



**Regulation der Toleranzinduktion von *steady-state* migratorischen  
Dendritischen Zellen durch den Transkriptionsfaktor RelB**

**Regulation of tolerance induction by steady-state migratory  
dendritic cells through the transcription factor RelB**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Graduate School of Life Sciences,  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Klasse: Infection and Immunity

vorgelegt von

**Anja Döhler**

aus

Zwickau

Würzburg 2012



**Eingereicht am:** .....

**Mitglieder des Promotionskomitees:**

**Vorsitzender:**        **Prof. Dr. Karl Mannheim**

**1. Betreuer:**        **Prof. Dr. Manfred B. Lutz**

**2. Betreuer:**        **Prof. Dr. Thomas Müller**

**3. Betreuer:**        **Prof. Dr. Thomas Hünig**

**Tag des Promotionskolloquiums:**.....

**Doktorurkunden ausgehändigt am:**.....



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Das Immunsystem .....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Die angeborene Immunität .....	1
1.1.2. Die adaptive Immunität .....	2
<b>1.2. Dendritische Zellen.....</b>	<b>4</b>
1.2.1. Erkennung und Aufnahme von Antigenen .....	4
1.2.2. Prozessierung und Präsentation von Antigenen .....	4
1.2.3. Migration zu den lymphatischen Organen.....	5
1.2.4. T-Zellaktivierung.....	5
1.2.5. Reifungsstadien von DZ und deren Funktion.....	7
1.2.6. Heterogenität von murinen DZ.....	8
<b>1.3. Mechanismen der T-Zelltoleranz.....</b>	<b>13</b>
1.3.1. Zentrale Toleranz.....	13
1.3.2. Periphere Toleranz.....	14
<b>1.4. CD4<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen und die Rolle von DZ bei deren Induktion und Erhaltung .....</b>	<b>16</b>
1.4.1. Gemeinsamkeiten und Unterschiede von Foxp3 <sup>+</sup> nT <sub>reg</sub> und iT <sub>reg</sub> .....	16
1.4.2. Die Rolle von DZ für die Induktion von Foxp3 <sup>+</sup> nT <sub>regs</sub> .....	18
1.4.3. Die Rolle von DZ für die Induktion von Foxp3 <sup>+</sup> iT <sub>regs</sub> .....	18
1.4.4. Die Rolle von DZ für die Erhaltung von Foxp3 <sup>+</sup> nT <sub>regs</sub> und iT <sub>regs</sub> in der Peripherie.....	20
<b>1.5. Der Transkriptionsfaktor NF-κB.....</b>	<b>22</b>
1.5.1. Die NF-κB-Familie .....	22
1.5.2. Die NF-κB-Signalwege .....	23
1.5.3. Die Bedeutung von NF-κB für DZ.....	25
<b>1.6. Zielsetzung .....</b>	<b>27</b>
<b>2. MATERIAL.....</b>	<b>28</b>
<b>2.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial .....</b>	<b>28</b>
<b>2.2. Medien, Puffer und Lösungen.....</b>	<b>28</b>
<b>2.3. Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe.....</b>	<b>30</b>
<b>2.4. Oligonukleotide.....</b>	<b>32</b>
<b>2.5. Enzyme und Peptide.....</b>	<b>32</b>

<b>2.6. Kits und Magnetische Beads.....</b>	<b>33</b>
<b>2.7. Versuchstiere .....</b>	<b>33</b>
<b>3. METHODEN.....</b>	<b>34</b>
<b>3.1. Zellkulturverfahren.....</b>	<b>34</b>
3.1.1. Kultivierung und Ernte von Zellen.....	34
3.1.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	34
3.1.3. Zellzählung und Vitalitätstest.....	34
3.1.4. Gewinnung von $\alpha$ IL-2 Antikörper.....	34
<b>3.2. Präparation von Zellen aus lymphatischen Organen der Maus .....</b>	<b>35</b>
3.2.1. Präparation von Knochenmarkszellen.....	35
3.2.2. Präparation von lymphatischen Organen als Quelle für T-Zellen.....	35
3.2.3. Präparation von lymphatischen Organen als Quelle für DZ.....	35
<b>3.3. Durchflusszytometrische Analyse .....</b>	<b>36</b>
3.3.1. Färbung von Oberflächenmolekülen auf Zellen lymphatischer Organe.....	36
3.3.2. Intrazelluläre Färbung von Foxp3, Helios und Ki67 in Zellen lymphatischer Organe .	37
3.3.3. Intrazelluläre Färbung von RelB in DZ der lymphatischen Organe.....	37
3.3.4. Oberflächen- und intrazelluläre Färbung von Zellen in Vollblut.....	37
<b>3.4. Zellsortierungen.....</b>	<b>38</b>
3.4.1. Magnetische Zellsortierung von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	38
3.4.2. Magnetische Zellsortierung von CD25 <sup>+</sup> und CD25 <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	38
3.4.3. Magnetische Zellsortierung von CD11c <sup>+</sup> DZ.....	38
3.4.4. Durchflusszytometrische Sortierung von CD11c <sup>+</sup> DZ .....	38
<b>3.5. Zellmarkierung mit CFSE.....</b>	<b>39</b>
<b>3.6. <i>In vitro</i> T<sub>reg</sub> Konversionsassay .....</b>	<b>39</b>
<b>3.7. Tierexperimentelle Methoden .....</b>	<b>40</b>
3.7.1. Adoptiver Transfer von naiven CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> T-Zellen .....	40
3.7.2. Adoptiver Transfer von regulatorischen CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T-Zellen.....	40
3.7.3. Generierung von Knochenmarkchimären.....	40
3.7.4. FITC-Bepinselung von Mäusen .....	40
3.7.5. Blutentnahme bei Mäusen .....	41
3.7.6. Injektion von $\alpha$ IL-2 monoklonalem Antikörper in Mäuse .....	41
<b>3.8. Immunhistologische Methoden .....</b>	<b>41</b>
3.8.1. Herstellung von Gewebeschnitten.....	41
3.8.2. Immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten .....	42

3.8.3.	Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten .....	42
3.8.4.	Herstellung und Immunfluoreszenzfärbung von <i>epidermal sheets</i> .....	43
3.8.5.	Immunfluoreszenzfärbung von Zellen.....	44
<b>3.9.</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>44</b>
3.9.1.	Genotypisierung von transgenen Mauslinien .....	44
3.9.2.	Relative Quantifizierung der mRNA Expression .....	47
<b>3.10.</b>	<b>Statistik.....</b>	<b>49</b>
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>50</b>
<b>4.1.</b>	<b>Analyse des tolerogenen Potentials von ssmDZ in hautdrainierenden Lymphknoten..</b>	<b>50</b>
4.1.1.	Phänotypische Charakterisierung von ssmDZ und residenten DZ in hautdrainierenden Lymphknoten.....	50
4.1.2.	Analyse der Expression von CD103 auf ssmDZ und residenten DZ .....	51
4.1.3.	SsmDZ induzieren Foxp3 <sup>+</sup> T <sub>regs</sub> <i>in vitro</i> mittels endogenem TGF-β .....	52
4.1.4.	SsmDZ induzieren Foxp3 <sup>+</sup> T <sub>regs</sub> <i>in vivo</i> .....	54
4.1.5.	Migratorische Langerin <sup>+</sup> dermale DZ induzieren Foxp3 <sup>+</sup> T <sub>regs</sub> <i>in vivo</i> .....	55
<b>4.2.</b>	<b>Analyse der Rolle von RelB für die Reifung und Migration von ssmDZ .....</b>	<b>58</b>
4.2.1.	SsmDZ zeigen eine nukleäre Translokation von RelB.....	58
4.2.2.	Verminderte Frequenz an ssmDZ in hautdrainierenden Lymphknoten von <i>relB</i> <sup>+/-</sup> und <i>p52</i> <sup>-/-</sup> Mäusen .....	61
<b>4.3.</b>	<b>Analyse der Auswirkung einer DZ-spezifischen Inaktivierung von RelB auf ssmDZ und Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub>.....</b>	<b>63</b>
4.3.1.	Fehlende RelB Expression in DZ von RelB <sup>DCko</sup> Mäusen .....	63
4.3.2.	RelB <sup>DCko</sup> Mäuse zeigen eine normale Zellularität von hautdrainierenden Lymphknoten und Milz .....	65
4.3.3.	Erhöhte Frequenz an ssmDZ in den hautdrainierenden Lymphknoten von RelB <sup>DCko</sup> Mäusen .....	66
4.3.4.	Keine Beeinträchtigung von DZ in der Haut von RelB <sup>DCko</sup> Mäusen .....	68
4.3.5.	SsmDZ in RelB <sup>DCko</sup> Mäusen exprimieren mehr CD40 im Vergleich zu Kontrollmäusen.. .....	70
4.3.6.	Einfluss der RelB-Defizienz in DZ auf die Homöostase von B- und T-Lymphozyten in peripheren lymphatischen Organen .....	72
4.3.7.	Einfluss der RelB-Defizienz in DZ auf die Homöostase und den Phänotyp von Foxp3 <sup>+</sup> T <sub>regs</sub> und Foxp3 <sup>-</sup> T <sub>konv</sub> in peripheren lymphatischen Organen.....	73
4.3.8.	Erhöhte Frequenz an Helios <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> T <sub>regs</sub> in den hautdrainierenden Lymphknoten und der Milz von RelB <sup>DCko</sup> Mäusen.....	76
4.3.9.	Verstärkte Proliferation von T <sub>regs</sub> im Thymus von RelB <sup>DCko</sup> Mäusen .....	77
4.3.10.	Verstärkte Proliferation von Helios <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> T <sub>regs</sub> in hautdrainierenden Lymphknoten von RelB <sup>DCko</sup> Mäusen .....	80

4.3.11.	Expansion von adoptiv transferierten $T_{regs}$ in den hautdrainierenden Lymphknoten von RelB <sup>DCko</sup> Mäusen .....	82
4.3.12.	Analyse von Faktoren, die eine erhöhte Proliferation von $T_{regs}$ in peripheren lymphatischen Organen von RelB <sup>DCko</sup> Mäusen bewirken können.....	83
4.3.13.	Erhöhte Expression von PD-1 auf $T_{reg}$ und $T_{konv}$ der peripheren lymphatischen Organe von RelB <sup>DCko</sup> Mäusen .....	86
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>89</b>
<b>5.1.</b>	<b>Tolerogenes Potential von ssmDZ in den hautdrainierenden Lymphknoten .....</b>	<b>89</b>
5.1.1.	SsmDZ in den hautdrainierenden Lymphknoten zeigen einen semireifen Phänotyp....	89
5.1.2.	Induktion von $Foxp3^+ iT_{regs}$ durch ssmDZ in den hautdrainierenden Lymphknoten .....	89
5.1.3.	Wie vermitteln ssmDZ die periphere Induktion von $Foxp3^+ iT_{regs}$ ?.....	93
5.1.4.	Sind die semireifen ssmDZ in den hautdrainierenden Lymphknoten mit anderen bereits bekannten semireifen DZ vergleichbar?.....	95
<b>5.2.</b>	<b>Rolle von RelB für die Reifung und Migration von ssmDZ und indirekt für die Induktion und Erhaltung von <math>Foxp3^+ T_{reg}</math>.....</b>	<b>96</b>
5.2.1.	Welchen Einfluss hat RelB auf die Reifung und Migration von ssmDZ ?.....	97
5.2.2.	Führt eine RelB-Defizienz in DZ zu einer Beeinträchtigung der Induktion und Homöostase von $Foxp3^+ T_{regs}$ ? .....	102
5.2.3.	Welche Faktoren könnten die erhöhte Frequenz an proliferierenden $Foxp3^+ T_{regs}$ in den peripheren lymphatischen Organen von RelB <sup>DCko</sup> Mäusen bewirken?.....	105
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>110</b>
<b>7.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>112</b>
<b>8.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>114</b>
<b>9.</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>130</b>
<b>10.</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>131</b>
<b>11.</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>132</b>
<b>12.</b>	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN .....</b>	<b>135</b>
<b>13.</b>	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....</b>	<b>136</b>
<b>14.</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>137</b>
<b>15.</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>138</b>



# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Das Immunsystem

Die Funktion des Immunsystems besteht in der Abwehr von Pathogenen sowie in der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz. Im Laufe der Evolution hat das Immunsystem daher zwei ineinander greifende Mechanismen entwickelt: Die angeborene und die adaptive Immunität. Beide unterscheiden sich hinsichtlich der Spezifität, mit der ein Pathogen erkannt wird und der Zeit, bis eine Immunantwort eingeleitet wird.

### 1.1.1. Die angeborene Immunität

Die angeborene Immunität reagiert schnell, aber antigenunspezifisch auf einen Krankheitserreger. Die Abwehrmechanismen sind so konzipiert, dass sie jederzeit in der Lage sind, das Eindringen von Pathogenen zu erschweren. So stellen z.B. die Oberflächenepithelien eine physikalische und chemische Barriere dar, indem sie die Adhäsion von Erregern verhindern und zugleich antimikrobielle Peptide und Enzyme sezernieren. Gelingt es jedoch dem Pathogen diese erste Verteidigungslinie zu durchbrechen, müssen weitere lösliche und zelluläre Komponenten der angeborenen Immunität greifen [1].

Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems zählen unter anderem Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen (DZ). Diese besitzen die Fähigkeit, Pathogene und deren Bestandteile durch Phagozytose aufzunehmen. Die Erkennung der Erreger verläuft hierbei über Rezeptoren, die als *pattern recognition receptors* (PRRs) bezeichnet werden. Die PRRs binden an evolutionär hochkonservierte Strukturen von Pathogenen (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) wie beispielsweise bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) [2]. Makrophagen und DZ setzen als Reaktion auf die pathogenen Bestandteile proinflammatorische Zytokine und Chemokine frei. Diese kleinen z.T. löslichen Proteine können das Verhalten anderer Zellen, die einen entsprechenden Rezeptor exprimieren, beeinflussen. So wirken Chemokine als Chemoattraktoren und induzieren die Wanderung von Zellen mit einem passenden Rezeptor zur Chemokinquelle. Die von den Makrophagen freigesetzten Chemokine führen zur weiteren Anlockung von Phagozyten zum Infektionsherd. Durch die sezernierten proinflammatorischen Zytokine kommt es darüber hinaus zur Aktivierung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Diese Zellen töten gezielt infizierte sowie entartete Zellen. Ein weiterer wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunität ist das Komplementsystem. Es handelt sich dabei um eine Gruppe

von Plasmaproteinen, die Pathogene für die Zerstörung durch Phagozyten markiert und eine Entzündungsreaktion einleitet [1].

Neben der Bekämpfung von eindringenden Erregern hat die angeborene Immunität auch die Aufgabe, die adaptive Immunität zu aktivieren.

### **1.1.2. Die adaptive Immunität**

Im Gegensatz zur angeborenen Immunität benötigt die Initiierung einer adaptiven Immunantwort einige Tage Anlaufzeit, richtet sich jedoch spezifisch gegen ein Antigen. Durch die Generierung von langlebigen Gedächtniszellen ist die adaptive Immunität in der Lage, im Falle einer erneuten Antigenexposition eine schnellere und effektivere Immunität zu gewährleisten als beim Erstkontakt [3].

Die adaptive Immunität beruht hauptsächlich auf B- und T-Lymphozyten. Beide Zellen gehen aus einer gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle im Knochenmark hervor. Während B-Zellen ihre Entwicklung im Knochenmark durchlaufen, wandern T-Zellen zur Reifung in den Thymus aus. Knochenmark und Thymus werden daher auch als primäre lymphatische Organe bezeichnet. Bereits zu Beginn der Entwicklung der Lymphozyten kommt es zu somatischen Rekombinationen der Rezeptorgensegmente, wodurch ein großes Repertoire an verschiedenen Rezeptoren entsteht. Jeder Lymphozyt besitzt infolge dessen nur einen Rezeptortyp einer einzigen Antigenpezifität. Potentiell selbstreaktive Lymphozyten, die körpereigene Antigene mit hoher Affinität binden, werden jedoch im Rahmen der Toleranzinduktion beseitigt bzw. stillgelegt. Dadurch wird sichergestellt, dass keine Immunreaktionen gegen körpereigene Zellen oder Strukturen erfolgen [4].

Nach Abschluss der Reifung wandern die noch Antigen-unerfahrenen (naiven) B- und T-Zellen über das Blut in die peripheren bzw. sekundären lymphatischen Organe ein. In diesen Organen, zu denen die Milz, die Lymphknoten und die darm-assoziierten lymphatischen Gewebe (GALT) zählen, erfolgt bei einer laufenden Infektion die Aktivierung der Lymphozyten. Trifft ein Lymphozyt hier auf sein spezifisches Antigen, kommt es zur Proliferation und Differenzierung in Effektor- und Gedächtniszellen, die alle denselben Antigenrezeptor tragen (klonale Expansion und Differenzierung). Ist jedoch kein Antigen vorhanden, rezirkulieren die Lymphozyten über die Lymphe zurück ins Blut [1, 4].

Damit adaptive Immunantworten ausgelöst werden, müssen antigenpräsentierende Zellen (APZ) Pathogene aufnehmen, zersetzen und deren antigene Komponenten den Lymphozyten in peripheren lymphatischen Organen präsentieren. Als APZ können aktivierte Makrophagen und DZ, aber auch B-Zellen selbst agieren. APZ zeichnen sich dadurch aus, dass sie in der

Lage sind, Peptidantigene gebunden an Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex*, MHC) den T-Zellen zu präsentieren. Letztere können mit Hilfe ihres T-Zellrezeptors (TZR) den Peptid:MHC-Komplex erkennen. Außerdem stellen die APZ zusätzliche kostimulatorische Moleküle zur Aktivierung und Regulierung von T-Zellen bereit. DZ nehmen eine Sonderstellung unter den APZ ein, da sie als einzige darauf spezialisiert sind, Antigene an naive T-Zellen zu präsentieren, um eine primäre Immunantwort zu induzieren (*priming*) [5].

T-Zellen sind Teil der zellulären Immunantwort des adaptiven Immunsystems. Aufgrund verschiedener Effektorfunktionen und MHC-Restriktionen unterscheidet man zwischen  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen.  $CD8^+$  T-Zellen erkennen endogene Peptide gebunden an MHC I, während  $CD4^+$  T-Zellen exogene Peptide im Komplex mit MHC II erkennen.  $CD8^+$  T-Zellen werden auch als zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) bezeichnet, da sie nach Aktivierung in der Lage sind, infizierte oder entartete Zellen zu töten. Die Funktion der  $CD4^+$  T-Zellen besteht hingegen vorwiegend in der Aktivierung anderer Effektorzellen, weshalb sie auch T-Helferzellen (Th) genannt werden. Unter dem Einfluss verschiedener Zytokine können die Th-Zellen in diverse Subpopulationen (z.B. Th1, Th2, Th17) differenzieren. Die bekanntesten unter ihnen sind die Th1- und Th2-Zellen. Th1-Zellen induzieren Immunantworten gegen intrazelluläre Erreger, die von Phagozyten aufgenommen worden. Th2-Zellen erkennen hingegen Antigene von extrazellulären Pathogenen und aktivieren u.a. B-Zellen, um opsonierende (Pathogen-markierende) Antikörper zu produzieren [3].

B-Zellen vertreten den humoralen Arm der adaptiven Immunität. Sie zeichnen sich durch einen membranständigen B-Zellrezeptor (BZR) aus. Nach Antigenbindung an den BZR können B-Zellen mit Hilfe von aktivierten  $CD4^+$  Th-Zellen zu Plasmazellen differenzieren und Antikörper als lösliche Form des BZR sezernieren. Antikörper haben vielfältige Funktionen: Sie dienen der Neutralisierung von Toxinen, der Phagozytose von opsonierten Pathogenen sowie der Aktivierung des Komplementsystems [3].

## 1.2. Dendritische Zellen

DZ stellen eine Schnittstelle zwischen der erworbenen und adaptiven Immunantwort dar. Sie wurden erstmals 1973 von Steinman und Cohn beschrieben [6]. Man findet sie in nahezu allen Geweben und Organen des Körpers. Besonders häufig kommen DZ jedoch in den lymphatischen Organen sowie in den Epithelien der Haut, Lunge und des Darms vor [7]. Als professionelle APZ besteht ihre Hauptaufgabe darin, Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und in den lymphatischen Organen an naive T-Zellen zu präsentieren. DZ sind dadurch in der Lage, antigenspezifische T-Zellantworten zu induzieren [8, 9]. Darüber hinaus spielen DZ auch eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Toleranz [10].

### 1.2.1. Erkennung und Aufnahme von Antigenen

DZ befinden sich in den peripheren Geweben und lymphatischen Organen meist in einem unreifen Zustand, in dem sie eine sehr hohe Kapazität zur Antigenaufnahme besitzen. So nehmen sie kontinuierlich große Mengen löslicher Antigene durch Makropinozytose auf [11]. Außerdem können unreife DZ apoptotisches Zellmaterial, Bakterien, Viren und Parasiten durch Phagozytose und Rezeptor-vermittelte Endozytose aufnehmen [12-14]. Um dabei zwischen Selbst- und Fremdan antigenen unterscheiden zu können, besitzen die Zellen die bereits erwähnten PRR (1.1.1) [15], zu denen die Scavenger-Rezeptoren [16], die C-Typ Lektin-Rezeptoren [11, 17] und die *Toll-like* Rezeptoren (TLR) [18] zählen. Die Aufnahme von mikrobiellen Antigenen induziert eine Reifung der DZ, wodurch die Internalisierung weiterer Antigene reduziert und eine Prozessierung der bereits aufgenommenen Antigene eingeleitet wird. DZ entwickeln sich nun von der ruhenden, phagozytierenden Zelle in eine aktivierte, antigenpräsentierende Zelle [9].

### 1.2.2. Prozessierung und Präsentation von Antigenen

Die aufgenommenen Antigene werden in den DZ zu Peptidfragmenten zersetzt, um sie anschließend in Assoziation mit MHC I und MHC II Molekülen den T-Zellen zu präsentieren [19]. Hierbei werden extrazelluläre Antigene, wie beispielsweise Bakterien, zunächst in Vesikeln, die als Endosomen bzw. Phagosomen bezeichnet werden, aufgenommen. Im sauren Milieu dieser Vesikel erfolgt durch Proteasen eine Spaltung der Proteinantigene. Die dabei entstandenen Peptidfragmente werden auf MHC II Moleküle geladen und auf der DZ-Oberfläche den CD4<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert. Im Gegensatz dazu werden intrazelluläre Antigene, wie z.B. virale Proteine in infizierten Zellen, im Zytosol durch Proteasomen zu Peptidfragmenten zerkleinert, ins Innere des Endoplasmatischen Retikulum geleitet und dort

an MHC I Moleküle gebunden. Die resultierenden Peptid:MHC I Komplexe werden zur Zelloberfläche transportiert und dort an CD8<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert [5]. Darüber hinaus besitzen DZ die besondere Fähigkeit, extrazelluläre Antigene auch in Kombination mit MHC I an CD8<sup>+</sup> T-Zellen präsentieren zu können – ein Vorgang, der als Kreuzpräsentation bezeichnet wird [12].

### **1.2.3. Migration zu den lymphatischen Organen**

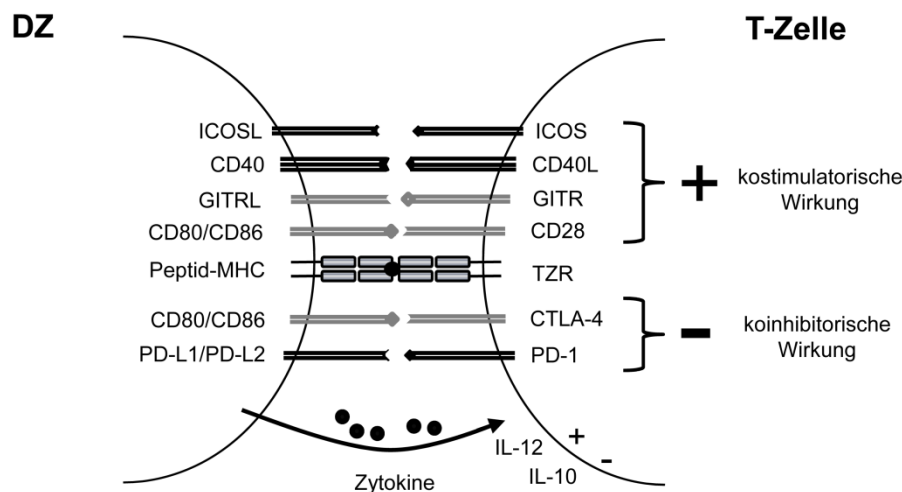
Nehmen DZ Antigene in den peripheren Geweben auf, wandern sie über die afferenten Lymphgefäße in die drainierenden lymphatischen Organe, um dort die prozessierten Antigene den naiven T-Zellen zu präsentieren. Die damit einhergehende Reifung der DZ bewirkt auch eine Änderung in der Expression von Chemokinrezeptoren und Adhäsionsmolekülen (Übersicht in [20]). Chemokinrezeptoren, die zuvor eine Einwanderung in die peripheren Gewebe ermöglichten, werden herunterreguliert [21]. Im Gegenzug wird auf den reifenden DZ CCR7, ein sogenannter Lymphknoten-*Homing*-Rezeptor, hochreguliert [21-23]. CCR7 bindet an die Chemokine CCL19 und CCL21. Diese Liganden bilden einen Gradienten entlang der afferenten Lymphgefäße bis in die T-Zellareale der drainierenden Lymphknoten [22, 24] und dirigieren so die DZ direkt zu den naiven T-Zellen.

### **1.2.4. T-Zellaktivierung**

Reife DZ sind die einzigen APZ, die naive T-Zellen aktivieren und so deren Differenzierung in Effektorzellen induzieren können. Sie gewährleisten, dass alle zur T-Zellaktivierung entscheidenden Signale vorliegen: So benötigt die T-Zelle zum einen ein antigenspezifisches Signal (Signal 1), welches durch die Interaktion des TZR-Komplexes mit dem Peptid:MHC-Komplex auf der DZ vermittelt wird. Zum anderen sind kostimulatorische Signale erforderlich (Signal 2) [25]. Diese können eine Signalverstärkung bewirken, so dass die Reizschwelle, die zur Aktivierung der T-Zelle überwunden werden muss, herabgesetzt wird [26]. Kostimulatorische Signale werden durch interagierende Moleküle auf der Oberfläche von DZ und T-Zellen vermittelt. Die am besten charakterisierten kostimulatorischen Moleküle sind CD28 auf naiven T-Zellen und dessen Liganden, CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2), die auf reifen DZ hochreguliert werden [27]. Das B7/CD28-Signal induziert die Produktion des T-Zellwachstumsfaktor IL-2, erhöht die Überlebenschance der T-Zelle und stellt die klonale Expansion und Differenzierung der T-Zellen sicher [28]. Fehlt das kostimulatorische Signal in Anwesenheit des antigenspezifischen Signals, werden die T-Zellen funktionell inaktiv, ein Zustand der als Anergie bezeichnet wird [29]. Neben den positiv agierende Kostimulatoren

gibt es jedoch auch negativ regulierende Koinhibitoren. Diese können eine T-Zellaktivierung verhindern oder bereits aktivierte T-Zellen stilllegen. Koinhibitoren werden meist auf bereits aktivierten T-Zellen hochreguliert. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Terminierung von T-Zell-vermittelten Immunantworten und der Induktion von T-Zelltoleranz [30, 31]. Als drittes Signal werden die von den DZ sekretierten Zytokine angesehen. Diese können über die Bindung an entsprechende Rezeptoren auf der T-Zelle die Polarisierung der T-Zellantwort beeinflussen [32].

Abbildung 1 zeigt eine Auswahl an kostimulatorischen und koinhibitorischen Molekülen sowie Zytokinen, die bei der Interaktion von DZ und T-Zellen eine entscheidende Rolle spielen.



**Abb. 1: Wichtige Kostimulatoren, Koinhibitoren und Zytokine bei Interaktionen von DZ und T-Zellen.** Zur Initiierung und Modulation von T-Zellantworten durch DZ sind drei Signale erforderlich: Signal 1 wird vermittelt durch die antigenspezifische Bindung des TZR-Komplexes an den Peptid/MHC-Komplex. Signal 2 wird gewährleistet durch akzessorische Moleküle, die sich entweder positiv (Kostimulatoren) oder negativ (Koinhibitoren) auf die Proliferation und Differenzierung der T-Zellen auswirken. Und Signal 3 wird vermittelt durch Zytokine, die ebenfalls die T-Zellantwort modulieren können. Kostimulatoren und Koinhibitoren auf der Seite der DZ gehören hauptsächlich der B7-Familie (CD80, CD86, PD-L1, PD-L2, ICOS-L) oder der TNFR-Superfamilie (CD40, GITR) an, während die entsprechenden Rezeptoren auf der T-Zelle zur CD28-Familie (CD28, ICOS, PD-1, CTLA-4) oder TNF-Familie (CD40L, GITRL) zählen. Abkürzungen: CTLA-4 – *cytotoxic T lymphocyte antigen-4*, GITR (L) – *glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein (ligand)*, ICOS (L) – *inducible T cell co-stimulator (ligand)*, PD-1 – *programmed cell death-1*, PD-L1/PD-L2 – *programmed cell death ligand 1/2*, TNF(R) – *tumor necrosis factor (receptor)*. Modifiziert nach [33].

DZ können die Qualität der T-Zellantwort durch die oben beschriebenen drei Signale so modulieren, dass T-Zellen entweder aktiviert oder toleriert werden. Dies ist entscheidend, denn je nachdem welche Antigene aufgenommen werden, muss entweder Toleranz (gegenüber Selbstantigenen) oder Immunität (gegenüber Fremdatigenen) induziert werden.

Inwiefern DZ immunogen oder tolerogen wirken, hängt u.a. von deren Reifungsstadium ab [34].

### **1.2.5. Reifungsstadien von DZ und deren Funktion**

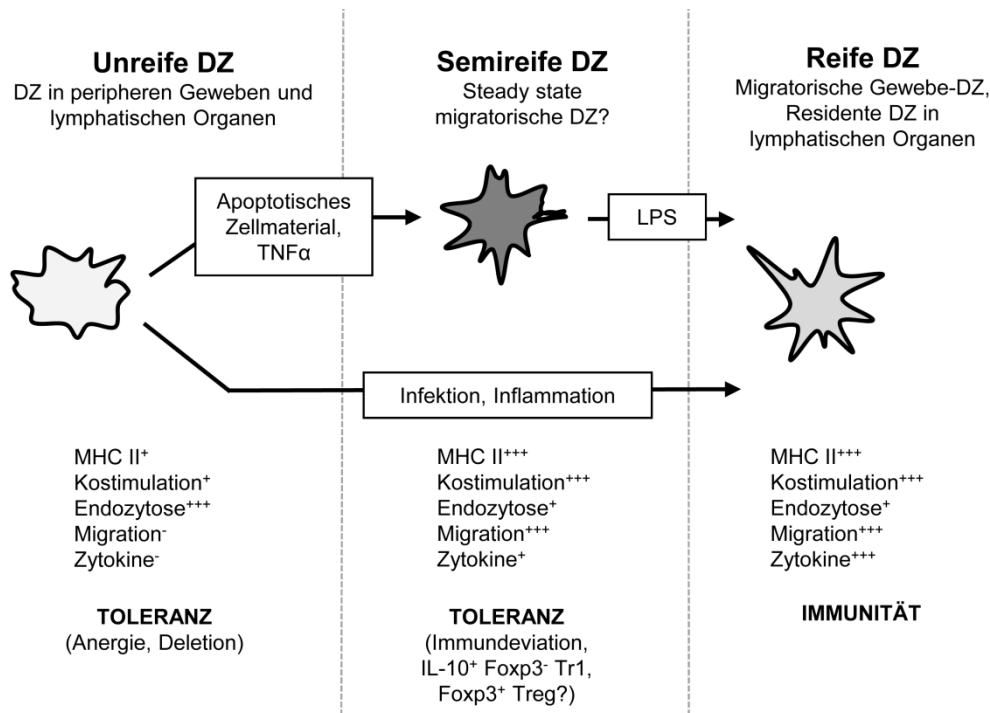
DZ existieren in verschiedenen Reifungsstadien: den bereits erwähnten unreifen und vollreifen DZ sowie einer Zwischenstufe, den semireifen DZ. Aufgrund der unterschiedlichen Charakteristika jedes einzelnen Reifungsstadiums werden diesen entweder tolerogene oder immunogene Funktionen zugesprochen (s. Abb. 2).

Unreife DZ, die sich in den peripheren Geweben und lymphatischen Organen befinden, besitzen zwar eine hohe Endozytosefähigkeit [11], nehmen aber in der Abwesenheit von Pathogenen nur Selbstantigene auf [12, 35] und können nicht migrieren [9]. Da sie zudem nur geringfügig MHC und kostimulatorische Moleküle exprimieren [36] und kaum Zytokine sezernieren, gelten sie als tolerogene DZ [10, 34].

Reife DZ, die nach Kontakt mit pathogenen Antigenen entstehen, stellen hingegen die Aufnahme von Antigenen ein, erhöhen aber gleichzeitig ihr Potential zur T-Zellstimulation. Sie exprimieren verstärkt MHC und kostimulatorische Moleküle (z.B. CD40, CD80, CD86) und sezernieren außerdem proinflammatorische Zytokine (z.B. IL-6, IL-12). Überdies regulieren sie CCR7 hoch, um zu den T-Zellarealen in den lymphatischen Organen zu gelangen [9]. Dort angekommen, agieren vollreife DZ als immunogene DZ und induzieren protektive T-Zellantworten [34]. Die Reifung der DZ kann durch die Interaktion mit den aktivierten T-Zellen sogar noch verstärkt werden [37]. So regulieren T-Zellen nach Stimulation beispielsweise CD40L hoch und bewirken durch die Interaktion mit CD40 auf den DZ nicht nur eine verlängerte Lebensspanne der DZ [38], sondern auch eine erhöhte Expression von kostimulatorischen Molekülen sowie eine verstärkte Produktion von Zytokinen [39].

Die semireifen DZ stellen ein Reifungsstadium zwischen den unreifen und vollreifen DZ dar. [34]. Ähnlich wie die reifen DZ zeigen diese Zellen eine verminderte Fähigkeit zur Endozytose, aber eine relativ hohe Expression von kostimulatorische Molekülen und MHC. Allerdings sezernieren semireife DZ im Gegensatz zu reifen DZ keine proinflammatorischen Zytokine [17]. Beschrieben wurde dieses Reifungsstadium u.a. bei *in vitro*-generierten Knochenmarks-DZ (KM-DZ), die entweder mit TNF $\alpha$  stimuliert worden [40] oder bei denen die E-Cadherin-vermittelte DZ-DZ-Interaktion unterbrochen wurde [41]. Diese KM-DZ zeigen eine tolerogene Wirkung *in vivo*. Injiziert in Mäuse mit experimenteller Autoimmun-Enzephalomyelitis (EAE) führen sie zu einer Protektion der EAE durch Induktion

peptidspezifischer IL-10<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen [40, 41]. Semireife DZ können durch Stimuli wie LPS und CD40L zu vollreifen DZ differenzieren [42]. *In vivo* konnten solche semireifen und zugleich tolerogenen DZ bisher nur in den drainierenden Lymphknoten der Lunge nachgewiesen werden. Diese DZ nehmen Inhalationsantigene in der Lunge auf und induzieren in den drainierenden Lymphknoten antigenspezifische IL-10<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen [43].



**Abb. 2: Eigenschaften und Funktionen der verschiedenen Reifungsstadien von DZ.** Man unterscheidet zwischen unreifen, semireifen und vollreifen DZ. Je nach Grad der Reifung zeigen die DZ Unterschiede hinsichtlich der Endozytosefähigkeit, der Expression von MHC und kostimulatorischen Molekülen (z.B. CD40, CD80, CD86), der Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen (z.B. IL-6, IL-12, TNFα) und der Migration. Bedingt durch diese phänotypischen Differenzen wird angenommen, dass DZ eines bestimmten Reifungsstadiums entweder tolerogen oder immunogen wirken [10, 34]. Modifiziert nach [34].

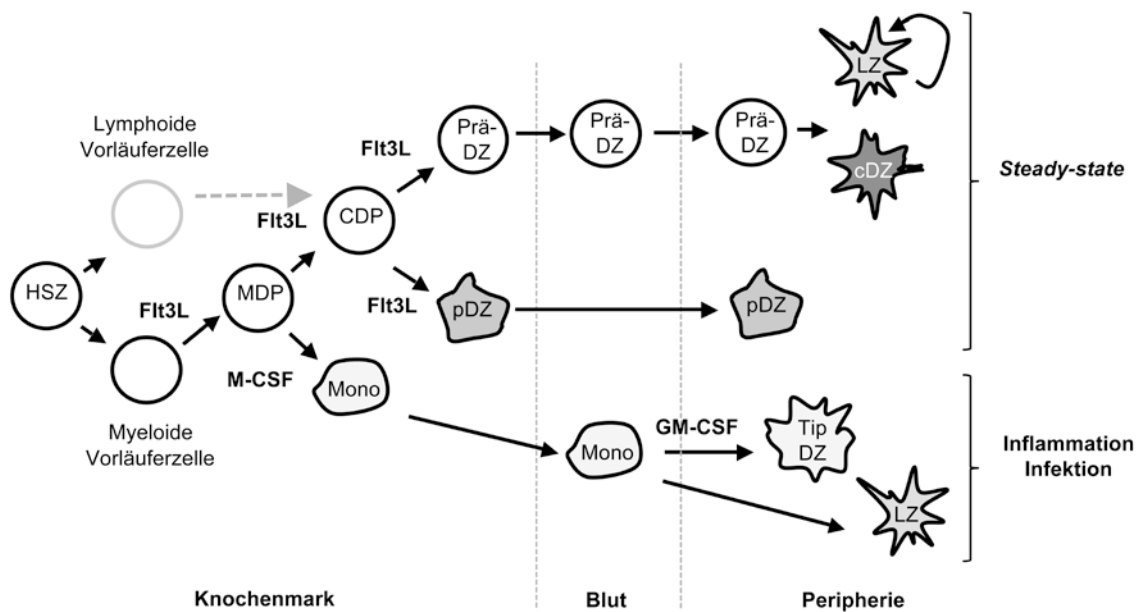
### 1.2.6. Heterogenität von murinen DZ

DZ stellen eine sehr heterogene Population von Zellen dar, die sich nicht nur im Reifungszustand unterscheiden können. Anhand von Unterschieden in ihrer Entwicklung, Verbreitung, Funktion und ihres Phänotyps werden DZ in verschiedene Gruppen unterteilt. Hierbei wird unter homöostatischen bzw. *steady-state* Bedingungen zwischen den konventionellen DZ (*conventional*, cDZ) und den plasmazytoiden DZ (pDZ) unterschieden. Die cDZ lassen sich wiederum in residente und migratorische DZ lymphatischer Organe unterteilen [7, 44]. Infolge einer Inflammation oder mikrobiellen Stimulation können zusätzlich noch die inflammatorischen DZ auftreten [44]. Das DZ-System weist allerdings



eine große Komplexität auf, da jeder der gerade erwähnten DZ-Typen noch in zahlreiche weitere DZ-Subpopulationen untergliedert werden kann.

Allen DZ-Typen ist jedoch gemein, dass sie aus hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) im Knochenmark hervorgehen. Abbildung 3 gibt einen genauen Überblick über die Entwicklung der verschiedenen murinen DZ-Typen. Die einzelnen Entwicklungsstufen hängen dabei stark von der Anwesenheit verschiedener Zytokine (z.B. Flt3L, GM-CSF, M-CSF) und der Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren (z.B. STAT3, STAT5) ab (Übersicht in [7, 44]).



**Abb. 3: Entwicklung von murinen DZ.** Ausgehend von den HSZ im Knochenmark entwickeln sich myeloide und lymphoide Vorläuferzellen. Letztere sind zwar auch an der Entwicklung von DZ beteiligt, jedoch werden unter homöostatischen Bedingungen DZ größtenteils aus myeloiden Vorläuferzellen gebildet [45, 46]. Aus den myeloiden Zellen entstehen Vorläufer von Makrophagen und DZ (*macrophage and dendritic cell precursors*, MDPs) [47], die sich weiterentwickeln in *common dendritic cell precursors* (CDPs) und Monozyten [48, 49]. CDPs haben die Fähigkeit verloren, in Monozyten zu differenzieren. Aus ihnen gehen die pDZ und die Prä-DZ hervor [49]. Prä-DZ migrieren über das Blut in die peripheren lymphatischen und nicht-lymphatischen Gewebe und unterliegen dort einer weiteren Differenzierung in konventionelle DZ-Subtypen [49, 50]. Aus den Monozyten können unter inflammatorischen Bedingungen die TNF- und iNOS-produzierenden DZ (Tip-DZ) hervorgehen. Die epidermalen Langerhans-Zellen (LZ) nehmen in der DZ-Ontogenese eine Sonderstellung ein. Sie entwickeln sich unter homöostatischen Bedingungen mit einer vergleichsweise niedrigen Umschlagsrate aus lokalen myeloiden Vorläufern oder durch Selbsterneuerung [51, 52]. Daher sind LZ im Gegensatz zu anderen DZ bestrahlungsresistent. Während einer Inflammation können sie allerdings auch aus Monozyten hervorgehen [53]. Modifiziert nach [46].

### ***Plasmazytoide DZ***

Diese DZ erhielten ihren Namen aufgrund ihrer Plasmazell-ähnlichen Morphologie im unreifen Zustand. Murine pDZ exprimieren B220, Ly6C, wenig MHC II und nur intermediär CD11c (CD11c<sup>int</sup>) [54, 55]. Man findet sie sowohl zirkulierend im Blut als auch in den primären und sekundären lymphatischen Organen [56]. pDZ sind vorwiegend verantwortlich für die Initiierung einer antivirale Immunantworten, indem sie große Mengen Typ I-Interferone als Reaktion auf virale Antigene freisetzen [56].

### ***Inflammatorische DZ***

Wie oben erwähnt werden diese DZ aus Monozytenvorläufern in der Anwesenheit von mikrobiellen oder inflammatorischen Stimuli gebildet [57, 58]. Ein Beispiel stellen die TNF- und iNOS-produzierenden DZ (Tip-DZ) dar [58]. Inflammatorische DZ sind charakterisiert als CD11c<sup>high</sup> CD11b<sup>high</sup> Zellen [59]

### ***Residente konventionelle DZ lymphatischer Organe***

Es handelt sich hierbei um DZ, die nur in lymphatischen Organen wie Lymphknoten, Milz und Thymus vorkommen [36, 60-62]. Residente DZ nehmen Fremd- und Selbstantigene aus dem Blut sowie aus der Lymphe auf und präsentieren diese an T-Zellen, um entweder T-Zellimmunität oder Toleranz zu induzieren [59]. Unter homöostatischen Bedingungen liegen sie in einem unreifen Zustand vor [36]. Residente DZ sind charakterisiert als MHC II<sup>+</sup> - Zellen, die viel CD11c (CD11c<sup>high</sup>) exprimieren, aber kein B220. Sie können prinzipiell in CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> DZ, CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> DZ und CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> CD4<sup>-</sup> doppelt negative (DN) DZ unterteilt werden [61]. Eine Auflistung von Subpopulationen residenter DZ verschiedener lymphatischer Organe findet sich in Tab. 1.

### ***Migratorische konventionelle DZ***

Migratorische DZ gehen aus Gewebe-residenten DZ hervor. Letztere befinden sich bevorzugt in nicht-lymphatischen Organen, die eine filtrierende Funktion ausüben (z.B. Leber, Niere) und in epithelialen Geweben, die eine Eintrittspforte für Pathogene darstellen (z.B. Haut, Schleimhäute) [7]. Entdecken Gewebe-residente DZ Pathogene in ihrer Umgebung, nehmen sie diese auf, wandern durch die afferenten Lymphgefäße zu den T-Zellarealen der drainierenden lymphatischen Organe (insbesondere in die Lymphknoten) und präsentieren die pathogenen Antigene den T-Zellen, um deren Stimulation zu bewirken. In der Lymphe und im drainierenden Lymphknoten werden diese DZ nun als migratorische DZ bezeichnet. Sie

liegen in den peripheren Geweben in einem unreifen Zustand vor, reifen jedoch nach Antigenaufnahme heran und werden in den lymphatischen Organen als CD11c<sup>+</sup> MHC II<sup>high</sup> B220<sup>-</sup> DZ definiert [62, 63]. Subpopulationen von migratorischen DZ sind in Tab. 1 aufgeführt.

Interessanterweise können migratorische DZ auch in der Abwesenheit einer Inflammation oder Infektion aus den peripheren Geweben in die drainierenden Lymphknoten wandern [62, 64-66]. Diese sogenannten *steady-state* migratorischen DZ (ssmDZ) sind in der Lage, Selbstantigene aus peripheren Organen wie Magen [67], Darm [68, 69] und Haut [70] aufzunehmen und in die drainierenden Lymphknoten zu transportieren. Einige Studien zeigen, dass diese Zellen gegenüber den transportierten Selbstantigenen periphere Toleranz induzieren können (Übersicht in [34, 71]).

Zu den wohl bekanntesten migratorischen DZ zählen die bereits erwähnten LZ in der Epidermis der Haut. Sie exprimieren das C-Typ Lektin Langerin, welches sowohl auf der Zelloberfläche als auch intrazellulär in Birbeck Granula vorliegt [72]. Neben den LZ gibt es noch zwei weitere DZ-Subpopulationen, die aus der Haut migrieren können: die Langerin<sup>+</sup> und Langerin<sup>-</sup> dermalen DZ (dDZ) [73-75]. Alle drei DZ-Subsets wandern in Abhängigkeit von CCR7 sowohl unter inflammatorischen als auch unter homöostatischen Bedingungen und zeigen auch im letzteren Fall nach Ankunft im hautdrainierenden Lymphknoten einen reiferen Phänotyp als in der Haut (u.a. werden MHC II und CD40 hochreguliert, s. Tab. 1) [63, 76]. Zur besseren Unterscheidung der einzelnen DZ-Subpopulationen in der Haut und den drainierenden Lymphknoten können zusätzlich Oberflächenmarker wie das *epithelial adhesion molecule* (EpCAM) und das  $\alpha_E$  Integrin CD103 herangezogen werden (s. Tab. 1).

**Tab. 1: DZ-Subpopulationen in den lymphatischen und nicht-lymphatischen Organen der Maus.** Auf die Aufführung von CD11c als DZ-Marker wurde verzichtet. Abkürzungen: dDZ – dermale DZ, Gew. DZ – Gewebe-residente DZ, Haut LN – hautdrainierende Lymphknoten, LZ – Langerhans-Zellen, Mig. DZ – migratorische DZ, Res. DZ – residente DZ lymphatischer Organe, Ref. – Referenz. Modifiziert nach [59].

Organ	DZ-Subpopulation	Phänotyp	DZ-Typ	Ref.
<i>Lymphatische Organe</i>				
Lymphknoten	CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DZ	MHC II <sup>+</sup> CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD205 <sup>+</sup>	Res. DZ	[62]
	CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> DZ	MHC II <sup>+</sup> CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup>	Res. DZ	[62]
	DN DZ	MHC II <sup>+</sup> CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> CD4 <sup>-</sup>	Res. DZ	[62]
	LZ (Haut LN)	MHC II <sup>high</sup> CD11b <sup>+</sup> Langerin <sup>+</sup> EpCAM <sup>+</sup> CD40 <sup>+</sup> CD103 <sup>-</sup>	Mig. DZ	[63, 76-78]
	Langerin <sup>+</sup> dDZ (Haut LN)	MHC II <sup>high</sup> CD11b <sup>-</sup> Langerin <sup>+</sup> EpCAM <sup>-</sup> CD40 <sup>+</sup> CD103 <sup>+/-</sup>	Mig. DZ	[63, 78]
	Langerin <sup>-</sup> dDZ (Haut LN)	MHC II <sup>high</sup> CD11b <sup>+</sup> Langerin <sup>-</sup> EpCAM <sup>-</sup> CD40 <sup>+</sup> CD103 <sup>-</sup>	Mig. DZ	[63, 78]
	Milz	CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DZ	MHC II <sup>+</sup> CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> DEC-205 <sup>+</sup>	Res. DZ
CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> DZ		MHC II <sup>+</sup> CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup> DCIR2 <sup>+</sup>	Res. DZ	[61, 79]
DN DZ		MHC II <sup>+</sup> CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> CD4 <sup>-</sup>	Res. DZ	[61, 79]
Thymus	CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DZ	MHC II <sup>+</sup> CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> Sirp $\alpha$ <sup>-</sup>	Res. DZ	[80]
	CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> DZ	MHC II <sup>+</sup> CD8 $\alpha$ <sup>-/low</sup> Sirp $\alpha$ <sup>+</sup>	Mig. DZ	[80]
<i>Nicht-lymphatische Organe</i>				
Haut	LZ	MHC II <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> Langerin <sup>+</sup> EpCAM <sup>+</sup> CD103 <sup>-</sup> F4/80 <sup>+</sup>	Gew. DZ	[78]
	Langerin <sup>+</sup> dDZ	MHC II <sup>+</sup> CD11b <sup>low</sup> Langerin <sup>+</sup> EpCAM <sup>-</sup> CD103 <sup>+/-</sup> F4/80 <sup>-</sup>	Gew. DZ	[78]
	Langerin <sup>-</sup> dDZ	MHC II <sup>+</sup> CD11b <sup>high</sup> Langerin <sup>-</sup> EpCAM <sup>-</sup> CD103 <sup>-</sup> F4/80 <sup>-</sup>	Gew. DZ	[78]

### 1.3. Mechanismen der T-Zelltoleranz

Wie bereits eingangs erwähnt, entstehen während der T-Zellentwicklung im Thymus nicht nur T-Zellen, die auf Fremdartigene reagieren können, sondern auch solche, die körpereigene Antigene erkennen [4]. Würde man diese autoreaktiven T-Zellen nicht eliminieren bzw. inaktivieren, wären selbst-zerstörerische Autoimmunerkrankungen die Folge. Aus diesem Grund gibt es zentrale und periphere Toleranzmechanismen, die eine Unterscheidung zwischen „Fremd“ und „Selbst“ ermöglichen und so eine Selbsttoleranz sicherstellen [81].

#### 1.3.1. Zentrale Toleranz

Bei der zentralen Toleranz werden unreife T-Zellen (Thymozyten) bereits während ihrer Entwicklung im Thymus zwei Selektionsprozessen ausgesetzt: der Positiv- und Negativselektion. Während die Positivselektion im Kortex stattfindet, erfolgt die Negativselektion hauptsächlich in der Medulla [82].

Thymozyten durchlaufen im Thymus verschiedene Entwicklungsstadien, die u.a. durch eine unterschiedliche Expression des TZR und der beiden Korezeptoren CD4 und CD8 gekennzeichnet sind [82]. Im Stadium der CD8<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> doppelt-positiven (DP) Thymozyten erfolgt die Positivselektion. Hier wird überprüft, inwiefern die Thymozyten mit ihren TZR fähig sind, Selbst-MHC-Komplexe auf thymischen APZ überhaupt zu erkennen [83]. Zur Beladung der MHC-Komplexe dienen Selbstantigene, da unter homöostatischen Bedingungen keine Fremdartigene im Thymus vorliegen. Die meisten Thymozyten exprimieren einen TZR, der die Peptid:MHC-Komplexe nicht erkennt. Diese Thymozyten sterben aufgrund fehlender Überlebenssignale durch *death by neglect*. Thymozyten, die hingegen mit einer gewissen TZR-Affinität die Peptid:MHC-Komplexe binden, werden positiv selektiert und proliferieren weiter. Darüber hinaus wird im Zuge der Positivselektion die Expression der Korezeptoren CD4 und CD8 mit der MHC-Restriktion der Thymozyten in Einklang gebracht. Folglich entwickeln sich aus den DP Thymozyten einzel positive (SP) Thymozyten, die entweder als CD4<sup>+</sup> T-Zellen MHC II-restringiert oder als CD8<sup>+</sup> T-Zellen MHC I-restringiert sind [83]. Zusätzlich erfolgt eine Negativselektion der Thymozyten. Hierbei werden Thymozyten, deren TZR eine zu hohe Affinität zu den Peptid:MHC-Komplexen aufweisen, durch Apoptose beseitigt (klonale Deletion) [83, 84]. Einige Thymozyten, die mit einer relativ hohen Affinität an die Selbst-Peptid:MHC-Komplexe im Thymus binden, werden jedoch nicht selektiert [85]. Sie reifen im Thymus heran und spielen in der Peripherie als regulatorische T-Zellen eine immunsuppressive Rolle [86, 87] (s. 1.4). Das Endergebnis der thymischen Selektionsprozesse sind reife CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die in die Peripherie entlassen werden. Die

meisten dieser Zellen erkennen Selbst-Peptid:MHC-Komplexe mit nur geringer Affinität und sind somit tolerant gegenüber Selbstantigenen. Auf diese Weise werden T-Zellen generiert, die mit großer Wahrscheinlichkeit hoch-affin gegenüber Fremd-Peptid:MHC-Komplexen sind.

Wie erfolgt nun die Präsentation der Peptid:MHC-Komplexe im Thymus? Bei der Positivselektion im Kortex sind dafür vor allem kortikale Thymusepithelzellen (*cortical thymic epithelial cell*, cTEC) verantwortlich. Hingegen sind medulläre Thymusepithelzellen (mTEC) und DZ essentiell für die Negativselektion in der Medulla [88]. Vor allem reife mTECs (CD80<sup>hi</sup>) besitzen dazu die Fähigkeit, zahlreiche gewebe-spezifische Antigene (*tissue specific antigens*, TSA) im Thymus zu exprimieren und auf MHC Molekülen zu präsentieren [88]. Die Expression der TSA wird durch den Transkriptionsfaktors AIRE (*autoimmune regulator*) reguliert [89]. Studien zeigten sogar, dass DZ auch TSA von mTEC aufnehmen und diese an Thymozyten kreuzpräsentieren können [88]. Durch dieses sog. *antigen spreading* wird die Präsentationsdichte der Selbstantigene im Thymus erhöht, was vermutlich zu einer verstärkten Negativselektion beiträgt [88]. Darüber hinaus können DZ weitere Selbstantigene, die sie in der Peripherie aufgenommen haben, nach Einwanderung in den Thymus präsentieren [90]. DZ sind vor allem an der negativen Selektion von CD4<sup>+</sup> SP Thymozyten beteiligt [91].

### 1.3.2. Periphere Toleranz

Die zentrale Toleranz ist zwar effizient, verläuft jedoch nicht vollkommen fehlerfrei [10]. Es können immer einige autoreaktive T-Zellen der Negativselektion im Thymus entgehen und in die Peripherie nachgewiesen werden [92]. Um diese Zellen auch nach Verlassen des Thymus zu kontrollieren, existieren verschiedene periphere Toleranzmechanismen. Zu diesen Mechanismen zählen u.a. Ignoranz, Anergie, Deletion und Immunsuppression [93, 94].

Ignoranz stellt hierbei die einfachste Form der peripheren Toleranz dar. Sie tritt ein, wenn Selbstantigen und autoreaktive T-Zelle koexistieren, ohne dass eine Aktivierung der T-Zelle erfolgt [93]. Dies kann beispielsweise dann der Fall sein, wenn das Selbstantigen in immunprivilegierten Organen wie dem Gehirn exprimiert wird [95] oder wenn die APZ-präsentierte Antigenmenge nicht ausreicht, um die T-Zellen effizient zu stimulieren [96].

Zu Anergie kommt es hingegen, wenn die T-Zellen zwar ihr antigenspezifisches TZR-Signal erhalten (Signal 1), aber kein kostimulatorisches Signal durch CD28 vermittelt bekommen (Signal 2) [97]. So anergisierte T-Zellen sind selbst bei einer nachfolgenden vollen

Stimulation (Signal 1 & 2) nicht in der Lage, zu proliferieren oder IL-2 zu produzieren [29]. Anergie bezeichnet daher einen Zustand der funktionellen Reaktionslosigkeit von T-Zellen auf ein TZR-Signal [29]. Anhand von *in vivo* Studien geht man davon aus, dass unreife DZ aufgrund fehlender kostimulatorischer Moleküle eine zentrale Rolle in der Anergieinduktion spielen [10, 98, 99]. Ferner scheinen auch Koinhibitoren wie CTLA-4 und PD-1 an der Induktion bzw. Erhaltung von Anergie beteiligt zu sein [100, 101].

