 h nach Injektion der transgenen Zellen. Je nach Experiment wurde Antigen mit und ohne Adjuvans (3 µg LPS oder 3 µg poly I:C (InvivoGen, San Diego, USA)) i.v. injiziert.

2.3.3 Serumpräparation

Zur Serumgewinnung wurde mit Isofluran anästhesierten Mäusen durch Punktion des retrobulbären Venenplexus mit einer 10 µl Kapillare (Hirschmann Laborgeräte GmbH, Eberstadt) Blut abgenommen. Dieses wurde 30 min bei 37 °C und anschließend bei 4 °C für 1 bis 3 h inkubiert. Nach erster Zentrifugation (1 000 g, 4 °C, 10 min) wurde der Überstand erneut bei 10 000 g, 4 °C für 10 min zentrifugiert, der Überstand (das Serum) in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -20 °C gelagert.

2.3.4 Proliferationsanalyse

Zur Analyse der Zellteilung antigenspezifischer Zellen wurden die OT-I-Zellen vor dem Transfer mit Carboxyfluorescein-Succinimidylester (CFSE; Molecular Probes, Eugene, USA) markiert. CFSE dringt in die Zellen ein, wo Esterasen die lipophilen Gruppen des Moleküls abspalten. Die Succinimidylgruppen werden kovalent an innere Zellmoleküle gebunden und der Farbstoff bleibt in der Zelle. Er wird bei der Zellteilung auf die Tochterzellen aufgeteilt, wodurch das CFSE-Signal schwächer wird. Mit CFSE können bis zu sieben Zellzyklen unterschieden werden (Lyons und Parish, 1994). Die Zellen wurden bei einer Zelldichte von 5×10^7 Zellen/ml mit 5 µM CFSE in PBS, 0,1 % BSA für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Färbung wurde durch mehrmaliges Waschen mit PBS, 0,1 % BSA gestoppt.

2.3.5 Zellaufnahmeassay

Um die Aufnahme von Zellen durch dendritische Zellen (DZ) zu bestimmen, wurden die entsprechenden Zellen mit CFSE markiert (siehe Kap. 2.3.4) und in Rezipienten-Mäuse i.v. injiziert. Nach 4 h und 12 h wurden die Milzen entnommen und das CFSE-Signal in den DZ durchflusszytometrisch analysiert.

2.3.6 Flt3-Ligand-Behandlung

Um DZ *in vivo* anzureichern, wurden Mäusen 1×10^6 Zellen der Flt3-Ligand exprimierenden Zelllinie B16.Flt3-Ligand subkutan injiziert. Nach 9 Tagen wurden die Mäuse getötet und die DZ aus den Milzen angereichert (siehe Kap. 2.4.6).

2.3.7 Tumorinduktion

Zur Induktion eines Tumors in Mäusen wurden 7 Tage nach Immunisierung $0,6 \times 10^6$ Zellen der EG.7-OVA Zelllinie subkutan (s.c.) in die Flanke injiziert. Gewachsene Tumore wurden an der Maus mit einem Messschieber vermessen. Nach Töten der Mäuse wurden die Tumore freigelegt und von Haut und Fett befreit.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Verwendete Reagenzien und Zelllinien

Tab. 2: Verwendete Puffer und Lösungen für zellbiologische Methoden

Bezeichnung	Zusammensetzung
ACK-Puffer	0,15 mM NH ₄ Cl, 10 mM KHCO ₃ , 0,1 mM Na ₂ EDTA, pH 7,2
FACS-PBS	PBS, 2,5 % FCS, 0,1 % NaN ₃
Fc-Block	20 µg/ml mAb 2.4G2 (anti-muCD16/32) in FACS-PBS
PBS	136,89 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 1,47 mM KH ₂ PO ₄ , 8,05 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,3
MACS-PBS	PBS, 0,5 % BSA (Fraktion V, Endotoxingehalt <1 EU/mg, PAA Laboratories, Cölbe)
R10F ⁻	RPMI 1640 (Biochrom AG, Berlin), 10 % FCS (Biochrom AG, Berlin), 2 mM Glutamin (Invitrogen, Darmstadt)
R10F ⁺	R10F ⁻ , 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin (Invitrogen, Darmstadt)
R10F ⁺ /β-ME	R10F ⁺ , 50 µM β-Mercaptoethanol
R10F ⁻ /β-ME	R10F ⁻ , 50 µM β-Mercaptoethanol

Das FCS wurde vor Verwendung hitzeinaktiviert (45 min bei 55 °C); FCS: Fötale Kälberserum (*fetal calf serum*)

Tab. 3: Verwendete Zelllinien und Kulturmedien

Zelllinie	Besonderheiten	Medium	Referenz
B16-Flt3L	B16-Melanomzellen, sezernieren Flt3-Ligand	R10F ⁺ /β-ME, 1 mM Natriumpyruvat, 1 mM nicht-essentielle Aminosäuren	Mach <i>et al.</i> , 2000
E.G7-OVA	EL-4-Tumorlinie, exprimieren OVA	R10F ⁺ /β-ME, 1 mM Natriumpyruvat, 0,5 mg/ml G418	ATCC: CRL-2113
P3x63Ag8.65	Myelomzellen	R10F ⁺ /β-ME	ATCC: CRL-1580

2.4.2 Zellkulturbedingungen

Die Kultivierung erfolgte in Zellkulturflaschen verschiedener Größe (25, 75 und 175 cm²) und in Zellkulturplatten (6-, 24- oder 96-*well*) in Begasungsbrutschränken mit gesättigter Wasserdampf-atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂.

2.4.3 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zahl primärer Zellen oder Zelllinien erfolgte mit dem Guava PCA (Guava Technologies, Hayward, USA). Die Zellen wurden in Viacount Reagenz (2,5 µg/ml LDS 751, 1 µg/ml Propidiumiodid, 5 mM EDTA, 0,05 % NaN₃, in PBS, pH 7,3) verdünnt und die Anzahl lebender, nukleärer Zellen durch die ViaCount Software (Guava Technologies, Hayward, USA) ermittelt.

2.4.4 Trypsinierung adhärenter Zelllinien

Zum Ablösen adhärenter Zelllinien wurde die Kulturflasche mit PBS gewaschen und mit 2 bis 5 ml PBS, 0,025 % Trypsin für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml Medium gestoppt und die Zellen zentrifugiert (380 g, 5 min, 22 °C). Die Zellen wurden in Medium aufgenommen und verwendet oder weiter kultiviert.

2.4.5 Präparation primärer Zellen

2.4.5.1 Isolierung von Zellen aus lymphatischen Organen

Milz und Thymus wurden zerkleinert und durch ein 70 µm Nylon-Zellsieb (BD Biosciences, Heidelberg) gedrückt. Erythrozyten der Milz wurden durch einminütige Inkubation in ACK-Puffer bei 22 °C lysiert. Die Lyse wurde mit PBS gestoppt und die Zellsuspension über ein 70 µm Nylon-Zellsieb gegeben. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (8 min, 380 g, 4 °C) und je nach weiterer Verwendung in MACS- oder FACS-PBS aufgenommen.

Lymphknoten wurden in kleine Stücke zerteilt und in 1 ml RPMI 1640, 2 % FCS, 0,5 mg/ml Collagenase D (Roche Applied Science, Mannheim), 20 µg/ml DNase I (Roche Applied Science, Mannheim) für 10 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde mit 10 mM EDTA gestoppt und das Gewebe durch ein 70 µm Nylon-Zellsieb gedrückt. Die Zellen wurden zentrifugiert (8 min, 380 g, 4 °C) und in FACS-PBS aufgenommen.

2.4.5.2 Präparation von Lungen

Lungen wurden mit PBS über die rechte Herzkammer perfundiert, um Zellen des Blutes zu entfernen. Anschließend wurden die Lungen von Lymphknoten und Fett befreit. Die Lungenflügel wurden in kleine Stücke zerteilt und in ein *GentleMACS*-Gefäß (C-Tubes; Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach) mit RPMI 1640, 2 % FCS, 20 µg/ml Liberase TM (Roche Applied Science, Mannheim), 20 µg/ml DNase I gegeben. Die Lungen wurden auf dem *GentleMACS* (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach) zerkleinert und daraufhin 30 min bei 37 °C unter Schütteln verdaut. Die Reaktion wurde mit 10 mM EDTA gestoppt und die Lungen weiter mit dem *GentleMACS* zerkleinert. Gewebestücke wurden über ein 70 µm Nylon-Zellsieb entfernt. Nach Zentrifugation (8 min, 380 g, 4 °C) wurden die Erythrozyten durch einminütige Inkubation mit ACK-Puffer bei 22 °C lysiert und die Zellsuspension erneut über ein 70 µm Nylon-Zellsieb gegeben. Die Zellen wurden zentrifugiert (8 min, 380 g, 4 °C) und in FACS-PBS aufgenommen.

2.4.5.3 Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC)

Zur Isolierung von PBMC wurden *buffy coats* oder Leukapheresepräparate verwendet. Ein *buffy coat* wurde in zwei 50 ml-Röhrchen überführt und zentrifugiert (400 g, 30 min, 18 °C, schwache Bremswirkung). Die Interphase wurde abgenommen und mit PBS auf 70 ml aufgefüllt. Es erfolgte eine Überschichtung von 15 ml *Biocoll Separating Solution* (Biochrom, Berlin; 1,077 g/ml) mit jeweils 35 ml der Zellsuspension und Zentrifugation (400 g, 30 min, 18 °C, schwache Bremswirkung). Die Interphase wurde abgenommen und die Zellen zweimal in PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in MACS-PBS aufgenommen.

2.4.6 Anreicherung von murinen dendritischen Zellen

Zur Anreicherung von murinen DZ aus Milzen wurden die Organe fein zerkleinert und in RPMI 1640, 2 % FCS mit 0,5 mg/ml Collagenase D und 20 µg/ml DNase I für 25 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde mit 10 mM EDTA gestoppt, das Gewebe durch ein 215 µm Zellsieb und anschließend durch ein 70 µm Nylon-Zellsieb gedrückt. Nach anschließender Zentrifugation (380 g, 5 min, 4 °C) wurden maximal 5×10^8 isolierte Milzzellen in 10 ml Nycodenz-Lösung mit einer Dichte von 1,073 g/ml (9,4 ml Nycoprep, 1,077 g/ml, Axis Shield, Heidelberg und 0,6 ml PBS, 1,01 g/ml, PAA, Cölbe) aufgenommen. Mit der Zellsuspension wurden 5 ml der gleichen Nycodenz-Lösung in einem 50 ml-Röhrchen überschichtet. Zusätzlich wurde mit 4 ml R10F⁺ überschichtet und ungebremst zentrifugiert (10 min, 4 °C, 1700 g). Die Interphase wurde abgenommen,

zweimal mit MACS-PBS gewaschen und für 8 min bei 380 g und 4 °C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in MACS-PBS aufgenommen.

2.4.7 Magnetische Zellsortierung muriner dendritische Zellen

Zur weiteren Anreicherung muriner DZ wurden diese magnetisch sortiert. Bei der magnetischen Zellsortierung (MACS) werden Zellen anhand von Antikörpern, die an paramagnetische Partikel gekoppelt sind, in einem magnetischen Feld von unmarkierten Zellen getrennt (Miltenyi *et al.*, 1990). Zur Anreicherung von DZ wurden nach der Dichtegradientenzentrifugation (siehe Kap. 2.4.6) 2×10^8 Zellen/ml zuerst mit Fc-Block inkubiert, um unspezifische Antikörperbindung an Fc-Rezeptoren zu blockieren, und anschließend mit anti-CD11c-magnetischen Partikeln (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach) 15 min bei 4 °C inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit MACS-PBS gewaschen und zentrifugiert (4 °C, 380 g, 8 min). Die Zellen wurden in MACS-PBS aufgenommen und über LS-Säulen (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach) im Magneten (MidiMACS, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach) gegeben. Die Säulen wurden dreimal mit MACS-PBS gewaschen. Nach Entfernen der Säule aus dem magnetischen Feld, wurden die CD11c⁺ Zellen mit MACS-PBS eluiert. Die Reinheit der CD11c⁺ DZ betrug nach der magnetischen Sortierung 75-80 %.

2.4.8 Sortierung humaner dendritischer Zellen

Für funktionelle Analysen wurden jeweils alle DZ-Populationen aus dem Blut desselben Spenders isoliert. Eine Voranreicherung erfolgte durch Verwendung von Kits zur magnetischen Zellsortierung (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach) nach Angaben des Herstellers (Tab. 4). Die Anreicherung von CD1c⁺ DZ basierte auf einer Entfernung von CD1c⁺ B-Zellen und der anschließenden positiven Sortierung von DZ mit dem Oberflächenmolekül CD1c. CD16⁺ DZ wurden durch Entfernung der CD15⁺CD16⁺ Granulozyten sowie der CD16⁺CD56⁺ NK-Zellen und positiver Sortierung mittels des Oberflächenmoleküls CD16 angereichert. Eine Aufreinigung von CD141⁺ DZ erfolgte durch direkte positive Sortierung mittels anti-CD141-gekoppelter paramagnetischer Partikel. Zur Anreicherung von plasmazytoiden DZ (pDZ) wurde ein Kit verwendet, welches nicht-pDZ aus der Zellsuspension abreicherte. Im Anschluss an die Voranreicherung erfolgte eine durchflusszytometrische Sortierung aller Populationen anhand spezifischer Oberflächenmoleküle unter Ausschluss von linienspezifischen Molekülen (Lin: CD56, CD14, CD3, CD19) und CD141, sofern es sich nicht um CD141⁺ DZ handelte.

Tab. 4: Anreicherung verschiedener Subtypen dendritischer Zellen aus PBMC

Zellpopulation	Voranreicherung durch magnetische Sortierung (Kits von Miltenyi)	Oberflächenmoleküle für die durchflusszytometrische Sortierung
CD1c⁺ DZ	CD1c (BDCA-1) ⁺ Dendritic Cell Isolation Kit	CD1c, CD11c, HLA-DR
CD16⁺ DZ	CD16 ⁺ Monocyte Isolation Kit	CD11c, CD16, HLA-DR
CD141⁺ DZ	CD141 (BDCA-3) MicroBead Kit	CD11c, CD141, HLA-DR
pDZ	Plasmacytoid Dendritic Cell Isolation Kit	CD304, HLA-DR

Einige humane Zellpopulationen benötigten keine Voranreicherung durch magnetische Sortierung und wurden direkt aus Vollblut nach Erythrozytenlyse oder PBMC durchflusszytometrisch sortiert. Die verwendeten Oberflächenmoleküle sind in Tab. 5 aufgeführt. Anschließend wurde die Reinheit der jeweils sortierten Population durchflusszytometrisch ermittelt.

Tab. 5: Strategien zur durchflusszytometrischen Sortierung verschiedener Zellpopulationen aus humanem Blut

Zellpopulation	Vorbereitung	Spezifische Oberflächenmoleküle	Ausgeschlossene Oberflächenmoleküle
T-Zellen	Dichtegradientenzentrifugation	CD3	CD19, CD141
B-Zellen	Dichtegradientenzentrifugation	CD19, HLA-DR	CD3, CD141
NK-Zellen	Dichtegradientenzentrifugation	CD16, CD56	CD3, CD141, HLA-DR
Monozyten	Dichtegradientenzentrifugation	CD14, CD16	CD3, CD19, CD141
Granulozyten	Erythrozytenlyse	CD15, CD45	CD3, CD14, CD19, CD141

2.4.9 Hitzeschockbehandlung von Milzzellen und Bindung von XCL1

Für die Bindung von XCL1 an nekrotische Zellen wurden Milzzellen isoliert und anschließend einem Hitzeschock unterzogen. Dazu wurde eine Zellsuspension aus 2×10^6 Zellen/ml in Zellkulturflaschen für 30 min bei 56 °C im Wasserbad unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen über Nacht bei 37 °C in PBS und 1 h vor Analyse bzw. Verwendung mit 1 µg/ml XCL1 inkubiert. Die Bindung von XCL1 wurde mit einem Anti-XCL1-Antikörper (MTAC-311) durchflusszytometrisch bestimmt.

2.4.10 Chemotaxis im Transwell-System

Die funktionelle Testung der chemotaktischen Wirkung von XCL1 erfolgte in einem Transwell-Assay. Dieser beruht auf der Diffusion von Chemokinen in der löslichen Phase und einem daraus resultierendem Gradienten. Zellen, die den entsprechenden Chemokinrezeptor tragen, migrieren in Richtung des steigenden Chemokingradienten durch eine Membran in den unteren Teil der Transwell-Kammer (Ponath *et al.*, 2000). Für den Assay wurden Transwell-Einsätze mit Polycarbonat-Membranen mit 5 µm großen Poren verwendet (Corning Inc., Corning, USA). Die Chemokine (R&D Systems, Minneapolis, USA; XCL1 aus laboreigener Herstellung) wurden in Chemotaxis-Medium (RPMI 1640, 1 % BSA, 50 µM β-ME, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin) verdünnt und 600 µl in die Vertiefung der Zellkulturplatte gegeben. 0,1 bis 1 x 10⁶ Zellen wurden in 100 µl Chemotaxis-Medium in die Transwell-Einsätze gegeben. Die Zellen wurden in den Transwell-Platten 2,5 h bei 37 °C im Begasungsbrutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Membranen von unten vorsichtig abgespült, um noch daran hängende Zellen nicht zu verlieren. Für die Analyse am Durchflusszytometer wurden die Zellen für mindestens 20 min mit Fc-Block und fluorophorgekoppelten monoklonalen Antikörpern (mAk) inkubiert. Die Analyse erfolgte für 5 min bei gleicher Flussgeschwindigkeit für alle Proben. Zur Berechnung der prozentualen Migration wurde die Zahl der gewanderten und der eingesetzten Zellen ins Verhältnis gesetzt (Prozentuale Migration = Anzahl gewanderter Zellen/Anzahl eingesetzter Zellen x 100).

2.5 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich, die Expression von Oberflächenmolekülen auf Einzelzellebene zu untersuchen (Radbruch *et al.*, 2000). Dazu werden fluorophorgekoppelte Antikörper gegen spezifische Oberflächenmoleküle mit Zellsuspensionen inkubiert und können in einem Durchflusszytometer analysiert werden.

2.5.1 Fluorophore

Zur Anfärbung von zellspezifischen Markern wurden fluorophorgekoppelte mAk verwendet. Analyse und Zellsortierung erfolgten mit den Durchflusszytometern LSR II (BD Biosciences, Heidelberg) oder FACSAria II (BD Biosciences, Heidelberg). Die verwendeten Fluorochrome und Detektionsfilter sind in Tab. 6 zusammengefasst.

Tab. 6: Optische Eigenschaften der genutzten Fluorophore und Analysebedingungen am Durchflusszytometer

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

Angabe der Wellenlänge der Laser zur Anregung der Fluorophore sowie der zur Detektion im jeweiligen Durchflusszytometer (LSRII und FACSAria II) verwendeten Filter. BP = Bandpassfilter. Emissionsmaxima wurden zusammengestellt mit Daten von BD und Molecular Probes.

2.5.2 Monoklonale Antikörper

Für die Analyse von Oberflächenmolekülen wurden verschiedene mAk genutzt (Tab. 7 und Tab. 8), welche an verschiedene Fluorophore bzw. Biotin oder Digoxigenin gekoppelt waren.

Tab. 7: Verwendete monoklonale Antikörper gegen humane Zielmoleküle

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

Hybridom: laboreigene Hybridome, Antikörper wurden aus ihrem Kulturüberstand aufgereinigt; ATCC: American Type Culture Collection; ECACC: European Collection of Cell Cultures

Tab. 8: Verwendete monoklonale Antikörper gegen murine Zielmoleküle

Antigenspezifität	Klonbezeichnung	Quelle	Referenz/Hersteller
CD3	KT3	Hybridom	Tomonari <i>et al.</i> , 1988
CD4	YTS 191.1	Hybridom	ECACC:87072282
CD4	GK1.5	Hybridom	ATCC: TIB 207
CD8	53-6.72	Hybridom	ATCC: TIB 105
CD11b	5c6	Hybridom	ATCC: CRL-1969
CD11c	N418	Hybridom	ATCC: HB-224
CD19	1D3	Hybridom	ATCC: HB-305
CD25	2E4	Hybridom	Ortega <i>et al.</i> , 1984
CD45	30-F11	kommerziell	BioLegend
CD45	M1/9.3	Hybridom	ATCC: TIB-122
CD45R (B220)	RA3-6B2	Hybridom	Coffman <i>et al.</i> , 1982
CD69	H1.2F3	kommerziell	BioLegend
CD80	16-10A1	Hybridom	Razi-Wolf <i>et al.</i> , 1994
CD86	GL1	Hybridom	Freeman <i>et al.</i> , 1993
CD90.1	OX-7	Hybridom	ECACC: 84112008
CD103	M290	kommerziell	BD Biosciences
CD137 (4-1BB)	17B5	kommerziell	BioLegend
CD254 (RANK-L)	IK22/5	kommerziell	BioLegend
CD317	eBio927	kommerziell	eBioscience
F4/80	BM8	kommerziell	eBioscience
I-A/I-E (MHCII)	M5/114.15.2	Hybridom	ATCC: TIB 120
ICOS	MIC280	Hybridom	Löhning <i>et al.</i> , 2003
IFN- γ	AN18.17.24	Hybridom	Prat <i>et al.</i> , 1984
Ly6G/C	RB6-8c5	Hybridom	Fleming <i>et al.</i> , 1993
NK1.1	PK136	Hybridom	Koo <i>et al.</i> , 1984
NKp46	29A1.4	kommerziell	eBioscience
PD-1	J43	kommerziell	eBioscience
PD-L1	MIH5	kommerziell	eBioscience
PD-L2	TY25	kommerziell	eBioscience
$\gamma\delta$ -TZR	GL3	kommerziell	eBioscience
V α 2-TZR	B20.1	kommerziell	eBioscience
V β 5-TZR	MR9-4	kommerziell	BD Biosciences
XCL1	MTAC-311	Hybridom	unveröffentlicht (Dr. C. Opitz)
XCR1	MARX10	Hybridom	diese Arbeit / Bachem <i>et al.</i> , 2012

Hybridom: laboreigene Hybridome, Antikörper wurden aus ihrem Kulturüberstand aufgereinigt; ATCC: American Type Culture Collection; ECACC: European Collection of Cell Cultures; TZR: T-Zellrezeptor

2.5.3 Färbung von Oberflächenantigenen

Zur durchflusszytometrischen Analyse wurden bis zu $2,5 \times 10^6$ Zellen pro Vertiefung in einer 96-well-Rundbodenplatten für 5 min auf Eis mit Fc-Block im Fall von murinen Zellen und mit 2 mg/ml Endobulin (Baxter Hyland-Immuno Division, Deerfield, USA) im Fall von humanen Zellen in FACS-PBS inkubiert. Dadurch wurden unspezifische Antikörperbindungen an Fc-Rezeptoren minimiert. Danach wurden die Zellen mit fluorophorgekoppelten Antikörpern in FACS-PBS für 20 min auf Eis inkubiert und anschließend mit FACS-PBS gewaschen.

Neben direkt an Fluorophore gekoppelten Antikörpern wurden auch Biotin- und Digoxigenin (Dig)-gekoppelte mAk verwendet. Die Detektion der Biotin- bzw. Dig-gekoppelten Primärantikörper erfolgte mit fluorophorgekoppeltem Streptavidin bzw. Anti-Dig-Antikörpern für 5 bzw. 20 min auf Eis.

Zum Nachweis von XCR1 auf der Zelloberfläche wurden $0,1 \mu\text{g/ml}$ des *Tag*-konjugierten Liganden XCL1 (*XCL1-Tag*; exprimiert von Dr. Hans-Werner Mages) mit $7,5 \mu\text{g/ml}$ eines fluorophorgekoppeltem Sekundärreagenz (IBA, Göttingen) in MACS-PBS für 20 min auf Eis vorinkubiert und dann zusammen mit den fluorophorgekoppelten Antikörpern zur Färbung eingesetzt.

Da tote Zellen unspezifisch Antikörper binden, erfolgte eine Detektion dieser Zellen durch den DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffe DAPI (4',6'-Diamidino-2-Phenylindol; $0,33 \mu\text{g/ml}$; Roche Applied Science, Mannheim). Das Eindringen des Farbstoffes in lebende Zellen wird durch die Zellmembran verhindert. Tote Zellen hingegen verlieren ihre Membranintegrität und sind in der Analyse als DAPI⁺ erkennbar.

2.5.4 Intrazelluläre Färbung von Molekülen

Zum intrazellulären Anreichern von Chemokinen oder Zytokinen wurden 2×10^6 Zellen für 3 h in Brefeldin A ($5 \mu\text{g/ml}$) in R10F⁺/β-ME bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden sie durch Zentrifugation geerntet und Oberflächenmoleküle angefärbt (siehe Kap 2.5.3). Daraufhin wurden die Zellen mit einem fixierbaren Lebend-Tot-Farbstoff gefärbt, um in der Analyse tote Zellen nach Fixierung immer noch unterscheiden zu können. Dazu wurden die Zellen mit Pacific Orange (PacO, Invitrogen, Darmstadt) für 20 min auf Eis inkubiert. Sie wurden erneut mit PBS gewaschen. Zur Fixierung wurden die Zellen in 2 % Formaldehyd aufgenommen und darin 20 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Zellen wurden mit

FACS-PBS gewaschen. Anschließend wurden sie einmal in Saponin-Puffer (0,5 % Saponin in FACS-PBS) gewaschen. Die Färbung der intrazellulären Moleküle erfolgte in Saponin-Puffer mit Fc-Block und den fluorophorgekoppelten Antikörpern für 20 min bei RT. Nach Waschen mit Saponin-Puffer wurden die Zellen in FACS-PBS für die Analyse im Durchflusszytometer aufgenommen.

2.5.5 FDG-Färbung

In B6.XCR1:LacZ wird unter Kontrolle des XCR1-Promotors das LacZ-Gen exprimiert. Die dadurch in den XCR1⁺ Zellen exprimierte β -Galaktosidase kann das Substrat Fluorescein-di- β -D-Galactopyranosid durch Hydrolyse in Fluorescein umsetzen. Somit können die normalerweise XCR1-exprimierenden Zellen in der Durchflusszytometrie detektiert werden. Für die Färbung wurden Milzzellen in FDG-Färbemedium (PBS, 4 % FCS, 10 mM HEPES, pH 7,2) bei 37 °C erwärmt, 2 mM vorgewärmtes FDG dazugegeben (Endkonzentration: 1 mM) und 1 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Auffüllen mit eiskaltem FDG-Färbemedium gestoppt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und für die weitere Oberflächenfärbung in FACS-PBS aufgenommen.

2.5.6 Apoptosefärbung

Zur Unterscheidung von Apoptosestadien wurden die Zellen mit AnnexinV und DAPI gefärbt. AnnexinV bindet an Phosphatidylserine, welche nach Eintritt einer Zelle in die Apoptose von der Innen- auf die Außenseite der Zellmembran translozieren. In der frühen Apoptose ist die Membran noch soweit intakt, dass die frühapoptotischen Zellen als AnnexinV⁺DAPI identifiziert werden können. In der späten Apoptose bzw. bei einer Nekrose verlieren die Zellen ihre Membranintegrität und werden daher auch mit DAPI gefärbt (AnnexinV⁺DAPI⁺). Da die Bindung von AnnexinV Ca²⁺-abhängig ist, wurden die Zellen nach der Oberflächenfärbung (siehe Kap. 2.5.3) in Annexin-Puffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂, 1 % NaN₃) aufgenommen und für 15 min bei RT mit AnnexinV-Cy5 (BD Pharmingen, San Diego, USA) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Annexin-Puffer gewaschen und für die Analyse am Durchflusszytometer in Annexin-Puffer aufgenommen. Direkt vor der Messung wurde DAPI zu den Proben hinzugegeben.

2.5.7 Durchflusszytometrische Messung und Sortierung

Zur Analyse wurden die Zellpopulationen am Durchflusszytometer LSR II gemessen. Zur durchflusszytometrischen Sortierung von Zellpopulationen wurde ein Ein- und Ausgrenzungsschema am FACSAria II erstellt, um die Zellen entsprechend der gewünschten Oberflächenmoleküle zu sortieren. Zur Auswertung der Daten wurde die Software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, USA) verwendet. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Histogramm, *Dot Plot* oder in Falschfarben, wobei die Zahlen den prozentualen Anteil der in den Eingrenzungen enthaltenen Zellen angeben. Die ersten Schritte jeder Analyse sind in Abb. 2 dargestellt und werden in späteren Abbildungen nicht mehr gezeigt. Zuerst wurden Zelltrümmer anhand ihrer Größe und Granularität im Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsscatter (SSC) ausgeschlossen. Danach folgte der Ausschluss von Dubletten anhand der Höhe und Fläche der Zellen im FSC und SSC. Tote Zellen wurden durch DAPI-Färbung und autofluoreszente Zellen im PacB und PacO-Detektor ausgeschlossen.

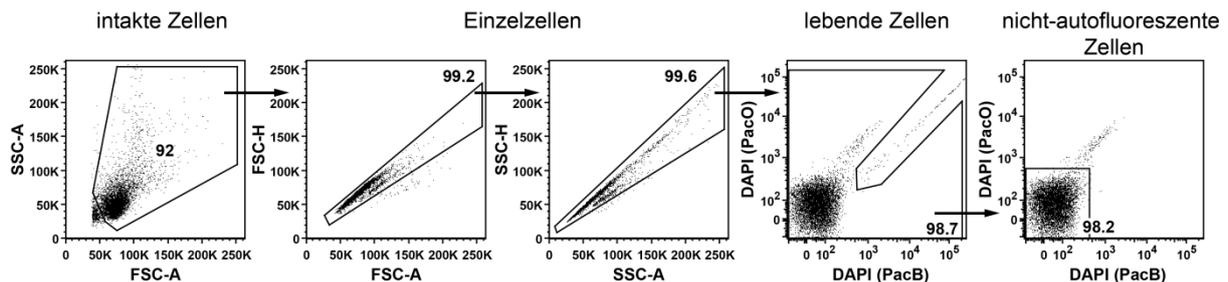


Abb. 2: Durchflusszytometrische Analyse

Im Durchflusszytometer gemessene Zellen wurden im Vorwärts (FSC)- und Seitwärts-scatter (SSC) eingegrenzt und damit Zelltrümmer ausgeschlossen. Anschließend wurden Zelldubletten, deren Größe bezüglich der Höhe (-H) und Fläche (-A) der Seitwärts- und Vorwärts-scatter-Signale nicht proportional zunahm, ausgegrenzt. Außerdem wurden tote Zellen (DAPI⁺) und autofluoreszente Zellen ausgeschlossen. DAPI und Autofluoreszenz wurden sowohl über die Detektoren für PacB (*Pacific Blue*) als auch PacO (*Pacific Orange*) detektiert.

2.6 Histologie

2.6.1 Präparation von Milzen und Anfertigung von Kryostatschnitten

Entnommene Milzen wurden in 0,9 % NaCl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert. Von den Milzen wurden 12 µm Gefrierschnitte angefertigt und auf mit 2 % Aminopropyltriethoxysilan-beschichtete Objektträger übertragen. Die Schnitte wurden

über Nacht bei RT getrocknet und anschließend mit Azeton für 10 min bei RT fixiert. Nach dem Trocknen wurden sie entweder direkt gefärbt oder bei -70 °C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Schnitte erneut mit Azeton fixiert.

