

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und
Kinderchirurgie

Chirurgische Klinik I

Direktor: Prof. Dr. med. C.-T. Germer

**Phänotypische und funktionelle Charakterisierung
Dendritischer Zellen aus der Mausmilz**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Hans Benno Leicht
aus Homburg/Saar

Würzburg, Juli 2014

Referent: Prof. Dr. rer. nat. C. Otto

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. M. B. Lutz

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Februar 2015

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Grundlagen der Immunität	1
1.2	Typen Dendritischer Zellen	5
1.3	Morphologie und Funktion konventioneller Dendritischer Zellen.....	9
1.4	Isolierung konventioneller Dendritischer Zellen aus der Milz	14
1.5	Ziele der Arbeit	15
2	Fragen	17
3	Material und Methoden	18
3.1	Tiere.....	18
3.2	Kulturmedium und Pufferlösungen.....	18
3.3	Gewinnung von Splenozyten und Isolierung Dendritischer Zellen über Dichtegradientenzentrifugation	19
3.4	Gewinnung von T-Lymphozyten aus zervikalen Lymphknoten	23
3.5	Durchflusszytometrie	24
3.6	Testung reifer Dendritischer Zellen in der gemischten Leukozytenkultur.....	27
3.7	Auswertung und Statistik	28
4	Ergebnisse	29
4.1	Phänotypisierung der Niederdichtefraktions-Zellen	29
4.2	Phänotypische Charakterisierung isolierter Dendritischer Zellen aus Mäusemilzen.....	30
4.2.1	Phänotypische Charakterisierung Dendritischer Zellen aus Milzen von Mäusen der Linie C57Bl/6.....	31
4.2.2	Phänotypische Charakterisierung Dendritischer Zellen aus Milzen von Mäusen der Linie NMRI	38
4.2.3	Phänotypische Charakterisierung Dendritischer Zellen aus Milzen von Mäusen der Linie Balb/c.....	43
4.2.4	Phänotypische Charakterisierung Dendritischer Zellen aus Milzen von Mäusen der Linie NMRI ^{nude}	44
4.3	Funktionelle Charakterisierung isolierter Dendritischer Zellen aus Mäusemilzen.....	48
5	Beantwortung der Fragen	51
6	Diskussion	53
6.1	Subtypen konventioneller Dendritischer Zellen.....	53
6.2	Reifungsstadien Dendritischer Zellen	58
6.3	Alloantigenerkennung und Transplantatabstoßung	69

7	Ausblick.....	74
8	Zusammenfassung	75
9	Literaturverzeichnis.....	76
10	Appendix	88
	Danksagung	
	Lebenslauf	

Abkürzungen

3H	Tritium
7-AAD	7-Aminoactinomycin D
APC	antigen-presenting cell, dt.: antigenpräsentierende Zelle
Balb/c	Bagg albino/c, eine Inzucht-Mauslinie
Batf3	basic leucine zipper transcription factor ATF-like 3, ein Transkriptionsfaktor
C57Bl/6	C57 Black 6, eine Inzucht-Mauslinie
CD	cluster of differentiation, dt.: Differenzierungscluster, ein System zur Klassifizierung von Oberflächenmolekülen auf Leukozyten
cDC	conventional dendritic cell, dt.: konventionelle Dendritische Zelle
cpm	counts per minute, dt.: Zerfälle pro Minute, Einheit für radioaktiven Zerfall
CpG	Cytidin-Phosphat-Guanosin
CRP	C-reaktives Protein, ein Akute-Phase-Protein
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
CX ₃ CR1	CX3C chemokine receptor 1, ein Chemokinrezeptor
DC	Dendritische Zelle
DCAL2	dendritic cell-associated lectin 2, ein C-Typ-Lektin-Rezeptor
DAMPs	damage associated molecular patterns, dt.: schadensassoziierte molekulare Muster
DNA	deoxyribonucleic acid, dt.: Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERAD	endoplasmic reticulum-associated protein degradation, ein Proteinkomplex
ESAM	endothelial cell-selective adhesion molecule, ein Adhäsionsmolekül
FACS	fluorescence activated cell sorter

F _c	fragment crystallizable, dt.: kristallisierbares Fragment, ein Bestandteil von Antikörpern
FCS	fetal calf serum, dt.: fetales Kälberserum
FSC	forward scatter, dt.: Vorwärtsstreulicht
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor, dt.: Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor, ein Wachstumsfaktor für Zellen der myeloiden Reihe der Hämatopoese
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution, eine Pufferlösung
HMGB1	high mobility group box 1, ein Chromatin-Protein
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
LTC-DC	long-term culture-DC
mH	minor histocompatibility
MHC	major histocompatibility complex, dt.: Haupthistokompatibilitätskomplex
MLC	mixed leukocyte culture, dt.: gemischte Leukozytenkultur
MLR	mixed leukocyte reaction, dt.: gemischte Leukozytenreaktion
NMRI	Bezeichnung einer Auszucht-Mauslinie, benannt nach dem US Naval Medical Research Institute
NMRI ^{nude}	eine Auszucht-Nacktmauslinie
NKDC	natural killer dendritic cell, dt.: Natürliche Killer-Dendritische Zelle
PAMPs	pathogen associated molecular patterns, dt.: pathogenassoziierte molekulare Muster
PBS	phosphate buffered saline, dt.: phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
pDC	plasmacytoid dendritic cell, dt.: plasmazytoide Dendritische Zelle
PE	Phycoerythrin
PRRs	pattern recognition receptors, dt.: Mustererkennungsrezeptoren
RNA	ribonucleic acid, dt.: Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute. RPMI 1640 ist die Bezeichnung eines Zellkulturmediums, das an diesem Institut entwickelt wurde.

SCID	severe combined immunodeficiency, dt.: schwere kombinierte Immundefizienz, Sammelbegriff für angeborene Immundefekte mit T-Zell-Defizienz und teilweise auch Defizienz von B-Lymphozyten und Natürlichen Killer-Zellen
SSC	side scatter, dt.: Seitwärtsstreulicht
ssmDC	steady-state migratory dendritic cell
TAP	transporter associated with antigen presentation, ein Peptid-transporter
TCR	T-cell receptor, dt.: T-Zell-Rezeptor
TGF- β	transforming growth factor β , ein Wachstumsfaktor
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
T _{reg}	regulatorischer T-Lymphozyt
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid, ein Neuropeptid

1 Einleitung

Ubiquitär verbreitete Pathogene wie Bakterien, Viren, Pilze und Protozoen sowie veränderte oder mutierte körpereigene Strukturen stellen eine permanente Bedrohung für Mensch und Tier dar. Dem setzt der Organismus ein komplexes und äußerst differenziertes Netzwerk biologischer Abwehrmechanismen entgegen – das Immunsystem.

Das Immunsystem verfügt über eine angeborene, unspezifische und eine adaptive, spezifische Komponente. Beide Systeme agieren jeweils mit einer Vielzahl zellulärer und humoraler Elemente, deren Interaktion die Eliminierung von Pathogenen und anormalen Strukturen ermöglicht. Die Komplexität des Immunsystems erfordert eine hochdifferenzierte Feinregulation seiner Funktionen, die gewährleistet, dass körpereigene Strukturen toleriert und körperfremde attackiert und zerstört werden.

Ralph Steinman und Zanvil Cohn isolierten erstmals 1973 aus Milzen von Mäusen Dendritische Zellen. Diese nehmen bei der Erkennung von körpereigenen und körperfremden Strukturen sowie bei entsprechenden Reaktionen des Immunsystems – destruktive versus tolerogene Immunantwort – eine Schlüsselrolle ein. In ihrer funktionell aktiven Form zeigen alle Dendritischen Zellen eine charakteristische baumähnliche Struktur; daher ihre Bezeichnung Dendritische Zellen von gr. *dendron* = Baum. Für die Entdeckung der Dendritischen Zellen wurde Ralph Steinman am 3. Oktober 2011 der Nobelpreis für Medizin zuerkannt.

1.1 Grundlagen der Immunität

Die erste Verteidigungslinie des Körpers gegenüber Pathogenen bildet das angeborene Immunsystem. Hierzu gehören auf zellulärer Ebene phagozytierende Zellen wie Neutrophile Granulozyten und Makrophagen und auf humoraler Ebene eine Vielzahl verschiedener Plasmaproteine unterschied-

lichster Funktion, z. B. C-reaktives Protein (CRP) oder Lysozym. Die Zellen des angeborenen Immunsystems erkennen Pathogene mithilfe von Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, Abkürzung: PRRs). Über diese Mustererkennungsrezeptoren erkennen Zellen des angeborenen Immunsystems unterschiedlichste Krankheitserreger anhand charakteristischer molekularer Muster. Beispiele für Strukturen, die solche molekulare Muster aufweisen, sind bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) oder virale CpG-Oligonukleotide.

Das erworbene, adaptive Immunsystem entwickelt sich erst im Laufe des Lebens und richtet sich selektiv gegen als fremd erkannte Bestandteile von Erregern oder gegen Oberflächenmoleküle befallener bzw. entarteter Zellen, insbesondere gegen körperfremde Proteinstrukturen. Hierfür stehen T- und B-Lymphozyten zur Verfügung. Die T-Lymphozyten werden in zwei Hauptgruppen unterteilt: zytotoxische T-Lymphozyten und Helfer-T-Lymphozyten. Zytotoxische T-Lymphozyten erkennen erregerbefallene oder entartete Körperzellen dadurch, dass diese auf ihrer Oberfläche körperfremde Strukturen präsentieren, woraufhin diese Zellen von den zytotoxischen T-Lymphozyten zerstört werden. Helfer-T-Lymphozyten haben eine Vielzahl immunstimulatorischer Funktionen inne. Insbesondere ist es ihre Aufgabe, B-Lymphozyten zu Antikörper produzierenden Plasmazellen reifen zu lassen. Antikörper sind die humoralen Effektoren der adaptiven Immunität.

Für die Generierung von Immunantworten durch das erworbene Immunsystem ist die spezifische Aktivierung von T-Lymphozyten durch Antigene notwendig. Damit ein T-Lymphozyt ein Antigen spezifisch erkennen kann, muss es ihm zuvor von einer anderen Zelle auf einem MHC-Molekül (der Klassen I oder II) präsentiert werden. Die immunologische Erkennung des Antigens durch den T-Lymphozyten erfolgt durch dessen T-Zell-Rezeptor (engl. *T cell receptor*, Abkürzung: TCR). Der T-Zell-Rezeptor bindet an das MHC-Molekül und erkennt spezifisch das darauf präsentierte Antigen. Jeder T-Lymphozyt bzw. ein sich hieraus entwickelnder T-Zell-Klon besitzt einen eigenen, durch genomische

Rekombination entstandenen T-Zell-Rezeptor. Bei der Reifung von T-Zell-Vorläuferzellen im Thymus (den sog. Thymozyten) werden diese den Prozessen der positiven und negativen Selektion unterzogen (Romagnani S, 2006; Moran AE, Hogquist KA, 2012; Yates AJ, 2014). Im Rahmen der positiven Selektion werden diejenigen Thymozyten selektiert, deren T-Zell-Rezeptor an körpereigene MHC-Moleküle bindet und darauf Peptide erkennen kann. Thymozyten, deren T-Zell-Rezeptoren nicht auf körpereigenes MHC und daran gebundenes Peptid reagieren, sterben durch Apoptose. Bei der negativen Selektion werden diejenigen Thymozyten abgetötet, die eine zu starke Affinität zu körpereigenen MHC-Molekülen und den darauf präsentierten körpereigenen Antigenen aufweisen. Diese Zellen wären, würden sie in die Peripherie auswandern, potentiell autoreaktiv und damit in der Lage, eine Autoimmunantwort auszulösen. Das Repertoire an peripheren T-Lymphozyten entsteht somit aus der Kombination von positiver und negativer Selektion; dies wird als zentrale Toleranz bezeichnet (Kyewski B, Klein L, 2006; Xing Y, Hogquist KA, 2012).

Bei der Antigenpräsentation werden kurze Antigenpeptide¹⁾ auf MHC-Klasse-I bzw. -Klasse-II-Molekülen präsentiert. Bei den Antigenpeptiden handelt es sich um Fragmente diverser Proteine, die bei deren Abbau im Endosom-Lysosom-Komplex bzw. im Proteasom entstehen; dies wird als Prozessierung bezeichnet (Vyas JM et al., 2008; Joffre OP et al., 2012). Helfer-T-Lymphozyten erkennen Antigenpeptide nur auf MHC-Klasse-II-Molekülen, während zytotoxische T-Lymphozyten Antigene nur auf MHC-Klasse-I-Molekülen erkennen. Die Spezifität von T-Lymphozyten für MHC-Klasse-I bzw. -II wird durch die Expression entsprechender Koliganden auf ihrer Zelloberfläche bestimmt. Helfer-T-Lymphozyten exprimieren den Koliganden CD4, der neben dem T-Zell-Rezeptor ausschließlich an MHC-Klasse-II-Moleküle bindet; zytotoxische T-Lymphozyten exprimieren den Koliganden CD8, der spezifisch an MHC-Klasse-I-Moleküle bindet.

¹⁾ Auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentierte Antigenpeptide haben im Allgemeinen eine Länge von acht bis zehn Aminosäuren, während MHC-Klasse-II-Moleküle Peptide von unbegrenzter Länge präsentieren können (Jensen PE, 2007).

Grundsätzlich sind alle kernhaltigen Körperzellen in der Lage, von ihnen selbst prozessierte Peptide auf MHC-Klasse-I-Molekülen zu präsentieren (Neefjes J et al., 2011; Joffre OP et al., 2012). Diese Peptide entstammen der kontinuierlichen Degradation zelleigener Proteine im Proteasom (Abb. 10.18). Ist die Körperzelle gesund, so ist das von ihr auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentierte Material körpereigen. Ist die Zelle dagegen von einem Erreger, z. B. einem Virus, befallen oder ist sie entartet, so wird sie neben körpereigenen auch körperfremde bzw. „entartete“ Peptide auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentieren. Diese Form der Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-I ermöglicht es aktivierten zytotoxischen T-Lymphozyten, befallene bzw. entartete Zellen zu erkennen und zu zerstören.

Sogenannte professionelle antigenpräsentierende Zellen (engl. *antigen-presenting cells*, Abkürzung: APC) präsentieren Antigene nicht nur auf MHC-Klasse-I-Molekülen, sondern auch auf MHC-Klasse-II-Molekülen (Jensen PE, 2007; Vyas JM et al., 2008). Zu den antigenpräsentierenden Zellen werden Dendritische Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten gezählt²⁾. Nach Aktivierung können jedoch auch andere Zelltypen, wie z. B. Endothelzellen, Antigen auf MHC-Klasse-II-Molekülen präsentieren (Neefjes J et al., 2011). Die Präsentation endozytierter Antigene durch Dendritische Zellen ist in Abb. 6.1 dargestellt. Dendritische Zellen nehmen unter den antigenpräsentierenden Zellen eine Sonderstellung ein, da nur sie über die Fähigkeit verfügen, naive T-Lymphozyten effektiv zu aktivieren und zur Proliferation zu stimulieren³⁾ (Nussenzweig MC, Steinman RM, 1980; Hey YY, O'Neill HC, 2012). Ein naiver T-Lymphozyt ist eine Zelle, die noch keinen stimulierenden Antigenkontakt hatte und somit immunologisch inaktiv ist. Eine solche Zelle erhält ihre immunologische Funktion erst nach Aktivierung durch eine (reife) Dendritische Zelle. Dazu muss der T-Lymphozyt auf der Dendritischen Zelle ein Antigen, präsentiert auf MHC-Klasse-I- bzw. MHC-Klasse-II-Molekülen, mit seinem T-

²⁾ Die für die Selektion von T-Lymphozyten im Thymus notwendigen Thymusepithelzellen werden ebenfalls als antigenpräsentierende Zellen bezeichnet (Moran AE, Hogquist KA, 2012). Sie spielen aber keine Rolle bei der Auslösung von Immunantworten.

³⁾ Neben Dendritischen Zellen verfügen *in vitro* erzeugte sog. CD40-aktivierte B-Lymphozyten ebenfalls über das Potential zur Aktivierung naiver T-Lymphozyten (Mathieu M et al., 2012).

Zell-Rezeptor erkennen. Zur vollständigen Aktivierung erhält der T-Lymphozyt noch zusätzliche kostimulatorische Signale von der Dendritischen Zelle. Andere antigenpräsentierende Zellen sind zwar in der Lage, bereits aktivierte T-Lymphozyten (inkl. Gedächtnis-T-Zellen) zu restimulieren bzw. ihre Aktivierung zu verstärken, die erstmalige Aktivierung naiver T-Lymphozyten ist jedoch den Dendritischen Zellen vorbehalten. Neben ihrer Funktion als antigenpräsentierende Zellen werden für Dendritische Zellen weitere Funktionen diskutiert, u.a. die Aktivierung von B-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen (Bar-On L, Jung S, 2010).

1.2 Typen Dendritischer Zellen

Dendritische Zellen weisen eine starke Diversität hinsichtlich Gestalt, Funktion, Oberflächenmarkern und Lebenszyklus auf. Die im Rahmen dieser Arbeit aus Mäusemilzen isolierten Dendritischen Zellen gehören zu den konventionellen Dendritischen Zellen (Tab. 1.1), in der englischsprachigen Literatur als *conventional Dendritic Cells* (alternativ: *classical Dendritic Cells*; Abkürzung: cDC) bezeichnet (Shortman K, Naik SH, 2007; Lewis KL, Reizis B, 2012; Satpathy AT et al., 2012).

Konventionelle Dendritische Zellen sind bei Abwesenheit einer Entzündung der dominierende Typus. Dabei zeigen sie unter nichtentzündlichen ebenso wie unter inflammatorischen Bedingungen die für Dendritische Zellen typische dendritische Morphologie (Kap. 1.3). Konventionelle Dendritische Zellen exprimieren sehr stark das Integrin CD11c auf ihrer Zelloberfläche (Metlay JP et al., 1990; Robbins SH et al., 2008). Sie durchlaufen einen biphasischen Lebenszyklus, der ein unreifes und ein reifes Stadium aufweist.

Die Gruppe der konventionellen Dendritischen Zellen wird anhand ihres Wanderungsverhaltens in migratorische und residente Dendritische Zellen (Tab. 1.1) unterteilt (Shortman K, Naik SH, 2007; Miloud T et al., 2010). Migratorische Dendritische Zellen sind in unterschiedlichen (fast allen)

Körpergeweben zu finden, die sie durchwandern und dabei vorhandene Antigene phagozytieren. Bei ihrer Reifung wandern sie in sekundäre lymphatische Organe, wo sie verbleiben (Merad M et al., 2013). Residente Dendritische Zellen verbleiben dauerhaft innerhalb der sekundären lymphatischen Organe und wandern dort, wenn überhaupt, nur sehr kurze Strecken (Kamath AT et al., 2000; Hey YY, O'Neill HC, 2012).

Residente konventionelle Dendritische Zellen werden anhand von Oberflächenmarkern weiter in CD8 α -positive und CD8 α -negative Zellen unterteilt (Liu Y-J et al., 2001; Shortman K, Naik SH, 2007; Bar-On L et al., 2010; Hey YY, O'Neill HC, 2012). Das Molekül CD8 α ist Bestandteil des Koliganden CD8 auf zytotoxischen T-Lymphozyten. Dort bildet es Heterodimere mit dem Molekül CD8 β . Auf Dendritischen Zellen bildet CD8 α Homodimere (Vremec D et al., 1992; Kamath AT et al., 2000; Shortman K, Heath WR, 2010), deren Funktion für Dendritische Zellen ungeklärt ist (Shortman K, Heath WR, 2010).

CD8 α -negative, nicht jedoch CD8 α -positive residente konventionelle Dendritische Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche das Integrin CD11b (Shortman K, Liu Y-J, 2002; Robbins SH et al., 2008; Hey YY, O'Neill HC, 2012; Joffre OP et al., 2012). Da CD11b auf Zellen der myeloiden und CD8 α auf Zellen der lymphoiden Reihe bekannt ist, ging man zunächst davon aus, dass CD11b-positive Dendritische Zellen von Vorläufern der myeloiden Reihe und CD8 α -positive Dendritische Zellen von Vorläufern der lymphoiden Reihe abstammen (Anjuère F et al., 1999). Daher wurden CD8 α -negative, CD11b-positive Dendritische Zellen als myeloide Dendritische Zellen und CD8 α -positive, CD11b-negative Dendritische Zellen als lymphoide Dendritische Zellen bezeichnet. Inzwischen ist jedoch bekannt, dass beide Typen sowohl der myeloiden als auch der lymphoiden Reihe entstammen können (Miloud T et al., 2010; Satpathy AT et al., 2012; Merad M et al., 2013).

Analog zu den residenten konventionellen Dendritischen Zellen werden auch die migratorischen konventionellen Dendritischen Zellen anhand von

Oberflächenmarkern in Subtypen unterteilt (Tab. 1.1). Den CD8 α -negativen, CD11b-positiven residenten Dendritischen Zellen entsprechen phänotypisch und funktionell die CD11b-positiven migratorischen Dendritischen Zellen. Das Gegenstück der CD8 α -positiven, CD11b-negativen residenten Dendritischen Zellen sind die CD11b-negativen, CD103-positiven migratorischen Dendritischen Zellen (Lewis KL et al., 2011; Joffre OP et al., 2012; Lewis KL, Reizis B, 2012; Satpathy AT et al., 2012).

Die 1868 erstmals von Paul Langerhans beschriebenen Langerhans-Zellen der Epidermis wurden lange Zeit zu den migratorischen konventionellen Dendritischen Zellen gezählt. Da sie sich jedoch von anderen Vorläuferzellen ableiten und gewisse Ähnlichkeiten mit Makrophagen aufweisen, werden sie mittlerweile von zahlreichen Autoren nicht mehr den konventionellen Dendritischen Zellen zugerechnet (Satpathy AT et al., 2012; Merad M et al., 2013).

Neben konventionellen Dendritischen Zellen und Langerhans-Zellen existieren noch weitere Typen Dendritischer Zellen. Plasmazytoide Dendritische Zellen (Abkürzung: pDC) verfügen bei Abwesenheit einer Entzündung nicht über die typische Form Dendritischer Zellen, sondern gleichen mit ihren runden Zellformen Plasmazellen (Shortman K, Naik SH, 2007). Durch Aktivierung und Reifung im Rahmen einer Inflammation nehmen plasmazytoide Dendritische Zellen eine dendritische Form an und erwerben die Fähigkeit, Antigene effektiv zu präsentieren (Colonna M et al., 2004; Shortman K, Naik SH, 2007; Lewis KL, Reizis B, 2012; Satpathy AT et al., 2012). Zusätzlich zur Antigenpräsentation besteht ihre besondere Funktion in der Produktion großer Mengen Typ 1-Interferone (Colonna M et al., 2004; Lewis KL, Reizis B, 2012; Satpathy AT et al., 2012; Merad M et al., 2013). Ihre Interferonproduktion verleiht den plasmazytoiden Dendritischen Zellen eine essentielle Rolle bei der Bekämpfung chronischer Virusinfektionen (Lewis KL, Reizis B, 2012; Satpathy AT et al., 2012).