Das Fehlen von kostimulatorischen Molekülen [102, 103] oder die Abwesenheit von Wachstumsfaktoren (z.B. IL-2) [104] kann auch zu einer Deletion von T-Zellen führen. Darüber hinaus können autoreaktive T-Zellen, die ihrem spezifischen Selbstantigen ausgesetzt sind, durch Fas-vermittelte Apoptose beseitigt werden [103, 105]. Diese Form der Deletion beruht auf der Interaktion von Fas auf den T-Zellen mit dem Fas-Liganden (FasL). Letzterer wird insbesondere in immunprivilegierten Organen exprimiert und verhindert dort eine Gewebeschädigung nach Eintritt autoreaktiver Fas<sup>+</sup> T-Zellen [93, 106].

Einer der Hauptmechanismen der peripheren Toleranz stellt jedoch die Immunsuppression dar. Hierbei kontrollierten spezialisierte Zellen des Immunsystems die Aktivität und Funktion anderer Immunzellen und unterdrücken überschießende Immunantworten. Zu den immunsuppressiv wirkenden Zellen gehören u.a. myeloide Suppressorzellen sowie CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen [107-109]. Die Strategien, die diese Zellen zur Unterdrückung von Immunreaktionen anwenden, unterscheiden sich je nach Zelltyp und reichen von der Sekretion immunmodulatorischer Faktoren (z.B. TGF- $\beta$ , IL-10), über die Konkurrenz um Wachstumsfaktoren bis hin zu diversen Zellkontakt-abhängigen Suppressionsmechanismen (Übersicht in [108-110]).

## 1.4. CD4<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen und die Rolle von DZ bei deren Induktion und Erhaltung

Anhand des Ortes ihrer Entstehung unterscheidet man zwei Kategorien von CD4<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen: Die natürlich vorkommenden regulatorischen T-Zellen (nT<sub>regs</sub>), die im Thymus generiert werden, und die peripher-induzierten T<sub>regs</sub> (iT<sub>regs</sub>), die in den sekundären lymphatischen Organen aus naiven T-Zellen hervorgehen [111, 112]. nT<sub>regs</sub> und ein Subset von iT<sub>regs</sub> exprimieren spezifisch den Transkriptionsfaktor Foxp3 (*forkhead box P3*) [112], der für die Differenzierung und suppressive Aktivität dieser Zellen entscheidend ist [113-116]. Daneben gibt es jedoch noch weitere Subsets von iT<sub>regs</sub>, die kein Foxp3 exprimieren und sich in die IL-10-produzierenden *T regulatory type-1* (Tr1)- und TGF- $\beta$ -sezernierenden Th3-Zellen aufteilen [117-119].

Im Fokus der vorliegenden Arbeit standen die Foxp3<sup>+</sup> nT<sub>regs</sub> und iT<sub>regs</sub>. Sie stellen die am intensivsten untersuchten T<sub>regs</sub> dar. Ein Fehlen oder eine funktionelle Inaktivierung dieser Zellen ist verbunden mit einer Beeinträchtigung der immunologischen Homöostase und der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen (Übersicht in [120]).

### 1.4.1. Gemeinsamkeiten und Unterschiede von Foxp3<sup>+</sup> nT<sub>reg</sub> und iT<sub>reg</sub>

Wie bereits oben erwähnt, unterscheiden sich nT<sub>regs</sub> und iT<sub>regs</sub> grundsätzlich darin, an welchem Ort und unter welchen Bedingungen sie generiert werden (Übersicht in [111, 112]). nT<sub>regs</sub> entwickeln sich im Thymus vorwiegend aus Foxp3<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> Thymozyten [121]. Entscheidend für deren Differenzierung im Thymus ist, dass es zu einem starken TZR-Signal infolge der hoch-affinen Erkennung von Selbst-Peptid:MHC-Komplexen auf thymischen APZ kommt [87, 122, 123]. Dieses TZR-Signal darf jedoch einen gewissen Schwellenwert nicht überschreiten, um eine Negativselektion auszulösen [87]. Daneben spielen auch kostimulatorische Signale vermittelt durch die Interaktion von CD28 mit CD80/CD86 auf thymischen APZ eine wichtige Rolle. Mäuse, die eine genetische Defizienz für CD80/CD86 oder CD28 aufweisen, zeigen eine stark reduzierte Frequenz an T<sub>regs</sub> im Thymus und in der Peripherie [124-126]. Ähnliches kann im Falle der Defizienz von CD40 beobachtet werden [127]. Ein weiteres essentielles Signal für die nT<sub>reg</sub>-Generation stellt IL-2 dar. Fehlt IL-2 oder andere Bestandteile des IL-2-Rezeptors, ist die Entwicklung von nT<sub>regs</sub> stark beeinträchtigt [128-130]. Zwar können andere *common gamma chain* ( $\gamma$ C)-Zytokine wie IL-7 und IL-15 die Funktion von IL-2 ersetzen, spielen aber unter physiologischen Bedingungen eine



untergeordnete Rolle [131-133]. Das Endergebnis der thymischen Selektion sind  $\text{Foxp3}^+$   $\text{nT}_{\text{regs}}$ , die den Thymus verlassen und in der Peripherie suppressiv wirken.

Im Gegensatz dazu werden  $\text{Foxp3}^+$   $\text{iT}_{\text{regs}}$  in peripheren lymphatischen Organen aus naiven  $\text{Foxp3}^-$  T-Zellen gebildet. Die Generierung dieser Zellen konnte sowohl *in vitro* als auch im Mausmodell *in vivo* gezeigt werden [134-136] und ist im Wesentlichen von drei Faktoren abhängig: der TZR-Stimulation und den Zytokinen IL-2 und TGF- $\beta$  [112].

Unabhängig von den Unterschieden in der Generierung teilen  $\text{nT}_{\text{regs}}$  und  $\text{iT}_{\text{regs}}$  einen ähnlichen Phänotyp [111]. Neben Foxp3 exprimieren beide  $\text{T}_{\text{reg}}$ -Populationen große Mengen an CD25 ( $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors), CTLA-4 und GITR [111]. Foxp3 gilt bisher jedoch als einziger  $\text{T}_{\text{reg}}$ -spezifischer Marker [113-116], da die anderen genannten Moleküle auch von konventionellen T-Zellen ( $\text{T}_{\text{konv}}$ ) nach deren Aktivierung hochreguliert werden können [137].

$\text{nT}_{\text{regs}}$  und  $\text{iT}_{\text{regs}}$  weisen zudem ähnliche funktionelle Eigenschaften auf [111]. So zeichnen sich beide  $\text{T}_{\text{reg}}$ -Populationen durch ein anergisches Verhalten nach TZR-Stimulation *in vitro* aus, proliferieren jedoch stark *in vitro* und *in vivo* nach Stimulation durch antigenbeladene reife DZ [134, 138-140]. Welche Mechanismen  $\text{Foxp3}^+$   $\text{T}_{\text{regs}}$  nutzen, um andere Immunzellen zu supprimieren, wurde vor allem an *in vitro*-Modellen untersucht, ist aber *in vivo* noch nicht hinreichend bestätigt. Man geht jedoch davon aus, dass  $\text{Foxp3}^+$   $\text{T}_{\text{regs}}$  vor allem über Zellkontakt-abhängige Mechanismen die Aktivität und Expansion von  $\text{T}_{\text{konv}}$  und die Reifung von DZ beeinträchtigen (Übersicht in [110, 141]). Hierzu bedarf es in jedem Fall der Aktivierung der  $\text{Foxp3}^+$   $\text{T}_{\text{regs}}$  durch ihr spezifisches Antigen. Einmal aktiviert, verläuft die  $\text{T}_{\text{reg}}$ -vermittelte Suppression antigenunspezifisch [134, 138, 142].

Weiterhin unklar ist, in welchem quantitativen Verhältnis  $\text{iT}_{\text{regs}}$  und  $\text{nT}_{\text{regs}}$  in der Peripherie vorliegen, da ein spezifischer Marker für eine der beiden  $\text{Foxp3}^+$   $\text{T}_{\text{reg}}$ -Populationen bislang fehlt [111, 112]. Daher ist es schwierig, Aussagen darüber zu treffen, welche Rolle die einzelnen  $\text{T}_{\text{reg}}$ -Populationen in der Peripherie unter physiologischen Bedingungen erfüllen. Vergleicht man die Umstände, unter denen  $\text{iT}_{\text{regs}}$  im Gegensatz zu  $\text{nT}_{\text{regs}}$  gebildet werden, deutet dies auf unterschiedliche Funktionen im Rahmen der peripheren Toleranzinduktion hin [111, 112]. Während  $\text{nT}_{\text{regs}}$  in einem relativ konstanten Milieu im Thymus gegen Selbstantigene selektioniert werden [87, 122, 123, 143], können  $\text{iT}_{\text{regs}}$  in entzündeten Geweben [144], Transplantaten [145], im Zuge der oralen Toleranz [146, 147] oder nach Verabreichung subimmunogener Antigen Dosen [136] aus naiven  $\text{T}_{\text{konv}}$  entstehen [112]. Die Tatsache, dass das TZR-Repertoire von  $\text{T}_{\text{konv}}$  und  $\text{nT}_{\text{regs}}$  je nach Studie zwischen 10 und 42 % überlappt [123, 143, 148], weist jedoch auch darauf hin, dass  $\text{nT}_{\text{regs}}$  und die aus den  $\text{T}_{\text{konv}}$

generierten  $iT_{regs}$  zu einem gewissen Anteil überschneidende Funktionen in der Peripherie erfüllen.

#### 1.4.2. Die Rolle von DZ für die Induktion von $Foxp3^+$ $nT_{regs}$

Welche APZ bei der  $nT_{reg}$ -Entwicklung im Thymus eine Rolle spielen wird kontrovers diskutiert (Übersicht [88, 133]). Einige Studien deuten darauf hin, dass einzig die thymischen Epithelzellen, und hier insbesondere die mTEC, für die Entstehung von  $nT_{regs}$  entscheidend sind [149, 150]. Allerdings gibt es zunehmend Hinweise darauf, dass auch DZ zur Differenzierung von  $nT_{regs}$  beitragen. So konnten Proietto *et al.* zeigen, dass migratorische  $CD8\alpha^- Sirp\alpha^+$  DZ aus dem Thymus der Maus in der Lage sind,  $Foxp3^+$   $T_{regs}$  *in vitro* zu induzieren [80]. Interessanterweise weist dieses DZ-Subset gegenüber den Thymus-residenten  $CD8\alpha^+$   $Sirp\alpha^-$  DZ einen reiferen Phänotyp auf (u.a. sind CD86 und MHC II hochreguliert) [80]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Hassall-Körperchen im menschlichen Thymus das Zytokin TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*) produzieren, das bei thymischen DZ zur Hochregulation der B7-Moleküle CD80 und CD86 führt. Solche TSLP-konditionierten DZ sind in der Lage,  $CD4^+$   $CD25^+$   $Foxp3^+$   $T_{regs}$  aus  $CD4^+$   $CD25^-$   $Foxp3^-$  Thymozyten zu differenzieren [151].

#### 1.4.3. Die Rolle von DZ für die Induktion von $Foxp3^+$ $iT_{regs}$

Während noch nicht eindeutig geklärt ist, inwieweit DZ an der Generierung von  $nT_{regs}$  im Thymus beteiligt sind, gelten DZ als wichtigste APZ zur Induktion von antigenspezifischen  $iT_{regs}$  in der Peripherie. Hierbei wird vor allem den unreifen residenten DZ in den sekundären lymphatischen Organen eine entscheidende Rolle zugesprochen [152]. Im Lymphknoten stehen diese Zellen in direktem Kontakt mit dem retikulären Röhrensystem, wodurch sie unter homöostatischen Bedingungen ständig lösliche Selbstantigene aus der Lymphe aufnehmen und naiven T-Zellen präsentieren können [153]. Erste Hinweise darauf, dass solche Lymphknoten-residenten DZ an der  $iT_{reg}$ -Generierung beteiligt sein könnten, stammen von Experimenten, in denen Mäusen osmotische Mini-Pumpen unter die Haut implantiert wurden. Diese Pumpen gaben kontinuierlich Peptidantigene ab und imitierten die Verfügbarkeit von löslichen Selbstantigenen in den drainierenden Lymphknoten. Transferierte man in so behandelte Tiere naive antigenspezifische T-Zellen, konnte nach einigen Tagen in den hautdrainierenden Lymphknoten eine *de novo* Konversion dieser T-Zellen in  $Foxp3^+$   $T_{regs}$  beobachtet werden [136]. Darüber hinaus führte auch die Verabreichung eines Antigens gekoppelt an einen DEC-205-Antikörper zu einer Induktion von  $iT_{regs}$  in den sekundären

lymphatischen Organen [135]. DEC-205 ist eine Endozytoserezeptor, der fast ausschließlich auf DZ exprimiert wird [154]. Wurde parallel zum DEC-205-Antikörper ein agonistischer CD40-Antikörper injiziert, der eine Reifung von DZ bewirkt, fand eine verminderte  $iT_{reg}$ -Konversion statt. Aufgrund dieser Beobachtungen ging man davon aus, dass unter homöostatischen Bedingungen vor allem unreife DZ in den sekundären lymphatischen Organen  $iT_{regs}$  induzieren, während reife DZ eine geringere Kapazität zur Differenzierung von  $iT_{reg}$  besitzen [135].

Weitere Untersuchungen *in vitro* unterstützten größtenteils die Theorie, dass eine Reifung von DZ einer Konversion von  $iT_{regs}$  entgegenwirkt. So konnte gezeigt werden, dass unreife Milz-DZ unter Zugabe von TGF- $\beta$  effektiv Foxp3<sup>+</sup>  $T_{regs}$  induzieren, dies jedoch noch effizienter vollziehen, wenn sie entweder gar keine kostimulatorischen Moleküle wie CD80/CD86 und CD40 mehr exprimieren oder letztere durch entsprechende Antikörper blockiert werden [155, 156]. Einhergehend damit führte im APZ-freien System *in vitro* eine starke Kostimulation durch  $\alpha$ CD28-Antikörpern zu einer verringerten Induktion von Foxp3 in T-Zellen [155, 157]. Es gibt allerdings auch Hinweise darauf, dass CD80/CD86 auf DZ indirekt auf die Entwicklung von  $iT_{regs}$  Einfluss nimmt. So regt die Interaktion von CD80/CD86 auf DZ mit CD28 auf Effektor-T-Zellen ( $T_{eff}$ ) deren IL-2-Produktion an [156, 158], was letztlich wiederum die  $iT_{reg}$ -Generierung und –Homöostase begünstigt [158]. Darüber hinaus wurde auch gezeigt, dass gereifte Milz-DZ eine den unreifen Milz-DZ ähnliche  $iT_{reg}$ -Konversionsrate *in vitro* aufweisen, wenn neben IL-2 und TGF- $\beta$  zusätzlich Retinolsäure (*retinoic acid*, RA) vorhanden ist [155]. RA dient als Kofaktor der TGF- $\beta$ -vermittelten  $T_{reg}$ -Konversion und scheint die negativen Effekte reifer DZ auf die  $iT_{reg}$ -Differenzierung zu kompensieren [146, 147, 155]. Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass unreife DZ zwar am besten  $iT_{regs}$  konvertieren können, reife DZ dazu jedoch unter gewissen Umständen ebenfalls in der Lage sind.

Es stellt sich allerdings die Frage, ob für die Entwicklung von  $iT_{regs}$  nicht nur der Reifungszustand der DZ entscheidend ist, sondern auch ein bestimmtes DZ-Subset existiert. In der Tat wurden bisher einige wenige DZ-Subsets beschrieben, die  $iT_{regs}$  *ex vivo* induzieren können. So sind beispielsweise unter den DZ in der Milz die CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DEC205<sup>+</sup> DZ als Einzige in der Lage, naive T-Zellen ohne exogenes TGF- $\beta$  in  $iT_{regs}$  zu konvertieren [159]. Dies deckt sich auch mit der zuvor beschriebenen Beobachtung, dass die Injektion von Antigenen gekoppelt an DEC-205-Antikörper zur  $iT_{reg}$ -Konversion *in vivo* führt [135]. Daneben wurden CD103<sup>+</sup> DZ aus der Lamina Propria (LP) und den mesenterischen Lymphknoten isoliert, die mit Hilfe von endogenem TGF- $\beta$  und RA  $iT_{reg}$  induzieren können. Die CD103<sup>-</sup> DZ in diesen

lymphatischen Organen konnten hingegen nur unter Zugabe von exogenem TGF- $\beta$  eine Foxp3-Expression in naiven T-Zellen bewirken [146, 147]. Im Gegensatz dazu fand man in den hautdrainierenden Lymphknoten CD103<sup>-</sup> DZ, die Vitamin A zu RA metabolisieren und naive T-Zellen *in vitro* in iT<sub>regs</sub> konvertieren können [160]. All diese Ergebnisse verdeutlichen, dass bestimmte DZ-Subsets für die Generierung von Foxp3<sup>+</sup> iT<sub>regs</sub> prädestiniert sind. Welche Rolle diese DZ für die iT<sub>reg</sub>-Konversion *in vivo* spielen, ist jedoch noch weitgehend unbeantwortet.

Ebenfalls ist relativ wenig darüber bekannt, wie unter homöostatischen Bedingungen im Lymphknoten naive T-Zellen gegenüber zellassozierten Selbstantigenen aus peripheren Geweben toleriert werden. Eine Möglichkeit besteht darin, dass ssmDZ Selbstantigene in der Peripherie aufnehmen und diese zur Differenzierung von iT<sub>regs</sub> im Lymphknoten naiven T-Zellen präsentieren. Dafür spricht, dass der Transport von Selbstantigenen durch diese DZ in die drainierenden Lymphknoten verschiedener Organe bereits dokumentiert ist [67-70]. SsmDZ stellen nur einen relativ geringen Anteil an den Gesamt-DZ im Lymphknoten dar, sind jedoch verhältnismäßig häufig in den hautdrainierenden Lymphknoten zu finden [66]. Hierbei handelt es sich vor allem um die aus der Haut migrierenden LZ sowie Langerin<sup>+</sup> und Langerin<sup>-</sup> dDZ [76, 161]. Die Migration dieser DZ ist jedoch nicht nur mit einer Hochregulation von CCR7, sondern auch von MHC II und kostimulatorischen Molekülen wie CD40 verbunden [63, 76]. Es ist daher unklar, inwiefern der „reife“ Zustand dieser migratorischen DZ eine iT<sub>reg</sub>-Konversion *in vivo* beeinträchtigt. Allerdings besteht auch die Möglichkeit, dass die ssmDZ nach Erreichen des Lymphknoten die Antigene an Lymphknoten-residente unreife DZ abgeben und diese letztlich für die iT<sub>reg</sub>-Induktion verantwortlich sind.

#### **1.4.4. Die Rolle von DZ für die Erhaltung von Foxp3<sup>+</sup> nT<sub>regs</sub> und iT<sub>regs</sub> in der Peripherie**

Für die Homöostase von T<sub>regs</sub> in der Peripherie sind verschiedene Faktoren verantwortlich, die zum Teil auch durch DZ vermittelt werden. So ist bekannt, dass T<sub>regs</sub> CD28 exprimieren und die Interaktion von CD28 mit CD80/CD86 für die Erhaltung der T<sub>reg</sub>-Population in der Peripherie eine wichtige Rolle spielt [124, 125]. Eine erst kürzlich erschienene Studie zeigt, dass hierfür vor allem CD80/CD86 auf DZ entscheidend ist. Fehlen die B7-Moleküle auf den DZ, nimmt die Frequenz an T<sub>regs</sub> in der Peripherie stark ab [162]. Darüber hinaus scheint auch Kostimulation durch CD40/CD40L für die T<sub>reg</sub>-Homöostase essentiell zu sein, da CD40-defiziente bzw.  $\alpha$ CD40L-behandelte Mäuse ebenfalls eine reduzierte Frequenz an peripheren

$T_{\text{regs}}$  aufweisen [127]. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass insbesondere vollreife DZ eine hohe Kapazität besitzen,  $T_{\text{regs}}$  *in vitro* und *in vivo* zu expandieren. Da jedoch unter homöostatischen Bedingungen keine vollreifen DZ vorliegen, bleibt zu klären, inwieweit der Reifungszustand von DZ und das damit verbundenen Expressionsniveau von kostimulatorischen Molekülen die  $T_{\text{reg}}$ -Homöostase beeinflusst.

Ferner spielt IL-2 eine große Rolle für die Erhaltung und das Überleben von  $T_{\text{regs}}$  in der Peripherie [163]. Deutlich wird dies vor allem durch Experimente, in denen die Blockade von IL-2 durch spezifische Antikörper zu einer Reduktion von peripheren  $T_{\text{regs}}$  führt [164]. Es ist allerdings noch nicht eindeutig geklärt, welche Zelle IL-2 unter homöostatischen Bedingungen zur Verfügung stellt, da  $T_{\text{regs}}$  selbst nicht in der Lage sind, dieses Zytokin zu produzieren [165]. Einige Studien deuten daraufhin, dass aktivierte  $T_{\text{konv}}$  IL-2 nach CD28/B7-Interaktion mit DZ produzieren [140, 158]. Daneben wurden auch autoreaktive  $CD4^+ CD25^{\text{low}}$  T-Zellen als IL-2-Produzenten identifiziert [164]. Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass DZ IL-2 produzieren können. Allerdings erfolgt dies vor allem nach mikrobiellen Stimulation [166], weshalb eine IL-2-Produktion durch DZ in der Homöostase fraglich ist.

Die Kontrolle der  $T_{\text{reg}}$ -Population wird auch mit der DZ-Zahl und dem Wachstumsfaktor Flt3L (*Fms-like tyrosine kinase 3 ligand*) in Verbindung gebracht [167]. So führt die mehrfache Injektion von Flt3L in Mäusen zu einer Expansion von  $T_{\text{regs}}$  [168]. Umgekehrt bewirkte ein Verlust an  $T_{\text{regs}}$  die verstärkte Teilung von DZ in einem Flt3L-abhängigen Mechanismus [49]. Aufgrund dieser Daten wurde ein Feedback-Mechanismus postuliert, der davon ausgeht, dass  $T_{\text{regs}}$  und DZ sich gegenseitig in ihrer Homöostase regulieren [167]. Darüber hinaus wird diskutiert, ob für  $T_{\text{regs}}$  in der Peripherie ähnlich wie für naive T-Zellen eine Erkennung von Selbst-MHC-Komplexen auf DZ notwendig ist, um ein sogenanntes tonisches Signal zu erhalten, dass das Überleben und die Funktionalität der T-Zelle sicherstellt [119, 169].

## 1.5. Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B

Bei dem nukleären Faktor kappa B (NF- $\kappa$ B) handelt es sich um eine Familie von dimeren Transkriptionsfaktoren, die in fast allen Zellen von Säugern nachgewiesen werden können. Sie sind an zahlreichen biologischen Prozessen wie dem Zellwachstum, der Zelldifferenzierung und der Apoptose beteiligt [170]. Ein Gegenstand intensiver Forschung ist die Rolle von NF- $\kappa$ B in der Entwicklung und Regulation des Immunsystems (Übersicht in [171-173])

### 1.5.1. Die NF- $\kappa$ B-Familie

In Säugerzellen wurden bisher fünf Proteine beschrieben, die zur NF- $\kappa$ B-Familie gehören: p50/p105 (NF- $\kappa$ B1), p52/p100 (NF- $\kappa$ B2) sowie die Rel-Proteine RelA (p65), RelB und c-Rel. Während die Rel-Proteine bereits in ihrer reifen Form vorliegen, müssen p50 und p52 erst durch Proteolyse aus den Vorläuferproteinen p105 und p100 prozessiert werden [174]. Ein gemeinsames Charakteristikum aller NF- $\kappa$ B-Proteine ist die am N-Terminus befindliche Rel-Homologie-Domäne (RHD). Diese Domäne beinhaltet eine Kernlokalisierungssequenz und vermittelt die Dimerisierung und DNA-Bindung. NF- $\kappa$ B-Proteine sind dadurch in der Lage sowohl Homo- als auch Heterodimere zu bilden, die nach Translokation in den Zellkern an spezifische DNA-Sequenzen, den sogenannten  $\kappa$ B-Sequenzen, innerhalb der regulatorischen Region von Zielgenen binden. Überdies besitzen RelA, RelB und c-Rel am C-Terminus zusätzlich eine Transaktivierungsdomäne (TAD). Diese vermittelt durch die Rekrutierung von Koaktivatoren bzw. die Dissoziation von Korepressoren die transkriptionelle Aktivität von NF- $\kappa$ B-Dimeren. Zwar fehlt den beiden NF- $\kappa$ B-Proteinen p50 und p52 die TAD, doch können sie durch Bildung von Heterodimeren mit TAD-enthaltenden Rel-Proteinen transkriptionell aktiv wirken. Dimere, die hingegen einzig aus p50 und p52 bestehen, bewirken eine Inhibition der Genexpression [173].

Prinzipiell können die fünf Mitglieder der NF- $\kappa$ B-Familie bis zu 15 verschiedene Hetero- bzw. Homodimere bilden [175]. Allerdings dimerisieren RelA und c-Rel vorwiegend mit p50 [176], während RelB bevorzugt Heterodimere mit p52 bzw. dem Vorläuferprotein p100 bildet [177-179]. Welche Dimere wann und wo generiert werden, ist abhängig vom Zelltyp und vom Stimulus [175].

RelB nimmt unter den NF- $\kappa$ B-Proteinen eine Sonderstellung ein. Es kann selbst keine Homodimere bilden [180] und nur in Kombination mit p50 und p52 entstehen transkriptionell aktive Komplexe [181, 182], nicht jedoch mit RelA [183, 184]. Ferner besitzt RelB eine

zusätzliche TAD in Form eines N-terminalen Leuzin-Zippers, der für die Transkriptionskontrolle essentiell ist [185].

In den meisten ruhenden Zellen liegen die NF- $\kappa$ B-Dimere inaktiv im Zytoplasma vor. Grund dafür ist die Bindung der Dimere an Proteine der inhibitorischen NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B)-Familie, zu der I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  und I $\kappa$ B $\epsilon$ , aber auch die Vorläuferproteine p100 und p105 gehören [186]. Allen gemein sind die im C-Terminus befindlichen Wiederholungen von Ankyrinresten, die die Kernlokalisierungssequenz der NF- $\kappa$ B-Dimere maskieren. Erst durch die Aktivierung der NF- $\kappa$ B-Signalwege (s.u.) wird eine Degradierung der I $\kappa$ Bs eingeleitet, die letztlich zur Freisetzung und nukleären Translokation der NF- $\kappa$ B-Dimere führt [175, 186]. Weitere Mitglieder der I $\kappa$ B-Familie wie Bcl-3 und I $\kappa$ B $\zeta$  regulieren die transkriptionelle Aktivität von NF- $\kappa$ B direkt im Zellkern [186].

### 1.5.2. Die NF- $\kappa$ B-Signalwege

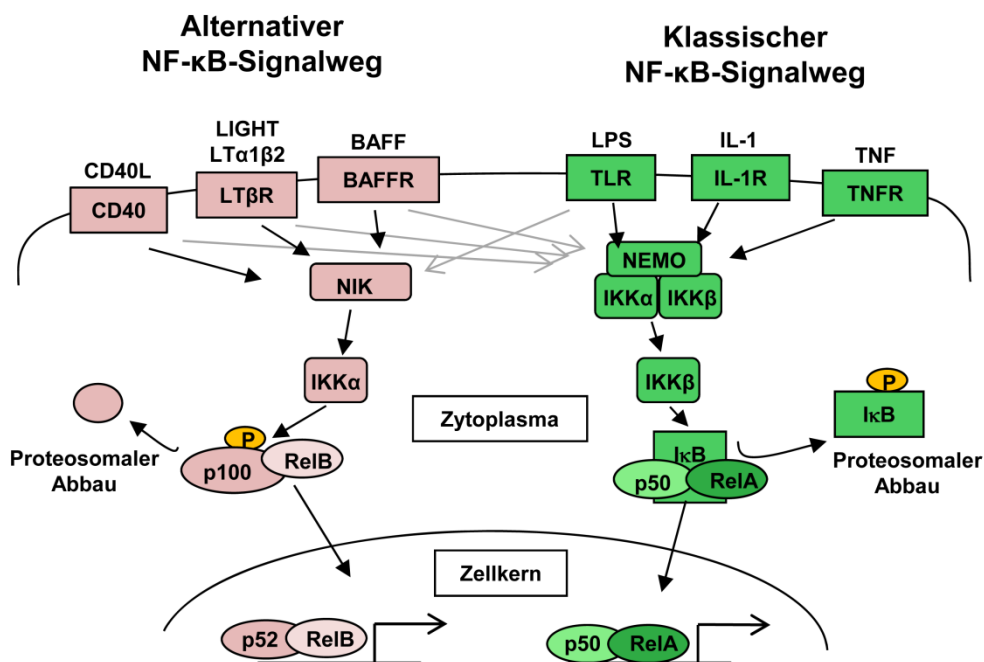
Für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B sind zwei Signalwege beschrieben: Der klassische und der alternative NF- $\kappa$ B-Signalweg. Beide unterscheiden sich hinsichtlich der auslösenden Stimuli, der beteiligten katalytischen Komponenten, der aktivierten NF- $\kappa$ B-Dimere und der regulierten Gene (Übersicht in [170, 175], s. Abb.4).

Der Aktivierung des klassischen NF- $\kappa$ B-Signalweg erfolgt relativ schnell durch eine Vielzahl an Stimuli wie proinflammatorische Zytokine (z.B. IL-1, TNF $\alpha$ ), pathogen-assoziierte Strukturen (z.B. LPS) und die Antigenerkennung in B- und T-Zellen [172, 175]. Infolge der Stimulation kommt es zur Aktivierung des I $\kappa$ B-Kinase (IKK)-Komplexes, der aus den katalytischen Untereinheiten IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  sowie der regulatorischen Untereinheit NEMO (auch IKK $\gamma$  genannt) besteht [176]. Die funktionell entscheidende Komponente ist hierbei die IKK $\beta$ , der die I $\kappa$ B-Proteine phosphoryliert und sie dadurch einem proteosomalen Abbau zuführt. Die Degradierung von I $\kappa$ B bewirkt die Freisetzung von NF- $\kappa$ B Dimeren, die in den Zellkern translozieren und dort die Transkription von Zielgenen induzieren können. Meist handelt es sich dabei um RelA/p50 und c-Rel/p50 Dimere [172]. Gene, die durch den klassischen NF- $\kappa$ B Signalweg reguliert werden, tragen vor allem zur Kontrolle von Entzündungsreaktionen, angeborenen Immunantworten und dem Überleben der Zelle bei [187]. Aber auch Teile der adaptiven Immunantwort, wie z.B. die Reifung und klonale Expansion der Lymphozyten werden durch diesen Signalweg reguliert [173].

Als Aktivatoren des alternativen NF- $\kappa$ B Signalwegs gelten die Liganden bestimmter Mitglieder der TNFR-Superfamilie wie CD40L, Lymphotoxin  $\beta$ , RANKL (*receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand*) oder BAFF (*B-cell activating factor of the TNF family*) [188]. Im Vergleich

zur klassischen NF- $\kappa$ B-Aktivierung zeigt dieser Signalweg eine verlangsamte Kinetik [174, 188] und beruht im Wesentlichen auf der NF- $\kappa$ B-induzierenden Kinase (NIK) und IKK $\alpha$ . Hierbei vermittelt NIK die Aktivierung von IKK $\alpha$ -Dimeren [178, 189], die anschließend die Phosphorylierung und Proteolyse von p100 zu p52 katalysieren [174, 178]. Da p100 vorwiegend mit RelB assoziiert vorliegt [177, 190], werden im Zuge dieses Signalwegs hauptsächlich RelB/p52 Dimere gebildet, die in den Zellkern translozieren. Dort angekommen regulieren sie vor allem Gene, die an der Entwicklung von lymphatischen Organen, der Homöostase und der Kontrolle adaptiver Immunantworten beteiligt sind [187].

Beide NF- $\kappa$ B Signalwege existieren jedoch nicht separat nebeneinander. In den letzten Jahren gab es zahlreiche Studien, die zeigten, dass es sich vielmehr um zwei miteinander interagierende Signalwege handelt (Übersicht in [175]). So können beispielsweise Stimuli des alternativen Signalwegs ebenfalls zur Aktivierung der für den klassischen Signalweg typischen RelA/p50 Dimere beitragen (Abb.4, markiert durch graue Pfeile).



**Abb. 4:** Schematische Darstellung des klassischen und alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs. Nähere Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen. Modifiziert nach [187].



### 1.5.3. Die Bedeutung von NF- $\kappa$ B für DZ

Generell werden alle Mitglieder der NF- $\kappa$ B-Familie in DZ exprimiert [191-194]. Allerdings scheinen die einzelnen NF- $\kappa$ B-Proteine in unterschiedlichem Maße an der Entwicklung, Reifung und Funktion der DZ beteiligt zu sein. Vieles, was bisher dazu bekannt ist, stammt von Expressionsanalysen sowie Mausmodellen, in denen die Gene von ein oder mehreren NF- $\kappa$ B-Proteinen inaktiviert bzw. zerstört wurden (Übersicht in [173, 195, 196]).

Ein NF- $\kappa$ B-Protein, das mit der Entwicklung und Reifung von DZ in Verbindung gebracht wird, ist RelB. Es kann spezifisch in den interdigitierenden DZ von Milz, Lymphknoten und Thymusmedulla detektiert werden, während Gewebe-DZ wie die LZ in der Epidermis kein RelB aufweisen [197-201]. Anhand von RelB-defizienten (*relB*<sup>-/-</sup>) Mäusen konnte gezeigt werden, dass RelB vor allem für die Entwicklung von CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> Milz-DZ essentiell ist, während es für CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> Milz-DZ scheinbar keine Rolle spielt [202, 203]. Zwar fehlten in den *relB*<sup>-/-</sup>-Mäusen auch die thymischen DZ, jedoch war dies auf eine zerstörte Thymusstruktur und nicht auf einen intrinsischen Defekt in diesen DZ zurückzuführen [203]. Weitere Studien mit *in vitro*-generierten humanen DZ belegten, dass verschiedene DZ-Aktivatoren (z.B. proinflammatorische Zytokine, CD40L) zu einer erhöhten Translokation von RelB in den Zellkern führen [193, 204-206]. Daher wurde vermutet, dass nukleäres RelB auch mit der Reifung und T-Zellaktivierung von DZ korreliert [200, 204]. Tatsächlich ergaben Untersuchungen von *in vitro*-generierten KM-DZ aus *relB*<sup>-/-</sup>-Mäusen eine reduzierte Expression von Reifungsmarkern wie MHC II-Komplexen und kostimulatorischen Molekülen [207]. Darüber hinaus zeigten funktionelle Analysen von RelB-defizienten DZ aus Knochenmarkchimären eine verminderte Fähigkeit, naive T-Zellen zu stimulieren [208, 209]. Trotz dieser Daten ist die RelB-abhängige Regulation von DZ-Reifung und -Funktion umstritten. So konnte auch gezeigt werden, dass die in den *relB*<sup>-/-</sup>-Mäusen verbliebenen CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> Milz-DZ keine Defekte in der Expression von Reifungsmarkern und der Stimulation von T-Zellen aufweisen [209].

Im Gegensatz zu RelB-defizienten Mäusen konnte in Mäusen mit Genverlusten (*Knock outs*) für RelA, c-Rel oder p50 keine Beeinträchtigung in der Entwicklung von bestimmten DZ Subpopulationen festgestellt werden [210]. Vermutlich erfüllen diese NF- $\kappa$ B-Proteine teils redundante Funktionen und können sich so im Falle der Defizienz eines anderen NF- $\kappa$ B-Proteins gegenseitig kompensieren [195, 210]. Unterstützt wird diese Theorie durch Daten von Doppel-*Knock out*-Mäusen, in denen Defekte in der Entwicklung als auch der Funktion von DZ zu beobachten sind. So führt das gleichzeitige Fehlen von p50 und p52 zu einer deutlich verringerten Zahl an KM-DZ sowie zu einer beeinträchtigten Stimulation von

T-Zellen [211]. Überdies konnte in RelA/p50-defizienten Mäusen kaum eine DZ –weder CD8 $\alpha^+$  noch CD8 $\alpha^-$  in der Milz nachgewiesen werden [210]. Die Autoren führen die starke Reduktion der DZ in diesen Tieren auf einem massiven Zelltod der sich entwickelnden DZ zurück [210]. Auch die Rolle von c-Rel in Kombination mit p50 wurde bereits an entsprechenden Doppel-*Knock out*-Mäusen untersucht. Hierbei konnte festgestellt werden, dass beide NF- $\kappa$ B-Proteine in unterschiedlichem Maße KM-DZ und *ex vivo* DZ aus lymphatischen Organen beeinflussen. Während die cDZ in der Milz von *c-Rel/p50*<sup>-/-</sup> Mäusen weder phänotypisch noch funktionell beeinträchtigt waren, zeigten die KM-DZ und pDZ nach Stimulation eine verminderte Produktion von IL-12 sowie eine verstärkte Apoptoserate [210, 212]. Ferner verminderte die Defizienz an c-Rel/p50 die Fähigkeit der KM-DZ und pDZ, T-Zellantworten zu induzieren [210, 212]. Da die Defekte hinsichtlich der IL-12-Produktion und der T-Zellstimulation auch in KM-DZ von p50- und c-Rel-Einzel-*Knockout*-Mäusen nachgewiesen werden konnten [194, 211, 213], ist davon auszugehen, dass beide NF- $\kappa$ B-Proteine eine nicht redundante Rolle für diese funktionellen Eigenschaften spielen.

Die Bedeutung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung für die Reifung und Funktion von DZ wird auch an Studien deutlich, in denen Komponenten der Signalkaskade oberhalb der NF- $\kappa$ B-Proteine inaktiviert bzw. überexprimiert wurden. So führte beispielsweise die Überexpression von I $\kappa$ B $\alpha$  in humanen gereiften DZ zu einer Verminderung der Expression von HLA-Komplexen, kostimulatorischen Molekülen und proinflammatorischen Zykoinen wie IL-12 [214]. Ferner zeigten humane DZ, in denen eine dominant-negative Form von IKK $\beta$  überexprimiert oder NEMO durch einen Peptidinhibitor geblockt wurde, eine beeinträchtigte Reifung und Antigenpräsentation [215, 216]. Neben diesen Effekten auf den klassischen NF- $\kappa$ B-Signalweg wurde auch die Funktion von katalytischen Komponenten des alternativen Signalwegs auf die DZ untersucht. Mäuse mit funktionell inaktivem NIK zeigten eine normale DZ-Entwicklung und -Reifung, jedoch waren die DZ unfähig, Antigene an CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu kreuzpräsentieren [217].

Zusammengefasst deuten diese Beobachtungen darauf hin, dass beide NF- $\kappa$ B-Signalwege eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Funktion von DZ spielen.

## 1.6. Zielsetzung

Wie vorn erwähnt, besteht weitgehend Unklarheit über die Frage, welche DZ in welchem Reifungszustand in der Peripherie dazu in der Lage sind,  $\text{Foxp3}^+$   $\text{iT}_{\text{reg}}$  gegen zellassoziierte Antigene zu induzieren. Als potentielle Kandidaten gelten migratorische DZ, die bereits unter homöostatischen Bedingungen Selbstantigene aus der Peripherie in die drainierenden Lymphknoten transportieren können [67-70].

In einem ersten Teilprojekt sollten daher zunächst die ssmDZ in den hautdrainierenden Lymphknoten phänotypisch näher charakterisiert werden. Anschließend sollte untersucht werden, inwiefern diese Zellen in der Lage sind,  $\text{Foxp3}^+$   $\text{iT}_{\text{regs}}$  gegen zellassoziierte Selbstantigene zu induzieren. Dabei stellte sich zum einen die Frage, welchen Mechanismus ssmDZ verwenden, um naive T-Zellen in  $\text{iT}_{\text{regs}}$  zu konvertieren und zum anderen, welche Subpopulation an Haut-DZ genau für die Tolerogenität verantwortlich ist.

Darüber hinaus sollte in einem zweiten Teilprojekt untersucht werden, welche intrinsischen Signalmoleküle dafür verantwortlich sind, dass die ssmDZ partiell reifen und in die drainierenden Lymphknoten migrieren. Als ein möglicher Kandidat galt  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , der massgeblich an der Reifung und Funktion von DZ beteiligt ist. Es sollte untersucht werden, inwiefern einzelne Mitglieder der  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Familie bei der Reifung und Migration von ssmDZ eine Rolle spielen. Dazu sollten die ssmDZ u.a. in den hautdrainierenden Lymphknoten von  $\text{relB}^{+/-}$ ,  $\text{p52}^{-/-}$  und  $\text{p50}^{-/-}$  Mäusen näher analysiert werden.

Um zu überprüfen, ob es sich bei den zuvor beobachteten Effekten in den Einzel-*Knock out*-Mäusen um DZ-intrinsische oder –extrinsische Effekte handelt, wurden in einem dritten Teilprojekt transgene Mäuse mit einer DZ-spezifischen Deletion von RelB analysiert. Anhand dieser Mäuse sollte zudem untersucht werden, ob die RelB-Defizienz in DZ auch funktionelle Auswirkungen auf die Entwicklung und Homöostase von  $\text{Foxp3}^+$   $\text{T}_{\text{regs}}$  hat.

## 2. MATERIAL

### 2.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Sofern nicht anders angegeben wurden die Chemikalien von Applichem (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland), Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), PAA (Pasching, Österreich), Peprotech (Hamburg, Deutschland) oder Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland bzw. St. Louis, USA) im jeweils höchsten Reinheitsgrad bezogen. Alle Verbrauchsmaterialien aus Polystyrol, Polyethylen und Polypropylen wurde von den Firmen Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland), Becton Dickinson Falcon (Heidelberg, Deutschland), B.Braun (Melsungen, Deutschland), Costar (Bodenheim, Deutschland), Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Fluka (Taufkirchen, Deutschland), Greiner (Solingen, Deutschland) und ThermoScientific bezogen.

### 2.2. Medien, Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit deionisiertem Wasser oder steriler Phosphat-gepufferter Saline (PBS) hergestellt. Fötale Kälberserum (FKS, bezogen von PAA) wurde für 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert, aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

**Tab. 2: Medien, Puffer und Lösungen sowie deren Zusammensetzung.**

<b>Medien, Puffer, Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>	
Diethylpyrophosphocarbonat (DEPC)-H <sub>2</sub> O	0,1% (w/v)	DEPC in ddH <sub>2</sub> O über Nacht gerührt und im Anschluß autoklaviert
DZ Präparationspuffer	5% 1 mM	FKS EDTA PBS
EasySep-Puffer	5%	Rattenserum (StemCell) PBS
Einfriermedium	45 ml 5 ml	FKS DMSO
Erythrozyten-Lysepuffer	1,6%	NH <sub>4</sub> Cl PBS vor Anwendung 1:2 mit dH <sub>2</sub> O verdünnt

FACS-Puffer	0,1%	BSA
	0,1%	NaN <sub>3</sub>
		PBS
Homogenisationspuffer (10x)	500 mM	KCl
	100 mM	Tris-HCl (pH 8,3)
	0,1 mg/ml	Gelatine
	0,45%	Nonidet-P40
	0,45%	Tween 20
		ddH <sub>2</sub> O
MACS Puffer	0,5%	BSA
	2 mM	EDTA
		PBS
4% ige Paraformaldehyd (PFA)-Lösung	4 g	PFA
	100 ml	PBS (1x), auf 60°C erhitzt, mit 10 N NaOH geklärt und auf einen pH von 7-7,3 einstellt
Phosphat-gepufferte Saline (PBS, 1x), pH 7,3	4 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	16 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	115 mM	NaCl
		ddH <sub>2</sub> O
TBE-Puffer (10x), pH 7,3	1 M	Tris
	0,9 M	Borsäure
	0,01	EDTA
		ddH <sub>2</sub> O
TAE-Puffer (10x)	0,4 M	Tris pH 8,0
	0,01 M	EDTA
	0,2 M	Eisessig
		DEPC-H <sub>2</sub> O
Zellkulturmedium (R10-Medium)	500 ml	RPMI1640
	50 ml	FKS
	100 U/ml	Penicillin
	100 µg/ml	Streptomycin
	2 mM	L-Glutamin
	50 µM	β-Mercaptoethanol

### 2.3. Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

**Tab. 3: Primärantikörper.** Abkürzungen: Rat – Ratte, Ham – Hamster, Ms – Maus, Kan – Kaninchen.

Antigen	Klon	Konjugat	Isotyp	Konz.	Bezugsquelle
CD4	RMA-5	FITC	Rat IgG2a	1:200	BD Biosciences
CD4	GK1.5	PacificBlue	Rat IgG2b	1:200	Biolegend
CD8 $\alpha$	53-6.7	PerCP	Rat IgG2a	1:200	Biolegend
CD11c	HL3	Biotin	Ham IgG1	1:100	BD Biosciences
CD11c	HL3	FITC	Ham IgG1	1:100	BD Biosciences
CD11c	N418	APC	Ham IgG	1:100	Biolegend
CD25	7D4	FITC	Rat IgM	1:200	BD Biosciences
CD25	PC61	PE	Rat IgG1	1:200	BD Biosciences
CD40	3/23	Biotin	Rat IgG2a	1:100	BD Biosciences
CD40	3/23	AlexaFluor 488	Rat IgG2a	1:50	Serotec
CD40	3/23	PE	Rat IgG2a	1:100	BD Biosciences
CD45R (B220)	RA3-6B2	Biotin	Rat IgG2a	1:200	BD Biosciences
CD45R (B220)	RA3-6B2	AlexaFluor 647	Rat IgG2a	1:200	BD Biosciences
CD80 (B7-1)	16-10A1	FITC	Ham IgG	1:100	BD Biosciences
CD86 (B7-2)	GL-1	FITC	Rat IgG2a	1:100	Biolegend
CD103	M290	Biotin	Rat IgG2a	1:100	BD Biosciences
CD207	eBioL31	PE	Rat IgG2a	1:100	eBioscience
CD273 (B7-DC)	TY25	PE	Rat IgG1	1:100	eBioscience
CD274 (B7-H1)	MIH5	PE	Rat IgG2a	1:100	eBioscience
CD279 (PD-1)	J43	PE	Ham IgG	1:100	eBiosciences
CD326	G8.8	PE	Rat IgG2a	1:200	eBioscience
cRel	C	pur	Kan IgG	1:100	Santa Cruz
Foxp3	FJK-16s	PE	Rat IgG2a	1:100	eBioscience
Foxp3	FJK-16s	APC	Rat IgG2a	1:100	eBioscience
GITR	DTA-1	FITC	Rat IgG2b	1:100	BD Biosciences
Helios	22F6	FITC	Ham IgG	1:30	BioLegend
I-A/I-E (MHC II)	2G9	pur	Rat IgG2b	1:200	BD Biosciences
I-A/I-E (MHC II)	M5/114.15.2	PE	Rat IgG2b	1:250	Biolegend
LAP (TGF- $\beta$ )	27232	PE	Ms IgG1	1:20	R & D Systems
RelA	C20	pur	Kan IgG	1:100	Santa Cruz
RelB	C19	pur	Kan IgG	1:100	Santa Cruz
TCR V $\beta$ 5.1, 5.2	MR9-4	Biotin	Ms IgG1	1:100	BD Biosciences
TCR V $\beta$ 5.1, 5.2	MR9-4	FITC	Ms IgG1	1:100	BD Biosciences
TGF- $\beta$	1D11	pur	Ms IgG1	20 $\mu$ /ml	R&D Systems

**Tab. 4: Sekundärantikörper.** Abkürzungen: Rat – Ratte, Kan – Kaninchen.

Antigen	Klon	Konjugat	Isotyp	Konz.	Bezugsquelle
Kan IgG		Cy3	Esel Ig	1:400	Invitrogen
Kan IgG		FITC	Ziege F(ab') <sub>2</sub>	1:200	Jackson
Kan IgG		DyeLight488	Ziege F(ab') <sub>2</sub>	1:100	Jackson
Rat IgG		AlexaFluor488	Esel F(ab') <sub>2</sub>	1:300	Jackson
Rat IgG	BA-4001	Biotin	Kan Ig	1:200	Vector, U.S.
Streptavidin	-	FITC	-	1:200	BD Biosciences
Streptavidin	-	PacificBlue	-	1:200	Invitrogen
Streptavidin	-	PE	-	1:200	BD Biosciences
Streptavidin	-	PE	-	1:200	Biolegend

**Tab. 5: Isotypkontrollantikörper.** Abkürzungen: Rat – Ratte, Ham – Hamster, Ms – Maus.

Isotyp	Klon	Konjugat	Konz.	Bezugsquelle
Ham IgG	HTK888	FITC	1:30 - 1:100	BioLegend
Ham IgG	HTK888	APC	1:100	BioLegend
Ham IgG	eBio299Arm	PE	1:100	eBiosciences
Ms IgG1	11711	pur	20 µg/ml	R&D Sytems
Ms IgG1	MOPC-21	FITC/BIO	1:100	BioLegend
Rat IgG1	R3-34	PE	1:100 - 1:200	BD
Rat IgG2a,κ	eBR2a	BIO	1:100	eBioscience
Rat IgG2a,κ	eBR2a	PE/APC	1:100 - 1:200	eBioscience
Rat IgG2b	RTK4530	FITC	1:100 - 1:200	BioLegend
Rat IgG2b	A95-1	PE	1:100 - 1:200	BD
Rat IgM	R4-22	FITC	1:200	BD

**Tab. 6: Fluoreszenzfarbstoffe.**

Fluoreszenzfarbstoff	Bezugsquelle
CFSE	Invitrogen
DAPI	Invitrogen
FITC isomer I	Sigma Aldrich

## 2.4. Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide (*Primer*) wurden von der Firma Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) synthetisiert. Die Oligonukleotide für die quantitative *Real-Time* PCR wurden mit Hilfe des Programms Primer 3 (Internetadresse: <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) geplant.

**Tab.7: Primer für die Genotypisierung von transgenen Mäusen.**

Zielgen	Primer	Sequenz (5' → 3')	Referenz
CD11cCRE	CD11c-Cre	acttggcagctgtctccaag	Boris Reizis, New York
	Cre-ORF	gcgaacatcttcaggttctg	Boris Reizis, New York
K5mOVA	MOVA3	ctgtgcagatgatgtac	H. Azukizawa, Osaka
	MOVA4	tggttgcatgtgcttg	H. Azukizawa, Osaka
RelB <sup>fl/fl</sup>	RelB-GT1	agggtgatggtaacttggatg	Marc Riemann, Jena
	SeqTVRelB1	tccaaaaaaccacaaacaac	Marc Riemann, Jena
	SeqTVRelB8	gtttcctctgcttggtctgc	Marc Riemann, Jena

**Tab.8: Primer für die quantitative *Real-Time* PCR.**

Abkürzungen: F/FOR-Forward, R/REV- Reverse.

Zielgen	Primer	Sequenz (5' → 3')
β-Actin	β-Actin-F qRT	cattgctgacaggatgcaga
	β-Actin-R qRT	ttgctgatccacatctgctg
Flt3L	Flt3L-F qRT	cccattctctccaacttcaa
	Flt3L-R qRT	acctgccacagtcttcagt
IL-2	mIL-2-FOR	tttgatgccaattcgatga
	mIL-2-REV	agggctgttgagatgatgc
IL-7	IL-7-FOR2	tcagcatcgatgaattggac
	IL-7-REV2	ccagtgtttgtgctcctgt
IL-15	mIL-15-FOR	cattttgggctgtgtcagtg
	mIL-15-REV	tgcaactgggatgaaagtca

## 2.5. Enzyme und Peptide

DNase I	Roche bzw. MBI Fermentas
Kollagenase III	Worthington Biochemical
OVA <sub>327-339</sub> -Peptid	Activotec
Proteinase K	MBI Fermentas
Taq-DNA Polymerase (nativ)	MBI Fermentas



## 2.6. Kits und Magnetische Beads

<i>DAB Peroxidase Substrate Kit</i>	Vector Lab.
<i>Foxp3 Staining Buffer Set</i>	eBiosciences
<i>Mouse CD11c MicroBeads</i>	Miltenyi Biotec
<i>Mouse CD4<sup>+</sup> T Cell Enrichment Kit</i>	StemCell
<i>Mouse CD25 MicroBeads</i>	Miltenyi Biotec

## 2.7. Versuchstiere

Alle Versuchstiere wurden unter pathogenfreien Bedingungen im Tierstall des Instituts für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg gezüchtet und gehalten. Die verwendeten transgenen Mauslinien befanden sich alle auf dem C57Bl/6J Hintergrund. Für die Experimente wurden vorwiegend Tiere im Alter von 5 – 10 Wochen eingesetzt. Alle durchgeführten Tierversuche wurden durch die Regierung von Unterfranken genehmigt.

**Tab.9: Verwendete Mauslinien.**

<b>Mauslinie</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Referenz</b>
CD11cCRE	Boris Reizis, New York	[218]
CCR7 <sup>-/-</sup>	Martin Lipp, Berlin	[22]
C57Bl/6(J)	Hauszucht, Charles River	
K5mOVA	Hiroaki Azukizawa, Osaka	[219]
MHC II <sup>-/-</sup>	Horst Bluethmann, Basel	[220]
OT-II	Francis Carbone, Melbourne	[221]
p50 <sup>-/-</sup>	Falk Weih, Jena	[222]
p52 <sup>-/-</sup>	Falk Weih, Jena	[223]
relB <sup>+/-</sup>	Falk Weih, Jena	[202]
RelB <sup>fl/fl</sup>	Falk Weih & Marc Riemann, Jena	noch nicht veröffentlicht

Die Genotypisierung einiger transgener Mauslinien (K5mOVA, CD11cCRE, RelB<sup>fl/fl</sup>) erfolgte mittels DNA-Isolierung aus Ohrbiopsien und anschließender PCR (s. 3.9.1). Mauslinien, auf deren Genotypisierung nicht weiter eingegangen wird, wurden entweder bereits homozygot gezüchtet oder nur für die Experimente bezogen und nicht selbst weiterverpaart.

### **3. METHODEN**

#### **3.1. Zellkulturverfahren**

##### **3.1.1. Kultivierung und Ernte von Zellen**

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden stets unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Kultivierung von Zellen erfolgte routinemäßig bei 37°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% im mit 5% CO<sub>2</sub>-begasteten Brutschrank.

##### **3.1.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zum langfristigen Aufbewahrung von Zellen wurden 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> Zellen zunächst pelletiert (1200 rpm, 5 min, RT), dann in 1 ml eiskaltem Einfriermedium resuspendiert und auf Eis in Kryoröhrchen überführt. Diese wurden langsam auf -80°C abgekühlt und nach 24 h zur Dauerkonservierung in flüssigem Stickstoff bei -140°C gelagert.

Zum Auftauen wurden die Zellen rasch bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und zügig in warmes R10-Medium überführt. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (1200 rpm, 5 min, RT) und in frisches R10-Medium aufgenommen.

##### **3.1.3. Zellzählung und Vitalitätstest**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die Zellsuspension gut resuspendiert, mit Trypanblaulösung verdünnt und mit Hilfe einer Neubauerzählkammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Trypanblau färbt tote Zellen aufgrund ihrer durchlässig gewordenen Membran blau und erlaubt so eine selektive Auszählung von ungefärbten lebenden Zellen. Hierzu wurde in 4 Großquadraten die Zahl der lebenden Zellen ausgezählt und die Zellzahl pro ml Volumen wie folgt bestimmt:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert aus 4 Großquadraten} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

##### **3.1.4. Gewinnung von $\alpha$ IL-2 Antikörper**

Um  $\alpha$ IL-2 monoklonalen Antikörper zu gewinnen, wurde die Hybridom-Zelllinie S4B6 verwendet. Die Zellen wurden in R10-Medium kultiviert und zur Produktion von Antikörperhaltigem Überstands in Nunc CellFactories (ThermoFisher) mit RPMI-Medium nach Vorgaben des Herstellers weiterkultiviert. Der Überstand wurde abgenommen, die Proteinkonzentration spektralphotometrisch bei 280 nm mit dem NanoDrop® ND-1000-Spektrophotometer (Peqlab) bestimmt und bei 4°C gelagert.

## **3.2. Präparation von Zellen aus lymphatischen Organen der Maus**

Alle Versuchstiere wurden durch CO<sub>2</sub>-Begasung getötet und vor der Entnahme von lymphatischen Organen äußerlich mit 70%-igen Ethanol desinfiziert.