2.6.2 Immunfluoreszenz

Da die Immunfärbung über eine Peroxidase (POD) vermittelt wird, ist es nötig, vor der Färbung im Gewebe enthaltene endogene POD zu blockieren. Dazu wurden die Schnitte für 1 h bei 37 °C in POD-Blockierlösung (1 mM NaN_3 , 10 mM Glukose, 1 U/ml Glukoseoxidase in PBS) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte in PBS gewaschen. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten in Feuchtekammern, um ein Austrocknen der Schnitte während längerer Inkubationszeiten zu verhindern. Die Schnitte wurden für 1 h mit Casein (Vector Laboratories, Burlingame, USA) und Fc-Block inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen zu sättigen. Anschließend wurden die Schnitte mit fluorophorgekoppelten Antikörpern und Biotin-gekoppeltem Anti-XCR1-Antikörper für 1 h bei RT inkubiert und anschließend zweimal mit PBS, 0,05 % Tween20 und einmal mit PBS gewaschen. Für die Detektion des XCR1-Signals musste dieses über eine Tyramidreaktion verstärkt werden. Dazu wurden die Schnitte mit Streptavidin-POD für 1 h bei RT inkubiert. Bei der Tyramidreaktion wird fluorophorgekoppeltes Tyramid durch die POD in hochreaktive kurzlebige Tyamidradikale umgesetzt. Diese binden kovalent an nukleophile Reste in der Umgebung des Zielantigens und bewirken damit eine dichte Besetzung der Zielzelle mit Fluorophoren. Für die Reaktion wurden die Schnitte mit fluorophorgekoppeltem Tyramid in Amplifizierungspuffer inkubiert (TSA-Kit, Molecular Probes, Eugene, USA). Nach anschließendem Waschen wurden die Zellkerne mit 100 ng/ml DAPI gefärbt. Die Schnitte wurden mit Fluoromount und einem Deckglas eingedeckt. Um ein schnelles Austrocknen zu verhindern, wurden sie mit Lack versiegelt. Die Gewebeschnitte wurden mit dem LSM 780 (Carl Zeiss, Jena) untersucht und mit dem Programm Zen2009 (Carl Zeiss, Jena) ausgewertet.

2.7 Generierung eines monoklonalen XCR1-spezifischen Antikörpers

2.7.1 Immunisierung

Für die Immunisierung wurden XCR1-defiziente B6.XCR1:LacZ als Rezipienten verwendet. In diesen ist XCR1 ein körperfremdes Protein, gegen welches eine Immunreaktion ausgelöst werden kann. Die Mäuse wurden mit angereicherten murinen DZ (siehe Kap. 2.4.6), welche

aus Flt3-Ligand-behandelten Mäusen (siehe Kap. 2.3.6) isoliert wurden, immunisiert. Den Mäusen wurden jeweils 40×10^6 Zellen i.p. injiziert. Um eine Entzündungsreaktion auszulösen, wurden verschiedene Adjuvanzien zusammen mit den Zellen injiziert. Einigen Mäusen wurden DZ, die in Freund's Adjuvans (FA) aufgenommen waren, injiziert. Anderen Mäusen wurden die DZ lokal getrennt von FA injiziert. Außerdem wurde einer Gruppe DZ zusammen mit 1×10^9 CFU hitzeinaktivierter *Bordetella pertussis* (Chiron Behring, Marburg) injiziert. Nach der ersten Immunisierung wurden die Mäuse viermal im Abstand von vier Wochen immunisiert, um eine Verstärkung der Immunantwort und dadurch hochaffine Antikörper zu erhalten. Bei den wiederholten Immunisierungen wurde statt komplettem FA inkomplettes FA verwendet. Eine Übersicht über die Immunisierungen ist in Tab. 9 gezeigt. Nach der vierten Immunisierung wurde den Mäusen Blut abgenommen und das Serum auf XCR1-Antikörper in der Durchflusszytometrie getestet. An den drei Tagen vor der Entnahme der Milzen wurden die Mäuse jeden Tag i.p. mit den jeweiligen Adjuvanzien bzw. am letzten Tag ohne Adjuvanz immunisiert (nicht in der Tabelle aufgeführt).

Tab. 9: Immunisierungsstrategien zur Generierung eines XCR1-spezifischen monoklonalen Antikörpers

Antigen	Volumen	Injektion	Zahl der Immunisierungen
40 x 10 ⁶ DZ in CFA/IFA	150 µl	i.p.	5
40 x 10 ⁶ DZ getrennt von CFA/IFA	50 µl Zellen, 150 µl CFA/IFA (1:1 in PBS)	i.p. (2x, verschiedene Seiten)	5
40 x 10 ⁶ DZ + <i>B. pertussis</i>	150 µl	i.p.	5

CFA: komplettes Freund's Adjuvans; IFA: inkomplettes Freund's Adjuvans

2.7.2 Fusion

Zur Gewinnung XCR1-spezifischer Antikörper wurde die Hybridomtechnik nach Köhler und Milstein (1975) verwendet. Die Milzen der immunisierten Mäuse wurden steril entnommen, Milzzellen isoliert (siehe Kap. 2.4.5.1) und diese in R10F⁻/β-ME resuspendiert. Die Myelomzellen P3x63Ag8.653 wurden parallel dazu zweimal mit R10F⁻/β-ME gewaschen und anschließend in R10F⁻/β-ME aufgenommen. Die Milzzellen wurden mit den Myelomzellen im Verhältnis 2:1 gemischt und zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml Polyethylenglykol (PEG 1500, Roche Applied Science, Mannheim) durch Inkubation für 1-2 min fusioniert. Daraufhin wurde das PEG langsam mit 4 ml RPMI 1640 verdünnt. Es

wurden weitere 10 ml RPMI hinzugegeben und die Zellen für 5 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in R10F⁻/β-ME und bei 37 °C gelagert. Für die Kultivierung wurden die Hybridomzellen mit Thymozyten aus Balb/c Mäusen (Isolierung siehe Kap. 2.4.5.1) als Feeder-Zellen gemischt und in Selektionsmedium (RPMI 1640, 20 % FCS, 50 μM β-ME, 500 U/ml IL-6 (Invitrogen, Darmstadt), 1x Azaserin-Hypoxanthin) aufgenommen. Es wurden jeweils 2 x 10⁴ Zellen in 200 μl auf 96-well-Flachbodenplatten verteilt und im Brutschrank inkubiert.

2.7.3 Screening der Hybridome

Nach frühestens zehn Tagen wurden die Überstände angewachsener Hybridome auf XCR1-spezifische Antikörper in der Durchflusszytometrie getestet. Dazu wurden über Dichtegradientenzentrifugation angereicherte DZ mit Überständen dieser Hybridome gefärbt. Die Antikörper wurden mit Anti-Maus-Cy5 (Fcγ-spezifisch, Dianova, Hamburg) nachgewiesen. Positiv-getestete Hybridome wurden einem Spezifitätsscreening unterzogen. Dazu wurden erneut Überstände abgenommen und angereicherte DZ aus C57BL/6 und B6.XCR1:LacZ Mäusen damit gefärbt. Nur Hybridome, die eine spezifische Färbung auf XCR1⁺ DZ zeigten, wurden weiter kultiviert.

2.7.4 Subklonierung der Hybridome

Die positiven Hybridome wurden durch limitierende Verdünnung subkloniert. So wurde sichergestellt, dass das Hybridom nur jeweils einem Klon entstammte. Die Zellen wurden in RPMI 1640, 20 % FCS, 50 μM β-ME, 5 U/ml IL-6, 100 μg/ml Penicillin/Streptomycin so verdünnt, dass statistisch in jede Vertiefung einer 96-well-Flachbodenplatte 30 Zellen gelangten. Von dieser Zellsuspension wurden vier weitere 1:3-Verdünnungen hergestellt. Alle Verdünnungen wurden jeweils auf eine 96-well-Flachbodenplatte verteilt. Die Platten, in denen nach einer Woche weniger als 20 Klone gewachsen waren, wurden für die Analyse herangezogen. Die Überstände wurden auf angereicherten DZ auf XCR1-spezifische Färbung durchflusszytometrisch untersucht. Positive Klone wurden weiter kultiviert, sukzessive IL-6 aus der Kultur entfernt und FCS auf 10 % reduziert.

2.7.5 Reinigung des monoklonalen Antikörpers

Für die Reinigung der mAk wurden die Hybridome bis zu einem Volumen von 1,5 l in Rollerflaschen kultiviert in RPMI 1640, 10 % Protein-G-gereinigtem FCS, 50 μM β-ME, 100 μg/ml Penicillin/Streptomycin. Die Überstände der ausgewachsenen Kulturen wurden

durch zweimaliges Zentrifugieren (15 min, 1 000 g und 15 min, 14 000 g) und anschließendem Filtrieren (0,2 μm Filter, Steritop, Millipore, Bedford, USA) gewonnen. Die Reinigung des Antikörpers erfolgte über GammaBind Plus Sepharose (GE Healthcare, Freiburg). Hierbei handelt es sich um ein an Sepharose gebundenes Protein G zur besseren Bindung von IgG. Der Zellkulturüberstand wurde über die Säule gegeben und anschließend wurde mit PBS gewaschen. Der gebundene mAk wurde mit 100 mM Glycin (pH 2,7) eluiert. Durch Zugabe von 1 M Tris (pH 9,0) wurde das Eluat neutralisiert. Es wurde anschließend gegen PBS dialysiert und sterilfiltriert.

2.8 Kopplung eines monoklonalen Antikörpers an Ovalbumin

Für die Kopplung von OVA an einen mAk wird zuerst OVA durch das bifunktionale Kreuzvernetzungsagens SMCC (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) derivatisiert. SMCC reagiert mit den primären Aminogruppen von OVA. Parallel werden die Disulfidbrücken des Antikörpers durch MESNA reduziert, wodurch freie Sulfhydrylgruppen entstehen. Diese können mit der Maleinimid-Gruppe von SMCC reagieren. Somit kann das aktivierte OVA mit dem reduzierten Antikörper eine kovalente Bindung eingehen.

OVA wurde in Kopplungspuffer (50 mM NaCl, 4 mM Na_2HPO_4 , 1 mM EDTA, pH 7,0) aufgenommen, SMCC (350 mM) dazugegeben und für 2 h bei RT inkubiert. Zur Reduktion des Antikörpers wurde dieser in 100 mM MESNA aufgenommen und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Freies MESNA und SMCC wurden jeweils über eine PD10-Säule (GE Healthcare, Freiburg) entfernt. Die Antikörper-Lösung wurde tropfenweise zu dem SMCC-gekoppelten OVA hinzugegeben und die Lösung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit 20 μM β -ME gestoppt. Freie Sulfhydrylgruppen wurden mit 50 μM N-Ethylmaleinimid gesättigt. Das Konjugat wurde erneut über eine PD10-Säule gegeben. Um ungekoppeltes OVA zu entfernen, wurde das Antikörper-OVA-Konjugat über ProteinG-Partikel (GammaBind Sepharose) gebunden (4 °C, über Nacht). Die Partikel wurden zweimal mit PBS gewaschen und bei 15 000 g für 1 min zentrifugiert. Die Elution des Antikörper-OVA-Konjugats erfolgte durch Inkubation der Partikel mit 0,1 M Glycin (pH 2,7) für 3 min und anschließender Zentrifugation (15 000 g, 1 min). Der Überstand wurde gesammelt und mit 150 mM Tris/HCl stabilisiert. Das Konjugat wurde anschließend gegen PBS dialysiert und sterilfiltriert.

2.9 Blockadeuntersuchung des XCR1-spezifischen Antikörpers

Zum Testen, ob ein XCR1-spezifischer Antikörper die Bindung von XCL1 an XCR1 oder XCL1 die Antikörperfärbung blockiert, wurden Milzzellen mit verschiedenen Mengen Anti-XCR1-Antikörper oder XCL1 für 20 min auf Eis inkubiert und nicht gewaschen. Die Zellen wurden daraufhin mit XCL1-Färbereagenz oder fluorophorgekoppeltem Anti-XCR1-Antikörper gefärbt (20 min auf Eis) und durchflusszytometrisch analysiert.

2.10 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

2.10.1 Isotypbestimmung der monoklonalen Antikörper

Für die Isotypbestimmung der generierten mAk mittels ELISA wurden 96er Mikrotiterplatten mit Ziege-anti-Maus-Ig (Southern Biotech, Birmingham, USA) in PBS über Nacht bei 4 °C beschichtet. Freie Bindungsstellen wurden mit 1 % BSA in PBS abgesättigt (1 h Inkubation bei RT). Anschließend wurden jeweils 0,25 mg/ml und zwei 1:5 Verdünnungen der mAk auf die Platten gegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Platten wurden 1 h bei 37 °C mit POD-gekoppelte Antikörpern gegen die verschiedenen murinen Immunglobulin-Subklassen (Gesamt-Immunglobuline (Ig), IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3) (Southern Biotech, Birmingham, USA)) inkubiert. Die Entwicklung erfolgte mit 100 µl TMB-Lösung (1 Tablette 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin gelöst in 0,1 M Na₂HPO₄, 0,05 M Zitronensäure, pH 5, 0,006 % H₂O₂) für 2 bis 10 min bei RT und wurde mit 100 µl 1 M H₂SO₄ abgestoppt. Die Vermessung der Platten erfolgte mit dem Mikroplattenlesegerät Infinite M200Pro (Tecan Group Ltd, Männedorf, Schweiz).

2.10.2 Detektion OVA-spezifischer Antikörper

Zum Nachweis OVA-spezifischer Antikörper wurden 96er Mikrotiterplatten mit 100 µg/ml OVA in PBS über Nacht bei 4 °C beschichtet. Freie Bindungsstellen wurden mit PBS, 1 % BSA für 1 h bei RT abgesättigt. Daraufhin folgte eine einstündige Inkubation mit den in PBS, 1 % BSA verdünnten Serumproben. Die OVA-spezifischen Antikörper wurden mit POD-gekoppelten Antikörpern gegen murines Gesamt-Ig detektiert. Die Farbreaktion erfolgte wie unter Kap. 2.10.1 beschrieben.

2.11 Statistische Analysen

Alle statistischen Analysen erfolgten mit der Prism Software (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA). Die Berechnung der Signifikanz der Unterschiede zwischen zwei Gruppen erfolgte mit dem t-Test. Ein p-Wert von $<0,5$ wurde für signifikant befunden (* $p<0,5$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; ns = nicht signifikant).

3 Ergebnisse

3.1 Generierung und Charakterisierung eines XCR1-spezifischen monoklonalen Antikörpers

3.1.1 Generierung eines Hybridoms, das einen XCR1-spezifischen Antikörper (MARX10) sezerniert

Da bisher kein monoklonaler Antikörper (mAk) gegen den murinen Chemokinrezeptor XCR1 vorhanden war, sollte zu Beginn dieser Arbeit ein solcher generiert werden. Dafür sollte die folgende Strategie verwendet werden: Als Antigen sollten primäre dendritische Zellen (DZ) dienen, die XCR1 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Der Anteil XCR1⁺ DZ an gesamten Milzzellen in C57BL/6 beträgt nur ca. 0,3 %. Um eine hohe Antigendichte für eine Immunisierung einzusetzen, mussten die XCR1⁺ DZ möglichst stark angereichert werden. Es ist bekannt, dass die Applikation von Flt3-Ligand zur Expansion konventioneller DZ führt (Maraskovsky *et al.*, 1996). Daher wurde C57BL/6 eine Flt3-Ligand exprimierende Zelllinie injiziert und nach 9 Tagen wurden die Milzen entnommen. Durch die Behandlung mit Flt3-Ligand wurden mehrere Zellpopulationen vermehrt. Der Anteil der XCR1⁺ DZ stieg auf ca. 9 % der gesamten lebenden Milzzellen (Abb. 3 A). Innerhalb der konventionellen DZ sind vor allem die XCR1⁺ DZ expandiert (Abb. 3 B). Diese haben um ungefähr das 20fache zugenommen, während die XCR1⁻ DZ nur um das 5fache expandierten. Durch Verdauung, Dichtegradientenzentrifugation und anschließende magnetische Sortierung konnten die XCR1⁺ DZ aus den Milzen der Flt3-Ligand-behandelten Mäusen weiter angereichert werden. Die resultierende Zellsuspension enthielt ca. 50 % XCR1⁺ DZ (Abb. 3 C) und wurde zur Immunisierung eingesetzt.

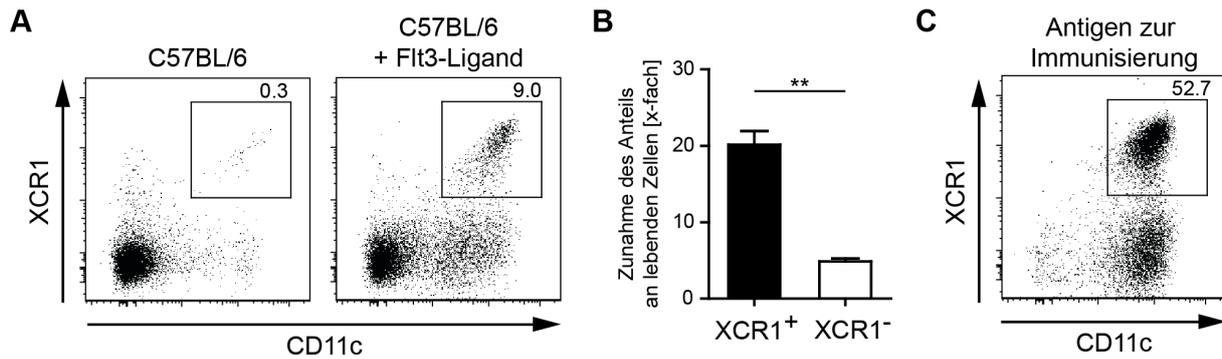


Abb. 3: Anreicherung von XCR1⁺ DZ durch Behandlung von C57BL/6 Mäusen mit einer Flt3-Ligand exprimierenden Zelllinie

C57BL/6 Mäusen wurden 1×10^6 B16-Flt3-Ligand Zellen s.c. injiziert. Nach 9 Tagen wurden die Milzen entnommen. XCR1 wurde mit dem XCL1-Färbereagenz gefärbt. A) Darstellung der XCR1⁺CD11c⁺ Zellen auf Gesamtsplenozyten von unbehandelten und mit Flt3-Ligand-behandelten Mäusen. B) Zunahme des Anteils an Gesamtsplenozyten der XCR1⁺ und der XCR1⁻ DZ. C) Die DZ der Flt3-Ligand-behandelten Mäuse wurden durch Verdau, Dichtegradientenzentrifugation und magnetische Sortierung (MACS) von CD11c⁺ Zellen angereichert. Gezeigt sind die Gesamtzellen nach MACS, die zur Immunisierung verwendet wurden.

Die angereicherten DZ wurden XCR1-defizienten (B6.XCR1:LacZ) Mäusen i.p. injiziert. XCR1 stellt in diesen Mäusen ein körperfremdes Protein dar, welches potentiell immunogen wirkt. Die restlichen Zellbestandteile sollten nicht als körperfremd erkannt werden, da sie aus syngenen Mäusen stammen. Um eine effektive Immunantwort auszulösen, in der antikörperproduzierende B-Zellen gebildet werden, wurden Adjuvanzen benutzt. In eine Gruppe Mäuse wurden DZ i.p. injiziert, die in komplettem Freund's Adjuvans resuspendiert waren. Bei der zweiten Gruppe wurden DZ und Freund's Adjuvans separat in verschiedene Bauchseiten injiziert, so dass die inflammatorische Wirkung besteht, gleichzeitig aber die DZ intakt bleiben. Die dritte Gruppe bekam hitzeinaktivierte *Bordetella pertussis* als Adjuvans. Die verschiedenen Immunisierungsstrategien sind in Tab. 10 zusammengefasst. Nach mehreren Immunisierungen zeigte nur eine Maus Antikörper gegen XCR1 im Serum (Tab. 10). Die Detektion von Antikörpern im Serum ist allerdings nicht zwingend nötig, um antigenspezifische antikörperproduzierende B-Zellen in einer anschließenden Fusion zu gewinnen. Daher wurden auch Milzen von Serum-negativen Mäusen für Fusionen verwendet.

Tab. 10: Immunisierungsstrategien und resultierende Hybridome

Immunisierungsstrategie	Anzahl der Mäuse	Serum mit Antikörpern für XCR1	Fusionen	Anzahl an Hybridomen	XCR1-Antikörper-produzierende Hybridome
DZ in CFA bzw. IFA resuspendiert, i.p.	3	0	0	-	-
DZ getrennt von CFA bzw. IFA i.p. auf verschiedene Seiten injiziert	3	0	1	412	0
DZ + <i>B. pertussis</i> , i.p.	3	1	2	1813	1

CFA = komplettes Freund's Adjuvans; IFA = inkomplettes Freund's Adjuvans

Nach insgesamt 5 Immunisierungen wurden die antikörperproduzierenden B-Zellen aus den Milzen zweier Mäuse, die mit *B. pertussis* und einer Maus, die mit CFA auf verschiedenen Seiten immunisiert waren, mit Myelomzellen fusioniert (Tab. 10). Überstände gewachsener Hybridome wurden mit angereicherten DZ inkubiert um XCR1-spezifische Antikörper nachzuweisen. Klone, die ein positives Signal in der durchflusszytometrischen Analyse zeigten, wurden weiterkultiviert und auf Spezifität in XCR1-defizienten Mäusen überprüft. Es gab insgesamt sechs Hybridome, die XCR1-spezifische Antikörper in ihrem Überstand enthielten. Bei weiterer Kultivierung wurde festgestellt, dass nur ein Klon Antikörper konstant produzierte. Der eine produzierende Klon (MARX10) stellte sich als monoklonal heraus, da sämtliche Subklone XCR1-spezifische Antikörper produzierten. MARX10 produzierte Antikörper des Isotyps IgG2b, wie die Untersuchung mit einem ELISA spezifisch für Immunglobulin-Subklassen ergab.

3.1.2 MARX10 erkennt spezifisch einen Teil der CD8⁺ und CD8⁻ dendritischen Zellen in der Milz, aber keine anderen Zellpopulationen

Der gewonnene Antikörper wurde hinsichtlich seiner Spezifität in der Durchflusszytometrie untersucht. Dazu wurden Splenozyten aus C57BL/6 Mäusen mit MARX10 und mit monoklonalen Antikörpern gegen diverse Oberflächenmoleküle gefärbt. Zur Kontrolle der Spezifität wurden parallel Splenozyten aus XCR1-defizienten Mäusen untersucht. Der Antikörper färbte ca. 18 % der konventionellen DZ in C57BL/6 aber nicht in XCR1-defizienten Mäusen an (Abb. 4 A). Bei Analyse der Subpopulationen der DZ war eine

Färbung auf ca. 85 % der CD8⁺ DZ und einer kleinen Population (ca. 5 %) der CD8⁻CD4⁻ DZ zu sehen (Abb. 4 B). Die CD4⁺ DZ exprimierten kein XCR1.

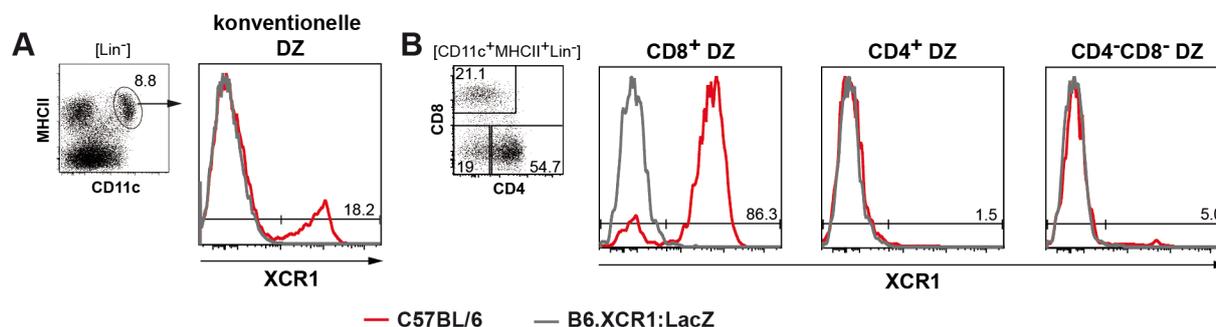


Abb. 4: MARX10 färbt einen Teil der konventionellen dendritischen Zellen der Milz an

Milzzellen aus C57BL/6 (rot) oder B6.XCR1:LacZ Mäusen (grau) wurden mit MARX10 gefärbt. Gezeigt sind A) konventionelle dendritische Zellen (DZ) definiert als MHCII⁺CD11c⁺ und negativ für linienspezifische Moleküle (Lin: CD3, B220, Ly6G/C) und B) die Subtypen der konventionellen DZ eingeteilt in CD8⁺, CD4⁺ und CD4⁻CD8⁻.

Andere Zellpopulationen der Milz, wie T-Zellen, NK-Zellen, plasmazytoide DZ, B-Zellen, Granulozyten und Makrophagen wurden nicht von MARX10 angefärbt (Abb. 5).

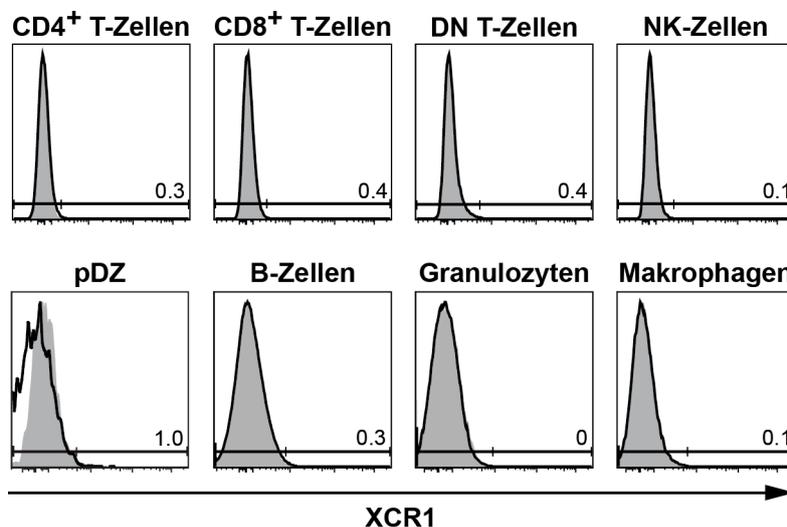


Abb. 5: MARX10 färbt keine T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, plasmazytoide dendritische Zellen, Granulozyten und Makrophagen an

Milzzellen aus C57BL/6 (schwarz) oder B6.XCR1:LacZ Mäusen (grauer Hintergrund) wurden mit MARX10 gefärbt und die Färbung auf verschiedenen Zellpopulationen analysiert. Dargestellt sind die Histogramme von CD4⁺, CD8⁺ und CD4⁻CD8⁻ (DN) T-Zellen (CD3⁺CD19⁻NK1.1⁻), NK-Zellen (NK1.1⁺Nkp46⁺CD3⁻CD19⁻), plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDZ) (CD317⁺B220⁺CD19⁻), B-Zellen (CD19⁺MHCII⁺CD3⁻), Granulozyten (Ly6G/C⁺CD3⁻CD19⁻) und Makrophagen (CD11b⁺CD3⁻CD19⁻Ly6G/C⁻DZ).

Parallel zur Antikörpergenerierung wurde eine Färbung von XCR1 über den Liganden XCL1 etabliert. Der Ligand wird dabei über ein Sekundärreagenz detektiert, das gleichzeitig durch Multimerisierung des Liganden die Bindung verstärkt. Diese ligandbasierte Färbung wurde für erste Oberflächenexpressionsanalysen von XCR1 eingesetzt (Abb. 3 und nicht gezeigt). In einer Ko-Färbung war zu sehen, dass MARX10 und das XCL1-Färbereagenz ca. 20 % der konventionellen DZ anfärbten (Abb. 6 A). Die Färbung beider Reagenzien überlagerte sich dabei zu 100 %. Der neu generierte Antikörper MARX10 färbt demnach dieselben Zellen wie das ligandbasierte Färbesystem. Daher wurde MARX10 in den folgenden Experimenten zur Detektion von XCR1 eingesetzt.

Weiterhin wurde MARX10 mit dem LacZ-Reportersystem in B6.XCR1:LacZ Mäusen verglichen. In diesen Mäusen wird die XCR1-Expression anhand des LacZ-Gens, welches unter der Kontrolle des XCR1-Promotors steht, detektiert. Dazu wird das Substrat FDG von der β -Galaktosidase, welche nur in den XCR1-exprimierenden Zellen vorhanden ist, zu Fluorescein umgesetzt. Da es sich hierbei um ein Genreportersystem handelt, muss diese Nachweismethode nicht der Zelloberflächenexpression entsprechen. Heterozygote B6.XCR1:LacZ Mäuse, die sowohl XCR1 auf der Oberfläche tragen als auch β -Galaktosidase exprimieren, wurden mit MARX10 und FDG gefärbt. Beide Reagenzien färbten ca. 20 % der konventionellen DZ (Abb. 6 B). Die FDG-Färbung zeigt aber keine gute Trennung des XCR1-Signals in den heterozygoten B6.XCR1:LacZ Mäusen und eine ausgeprägte Hintergrundfärbung in C57BL/6-Mäusen. Trotzdem ist zu sehen, dass der Antikörper dieselben Zellen färbt, die auch über FDG gefärbt wurden.

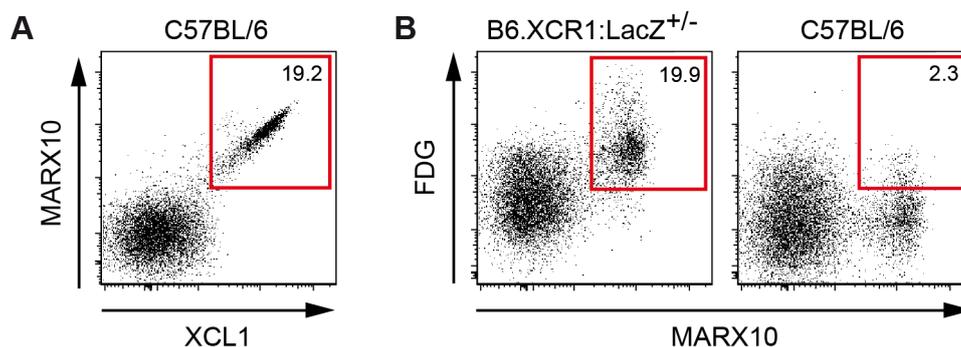


Abb. 6: MARX10, XCL1-Reagenz und FDG in B6.XCR1:LacZ Mäusen färben dieselben Zellen

Die Färbung des mAk MARX10 wurde mit den anderen Färbemethoden für XCR1 verglichen. A) Milzzellen aus C57BL/6-Mäusen wurden mit MARX10 und XCL1-Färbereagenz gleichzeitig gefärbt. B) Milzzellen aus C57BL/6 und heterozygoten B6.XCR1:LacZ Mäusen wurden zuerst mit FDG gefärbt und anschließend auf der Oberfläche mit MARX10.

Alle Daten zeigen, dass der monoklonale Antikörper MARX10 dieselben Zellen färbt wie die anderen Färbesysteme (der Ligand XCL1 oder die Reportermaus B6.XCR1:LacZ). Die Färbung über MARX10 entspricht damit den bisher anhand der Reportermaus gewonnenen Daten. Der erste monoklonale Antikörper gegen XCR1 färbt also spezifisch nur XCR1-tragende Zellen, welche eine Subpopulation der DZ darstellen.