Wie der Name bereits andeutet, sind inflammatorische Dendritische Zellen nur bei einer Entzündung nachzuweisen. Dabei entwickeln sie sich aus Monozyten, aber auch aus verschiedenen hämatopoetischen Vorläuferzellen sowie aus Langerhans-Zellen (Shortman K, Naik SH, 2007; Miloud T et al., 2010; Merad M et al., 2013).

Weiterhin sind spezialisierte Sonderformen Dendritischer Zellen beschrieben worden, wie beispielsweise die Natürlichen Killer-Dendritischen Zellen (engl. *natural killer dendritic cells*, Abkürzung: NKDC) oder die sog. L-DC. Natürliche Killer-Dendritische Zellen vereinen zytotoxische Funktionen und die Fähigkeit zur Antigenpräsentation und Aktivierung naiver T-Lymphozyten. Sie könnten eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Malignomen spielen (Pillarisetty VG et al., 2005; Larmonier N et al., 2010). L-DC stellen das *In-vivo*-Äquivalent zu einem als LTC-DC bezeichneten, in Langzeitkulturen generierten Typus Dendritischer Zellen dar (LTC bedeutet abgekürzt *long-term culture*.) (Tan JKH, O'Neill HC, 2010; Hey YY, O'Neill HC, 2012).

Die Typisierung Dendritischer Zellen gilt bei weitem als noch nicht abgeschlossen. Neue und verfeinerte Analysemethoden, wie z. B. Genexpressionsanalysen⁴⁾, ermöglichen es, die einzelnen Gruppen Dendritischer Zellen anhand verschiedener Kriterien weiter zu unterteilen (Bar-On L et al., 2010; Lewis KL et al., 2011; Satpathy AT et al., 2012; Merad M et al., 2013). So wird auch die Zuordnung Dendritischer Zellen zu bestimmten Typen, bspw. der Langerhans-Zellen zu den konventionellen Dendritischen Zellen (s.o.), kritisch hinterfragt.

⁴⁾ Bei einer Genexpressionsanalyse wird ein Profil der von den untersuchten Zellen exprimierten Gene erstellt, und zwar durch Bestimmung ihrer mRNA. Die so ermittelten Genexpressionsprofile ermöglichen u.a. Rückschlüsse auf die Funktion der Zellen (Lewis KL et al., 2011).

Tabelle 1.1: Typen Dendritischer Zellen der Maus. Zu ihrer Beschreibung siehe Text.

• Konventionelle Dendritische Zellen (cDC)			
Residente cDC		Migratorische cDC	
CD8 α ⁻ CD11b ⁺	CD8 α ⁺ CD11b ⁻	CD11b ⁺	CD11b ⁻ CD103 ⁺
• Plasmazytoide Dendritische Zellen (pDC)			
• Langerhans-Zellen			
• Inflammatorische Dendritische Zellen			
• Sonderformen, z. B. NKDC, L-DC			

1.3 Morphologie und Funktion konventioneller Dendritischer Zellen

Die von Steinman und Cohn 1973 aus Milzen von Mäusen isolierten konventionellen Dendritischen Zellen weisen sehr große, gekrümmte, lichtbrechende Zellkerne auf. Ihr Zytoplasma ist von zahlreichen großen, sphärischen Mitochondrien durchsetzt. Zudem verfügen die Zellen über lange, teilweise verzweigte, ihre Form kontinuierlich verändernde Zytoplasmafortsätze (Steinman RM, Cohn ZA, 1973). Mit diesen Pseudopodien kontrollieren Dendritische Zellen nicht nur ihre Umgebung, sondern sie bieten auch Anlagerungs- und Interaktionsstellen für T-Lymphozyten (Green J, Jotte R, 1985). Zur Morphologie Dendritischer Zellen siehe Abb. 1.1.

Dendritische Zellen sind die mit Abstand effektivsten antigenpräsentierenden Zellen und in ihrer Fähigkeit zur Stimulation naiver T-Lymphozyten einzigartig (Nussenzweig MC, Steinman RM, 1980; Hey YY, O'Neill HC, 2012). Sie präsentieren endozytiertes Antigen sowohl auf MHC-Klasse-I-, als auch auf MHC-Klasse-II-Molekülen (Abb. 6.1). Dadurch können sie das endozytierte

Antigen sowohl zytotoxischen T-Lymphozyten als auch Helfer-T-Lymphozyten präsentieren (Kap. 1.1).

Der Vorgang der Präsentation von endozytierten, also von außen aufgenommenen Antigenen auf MHC-Klasse-I-Molekülen wird als Kreuzpräsentation bezeichnet (den Haan JMM et al., 2000; Shortman K, Liu Y-J, 2002; Jensen PE, 2007; Vyas JM et al., 2008; Joffre OP et al., 2012; Kreer C et al., 2012). Die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation ist charakteristisch für antigenpräsentierende Zellen. Andere, nicht-antigenpräsentierende Zellen präsentieren auf MHC-Klasse-I-Molekülen keine endozytierten, sondern ausschließlich aus der Zelle stammende Peptide (Abb. 10.18). Während *in vitro* neben Dendritischen Zellen auch andere antigenpräsentierende Zellen kreuzpräsentieren, ist davon auszugehen, dass *in vivo* Dendritische Zellen die hauptsächlichen kreuzpräsentierenden Zellen darstellen (Joffre OP et al., 2012).

Der Mechanismus der Kreuzpräsentation ist entscheidend für die Initiierung spezifischer Immunantworten gegenüber Viren, intrazellulären Bakterien und Parasiten sowie gegenüber malignen Zellen. Tolerogene Dendritische Zellen werden ebenfalls in der Transplantationsmedizin intensiv untersucht; hier sollen sie die Transplantatabstoßung verhindern (Kap. 6.2). Dazu sollen sie unter anderem durch Kreuzpräsentation Immuntoleranz gegen Transplantate induzieren (Segovia M et al., 2014). Die Entdeckung der Kreuzpräsentation war von grundlegender Bedeutung für das Verständnis der Funktion des adaptiven Immunsystems. Lange Zeit war unklar, wie es dem adaptiven Immunsystem möglich ist, intrazelluläre Erreger zu bekämpfen. Antigenpeptide solcher Erreger werden zwar von den befallenen Zellen über MHC-Klasse-I-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche präsentiert, jedoch sind diese Zellen nicht in der Lage, naive T-Lymphozyten zu aktivieren (sofern es sich bei den befallenen Zellen nicht selbst um Dendritische Zellen handelt). Aktivierte CD8-positive T-Lymphozyten sind jedoch zur Abtötung der befallenen Zellen erforderlich, da nur sie die von ihnen auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentierten Antigene erkennen können. Solange der Mechanismus der Kreuzpräsentation nicht

bekannt war, ging man davon aus, dass antigenpräsentierende Zellen (inkl. Dendritische Zellen) endozytierte Antigene nur auf MHC-Klasse-II-Molekülen präsentieren könnten. Somit musste man annehmen, dass (unbefallene) Dendritische Zellen nur CD4-positive T-Lymphozyten gegen die intrazellulären Erreger aktivieren könnten, nicht aber die erforderlichen CD8-positiven T-Lymphozyten. Die Kreuzpräsentation löst dieses Problem und ermöglicht Dendritischen Zellen, endozytierte Antigene auf MHC-Klasse-I-Molekülen zu präsentieren. Auf diese Weise werden naive CD8-positive T-Lymphozyten aktiviert, die als zytotoxische Effektorzellen die befallenen Körperzellen abtöten.

Die der Kreuzpräsentation zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sind in den letzten Jahren zunehmend besser verstanden worden, wenngleich zahlreiche Details noch ungeklärt sind (siehe auch Kap. 6.1).

Wie bereits erwähnt, besitzen Dendritische Zellen nicht nur die Fähigkeit zur Auslösung von Immunantworten, sondern sie können auch tolerogen wirken, d.h. eine Immunantwort verhindern. Solche tolerogenen Dendritischen Zellen anergisieren oder zerstören potentiell autoreaktive T-Lymphozyten (Cools N et al., 2007; Lutz MB, Kurts C, 2009), d.h. T-Lymphozyten, die der negativen Selektion im Thymus entkommen sind (Kap. 1.1). Anergie ist ein Zustand langfristiger immunologischer Hyporeaktivität (Valdor R, Macian F, 2013). Darüber hinaus kontrollieren tolerogene Dendritische Zellen eine immuninhibitorische Subgruppe von T-Lymphozyten, die regulatorischen T-Lymphozyten (T_{reg}), und sind in der Lage, aus potentiell autoreaktiven T-Lymphozyten regulatorische T-Lymphozyten zu induzieren (Gad M et al., 2004; Cools N et al., 2007; Kornete M, Piccirillo CA, 2012). Durch diese Mechanismen erzeugen tolerogene Dendritische Zellen die sog. periphere Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen (Reis e Sousa C, 2006; Xing Y, Hogquist KA, 2012).

Sämtliche Dendritischen Zellen entstammen der hämatopoetischen Zellreihe (Kap. 1.2). Vorläuferzellen konventioneller Dendritischer Zellen wandern aus dem Knochenmark über Blutgefäße in die sekundären lymphatischen Organe

sowie in die meisten Körpergewebe ein, wo sie sich zu unreifen Dendritischen Zellen entwickeln (Shortman K, Naik SH, 2007; Liu K et al., 2009). Unreife konventionelle Dendritische Zellen phagozytieren Material aus ihrer Umgebung (Wilson NS et al., 2003; Wilson NS et al., 2004). Phagozytierte Proteine werden von ihnen prozessiert und die Produkte der Prozessierung kontinuierlich auf MHC-Molekülen präsentiert (Wilson NS et al., 2004; Shortman K, Heath WR, 2010). Die kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 sind auf unreifen Dendritischen Zellen nicht oder nur schwach exprimiert (Wilson NS et al., 2003; Wilson NS et al., 2004; Shortman K, Heath WR, 2010). Unreife Dendritische Zellen sind tolerogen und erzeugen eine periphere T-Zell-Toleranz für die von ihnen präsentierten Antigene (Lutz MB, Schuler G, 2002; Reis e Sousa C, 2006; Lutz MB, Kurts C, 2009; Xing Y, Hogquist KA, 2012).

Inflammatorische Stimuli induzieren die Reifung konventioneller Dendritischer Zellen, wobei diese nach einer vorübergehenden Phase vermehrter Antigenaufnahme die Phagozytose herunterregulieren (Jensen PE, 2007; Gordon JR et al., 2014). Das Material, das zum Zeitpunkt des stimulatorischen Geschehens phagozytiert wurde, wird von reifen Dendritischen Zellen auf MHC-Molekülen präsentiert (Wilson NS et al., 2003; Miloud T et al., 2010). Die Expression von MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche reifer Dendritischer Zellen ist im Vergleich zu unreifen Dendritischen Zelle stark erhöht. Die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 wird während der Reifung stark gesteigert (De Smedt T et al., 1996; Wilson NS et al., 2003; Shortman K, Heath WR, 2010). Gleichzeitig ändert sich das Muster der von Dendritischen Zellen sezernierten Zytokine (Lutz MB, Schuler G, 2002). Während dieser Reifung entwickeln sich aus unreifen, tolerogenen Dendritischen Zellen reife, immunogene Dendritische Zellen, die naive T-Lymphozyten aktivieren und zur Proliferation stimulieren. Dazu sind neben dem auf MHC-Molekülen präsentierten Antigen die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 sowie die von den Dendritischen Zellen produzierten Zytokine notwendig. Ohne Kostimulation durch CD80 und CD86 ist eine Stimulierung naiver T-Lymphozyten nicht möglich (Larsen CP et al., 1994; Lenschow DJ et al., 1996).

Ein reifer Phänotyp ist somit Voraussetzung dafür, dass Dendritische Zellen eine immunogene Funktion aufweisen. Jedoch sind nicht alle phänotypisch reifen Dendritischen Zellen immunogen; vielmehr können phänotypisch reife Dendritische Zellen auch tolerogen sein. Die jeweilige Funktion einer phänotypisch reifen Dendritischen Zelle ist abhängig von den von ihr produzierten Zytokinen (Reis e Sousa C, 2006). Zur Reifung Dendritischer Zellen siehe auch Kap. 6.2 sowie Abb. 6.2.

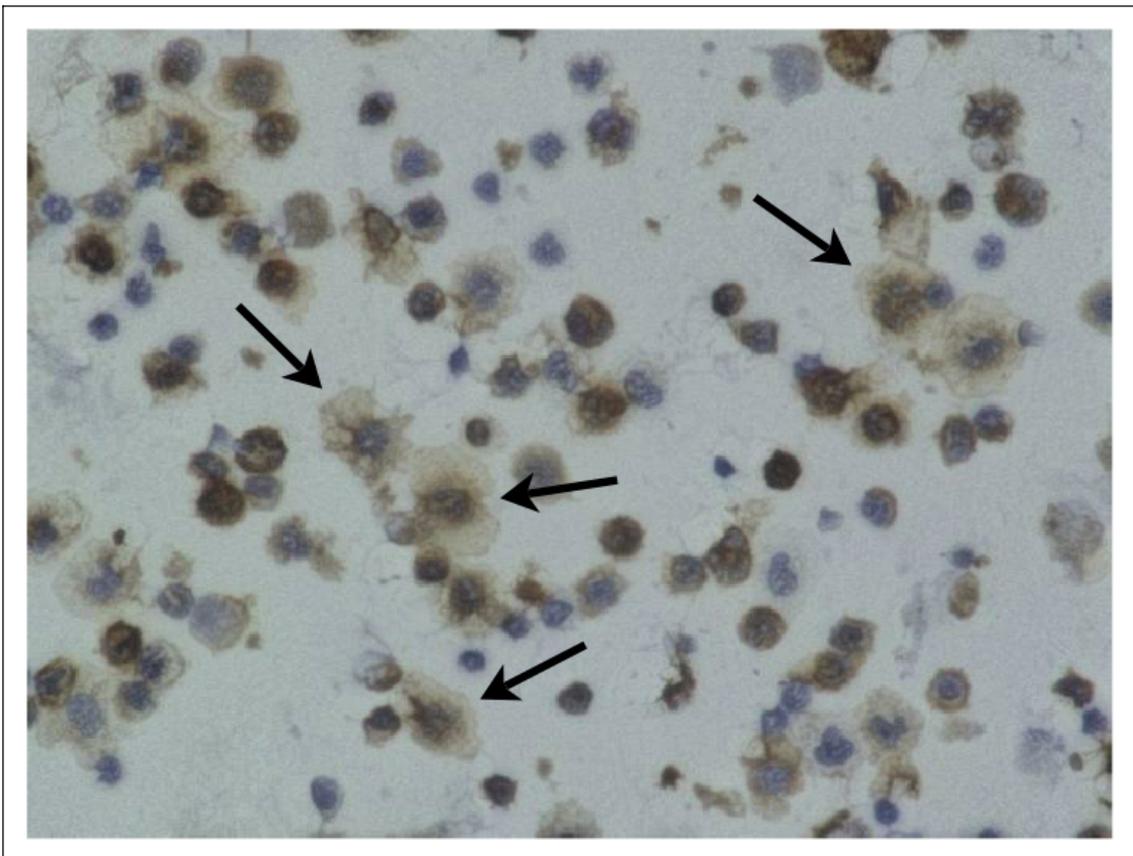


Abb. 1.1: Charakteristische Morphologie kultivierter konventioneller Dendritischer Zellen (Pfeile) der Mausmilz. In Kultur (sowie *in vivo* in Lymphgefäßen) weisen konventionelle Dendritische Zellen segelförmige Fortsätze („veiled cells“) auf. Nachweis der Expression von MHC-Klasse-II mit dem anti-MHC-Klasse-II-Antikörper M5/114.15.2. Immunzytologie, 60-fache Vergrößerung. Färbung: Manuela Schneider; Foto: Dr. Irina Chodnevskaja.

1.4 Isolierung konventioneller Dendritischer Zellen aus der Milz

Dendritische Zellen stellen in den Geweben, in denen sie vorkommen, eine sehr kleine Minderheit an der Gesamtzellpopulation dar. Dabei kommen sie noch am häufigsten in den lymphatischen Organen vor. In der Milz machen Dendritische Zellen etwa ein halbes Prozent aller kernhaltigen Zellen aus (Steinman RM, Witmer MD, 1978). Deshalb und aufgrund ihrer Größe ist die Milz zur Isolierung Dendritischer Zellen besonders geeignet.

Bei sämtlichen Verfahren zur Aufreinigung Dendritischer Zellen aus der Milz wird das Milzgewebe zunächst mechanisch zerkleinert und evtl. zusätzlich, zur besseren Extraktion gewebegebundener Zellen, enzymatisch mit Kollagenase verdaut. Aus der auf diese Weise gewonnenen Zellsuspension werden anschließend die Dendritischen Zellen isoliert. Für die Isolierung Dendritischer Zellen aus der Milz werden folgende Eigenschaften dieser Zellen genutzt:

- (1) **Adhärenz:** Die Fähigkeit Dendritischer Zellen zur Adhärenz führte zu ihrer Entdeckung (Steinman RM, Cohn ZA, 1973). Nach Zerkleinerung der Milz wird die gewonnene Suspension von Splenozyten auf Glas- oder Plastikoberflächen kultiviert. An diesen werden Dendritische Zellen, ebenso wie Makrophagen und andere Zellen, adhären. Durch Abspülen der nicht-adhären Zellen lassen sich auf diese Weise Dendritische Zellen anreichern. Nachteile dieser Methode sind der hohe Aufwand und die geringe Reinheit der angereicherten Dendritischen Zellen.
- (2) **Dichte:** Dendritische Zellen weisen eine deutlich geringere Dichte als die meisten anderen Zellen der Milz auf. Sie reichern sich deshalb bei der Dichtegradientenzentrifugation in einer Niederdichtefraktion an. Die Isolierung Dendritischer Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation wird z. B. von Leenen und Kollegen sowie von Kamath und Kollegen beschrieben (Leenen PJM et al., 1998; Kamath AT et al., 2000). Vorteil ist die einfache und kostengünstige Durchführbarkeit. Hinsichtlich der Reinheit der isolierten Dendritischen Zellen ist die Dichtegradienten-

zentrifugation der Isolierung Dendritischer Zellen anhand von Oberflächenmarkern (siehe Punkt 3) jedoch unterlegen.

- (3) **Oberflächenmarker:** Von Dendritischen Zellen exprimierte Oberflächenmarker wie das Integrin CD11c sind für die Zellaufreinigung mit Hilfe spezifischer Antikörper geeignet (Crowley MT et al., 1990). Je nach Aufreinigungstechnik sind die Antikörper entweder mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert und für die durchflusszytometrische Isolierung geeignet oder sie sind an magnetische Partikel gebunden und für die immunmagnetische Isolierung geeignet. Beide Immuntechniken erlauben die Isolierung Dendritischer Zellen aus der Splenozytensuspension entweder durch Anreicherung Dendritischer Zellen (die so genannte Positivselektion) oder durch Abreicherung nicht-dendritischer Zellen (die so genannte Negativselektion). Bei der Negativselektion werden sämtliche nicht-dendritischen Zellen mit spezifischen Antikörpern markiert, sodass die Dendritischen Zellen als unmarkierte Zellen übrigbleiben. Der Vorteil, Dendritische Zelle anhand von Oberflächenmarkern zu isolieren, ist ihre hohe Reinheit. Nachteil sind die hohen Kosten und der große technische Aufwand dieser Methode. Darüber hinaus ist bei der Positivselektion von Nachteil, dass Dendritische Zellen mit Antikörpern markiert werden und ein Einfluss der Antikörperbindung auf die Zellfunktion nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann. Bei der Negativselektion entfällt dieser Nachteil. Für diese Methode ist aber eine große Anzahl an Antikörpern mit unterschiedlicher Spezifität notwendig.

1.5 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden Dendritische Zellen aus Milzen genetisch unterschiedlicher Mauslinien isoliert und anschließend charakterisiert. Die Isolierung wurde mittels Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Dabei sollte OptiPrep, ein Iodixanol-Präparat, zur Isolierung Dendritischer Zellen neu

etabliert werden, nachdem das bislang erfolgreich eingesetzte Metrizamid der Gruppe nicht mehr zur Verfügung stand.

Um Subtypen konventioneller Dendritischer Zellen zu identifizieren, wurde die Expression der Oberflächenmarker CD8 α und CD11b (Tab. 1.1) durchflusszytometrisch bestimmt. Da die *In-vitro*-Kultur einen Reifungsstimulus für Dendritische Zellen darstellt (Inaba K et al., 1994; De Smedt T et al., 2001), wurde das Reifungsstadium der Dendritischen Zellen sowohl unmittelbar nach der Zellgewinnung als auch nach unterschiedlich langer Kultivierung *in vitro* bestimmt. Hierzu wurde die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen sowie der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 durchflusszytometrisch gemessen.

Dendritische Zellen genetisch unterschiedlicher Mauslinien sollten bezüglich ihrer Reifung und Subtypen miteinander verglichen werden. Besonderes Interesse galt dabei den Zellen der thymuslosen und daher T-Zell-defizienten Mauslinie NMR1^{nude}. Dendritische Zellen dieser Mauslinie haben nicht die Möglichkeit einer physiologischen Interaktion mit T-Lymphozyten (Kap. 6.2). Dies könnte ihren Phänotyp substantiell beeinflussen, da Dendritische Zellen und T-Lymphozyten physiologisch in einem engen Rückkopplungsverhältnis stehen (Ezzelarab M, Thomson AW, 2011; Kornete M, Piccirillo CA, 2012; Švajger U, Rožman P, 2014).

Abschließend sollte die immunologische Funktion der phänotypisch reifen Dendritischen Zellen getestet werden. Reife, immunstimulatorische Dendritische Zellen besitzen die Fähigkeit, naive T-Lymphozyten zu aktivieren und zur Proliferation anzuregen⁵⁾ (Reis e Sousa C, 2006). Zur Überprüfung dieser immunstimulatorischen Funktion diente die gemischte Leukozytenkultur, bei der Dendritische Zellen gemeinsam mit allogenen T-Lymphozyten inkubiert wurden.