### **3.2.1. Präparation von Knochenmarkszellen**

Für die Gewinnung von Knochenmark wurden zunächst Femur und Tibia entnommen und von umliegenden Gewebe befreit. Die Knochen wurden 2 min in 70%-igen Ethanol desinfiziert, in PBS gewaschen und an beiden Enden abgeschnitten, so dass das Knochenmark mit einer PBS-gefüllten Einmalspritze mit 27G Nadel ausgespült werden konnte. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (1200 rpm, 5 min) und einer Erythrozytenlyse unterzogen. Hierzu wurden die Knochenmarkszellen in einer sterilen 0,8%-iger Ammoniumchloridlösung für 5 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von R10-Medium wurde die Lyse abgestoppt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (1200 rpm, 5 min, 4°C), in R10-Medium aufgenommen und gezählt.

### **3.2.2. Präparation von lymphatischen Organen als Quelle für T-Zellen**

Je nach Versuch wurden die hautdrainierenden Lymphknoten (axial, brachial, inguinal, popliteal), mesenterischen Lymphknoten, Milz und/oder Thymus unter sterilen Bedingungen isoliert und in eiskaltem PBS aufbewahrt. Anschließend wurden die lymphatischen Gewebe mittels der rauen Seite zweier Objektträger zerrieben. Die Zellsuspensionen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und durch ein Zellsieb ( $\varnothing = 70 \mu\text{m}$ ) gefiltert, um Gewebestücke zurückzuhalten. Milzsuspensionen wurden vor Abtrennung der Gewebestücke zusätzlich noch einer Erythrozytenlyse unterzogen. Hierzu wurden die Milzzellen bei 1200 rpm für 5 min pelletiert und anschließend in einer sterilen 0,8%-igen Ammoniumchloridlösung für 5 min bei 37°C inkubiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von R10-Medium abgestoppt und die Zellen abzentrifugiert (1200 rpm, 5 min, 4°C). Nach Resuspension des Zellpellets in R10-Medium wurden die Milzzellen ebenfalls durch ein Zellsieb ( $\varnothing = 70 \mu\text{m}$ ) gegeben. Die resultierenden Einzelzellsuspensionen wurden nun direkt zur durchflusszytometrischen Analyse herangezogen (s. 3.3) oder zur Separation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowie deren Unterarten eingesetzt (s. 3.4.1, 3.4.2).

### **3.2.3. Präparation von lymphatischen Organen als Quelle für DZ**

Für eine durchflusszytometrische Analyse bzw. Separation von DZ wurden je nach Versuch folgende lymphatische Organe steril isoliert und in eiskaltem R10-Medium aufbewahrt:

hautdrainierende Lymphknoten (axial, brachial, inguinal), mesenterische Lymphknoten und/oder Milz. Die Isolation der DZ erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Vremec *et al.* [61]. Zunächst wurden die lymphatischen Organe mit Hilfe zweier gebogener Pinzetten in sehr kleine Gewebestücke zerteilt. Diese wurden dann zentrifugiert (1200 rpm, 5 min) und in je 1 ml R10-Medium mit DNase I (1 mg/ml) und Kollagenase III (1 mg/ml) resuspendiert. Milzgewebe wurde vor enzymatischer Behandlung zusätzlich einer Erythrozytenlyse wie unter 3.2.2 beschrieben unterzogen. Um einen effektiven Verdau des Gewebes zu gewährleisten, wurden die Proben 20 min bei RT inkubiert und währenddessen ab und zu geschüttelt. Um DZ/T-Zell-Komplexe zu trennen, wurde EDTA (10 mM) zugegeben und für weitere 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 10 ml DZ Präparationspuffer zugesetzt und die Zellsuspension durch ein Zellsieb ( $\varnothing = 70 \mu\text{m}$ ) transferiert. Die Zellen wurden gezählt und entweder direkt zur durchflusszytometrischen Analyse herangezogen (s. 3.3) oder alternativ zur Separation von DZ Subpopulationen eingesetzt (s. 3.4.3, 3.4.4).

### **3.3. Durchflusszytometrische Analyse**

Alle für die Durchflusszytometrie verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sowie die entsprechenden Fluorochromkonjugate und eingesetzten Verdünnungen sind unter 2.3 aufgeführt. Die Analyse der Fluoreszenzen erfolgte an den Durchflusszytometern (*fluorescence activated cell sorter*, FACS) FACSCalibur oder FACSLSR II der Firma BD Biosciences. Zur Auswertung der gewonnenen Daten wurde die Software FlowJo 8.0 der Firma TreeStar Inc. verwendet.

#### **3.3.1. Färbung von Oberflächenmolekülen auf Zellen lymphatischer Organe**

Je Färbung wurden mindestens  $4 \times 10^5$  Zellen, jedoch meist  $1 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden in 0,6 ml FACS-Röhrchen überführt und zentrifugiert (1200 rpm, 5 min,  $4^\circ\text{C}$ ). Um eine unspezifische Bindung durch Fc-Rezeptoren zu verhindern, wurde das Zellpellet zunächst in 50  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer mit 10% 2.4G2 Überstand resuspendiert und 15 min bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach einem Waschschriff in FACS-Puffer wurden die Zellen mit 50  $\mu\text{l}$  einer in FACS-Puffer verdünnten Antikörperlösung für 30 min bei  $4^\circ\text{C}$  im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und für die nachfolgende Messung in 300  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer aufgenommen. Bei Färbungen mit Sekundärantikörpern wurde der Färbeschritt und die nachfolgenden Waschschriffe wiederholt und die Zellen letztlich ebenfalls in 300  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer aufgenommen.

### 3.3.2. Intrazelluläre Färbung von Foxp3, Helios und Ki67 in Zellen lymphatischer Organe

Zur Färbung der intrazellulären Moleküle Foxp3, Helios und Ki67 wurden  $1 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden in kleine FACS-Röhrchen überführt und zentrifugiert (1200 rpm, 5min 4°C). Die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen sowie diverse Waschschriffe erfolgten mittels des *Foxp3 Staining Buffer Set* der Firma eBiosciences gemäß den Vorgaben des Herstellers. Die anschließende Färbung der Zellen erfolgte für 30 min bei 4°C im Dunkeln. Danach wurden die Zellen gewaschen und für die Messung in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen.

### 3.3.3. Intrazelluläre Färbung von RelB in DZ der lymphatischen Organe

Für die Färbung von RelB wurden je  $2 \times 10^6$  Zellen in kleine FACS-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (1200 rpm, 5 min, 4°C). Das Zellpellet wurde zunächst in 50 µl FACS-Puffer mit 10% 2.4G2 Überstand resuspendiert und 15 min bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschschriff in FACS-Puffer wurden die Zellen mit 100 µl einer in FACS-Puffer verdünnten Antikörperlösung für CD11c-APC für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und in 100 µl frisch angesetzter 2%-iger Formaldehydlösung für 30 min bei RT im Dunkeln fixiert. Nach einem Waschschriff mit R10-Medium wurde zur Permeabilisierung der Zellen 300 µl eiskalter 90%-iger Methanol unter ständigem Vortexen zugeführt. Die Zellen wurden 30 min bei 4°C im Dunkeln gelagert und anschließend zweimal mit PBS/4% FKS gewaschen. Danach erfolgte die Färbung gegen RelB (polyklonaler Kaninchen IgG) in 100 µl PBS/4% FKS für 45 min bei 4°C im Dunkeln. Zur Detektion des  $\alpha$ RelB-Antikörpers wurde mit dem FITC bzw. DyeLight488-konjugierten Sekundäntikörper Ziege-anti-Kaninchen IgG F(ab)2 in 100 µl PBS/4% FKS für 45 min bei 4°C im Dunkeln gefärbt. Nach einem Waschschriff wurden die Zellen für die Messung in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen.

### 3.3.4. Oberflächen- und intrazelluläre Färbung von Zellen in Vollblut

50 µl heparinisieretes Vollblut (s. 3.7.5) wurde zentrifugiert (1200 rpm, 5 min, 4°C) und mit 100 µl einer in FACS-Puffer verdünnten Antikörperlösung für Oberflächenmoleküle für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Zur Lyse der Erythrozyten und zur Fixierung der Zellen wurden die Zellen in 100 µl Fix/Perm-Lösung (*Foxp3 Staining Buffer Set*, eBiosciences) für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen einmal mit FACS-Puffer gewaschen und für die Messung in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen. Bei einigen

Versuchen wurde nach dem Waschen eine intrazelluläre Färbung von Foxp3 und Ki67 wie unter 3.3.2 beschrieben angeschlossen.

### **3.4. Zellsortierungen**

#### **3.4.1. Magnetische Zellsortierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

Für die Isolation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus den Einzelzellsuspensionen der lymphatischen Organen (s. 3.2.2) wurde der *mouse CD4<sup>+</sup> T Cell Enrichment Kit* der Firma Stemcell gemäß den Herstellerangaben verwendet. Zur Bestimmung der Reinheit der sortierten Zellen wurde im Anschluss eine durchflusszytometrisch Reanalyse anhand der CD4-Expression durchgeführt. Die Reinheit lag meistens bei >90%.

#### **3.4.2. Magnetische Zellsortierung von CD25<sup>+</sup> und CD25<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

Die durch magnetische Zellseparation gewonnenen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (3.4.1) wurden für einige Experimente zur weiteren Isolation der CD25<sup>+</sup> und CD25<sup>-</sup> T-Zellsubpopulationen eingesetzt. Hierfür wurde der *mouse CD25 MicroBead Kit* der Firma Miltenyi Biotec gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die Reinheit der sortierten Zellpopulation (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> bzw. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>) wurde im Anschluss durchflusszytometrisch anhand der Expression von CD4 und CD25 bestimmt und betrug im Falle der CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T-Zellen meist >90% und bei den CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen >75%.

#### **3.4.3. Magnetische Zellsortierung von CD11c<sup>+</sup> DZ**

Zur Anreicherung von DZ aus Einzelzellsuspensionen (s. 3.2.3) wurden *mouse CD11c MicroBeads* der Firma Miltenyi Biotec eingesetzt. Die Färbe- und Waschschrte erfolgten gemäß den Vorgaben des Herstellers, wobei immer vor dem Färben ein Fc-Block mit 10% 2.4G2 Überstand für 15 min bei 4°C durchgeführt wurde. Da die Reinheit der separierten CD11c<sup>+</sup> Zellen nach durchflusszytometrischer Reanalyse meistens nur bei >60% lag, wurde eine durchflusszytometrische Zellsortierung (3.4.4) angeschlossen.

#### **3.4.4. Durchflusszytometrische Sortierung von CD11c<sup>+</sup> DZ**

Einzellzellsuspensionen von lymphatischen Organen (s. 3.2.3) oder mittels magnetischer Beads angereicherte CD11c<sup>+</sup> DZ (s.o.) wurden für die Oberflächenmarker CD11c bzw. CD11c und CD40 gefärbt (s. 3.3.1) und nach erneuter Filtration durch ein Zellsieb ( $\varnothing = 70 \mu\text{m}$ ) mit Hilfe eines FACSVantage Durchflusszytometers (BD) sortiert. Je nach Versuch wurden entweder CD11c<sup>+</sup> Gesamt-DZ oder Subpopulationen von DZ (z.B. residente CD40<sup>low</sup>

CD11c<sup>+</sup> und migratorische CD40<sup>high</sup> CD11c<sup>+</sup> DZ aus hautdrainierenden Lymphknoten) aufgetrennt. Die Reinheit der sortierten Zellen wurde durchflusszytometrisch anhand der Expression der gefärbten Oberflächenmarker reanalysiert und lag meist bei >90%. Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten durchflusszytometrischen Zellsortierungen wurden durch Herrn Christian Linden und Herrn Christian Bauer am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg durchgeführt.

### **3.5. Zellmarkierung mit CFSE**

Die Markierung von Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Carboxyfluorescein- Succinimidyl Ester (CFSE) ermöglicht zum einen die Re-Identifikation der Zellen nach einem adoptiven Transfer in eine andere Maus. Zum anderen erlaubt die CFSE-Färbung auch die Analyse von proliferierenden Zellen, da die Farbstoffmenge bei jeder Zellteilung zu gleichen Teilen auf die Tochterzellen aufgeteilt wird [224]. Für die Färbung wurden je  $1 \times 10^7$  Zellen in 1 ml PBS resuspendiert und mit 2,5  $\mu$ M CFSE (finale Konzentration in PBS) für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Im Anschluß wurden die Zellen einmal mit R10-Medium und einmal mit PBS gewaschen.

### **3.6. *In vitro* T<sub>reg</sub> Konversionsassay**

Der Assay zur *in vitro* Generierung von T<sub>regs</sub> aus naiven T-Zellen erfolgte in modifizierter Weise nach dem Protokoll von Yamazaki et al. [158]. Naive CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T-Zellen wurden aus den Lymphknoten und Milzen von OT-II Mäusen aufgereinigt (s. 3.2.2, 3.4.1, 3.4.2). Die Isolierung von CD40<sup>hi</sup> CD11c<sup>+</sup> und CD40<sup>low</sup> CD11c<sup>+</sup> DZ aus hautdrainierenden Lymphknoten von WT Mäusen erfolgte wie unter 3.4.4. beschrieben. Anschließend wurden je 20.000 naive CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> OT-2 T-Zellen mit 6.000 DZ für 5 Tage mit 100 ng/ml OVA<sub>327-339</sub> Peptide in 96W Rundbodenplatten kokultiviert. Zum Teil wurde porzines TGF- $\beta$  (2 ng/ml, R&D Systems), ein  $\alpha$ TGF- $\beta$ -Antikörper (20  $\mu$ g/ml) oder ein Maus IgG1-Kontrollantikörper (20  $\mu$ g/ml) zugesetzt. Am Ende der Kokultur wurden die Zellen durchflusszytometrisch anhand der Expression von V $\beta$ 5, CD4, CD25 und Foxp3 analysiert.

### **3.7. Tierexperimentelle Methoden**

#### **3.7.1. Adoptiver Transfer von naiven CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T-Zellen**

Als Spendertiere für die naive T-Zellen dienten OT-II Mäuse. Aus den Lymphknoten und der Milz der Spendertiere wurden Einzellzell suspensionen hergestellt und gezählt (s. 3.2.2). Anschließend wurden die naive CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T-Zellen mittels magnetischer Beads aufgereinigt (s. 3.4.1, 3.4.2). Um die Zellen nach einem Transfer in eine Empfängermaus *in vivo* wieder zu finden, wurden sie wie unter 3.5 beschrieben mit CFSE markiert. Danach wurden die Zellen gezählt und auf eine Zelldichte von  $2 \times 10^7$  Zellen/ml PBS eingestellt. Den Empfängertieren (WZ bzw. K5mOVA-Mäuse) wurden je  $6 \times 10^6$  Zellen in einem Volumen von 300 µl PBS intravenös injiziert.

#### **3.7.2. Adoptiver Transfer von regulatorischen CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen**

Als Spendertiere für die regulatorischen T-Zellen dienten WT Mäuse (C57Bl/6J). Aus den Lymphknoten und der Milz der Spendertiere wurden Einzellzell suspensionen wie unter 3.2.2 beschrieben hergestellt und gezählt. Anschließend wurden die CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen mittels magnetischer Zellseparation aufgereinigt (s. 3.4.1, 3.4.2). Zur Re-Identifikation und Analyse der Proliferation der Zellen nach einem Transfer in eine Empfängermaus, wurden die Zellen mit CFSE gefärbt (s. 3.5). Danach wurden die Zellen gezählt und auf eine Zelldichte von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml PBS eingestellt. Den Empfängermäusen wurden je  $3 \times 10^6$  Zellen in einem Volumen von 300 µl PBS intravenös injiziert.

#### **3.7.3. Generierung von Knochenmarkchimären**

Als Empfängertiere dienten K5mOVA-Mäuse. Diese wurden zweimal mit einer Dosis von 4,5 Gy in einem Abstand von 4 h bestrahlt. Nach weiteren 4 h erhielten die Empfängertiere je  $5 \times 10^6$  Knochenmarkszellen (3.2.1) von Spendertieren (MHC II<sup>-/-</sup> oder WT Mäuse), die intravenös injiziert wurden. Um mögliche Infektionen während der Rekonstitution des hämatopoetischen Systems zu vermeiden, wurde für mindestens 4 Wochen das Antibiotikum Neomycin (250 µg/ml) über das Trinkwasser verabreicht. Acht Wochen nach Bestrahlung wurde der Status der Rekonstitution in Ohrbiospien immunhistologisch untersucht (s. 3.8.2).

#### **3.7.4. FITC-Bepinselung von Mäusen**

Um FITC-transportierende migratorische DZ aus hautdrainierenden Lymphknoten zu isolieren, wurde eine epikutane FITC-Behandlung der Mäuse nach dem von Kaplan *et al.*



beschriebenen Protokoll [225] durchgeführt. FITC isomer I wurde in DMSO gelöst (Stockkonzentration = 0,5 mg/ml) und mit einem 1:1 Mix an Aceton/Dibutylphthalat auf eine finale FITC-Endkonzentration von 0,5% gebracht. Je 100 µl dieser 0,5% FITC-Lösung wurden im Anschluß auf die rasierte Bauchfläche von WT Mäusen epikutan aufgebracht. Nach 2 Tagen wurden die drainierenden inguinalen, axillaren und brachialen Lymphknoten isoliert, Einzelzellsuspensionen hergestellt (s. 3.2.3) und folgende DZ Subpopulationen mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung (s. 3.4.4) isoliert: FITC<sup>+</sup> CD40<sup>hi</sup> CD11c<sup>+</sup> DZ und FITC<sup>-</sup> CD40<sup>hi</sup> CD11c<sup>+</sup> DZ. Parallel wurden die Lymphknotenzellen von nicht behandelte WT Kontrollmäuse in gleicher Art und Weise aufgearbeitet, gefärbt und zur durchflusszytometrischen Sortierung von CD40<sup>low</sup> CD11c<sup>+</sup> DZ und CD40<sup>hi</sup> CD11c<sup>+</sup> DZ herangezogen.

### **3.7.5. Blutentnahme bei Mäusen**

Mit Hilfe einer Blut Lanzette (Solofix®, B.Braun) wurde den Mäusen ca. 50 µl Blut aus der Vena facialis im Unterkieferbereich entnommen und direkt in ein mit 10 µl Heparin-Natrium (25000 I.E./ 5ml, Ratiopharm) befülltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und gut vermischt. Das Blut konnte nun für FACS-Färbungen eingesetzt werden (s. 3.3.4).

### **3.7.6. Injektion von αIL-2 monoklonalem Antikörper in Mäuse**

Den Versuchstieren wurde vor Injektion des Antikörpers Blut entnommen (s. 3.7.5). Dieses wurde mit Antikörpern gegen CD4, Foxp3 und Ki67 gefärbt und mittels dem Durchflusszytometer analysiert (s. 3.3.4). Je Tier wurde 1 mg αIL-2 (Klon S4B6) in Form von 2 ml Überstand (s. 3.1.4) intraperitoneal injiziert. Die Kontrolltiere erhielten das vergleichbare Volumen RPMI-Medium. An Tag 2 erfolgte eine erneute Blutabnahme und durchflusszytometrische Analyse.

## **3.8. Immunhistologische Methoden**

### **3.8.1. Herstellung von Gewebeschnitten**

Im Rahmen der Arbeit wurden Schnitte von der Haut von Knochenmarkschimären und verschiedenen transgenen Tieren hergestellt. Hierfür wurde die Haut aus Ohrbiopsien bzw. Bauchhaut in Einbetttschälchen (Sakura, U.S.) mit TissueTek O.C.T. Compound (Sakura, U.S) überführt und auf Trockeneis eingefroren. Das gefrorene Gewebe wurde an einem Leica Kryostat in 9 µm dicke Schnitte geschnitten und auf SuperFrost<sup>®</sup> Plus Objektträgern (Thermo

Scientific) aufgenommen. Die Schnitte wurden bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  zwischengelagert.

### **3.8.2. Immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten**

Um MHC II in der Haut von Knochenmarkschimären (s. 3.7.3) und Kontrollmäusen zu detektieren, wurde eine immunhistologische Peroxidase-basierende Diamino-benzidin-Färbung (auch DAB-Färbung genannt) gegen MHC II mit einer Hämatoxylinfärbung kombiniert. Die hierfür verwendeten Hautschnitte wurden wie unter 3.8.1 beschrieben hergestellt und nach Zwischenlagerung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für 10 min bei RT aufgetaut. Nach dem Fixieren mit 4% PFA für 10 min wurden die Schnitte gewaschen und in eine feuchte Kammer überführt. Die Waschschritte erfolgten, wenn nicht anders angegeben, dreimal mit PBS für 5 min. Um eine unspezifische Antikörperbindung zu verhindern, wurde mit 10% BSA/PBS für 30 min bei RT geblockt. Nach erneutem Waschen erfolgte die Färbung mit den Primärantikörpern  $\alpha\text{MHC II}$  (Klon 2G9, 1:200) bzw. Rat IgG2a (1:200) in 1% BSA/PBS über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$ . Am Folgetag wurden die Schnitte gewaschen, einem Peroxidase-Block (4 ml Methanol + 0,6 ml 2M  $\text{NaN}_3$  + 2 ml 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) für 13 min bei RT unterzogen und wieder gewaschen. Anschließend erfolgte die Färbung mit dem biotinylierten Sekundärantikörper  $\alpha\text{Rat IgG}$  (1:200) in 1% BSA/PBS für 45 min bei RT. Während der Färbung wurde bereits der Streptavidin-AB-Komplex (je 1:100 in PBS, DAKO) angesetzt und für 15-20 min bei RT prä-inkubiert. Die Schnitte wurden gewaschen und mit dem AB-Komplex für 35 min bei RT inkubiert. Parallel wurde das DAB-Substrat vorbereitet ( $\frac{1}{2}$  DAB-Tablette in 5 ml PBS + 75  $\mu\text{l}$  3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , filtrieren). Nach erneutem Waschen wurden das DAB-Substrat auf die Schnitte gegeben und max. 5 min bis zur bräunlichen Verfärbung von Zellen auf den Schnitten belassen. Die Reaktion wurde durch zweimaliges Waschen mit  $\text{H}_2\text{O}$  gestoppt. Im Anschluß erfolgte die Färbung mit Hämatoxylin für 2 min bei RT. Danach wurden die Schnitte unter fließendem Wasser für 10 min gewaschen und anschließend einer Dehydratisierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe unterzogen (zweimal in 76% Ethanol für je 1 min, zweimal in 96% Ethanol für je 1 min, zweimal in 99% Ethanol für je 1 min, zweimal in Xylen für je 5 min). Die dehydratisierten Schnitte wurden mit Entellan (Merck) eingedeckelt und an einem Zeiss Mikroskop, Modell Axiovert 40 C, analysiert.

### **3.8.3. Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten**

Zur Detektion von MHC II<sup>+</sup>-Zellen in der Haut von Mäusen wurden Schnitte von Ohrbiosprien angefertigt (3.8.1) und nach dem Auftauen bei RT für 10 min mit 4% PFA

fixiert. Im Anschluss wurden die Schnitte viermal mit PBS gewaschen und in eine feuchte Kammer überführt. Zum Blocken wurde für 30 min bei RT mit 10% BSA/PBS inkubiert und nochmals gewaschen. Die Färbung mit dem Primärantikörpern  $\alpha$ MHC II (Klon 2G9, 1:200) bzw. Rat IgG2a (1:200) erfolgte in PBS über Nacht bei 4°C. Nach einem weiteren Waschschrift wurde mit dem Sekundärantikörper  $\alpha$ Rat IgG2a-AlexaFluor488 (1:300) für 30 min bei RT gefärbt. Schließlich wurden die Schnitte ein letztes Mal gewaschen, mit Fluoromount G (SouthernBiotech) eingedeckelt und nach kurzem Trocknen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (DM IRE220, Leica) untersucht.

#### **3.8.4. Herstellung und Immunfluoreszenzfärbung von *epidermal sheets***

Um die Verteilung von MHC II<sup>+</sup> LZ in der Epidermis transgener Mäuse analysieren zu können, wurden sogenannte *epidermal sheets* (Epidermisstücke) angefertigt. Hierzu wurden die Ohren mit einer Schere abgetrennt, 10 min in 70%-igen Ethanol inkubiert und 30 min unter der Sterilbank getrocknet. Ausgehend von der Schnittfläche wurde die dorsale von der ventralen Ohrhälfte mit Hilfe zweier Pinzetten voneinander getrennt. Die Ohrhälften wurden mit der Dermis nach unten auf eine 0,5 M Ammoniumthiocyanatlösung gelegt und für 25 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Ohrhälften auf PBS überführt und die Epidermis von der Dermis mittels zweier Pinzetten getrennt. Die Epidermis wurde in kleine Stücke geschnitten. Diese *epidermal sheets* wurden anschließend in Aceton für 20 min bei RT fixiert und jeweils zweimal für 15 min in PBS und in 1% BSA/PBS gewaschen. Zur Lagerung wurden die *epidermal sheets* vorsichtig auf einen Tropfen PBS in kleinen Alufolienstücken gelegt und nach Verschließen bei -20°C aufbewahrt. Die nachfolgenden Blockier-, Wasch- und Färbeschritte erfolgten in 96well-Platten mit Deckel. Zum Transferieren der *epidermal sheets* wurden Pinzetten verwendet, die zwischen den Transfers mit PBS gewaschen wurden. Bei allen Waschsritten wurde zweimal mit 1% BSA/PBS gewaschen. Die *epidermal sheets* wurden zunächst 10 min bei RT aufgetaut und zum Blocken für 30 min in 10% BSA/PBS inkubiert. Nach einem Waschschrift erfolgte die Färbung mit den Primärantikörpern  $\alpha$ MHC II (Klon 2G9, 1:200) bzw. Rat IgG2a (1:200) in je 100  $\mu$ l 1% BSA/PBS über Nacht bei 4°C. Am Folgetag wurde gewaschen und erneut für 30 min in 10% BSA/PBS geblockt. Nach einem weiteren Waschsritten wurde mit dem Sekundärantikörper  $\alpha$ Rat IgG2a-AlexaFluor488 (1:300) in je 100  $\mu$ l 1% BSA/PBS für 1 h bei 37°C gefärbt. Im Anschluß wurde erneut gewaschen und 30 min mit DAPI (Invitrogen, Endkonzentration 0,25 ng/ml) gefärbt. Nach einem letzten Waschschrift wurden die *epidermal sheets* auf Objektträger

überführt, glattgezogen, mit Fluoromount G eingedeckelt und nach kurzem Trocknen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (DM IRE220, Leica) analysiert.

### **3.8.5. Immunfluoreszenzfärbung von Zellen**

Zur Detektion der nukleären Translokation von Rel/NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren wurden verschiedene DZ Subpopulationen aus hautdrainierenden Lymphknoten von FITC-behandelten (s. 3.7.4) oder unbehandelten WT-Mäusen mittels Durchflusszytometer anhand der Expression von CD40, CD11c und FITC sortiert (3.4.4). Im Anschluß wurden bis zu 20000 Zellen mittels Zytopinzentrifugation auf mit Poly-L-Lysin-beschichteten SuperFrost<sup>®</sup> Plus Objektträgern (ThermoScientific) aufgebracht und über Nacht getrocknet. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten in einer feuchten Kammer bei RT. Für jeden Waschschrift wurde dreimal mit PBS für je 5 min inkubiert. Zunächst wurden die Zellen 20 min mit 4% PFA fixiert und gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellen wurde 0,2% Triton-X 100 für 5 min zugegeben. Nach einem weiteren Waschschrift wurden unspezifische Bindungen der Antikörper durch Zugabe von je 50  $\mu$ l Eselserum (1:20 in PBS, Invitrogen) für 20 min geblockt. Anschließend wurden die Zellen mit den in PBS verdünnten Primäantikörpern ( $\alpha$ -RelB,  $\alpha$ -Rela,  $\alpha$ -cRel, 2.3) für mindestens 45 min inkubiert und gewaschen. Es folgte eine Färbung mit dem Sekundäantikörper (Donkey  $\alpha$ -Rabbit-Cy3, 2.3) für mindestens 45 min. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Zellen mit DAPI-versetztem Fluoromount G eingedeckelt und nach kurzem Trocknen mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops (Leica TCS SP2) untersucht. Dabei wurde die nukleäre Expression der einzelnen Transkriptionsfaktoren mit der Software Leica LCS analysiert.

## **3.9. Molekularbiologische Methoden**

### **3.9.1. Genotypisierung von transgenen Mauslinien**

#### **3.9.1.1. Aufarbeitung von genomischer DNA aus Ohrbiopsien von Mäusen**

Die Gewebeproben von Mäusen wurden in je 200  $\mu$ l Homogenisierungspuffer (1x) aufgenommen und mit je 5  $\mu$ l Proteinase K (c = 20 mg/ml) versetzt. Der Verdau der Zellen erfolgte über Nacht bei 56°C in einem Thermoschüttler (Eppendorf). Im Anschluss wurde zur Hitzeinaktivierung der Proteinase K für 10 min bei 94°C inkubiert. Die genomische DNA lag nun freisetzt vor und konnte bis zur Genotypisierungs-PCR bei 4°C bzw. -20°C (für längere Aufbewahrung) gelagert werden.

### 3.9.1.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für den Nachweis der Transgene in den Mauslinien K5mOVA, CD11cCRE und RelB<sup>fl/fl</sup> wurden die nachfolgend aufgeführten PCRs gefahren. Die dazu verwendeten *Primer* sind unter 2.4 aufgelistet. Nach dem Pipettieren der PCR-Ansätze wurde diese in einen Thermocycler der Firma PeqLab (PeqStar 96 Universal Gradient) überführt und dem jeweiligen PCR-Programm unterzogen.

#### K5mOVA-PCR

PCR-Ansatz (20 µl):	12,9 µl	ddH <sub>2</sub> O
	1,6 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
	2 µl	Taq-Puffer (10x, mit (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )
	1 µl	MOVA3-Primer (20 µM)
	1 µl	MOVA4-Primer (20 µM)
	0,4 µl	dNTPs (10 mM)
	0,1 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)
	1 µl	DNA

PCR-Programm:	93°C	30 sek.	} 30 Zyklen
	55°C	30 sek.	
	72°C	45 sek.	
	72°C	7 min	
	4°C	∞	

In dieser PCR wird bei K5mOVA transgenen Tieren spezifisch ein PCR-Produkt mit einer Länge von 500 bp generiert. Bei WT-Tieren wird kein PCR-Produkt amplifiziert.

#### CD11cCRE-PCR

PCR-Ansatz (25 µl):	12,4 µl	ddH <sub>2</sub> O
	1,5 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
	2,5 µl	Taq-Puffer (10x, mit KCl)
	2 µl	CD11c-CRE Primer (10 µM)
	2 µl	Cre-ORF Primer (10 µM)
	0,5 µl	dNTPs (10 mM)
	0,1 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)
	4 µl	DNA

PCR-Programm:	93°C	30 sek.	} 35 Zyklen
	63°C	30 sek.	
	72°C	30 sek.	
	4°C	∞	

Während bei CD11cCRE transgenen Tieren ein PCR-Fragment mit 300 bp Länge amplifiziert wird, entsteht bei WT-Tieren kein PCR-Produkt.

### RelB<sup>fl/fl</sup>-PCR

PCR-Ansatz (20 µl):	9,4 µl	ddH <sub>2</sub> O
	3 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
	2 µl	Taq-Puffer (10x, mit (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )
	1 µl	RelB-GT1 Primer (10 µM)
	1 µl	SeqTVReB1 Primer (10 µM)
	1 µl	seqTVRelb8 Primer (10 µM)
	0,5 µl	dNTPs (10 mM)
	0,1 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)
	2 µl	DNA

PCR-Programm:	94°C	2 min	} 35 Zyklen
	94°C	45 sek.	
	56°C	45 sek.	
	72°C	45 sek.	
	4°C	∞	

Bei RelB<sup>fl/fl</sup> Tieren wird ein PCR-Fragment mit 270 bp Länge amplifiziert. Hingegen entsteht bei WT-Tieren ein PCR-Produkt mit 230 bp.

#### 3.9.1.3. Gelelektrophorese von DNA

Zur Auftrennung und Identifikation der PCR-Produkte wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierzu wurde ein Horizontal-Flachbettgel aus 2 % (w/v) Agarose in 0,5x TBE-Puffer hergestellt. Das Agarosegel wurde für eine spätere Analyse der PCR-Produkte unter UV-Licht mit Ethidiumbromid (Endkonz. 1:20.000) versetzt. Pro Gelspur wurden 10 µl PCR-Ansatz mit 2 µl 2x LoadingDye (MBI, Fermentas) aufgetragen. Als Längenstandard diente der GeneRuler 100bp DNA Ladder (MBI, Fermentas). Die Elektrophorese erfolgte in einer Gelkammer (Eigenbau der Hauswerkstatt) bei einer Spannung von 90V mit 0,5x TBE als Laufpuffer.

### **3.9.2. Relative Quantifizierung der mRNA Expression**

Um Kontaminationen mit RNAsen zu vermeiden, wurden während der Arbeit mit RNA verschiedene Vorkehrungen getroffen: Grundsätzlich wurde immer mit RNase-freien Filtertips und Reaktionsgefäßen gearbeitet. Es wurden ständig Handschuhe getragen und alle verwendeten Lösungen und Puffer wurden mit DEPC-H<sub>2</sub>O (2.2) hergestellt.

#### **3.9.2.1. Isolierung von RNA**

Um Gesamt-RNA aus lymphatischen Organen zu isolieren, wurden die axialen Lymphknoten oder ca 1/6 der Milz mittels eines Glas-Homogenisators in je 1 ml Trizol (Invitrogen) homogenisiert. Die Homogenisate wurde anschließend entsprechend den Angaben des Herstellers zur RNA-Isolierung aufgearbeitet. Die gewonnene RNA wurde in je 20 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen und nach photometrischer Konzentrationsbestimmung (3.9.2.2) zur Qualitätskontrolle einer Gelelektrophorese unterzogen (3.9.2.3). Anschließend wurde die RNA direkt für den DNase I-Verdau eingesetzt (3.9.2.4) oder bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### **3.9.2.2. Bestimmung der RNA-Konzentration**

Die Konzentration- und Reinheitsbestimmung der gewonnenen RNA erfolgte mit Hilfe des NanoDrop® ND-1000-Spektrophotometer (Peqlab) bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm.

#### **3.9.2.3. Gelelektrophorese von RNA**

Für die Überprüfung der RNA-Qualität wurde ein Horizontal-Flachbettgel aus 1% (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer (mit DEPC-H<sub>2</sub>O) hergestellt. Das Gel wurde zur späteren RNA-Analyse zusätzlich noch mit Ethidiumbromid (Endkonz. 1:20.000) versetzt. Pro Gelspur wurden 3 µg RNA mit 2x LoadingDye (MBI, Fermentas) aufgetragen. Die Auftrennung der RNA erfolgte in einer Gelkammer (Eigenbau der Hauswerkstatt) bei einer Spannung von 80V mit 1x TAE als Laufpuffer. Nach etwa 1 h wurden die RNA-Banden unter UV-Licht analysiert. Als qualitativ hochwertige RNA wurde erachtet, wenn auf dem Gel zwei Banden der ribosomalen RNA (rRNA) zu erkennen waren: die 28S rRNA mit 4,7 kb und die 18S rRNA mit 1,9 kb, wobei die 28S rRNA wesentlich stärker vertreten sein sollte.

### 3.9.2.4. DNase I-Behandlung von RNA

Zur Entfernung eventuell noch vorhandener genomischer DNA wurden die isolierte RNA einem DNase I-Verdau unterzogen. Hierzu wurden die DNase I von MBI Fermentas entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

### 3.9.2.5. cDNA-Synthese

Als Ausgangsmenge wurde stets 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die cDNA-Synthese erfolgte mittels Bioscript Kit (Bioline) unter Verwendung von Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primern (MBI Fermentas) gemäß den Angaben des Herstellers. Je 20 µl-Ansatz wurden 100 Units Reverse Transkriptase verwendet.

### 3.9.2.6. Quantitative *Real-time* PCR (qRT-PCR)

Für die qRT-PCR wurde zunächst ein Mastermix ausreichend für alle PCR-Ansätze hergestellt. Je PCR-Reaktion wurde ein 25 µl-Ansatz zusammenpipettiert:

12,5 µl	Maxima <sup>®</sup> SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2x, MBI Fermentas)
11 µl	ddH <sub>2</sub> O
0,25 µl	Reverse-Primer (10 µM)
0,25 µl	Forward-Primer (10 µM)
1 µl	cDNA (1:10 verdünnt)

Die eingesetzten Primer sind unter 2.4 aufgelistet. Die Messungen erfolgten stets in Duplikaten und wurden nach dem folgenden PCR-Protokol im Thermocycler iCycler (BioRad) durchgeführt:

Initiale Denaturierung	95°C	14 min		
Denaturierung	95°C	30 sek	}	40 Zyklen
Hybridisierung	60°C	30 sek		
Elongation	72°C	30 sek		
Denaturierung	95°C	1 min		
	55 °C	1 min		
Schmelzkurven	55 - 95°C	aller 10 sek Anstieg um 0,5°C		45 Zyklen
Lagerung	15°C	∞		

Um die relative Expression des Zielgens zu bestimmen, wurde die komparative CT-Methode ( $\Delta\Delta CT$ ) angewandt [226]. Die hierzu benötigten CT-Werte (*Threshold Cycle*) wurden von der



iCycler iQ *Real Time Detection System Software* (BioRad) während der exponentiellen Phase der qRT-PCR ermittelt.

Zur Berechnung der relativen Expression des Zielgens wurde dessen Expression zunächst mit der Expression eines Referenzgens, das möglichst ubiquitär und gleichmäßig exprimiert wird, normalisiert. Als Referenzgen wurde  $\beta$ -Actin gewählt.

$$\Delta CT = CT_{\text{Zielgen}} - CT_{\text{Referenzgen}}$$

Diese Normalisierung wurde für die CT-Werte der RelB<sup>DCko</sup>-Maus und der Kontrollmaus vorgenommen. Anschließend wurden die  $\Delta CT$ -Werte der Kontrollmaus von denen der RelB<sup>DCko</sup>-Maus abgezogen. Der  $\Delta CT$ -Werte der Kontrollmaus dient hierbei als Kalibrator (Bezugsgröße).

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{RelBDCko-Maus}} - \Delta CT_{\text{Kontrollmaus}}$$

Der relative Unterschied in der Expression des Zielgens zwischen der RelB<sup>DCko</sup>-Maus und der Kontrollmaus wurde letztlich wie folgt ermittelt:

$$\text{mRNA Expression des Zielgens relativ zur Kontrollmaus} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

### 3.10. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 5.0. Die für die Berechnung der Signifikanzwerte angewandten Tests sind an entsprechender Stelle in der Abbildungsbezeichnung angegeben. Als signifikant galt, wenn  $p < 0,05$  war.

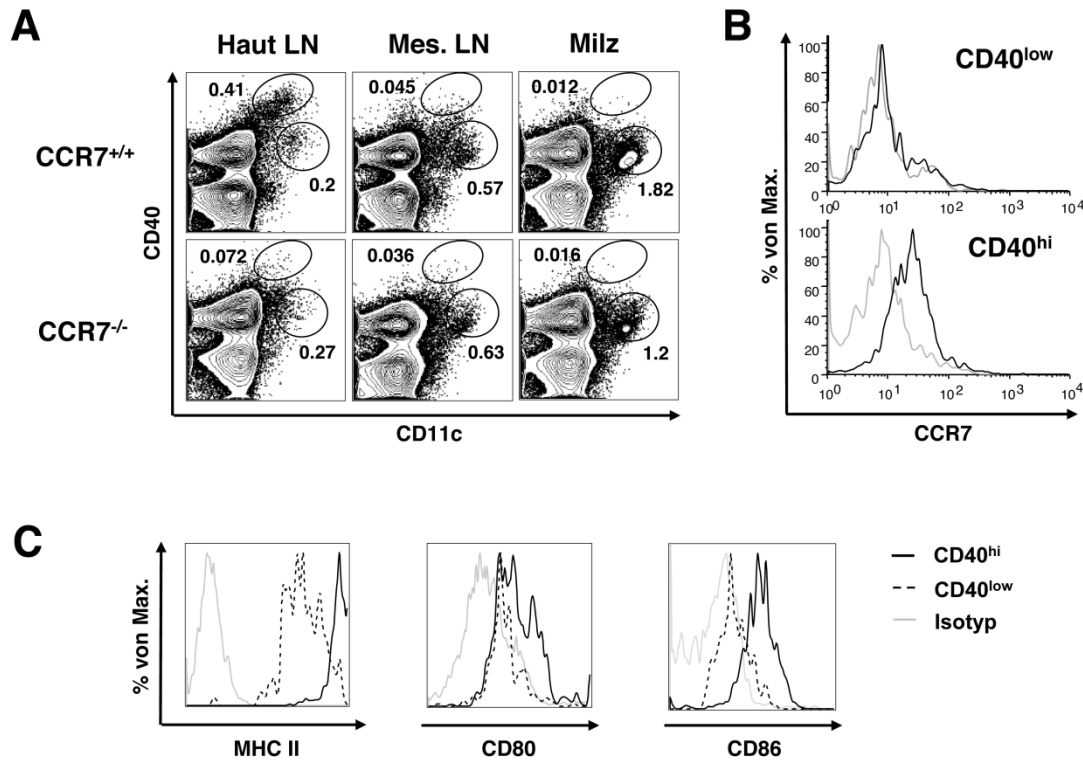
## 4. ERGEBNISSE

### 4.1. Analyse des tolerogenen Potentials von ssmDZ in hautdrainierenden Lymphknoten

#### 4.1.1. Phänotypische Charakterisierung von ssmDZ und residenten DZ in hautdrainierenden Lymphknoten

Zur Untersuchung der residenten und migratorischen DZ wurden verschiedene lymphatische Organe von WT Mäusen zunächst durchflusszytometrisch anhand der Expression von CD11c und CD40 analysiert. In Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen [63] konnten CD11c<sup>+</sup> DZ, die den Reifungsmarker CD40 in größeren Mengen auf ihrer Oberfläche exprimieren (CD40<sup>hi</sup>), nur in hautdrainierenden Lymphknoten, jedoch nicht in den mesenterischen Lymphknoten und der Milz gefunden werden. Demgegenüber wurden CD11c<sup>+</sup> DZ, die wenig CD40 exprimieren (CD40<sup>low</sup>), in allen untersuchten lymphatischen Organen nachgewiesen (Abb. 5A, obere Reihe). Um zu überprüfen, ob es sich bei den CD40<sup>hi</sup> DZ um ssmDZ aus der Haut handelt, wurden Mäuse mit einer Defizienz für CCR7 (CCR7<sup>-/-</sup>) in gleicher Art und Weise untersucht. Von diesen Mäusen ist bekannt, dass sie unter homöostatischen Bedingungen keine migratorischen DZ in hautdrainierenden Lymphknoten aufweisen [76]. Wie in der unteren Reihe von Abb. 5A zu sehen ist, konnten in CCR7<sup>-/-</sup> Mäusen keine CD40<sup>hi</sup> DZ in den hautdrainierenden Lymphknoten gefunden werden. Damit einhergehend exprimieren nur CD40<sup>hi</sup> DZ, nicht aber CD40<sup>low</sup> DZ, CCR7 auf ihrer Oberfläche (Abb. 5B). Somit handelt es sich bei den CD40<sup>hi</sup> DZ um ssmDZ und bei den CD40<sup>low</sup> DZ um im Lymphknoten residente DZ.

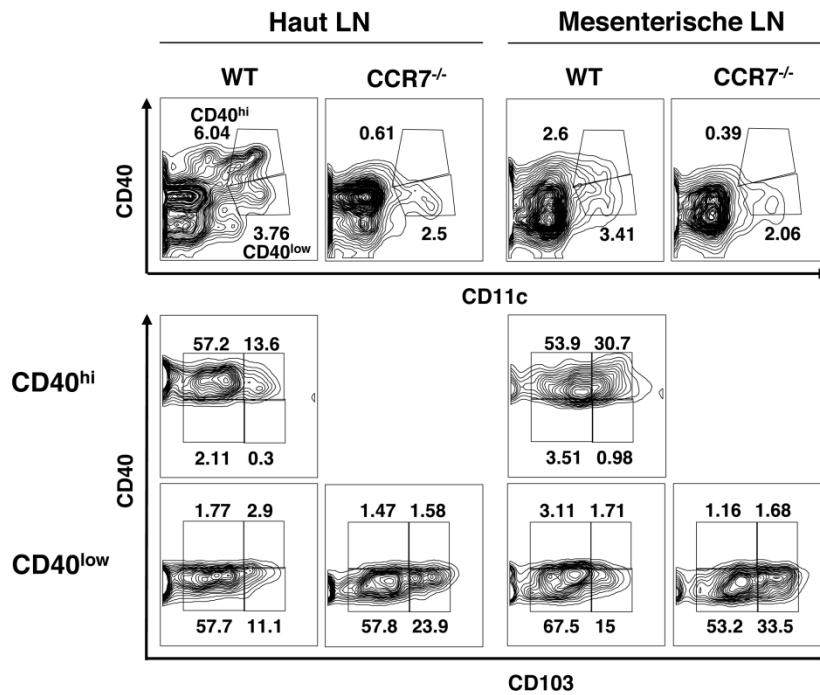
Weitere durchflusszytometrische Analysen ergaben, dass in hautdrainierenden Lymphknoten die migratorischen CD40<sup>hi</sup> DZ gegenüber den residenten CD40<sup>low</sup> DZ mehr MHC II, CD80 und CD86 auf ihrer Oberfläche exprimieren (Abb. 5C) und damit phänotypisch reifer sind. Allerdings wiesen die migratorischen CD40<sup>hi</sup> DZ im Vergleich zu vollreifen DZ nur eine intermediäre Expression von Oberflächen-Reifungsmarkern auf und zeigten ähnlich wie residente DZ keine Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (Daten von H. Azukizawa). Infolge dessen wurden residente CD40<sup>low</sup> DZ als unreife DZ definiert und CD40<sup>hi</sup> ssmDZ als semireife DZ.



**Abb. 5: Hautdrainierende Lymphknoten enthalten unreife residente und semireife ssmDZ.** (A) Zellen von den hautdrainierenden Lymphknoten (Haut LN: inguinal, brachial, axillar), mesenterischen Lymphknoten (Mes. LN) und der Milz von WT (CCR7<sup>+/+</sup>) und CCR7<sup>-/-</sup> Mäusen wurden durchflusszytometrisch für die Expression von CD11c und CD40 analysiert. CD11c<sup>+</sup> CD40<sup>low</sup> Zellen definieren residente DZ, CD11c<sup>+</sup> CD40<sup>hi</sup> DZ entsprechen ssmDZ. Die Zahlen geben die Frequenz der Zellen innerhalb der Eingrenzungen an. (B) Expression von CCR7 auf residenten CD40<sup>low</sup> und migratorischen CD40<sup>hi</sup> DZ in hautdrainierenden Lymphknoten von WT Mäusen. Schwarze Linien zeigen die CCR7-Färbung auf DZ, graue Linien die der Isotypkontrolle. (C) Expression von MHC II, CD80 und CD86 auf residenten CD40<sup>low</sup> DZ (gestrichelte Linien) und migratorischen CD40<sup>hi</sup> DZ (schwarze Linien) in hautdrainierenden Lymphknoten von WT-Mäusen. Graue Linien zeigen die Isotypkontrolle. (A-C) Mindestens drei Experimente mit ähnlichen Ergebnissen wurden durchgeführt.

#### 4.1.2. Analyse der Expression von CD103 auf ssmDZ und residenten DZ

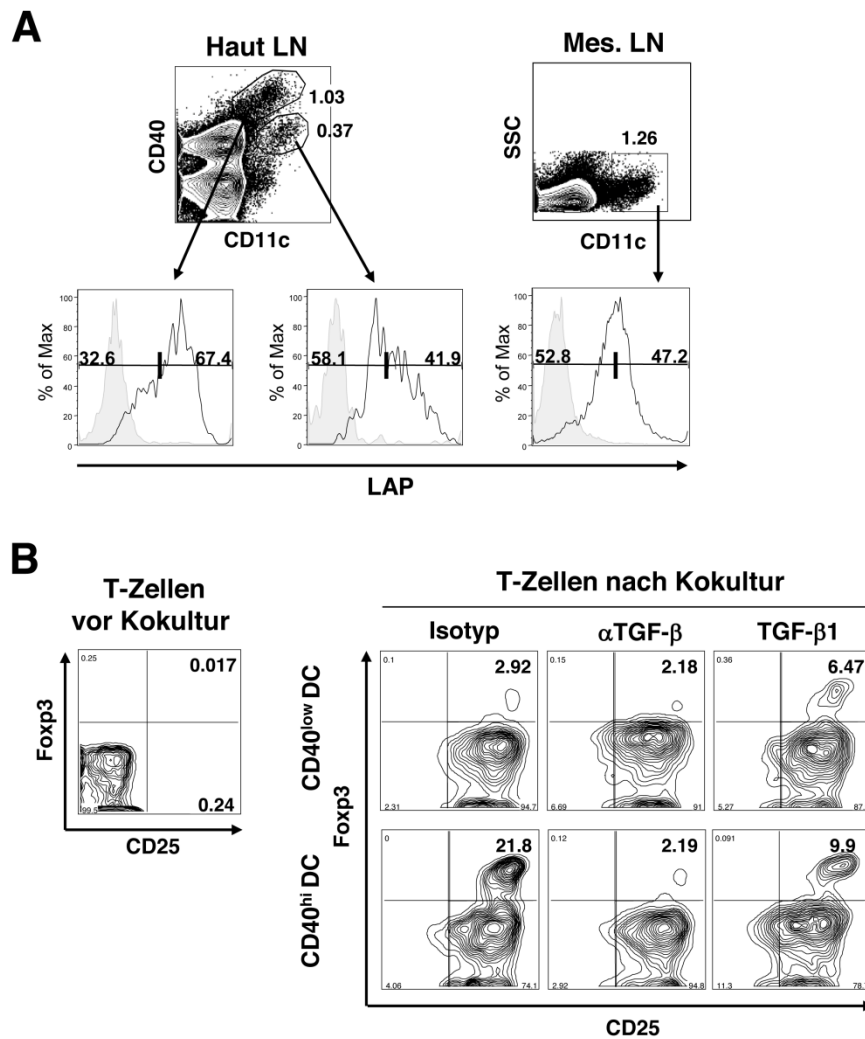
DZ in der LP und in den mesenterischen Lymphknoten, die das  $\alpha_E$ -Integrin CD103 exprimieren, können Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> *in vitro* induzieren [146, 147]. Um zu überprüfen, ob CD103 auch ein Marker für ssmDZ ist, wurde eine durchflusszytometrische Analyse der hautdrainierenden Lymphknoten und mesenterischen Lymphknoten von WT als auch von CCR7<sup>-/-</sup> Mäusen durchgeführt. Wie in Abbildung 6 zu sehen ist, wird CD103 sowohl von migratorischen CD40<sup>hi</sup> als auch residenten CD40<sup>low</sup> DZ zu etwa gleichen Teilen exprimiert. Somit konnte CD103 keiner der beiden DZ Subpopulationen zugeordnet werden.



**Abb. 6: Durchflusszytometrische Analyse der CD103 Expression auf residenten und migratorischen DZ in hautdrainierenden und mesenterischen Lymphknoten von WT und CCR7<sup>-/-</sup> Mäusen.** Die obere Reihe zeigt repräsentative Kontur-Diagramme für die Färbung von CD11c und CD40. In der mittleren Reihe wird die CD103 Expression auf migratorischen CD40<sup>hi</sup> DZ gezeigt, während in der unteren Reihe die CD103 Expression auf residenten CD40<sup>low</sup> DZ dargestellt ist. Die Zahlen geben die Frequenz der Zellen innerhalb der Eingrenzungen an. Tote Zellen und Lymphozyten wurden von der Analyse durch die Eingrenzung großer Zellen innerhalb des FSC/SSC ausgeschlossen. Mindestens zwei Experimente mit ähnlichen Ergebnissen wurden durchgeführt.

#### 4.1.3. SsmDZ induzieren Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> *in vitro* mittels endogenem TGF-β

Migratorische DZ aus mesenterischen Lymphknoten induzieren Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> *in vitro* unter Verwendung von endogenem TGF-β [146]. Im Folgenden sollte daher untersucht werden, ob ssmDZ aus hautdrainierenden Lymphknoten ebenfalls TGF-β zur Konversion von Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> nutzen. Hierzu wurde zunächst mittels durchflusszytometrischer Analyse überprüft, inwiefern auf der Oberfläche von ssmDZ TGF-β in Assoziation mit dem Membran-gebundenen *latency-associated peptide* (LAP) vorliegt. Diese TGF-β/LAP-Komplexe sind für die Induktion bzw. Erhaltung von T<sub>regs</sub> durch humane DZ essentiell [227]. Wie aus Abbildung 7A hervorgeht, ist die höchste Expression an LAP auf migratorischen CD40<sup>hi</sup> DZ in hautdrainierenden Lymphknoten zu finden, wohingegen residente CD40<sup>low</sup> DZ LAP in geringeren Mengen exprimieren. DZ in mesenterischen Lymphknoten zeigen eine intermediäre Expression von LAP (Abb. 7A).



**Abb. 7: SsmDZ aus hautdrainierenden Lymphknoten exprimieren auf ihrer Oberfläche TGF- $\beta$  in Form von LAP und induzieren T<sub>regs</sub> mit Hilfe von endogenem TGF- $\beta$  *ex vivo*. (A) Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächen-LAP-Expression auf CD11c<sup>+</sup> CD40<sup>low</sup> residenten und CD11c<sup>+</sup> CD40<sup>hi</sup> migratorischen DZ in hautdrainierenden Lymphknoten und auf CD11c<sup>+</sup> DZ in mesenterischen Lymphknoten. Die Zahlen geben die Frequenz der Zellen innerhalb der Eingrenzungen an. Zahlen innerhalb der Histogramme stehen für den Prozentsatz LAP<sup>+</sup> bzw. LAP<sup>-</sup> DZ innerhalb der jeweiligen DZ Population. Grau gefüllte Histogramme zeigen die Isotypkontrolle. (B) FACS-sortierte residente CD40<sup>low</sup> und migratorische CD40<sup>hi</sup> DZ aus hautdrainierenden Lymphknoten von WT Mäusen wurden mit CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> OT-II T-Zellen in Anwesenheit von OVA-Peptid kultiviert.  $\alpha$ TGF- $\beta$  Antikörper, Kontrollantikörper oder rekombinantes TGF- $\beta$  wurde, wenn angegeben, zugesetzt. Die Induktion von CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> wurde nach 5 Tagen mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Zahlen innerhalb der Quadranten stehen für die Frequenz der jeweiligen Population in Bezug auf CD4<sup>+</sup> V $\beta$ 5<sup>+</sup> OT-II T-Zellen. (A,B) Mindestens zwei Experimente mit ähnlichen Ergebnissen wurden durchgeführt.**

Um herauszufinden, ob eine Korrelation zwischen dem LAP-Expressionslevel der DZ und deren Fähigkeit, Foxp<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> zu induzieren, besteht, wurde ein *in vitro* T<sub>reg</sub>-Konversionsassay (s. 3.6) durchgeführt. Hierfür wurden CD40<sup>hi</sup> und CD40<sup>low</sup> DZ aus hautdrainierenden Lymphknoten isoliert und in Anwesenheit von Ovalbumin (OVA)<sub>323-339</sub>-Peptid mit naiven CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T-Zellen von OT-II Mäusen kokultiviert. T-Zellen von OT-II Mäusen exprimieren einen transgenen V $\alpha$ 2/V $\beta$ 5-TZR, der das OVA-Peptid in Verbindung mit

MHC II (H-2<sup>b</sup>) erkennt [221]. Nach 5 Tagen erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse der OT-II T-Zellen anhand der Expression von CD4, V $\beta$ 5, CD25 und Foxp3.

In allen Ansätzen konnte eine Hochregulation der CD25 Expression auf den T-Zellen beobachtet werden, allerdings waren nur die migratorischen CD40<sup>hi</sup> DZ in der Lage, CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> zu generieren. Residente CD40<sup>low</sup> DZ konnten einzig unter Zugabe von exogenem TGF- $\beta$  Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> induzieren (Abb. 7B). DZ aus mesenterischen Lymphknoten zeigten eine den migratorischen DZ ähnliche Konversion (Daten nicht gezeigt), wie bereits publizierte Daten belegen [146]. Die Zugabe von  $\alpha$ TGF- $\beta$  Antikörpern inhibierte die Generierung von T<sub>regs</sub> durch migratorische CD40<sup>hi</sup> DZ, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Konversion durch residente CD40<sup>low</sup> DZ (Abb. 7B). Interessanterweise führte eine Zugabe von rekombinanten TGF- $\beta$  bei migratorischen CD40<sup>hi</sup> DZ nicht, wie erwartet, zu einer weiteren Zunahme der konvertierten T<sub>regs</sub> (Abb. 7B).