3.1.3 MARX10 färbt in der Histologie CD8⁺CD11c⁺ Zellen in T-Zellzone, Marginalzone und roter Pulpa

Eine weitere wichtige Anwendung für einen monoklonalen Antikörper ist die Färbung histologischer Schnitte. Daher wurden Milzschnitte mit MARX10 gefärbt. Um den Antikörper in der konfokalen Mikroskopie zu nutzen, musste dieser über eine Tyramidamplifikation verstärkt werden, da ansonsten das Signal für eine Detektion zu schwach war. Mit dieser Methode konnte XCR1 zusammen mit CD3, CD8, CD11c und B220 auf Milzschnitten angefärbt werden. Die Ko-Färbung ermöglichte die genaue Darstellung der Positionierung XCR1⁺ Zellen. So ist zu sehen, dass alle Zellen, die XCR1 exprimieren, auch positiv für CD11c waren (Abb. 7). Die XCR1⁺ Zellen befanden sich vor allem in der T-Zellzone, aber auch in der Marginalzone und der roten Pulpa. In den Bereichen der B-Zellen konnten keine XCR1⁺ Zellen nachgewiesen werden. Auf Milzschnitten XCR1-defizienter Mäuse zeigte der Antikörper keine Färbung (nicht gezeigt).

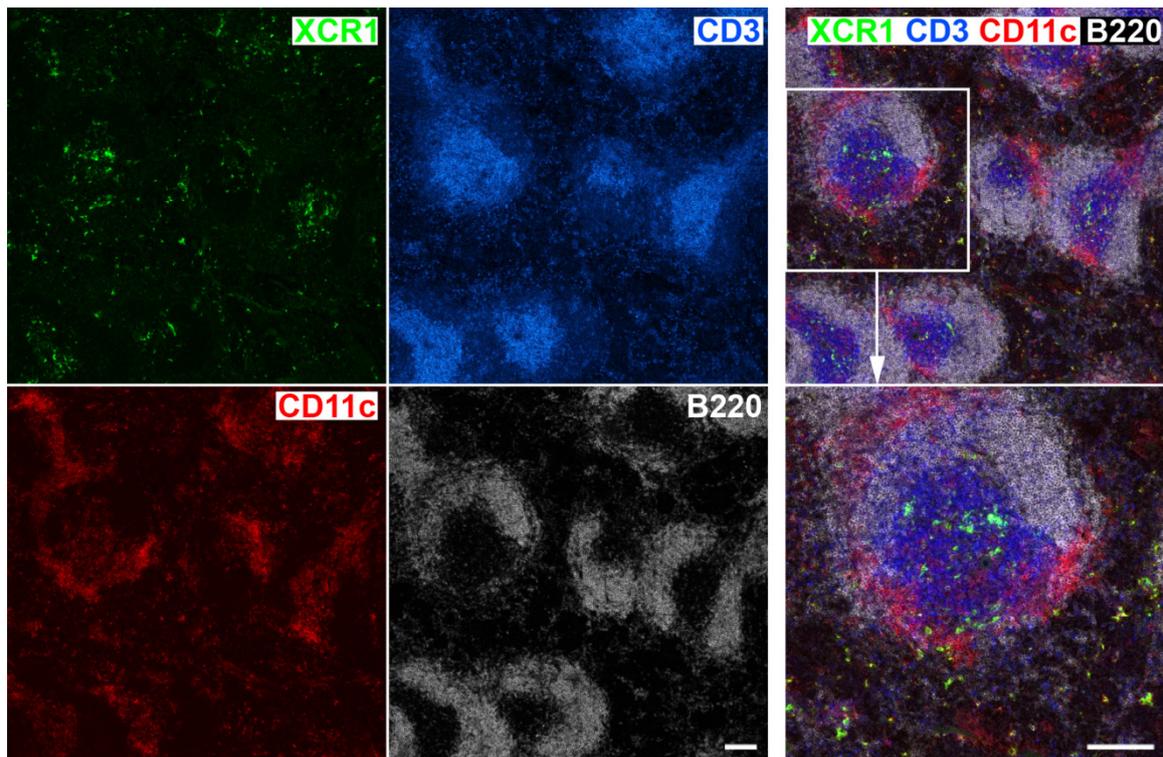


Abb. 7: XCR1⁺ DZ sind in der T-Zellzone und der roten Pulpa lokalisiert, aber nicht in B-Zellzonen

Kryostatschnitte (12 μm) der Milz wurden mit MARX10 (grün), CD3 (blau), CD11c (rot) und B220 (weiß) gefärbt und mit einem konfokalen Mikroskop analysiert. Eine Kolokalisation von XCR1 mit CD11c ist im Mischbild durch eine gelbe Farbe zu erkennen. Skala = 100 μm

Eine Analyse der Kolokalisation mit CD8 erwies sich als schwierig, da CD8 von T-Zellen in der T-Zellzone exprimiert wird. Aufgrund der dichten Zellanordnung war die Detektion von CD8 auf XCR1⁺ DZ in der T-Zellzone nicht eindeutig möglich. Außerhalb der T-Zellzone war dagegen sehr gut zu erkennen, dass CD8 mit der XCR1-Färbung kolokalisiert ist (Abb. 8). Die XCR1⁺ DZ außerhalb der T-Zellzonen exprimierten also zusätzlich CD8.

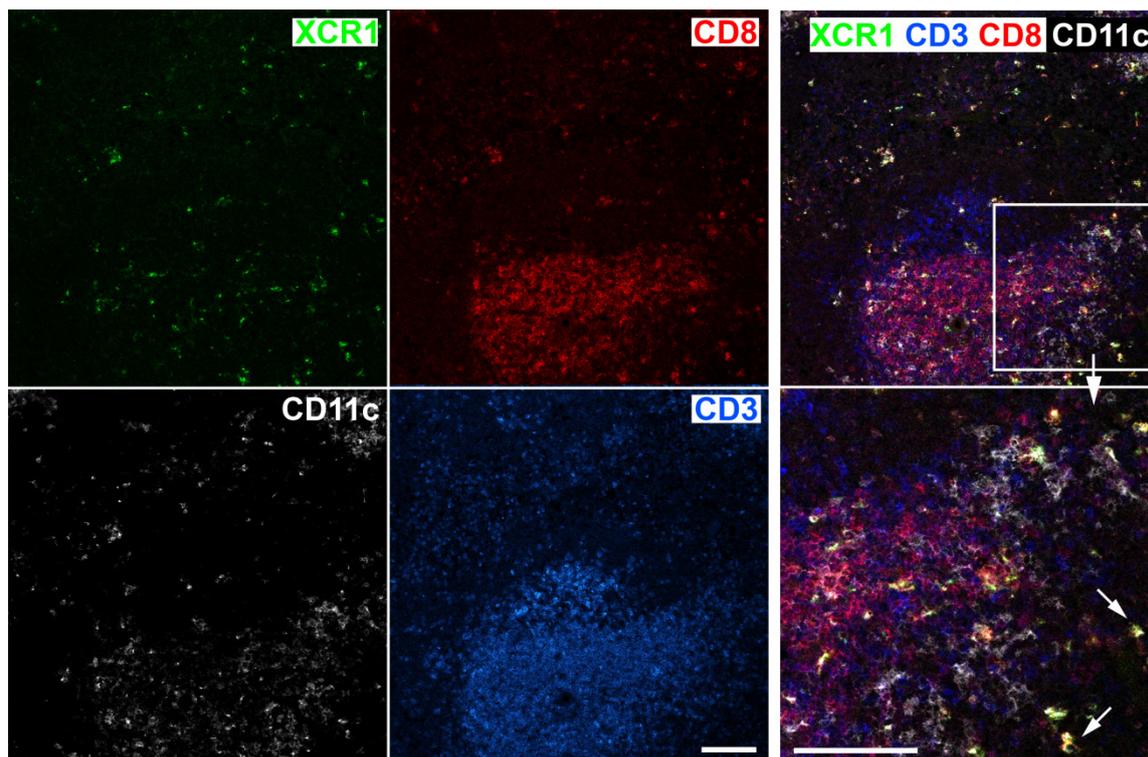


Abb. 8: Auf Milzschnitten sind XCR1 und CD8 kolokalisiert

Kryostatschnitte (12 μm) der Milz wurden mit MARX10 (grün), CD3 (blau), CD8 (rot) und CD11c (weiß) gefärbt und mit einem konfokalen Mikroskop analysiert. Eine Kolokalisation von XCR1 mit CD8 ist im Mischbild durch eine gelbe Farbe zu erkennen. Beispiele sind durch Pfeile gekennzeichnet. Skala = 100 μm

Erstmalig konnte somit eine histologische Färbung mit einem monoklonalen Antikörper gegen XCR1 etabliert werden. Sie zeigt die Lokalisation der XCR1⁺ DZ innerhalb der T-Zellzonen, der Marginalzone und der roten Pulpa.

3.1.4 MARX10 blockiert nicht die Bindung von XCL1 an XCR1

Um MARX10 in funktionellen Studien nutzen zu können, ist es wichtig zu wissen, ob er die Bindung des Liganden XCL1 blockiert. Ein blockierender Antikörper könnte eingesetzt werden, um die Interaktion zwischen XCL1 und XCR1 zu unterbinden. Eine mögliche Blockade wurde in der Durchflusszytometrie und in einem Chemotaxisversuch untersucht.

3.1.4.1 MARX10 blockiert nicht die Färbung von XCR1 in der Durchflusszytometrie

Zur möglichen Blockierung einer durchflusszytometrischen Färbung wurden Splenozyten mit verschiedenen Konzentrationen von MARX10 inkubiert. Daraufhin wurden sie mit dem XCL1-Färbereagenz gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die XCR1⁺ DZ waren in der Färbung mit XCL1 selbst bei 400 µg/ml MARX10 weiterhin deutlich zu sehen, wobei die Intensität der Färbung im Vergleich zu unbehandelten Zellen etwas abgenommen hatte (Abb. 9 A). MARX10 stört die Bindung von XCL1 an seinen Rezeptor demnach nicht.

Außerdem wurde getestet, ob XCL1 die Bindung des Antikörpers an XCR1 blockieren kann. Dazu wurden Splenozyten mit verschiedenen Konzentrationen an XCL1 vorinkubiert und anschließend mit MARX10 gefärbt. Die Bindung von MARX10 wurde nicht blockiert, da sogar bei der höchsten eingesetzten Menge von 100 µg/ml XCL1 keine Abnahme der Färbung mit MARX10 beobachtet werden konnte (Abb. 9 B). Trotz Bindung von XCL1 an XCR1 ist demnach eine Färbung mit MARX10 immer noch möglich.

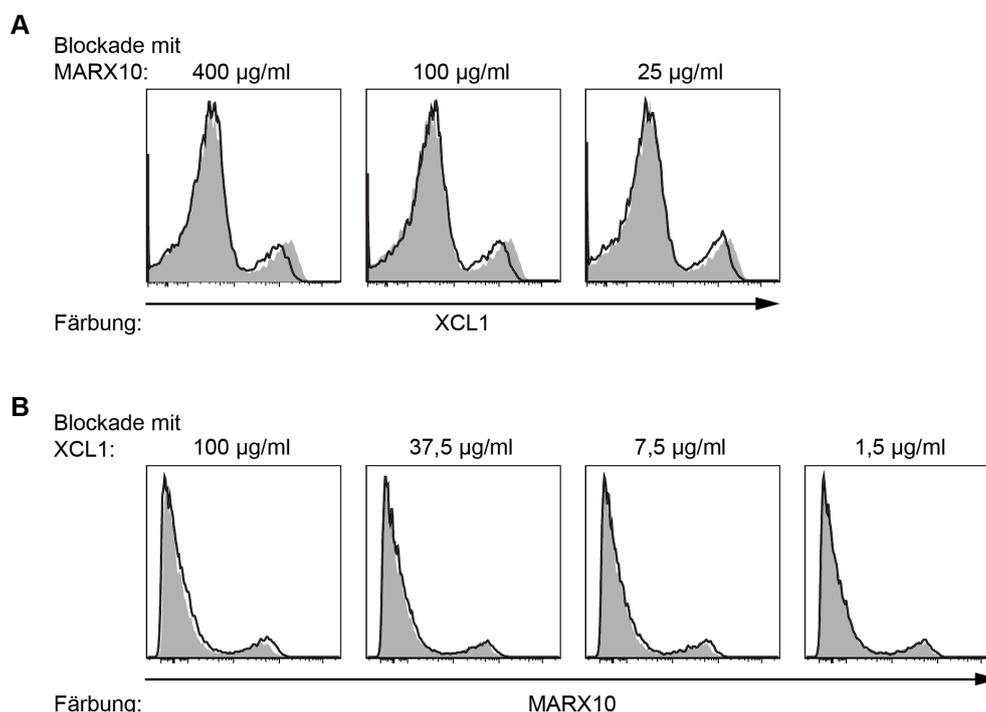


Abb. 9: MARX10 blockiert nicht die Bindung von XCL1 an XCR1 und XCL1 nicht die Bindung von MARX10

Milzzellen aus C57BL/6 Mäusen wurden mit A) MARX10 oder B) XCL1 in den angegebenen Mengen für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ohne vorheriges Waschen A) XCL1-Färbereagenz oder B) MARX10 für die Oberflächenfärbung hinzugegeben und diese durchflusszytometrisch analysiert. Das jeweilige XCR1-Signal ohne Blockadereagenzien ist als grauer Hintergrund gezeigt.

3.1.4.2 MARX10 blockiert nicht die Migration CD8⁺ DZ zu XCL1

Weiterhin wurde in einem Migrationsassay untersucht, ob MARX10 die Bindung und Wirkung von XCL1 blockiert. Dazu wurde die Migration angereicherter DZ zu XCL1 bestimmt, wobei die Zellen mit MARX10 vorinkubiert wurden und MARX10 während des gesamten Assays in hohen Konzentrationen eingesetzt wurde. Zur Auswertung wurden DZ anhand ihrer CD8-Expression eingeteilt, da XCR1 von ca. 85 % der CD8⁺ DZ exprimiert wird.

Bei Zugabe von 400 µg/ml MARX10 war nur eine geringe Abnahme der Chemotaxis zu beobachten (Abb. 10). Die Zellen migrierten trotz Bindung des Antikörpers an XCR1 weiterhin zu XCL1. MARX10 blockiert demnach nicht die durch XCL1 induzierte Chemotaxis.

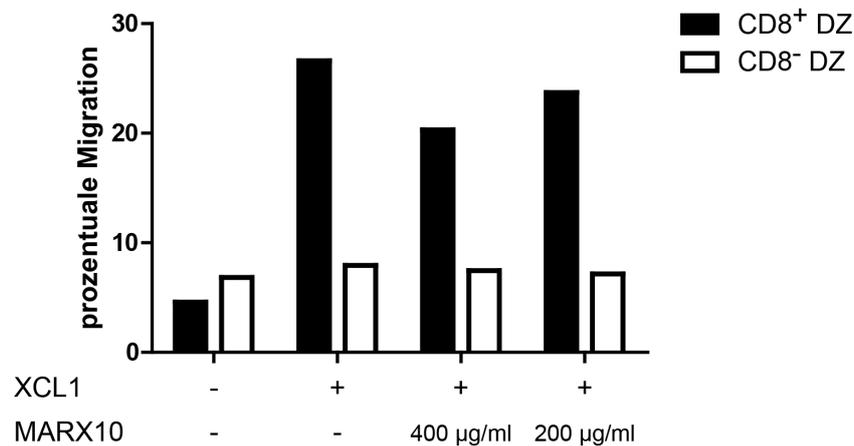


Abb. 10: MARX10 blockiert nicht die Chemotaxis von CD8⁺ DZ zu XCL1

Durch magnetische Sortierung angereicherte DZ wurden mit verschiedenen Konzentrationen des mAk MARX10 für 5 min inkubiert und anschließend ohne einen Waschschriff im Transwell-Assay eingesetzt. Nach 2,5 h Inkubation bei 37 °C im Brutschrank wurden die migrierten Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist die prozentuale Migration (Anteil der gewanderten Zellen bezogen auf die Anzahl der eingesetzten Zellen) der CD8⁺ und CD8⁻ DZ (CD11c⁺B220⁻).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass MARX10 nicht die Bindung von XCL1 an seinen Rezeptor blockiert. Somit kann der Antikörper nicht zur Unterbrechung der XCL1-XCR1-Interaktion genutzt werden. Dafür ermöglicht die fehlende Blockade den Einsatz des Antikörpers für funktionelle Studien, ohne die Interaktion des Chemokinrezeptors mit seinem Liganden zu beeinträchtigen. Außerdem zeigen die Daten, dass XCR1 über den Antikörper detektiert werden kann, auch wenn XCL1 an ihn gebunden ist.

3.2 XCR1-Expression in Lunge und mediastinalem Lymphknoten

Bislang war die Expression von XCR1 auf der Oberfläche nur in der Milz untersucht worden. Erstmals sollte daher mit MARX10 die Oberflächenexpression von XCR1 auch in peripheren Organen untersucht werden. Der Schwerpunkt lag auf der Lunge und dem lungendränierenden (mediastinalen) Lymphknoten.

3.2.1 XCR1-Expression in der Lunge korreliert mit CD103 und CD207, aber nicht mit CD11b und CX3CR1, und ist abhängig vom Transkriptionsfaktor Batf3

In peripheren Organen werden andere Oberflächenmoleküle zur Abgrenzung von DZ-Subpopulationen genutzt als in der Milz. Daher wurde die XCR1-Expression in der Lunge zuerst mit diversen Molekülen korreliert. Die Rezeptoren CD207 (Langerin) und CX3CR1 (Fraktalkin-Rezeptor) wurden in GFP-Reportermäusen analysiert, die GFP unter der Kontrolle des CD207- bzw. CX3CR1-Promotors exprimieren. Alle anderen Rezeptoren wurden mittels monoklonaler Antikörper gefärbt.

Diese Analysen ergaben, dass von den konventionellen DZ der Lunge rund 43 % XCR1 exprimierten. Die XCR1-Expression korrelierte zu rund 85 % mit den beiden Rezeptoren CD103 und CD207 (Abb. 11). Dabei exprimieren jeweils rund 15 % der XCR1⁺ DZ nur XCR1 und nicht CD103 oder CD207. Die Korrelation der Expression von XCR1 mit CD103, dem bisher verwendeten Marker für kreuzpräsentierende DZ in der Peripherie, und CD207, einem auch mit Kreuzpräsentation korreliertem Molekül, besteht also nicht vollständig. Mit CD11b überschneidet sich die XCR1-Expression kaum, nur ca. 9 % der XCR1⁺ DZ sind auch CD11b⁺. Die Antikorrelation der XCR1-Expression zu CX3CR1 ist noch stärker ausgeprägt, da nur 2 % der DZ XCR1⁺CX3CR1⁺ sind. CD8 ist in der Lunge nur auf ca. 4 % der DZ mit einem schwachen Signal detektierbar und somit nicht für eine Unterteilung der DZ nutzbar.

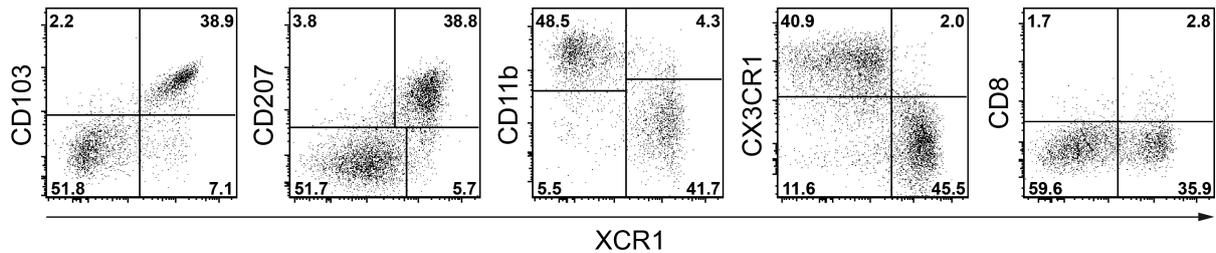


Abb. 11: Die XCR1-Expression in der Lunge korreliert mit CD103 und CD207, aber nicht mit CD11b und CX3CR1

Zellen der Lungen von C57BL/6, Lang-EGFP (für CD207-Detektion) und CX3CR1^{GFP} Mäusen wurden mittels Verdau isoliert und mit MARX10 die Expression von XCR1 auf dendritischen Zellen (DZ) (CD11c⁺MHCII⁺CD45⁺CD3⁻B220⁻Autofluoreszenz) in Korrelation zu DZ-assoziierten Rezeptoren untersucht.

Die DZ der Lunge werden derzeit in der Literatur (Sung *et al.*, 2006; Plantinga *et al.*, 2010) anhand ihrer CD103- und CD11b-Expression in zwei Subpopulationen unterteilt, die CD103⁺CD11b⁻ und die CD103⁻CD11b⁺ DZ. Außerdem gibt es CD103⁺CD11b⁺ und CD103⁻CD11b⁻ DZ, die nicht in allen Mausstämmen deutlich ausgeprägt sind (Edelson *et al.*, 2010). Im Folgenden wurde die XCR1-Expression in den Subpopulationen der DZ der Lunge untersucht. Es wurden 129 WT Mäuse verwendet, um die Subpopulationen mit Transkriptionsfaktor Batf3-defizienten Mäusen vergleichen zu können (siehe folgender Abschnitt). Zur Kontrolle des XCR1-Signals wurden B6.XCR1:LacZ Mäuse verwendet. In den 129 WT Mäusen gab es im Gegensatz zu C57BL/6 Mäusen nur ca. 10 % XCR1⁺ DZ. Bei Analyse der verschiedenen Subpopulationen war zu sehen, dass XCR1 von ca. 86 % der CD103⁺CD11b⁻ DZ exprimiert wurde (Abb. 12). Außerdem zeigte ungefähr die Hälfte der CD103⁺CD11b⁺ sowie der doppelt-negativen DZ XCR1 auf der Oberfläche. Dagegen fehlte XCR1 völlig auf CD103⁻CD11b⁺ DZ. Die Korrelation der Expression von XCR1 mit CD103 besteht somit nicht vollständig. Andererseits gibt es eine Antikorrelation von XCR1 mit CD11b⁺ Zellen, die nicht CD103 exprimieren.

Der Transkriptionsfaktor Batf3 ist essentiell für die Entwicklung kreuzpräsentierender DZ (Hildner *et al.*, 2008). In Batf3-defizienten Mäusen fehlen in der Lunge die CD103⁺ DZ (Edelson *et al.*, 2010). Daher wurde die XCR1-Expression in Batf3-defizienten Mäusen untersucht. In der Lunge fehlten die CD103⁺CD11b⁻ und CD103⁺CD11b⁺ DZ und dementsprechend fehlten die XCR1-exprimierenden Zellen dieser Subtypen (Abb. 12). Weiterhin waren die CD103⁻CD11b⁻ DZ reduziert und innerhalb dieser Population waren keine XCR1⁺ DZ detektierbar. Das bedeutet, dass außer den CD103⁺ DZ zusätzlich die CD103⁻XCR1⁺ Zellen in den Batf3-defizienten Mäusen fehlen.

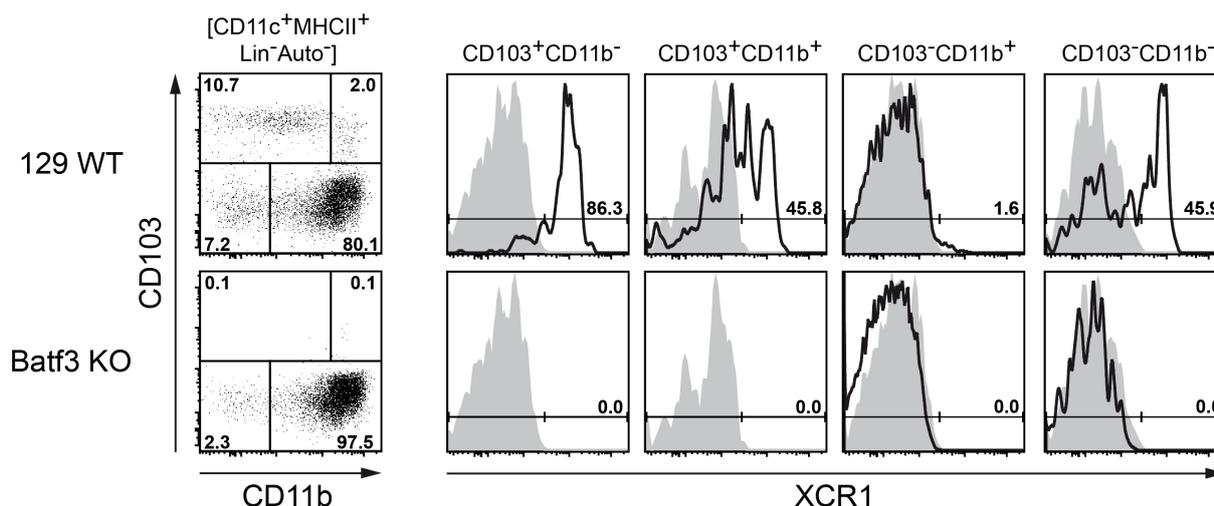


Abb. 12: Die XCR1-Expression in der Lunge von 129 WT Mäusen korreliert stark mit CD103 und ist Batf3-abhängig

Zellen der Lungen aus 129 WT (obere Reihe), Batf3 KO (untere Reihe) und B6.XCR1:LacZ Mäusen (grauer Hintergrund) wurden mittels Verdau isoliert und mit MARX10 die Expression von XCR1 auf Lungen-DZ ($CD11c^+MHCII^+CD45^+Lin^-$ Autofluoreszenz $^-$) untersucht. Die DZ wurden in die vier Subtypen $CD103^+CD11b^-$, $CD103^+CD11b^+$, $CD103^-CD11b^+$ und $CD103^-CD11b^-$ unterteilt. Lin: CD3, B220

Für das Fehlen der $XCR1^+$ DZ in Batf3-defizienten Mäusen kann es zwei verschiedene Ursachen geben: Entweder diese Zellen werden nicht gebildet oder sie exprimieren nur bestimmte Oberflächenmoleküle wie XCR1 und CD103 nicht. Dies kann anhand der vorhandenen Daten nicht unterschieden werden.

3.2.2 XCR1-Expression im mediastinalen Lymphknoten korreliert teilweise mit CD103 und CD8 und ist abhängig vom Transkriptionsfaktor Batf3

In der Lunge aufgenommene Antigene werden in den lungendränierenden (mediastinalen) Lymphknoten transportiert, wo sie T-Zellen präsentiert werden. Daher wurde auch der mediastinale Lymphknoten bezüglich XCR1-exprimierenden Zellen untersucht. Im Ruhezustand können im Lymphknoten migratorische von residenten DZ anhand ihrer höheren MHCII-Expression unterschieden werden (Vermaelen *et al.*, 2001). Zur Kontrolle des XCR1-Signals wurden B6.XCR1:LacZ Mäuse mit MARX10 gefärbt.

Innerhalb der residenten DZ exprimierten 31 % XCR1 und CD8, aber jeweils 5 % der residenten DZ exprimieren nur XCR1 oder nur CD8 (Abb. 13 A). Die Korrelation der XCR1- und CD8-Expression auf den residenten DZ im mediastinalen Lymphknoten ist demnach ähnlich wie in der Milz. Bei den migratorischen DZ waren 42 % $XCR1^+CD103^+$ und nur

ca. 3 % $XCR1^+CD103^-$ DZ, die nur CD103 aber nicht XCR1 exprimierten, bildeten ca. 13 % der migratorischen DZ. XCR1 korreliert im mediastinalen Lymphknoten demnach nicht so gut mit CD103 wie in der Lunge. Die $CD103^+XCR1^+$ DZ entsprechen wahrscheinlich den $CD103^+XCR1^+$ DZ aus der Lunge, welche in den drainierenden Lymphknoten eingewandert sind. Diese Wanderung findet kontinuierlich auch ohne Inflammation statt.

In *Batf3*-defizienten Mäusen ist keine XCR1-Expression in den residenten als auch den migratorischen DZ detektierbar (Abb. 13 B). Es ist anhand der Daten nicht sicher, ob die Zellen vollkommen abwesend sind oder ihnen nur die XCR1-Expression fehlt.

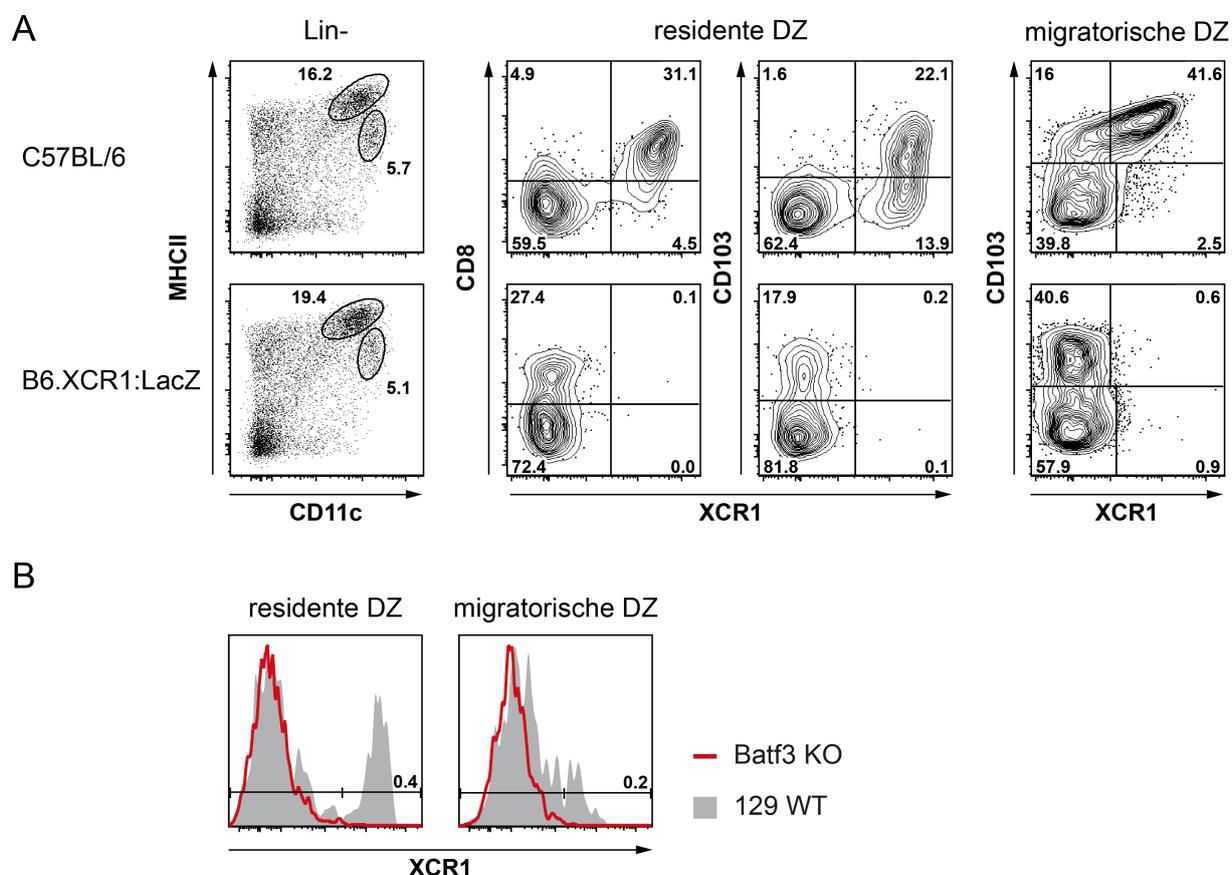


Abb. 13: Die XCR1-Expression im mediastinalen Lymphknoten korreliert mit CD8 auf den residenten und teilweise mit CD103 auf den migratorischen dendritischen Zellen und ist *Batf3*-abhängig

Lymphozyten aus dem mediastinalen Lymphknoten wurden durch Verdau isoliert und mit MARX10 die Expression von XCR1 auf den DZ ($CD11c^+MHCII^+Lin^-$) untersucht. Die DZ des Lymphknotens wurden in residente ($MHC II^{mittel}$) und migratorische DZ ($MHC II^{hoch}$) unterteilt. A) Lymphozyten aus C57BL/6 (obere Reihe) und B6.XCR1:LacZ Mäusen (untere Reihe) wurden für XCR1, CD8 und CD103 gefärbt. B) Lymphozyten aus 129 WT (grauer Hintergrund) und *Batf3* KO-Mäusen (rot) wurden nach Einteilung in residente und migratorische DZ auf ihre XCR1-Expression untersucht. Die dargestellten Zahlen geben den Anteil $XCR1^+$ Zellen in *Batf3* KO-Mäusen an. Lin: CD3, B220

3.3 Die Wechselwirkung von XCR1 mit seinem Liganden XCL1 verstärkt die CD8⁺ T-Zellantwort

Die Interaktion von XCR1 mit seinem Liganden XCL1 erfolgt in einer sehr frühen Phase einer Immunantwort, wenn XCL1 kurz nach Aktivierung von NK-Zellen und auch von CD8⁺ T-Zellen sezerniert wird (Dorner *et al.*, 2002; Dorner *et al.*, 2009). XCR1⁺ DZ spielen durch ihre Fähigkeit zur Kreuzpräsentation (Bachem *et al.*, 2012) eine zentrale Rolle in der Induktion einer CD8⁺ T-Zellantwort. Daher sollte untersucht werden, ob XCL1 die Kreuzpräsentation und Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen beeinflusst.