⁵⁾ Phänotypisch reife, aber funktionell tolerogene Dendritische Zellen besitzen diese Fähigkeit nicht (Kap. 1.3 und 6.2).

2 Fragen

1. Welche Dendritischen Zellen lassen sich durch Dichtegradientenzentrifugation unter Verwendung von OptiPrep aus Mäusemilzen isolieren?
2. Welches Reifungsstadium weisen aus Milzen isolierte Dendritische Zellen unmittelbar nach der Zellgewinnung auf und wie wirkt sich eine Kultivierung *in vitro* auf ihr Reifungsstadium aus?
3. Weisen Dendritische Zellen aus Milzen von Mäusen der Linien C57Bl/6, NMRI, Balb/c und NMRI^{nude} phänotypische Unterschiede auf?

3 Material und Methoden

3.1 Tiere

Verwendet wurden Mäuse männlichen Geschlechts der Mauslinien C57Bl/6 und NMRI, Mäuse beider Geschlechter der Linie Balb/c sowie weibliche Nacktmäuse der Linie NMRI^{nude}. Nacktmäuse sind kaum behaart, thymuslos und somit T-Zell-defizient. Bei den Linien C57Bl/6 und Balb/c handelt es sich um Inzuchtlinien, während NMRI und NMRI^{nude} Auszuchtlinien darstellen. Das Gewicht der Mäuse lag zwischen 20 und 44 Gramm bei einem Alter von 4 bis 15 Wochen. Die vom Zuchtbetrieb Harlan Winkelmann GmbH, Borchon, gezüchteten Mäuse wurden in der lokalen Kleintierhaltung des Universitätsklinikums Würzburg gehalten.

3.2 Kulturmedium und Pufferlösungen

Kulturmedium

Als Zellkulturmedium wurde das Standardkulturmedium RPMI 1640 (Dutch Modified) von der Firma GIBCO mit folgenden Zusätzen verwendet:

- 10 % hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FCS)
- 1 % nichtessentielle Aminosäuren
- 2 mmol/l L-Glutamin
- 100 U/ml Penicillin
- 100 µg/ml Streptomycin
- 5×10^{-5} mol/l Mercaptoethanol

Lysepuffer

Der 10-fach konzentrierte Lysepuffer zur Lyse der Erythrozyten besteht aus:

- 1,68 mmol/l Ammoniumchlorid
- 99,88 mmol/l Kaliumhydrogencarbonat
- 12,6 mmol/l EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)

Zur Herstellung der Gebrauchsverdünnung wurde der Lysepuffer um den Faktor 10 mit Aqua dest. verdünnt.

PBS (Phosphate Buffered Saline) mit einem pH-Wert von 7,2 enthält:

- 140 mmol/l Natriumchlorid
- 2,7 mmol/l Kaliumchlorid
- 7,2 mmol/l Natriumdihydrogenphosphatdihydrat
- 1,47 mmol/l Kaliumdihydrogenphosphat

3.3 Gewinnung von Splenozyten und Isolierung Dendritischer Zellen über Dichtegradientenzentrifugation

Die Isofluran-narkotisierten Mäuse wurden durch Herzschnitt getötet und ihnen unter aseptischen Bedingungen die Milz entnommen. Anschließend wurden in einer Reinraumwerkbank die Milzen mit sterilen Spritzenkolben in einem Zellsieb (cell-strainer der Fa. Falcon, Porengröße 70 µm, Nylon) zerkleinert und die Zellsuspension in einer Petrischale mit 10 ml Kulturmedium aufgefangen. Die gewonnenen Zellen wurden in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und mit 40 ml Kulturmedium aufgefüllt.

Die Zellsuspension wurde bei Raumtemperatur für 6 Minuten mit 402 g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand des Zentrifugates vorsichtig abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 10 ml frisch angesetztem, sterilem Lysepuffer resuspendiert. Der Lyseprozess wurde nach drei- bis fünfminütiger Einwirkzeit durch Verdünnen mit sterilem Kulturmedium abgebrochen. Nach erneuter Zentrifugation für 6 Minuten bei 402 g wurde der so gewonnene Überstand abgesaugt, das Zellpellet in Kulturmedium resuspendiert und der Ansatz erneut, wie oben beschrieben, zentrifugiert und der Überstand wiederum abgesaugt.

Das Zellpellet wurde entweder unmittelbar für die Dichtegradientenzentrifugation verwendet oder in Kulturmedium resuspendiert, auf zwei

Petrischalen verteilt und für eine bzw. für zwei Nächte im Brutschrank bei 37°C und einer zu 5% mit CO₂ gesättigten Luft inkubiert. Nach der *In-vitro*-Kultur wurden die Zellen aus den beiden Petrischalen gemeinsam in der Dichtegradientenzentrifugation weiterverarbeitet.

Grundlage zur Herstellung von Lösungen unterschiedlicher Dichte war OptiPrep, ein Iodixanolpräparat der Firma Axis-Shield, bezogen von Sigma-Aldrich. Hierzu wurde OptiPrep jeweils mit Aqua dest. unterschiedlich verdünnt. Die untere Schicht des Dichtegradienten bestand aus 4 ml 15-prozentiger OptiPrep-Lösung mit einer Dichte von 1,085 g/ml. Hierin wurden die Splenozyten resuspendiert. Die mittlere Schicht bestand aus 5 ml einer 12-prozentigen OptiPrep-Lösung mit einer Dichte von 1,069 g/ml und wurde vorsichtig auf die untere Schicht pipettiert. Die obere Schicht bildeten 3 ml phenolrotes HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) der Firma GIBCO, die vorsichtig auf die mittlere Schicht pipettiert wurden (Abb. 3.1).

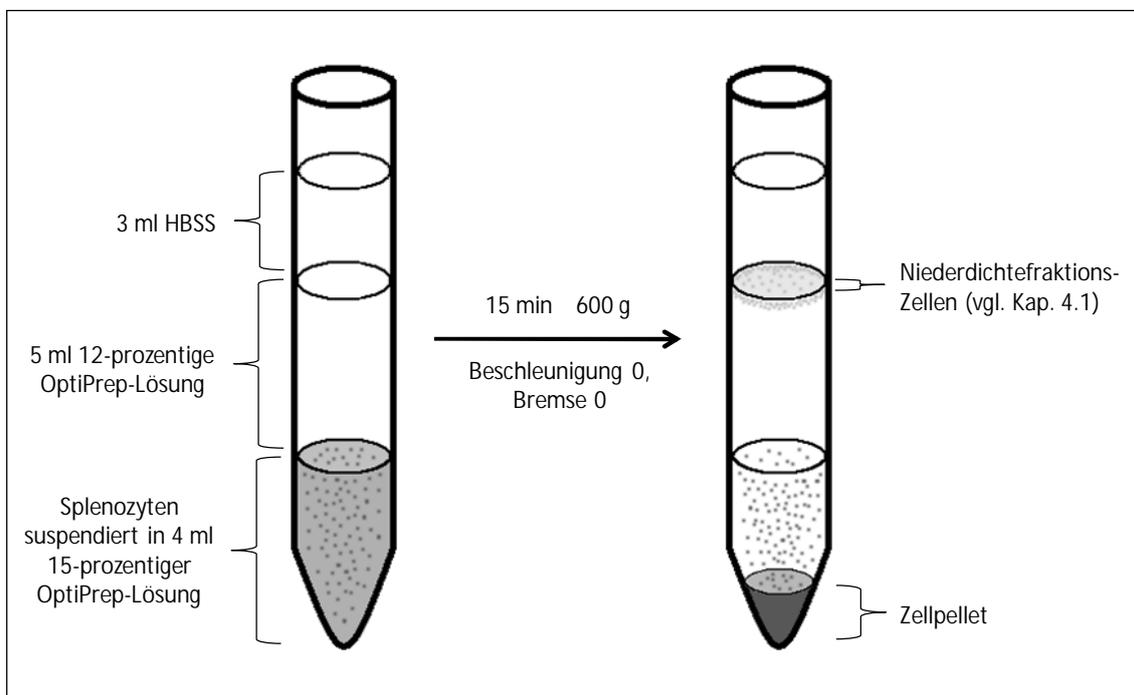


Abb. 3.1: Schematische Darstellung zur Verteilung der Splenozyten vor und nach Zentrifugation. Die Dendritischen Zellen reichern sich auf der 12-prozentigen OptiPrep-Lösung in einer Niederdichtefraktion an.

Der so angesetzte Dichtegradient wurde anschließend bei 600 g für einen Zeitraum von 15 Minuten zentrifugiert. Um ein Vermischen der Schichten zu verhindern, wurde ohne Beschleunigung und Bremse zentrifugiert. Dabei bildete sich an der Berührungszone der mittleren und oberen Schicht eine mit bloßem Auge kaum sichtbare Interphase, in der die Dendritischen Zellen sich anreicherten. Durch vorsichtiges Abpipettieren der Interphase wurden die angereicherten Dendritischen Zellen in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und anschließend mit Kulturmedium bzw. PBS gewaschen.

Zur Bestimmung der Anzahl Dendritischer Zellen wurde eine Zählkammer nach Neubauer verwendet, die mit einer im Verhältnis 1:10 mit Trypan-Blau versetzten Zellsuspension beschickt wurde. Ausgezählt wurden die vitalen, nicht von Trypan-Blau angefärbten Zellen.

Abb. 3.2 gibt einen Überblick über die zur Isolierung Dendritischer Zellen durchgeführten Arbeitsschritte.

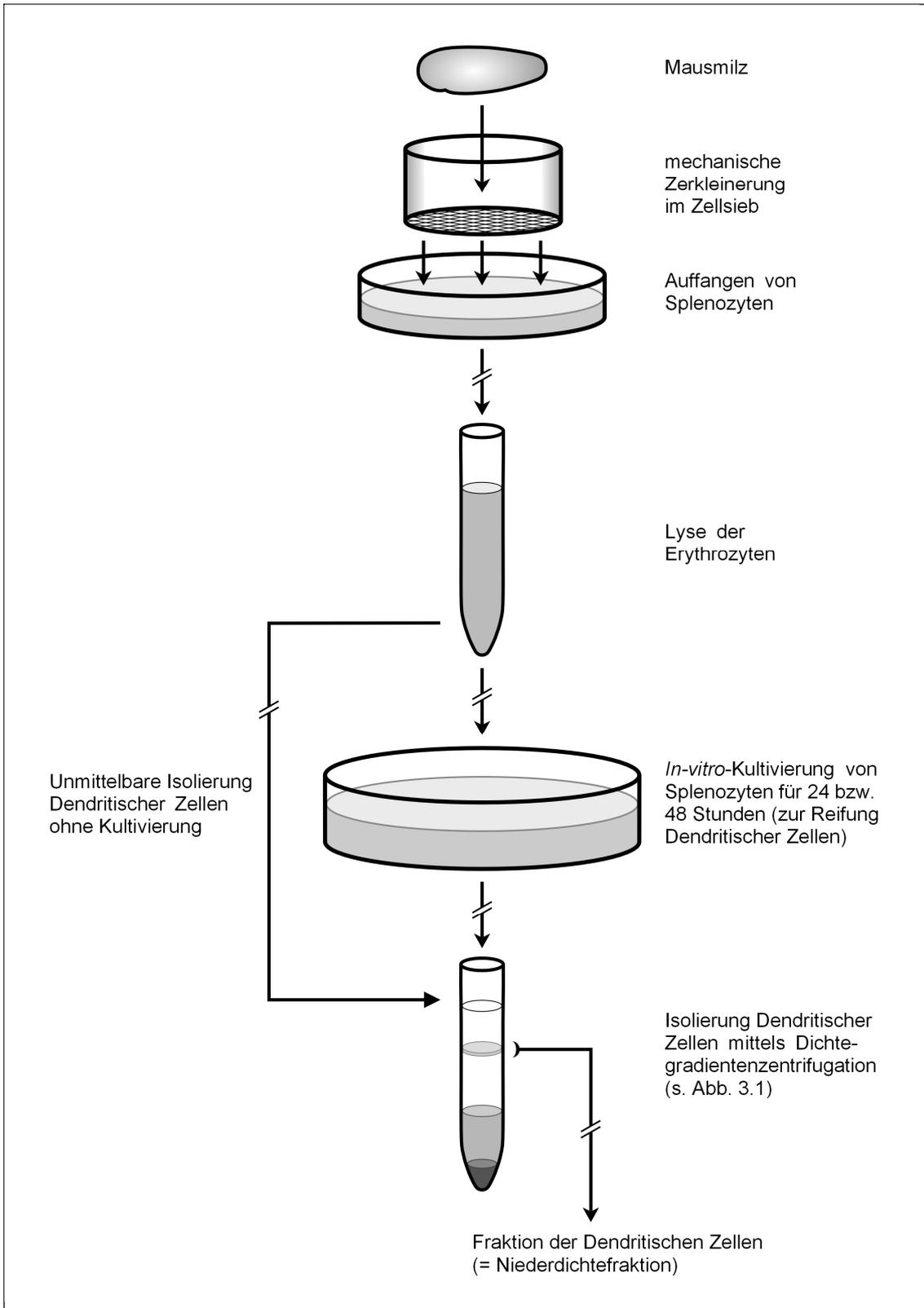


Abb. 3.2: Arbeitsschritte bei der Isolierung Dendritischer Zellen. Unterbrochene Pfeile kennzeichnen Waschprozeduren (Zentrifugieren, Absaugen des Überstandes und Resuspendieren des Zellpellets). Zur Beschreibung der einzelnen Arbeitsschritte siehe Text. Die isolierten Dendritischen Zellen sind für Durchflusszytometrie und gemischte Leukozytenkultur geeignet.

3.4 Gewinnung von T-Lymphozyten aus zervikalen Lymphknoten

Analog zu der Vorgehensweise bei der Gewinnung von Splenozyten, wie in Kap. 3.3 beschrieben, wurden T-Lymphozyten aus zervikalen Lymphknoten von Mäusen gewonnen. Die *post mortem* entnommenen zervikalen Lymphknoten wurden in Kulturmedium überführt und anschließend in einem Zellsieb mit 70 µm Porengröße zerkleinert. Die Zellsuspension wurde in einer Petrischale mit 10 ml Kulturmedium aufgefangen und in ein Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml Lysepuffer resuspendiert, was innerhalb einer Reaktionszeit von drei bis fünf Minuten zur Lyse der Erythrozyten führte. Im Anschluss wurde der Lysepuffer durch zweimaliges Waschen der Zellen mit Kulturmedium entfernt. Auf eine weitere Aufreinigung der T-Lymphozyten wurde verzichtet. Die Bestimmung der Zellzahlen erfolgte wie in Kap. 3.3 beschrieben.

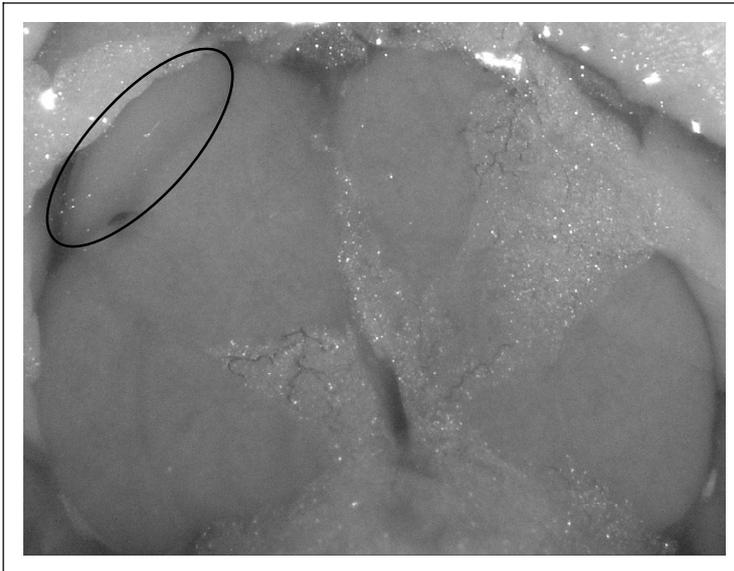


Abb. 3.3: Anatomische Lage zervikaler Lymphknoten einer Maus. Die Markierung zeigt einen zervikalen Lymphknoten; darunter sind Speicheldrüsen zu erkennen. Foto: Prof. Dr. Christoph Otto.

3.5 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein Verfahren, mit dem Zellpopulationen auf Zellgröße und -granularität, exprimierte Oberflächenmarker sowie Zellvitalität untersucht werden. Die Zellen passieren dazu einen Laserstrahl, der an den Zellen verschiedene charakteristische Lichtsignale erzeugt, die vom Durchflusszytometer registriert werden.

Ein solches Lichtsignal ist das Vorwärtsstreulicht (engl. *Forward Scatter*, Abkürzung: FSC), das Auskunft über die Zellgröße gibt. Das Seitwärtsstreulicht (engl. *Side Scatter*, Abkürzung: SSC) dagegen enthält Informationen über die Granularität der untersuchten Zelle. Darüber hinaus ist das Durchflusszytometer auch in der Lage, Fluoreszenzlicht zu messen. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, die zu analysierenden Zellen auf Oberflächenmarker hin zu untersuchen. Dazu werden monoklonale Antikörper mit definierter Spezifität verwendet, die an ihrem F_c-Fragment mit einem fluoreszierenden Farbstoffmolekül konjugiert sind. Die mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugierten Antikörper binden an die entsprechenden Oberflächenmarker auf den Zellen. Je mehr eine Zelle von einem Oberflächenmarker exprimiert, desto mehr fluoreszenzmarkierte Antikörper binden an die Zelle und desto stärker wird das Fluoreszenzsignal, das entsteht, wenn die Zelle den Laserstrahl des Durchflusszytometers passiert. Das so erzeugte Fluoreszenzlicht wird von Wellenlängen-spezifischen Detektoren aufgefangen. Zusammen mit den beiden Streulichtdetektoren kann das Durchflusszytometer so zugleich mehrere Informationen über jede einzelne analysierte Zelle auswerten. Durch den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen unterschiedlicher Wellenlänge können mehrere Oberflächenmarker einer Zelle gleichzeitig analysiert werden (sog. Doppel- bzw. Mehrfachfärbungen). Auf diese Weise sind umfassende Untersuchungen von Zellpopulationen hinsichtlich verschiedener Marker und Charakteristika möglich.

Für die Durchführung der Versuche wurde ein Durchflusszytometer der Firma Becton-Dickinson, Modell FACScan, genutzt (FACS = *fluorescence activated*

cell sorter). Die verwendeten Antikörper waren mit dem grün fluoreszierenden Farbstoff Fluoreszeinisothiozyanat (FITC, Emissionsmaximum 530 nm) oder mit dem gelbrot fluoreszierenden Farbstoff Phycoerythrin (PE, Emissionsmaximum 585 nm) konjugiert.

Pro Probe wurden 1×10^4 Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Um ausreichende Zellmengen für die Analysen zu haben, betrug die Mindestzellzahl pro Probenröhrchen 1×10^5 Zellen (maximal 5×10^5 Zellen). Zur Gewinnung ausreichender Mengen an Niederdichtefraktions-Zellen war es notwendig, jeweils die Zellen aus 2 bis 5 Milzen zu poolen.

Die durchflusszytometrischen Proben wurden auf Eis angesetzt. Zu jeweils 50 μ l PBS-Zellsuspension pro FACS-Röhrchen wurden die entsprechenden Antikörperlösungen pipettiert. Bei jedem Versuch wurden eine Leerkontrolle ohne zugesetzte Antikörper sowie zwei Isotypenkontrollen angesetzt. Für die Isotypenkontrollen wurden je 1 μ l FITC- bzw. PE-konjugierte Isotypenantikörper-Lösung verwendet, zur Analyse der Oberflächenmarker jeweils 3 μ l der entsprechenden spezifischen Antikörper-Lösungen. Die Mengen an einzusetzenden Antikörpern waren in Vorversuchen ermittelt worden. Bei Doppelfärbungen erhielt ein FACS-Röhrchen 3 μ l eines PE-konjugierten Antikörpers (dabei handelte es sich immer um den Antikörper gegen CD11c) und zusätzlich 3 μ l eines FITC-konjugierten Antikörpers.

Nach Zugabe der Antikörper wurden die Versuchsansätze für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden in jedes FACS-Röhrchen jeweils 300 μ l PBS gegeben. Anschließend wurden die Proben (mit Ausnahme der Leerkontrolle) zentrifugiert (402 g, 6 Minuten, Beschleunigungsstufe 4, Bremsstufe 4). Nach Entfernen des Überstandes wurden die Pellets in jeweils 100 μ l PBS resuspendiert.

Tabelle 3.1: Für die Durchflusszytometrie verwendete Antikörper. Zu den eingesetzten Konzentrationen siehe Tab. 10.1.

Antikörper (Klon)	Antigen	Zielzellen	Konjugat	Bezugs- quelle
MOPC-31C	(Isotyp)	–	FITC	BD Pharmingen
MOPC-21	(Isotyp)	–	PE	BD Pharmingen
N418	CD11c	Myeloide Zellen	PE	Miltenyi Biotec
M1/70.15.11.5	CD11b	Myeloide Zellen, NK-Zellen	FITC	Miltenyi Biotec
53-6.7	CD8 α	T-Lymphozyten, Dendritische Zellen	FITC	Miltenyi Biotec
M5/114.15.2	MHC- Klasse-II	Antigenpräsentierende Zellen	FITC	Miltenyi Biotec
RMMP-1	CD80	Antigenpräsentierende Zellen	FITC	AbD Serotec
RMMP-2	CD86	Antigenpräsentierende Zellen	FITC	AbD Serotec
3/23	CD40	Antigenpräsentierende Zellen, Epithelbasalzellen	FITC	AbD Serotec
RA3-6B2	CD45R	B-Lymphozyten, manche T- Lymphozyten und NK-Zellen	FITC	Miltenyi Biotec

Zur Untersuchung der Zellvitalität diente die nach dem Einlesen der Leerprobe im FACS-Röhrchen verbliebene antikörperfreie Zellsuspension. Diese wurde mit 5 μ l 7-AAD (7-Aminoactinomycin D, orangefarbene Fluoreszenz, Emissionsmaximum 647 nm) versetzt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. 7-AAD wurde als Cell Viability Solution von Becton Dickinson, Mountain View, Kalifornien, USA, bezogen. Es ermöglicht die durchflusszytometrische Identifikation abgestorbener Zellen, da es mit deren DNA interkaliert.

Die durchflusszytometrischen Analysedaten wurden mit dem Programm WinMDI (Joseph Trotter, Versionen 2.8 und 2.9) digital ausgewertet.