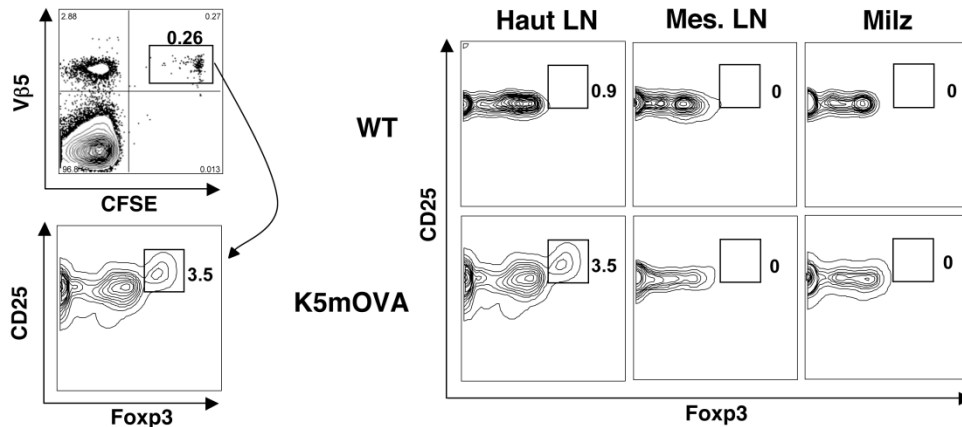
Es konnte somit gezeigt werden, dass ssmDZ im Gegensatz zu residenten DZ die Fähigkeit besitzen, Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> *in vitro* mit Hilfe von endogenem TGF- $\beta$ /LAP zu induzieren.

#### **4.1.4. SsmDZ induzieren Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> *in vivo***

Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe und von Kooperationspartnern zeigten, dass nur migratorische DZ, nicht aber residente DZ, in der Lage sind, geringe Mengen an epidermalen Selbstantigenen von der Haut zu den drainierenden Lymphknoten zu transportieren und diese effektiv an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu (kreuz-) präsentieren ([228], Daten von H. Azukizawa). Für diese Studien wurden transgene K5mOVA Mäuse verwendet. Diese Mäuse exprimieren eine membrangebundene Form des Neo-Selbstantigens OVA (mOVA) unter dem Keratin-5 Promotor, so dass das OVA-Protein in epidermalen Keratinozyten zu finden ist. Daneben konnte eine Expression des Neo-Selbstantigens noch im Thymus und Ösophagus, nicht aber in anderen Organen der K5mOVA Mäuse nachgewiesen werden [219].

Um zu überprüfen, ob ssmDZ auch *in vivo* CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> gegen zellassoziierte Selbstantigene induzieren können, wurden OVA-spezifische naive CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> OT-II T-Zellen intravenös in K5mOVA Mäuse und WT Kontrollmäuse injiziert. Zusätzlich wurden die Zellen vor dem Transfer mit CFSE gefärbt, um eine spätere Re-Identifikation zu ermöglichen. Nach 12 Tagen wurden die injizierten T-Zellen anhand der Markierung mit CFSE und der Expression von CD25 und Foxp3 durchflusszytometrisch analysiert. Darüber hinaus wurde zur restriktiven Analyse der transgenen OT-II T-Zellen die Expression der TZR-Kette V $\beta$ 5 auf den CD4<sup>+</sup> T-Zellen untersucht. Die dazugehörige Auswertestrategie ist in Abbildung 8 links dargestellt. In den hautdrainierenden Lymphknoten von K5mOVA

Mäusen, aber nicht in denen von WT Mäusen, konnten  $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+ OT-II T_{regs}$  detektiert werden. Diese  $T_{regs}$  sind jedoch nicht in den mesenterischen Lymphknoten und der Milz von K5mOVA und WT Mäusen zu finden (Abb. 8, rechts).



**Abb. 8: Adoptiv transferierte naive  $CD4^+ CD25^- OT-2$  T-Zellen konvertieren zu  $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+ T_{regs}$  in K5mOVA Mäusen.**  $6 \times 10^6$  CFSE-markierte  $CD4^+ CD25^- OT-2$  T-Zellen wurden intravenös in WT und K5mOVA Mäuse injiziert. Nach 12 Tage wurden die adoptiv transferierten Zellen in Lymphknoten und Milz der Mäuse durchflusszytometrisch für die Expression von CD25 und Foxp3 innerhalb der  $CFSE^+ CD4^+ V\beta5^+$  T-Zellen untersucht. Die hierzu verwendete Strategie zur Eingrenzung der Zellen ist links aufgeführt. Die Zahlen geben die Frequenz der Zellen innerhalb der Eingrenzungen an. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von drei Experimenten mit ähnlichen Resultaten.

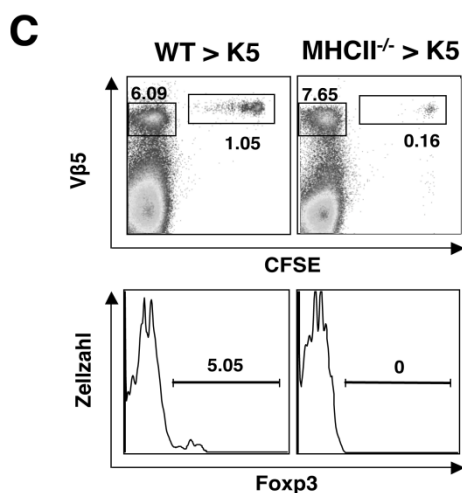
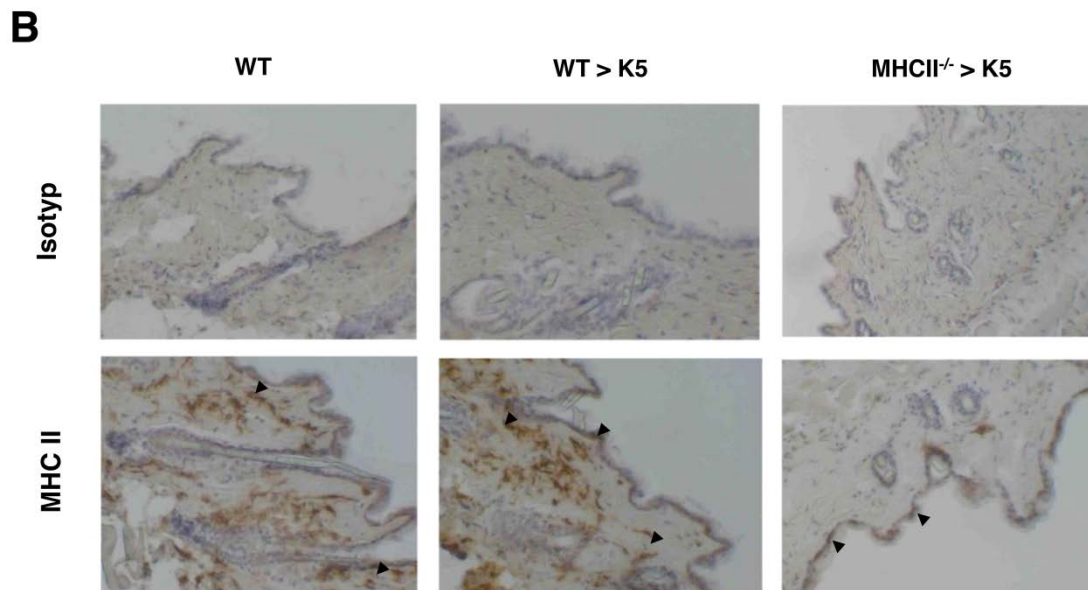
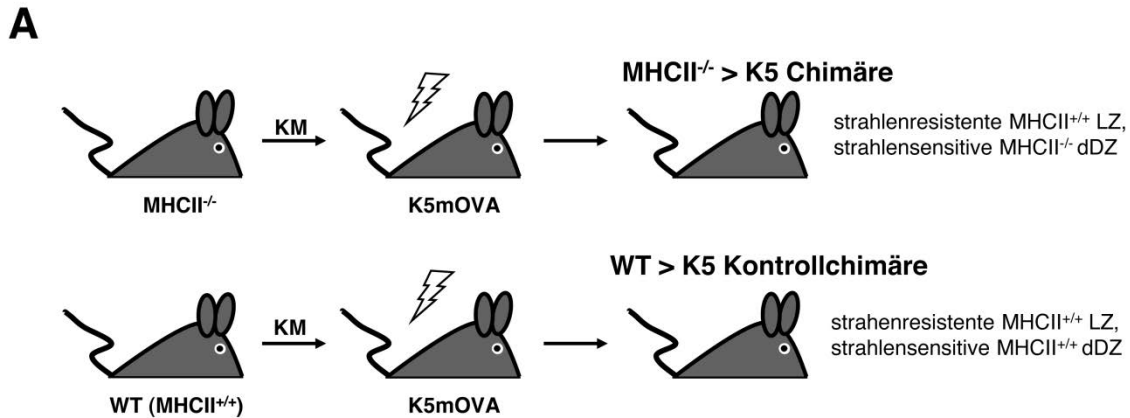
Die Ergebnisse aus Abbildung 8 deuten darauf hin, dass ssmDZ zellassozierte Selbstantigene aus der Haut aufnehmen, in die drainierenden Lymphknoten transportieren und dort naiven T-Zellen zur Induktion von  $T_{regs}$  präsentieren. Dass diese Konversion tatsächlich durch ssmDZ erfolgt, konnte anhand eines adoptiven Transfers von naiven OT-II T-Zellen in CCR7-defiziente K5mOVA Mäuse gezeigt werden. Hier fehlen neben den migratorischen  $CD40^{hi}$  DZ in den hautdrainierenden Lymphknoten (Daten nicht gezeigt, vgl. Abb. 5A) auch induzierte  $Foxp3^+ T_{regs}$  (Daten von H. Azukizawa).

#### 4.1.5. Migratorische Langerin<sup>+</sup> dermale DZ induzieren $Foxp3^+ T_{regs}$ *in vivo*

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, gibt es drei verschiedene migratorische DZ Subpopulationen in der Haut: epidermale Langerin<sup>+</sup> LZ sowie Langerin<sup>+</sup> und Langerin<sup>-</sup> dDZ [73-75]. All diese DZ sind potenziell in der Lage, zellassozierte Antigene wie das OVA in den Keratinozyten von K5mOVA Mäusen aus der Haut in die drainierenden Lymphknoten zu transportieren und zu präsentieren. In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits anhand des K5mOVA-Mausmodells gezeigt werden, dass eine Depletion aller Langerin<sup>+</sup> DZ zu einem Verlust der  $T_{reg}$  Induktion führt (Daten von H. Azukizawa). Allerdings blieb weiterhin unklar,

ob nun Langerin<sup>+</sup> dDZ oder LZ für die Konversion von T<sub>regs</sub> verantwortlich waren. Daher sollten Experimente mit Knochenmarkchimären durchgeführt werden. Hierfür wurden K5mOVA Mäuse zur Zerstörung ihres hämatopoetischen Systems radioaktiv bestrahlt und mit MHC II<sup>-/-</sup> Knochenmarkszellen rekonstituiert (MHC II<sup>-/-</sup> > K5 Chimäre). Als Kontrolltiere dienten K5mOVA Mäuse, denen ausschließlich Knochenmarkszellen aus WT Mäusen injiziert wurden (WT > K5 Chimäre). Aufgrund der Tatsache, dass LZ im Gegensatz zu dDZ strahlenresistent sind, wurde erwartet, dass in den Knochenmarkchimären das epidermale OVA in Kombination mit MHC II entweder nur auf LZ (MHC II<sup>-/-</sup> > K5) oder auf LZ und dDZ (WT > K5) präsentiert werden kann (Abb. 9A). Zur Überprüfung des Status der Rekonstitution wurde acht Wochen nach dem Zelltransfer eine MHC II-Färbung von Ohrhautschnitten durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass in der Haut von MHC II<sup>-/-</sup> > K5 Chimären noch MHC II<sup>+/+</sup> LZ in der Epidermis detektiert werden konnten, während die dermalen DZ Populationen MHC II<sup>-/-</sup> waren. Haut von WT Mäusen und den WT > K5 Kontrollchimären wies hingegen sowohl MHC II<sup>+/+</sup> LZ als auch MHC II<sup>+/+</sup> dDZ auf (Abb. 9B).





**Abb. 9: Migratorische dermale DZ induzieren T<sub>regs</sub> *in vivo*.** (A) Schematische Darstellung der Generierung von MHC II<sup>-/-</sup> > K5 Chimären und WT > K5 Kontrollchimären. K5mOVA Mäuse wurden zweimal im Abstand von 4 h mit 4,5 Gy radioaktiv bestrahlt und mit 5 × 10<sup>6</sup> Knochenmark (KM) - Zellen von WT oder MHC II<sup>-/-</sup> Mäusen rekonstituiert (WT > K5; MHC II<sup>-/-</sup> > K5). (B) Hämatoxylin- und MHC II-Färbung von Haut der Knochenmarkschimäre und WT Kontrollmäuse. Acht Wochen nach Bestrahlung wurde den Mäusen Ohrhaut entnommen, Gefrierschnitte hergestellt und eine Hämatoxylin- sowie MHC II-Färbung durchgeführt. Die Pfeile verdeutlichen die Position MHC II<sup>+</sup> Zellen in der Epidermis und Dermis. (C) Ebenfalls acht Wochen nach Bestrahlung wurden 6 × 10<sup>6</sup> CFSE-markierte CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> OT-II T-Zellen intravenös transferiert. Nach weiteren 13 Tagen wurden die transferierten Zellen in den hautdrainierenden Lymphknoten durchflusszytometrisch reanalysiert. Hierzu wurde

die Foxp3 Expression innerhalb der CFSE<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Vβ5<sup>+</sup> T-Zellen ermittelt. Die Zahlen geben die Frequenz der Zellen innerhalb der Eingrenzungen an. (B, C) Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von zwei Experimenten mit ähnlichen Resultaten.

Da die Rekonstitution der Knochenmarkchimäre erfolgreich verlief, sollte im nächsten Schritt überprüft werden, inwiefern die noch vorhandenen Haut-DZ an der Induktion von  $T_{\text{regs}}$  beteiligt sind. Hierzu wurden in die Knochenmarkchimäre CFSE-markierte  $CD4^+ CD25^-$  OT-II T-Zellen intravenös injiziert. Die CFSE-Färbung diente in diesem Fall sowohl der Re-Identifizierung als auch der Analyse der Proliferation der injizierten Zellen. Nach 12 Tagen wurden die transferierten Zellen anhand der Markierung von CFSE und der Expression von CD4, CD25 und Foxp3 reanalysiert. Es zeigte sich, dass nur die WT > K5 Kontrollchimäre, nicht aber die MHC II<sup>-/-</sup> > K5 Chimäre, in der Lage waren, eine Proliferation der injizierten OT-II T-Zellen zu induzieren und Foxp3<sup>+</sup>  $T_{\text{regs}}$  zu generieren (Abb. 9C).

Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse und die oben erwähnten Daten zur Depletion von Langerin<sup>+</sup> DZ darauf hin, dass migratorische Langerin<sup>+</sup> dDZ essentiell sind für die *in vivo* Induktion von Foxp3<sup>+</sup>  $T_{\text{regs}}$  in hautdrainierenden Lymphknoten. Die Resultate stehen im Einklang mit Daten, die zeigten, dass Langerin<sup>+</sup> dDZ in K5mOVA Mäusen die einzige hautmigrierende DZ Population darstellen, die OVA an OVA-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen kreuzpräsentieren kann [229, 230].

## **4.2. Analyse der Rolle von RelB für die Reifung und Migration von ssmDZ**

Wie unter 4.1.1 gezeigt, sind ssmDZ in den hautdrainierenden Lymphknoten durch einen semireifen Status gekennzeichnet. Dieser Status grenzt diese Zellen von unreifen residenten DZ sowie vollreifen DZ ab. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher die Frage geklärt werden, welche intrazellulären Signalmoleküle für die partielle Reifung und letztlich Migration der ssmDZ verantwortlich sind.

Bekannt ist, dass die Differenzierung und Reifung von DZ stark mit der Aktivierung von NF- $\kappa$ B verknüpft ist (Übersicht in [173, 195]). Ein wichtiges NF- $\kappa$ B-Protein ist dabei RelB, dessen nukleäre Translokation mit der Reifung der DZ korreliert [193, 206]. Allerdings liegt RelB bereits unter homöostatischen Bedingungen konstitutiv aktiv im lymphatischen Gewebe vor [198, 231] und kann dort spezifisch DZ zugeordnet werden [197, 198]. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass RelB bei der partiellen Reifung und Migration von ssmDZ wichtig ist.

### **4.2.1. SsmDZ zeigen eine nukleäre Translokation von RelB**

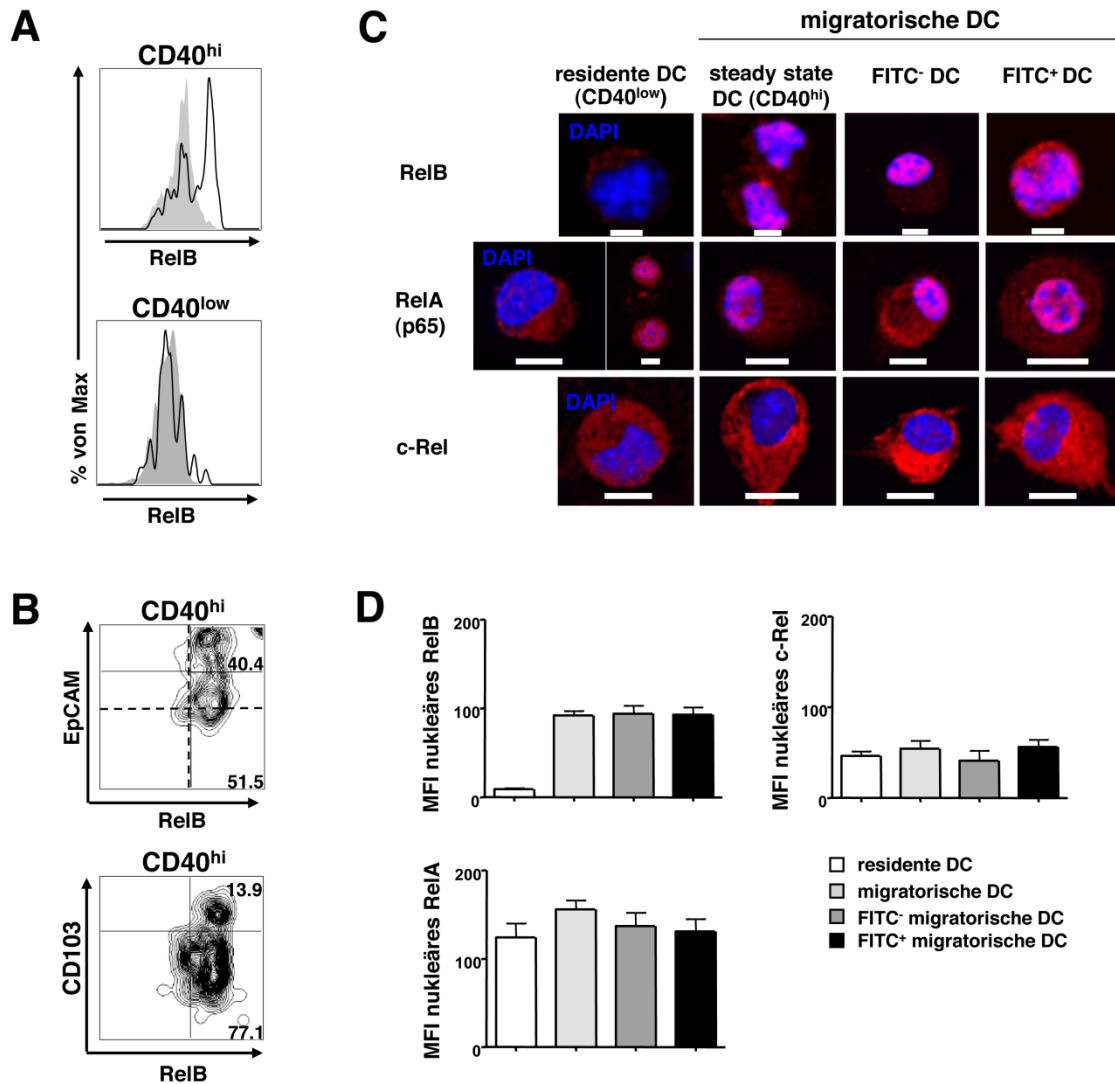
Um zu überprüfen, ob RelB eine Rolle in der partiellen Reifung von ssmDZ spielt, sollte zunächst die Expression von RelB durchflusszytometrisch in den DZ Subpopulationen der

hautdrainierenden Lymphknoten untersucht werden. Wie aus Abbildung 10A ersichtlich ist, konnte RelB nur in migratorischen CD40<sup>hi</sup> DZ, jedoch nicht in residenten CD40<sup>low</sup> DZ detektiert werden. Darüber hinaus konnte die Expression von RelB nicht auf eine bestimmte Haut-DZ Subpopulation innerhalb der migratorischen CD40<sup>hi</sup> DZ zurückgeführt werden. So ergab eine Analyse von EpCAM<sup>hi</sup> DZ, die Langerin<sup>+</sup> LZ entsprechen, und EpCAM<sup>low</sup> DZ, die Langerin<sup>+</sup> dDZ darstellen [232], dass RelB in diesen Zellen zu etwa gleichen Teilen exprimiert wird. Auch die Expression von CD103, ein Marker der mit T<sub>reg</sub>-induzierenden und kreuztoleranten DZ Subsets in Verbindung gebracht wird [146, 147, 229], korreliert nicht mit der RelB Expression (Abb. 10B).

Zur näheren Untersuchung der intrazellulären Verteilung von RelB wurden die residenten CD40<sup>low</sup> und migratorischen CD40<sup>hi</sup> DZ aus den hautdrainierenden Lymphknoten von unbehandelten und FITC-bepinselten WT Mäusen sortiert, gefärbt und mittels konfokalem Mikroskop analysiert. Durch die epikutane Verabreichung von FITC in Kombination mit Aceton und Dibutylphtalat wird eine Reifung der migratorischen DZ in der Haut induziert [233], die hier genutzt wurde, um neben unreifen residenten und semireifen ssmDZ auch vollreife migratorische DZ untersuchen zu können. Solche FITC-Behandlungen dienen als Modell zur Induktion einer Kontakthypersensibilität [234]. In Vorversuchen konnte klar gezeigt werden, dass in den hautdrainierenden Lymphknoten von FITC-behandelten Mäusen zwischen zwei migratorischen DZ Populationen unterschieden werden kann: FITC<sup>+</sup> CD40<sup>hi</sup> und FITC<sup>-</sup> CD40<sup>hi</sup> DZ (Daten von Dr. H. Azukizawa). Da die FITC<sup>-</sup> DZ weniger kostimulatorische Moleküle exprimieren als FITC<sup>+</sup> DZ entsprechen sie den ssmDZ. Wie in Abbildung 10C und D zu sehen ist, wiesen residente DZ nur eine geringfügige Expression von RelB im Zytoplasma auf. Demgegenüber konnte in den ssmDZ eine erhöhte Expression von RelB sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern detektiert werden. Letzteres war auch der Fall in FITC<sup>-</sup> DZ, die ssmDZ unter inflammatorischen Bedingungen darstellen. Vollreife FITC<sup>+</sup> DZ zeigten eine den ssmDZ vergleichbare RelB Expression (Abb. 10C und D). Ferner wurde auch die intrazelluläre Verteilung zwei weiterer Mitglieder der Rel/NF-κB-Familie, c-Rel und RelA, überprüft. RelA konnte in den residenten, *steady state* migratorischen, FITC<sup>-</sup> und FITC<sup>+</sup> migratorischen DZ sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurde c-Rel nur im Zytoplasma der vier DZ Subpopulationen exprimiert (Abb. 10C und D).

Diese Daten zeigen, dass RelB bereits unter homöostatischen Bedingungen in migratorischen DZ, nicht jedoch in residenten DZ, nukleär transloziert vorliegt und somit aktiv ist.

Demgegenüber korreliert die nukleäre Translokation von RelA und c-Rel nicht mit der Ausprägung des semi-reifen Phänotyps der ssmDZ.

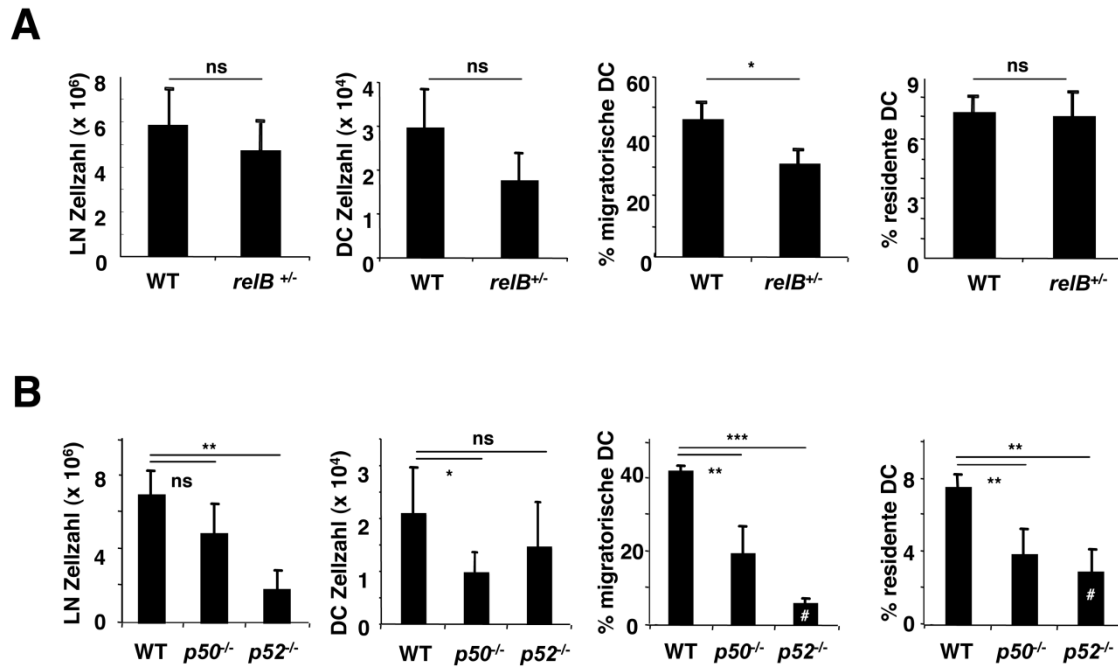


**Abb. 10: CD40<sup>hi</sup> ssmDZ zeigen eine nukleäre Translokation von RelB.** (A) Durchflusszytometrische Analyse der intrazellulären RelB Expression in CD11c<sup>+</sup> CD40<sup>hi</sup> migratorische DZ (oberes Histogramm) und in CD11c<sup>+</sup> CD40<sup>low</sup> residenten DZ (unteres Histogramm) aus hautdrainierenden Lymphknoten von WT Mäusen. Schwarze Linien zeigen die RelB-Expression in den DZ Populationen, grau gefüllte die Isotypkontrolle. (B) FACS-Analyse von CD11c<sup>+</sup> CD40<sup>hi</sup> migratorischen DZ aus hautdrainierenden Lymphknoten für intrazelluläres RelB in Kombination mit EpCAM (oberes Kontur-Diagramm) oder CD103 (unteres Kontur-Diagramm). Für das EpCAM-RelB Kontur-Diagramm ist sowohl ein Quadrant dargestellt, der sich am Isotyp orientiert (gestrichelte Linie), als auch ein Quadrant, der anhand der Populationen ausgerichtet und zur Erhebung der Statistik herangezogen wurde (schwarze Linie). Die Zahlen innerhalb der Quadranten geben den Prozentsatz der Zellen in Bezug auf ssmDZ wieder. (C, D) Residente DZ und migratorische DZ aus hautdrainierenden Lymphknoten von unbehandelten WT Mäusen und FITC<sup>+</sup> migratorische DZ und FITC<sup>-</sup> migratorische DZ aus hautdrainierenden Lymphknoten von FITC-gepinselten WT Mäusen wurden zwei Tage nach Behandlung mittels FACS-Sorter isoliert. Zytospins der Zellen wurden für DAPI und RelB, RelA oder c-Rel gefärbt und mittels konfokalem Mikroskop analysiert. Maßstabsbalken: 5 µm (D) Mittels der Leica LCS Software wurde der MFI für RelB, RelA, und c-Rel innerhalb der Zellkerne bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM (*standard error of mean*, Standardfehler) von 20-30 Zellkernen pro Bedingung.

#### 4.2.2. Verminderte Frequenz an ssmDZ in hautdrainierenden Lymphknoten von *relB*<sup>+/-</sup> und *p52*<sup>-/-</sup> Mäusen

Der Nachweis von aktiviertem RelB in ssmDZ warf die Frage auf, ob es einen Zusammenhang zwischen der nukleären Translokation von RelB und der Migration dieser DZ gibt. Um dies herauszufinden, wurden heterozygote *relB*<sup>+/-</sup> Mäuse hinsichtlich der Frequenz an migratorischen CD40<sup>hi</sup> und residenten CD40<sup>low</sup> DZ in hautdrainierenden Lymphknoten untersucht. Die Analyse erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Hiroaki Azukizawa. Homozygote *relB*<sup>-/-</sup> Mäuse konnten aufgrund des Fehlens von Lymphknoten nicht analysiert werden [202]. Die Lymphknoten von *relB*<sup>+/-</sup> Mäusen waren zwar etwas kleiner als die der WT-Kontrollmäuse, unterschieden sich jedoch nicht signifikant in der Gesamtzellzahl. Ebenso konnte keine signifikante Abweichung in der Gesamtzellzahl an CD11c<sup>+</sup> DZ detektiert werden. Allerdings zeigten *relB*<sup>+/-</sup> Mäuse eine signifikante Reduktion in der prozentualen Verteilung von CD40<sup>hi</sup> ssmDZ, während die Frequenz an residenten CD40<sup>low</sup> DZ vergleichbar mit der der WT Kontrolle war (Abb. 11A).

Da die obigen Daten auf eine funktionelle Bedeutung von RelB an der Migration der ssmDZ hindeuten, sollte auch der RelB-Bindungspartner p52 untersucht werden. Die Lymphknoten von *p52*<sup>-/-</sup> Mäusen sind aufgrund einer Defizienz an B220<sup>+</sup> B-Zellen [235] wesentlich kleiner als die von WT Mäusen. Jedoch sind in *p52*<sup>-/-</sup> Mäusen keine signifikanten Unterschiede in der Gesamtzellzahl an CD11c<sup>+</sup> DZ im Vergleich zu Kontrolltieren festzustellen. Gravierende Unterschiede konnten hingegen bei der Frequenz der einzelnen DZ Subpopulationen in den hautdrainierenden Lymphknoten beobachtet werden. So war der prozentuale Anteil an ssmDZ in den *p52*<sup>-/-</sup> Mäusen um fast 90% gegenüber der WT-Kontrolle verringert. Die Frequenz an residenten DZ war in p52-defizienten Mäusen ebenfalls reduziert, allerdings mit ca. 55% im Vergleich zum WT nicht ganz so stark wie bei den ssmDZ (Abb. 11B).



**Abb. 11: Reduzierte Frequenz an migratorischen DZ in den hautdrainierenden Lymphknoten von *relB*<sup>-/-</sup> und *p52*<sup>-/-</sup> Mäusen.** (A) Zellsuspensionen aus hautdrainierenden Lymphknoten von WT (n = 5) und *relB*<sup>-/-</sup> (n = 5) Mäusen oder (B) von WT (n = 4), *p50*<sup>-/-</sup> (n = 4) und *p52*<sup>-/-</sup> (n = 4) Mäusen wurden hinsichtlich ihrer Zellularität, Frequenz an CD11c<sup>+</sup> Gesamt-DZ und der Frequenz an migratorischen DZ (CD11c<sup>+</sup> CD40<sup>hi</sup>) und residenten DZ (CD11c<sup>+</sup> CD40<sup>low</sup>) verglichen. Die Frequenzen migratorischer und residenter DZ beziehen sich auf große Zellen innerhalb des FSC/SSC-Diagramms unter Ausschluß von Lymphozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichungen (*standard derivations*, SD). Die Signifikanzwerte wurden anhand des ungepaarten Student's T-Tests berechnet: ns = nicht signifikant, \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001. Bei Werten der mit # markierten Balkendiagramme wurde aufgrund eines B-Zelldefizits in *p52*<sup>-/-</sup> Mäusen eine Normalisierung vorgenommen.

Um eine Beteiligung des klassischen NF-κB-Signalwegs durch RelA/p50 abzuklären, sollte auch eine Untersuchung von *p50*<sup>-/-</sup> Mäusen stattfinden. *relA*<sup>-/-</sup> Mäuse versterben bereits während der embryonalen Entwicklung [236] und konnten daher nicht analysiert werden. Im Gegensatz zu *p52*<sup>-/-</sup> Mäusen zeigen Lymphknoten von *p50*-defizienten Mäusen eine normale Zellularität, aber eine signifikant verringerte Gesamtzellzahl an CD11c<sup>+</sup> DZ im Vergleich zu WT Tieren. Zudem ist in *p50*<sup>-/-</sup> Mäusen die Frequenz an ssmDZ und residenten DZ gleichermaßen um ca. 50% gegenüber der Kontrolle reduziert (Abb. 11B). Diese Daten legen nahe, dass p50 bereits im Stadium der unreifen DZ eine entscheidende Rolle spielt und weniger bei der späteren Reifung und Migration der DZ. Andernfalls müsste die Reduktion bei den ssmDZ wesentlich stärker ausfallen.

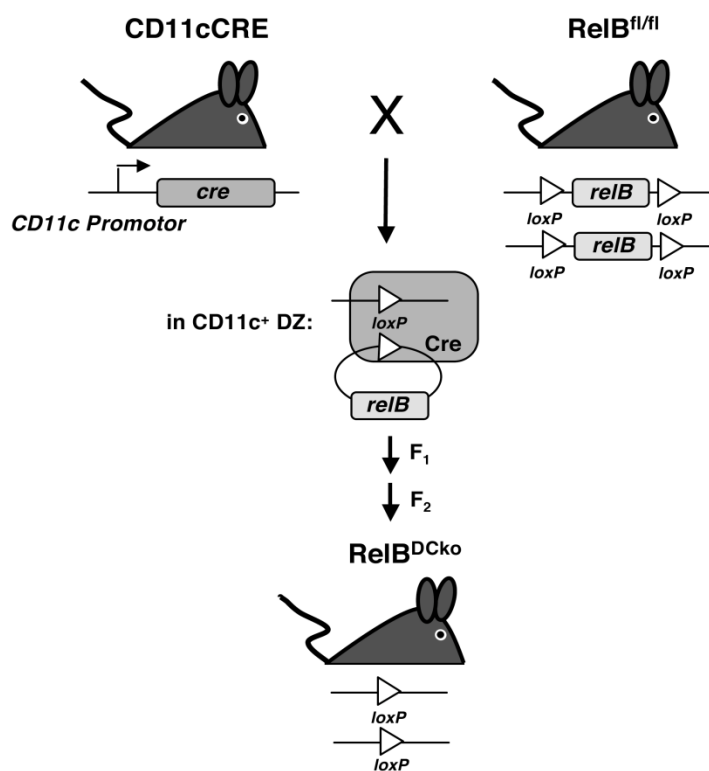
Zusammengefasst deuten die Ergebnisse daraufhin, dass die zwei Mitglieder des alternativen NF-κB-Signalwegs, RelB und p52, essentiell sind für die partielle Reifung der ssmDZ und deren Migration in die hautdrainierenden Lymphknoten.

### 4.3. Analyse der Auswirkung einer DZ-spezifischen Inaktivierung von RelB auf ssmDZ und Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub>

Die erhobenen Daten von den *relB*<sup>+/-</sup> und *p52*<sup>-/-</sup> Mäusen lassen vermuten, dass RelB und p52 für die Wanderung von ssmDZ in die hautdrainierenden Lymphknoten benötigt werden (4.2.2). Jedoch kann dies sowohl auf DZ-intrinsischen als auch auf DZ-extrinsischen Effekten, ausgelöst durch andere Defekte in diesen Tieren, beruhen. Zur Klärung dieser Frage sollten Mäuse mit einer DZ-spezifischen Deletion von RelB analysiert werden. In diesen Tieren sollte neben einer Untersuchung der DZ auch eine Analyse der Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> erfolgen, um herauszufinden, ob eine DZ-intrinsische RelB-Inaktivierung auch Auswirkungen auf die Tolerogenität der DZ hat.

#### 4.3.1. Fehlende RelB Expression in DZ von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen

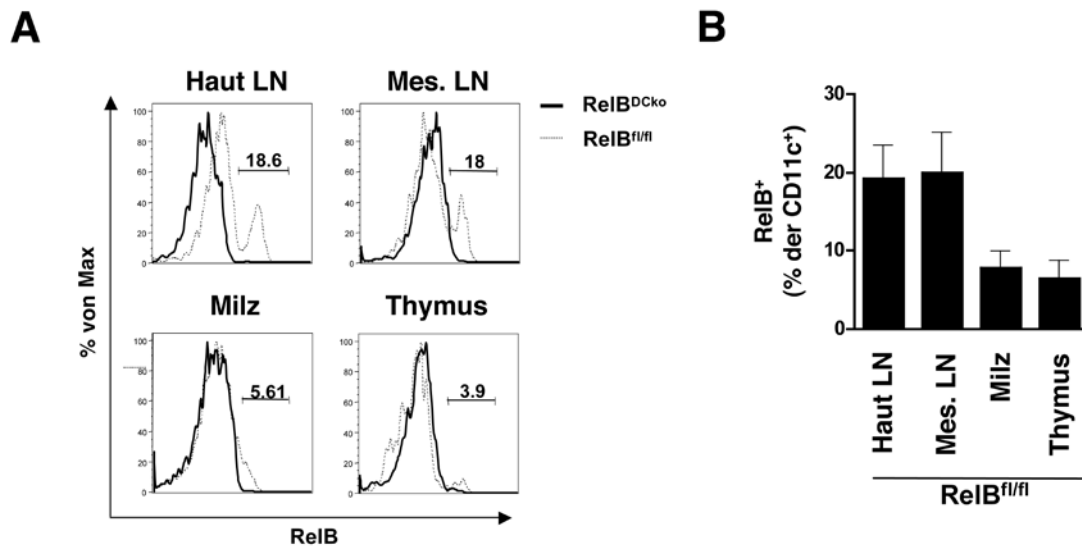
Um Mäuse mit einer konditionalen Inaktivierung des *relB*-Gens in DZ zu erhalten, wurde auf das Cre/loxP-Rekombinationssystem zurückgegriffen [237]. Es beruht auf der spezifischen Bindung der DNA-Rekombinase Cre aus dem Bakteriophagen P1 an sogenannte loxP-Erkennungssequenzen. Ein Allel bzw. eine DNA-Sequenz, die von zwei gleichgerichteten loxP-Erkennungssequenzen flankiert ist (engl. *floxed*, Abkürzung: fl), kann von der Cre-Rekombinase erkannt und durch reziproken Strangaustausch (Rekombination) aus dem Chromosom herausgeschnitten werden [238]. Als Resultat verbleibt auf dem Chromosom lediglich eine loxP-Erkennungssequenz. Um dieses System für die Inaktivierung des *relB*-Gens in DZ zu nutzen, wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst CD11cCRE-Mäuse, die die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des DZ-spezifischen CD11c-Promotors exprimieren [218], mit RelB<sup>fl/fl</sup>-Mäusen (generiert von Marc Riemann & Falk Weih, Jena, noch nicht veröffentlicht) verkreuzt. In RelB<sup>fl/fl</sup>-Mäusen liegt das Exon 4 des *relB*-Gens, das für die DNA-Bindung und Dimerisierung des NF-κB-Proteins essentiell ist [181], flankiert durch loxP-Erkennungssequenzen vor. Die aus der Verpaarung resultierende F1-Generation bestand aus heterozygoten CD11cCRE RelB<sup>fl/wt</sup>-Mäusen, die zur Erhaltung von homozygoten Tieren nochmals miteinander verkreuzt und hinsichtlich der transgenen Allele genotypisiert wurden (s. 3.9.1). Mäuse, die sowohl das CRE-Transgen als auch die beiden *floxed relB*-Allele besaßen, galten als homozygote CD11cCRE RelB<sup>fl/fl</sup> Mäuse, die fortan als RelB<sup>DCko</sup> bezeichnet wurden (Abb. 12).



**Abb. 12: Schematische Darstellung der Inaktivierung des *relB*-Gens in CD11c-exprimierenden Zellen mit Hilfe des Cre/loxP-Rekombinations-systems.** Mäuse mit einem loxP-flankierten Exon des *relB*-Gens ( $RelB^{fl/fl}$ ) wurden mit Mäusen, die die Cre-Rekombinase unter dem CD11c-Promotor exprimieren (CD11cCRE), verkreuzt. Nach zwei Verpaarungen (1. CD11cCRE x  $RelB^{fl/fl}$ , 2. CD11cCRE  $RelB^{fl/+}$  x CD11cCRE  $RelB^{fl/+}$ ) erhält man in der F<sub>2</sub>-Generation CD11cCRE  $RelB^{fl/fl}$ -Mäuse, die fortan als  $RelB^{DCKO}$  Mäusen bezeichnet wurden. In den  $CD11c^+$  Zellen in diesen Tieren katalysiert die Cre-Rekombinase eine Rekombination an den loxP-flankierten Exons beider *relB*-Allele, wodurch die Expression von RelB nicht mehr möglich ist.

Um die Spezifität der Deletion in  $RelB^{DCKO}$  Mäusen zu überprüfen, wurden die  $CD11c^+$  DZ aus verschiedenen lymphatischen Organen durchflusszytometrisch für die Expression des RelB-Proteins analysiert. Als Kontrolltiere wurden  $RelB^{fl/fl}$  Mäuse verwendet. Aus Abbildung 13A geht hervor, dass in den  $CD11c^+$  DZ aller untersuchten lymphatischen Organe von  $RelB^{DCKO}$  Mäusen kein RelB-Protein detektiert werden konnte. Dies deutet daraufhin, dass in den  $RelB^{DCKO}$  Mäusen eine effiziente Inaktivierung des *relB*-Gens stattfand. In den  $CD11c^+$  DZ der  $RelB^{fl/fl}$  Kontrollmäuse ist hingegen keine Beeinträchtigung der RelB-Expression festzustellen. Interessanterweise wiesen in diesen Tieren die DZ der hautdrainierenden und mesenterischen Lymphknoten die höchste RelB-Expression auf, während die DZ aus Milz und Thymus eine um mehr als 2-fach geringere Expression von RelB zeigten (Abb. 13B). Aufgrund der unterschiedlich hohen RelB-Expression in den DZ der verschiedenen lymphatischen Organe, wurden für die nachfolgenden Analysen neben den hautdrainierenden Lymphknoten auch die Milzen der  $RelB^{DCKO}$  und Kontrollmäuse untersucht. Hierdurch war es möglich, die Effekte einer RelB-Defizienz in lymphatischen Organen mit unterschiedlicher RelB-Expression in DZ zu erfassen und miteinander zu vergleichen.

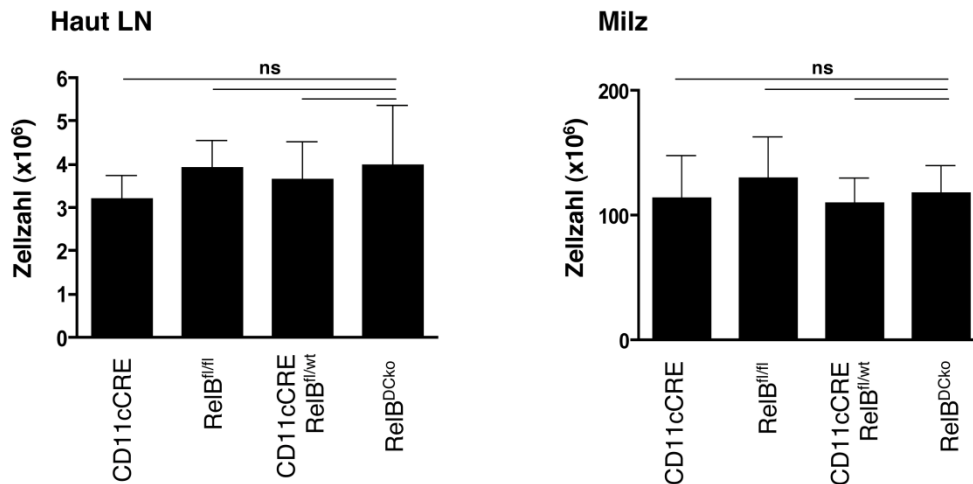




**Abb. 13: CD11c<sup>+</sup> DZ von RelB<sup>DCKo</sup> Mäusen exprimieren kein RelB.** (A, B) Zellen aus hautdrainierenden und mesenterischen Lymphknoten, Milz und Thymus von RelB<sup>fl/fl</sup> und RelB<sup>DCKo</sup> Mäusen wurden für CD11c und intrazellulär für RelB gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. (A) Die Histogramme stellen die RelB Expression von CD11c<sup>+</sup> DZ in den lymphatischen Organen dar. Die Zahlen geben den Prozentsatz der RelB<sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD11c<sup>+</sup> DZ von RelB<sup>fl/fl</sup> Mäusen an. (B) Dargestellt sind die Mittelwerte + SD der prozentualen Anteile von RelB<sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD11c<sup>+</sup> DZ in verschiedenen lymphatischen Organen von RelB<sup>fl/fl</sup> Mäusen (n = 6).

#### 4.3.2. RelB<sup>DCKo</sup> Mäuse zeigen eine normale Zellularität von hautdrainierenden Lymphknoten und Milz

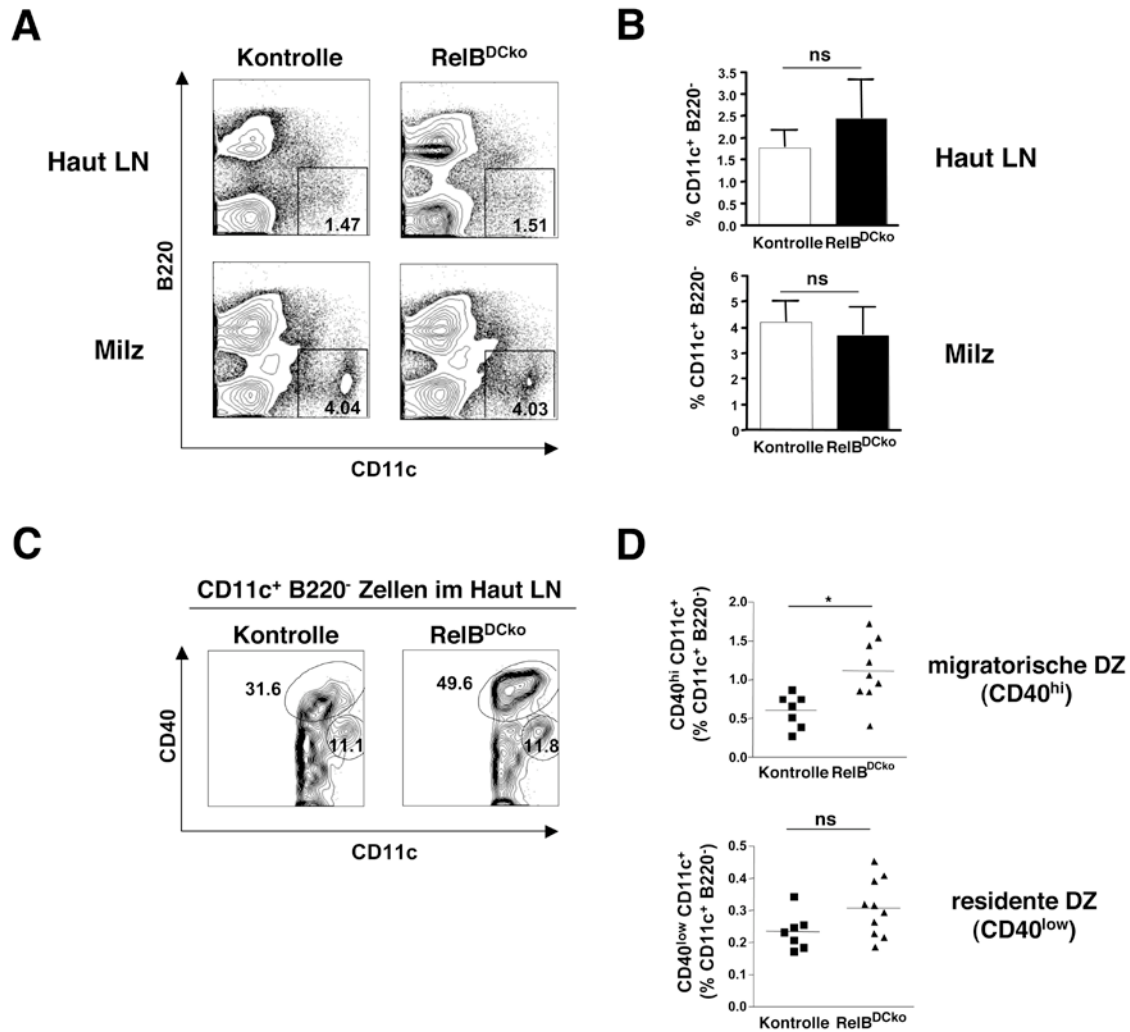
In einem ersten Schritt sollte die Zellularität der hautdrainierenden Lymphknoten und der Milz von RelB<sup>DCKo</sup> Mäusen mit der von Kontrollmäusen (CD11cCRE, RelB<sup>fl/fl</sup>, heterozygote CD11cCRE RelB<sup>fl/wt</sup>) verglichen werden. Um möglichst genaue Aussagen treffen zu können, wurden für alle Untersuchungen, auch die noch folgenden, stets Tiere gleichen Geschlechts und ähnlichen Alters (5 – 10 Wochen) verwendet und miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass die hautdrainierenden Lymphknoten und Milzen von RelB<sup>DCKo</sup> Mäusen eine ähnliche Gesamtzellzahl aufwiesen wie die der Kontrolltiere (Abb. 14). Für die weiteren Analysen wurden daher die einzeltransgenen Mauslinien CD11cCRE und RelB<sup>fl/fl</sup> als Referenztiere herangezogen. Heterozygote CD11cCRE RelB<sup>fl/wt</sup> Tiere wurden nicht weiter in die Untersuchung eingebezogen.



**Abb. 14: RelB<sup>DCKO</sup> Mäuse zeigen keine Unterschiede in der Zellularität der hautdrainierenden Lymphknoten und der Milz gegenüber Kontrollmäusen.** Zellsuspensionen aus hautdrainierenden Lymphknoten und Milzen von CD11cCRE (n = 3), RelB<sup>fl/fl</sup> (n = 5), CD11cCRE x RelB<sup>fl/wt</sup> (n = 7) und RelB<sup>DCKO</sup> (n = 11) Mäusen wurden hinsichtlich ihrer Zellularität verglichen. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney Tests: ns = nicht signifikant.

#### 4.3.3. Erhöhte Frequenz an ssmDZ in den hautdrainierenden Lymphknoten von RelB<sup>DCKO</sup> Mäusen

Da in vorangegangenen Analysen gezeigt wurde, dass *relB*<sup>+/-</sup> Mäuse weniger ssmDZ in den hautdrainierenden Lymphknoten aufweisen (4.2.2), sollte nun überprüft werden, ob dies auch in Mäusen mit einer DZ-spezifischen RelB-Deletion der Fall ist. Neben den DZ in den hautdrainierenden Lymphknoten wurden auch die DZ in der Milz der RelB<sup>DCKO</sup> Mäuse untersucht. Um CD11c<sup>+</sup> B220<sup>+</sup> plasmazytoide DZ von der Untersuchung auszuschließen, erfolgte nach Färbung der Oberflächenmarker CD11c und B220 eine selektive durchflusszytometrische Analyse der CD11c<sup>+</sup> B220<sup>-</sup> Zellen. Die Frequenz dieser Zellen war in den hautdrainierenden Lymphknoten von RelB<sup>DCKO</sup> Mäusen leicht erhöht, jedoch nicht signifikant gegenüber den Kontrolltieren verändert. In der Milz der RelB<sup>DCKO</sup> Mäuse zeigte sich hingegen eine Verringerung der Frequenz an CD11c<sup>+</sup> B220<sup>-</sup> Zellen, die allerdings im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls nicht signifikant war (Abb. 15 A, B).



**Abb. 15: RelB-Defizienz in DZ führt zu einem Anstieg an migratorischen DZ in hautdrainierenden Lymphknoten.** (A) Repräsentative FACS-Analyse der CD11c<sup>+</sup> B220<sup>-</sup> Zellen aus den hautdrainierenden Lymphknoten und der Milz von einer Kontrollmaus (RelB<sup>fl/fl</sup>) und einer RelB<sup>DCKO</sup> Maus. Dargestellte Kontur-Diagramme zeigen nur lebende Zellen innerhalb des FSC/SSC. Die Zahlen geben die Frequenz der CD11c<sup>+</sup> B220<sup>-</sup> Zellen innerhalb der Eingrenzungen an. (B) Prozentualer Anteil der CD11c<sup>+</sup> B220<sup>-</sup> Zellen in den hautdrainierenden Lymphknoten und den Milzen von Kontrollmäusen (CD11cCRE (n = 2), RelB<sup>fl/fl</sup> (n = 5)) und RelB<sup>DCKO</sup> Mäusen (n = 11) in Bezug auf die Gesamtzellen. Dargestellt sind die Mittelwerte + SD. (C) Repräsentative FACS-Analyse der residenten CD11c<sup>+</sup> CD40<sup>low</sup> DZ und migratorischen CD11c<sup>+</sup> CD40<sup>hi</sup> DZ in hautdrainierenden Lymphknoten von einer Kontrollmaus (RelB<sup>fl/fl</sup>) und einer RelB<sup>DCKO</sup> Maus. Die Kontur-Diagramme zeigen nur Zellen, die zuvor als CD11c<sup>+</sup> B220<sup>-</sup> definiert wurden. Die Zahlen geben die Frequenz der jeweiligen Population innerhalb der Eingrenzungen an. (D) Frequenz der migratorischen und residenten DZ in hautdrainierenden Lymphknoten von Kontrollmäusen (CD11cCRE (n = 2), RelB<sup>fl/fl</sup> (n = 5)) und RelB<sup>DCKO</sup> Mäusen (n ≥ 9) innerhalb der CD11c<sup>+</sup> B220<sup>-</sup> Zellen in Bezug auf die Gesamtzellen. Jedes Symbol repräsentiert ein Tier und die schwarze Linien markieren den Mittelwert. (B, D) Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney Tests: ns = nicht signifikant, \* p < 0.05.