3.3.1 Zugabe von XCL1 bei einer Immunisierung mit Ovalbumin führt zu einer verstärkten T-Zellproliferation

Um die Wirkung von XCL1 auf die Antigenpräsentation und T-Zellaktivierung zu untersuchen, wurden limitierende Mengen von Ovalbumin (OVA) zusammen mit löslichem XCL1 i.v. injiziert. Die Proliferation der antigenspezifischen T-Zellen wurde in einem OT-I-Transfersystem nach zwei Tagen untersucht. Bei Gabe von 20 µg OVA allein proliferierten ungefähr 50 % der transferierten CD8⁺ T-Zellen (Abb. 14 A linkes Histogramm, B). Durch Zugabe von XCL1 wurde die Proliferation signifikant auf rund 90 % verstärkt (Abb. 14 A rechtes Histogramm, B). Um sicherzustellen, dass dieser Effekt tatsächlich durch die Bindung von XCL1 an seinen Rezeptor XCR1 vermittelt wird, wurde das gleiche Experiment in XCR1-defizienten Mäusen durchgeführt. In diesen Mäusen zeigte die Gabe von zusätzlichem XCL1 keinen Unterschied in der Proliferation antigenspezifischer T-Zellen (Abb. 14 C, D). Die Verstärkung der CD8⁺ T-Zellproliferation in C57BL/6-Mäusen beruht demnach auf der Wechselwirkung von XCL1 mit seinem Rezeptor XCR1. XCL1 verstärkt möglicherweise die Aufnahme des Antigens und/oder die Kreuzpräsentation.

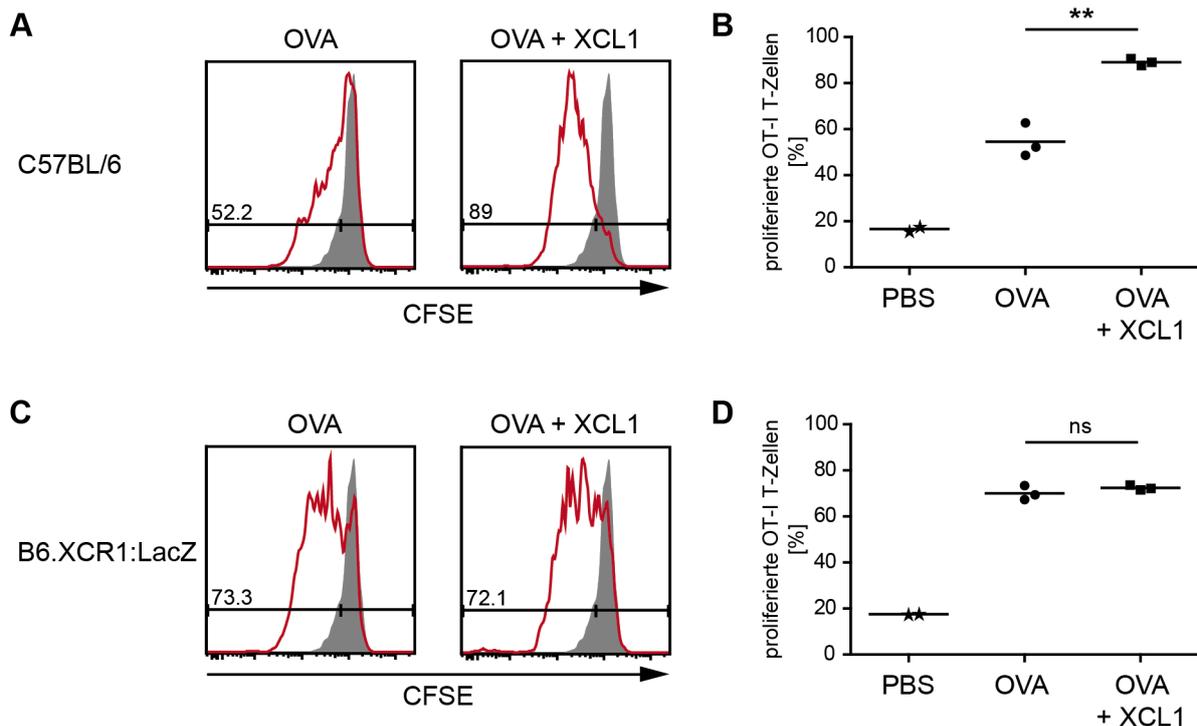


Abb. 14: Die Zugabe von XCL1 zu OVA bei der Immunisierung verstärkt die Proliferation der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen

C57BL/6 (A und B) oder B6.XCR1:LacZ (C und D) Mäusen wurden 2×10^6 CFSE-markierte OT-I-Zellen i.v. injiziert. Einen Tag später wurden die Mäuse mit 20 μ g OVA +/- 5 μ g XCL1 i.v. immunisiert. Als Kontrolle wurde PBS injiziert. Zwei Tage nach Immunisierung wurden die Milzzellen isoliert und die Proliferation der OT-I-T-Zellen (CD8⁺CD90.1⁺) anhand der Abnahme des CFSE-Signals bestimmt. A, C) Repräsentative CFSE-Histogramme nach Immunisierung mit oder ohne XCL1; im Hintergrund (grau) ist das Signal der PBS-Gruppe zu sehen. B, D) Darstellung der proliferierten OT-I-T-Zellen (CFSE^{niedrig}) bezogen auf Gesamt-OT-I-T-Zellen.

3.3.2 Bindung von XCL1 an Zellen verstärkt die CD8⁺ T-Zellaktivierung

3.3.2.1 XCL1 bindet an nekrotische Splenozyten

Chemokine binden nicht nur an ihren jeweiligen Rezeptor, sondern auch an Glykosaminoglykane (GAGs) (Allen *et al.*, 2007). Diese sind u. a. als Proteoglykane Bestandteil der Oberflächenstrukturen von Zellen. Daher wurde untersucht, ob XCL1 an Zellen unabhängig vom XCR1-Rezeptor binden kann. In einer Untersuchung mit Zelllinien konnte bereits A. Mora in unserem Labor zeigen, dass XCL1 an Zellen im Nekrotestadium bindet (Dissertation A. Mora, 2010). Über die Bindung von XCL1 an nekrotische Milzzellen war dagegen noch nichts bekannt. Um die Bindung zu untersuchen, wurden Milzzellen *in vitro* mit XCL1 inkubiert. Anhand einer Annexin- und DAPI-Färbung konnten lebendige, apoptotische, nekrotische und tote Zellen unterschieden werden (Krysko *et al.*, 2008). XCL1

wurde auf 67 % der nekrotischen Zellen detektiert und auf 11 % der toten Zellen (Abb. 15). Auf apoptotischen Zellen zeigte nur ein Teil von 7 % ein XCL1-Signal. XCL1 bindet also vorrangig an Zellen, die bereits vollständig ihre Membranintegrität verloren haben. Ein schwaches XCL1-Signal war auf 26 % der lebenden Zellen zu sehen. Hierbei handelt es sich größtenteils um B-Zellen (nicht gezeigt). Diese sind dafür bekannt, sehr viele Stoffe unspezifisch zu binden (Avrameas, 1991)

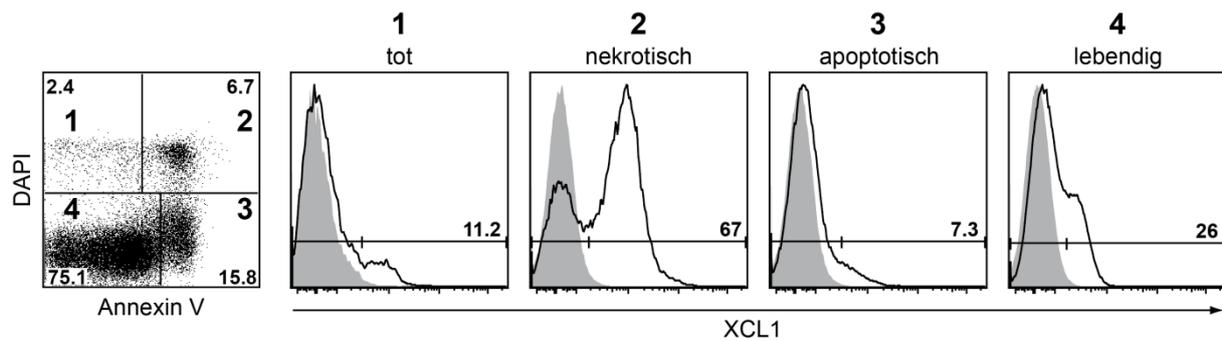


Abb. 15: XCL1 bindet an nekrotische Zellen

Milzzellen aus C57BL/6 Mäusen wurden in R10F⁺/β-ME über Nacht bei 37 °C und für 1 h vor Analyse mit 1 µg/ml XCL1 inkubiert. Anschließend wurde XCL1 über einen Anti-XCL1-Antikörper (MTAC-311) auf der Oberfläche gefärbt und in der Durchflusszytometrie untersucht. Die Diskriminierung von lebendigen und apoptotischen Zellen erfolgte anhand einer AnnexinV-Färbung. 1) AnnexinV⁻DAPI⁺ = tot 2) AnnexinV⁺DAPI⁺ = nekrotisch 3) AnnexinV⁺DAPI⁻ = apoptotisch 4) AnnexinV⁻DAPI⁻ = lebendig. Als Hintergrund (grau) sind Milzzellen dargestellt, die nicht mit XCL1 inkubiert wurden.

Die Fähigkeit zur Bindung an nekrotische Zellen muss nicht unbedingt eine einzigartige Eigenschaft von XCL1 sein. Es wurden aber bisher noch keine Daten zu so einer möglichen Bindung durch Chemokine veröffentlicht. Die Frage, ob nur XCL1 diese Eigenschaft besitzt, sollte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Allerdings liefert dieser Befund Anlass zu weiteren funktionellen Untersuchungen, da XCR1-tragende DZ dafür bekannt sind, sterbende Zellen aufzunehmen.

3.3.2.2 Nekrotische Zellen, an die XCL1 gebunden ist, werden verstärkt von XCR1⁺ DZ aufgenommen

XCR1⁺ DZ nehmen tote und lebendige Zellen auf und präsentieren antigene Peptide über MHC den T-Zellen. An nekrotische Zellen gebundenes XCL1 kann möglicherweise die Aufnahme dieser Zellen durch XCR1⁺ DZ verstärken.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Milzzellen mit Hitzeschock (56 °C, 30 min) behandelt und über Nacht mit XCL1 bei 37 °C inkubiert. Die resultierende Zellpopulation bestand aus ca. 90 % nekrotischen Zellen, die alle mit XCL1 dekoriert waren (nicht gezeigt). Diese Zellen wurden mit CFSE markiert und Mäusen i.v. injiziert. Als Kontrolle für das CFSE-Signal dienten Mäuse, denen PBS injiziert wurde. Nach 4 h und 12 h wurde die Aufnahme der Zellen analysiert. Wurden undekorierte Zellen von ca. 0,2 % aller XCR1⁺ DZ aufgenommen, so waren es bei den mit XCL1-dekorierten Zellen ca. 0,3 % aller XCR1⁺ DZ nach 4 h bzw. 0,4 % nach 12 h (Abb. 16 A). Zu beiden Zeitpunkten haben mehr XCR1⁺ DZ tote Zellen aufgenommen, wenn diese mit XCL1 dekoriert waren. Sehr deutlich war eine Erhöhung der mittleren Fluoreszenzintensität des CFSE-Signals in den XCR1⁺ DZ zu sehen. Dies bedeutet, dass pro XCR1⁺ DZ mehr tote Zellen aufgenommen wurden. Beide Verstärkungsphänomene traten jeweils nach 4 h als auch nach 12 h auf. Parallel wurde die Aufnahme von nekrotischen Zellen in XCR-defizienten Mäusen nach 12 h untersucht. Da in diesen Mäusen kein XCR1 exprimiert wird, wurden hier die CD8⁺ DZ, welche zum größten Teil den XCR1⁺ DZ entsprechen, auf Aufnahme toter Zellen geprüft. In diesen Mäusen unterscheidet sich die Aufnahme von Zellen, an die XCL1 gebunden hat, nicht von denen ohne XCL1. Es haben weder mehr DZ sterbende Zellen aufgenommen, noch wurden mehr sterbende Zellen pro DZ aufgenommen (Abb. 16 B). Die verstärkte Aufnahme der Zellen durch DZ wird demnach spezifisch durch die Interaktion von XCL1 und XCR1 induziert.

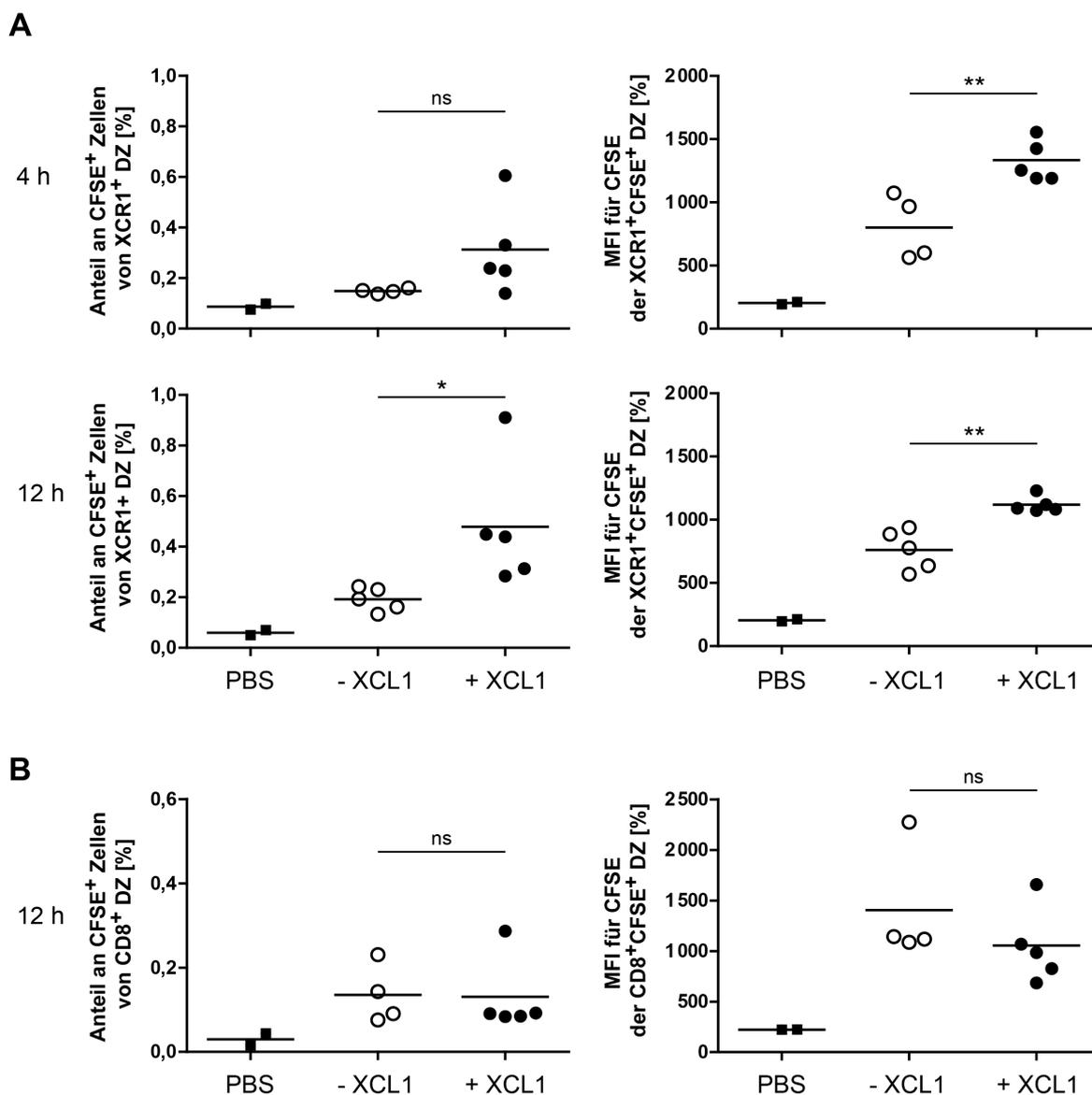


Abb. 16: Nekrotische Zellen, an die XCL1 gebunden ist, werden verstärkt von XCR1⁺ DZ aufgenommen
 C57BL/6 (A) oder B6.XCR1:LacZ (B) Mäusen wurden 1×10^7 hitzeschockbehandelte Milzzellen aus C57BL/6 Mäusen, die nicht mit XCL1 behandelt waren oder die über Nacht mit 1 $\mu\text{g/ml}$ XCL1 inkubiert worden sind, i.v. injiziert. Nach 4 h oder 12 h wurden die Milzen entnommen und das CFSE-Signal der aufgenommenen Zellen in XCR1⁺ DZ analysiert. Dargestellt ist der Anteil CFSE⁺ Zellen an XCR1⁺ DZ in C57BL/6 (A) oder CD8⁺ DZ in B6.XCR1:LacZ (B) und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des CFSE-Signals der XCR1⁺ DZ (A) oder CD8⁺ DZ (B), welche positiv für CFSE waren.

XCL1, welches an tote Zellen gebunden hat, kann also die Aufnahme solcher Zellen verstärken und damit möglicherweise zu einem effizienten Entfernen von toten Zellen aus dem Körper führen.

3.3.2.3 Nekrotische Zellen, an die XCL1 gebunden ist, induzieren eine verstärkte CD8⁺ T-Zellproliferation

Der Einfluss von XCL1-dekorierten Zellen auf die CD8⁺ T-Zellstimulation wurde in einem OT-I-Transfersystem untersucht. Einen Tag nach dem Transfer wurden Mäuse mit nekrotischen Milzzellen aus OVA-transgenen Mäusen immunisiert. Diese Zellen exprimieren OVA konstitutiv, sezernieren es aber nicht. Die nekrotischen Zellen wurden mit XCL1 dekoriert und die Proliferation der antigenspezifischen OT-I-T-Zellen nach zwei Tagen untersucht. Als Negativkontrolle wurde Mäusen PBS injiziert, das keine Proliferation auslösen sollte. Nekrotische Zellen, an die kein XCL1 gebunden war, induzierten nur eine sehr geringe Proliferation von ca. 12 % der CD8⁺ T-Zellen (Abb. 17A). Diese Proliferation wurde deutlich verstärkt auf 50 %, wenn die Mäuse mit XCL1-dekorierten nekrotischen Zellen immunisiert worden sind. Um unspezifische Effekte ausschließen zu können, wurden in einem weiteren Experiment XCR1-defiziente Mäuse mit XCL1-dekorierten Zellen immunisiert. In diesen Mäusen wurde keine signifikante Verstärkung der Proliferation antigenspezifischer T-Zellen festgestellt (Abb. 17 B).

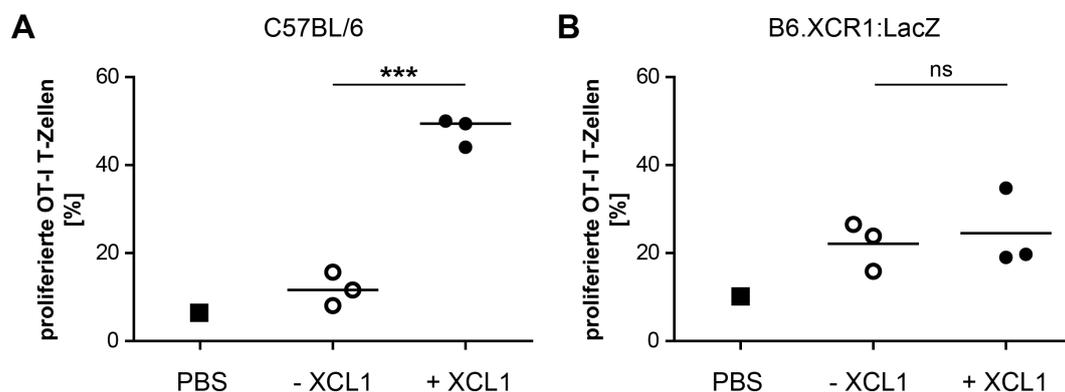


Abb. 17: Nekrotische Zellen, an die XCL1 gebunden ist, induzieren eine verstärkte CD8⁺ T-Zellproliferation

C57BL/6 (A) oder B6.XCR1:LacZ (B) Mäusen wurden 2×10^6 CFSE-markierte OT-I-Zellen i.v. injiziert und einen Tag später wurden die Mäuse mit 1×10^7 hitzeschockbehandelten Milzzellen aus B6.OVA^{tg} Mäusen, die nicht mit XCL1 behandelt waren (-XCL1) oder die über Nacht mit 1 µg/ml XCL1 inkubiert worden sind (+XCL1), i.v. immunisiert. Als Kontrolle wurde PBS injiziert. Zwei Tage später wurden die Milzzellen isoliert und die Proliferation der OT-I-T-Zellen (CD8⁺CD90.1⁺) anhand der Abnahme des CFSE-Signals bestimmt.

Die Bindung von XCL1 an nekrotische Zellen führt zu einer verstärkten Aufnahme dieser Zellen durch XCR1⁺ DZ und zu einer stärkeren Proliferation antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen. Dies könnte entweder an der besseren Aufnahme der Zellen oder an einer zusätzlichen Wirkung der XCL1-XCR1-Interaktion liegen.

3.4 Spezifische Antigenbeladung kreuzpräsentierender Zellen über XCR1

XCR1⁺ DZ sind spezialisiert auf die Kreuzpräsentation von Antigenen und damit auf die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen. Deswegen ist dieser Subtyp von DZ von besonderer Bedeutung bei der Entwicklung neuer Impfstoffe, die effektive zytotoxische T-Zellantworten induzieren. XCR1 ist in seiner Expression nur auf kreuzpräsentierende DZ beschränkt und daher ein ideales Ziel für eine hochspezifische Antigenbeladung dieser Zellen. Die Beladung kann über XCL1, den einzigen Liganden von XCR1, und über den XCR1-spezifischen Antikörper erfolgen.

Für die Beladung über den Liganden XCL1 wurde dieser als Fusionsprotein mit OVA (fusioniert an den C-Terminus) exprimiert (hier XCL1-OVA genannt). Die Herstellung des Fusionsproteins erfolgte durch Dr. H.-W. Mages. Für die zweite Strategie zur spezifischen Antigenbeladung wurde OVA an den XCR1-spezifischen Antikörper MARX10 chemisch gekoppelt. Die so hergestellte Verbindung wird im Folgenden MARX-OVA genannt. Von beiden Konstrukten wurde die Proteinkonzentration mit dem BCA-Assay bestimmt. Die im Folgenden angegebenen Mengen beziehen sich daher jeweils auf das ganze Konstrukt und nicht auf den Gehalt an OVA.

3.4.1 XCL1-OVA und MARX-OVA aktivieren ohne Adjuvans dendritische Zellen *in vivo* nicht

Im ersten Schritt wurde die Wirkung der Beladungsreagenzien auf die Aktivierung der DZ untersucht. Da beide Reagenzien spezifisch an XCR1⁺ DZ binden, besteht die Möglichkeit, dass durch die Aufnahme eine Aktivierung der DZ hervorgerufen wird. Um dies zu testen wurden Mäusen XCL1-OVA oder MARX-OVA i.v. injiziert und 12 h später die DZ-Aktivierung anhand verschiedener Aktivierungsmarker (Kostimulationsmoleküle) bestimmt. DZ reagieren sehr empfindlich auf Adjuvantien wie z. B. das Endotoxin LPS. Dieses wurde als Positivkontrolle mitgeführt. Als Kontrolle für den Ruhezustand wurde den Mäusen PBS injiziert. Nach Gabe von LPS erfolgte eine starke Heraufregulation der Kostimulationsmoleküle CD40, CD80, CD86 und PD-L2. Mit XCL1-OVA und MARX-OVA war nach 12 h keine verstärkte Expression dieser Aktivierungsmarker zu sehen (Abb. 18). Auch bei Betrachtung der einzelnen DZ-Subtypen unterteilt in ihre Expression von XCR1 und CD8 war keine Aktivierung durch die beiden Beladungsreagenzien zu sehen (nicht gezeigt).

Daher kann in folgenden Studien die Aktivierung der DZ allein durch die Beladungsreagenzien als unwahrscheinlich betrachtet werden.

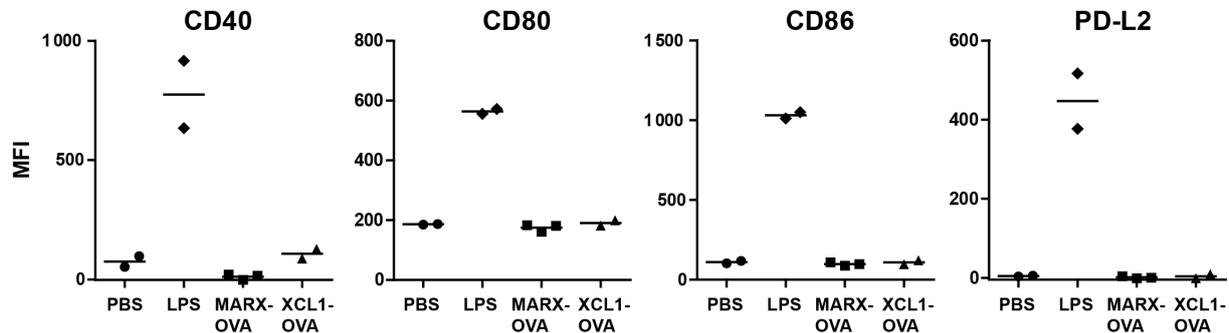


Abb. 18: XCL1-OVA und MARX-OVA aktivieren dendritische Zellen *in vivo* nicht

C57BL/6 Mäusen wurden PBS, 3 µg LPS, 5 µg MARX-OVA oder 5 µg XCL1-OVA i.v. injiziert und 12 h später wurden die DZ der Milz durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der Aktivierungsmarker CD40, CD80, CD86 und PD-L2 auf gesamten DZ (CD11c⁺MHCII⁺Lin⁻).

3.4.2 Immunisierungen mit XCL1-OVA und MARX-OVA aktivieren antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen

Eine Aktivierung von T-Zellen führt zur klonalen Expansion der antigenspezifischen T-Zellen sowie zur Heraufregulation kostimulatorischer Moleküle, die mit DZ interagieren, welche das spezifische Antigen präsentieren. Die Aktivierung der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen nach Immunisierung mit den Beladungsreagenzien wurde anhand des Transfers von OT-I-Zellen untersucht. Die Mäuse wurden mit XCL1-OVA oder MARX-OVA immunisiert. Als Vergleich dienten 20 µg OVA, dessen Menge damit ungefähr der höchsten Titrationstufe von XCL1-OVA (20 µg) entsprach. Die Mengen an XCL1-OVA und MARX-OVA wurden titriert, um eine optimale Proliferation der CD8⁺ T-Zellen zu erreichen. Die transferierten OT-I-Zellen zeigten in den mit PBS immunisierten Kontrollmäusen eine Hintergrundproliferation von ca. 20 % (Abb. 19 A, B). Die Gabe von 20 µg OVA führte zur Proliferation von rund 60 % der antigenspezifischen T-Zellen. Mit hohen Mengen an XCL1-OVA (5 bis 20 µg) konnte eine Proliferation von fast 100 % erreicht werden (Abb. 19 A). Bei ca. 0,5 µg XCL1-OVA entsprach die Proliferation der CD8⁺ T-Zellen der bei 20 µg OVA. XCL1-OVA ist also 40mal effizienter als lösliches OVA in der Induktion der CD8⁺ T-Zellproliferation. Die Immunisierung mit MARX-OVA bewirkte mit 2,5 µg die Proliferation von ca. 95 % der T-Zellen (Abb. 19 B). Auch hier entsprach die Proliferation bei

0,5 μg ungefähr der von 20 μg OVA. Die an den Antikörper gekoppelte Menge OVA kann je nach Kopplung variieren. Daher schwankt die Effizienz von MARX-OVA je nach verwendeter Charge. Die hier gezeigte Charge von MARX-OVA wurde in allen weiteren Experimenten eingesetzt.