3.6 Testung reifer Dendritischer Zellen in der gemischten Leukozytenkultur

Die besondere Fähigkeit reifer Dendritischer Zellen, T-Lymphozyten zur Proliferation zu stimulieren, wird in der gemischten Leukozytenkultur (engl. *mixed leukocyte culture*, Abkürzung: MLC) nachgewiesen. Die gemischte Leukozytenkultur wird auch als gemischte Leukozytenreaktion (engl. *mixed leukocyte reaction*, Abkürzung: MLR) bezeichnet. Bei der allogenen gemischten Leukozytenkultur stammen die verschiedenen Zellpopulationen von genetisch unterschiedlichen Tieren bzw. Tierlinien einer Spezies.

Die Dendritischen Zellen wurden vor der Isolierung im Dichtegradienten durch Übernachtkultur zum Reifen gebracht (Kap. 3.3). Zur Durchführung der gemischten Leukozytenkultur wurden pro Vertiefung einer Rundbodenplatte mit 96 Vertiefungen unterschiedliche Zellzahlen (zwischen 1×10^3 und 4×10^4 Zellen) gereifter Dendritischer Zellen der Inzucht-Mauslinie C57Bl/6 mit jeweils 1×10^5 T-Lymphozyten der Inzucht-Mauslinie Balb/c in 150 μ l Kulturmedium angesetzt. Negativkontrollen waren Ansätze mit Dendritischen Zellen ohne T-Lymphozyten sowie mit T-Lymphozyten ohne Dendritische Zellen. Die Zellkulturplatten wurden für 72 Stunden im Brutschrank inkubiert, wobei die Dendritischen Zellen die T-Lymphozyten zur Proliferation stimulierten. Nach Ablauf der 72 Stunden wurden die Leukozytenkulturen mit 0,5 μ Ci [3 H]-Thymidin pro well, enthalten in 50 μ l einer Lösung aus 0,5 μ l [3 H]-Thymidin-Stammlösung und 49,5 μ l Kulturmedium, gepulst. Die Stammlösung von Tritium-markiertem Thymidin (Methyl- 3 H) wurde in der Konzentration von 1 mCi/ml von der Firma MP Biomedicals Germany bezogen. Die gepulsten Zellkulturplatten wurden erneut für 6 Stunden im Brutschrank inkubiert; in dieser Zeit bauten die proliferierenden T-Lymphozyten das radioaktive Thymidin in ihre DNA ein.

Unmittelbar nach Ablauf dieser 6 Stunden wurde die DNA-Synthese der T-Lymphozyten durch Einfrieren der Kulturplatten gestoppt.

Zur Auswertung der Versuche wurden die aufgetauten Kulturen mithilfe eines Zell-Harvesters des Typs MicroBeta Filtermat-96 der Firma Wallac (Turku, Finnland) geerntet. Hierbei wurde die DNA der Zellen auf ein Spezial-Filterpapier übertragen, dieses getrocknet, mit Szintillationslösung getränkt und versiegelt. Der radioaktive Zerfall wurde mithilfe eines „β-plate“-Szintillationsmessgerätes des Typs MicroBeta TriLux der Firma Wallac (Turku, Finnland) in der Einheit „counts per minute“ (cpm) quantifiziert. Die gemessene Radioaktivität entsprach der Menge des eingebauten radioaktiven Thymidins in die DNA und somit der Proliferationsintensität der T-Lymphozyten.

3.7 Auswertung und Statistik

Zur statistischen Auswertung und graphischen Darstellung der Ergebnisse dienten die Programme Excel, Versionen 2003, 2007 und 2010, der Firma Microsoft und Prism, Vers. 5, der Firma Graphpad Software. Die durchflusszytometrischen Analysedaten wurden mit dem Programm WinMDI, Versionen 2.8 und 2.9, von Joseph Trotter ausgewertet (<http://facs.scripps.edu/software.html>).

4 Ergebnisse

Dendritische Zellen aus Milzen von Mäusen der Linien C57Bl/6, NMRI, Balb/c sowie NMRI^{nude} wurden phänotypisch und funktionell charakterisiert. Hierzu wurden die Dendritischen Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation mit OptiPrep (Iodixanol) angereichert.

Die Zellausbeute pro Milz nach Anreicherung lag durchschnittlich bei $8,1 \times 10^5 \pm 4,6 \times 10^5$ vitalen Zellen (Mittelwert \pm Standardabweichung), mit einem Minimalwert von $1,8 \times 10^5$ Zellen und einem Maximalwert von $1,8 \times 10^6$ Zellen (Ergebnis aus 41 aufgearbeiteten Milzen). Der durchschnittliche Anteil Dendritischer Zellen an den vitalen Niederdichtefraktions-Zellen (Abb. 3.1) lag zwischen 18 Prozent (Mauslinie NMRI^{nude}) und 52,4 Prozent (Mauslinie C57Bl/6).

4.1 Phänotypisierung der Niederdichtefraktions-Zellen

Die Niederdichtefraktions-Zellen (Abb. 3.1) wurden durchflusszytometrisch charakterisiert. Dendritische Zellen wurden anhand ihrer Expression von CD11c identifiziert (Abb. 4.1). Die Niederdichtefraktions-Zellen bestanden nicht nur aus Dendritischen Zellen, sondern waren mit anderen Leukozyten, avitalen Zellen und Zellfragmenten verunreinigt. Unter den verunreinigenden Zellen wurden B-Lymphozyten anhand ihrer Expression der Tyrosinphosphatase CD45R, eines typischen Markers für B-Lymphozyten, identifiziert (Abb. 4.1d). CD45R findet sich auch auf plasmazytoiden Dendritischen Zellen (Colonna M et al., 2004; Miloud T et al. 2010). Da diese aber auch CD11c auf ihrer Oberfläche exprimieren (Colonna M et al., 2004; Robbins SH et al., 2008; Miloud T et al. 2010), war eine Verwechslung mit B-Lymphozyten auszuschließen. Diejenigen Zellen, die weder das Oberflächenmolekül CD11c noch das Oberflächenmolekül CD45R aufwiesen, wurden nicht weiter charakterisiert.

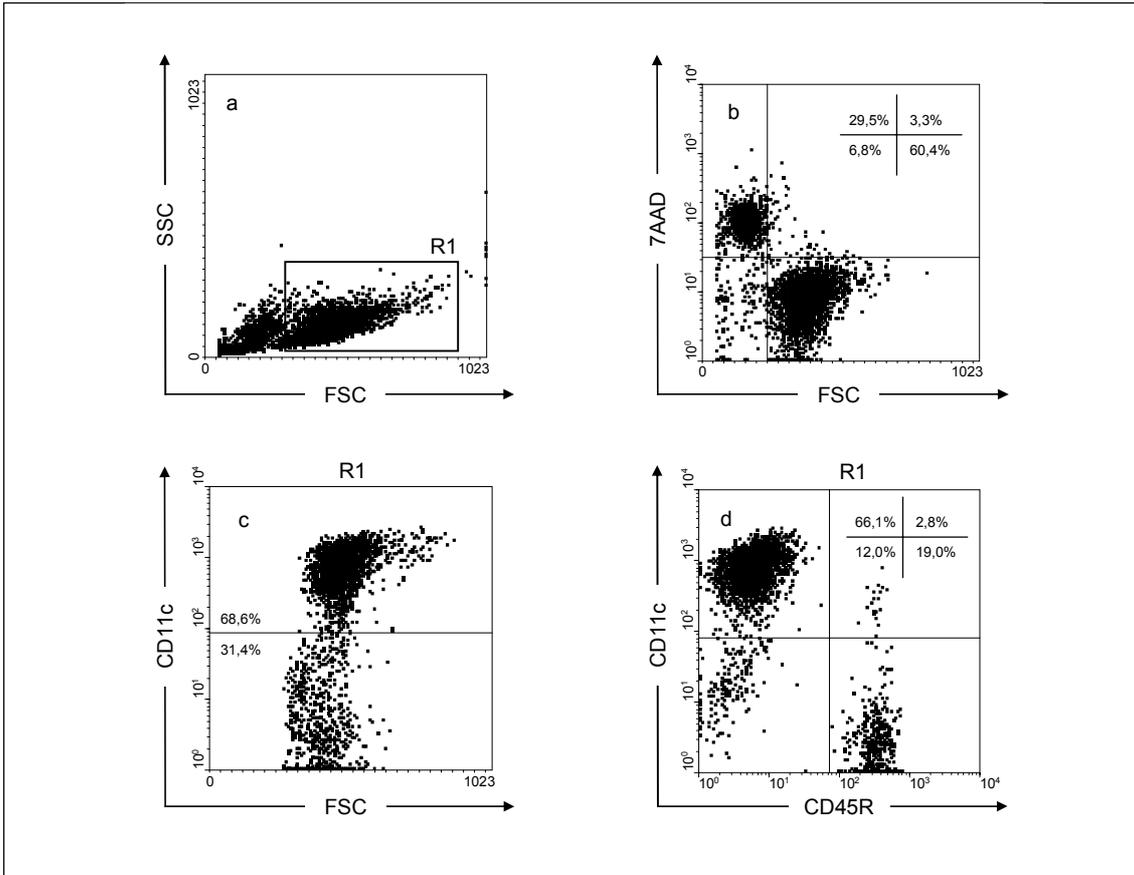


Abb. 4.1: Phänotypisierung der Niederdichtefraktions-Zellen. a: Zellgröße (FSC) und Zellgranularität (SSC); b: 7-AAD-positive, avitale Zellen; c: CD11c-positive Dendritische Zellen; d: Dendritische Zellen (CD11c-positiv, CD45R-negativ) und B-Lymphozyten (CD45R-positiv, CD11c-negativ). Die Fluoreszenzintensitäten der Isotypenkontrollen lagen im Bereich von 10⁰ bis 10¹.

4.2 Phänotypische Charakterisierung isolierter Dendritischer Zellen aus Mäusemilzen

Der konstitutiv exprimierte Oberflächenmarker CD11c wurde zum Nachweis Dendritischer Zellen in der Niederdichtefraktion (Abb. 3.1) verwendet. CD11c-positive Dendritische Zellen wurden weiter in CD8 α -positive und CD8 α -negative Zellen unterteilt. Ebenfalls wurde die Expression des Markers CD11b bestimmt. CD11b ist charakteristisch für den CD8 α -negativen Subtyp residenter konventioneller Dendritischer Zellen, nicht jedoch für den CD8 α -positiven Subtyp (Kap. 1.2). Die untersuchten Dendritischen Zellen zeigten nach ihrer Kultivierung *in vitro* jedoch eine weitgehend homogene Expression von CD11b, anhand derer keine Subtypen abgegrenzt werden können. Die Ergebnisse der

vorliegenden Arbeit bestätigen somit die von Shortman beschriebenen Beobachtungen, dass der Marker CD11b auf Dendritischen Zellen durch *In-vitro*-Kultivierung hochreguliert wird (Vremec D, Shortman K, 1997; Shortman K, Heath WR, 2010).

Die isolierten Dendritischen Zellen wurden unterschiedlich lange *in vitro* kultiviert und anschließend ihr Reifungsstadium bestimmt. Hierzu wurde die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen sowie der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 gemessen (Tab. 3.1).

4.2.1 Phänotypische Charakterisierung Dendritischer Zellen aus Milzen von Mäusen der Linie C57Bl/6

Dendritische Zellen von Mäusen der Linie C57Bl/6 wurden entweder direkt nach der Organentnahme oder nach 24- bzw. 48-stündiger *In-vitro*-Kultivierung isoliert (Abb. 3.2) und anschließend durchflusszytometrisch untersucht.

Die frisch isolierten Dendritischen Zellen wiesen einen unreifen Phänotyp auf. Sie zeigten eine starke Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen, aber eine nur geringe oder fehlende Expression von CD86 (Abb. 4.2c+d, Tab. 4.1). Es fiel auf, dass die unreifen Dendritischen Zellen keine einheitliche Population darstellten; vielmehr ließen sich durchflusszytometrisch zwei Populationen unreifer Dendritischer Zellen abgrenzen, die sich in der Stärke der Expression von CD11c und MHC-Klasse-II unterschieden (Abb. 4.2b+c). Ähnliche Ergebnisse erbrachte die Analyse unreifer Dendritischer Zellen der Mauslinie NMRI (Kap. 4.2.2). Diese Heterogenität unreifer Dendritischer Zellen wurde nicht weiter untersucht.

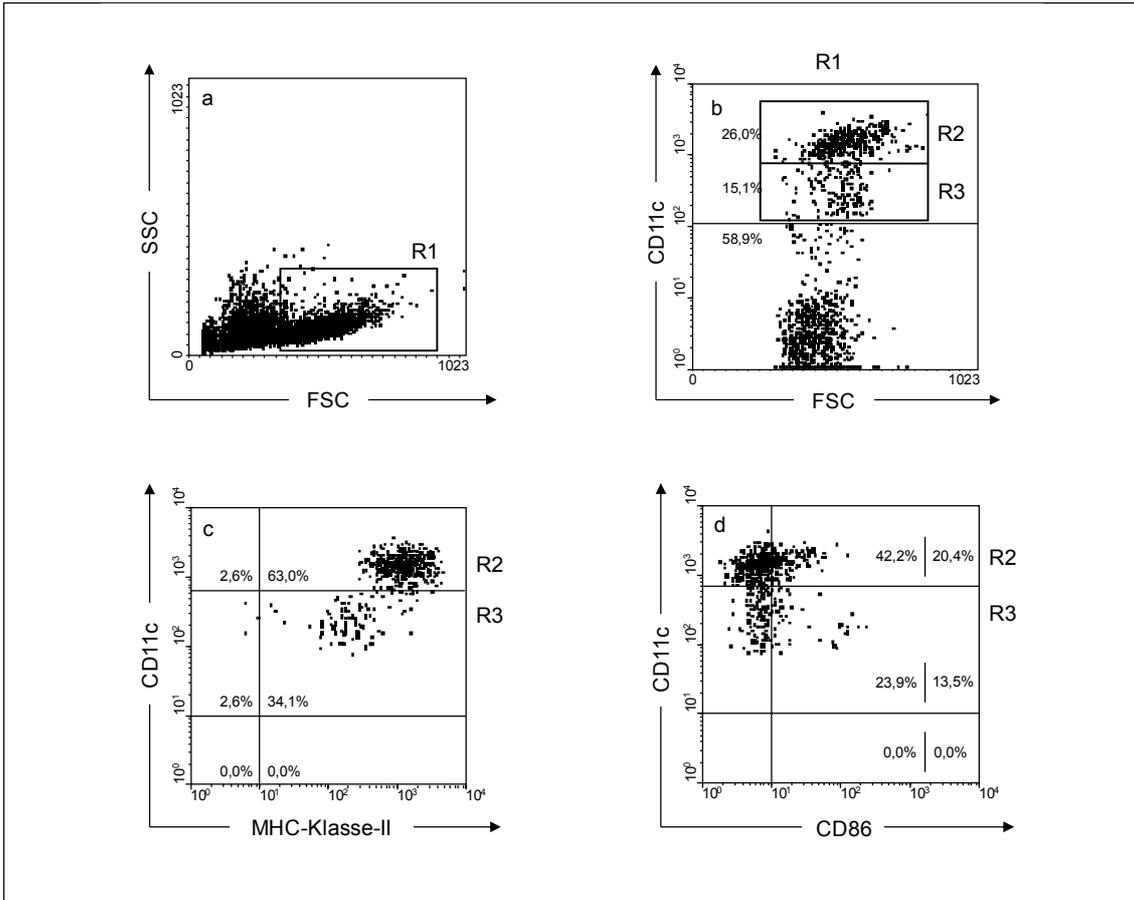


Abb. 4.2: Phänotypisierung frisch isolierter Dendritischer Zellen der Mauslinie C57Bl/6. a: Zellgröße (FSC) und Zellgranularität (SSC); b: CD11c-positive Dendritische Zellen; c, d: Expression von MHC-Klasse-II bzw. CD86 auf CD11c-positiven Dendritischen Zellen. Die Fluoreszenzintensitäten der Isotypenkontrollen lagen im Bereich von 10^0 bis 10^1 . Repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Nach 24-stündiger Kultivierung wiesen Dendritische Zellen der Mauslinie C57Bl/6 einen reifen Phänotyp auf. Sie exprimierten MHC-Klasse-II sehr stark und waren für die kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 zum größten Teil positiv (Abb. 4.3c-f, Tab. 4.1). Die mittlere Expressionsstärke (gemessen an der mittleren Fluoreszenzintensität) von MHC-Klasse-II lag bei den für 24 Stunden kultivierten Dendritischen Zellen um den Faktor 3,6 höher als bei den frisch isolierten Dendritischen Zellen; die mittlere Expressionsstärke von CD86 lag um den Faktor 3,9 höher (Tab. 4.1). Der Anteil CD8 α -positiver Dendritischer Zellen lag bei durchschnittlich 22,1 Prozent, der Anteil CD8 α -negativer Dendritischer Zellen bei durchschnittlich 77,9 Prozent (Abb. 4.3g, Tab. 4.1). CD11b eignete sich nicht, um Dendritische Zellen weiter zu unterteilen, da nahezu sämtliche Dendritische Zellen für diesen Marker positiv waren (Abb. 4.3h).

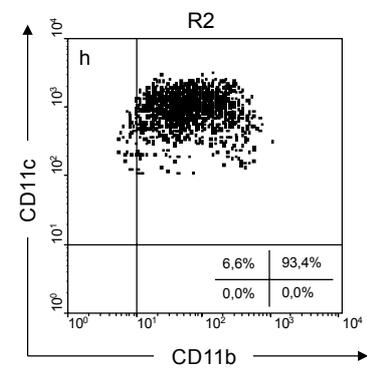
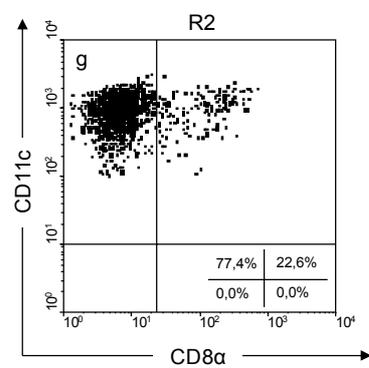
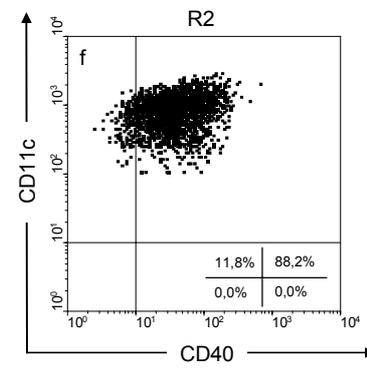
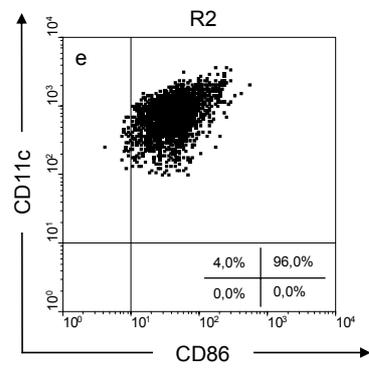
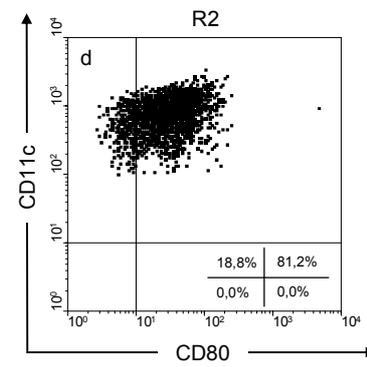
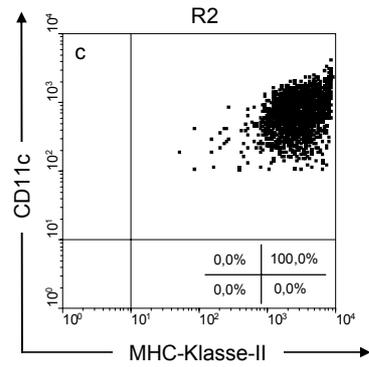
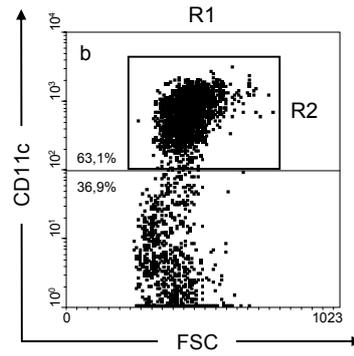
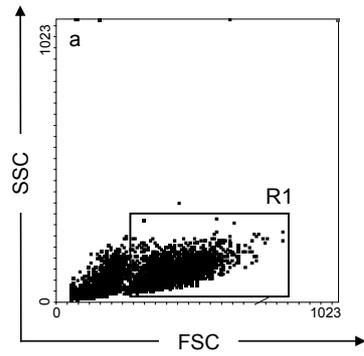


Abb. 4.3 (S. 34): Phänotypisierung Dendritischer Zellen der Mauslinie C57Bl/6 nach 24-stündiger Kultivierung *in vitro*. a: Zellgröße (FSC) und Zellgranularität (SSC); b: CD11c-positive Dendritische Zellen; c-h: Expression von MHC-Klasse-II, CD80, CD86, CD40, CD8 α bzw. CD11b auf CD11c-positiven Dendritischen Zellen. Die Fluoreszenzintensitäten der Isotypenkontrollen lagen im Bereich von 10^0 bis 10^1 . Repräsentatives Ergebnis von mindestens vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Nach 48-stündiger Kultivierung änderte sich der reife Phänotyp der Dendritischen Zellen der Mauslinie C57Bl/6 nicht wesentlich (Abb. 4.4c-f, Tab. 4.1). Der durchschnittliche Anteil CD8 α -positiver Dendritischer Zellen betrug 20,5 Prozent, der durchschnittliche Anteil CD8 α -negativer Dendritischer Zellen dementsprechend 79,5 Prozent (Abb. 4.4g, Tab. 4.1).

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Charakterisierung Dendritischer Zellen der Mauslinie C57Bl/6 sind in Tab. 4.1 zusammengefasst.