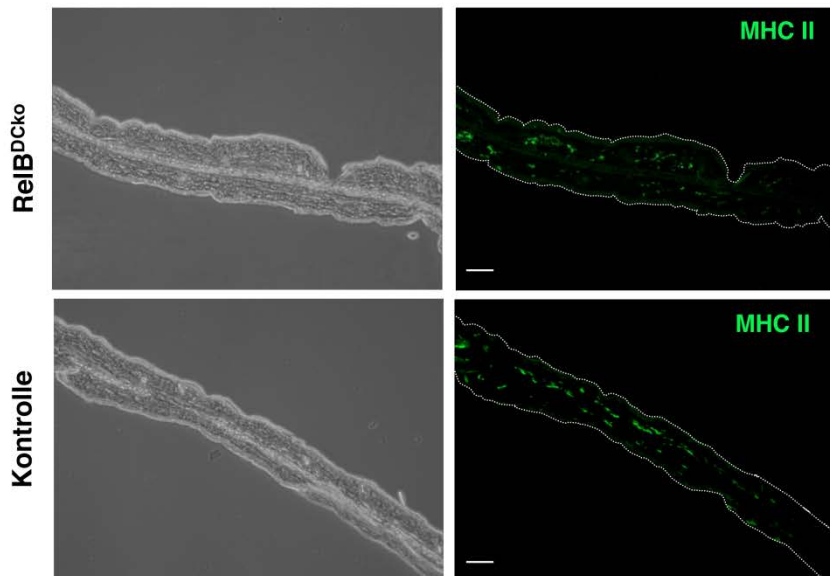
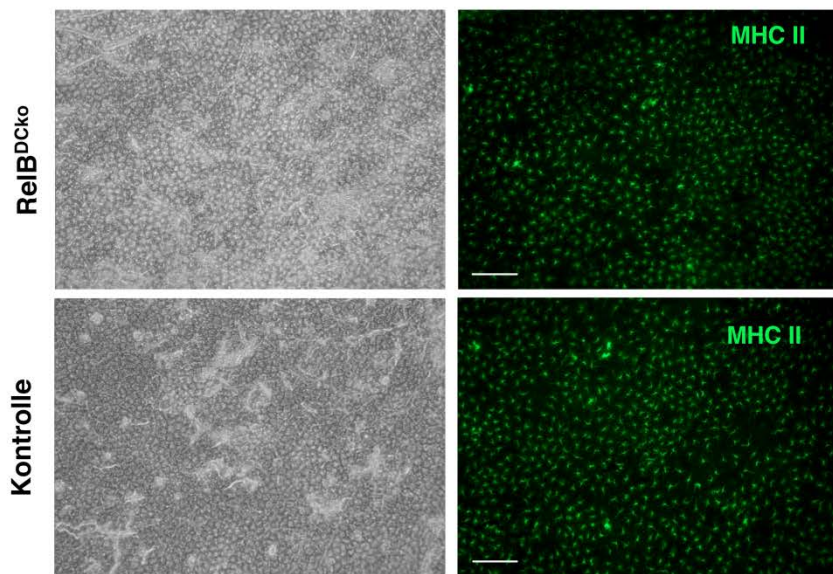
Anschließend wurden innerhalb der CD11c<sup>+</sup> B220<sup>-</sup> Zellen der hautdrainierenden Lymphknoten die prozentualen Anteile der CD40<sup>hi</sup> ssmDZ und der CD40<sup>low</sup> residenten DZ näher untersucht (Abb. 15C). CD40<sup>-</sup> CD11c<sup>int</sup> Zellen wurden von der Analyse

ausgeschlossen, da sie in ihrer Morphologie und Funktionalität nicht DZ entsprechen [63]. Die aus der Analyse resultierenden Frequenzen wurden auf die Frequenz der Gesamt-Zellen, die B220<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> sind, zurückgerechnet und ergaben die in Abbildung 15D dargestellten Ergebnisse. Überraschenderweise zeigten RelB<sup>DCko</sup> Mäuse eine signifikante Erhöhung des prozentualen Anteils an CD40<sup>hi</sup> ssmDZ ( $1,1 \pm 0,4\%$ ) im Vergleich zu Kontrolltieren ( $0,6 \pm 0,2\%$ ). Die Frequenz der residenten CD40<sup>low</sup> DZ war in den RelB<sup>DCko</sup> Mäusen leicht erhöht, allerdings nicht signifikant gegenüber der Kontrolle verändert (Kontrolle:  $0,2 \pm 0,06\%$ , RelB<sup>DCko</sup>:  $0,3 \pm 0,09\%$ ) (Abb. 15D).

Diese Ergebnisse stehen in einem klaren Gegensatz zu den bereits erhaltenen Daten aus den *relB*<sup>+/-</sup> Mäusen (4.2.2). Demnach ist die in *relB*<sup>+/-</sup> Mäusen beobachtete verringerte Migration von migratorischen CD40<sup>hi</sup> DZ auf indirekte Effekte durch andere Defizite in diesen Mäusen zurückzuführen. Die erhöhte Frequenz an migratorischen DZ in RelB<sup>DCko</sup> Mäusen deutet eher auf einen inhibitorischen Effekt von RelB auf die Migration dieser Zellen hin.

#### **4.3.4. Keine Beeinträchtigung von DZ in der Haut von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen**

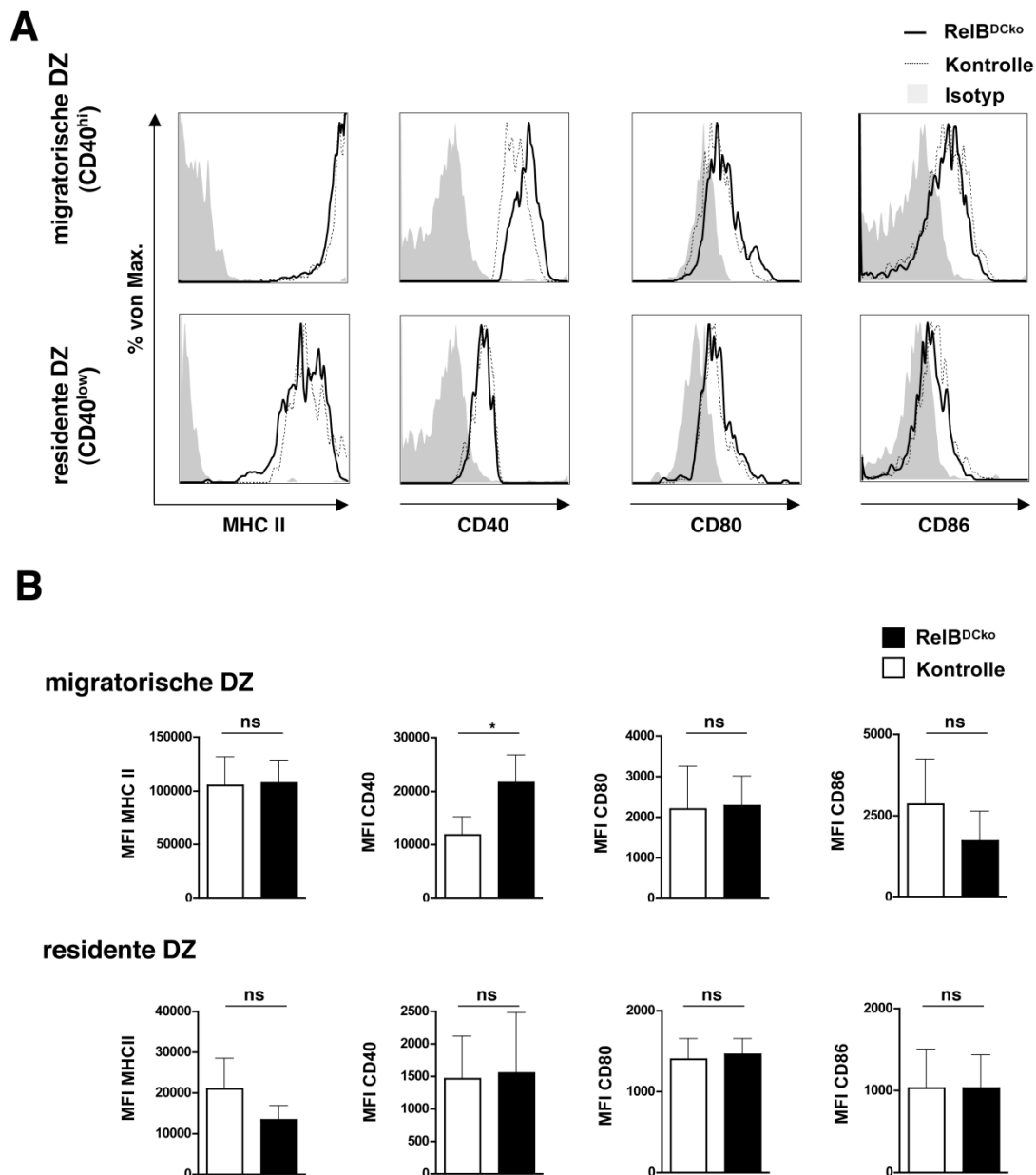
Aufgrund der Zunahme an migratorischen CD40<sup>hi</sup> DZ in den hautdrainierenden Lymphknoten von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen (4.3.3) stellte sich die Frage, ob bereits in der Haut dieser Tiere eine erhöhte Zahl an DZ vorlag. Um dies zu überprüfen, wurden MHC II-Färbungen von Ohrhautschnitten der Mäuse durchgeführt. Hierdurch war es möglich, die Verteilung von MHC II<sup>+</sup> Zellen und somit DZ in der Epidermis und der Dermis der Tiere zu untersuchen. Wie in Abbildung 16A zu sehen ist, konnte in der Haut von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen eine vergleichbare Verteilung von MHC II<sup>+</sup> Zellen gegenüber den Kontrollmäusen festgestellt werden. Darüber hinaus zeigte die MHC II-Färbung von sogenannten *epidermal sheets* (Epidermisstücken), dass LZ in der Epidermis von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen in ähnlicher Zahl und Verteilung vorkommen wie in den Kontrollmäusen (Abb. 16B). Somit scheint die RelB-Defizienz in DZ keine Auswirkungen auf die DZ-Homöostase in der Haut zu haben.

**A****B**

**Abb. 16: RelB<sup>DCko</sup> Mäuse weisen eine normale Verteilung von DZ in der Haut auf. (A, B)** Durchlichtmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von (A) Ohrhaut und (B) *epidermal sheets* einer RelB<sup>DCko</sup> Maus und einer Kontrollmaus. Gefrierschnitte von Ohrbiospien bzw. *epidermal sheets* der Mäuse wurden fixiert, mit  $\alpha$ MHC II in Kombination mit  $\alpha$ Rat IgG2a-AlexaFluor488 gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop analysiert. (A, B) Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von zwei Experimenten mit ähnlichen Resultaten. Maßstabsbalken: 200  $\mu$ m

#### **4.3.5. SsmDZ in RelB<sup>DCko</sup> Mäusen exprimieren mehr CD40 im Vergleich zu Kontrollmäusen**

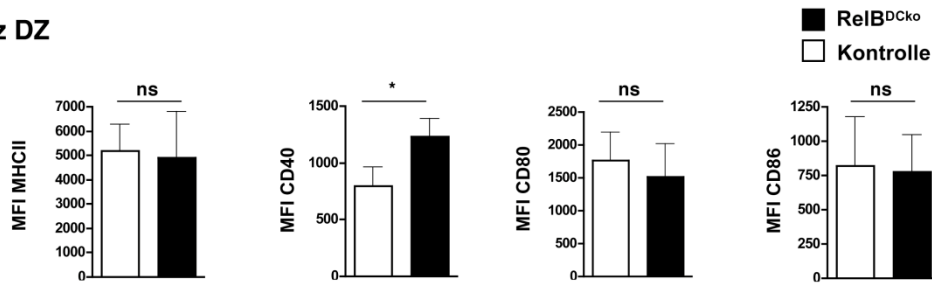
Die erhöhte Frequenz an semireifen migratorischen DZ in den hautdrainierenden Lymphknoten von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen deutet darauf hin, dass aktives RelB nicht, wie ursprünglich angenommen, mit der partiellen Reifung dieser DZ korreliert (vgl. 4.2.). In weiteren Experimenten sollte daher untersucht werden, inwiefern eine RelB-Defizienz in DZ deren Reifung beeinflusst. Hierzu wurde zunächst in den DZ der hautdrainierenden Lymphknoten die Expression von MHC II, CD40, CD80 und CD86 durchflusszytometrisch analysiert. Es zeigte sich, dass ssmDZ von RelB<sup>DCko</sup> Tieren eine zur Kontrolle vergleichbare Expression von MHC II und CD80 aufwiesen. Zwar war die Expression von CD86 auf den migratorischen DZ in RelB<sup>DCko</sup> Mäusen leicht erniedrigt, jedoch nicht signifikant gegenüber den Kontrolltieren verändert. SsmDZ in den RelB<sup>DCko</sup> Mäusen exprimierten allerdings verglichen mit der Kontrolle signifikant mehr CD40 auf ihrer Oberfläche. Im Gegensatz dazu zeigten residente DZ von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen keine Unterschiede in der Expression von CD40, CD80 und CD86. Einzig MHC II schien auf den residenten DZ herunterreguliert, dies jedoch nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 17A, B).



**Abb. 17: Migratorische DZ in den hautdrainierenden Lymphknoten von ReIB<sup>DCKo</sup> Mäusen exprimieren mehr CD40 als in Kontrollmäusen.** (A) Migratorische (CD11c<sup>+</sup> CD40<sup>hi</sup>) und resident DZ (CD11c<sup>+</sup> CD40<sup>hi</sup>) aus hautdrainierenden Lymphknoten von Kontrollmäusen (CD11cCRE, ReIB<sup>fl/fl</sup>) und ReIB<sup>DCKo</sup> Mäusen wurden durchflusszytometrisch für die Expression der Oberflächenmarker MHC II, CD40, CD80 und CD86 analysiert. (B) Expression von MHC II, CD40, CD80 und CD86 als MFI pro Zelle innerhalb der migratorischen und residenten DZ in hautdrainierenden Lymphknoten von Kontrollmäusen (CD11cCRE (n ≥ 2), ReIB<sup>fl/fl</sup> (n = 4)) und ReIB<sup>DCKo</sup> Mäusen (n ≥ 4). (A, B) Dargestellt sind die Mittelwerte + SD. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney Tests: ns = nicht signifikant, \* p < 0.05.

Weitere Untersuchungen der CD11c<sup>+</sup> DZ in der Milz von ReIB<sup>DCKo</sup> Mäusen ergaben auch hier eine signifikant erhöhte Expression von CD40 gegenüber den Kontrollmäusen. Hingegen konnte für die Reifungsmarker CD80, CD86 und MHC II kein wesentlicher Unterschied in der Expression festgestellt werden (Abb. 18).

Milz DZ



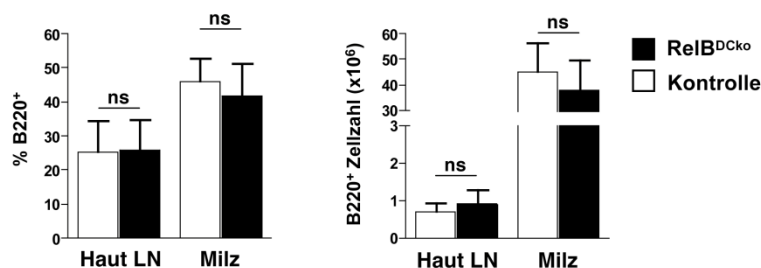
**Abb. 18: Milz DZ von RelB<sup>DCKO</sup> Mäusen exprimieren mehr CD40 als in Kontrollmäusen.** Expression der Oberflächenmarker MHC II, CD40, CD80 und CD86 als MFI pro Zelle innerhalb CD11c<sup>+</sup> DZ der Milz von Kontrollmäusen (CD11cCRE (n ≥ 2), RelB<sup>fl/fl</sup> (n = 4)) und RelB<sup>DCKO</sup> Mäusen (n ≥ 4). Dargestellt sind die Mittelwerte + SD. Die Signifikanzwerte wurden anhand des Mann-Whitney Tests berechnet: ns = nicht signifikant, \* p < 0.05.

Zusammengefasst lassen die bisher dargestellten Ergebnisse vermuten, dass RelB, entgegen der ursprünglichen Annahme, die Migration und partielle Reifung von ssmDZ eher negativ beeinträchtigt.

**4.3.6. Einfluss der RelB-Defizienz in DZ auf die Homöostase von B- und T-Lymphozyten in peripheren lymphatischen Organen**

DZ spielen als professionelle APZ eine wichtige Rolle für die Aktivierung von Lymphozyten [9]. Daher sollte als Nächstes untersucht werden, ob eine RelB-Defizienz in DZ indirekt auch Auswirkungen auf die Homöostase von B- und T-Zellen hat.

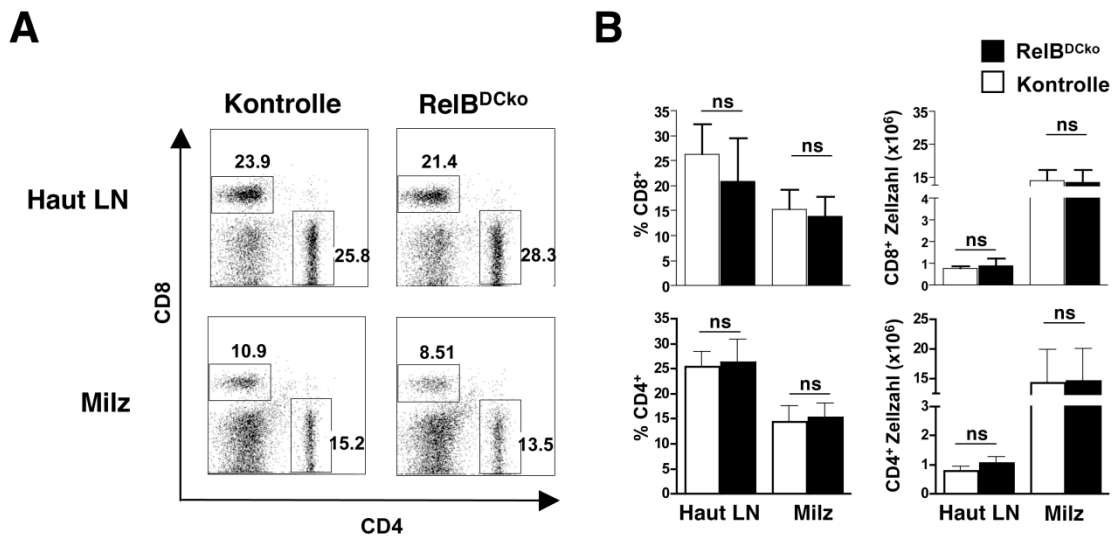
Durchflusszytometrische Analysen der hautdrainierenden Lymphknoten und der Milz zeigten anhand der Expression des Oberflächenmarkers B220 eine normale prozentuale Verteilung als auch eine zu Kontrolltieren vergleichbare Gesamtzellzahl an B220<sup>+</sup> B-Zellen in RelB<sup>DCKO</sup> Mäusen (Abb. 19).



**Abb. 19: Durchflusszytometrische Analyse von B220<sup>+</sup> B-Zellen in den lymphatischen Organen von RelB<sup>DCKO</sup> Mäusen und Kontrollmäusen.** Prozentualer Anteil der B220<sup>+</sup> Zellen in Bezug auf die Gesamtzellen und absolute Zellzahlen der B220<sup>+</sup> Zellen in hautdrainierenden Lymphknoten und Milz von Kontrollmäusen (CD11cCRE (n = 1), RelB<sup>fl/fl</sup> (n = 6)) und RelB<sup>DCKO</sup> Mäusen (n = 5). Dargestellt sind die Mittelwerte + SD. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney Tests: ns = nicht signifikant.



Ein ähnliches Bild ergab sich bei der FACS-Analyse der CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen. In den hautdrainierenden Lymphknoten und der Milz von RelB<sup>DCKo</sup> Mäusen konnten sowohl für die Frequenzen als auch die absoluten Zellzahlen der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen keine signifikanten Unterschiede gegenüber den Kontrolltieren erfasst werden (Abb. 20A, B).

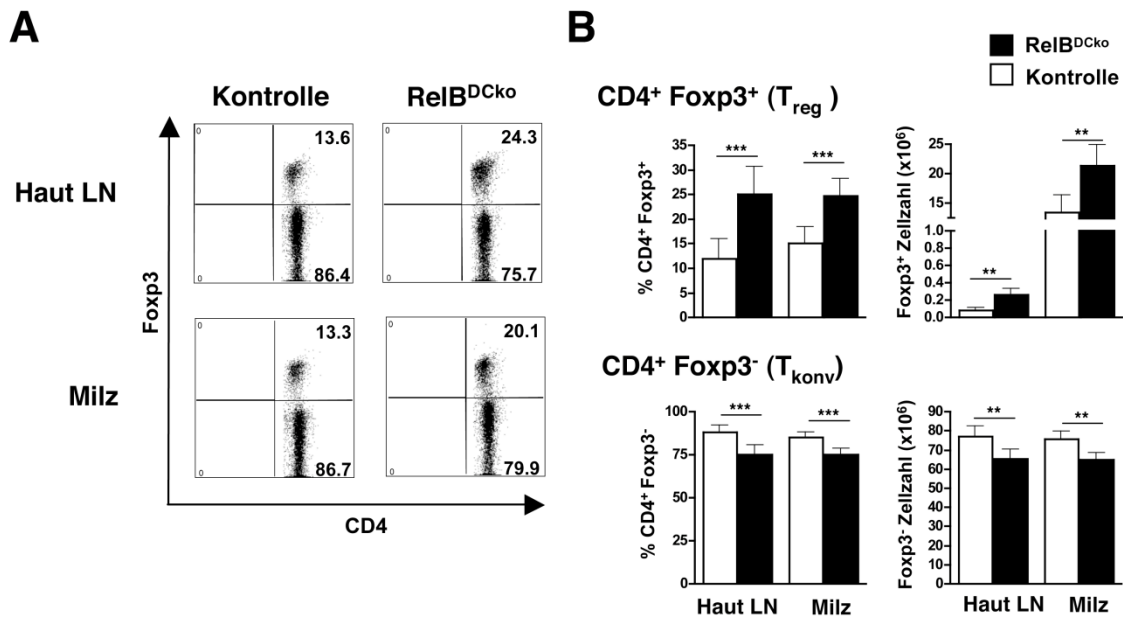


**Abb. 20: Durchflusszytometrische Analyse von CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den hautdrainierenden Lymphknoten und der Milz von RelB<sup>DCKo</sup> Mäusen und Kontrollmäusen.** (A) Repräsentative FACS-Analyse von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den hautdrainierenden Lymphknoten und der Milz einer Kontrollmaus (RelB<sup>fl/fl</sup>) und einer RelB<sup>DCKo</sup> Maus. Dargestellt sind nur lebende Zellen innerhalb des FSC/SSC. Die Zahlen geben die Frequenz der jeweiligen Population innerhalb der Eingrenzungen an. (B) Prozentualer Anteil der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Bezug auf die Gesamtzellen sowie absolute Zellzahlen der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den hautdrainierenden Lymphknoten und den Milzen von Kontrollmäusen (CD11cCRE (n = 3), RelB<sup>fl/fl</sup> (n ≥ 4)) und RelB<sup>DCKo</sup> Mäusen (n = 7). Dargestellt sind die Mittelwerte + SD. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney Tests: ns = nicht signifikant.

#### 4.3.7. Einfluss der RelB-Defizienz in DZ auf die Homöostase und den Phänotyp von Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> und Foxp3<sup>+</sup> T<sub>konv</sub> in peripheren lymphatischen Organen

Wie bereits gezeigt, können ssmDZ *in vitro* und *in vivo* Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> induzieren (4.1.3; 4.1.4). Da in den RelB<sup>DCKo</sup> Mäusen mehr ssmDZ vorliegen (4.3.3), sollte untersucht werden, ob in diesen Tieren eventuell die Homöostase und Generierung von Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> beeinflusst ist. Hierzu wurden die T-Zellen aus den hautdrainierenden Lymphknoten und der Milz für die Marker CD4 und Foxp3 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Anhand von Abbildung 21 A und B ist ersichtlich, dass in beiden peripheren lymphatischen Organen von RelB<sup>DCKo</sup> Mäusen eine signifikant erhöhte Frequenz an CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> gegenüber den Kontrollen detektiert werden konnte. Dieser Anstieg im Vergleich zur Kontrolle fiel in den

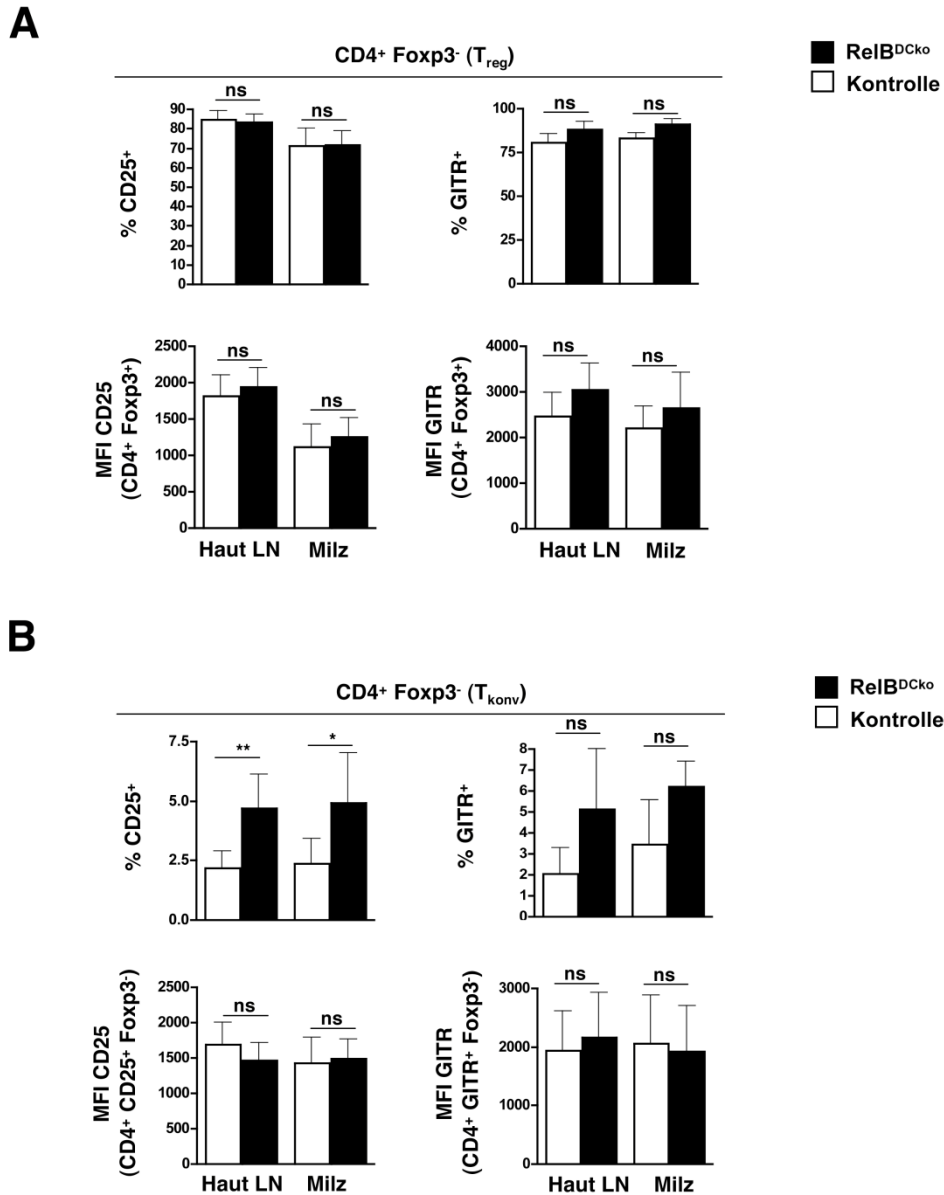
hautdrainierenden Lymphknoten ( $11,9 \pm 4\%$  versus  $25,1 \pm 5,5\%$ ) etwas höher als in der Milz ( $15,1 \pm 3,3\%$  versus  $24,7 \pm 3,5\%$ ). Im Gegenzug verringerte sich die Frequenz an  $CD4^+$   $Foxp3^-$   $T_{konv}$  in beiden lymphatischen Organen der  $RelB^{DCko}$  Mäuse im Vergleich zu den Kontrollmäusen (hautdrainierenden Lymphknoten:  $88,1 \pm 4\%$  versus  $74,9 \pm 5,5\%$ , Milz:  $84,9 \pm 3,3\%$  versus  $75,3 \pm 3,5\%$ ). Diese Verschiebungen in den prozentualen Anteilen der  $Foxp3^+$   $T_{regs}$  und  $Foxp3^-$   $T_{konv}$  wurden auch in den absoluten Zellzahlen deutlich (Abb. 21B).



**Abb. 21: Erhöhte Frequenz an  $Foxp3^+$   $T_{regs}$  in den hautdrainierenden Lymphknoten und der Milz von  $RelB^{DCko}$  Mäusen.** (A) Repräsentative FACS-Analyse von  $Foxp3$  innerhalb der  $CD4^+$  T-Zellen der hautdrainierenden Lymphknoten und der Milz einer Kontrollmaus ( $RelB^{fl/fl}$ ) und einer  $RelB^{DCko}$  Maus. Die Frequenz der jeweiligen Populationen sind innerhalb der Quadranten dargestellt. (B) Prozentualer Anteil der  $Foxp3^+$  und  $Foxp3^-$  T-Zellen in Bezug auf die  $CD4^+$  T-Zellen sowie absolute Zellzahlen der  $Foxp3^+$  und  $Foxp3^-$   $CD4^+$  T-Zellen in den hautdrainierenden Lymphknoten und der Milz von Kontrollmäusen ( $CD11cCRE$  ( $n = 3$ ),  $RelB^{fl/fl}$  ( $n \geq 4$ )) und  $RelB^{DCko}$  Mäusen ( $n = 7$ ). Dargestellt sind die Mittelwerte + SD. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney Tests: ns = nicht signifikant, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

In weiteren durchflusszytometrischen Analysen wurde die Expression der Oberflächenmarker  $CD25$  und  $GITR$  auf den  $Foxp3^+$   $T_{regs}$  und  $Foxp3^-$   $T_{konv}$  untersucht. Während  $T_{regs}$  die beiden Moleküle konstitutiv exprimieren [239, 240], werden  $CD25$  und  $GITR$  in  $T_{konv}$  erst nach Aktivierung hochreguliert [137]. Wie aus Abbildung 22A (obere Reihe) hervorgeht, zeigten  $RelB^{DCko}$  Mäuse gegenüber den Kontrollmäusen keine auffälligen Unterschiede in der Frequenz an  $CD25^+$  bzw.  $GITR^+$  Zellen innerhalb der peripheren  $T_{regs}$ . Darüber hinaus konnte auf den  $T_{regs}$  der  $RelB^{DCko}$  Mäuse auch keine signifikante Veränderung in der Expression von  $CD25$  und  $GITR$  pro Zelle im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (Abb. 22A, untere Reihe). Interessanterweise zeigten die  $RelB^{DCko}$  Mäuse jedoch einen Anstieg in der Frequenz

peripherer CD25<sup>+</sup> bzw. GITR<sup>+</sup> T<sub>konv</sub>. Dieser Anstieg fiel im Falle der CD25<sup>+</sup> T<sub>konv</sub> sowohl in den hautdrainierenden Lymphknoten als auch in der Milz der RelB<sup>DCko</sup> Mäuse signifikant im Vergleich zur Kontrolle aus (Abb. 22B, obere Reihe). Eine genauere Analyse der Expression von CD25 und GITR auf den aktivierten T<sub>konv</sub> zeigte, dass es diesbezüglich in den RelB<sup>DCko</sup> Mäusen keine Unterschiede gegenüber den Kontrollmäusen gab (Abb. 22B, untere Reihe).



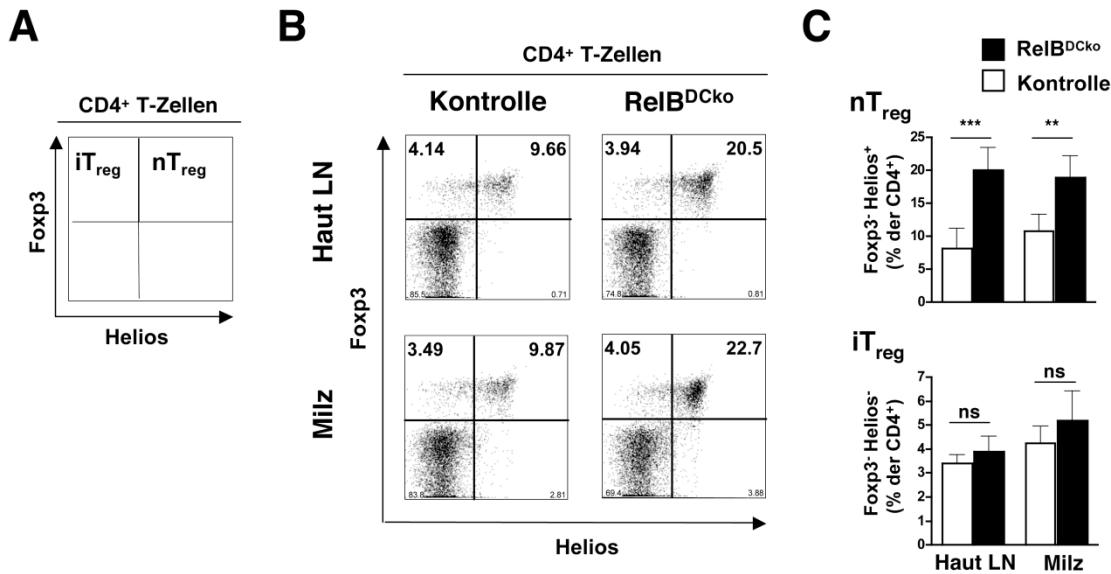
**Abb. 22: RelB<sup>DCko</sup> Mäuse weisen gegenüber den Kontrolltieren in den hautdrainierenden Lymphknoten und der Milz eine erhöhte Frequenz an CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup> T<sub>konv</sub> auf.** (A, B) Obere Reihe: Prozentualer Anteil der CD25<sup>+</sup> und GITR<sup>+</sup> Zellen in Bezug auf (A) die CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup> T<sub>reg</sub> und (B) die CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup> T<sub>konv</sub> aus den hautdrainierenden Lymphknoten und der Milz von Kontrollmäusen (RelB<sup>fl/fl</sup>, n = 4) und RelB<sup>DCko</sup> Mäusen (n = 3). (A, B) Untere Reihe: Expression von CD25 bzw. GITR auf (A) den Gesamt-T<sub>reg</sub> und (B) den CD25<sup>+</sup> bzw. GITR<sup>+</sup> T<sub>konv</sub> aus den hautdrainierenden Lymphknoten und der Milz von Kontrollmäusen (RelB<sup>fl/fl</sup>, n = 4) und RelB<sup>DCko</sup> Mäusen (n = 3) als MFI pro Zelle. (A, B) Dargestellt sind die Mittelwerte + SD. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney Test: ns = nicht signifikant, \* p < 0.05, \*\* p < 0.01.

Aufgrund dieser Daten kann festgestellt werden, dass eine konditionale Geninaktivierung von RelB in DZ zu einem Anstieg an CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> und aktivierten (CD25<sup>+</sup> bzw. GITR<sup>+</sup>) CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup> T<sub>konv</sub> in den peripheren lymphatischen Organen von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen führt.

#### **4.3.8. Erhöhte Frequenz an Helios<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> in den hautdrainierenden Lymphknoten und der Milz von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen**

Die Zunahme an Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> in den peripheren lymphatischen Organen der RelB<sup>DCko</sup> Maus (4.3.7) warf die Frage auf, ob es sich dabei um peripher-induzierte iT<sub>regs</sub> oder um natürlich vorkommende nT<sub>regs</sub> thymischen Ursprungs handelt. Um dies herauszufinden, wurde in den T<sub>regs</sub> neben Foxp3 die intrazelluläre Expression von Helios durchflusszytometrisch analysiert. Helios ist ein Transkriptionsfaktor der Ikarosfamilie, von dem angenommen wird, dass er unter homöostatischen Bedingungen spezifisch in nT<sub>regs</sub>, nicht aber in iT<sub>regs</sub>, exprimiert wird [241]. Die zur Differenzierung der beiden T<sub>reg</sub>-Subpopulationen verwendete Auswertestrategie der FACS-Analyse ist exemplarisch in Abbildung 23A dargestellt. RelB<sup>DCko</sup> Mäuse wiesen in den peripheren lymphatischen Organen eine signifikant erhöhte Frequenz an Helios<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> nT<sub>regs</sub> auf, während die Helios<sup>-</sup> Foxp3<sup>+</sup> iT<sub>regs</sub> keine Unterschiede gegenüber den Kontrolltieren zeigten (Abb. 23B, C). Hierbei fiel der Anstieg in der relativen Häufigkeit der Helios<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> nT<sub>regs</sub> in den hautdrainierenden Lymphknoten etwas höher aus als in der Milz der RelB<sup>DCko</sup> Mäuse (Abb. 23C; Lymphknoten: 8,2 ± 2,9% versus 20 ± 3,5%; Milz: 10,7 ± 2,5% versus 18,9 ± 3,2%).

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Zunahme an T<sub>regs</sub> in beiden peripheren lymphatischen Organen der RelB<sup>DCko</sup> Mäuse vermutlich auf eine Erhöhung der nT<sub>regs</sub>, nicht aber der iT<sub>regs</sub>, zurückzuführen ist. Allerdings ist bei der Interpretation der Daten zu berücksichtigen, dass neueste Studien eine Verwendung von Helios als Marker für nT<sub>regs</sub> in Frage stellen [242-244].

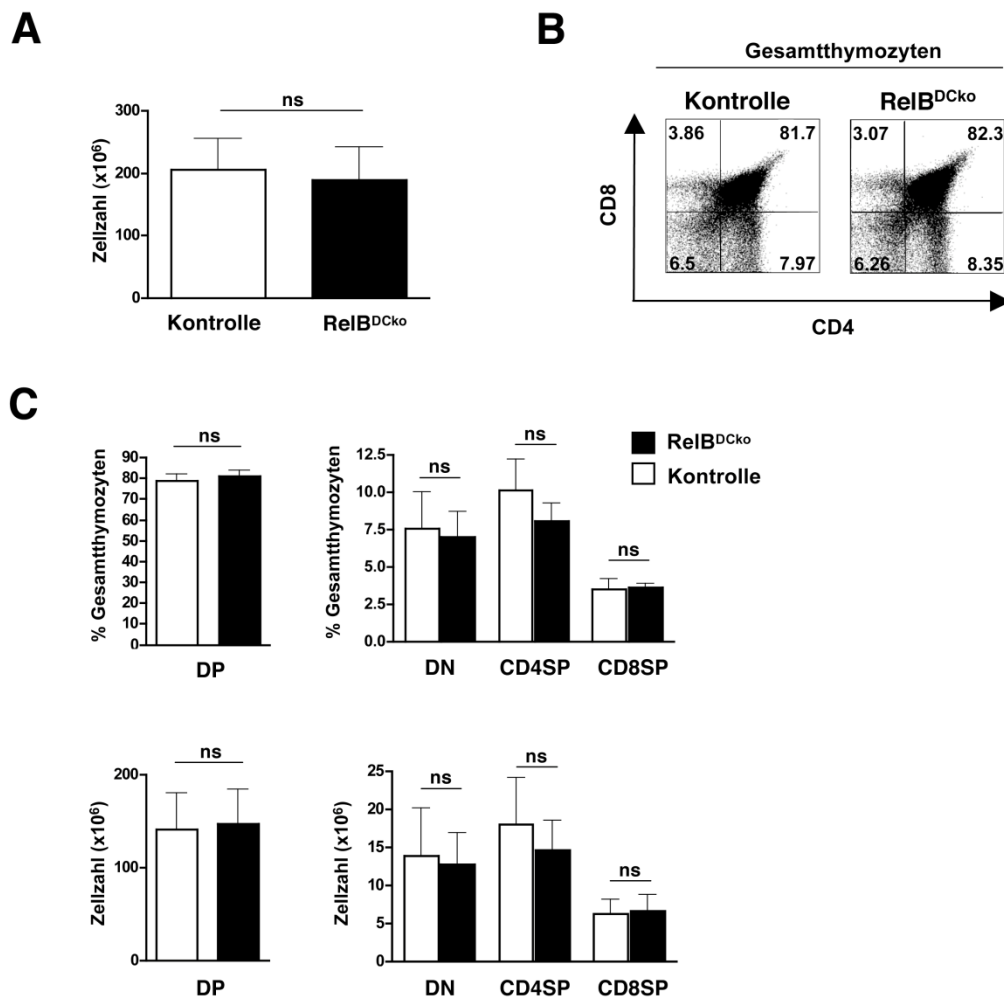


**Abb. 23: Erhöhte Frequenz an Helios<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> in den hautdrainierenden Lymphknoten und der Milz von RelB<sup>DCKO</sup> Mäusen.** (A) Diagramm zur Darstellung der Unterscheidung von nT<sub>regs</sub> (Foxp3<sup>+</sup> Helios<sup>+</sup>) und iT<sub>regs</sub> (Foxp3<sup>+</sup> Helios<sup>-</sup>) innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellen. (B) Repräsentative FACS-Analyse von Foxp3 und Helios innerhalb CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den hautdrainierenden Lymphknoten und der Milz einer Kontrollmaus (RelB<sup>fl/fl</sup>) und einer RelB<sup>DCKO</sup> Maus. Die Frequenzen der jeweiligen Populationen sind innerhalb der Quadranten dargestellt. (C) Prozentualer Anteil der Foxp3<sup>+</sup> Helios<sup>+</sup> und Foxp3<sup>+</sup> Helios<sup>-</sup> T-Zellen in Bezug auf die Gesamt-CD4<sup>+</sup> T-Zellen in hautdrainierenden Lymphknoten und Milz von Kontrollmäusen (CD11cCRE (n = 3), RelB<sup>fl/fl</sup> (n = 5)) und RelB<sup>DCKO</sup> Mäusen (n = 6). Dargestellt sind die Mittelwerte + SD. Die statistische Auswertung erfolgte anhand des Mann-Whitney Tests: ns = nicht signifikant, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001.

#### 4.3.9. Verstärkte Proliferation von T<sub>regs</sub> im Thymus von RelB<sup>DCKO</sup> Mäusen

Da in den peripheren lymphatischen Organen der RelB<sup>DCKO</sup> Mäuse verstärkt Helios<sup>+</sup> nT<sub>regs</sub> gefunden wurden, sollte als Nächstes geklärt werden, ob es bereits im Thymus dieser Tiere zu Auswirkungen auf die Entwicklung von nT<sub>regs</sub> kam.

Hierzu wurde mit der Untersuchung der Zellularität des Thymus begonnen. RelB<sup>DCKO</sup> Tiere zeigten diesbezüglich keine auffälligen Unterschiede im Vergleich zu Kontrolltieren (Abb. 24A). Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der Thymozyten anhand der Expression der T-Zelloberflächenmarker CD4 und CD8. Dabei zeigte der Thymus von RelB<sup>DCKO</sup> Mäusen sowohl eine normale prozentuale Verteilung als auch eine zu den Kontrolltieren vergleichbare Gesamtzellzahl der vier Thymozyten-Populationen: CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> doppelt-positive (DP), CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> doppelt-negative (DN), CD4<sup>+</sup> einfach-positive (CD4 SP) und CD8<sup>+</sup> einfach-positive Thymozyten (CD8 SP) (Abb. 24B, C).

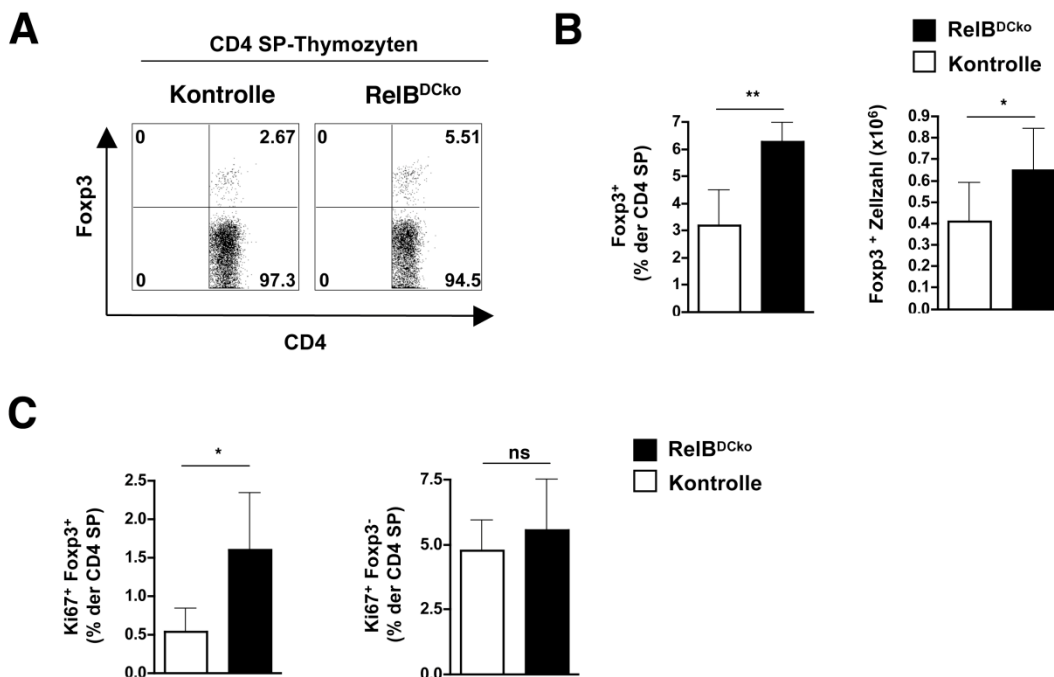


**Abb. 24: Durchflusszytometrische Analyse der Thymozyten-Populationen im Thymus von RelB<sup>DCKO</sup> Mäusen und Kontrollmäusen.** (A) Zellsuspensionen aus Thymi von Kontrollmäusen (CD11cCRE (n = 3), RelB<sup>fl/fl</sup> (n = 5)) und RelB<sup>DCKO</sup> Mäusen (n = 6) wurden hinsichtlich ihrer Zellularität verglichen. (B) Repräsentative FACS-Analyse der Thymozyten-Populationen anhand der Expression von CD4 und CD8. Dargestellte Punkte-Diagramme zeigen nur lebende Zellen innerhalb des FSC/SSC. Die Zahlen innerhalb der Quadranten geben die Frequenz der jeweiligen Population innerhalb der Gesamthymozyten an. (C) Prozentualer Anteil der verschiedenen Thymozyten-Populationen in Bezug auf die Gesamthymozyten sowie absolute Zellzahlen der Thymozyten-Populationen von Kontrollmäusen (CD11cCRE (n = 3), RelB<sup>fl/fl</sup> (n = 5)) und RelB<sup>DCKO</sup> Mäusen (n = 6). CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> doppelt-positive Thymozyten (DP), CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> doppelt-negative (DN), CD4<sup>+</sup> einfach-positive (CD4 SP), CD8<sup>+</sup> einfach-positive Thymozyten (CD8 SP). (A, C) Dargestellt sind die Mittelwerte + SD. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney Tests: ns = nicht signifikant.

Eine genaue Betrachtung der Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> innerhalb der CD4 SP Thymozyten zeigte, dass deren Frequenz als auch deren absolute Zellzahl in RelB<sup>DCKO</sup> Mäusen um fast 100% bzw. 60% gegenüber den Kontrolltieren erhöht war (Abb. 25A, B). Um herauszufinden, inwiefern eine Proliferation der Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> bei dieser Zunahme eine Rolle spielt, wurden die Zellen zusätzlich für den Proliferationsmarker Ki67 gefärbt. Ki67 wird in allen aktiven Phasen des Zellzyklus (G1-, S-, G2-Phase) exprimiert, kann jedoch nicht in ruhenden Zellen (G0-Phase)

nachgewiesen werden [245]. Anhand von Abbildung 25C wird ersichtlich, dass der Anstieg an  $\text{Foxp3}^+$   $\text{T}_{\text{regs}}$  im Thymus u.a. auf eine verstärkte Proliferation dieser Zellen zurückzuführen ist. In  $\text{RelB}^{\text{DCKo}}$  Mäusen ist die Frequenz an  $\text{Ki67}^+$   $\text{Foxp3}^+$   $\text{T}_{\text{regs}}$  im Vergleich zu den Kontrollmäusen wesentlich erhöht. Hingegen zeigten die  $\text{Foxp3}^-$  Thymozyten keine signifikanten Unterschiede in der Proliferation (Abb. 25C).

Somit konnte gezeigt werden, dass eine Inaktivierung von RelB in DZ bereits im Thymus zu einer erhöhten Proliferation von  $\text{nT}_{\text{regs}}$  führt.



**Abb. 25: Erhöhte Proliferation von  $\text{T}_{\text{regs}}$  im Thymus von  $\text{RelB}^{\text{DCKo}}$  Mäusen.** (A) Repräsentative FACS-Analyse der CD4- und Foxp3-Expression innerhalb der CD4 SP-Thymozyten im Thymus von einer Kontrollmaus ( $\text{RelB}^{\text{fl/fl}}$ ) und einer  $\text{RelB}^{\text{DCKo}}$  Maus. Die Frequenzen der jeweiligen Populationen sind innerhalb der Quadranten dargestellt. (B) Prozentualer Anteil der  $\text{Foxp3}^+$  T-Zellen in Bezug auf die CD4 SP Thymozyten sowie absolute Zellzahlen der  $\text{Foxp3}^+$  T-Zellen im Thymus von Kontrollmäusen ( $\text{CD11cCRE}$  (n = 1),  $\text{RelB}^{\text{fl/fl}}$  (n = 5)) und  $\text{RelB}^{\text{DCKo}}$  Mäusen (n = 4). (C) Prozentualer Anteil der proliferierenden  $\text{Ki67}^+$   $\text{Foxp3}^+$  und  $\text{Foxp3}^-$  Thymozyten in Bezug auf CD4 SP Thymozyten im Thymus von Kontrollmäusen ( $\text{CD11cCRE}$  (n = 1),  $\text{RelB}^{\text{fl/fl}}$  (n = 5)) und  $\text{RelB}^{\text{DCKo}}$  Mäusen (n = 4). (B,C) Dargestellt sind die Mittelwerte + SD. Die Signifikanzwerte wurden anhand des Mann-Whitney Tests ermittelt: ns = nicht signifikant, \* p < 0.05, \*\* p < 0.01.

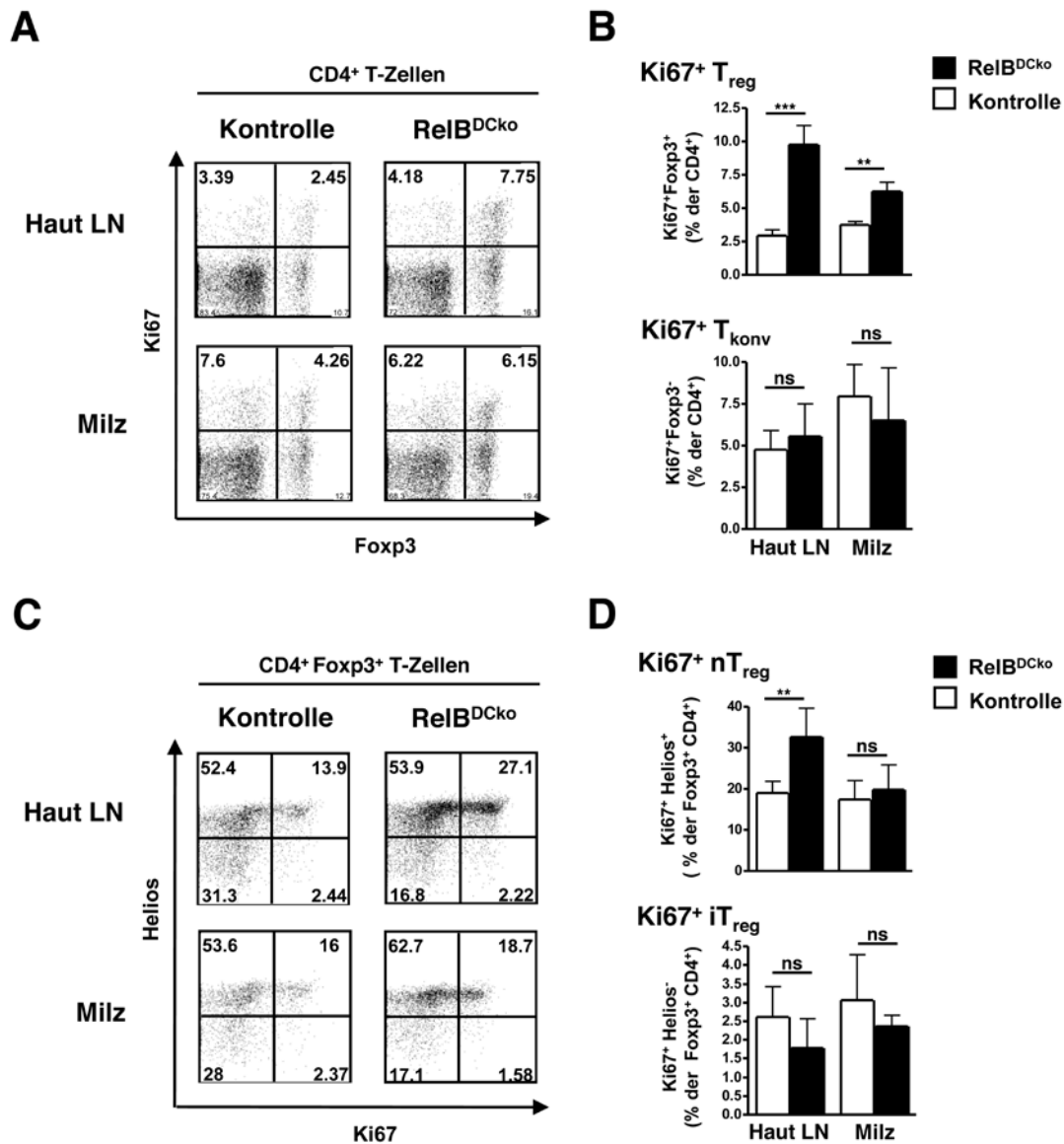
#### **4.3.10. Verstärkte Proliferation von Helios<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> in hautdrainierenden Lymphknoten von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen**

T<sub>regs</sub> wandern nach der Reifung im Thymus in die Peripherie aus, um dort eine Toleranz gegenüber Selbstantigenen aufrecht zu erhalten [239]. In Mäusen mit einer RelB-Defizienz in DZ spiegelte sich die Zunahme an nT<sub>regs</sub> im Thymus (4.3.9) auch in einem Anstieg dieser Zellen in der Peripherie wieder (4.3.8). Unklar blieb allerdings, ob die Zunahme an peripheren nT<sub>regs</sub> allein auf einer erhöhten Proliferation dieser Zellen im Thymus beruht oder ob auch eine verstärkte Proliferation in der Peripherie eine Rolle spielt.

Zur Klärung dieser Frage wurde zunächst die Proliferation von Foxp3<sup>+</sup> Gesamt-T<sub>regs</sub> innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den hautdrainierenden Lymphknoten und der Milz von RelB<sup>DCko</sup> und Kontrollmäusen durchflusszytometrisch untersucht. Es zeigte sich, dass in RelB<sup>DCko</sup> Tieren Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> in den hautdrainierenden Lymphknoten im Vergleich zu den Kontrolltieren wesentlich stärker proliferierten und dass dieser Effekt auch höher ausfiel als in der Milz (Abb. 26A, B). Im Gegensatz dazu konnten keine signifikante Unterschiede in der Proliferation von Foxp3<sup>-</sup> T<sub>konv</sub> in den hautdrainierenden Lymphknoten und der Milz von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen festgestellt werden (Abb. 26A, B). Eine genauere Betrachtung der Proliferation der beiden T<sub>reg</sub>-Subpopulationen ergab, dass Helios<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> nT<sub>regs</sub> in den hautdrainierenden Lymphknoten von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen um mehr als die Hälfte stärker proliferierten als in Kontrollmäusen. Die Milzen beider Mäuse wiesen hinsichtlich der Frequenz an Ki67<sup>+</sup> Helios<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> nT<sub>regs</sub> keine beträchtlichen Unterschiede auf. Die Proliferation der Helios<sup>-</sup> Foxp3<sup>+</sup> iT<sub>regs</sub> schien zwar in den lymphatischen Organen der RelB<sup>DCko</sup> Mäuse reduziert, jedoch war die Reduktion im Vergleich zu den Kontrolltieren nicht signifikant (Abb. 26C, D).

Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass die erhöhte Frequenz an peripheren Helios<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> in RelB<sup>DCko</sup> Mäusen z.T. auch auf einer verstärkten Expansion dieser Zellen in den hautdrainierenden Lymphknoten beruht.