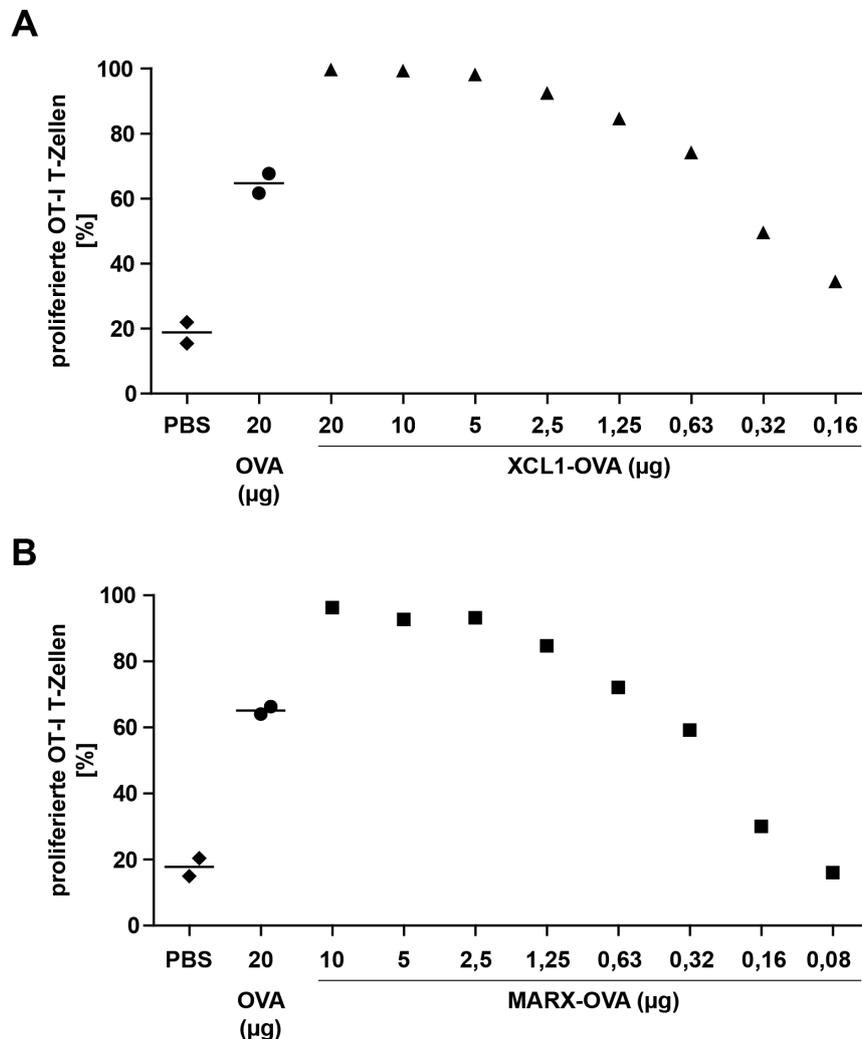


Abb. 19: Immunisierung mit XCL1-OVA oder MARX-OVA führt zur Proliferation antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen

C57BL/6 Mäusen wurden 2×10^6 CFSE-markierte OT-I-Zellen i.v. injiziert. Einen Tag später wurden die Mäuse mit verschiedenen Mengen XCL1-OVA (A) oder MARX-OVA (B) i.v. immunisiert. Als Kontrollen wurden OVA oder PBS injiziert. Zwei Tage nach Immunisierung wurden die Milzzellen isoliert und die Proliferation der OT-I-T-Zellen (CD8⁺CD90.1⁺) anhand der Abnahme des CFSE-Signals bestimmt.

Zum Test der Spezifität der Beladung wurden B6.XCR1:LacZ Mäuse mit beiden Reagenzien immunisiert. In diesen Mäusen war mit 5 μg XCL1-OVA eine leichte Proliferation der CD8⁺ T-Zellen zu erkennen, die aber deutlich unter der durch 20 μg OVA induzierten Proliferation lag (Abb. 20 A). Mit 1 μg XCL1-OVA entsprach die Proliferation der T-Zellen denen der PBS-Gruppe, also einer Hintergrundproliferation. Ab 5 μg ist demnach nicht allein

die Bindung von XCL1 an XCR1 sondern auch unspezifische Effekte ausschlaggebend für die T-Zellproliferation, während 1 μg XCL1-OVA ausschließlich an XCR1⁺ DZ bindet. MARX-OVA zeigte in XCR1-defizienten Mäusen mit 10 μg eine sehr schwache T-Zellproliferation, die kaum über der PBS-Kontrolle lag, und keine Reaktion mit 1 μg (Abb. 20 B).

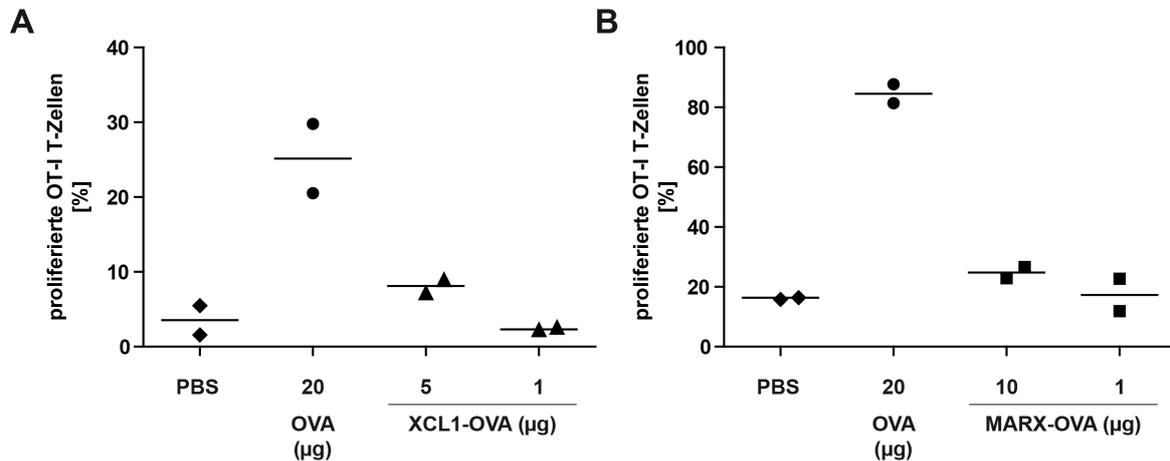


Abb. 20: Immunisierung mit XCL1-OVA oder MARX-OVA führt in XCR1-defizienten Mäusen nicht zur Proliferation antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen

B6.XCR1:LacZ Mäusen wurden 2×10^6 CFSE-markierte OT-I-Zellen i.v. injiziert. Einen Tag später wurden die Mäuse mit verschiedenen Mengen XCL1-OVA (A) oder MARX-OVA (B) i.v. immunisiert. Als Kontrollen wurden OVA oder PBS injiziert. Zwei Tage nach Immunisierung wurden die Milzzellen isoliert und die Proliferation der OT-I-T-Zellen (CD8⁺CD90.1⁺) anhand der Abnahme des CFSE-Signals bestimmt.

Weiterhin wurde die frühe Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen nach 24 h analysiert. Erkennen T-Zellen ihr spezifisches Antigen, welches von DZ präsentiert wird, regulieren sie kostimulatorische Moleküle hoch. Diese Aktivierung wurde durchflusszytometrisch nach Transfer von OT-I-Zellen gemessen.

Die mit PBS immunisierten Mäuse zeigten keine Expression der Aktivierungsmarker im Ruhezustand. Die Injektion von poly I:C als Adjuvans allein führte zu keiner Heraufregulation der Aktivierungsmarker. Die antigenspezifischen T-Zellen zeigten nach Immunisierung mit beiden Reagenzien ohne Adjuvans eine leichte Aktivierung durch Heraufregulation von 4-1BB, CD25, CD69, CD160, ICOS, PD-1 und PD-L1 (Abb. 21). RANK-L wurde ohne Zugabe von Adjuvans sehr stark hochreguliert. Ohne Adjuvans produzierten die T-Zellen auch etwas XCL1. Mit poly I:C als Adjuvans änderte sich der Aktivierungsstatus der CD8⁺ T-Zellen drastisch. Die Expression aller Aktivierungsmarker war deutlich gesteigert mit Ausnahme von RANK-L. Die CD8⁺ T-Zellen produzierten

wesentlich mehr XCL1 als ohne Gabe von Adjuvans. Nur durch die zusätzliche Gabe von poly I:C kam es auch zur Produktion von IFN- γ . Die Aktivierung der antigenspezifischen T-Zellen unterschied sich zwischen Immunisierung mit XCL1-OVA und MARX-OVA kaum. In beiden Fällen wurden die CD8⁺ T-Zellen nur mit zusätzlichem Adjuvans deutlich aktiviert.

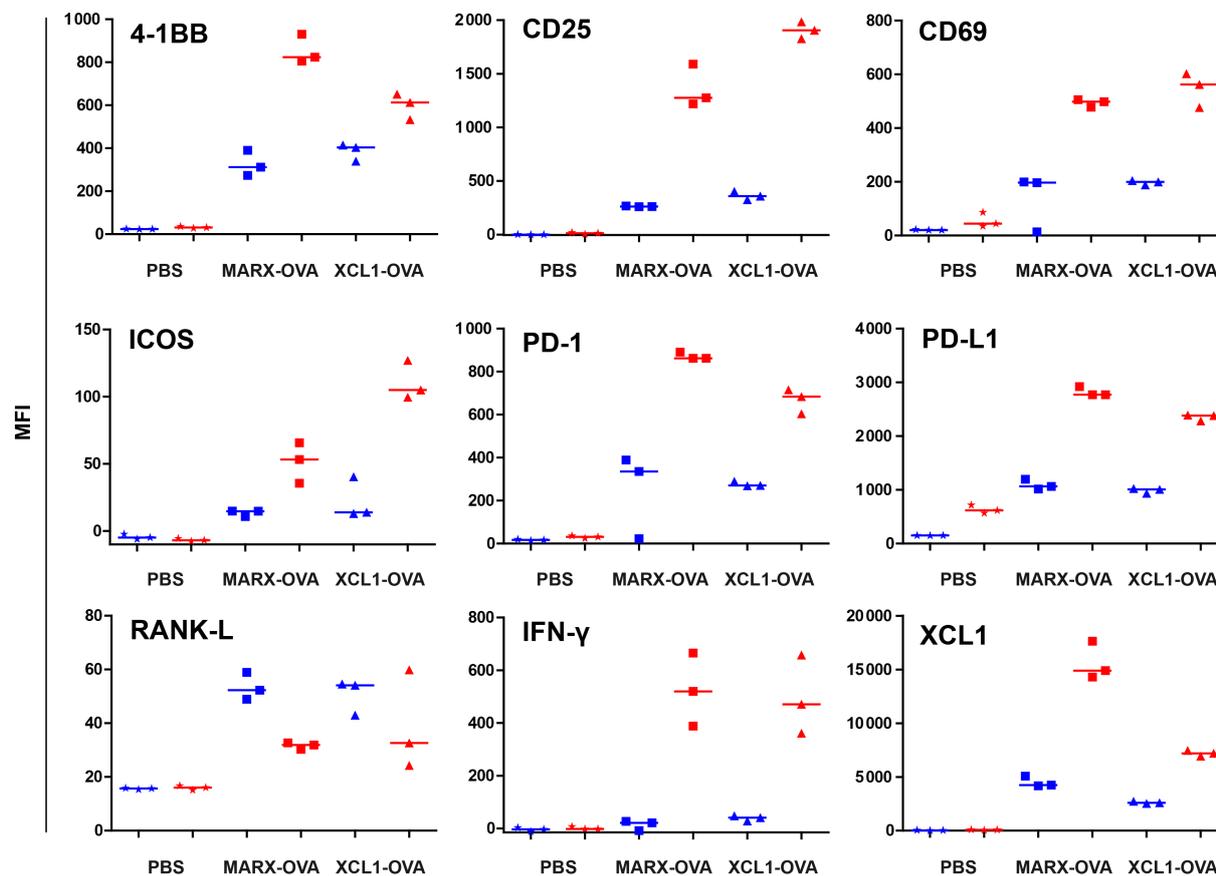


Abb. 21: Immunisierung mit XCL1-OVA oder MARX-OVA führt zur Aktivierung antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen nach 24 h

C57BL/6 Mäusen wurden 2×10^6 OT-I-Zellen i.v. injiziert. Einen Tag später wurden die Mäuse mit 1,25 μg XCL1-OVA oder 1,25 μg MARX-OVA mit (rot) und ohne (blau) 3 μg poly I:C i.v. immunisiert. Zur Kontrolle wurde PBS injiziert. Einen Tag nach Immunisierung wurden die Milzzellen isoliert und der Aktivierungsstatus der T-Zellen bestimmt. Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) verschiedener Oberflächenmoleküle auf den CD8⁺CD90.1⁺ T-Zellen. Für die Analyse von XCL1 und IFN- γ wurden die Milzzellen 3 h mit Brefeldin A bei 37 °C inkubiert und für die intrazelluläre Färbung von XCL1 und IFN- γ fixiert.

3.4.3 Immunisierungen mit XCL1-OVA und MARX-OVA führen zur Bildung antigenspezifischer Antikörper

Im Zuge einer Immunantwort kommt es nicht nur zur Ausbildung zytotoxischer T-Zellen, sondern auch zur Aktivierung von antikörperproduzierenden B-Zellen. Um zu überprüfen, ob die spezifische Beladung von XCR1⁺ Zellen auch zu einer B-Zellaktivierung und einer damit verbundenen Antikörperantwort kommt, wurde der Gehalt an OVA-spezifischen Antikörpern im Serum von Mäusen bestimmt, die mit MARX-OVA oder XCL1-OVA immunisiert waren. Zur Kontrolle der durch die Beladungsreagenzien induzierten Antikörper wurden Mäuse mit PBS immunisiert. Diese zeigten im ELISA für OVA-spezifische Antikörper bei Verdünnungen des Serums 1:50 und 1:150 im Ruhezustand oder nach Gabe von poly I:C ein Signal, welches entweder durch unspezifische Bindungen von zu wenig verdünntem Serum oder durch im Serum enthaltene natürliche Antikörper hervorgerufen wurde (Abb. 22). Mit MARX-OVA immunisierte Mäuse wiesen einen schwachen aber signifikanten Gehalt an OVA-spezifischen Antikörpern ohne die Gabe von poly I:C auf, der deutlich über dem Signal der PBS-Gruppe lag. Bei Immunisierung mit XCL1-OVA ohne Adjuvans wurden keine Antikörper gegen OVA gebildet. Wurde zusätzlich zu XCL1-OVA oder MARX-OVA poly I:C als Adjuvans injiziert, konnten im Serum deutlich mehr Antikörper gegen OVA nachgewiesen werden. Die OVA-spezifischen Antikörper ließen sich dabei nach Immunisierung mit MARX-OVA und poly I:C selbst mit einer Serumverdünnung von 1:12 150 noch nachweisen, während nach Immunisierung mit XCL1-OVA und poly I:C die Detektion nur bis zu einer Serumverdünnung von 1:1 350 möglich war.

Es erfolgte also durch die Immunisierung im Zuge der Immunantwort eine Aktivierung von antikörperproduzierenden B-Zellen. Auffällig ist, dass MARX-OVA auch ohne Adjuvans im Gegenteil zu XCL1-OVA die Bildung von Antikörpern bewirkt. Hier gibt es offensichtlich Unterschiede zwischen den beiden Immunisierungsstrategien. Außerdem wurde durch Immunisierung mit MARX-OVA ein höherer Gehalt an antigenspezifischen Antikörpern erreicht als durch XCL1-OVA.

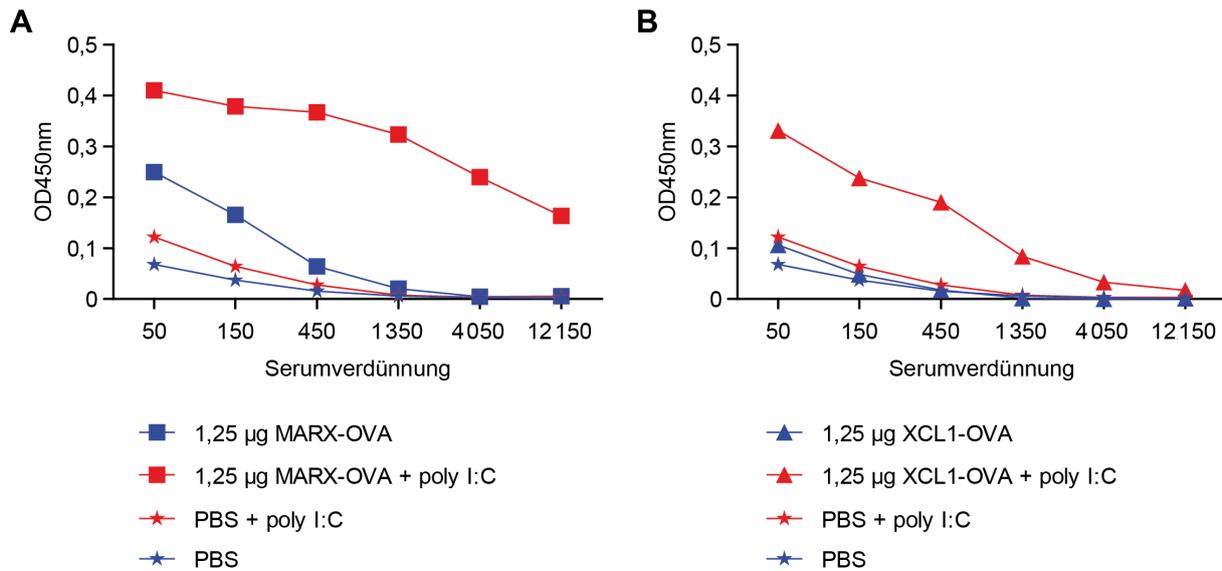


Abb. 22: Immunisierung mit XCL1-OVA oder MARX-OVA führt zur Bildung antigenspezifischer Antikörper

C57BL/6 Mäuse wurden mit (A) 1,25 µg MARX-OVA oder (B) 1,25 µg XCL1-OVA jeweils mit und ohne 3 µg poly I:C immunisiert. Den Mäusen wurde 14 Tage später Blut entnommen und daraus Serum gewonnen. Die Menge an Gesamt-Ig im Serum wurde mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte von jeweils drei Tieren.

3.4.4 Immunisierung mit XCL1-OVA verhindert das Wachstum eines Tumors

Einige Pathogene, wie z. B. *Helicobacter pylori* oder humane Papillomaviren, können durch Infektion die Bildung von Tumoren auslösen (Moss und Blaser, 2005). Um dies zu verhindern, ist eine ausgeprägte zytotoxische T-Zellantwort nötig, welche infizierte Zellen effizient beseitigt. In ersten Versuchen unserer Arbeitsgruppe (von M. Becker) ist eine gut ausgeprägte Zytotoxizität der CD8⁺ T-Zellen nach Immunisierung mit XCL1-OVA und MARX-OVA zu erkennen, die zu 100 % Eliminierung von Zielzellen führte. Die spezifische Beladung der kreuzpräsentierenden Zellen über XCR1 stellt daher ein vielversprechendes Modell zur Verhinderung von pathogeninduzierten Tumoren dar. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden Mäuse mit XCL1-OVA immunisiert. Eine Woche später wurde ihnen eine aggressive Tumorzelllinie (E.G7) subkutan injiziert, welche OVA exprimiert.

In Kontroll-Mäusen, die PBS bekommen hatten, waren nach 7 Tagen kleine Tumore mit einer ungefähren Fläche von 40 mm² gewachsen (Abb. 23 A). Diese wiesen nach 14 Tagen eine Fläche von 100 mm² auf und die Tiere wurden getötet. Die Tumore bildeten einen eingekapselten Bereich unter der Haut mit jeweils einem ausgeprägten Blutgefäß (Abb. 23 B).

Waren die Mäuse dagegen mit XCL1-OVA in Kombination mit LPS immunisiert worden, so konnten selbst nach 14 Tagen keine Tumore in den Mäusen gefunden werden. Auch nach 21 Tagen waren keine Tumore gewachsen (nicht gezeigt). Die durch die Immunisierung mit XCL1-OVA hervorgerufene zytotoxische T-Zellantwort ist demzufolge in der Lage ein Tumorwachstum zu verhindern.

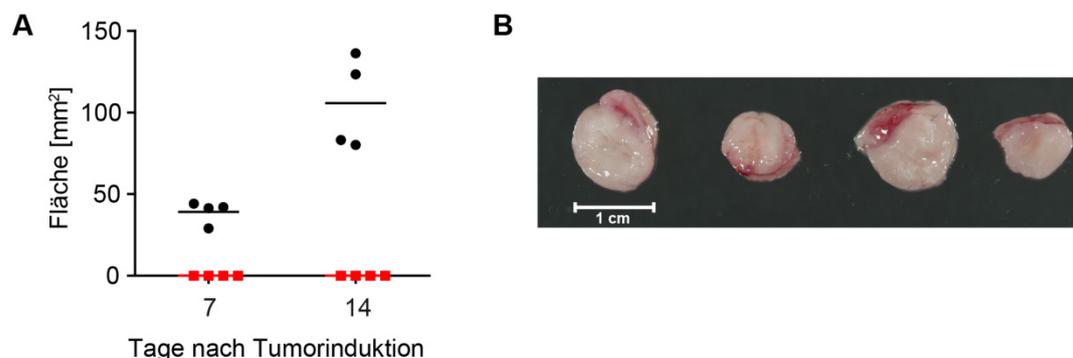


Abb. 23: Immunisierung mit XCL1-OVA verhindert das Wachstum eines Tumors

C57BL/6 Mäuse wurden mit 5 µg XCL1-OVA mit 5 µg LPS immunisiert, 6 Tage später wurden $0,6 \times 10^6$ E.G7-Zellen s.c. injiziert. A) Die Tumorgroße (Fläche = Länge x Breite) wurde an den lebenden Mäusen mit einem Messschieber gemessen. B) 14 Tage nach Injektion der Tumorzellen wurden die Mäuse getötet und der Tumor von den Mäusen entfernt. Gezeigt sind die Tumore der mit PBS immunisierten Mäuse, da in den mit XCL1-OVA immunisierten Mäusen keine Tumore gefunden wurden.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine spezifische Antigenbeladung von kreuzpräsentierenden Zellen über XCR1 zu einer Aktivierung von $CD8^+$ T-Zellen führt, die antigenspezifisch ein Tumorwachstum verhindern können.

3.5 XCR1-Expression im Menschen

Zur Entwicklung eines Impfstoffes, basierend auf der spezifischen Antigenbeladung kreuzpräsentierender Zellen über XCR1, muss dieses System auf den Menschen übertragbar sein. Die wichtigste Voraussetzung ist eine ähnlich selektive Expression von XCR1 auf kreuzpräsentierenden DZ wie in der Maus. Im Menschen gibt es verschiedene DZ-Subtypen, die zu Beginn dieser Arbeit wenig charakterisiert waren. Auch war nicht bekannt, welche Zellen im Menschen XCR1 exprimieren. Aus den Ergebnissen der Genexpressionsstudien von Robbins *et al.* (2008) wurde hergeleitet, dass die $CD141^+$ DZ des menschlichen Blutes mit

den CD8⁺ DZ der Maus homolog sind. Die hier aufgeführten Arbeiten mit menschlichem Blut wurden wegen der Komplexität zusammen mit A. Bachem und S. Güttler durchgeführt.

3.5.1 XCR1 wird im menschlichen Blut nur auf CD141⁺ dendritischen Zellen exprimiert

Die konventionellen DZ des humanen Blutes werden in drei Subtypen unterteilt: CD1c⁺, CD16⁺ und CD141⁺ DZ (Dzionic *et al.*, 2000; MacDonald *et al.*, 2002). Mittels quantitativer *real time* PCR (qRT-PCR) wurde die Expression von XCR1 in nur einem Subtyp der DZ des menschlichen Blutes nachgewiesen. XCR1-mRNA wurde nur von CD141⁺ DZ exprimiert, während die anderen DZ-Populationen, die CD16⁺ DZ, CD1c⁺ DZ und pDZ keine XCR1-Expression zeigten (nicht gezeigt, Bachem *et al.*, 2010). Auch andere Zellpopulationen exprimierten kein XCR1 (nicht gezeigt, Bachem *et al.*, 2010).

Da murines XCL1 auch an humanes XCR1 bindet (Shan *et al.*, 2000), wurden die humanen DZ auf ihre Oberflächenexpression von XCR1 über das ligandbasierte Färbesystem untersucht. Von den CD141⁺ DZ exprimierten ca. 75 % XCR1 auf der Oberfläche (Abb. 24). Die CD1c⁺ und CD16⁺ DZ, zusammengefasst als CD141⁻ DZ, zeigten keine Oberflächenexpression von XCR1. Damit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass XCR1 auf der Oberfläche der CD141⁺ DZ exprimiert wird.

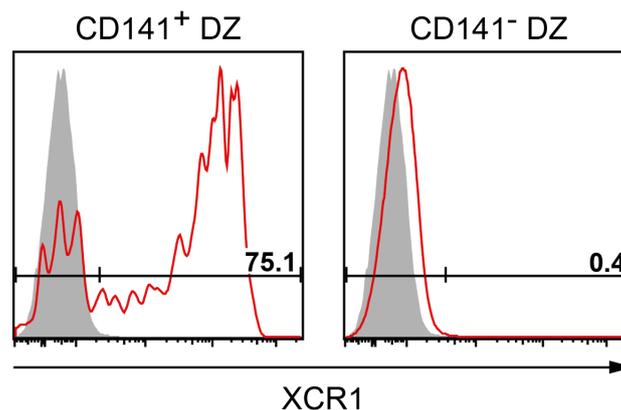


Abb. 24: XCR1 wird nur auf der Oberfläche der CD141⁺ dendritische Zellen exprimiert

Die XCR1-Expression auf mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wurde mit dem XCL1-Färbereagenz untersucht. Dargestellt sind DZ (CD11c⁺HLA-DR⁺CD3⁻CD14⁻CD19⁻CD56⁻) unterteilt in CD141⁺ und CD141⁻ DZ. Färbung mit XCL1 in rot, Sekundärreagenz allein in grau.

3.5.2 Etablierung einer Strategie zum gleichzeitigen Sortieren aller Populationen der dendritischen Zellen aus humanem Blut

Um die verschiedenen DZ-Subtypen in funktionellen Studien vergleichen zu können, war es erforderlich eine Strategie zur Sortierung aller DZ-Subtypen aus einem Blutspender zu entwickeln. Für die Sortierung wurden die $CD141^+$ DZ nur als eine Population behandelt und nicht nach ihrer XCR1-Expression aufgeteilt, da der Anteil der $CD141^+$ DZ in den mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) zu gering war. Die PBMC wurden aus *buffy coats* mittels Ficoll-Gradienten isoliert. Aus diesen wurden in schrittweisen magnetischen Sortierungen nacheinander die einzelnen DZ-Typen angereichert. Nach der ersten magnetischen Sortierung der $CD141^+$ DZ lagen diese zu ca. 5 % vor. Aus dem $CD141^+$ Durchfluss wurden die $CD1c^+$ DZ zu 60 % angereichert. Der Durchfluss dieser Sortierung wurde wiederum für die Anreicherung der $CD16^+$ DZ auf ca. 20 % benutzt. Der Grad der Anreicherung schwankte abhängig von den jeweiligen Spendern. Die angereicherten DZ konnten anhand des in Abb. 25 gezeigten Schemas zu >99 % Reinheit mittels Durchflusszytometrie sortiert werden. Die hohe Reinheit garantierte in anschließenden Untersuchungen (qRT-PCR und Kreuzpräsentationsassays, gezeigt in Bachem *et al.*, 2010) den Ausschluss kontaminierender Populationen und daraus resultierende Verfälschung der Ergebnisse.

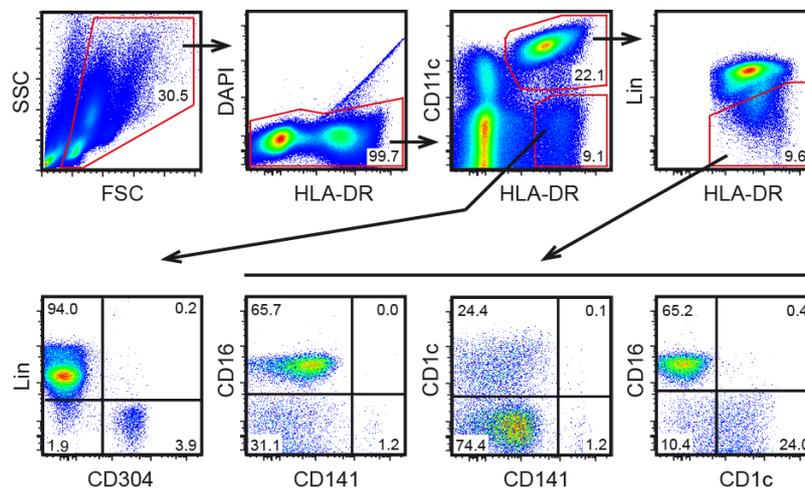


Abb. 25: Strategie zur Sortierung humaner dendritischer Zellen

Aus menschlichem peripherem Blut wurden PBMC mittels Dichtegradientenzentrifugation angereichert und die dargestellten Oberflächenmoleküle für eine durchflusszytometrische Analyse gefärbt. Die durchflusszytometrische Sortierung (nach Voranreicherung durch magnetische Sortierungen) erfolgte anhand des hier dargestellten Schemas zur Ein- und Ausgrenzung von verschiedenen Zellpopulationen. Bei der Sortierung von DZ wurden immer die linienspezifischen Moleküle (Lin) CD3, CD14, CD19 und CD56 ausgeschlossen.

3.5.3 CD141⁺ dendritische Zellen migrieren als einzige Zellen zu XCL1

Um eine Funktionalität des Chemokinrezeptors XCR1 und seine Bindung an humanes XCL1 nachzuweisen, wurden die sortierten Zellen einem Migrationsassay unterzogen. Dafür wurden 20 % CD141⁺, 40 % CD1c⁺ und 40 % CD16⁺ DZ gemischt. Durch das konstante Verhältnis konnte eine Behinderung der sehr kleinen CD141⁺ Zellpopulation (normalerweise nur 1 % der Gesamt-DZ) im Migrationsassay vermieden werden.

Bei verschiedenen eingesetzten Mengen von XCL1 ist zu erkennen, dass nur die CD141⁺ DZ zu XCL1 wandern (Abb. 26 A). Bei der optimalen XCL1-Konzentration von 1000 µg/ml wanderten rund 40 % der CD141⁺ DZ zu XCL1. Mit höherer Konzentration sank der Anteil der migrierenden CD141⁺ DZ auf 20 %. Dies ist ein Indiz für eine wirkliche Chemotaxis und nicht reine Chemokinese. In einer „Checkerboard“-Analyse, bei der XCL1 direkt zu den Zellen gegeben wurde, wanderten keine CD141⁺ DZ (nicht gezeigt). XCL1 wirkt demnach als Chemokin auf CD141⁺ DZ. Auffällig war außerdem, dass die CD141⁺ DZ eine sehr schwache unspezifische Migration ohne Chemokin aufwiesen (<1 %). Dagegen zeigten schon ca. 3 % der CD1c⁺ DZ und ca. 20 % aller CD16⁺ DZ eine unspezifische Hintergrundwanderung. Allerdings wanderten die CD1c⁺ und CD16⁺ DZ nicht zu XCL1. Die Migrationsfähigkeit der anderen DZ-Typen wurde mit einem Gemisch aus verschiedenen Chemokinen getestet (Positivkontrolle). Die CD1c⁺ und CD16⁺ DZ zeigten eine Migration von 50 % bzw. 40 % zu CCL2, CCL21 und CX3CL1. Ihre Unfähigkeit zu XCL1 hin zu wandern beruht also nicht auf einer allgemeinen Unfähigkeit *in vitro* wandern zu können.

Weiterhin wurden diverse andere Zellpopulationen auf Chemotaxis zu XCL1 hin untersucht. Weder pDZ, Monozyten, Granulozyten, T-Zellen, B-Zellen oder NK-Zellen migrierten zu XCL1 (Abb. 26 B). Dass sie *in vitro* zur Migration grundsätzlich befähigt waren, zeigten die Kontrollen mit CXCL12 oder CXCL8.