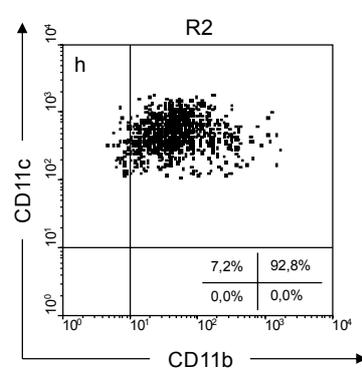
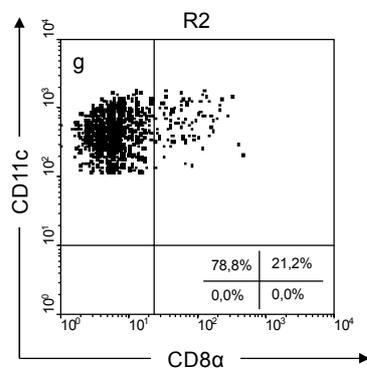
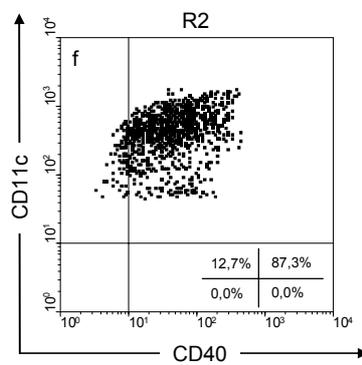
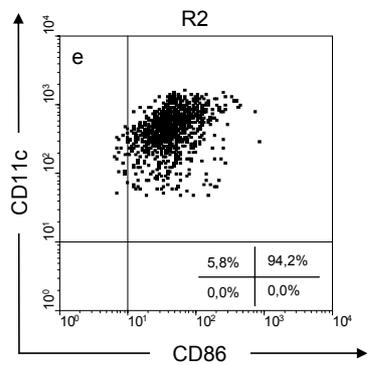
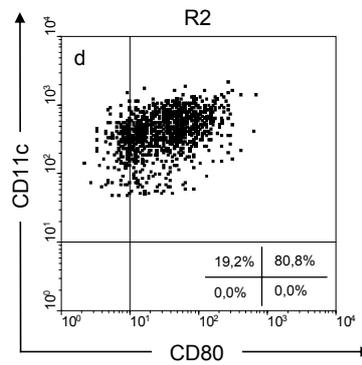
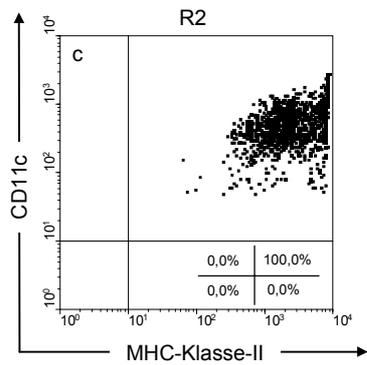
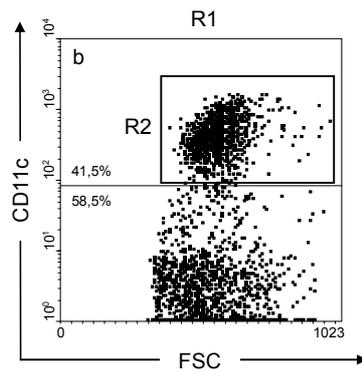
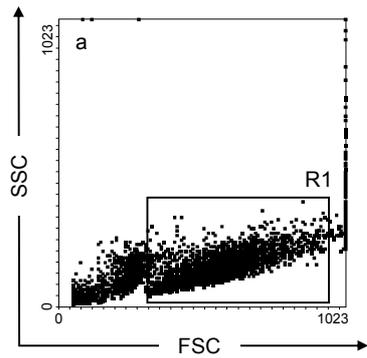


Abb. 4.4 (S. 36): Phänotypisierung Dendritischer Zellen der Mauslinie C57Bl/6 nach 48-stündiger Kultivierung *in vitro*. a: Zellgröße (FSC) und Zellgranularität (SSC); b: CD11c-positive Dendritische Zellen; c-h: Expression von MHC-Klasse-II, CD80, CD86, CD40, CD8 α bzw. CD11b auf CD11c-positiven Dendritischen Zellen. Die Fluoreszenzintensitäten der Isotypenkontrollen lagen im Bereich von 10⁰ bis 10¹. Repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Tabelle 4.1: Durchflusszytometrische Analyse Dendritischer Zellen der Mauslinie C57Bl/6. Die präsentierten Daten basieren auf den CD11c-positiven Dendritischen Zellen (R2+R3 aus Abb. 4.2b, R2 aus den Abb. 4.3b und 4.4b). Die mittlere Fluoreszenzintensität für CD11c war unabhängig von der Kulturdauer und lag bei durchschnittlich 559,4 \pm 134,8 (Mittelwert \pm Standardabweichung; dimensionslose Größe). Die Anzahl der Zellisolierungen lag zwischen 2 und 6.

Marker	Anteil positiver Dendritischer Zellen \pm Standardabweichung			Mittlere Fluoreszenzintensität \pm Standardabweichung			
	Kulturdauer			Kulturdauer			
	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h	
MHC-II	97,1 \pm 0,7 %	99,9 \pm 0,2 %	100 %	602,6 \pm 59,6	2 196 \pm 474,2	1 797,1 \pm 14,9	
CD80	nicht bestimmt	82,4 \pm 4,3 %	81,3 \pm 0,6 %	nicht bestimmt	29,2 \pm 4,7	33,3 \pm 1,2	
CD86	36 \pm 0,6 %	94,1 \pm 1,6 %	94,4 \pm 0,3 %	10,2 \pm 0,2	39,9 \pm 1,8	45,2 \pm 2,3	
CD40	nicht bestimmt	90,5 \pm 3,3 %	87,5 \pm 0,1 %	nicht bestimmt	39,6 \pm 6,4	41,4 \pm 0,2	
CD11b	nicht bestimmt	90,6 \pm 2,6 %	91,4 \pm 0,4 %	nicht bestimmt	51,4 \pm 5,2	48,7 \pm 1,5	
CD8 α	nicht bestimmt	22,1 \pm 1 %	20,5 \pm 1,1 %	CD8 α^+ DC	nicht bestimmt	92,6 \pm 12,8	72,5 \pm 4,7
				CD8 α^- DC	nicht bestimmt	5,15 \pm 0,6	5,3 \pm 0,2

4.2.2 Phänotypische Charakterisierung Dendritischer Zellen aus Milzen von Mäusen der Linie NMRI

Dendritische Zellen von Mäusen der Linie NMRI wurden entweder direkt nach der Organentnahme oder nach 24-stündiger *In-vitro*-Kultivierung isoliert (Abb. 3.2) und anschließend durchflusszytometrisch untersucht.

Die frisch isolierten Dendritischen Zellen wiesen einen unreifen Phänotyp auf. Sie zeigten eine starke Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen, aber eine nur geringe oder fehlende Expression von CD80 und CD86. Für CD40 waren sie mehrheitlich positiv (Abb. 4.5c-f, Tab. 4.2). Die unreifen Dendritischen Zellen stellten keine einheitliche Population dar; vielmehr ließen sich durchflusszytometrisch zwei Populationen unreifer Dendritischer Zellen abgrenzen, die sich in der Stärke der Expression von CD11c, MHC-Klasse-II und CD40 unterschieden (Abb. 4.5b, c, f).

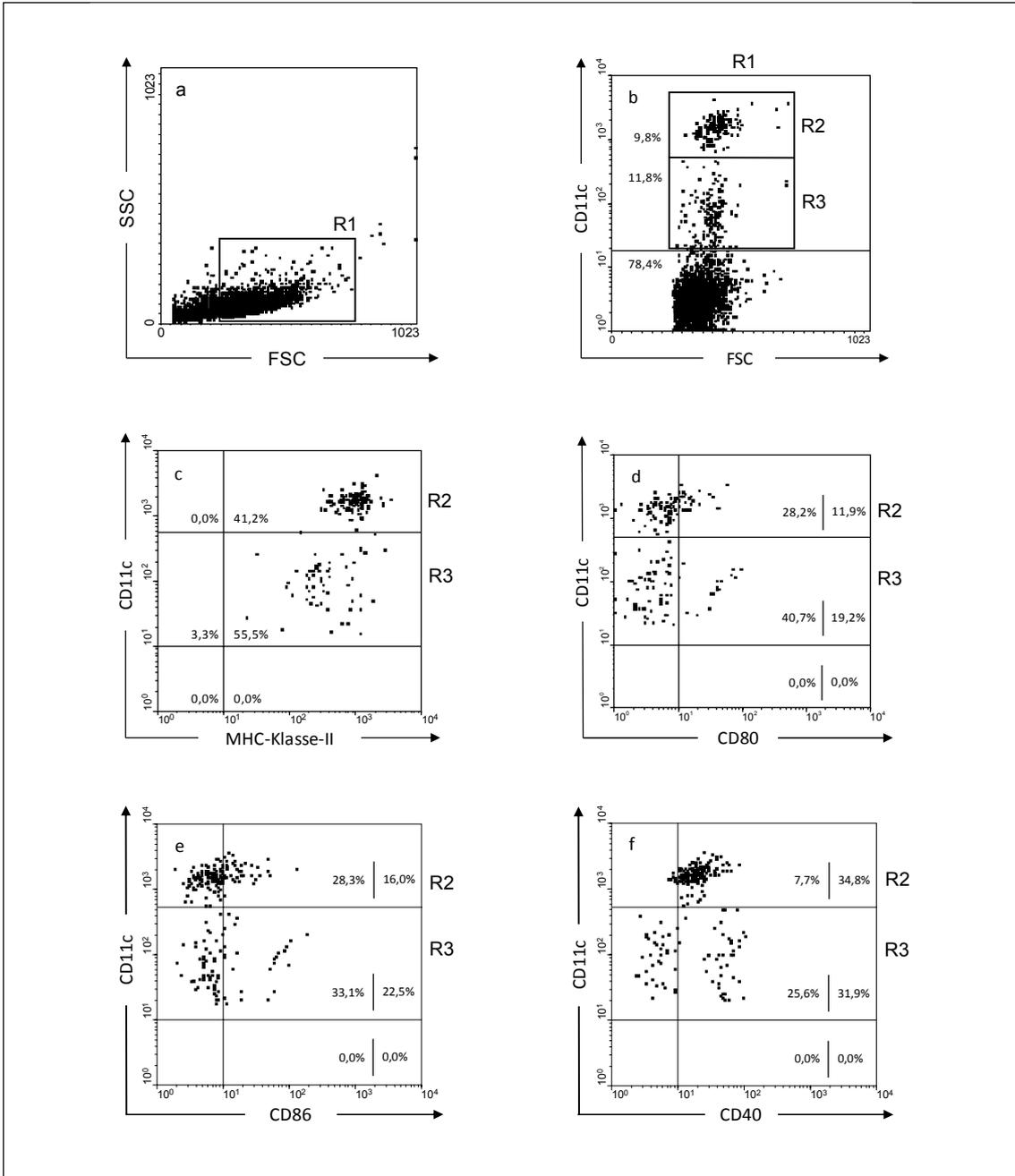


Abb. 4.5: Phänotypisierung frisch isolierter Dendritischer Zellen der Mauslinie NMRI. a: Zellgröße (FSC) und Zellgranularität (SSC); b: CD11c-positive Dendritische Zellen; c-f: Expression von MHC-Klasse-II, CD80, CD86 bzw. CD40 auf CD11c-positiven Dendritischen Zellen. Die Fluoreszenzintensitäten der Isotypenkontrollen lagen im Bereich von 10⁰ bis 10¹. Repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Nach 24-stündiger Kultivierung wiesen Dendritische Zellen der Mauslinie NMRI einen reifen Phänotyp auf. Sie exprimierten MHC-Klasse-II sehr stark und waren für die kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 zum größten Teil positiv (Abb. 4.6c-f, Tab. 4.2). Die mittleren Expressionsstärken der Reifungsmarker lagen bei den für 24 Stunden kultivierten Dendritischen Zellen jeweils deutlich höher als bei den frisch isolierten Dendritischen Zellen, und zwar um den Faktor 2,4 für MHC-Klasse-II, CD80 und CD40 und um den Faktor 3,5 für CD86 (Tab. 4.2). Der Anteil CD8 α -positiver Dendritischer Zellen lag bei durchschnittlich 24,6 Prozent, der Anteil CD8 α -negativer Dendritischer Zellen bei durchschnittlich 75,4 Prozent (Abb. 4.6g, Tab. 4.2).

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Charakterisierung Dendritischer Zellen der Mauslinie NMRI sind in Tab. 4.2 zusammengefasst.

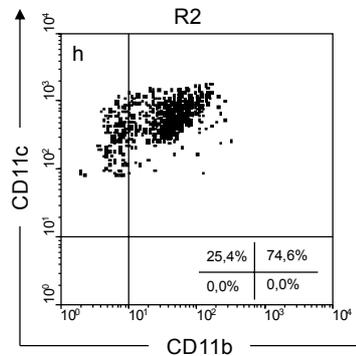
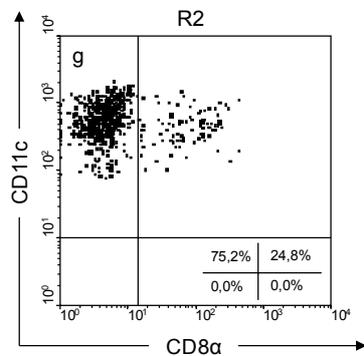
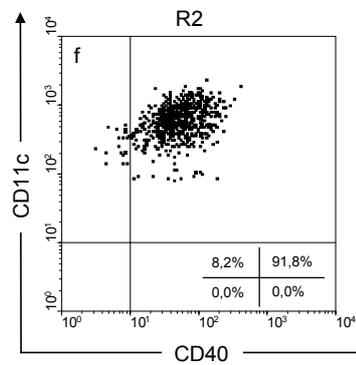
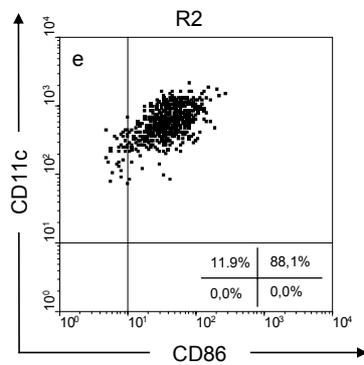
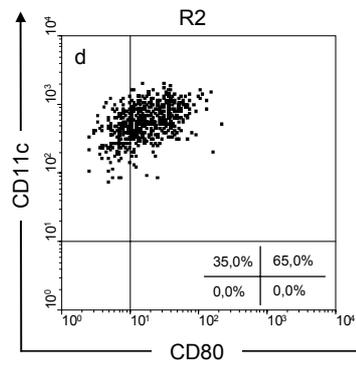
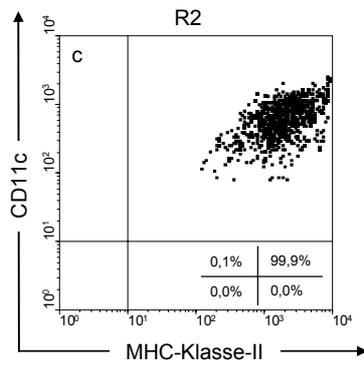
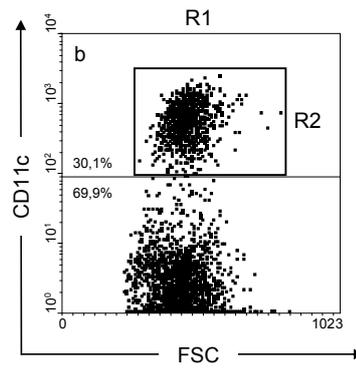
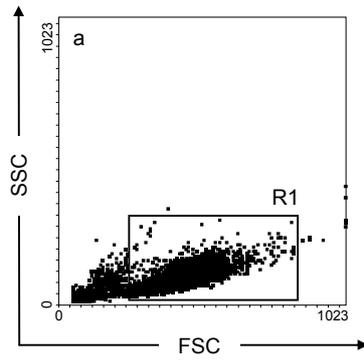


Abb. 4.6 (S. 41): Phänotypisierung Dendritischer Zellen der Mauslinie NMRI nach 24-stündiger Kultivierung *in vitro*. a: Zellgröße (FSC) und Zellgranularität (SSC); b: CD11c-positive Dendritische Zellen; c-h: Expression von MHC-Klasse-II, CD80, CD86, CD40, CD8 α bzw. CD11b auf CD11c-positiven Dendritischen Zellen. Die Fluoreszenzintensitäten der Isotypenkontrollen lagen im Bereich von 10^0 bis 10^1 . Repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Tabelle 4.2: Durchflusszytometrische Analyse Dendritischer Zellen der Mauslinie NMRI. Die präsentierten Daten basieren auf den CD11c-positiven Dendritischen Zellen (R2+R3 aus Abb. 4.5b, R2 aus Abb. 4.6b). Die mittlere Fluoreszenzintensität für CD11c lag bei durchschnittlich $412,9 \pm 119,2$ (Mittelwert \pm Standardabweichung). Es wurden jeweils zwei Zellisolierungen durchgeführt.

Marker	Anteil positiver Dendritischer Zellen \pm Standardabweichung		Mittlere Fluoreszenzintensität \pm Standardabweichung		
	<i>Kulturdauer</i>		<i>Kulturdauer</i>		
	<i>0 h</i>	<i>24 h</i>	<i>0 h</i>	<i>24 h</i>	
MHC-II	98,3 \pm 1,3 %	100 %	647,2 \pm 265,9	1 580,5 \pm 18,4	
CD80	30,9 \pm 2,8 %	66 \pm 0,8 %	7,7 \pm 0,7	18,1 \pm 0,7	
CD86	38 \pm 1,8 %	88,8 \pm 0,4 %	10 \pm 0,7	34,9 \pm 1,4	
CD40	74 \pm 8,8 %	92 \pm 0 %	18,8 \pm 0,8	45,5 \pm 1	
CD11b	nicht bestimmt	77,1 \pm 0,5 %	nicht bestimmt	28,1 \pm 0,7	
CD8 α	nicht bestimmt	24,6 \pm 0,6 %	CD8α⁺ DC	nicht bestimmt	78,6 \pm 1,1
			CD8α DC	nicht bestimmt	4,2 \pm 0

4.2.3 Phänotypische Charakterisierung Dendritischer Zellen aus Milzen von Mäusen der Linie Balb/c

Dendritische Zellen von Mäusen der Linie Balb/c wurden nach 24-stündiger *In-vitro*-Kultivierung isoliert (Abb. 3.2) und durchflusszytometrisch untersucht. Die Dendritischen Zellen wiesen einen reifen Phänotyp auf. Sie exprimierten MHC-Klasse-II sehr stark und waren für CD86 zum größten Teil positiv (Abb. 4.7c+d, Tab. 4.3).

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Charakterisierung Dendritischer Zellen der Mauslinie Balb/c sind in Tab. 4.3 zusammengefasst.

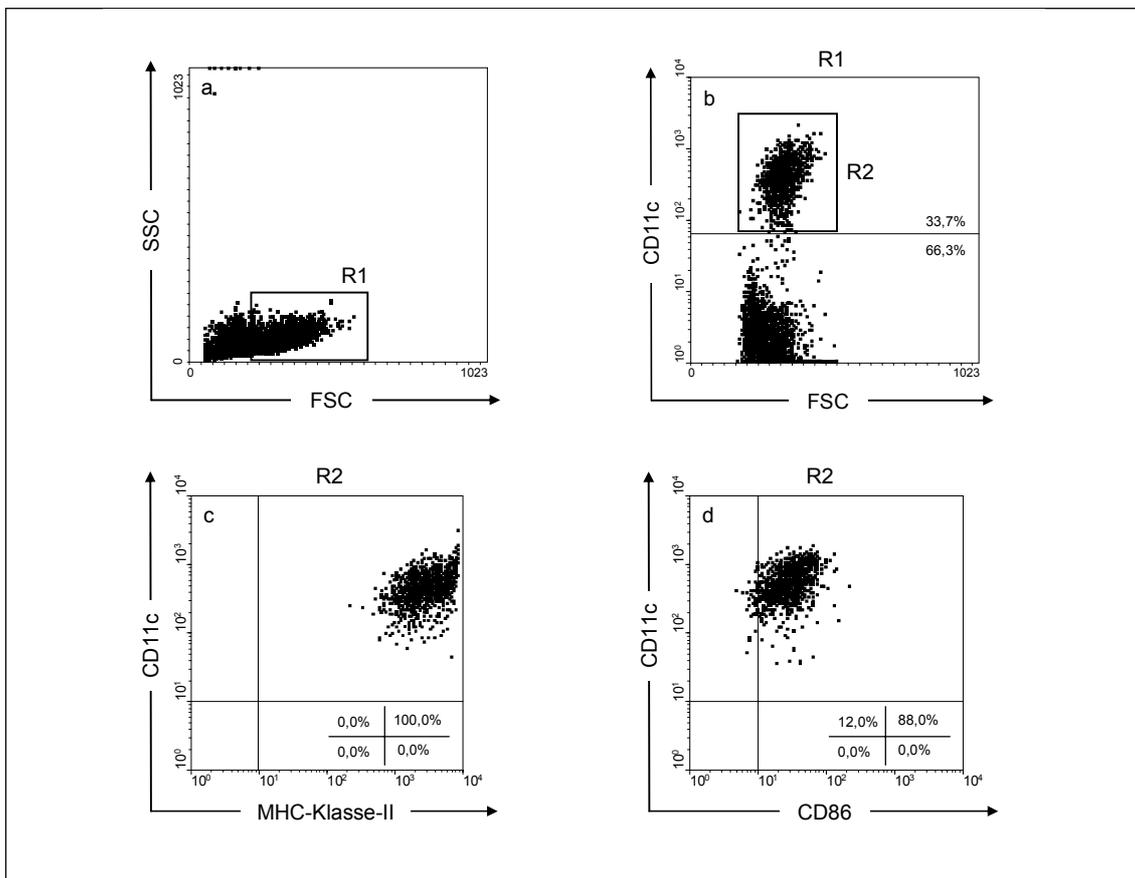


Abb. 4.7: Phänotypisierung Dendritischer Zellen der Mauslinie Balb/c nach 24-stündiger Kultivierung *in vitro*. a: Zellgröße (FSC) und Zellgranularität (SSC); b: CD11c-positive Dendritische Zellen; c, d: Expression von MHC-Klasse-II bzw. CD86 auf CD11c-positiven Dendritischen Zellen. Die Fluoreszenzintensitäten der Isotypenkontrollen lagen im Bereich von 10^0 bis 10^1 . Repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Tabelle 4.3: Durchflusszytometrische Analyse Dendritischer Zellen der Mauslinie Balb/c. Die präsentierten Daten basieren auf den CD11c-positiven Dendritischen Zellen (R2 aus Abb. 4.7b). Die mittlere Fluoreszenzintensität für CD11c lag bei durchschnittlich $445,3 \pm 62,1$ (Mittelwert \pm Standardabweichung). Es wurden jeweils zwei Zellisolierungen durchgeführt.