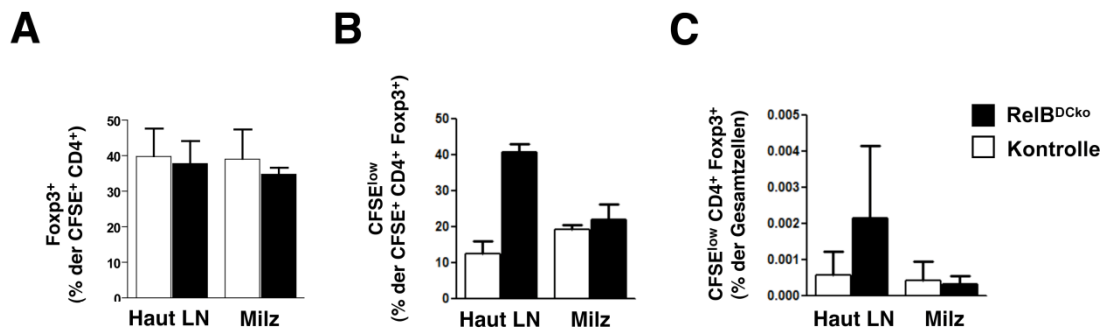




**Abb. 26: Erhöhte Proliferation von Helios<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> in den hautdrainierenden Lymphknoten, aber nicht in der Milz von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen.** (A) Repräsentative FACS-Analyse der Ki67- und Foxp3-Expression innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den hautdrainierenden Lymphknoten und der Milz einer Kontrollmaus (RelB<sup>fl/fl</sup>) und einer RelB<sup>DCko</sup> Maus. Die Frequenzen der einzelnen Populationen sind innerhalb der Quadranten dargestellt. (B) Prozentualer Anteil der Ki67<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> und Ki67<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup> T-Zellen in Bezug auf die Gesamt-CD4<sup>+</sup> T-Zellen in hautdrainierenden Lymphknoten und Milz von Kontrollmäusen (CD11cCRE (n = 3), RelB<sup>fl/fl</sup> (n = 5)) und RelB<sup>DCko</sup> Mäusen (n = 6). Dargestellt sind die Mittelwerte + SD. (C) Repräsentative FACS-Analyse der Ki67- und Helios-Expression innerhalb der CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen in den hautdrainierenden Lymphknoten und der Milz einer Kontrollmaus (RelB<sup>fl/fl</sup>) und einer RelB<sup>DCko</sup> Maus. Die Frequenzen der jeweiligen Populationen sind innerhalb der Quadranten dargestellt. (D) Prozentualer Anteil der Ki67<sup>+</sup> Helios<sup>+</sup> nTregs in Bezug auf die CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen in hautdrainierenden Lymphknoten und Milz von Kontrollmäusen (CD11cCRE (n = 1), RelB<sup>fl/fl</sup> (n = 5)) und RelB<sup>DCko</sup> Mäusen (n = 6). Dargestellt sind die Mittelwerte + SD. (C,D) Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney Tests: ns = nicht signifikant, \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001

### 4.3.11. Expansion von adoptiv transferierten $T_{\text{regs}}$ in den hautdrainierenden Lymphknoten von $\text{RelB}^{\text{DCKO}}$ Mäusen

Um die Proliferation von  $T_{\text{regs}}$  in den peripheren lymphatischen Organen der  $\text{RelB}^{\text{DCKO}}$  Mäuse näher zu untersuchen, wurden  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$  T-Zellen von WT Mäusen isoliert, mit CFSE markiert und intravenös in  $\text{RelB}^{\text{DCKO}}$  Mäuse sowie Kontrollmäuse injiziert. Nach 8 Tagen erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse der transferierten T-Zellen anhand der CFSE-Markierung und der Expression von  $\text{CD4}$  und  $\text{Foxp3}$ . Wie in Abbildung 27A zu sehen ist, exprimierten in den peripheren lymphatischen Organen der Empfängermäuse durchschnittlich 35 bis 40% der adoptiv transferierten T-Zellen  $\text{Foxp3}$ . Anschließend wurde innerhalb der transferierten  $\text{Foxp3}^+ T_{\text{regs}}$  der prozentuale Anteil der proliferierenden ( $\text{CFSE}^{\text{low}}$ ) Zellen ermittelt. Hierbei konnten in den hautdrainierenden Lymphknoten von  $\text{RelB}^{\text{DCKO}}$  Mäusen wesentlich mehr proliferierende  $\text{CD4}^+ \text{Foxp3}^+ T_{\text{regs}}$  detektiert werden als in den Kontrollmäusen (Abb. 27B). Der Anstieg an proliferierenden  $T_{\text{regs}}$  in den hautdrainierenden Lymphknoten von  $\text{RelB}^{\text{DCKO}}$  Mäusen war bezogen auf die Gesamtzellen erhöht, jedoch nicht signifikant gegenüber der Kontrolle verändert (Abb. 27C). Im Gegensatz dazu waren in der Milz der  $\text{RelB}^{\text{DCKO}}$  Mäuse keine Unterschiede in der Frequenz der proliferierenden  $\text{CD4}^+ \text{Foxp3}^+ T_{\text{regs}}$  im Vergleich zur Kontrolle festzustellen. Dies betraf die prozentualen Anteile dieser Zellen sowohl in Bezug auf die transferierten  $\text{CFSE}^+ \text{CD4}^+ \text{Foxp3}^+$  Zellen (Abb. 27B) als auch in Bezug auf die Gesamtzellen (Abb. 27C).



**Abb. 27: Adoptiv transferierte  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+ T_{\text{regs}}$  expandieren in den hautdrainierenden Lymphknoten, aber nicht in der Milz von  $\text{RelB}^{\text{DCKO}}$  Mäusen.** (A-C)  $3 \times 10^6$  CFSE-gefärbte  $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$  T-Zellen von WT-Mäusen wurden intravenös in  $\text{RelB}^{\text{DCKO}}$  Mäuse oder Kontrollmäuse ( $\text{RelB}^{\text{fl/fl}}$ ) injiziert. Nach 8 Tagen wurden die adoptiv transferierten Zellen in den hautdrainierenden Lymphknoten und der Milz durchflusszytometrisch für CFSE und die Expression von  $\text{CD4}$  und  $\text{Foxp3}$  untersucht. (A) Prozentuale Anteile der  $\text{Foxp3}^+$ -Zellen in Bezug auf die transferierten  $\text{CFSE}^+ \text{CD4}^+$  Zellen in den hautdrainierenden Lymphknoten und der Milz. (B) Frequenzen der proliferierenden ( $\text{CFSE}^{\text{low}}$ )-Zellen innerhalb der  $\text{CFSE}^+ \text{CD4}^+ \text{Foxp3}^+$  Zellen und rechts die Frequenzen der proliferierenden  $\text{CFSE}^{\text{low}} \text{CD4}^+ \text{Foxp3}^+$  Zellen innerhalb der Gesamtzellen der hautdrainierenden Lymphknoten und der Milz von  $\text{RelB}^{\text{DCKO}}$  Mäusen ( $n = 2$ ) und Kontrollmäusen ( $n = 2$ ). (A-C) Angegeben sind die Mittelwerte + SD aus zwei unabhängigen Experimenten mit  $n = 2$  Mäusen pro Genotyp.

Darüber hinaus konnten im Thymus beider Mauslinien keine adoptiv transferierten CFSE<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> wiedergefunden werden (Daten nicht gezeigt). Dies spricht gegen die Möglichkeit, dass die erhöhte Zahl an T<sub>regs</sub> im Thymus durch Einwanderung von peripheren T<sub>regs</sub> mitverursacht wird.

Zusammengefasst bestätigen diese Daten die vorherigen Beobachtungen, wonach der Anstieg an peripheren Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> in den RelB<sup>DCko</sup> Mäusen auch auf einer verstärkten Expansion dieser Zellen in peripheren Lymphknoten beruht (s. Abb. 26). In Übereinstimmung mit der FACS-Analyse von proliferierenden Ki67<sup>+</sup> Helios<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> nT<sub>regs</sub> (s. Abb. 26C, D) konnte auch hier eine erhöhte Proliferation von transferierten T<sub>regs</sub> in den hautdrainierenden Lymphknoten, nicht aber in der Milz der RelB<sup>DCko</sup> Mäuse festgestellt werden. Allerdings zeigten die vorangegangenen Untersuchungen auch, dass in der Milz von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen, ungeachtet von der Expression des Markers Helios, ebenfalls eine erhöhte Frequenz an proliferierenden Ki67<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> nachweisbar ist (s. Abb. 26A, B). Es stellte sich daher die Frage, welcher Mechanismus für die verstärkte Proliferation von T<sub>regs</sub> in beiden peripheren lymphatischen Organen von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen verantwortlich ist.

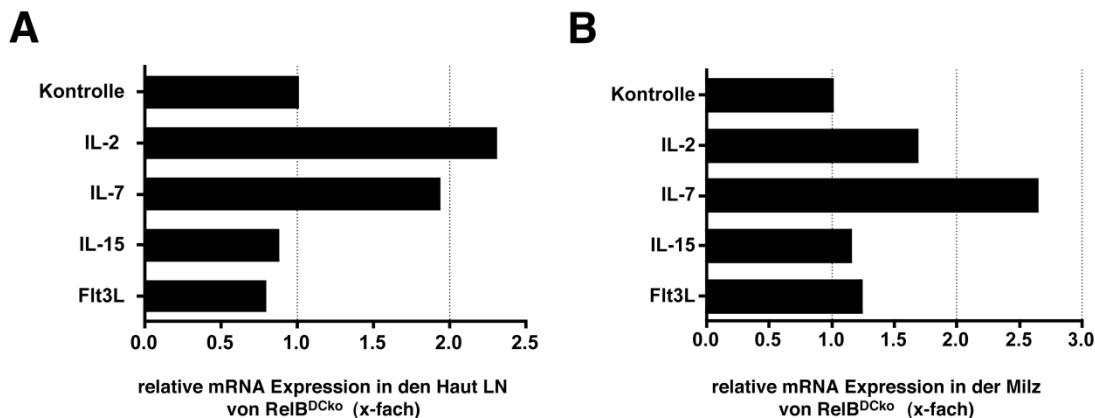
#### **4.3.12. Analyse von Faktoren, die eine erhöhte Proliferation von T<sub>regs</sub> in peripheren lymphatischen Organen von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen bewirken können**

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, gibt es verschiedene Faktoren, die die periphere Homöostase und Proliferation von T<sub>regs</sub> beeinflussen (s. 1.4.4). Hierzu zählen u.a. der Wachstumsfaktor Flt3L sowie das Zytokin IL-2 [119]. Um zu überprüfen, ob die RelB-Inaktivierung in DZ Auswirkungen auf die Expression dieser Moleküle hat, sollte in einem Vorversuch die RNA aus den Lymphknoten und der Milz von RelB<sup>DCko</sup> und Kontrolltieren isoliert und in eine quantitative *Real-Time*-PCR eingesetzt werden. Hierbei wurde die mRNA-Expression von Flt3L- und IL-2 in den lymphatischen Organen der RelB<sup>DCko</sup> Maus mit der in der Kontrollmaus verglichen. Zur Auswertung wurde die unter 3.9.2.6 beschriebene komparative CT-Methode angewandt. Die Werte der Kontrollmaus wurden dazu gleich 1 gesetzt. Wie in Abbildung 28 zu sehen ist, nimmt die relative mRNA-Expression von IL-2 in den hautdrainierenden Lymphknoten und der Milz von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen zu. Demgegenüber konnte für die mRNA-Expression von Flt3L in den beiden lymphatischen Organen von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen nur eine geringfügige Änderung gegenüber der Kontrolle festgestellt werden.

Darüber hinaus sollte die Genexpression weiterer  $\gamma$ -Zytokine wie IL-7 und IL-15 untersucht werden. Diese Zytokine spielen eine wichtige Rolle für die Proliferation und das Überleben

von naiven T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen [246]. Interessanterweise konnte für IL-7 sowohl in den hautdrainierenden Lymphknoten als auch in der Milz der RelB<sup>DCko</sup> Mäuse eine erhöhte mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden. Im Gegensatz dazu war die mRNA-Expression von IL-15 in den lymphatischen Organen von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen kaum gegenüber der Kontrolle verändert (Abb. 28A und B).

Die Ergebnisse dieses Versuchs deuten darauf hin, dass es durch die DZ-spezifische Inaktivierung von RelB zu einer erhöhten Expression von IL-2 und IL-7 in den peripheren lymphatischen Organen kommt.

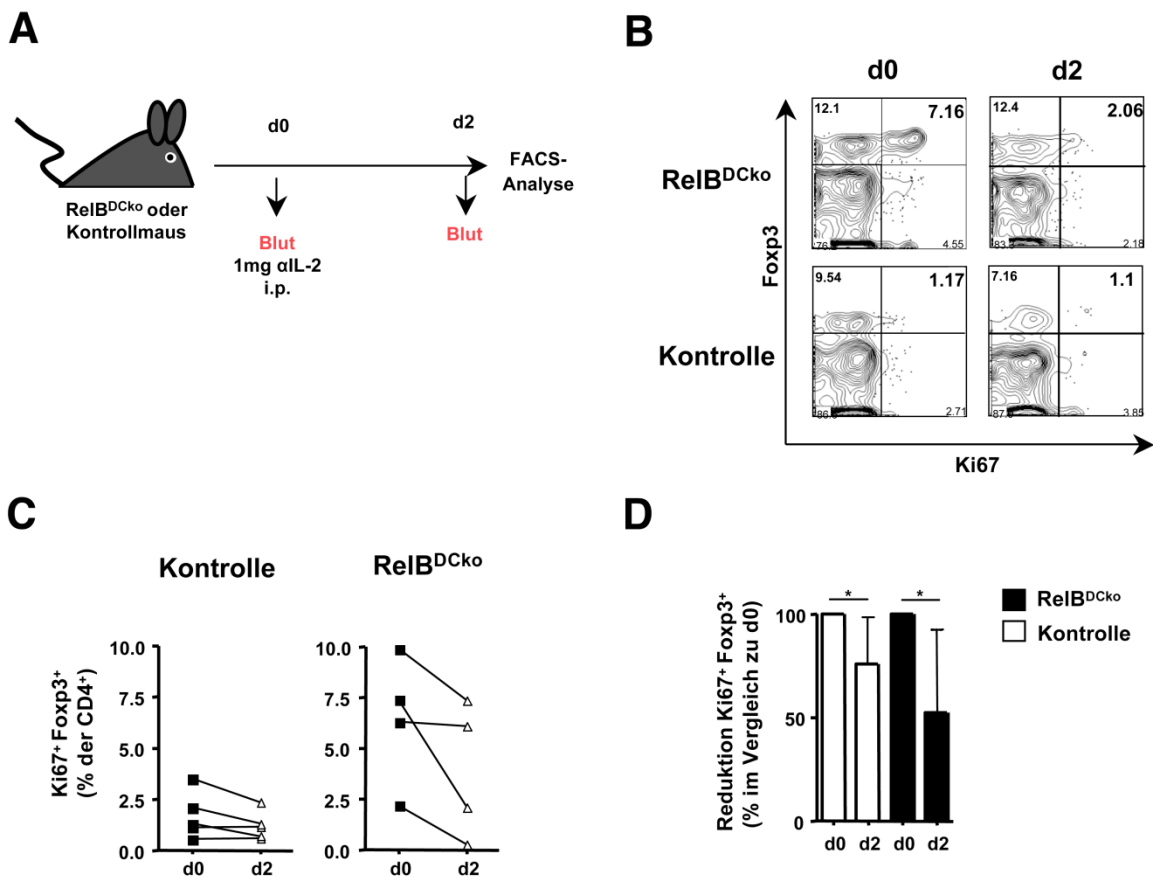


**Abb. 28: Relative mRNA Expression von IL-2, IL-7, IL-15 und Flt3L in den hautdrainierenden Lymphknoten und der Milz einer RelB<sup>DCko</sup> Maus im Vergleich zu einer Kontrollmaus.** Aus den Zellen der axialen Lymphknoten oder der Milz einer Kontrollmaus und einer RelB<sup>DCko</sup> Maus wurde RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und zur Bestimmung der relativen Expression von IL-2, IL-7, IL-15 und Flt3L in Duplikaten mittels qRT-PCR untersucht. Dargestellt ist die relative mRNA Expression dieser Zytokine in (A) den axialen Lymphknoten bzw. (B) der Milz der RelB<sup>DCko</sup> Maus in Bezug auf die Expression dieser mRNAs in den jeweiligen lymphatischen Organen der Kontrollmaus. Zur Auswertung wurde die komparative CT-Methode angewandt. Die Werte der Kontrollmaus wurden gleich 1 gesetzt. Als endogene Kontrolle diente die Expression der  $\beta$ -Actin mRNA. Die qRT-PCR wurde für jedes Organ der beiden Mäuse einmal durchgeführt.

Aufgrund der Tatsache, dass IL-2 das wichtigste Zytokin für die Erhaltung der peripheren T<sub>reg</sub>-Population ist [163], sollte im Folgenden untersucht werden, inwiefern eine Blockierung von IL-2 die Proliferation von T<sub>regs</sub> in RelB<sup>DCko</sup> Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen beeinträchtigt. Hierzu wurde den Tieren je 1 mg eines neutralisierenden  $\alpha$ IL-2-Antikörper (Klon S4B6) intraperitoneal injiziert. Dieser Antikörper verhindert die Bindung von IL-2 an CD25 [247] und führt zu einer selektiven Reduktion von CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> in WT Mäusen [164]. Um die Auswirkungen der IL-2-Blockade auf die Proliferation der T<sub>regs</sub> zu überprüfen, wurde den Tieren vor der Behandlung und zwei Tage danach Blut abgenommen und die Frequenz an Ki67<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Tregs innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 29A).

Ähnlich wie in den lymphatischen Organen konnte auch im Blut unbehandelter RelB<sup>DCko</sup> Mäuse eine gegenüber der Kontrolle erhöhte Frequenz an proliferierenden Ki67<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> festgestellt werden (Abb. 29B, C). Die Injektion des  $\alpha$ IL-2-Antikörpers führte bei 3 von 4 RelB<sup>DCko</sup> Mäusen sowie bei 3 von 5 Kontrollmäusen zu einer verringerten Frequenz an proliferierenden T<sub>regs</sub> im Blut (Abb. 29C). Die statistische Analyse ergab, dass an Tag 2 sowohl in den RelB<sup>DCko</sup> Mäusen als auch in den Kontrollmäusen signifikant weniger T<sub>regs</sub> proliferierten im Vergleich zu Tag 0. Darüber hinaus scheint in den RelB<sup>DCko</sup> Mäusen die Reduktion an Ki67<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> tendenziell stärker zu verlaufen als in den Kontrollmäusen (Abb. 29D).

Zusammenfassend deuten diese Daten darauf hin, dass die Proliferation von T<sub>regs</sub> in RelB<sup>DCko</sup> Mäusen von IL-2 abhängig ist.



**Abb. 29: IL-2-abhängige Reduktion von proliferierenden T<sub>regs</sub> im Blut von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen nach Injektion eines neutralisierenden  $\alpha$ IL-2 Antikörpers.** (A) Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. RelB<sup>DCko</sup> Mäusen bzw. Kontrollmäusen wurde intraperitoneal (i.p.) 1 mg  $\alpha$ IL-2-Antikörper (Klon S4B6) verabreicht. Vor der Gabe von  $\alpha$ IL-2 sowie 2 Tage danach wurde den Tieren Blut abgenommen und dieses durchflusszytometrisch untersucht. (B) Repräsentative FACS-Analyse der Ki67- und Foxp3-Expression innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Blut von  $\alpha$ IL-2-behandelten RelB<sup>DCko</sup> Mäusen und Kontrollmäusen an Tag 0 vor und an Tag 2 nach Antikörpergabe. Die Frequenzen der jeweiligen Populationen sind innerhalb der

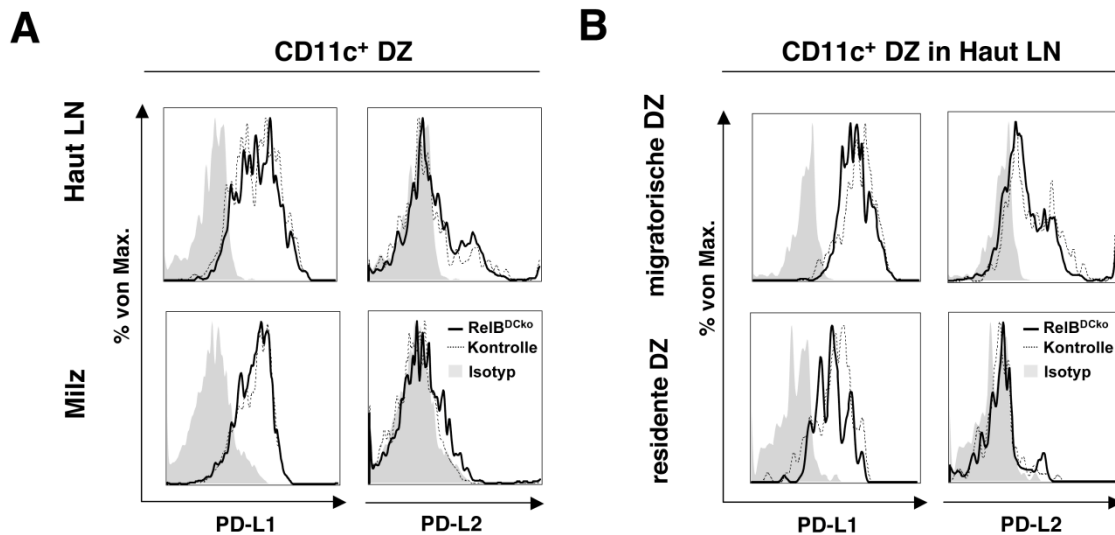
Quadranten dargestellt. (C) Prozentualer Anteil proliferierender Ki67<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Blut von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen (n = 4) und Kontrollmäusen (RelB<sup>fl/fl</sup>, n = 5) an Tag 0 vor und Tag 2 nach Antikörpergabe. Verbundene Symbole repräsentierten die Werte des gleichen Tiers. (D) Dargestellt ist der prozentuale Anteil Ki67<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Blut von RelB<sup>DCko</sup> (n = 4) und Kontrollmäusen (RelB<sup>fl/fl</sup>, n = 5) an Tag 2 bezogen auf die Frequenz dieser Zellen an Tag 0. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des gepaarten Student's T-Test: \* p < 0.05.

#### **4.3.13. Erhöhte Expression von PD-1 auf T<sub>reg</sub> und T<sub>konv</sub> der peripheren lymphatischen Organe von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen**

Bei der Proliferation von T<sub>regs</sub> kann neben den bereits besprochenen Faktoren auch das koinibitorische Molekül PD-1 eine Rolle spielen [248]. PD-1 gehört zur CD28-Superfamilie und wird von aktivierten B- und T-Zellen sowie von T<sub>regs</sub> exprimiert [249]. Es bindet an die beiden Liganden PD-L1 und PD-L2, die u.a. von DZ exprimiert werden. Während DZ PD-L1 konstitutiv exprimieren und nach Aktivierung noch weiter hochregulieren, erfolgt die Expression von PD-L2 erst nach der Stimulation der DZ [249]. Interaktionen zwischen PD-1 und dessen Liganden können die Proliferation und Funktion von T-Zellen sowohl inhibieren als auch aktivieren [249].

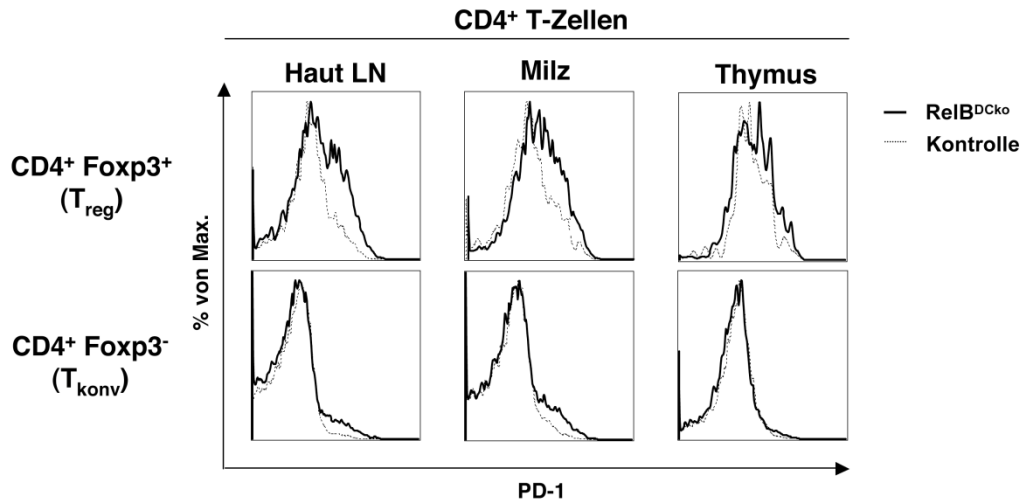
Im Folgenden sollte zunächst überprüft werden, ob die Expression von PD-L1 und PD-L2 durch die RelB-Inaktivierung in DZ beeinträchtigt ist. Anhand von durchflusszytometrischen Analysen konnte gezeigt werden, dass die DZ in den hautdrainierenden Lymphknoten und der Milz der RelB<sup>DCko</sup> Mäuse eine zur Kontrolle vergleichbare Expression von PD-L1 und PD-L2 aufwiesen (Abb. 30A).

Eine genauere Untersuchung der beiden DZ-Subpopulationen in den hautdrainierenden Lymphknoten führte zu der Feststellung, dass PD-L1 in vergleichbarem Maße auf den migratorischen und residenten DZ von RelB<sup>DCko</sup> und Kontrollmäusen exprimiert wird. PD-L2 war auf den migratorischen DZ beider Mauslinien hochreguliert, während residente DZ kein PD-L2 exprimierten (Abb. 30B).



**Abb. 30: Expression von PD-L1 und PD-L2 auf DZ von RelB<sup>DCKo</sup> Mäusen und Kontrollmäusen.** Durchflusszytometrische Analyse der Expression von PD-L1 und PD-L2 (A) auf CD11c<sup>+</sup> DZ aus hautdrainierenden Lymphknoten und der Milz von RelB<sup>fl/fl</sup> Kontroll- und RelB<sup>DCKo</sup> Mäusen sowie (B) auf migratorischen (CD11c<sup>+</sup> CD40<sup>hi</sup>) und residenten DZ (CD11c<sup>+</sup> CD40<sup>hi</sup>) aus den hautdrainierenden Lymphknoten von Kontroll- und RelB<sup>DCKo</sup> Mäusen (A, B) Dargestellt sind die Daten eines repräsentativen Experiments von zwei Experimenten mit ähnlichen Resultaten.

Um die PD-1 Expression auf den T<sub>regs</sub> und T<sub>konv</sub> zu untersuchen, wurden die T-Zellen aus verschiedenen lymphatischen Organen von RelB<sup>DCKo</sup> und Kontrollmäusen für CD4, Foxp3 und PD-1 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Hierbei zeigte sich, dass sowohl die T<sub>regs</sub> als auch die T<sub>konv</sub> in den hautdrainierenden Lymphknoten und der Milz von RelB<sup>DCKo</sup> Mäusen wesentlich mehr PD-1 exprimierten als in den Kontrollmäusen. Demgegenüber konnte im Thymus der RelB<sup>DCKo</sup> Mäuse für beide T-Zellpopulationen eine gegenüber der Kontrolle vergleichbare Expression von PD-1 festgestellt werden (Abb. 31).



**Abb. 31: Expression von PD-1 auf T-Zellen von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen und Kontrollmäusen.** Zellen aus den hautdrainierenden Lymphknoten, der Milz und dem Thymus von Kontrollmäusen (RelB<sup>fl/fl</sup>) und RelB<sup>DCko</sup> Mäusen wurden für CD4, PD-1 und intrazellulär für Foxp3 gefärbt. Gezeigt ist die die Expression von PD-1 auf T<sub>konv</sub> (CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup>) sowie T<sub>reg</sub> (CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>). Dargestellt sind die Daten eines repräsentativen Experiments von zwei Experimenten mit ähnlichen Resultaten.



## 5. DISKUSSION

### 5.1. Tolerogenes Potential von ssmDZ in den hautdrainierenden Lymphknoten

DZ spielen eine wesentliche Rolle bei der Induktion von Foxp3<sup>+</sup> iT<sub>regs</sub> in den peripheren lymphatischen Organen [152, 250]. Allerdings ist relativ wenig darüber bekannt, welche DZ in welchem Reifungszustand in der Lage sind, die Differenzierung von iT<sub>regs</sub> gegen Selbstantigene aus peripheren Geweben zu vermitteln. Die vorliegende Arbeit gibt nun Hinweise darauf, wie diese Wissenslücke zumindestens für die Induktion von iT<sub>regs</sub> gegen Selbstantigene aus der Haut geschlossen werden kann. Hierzu wurde der Phänotyp sowie das tolerogene Potential der ssmDZ in den hautdrainierenden Lymphknoten näher untersucht.

#### 5.1.1. SsmDZ in den hautdrainierenden Lymphknoten zeigen einen semireifen Phänotyp

Vor Beginn dieser Arbeit wurde bereits gezeigt, dass es in den hautdrainierenden Lymphknoten von Mäusen eine Population reifer DZ gibt, die sich durch eine relativ hohe Expression von MHC II und kostimulatorischen Molekülen wie CD40, CD80 und CD86 auszeichnet [62, 63, 251]. Weitere Analysen führten zu der Feststellung, dass es sich um migratorische DZ handelt, die unter homöostatischen Bedingungen in Abhängigkeit von CCR7 aus der Haut in die drainierenden Lymphknoten einwandern [76]. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen konnten auch wir migratorische CD40<sup>hi</sup> CCR7<sup>+</sup> DZ in den hautdrainierenden Lymphknoten von WT Mäusen nachweisen, die in CCR7-defizienten Mäusen fehlten. Im Vergleich zu den im Lymphknoten residenten CD40<sup>low</sup> DZ exprimierten die migratorischen CD40<sup>hi</sup> DZ mehr MHC II und kostimulatorische Moleküle, waren jedoch nicht in der Lage, proinflammatorische Zytokine zu produzieren (Daten aus dieser Arbeit und von H. Azukizawa, [252]). Die Ergebnisse führten zu dem Schluss, dass die ssmDZ in den hautdrainierenden Lymphknoten phänotypisch den bereits beschriebenen semireifen und zugleich tolerogenen DZ [40, 41, 43] sehr ähnlich sind.

#### 5.1.2. Induktion von Foxp3<sup>+</sup> iT<sub>regs</sub> durch ssmDZ in den hautdrainierenden Lymphknoten

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, existieren verschiedene *in vivo*-Modelle, die eine Induktion von Foxp3<sup>+</sup> iT<sub>regs</sub> in den peripheren lymphatischen Organen der Maus zeigen [135, 136]. Diese Studien gaben jedoch keinen Aufschluss darüber, welche DZ unter

physiologischen Bedingungen und ohne Gabe von Antikörpern für die  $iT_{reg}$ -Konversion verantwortlich sind. Anhand von *in vitro*-Versuchen war es allerdings möglich, einige DZ Subpopulationen in den peripheren lymphatischen Organen zu identifizieren, die an der Generierung von  $Foxp3^+ iT_{regs}$  *in vivo* beteiligt sein könnten. So besaßen in Übereinstimmung mit den *in vivo* Befunden zur  $T_{reg}$ -Induktion durch Injektion von Antigen-beladenen DEC205-Antikörpern [135],  $CD8\alpha^+ DEC205^+$  DZ aus der Milz die Fähigkeit, naive T-Zellen *in vitro* in  $Foxp3$ -exprimierende  $T_{regs}$  zu konvertieren [159]. Aus den mesenterischen Lymphknoten und der Lamina propria wurden  $CD103^+$  DZ isoliert, die ebenfalls  $Foxp3^+ iT_{regs}$  induzieren konnten [146, 147]. Jedoch war im Vorfeld dieser Arbeit kaum etwas darüber bekannt, welche DZ für die Generierung von  $iT_{regs}$  gegen Selbstantigene aus der Haut verantwortlich sind. Einzig eine Studie von Williams *et al.* zeigte, dass  $CD103^-$  DZ aus den hautdrainierenden Lymphknoten *in vitro*  $iT_{regs}$  induzieren können [160]. *In vivo* Studien hierzu fehlten.

Anhand des K5mOVA-Mausmodells konnte nun gezeigt werden, dass ssmDZ die Kapazität besitzen, zellassoziertes epidermales OVA aus der Haut in die drainierenden Lymphknoten zu transportieren und dort naiven OVA-spezifischen  $CD4^+ CD25^- OT-II$  T-Zellen zur Induktion von  $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+ T_{regs}$  zu präsentieren (Daten aus dieser Arbeit und von H. Azukizawa, [252]). Darüber hinaus bewirkten die ssmDZ auch *in vitro* nach Zugabe von exogenem OVA-Peptid eine Differenzierung von naiven OT-II T-Zellen in  $Foxp3^+ T_{regs}$ . Weitere Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe demonstrierten zudem, dass die im Lymphknoten vorhandenen residenten DZ nicht an der Antigenpräsentation und  $T_{reg}$ -Konversion in K5mOVA-Mäusen beteiligt sind (Daten von H. Azukizawa, [252]). Ein möglicher Transfer der epidermalen Antigene von migratorischen DZ auf residente DZ, wie er für mikrobielle Antigene beschrieben wurde [253], konnte somit ausgeschlossen werden.

Überraschenderweise war die  $T_{reg}$ -Konversionsrate von OT-II T-Zellen in den hautdrainierenden Lymphknoten von K5mOVA-Mäusen mit 2 – 3,5% recht gering. Andere Studien, die eine periphere Induktion von  $T_{regs}$  *in vivo* zeigen, konnten bis zu 20% konvertierte  $Foxp3^+ T_{regs}$  in den sekundären lymphatischen Organen beobachten [135, 146, 147]. Dies könnte darin begründet sein, dass es sich bei dem hier verwendeten Neo-Selbstantigenmodell um ein relativ physiologisches System handelt, indem nur wenig endogen exprimiertes Antigen von nur wenigen ssmDZ präsentiert wird. Demgegenüber beruhen die bereits publizierten *in vivo*-Studien auf der Antigenbeladung von DZ durch Antikörper, der Verwendung lymphopenischer Mäuse oder der Gabe großer Mengen an oral verabreichtem Antigen [135, 146, 147]. Allerdings könnte die geringe  $T_{reg}$ -Konversionsrate auch mit einer verminderten intrinsischen Kapazität des OT-II TZR zur T-Zellaktivierung bzw.

Foxp3-Induktion verbunden sein. Für Letzteres spricht, dass auch bei den hier durchgeführten *in vitro* Experimenten nur geringe  $T_{\text{reg}}$ -Konversionsraten erreicht worden. Einhergehend damit zeigten Publikationen, die ebenfalls naive OT-II T-Zellen für ähnliche *in vitro*-Konversionsversuche verwendeten, eine vergleichbare Rate an induzierten  $\text{Foxp3}^+ T_{\text{regs}}$  [156, 160], während der Einsatz von anderen TZR-transgenen T-Zellen zu höheren  $T_{\text{reg}}$ -Konversionsraten führte [159]. Jedoch ist hierbei zu berücksichtigen, dass *in vitro* auch die unterschiedlichen Kulturbedingungen wie z.B. das Verhältnis von DZ zu T-Zellen, die eingesetzte Antigenosis und die Zugabe von TGF- $\beta$  eine wichtige Rolle spielen können [158].

Apostolou *et al.* konnten zeigen, dass die kontinuierliche Abgabe geringer Mengen löslicher Antigene durch eine unter die Haut implantierte osmotische Pumpe zu einer *de novo* Konversion von  $T_{\text{regs}}$  in den peripheren Lymphknoten führt [136]. Es wurde vermutet, dass in diesem Modell die Lymphknoten-residenten DZ, die mit dem retikulären Röhrensystem verbunden sind, die löslichen Antigene aufnehmen und antigenspezifische  $iT_{\text{regs}}$  induzieren. Experimente in unserer Arbeitsgruppe zeigten jedoch, dass geringe Mengen eines löslichen Antigens nicht über retikuläre Röhren zu residenten DZ gelangen, sondern in der Haut von ssmDZ aufgenommen und zur Induktion von  $iT_{\text{regs}}$  in den hautdrainierenden Lymphknoten an naive T-Zellen präsentiert werden. Nur hohe Dosen eines löslichen Antigens konnten bei Lymphknoten-residenten DZ zu einer effektiven T-Zellstimulation führen (Daten von H. Azukizawa, [252]). Zusammen mit den Daten in dieser Arbeit deuten diese Beobachtungen darauf hin, dass nur ssmDZ dazu in der Lage, sowohl geringe Mengen eines löslichen Antigens als auch eines zellassozierten Antigens aus der Haut in die drainierenden Lymphknoten zu transportieren, um dort antigenspezifische  $iT_{\text{regs}}$  zu induzieren.

Wie bereits oben erwähnt, konnte in den mesenterischen Lymphknoten und der Lamina propria die tolerogene Kapazität zur  $T_{\text{reg}}$ -Konversion auf ein Subset eingegrenzt werden, das CD103 exprimiert. Im Gegensatz dazu wurden in den hautdrainierenden Lymphknoten die CD103<sup>-</sup> DZ als diejenigen DZ identifiziert, die  $\text{Foxp3}^+ T_{\text{regs}}$  induzieren [160]. Dies deutete bereits darauf hin, dass CD103 nicht als genereller Marker für tolerogene DZ verwendet werden kann. Unsere Analysen bestätigten diese Annahme, indem gezeigt werden konnte, dass CD103 zu etwa gleichen Teilen auf einer Subpopulation von migratorischen und residenten DZ in den hautdrainierenden und mesenterischen Lymphknoten exprimiert wird. Diese Untersuchung verdeutlichte zudem, dass es sich bei den ssmDZ nicht um eine definierte DZ-Population, sondern vielmehr um verschiedene DZ-Subpopulationen handelt.

Es stellte sich daher die Frage, welche DZ innerhalb der ssmDZ für die Konversion von  $iT_{reg}$  gegen epidermales OVA in K5mOVA-Mäusen verantwortlich sind. Bekannt ist, dass die migratorischen DZ aus der Haut vor allem aus LZ und Langerin<sup>+</sup> sowie Langerin<sup>-</sup> dDZ gebildet werden [51]. Da LZ in der Epidermis von K5mOVA-Mäusen direkt an das epidermale OVA gelangen, wurde anfangs vermutet, dass diese Zellen für die  $iT_{reg}$ -Generierung in den hautdrainierenden Lymphknoten verantwortlich sein könnten. Allerdings konnte im Rahmen dieser Arbeit in den Knochenmarkchimären, in denen nur die strahlenresistenten LZ die Fähigkeit besaßen, epidermales OVA an naive OT-II T-Zellen zu präsentieren, keine  $iT_{reg}$ -Konversion nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe zeigten zudem, dass in K5mOVA-Mäuse, in denen sowohl LZ als auch Langerin<sup>+</sup> dDZ depletiert worden, keine Differenzierung von  $iT_{reg}$  stattfindet (Daten von H. Azukizawa, [252]). Zusammengenommen deuten diese Beobachtungen darauf hin, dass die migratorischen Langerin<sup>+</sup> dDZ in den hautdrainierenden Lymphknoten die Induktion von Foxp3<sup>+</sup>  $iT_{reg}$  gegen epidermale Selbstantigene vermitteln. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit weiteren Studien am K5mOVA-Modell, die zeigen, dass innerhalb der hautmigrierenden DZ vor allem Langerin<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> dDZ epidermal exprimiertes OVA an OVA-spezifische TZR-transgene CD8<sup>+</sup> T-Zellen (OT-I) kreuzpräsentieren können [229, 230]. Als Folge dieser Kreuzpräsentation kommt es zu einer Deletion der OT-I T-Zellen und somit zur Induktion von Kreuztoleranz [228].

Offen bleibt allerdings, wie die Langerin<sup>+</sup> dDZ unter homöostatischen Bedingungen an die epidermalen Antigene gelangen. In der Literatur werden dazu verschiedene Mechanismen diskutiert [161, 254]: Zum einen könnte es sein, dass die dDZ selbst in die Epidermis einwandern oder deren dendritische Fortsätze hineinragen und es so zu einer Antigenaufnahme kommt. Für diese Theorie spricht, dass Langerin<sup>+</sup> dDZ nicht nur in der Dermis, sondern auch in der Nähe von Haarfollikel und in seltenen Fällen sogar zwischen den follikulären Epidermiszellen detektiert werden konnten [73, 74]. Es besteht allerdings auch die Möglichkeit, dass die LZ die epidermalen Antigene aufnehmen und diese nach Wanderung in die Dermis an dDZ abgeben. Neueste Daten von Henri *et al.* deuten jedoch darauf hin, dass LZ-assoziierte Antigene von dDZ nicht aufgenommen werden [230]. Darüber hinaus könnten die epidermalen Antigene auch ohne die Beteiligung von einwandernden LZ in die Dermis gelangen.

### 5.1.3. Wie vermitteln ssmDZ die periphere Induktion von Foxp3<sup>+</sup> iT<sub>regs</sub>?

Für die periphere Induktion von Foxp3<sup>+</sup> iT<sub>regs</sub> ist TGF-β von essentieller Bedeutung. Zusammen mit dem TZR-Signal und IL-2 vermittelt TGF-β die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 in naiven T-Zellen [112, 134]. Anhand von *in vitro*-Studien konnte bereits gezeigt werden, dass CD103<sup>+</sup> DZ aus den darmassoziierten lymphatischen Geweben endogenes TGF-β verwenden, um Foxp3-exprimierende iT<sub>regs</sub> zu generieren [146, 147]. Ähnliches wurde für CD8α<sup>+</sup> DEC205<sup>+</sup> DZ aus der Milz beschrieben [159]. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass auch ssmDZ, nicht aber residente DZ, aus den hautdrainierenden Lymphknoten endogenes TGF-β nutzen, um Foxp3<sup>+</sup> iT<sub>regs</sub> zu induzieren.

TGF-β wird in inaktiver Form als Komplex bestehend aus einem TGF-β Dimer in Assoziation mit LAP synthetisiert [255]. Diese TGF-β/LAP-Komplexe liegen nach Sekretion gebunden an sogenannte *latent-TGF-β-binding proteins* (LTBP) in der extrazellulären Matrix vor [255], können jedoch auch auf der Oberfläche von Zellen wie DZ [227] und aktivierten Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> [256] nachgewiesen werden. Unsere Daten belegen, dass in den hautdrainierenden Lymphknoten die ssmDZ im Vergleich zu residenten DZ mehr LAP und somit mehr membran-assoziierte TGF-β/LAP-Komplexe auf der Oberfläche exprimieren. Darüber hinaus führte die Zugabe von exogenem TGF-β bei ssmDZ nicht zu einer gesteigerten Induktion von iT<sub>regs</sub>. Dies legt die Vermutung nahe, dass ssmDZ TGF-β vor allem in Form von membran-assoziierten TGF-β/LAP-Komplexen für die iT<sub>reg</sub>-Konversion bereitstellen und diese im Falle der Zugabe von exogenem TGF-β miteinander konkurrieren anstatt synergistisch zu wirken. Allerdings kann anhand der Ergebnisse nicht eindeutig festgestellt werden, ob das membran-assoziierte TGF-β von den DZ selbst produziert wird oder aus dem umgebenden Milieu stammt. Innerhalb der hautmigrierenden DZ wurde bisher nur für die LZ eine Produktion von TGF-β nachgewiesen [257]. Daten zur TGF-β-Expression von migratorischen dDZ fehlen. Interessant ist jedoch, dass Zellen in der Umgebung von Gewebe-DZ wie z.B. die Epithelzellen im Darm und die Stromazellen in der Lunge in der Lage sind, durch Sekretion von immunregulatorischen Substanzen wie TGF-β das tolerogene Potential der DZ zu erhöhen, so dass diese Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> induzieren können [258, 259]. Es wäre daher durchaus denkbar, dass die aus der Haut stammenden migratorischen DZ durch ihre Nähe zu TGF-β-produzierenden Keratinozyten [260] ebenfalls tolerogen konditioniert und mit TGF-β ausgestattet werden. Da es sich bei den membran-assoziierten TGF-β/LAP-Komplexen um inaktives sogenanntes latentes TGF-β handelt, bleibt allerdings zu klären, inwiefern ssmDZ das TGF-β auf ihrer Oberfläche selbst aktivieren können.

Zur Induktion von  $iT_{regs}$  stellen  $CD103^+$  DZ in den darmassoziierten lymphatischen Geweben neben TGF- $\beta$  auch RA bereit [146, 147]. RA dient als Kofaktor der TGF- $\beta$ -vermittelten  $T_{reg}$ -Konversion, kann jedoch allein keine Foxp3-Expression in naiven T-Zellen induzieren [261]. In dieser Arbeit wurde die Produktion von RA durch ssmDZ in den hautdrainierenden Lymphknoten zwar nicht untersucht, allerdings gibt es Hinweise darauf, dass innerhalb der migratorischen DZ in den hautdrainierenden Lymphknoten  $CD103^-$  DZ RA synthetisieren und so *in vitro* eine  $iT_{reg}$ -Induktion verstärken können [160].

Neben der Bereitstellung von TGF- $\beta$  und RA spielt auch der Reifungszustand der DZ bei der Konversion von  $T_{regs}$  eine bedeutende Rolle. Unter homöostatischen Bedingungen *in vivo* gelten unreife DZ als diejenigen DZ, die  $iT_{regs}$  induzieren [152]. Damit einhergehend belegen verschiedene Publikationen, dass eine geringe TZR-Stimulation und wenige kostimulatorische Moleküle eine Induktion von Foxp3 $^+$   $iT_{regs}$  begünstigen [135, 155, 156]. Die vorliegende Arbeit zeigt jedoch, dass ssmDZ trotz partieller Reifung und der damit verbundenen intermediären Expression von MHC II und kostimulatorischen Molekülen in der Lage sind, Foxp3 $^+$   $iT_{regs}$  zu induzieren. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass ssmDZ aufgrund des endogenen bzw. membran-assoziierten TGF- $\beta$  die negativen Effekte einer DZ-Reifung auf die  $T_{reg}$ -Differenzierung kompensieren können. In Übereinstimmung damit konnte anhand von *in vitro*-Experimenten demonstriert werden, dass reife Milz-DZ unter Zugabe von exogenem TGF- $\beta$  eine gesteigerte  $T_{reg}$ -Konversionsrate aufweisen [155]. Die Wirkung von TGF- $\beta$  besteht hierbei vermutlich darin, den Bereich, in dem eine TZR-Stimulation zu einer Foxp3-Expression führt, zu erweitern, so dass auch eine stärkere TZR-Stimulation eine  $iT_{reg}$ -Induktion vermitteln kann [262]. Darüber hinaus könnte auch RA, produziert von den DZ selbst oder von benachbarten Epithelzellen [258], eine Rolle spielen. In Abhängigkeit von TGF- $\beta$  ermöglicht die Zugabe von RA bei reifen Milz-DZ *in vitro* eine zu unreifen DZ vergleichbare Konversionsrate. Man geht davon aus, dass RA die inhibitorischen Effekte von kostimulatorischen Molekülen auf tolerogenen DZ vermindert [155]. Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass kostimulatorische Moleküle wie CD80/CD86 auf DZ für die  $iT_{reg}$ -Konversion notwendig sind, indem sie durch Interaktion mit CD28 auf  $T_{konv}$  deren Produktion von IL-2 anregen und somit die Induktion von  $iT_{regs}$  fördern [158]. Unsere Daten deuten somit darauf hin, dass ssmDZ zwar nicht die höchste Kapazität zur  $T_{reg}$ -Konversion besitzen, aber aufgrund des endogenen TGF- $\beta$ /LAP und einer intermediären Expression von kostimulatorischen Molekülen in der Lage sind,  $iT_{regs}$  zu induzieren.

In diesem Zusammenhang sollte ebenso in Betracht gezogen werden, dass es sich bei den semireifen ssmDZ auch um einen evolutionären Kompromiss zwischen der Fähigkeit zur Migration (durch Hochregulation von CCR7) und dem Potential zur Induktion von Toleranz (durch Antigenpräsentation) handeln könnte [119]. Einhergehend damit zeigten erst kürzlich erschienene Veröffentlichungen, dass semireife ssmDZ auch in den hautdrainierenden Lymphknoten von Schwein und Mensch zu finden sind [263-265].

#### **5.1.4. Sind die semireifen ssmDZ in den hautdrainierenden Lymphknoten mit anderen bereits bekannten semireifen DZ vergleichbar?**

Semireife und zugleich tolerogene DZ wurden bereits *in vitro* und *in vivo* beschrieben [40, 41, 43]. Allerdings nutzen die verschiedenen semireifen DZ unterschiedliche Mechanismen zur Induktion von Toleranz. Semireife DZ, die *in vitro* durch TNF $\alpha$ -Stimulation oder Zerstörung der E-Cadherin-Interaktion generiert worden, vermitteln *in vivo* nach mehrmaliger Injektion Toleranz durch die Induktion von Foxp3<sup>-</sup> Tr1-Zellen [40, 41]. Ähnliches konnte für semireife DZ in den lungendrainierenden Lymphknoten von Mäusen beobachtet werden. Nach Inhalation des Modellantigens OVA sezernierten diese DZ verstärkt IL-10 und bewirkten die Generierung von OVA-spezifischen Foxp3<sup>-</sup> Tr1-Zellen [43]. Die hier untersuchten ssmDZ sind jedoch dazu in der Lage, Foxp3<sup>+</sup> iT<sub>regs</sub> zu induzieren. Dies lässt vermuten, dass der semireife Zustand einer DZ allein nicht bestimmt, in welcher Art und Weise diese DZ Toleranz induzieren. Vielmehr scheint es von Bedeutung zu sein, unter welchen Umständen es zu einer Semireifung kommt.

Im Falle der ssmDZ scheinen inflammatorische Signale wie TNF $\alpha$  keine Rolle für die partielle Reifung und letztlich Migration dieser Zellen zu spielen. TNFR-defiziente Mäuse weisen in den hautdrainierenden Lymphknoten normale Frequenzen an ssmDZ auf (nicht veröffentlichte Daten von N. Kanazawa). Auch kann ausgeschlossen werden, dass kommensale Mikroben, wie sie stets auf der Haut vorkommen, die partielle Reifung und Migration der ssmDZ auslösen. Weder in pathogenfrei-gehaltenen Mäusen noch in Mäusen, denen wichtige Komponenten des TLR-Signalweges fehlten, konnte eine verringerte Frequenz an migratorischen DZ in den hautdrainierenden Lymphknoten festgestellt werden ([65] und nicht veröffentlichte Daten von N. Kanazawa). Darüber hinaus ist die Entwicklung der semireifen DZ *in vitro* und *in vivo* grundlegend unterschiedlich und könnte ein Grund für die Varianz in der Toleranzinduktion darstellen. Während *in vitro*-generierte KM-DZ aus Monozyten unter standardisierten Kulturbedingungen hervorgehen, stammen ssmDZ von Prä-DZ ab (s. Abb. 3) [266].

Unklar bleibt jedoch, warum *in vivo* ssmDZ in den hautdrainierenden Lymphknoten Foxp3<sup>+</sup> iT<sub>regs</sub> gegen endogen exprimiertes OVA induzieren, während DZ in den lungendrainierenden Lymphknoten nach der Aufnahme von intranasal verabreichten OVA eine Induktion von Foxp3<sup>-</sup> Tr1-Zellen bewirken [43]. In diesem Zusammenhang wird diskutiert, ob das zur intranasalen Injektion verwendete OVA eventuell mit geringen Mengen Endotoxin verunreinigt war [267]. Dies würde erklären, warum die DZ in den lungendrainierenden Lymphknoten IL-10 produzieren, was unter pathogenfreien Bedingungen sonst nicht zu beobachten ist [267].

Zusammenfassend konnte in diesem Teil der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass ssmDZ in den hautdrainierenden Lymphknoten einen semireifen Phänotyp aufweisen und *in vitro* mit Hilfe von endogenem TGF- $\beta$  Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> induzieren können. Darüber hinaus waren die ssmDZ *in vivo* in der Lage, Selbstantigene aus der Haut in die drainierenden Lymphknoten zu transportieren und so eine Konversion von naiven antigenspezifischen T-Zellen in Foxp3-exprimierende T<sub>regs</sub> zu vermitteln. Innerhalb der ssmDZ konnten die Langerin<sup>+</sup> dDZ als die DZ-Subpopulation eingegrenzt werden, die für die Tolerisierung von T-Zellen gegen Selbstantigene aus der Haut verantwortlich war.

## **5.2. Rolle von RelB für die Reifung und Migration von ssmDZ und indirekt für die Induktion und Erhaltung von Foxp3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>**

Der Nachweis von semireifen ssmDZ in den hautdrainierenden Lymphknoten, warf die Frage auf, welche intrinsischen Signalmoleküle an der partiellen Reifung und letztlich Migration dieser DZ beteiligt sein könnten. Die NF- $\kappa$ B-Proteine stellen in diesem Zusammenhang interessante Kandidaten dar, da ihre Aktivierung stark mit der Entwicklung und Funktion von DZ verknüpft ist (Übersicht in [173, 195]). Insbesondere RelB als Teil des alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs wird mit der Differenzierung und Reifung von DZ in Verbindung gebracht [200, 201, 203, 204]. Die erhobenen Daten in dieser Doktorarbeit geben nun Hinweise darauf, welche Rolle RelB für die Reifung und Migration der ssmDZ spielt und inwiefern die Expression dieses Transkriptionsfaktors in DZ die Induktion und Homöostase von Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> beeinflusst.



### 5.2.1. Welchen Einfluss hat RelB auf die Reifung und Migration von ssmDZ ?

Bekannt ist, dass die Aktivierung von DZ mit einer nukleären Translokation und DNA-Bindung von RelB einhergeht [193, 206]. So bewirkt die Stimulation von *in vitro*-generierten DZ mit z.B. TNF $\alpha$  oder  $\alpha$ CD40 eine verstärkte RelB-Translokation in den Zellkern, während unstimulierte DZ kaum nukleäres RelB aufweisen [193, 204, 206, 211]. Einhergehend damit wurde in unreifen Gewebe-DZ wie den LZ in der Epidermis kein RelB gefunden [197-201]. Interdigitierende DZ in den lymphatischen Organen hingegen exprimieren RelB [197, 198] und interessanterweise konnte in eben diesen Organen bereits unter homöostatischen Bedingungen konstitutiv aktives RelB nachgewiesen werden [198, 231]. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass RelB möglicherweise bereits in den ssmDZ in den hautdrainierenden Lymphknoten nukleär vorliegt. Tatsächlich konnte in dieser Arbeit belegt werden, dass die semireifen ssmDZ aus den hautdrainierenden Lymphknoten nukleäres RelB aufweisen, während in den unreifen residenten DZ RelB inaktiv im Zytoplasma verbleibt. Hierbei war die nukleäre Translokation in den semireifen migratorischen DZ genauso stark ausgeprägt wie in den FITC<sup>+</sup> vollreifen DZ nach Kontakthypersensibilisierung. Andere NF- $\kappa$ B-Proteine wie RelA und cRel zeigten hingegen keine Korrelation in ihrer nukleären Expression mit der Ausprägung eines bestimmten DZ-Reifungsstadiums. In Einklang damit konnte die nukleäre Translokation von RelA und c-Rel auch bei unterschiedlich reifen *in vitro*-generierten DZ nicht einem bestimmten Reifungszustand zugeordnet werden [193, 268].

Eine aktuelle Veröffentlichung von Shklovskaya *et al.* zeigt, dass nach Kontakthypersensibilisierung mittels FITC-Bepinselung nur die migratorischen dDZ, nicht aber die LZ in den hautdrainierenden Lymphknoten RelB im Zellkern aufweisen [269]. Allerdings gibt diese Studie keinen Aufschluss darüber, welche migrierenden DZ unter homöostatischen Bedingungen nukleäres RelB exprimieren. Durchflusszytometrische Analysen in der vorliegenden Arbeit ergaben, dass die Expression von RelB nicht auf ein bestimmtes DZ-Subset innerhalb der ssmDZ in den hautdrainierenden Lymphknoten eingegrenzt werden kann. Übereinstimmend mit dieser Beobachtung und entgegen der oben erwähnten Studie [269], konnte im Rahmen der Doktorarbeit sowohl mit als auch ohne FITC-Bepinselung eine generelle Erhöhung der nukleären Translokation von RelB in semireifen FITC<sup>-</sup> ssmDZ und in vollreifen FITC<sup>+</sup> migratorischen DZ festgestellt werden. Unsere Daten deuten somit darauf hin, dass RelB unter homöostatischen Bedingungen in allen migratorischen DZ in den hautdrainierenden Lymphknoten nukleär vorliegt.