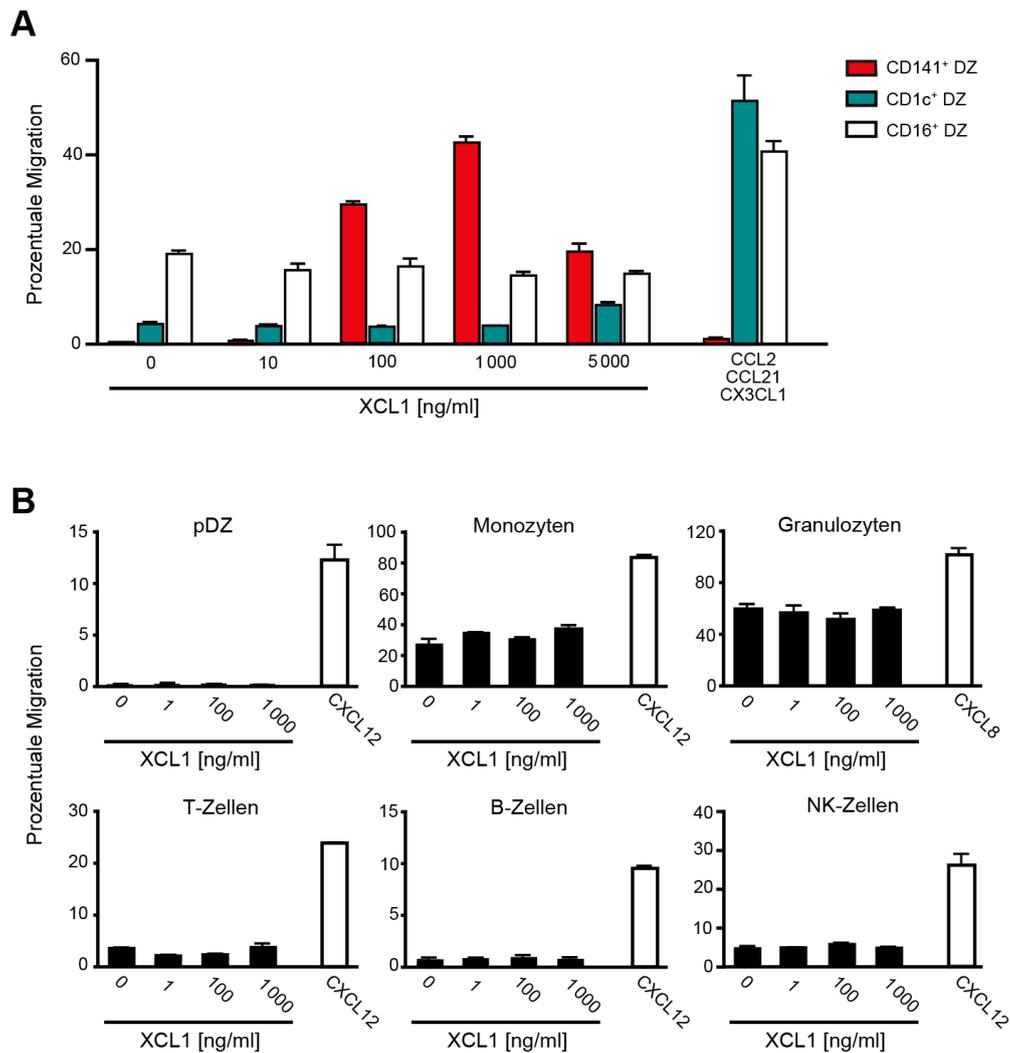


Abb. 26: Nur CD141⁺ DZ, aber keine anderen Zellpopulationen migrieren zu XCL1

A) Die humanen DZ-Subtypen wurden durch magnetische und durchflusszytometrische Sortierung angereichert und gemischt im Transwell-Assay verwendet (20 % CD141⁺, 40 % CD1c⁺ und 40 % CD16⁺ DZ). Es wurden verschiedene Konzentrationen an humanem XCL1 eingesetzt. Als Positivkontrolle für die CD1c⁺ und CD16⁺ DZ diente ein Gemisch aus CCL2, CCL21 und CX3CL1. Nach 2,5 h Inkubation bei 37 °C wurden die gewanderten Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die prozentuale Migration (Anteil der gewanderten Zellen bezogen auf die Anzahl der eingesetzten Zellen) der DZ-Subtypen. B) Für den Transwell-Assay wurden pDZ magnetisch sortiert. Monozyten, B- und NK-Zellen wurden nach Depletion von CD3 durch magnetische Sortierung eingesetzt. Zur Untersuchung der T-Zellen wurden Gesamt-PBMC verwendet. Granulozyten wurden aus Vollblut nach Erythrozytenlyse chemotaktisch untersucht. CXCL12 und CXCL8 dienen als Positivkontrollen.

Die Ergebnisse zeigen, dass XCR1 im Menschen sehr spezifisch auf CD141⁺ DZ im Blut exprimiert wird und diese Zellen zu XCL1 migrieren. Der Chemokinrezeptor ist funktionell aktiv und interagiert mit XCL1. Außerdem wurde im Rahmen dieser Arbeiten gezeigt, dass die XCR1⁺ DZ die effizientesten kreuzpräsentierenden Zellen sind (publiziert in Bachem *et al.*, 2010). Sie gelten daher als homolog zu den XCR1⁺ kreuzpräsentierenden Zellen der Maus. Damit sind die Voraussetzungen für ein spezifisches Beladen der humanen kreuzpräsentierenden Zellen über XCR1 erfüllt.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde erstmals ein für den Chemokinrezeptor XCR1 spezifischer monoklonaler Antikörper generiert. Dieser ermöglichte die Analyse der XCR1-Oberflächenexpression in diversen Organen. So konnte gezeigt werden, dass XCR1 ein linienspezifischer Marker für kreuzpräsentierende dendritische Zellen (DZ) ist. Der Antikörper konnte außerdem zur spezifischen Antigenbeladung der kreuzpräsentierenden XCR1⁺ DZ verwendet werden und damit zytotoxische CD8⁺ T-Zellantworten induzieren. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Ligand für XCR1, das Chemokin XCL1, an sterbende Zellen bindet. Damit führt er u. a. zu einer besseren Aufnahme dieser Zellen durch XCR1⁺ DZ. Außerdem konnte die selektive Expression von XCR1 auch im Menschen auf kreuzpräsentierenden DZ nachgewiesen werden, was eine Voraussetzung für die Übertragung der spezifischen Antigenbeladung auf den Menschen ist.

4.1 Generierung eines XCR1-spezifischen monoklonalen Antikörpers

Der Chemokinrezeptor XCR1 wird nur von einer Subpopulation von DZ in der Maus exprimiert. Aufgrund eines fehlenden Antikörpers gegen XCR1 konnte dies nur anhand einer LacZ-Reportermaus für XCR1 und qRT-PCR-Analysen verschiedener Zellpopulation gezeigt werden (Dorner *et al.*, 2009). Die Expression von XCR1 auf der Oberfläche konnte mit diesen Methoden allerdings nicht nachgewiesen werden. Innerhalb dieser Arbeit wurde eine Färbung von XCR1 auf der Zelloberfläche über seinen Liganden, das Chemokin XCL1, etabliert. Diese Färbemethode zeigt allerdings eine relativ hohe Hintergrundfärbung, ist nicht in der Histologie und für funktionelle Studien nutzbar und kostenintensiv. Daher sollte in dieser Arbeit auch ein XCR1-spezifischer monoklonaler Antikörper generiert werden.

Mehrere Versuche in unserer Arbeitsgruppe mit XCR1-exprimierenden Transfektanten waren leider nicht erfolgreich. Allgemein ist die Generierung von Antikörpern gegen G-Proteingekoppelte Rezeptoren, wie z. B. Chemokinrezeptoren, oft schwierig. Sie lassen sich in Transfektanten meist nur schwach auf der Oberfläche exprimieren und können auch nicht als stabiles lösliches Protein synthetisiert werden (Hutchings *et al.*, 2010). In dieser Arbeit wurde erstmalig ein XCR1-spezifischer monoklonaler Antikörper generiert. Für die Immunisierung wurden XCR1-exprimierende DZ verwendet. XCR1 zeigt auf DZ eine deutlich höhere Oberflächenexpression als auf den bisher verwendeten Transfektanten. Da die XCR1⁺ DZ

allerdings nur ca. 0,3 % der Milzzellen einer Maus darstellen, mussten sie zur Erhöhung der Antigendichte angereichert werden. Dies erfolgte durch die Gabe von Flt3-Ligand, da bekannt war, dass die Behandlung von Mäusen oder Menschen mit Flt3-Ligand zu einer starken Zunahme von DZ führt (Maraskovsky *et al.*, 1996; Maraskovsky *et al.*, 2000). Nach zusätzlicher Anreicherung der DZ *ex vivo* konnte für die Immunisierung eine Zellsuspension mit ca. 50 % XCR1⁺ Zellen eingesetzt werden. Für eine Immunreaktion gegen das gewünschte Molekül ist es wichtig, dass dieses als immunogen erkannt wird. Daher wurden Mäuse immunisiert, die XCR1 nicht exprimieren (B6.XCR1:LacZ^{+/+}). Ein weiterer Vorteil dieser Immunisierungsstrategie gegenüber dem Einsatz von Transfektanten war die Injektion syngener Zellen in XCR1-defiziente Mäuse. Somit war nur XCR1 in diesen Mäusen ein körperfremdes Protein. Aus über 2000 gewachsenen Hybridomen konnte ein Klon erhalten werden, welcher einen XCR1-spezifischen Antikörper produzierte. Dieser Antikörper (MARX10) ist für die durchflusszytometrische Analyse und histologische Untersuchungen geeignet. Außerdem blockiert er nicht die Interaktion zwischen XCR1 und seinem Liganden XCL1 und ist damit auch für funktionelle Studien einsetzbar, die nicht in diese Interaktion eingreifen sollen.

4.2 XCR1-Expression

Die histologische Untersuchung der Milz zeigte, dass sich die XCR1⁺ Zellen vor allem in der T-Zellzone, aber auch in der Marginalzone und der roten Pulpa befinden. In der roten Pulpa und der Marginalzone können die DZ Antigene aus dem einströmenden Blut aufnehmen und in der T-Zellzone präsentieren sie die prozessierten Antigene. Die Lokalisation in T-Zellzonen und Marginalzonen entspricht einigen immunhistologischen Nachweisen der Position von CD8⁺/CD207⁺ DZ (McLellan *et al.*, 2003; Idoyaga *et al.*, 2009). Damit bestätigen die Daten zu XCR1 die Lokalisation in T-Zellzone und Marginalzone im Gegensatz zu Studien, die CD205⁺ DZ, welche den CD8⁺ DZ weitestgehend entsprechen, nur in T-Zellzonen gezeigt haben (Kraal *et al.*, 1986; Witmer-Pack *et al.*, 1995).

Der Antikörper konnte in der Durchflusszytometrie im Gegensatz zur Histologie die selektive Expression von XCR1 auf einem Teil der DZ in der Maus zeigen. Auf T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, plasmazytoiden DZ, Granulozyten oder Makrophagen wurde keine XCR1-Expression nachgewiesen. XCR1 wird von ca. 85 % der CD8⁺ DZ und ca. 5 % der CD4⁻CD8⁻ DZ exprimiert. Damit passt seine Expression nicht in die klassische Einteilung der

konventionellen DZ nach ihrer CD8- und CD4-Expression (Vremec *et al.*, 2000). Funktionelle Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die XCR1⁺ DZ unabhängig von ihrer CD8-Expression v. a. zellassoziertes Antigen aufnehmen und kreuzpräsentieren können (Bachem *et al.*, 2012). XCR1 bietet zum ersten Mal die Möglichkeit, diese kreuzpräsentierenden DZ anhand nur eines Markers zu identifizieren.

Mit dem neuen Antikörper wurden auch andere Organe analysiert. In dieser Arbeit lag der Fokus auf der Untersuchung der XCR1-Expression in der Lunge und dem lungendränierenden (mediastinalen) Lymphknoten. Hier und in anderen peripheren Organen dient CD103 bisher als Marker für kreuzpräsentierenden Zellen (del Rio *et al.*, 2007; Henri *et al.*, 2007; Bedoui *et al.*, 2009b; del Rio *et al.*, 2010). In der Lunge ist die XCR1-Expression sehr gut mit CD103 und CD207 korreliert. CD207 wird in der Lunge von den CD103⁺ DZ exprimiert (Sung *et al.*, 2006) und wurde zur Depletion dieser Zellen in transgenen Mäusen benutzt (GeurtsvanKessel *et al.*, 2008). Die Analyse der DZ-Subpopulationen, unterteilt anhand ihre CD103- und CD11b-Expression, ergab, dass XCR1 auch von CD103⁻CD11b⁻ Zellen exprimiert wird, welche bisher oft als Makrophagen deklariert wurden (Sung *et al.*, 2006; GeurtsvanKessel *et al.*, 2008). Makrophagen wurden aber in der Analyse durch ihre hohe Autofluoreszenz (Vermaelen *et al.*, 2004) ausgeschlossen. Aufgrund ihrer XCR1-Expression handelt es sich höchstwahrscheinlich auch um einen Teil der DZ der Lunge und nicht um Makrophagen. Weiterhin wurde XCR1 auf CD103⁺CD11b⁺ Zellen detektiert. Diese Subpopulation ist nicht in allen Mausstämmen deutlich abgegrenzt von den CD103⁺CD11b⁻ DZ, sondern nur besonders deutlich ausgeprägt in den 129 WT und Balb/c Mäusen (Edelson *et al.*, 2010; Sung *et al.*, 2006). Hierbei handelt es sich möglicherweise um aktivierte CD103⁺ DZ, die CD11b hochreguliert haben (Sung *et al.*, 2006). Auf CD11b⁺ Zellen, die nicht CD103 exprimieren, konnte dagegen keine XCR1-Expression nachgewiesen werden. Weiterhin schloss sich die Expression von XCR1 mit der von CX3CR1 eindeutig aus. XCR1 korreliert in seiner Expression also nicht mit CD11b und CX3CR1, aber stark mit CD207 und CD103, den bisherigen Markern von kreuzpräsentierenden DZ in der Peripherie.

Die CD103⁺ DZ wandern nach Antigenaufnahme in den mediastinalen Lymphknoten, wo sie hauptsächlich an der Kreuzpräsentation beteiligt sind (del Rio *et al.*, 2007; GeurtsvanKessel *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009). Im mediastinalen Lymphknoten ist XCR1 auf den migratorischen DZ nur teilweise mit CD103 korreliert, denn es gibt auch CD103⁺ DZ, die nicht XCR1 exprimieren. Die residenten DZ des Lymphknotens zeigen eine ähnliche XCR1-Expression wie die residenten DZ der Milz. Hier korreliert XCR1 sehr stark mit CD8 und CD103, wobei

CD103 deutlich schwächer als auf migratorischen DZ exprimiert wird. Die Ergebnisse zeigen, dass auch in der Peripherie, hier am Beispiel der Lunge, die XCR1-Expression mit der bisherigen Klassifizierung der DZ nicht perfekt übereinstimmt. XCR1 ist deutlich besser zur Klassifizierung geeignet als CD103, da XCR1 auf keinen anderen Zelltypen exprimiert wird. Dagegen kommt CD103 auch auf T-Zellen und Makrophagen vor (Kilshaw *et al.*, 1990; Tiisala *et al.*, 1995) und seine Expression unterliegt starken Schwankungen, welche durch verschiedene Zytokine verursacht werden (Sathe *et al.*, 2011).

Um den Zusammenhang zwischen XCR1 und der Linie der kreuzpräsentierenden DZ weiter zu untersuchen, wurde die XCR1-Expression in Batf3-defizienten Mäusen analysiert. Der Transkriptionsfaktor Batf3 ist essentiell für die Entwicklung kreuzpräsentierender Zellen in der Milz (Hildner *et al.*, 2008), aber auch in peripheren Organen wie Lunge, Darm und Haut (Edelson *et al.*, 2010). In diesen Mäusen konnte keine XCR1-Expression in der Lunge und dem mediastinalen Lymphknoten detektiert werden. Dies galt auch für Milz, Darm und mesenterialen Lymphknoten (Bachem *et al.*, 2012). Da auch andere Oberflächenmoleküle wie CD103 und CD207 in diesen Mäusen auf DZ nicht detektierbar sind (Edelson *et al.*, 2010) und diese Mäuse starke Defekte bei der Kreuzpräsentation aufweisen (Hildner *et al.*, 2008), ist es sehr wahrscheinlich, dass die Population der XCR1⁺ DZ tatsächlich fehlt und nicht nur die Oberflächenexpression von XCR1 (und den anderen genannten Markern). Batf3 ist also entscheidend für die Entwicklung der XCR1⁺ DZ.

Die Expressionsdaten zu XCR1 in der Milz und der Peripherie, sowie funktionelle Untersuchungen der XCR1⁺ DZ lassen darauf schließen, dass XCR1 ein linienspezifischer Marker für kreuzpräsentierende Zellen ist, dessen Entwicklung abhängig von Batf3 ist. Damit umfassen die XCR1⁺ DZ die Subpopulation der konventionellen DZ, die bisher nur durch die Kombination verschiedener Marker definiert werden konnte. Dass die Einteilung der DZ in der Milz nach ihrer CD8-Expression nicht mit der Funktion der DZ übereinstimmte, war bekannt. Nicht alle CD8⁺ DZ in der Milz sind zur Kreuzpräsentation fähig (Lin *et al.*, 2008; Farrand *et al.*, 2009; Qiu *et al.*, 2009) und erst in Kombination mit der Expression von CD103 und CD207 konnten die kreuzpräsentierenden DZ identifiziert werden. Über die CD8⁺CD103⁻CD207⁻ DZ ist inzwischen bekannt, dass sie hohe Ähnlichkeit mit den pDZ aufweisen (Bar-On *et al.*, 2010). Außerdem haben Vremec *et al.* (2007) und Bedoui *et al.* (2009a) gezeigt, dass es einige CD8⁻ DZ gibt, die kreuzpräsentieren können. Zudem kann CD8 aufgrund der fehlenden Expression in peripheren Organen nicht zur Unterteilung der migratorischen DZ verwendet werden. Stattdessen wurde die Expression von CD103 mit den

kreuzpräsentierenden DZ in der Peripherie assoziiert (del Rio *et al.*, 2007; Henri *et al.*, 2007; Bedoui *et al.*, 2009b). XCR1 bietet nun die Möglichkeit in Milz und peripheren Organen die Subpopulation der kreuzpräsentierenden DZ eindeutig abzugrenzen, da XCR1 auf keinen anderen Zellpopulationen exprimiert wird.

4.3 Interaktion von XCR1 und XCL1

Durch ihre ausgeprägte Kreuzpräsentation können XCR1⁺ DZ zellassoziierte oder lösliche Antigene aufnehmen und antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen aktivieren. Die Interaktion von XCR1 mit seinem Liganden, dem Chemokin XCL1, ist wichtig für die effiziente Ausbildung einer zytotoxischen T-Zellantwort. In XCL1-defizienten Mäusen ist die Anzahl der zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen 12 Tage nach Immunisierung deutlich verringert (Dorner *et al.*, 2009). XCL1 wird u. a. von CD8⁺ T-Zellen sezerniert (Dorner *et al.*, 2002). Damit hat XCL1 wahrscheinlich Einfluss auf die Interaktion von antigenpräsentierenden DZ mit antigenspezifischen T-Zellen.

Durch Zugabe von löslichem XCL1 zu Ovalbumin (OVA) als Modellantigen bei einer Immunisierung konnte in dieser Arbeit die Proliferation antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen verstärkt werden. Dieser Effekt wurde spezifisch über XCR1 vermittelt, da in XCR1-defizienten Mäusen keine verstärkte T-Zellproliferation auftrat. Woraus der Einfluss von XCL1 besteht, ist allerdings unklar. Möglicherweise verstärkt XCL1 die Aufnahme von Antigen durch eine verbesserte Migrationsfähigkeit der DZ oder durch eine erhöhte Phagozytoseaktivität. Es ist auch denkbar, dass XCL1 eine effizientere Präsentation des Antigens bewirkt. Eine andere Möglichkeit ist, dass XCL1 die Interaktion von CD8⁺ T-Zellen mit XCR1⁺ DZ verlängert.

Da XCR1⁺ Zellen deutlich besser zellassoziiertes Antigen aufnehmen als andere DZ (Bachem *et al.*, 2012), war es besonders interessant, dass XCL1 an nekrotische Zellen binden kann. Sehr wahrscheinlich bindet XCL1 an eine Substanz, die bei der Auflösung der Membranintegrität zugänglich wird. Dabei kann es sich z. B. um zytosolische Moleküle oder Membranbestandteile handeln. Die Bindung eines Chemokins an sterbende Zellen ist bisher noch nicht publiziert worden. Chemokine sind allerdings dafür bekannt, dass sie nicht nur an ihren Rezeptor sondern auch an Glykosaminoglykane binden können (Allen *et al.*, 2007). Solche Kohlenhydratstrukturen befinden sich in der extrazellulären Matrix, aber auch an Membranproteinen. Durch die Bindung von XCL1 an nekrotische Zellen könnte es als

Brückenmolekül, welches zwischen toten und phagozytierenden Zellen vermittelt, dienen. In der Literatur gibt es zahlreiche Beispiele für solche Brückenmoleküle. So bindet z. B. MFG-E8 an die nach außen umgelagerten Phosphatidylserine von apoptotischen Zellen. MFG-E8 wird daraufhin von $\alpha\beta3$ - und $\alpha\beta5$ -Integrinen auf Makrophagen erkannt und induziert die Phagozytose der sterbenden Zellen (Schlegel *et al.*, 1999). Weiterhin wurde gezeigt, dass TSP-1 an Strukturen sterbender Zellen bindet und damit die Aufnahme über den Rezeptor CD36 ermöglicht (Savill *et al.*, 1992). Woran XCL1 in nekrotischen Zellen bindet, ist allerdings noch unklar. Die Bindung von XCL1 führte zu einer verstärkten Aufnahme durch XCR1⁺ DZ, wobei v. a. mehr nekrotische Zellen pro XCR1⁺ DZ aufgenommen wurden. XCL1 führt möglicherweise zu einer erhöhten Migration der DZ zu sterbenden Zellen oder erhöht die Phagozytose dieser Zellen. Die Immunisierung mit XCL1-dekorierten nekrotischen Zellen führte außerdem zur Proliferation antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen.

In einer primären Immunantwort wird XCL1 zuerst innerhalb der angeborenen Immunantwort hauptsächlich von NK-Zellen sezerniert. Somit ergibt sich folgendes Modell (Abb. 27): NK-Zellen töten infizierte Zellen im Rahmen der angeborenen Immunität. Die aktiven NK-Zellen produzieren gleichzeitig XCL1, welches an die sterbenden Zellen bindet, falls diese nicht im apoptotischen Zustand durch Makrophagen beseitigt wurden. Die effiziente Aufnahme der nekrotischen Zellen durch kreuzpräsentierende Zellen wird durch das gebundene XCL1 aber auch z. B. durch die Expression von Clec9A induziert. Clec9A dient zur Erkennung nekrotischer Zellen (Sancho *et al.*, 2009) und überführt die aufgenommenen zellassoziierten Antigene in den Kreuzpräsentationsweg (Iborra *et al.*, 2012; Zelenay *et al.*, 2012). Die XCR1⁺ DZ präsentieren zellassoziiertes Antigen an CD8⁺ T-Zellen und induzieren damit eine zytotoxische T-Zellantwort. Dadurch können sehr effizient im Rahmen der adaptiven Immunantwort weitere infizierte Zellen eliminiert werden. Das von den CD8⁺ T-Zellen sezernierte XCL1 dient dabei einer verstärkten Interaktion von DZ mit CD8⁺ T-Zellen und zu einer weiteren Dekorierung der getöteten Zellen. Somit können mehr DZ die sterbenden Zellen aufnehmen und weitere CD8⁺ T-Zellen aktivieren, wodurch sie die Immunantwort verstärken können. In einer sekundären Immunantwort werden reaktivierte CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen zuerst oder gemeinsam mit NK-Zellen infizierte Zellen eliminieren und XCL1 sezernieren. Damit beginnt der beschriebene Kreislauf erneut.

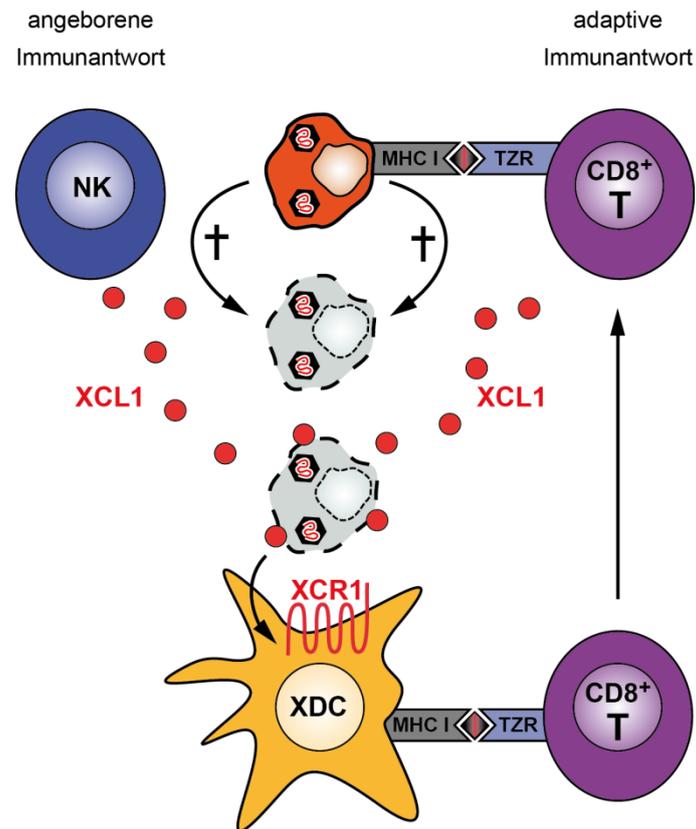


Abb. 27: Die Bindung von XCL1 an nekrotische Zellen führt zur Aufnahme dieser Zellen und zur Kreuzpräsentation zellulärer Antigene

NK-Zellen eliminieren während der angeborenen Immunantwort infizierte Körperzellen und dekorieren diese nach Verlust der Membranintegrität mit sezerniertem XCL1. Dies ermöglicht eine effiziente Aufnahme der nekrotischen Zellen durch kreuzpräsentierende dendritische Zellen (XDZ) durch Binden von XCL1 an XCR1. Die XDZ präsentieren CD8⁺ T-Zellen (T) prozessiertes Antigen der infizierten Zellen und induzieren durch Aktivierung antigenspezifischer zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen die adaptive Immunantwort. Die CD8⁺ T-Zellen erkennen über ihren T-Zellrezeptor (TZR) auf MHC I-präsentiertes Antigen auf infizierten Zellen und eliminieren diese. Aktivierte CD8⁺ T-Zellen sezernieren außerdem XCL1, welches an die nekrotischen Zellen bindet.

4.4 Antigenbeladung kreuzpräsentierender dendritischer Zellen über XCR1

DZ, welche die Schnittstelle zwischen angeborener und erworbener Immunantwort bilden, sind ein wichtiger Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer Impfstoffe und Therapien gegen z. B. HIV oder Tumore (Steinman, 2008). Sie sollen Immunantworten gegen Krankheiten induzieren, welche nicht allein durch neutralisierende Antikörper bekämpft werden können, sondern ausgeprägte zytotoxische T-Zellantworten benötigen. Mit neuen Impfstrategien sollen

die DZ so manipuliert werden, dass sie das Immunsystem in die gewünschte Richtung lenken. Neben der *in vitro*-Behandlung von DZ und anschließender Reinjektion gibt es immer mehr Versuche, die DZ *in vivo* zu beladen. Dadurch sollen Nachteile der *in vitro*-Behandlung, wie sehr schlechte Wirksamkeit, hohe Kosten und großer Zeitaufwand, umgangen werden (Tacken und Figdor, 2011).

In dieser Arbeit bildet die selektive Expression von XCR1 den Ausgangspunkt für eine spezifische Antigenbeladung kreuzpräsentierender Zellen. Um dies zu erreichen, wurde OVA als Antigen an den neu generierten XCR1-spezifischen Antikörper chemisch gekoppelt oder an den Liganden XCL1 fusioniert. Beide Konstrukte führten zu einer Aktivierung und Proliferation zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen, aber auch zur Bildung antigenspezifischer Antikörper. Damit erzielt die Beladung kreuzpräsentierender DZ über XCR1 ähnliche Effekte wie über andere Moleküle, die von kreuzpräsentierenden DZ exprimiert werden, wie CD205 (Bonifaz *et al.*, 2002), Clec9A (Caminschi *et al.*, 2008; Sancho *et al.*, 2008), CD207 (Idoyaga *et al.*, 2008) und CD103 (Semmrich *et al.*, 2012). In allen Fällen war für eine zytotoxische T-Zellantwort unbedingt Adjuvans nötig. Wurde kein Adjuvans verwendet, resultierte dies in einer Toleranzreaktion der CD8⁺ T-Zellen, die sich bei erneuter Antigengabe nicht restimulieren ließen (Bonifaz *et al.*, 2004; Sancho *et al.*, 2008; Semmrich *et al.*, 2012). Auch in dieser Arbeit führte nur die zusätzliche Gabe von Adjuvans zur Induktion von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen, die kostimulatorische Moleküle hochregulierten und Zytokine wie IFN- γ sezernierten. Inwieweit eine Immunisierung ohne Adjuvans zu einer Toleranzreaktion der T-Zellen führt, muss in weiterführenden Studien untersucht werden. Da kreuzpräsentierende DZ auch eine wichtige Rolle bei der Toleranzinduktion spielen, könnte die spezifische Antigenbeladung über XCR1 nicht nur zum Auslösen zytotoxischer T-Zellantworten genutzt werden, sondern unter tolerogenen Bedingungen möglicherweise zur aktiven Toleranzinduktion bei Autoimmunerkrankungen.

Die Beladung von XCR1⁺ DZ über den XCR1-spezifischen Antikörper und mit dem Liganden führt zur Bildung von antigenspezifischen Antikörpern, wenn Adjuvans eingesetzt wurde. Das bedeutet, dass die XCR1⁺ DZ neben CD8⁺ T-Zellen auch CD4⁺ Helfer-T-Zellen aktivieren, welche B-Zellen zur Antikörperproduktion anregen. Allerdings führte das Beladen über den Antikörper, aber nicht über XCL1, auch ohne Adjuvans zu einer geringen Bildung von antigenspezifischen Antikörpern. Dies könnte an einer längeren Verweildauer des XCR1-Antikörpers im Serum liegen. Caminschi *et al.* (2008) und Lahoud *et al.* (2011) zeigten, dass das Beladen anhand antigengekoppelter Antikörper über Clec9A ohne Adjuvans zu einer

starken spezifischen Antikörperantwort führt, aber auch das Beladen über CD205 eine leichte Antikörperantwort induziert. Sie konnten weiterhin zeigen, dass das Anti-Clec9A-Antigen-Konstrukt sehr lange im Serum nachweisbar ist (Lahoud *et al.*, 2011). Die lange Zugänglichkeit und dadurch fortwährende Präsentation an CD4⁺ T-Zellen führte zu einer hohen Induktion folliculärer T-Helferzellen (Obst *et al.*, 2007; Lahoud *et al.*, 2011), welche für die Aktivierung der antikörperproduzierenden B-Zellen zuständig sind.