Marker	Anteil positiver Dendritischer Zellen \pm Standardabweichung	Mittlere Fluoreszenzintensität \pm Standardabweichung
	<i>Kulturdauer 24 h</i>	<i>Kulturdauer 24 h</i>
MHC-II	100 %	2 314,9 \pm 9,3
CD86	89,3 \pm 0,1 %	27,9 \pm 0,3

4.2.4 Phänotypische Charakterisierung Dendritischer Zellen aus Milzen von Mäusen der Linie NMRI^{nude}

Dendritische Zellen von Mäusen der Linie NMRI^{nude} wurden nach 24-stündiger *In-vitro*-Kultivierung isoliert (Abb. 3.2) und durchflusszytometrisch untersucht. Die Dendritischen Zellen exprimierten MHC-Klasse-II stark und waren für CD86 und CD40 mehrheitlich positiv, für CD80 jedoch mehrheitlich negativ (Abb. 4.8c-f, Tab. 4.4). Die Expressionsstärken von MHC-Klasse-II, CD80 und CD86 lagen jeweils zwischen den entsprechenden Werten unreifer und reifer Dendritischer Zellen der anderen Mauslinien, die Expressionsstärke von CD40 sogar unter dem Wert unreifer Dendritischer Zellen (Tab. 4.1-4). Somit zeigten Dendritische Zellen der Mauslinie NMRI^{nude} ein weniger stark ausgeprägtes Reifungsstadium als kultivierte Dendritische Zellen der anderen untersuchten Mauslinien. Der Anteil CD8 α -positiver Dendritischer Zellen lag bei durchschnittlich 24,5 Prozent, der Anteil CD8 α -negativer Dendritischer Zellen bei durchschnittlich 75,5 Prozent (Abb. 4.8g, Tab. 4.4).

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Charakterisierung Dendritischer Zellen der Mauslinie NMRI^{nude} sind in Tab. 4.4 zusammengefasst.

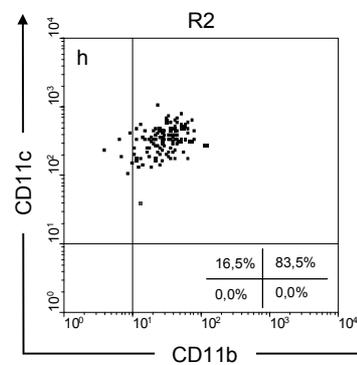
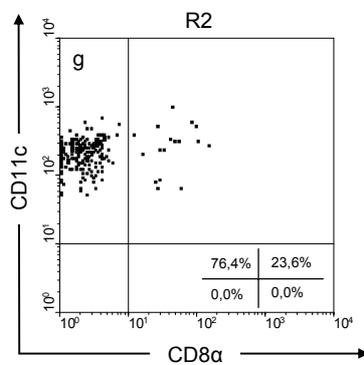
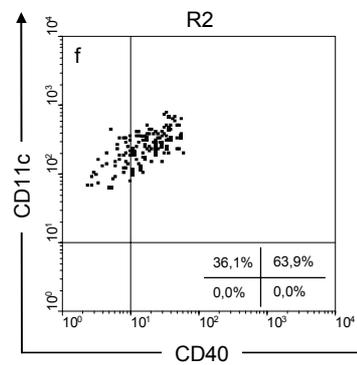
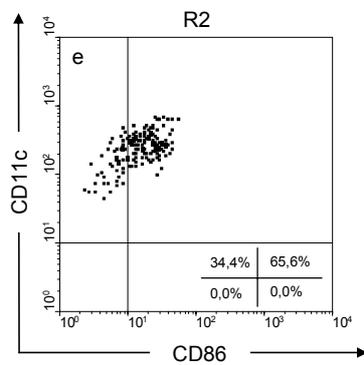
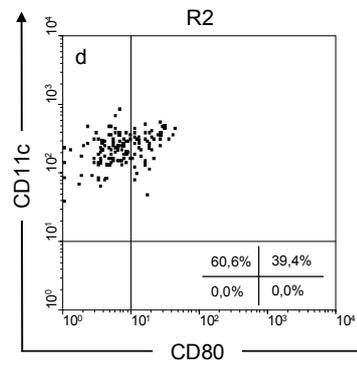
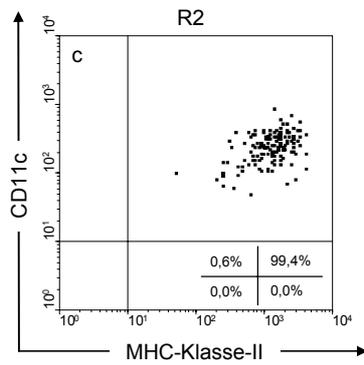
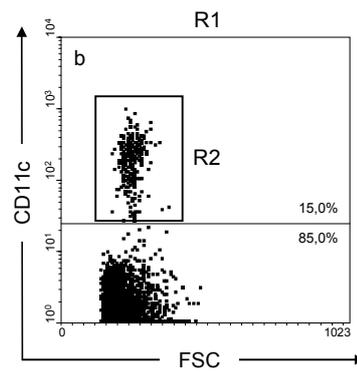
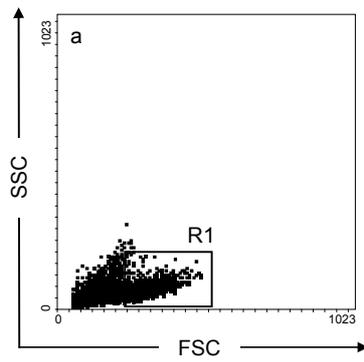


Abb. 4.8 (S. 45): Phänotypisierung Dendritischer Zellen der Mauslinie NMRI^{nude} nach 24-stündiger Kultivierung *in vitro*. a: Zellgröße (FSC) und Zellgranularität (SSC); b: CD11c-positive Dendritische Zellen; c-h: Expression von MHC-Klasse-II, CD80, CD86, CD40, CD8 α bzw. CD11b auf CD11c-positiven Dendritischen Zellen. Die Fluoreszenzintensitäten der Isotypenkontrollen lagen im Bereich von 10⁰ bis 10¹. Repräsentatives Ergebnis von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Tabelle 4.4: Durchflusszytometrische Analyse Dendritischer Zellen der Mauslinie NMRI^{nude}. Die präsentierten Daten basieren auf den CD11c-positiven Dendritischen Zellen (R2 aus Abb. 4.8b). Die mittlere Fluoreszenzintensität für CD11c lag bei durchschnittlich 201,7 \pm 69,8 (Mittelwert \pm Standardabweichung). Es wurden jeweils drei Zellisolierungen durchgeführt.

Marker	Anteil positiver Dendritischer Zellen \pm Standardabweichung	Mittlere Fluoreszenzintensität \pm Standardabweichung	
	<i>Kulturdauer 24 h</i>	<i>Kulturdauer 24 h</i>	
MHC-II	99,6 \pm 0,4 %	915,5 \pm 401,4	
CD80	38,2 \pm 1,5 %	8,9 \pm 0,3	
CD86	74,1 \pm 5,9 %	21,6 \pm 6,5	
CD40	68,8 \pm 1,4 %	18,4 \pm 0,9	
CD11b	70,4 \pm 5,6 %	23,8 \pm 4,2	
CD8 α	24,5 \pm 1,3 %	CD8 α^+ DC	43,6 \pm 2,1
		CD8 α^- DC	2,4 \pm 0,1

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen durchflusszytometrischen Daten von Dendritischen Zellen der Mauslinie NMRI^{nude} geben einen Hinweis auf potentielle Unterschiede zwischen Dendritischen Zellen der T-Zell-defizienten Mauslinie NMRI^{nude} und Dendritischen Zellen anderer, immunkompetenter Mauslinien. Unter gleichen Versuchsbedingungen induzierte die 24-stündige Kultivierung *in vitro* ein weniger stark ausgeprägtes Reifungsstadium bei Dendritischen Zellen der Mauslinie NMRI^{nude} als bei Dendritischen Zellen der anderen untersuchten Mauslinien. Abb. 4.9 zeigt exemplarisch die Unterschiede in der Expression von MHC-Klasse-II auf Dendritischen Zellen der unterschiedlichen Mauslinien in Abhängigkeit von der Kulturdauer. Nicht nur bei den Reifungsmarkern, sondern auch bei den meisten anderen untersuchten Oberflächenmarkern zeigten Dendritische Zellen der Mauslinie NMRI^{nude} deutliche Unterschiede zu Dendritischen Zellen der anderen Mauslinien (Abb. 10.1-12).

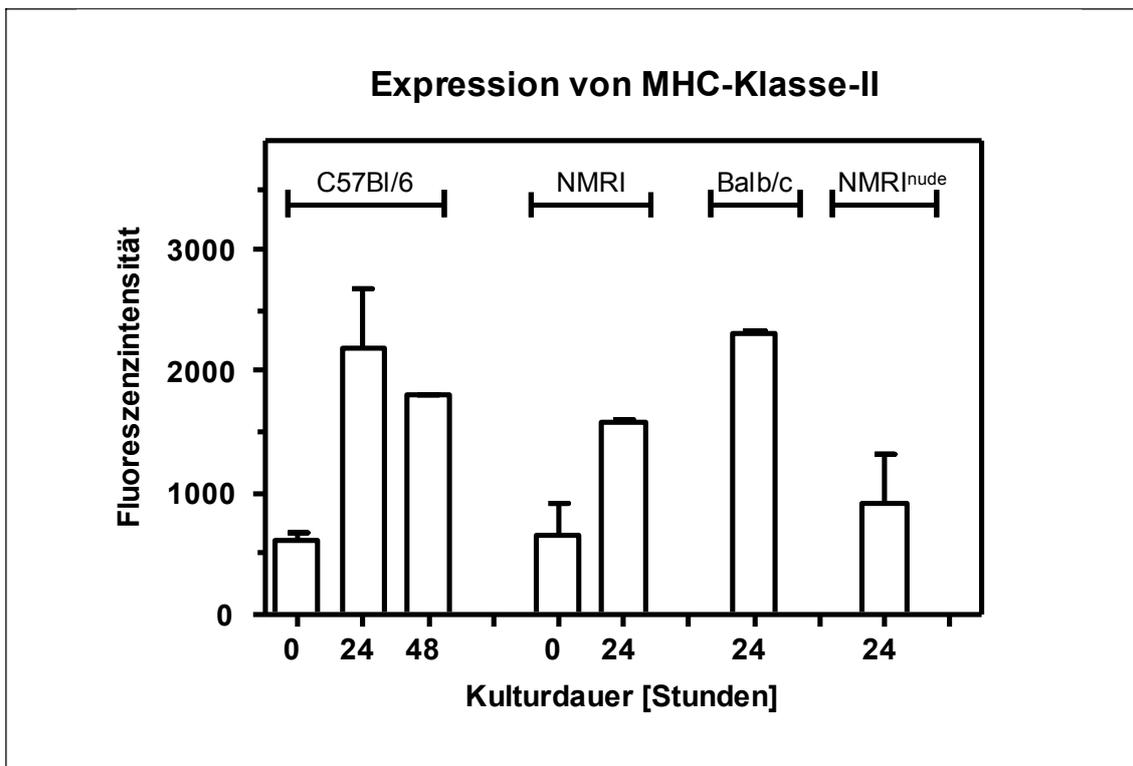


Abb. 4.9: Expressionsstärke von MHC-Klasse-II auf Dendritischen Zellen unterschiedlicher Mauslinien in Abhängigkeit von der Kulturdauer *in vitro*. Eine statistische Analyse wurde nicht durchgeführt, da die Anzahl der Daten für die einzelnen Messzeitpunkte mit 2 bis 6 Isolierungen zu gering war.

4.3 Funktionelle Charakterisierung isolierter Dendritischer Zellen aus Mäusemilzen

Dendritische Zellen aus Milzen von Mäusen der Linie C57Bl/6 wurden nach 24-stündiger *In-vitro*-Kultivierung isoliert und funktionell charakterisiert. Hierzu wurden sie in gemischten (allogenen) Leukozytenkulturen zusammen mit T-Lymphozyten der Mauslinie Balb/c für 72 Stunden inkubiert. Die Dendritischen Zellen aktivierten die allogenen T-Lymphozyten und regten sie zur Proliferation an. Der Einbau Tritium-markierten Thymidins als Indikator der Proliferation von T-Lymphozyten wurde durch Zugabe von 1×10^4 Dendritischen Zellen zu 1×10^5 T-Lymphozyten um mehr als den Faktor 30 gegenüber T-Lymphozyten ohne Dendritische Zellen gesteigert (Tab. 4.5). Die Dendritischen Zellen zeigten somit immunstimulatorische Eigenschaften.

Tabelle 4.5: Gemischte (allogene) Leukozytenkulturen. Überblick über drei unabhängig voneinander durchgeführte gemischte (allogene) Leukozytenkulturen. Dendritische Zellen stammten von der Mauslinie C57Bl/6, T-Lymphozyten von der Mauslinie Balb/c.

	1x10⁵ T-Lymphozyten ohne Dendritische Zellen	1x10⁵ T-Lymphozyten plus 1x10⁴ Dendritische Zellen
Zerfälle pro Minute (cpm):	1 051,1 ± 359,4	31 517,2 ± 6 793,4
Mittelwert	147 ± 70,1	17 666,3 ± 10 282,2
± Standardabweichung	29,2 ± 46,3	26 210,7 ± 3 906,5

Die stimulatorische Wirkung Dendritischer Zellen wurde bei unterschiedlichen Anteilen von Dendritischen Zellen und T-Lymphozyten getestet. Hierzu wurden zwischen 1×10^3 und 4×10^4 Dendritische Zellen zusammen mit jeweils 1×10^5 allogenen T-Lymphozyten in der gemischten Leukozytenkultur inkubiert. Es zeigte sich eine lineare Beziehung zwischen der Stärke der Proliferation von T-Lymphozyten und der Anzahl stimulatorischer Dendritischer Zellen. Die gemessene Proliferation lag in den Ansätzen mit der höchsten Anzahl Dendritischer Zellen um den Faktor 5 über der Proliferation in den Ansätzen mit niedrigsten Anzahl Dendritischer Zellen (Tab. 4.6, Abb. 4.10).

Tabelle 4.6 Gemischte (allogene) Leukozytenkultur unter Verwendung unterschiedlicher Zahlen Dendritischer Zellen. Dendritische Zellen stammten von der Mauslinie C57Bl/6, T-Lymphozyten von der Mauslinie Balb/c. Repräsentatives Ergebnis von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Dendritische Zellen	T-Lymphozyten	Zerfälle pro Minute (cpm): Mittelwert ± Standardabweichung
0	1×10^5	147 ± 70,1
1×10^3	1×10^5	8 266,7 ± 3 822,2
$2,5 \times 10^3$	1×10^5	10 963,5 ± 7 288,3
5×10^3	1×10^5	14 902,8 ± 6 964,6
$7,5 \times 10^3$	1×10^5	14 683,7 ± 10 173,9
1×10^4	1×10^5	17 666,3 ± 10 282,2
2×10^4	1×10^5	27 914 ± 14 216
4×10^4	1×10^5	41 639,3 ± 20 717

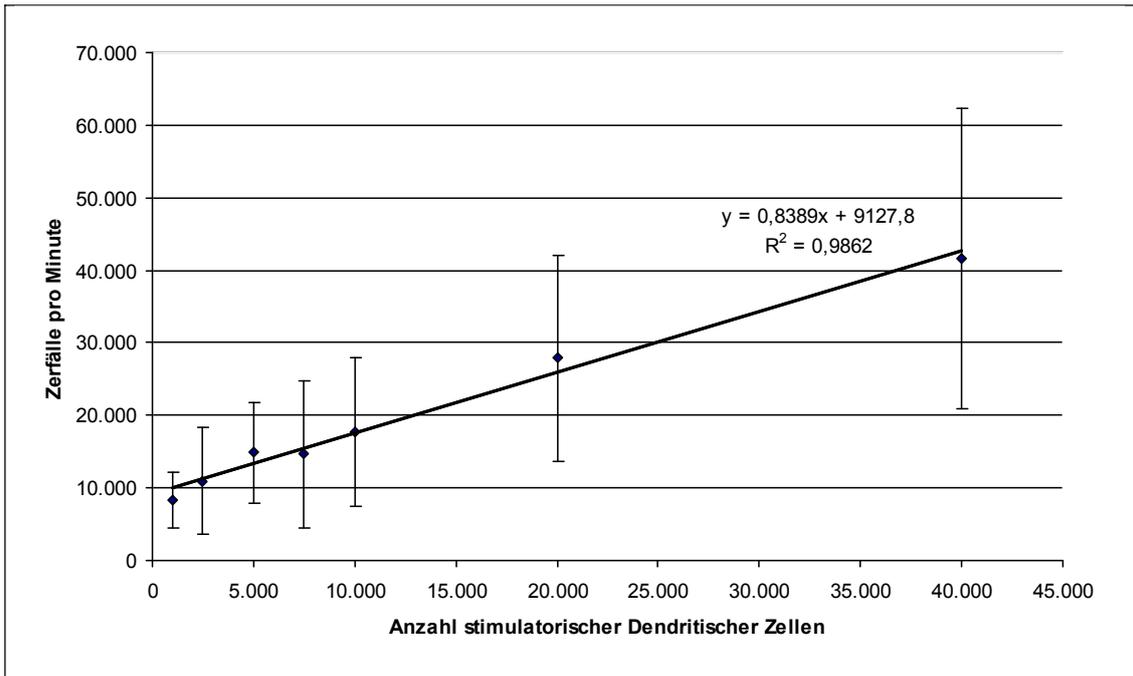


Abb. 4.10: Proliferation allogener T-Lymphozyten in Abhängigkeit von der Anzahl stimulatorischer Dendritischer Zellen. Graphische Darstellung der Daten aus Tab. 4.6 (Mittelwert \pm Standardabweichung). Repräsentatives Ergebnis von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

5 Beantwortung der Fragen

1. Welche Dendritischen Zellen lassen sich durch Dichtegradientenzentrifugation unter Verwendung von OptiPrep aus Mäusemilzen isolieren?

Aus Mäusemilzen wurden residente konventionelle Dendritische Zellen (Tab. 1.1) isoliert. Unabhängig von der untersuchten Mauslinie waren 19 bis 26 Prozent der isolierten Dendritischen Zellen CD8 α -positiv und 74 bis 81 Prozent CD8 α -negativ.

2. Welches Reifungsstadium weisen aus Milzen isolierte Dendritische Zellen unmittelbar nach der Zellgewinnung auf und wie wirkt sich eine Kultivierung *in vitro* auf ihr Reifungsstadium aus?

Dendritische Zellen zeigten unmittelbar nach Zellgewinnung einen unreifen Phänotyp mit starker Expression von MHC-Klasse-II, aber geringer bis fehlender Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40. Die 24-stündige Kultivierung *in vitro* führte zur Reifung Dendritischer Zellen, wobei die Expression von MHC-Klasse-II, CD80, CD86 und CD40 auf der Zelloberfläche jeweils um den Faktor 2 bis 4 hochreguliert war. Eine Kulturdauer von 48 Stunden führte zu keiner wesentlichen Steigerung der Expression dieser Moleküle. Nach 24-stündiger Kultivierung *in vitro* wurde die immunologische Funktion Dendritischer Zellen der Mauslinie C57Bl/6 in der gemischten (allogenen) Leukozytenkultur mit T-Lymphozyten der Mauslinie Balb/c getestet. In einem Verhältnis von 1:10 zwischen Dendritischen Zellen und T-Lymphozyten nahm die Proliferation der T-Lymphozyten um den Faktor von mindestens 30 gegenüber der Kontrolle (T-Lymphozyten ohne Dendritische Zellen) zu. Damit erwiesen sich die Dendritischen Zellen als immunstimulatorisch und somit funktionell reif.

3. Weisen Dendritische Zellen aus Milzen von Mäusen der Linien C57Bl/6, NMRI, Balb/c und NMRI^{nude} phänotypische Unterschiede auf?

Die Zusammensetzung der Dendritischen Zellen in den isolierten Zellpopulationen war bei allen untersuchten Mauslinien sehr ähnlich (s. Frage 1). Dendritische Zellen der Mauslinie NMRI^{nude} wiesen gegenüber Dendritischen Zellen der anderen Mauslinien nach 24-stündiger Kultivierung *in vitro* ein weniger stark ausgeprägtes Reifungsstadium auf, d.h. sie exprimierten die Reifungsmarker MHC-Klasse-II, CD80, CD86 und CD40 deutlich schwächer; die gemessenen Expressionsstärken lagen jeweils zwischen den entsprechenden Werten unreifer und reifer Dendritischer Zellen der anderen Mauslinien, die Expressionsstärke von CD40 sogar unter dem Wert unreifer Dendritischer Zellen (Tab. 4.1-4, Abb. 4.9, Abb. 10.4, 6, 8). Auch andere untersuchte Oberflächenmarker wurden von Dendritischen Zellen der Mauslinie NMRI^{nude} deutlich schwächer exprimiert. Beispielsweise erreichte die durchschnittliche Expressionsstärke von CD11c auf der Oberfläche Dendritischer Zellen der Mauslinie NMRI^{nude} nicht einmal die Hälfte der entsprechenden Durchschnittswerte für die anderen Mauslinien (Tab. 4.1-4, Abb. 10.1). Dies ist ein Hinweis auf potentielle Unterschiede zwischen Dendritischen Zellen der thymuslosen Mauslinie NMRI^{nude} gegenüber Dendritischen Zellen der anderen Mauslinien. Die eingeschränkte Möglichkeit zur Interaktion mit T-Lymphozyten oder ein abweichendes Zytokinmilieu scheinen Phänotyp und Reifung Dendritischer Zellen der Mauslinie NMRI^{nude} zu beeinflussen (Kap. 6.2).

6 Diskussion

6.1 Subtypen konventioneller Dendritischer Zellen

Konventionelle Dendritische Zellen (Tab. 1.1) werden nach ihrer Fähigkeit zur Wanderung in migratorische und residente Zellen unterteilt. Residente Dendritische Zellen überwiegen bei weitem in der Mausmilz (Shortman K, Naik SH), wenn sie nicht sogar – so nach Merad und Kollegen – die Gesamtheit der konventionellen Dendritischen Zellen in der Milz stellen (Merad M et al., 2013). Residente Dendritische Zellen lassen sich in CD8 α -positive und CD8 α -negative Zellen unterteilen (Tab. 1.1).