Die spezifische nukleäre Translokation von RelB, nicht aber von RelA und c-Rel, in den ssmDZ ließ eine Funktion von RelB für die Reifung und somit auch die Migration dieser DZ aus der Haut in die drainierenden Lymphknoten vermuten. Um dem nachzugehen, wurden zunächst *relB*<sup>+/-</sup> Mäuse und Mäuse mit einer Defizienz für die RelB-Bindungspartner p52 und p50 untersucht. Homozygote *relB*<sup>-/-</sup> Mäuse entwickeln einen komplexen inflammatorischen Phänotyp, eine myeloide Hyperplasie im Knochenmark und eine vergrößerte Milz aufgrund einer extramedullären Hämopoese [199, 202, 270]. Da in diesen Mäusen zudem Defekte in der Ausbildung von Lymphknoten auftreten [202], wurden *relB*<sup>+/-</sup> Mäuse ohne Krankheitssymptome und mit normaler Lymphknotenentwicklung [271] analysiert. Sowohl in *relB*<sup>+/-</sup> als auch in *p52*<sup>-/-</sup> Mäusen konnte eine selektive Reduktion der migratorischen DZ in den hautdrainierenden Lymphknoten festgestellt werden. Hingegen war in den hautdrainierenden Lymphknoten von *p50*<sup>-/-</sup> Mäusen die Frequenz der migratorischen und residenten DZ in gleichem Maße reduziert. Dies lässt darauf schließen, dass p50 bereits in einem unreifen DZ-Stadium eine wichtige Rolle spielt, da sich ansonsten die Effekte mit einer Reifung der DZ, wie es bei ssmDZ der Fall ist, verstärken würden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde angenommen, dass RelB vor allem in Kombination mit p52 für die Erscheinung bzw. Erhaltung von ssmDZ in den hautdrainierenden Lymphknoten verantwortlich ist.

Ein Nachteil der Untersuchung der *relB*<sup>+/-</sup> Mäuse lag jedoch darin, dass es sich um Mäuse mit einem Nicht-DZ-spezifischen Genverlust für RelB handelte. Somit waren keine Rückschlüsse darüber möglich, ob die beobachteten Auswirkungen in diesen Mäusen auf DZ-intrinsische oder -extrinsische Effekte zurückzuführen sind. Um dies abzuklären, wurden erstmalig RelB<sup>DCko</sup> Mäuse mit einer DZ-spezifischen Geninaktivierung von RelB untersucht. Überraschenderweise konnte in diesen Tieren eine signifikant erhöhte Frequenz an ssmDZ, nicht aber an residenten DZ, in den hautdrainierenden Lymphknoten festgestellt werden. Diese Beobachtungen deuten zum einen darauf hin, dass die verringerte Frequenz an ssmDZ in den *relB*<sup>+/-</sup> Mäusen nicht durch eine geringere Expression von RelB in den DZ, sondern indirekt durch DZ-extrinsische Mechanismen ausgelöst wird. Andererseits gibt die verstärkte Erscheinung von migratorischen DZ in den hautdrainierenden Lymphknoten von RelB<sup>DCko</sup>-Mäusen Anlass zu der Annahme, dass RelB unter homöostatischen Bedingungen die Erhaltung bzw. Migration dieser DZ eher negativ beeinflusst.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse lassen keine eindeutige Beschreibung der Ereignisse zu, wie genau RelB mit der Homöostase und Migration der ssmDZ in den

hautdrainierenden Lymphknoten interferiert. Allerdings konnte anhand von immunfluoreszenzmikroskopischen Analysen der Haut von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen gezeigt werden, dass eine RelB-Defizienz in DZ die Verteilung der LZ und dDZ in der Haut nicht beeinträchtigt. In Übereinstimmung damit wurde auch in *relB*<sup>-/-</sup> Mäusen eine normale Frequenz an LZ in der Epidermis nachgewiesen [203]. Somit scheint RelB zumindestens für die Einwanderung und Differenzierung der DZ in die Haut keine wesentliche Rolle zu spielen. Denkbar wäre jedoch, dass RelB durch die Kontrolle der Proliferation bzw. Apoptose von ssmDZ deren Frequenz in den hautdrainierenden Lymphknoten reguliert. Zwar sind bisher keine Auswirkungen einer RelB-Defizienz auf die Lebensspanne von DZ bekannt [272], allerdings führen Defekte bei Mitgliedern des klassischen NF-κB-Signalwegs (z.B. in *c-Rel*<sup>-/-</sup>, *relA/p50*<sup>-/-</sup>, *c-Rel/p50*<sup>-/-</sup> Mäusen) zu einer erhöhten Apoptoserate in KM-DZ und Milz-DZ [210-212]. Sollten durch das Fehlen von RelB die NF-κB-Proteine des klassischen Signalwegs überwiegen und verstärkt im Zellkern der DZ vorliegen, könnte dies möglicherweise auch das Überleben der ssmDZ in den RelB<sup>DCko</sup> Mäusen verlängern. Nicht unwahrscheinlich ist zudem, dass RelB die Migration der DZ direkt beeinflusst. Denkbar wäre beispielsweise, dass RelB die Expression von Chemokinrezeptoren und/oder Adhäsionsmolekülen in DZ reguliert. Essentiell für die Migration von DZ aus der Haut in die drainierenden Lymphknoten ist der Chemokinrezeptor CCR7 [21-23]. Im Promotorbereich des CCR7-Gens befinden sich mehrere NF-κB-Bindungsstellen, was auf eine mögliche Regulation der CCR7-Expression durch RelB hindeutet [273]. Darüber hinaus sollte auch in Betracht gezogen werden, dass es in Abhängigkeit von RelB zu einer selektiven Migration von einzelnen DZ-Subpopulationen aus der Haut in die drainierenden Lymphknoten kommen kann. Zwar konnte in dieser Arbeit die RelB-Expression mittels FACS-Analyse nicht auf eine bestimmte DZ-Subpopulation innerhalb der ssmDZ eingegrenzt werden, allerdings bleibt zu klären, inwiefern eine DZ-spezifische RelB-Inaktivierung die prozentualen Anteile der einzelnen migratorischen DZ-Fraktionen in den hautdrainierenden Lymphknoten verändert. Insgesamt kommen somit mehrere Gründe für eine erhöhte Frequenz an ssmDZ in den hautdrainierenden Lymphknoten von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen in Frage, deren Beantwortung weiterer Experimente bedarf.

Wie bereits beschrieben, legen publizierte Daten den Schluss nahe, dass die Aktivierung und nukleäre Translokation von RelB mit der Reifung von DZ einhergeht [193, 200, 201, 206, 207]. Allerdings ist bisher weitgehend unklar, welche Rolle RelB bei der Reifung von DZ unter homöostatischen Bedingungen spielt. Insbesondere die Bedeutung von RelB für die

Reifung von hautmigrierenden DZ *in vivo* wurde im Vorfeld dieser Arbeit noch nicht untersucht.

Studien, die sich bislang mit der RelB-abhängigen Reifung von DZ unter homöostatischen Bedingungen befassten, beruhen vor allem auf der Analyse von Reifungsmarkern auf isolierten Milz-DZ aus *relB*<sup>-/-</sup> Mäusen bzw. Knochenmarkchimären. Hierbei konnte auf den RelB-defizienten Milz-DZ eine normale Expression von CD80 und CD86 nachgewiesen werden, während CD40 sogar verstärkt detektiert wurde [203, 274, 275]. Darüber hinaus gibt es auch Untersuchungen zur Rolle von RelB bei *in vitro*-generierten KM-DZ. Allerdings sind die zugrundeliegenden Daten z.T. sehr widersprüchlich. So konnte einerseits von Martin *et al.* gezeigt werden, dass KM-DZ von *relB*<sup>-/-</sup> Mäusen eine verminderte Expression von MHC II, CD80 und CD40 aufweisen [207]. Andererseits stellte eine weiteren Studie mit RelB-defizienten KM-DZ keine Unterschiede in der Expression von CD80, CD86 und MHC II fest, während CD40 wie bei den *ex vivo*-Analysen von Milz-DZ aus *relB*<sup>-/-</sup> Mäusen sogar leicht erhöht war [211]. Ob eine unterschiedliche Kultivierung oder andere technische Unterschiede für diese Diskrepanzen bei den *in vitro*-Studien verantwortlich sind, bleibt zu klären.

Interessanterweise konnte anhand dieser Arbeit gezeigt werden, dass die ssmDZ in den hautdrainierenden Lymphknoten von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen ähnlich wie die Milz-DZ aus *relB*<sup>-/-</sup> Mäusen und Knochenmarkschimären [203, 274, 275] eine erhöhte Expression von CD40 aufweisen, während andere Reifungsmarker wie CD80, CD86 und MHC II nicht signifikant in ihrer Expression beeinträchtigt waren. Für die Lymphknoten-residenten DZ in diesen Tieren konnten hingegen keine wesentlichen Änderungen in der Expression der untersuchten Reifungsmarker festgestellt werden. Als Kontrolle wurden zudem die Milz-DZ in den RelB<sup>DCko</sup> Mäusen untersucht. Diese zeigten in Übereinstimmung mit den bereits veröffentlichten *ex vivo*-Studien [203, 274, 275] eine selektive Erhöhung der CD40-Expression.

Im Kontext mit der Literatur deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass RelB in DZ *in vivo* an der Regulation der CD40-Expression beteiligt ist. Im Gegensatz dazu scheint die Expression andere Reifungsmarker wie CD80, CD86 und MHC II nicht von einer RelB-Defizienz in DZ unter homöostatischen Bedingungen betroffen zu sein. Einhergehend damit führt auch der funktionelle Verlust weiterer Mitglieder des alternativen NF-κB-Signalwegs (p52, NIK) in Milz-DZ aus unbehandelten *knock out*-Mäusen zu keiner Beeinträchtigung der Expression von MHC II, CD80 und CD86 [217, 276]. Erfolgt hingegen eine Stimulation der *relB*<sup>-/-</sup> Milz-DZ mit αCD40 oder LPS, bleibt die Expression von CD80 und CD86 vermindert, während CD40 in vergleichbarem Maße wie auf den wildtypischen

Milz-DZ exprimiert wird [274]. Ähnliches konnte auch für wildtypische KM-DZ gezeigt werden, in denen die RelB-Expression mittels RNA-Interferenz gehemmt wurde. Diese sog. RelB<sup>low</sup> KM-DZ wiesen nach Stimulation mit  $\alpha$ CD40 bzw. LPS im Vergleich zu vollreifen RelB<sup>+</sup> KM-DZ eine reduzierte Expression der Oberflächenmarker MHC II, CD80 und CD86 auf [277-279]. Daten zur CD40-Expression in den RelB<sup>low</sup> KM-DZ fehlen allerdings. Zusammengenommen legen diese Beobachtungen die Vermutung nahe, dass RelB unter homöostatischen Bedingungen CD40 reguliert, während es unter immunogenen Bedingungen vor allem MHC II und die beiden kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 kontrolliert.

Martin *et al.* äußerten die Vermutung, dass nicht RelB, sondern inflammatorische Signale in den *relB*<sup>-/-</sup> Mäusen für die Hochregulation von CD40 auf den Milz-DZ verantwortlich sind [207]. Wie bereits erwähnt, entwickeln *relB*<sup>-/-</sup> Mäuse in Abhängigkeit von T-Zellen eine chronische Entzündung in verschiedenen Organen (z.B. Haut, Auge, und Lunge) und versterben bereits nach etwa 3 Monaten [40, 199, 202]. Die in dieser Arbeit untersuchten RelB<sup>DCko</sup>-Mäuse erreichten hingegen ein normales Alter (>12 Monate) und zeigten keine für *relB*<sup>-/-</sup> Mäuse typischen Symptome wie Entzündungen der Haut, der Augen sowie eine vergrößerte Milz (Daten z.T. nicht gezeigt). Möglicherweise spielen daher inflammatorische Signale für die Regulation der CD40-Expression auf DZ in RelB<sup>DCko</sup> Mäusen keine Rolle. Allerdings müssen weitere Experimente klären, wie genau RelB die Expression von CD40 auf DZ in RelB<sup>DCko</sup> Mäusen kontrolliert.

Die selektiv erhöhte Expression von CD40 auf den ssmDZ und den Milz-DZ, nicht aber den Lymphknoten-residenten DZ in den RelB<sup>DCko</sup> Mäusen, deutet zudem darauf hin, dass RelB nur bestimmte DZ-Populationen beeinflusst. Einhergehend damit war in dieser Arbeit nur in den ssmDZ, nicht aber den residenten DZ in den hautdrainierenden Lymphknoten eine Expression und nukleäre Translokation von RelB festzustellen. Inwiefern in Milz-DZ unter homöostatischen Bedingungen RelB nukleär vorliegt, ist nicht bekannt. Allerdings konnte in dieser Arbeit und in einer bereits publizierten Studie [203] eine Expression von RelB in Milz-DZ, wenn auch geringer als in den migrierenden DZ der hautdrainierenden Lymphknoten, nachgewiesen werden. Da in *relB*<sup>-/-</sup> Mäusen insbesondere die CD8 $\alpha$  myeloiden DZ in der Milz von einer RelB-Defizienz betroffen sind [203], wäre es für weiterführende Untersuchungen interessant zu überprüfen, inwieweit diese DZ-Subpopulation sowohl frequentiell als auch phänotypisch in den hautdrainierenden Lymphknoten und der Milz der RelB<sup>DCko</sup> Mäuse beeinträchtigt ist.

Insgesamt lassen die in dieser Arbeit erhobenen Daten den Schluss zu, dass semireife ssmDZ in den hautdrainierenden Lymphknoten zwar nukleäres RelB aufweisen, dessen Verlust jedoch nicht, wie anfangs vermutet, zu einer verminderten partiellen Reifung und Migration dieser DZ beiträgt, sondern vielmehr beides unter homöostatischen Bedingungen verstärkt. Die genauen Gründe hierfür bleiben jedoch Gegenstand weiterer Untersuchungen.

### **5.2.2. Führt eine RelB-Defizienz in DZ zu einer Beeinträchtigung der Induktion und Homöostase von Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub>?**

DZ spielen bei der Generierung und Erhaltung von Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> eine wesentliche Rolle (Übersicht in [119, 250]). Es gibt Hinweise, dass eine RelB-Defizienz in DZ zu einer erhöhten Tolerogenität beiträgt. So besitzen die bereits erwähnten RelB<sup>low</sup> KM-DZ, in denen die RelB-Expression mittels RNA-Interferenz inhibiert wurde, das Potential, *in vivo* Toleranz in einem Herztransplantationsmodell zu induzieren [277]. Darüber hinaus waren ähnlich behandelte KM-DZ in der Lage, die Entwicklung und Schwere einer experimentellen autoimmunen Myasthenia gravis in Mäusen zu verringern [278]. Interessanterweise ging in beiden *in vivo* Modellen die Toleranzinduktion mit einer erhöhten Frequenz an peripheren Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> einher [277, 278]. Ob es sich hierbei um eine Expansion bereits vorhandener nT<sub>regs</sub> oder um eine Induktion von iT<sub>regs</sub> aus naiven T-Zellen handelte, wurde jedoch nicht eindeutig gezeigt. Fest steht allerdings, dass die *in vitro*-generierten RelB<sup>low</sup> KM-DZ einer Reifungsresistenz unterliegen, weshalb die erhöhte Tolerogenität dieser DZ mit ihrem eher unreifen Phänotyp in Verbindung gebracht wird [277-279]. Bisher ist jedoch kaum etwas darüber bekannt, inwieweit eine spezifische Inaktivierung von RelB in DZ *in vivo* die Generierung und Homöostase von Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> beeinflusst.

Anhand dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass eine RelB-Defizienz in DZ zu einer erhöhten Frequenz und Gesamtzellzahl an Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> in den hautdrainierenden Lymphknoten und der Milz von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen führt. Hierbei war sowohl die Frequenz als auch die absolute Zellzahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in beiden lymphatischen Organen der RelB<sup>DCko</sup> Mäuse nicht signifikant gegenüber den Kontrollmäusen erhöht. Daher ging in diesen Tieren mit der Erhöhung der Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> zugleich eine Verminderung der Foxp3<sup>-</sup> T<sub>konv</sub> in den peripheren lymphatischen Organen einher. Interessanterweise demonstrieren Studien bei *relB*<sup>-/-</sup> Mäusen einen gegenteiligen Effekt auf das periphere T-Zellkompartiment. So wurden in der Milz der *relB*<sup>-/-</sup> Mäuse weniger CD4<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen, während die Zahl der Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> gegenüber den Kontrollmäusen unverändert blieb [202, 274]. Darüber hinaus zeigten die *relB*<sup>-/-</sup> Mäuse in der Milz auch eine verringerte Frequenz an CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie

B220<sup>+</sup> B-Zellen [202], was bei RelB<sup>DCko</sup> Mäusen nicht beobachtet werden konnte. Dies deutet darauf hin, dass in den Komplet-*knock out*- Mäusen, in denen nicht nur DZ von einer RelB-Defizienz betroffen sind, auch DZ-extrinsische Mechanismen die Homöostase von T- und B-Zellen in der Peripherie beeinträchtigen. Hingegen konnte bei einer DZ-spezifischen RelB-Deletion in RelB<sup>DCko</sup> Mäusen nur eine selektive Erhöhung an Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> in den peripheren lymphatischen Organen festgestellt werden.

In wildtypischen Mäusen ist der überwiegende Anteil an peripheren Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> thymischen Ursprungs und wird durch peripher-induzierte iT<sub>regs</sub> ergänzt [123, 143, 148]. Zwei Befunde in der vorliegenden Arbeit legen die Vermutung nahe, dass es sich bei den verstärkt beobachteten Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> in den peripheren lymphatischen Organen von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen um nT<sub>regs</sub> und nicht um iT<sub>regs</sub> handelt. Zum einen wurde bereits im Thymus der RelB<sup>DCko</sup> Mäuse eine erhöhte Frequenz an proliferierenden Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> nachgewiesen. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass die vermehrt in den peripheren lymphatischen Organen auftretenden Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> positiv für Helios sind. Die Verwendung von Helios als nT<sub>reg</sub>-Marker ist zwar umstritten [242-244], aber die Tatsache, dass bereits mehr Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> im Thymus von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen vorliegen, deutet in diesem Fall auf eine relativ verlässliche Einschätzung für Helios als nT<sub>reg</sub>-Marker hin. Zur endgültigen Klärung bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen.

Da in den RelB<sup>DCko</sup> Mäusen auch eine erhöhte Frequenz an ssmDZ in den hautdrainierenden Lymphknoten nachgewiesen wurde, könnte man annehmen, dass dies ebenso Auswirkungen auf die Frequenz der Foxp3<sup>+</sup> iT<sub>regs</sub> in diesen Tieren hat. Jedoch war in den hautdrainierenden Lymphknoten der RelB<sup>DCko</sup> Mäuse kein signifikant erhöhter Anteil an Helios<sup>-</sup> Foxp3<sup>+</sup> iT<sub>regs</sub> festzustellen. Dies lässt vermuten, dass die Funktionalität bzw. tolerogene Kapazität der ssmDZ in den hautdrainierenden Lymphknoten durch die RelB-Defizienz möglicherweise beeinträchtigt ist. Hierbei könnte die erhöhte Expression von CD40 auf den DZ eventuell einer verstärkten Induktion von iT<sub>regs</sub> entgegenwirken [135, 155, 156]. Um jedoch eindeutig abzuklären, inwieweit RelB in DZ, insbesondere in ssmDZ, die Fähigkeit zur Induktion von iT<sub>regs</sub> beeinflusst, bedarf es noch weiterer Versuche. Interessant wäre in diesem Zusammenhang die Anwendung des bereits beschriebenen K5mOVA-Mausmodells, um die antigenspezifische Konversion von iT<sub>regs</sub> in den RelB<sup>DCko</sup> Mäusen näher zu untersuchen. Diese Experimente würden zugleich auch Aufschluss darüber geben, ob der Anstieg an peripheren Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> in den RelB<sup>DCko</sup> Mäusen tatsächlich vor allem auf nT<sub>regs</sub> beruht.

Die erhöhte Frequenz an thymischen  $\text{Foxp3}^+$   $\text{T}_{\text{regs}}$  in den  $\text{RelB}^{\text{DCko}}$  Mäusen deutet darauf hin, dass im Thymus dieser Tiere die DZ durch die Inaktivierung von RelB funktionell beeinträchtigt sind. Thymische DZ sind vor allem an der Negativselektion von  $\text{CD4}^+$  T-Zellen beteiligt [91]. Ihre Rolle in der Induktion von  $\text{nT}_{\text{regs}}$  wird hingegen kontrovers diskutiert [88, 133]. Es gibt jedoch zunehmend Hinweise, dass neben den mTECs in der Thymusmedulla auch DZ für die  $\text{nT}_{\text{reg}}$ -Generierung von Bedeutung sind [80]. Interessanterweise exprimieren sowohl thymische DZ als auch mTECs RelB [197, 199], weshalb  $\text{relB}^{-/-}$  Mäuse nur eine rudimentäre Thymusmedulla aufweisen [199, 202]. Als Folge der partiellen Thymusatrophie kommt es in  $\text{relB}^{-/-}$  Mäusen zu Defekten in der Negativselektion von T-Zellen [199, 202, 280]. Die hierdurch auftretenden autoreaktiven T-Zellen werden als Auslöser für den chronischen Entzündungsphänotyp dieser Tiere angesehen [274, 280, 281]. Ob trotz der normalen Zahl an peripheren  $\text{Foxp3}^+$   $\text{T}_{\text{regs}}$  in den  $\text{relB}^{-/-}$  Mäusen Defekte in der Entwicklung dieser Zellen im Thymus vorliegen, ist nicht bekannt [274]. Da die  $\text{RelB}^{\text{DCko}}$  Mäuse jedoch keine Beeinträchtigungen in der Zellularität des Thymus und keine für  $\text{relB}^{-/-}$  Mäuse typischen inflammatorischen Symptome aufwiesen (Daten z.T. nicht gezeigt), ist davon auszugehen, dass vor allem das Fehlen der mTECs in den  $\text{relB}^{-/-}$  Mäusen einen wesentlichen Beitrag zum Phänotyp dieser Mäuse leistet. Darüber hinaus legen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Vermutung nahe, dass DZ durchaus an der Entwicklung bzw. Proliferation der  $\text{nT}_{\text{regs}}$  im Thymus beteiligt sind. Wie genau die RelB-Defizienz in thymischen DZ von  $\text{RelB}^{\text{DCko}}$  Mäusen die Generierung und Proliferation von  $\text{nT}_{\text{regs}}$  beeinflusst, wurde in dieser Arbeit nicht näher untersucht und ist Ziel zukünftiger Experimente. Klar belegt werden konnte hingegen, dass die Positivselektion im Thymus der  $\text{RelB}^{\text{DCko}}$  Mäuse nicht von einer RelB-Inaktivierung in DZ betroffen ist.  $\text{RelB}^{\text{DCko}}$  Mäuse zeigten eine normale Verteilung der DN-, DP-, CD8SP- und CD4SP-Thymozyten im Vergleich zu Kontrollmäusen. In Übereinstimmung damit war auch in  $\text{relB}^{-/-}$  Mäusen keine Beeinträchtigung in der Frequenz aller Thymozytenpopulationen feststellbar [202, 280]. Dies steht im Einklang mit der Vorstellung, dass vor allem cTECs im Thymuskortex die Positivselektion vermitteln [88].

Anhand dieser Arbeit konnte außerdem demonstriert werden, dass der Anstieg an  $\text{Foxp3}^+$   $\text{T}_{\text{regs}}$  in den peripheren lymphatischen Organen von  $\text{RelB}^{\text{DCko}}$  Mäusen nicht nur auf einer Zunahme an  $\text{T}_{\text{regs}}$  im Thymus beruht, sondern auch auf einer erhöhten Proliferation dieser Zellen in der Peripherie. Hierbei war die Expansion der  $\text{Foxp3}^+$   $\text{T}_{\text{regs}}$  in den hautdrainierenden Lymphknoten sogar stärker ausgeprägt als in der Milz der  $\text{RelB}^{\text{DCko}}$  Mäuse. Wurde zudem bei der Proliferationsanalyse zwischen  $\text{Helios}^+$   $\text{Foxp3}^+$   $\text{nT}_{\text{regs}}$  und  $\text{Helios}^-$   $\text{Foxp3}^+$   $\text{iT}_{\text{regs}}$



unterschieden, konnte nur in den hautdrainierenden Lymphknoten, nicht jedoch in der Milz der RelB<sup>DCko</sup> Mäuse eine signifikant erhöhte Proliferation an nT<sub>regs</sub> festgestellt werden. Unterstützt wird diese Beobachtung durch ein adoptives Transferexperiment, in dem gezeigt werden konnte, dass wildtypische CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen, die größtenteils Foxp3<sup>+</sup> nT<sub>regs</sub> beinhalten [113-116], nach Transfer in RelB<sup>DCko</sup> Mäuse vor allem in den hautdrainierenden Lymphknoten und nicht in der Milz der Tiere expandieren.

Demnach hat die spezifische Inaktivierung von RelB in DZ zwei wesentliche Effekte auf Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> *in vivo*: Einerseits wird die Produktion von Foxp3<sup>+</sup> nT<sub>regs</sub> im Thymus durch Expansion erhöht, andererseits erfolgt auch eine verstärkte Proliferation dieser Zellen in der Peripherie. Somit scheint die RelB-Defizienz in DZ im Einklang mit den bereits erwähnten Studien an RelB<sup>low</sup> KM-DZ [277-279] auch unter homöostatischen Bedingungen *in vivo* die Tolerogenität der DZ zu verstärken.

### **5.2.3. Welche Faktoren könnten die erhöhte Frequenz an proliferierenden Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> in den peripheren lymphatischen Organen von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen bewirken?**

Die erhobenen Daten in dieser Arbeit zeigen, dass es in RelB<sup>DCko</sup> Mäusen neben einer generellen Erhöhung in der Frequenz an proliferierenden Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> in den peripheren lymphatischen Organen auch zu einer verstärkten Proliferation dieser Zellen in den hautdrainierenden Lymphknoten kommt. Dies legt die Vermutung nahe, dass es einen Mechanismus geben muss, wodurch die RelB-Defizienz in DZ einerseits die Proliferation der Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> in allen peripheren lymphatischen Organen erhöht und andererseits diese spezifisch in den hautdrainierenden Lymphknoten noch weiter verstärkt. Im Folgenden werden verschiedene Ansätze diskutiert, inwiefern eine Inaktivierung von RelB in DZ direkt oder indirekt die Proliferation von Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> in den peripheren lymphatischen Organen beeinflussen kann.

Es gibt Hinweise darauf, dass die DZ-Zahl mit der Proliferationsrate peripherer T<sub>regs</sub> korreliert. Hierbei spielt der Wachstumsfaktor Flt3L eine wesentliche Rolle. Die Behandlung von Mäusen mit Flt3L führt zu einer Expansion von cDZ und letztlich auch zu einer Proliferation von Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> in peripheren lymphatischen Organen [167, 168]. Umgekehrt konnte bei einem konditionalen Verlust an DZ in Mäusen eine reduzierte Zahl und homöostatische Proliferation von peripheren Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> beobachtet werden [167]. Die Daten

in dieser Arbeit deuten darauf hin, dass in RelB<sup>DCko</sup> Mäusen die RelB-Defizienz in DZ nicht zu einer generell erhöhten T<sub>reg</sub>-Proliferation in den peripheren lymphatischen Organen beiträgt, indem sie die Frequenz der DZ reguliert. So konnte in den RelB<sup>DCko</sup> Mäusen sowohl in den hautdrainierenden Lymphknoten als auch in der Milz keine signifikant erhöhte Frequenz an CD11c<sup>+</sup> B220<sup>-</sup> Zellen, die weitestgehend cDZ entsprechen, festgestellt werden. Darüber hinaus war in beiden peripheren lymphatischen Organen der RelB<sup>DCko</sup> Mäuse auch keine wesentliche Änderung in der Expression von Flt3L gegenüber den Kontrollmäusen zu detektieren.

Allerdings könnte die erhöhte Expression der beiden Zytokine IL-2 und IL-7 in den hautdrainierenden Lymphknoten sowie in der Milz der RelB<sup>DCko</sup> Mäuse mit dem Anstieg an proliferierenden Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> in diesen Organen im Zusammenhang zu stehen.

IL-2 ist einer der wichtigsten Faktoren für das Überleben und die Homöostase von peripheren Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> (Übersicht in [282, 283]). Unter anderem wird durch die Bindung von IL-2 an den IL-2R der Transkriptionsfaktor STAT5 aktiviert, der die Expression von Foxp3 und CD25 in den T<sub>regs</sub> sicherstellt [284, 285]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass unter Verwendung eines neutralisierenden  $\alpha$ IL-2-Antikörpers die Proliferation der peripheren Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> in den RelB<sup>DCko</sup> Mäusen von IL-2 abhängig ist. Da T<sub>regs</sub> selbst kein IL-2 produzieren können [165, 286], sind sie auf die Sekretion des Zytokins durch benachbarte Zellen angewiesen. Für die erhöhte IL-2-Expression in RelB<sup>DCko</sup> Mäusen kommen verschiedene Zellen in Frage.

DZ können IL-2 produzieren und es sogar über die Expression von CD25 auf ihrer Oberfläche an T-Zellen in *trans* präsentieren. Allerdings wurde eine IL-2-Produktion und-Präsentation durch DZ bisher nur nach deren Reifung mit mikrobiellen Antigenen oder nach Gabe proinflammatorischer Zytokine beobachtet [287, 288]. Daher ist fraglich, inwieweit DZ unter homöostatischen Bedingungen überhaupt IL-2 zur T<sub>reg</sub>-Homöostase bereitstellen [289]. Denkbar wäre allerdings, dass die RelB-Defizienz in DZ bereits in der Abwesenheit eines Reifungsstimulus eine IL-2-Produktion in den DZ induziert und dies zur Proliferation und Erhaltung der peripheren Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> in den RelB<sup>DCko</sup> Mäusen beiträgt.

Unter homöostatischen Bedingungen wird IL-2 vermutlich von einigen aktivierten CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T<sub>konv</sub> in den sekundären lymphatischen Organen produziert [282]. Da in den hautdrainierenden Lymphknoten und der Milz von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen auch eine erhöhte Frequenz an CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> (GITR<sup>+</sup>) Foxp3<sup>-</sup> T<sub>konv</sub> nachgewiesen wurde, könnten diese Zellen potentiell für die verstärkte IL-2-Produktion in den RelB<sup>DCko</sup> Mäusen verantwortlich sein. Allerdings

stellen aktivierte  $CD4^+ CD25^+ T_{konv}$  neben den  $Foxp3^+ T_{regs}$  auch mögliche Konsumenten von IL-2 dar [290]. So ist bekannt, dass IL-2 nach Bindung an den IL-2R nicht nur in  $T_{regs}$ , sondern auch in aktivierten  $T_{konv}$  eine Hochregulation von CD25 bewirkt [291]. In dieser Arbeit wurde jedoch CD25 im vergleichbaren Maße auf den aktivierten  $T_{konv}$  und  $T_{regs}$  in den peripheren lymphatischen Organen der  $RelB^{DCKO}$  Mäuse exprimiert. Daher muss ein Anstieg von aktivierten  $T_{konv}$  in diesen Mäusen nicht zwangsläufig auch mit einer erhöhten Verfügbarkeit von IL-2 und letztlich einer verstärkten  $T_{reg}$ -Proliferation verbunden sein. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass  $T_{regs}$  aufgrund der konstitutiven Expression von CD25 einen Vorteil bei der IL-2 Konsumierung haben und somit das Zytokin  $T_{konv}$  entziehen können [163, 289, 292].

Die aktivierten  $T_{konv}$  könnten allerdings in ihrer Erhaltung auch von anderen Faktoren anstatt IL-2 abhängig sein [290]. So wird vermutet, dass es sich bei den aktivierten  $T_{konv}$ , die unter homöostatischen Bedingungen IL-2 produzieren, vor allem um autoreaktive T-Zellen handelt [164, 289]. Diese wären in ihrer Erhaltung und Aktivierung von der Präsentation von Selbstantigenen durch periphere APZ wie DZ abhängig. Darüber hinaus konnte in weiteren Studien gezeigt werden, dass aktivierte  $T_{konv}$  auch die  $\alpha$ -Kette des IL-7R (CD127) exprimieren [293, 294]. Eventuell greifen diese Zellen somit auf IL-7 als Wachstums- und Überlebensfaktor zurück [295], der neben IL-2 ebenfalls verstärkt in den peripheren lymphatischen Organen der  $RelB^{DCKO}$  Mäuse exprimiert wird. IL-7 stellt zusätzlich zum tonischen TZR-Signal einen wesentlichen Faktor für die Homöostase von naiven T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen dar (Übersicht in [246]). Für die Erhaltung und Proliferation von  $Foxp3^+ T_{regs}$  spielt IL-7 in der Anwesenheit von IL-2 nur eine untergeordnete Rolle [132, 290]. Es besteht allerdings die Möglichkeit, dass die erhöhte IL-7-Produktion in den  $RelB^{DCKO}$  Mäusen auch zu einem Anstieg an T-Zellen mit einem Gedächtnis-T-Zell-ähnlichen Phänotyp führt. Diese Zellen können in geringem Maße selbst in unbehandelten oder keimfrei gehaltenen Mäusen gefunden werden und stellen potentielle IL-2-Produzenten dar [246].

Wie kann nun die  $RelB$ -Defizienz in DZ eine erhöhte IL-7 Produktion in den  $RelB^{DCKO}$  Mäusen bewirken? Hauptproduzenten von IL-7 sind Stromazellen [296]. Sollten diese Zellen in den  $RelB^{DCKO}$  Mäusen eine gesteigerte Sekretion von IL-7 aufweisen, dann durch indirekte DZ-vermittelte Effekte. Möglich ist jedoch auch eine erhöhte Expression von IL-7 durch die  $RelB$ -defizienten DZ selbst. Eine Studie von Guimond *et al.* deutet darauf hin, dass vor allem das von DZ produzierte IL-7 für die Homöostase peripherer  $CD4^+$  T-Zellen von Bedeutung ist [297]. Diese Studie ist jedoch umstritten [298].

Gegebenenfalls kann die Inaktivierung von RelB in den DZ von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen auch durch eine veränderte Expression von kostimulatorischen und koinhibitorischen Molekülen auf die erhöhte Proliferation von Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> in der Peripherie Einfluss nehmen. CD80/CD86 auf den DZ sind essentiell für Erhaltung des peripheren T<sub>reg</sub>-Pool [162], waren jedoch auf den RelB-defizienten DZ im Vergleich zu Kontroll-DZ nicht unterschiedlich exprimiert. Denkbar wäre allerdings, dass die erhöhte Expression von CD40 auf den DZ in den peripheren lymphatischen Organen in den RelB<sup>DCko</sup> Mäusen Auswirkungen auf die T<sub>reg</sub>-Homöostase und Proliferation hat. So ist bekannt, dass CD40-defiziente bzw.  $\alpha$ CD40L-behandelte Mäuse eine verringerte Frequenz an peripheren Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> aufweisen [127]. Zudem gibt Hinweise, dass CD40/CD40L-Interaktionen zwischen reifen murinen KM-DZ und aktivierten T<sub>regs</sub> bzw. T<sub>konv</sub> zu einer IL-2 Produktion in den DZ oder aktivierten T<sub>konv</sub> führen [127].

Darüber hinaus konnte im Rahmen dieser Arbeit demonstriert werden, dass die RelB-Defizienz in DZ nicht die Expression von PD-L1 und PD-L2 auf DZ in den peripheren lymphatischen Organen von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen beeinträchtigt, während die Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> und die Foxp3<sup>-</sup> T<sub>konv</sub> in diesen Tieren verstärkt PD-1 exprimierten. Dies deutet darauf hin, dass PD-1 in den T-Zellen indirekt hochreguliert wurde und nicht als Folge einer Interaktion mit den Liganden PD-L1/PD-L2 auf den RelB-defizienten DZ. Einhergehend damit ist bekannt, dass die Aktivierung von T<sub>regs</sub> und T<sub>konv</sub> zu einer Hochregulation von PD-1 führt (Übersicht in [249]). PD-1-Interaktionen mit dessen Liganden bewirken in den aktivierten T-Zellen u.a. eine Verminderung der Proliferation [249, 299, 300]. Möglicherweise kann aufgrund der unveränderten Expression von PD-L1 und PD-L2 auf den RelB-defizienten DZ bei gleichzeitiger Hochregulation von PD-1 auf den aktivierten T<sub>konv</sub> und T<sub>regs</sub> einer Proliferation dieser Zellen nicht entgegengewirkt werden. Um abzuklären, ob dieser Mechanismus bei der verstärkten Proliferation von peripheren Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> in den RelB<sup>DCko</sup> Mäusen eine Rolle spielt, wäre es interessant, in weiterführenden Experimenten u.a. adoptive Transfers mit PD-1<sup>-/-</sup> T<sub>regs</sub> in RelB<sup>DCko</sup> Mäusen durchzuführen.

Keiner der zuvor diskutierten Faktoren kann jedoch erklären, warum es in den hautdrainierenden Lymphknoten der RelB<sup>DCko</sup> Mäuse zu einer stärkeren Proliferation der Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> kommt als in der Milz der Tiere. Ein Grund hierfür könnte der erhöhte Anteil an semireifen ssmDZ innerhalb der DZ in den hautdrainierenden Lymphknoten von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen sein. Dadurch wird die Dichte an kostimulatorischen Molekülen und MHC II Komplexen erhöht, was indirekt dazu führen kann, dass T<sub>konv</sub> verstärkt zur Produktion von

IL-2 angeregt werden [140, 158] und/oder  $T_{\text{regs}}$  und  $T_{\text{konv}}$  mehr TZR-Signale zum Überleben erhalten [119]. Beides kann die Proliferation von  $\text{Foxp3}^+ T_{\text{regs}}$  erhöhen.

Zusammenfassend betrachtet, bestehen verschiedene Möglichkeiten wie eine RelB-Defizienz in den DZ von  $\text{RelB}^{\text{DCko}}$  Mäusen zu einem Anstieg an proliferierenden  $\text{Foxp3}^+ T_{\text{regs}}$  in den peripheren lymphatischen Organen beitragen kann. Weiterführende Experimente müssen jedoch klären, welche davon tatsächlich zum Tragen kommen. Letztlich kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass neben der verstärkten Proliferation auch andere Mechanismen für die erhöhte Frequenz an  $\text{Foxp3}^+ T_{\text{regs}}$  in den peripheren lymphatischen Organen der  $\text{RelB}^{\text{DCko}}$  Mäuse eine Rolle spielen. Denkbar wäre beispielsweise, dass die RelB-Defizienz in DZ zu einer veränderten Expression von Chemokinen führt, die die Migration von  $T_{\text{regs}}$  in die lymphatischen Organe beeinflussen.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Toleranz gegenüber Selbstantigenen in den peripheren Geweben kann durch  $CD4^+ CD25^+$  Foxp3<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen ( $T_{regs}$ ) vermittelt werden. Diese Zellen entstehen entweder in Folge der thymischen T-Zellselektion (natürlich vorkommende  $T_{regs}$ ,  $nT_{reg}$ ) oder durch Konversion aus naiven T-Zellen in den peripheren lymphatischen Organen (induzierte  $T_{regs}$ ,  $iT_{regs}$ ). Im Vorfeld der Arbeit war bereits bekannt, dass Dendritische Zellen (DZ) eine wichtige Rolle bei der Generierung von  $iT_{reg}$  spielen. Allerdings bestand weitestgehend Unklarheit darüber, welche DZ in welchem Reifungszustand dazu in der Lage sind,  $iT_{regs}$  gegen peripher-exprimierte Selbstantigene zu induzieren. *Steady-state* migratorische DZ (ssmDZ) gelten in dieser Hinsicht als potentielle Kandidaten, da bekannt ist, dass diese DZ bereits unter homöostatischen Bedingungen Selbstantigene aus peripheren Geweben in die drainierenden Lymphknoten transportieren und dort T-Zellen präsentieren können. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, den Phänotyp und die tolerogene Kapazität der ssmDZ in den hautdrainierenden Lymphknoten näher zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass ssmDZ einen semireifen MHC II<sup>int</sup> CD40<sup>hi</sup> CD80/CD86<sup>int</sup> CCR7<sup>+</sup> Phänotyp aufweisen und *in vitro* mit Hilfe von endogenem TGF- $\beta$   $iT_{regs}$  induzieren können. Darüber hinaus belegt diese Arbeit zusammen mit weiteren Daten aus unserer Arbeitsgruppe, dass ssmDZ in transgenen K5mOVA-Mäusen zellassoziertes epidermales OVA aus der Haut in die drainierenden Lymphknoten transportieren und dort an  $CD4^+$  OVA-spezifische TZR-transgene OT-II T-Zellen präsentieren können. Innerhalb der ssmDZ konnten die Langerin<sup>+</sup> dermalen DZ als die DZ-Subpopulation eingegrenzt werden, die für die Konversion von naiven OT-II T-Zellen in  $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+ iT_{regs}$  verantwortlich war. Ferner zeigte sich, dass CD103 nicht als Marker für ssmDZ in den hautdrainierenden Lymphknoten herangezogen werden kann.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, herauszufinden, welchen Einfluss der Transkriptionsfaktor RelB auf die partielle Reifung und Migration der ssmDZ hat. RelB ist ein Mitglied der NF- $\kappa$ B-Familie und wird mit der Reifung von DZ in Verbindung gebracht. Erste Experimente zeigten eine nukleäre Translokation von RelB in ssmDZ sowie eine verringerte Frequenz dieser DZ in den hautdrainierenden Lymphknoten von  $relB^{+/-}$  Mäusen und Mäusen mit einer Defizienz für den RelB-Bindungspartner p52. Allerdings konnte bei Mäusen mit einer DZ-spezifischen RelB-Inaktivierung ( $RelB^{DCKO}$  Mäuse) eine erhöhte Frequenz an ssmDZ in den hautdrainierenden Lymphknoten festgestellt, die nicht auf einer Zunahme an DZ in der Haut der Tiere zurückzuführen war. Diese Ergebnisse legen einerseits die Vermutung nahe, dass es sich bei den beobachteten Effekte in den  $relB^{+/-}$  Mäusen um DZ-

extrinsische Auswirkungen auf die ssmDZ handelt. Andererseits scheint RelB unter homöostatischen Bedingungen die Erhaltung und Migration der ssmDZ eher negativ zu beeinflussen. Weitere durchflusszytometrische Analysen wiesen zudem darauf hin, dass RelB in ssmDZ die Expression von Reifungsmarkern nur partiell reguliert. So konnte auf den ssmDZ in den hautdrainierenden Lymphknoten von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen eine erhöhte Expression von CD40 beobachtet werden, während andere Reifungsmarker wie MHC II, CD80 und CD86 nicht signifikant in ihrer Expression betroffen waren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zudem untersucht, wie sich eine RelB-Defizienz in DZ auf die Homöostase und Induktion von T<sub>regs</sub> auswirkt. Die hierzu analysierten RelB<sup>DCko</sup> Mäuse wiesen eine erhöhte Frequenz und absolute Zellzahl an T<sub>regs</sub> in allen untersuchten lymphatischen Organen (hautdrainierende Lymphknoten, Milz und Thymus) auf. Darüber hinaus war in diesen Organen auch eine verstärkte Proliferation der T<sub>regs</sub> gegenüber den Kontrolltieren festzustellen. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Proliferation der T<sub>regs</sub> in RelB<sup>DCko</sup> Mäusen in den hautdrainierenden Lymphknoten sogar stärker ausfiel als in der Milz. RelB scheint somit die tolerogene Kapazität der DZ zur Regulation der T<sub>reg</sub>-Expansion im Thymus und in der Peripherie zu beeinflussen. Unter Verwendung von neutralisierenden  $\alpha$ IL-2-Antikörpern konnte zudem belegt werden, dass die periphere Proliferation der T<sub>regs</sub> in den RelB<sup>DCko</sup> Mäusen von IL-2 abhängig ist. Damit einhergehend zeigten erste Vorversuche eine erhöhte IL-2-Produktion in den peripheren lymphatischen Organen von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen.

Zusammenfassend legen die Daten dieser Arbeit den Schluss nahe, dass ssmDZ in den hautdrainierenden Lymphknoten in der Lage sind, Toleranz durch Induktion von iT<sub>regs</sub> gegen epidermale Selbstantigene zu induzieren. Untersuchungen an neuartigen Mäusen mit einer konditionalen RelB-Inaktivierung spezifisch in DZ deuten darauf hin, dass die Migration und Reifung von ssmDZ partiell durch RelB reguliert wird. Da T<sub>regs</sub> eine Schlüsselrolle bei der Erhaltung der peripheren Toleranz einnehmen, ist die Beobachtung, dass eine RelB-Defizienz in allen DZ zu einer verstärkten T<sub>reg</sub>-Proliferation und somit zu einer veränderten T<sub>reg</sub>-Homöostase führt, ein interessanter Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen.

## 7. SUMMARY

Tolerance against self-antigens from peripheral tissues can be mediated through CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells (T<sub>regs</sub>). These cells develop either during thymic T cell selection (nT<sub>regs</sub>) or by conversion from naive CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> Foxp3<sup>-</sup> T cells in peripheral lymphoid organs (induced Tregs, iT<sub>regs</sub>). During the last years, a role for dendritic cells (DC) in the generation of iT<sub>regs</sub> has been clearly established. However, the precise DC subset and maturation stage which are required to induce iT<sub>regs</sub> against peripheral self-antigens remain unknown. Steady-state migratory DC (ssmDC) are a good candidate to carry out such function, since these cells are able to transport self-antigen from peripheral tissues to draining lymph nodes under steady-state conditions. Thus one aim of this thesis was to define the phenotype and tolerogenic capacity of ssmDC in skin-draining lymph nodes. Here, we show that ssmDC display a partially mature MHC II<sup>int</sup> CD40<sup>hi</sup> CD80/CD86<sup>int</sup> CCR7<sup>+</sup> phenotype and that these DC used endogenous TGF-β to convert naive T cells into iT<sub>regs</sub> *in vitro*. This study, together with former data generated in our laboratory, demonstrate that in transgenic K5mOVA mice, ssmDC transport and present cell-associated epidermal OVA to CD4<sup>+</sup> OVA-specific TCR-transgenic OT-II T cells in the skin-draining lymph nodes. We also identified langerin<sup>+</sup> dermal DC cells among the different subsets of ssmDC, as the subset which mediates the conversion of naïve OT-II T cells into CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> iT<sub>regs</sub>. Furthermore, we observed that CD103 was not a suitable marker for ssmDC in skin-draining lymph nodes despite that it has been correlated with tolerogenic DC in the intestine.

An additional aim of this work was to investigate the impact of the transcription factor RelB on the partial maturation and migration of ssmDC. RelB is a member of the NF-κB family and has been associated with DC maturation. Initial experiments showed nuclear translocation of RelB in ssmDC and in addition, *relB*<sup>+/-</sup> mice as well as mice with a deficiency of the RelB-binding partner p52 had a reduced migration of ssmDC to skin-draining lymph nodes. Nevertheless, the analysis of mice with a DC-specific ablation of RelB (RelB<sup>DCko</sup> mice) revealed an increased frequency of ssmDC in skin-draining lymph nodes which was not due to an increased number or altered distribution of DC in the skin. On the one hand, these data suggest that the effects on ssmDC seen in the *relB*<sup>+/-</sup> mice were mediated by DC-extrinsic mechanisms. On the other hand, the increase of ssmDC in RelB<sup>DCko</sup> mice indicated that RelB might be rather a negative regulator of ssmDC migration under homeostatic conditions. Moreover, RelB also affected the maturation of ssmDC partially, since ssmDC in the skin-



draining lymph nodes of RelB<sup>DCko</sup> mice expressed more CD40 on their surface, while other maturation markers as MHC II, CD80 and CD86 were not significantly altered.

Finally, it was investigated how RelB deficiency in DC affects the induction and homeostasis of T<sub>regs</sub>. To this aim we examined RelB<sup>DCko</sup> mice in which we observed an increased frequency and absolute number of T<sub>regs</sub> in all lymphatic organs analyzed (skin-draining lymph nodes, spleen and thymus). Furthermore, T<sub>regs</sub> showed an increased proliferation in these organs compared to control mice. In particular, T<sub>regs</sub> in RelB<sup>DCko</sup> mice proliferated more vigorously in the skin-draining lymph nodes compared to the spleen. Thus, RelB seems to influence the tolerogenic DC capacity by regulating the expansion of T<sub>regs</sub> generated in the thymus as well as their peripheral maintenance. By using a neutralizing anti-IL-2 antibody, we could also demonstrate that the peripheral proliferation of T<sub>regs</sub> in the RelB<sup>DCko</sup> mice was dependent on IL-2, indicating that production of IL-2 either by conventional T cells or DC themselves is affected through RelB deficiency. In accordance with this observation, preliminary experiments showed an increased IL-2 production in the peripheral lymphoid organs of RelB<sup>DCko</sup> mice.

Taken together, the data of this study strongly suggest that ssmDZ are potent inducers of iT<sub>regs</sub> in response to epidermal self-antigens in skin-draining lymph nodes. Moreover, the analysis of a novel conditional mouse model with a DC-specific deletion of RelB indicated that the migration and maturation of ssmDC is partially regulated by RelB. Since T<sub>regs</sub> play a key role in the maintenance of peripheral tolerance, our finding that a deficiency of RelB in all DC affects the proliferation and therefore the homeostasis of T<sub>regs</sub> provides an interesting starting-point for further investigation.

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

1. **Janeway CAT, Walport M, Shlomchik M:** Immunobiology, Part I, An Introduction to Immunobiology and Innate Immunity. *Garland Science, New York* 2001, **5th Edition**.
2. **Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S:** Cellular and Molecular Immunology, Chapter 2, Innate Immunity. *Saunders Elsevier, Philadelphia* 2007, **6th Edition**.
3. **Janeway CAT, Walport M, Shlomchik M:** Immunobiology, Part IV, The Adaptive Immune Response. *Garland Science, New York* 2007, **5th Edition**.
4. **Janeway CAT, Walport M, Shlomchik M:** Immunobiology, Part III, The Development of Mature Lymphocyte Receptor Repertoires. *Garland Science, New York* 2001, **5th Edition**.
5. **Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S:** Cellular and Molecular Immunology, Chapter 6, Antigen Processing and Presentation to T Lymphocytes. *Saunders Elsevier, Philadelphia* 2007, **6th Edition**.
6. **Steinman RM, Cohn ZA:** Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973, **137**(5):1142-1162.
7. **Merad M, Manz MG:** Dendritic cell homeostasis. *Blood* 2009, **113**(15):3418-3427.
8. **Banchereau J, Steinman RM:** Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998, **392**(6673):245-252.
9. **Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S et al:** Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000, **18**:767-811.
10. **Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC:** Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2003, **21**:685-711.
11. **Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A:** Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 1995, **182**(2):389-400.
12. **Albert ML, Pearce SF, Francisco LM, Sauter B, Roy P et al:** Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alpha5beta1 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1998, **188**(7):1359-1368.
13. **Amigorena S, Bonnerot C:** Fc receptor signaling and trafficking: a connection for antigen processing. *Immunol Rev* 1999, **172**:279-284.
14. **Ritter U, Meissner A, Scheidig C, Korner H:** CD8 alpha- and Langerin-negative dendritic cells, but not Langerhans cells, act as principal antigen-presenting cells in leishmaniasis. *Eur J Immunol* 2004, **34**(6):1542-1550.
15. **Janeway CA, Jr.:** The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* 1992, **13**(1):11-16.
16. **Shakushiro K, Yamasaki Y, Nishikawa M, Takakura Y:** Efficient scavenger receptor-mediated uptake and cross-presentation of negatively charged soluble antigens by dendritic cells. *Immunology* 2004, **112**(2):211-218.
17. **Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, Peng M, Mirza A et al:** The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 1995, **375**(6527):151-155.
18. **Akira S, Takeda K, Kaisho T:** Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001, **2**(8):675-680.
19. **Thery C, Amigorena S:** The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 2001, **13**(1):45-51.
20. **Alvarez D, Vollmann EH, von Andrian UH:** Mechanisms and consequences of dendritic cell migration. *Immunity* 2008, **29**(3):325-342.

21. **Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, Schaniel C, Lenig D et al:** Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 1998, **28**(9):2760-2769.
22. **Forster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Muller I et al:** CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 1999, **99**(1):23-33.
23. **Sozzani S, Allavena P, D'Amico G, Luini W, Bianchi G et al:** Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol* 1998, **161**(3):1083-1086.
24. **Saeki H, Moore AM, Brown MJ, Hwang ST:** Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes. *J Immunol* 1999, **162**(5):2472-2475.
25. **Janeway CA, Jr., Bottomly K:** Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell* 1994, **76**(2):275-285.
26. **Viola A, Lanzavecchia A:** T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* 1996, **273**(5271):104-106.
27. **Sharpe AH, Freeman GJ:** The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2002, **2**(2):116-126.
28. **Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA:** CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996, **14**:233-258.
29. **Schwartz RH, Mueller DL, Jenkins MK, Quill H:** T-cell clonal anergy. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989, **54 Pt 2**:605-610.
30. **Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH:** The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 2005, **23**:515-548.
31. **Bour-Jordan H, Esensten JH, Martinez-Llordella M, Penaranda C, Stumpf M et al:** Intrinsic and extrinsic control of peripheral T-cell tolerance by costimulatory molecules of the CD28/ B7 family. *Immunol Rev* 2011, **241**(1):180-205.
32. **Kalinski P, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML:** T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* 1999, **20**(12):561-567.
33. **Pardoll DM:** Spinning molecular immunology into successful immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2002, **2**(4):227-238.
34. **Lutz MB, Schuler G:** Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 2002, **23**(9):445-449.
35. **Inaba K, Pack M, Inaba M, Sakuta H, Isdell F et al:** High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes. *J Exp Med* 1997, **186**(5):665-672.
36. **Wilson NS, El-Sukkari D, Belz GT, Smith CM, Steptoe RJ et al:** Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature. *Blood* 2003, **102**(6):2187-2194.
37. **von Andrian UH, Mempel TR:** Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat Rev Immunol* 2003, **3**(11):867-878.
38. **McLellan A, Heldmann M, Terbeck G, Weih F, Linden C et al:** MHC class II and CD40 play opposing roles in dendritic cell survival. *Eur J Immunol* 2000, **30**(9):2612-2619.
39. **Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A et al:** Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 1996, **184**(2):747-752.

40. **Menges M, Rossner S, Voigtlander C, Schindler H, Kukutsch NA et al:** Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J Exp Med* 2002, **195**(1):15-21.
41. **Jiang A, Bloom O, Ono S, Cui W, Unternaehrer J et al:** Disruption of E-cadherin-mediated adhesion induces a functionally distinct pathway of dendritic cell maturation. *Immunity* 2007, **27**(4):610-624.
42. **Voigtlander C, Rossner S, Cierpka E, Theiner G, Wiethe C et al:** Dendritic cells matured with TNF can be further activated in vitro and after subcutaneous injection in vivo which converts their tolerogenicity into immunogenicity. *J Immunother* 2006, **29**(4):407-415.
43. **Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT:** Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol* 2001, **2**(8):725-731.
44. **Shortman K, Naik SH:** Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* 2007, **7**(1):19-30.
45. **Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M et al:** Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 2010, **327**(5966):656-661.
46. **Liu K, Nussenzweig MC:** Origin and development of dendritic cells. *Immunol Rev* 2010, **234**(1):45-54.
47. **Fogg DK, Sibon C, Miled C, Jung S, Aucouturier P et al:** A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* 2006, **311**(5757):83-87.
48. **Onai N, Obata-Onai A, Schmid MA, Ohteki T, Jarrossay D et al:** Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat Immunol* 2007, **8**(11):1207-1216.
49. **Liu K, Vitoria GD, Schwickert TA, Guermontprez P, Meredith MM et al:** In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science* 2009, **324**(5925):392-397.
50. **Kushwah R, Hu J:** Complexity of dendritic cell subsets and their function in the host immune system. *Immunology* 2011, **133**(4):409-419.
51. **Merad M, Manz MG, Karsunky H, Wagers A, Peters W et al:** Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol* 2002, **3**(12):1135-1141.
52. **Chorro L, Sarde A, Li M, Woollard KJ, Chambon P et al:** Langerhans cell (LC) proliferation mediates neonatal development, homeostasis, and inflammation-associated expansion of the epidermal LC network. *J Exp Med* 2009, **206**(13):3089-3100.
53. **Ginhoux F, Tacke F, Angeli V, Bogunovic M, Loubeau M et al:** Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat Immunol* 2006, **7**(3):265-273.
54. **Asselin-Paturel C, Boonstra A, Dalod M, Durand I, Yessaad N et al:** Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol* 2001, **2**(12):1144-1150.
55. **Nakano H, Yanagita M, Gunn MD:** CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2001, **194**(8):1171-1178.
56. **Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ:** Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 2004, **5**(12):1219-1226.
57. **Leon B, Lopez-Bravo M, Ardavin C:** Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania. *Immunity* 2007, **26**(4):519-531.
58. **Serbina NV, Salazar-Mather TP, Biron CA, Kuziel WA, Pamer EG:** TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* 2003, **19**(1):59-70.