Die Antigenbeladung über XCR1 führt also zur Bildung zytotoxischer T-Zellen und antigenspezifischer Antikörper und ist damit mit ähnlichen Studien über andere Moleküle vergleichbar. Allerdings zeigt keines der anderen genannten Moleküle eine ausschließliche Expression auf kreuzpräsentierenden Zellen. CD103 wird u. a. auch von T-Zellen exprimiert (Kilshaw *et al.*, 1990), CD205 befindet sich u. a. auf B-Zellen (Inaba *et al.*, 1995; Witmer-Pack *et al.*, 1995), CD207 auf Langerhans-Zellen (Valladeau *et al.*, 2000) und Clec9A wird auch von pDZ exprimiert (Caminschi *et al.*, 2008; Sancho *et al.*, 2008). Einzig XCR1 wird nur von einem Zelltyp, den kreuzpräsentierenden DZ, exprimiert. Dadurch wird ein sehr selektives Beladen dieser Zellen möglich. Dies hat den Vorteil, dass die Zielzellen genau bekannt sind und damit die gewünschten Effekte und mögliche Nebeneffekte klarer definiert werden können. Außerdem bewirkt die selektive Expression, dass nur die kreuzpräsentierenden DZ das Antigen bei entsprechend niedriger Dosierung aufnehmen. Dadurch wird das Antigen nicht von anderen Zellen „abgefangen“, sondern kann länger im Blut zirkulieren und dadurch kontinuierlich präsentiert werden (Caminschi und Shortman, 2011). Die Antigenmenge kann dementsprechend geringer gehalten werden als bei nicht zielgerichteter Antigengabe. So zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit, dass verglichen mit löslichem OVA, mindestens 40fach weniger Antigen bei spezifischer Beladung über XCR1 benötigt wurde, um die gleiche Proliferation antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen zu induzieren. Die selektive Expression von XCR1 beschränkt die Immunantwort allerdings nicht nur auf zytotoxische T-Zellen, sondern induziert auch die Bildung von antigenspezifischen Antikörpern. Bisher gibt es keine Möglichkeit durch eine spezifische Beladung eine Immunantwort beschränkt auf zytotoxische T-Zellen zu induzieren. Aber es konnte auch noch kein Beweis geführt werden, dass eine alleinige zytotoxische T-Zellantwort den Organismus vor Infektionen schützt. Studien in Primaten zu Hepatitis C zeigen eher, dass nur antikörperinduzierende Vakzine eine Infektion verhindern können, während T-Zellbasierte Vakzine wichtig für die Eindämmung einer etablierten Infektion sind (Rappuoli, 2007).

Um eine Impfstrategie mit spezifischer Antigenbeladung von der Maus auf den Menschen übertragen zu können, muss das Zielmolekül im Menschen eine ähnlich selektive Expression und Verteilung aufweisen (Caminschi *et al.*, 2012). Allerdings war aufgrund der unterschiedlichen Phänotypen von humanen und murinen DZ bisher die direkte Übertragung der in der Maus gewonnenen Daten zu DZ auf den Menschen nicht möglich. Weiterhin war bisher nur wenig über kreuzpräsentierende humane DZ bekannt. Schnurr *et al.* (2005) zeigten, dass CD1c⁺ DZ des humanen Blutes Antigen kreuzpräsentieren, pDZ jedoch nicht in der Lage dazu sind. Andere Studien konnten wiederum zeigen, dass pDZ auch kreuzpräsentieren können (Hoeffel *et al.*, 2007; Di Pucchio *et al.*, 2008). Eine vergleichende Studie aller humanen DZ-Subtypen des Blutes gab es bisher jedoch nicht. Das Problem lag dabei vor allem an den geringen Frequenzen der DZ im peripheren Blut. Besonders die Subpopulation der CD141⁺ DZ ist nur zu 0,04 % in humanen mononukleären Zellen des Blutes (PBMC) enthalten.

Für vergleichende funktionelle Studien müssen alle DZ in ausreichenden Mengen zu hoher Reinheit sortiert werden. Eine entsprechende Sortierungsstrategie konnte in dieser Arbeit zusammen mit A. Bachem und S. Güttler etabliert werden. Daraufhin konnte unsere Arbeitsgruppe in einer quantitativen PCR-Analyse der verschiedenen Zellpopulationen von PBMC zeigen, dass nur CD141⁺ DZ XCR1 exprimieren (Bachem *et al.*, 2010). Es konnte auch demonstriert werden, dass diese Zellen in der Kreuzpräsentation überragend sind. Daraus wurde geschlossen, dass die CD141⁺ DZ die funktionellen homologen Zellen zu den murinen kreuzpräsentierenden XCR1⁺ DZ sind. Diese Annahme wurde in gleichzeitig erschienenen Publikationen von Crozat *et al.* (2010) und Jongbloed *et al.* (2010) bestätigt. Diese zeigten auch die ausgeprägte Fähigkeit der CD141⁺ DZ zur Kreuzpräsentation. Crozat *et al.* (2010) bestätigten außerdem die Expression von XCR1 in den CD141⁺ DZ.

Gestützt wurde die Hypothese, dass die murinen CD8⁺ DZ homolog zu den humanen CD141⁺ DZ sind, durch bereits vorher veröffentlichte Arbeiten, in denen gezeigt wurde, dass sowohl die CD8⁺ DZ der Maus als auch die CD141⁺ DZ des Menschen die beiden Moleküle Necl2 (Galibert *et al.*, 2005) und Clec9A (Caminschi *et al.*, 2008; Huysamen *et al.*, 2008; Sancho *et al.*, 2008) exprimieren. Vergleichende Genexpressionsanalysen der murinen und humanen DZ-Subtypen durch Robbins *et al.* (2008) deuteten auch die Homologie zwischen murinen CD8⁺ DZ und humanen CD141⁺ DZ an. In der vorliegenden Arbeit konnte auch die Oberflächenexpression von XCR1 auf den CD141⁺ DZ nachgewiesen werden. Allerdings wird XCR1 nur von ca. 75 % der CD141⁺ DZ auf der Oberfläche exprimiert. Dies zeigt, wie

schon in der Maus, dass die Expression von XCR1 mit der bisher bestehenden Klassifikation der DZ nicht übereinstimmt und wahrscheinlich XCR1 im Menschen ein besserer Marker für kreuzpräsentierende DZ ist als CD141. CD141 wird zudem von Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen exprimiert (McCachren *et al.*, 1991; Esmon *et al.*, 1982).

XCR1 ist auf den CD141⁺ DZ funktionell aktiv und bewirkt eine Migration dieser DZ zu XCL1. Keine der anderen DZ- oder sonstigen getesteten Zellpopulationen wanderte zu XCL1. Dies bestätigt neben den PCR-Daten (Bachem *et al.*, 2010), die spezifische Expression von XCR1 auf den kreuzpräsentierenden Zellen und XCR1 als einzigen Rezeptor für XCL1.

Die selektive Expression von XCR1 auf den kreuzpräsentierenden Zellen des Menschen macht die spezifische Antigenbeladung dieser Zellen über XCR1 möglich. Da der Ligand XCL1 an die Zellen über XCR1, seinem einzigen Rezeptor, bindet, könnte das gewünschte Antigen an XCL1 fusioniert werden. Außerdem wäre, wie in der Maus, die Beladung über einen Antikörper gegen XCR1 möglich. Das setzt allerdings die Generierung eines humanen XCR1-spezifischen Antikörpers voraus. Das Chemokin XCL1 ist im Gegensatz zu einem XCR1-spezifischen Antikörper ein körpereigenes Molekül, gegen das keine Immunantwort stattfinden wird. Diese wird sich theoretisch nur gegen das gewünschte Antigen richten. Allerdings hat XCL1 im Gegensatz zu einem künstlich generierten Antikörper auch eine Funktion im Menschen, die bei Gabe von XCL1 als Vakzin zu eventuellen Nebenwirkungen oder Überreaktionen führen könnte. Welches Reagenz letztendlich am besten geeignet ist, kann nur durch weitere Studien herausgefunden werden.

Einige Beladungskonzepte, bei denen Antigen an einen monoklonalen Antikörper gekoppelt ist, werden zurzeit für die Anwendung im Menschen getestet. Dazu gehört die Beladung über CD205, DC-SIGN und den Mannose-Rezeptor (Caminschi *et al.*, 2012). DC-SIGN wird von einem Teil der DZ und Makrophagen (Geijtenbeek *et al.*, 2000) in den Lymphknoten und in der Dermis (Angel *et al.*, 2009) exprimiert. Diese Zellen koexprimieren meist auch den Mannose-Rezeptor (Tacke und Figdor, 2011). Beide Rezeptoren wurden in humanisierten Mausmodellen als Beladungsziel getestet (He *et al.*, 2007; Kretz-Rommel *et al.*, 2007). In beiden Fällen wurde eine humorale Antwort ausgelöst. Eine Beladung über den Mannose-Rezeptor induzierte auch eine CD8⁺ T-Zellantwort. An CD205-Antikörper gekoppeltes Antigen führte in einer Primaten-Studie zur besseren Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen als nicht zielgerichtetes Antigen (Flynn *et al.*, 2011). Antikörper gegen CD205 und Mannose-Rezeptor gekoppelt an Tumorantigene werden zurzeit als Anti-Tumor-Vakzine in klinischen Studien getestet (Morse *et al.*, 2011; Caminschi *et al.*, 2012). Diese Antigenbeladung hat aber

nicht nur die kreuzpräsentierenden CD141⁺ DZ als Ziel, da die genutzten Moleküle auch auf anderen Zellen exprimiert werden. Dagegen wird XCR1 ausschließlich auf den kreuzpräsentierenden DZ im Menschen exprimiert.

Die zielgerichtete Antigenbeladung über XCR1 bietet die Möglichkeit, Impfstoffe zu entwickeln, die auf der Induktion effizienter CD8⁺ T-Zellantworten beruhen. Andererseits könnte die Beladung über XCR1 möglicherweise auch zur Induktion von Toleranz und damit als Wirkstoff gegen Autoimmunkrankheiten eingesetzt werden.

5 Zusammenfassung/Summary

5.1 Zusammenfassung

Dendritische Zellen (DZ) sind antigenpräsentierende Zellen, die in der Lage sind naive T-Zellen zu aktivieren. Zytotoxische CD8⁺ T-Zellantworten werden insbesondere durch kreuzpräsentierende DZ induziert. Bisher gab es keine einheitliche Definition dieser DZ-Subpopulationen in den verschiedenen lymphoiden und nichtlymphoiden Organen, da die dazu verwendeten Oberflächenmoleküle (u. a. CD8, CD207, CD205 und CD103) nicht konsistent auf DZ in den verschiedenen Organen exprimiert werden. Erste Arbeiten zeigten, dass der Chemokinrezeptor XCR1 auf mRNA-Ebene stark mit kreuzpräsentierenden DZ der Maus korreliert.

In dieser Arbeit konnte erstmals ein XCR1-spezifischer monoklonaler Antikörper generiert werden. Mit Hilfe dieses Antikörpers wurden XCR1⁺ DZ in diversen Organen von Wildtyp-Mäusen, sowie in Mäusen, in denen kreuzpräsentierende DZ aufgrund des Fehlens des Transkriptionsfaktors Batf3 nicht ausgebildet werden, phänotypisch und funktionell analysiert. Diese Analysen ergaben, dass XCR1 ein DZ-spezifisches Molekül ist, das nach Bindung des Liganden Chemotaxis auslöst. Die Expression von XCR1 korrelierte stark, aber nicht vollständig, mit bisher verwendeten Markern für kreuzpräsentierende DZ. Insgesamt konnte mit XCR1 das erste linienspezifische Markermolekül für kreuzpräsentierende DZ in der Maus identifiziert werden. Auch beim Menschen konnte XCR1 als ein linienspezifischer Marker definiert werden, der ausschließlich von kreuzpräsentierenden CD141⁺ DZ exprimiert wird. Somit konnten die humanen XCR1⁺CD141⁺ DZ als zu XCR1⁺ DZ der Maus homologe DZ erkannt werden.

In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass das Chemokin XCL1, der Ligand von XCR1, an nekrotische Milzzellen bindet. Dadurch wird die Aufnahme dieser Zellen durch XCR1⁺ DZ und die Proliferation antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen verstärkt.

Die selektive Expression von XCR1 auf kreuzpräsentierenden DZ wurde für eine spezifische Antigenbeladung dieser DZ *in vivo* genutzt. Immunisierung von Mäusen mit dem Modellantigen Ovalbumin, gekoppelt an den XCR1-spezifischen mAk oder den Liganden XCL1, führte zur Aktivierung und Proliferation antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen, die in der Lage waren, das Wachstum eines Ovalbumin-exprimierenden Tumors zu verhindern. Die in dieser Arbeit erworbenen Erkenntnisse können als Grundlage für die Entwicklung von neuartigen Impfstoffen genutzt werden, die zytotoxische CD8⁺ T-Zellantworten induzieren, was mit den bisherigen Impfvorgängen nicht möglich ist.

5.2 Summary

Dendritic cells (DC) can activate naïve T cells by presenting antigen to them. In particular, activation of CD8⁺ T cells is achieved through cross-presenting DC. Until now there was no consistent phenotypic definition of cross-presenting DC, since the markers used (among others CD8, CD103, CD205, CD207) are not uniformly expressed in the various lymphoid compartments and organs. First data on the mRNA level suggested that the chemokine receptor XCR1 strongly correlates with cross-presenting DC.

In the present work, the first monoclonal antibody against murine XCR1 could be generated. Using this antibody, XCR1⁺ DC could be phenotypically and functionally analyzed in wild type mice and also in mice which are deficient for the transcription factor Batf3 and lack cross-presenting DC. These studies revealed that XCR1 is a DC-specific molecule and a bona fide chemokine receptor inducing chemotaxis upon binding of its ligand. The expression of XCR1 correlated strongly but not completely with markers currently used for defining cross-presenting DC. Overall, XCR1 could be established as the first lineage marker for cross-presenting DC. Phenotypic and functional studies revealed that XCR1 also in the human can be regarded as a lineage marker for cross-presenting CD141⁺ DC, which thus could be identified as homologs of mouse XCR1⁺ DC.

XCL1 was shown for the first time to bind to necrotic splenocytes. This increases the uptake of dying cells by XCR1⁺ DC and augments the proliferation of antigen-specific CD8⁺ T cells. The selective expression of XCR1 on cross-presenting DC was used to specifically target antigen to these DC *in vivo*. Immunization of mice with the model antigen ovalbumin, when coupled to MARX10 or the chemokine ligand XCL1, induced activation and proliferation of antigen-specific CD8⁺ T cells capable of preventing outgrowth of a tumor expressing ovalbumin. Based on these data, the development of a new type of vaccines will become possible. Through targeting of antigen into cross-presenting DC these vaccines will be capable of inducing cytotoxic CD8⁺ T cell responses, which current vaccines cannot.

6 Literaturverzeichnis

- Ahrens, S., Zelenay, S., Sancho, D., Hanc, P., Kjaer, S., Feest, C., Fletcher, G., Durkin, C., Postigo, A., Skehel, M., Batista, F., Thompson, B., Way, M., Reis E Sousa, C., Schulz, O. (2012). F-actin is an evolutionarily conserved damage-associated molecular pattern recognized by DNCR-1, a receptor for dead cells. *Immunity* 36, 635-645.
- Albert, M.L., Pearce, S.F., Francisco, L.M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R.L., Bhardwaj, N. (1998). Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via $\alpha_v\beta_5$ and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 188, 1359-1368.
- Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., Flavell, R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732-738.
- Aliberti, J., Schulz, O., Pennington, D.J., Tsujimura, H., Reis E Sousa, C., Ozato, K., Sher, A. (2003). Essential role for ICSBP in the in vivo development of murine CD8 α^+ dendritic cells. *Blood* 101, 305-310.
- Allen, S.J., Crown, S.E., Handel, T.M. (2007). Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 787-820.
- Angel, C.E., Chen, C.J., Horlacher, O.C., Winkler, S., John, T., Browning, J., Macgregor, D., Cebon, J., Dunbar, P.R. (2009). Distinctive localization of antigen-presenting cells in human lymph nodes. *Blood* 113, 1257-1267.
- Avrameas, S. (1991). Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'. *Immunology today* 12, 154-159.
- Bachem, A., Güttler, S., Hartung, E., Ebstein, F., Schaefer, M., Tannert, A., Salama, A., Movassaghi, K., Opitz, C., Mages, H.W., Henn, V., Kloetzel, P.-M., Gurka, S., Kroczeck, R.A. (2010). Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c $^+$ CD141 $^+$ cells as homologues of mouse CD8 $^+$ dendritic cells. *J. Exp. Med.* 207, 1273-1281.
- Bachem, A., Hartung, E., Güttler, S., Mora, A., Zhou, X., Hegemann, A., Plantinga, M., Mazzini, E., Stoitzner, P., Gurka, S., Henn, V., Mages, H.W., Kroczeck, R.A. (2012). Expression of XCR1 Characterizes the Batf3-Dependent Lineage of Dendritic Cells Capable of Antigen Cross-Presentation. *Front. Immunol.* 3, 214.
- Bar-On, L., Birnberg, T., Lewis, K.L., Edelson, B.T., Bruder, D., Hildner, K., Buer, J., Murphy, K.M., Reizis, B., Jung, S. (2010). CX $_3$ CR1 $^+$ CD8 α^+ dendritic cells are a steady-state population related to plasmacytoid dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 14745-14750.
- Bedoui, S., Prato, S., Mintern, J., Gebhardt, T., Zhan, Y., Lew, A.M., Heath, W.R., Villadangos, J.A., Segura, E. (2009a). Characterization of an immediate splenic precursor of CD8 $^+$ dendritic cells capable of inducing antiviral T cell responses. *J. Immunol.* 182, 4200-4207.
- Bedoui, S., Whitney, P.G., Waithman, J., Eidsmo, L., Wakim, L., Caminschi, I., Allan, R.S., Wojtasiak, M., Shortman, K., Carbone, F.R., Brooks, A.G., Heath, W.R. (2009b). Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103 $^+$ dendritic cells. *Nat. Immunol.* 10, 488-495.

- Belz, G.T., Smith, C.M., Kleinert, L., Reading, P., Brooks, A., Shortman, K., Carbone, F.R., Heath, W.R. (2004). Distinct migrating and nonmigrating dendritic cell populations are involved in MHC class I-restricted antigen presentation after lung infection with virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 8670-8675.
- Bevan, M.J. (1976). Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during in vivo priming. *J. Immunol.* 117, 2233-2238.
- Blasius, A.L., Giurisato, E., Cella, M., Schreiber, R.D., Shaw, A.S., Colonna, M. (2006). Bone marrow stromal cell antigen 2 is a specific marker of type I IFN-producing cells in the naive mouse, but a promiscuous cell surface antigen following IFN stimulation. *J. Immunol.* 177, 3260-3265.
- Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, M.C., Steinman, R.M. (2002). Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8⁺ T cell tolerance. *J. Exp. Med.* 196, 1627-1638.
- Bonifaz, L.C., Bonnyay, D.P., Charalambous, A., Darguste, D.I., Fujii, S., Soares, H., Brimnes, M.K., Molledo, B., Moran, T.M., Steinman, R.M. (2004). In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J. Exp. Med.* 199, 815-824.
- Boscardin, S.B., Hafalla, J.C., Masilamani, R.F., Kamphorst, A.O., Zebroski, H.A., Rai, U., Morrot, A., Zavala, F., Steinman, R.M., Nussenzweig, R.S., Nussenzweig, M.C. (2006). Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses. *J. Exp. Med.* 203, 599-606.
- Caminschi, I., Lucas, K.M., O'keeffe, M.A., Hochrein, H., Laabi, Y., Brodnicki, T.C., Lew, A.M., Shortman, K., Wright, M.D. (2001). Molecular cloning of a C-type lectin superfamily protein differentially expressed by CD8 α ⁻ splenic dendritic cells. *Mol. Immunol.* 38, 365-373.
- Caminschi, I., Proietto, A.I., Ahmet, F., Kitsoulis, S., Shin Teh, J., Lo, J.C., Rizzitelli, A., Wu, L., Vremec, D., Van Dommelen, S.L., Campbell, I.K., Maraskovsky, E., Braley, H., Davey, G.M., Mottram, P., Van De Velde, N., Jensen, K., Lew, A.M., Wright, M.D., Heath, W.R., Shortman, K., Lahoud, M.H. (2008). The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement. *Blood* 112, 3264-3273.
- Caminschi, I., Shortman, K. (2011). Boosting antibody responses by targeting antigens to dendritic cells. *Trends Immunol.*
- Caminschi, I., Vremec, D., Ahmet, F., Lahoud, M.H., Villadangos, J.A., Murphy, K.M., Heath, W.R., Shortman, K. (2011). Antibody responses initiated by Clec9A-bearing dendritic cells in normal and Batf3^{-/-} mice. *Mol. Immunol.*
- Caminschi, I., Maraskovsky, E., Heath, W.R. (2012). Targeting Dendritic Cells in vivo for Cancer Therapy. *Front. Immunol.* 3, 13.
- Castro, F.V., Tutt, A.L., White, A.L., Teeling, J.L., James, S., French, R.R., Glennie, M.J. (2008). CD11c provides an effective immunotarget for the generation of both CD4 and CD8 T cell responses. *Eur. J. Immunol.* 38, 2263-2273.
- Cheong, C., Idoyaga, J., Do, Y., Pack, M., Park, S.H., Lee, H., Kang, Y.S., Choi, J.H., Kim, J.Y., Bonito, A., Inaba, K., Yamazaki, S., Steinman, R.M., Park, C.G. (2007). Production of monoclonal antibodies that recognize the extracellular domain of mouse

- langerin/CD207. *J. Immunol. Methods* 324, 48-62.
- Coffman, R.L. (1982). Surface antigen expression and immunoglobulin gene rearrangement during mouse pre-B cell development. *Immunol. Rev.* 69, 5-23.
- Corbett, A.J., Caminschi, I., McKenzie, B.S., Brady, J.L., Wright, M.D., Mottram, P.L., Hogarth, P.M., Hodder, A.N., Zhan, Y., Tarlinton, D.M., Shortman, K., Lew, A.M. (2005). Antigen delivery via two molecules on the CD8⁻ dendritic cell subset induces humoral immunity in the absence of conventional "danger". *Eur. J. Immunol.* 35, 2815-2825.
- Crowley, M., Inaba, K., Witmer-Pack, M., Steinman, R.M. (1989). The cell surface of mouse dendritic cells: FACS analyses of dendritic cells from different tissues including thymus. *Cell. Immunol.* 118, 108-125.
- Crozat, K., Guiton, R., Contreras, V., Feuillet, V., Dutertre, C.-A., Ventre, E., Manh, T.-P.V., Baranek, T., Storset, A.K., Marvel, J., Boudinot, P., Hosmalin, A., Schwartz-Cornil, I., Dalod, M. (2010). The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8 α ⁺ dendritic cells. *J. Exp. Med.* 207, 1283-1292.
- De Vries, I.J., Krooshoop, D.J., Scharenborg, N.M., Lesterhuis, W.J., Diepstra, J.H., Van Muijen, G.N., Strijk, S.P., Ruers, T.J., Boerman, O.C., Oyen, W.J., Adema, G.J., Punt, C.J., Figdor, C.G. (2003). Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients is determined by their maturation state. *Cancer Res.* 63, 12-17.
- Del Rio, M.-L., Rodriguez-Barbosa, J.-I., Kremmer, E., Förster, R. (2007). CD103⁻ and CD103⁺ bronchial lymph node dendritic cells are specialized in presenting and cross-presenting innocuous antigen to CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J. Immunol.* 178, 6861-6866.
- Del Rio, M.L., Bernhardt, G., Rodriguez-Barbosa, J.I., Förster, R. (2010). Development and functional specialization of CD103⁺ dendritic cells. *Immunol. Rev.* 234, 268-281.
- Den Haan, J.M., Lehar, S.M., Bevan, M.J. (2000). CD8⁺ but not CD8⁻ dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J. Exp. Med.* 192, 1685-1696.
- Di Pucchio, T., Chatterjee, B., Smed-Sorensen, A., Clayton, S., Palazzo, A., Montes, M., Xue, Y., Mellman, I., Banchereau, J., Connolly, J.E. (2008). Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I. *Nat. Immunol.* 9, 551-557.
- Dorner, B., Müller, S., Entschladen, F., Schröder, J.M., Franke, P., Kraft, R., Friedl, P., Clark-Lewis, I., Kroczeck, R.A. (1997). Purification, structural analysis, and function of natural ATAC, a cytokine secreted by CD8⁺ T cells. *J. Biol. Chem.* 272, 8817-8823.
- Dorner, B.G., Scheffold, A., Rolph, M.S., Huser, M.B., Kaufmann, S.H.E., Radbruch, A., Flesch, I.E.A., Kroczeck, R.A. (2002). MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, and ATAC/lymphotactin function together with IFN- γ as type 1 cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 6181-6186.
- Dorner, B.G., Dorner, M.B., Zhou, X., Opitz, C., Mora, A., Güttler, S., Hutloff, A., Mages, H.W., Ranke, K., Schaefer, M., Jack, R.S., Henn, V., Kroczeck, R.A. (2009). Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8⁺ T cells. *Immunity* 31, 823-833.

- Dudziak, D., Kamphorst, A.O., Heidkamp, G.F., Buchholz, V.R., Trumpheller, C., Yamazaki, S., Cheong, C., Liu, K., Lee, H.W., Park, C.G., Steinman, R.M., Nussenzweig, M.C. (2007). Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* 315, 107-111.
- Dzionek, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D.W., Schmitz, J. (2000). BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* 165, 6037-6046.
- Edelson, B.T., Kc, W., Juang, R., Kohyama, M., Benoit, L.A., Klekotka, P.A., Moon, C., Albring, J.C., Ise, W., Michael, D.G., Bhattacharya, D., Stappenbeck, T.S., Holtzman, M.J., Sung, S.S., Murphy, T.L., Hildner, K., Murphy, K.M. (2010). Peripheral CD103⁺ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8 α ⁺ conventional dendritic cells. *J. Exp. Med.* 207, 823-836.
- Ehst, B.D., Ingulli, E., Jenkins, M.K. (2003). Development of a novel transgenic mouse for the study of interactions between CD4 and CD8 T cells during graft rejection. *Am. J. Transplant.* 3, 1355-1362.
- Esmon, N.L., Owen, W.G., Esmon, C.T. (1982). Isolation of a membrane-bound cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *J. Biol. Chem.* 257, 859-864.
- Farrand, K.J., Dickgreber, N., Stoitzner, P., Ronchese, F., Petersen, T.R., Hermans, I.F. (2009). Langerin⁺CD8 α ⁺ dendritic cells are critical for cross-priming and IL-12 production in response to systemic antigens. *J. Immunol.* 183, 7732-7742.
- Flavell, D.J., Flavell, S.U., Boehm, D.A., Emery, L., Noss, A., Ling, N.R., Richardson, P.R., Hardie, D., Wright, D.H. (1995). Preclinical studies with the anti-CD19-saporin immunotoxin BU12-SAPORIN for the treatment of human-B-cell tumours. *Br. J. Cancer* 72, 1373-1379.
- Fleming, T.J., Fleming, M.L., Malek, T.R. (1993). Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *J. Immunol.* 151, 2399-2408.
- Flynn, B.J., Kastenmüller, K., Wille-Reece, U., Tomaras, G.D., Alam, M., Lindsay, R.W., Salazar, A.M., Perdiguer, B., Gomez, C.E., Wagner, R., Esteban, M., Park, C.G., Trumpheller, C., Keler, T., Pantaleo, G., Steinman, R.M., Seder, R. (2011). Immunization with HIV Gag targeted to dendritic cells followed by recombinant New York vaccinia virus induces robust T-cell immunity in nonhuman primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 7131-7136.
- Freeman, G.J., Gribben, J.G., Boussiotis, V.A., Ng, J.W., Restivo, V.A., Jr., Lombard, L.A., Gray, G.S., Nadler, L.M. (1993). Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science* 262, 909-911.
- Galibert, L., Diemer, G.S., Liu, Z., Johnson, R.S., Smith, J.L., Walzer, T., Comeau, M.R., Rauch, C.T., Wolfson, M.F., Sorensen, R.A., Van Der Vuurst De Vries, A.R., Branstetter, D.G., Koelling, R.M., Scholler, J., Fanslow, W.C., Baum, P.R., Derry, J.M., Yan, W. (2005). Nectin-like protein 2 defines a subset of T-cell zone dendritic cells and is a ligand for class-I-restricted T-cell-associated molecule. *J. Biol. Chem.* 280, 21955-21964.
- Geijtenbeek, T.B., Torensma, R., Van Vliet, S.J., Van Duijnhoven, G.C., Adema, G.J., Van Kooyk, Y., Figdor, C.G. (2000). Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100, 575-585.

- Geurtsvankessel, C.H., Willart, M.a.M., Van Rijt, L.S., Muskens, F., Kool, M., Baas, C., Thielemans, K., Bennett, C., Clausen, B.E., Hoogsteden, H.C., Osterhaus, A.D.M.E., Rimmelzwaan, G.F., Lambrecht, B.N. (2008). Clearance of influenza virus from the lung depends on migratory langerin⁺CD11b⁻ but not plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 205, 1621-1634.
- Gupta, R.K., Relyveld, E.H., Lindblad, E.B., Bizzini, B., Ben-Efraim, S., Gupta, C.K. (1993). Adjuvants - a balance between toxicity and adjuvanticity. *Vaccine* 11, 293-306.
- Hacker, C., Kirsch, R.D., Ju, X.S., Hieronymus, T., Gust, T.C., Kuhl, C., Jorgas, T., Kurz, S.M., Rose-John, S., Yokota, Y., Zenke, M. (2003). Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development. *Nat. Immunol.* 4, 380-386.
- Hashimoto, D., Miller, J., Merad, M. (2011). Dendritic cell and macrophage heterogeneity in vivo. *Immunity* 35, 323-335.
- Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., Ravetch, J.V., Steinman, R.M., Nussenzweig, M.C. (2001). Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J. Exp. Med.* 194, 769-779.
- He, L.Z., Crocker, A., Lee, J., Mendoza-Ramirez, J., Wang, X.T., Vitale, L.A., O'Neill, T., Petromilli, C., Zhang, H.F., Lopez, J., Rohrer, D., Keler, T., Clynes, R. (2007). Antigenic targeting of the human mannose receptor induces tumor immunity. *J. Immunol.* 178, 6259-6267.
- Henri, S., Siret, C., Machy, P., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Leserman, L. (2007). Mature DC from skin and skin-draining LN retain the ability to acquire and efficiently present targeted antigen. *Eur. J. Immunol.* 37, 1184-1193.
- Hildner, K., Edelson, B.T., Purtha, W.E., Diamond, M., Matsushita, H., Kohyama, M., Calderon, B., Schraml, B.U., Unanue, E.R., Diamond, M.S., Schreiber, R.D., Murphy, T.L., Murphy, K.M. (2008). *Batf3* deficiency reveals a critical role for CD8 α ⁺ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* 322, 1097-1100.
- Hintzen, G., Ohl, L., Del Rio, M.L., Rodriguez-Barbosa, J.I., Pabst, O., Kocks, J.R., Krege, J., Hardtke, S., Förster, R. (2006). Induction of tolerance to innocuous inhaled antigen relies on a CCR7-dependent dendritic cell-mediated antigen transport to the bronchial lymph node. *J. Immunol.* 177, 7346-7354.
- Hoeffel, G., Ripoche, A.C., Matheoud, D., Nascimbeni, M., Escriou, N., Lebon, P., Heshmati, F., Guillet, J.G., Gannage, M., Caillat-Zucman, S., Casartelli, N., Schwartz, O., De La Salle, H., Hanau, D., Hosmalin, A., Maranon, C. (2007). Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 27, 481-492.
- Hogquist, K.A., Jameson, S.C., Heath, W.R., Howard, J.L., Bevan, M.J., Carbone, F.R. (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76, 17-27.
- Hutchings, C.J., Koglin, M., Marshall, F.H. (2010). Therapeutic antibodies directed at G protein-coupled receptors. *mAbs* 2, 594-606.
- Huysamen, C., Willment, J.A., Dennehy, K.M., Brown, G.D. (2008). CLEC9A is a novel activation C-type lectin-like receptor expressed on BDCA3⁺ dendritic cells and a subset of monocytes. *J. Biol. Chem.* 283, 16693-16701.
- Iborra, S., Izquierdo, H.M., Martinez-Lopez, M., Blanco-Menendez, N., Reis E Sousa, C., Sancho, D. (2012). The DC receptor DNDR-1 mediates cross-priming of CTLs during vaccinia virus infection in mice. *J. Clin. Investig.* 122, 1628-1643.