Die Funktion von CD8 α auf Dendritischen Zellen ist bisher noch ungeklärt. Während CD8 α auf T-Lymphozyten mit CD8 β Heterodimere bildet, sind auf Dendritischen Zellen CD8 α -Homodimere zu finden (Vremec D et al., 1992; Kamath AT et al., 2000; Shortman K, Heath WR, 2010). Für die immunologische Funktion von Dendritischen Zellen scheint CD8 α keine Rolle zu spielen, wie Untersuchungen an CD8-Null-Mäusen nahelegen (Shortman K, Heath WR, 2010).

Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Isolierungen betrug der Anteil CD8 α -positiver Dendritischer Zellen an den in der Milz befindlichen Dendritischen Zellen 19 bis 26 Prozent – und zwar unabhängig von der untersuchten Mauslinie (Kap. 4.2). Vergleichbare Werte (zwischen 20 und 24 Prozent) für CD8 α -positive Dendritische Zellen werden auch von anderen Autoren angegeben (Kamath AT et al., 2002; McLellan AD et al., 2002; Shortman K, Liu Y-J, 2002; Chung Y et al., 2007; Miloud T et al., 2010; Shortman K, Heath WR, 2010). Wieder andere Autoren dagegen beziffern den Anteil CD8 α -positiver Dendritischer mit mehr als 50 Prozent deutlich höher (Vremec D et al., 1992; Anjuère F et al., 1999; Jonuleit H et al., 2001).

Die abweichenden Angaben zum Anteil CD8 α -positiver Dendritischer Zellen in der Milz sind vermutlich mit unterschiedlichen Protokollen zur Zellisolierung zu

erklären. So beschreibt Vremec, dass bei der mechanischen Isolierung Dendritischer Zellen aus der Milz CD8 α -positive Dendritische Zellen in der Minderheit sind, während sie bei zusätzlichem Einsatz von Kollagenase und EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) die Mehrheit unter den isolierten Dendritischen Zellen ausmachen (Vremec D et al., 1992; Vremec D, Shortman K, 1997). Kollagenase und EDTA führen zur Auflösung der Rosetten aus Dendritischen Zellen und Lymphozyten (Vremec D et al., 1992); EDTA verhindert darüber hinaus deren Reassoziaton (Vremec D et al., 1992; Vremec D, Shortman K, 1997). CD8 α -positive Dendritische Zellen exprimieren zahlreiche Zelladhäsionsmoleküle deutlich stärker als CD8 α -negative Dendritische Zellen (McLellan AD et al., 2002); daher steigt ihr Anteil beim Einsatz von gewebeverdauender Kollagenase und EDTA.

Die verschiedenen Dendritischen Zellen unterscheiden sich ebenfalls in ihrer Lebensdauer. Diese beträgt bei konventionellen Dendritischen Zellen wenige Tage, beispielsweise nur drei Tage bei CD8 α -positiven Dendritischen Zellen der Milz (Kamath AT et al., 2002; Shortman K, Heath WR, 2010). Auch *in vitro* sterben CD8 α -positive Dendritische Zellen schneller ab als CD8 α -negative (Vremec D et al., 2000). Im Gegensatz dazu ist die Lebenszeit plasmazytoider Dendritischer Zellen mit ca. zwei Wochen deutlich länger (Colonna M et al., 2004).

CD8 α -positive und CD8 α -negative residente konventionelle Dendritische Zellen zeichnen sich auch durch funktionelle Unterschiede aus. Eine Zeit lang wurde angenommen, dass CD8 α -positive Dendritische Zellen tolerogene und CD8 α -negative Dendritische Zellen immunogene Eigenschaften aufweisen (Steinman RM et al., 1997; Kamath AT et al., 2002). Es konnte aber gezeigt werden, dass CD8 α -positive und CD8 α -negative Dendritische Zellen in der gemischten Leukozytenkultur unfraktionierte T-Lymphozyten vergleichbar stark stimulieren (McLellan AD et al., 2002). Ein entscheidender funktioneller Unterschied zwischen beiden Zellpopulationen besteht bei der Antigenpräsentation. CD8 α -negative Dendritische Zellen sind auf die Antigenpräsentation durch MHC-

Klasse-II-Molekülen spezialisiert (Dudziak D et al., 2007; Joffre OP et al., 2012). Sie präsentieren endozytierte, also von außen aufgenommene Antigene auf MHC-Klasse-II-Molekülen, jedoch *in vivo* kaum bzw. nur unter bestimmten Bedingungen auf MHC-Klasse-I-Molekülen (den Haan JMM, Bevan MJ, 2002; Dudziak D et al., 2007). Auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentieren sie, wie jede andere kernhaltige Körperzelle (Abb. 10.18), Peptide aus dem proteasomalen Abbau zelleigener Proteine (Joffre OP et al., 2012). Diese Peptide sind körpereigenen Ursprungs, es sei denn, die Dendritische Zelle ist selbst von einem Erreger, beispielsweise von einem Virus, befallen. CD8 α -positive Dendritische Zellen dagegen sind auf die Kreuzpräsentation (Kap. 1.3) spezialisiert (Dudziak D et al., 2007; Joffre OP et al., 2012). Sie präsentieren endozytierte Antigene nicht nur auf MHC-Klasse-II, sondern auch auf MHC-Klasse-I und aktivieren dadurch erregerspezifische, naive CD8-positive T-Lymphozyten. Die Spezialisierung CD8 α -positiver Dendritischer Zellen auf die Kreuzpräsentation ist mit einer besonderen Fähigkeit zur Endozytose apoptotischer Zellen verbunden (Ioyada T et al., 2002). *In vitro* sind auch CD8 α -negative Dendritische Zellen zur Kreuzpräsentation fähig und unterscheiden sich darin kaum von CD8 α -positiven Dendritischen Zellen; zugleich präsentieren sie auch *in vitro* Antigene auf MHC-Klasse-II-Molekülen deutlich effektiver als CD8 α -positive Dendritische Zellen (Kamphorst AO et al., 2010).

Die Kreuzpräsentation erfolgt im Wesentlichen über zwei verschiedene Wege der Antigenprozessierung: über den zytosolischen und über den vakuolären Weg (Joffre OP et al., 2012; Kreer C et al., 2012). Über den vakuolären Weg werden die von der Zelle aufgenommenen Proteine im Endosom zerkleinert und die entstehenden Peptidantigene ebenfalls im Endosom auf MHC-Klasse-I-Moleküle übertragen. Über den zytosolischen Weg (dargestellt in Abb. 6.1) verlassen die Proteine das Endosom und werden in zytosolischen Proteasomen zu Peptidantigenen abgebaut, die dann zurück in das Endosom (und möglicherweise auch in das endoplasmatische Retikulum) transportiert und dort auf MHC-Klasse-I-Moleküle übertragen werden.

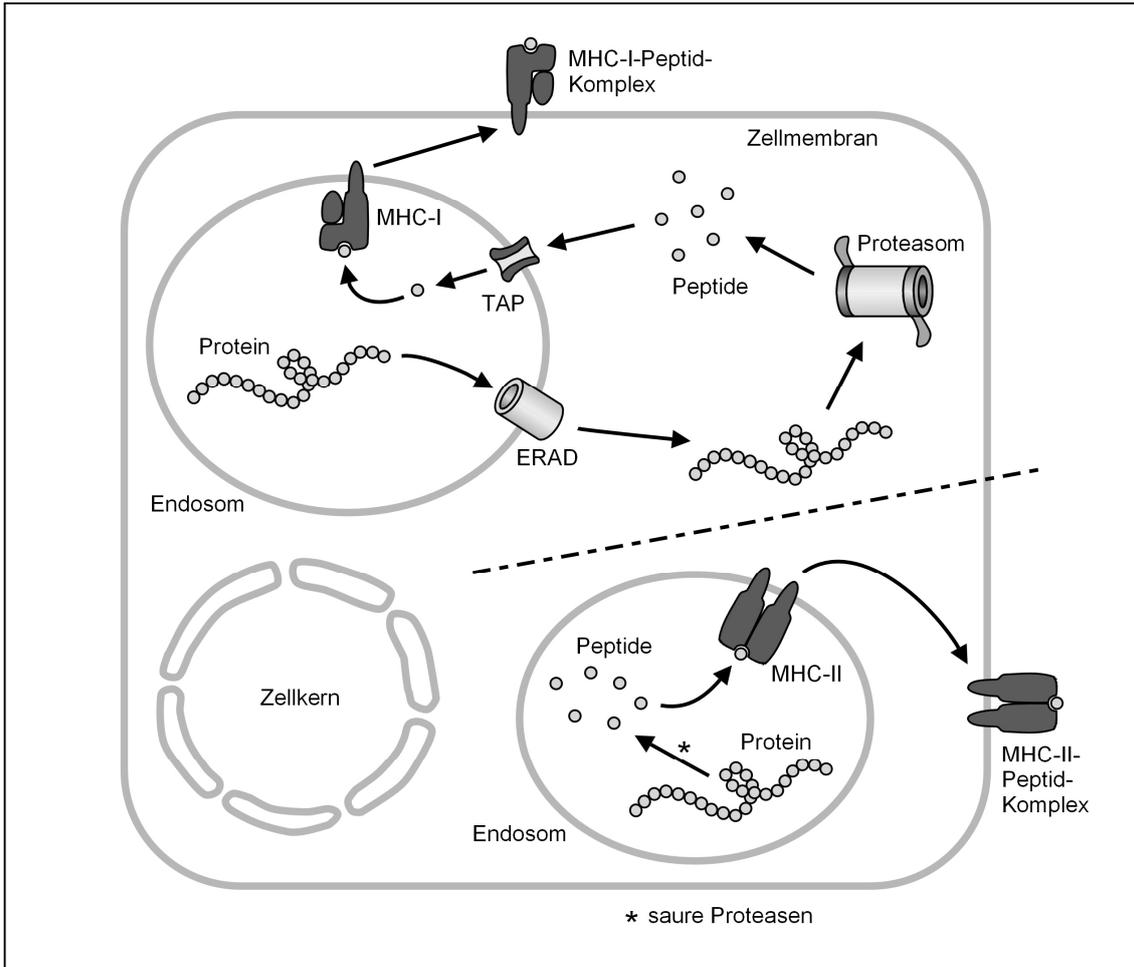


Abbildung 6.1: Präsentation endozytierter Antigene durch eine Dendritische Zelle. Bei der Endozytose gelangt extrazelluläres Material in intrazelluläre Vesikel (Endosomen). Dendritische Zellen präsentieren endozytierte Antigene sowohl auf MHC-Klasse-I-Molekülen (Kreuzpräsentation; oberer Bildabschnitt) als auch auf MHC-Klasse-II-Molekülen (unterer Bildabschnitt). Oberer Bildabschnitt: Zur Kreuzpräsentation wird endozytiertes Protein unter Vermittlung des ERAD-Komplexes aus dem Endosom in das Zytosol geschleust (zytosolischer Weg der Kreuzpräsentation; der vakuoläre Weg ist nicht dargestellt). Im Zytosol werden die exogenen Proteine von Proteasomen zu Peptidfragmenten prozessiert. Die Peptide gelangen über TAP-Transporter wieder in das endosomale Kompartiment, wo sie auf MHC-Klasse-I-Moleküle geladen werden. Die beladenen MHC-Klasse-I-Moleküle werden anschließend zur Zellmembran transferiert und präsentiert. Unterer Bildabschnitt: Die Prozessierung von endozytierten Proteinen zur anschließenden Präsentation über MHC-Klasse-II-Moleküle erfolgt durch saure Proteasen im endosomalen Kompartiment. Hier erfolgt anschließend die Beladung der MHC-Klasse-II-Moleküle mit Peptiden. Die MHC-II-Peptid-Komplexe werden zur Zellmembran transferiert und präsentiert. Abkürzungen: ERAD = endoplasmic reticulum-associated protein degradation; TAP = transporter associated with antigen presentation.

Die Kreuzpräsentation durch Dendritische Zellen ist von entscheidender Bedeutung für die Generierung spezifischer Immunantworten gegenüber Viren, intrazellulären Bakterien und Parasiten sowie gegenüber malignen Zellen. Sie ermöglicht die Aktivierung naiver CD8-positiver T-Lymphozyten durch intra-

zelluläre Erreger (genauer: durch deren Peptidantigene), ohne dass die aktivierende Dendritische Zelle selbst infiziert ist. Bei Abwesenheit einer Entzündung löst die Kreuzpräsentation körpereigener Antigene die sog. „periphere Kreuztoleranz“ aus und ist auf diese Weise an der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz (Kap. 1.3) beteiligt (Joffre OP et al., 2012).

CD8 α -positive Dendritische Zellen sind, ihrer Fähigkeit zur Kreuzpräsentation entsprechend, auf die Phagozytose untergegangener Zellen spezialisiert, deren Antigene sie anschließend präsentieren (Ioyada T et al., 2002). Darüber hinaus existieren weitere Unterschiede zwischen CD8 α -positiven und CD8 α -negativen Dendritischen Zellen. Die beiden Zelltypen unterscheiden sich in der Expression einer Vielzahl von Oberflächenmolekülen, insbesondere von verschiedenen Toll-ähnlichen Rezeptoren, sowie hinsichtlich der von ihnen produzierten Zytokine (Segura E et al., 2010; Shortman K, Heath WR, 2010; Merad M et al., 2013).

Den CD8 α -positiven residenten Dendritischen Zellen entsprechen die CD103-positiven migratorischen Dendritischen Zellen (Satpathy AT et al., 2012), die ebenfalls zur Kreuzpräsentation fähig sind (Joffre OP et al., 2012). CD8 α -positive und CD103-positive Dendritische Zellen haben die Abhängigkeit ihrer Entwicklung von dem Transkriptionsfaktor Batf3 gemeinsam (Joffre OP et al., 2012; Merad M et al., 2013). Batf3-defizienten Mäusen fehlen Dendritische Zellen, die über die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation verfügen, was dazu führt, dass diese Tiere bei der Virus- und Tumorbekämpfung stark beeinträchtigt sind (Hildner K et al., 2008).

In den letzten Jahren ist die Klassifikation Dendritischer Zellen immer komplexer geworden. Verschiedene molekulare Marker erlauben die Definition bisher unbekannter Subtypen Dendritischer Zellen mit potentiell divergierenden Funktionen. Solche charakteristischen Marker sind beispielsweise das Adhäsionsmolekül ESAM (Lewis KL et al., 2011), der C-Typ-Lektin-Rezeptor DCAL2 (Kasahara S, Clark EA, 2012) oder der Chemokinrezeptor CX₃CR1 (Bar-On L et al., 2010). Die genaue Kenntnis der verschiedenen Subtypen

Dendritischer Zellen und ihrer jeweiligen Funktionen bei der Auslösung bzw. Verhinderung von Immunantworten könnte neue, klinisch relevante Interventionsmöglichkeiten eröffnen, so z. B. bei der Entwicklung von Impfstrategien, bei der Tumorbekämpfung oder in der Transplantationsmedizin.

6.2 Reifungsstadien Dendritischer Zellen

Das klassische Konzept zur Reifung Dendritischer Zellen sieht ein unreifes und ein reifes Stadium vor, wobei unreife Dendritische Zellen tolerogen und reife immunogen sind (Steinman RM, Nussenzweig MC, 2002). Die direkte Verknüpfung von Phänotyp und Funktion, auf der das klassische Konzept basiert, kann nach neueren Erkenntnissen nicht aufrechterhalten werden (Cools N et al., 2007; Naranjo-Gómez M et al., 2011). Insbesondere muss zwischen phänotypischer Reifung, welche über exprimierte Oberflächenmarker (Reifungsmarker) definiert ist, und funktioneller Reifung, die den Funktionswechsel von tolerogen zu immunogen beschreibt, unterschieden werden (Reis e Sousa C, 2006). Derzeit erscheint gesichert, dass phänotypisch unreife Dendritische Zellen auch funktionell unreif sind, dass jedoch phänotypisch reife Dendritische Zellen keineswegs immer auch funktionell reif sind (Reis e Sousa C, 2006; Kornete M, Piccirillo CA, 2012). Phänotyp und Funktion erscheinen somit als zwei Komponenten, die gemeinsam das jeweilige Reifungsstadium einer Dendritischen Zelle definieren.

Die tolerogene bzw. immunogene Wirkung einer Dendritischen Zelle auf einen T-Lymphozyten wird durch das Konzept der zwei bzw. drei Signale⁶⁾ erklärt (Sharpe AH, Freeman GJ, 2002; Reis e Sousa C, 2006; Kornete M, Piccirillo CA, 2012; Vassalli G, 2013). Eine immunogene Dendritische Zelle übermittelt einem naiven T-Lymphozyten demnach drei verschiedene Signale für seine erfolgreiche Aktivierung. Signal 1 wird durch den T-Zellrezeptor bei dessen spezifischer Bindung an einen MHC-Peptid-Komplex vermittelt. Signal 2 besteht

⁶⁾ Gordon und Kollegen beschreiben ein zusätzliches viertes Signal, welches das Homing beeinflusst, d.h. das gezielte Einwandern von T-Lymphozyten in bestimmte Gewebe (Gordon JR et al., 2014).

in der Kostimulation durch verschiedene zellmembrangebundene kostimulatorische Moleküle, insbesondere durch CD80 und CD86. Bei Signal 3 handelt es sich um von der Dendritischen Zelle sezernierte, stimulatorische Zytokine, z. B. IL-12 (Reis e Sousa C, 2006; Vassalli G, 2013). Diese „kostimulatorischen“ Zytokine wurden nach älterer Nomenklatur teilweise dem zweiten Signal zugerechnet (Lenschow DJ et al., 1996). Die verschiedenen Reifungsstadien Dendritischer Zellen weisen große Unterschiede bei der Vermittlung bzw. Nicht-Vermittlung der einzelnen Signale auf (s.u.).

Phänotypische Reifung

Phänotypisch unreife Dendritische Zellen sind durch eine starke Expression von MHC-Molekülen gekennzeichnet. Die MHC-Antigen-Komplexe auf der Oberfläche phänotypisch unreifer Dendritischer Zellen werden kontinuierlich degradiert und durch neue ersetzt (Wilson NS et al., 2004; Shortman K, Heath WR, 2010). Die Halbwertszeit von MHC-Klasse-II-Molekülen auf der Oberfläche unreifer konventioneller Dendritischer Zellen liegt bei weniger als einer Stunde (Wilson NS et al., 2004). Die kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 werden von unreifen Dendritischen Zellen nur schwach exprimiert oder fehlen vollständig (Vremec D, Shortman K, 1997; Lutz MB, Schuler G, 2002; Wilson NS et al., 2003; Wilson NS et al., 2004; Shortman K, Heath WR, 2010; Vitali C et al., 2012).

Phänotypisch reife Dendritische Zellen exprimieren MHC-Moleküle deutlich stärker als phänotypisch unreife Dendritische Zellen (Larsen CP et al., 1994; Wilson NS et al., 2003; Wilson NS et al., 2004; Bar-On L, Jung S, 2010; Shortman K, Heath WR, 2010). Die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 wird bei reifen Dendritischen Zellen hochreguliert (Banchereau J, Steinman RM, 1998; Banchereau J et al., 2000). Eine Dendritische Zelle mit vollständig reifem Phänotyp weist eine höhere Expression von CD86 auf als jeder andere Leukozyt (Inaba K et al., 1994). CD80 und CD86 sind Liganden von zwei auf T-Lymphozyten exprimierten Rezeptoren: des stimulatorischen CD28 und des inhibitorischen CTLA-4/CD152 (Lenschow DJ et al., 1996;

Sharpe AH, Freeman GJ, 2002; Sansom DM et al., 2003; Greenwald RJ et al., 2005; Xiang J et al., 2008). CD80 und CD86 können beide sowohl an CD28 als auch an CTLA-4 binden und addieren sich in ihrer Wirkung (Inaba K et al., 1994; Sansom DM et al., 2003). Insbesondere über die Aktivierung von CD28 wird das zweite Signal des 3-Signale-Konzepts (s.o.) vermittelt (Reis e Sousa C, 2006; Valdor R, Macian F, 2013). Die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD40 wird bei der Reifung ebenfalls verstärkt (Vremec D, Shortman K, 1997; Banchereau J, Steinman RM, 1998; Banchereau J et al., 2000). CD40 ist der Rezeptor für das Molekül CD40L (CD40-Ligand), das u.a. von aktivierten T-Lymphozyten exprimiert wird (McAdam AJ et al., 1998; Ma DY, Clark EA, 2009). Die Aktivierung von CD40 durch CD40L führt zur Reifung Dendritischer Zellen (Banchereau J, Steinman RM, 1998; Banchereau J et al., 2000; Elgueta R et al., 2009; Ma DY, Clark EA, 2009). Neben MHC-Molekülen sowie CD80, CD86 und CD40 gibt es weitere Reifungsmarker, deren Expression für reife Dendritische Zellen charakteristisch ist, wie z. B. CD83 (Banchereau J, Steinman RM, 1998; Vlad G et al., 2005; Suciú-Foca N et al., 2009) oder der Zytokinrezeptor CCR7 (Švajger U, Rožman P, 2014). Der reife Phänotyp geht bei konventionellen Dendritischen Zellen mit einer veränderten Morphologie einher, die durch ausgeprägtere dendritische Fortsätze gekennzeichnet ist⁷⁾ (Banchereau J et al., 2000).

Funktionelle Reifung

Funktionell unreife Dendritische Zellen sind tolerogen (Reis e Sousa C, 2006). Die Aufgabe unreifer Dendritischer Zellen besteht in der Induktion und Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz sowie in der Überwachung der Körpergewebe auf körperfremde Stoffe (Wilson NS et al., 2004). Die periphere Toleranz umfasst die Kontrolle potentiell autoreaktiver T-Lymphozyten, die der negativen Selektion im Thymus entkommen sind und in die Peripherie gelangen konnten (Xing Y, Hogquist KA, 2012). Potentiell autoreaktive T-Lymphozyten werden von tolerogenen Dendritischen Zellen zerstört, anergisiert oder in regulatorische T-Lymphozyten (T_{reg}) umgewandelt (Cools N et al., 2007; Lutz

⁷⁾ Plasmazytoide Dendritische Zellen entwickeln erst im Rahmen ihrer Reifung eine dendritische Form; als unreife Zellen ähneln sie morphologisch Plasmazellen (Shortman K, Naik SH, 2007).