59. **Miloud T, Hammerling GJ, Garbi N:** Review of murine dendritic cells: types, location, and development. *Methods Mol Biol* 2010, **595**:21-42.
60. **Ardavin C:** Thymic dendritic cells. *Immunol Today* 1997, **18**(7):350-361.
61. **Vremec D, Pooley J, Hochrein H, Wu L, Shortman K:** CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol* 2000, **164**(6):2978-2986.
62. **Henri S, Vremec D, Kamath A, Waithman J, Williams S et al:** The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. *J Immunol* 2001, **167**(2):741-748.
63. **Ruedl C, Koebel P, Bachmann M, Hess M, Karjalainen K:** Anatomical origin of dendritic cells determines their life span in peripheral lymph nodes. *J Immunol* 2000, **165**(9):4910-4916.
64. **Yoshino M, Yamazaki H, Shultz LD, Hayashi S:** Constant rate of steady-state self-antigen trafficking from skin to regional lymph nodes. *Int Immunol* 2006, **18**(11):1541-1548.
65. **Wilson NS, Young LJ, Kupresanin F, Naik SH, Vremec D et al:** Normal proportion and expression of maturation markers in migratory dendritic cells in the absence of germs or Toll-like receptor signaling. *Immunol Cell Biol* 2008, **86**(2):200-205.
66. **Jakubzick C, Bogunovic M, Bonito AJ, Kuan EL, Merad M et al:** Lymph-migrating, tissue-derived dendritic cells are minor constituents within steady-state lymph nodes. *J Exp Med* 2008, **205**(12):2839-2850.
67. **Scheinecker C, McHugh R, Shevach EM, Germain RN:** Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node. *J Exp Med* 2002, **196**(8):1079-1090.
68. **Huang FP, Platt N, Wykes M, Major JR, Powell TJ et al:** A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J Exp Med* 2000, **191**(3):435-444.
69. **Jang MH, Sougawa N, Tanaka T, Hirata T, Hiroi T et al:** CCR7 is critically important for migration of dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes. *J Immunol* 2006, **176**(2):803-810.
70. **Hemmi H, Yoshino M, Yamazaki H, Naito M, Iyoda T et al:** Skin antigens in the steady state are trafficked to regional lymph nodes by transforming growth factor-beta1-dependent cells. *Int Immunol* 2001, **13**(5):695-704.
71. **Lutz MB, Kurts C:** Induction of peripheral CD4+ T-cell tolerance and CD8+ T-cell cross-tolerance by dendritic cells. *Eur J Immunol* 2009, **39**(9):2325-2330.
72. **Valladeau J, Ravel O, Dezutter-Dambuyant C, Moore K, Kleijmeer M et al:** Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 2000, **12**(1):71-81.
73. **Bursch LS, Wang L, Igyarto B, Kissenpfennig A, Malissen B et al:** Identification of a novel population of Langerin+ dendritic cells. *J Exp Med* 2007, **204**(13):3147-3156.
74. **Poulin LF, Henri S, de Bovis B, Devilard E, Kissenpfennig A et al:** The dermis contains langerin+ dendritic cells that develop and function independently of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 2007, **204**(13):3119-3131.
75. **Ginhoux F, Collin MP, Bogunovic M, Abel M, Leboeuf M et al:** Blood-derived dermal langerin+ dendritic cells survey the skin in the steady state. *J Exp Med* 2007, **204**(13):3133-3146.
76. **Ohl L, Mohaupt M, Czeloth N, Hintzen G, Kiafard Z et al:** CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity* 2004, **21**(2):279-288.
77. **Stoitzner P, Tripp CH, Douillard P, Saeland S, Romani N:** Migratory Langerhans cells in mouse lymph nodes in steady state and inflammation. *J Invest Dermatol* 2005, **125**(1):116-125.

78. **Merad M, Ginhoux F, Collin M:** Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 2008, **8**(12):935-947.
79. **Dudziak D, Kamphorst AO, Heidkamp GF, Buchholz VR, Trumpfheller C et al:** Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* 2007, **315**(5808):107-111.
80. **Proietto AI, van Dommelen S, Zhou P, Rizzitelli A, D'Amico A et al:** Dendritic cells in the thymus contribute to T-regulatory cell induction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(50):19869-19874.
81. **Bluestone JA:** Mechanisms of tolerance. *Immunol Rev* 2011, **241**(1):5-19.
82. **Germain RN:** T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* 2002, **2**(5):309-322.
83. **Teh HS, Kisielow P, Scott B, Kishi H, Uematsu Y et al:** Thymic major histocompatibility complex antigens and the alpha beta T-cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. *Nature* 1988, **335**(6187):229-233.
84. **Swat W, Ignatowicz L, von Boehmer H, Kisielow P:** Clonal deletion of immature CD4+8+ thymocytes in suspension culture by extrathymic antigen-presenting cells. *Nature* 1991, **351**(6322):150-153.
85. **Papiernik M, de Moraes ML, Pontoux C, Vasseur F, Penit C:** Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. *Int Immunol* 1998, **10**(4):371-378.
86. **Fehervari Z, Sakaguchi S:** Development and function of CD25+CD4+ regulatory T cells. *Curr Opin Immunol* 2004, **16**(2):203-208.
87. **Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Holenbeck AE et al:** Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2001, **2**(4):301-306.
88. **Kyewski B, Klein L:** A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol* 2006, **24**:571-606.
89. **Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, Chen Z, Berzins SP et al:** Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 2002, **298**(5597):1395-1401.
90. **Bonasio R, Scimone ML, Schaerli P, Grabie N, Lichtman AH et al:** Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus. *Nat Immunol* 2006, **7**(10):1092-1100.
91. **Brocker T, Riedinger M, Karjalainen K:** Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med* 1997, **185**(3):541-550.
92. **Bouneaud C, Kourilsky P, Bousso P:** Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity* 2000, **13**(6):829-840.
93. **Kamradt T, Mitchison NA:** Tolerance and autoimmunity. *N Engl J Med* 2001, **344**(9):655-664.
94. **Lutz MB:** Differentiation Stages and Subsets of Tolerogenic Dendritic Cells. *Handbook of Dendritic Cells Biology, Diseases, and Therapies Edited by MB Lutz, N Romani, and A Steinkasserer* 2006(WILEY-VHC Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim):517-543.
95. **Lehmann PV:** The fate of T cells in the brain: veni, vidi, vici and veni, mori. *Am J Pathol* 1998, **153**(3):677-680.
96. **Kurts C, Miller JF, Subramaniam RM, Carbone FR, Heath WR:** Major histocompatibility complex class I-restricted cross-presentation is biased towards high dose antigens and those released during cellular destruction. *J Exp Med* 1998, **188**(2):409-414.

97. **Jenkins MK, Schwartz RH:** Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J Exp Med* 1987, **165**(2):302-319.
98. **Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K et al:** Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* 2001, **194**(6):769-779.
99. **Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC et al:** 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* 2002, **196**(12):1627-1638.
100. **Greenwald RJ, Boussiotis VA, Lorschach RB, Abbas AK, Sharpe AH:** CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo. *Immunity* 2001, **14**(2):145-155.
101. **Fife BT, Pauken KE, Eagar TN, Obu T, Wu J et al:** Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR-induced stop signal. *Nat Immunol* 2009, **10**(11):1185-1192.
102. **Ferber I, Schonrich G, Schenkel J, Mellor AL, Hammerling GJ et al:** Levels of peripheral T cell tolerance induced by different doses of tolerogen. *Science* 1994, **263**(5147):674-676.
103. **Critchfield JM, Racke MK, Zuniga-Pflucker JC, Cannella B, Raine CS et al:** T cell deletion in high antigen dose therapy of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 1994, **263**(5150):1139-1143.
104. **Forster I, Hirose R, Arbeit JM, Clausen BE, Hanahan D:** Limited capacity for tolerization of CD4+ T cells specific for a pancreatic beta cell neo-antigen. *Immunity* 1995, **2**(6):573-585.
105. **Singer GG, Abbas AK:** The fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. *Immunity* 1994, **1**(5):365-371.
106. **Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA:** Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 1995, **270**(5239):1189-1192.
107. **Wang RF:** CD8+ regulatory T cells, their suppressive mechanisms, and regulation in cancer. *Hum Immunol* 2008, **69**(11):811-814.
108. **Bronte V:** Myeloid-derived suppressor cells in inflammation: uncovering cell subsets with enhanced immunosuppressive functions. *Eur J Immunol* 2009, **39**(10):2670-2672.
109. **Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M:** Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008, **133**(5):775-787.
110. **Shevach EM:** Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 2009, **30**(5):636-645.
111. **Horwitz DA, Zheng SG, Gray JD:** Natural and TGF-beta-induced Foxp3(+)CD4(+)CD25(+) regulatory T cells are not mirror images of each other. *Trends Immunol* 2008, **29**(9):429-435.
112. **Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ:** Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 2009, **30**(5):626-635.
113. **Khattari R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F:** An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 2003, **4**(4):337-342.
114. **Hori S, Nomura T, Sakaguchi S:** Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003, **299**(5609):1057-1061.
115. **Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY:** Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003, **4**(4):330-336.
116. **Josefowicz SZ, Rudensky A:** Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity* 2009, **30**(5):616-625.

117. **Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K et al:** Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 2006, **212**:28-50.
118. **Weiner HL:** Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 2001, **182**:207-214.
119. **Pletinckx K, Döhler A, Vladimir P, Lutz MB:** Role of dendritic cell maturity/costimulation for generation, homeostasis, and suppressive activity of regulatory T cells. *Frontiers in Immunology* 2011, **2**(39):1-16.
120. **Wing K, Sakaguchi S:** Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol* 2010, **11**(1):7-13.
121. **Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG et al:** Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 2005, **22**(3):329-341.
122. **Apostolou I, Sarukhan A, Klein L, von Boehmer H:** Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol* 2002, **3**(8):756-763.
123. **Pacholczyk R, Ignatowicz H, Kraj P, Ignatowicz L:** Origin and T cell receptor diversity of Foxp3+CD4+CD25+ T cells. *Immunity* 2006, **25**(2):249-259.
124. **Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B et al:** B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 2000, **12**(4):431-440.
125. **Tang Q, Henriksen KJ, Boden EK, Tooley AJ, Ye J et al:** Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2003, **171**(7):3348-3352.
126. **Lohr J, Knoechel B, Kahn EC, Abbas AK:** Role of B7 in T cell tolerance. *J Immunol* 2004, **173**(8):5028-5035.
127. **Guiducci C, Valzasina B, Dislich H, Colombo MP:** CD40/CD40L interaction regulates CD4+CD25+ T reg homeostasis through dendritic cell-produced IL-2. *Eur J Immunol* 2005, **35**(2):557-567.
128. **Malek TR, Yu A, Vincek V, Scibelli P, Kong L:** CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity* 2002, **17**(2):167-178.
129. **Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY:** A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 2005, **6**(11):1142-1151.
130. **Burchill MA, Yang J, Vang KB, Farrar MA:** Interleukin-2 receptor signaling in regulatory T cell development and homeostasis. *Immunol Lett* 2007, **114**(1):1-8.
131. **Vang KB, Yang J, Mahmud SA, Burchill MA, Vegoe AL et al:** IL-2, -7, and -15, but not thymic stromal lymphopoeitin, redundantly govern CD4+Foxp3+ regulatory T cell development. *J Immunol* 2008, **181**(5):3285-3290.
132. **Bayer AL, Lee JY, de la Barrera A, Surh CD, Malek TR:** A function for IL-7R for CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* 2008, **181**(1):225-234.
133. **Wirnsberger G, Hinterberger M, Klein L:** Regulatory T-cell differentiation versus clonal deletion of autoreactive thymocytes. *Immunol Cell Biol* 2011, **89**(1):45-53.
134. **Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L et al:** Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003, **198**(12):1875-1886.
135. **Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, Khazaie K, Nussenzweig MC et al:** Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol* 2005, **6**(12):1219-1227.
136. **Apostolou I, von Boehmer H:** In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med* 2004, **199**(10):1401-1408.
137. **Corthay A:** How do regulatory T cells work? *Scand J Immunol* 2009, **70**(4):326-336.



138. **Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M et al:** Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 1998, **10**(12):1969-1980.
139. **Klein L, Khazaie K, von Boehmer H:** In vivo dynamics of antigen-specific regulatory T cells not predicted from behavior in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(15):8886-8891.
140. **Yamazaki S, Iyoda T, Tarbell K, Olson K, Velinzon K et al:** Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med* 2003, **198**(2):235-247.
141. **Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T:** Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol* 2009, **21**(10):1105-1111.
142. **Thornton AM, Shevach EM:** Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* 2000, **164**(1):183-190.
143. **Hsieh CS, Liang Y, Tyznik AJ, Self SG, Liggitt D et al:** Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors. *Immunity* 2004, **21**(2):267-277.
144. **Curotto de Lafaille MA, Kutchukhidze N, Shen S, Ding Y, Yee H et al:** Adaptive Foxp3+ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation. *Immunity* 2008, **29**(1):114-126.
145. **Cobbold SP, Castejon R, Adams E, Zelenika D, Graca L et al:** Induction of foxP3+ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants. *J Immunol* 2004, **172**(10):6003-6010.
146. **Coomes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Carcamo CV, Hall J, Sun CM et al:** A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* 2007, **204**(8):1757-1764.
147. **Sun CM, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M et al:** Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med* 2007, **204**(8):1775-1785.
148. **Wong J, Obst R, Correia-Neves M, Losyev G, Mathis D et al:** Adaptation of TCR repertoires to self-peptides in regulatory and nonregulatory CD4+ T cells. *J Immunol* 2007, **178**(11):7032-7041.
149. **Kajiura F, Sun S, Nomura T, Izumi K, Ueno T et al:** NF-kappa B-inducing kinase establishes self-tolerance in a thymic stroma-dependent manner. *J Immunol* 2004, **172**(4):2067-2075.
150. **Aschenbrenner K, D'Cruz LM, Vollmann EH, Hinterberger M, Emmerich J et al:** Selection of Foxp3+ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire+ medullary thymic epithelial cells. *Nat Immunol* 2007, **8**(4):351-358.
151. **Watanabe N, Wang YH, Lee HK, Ito T, Cao W et al:** Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature* 2005, **436**(7054):1181-1185.
152. **Steinman RM, Hawiger D, Liu K, Bonifaz L, Bonnyay D et al:** Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Ann N Y Acad Sci* 2003, **987**:15-25.
153. **Sixt M, Kanazawa N, Selg M, Samson T, Roos G et al:** The conduit system transports soluble antigens from the afferent lymph to resident dendritic cells in the T cell area of the lymph node. *Immunity* 2005, **22**(1):19-29.
154. **Inaba K, Swiggard WJ, Inaba M, Meltzer J, Mirza A et al:** 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* 1995, **163**(1):148-156.

155. **Benson MJ, Pino-Lagos K, Roseblatt M, Noelle RJ:** All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J Exp Med* 2007, **204**(8):1765-1774.
156. **Wang L, Pino-Lagos K, de Vries VC, Guleria I, Sayegh MH et al:** Programmed death 1 ligand signaling regulates the generation of adaptive Foxp3+CD4+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**(27):9331-9336.
157. **Semple K, Nguyen A, Yu Y, Wang H, Anasetti C et al:** Strong CD28 costimulation suppresses induction of regulatory T cells from naive precursors through Lck signaling. *Blood* 2011, **117**(11):3096-3103.
158. **Yamazaki S, Bonito AJ, Spisek R, Dhodapkar M, Inaba K et al:** Dendritic cells are specialized accessory cells along with TGF- for the differentiation of Foxp3+ CD4+ regulatory T cells from peripheral Foxp3 precursors. *Blood* 2007, **110**(13):4293-4302.
159. **Yamazaki S, Dudziak D, Heidkamp GF, Fiorese C, Bonito AJ et al:** CD8+ CD205+ splenic dendritic cells are specialized to induce Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 2008, **181**(10):6923-6933.
160. **Guilliams M, Crozat K, Henri S, Tamoutounour S, Grenot P et al:** Skin-draining lymph nodes contain dermis-derived CD103(-) dendritic cells that constitutively produce retinoic acid and induce Foxp3(+) regulatory T cells. *Blood* 2010, **115**(10):1958-1968.
161. **Lutz MB, Dohler A, Azukizawa H:** Revisiting the tolerogenicity of epidermal Langerhans cells. *Immunol Cell Biol* 2010, **88**(4):381-386.
162. **Bar-On L, Birnberg T, Kim KW, Jung S:** Dendritic cell-restricted CD80/86 deficiency results in peripheral regulatory T-cell reduction but is not associated with lymphocyte hyperactivation. *Eur J Immunol* 2011, **41**(2):291-298.
163. **Cheng G, Yu A, Malek TR:** T-cell tolerance and the multi-functional role of IL-2R signaling in T-regulatory cells. *Immunol Rev* 2011, **241**(1):63-76.
164. **Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S:** Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med* 2005, **201**(5):723-735.
165. **Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, Feuerer M, Lapan AD et al:** FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* 2006, **126**(2):375-387.
166. **Granucci F, Feau S, Angeli V, Trottein F, Ricciardi-Castagnoli P:** Early IL-2 production by mouse dendritic cells is the result of microbial-induced priming. *J Immunol* 2003, **170**(10):5075-5081.
167. **Darrasse-Jeze G, Deroubaix S, Mouquet H, Victora GD, Eisenreich T et al:** Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 2009, **206**(9):1853-1862.
168. **Swee LK, Bosco N, Malissen B, Ceredig R, Rolink A:** Expansion of peripheral naturally occurring T regulatory cells by Fms-like tyrosine kinase 3 ligand treatment. *Blood* 2009, **113**(25):6277-6287.
169. **Kim JK, Klinger M, Benjamin J, Xiao Y, Erle DJ et al:** Impact of the TCR signal on regulatory T cell homeostasis, function, and trafficking. *PLoS One* 2009, **4**(8):e6580.
170. **Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S:** Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. *Nat Immunol* 2011, **12**(8):695-708.
171. **Bonizzi G, Karin M:** The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 2004, **25**(6):280-288.
172. **Vallabhapurapu S, Karin M:** Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* 2009, **27**:693-733.
173. **Hayden MS, Ghosh S:** NF-kappaB in immunobiology. *Cell Res* 2011, **21**(2):223-244.

174. **Mordmuller B, Krappmann D, Esen M, Wegener E, Scheidereit C:** Lymphotoxin and lipopolysaccharide induce NF-kappaB-p52 generation by a co-translational mechanism. *EMBO Rep* 2003, **4**(1):82-87.
175. **Shih VF, Tsui R, Caldwell A, Hoffmann A:** A single NFkappaB system for both canonical and non-canonical signaling. *Cell Res* 2011, **21**(1):86-102.
176. **Karin M, Ben-Neriah Y:** Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 2000, **18**:621-663.
177. **Dobrzanski P, Ryseck RP, Bravo R:** Specific inhibition of RelB/p52 transcriptional activity by the C-terminal domain of p100. *Oncogene* 1995, **10**(5):1003-1007.
178. **Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten FR, Krahn G et al:** Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* 2001, **293**(5534):1495-1499.
179. **Yilmaz ZB, Weih DS, Sivakumar V, Weih F:** RelB is required for Peyer's patch development: differential regulation of p52-RelB by lymphotoxin and TNF. *Embo J* 2003, **22**(1):121-130.
180. **Ryseck RP, Weih F, Carrasco D, Bravo R:** RelB, a member of the Rel/NF-kappa B family of transcription factors. *Braz J Med Biol Res* 1996, **29**(7):895-903.
181. **Ryseck RP, Bull P, Takamiya M, Bours V, Siebenlist U et al:** RelB, a new Rel family transcription activator that can interact with p50-NF-kappa B. *Mol Cell Biol* 1992, **12**(2):674-684.
182. **Dobrzanski P, Ryseck RP, Bravo R:** Differential interactions of Rel-NF-kappa B complexes with I kappa B alpha determine pools of constitutive and inducible NF-kappa B activity. *Embo J* 1994, **13**(19):4608-4616.
183. **Marienfeld R, May MJ, Berberich I, Serfling E, Ghosh S et al:** RelB forms transcriptionally inactive complexes with RelA/p65. *J Biol Chem* 2003, **278**(22):19852-19860.
184. **Jacque E, Tchenio T, Piton G, Romeo PH, Baud V:** RelA repression of RelB activity induces selective gene activation downstream of TNF receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(41):14635-14640.
185. **Dobrzanski P, Ryseck RP, Bravo R:** Both N- and C-terminal domains of RelB are required for full transactivation: role of the N-terminal leucine zipper-like motif. *Mol Cell Biol* 1993, **13**(3):1572-1582.
186. **Hayden MS, Ghosh S:** Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 2008, **132**(3):344-362.
187. **Weih F, Caamano J:** Regulation of secondary lymphoid organ development by the nuclear factor-kappaB signal transduction pathway. *Immunol Rev* 2003, **195**:91-105.
188. **Sun SC:** Non-canonical NF-kappaB signaling pathway. *Cell Res* 2011, **21**(1):71-85.
189. **Xiao G, Harhaj EW, Sun SC:** NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol Cell* 2001, **7**(2):401-409.
190. **Solan NJ, Miyoshi H, Carmona EM, Bren GD, Paya CV:** RelB cellular regulation and transcriptional activity are regulated by p100. *J Biol Chem* 2002, **277**(2):1405-1418.
191. **Granelli-Piperno A, Pope M, Inaba K, Steinman RM:** Coexpression of NF-kappa B/Rel and Sp1 transcription factors in human immunodeficiency virus 1-induced, dendritic cell-T-cell syncytia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**(24):10944-10948.
192. **Feuillard J, Korner M, Israel A, Vassy J, Raphael M:** Differential nuclear localization of p50, p52, and RelB proteins in human accessory cells of the immune response in situ. *Eur J Immunol* 1996, **26**(11):2547-2551.
193. **Neumann M, Fries H, Scheicher C, Keikavoussi P, Kolb-Maurer A et al:** Differential expression of Rel/NF-kappaB and octamer factors is a hallmark of the generation and maturation of dendritic cells. *Blood* 2000, **95**(1):277-285.

194. **Boffa DJ, Feng B, Sharma V, Dematteo R, Miller G et al:** Selective loss of c-Rel compromises dendritic cell activation of T lymphocytes. *Cell Immunol* 2003, **222**(2):105-115.
195. **Bottero V, Withoff S, Verma IM:** NF-kappaB and the regulation of hematopoiesis. *Cell Death Differ* 2006, **13**(5):785-797.
196. **Gerondakis S, Grumont R, Gugasyan R, Wong L, Isomura I et al:** Unravelling the complexities of the NF-kappaB signalling pathway using mouse knockout and transgenic models. *Oncogene* 2006, **25**(51):6781-6799.
197. **Carrasco D, Ryseck RP, Bravo R:** Expression of relB transcripts during lymphoid organ development: specific expression in dendritic antigen-presenting cells. *Development* 1993, **118**(4):1221-1231.
198. **Weih F, Carrasco D, Bravo R:** Constitutive and inducible Rel/NF-kappa B activities in mouse thymus and spleen. *Oncogene* 1994, **9**(11):3289-3297.
199. **Burkly L, Hession C, Ogata L, Reilly C, Marconi LA et al:** Expression of relB is required for the development of thymic medulla and dendritic cells. *Nature* 1995, **373**(6514):531-536.
200. **Pettit AR, Quinn C, MacDonald KP, Cavanagh LL, Thomas G et al:** Nuclear localization of RelB is associated with effective antigen-presenting cell function. *J Immunol* 1997, **159**(8):3681-3691.
201. **Clark GJ, Gunningham S, Troy A, Vuckovic S, Hart DN:** Expression of the RelB transcription factor correlates with the activation of human dendritic cells. *Immunology* 1999, **98**(2):189-196.
202. **Weih F, Carrasco D, Durham SK, Barton DS, Rizzo CA et al:** Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF-kappa B/Rel family. *Cell* 1995, **80**(2):331-340.
203. **Wu L, D'Amico A, Winkel KD, Suter M, Lo D et al:** RelB is essential for the development of myeloid-related CD8alpha- dendritic cells but not of lymphoid-related CD8alpha+ dendritic cells. *Immunity* 1998, **9**(6):839-847.
204. **Koski GK, Lyakh LA, Cohen PA, Rice NR:** CD14+ monocytes as dendritic cell precursors: diverse maturation-inducing pathways lead to common activation of NF-kappab/RelB. *Crit Rev Immunol* 2001, **21**(1-3):179-189.
205. **Brossart P, Zobywalski A, Grunebach F, Behnke L, Stuhler G et al:** Tumor necrosis factor alpha and CD40 ligand antagonize the inhibitory effects of interleukin 10 on T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Cancer Res* 2000, **60**(16):4485-4492.
206. **Hofer S, Rescigno M, Granucci F, Citterio S, Francolini M et al:** Differential activation of NF-kappa B subunits in dendritic cells in response to Gram-negative bacteria and to lipopolysaccharide. *Microbes Infect* 2001, **3**(4):259-265.
207. **Martin E, O'Sullivan B, Low P, Thomas R:** Antigen-specific suppression of a primed immune response by dendritic cells mediated by regulatory T cells secreting interleukin-10. *Immunity* 2003, **18**(1):155-167.
208. **Castiglioni P, Janssen EM, Prilliman KR, Gerloni M, Schoenberger S et al:** Cross-priming is under control of the relB gene. *Scand J Immunol* 2002, **56**(3):219-223.
209. **Zanetti M, Castiglioni P, Schoenberger S, Gerloni M:** The role of relB in regulating the adaptive immune response. *Ann N Y Acad Sci* 2003, **987**:249-257.
210. **Ouaaz F, Arron J, Zheng Y, Choi Y, Beg AA:** Dendritic cell development and survival require distinct NF-kappaB subunits. *Immunity* 2002, **16**(2):257-270.
211. **Herrmann T:** Die Rolle der Rel/NF-κB-Transkriptionsfaktoren in der Reifung und Funktion dendritischer Zellen. *Dissertation* 2004.
212. **O'Keefe M, Grumont RJ, Hochrein H, Fuchsberger M, Gugasyan R et al:** Distinct roles for the NF-kappaB1 and c-Rel transcription factors in the differentiation and

- survival of plasmacytoid and conventional dendritic cells activated by TLR-9 signals. *Blood* 2005, **106**(10):3457-3464.
213. **Artis D, Kane CM, Fiore J, Zaph C, Shapira S et al:** Dendritic cell-intrinsic expression of NF-kappa B1 is required to promote optimal Th2 cell differentiation. *J Immunol* 2005, **174**(11):7154-7159.
214. **Yoshimura S, Bondeson J, Foxwell BM, Brennan FM, Feldmann M:** Effective antigen presentation by dendritic cells is NF-kappaB dependent: coordinate regulation of MHC, co-stimulatory molecules and cytokines. *Int Immunol* 2001, **13**(5):675-683.
215. **Andreaskos E, Smith C, Monaco C, Brennan FM, Foxwell BM et al:** Ikappa B kinase 2 but not NF-kappa B-inducing kinase is essential for effective DC antigen presentation in the allogeneic mixed lymphocyte reaction. *Blood* 2003, **101**(3):983-991.
216. **Tas SW, de Jong EC, Hajji N, May MJ, Ghosh S et al:** Selective inhibition of NF-kappaB in dendritic cells by the NEMO-binding domain peptide blocks maturation and prevents T cell proliferation and polarization. *Eur J Immunol* 2005, **35**(4):1164-1174.
217. **Lind EF, Ahonen CL, Wasiuk A, Kosaka Y, Becher B et al:** Dendritic cells require the NF-kappaB2 pathway for cross-presentation of soluble antigens. *J Immunol* 2008, **181**(1):354-363.
218. **Caton ML, Smith-Raska MR, Reizis B:** Notch-RBP-J signaling controls the homeostasis of CD8- dendritic cells in the spleen. *J Exp Med* 2007, **204**(7):1653-1664.
219. **Azukizawa H, Kosaka H, Sano S, Heath WR, Takahashi I et al:** Induction of T-cell-mediated skin disease specific for antigen transgenically expressed in keratinocytes. *Eur J Immunol* 2003, **33**(7):1879-1888.
220. **Kontgen F, Suss G, Stewart C, Steinmetz M, Bluethmann H:** Targeted disruption of the MHC class II Aa gene in C57BL/6 mice. *Int Immunol* 1993, **5**(8):957-964.
221. **Barnden MJ, Allison J, Heath WR, Carbone FR:** Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol Cell Biol* 1998, **76**(1):34-40.
222. **Sha WC, Liou HC, Tuomanen EI, Baltimore D:** Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell* 1995, **80**(2):321-330.
223. **Caamano JH, Rizzo CA, Durham SK, Barton DS, Raventos-Suarez C et al:** Nuclear factor (NF)-kappa B2 (p100/p52) is required for normal splenic microarchitecture and B cell-mediated immune responses. *J Exp Med* 1998, **187**(2):185-196.
224. **Lyons AB, Parish CR:** Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1994, **171**(1):131-137.
225. **Kaplan DH, Jenison MC, Saeland S, Shlomchik WD, Shlomchik MJ:** Epidermal langerhans cell-deficient mice develop enhanced contact hypersensitivity. *Immunity* 2005, **23**(6):611-620.
226. **Pfaffl MW:** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001, **29**(9):e45.
227. **Gandhi R, Anderson DE, Weiner HL:** Cutting Edge: Immature human dendritic cells express latency-associated peptide and inhibit T cell activation in a TGF-beta-dependent manner. *J Immunol* 2007, **178**(7):4017-4021.
228. **Waithman J, Allan RS, Kosaka H, Azukizawa H, Shortman K et al:** Skin-derived dendritic cells can mediate deletional tolerance of class I-restricted self-reactive T cells. *J Immunol* 2007, **179**(7):4535-4541.
229. **Bedoui S, Whitney PG, Waithman J, Eidsmo L, Wakim L et al:** Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nat Immunol* 2009, **10**(5):488-495.

230. **Henri S, Poulin LF, Tamoutounour S, Ardouin L, Guilliams M et al:** CD207+ CD103+ dermal dendritic cells cross-present keratinocyte-derived antigens irrespective of the presence of Langerhans cells. *J Exp Med* 2010, **207**(1):189-206.
231. **Lernbecher T, Kistler B, Wirth T:** Two distinct mechanisms contribute to the constitutive activation of RelB in lymphoid cells. *Embo J* 1994, **13**(17):4060-4069.
232. **Nagao K, Ginhoux F, Leitner WW, Motegi S, Bennett CL et al:** Murine epidermal Langerhans cells and langerin-expressing dermal dendritic cells are unrelated and exhibit distinct functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(9):3312-3317.
233. **Cumberbatch M, Illingworth I, Kimber I:** Antigen-bearing dendritic cells in the draining lymph nodes of contact sensitized mice: cluster formation with lymphocytes. *Immunology* 1991, **74**(1):139-145.
234. **Thomas WR, Edwards AJ, Watkins MC, Asherson GL:** Distribution of immunogenic cells after painting with the contact sensitizers fluorescein isothiocyanate and oxazolone. Different sensitizers form immunogenic complexes with different cell populations. *Immunology* 1980, **39**(1):21-27.
235. **Franzoso G, Carlson L, Poljak L, Shores EW, Epstein S et al:** Mice deficient in nuclear factor (NF)-kappa B/p52 present with defects in humoral responses, germinal center reactions, and splenic microarchitecture. *J Exp Med* 1998, **187**(2):147-159.
236. **Beg AA, Sha WC, Bronson RT, Ghosh S, Baltimore D:** Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B. *Nature* 1995, **376**(6536):167-170.
237. **Metzger D, Feil R:** Engineering the mouse genome by site-specific recombination. *Curr Opin Biotechnol* 1999, **10**(5):470-476.
238. **Sauer B, Henderson N:** Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988, **85**(14):5166-5170.
239. **Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M:** Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995, **155**(3):1151-1164.
240. **McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM et al:** CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002, **16**(2):311-323.
241. **Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE et al:** Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* 2010, **184**(7):3433-3441.
242. **Verhagen J, Wraith DC:** Comment on "Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells". *J Immunol* 2010, **185**(12):7129; author reply 7130.
243. **Gottschalk RA, Corse E, Allison JP:** Expression of Helios in Peripherally Induced Foxp3+ Regulatory T Cells. *J Immunol* 2011.
244. **Akimova T, Beier UH, Wang L, Levine MH, Hancock WW:** Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation. *PLoS One* 2011, **6**(8):e24226.
245. **Scholzen T, Gerdes J:** The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000, **182**(3):311-322.
246. **Sprent J, Surh CD:** Normal T cell homeostasis: the conversion of naive cells into memory-phenotype cells. *Nat Immunol* 2011, **12**(6):478-484.
247. **Letourneau S, van Leeuwen EM, Krieg C, Martin C, Pantaleo G et al:** IL-2/anti-IL-2 antibody complexes show strong biological activity by avoiding interaction with IL-2 receptor alpha subunit CD25. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**(5):2171-2176.

248. **Franceschini D, Paroli M, Francavilla V, Videtta M, Morrone S et al:** PD-L1 negatively regulates CD4+CD25+Foxp3+ Tregs by limiting STAT-5 phosphorylation in patients chronically infected with HCV. *J Clin Invest* 2009, **119**(3):551-564.
249. **Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH:** The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev* 2010, **236**:219-242.
250. **Kushwah R, Hu J:** Role of dendritic cells in the induction of regulatory T cells. *Cell Biosci* 2011, **1**(1):20.
251. **Kissenpfennig A, Henri S, Dubois B, Laplace-Builhe C, Perrin P et al:** Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity* 2005, **22**(5):643-654.
252. **Azukizawa H, Dohler A, Kanazawa N, Nayak A, Lipp M et al:** Steady state migratory RelB+ langerin+ dermal dendritic cells mediate peripheral induction of antigen-specific CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2011, **41**(5):1420-1434.
253. **Allan RS, Waithman J, Bedoui S, Jones CM, Villadangos JA et al:** Migratory dendritic cells transfer antigen to a lymph node-resident dendritic cell population for efficient CTL priming. *Immunity* 2006, **25**(1):153-162.
254. **Henri S, Guillemins M, Poulin LF, Tamoutounour S, Ardouin L et al:** Disentangling the complexity of the skin dendritic cell network. *Immunol Cell Biol* 2010, **88**(4):366-375.
255. **Li MO, Flavell RA:** TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell* 2008, **134**(3):392-404.
256. **Andersson J, Tran DQ, Pesu M, Davidson TS, Ramsey H et al:** CD4+ FoxP3+ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF-beta-dependent manner. *J Exp Med* 2008, **205**(9):1975-1981.
257. **Kaplan DH, Li MO, Jenison MC, Shlomchik WD, Flavell RA et al:** Autocrine/paracrine TGFbeta1 is required for the development of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 2007, **204**(11):2545-2552.
258. **Iliev ID, Mileti E, Matteoli G, Chieppa M, Rescigno M:** Intestinal epithelial cells promote colitis-protective regulatory T-cell differentiation through dendritic cell conditioning. *Mucosal Immunol* 2009, **2**(4):340-350.
259. **Li Q, Guo Z, Xu X, Xia S, Cao X:** Pulmonary stromal cells induce the generation of regulatory DC attenuating T-cell-mediated lung inflammation. *Eur J Immunol* 2008, **38**(10):2751-2761.
260. **Wang B, Amerio P, Sauder DN:** Role of cytokines in epidermal Langerhans cell migration. *J Leukoc Biol* 1999, **66**(1):33-39.
261. **von Boehmer H:** Oral tolerance: is it all retinoic acid? *J Exp Med* 2007, **204**(8):1737-1739.
262. **Gottschalk RA, Corse E, Allison JP:** TCR ligand density and affinity determine peripheral induction of Foxp3 in vivo. *J Exp Med* 2010, **207**(8):1701-1711.
263. **Bertho N, Marquet F, Pascale F, Kang C, Bonneau M et al:** Steady state pig dendritic cells migrating in skin draining pseudo-afferent lymph are semi-mature. *Vet Immunol Immunopathol* 2011, **144**(3-4):430-436.
264. **van de Ven R, van den Hout MF, Lindenberg JJ, Sluijter BJ, van Leeuwen PA et al:** Characterization of four conventional dendritic cell subsets in human skin-draining lymph nodes in relation to T-cell activation. *Blood* 2011, **118**(9):2502-2510.
265. **Segura E, Valladeau-Guilemond J, Donnadiou MH, Sastre-Garau X, Soumelis V et al:** Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *J Exp Med* 2012.
266. **Naik SH, Sathe P, Park HY, Metcalf Db, Proietto AI et al:** Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat Immunol* 2007, **8**(11):1217-1226.

267. **Lutz MB**: Therapeutic potential of semi-mature dendritic cells for tolerance induction. *Frontiers in Immunology* 2012, **3**(123).
268. **Moore F, Buonocore S, Aksoy E, Ouled-Haddou N, Goriely S et al**: An alternative pathway of NF-kappaB activation results in maturation and T cell priming activity of dendritic cells overexpressing a mutated IkappaBalpha. *J Immunol* 2007, **178**(3):1301-1311.
269. **Shklovskaya E, O'Sullivan BJ, Ng LG, Roediger B, Thomas R et al**: Langerhans cells are precommitted to immune tolerance induction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**(44):18049-18054.
270. **Weih F, Warr G, Yang H, Bravo R**: Multifocal defects in immune responses in RelB-deficient mice. *J Immunol* 1997, **158**(11):5211-5218.
271. **Weih F, Durham SK, Barton DS, Sha WC, Baltimore D et al**: p50-NF-kappaB complexes partially compensate for the absence of RelB: severely increased pathology in p50(-/-)relB(-/-) double-knockout mice. *J Exp Med* 1997, **185**(7):1359-1370.
272. **Qiu T, Zhu HC, Liu XH, Dong WC, Weng XD et al**: Lentiviral-mediated shRNA against RelB induces the generation of tolerogenic dendritic cells. *Int Immunopharmacol* 2012, **12**(3):501-509.
273. **Mburu YK, Egloff AM, Walker WH, Wang L, Seethala RR et al**: Chemokine receptor 7 (CCR7) gene expression is regulated by NF-kappaB and activator protein 1 (AP1) in metastatic squamous cell carcinoma of head and neck (SCCHN). *J Biol Chem* 2012, **287**(5):3581-3590.
274. **O'Sullivan BJ, Pai S, Street S, An X, MacDonald KP et al**: Immunotherapy with costimulatory dendritic cells to control autoimmune inflammation. *J Immunol* 2011, **187**(8):4018-4030.
275. **MacDonald KP, Kuns RD, Rowe V, Morris ES, Banovic T et al**: Effector and regulatory T-cell function is differentially regulated by RelB within antigen-presenting cells during GVHD. *Blood* 2007, **109**(11):5049-5057.
276. **Speirs K, Lieberman L, Caamano J, Hunter CA, Scott P**: Cutting edge: NF-kappa B2 is a negative regulator of dendritic cell function. *J Immunol* 2004, **172**(2):752-756.
277. **Li M, Zhang X, Zheng X, Lian D, Zhang ZX et al**: Immune modulation and tolerance induction by RelB-silenced dendritic cells through RNA interference. *J Immunol* 2007, **178**(9):5480-5487.
278. **Zhang Y, Yang H, Xiao B, Wu M, Zhou W et al**: Dendritic cells transduced with lentiviral-mediated RelB-specific ShRNAs inhibit the development of experimental autoimmune myasthenia gravis. *Mol Immunol* 2009, **46**(4):657-667.
279. **Luo L, Li C, Wu W, Lu J, Shan J et al**: Dendritic cells transduced with lentiviral vector targeting RelB gene using RNA interference induce hyporesponsiveness in memory CD4(+) T cells and naive CD4(+) T cells. *Cell Immunol* 2012, **273**(1):85-93.
280. **Laufer TM, DeKoning J, Markowitz JS, Lo D, Glimcher LH**: Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex. *Nature* 1996, **383**(6595):81-85.
281. **Weih F, Durham SK, Barton DS, Sha WC, Baltimore D et al**: Both multiorgan inflammation and myeloid hyperplasia in RelB-deficient mice are T cell dependent. *J Immunol* 1996, **157**(9):3974-3979.
282. **Boyman O, Sprent J**: The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2012, **12**(3):180-190.
283. **Campbell DJ, Koch MA**: Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2011, **11**(2):119-130.
284. **Burchill MA, Goetz CA, Prlic M, O'Neil JJ, Harmon IR et al**: Distinct effects of STAT5 activation on CD4+ and CD8+ T cell homeostasis: development of



- CD4+CD25+ regulatory T cells versus CD8+ memory T cells. *J Immunol* 2003, **171**(11):5853-5864.
285. **Bayer AL, Yu A, Malek TR**: Function of the IL-2R for thymic and peripheral CD4+CD25+ Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* 2007, **178**(7):4062-4071.
286. **Thornton AM, Shevach EM**: CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 1998, **188**(2):287-296.
287. **Granucci F, Zanoni I, Feau S, Ricciardi-Castagnoli P**: Dendritic cell regulation of immune responses: a new role for interleukin 2 at the intersection of innate and adaptive immunity. *Embo J* 2003, **22**(11):2546-2551.
288. **Wuest SC, Edwan JH, Martin JF, Han S, Perry JS et al**: A role for interleukin-2 trans-presentation in dendritic cell-mediated T cell activation in humans, as revealed by daclizumab therapy. *Nat Med* 2011, **17**(5):604-609.
289. **Malek TR, Castro I**: Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity* 2010, **33**(2):153-165.
290. **Ma A, Koka R, Burkett P**: Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu Rev Immunol* 2006, **24**:657-679.
291. **Kim HP, Kelly J, Leonard WJ**: The basis for IL-2-induced IL-2 receptor alpha chain gene regulation: importance of two widely separated IL-2 response elements. *Immunity* 2001, **15**(1):159-172.
292. **Busse D, de la Rosa M, Hobiger K, Thurley K, Flossdorf M et al**: Competing feedback loops shape IL-2 signaling between helper and regulatory T lymphocytes in cellular microenvironments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**(7):3058-3063.
293. **Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR et al**: CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 2006, **203**(7):1701-1711.
294. **Simonetta F, Chiali A, Cordier C, Urrutia A, Girault I et al**: Increased CD127 expression on activated FOXP3+CD4+ regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2010, **40**(9):2528-2538.
295. **Mazzucchelli R, Durum SK**: Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nat Rev Immunol* 2007, **7**(2):144-154.
296. **Link A, Vogt TK, Favre S, Britschgi MR, Acha-Orbea H et al**: Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. *Nat Immunol* 2007, **8**(11):1255-1265.
297. **Guimond M, Veenstra RG, Grindler DJ, Zhang H, Cui Y et al**: Interleukin 7 signaling in dendritic cells regulates the homeostatic proliferation and niche size of CD4+ T cells. *Nat Immunol* 2009, **10**(2):149-157.
298. **Martin CE, Kim DM, Sprent J, Surh CD**: Is IL-7 from dendritic cells essential for the homeostasis of CD4+ T cells? *Nat Immunol* 2010, **11**(7):547-548; author reply 548.
299. **Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T et al**: Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 2000, **192**(7):1027-1034.
300. **Parry RV, Chemnitz JM, Frauwirth KA, Lanfranco AR, Braunstein I et al**: CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol* 2005, **25**(21):9543-9553.

## 9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 1:** Wichtige Kostimulatoren, Koinhibitoren und Zytokine bei Interaktionen von DZ und T-Zellen.
- Abb. 2:** Eigenschaften und Funktionen der verschiedenen Reifungsstadien von DZ.
- Abb. 3:** Entwicklung von murinen DZ.
- Abb. 4:** Schematische Darstellung des klassischen und alternativen NF- $\kappa$ B-Signalwegs.
- Abb. 5:** Hautdrainierende Lymphknoten enthalten unreife residente und semireife *steady state* migratorische DZ.
- Abb. 6:** Durchflusszytometrische Analyse der CD103 Expression auf residenten und migratorischen DZ in hautdrainierenden und mesenterischen Lymphknoten von WT und CCR7<sup>-/-</sup> Mäusen.
- Abb. 7:** *Steady state* migratorische DZ aus hautdrainierenden Lymphknoten exprimieren auf ihrer Oberfläche TGF- $\beta$  in Form von LAP und induzieren T<sub>regs</sub> mit Hilfe von endogenem TGF- $\beta$  *ex vivo*.
- Abb. 8:** Adoptiv transferierte naive CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> OT-2 T-Zellen konvertieren zu CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> in K5mOVA Mäusen.
- Abb. 9:** Migratorische dermale DZ induzieren T<sub>regs</sub> *in vivo*.
- Abb. 10:** CD40<sup>hi</sup> ssmDZ zeigen eine nukleäre Translokation von RelB.
- Abb. 11:** Reduzierte Frequenz an migratorischen DZ in den hautdrainierenden Lymphknoten von *relB*<sup>+/-</sup> und *p52*<sup>-/-</sup> Mäusen.
- Abb. 12:** Schematische Darstellung der Inaktivierung des *relB*-Gens in CD11c-exprimierenden Zellen mit Hilfe des Cre/loxP- Rekombinationssystems.
- Abb. 13:** CD11c<sup>+</sup> DZ von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen exprimieren kein RelB.
- Abb. 14:** RelB<sup>DCko</sup> Mäuse zeigen keine Unterschiede in der Zellularität der hautdrainierenden Lymphknoten und der Milz gegenüber Kontrollmäusen.
- Abb. 15:** RelB-Defizienz in DZ führt zu einem Anstieg an migratorischen DZ in hautdrainierenden Lymphknoten.
- Abb. 16:** RelB<sup>DCko</sup> Mäuse weisen eine normale Verteilung von DZ in der Haut auf
- Abb. 17:** Migratorische DZ in den hautdrainierenden Lymphknoten von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen exprimieren mehr CD40 als in Kontrollmäusen.
- Abb. 18:** Milz DZ von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen exprimieren mehr CD40 als in Kontrollmäusen.
- Abb. 19:** Durchflusszytometrische Analyse von B220<sup>+</sup> B-Zellen in den lymphatischen Organen von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen und Kontrollmäusen.
- Abb. 20:** Durchflusszytometrische Analyse von CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den hautdrainierenden Lymphknoten und der Milz von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen und Kontrollmäusen.
- Abb. 21:** Erhöhte Frequenz an Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> in den hautdrainierenden Lymphknoten und der Milz von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen.
- Abb. 22:** RelB<sup>DCko</sup> Mäuse weisen gegenüber den Kontrolltieren in den hautdrainierenden Lymphknoten und der Milz eine erhöhte Frequenz an CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup> T<sub>konv</sub> auf.
- Abb. 23:** Erhöhte Frequenz an Helios<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> in den hautdrainierenden Lymphknoten und der Milz von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen.
- Abb. 24:** Durchflusszytometrische Analyse der Thymozyten-Populationen im Thymus von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen und Kontrollmäusen.
- Abb. 25:** Erhöhte Proliferation von T<sub>regs</sub> im Thymus von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen.
- Abb. 26:** Erhöhte Proliferation von Helios<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> in den hautdrainierenden Lymphknoten, aber nicht in der Milz von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen.
- Abb. 27:** Adoptiv transferierte CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T<sub>regs</sub> expandieren in den hautdrainierenden Lymphknoten, aber nicht in der Milz von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen.
- Abb. 28:** Relative mRNA Expression von IL-2, IL-7, IL-15 und Flt3L in den hautdrainierenden Lymphknoten und der Milz einer RelB<sup>DCko</sup> Maus im Vergleich zu einer Kontrollmaus.
- Abb. 29:** IL-2-abhängige Reduktion von proliferierenden T<sub>regs</sub> im Blut von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen nach Injektion eines neutralisierenden  $\alpha$ IL-2 Antikörpers.
- Abb. 30:** Expression von PD-L1 und PD-L2 auf DZ von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen und Kontrollmäusen.
- Abb. 31:** Expression von PD-1 auf T-Zellen von RelB<sup>DCko</sup> Mäusen und Kontrollmäusen.

## 10. TABELLENVERZEICHNIS

**Tab. 1:** DZ-Subpopulationen in den lymphatischen und nicht-lymphatischen Organen der Maus.

**Tab. 2:** Medien, Puffer und Lösungen sowie deren Zusammensetzung.

**Tab. 3:** Primärantikörper.

**Tab. 4:** Sekundärantikörper

**Tab. 5:** Isotypkontrollantikörper.

**Tab. 6:** Fluoreszenzfarbstoffe.

**Tab. 7:** Primer für die Genotypisierung von transgenen Mäusen.

**Tab. 8:** Primer für die quantitative *Real-Time* PCR.

**Tab. 9:** Verwendete Mauslinien.

## 11. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AIRE	<i>autoimmune regulator</i>
APC	Allophycocyanin
APZ	antigenpräsentierende Zelle
BAFF	<i>B-cell activating factor of the TNF family</i>
BZR	B-Zellrezeptor
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCL	CC-Chemokinligand
CCR	CC-Chemokinrezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDP	common dendritic cell precursor
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
cDZ	konventionelle dendritische Zelle
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester
Cre	<i>causes recombination</i>
cTEC	<i>cortical thymic epithelial cell</i> (kortikale Thymusepithelzelle)
CTLA-4	<i>cytotoxic T lymphocyte antigen-4</i>
dDZ	dermale Dendritische Zelle
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	doppelt negativ
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DP	doppelt positiv
DZ	Dendritische Zelle
EAE	Experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorter/sorting</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyana
FKS	fötale Kälberserum
fl	<i>floxed</i>
Flt3L	<i>Fms-like tyrosine kinase 3 ligand</i>
FOR	<i>forward</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
GALT	<i>gut associated lymphoid tissue</i>
Gew. DZ	Gewebe-residente Dendritische Zelle
gg.	gegenüber
GITR (L)	<i>glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein (ligand)</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i> (Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor)
Ham	Hamster
Haut LN	hautdrainierender Lymphknoten
HSZ	hämatopoetische Stammzelle
ICOS (L)	<i>inducible T cell co-stimulator (ligand)</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IκB	Inhibitor von NF-κB
IKK	Inhibitors von NF-κB Kinase
iT <sub>reg</sub>	peripher-induzierte regulatorische T-Zelle
Kan	Kaninchen

KM-DZ	aus Knochenmark generierte Dendritische Zelle
LAP	<i>latenc- associated peptide</i>
LN	Lymphknoten
loxP	<i>locus of crossing over</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LTBP	<i>latent-TGF-<math>\beta</math>-binding proteins</i>
LZ	Langerhans-Zelle
M	Mol = mol/Liter
MDP	macrophage and dendritic cell precursor
mes.	mesenterisch
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
Mig. DZ	migratorische Dendritische Zelle
min	Minute(n)
mTEC	<i>medullary thymic epithelial cell</i> (medulläre Thymusepithelzelle)
Ms	Maus
NF- $\kappa$ B	nukleärer Faktor kappa B
nT <sub>reg</sub>	natürlich vorkommende regulatorische T-Zelle
OVA	Ovalbumin
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PE	Phycoerythrin
PBS	<i>phosphate buffer saline</i> (Phosphatpuffer)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	<i>programmed cell death-1</i>
PD-L1/PD-L2	<i>programmed cell death ligand 1/2</i>
pDZ	plasmazytoide Dendritische Zelle
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
qRT-PCR	quantitative <i>Real-Time</i> PCR
RA	<i>retinoic acid</i> (Retinolsäure)
RANK L	<i>receptor activator of NF-<math>\kappa</math>B ligand</i>
Rat	Ratte
Ref.	Referenz
Res. DZ	residente Dendritische Zelle lymphatischer Organe
REV	<i>reverse</i>
RHD	Rel-Homologie-Domäne
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SA	Streptavidin
SD	<i>standard derivation</i> (Standardabweichung)
sek	Sekunden
SEM	<i>standard error of the mean</i> (Standardfehler)
sog.	so genannte/er/es
SP	<i>single positive</i> (einzel positiv)
SSC	<i>side scatter</i>
ssmDZ	<i>steady-state</i> migratorische Dendritische Zelle
Tab.	Tabelle
TAD	Transaktivierungsdomäne
T <sub>eff</sub>	Effektor-T-Zelle
Tip-DZ	TNF- und iNOS-produzierende Dendritische Zellen
TGF- $\beta$	<i>Tumor growth factor-<math>\beta</math></i>
Th-Zelle	T-Helferzelle
T <sub>konv</sub>	konventionelle T-Zelle

TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TNF(R)	<i>tumor necrosis factor (receptor)</i>
T <sub>reg</sub>	regulatorische T-Zelle
TSA	<i>tissue specific antigens</i> (gewebe-spezifische Antigene)
TSLP	<i>thymic stromal lymphopoietin</i>
TZR	T-Zellrezeptor
U	<i>Unit</i> (Enzymeinheit)
u.a.	unter anderem
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

## 12. VERÖFFENTLICHUNGEN

**Oberländer U, Pletinckx K, Döhler A, Müller N, Lutz MB, Arzberger T, Riederer P, Gerlach M, Koutsillieri E, Scheller C:** Neuromelanin is an immune stimulator for dendritic cells in vitro. *BMC Neuroscience* 2011. **12**: p. 116.

**Pletinckx K, Döhler A, Pavlovic V, Lutz MB:** Role of dendritic cell maturity/costimulation for generation, homeostasis, and suppressive activity of regulatory T cells. *Front Immun*, 2011. **2**: p. 39. doi: 10.3389/fimmu.2011.00039

**Azukizawa H<sup>\*</sup>, Döhler A<sup>\*</sup>, Kanazawa N, Nayak A, Lipp M, Malissen B, Autenrieth I, Katayama I, Riemann M, Weih F, Berberich-Siebelt F, Lutz MB:** Steady state migratory RelB<sup>+</sup> langerin<sup>+</sup> dermal dendritic cells mediate peripheral induction of antigen-specific CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2011. **41**(5):1420-34.

\* geteilte Erstautorenschaft

**Lutz MB, Döhler A, Azukizawa H:** Revisiting the tolerogenicity of epidermal Langerhans cells. *Immunol Cell Biol* 2010, **88**(4):381-386.

### 13. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Regulation der Toleranzinduktion von *steady-state* migratorischen Dendritischen Zellen durch den Transkriptionsfaktor RelB“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg,  
Ort, Datum

Unterschrift

### AFFIDAVIT

I hereby confirm that my thesis entitled „Regulation of tolerance induction by steady-state migratory dendritic cells through the transcription factor RelB“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and/or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Wuerzburg,  
Place, Date

Signature



## 14. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit auf vielfältige Art und Weise beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Manfred B. Lutz für die Möglichkeit, diese Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen sowie für die sehr gute Betreuung und Unterstützung. Seine Ratschläge und sein unerschütterlicher Enthusiasmus waren für diese Arbeit von unschätzbarem Wert.

Herrn Prof. Dr. Thomas Müller danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Herrn Prof. Dr. Thomas Hünig möchte ich mich für das Interesse an dieser Arbeit, die konstruktiven Diskussionen sowie für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg 520 „*Immunomodulation*“ bedanken. Die Zeit im Graduiertenkolleg empfand ich aufgrund des regen Austauschs mit anderen Doktoranden, dem abwechslungsreichen und interessanten wissenschaftlichen Programm sowie der Netzwerktreffen als eine enorme Bereicherung.

Weiterhin danke ich ganz herzlich allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Lutz für die Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Insbesondere möchte ich Herrn Dr. Hiroaki Azukizawa für die fachliche und praktische Einarbeitung in die „unerschöpfliche Welt“ der ssmDZ danken.

Herrn Prof. Dr. Falk Weih und seinen Mitarbeitern Dr. Marc Riemann und Nico Andreas danke ich für die Bereitstellung verschiedener Mäuse ( $p52^{-/-}$ ,  $p50^{-/-}$ ,  $relB^{+/-}$  und  $RelB^{DCKO}$ ) und die gute Zusammenarbeit.

Vielen Dank auch an alle Mitarbeiter des Instituts für Virologie und Immunbiologie für die stete Hilfsbereitschaft und die Bereitstellung so mancher Reagenz.

Allen Doktoranden, die mit mir Mitglied des GK520 waren, danke ich für die vielen hilfreichen Diskussionen und vor allem für die schönen Abende bei den Netzwerktreffen und den *monthly meetings*. Einige von euch sind für mich zu echten Freunden geworden, die die Zeit in Würzburg unvergesslich machen.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinem Freund für den Rückhalt sowie das Verständnis während der gesamten Promotionszeit und darüber hinaus. Tausend Dank!

## **15. LEBENS LAUF**