- Idoyaga, J., Cheong, C., Suda, K., Suda, N., Kim, J.Y., Lee, H., Park, C.G., Steinman, R.M. (2008). Cutting edge: langerin/CD207 receptor on dendritic cells mediates efficient antigen presentation on MHC I and II products in vivo. *J. Immunol.* 180, 3647-3650.
- Idoyaga, J., Suda, N., Suda, K., Park, C.G., Steinman, R.M. (2009). Antibody to Langerin/CD207 localizes large numbers of CD8 α ⁺ dendritic cells to the marginal zone of mouse spleen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 1524-1529.
- Inaba, K., Swiggard, W.J., Inaba, M., Meltzer, J., Mirza, A., Sasagawa, T., Nussenzweig, M.C., Steinman, R.M. (1995). Tissue distribution of the DEC-205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145. I. Expression on dendritic cells and other subsets of mouse leukocytes. *Cell. Immunol.* 163, 148-156.
- Iyoda, T., Shimoyama, S., Liu, K., Omatsu, Y., Akiyama, Y., Maeda, Y., Takahara, K., Steinman, R.M., Inaba, K. (2002). The CD8⁺ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J. Exp. Med.* 195, 1289-1302.
- Jiang, W., Swiggard, W.J., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R.M., Nussenzweig, M.C. (1995). The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 375, 151-155.
- Jongbloed, S.L., Kassianos, A.J., McDonald, K.J., Clark, G.J., Ju, X., Angel, C.E., Chen, C.-J.J., Dunbar, P.R., Wadley, R.B., Jeet, V., Vulink, A.J.E., Hart, D.N.J., Radford, K.J. (2010). Human CD141⁺ (BDCA-3)⁺ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J. Exp. Med.* 207, 1247-1260.
- Jung, S., Aliberti, J., Graemmel, P., Sunshine, M.J., Kreutzberg, G.W., Sher, A., Littman, D.R. (2000). Analysis of fractalkine receptor CX₃CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4106-4114.
- Jung, S., Unutmaz, D., Wong, P., Sano, G., De Los Santos, K., Sparwasser, T., Wu, S., Vuthoori, S., Ko, K., Zavala, F., Pamer, E.G., Littman, D.R., Lang, R.A. (2002). In vivo depletion of CD11c⁺ dendritic cells abrogates priming of CD8⁺ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 17, 211-220.
- Kato, M., McDonald, K.J., Khan, S., Ross, I.L., Vuckovic, S., Chen, K., Munster, D., Macdonald, K.P., Hart, D.N. (2006). Expression of human DEC-205 (CD205) multilectin receptor on leukocytes. *Int. Immunol.* 18, 857-869.
- Kelner, G.S., Kennedy, J., Bacon, K.B., Kleyensteuber, S., Largaespada, D.A., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Bazan, J.F., Moore, K.W., Schall, T.J., Et Al. (1994). Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 266, 1395-1399.
- Kennedy, J., Kelner, G.S., Kleyensteuber, S., Schall, T.J., Weiss, M.C., Yssel, H., Schneider, P.V., Cocks, B.G., Bacon, K.B., Zlotnik, A. (1995). Molecular cloning and functional characterization of human lymphotactin. *J. Immunol.* 155, 203-209.
- Kilshaw, P.J., Murant, S.J. (1990). A new surface antigen on intraepithelial lymphocytes in the intestine. *Eur. J. Immunol.* 20, 2201-2207.
- Kim, T.S., Braciale, T.J. (2009). Respiratory dendritic cell subsets differ in their capacity to support the induction of virus-specific cytotoxic CD8⁺ T cell responses. *PLoS One* 4, e4204.
- Kissenpfennig, A., Henri, S., Dubois, B., Laplace-Builhé, C., Perrin, P., Romani, N., Tripp, C.H., Douillard, P., Leserman, L., Kaiserlian, D., Saeland, S., Davoust, J., Malissen, B. (2005). Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells

- colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity* 22, 643-654.
- Köhler, G., Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497.
- Koo, G.C., Peppard, J.R. (1984). Establishment of monoclonal anti-Nk-1.1 antibody. *Hybridoma* 3, 301-303.
- Kraal, G., Breel, M., Janse, M., Bruin, G. (1986). Langerhans' cells, veiled cells, and interdigitating cells in the mouse recognized by a monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* 163, 981-997.
- Kretz-Rommel, A., Qin, F., Dakappagari, N., Torensma, R., Faas, S., Wu, D., Bowdish, K.S. (2007). In vivo targeting of antigens to human dendritic cells through DC-SIGN elicits stimulatory immune responses and inhibits tumor growth in grafted mouse models. *J. Immunother.* 30, 715-726.
- Krysko, D.V., Vanden Berghe, T., D'herde, K., Vandenabeele, P. (2008). Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods* 44, 205-221.
- Kurts, C., Robinson, B.W., Knolle, P.A. (2010). Cross-priming in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 403-414.
- Lahoud, M.H., Proietto, A.I., Ahmet, F., Kitsoulis, S., Eidsmo, L., Wu, L., Sathe, P., Pietersz, S., Chang, H.W., Walker, I.D., Maraskovsky, E., Braley, H., Lew, A.M., Wright, M.D., Heath, W.R., Shortman, K., Caminschi, I. (2009). The C-type lectin Clec12A present on mouse and human dendritic cells can serve as a target for antigen delivery and enhancement of antibody responses. *J. Immunol.* 182, 7587-7594.
- Lahoud, M.H., Ahmet, F., Kitsoulis, S., Wan, S.S., Vremec, D., Lee, C.N., Phipson, B., Shi, W., Smyth, G.K., Lew, A.M., Kato, Y., Mueller, S.N., Davey, G.M., Heath, W.R., Shortman, K., Caminschi, I. (2011). Targeting antigen to mouse dendritic cells via Clec9A induces potent CD4 T cell responses biased toward a follicular helper phenotype. *J. Immunol.* 187, 842-850.
- Lin, M.L., Zhan, Y., Proietto, A.I., Prato, S., Wu, L., Heath, W.R., Villadangos, J.A., Lew, A.M. (2008). Selective suicide of cross-presenting CD8⁺ dendritic cells by cytochrome *c* injection shows functional heterogeneity within this subset. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 3029-3034.
- Löhning, M., Hutloff, A., Kallinich, T., Mages, H.W., Bonhagen, K., Radbruch, A., Hamelmann, E., Kroczeck, R.A. (2003). Expression of ICOS in vivo defines CD4⁺ effector T cells with high inflammatory potential and a strong bias for secretion of interleukin 10. *J. Exp. Med.* 197, 181-193.
- Lyons, A.B., Parish, C.R. (1994). Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 171, 131-137.
- Macdonald, K.P., Munster, D.J., Clark, G.J., Dzionek, A., Schmitz, J., Hart, D.N. (2002). Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* 100, 4512-4520.
- Mach, N., Gillessen, S., Wilson, S.B., Sheehan, C., Mihm, M., Dranoff, G. (2000). Differences in dendritic cells stimulated *in vivo* by tumors engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or Flt3-ligand. *Cancer Res.* 60, 3239-3246.

- Mahnke, K., Guo, M., Lee, S., Sepulveda, H., Swain, S.L., Nussenzweig, M., Steinman, R.M. (2000). The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J. Cell Biol.* 151, 673-684.
- Maraskovsky, E., Brasel, K., Teepe, M., Roux, E.R., Lyman, S.D., Shortman, K., Mckenna, H.J. (1996). Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J. Exp. Med.* 184, 1953-1962.
- Maraskovsky, E., Daro, E., Roux, E., Teepe, M., Maliszewski, C.R., Hoek, J., Caron, D., Lebsack, M.E., Mckenna, H.J. (2000). In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand. *Blood* 96, 878-884.
- McCachren, S.S., Diggs, J., Weinberg, J.B., Dittman, W.A. (1991). Thrombomodulin expression by human blood monocytes and by human synovial tissue lining macrophages. *Blood* 78, 3128-3132.
- McKenna, H.J., Stocking, K.L., Miller, R.E., Brasel, K., De Smedt, T., Maraskovsky, E., Maliszewski, C.R., Lynch, D.H., Smith, J., Pulendran, B., Roux, E.R., Teepe, M., Lyman, S.D., Peschon, J.J. (2000). Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* 95, 3489-3497.
- McLellan, A.D., Kapp, M., Eggert, A., Linden, C., Bommhardt, U., Brocker, E.B., Kammerer, U., Kampgen, E. (2002). Anatomic location and T-cell stimulatory functions of mouse dendritic cell subsets defined by CD4 and CD8 expression. *Blood* 99, 2084-2093.
- Miltenyi, S., Müller, W., Weichel, W., Radbruch, A. (1990). High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11, 231-238.
- Mora, A. (2010). Expression and function of the chemokine receptor XCR1 on murine CD8⁺ DC. Dissertation. Humboldt-Universität Berlin.
- Morse, M.A., Bradley, D.A., Keler, T., Laliberte, R.J., Green, J.A., Davis, T.A., Inman, B.A. (2011). CDX-1307: a novel vaccine under study as treatment for muscle-invasive bladder cancer. *Expert Rev. Vaccines* 10, 733-742.
- Moss, S.F., Blaser, M.J. (2005). Mechanisms of disease: Inflammation and the origins of cancer. *Nature clinical practice. Oncology* 2, 90-97; quiz 91 p following 113.
- Müller, S., Dorner, B., Korthäuer, U., Mages, H.W., D'apuzzo, M., Senger, G., Kroczeck, R.A. (1995). Cloning of ATAC, an activation-induced, chemokine-related molecule exclusively expressed in CD8⁺ T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 25, 1744-1748.
- Murphy, P.M., Baggiolini, M., Charo, I.F., Hebert, C.A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L.H., Oppenheim, J.J., Power, C.A. (2000). International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol. Rev.* 52, 145-176.
- Obst, R., Van Santen, H.M., Melamed, R., Kamphorst, A.O., Benoist, C., Mathis, D. (2007). Sustained antigen presentation can promote an immunogenic T cell response, like dendritic cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 15460-15465.
- O'Doherty, U., Steinman, R.M., Peng, M., Cameron, P.U., Gezelter, S., Kopeloff, I., Swiggard, W.J., Pope, M., Bhardwaj, N. (1993). Dendritic cells freshly isolated from human blood express CD4 and mature into typical immunostimulatory dendritic cells after culture in monocyte-conditioned medium. *J. Exp. Med.* 178, 1067-1076.

- Ortega, G., Robb, R.J., Shevach, E.M., Malek, T.R. (1984). The murine IL 2 receptor. I. Monoclonal antibodies that define distinct functional epitopes on activated T cells and react with activated B cells. *J. Immunol.* 133, 1970-1975.
- Osugi, Y., Vuckovic, S., Hart, D.N. (2002). Myeloid blood CD11c⁺ dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells differ in their ability to stimulate T lymphocytes. *Blood* 100, 2858-2866.
- Perussia, B., Acuto, O., Terhorst, C., Faust, J., Lazarus, R., Fanning, V., Trinchieri, G. (1983). Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. II. Studies of B73.1 antibody-antigen interaction on the lymphocyte membrane. *J. Immunol.* 130, 2142-2148.
- Piccioli, D., Tavarini, S., Borgogni, E., Steri, V., Nuti, S., Sammicheli, C., Bardelli, M., Montagna, D., Locatelli, F., Wack, A. (2007). Functional specialization of human circulating CD16 and CD1c myeloid dendritic-cell subsets. *Blood* 109, 5371-5379.
- Plotkin, S.A. (2008). Vaccines: correlates of vaccine-induced immunity. *Clin. Infect. Dis.* 47, 401-409.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., Beutler, B. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282, 2085-2088.
- Ponath, P.D., Wang, J., Heath, H. (2000). Transwell chemotaxis. *Methods Mol. Biol.* 138, 113-120.
- Pooley, J.L., Heath, W.R., Shortman, K. (2001). Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8⁻ dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8⁺ dendritic cells. *J. Immunol.* 166, 5327-5330.
- Poon, I.K., Hulett, M.D., Parish, C.R. (2010). Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance. *Cell Death Differ.* 17, 381-397.
- Prat, M., Gribaudo, G., Comoglio, P.M., Cavallo, G., Landolfo, S. (1984). Monoclonal antibodies against murine gamma interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 4515-4519.
- Proudfoot, A.E., Handel, T.M., Johnson, Z., Lau, E.K., Liwang, P., Clark-Lewis, I., Borlat, F., Wells, T.N., Kosco-Vilbois, M.H. (2003). Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 1885-1890.
- Pulendran, B., Ahmed, R. (2011). Immunological mechanisms of vaccination. *Nat. Immunol.* 12, 509-517.
- Qiu, C.H., Miyake, Y., Kaise, H., Kitamura, H., Ohara, O., Tanaka, M. (2009). Novel subset of CD8 α ⁺ dendritic cells localized in the marginal zone is responsible for tolerance to cell-associated antigens. *J. Immunol.* 182, 4127-4136.
- Radbruch, A. (2000). *Flow Cytometry and Cell Sorting*. Berlin: Springer-Verlag.
- Rappuoli, R. (2007). Bridging the knowledge gaps in vaccine design. *Nat. Biotechnol.* 25, 1361-1366.

- Razi-Wolf, Z., Falo, L.D., Jr., Reiser, H. (1994). Expression and function of the costimulatory molecule B7 on murine Langerhans cells: evidence for an alternative CTLA-4 ligand. *Eur. J. Immunol.* 24, 805-811.
- Robbins, S.H., Walzer, T., Dembele, D., Thibault, C., Defays, A., Bessou, G., Xu, H., Vivier, E., Sellars, M., Pierre, P., Sharp, F.R., Chan, S., Kastner, P., Dalod, M. (2008). Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling. *Genome Biol.* 9, R17.
- Robinson, S.P., Patterson, S., English, N., Davies, D., Knight, S.C., Reid, C.D. (1999). Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 29, 2769-2778.
- Sancho, D., Mourao-Sá, D., Joffre, O.P., Schulz, O., Rogers, N.C., Pennington, D.J., Carlyle, J.R., Reis E Sousa, C. (2008). Tumor therapy in mice via antigen targeting to a novel, DC-restricted C-type lectin. *J. Clin. Investig.* 118, 2098-2110.
- Sancho, D., Joffre, O.P., Keller, A.M., Rogers, N.C., Martinez, D., Hernanz-Falcon, P., Rosewell, I., Reis E Sousa, C. (2009). Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature* 458, 899-903.
- Sathe, P., Pooley, J., Vremec, D., Mintern, J., Jin, J.O., Wu, L., Kwak, J.Y., Villadangos, J.A., Shortman, K. (2011). The acquisition of antigen cross-presentation function by newly formed dendritic cells. *J. Immunol.* 186, 5184-5192.
- Savill, J., Hogg, N., Ren, Y., Haslett, C. (1992). Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J. Clin. Investig.* 90, 1513-1522.
- Schiavoni, G., Mattei, F., Sestili, P., Borghi, P., Venditti, M., Morse, H.C., 3rd, Belardelli, F., Gabriele, L. (2002). ICSBP is essential for the development of mouse type I interferon-producing cells and for the generation and activation of CD8 α^+ dendritic cells. *J. Exp. Med.* 196, 1415-1425.
- Schlegel, R.A., Krahlting, S., Callahan, M.K., Williamson, P. (1999). CD14 is a component of multiple recognition systems used by macrophages to phagocytose apoptotic lymphocytes. *Cell Death Differ.* 6, 583-592.
- Schnurr, M., Chen, Q., Shin, A., Chen, W., Toy, T., Jenderek, C., Green, S., Miloradovic, L., Drane, D., Davis, I.D., Villadangos, J., Shortman, K., Maraskovsky, E., Cebon, J. (2005). Tumor antigen processing and presentation depend critically on dendritic cell type and the mode of antigen delivery. *Blood* 105, 2465-2472.
- Schulz, O., Reis E Sousa, C. (2002). Cross-presentation of cell-associated antigens by CD8 α^+ dendritic cells is attributable to their ability to internalize dead cells. *Immunology* 107, 183-189.
- Segura, E., Villadangos, J.A. (2009). Antigen presentation by dendritic cells *in vivo*. *Curr. Opin. Immunol.* 21, 105-110.
- Semrich, M., Plantinga, M., Svensson-Frej, M., Uronen-Hansson, H., Gustafsson, T., Mowat, A.M., Yrlid, U., Lambrecht, B.N., Agace, W.W. (2012). Directed antigen targeting *in vivo* identifies a role for CD103 $^+$ dendritic cells in both tolerogenic and immunogenic T-cell responses. *Mucosal Immunol.* 5, 150-160.

- Shan, L., Qiao, X., Oldham, E., Catron, D., Kaminski, H., Lundell, D., Zlotnik, A., Gustafson, E., Hedrick, J.A. (2000). Identification of viral macrophage inflammatory protein (vMIP)-II as a ligand for GPR5/XCR1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268, 938-941.
- Sharpe, A.H., Freeman, G.J. (2002). The B7-CD28 superfamily. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 116-126.
- Shortman, K., Heath, W.R. (2010). The CD8⁺ dendritic cell subset. *Immunol. Rev.* 234, 18-31.
- Shrimpton, R.E., Butler, M., Morel, A.S., Eren, E., Hue, S.S., Ritter, M.A. (2009). CD205 (DEC-205): a recognition receptor for apoptotic and necrotic self. *Mol. Immunol.* 46, 1229-1239.
- Smith, T.J., Ducharme, L.A., Shaw, S.K., Parker, C.M., Brenner, M.B., Kilshaw, P.J., Weis, J.H. (1994). Murine M290 integrin expression modulated by mast cell activation. *Immunity* 1, 393-403.
- Steinman, R.M., Banchereau, J. (2007). Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 449, 419-426.
- Steinman, R.M. (2008). Dendritic cells in vivo: a key target for a new vaccine science. *Immunity* 29, 319-324.
- Sung, S.S., Fu, S.M., Rose, C.E., Jr., Gaskin, F., Ju, S.T., Beaty, S.R. (2006). A major lung CD103 (α_E)- β_7 integrin-positive epithelial dendritic cell population expressing Langerin and tight junction proteins. *J. Immunol.* 176, 2161-2172.
- Suzuki, S., Honma, K., Matsuyama, T., Suzuki, K., Toriyama, K., Akitoyo, I., Yamamoto, K., Suematsu, T., Nakamura, M., Yui, K., Kumatori, A. (2004). Critical roles of interferon regulatory factor 4 in CD11b^{high}CD8 α^- dendritic cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 8981-8986.
- Tacken, P.J., Figdor, C.G. (2011). Targeted antigen delivery and activation of dendritic cells in vivo: steps towards cost effective vaccines. *Seminars in immunology* 23, 12-20.
- Thacker, R.I., Janssen, E.M. (2012). Cross-presentation of cell-associated antigens by mouse splenic dendritic cell populations. *Front. Immunol.* 3, 41.
- Tiisala, S., Paavonen, T., Renkonen, R. (1995). $\alpha_E\beta_7$ and $\alpha_4\beta_7$ integrins associated with intraepithelial and mucosal homing, are expressed on macrophages. *Eur. J. Immunol.* 25, 411-417.
- Tomonari, K. (1988). A rat antibody against a structure functionally related to the mouse T-cell receptor/T3 complex. *Immunogenetics* 28, 455-458.
- Trombetta, E.S., Mellman, I. (2005). Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 975-1028.
- Ugolini, V., Nunez, G., Smith, R.G., Stastny, P., Capra, J.D. (1980). Initial characterization of monoclonal antibodies against human monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 6764-6768.
- Valladeau, J., Ravel, O., Dezutter-Dambuyant, C., Moore, K., Kleijmeer, M., Liu, Y., Duvert-Frances, V., Vincent, C., Schmitt, D., Davoust, J., Caux, C., Lebecque, S., Saeland, S. (2000). Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 12, 71-81.

- Vermaelen, K.Y., Carro-Muino, I., Lambrecht, B.N., Pauwels, R.A. (2001). Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes. *J. Exp. Med.* 193, 51-60.
- Vermaelen, K., Pauwels, R. (2004). Accurate and simple discrimination of mouse pulmonary dendritic cell and macrophage populations by flow cytometry: methodology and new insights. *Cytometry A.* 61, 170-177.
- Villadangos, J.A., Schnorrer, P. (2007). Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 543-555.
- Villadangos, J.A., Young, L. (2008). Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 29, 352-361.
- Vremec, D., Zorbas, M., Scollay, R., Saunders, D.J., Ardavin, C.F., Wu, L., Shortman, K. (1992). The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *J. Exp. Med.* 176, 47-58.
- Vremec, D., Pooley, J., Hochrein, H., Wu, L., Shortman, K. (2000). CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J. Immunol.* 164, 2978-2986.
- Vremec, D., O'keeffe, M., Hochrein, H., Fuchsberger, M., Caminschi, I., Lahoud, M., Shortman, K. (2007). Production of interferons by dendritic cells, plasmacytoid cells, natural killer cells, and interferon-producing killer dendritic cells. *Blood* 109, 1165-1173.
- Wang, H., Griffiths, M.N., Burton, D.R., Ghazal, P. (2000). Rapid antibody responses by low-dose, single-step, dendritic cell-targeted immunization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 847-852.
- Waskow, C., Liu, K., Darrasse-Jeze, G., Guermonprez, P., Ginhoux, F., Merad, M., Shengelia, T., Yao, K., Nussenzweig, M. (2008). The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. *Nat. Immunol.* 9, 676-683.
- Wei, H., Wang, S., Zhang, D., Hou, S., Qian, W., Li, B., Guo, H., Kou, G., He, J., Wang, H., Guo, Y. (2009). Targeted delivery of tumor antigens to activated dendritic cells via CD11c molecules induces potent antitumor immunity in mice. *Clin. Cancer Res.* 15, 4612-4621.
- Wilson, N.S., Villadangos, J.A. (2005). Regulation of antigen presentation and cross-presentation in the dendritic cell network: facts, hypothesis, and immunological implications. *Adv. Immunol.* 86, 241-305.
- Witmer-Pack, M.D., Swiggard, W.J., Mirza, A., Inaba, K., Steinman, R.M. (1995). Tissue distribution of the DEC-205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145. II. Expression in situ in lymphoid and nonlymphoid tissues. *Cell. Immunol.* 163, 157-162.
- Wu, L., D'amico, A., Winkel, K.D., Suter, M., Lo, D., Shortman, K. (1998). RelB is essential for the development of myeloid-related CD8 α ⁻ dendritic cells but not of lymphoid-related CD8 α ⁺ dendritic cells. *Immunity* 9, 839-847.
- Yoshida, T., Imai, T., Kakizaki, M., Nishimura, M., Yoshie, O. (1995). Molecular cloning of a novel C or gamma type chemokine, SCM-1. *FEBS Lett.* 360, 155-159.

- Yoshida, T., Imai, T., Kakizaki, M., Nishimura, M., Takagi, S., Yoshie, O. (1998). Identification of single C motif-1/lymphotactin receptor XCR1. *J. Biol. Chem.* 273, 16551-16554.
- Zelenay, S., Keller, A.M., Whitney, P.G., Schraml, B.U., Deddouche, S., Rogers, N.C., Schulz, O., Sancho, D., Reis E Sousa, C. (2012). The dendritic cell receptor DNGR-1 controls endocytic handling of necrotic cell antigens to favor cross-priming of CTLs in virus-infected mice. *J. Clin. Investig.* 122, 1615-1627.
- Zhang, J.G., Czabotar, P.E., Policheni, A.N., Caminschi, I., Wan, S.S., Kitsoulis, S., Tullett, K.M., Robin, A.Y., Brammananth, R., Van Delft, M.F., Lu, J., O'reilly, L.A., Josefsson, E.C., Kile, B.T., Chin, W.J., Mintern, J.D., Olshina, M.A., Wong, W., Baum, J., Wright, M.D., Huang, D.C., Mohandas, N., Coppel, R.L., Colman, P.M., Nicola, N.A., Shortman, K., Lahoud, M.H. (2012). The dendritic cell receptor Clec9A binds damaged cells via exposed actin filaments. *Immunity* 36, 646-657.
- Zlotnik, A., Yoshie, O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12, 121-127.

7 Abkürzungsverzeichnis

ACK	Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat
ATAC	<i>activation induced, T cell derived and chemokine-like molecule</i>
Batf3	<i>basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 3</i>
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
BP	Bandpassfilter
β-ME	β-Mercaptoethanol
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFA	komplettes Freund's Adjuvans
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidylester
CFU	<i>colony forming unit</i>
Clec9A	<i>C-type lectin domain family 9A</i>
DAMP	<i>danger associated molecular patterns</i>
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol
DZ	dendritische Zelle(n)
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FDG	Fluorescein-di-β-D-Galactopyranosid
Flt3	<i>Fms-related tyrosine kinase 3</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Erdbeschleunigung (in Zusammenhang mit Zentrifugationen)
GAG	Glykosaminoglykan
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
ICOS	<i>inducible costimulator</i>
IFA	inkomplettes Freund's Adjuvans
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
i.p.	intraperitoneal

IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
i.v.	intravenös
KO	<i>knock-out</i>
Lin	Linienpezifische Marker
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
mAk	monoklonaler Antikörper
MESNA	2-Mercaptoethansulfonat-Natrium
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MoDZ	monozytengenerierte dendritische Zellen
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
Necl2	<i>nectin-like molecule 2</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
OD	Optische Dichte
OVA	Ovalbumin
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PD-1	<i>programmed cell death 1</i>
PD-L2	<i>programmed cell death ligand 2</i>
pDZ	plasmazytoide dendritische Zellen
POD	Peroxidase
poly I:C	Komplex aus Polyriboinosinsäure und Polyribocytidylsäure
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>real-time polymerase chain reaction</i>
s.c.	subkutan
SCM-1	<i>single-cystein motif 1</i>
SMCC	Succinimidyl-4-(N-Maleimidomethyl)-Cyclohexan-1-Carboxylat
SSC	<i>side scatter</i>
TH1	Typ 1 Helfer-T-Zellen
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TZR	T-Zellrezeptor
WT	Wildtyp

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. R. A. Kroczek, der mir ermöglicht hat, an diesem interessanten Thema zu arbeiten und mir durch seine Betreuung und Unterstützung bei meiner Arbeit sehr geholfen hat.

Herrn Prof. Dr. R. Mutzel danke ich für die freundliche Übernahme der Betreuung an der FU Berlin.

Stephanie Gurka, Andreas Hutloff und Anika Jäkel danke ich für die hervorragende Einarbeitung und Betreuung in der Durchflusszytometrie.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern von P21 danke ich herzlich für die Hilfsbereitschaft und die freundliche Atmosphäre während meiner Arbeit. Mit Euch hatte ich viele anregende Diskussionen und viel Spaß. Ihr habt damit eine ausgezeichnete Umgebung für das wissenschaftliche Arbeiten geschaffen.

Besonders herzlich bedanke ich mich bei Annabell Bachem und Steffen Güttler für die wunderbare Zusammenarbeit, selbst bei der nächtlichen Durchführung der humanen Experimente, die dank Euch stets mit guter Laune verbunden war. Euch und Volker Henn danke ich auch für die Korrektur meiner Arbeit.

Meinen Eltern danke ich für die fortwährende Unterstützung während meines Studiums und meiner Arbeit.

Mein größter Dank gilt Alexander, der immer für mich da ist.

9 Publikationen

9.1 Originalpublikationen

Bachem, A.*, Güttler, S.*, **Hartung, E.***, Ebstein, F., Schaefer, M., Tannert, A., Salama, A., Movassaghi, K., Opitz, C., Mages, H.W., Henn, V., Kloetzel, P.-M., Gurka, S., Kroczeck, R.A. (2010). Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c⁺CD141⁺ cells as homologues of mouse CD8⁺ dendritic cells. *J. Exp. Med.* 207, 1273-1281.

Bachem, A.*, **Hartung, E.***, Güttler, S.*, Mora, A., Zhou, X., Hegemann, A., Plantinga, M., Mazzini, E., Stoitzner, P., Gurka, S., Henn, V., Mages, H.W., Kroczeck, R.A. (2012). Expression of XCR1 Characterizes the Batf3-Dependent Lineage of Dendritic Cells Capable of Antigen Cross-Presentation. *Front. Immunol.* 3, 214.

* die Autoren leisteten einen gleichen Beitrag

9.2 Kongressbeiträge und sonstige Vorträge

Poster:

Bachem, A., Güttler, S., **Hartung, E.**, Ebstein, F., Schaefer, M., Tannert, A., Salama, A., Movassaghi, K., Opitz, C., Mages, H.W., Henn, V., Kloetzel, P.-M., Gurka, S., Kroczeck, R.A., Superior antigen cross presentation and XCR1 expression define human CD11c⁺CD141⁺ cells as homologues of murine CD8⁺ dendritic cells, 40th Annual Meeting DGfI, 22.-25.09.2010, Leipzig

Bachem, A., Güttler, S., **Hartung, E.**, Henn, V., Gurka, S., Hegemann, A., Mages, H.W., Weber, H., Kroczeck, R.A., Phenotypic and functional analysis of XCR1-expressing, antigen cross-presenting DC in the mouse and the human, DC2010: Forum on Vaccine Science, 26.-30.09.2010, Lugano, Schweiz

Bachem, A., Güttler, S., **Hartung, E.**, Plantinga, M., Lambrecht, B.N., Stoitzner, P., Romani, N., Mazzini, E., Rescigno, M., Kroczeck, R.A., Tight correlation between XCR1 expression and antigen cross-presentation changes functional classification of splenic dendritic cells, Joint Annual Meeting SIICA – Dgfi, 28.09.-01.10.2011, Riccione, Italien

Bachem, A., **Hartung, E.**, Güttler, S., Mora, A., Zhou, X., Hegemann, A., Plantinga, M., Mazzini, E., Stoitzner, P., Gurka, S., Henn, V., Mages, H.W., KroczeK, R.A., Expression of XCR1 characterizes the cross-presenting Batf3-dependent lineage of dendritic cells, 05.-08.09.2012, Glasgow, Großbritannien

Vorträge:

Hartung, E., KroczeK, R.A., XCR1⁺ dendritic cells cross-present antigen and trigger a CD8 T cell cytotoxic response in vivo, 31.08.2012, Universität Gent, VIB, Gent, Belgien

Hartung, E., Becker, M., Bachem, A., Weber, H., Gurka, S., Henn, V., Mages, H.W., KroczeK, R.A., Targeting of antigen via XCR1, the lineage marker for cross-presenting dendritic cells, elicits potent CD8 cytotoxicity in vivo, 05.-08.09.2012, Glasgow, Großbritannien