MB, Kurts C, 2009). Zu den funktionell unreifen Dendritischen Zellen zählen nicht nur phänotypisch unreife Dendritische Zellen, sondern auch solche, die einen reifen Phänotyp bei gleichzeitig tolerogener Funktion aufweisen (Reis e Sousa C, 2006). Diese Konstellation ist charakteristisch für sog. halbreife Dendritische Zellen. Sie verfügen über eine starke Expression von MHC-Molekülen und kostimulatorischen Molekülen (Lutz MB, Schuler G, 2002; Kleindienst P et al., 2005; Lutz MB, 2012) und sind hierin von vollständig reifen, immunogenen Dendritischen Zellen nicht zu unterscheiden (Kleindienst P et al., 2005). Zugleich weisen sie eine tolerogene Funktion auf und sezernieren (teilweise) immunregulatorische Zytokine wie IL-10 und TGF- β (Lutz MB, Schuler G, 2002; Lutz MB, 2012). *In vivo* ist der halbreife Zustand charakteristisch für eine bestimmte Gruppe Dendritischer Zellen, die in der englischsprachigen Literatur als *steady-state migratory DC* (ssmDC) bezeichnet werden (Lutz MB, Schuler G, 2002; Kleindienst P et al., 2005; Lutz MB, 2012). Dabei handelt es sich um migratorische konventionelle Dendritische Zellen, die bei Abwesenheit einer Entzündung körpereigene Antigene aus den peripheren Geweben in die Lymphknoten transportieren und dort Toleranz induzieren.

Phänotypisch unreife und halbreife Dendritische Zellen sind tolerogen, unterscheiden sich aber in den Mechanismen, über die sie Immuntoleranz induzieren. Die Induktion von Anergie tritt beispielsweise im Regelfall bei der Antigenpräsentation ohne Kostimulation auf, d.h. bei vorhandenem Signal 1 und fehlendem Signal 2 (Valdor R, Macian F, 2013). Diese Konstellation ist typisch für phänotypisch unreife Dendritische Zellen, sodass davon auszugehen ist, dass Anergie durch diese Zellen vermittelt wird. Demgegenüber exprimieren halbreife Dendritische Zellen die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 und liefern somit neben Signal 1 auch Signal 2. Gleichzeitig fehlt ihnen jedoch ein immunstimulatorisches Signal 3; vielmehr produzieren sie (zumindest teilweise) immuninhibitorische Zytokine (Lutz MB, Schuler G, 2002; Lutz MB, 2012). Es ist anzunehmen, dass Dendritische Zellen zur Induktion regulatorischer T-Lymphozyten ein gewisses Maß an Reifung, insbesondere Kostimulation, aufweisen müssen (Jonuleit H et al., 2001; Naranjo-Gómez M et

al., 2011). Dazu passt die Beobachtung von Vitali und Kollegen, dass die Induktion regulatorischer T-Lymphozyten nur durch *steady-state migratory DC* in Lymphknoten erfolgt. Allerdings führen diese Autoren dies nicht auf die Kostimulation, sondern auf die von *steady-state migratory DC* gebildete Retinsäure zurück (Vitali C et al., 2012).

Funktionell reife Dendritische Zellen sind immunogen und verfügen über die Fähigkeit, naive T-Lymphozyten zur Proliferation zu stimulieren (Reis e Sousa C, 2006). Auf diese Weise entstehen aus naiven T-Lymphozyten verschiedene Effektor-T-Lymphozyten (Reis e Sousa C, 2006). Die Aktivierung unreifer Dendritischer Zellen zur funktionellen Reifung erfordert einen Reifungsstimulus. Verschiedene, für inflammatorische Situationen charakteristische Signale stellen Reifungsstimuli dar. Besonders wichtig ist die Aktivierung von Mustererkennungsrezeptoren (z. B. Toll-ähnlichen Rezeptoren) auf Dendritischen Zellen durch Moleküle, die sog. pathogen- bzw. schadensassoziierte molekulare Muster (engl. *pathogen/damage associated molecular patterns*, Abkürzungen: PAMPs/DAMPS) aufweisen (Maldonado RH, von Andrian UH, 2010; Zelenay S, Reis e Sousa C, 2013). Solche molekularen Muster sind charakteristisch für Bestandteile von Krankheitserregern (z. B. Lipopolysaccharide aus Bakterienmembranen) bzw. für Stoffe, die von geschädigten Zellen freigesetzt werden (z. B. das Chromatin-Protein HMGB1). Weitere Reifungsstimuli sind inflammatorische Zytokine (Reis e Sousa C, 2006; Maldonado RA, von Andrian UH, 2010; Lutz MB, 2013) und die Aktivierung von CD40 durch CD40L (Reis e Sousa C, 2006; Cools N et al., 2007; Dudziak D et al., 2007; Elgueta R et al., 2009; Ma DY et Clark EA, 2009; Maldonado RA, von Andrian UH, 2010). Die *In-vitro*-Kultur stellt ebenfalls einen Reifungsstimulus dar, möglicherweise vermittelt durch GM-CSF, das bei der Zellisolierung freigesetzt wird (Inaba K et al., 1994; De Smedt et al., 2001). Die Rolle der Mustererkennungsrezeptoren bei der Reifung Dendritischer Zellen macht deren zentrale Position bei der Immunabwehr deutlich: Dendritische Zellen werden durch die zum angeborenen Immunsystem zählenden Mustererkennungsrezeptoren aktiviert und lösen daraufhin eine spezifische Immunantwort aus – sie

bilden somit eine entscheidende Verbindung zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem (Gordon JR et al., 2014).

Funktionell reife Dendritische Zellen haben die Endozytose und anschließende Prozessierung von Antigenen eingestellt (Wilson NS et al., 2004; Maldonado RH, von Andrian UH, 2010). Sie präsentieren diejenigen Antigene, die sie zum Zeitpunkt des Reifungsstimulus aufgenommen haben. Man spricht daher von antigenischem Gedächtnis (Wilson NS et al., 2004; Miloud T et al., 2010). Bei der Reifung suchen Dendritische Zellen die T-Zell-Zonen der sekundären lymphatischen Organe auf, um dort T-Lymphozyten zu stimulieren (De Smedt T et al., 1996; Steinman RM et al., 1997). Funktionell reife Dendritische Zellen vermitteln durch die Antigenpräsentation das 1. Signal und durch die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 das 2. Signal des Drei-Signale-Modells. Darüber hinaus vermitteln sie durch proinflammatorische Zytokine wie IL-12, IL-6, TNF- α oder Typ 1-Interferone das für ihre immunstimulatorische Funktion notwendige 3. Signal (Lutz MB, Schuler G, 2002; Reis e Sousa C, 2006; Cools N et al., 2007). Die vollständige Reifung zu immunogenen Dendritischen Zellen geht mit einer massiven Aktivierung von bis zu 5 000 Genen einher (Lutz MB, 2013).

Die Reifung Dendritischer Zellen ist durch ein hohes Maß an Plastizität und Feinregulation gekennzeichnet. So entwickeln sich z. B. durch unterschiedliche Stimuli verschiedene Typen halbreifer Dendritischer Zellen, die sich durch die von ihnen produzierten Zytokine unterscheiden und die teilweise gleichzeitig Toleranz und Immunität vermittelnde Funktionen ausüben (Kleindienst P et al., 2005; Lutz MB, 2012). Ebenso können *in vitro* unter Verwendung verschiedener Kultivierungsprotokolle unterschiedliche Typen tolerogener Dendritischer Zellen gezüchtet werden, die jeweils unterschiedliche, unreife oder reife Phänotypen aufweisen und ihre tolerogene Funktion über unterschiedliche Mechanismen vermitteln (Naranjo-Gómez M et al., 2011; Moreau A et al., 2012(2); Švajger U, Rožman P, 2014).

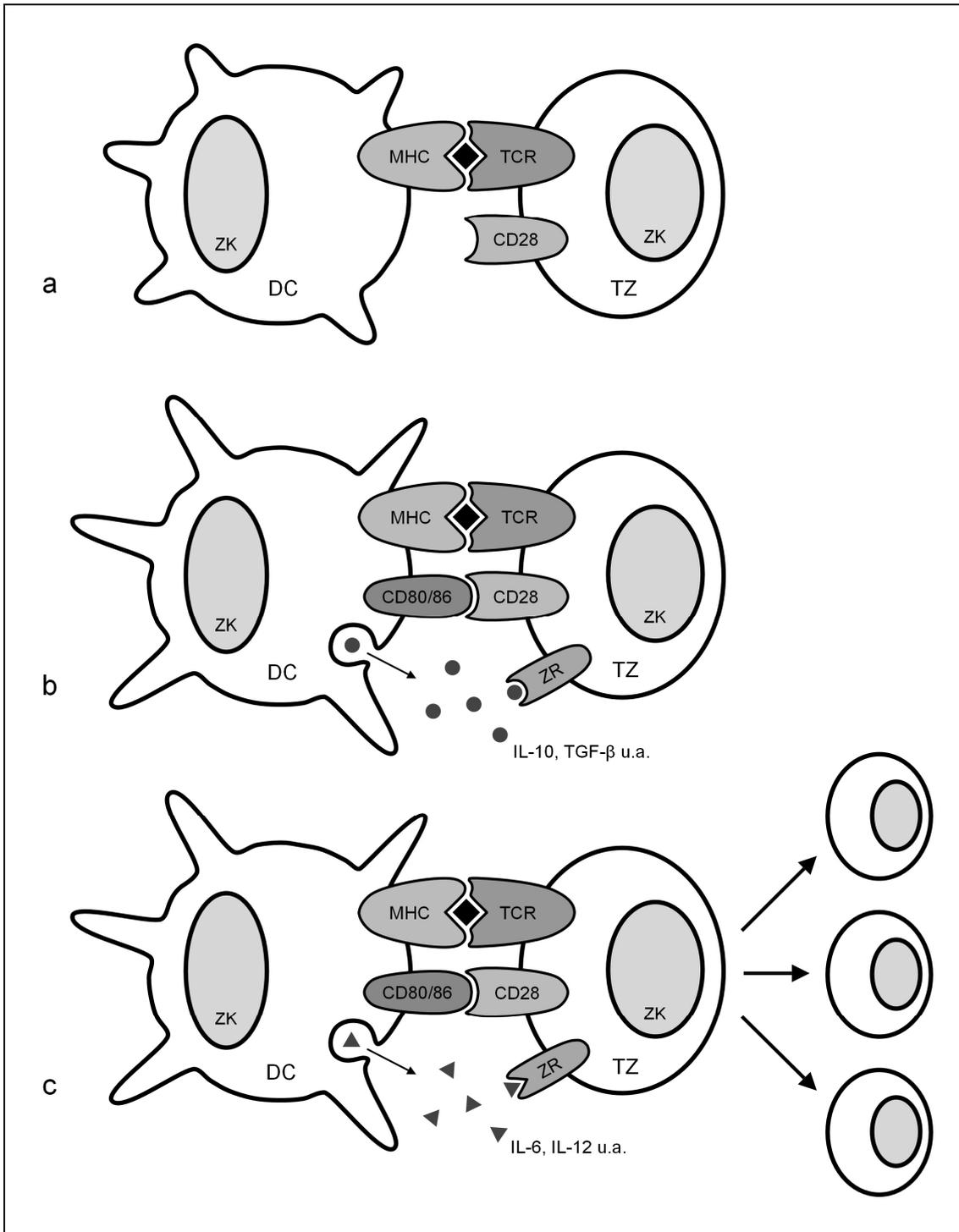


Abb. 6.2: Interaktion zwischen Dendritischen Zellen unterschiedlicher Reifungsstadien und naiven T-Lymphozyten. a: Eine phänotypisch unreife Dendritische Zelle vermittelt dem T-Lymphozyten durch Antigenpräsentation auf MHC-Klasse-I/II Signal 1, aber durch fehlende Expression von CD80 bzw. CD86 kein Signal 2. b: Eine halb reife Dendritische Zelle vermittelt die Signale 1 und 2, produziert aber gleichzeitig immuninhibitorische Zytokine. c: Eine vollständig reife Dendritische Zelle vermittelt neben den Signalen 1 und 2 durch die Produktion proinflammatorischer Zytokine das für die Aktivierung des naiven T-Lymphozyten notwendige stimulatorische Signal 3. Abkürzungen: DC: Dendritische Zelle; TZ: T-Lymphozyt; ZK: Zellkern; TCR: T-Zell-Rezeptor; ZR: Zytokinrezeptor.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Reifungsstadium Dendritischer Zellen unmittelbar nach der Zellgewinnung sowie nach 24- bzw. 48-stündiger Kultivierung *in vitro* untersucht. Hierbei zeigten die frisch isolierten Dendritischen Zellen einen unreifen Phänotyp mit starker Expression von MHC-Klasse-II und geringer bis fehlender Expression von CD80 und CD86 (Tab. 4.1 und 4.2). Die Kultivierung *in vitro* führte zur Reifung der Dendritischen Zellen. Die Expression von MHC-Klasse-II, CD80 und CD86 nahm um den Faktor 2 bis 4 zu (Tab. 4.1 und 4.2). Demgegenüber ist in der Literatur eine Zunahme der Expression von MHC-Klasse-II um den Faktor 4 bis 5 und der Expression von CD86 um den Faktor 100 durch *In-vitro*-Kultivierung beschrieben (Wilson NS et al., 2003; Wilson NS et al., 2004). Andererseits beobachteten Vremec und Shortman eine nur geringe Zunahme von CD86 (bei gleichzeitig starker Zunahme der Expression von CD80) in der *In-vitro*-Kultur (Vremec D, Shortman K, 1997). Desweiteren beschreiben Inaba und Kollegen eine stärkere Expression von CD86 als von MHC-Klasse-II-Molekülen auf reifen konventionellen Dendritischen Zellen (Inaba K et al., 1994), während in der vorliegenden Arbeit die Expression von MHC-Klasse-II die von CD86 auf reifen Dendritischen Zellen bei weitem übertraf. Eine Erklärung für diese Diskrepanzen könnte die von Inaba und Kollegen geäußerte Vermutung sein, wonach die *In-vitro*-Reifung Dendritischer Zellen durch GM-CSF ausgelöst wird, das bei der Gewebszerkleinerung freigesetzt wird (Inaba K et al., 1994). Die geringeren Expressionen der Marker MHC-Klasse-II, CD80 und CD86 auf den in dieser Arbeit untersuchten konventionellen Dendritischen Zellen erklären sich vermutlich aus der Tatsache, dass die Splenozyten aus den mechanisch zerkleinerten Milzen sehr schnell von dem im Zellsieb zurückgebliebenen Gewebsstroma getrennt wurden. In den Arbeitsprotokollen anderer Autoren erfolgt diese Trennung weniger schnell, insbesondere, wenn zusätzlich zur mechanischen Zerkleinerung ein Gewebsverdau durch Kollagenase vorgenommen wird. Denkbar ist daher, dass bei den in dieser Arbeit vorgenommenen Zellisolierungen wenig GM-CSF freigesetzt wurde bzw. in das Zellkulturmedium gelangte. Dies könnte die geringeren Expressionssteigerungen von MHC-Klasse-II, CD80 und CD86 erklären.

CD80 und CD86 werden von reifen Dendritischen Zellen nicht gleich stark exprimiert. Nach Inaba und Kollegen beträgt die Expressionsstärke von CD80 auf einer reifen Dendritischen Zelle weniger als ein Zehntel der Expressionsstärke von CD86 (Inaba K et al., 1994). Auch in dieser Arbeit zeigte sich durchwegs eine schwächere Expression von CD80 als von CD86; dabei übertraf die Expression von CD86 die von CD80 maximal um den Faktor 2 (Tab. 4.1, 2, 4).

Das Reifungsstadium Dendritischer Zellen der Mauslinie NMRI^{nude} und der anderen untersuchten Mauslinien unterschied sich deutlich nach 24-stündiger *In-vitro*-Kultur. Die Expression der Reifungsmarker MHC-Klasse-II, CD80, CD86 und CD40 war bei Dendritischen Zellen der Mauslinie NMRI^{nude} deutlich geringer (Kap. 4.2). Die geringere Reifung könnte durch das Fehlen von T-Lymphozyten bei diesen Mäusen bedingt sein. Die für das „nude“-Allel homozygoten Mäuse besitzen keinen Thymus (Pantelouris EM, 1968) und sind daher T-Zell-defizient; allerdings entwickeln sie mit zunehmendem Alter extrathymisch entstandene, oligoklonale T-Lymphozyten mit reduzierter Proliferationskapazität (MacDonald HR et al., 1986; MacDonald HR et al., 1987; Lawetzky A, Hünig T, 1988). In Lymphknoten der in dieser Arbeit untersuchten Mäusen der Linie NMRI^{nude} wurden mit dem gegen die Beta-Kette des T-Zellrezeptors gerichteten Antikörper H57-597 T-Lymphozyten nachgewiesen; ihr Anteil war jedoch deutlich geringer als in Lymphknoten der Mauslinien C57Bl/6 sowie Balb/c (Abb. 10.13-16, Tab. 10.2). Die Dendritischen Zellen dieser Tiere konnten somit sowohl *in vivo* als auch während der Kultivierung *in vitro* nicht in physiologischem Ausmaß mit T-Lymphozyten interagieren. Die Bindung des von T-Lymphozyten exprimierten CD40L an CD40 stellt einen wichtigen Reifungsstimulus dar (s.o.); die Bindung von CD40 ist sogar als alleiniger Reifungsstimulus ausreichend für die vollständige Reifung einer Dendritischen Zelle (Dudziak D et al., 2007). Alternativ könnte die geringere Reifung Dendritischer Zellen der Mauslinie NMRI^{nude} durch eine verminderte Freisetzung von GM-CSF bei der Zellgewinnung erklärt werden. Grabbe und Kollegen beschreiben eine geringere GM-CSF-Produktion durch Epidermiszellen von Nacktmäusen, wobei aber unklar bleibt, ob sich diese Beobachtung

auf Milzgewebe übertragen lässt (Grabbe S et al., 1993). In derselben Arbeit wird eine signifikant reduzierte Fähigkeit von Langerhans-Zellen aus Nacktmäusen zur Antigenpräsentation beschrieben. Die Fähigkeit zur Antigenpräsentation konnte jedoch durch Infusion von GM-CSF oder TNF- α oder durch intraperitoneale Implantation von Thymusgewebe normalisiert werden (Grabbe S et al., 1993). Leider wurde in der betreffenden Arbeit das Reifungsstadium der untersuchten Langerhans-Zellen nicht angegeben. Interessanterweise war eine ineffektive Antigenpräsentation bei Langerhans-Zellen von T-Zelldefizienten SCID-Mäusen nicht zu beobachten (Grabbe S et al., 1993), sodass das alleinige Fehlen von T-Lymphozyten nicht für die verringerte Fähigkeit der Langerhans-Zellen zur Antigenpräsentation verantwortlich zu sein scheint. Aus Knochenmarkstammzellen von Nacktmäusen *in vitro* gezüchtete Dendritische Zellen unterscheiden sich phänotypisch und funktionell nicht von *in vitro* gezüchteten Dendritischen Zellen des Wildtyps (Shurin GV et al., 2004). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete reduzierte Reifung Dendritischer Zellen dürfte somit nicht auf intrinsischen Eigenschaften Dendritischer Zellen von Nacktmäusen beruhen, sondern auf Umgebungseinflüsse zurückzuführen sein, d.h. eventuell auf eine unzureichende Interaktion mit T-Lymphozyten oder aber auf ein abweichendes Zytokinprofil oder sonstige, noch zu identifizierende Faktoren.

Zusätzlich zur phänotypischen Untersuchung wurden in der vorliegenden Arbeit phänotypisch reife Dendritische Zellen der Mauslinie C57Bl/6 nach 24-stündiger *In-vitro*-Kultivierung in der gemischten Leukozytenkultur funktionell charakterisiert. Sie waren in der Lage, naive allogene T-Lymphozyten der Mauslinie Balb/c zur Proliferation zu stimulieren und erwiesen sich somit als immunogen und demnach auch funktionell reif (Kap. 4.3).

Klinische Relevanz

Die Kenntnis der verschiedenen Reifungsstadien Dendritischer Zellen ist essentiell für die Entwicklung von Immuntherapien gegen unterschiedliche Krankheiten. In der Krebstherapie werden seit einigen Jahren im Rahmen

zahlreicher Studien Vakzinierungsstrategien gegen verschiedene Tumorentitäten getestet, die auf der immunogenen Funktion reifer Dendritischer Zellen basieren (Palucka K, Banchereau J, 2013). Ebenso besteht die Hoffnung, den immunregulatorischen Effekt funktionell unreifer Dendritischer Zellen klinisch nutzbar zu machen, insbesondere bei der Therapie von Autoimmunerkrankungen und in der Transplantationsmedizin. In einer ersten Phase-I-Studie wurden Dendritische Zellen bereits an Patienten mit Typ-I-Diabetes getestet (Giannoukakis N et al., 2011). Zur Bekämpfung der Transplantatabstoßung ist im Rahmen der europäischen ONE Study erstmals der Einsatz tolerogener Dendritischer Zellen bei Empfängern allogener Nierentransplantate geplant (Moreau A et al., 2012(1); Riquelme P et al., 2012; Wood KJ et al., 2012; Vassalli G, 2013).

Tolerogene Dendritische Zellen können *in vitro* aus kultivierten Knochenmarkstammzellen von Nagern bzw. Monozyten aus menschlichem Blut gezüchtet werden (Beriou G et al., 2012; Moreau A et al., 2012(1)). Die *In-vitro*-Differenzierung Dendritischer Zellen wird durch Zugabe von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Vitamin D₃, dem Neuropeptid VIP und/oder immunsuppressiven Pharmaka beeinflusst (Kornete M, Piccirillo CA, 2012; Moreau A et al., 2012(1); Moreau A et al., 2012(2); Ezzelarab MB et al., 2013; Vassalli G, 2013; Gordon JR et al., 2014). Je nach verwendetem Arbeitsprotokoll unterscheiden sich *in vitro* gezüchtete, tolerogene Dendritische Zellen deutlich in ihrem Reifungsstadium. Sie weisen teils einen unreifen, teils einen reifen Phänotyp auf und vermitteln ihre tolerogenen Effekte über unterschiedliche Mechanismen (Naranjo-Gómez M et al., 2011; Moreau A et al., 2012(2); Švajger U, Rožman P, 2014). Tiurbe und Kollegen zeigten, dass *in vitro* gezüchtete tolerogene Dendritische Zellen sich auch bei praktisch identischem Phänotyp in Abhängigkeit von den bei ihrer Kultivierung eingesetzten Zytokinen funktionell unterscheiden können, nämlich in ihrer Fähigkeit, T-Lymphozyten mit regulatorischen Eigenschaften zu induzieren (Tiurbe G et al., 2009). Eine für den Einsatz bei Transplantatempfängern besonders wichtige Eigenschaft *in vitro* gezüchteter Dendritischer Zellen ist die Reifungsresistenz, was bedeutet,

dass die Dendritischen Zellen in Gegenwart inflammatorischer Stimuli nicht zu immunogenen Zellen reifen (Naranjo-Gómez M et al., 2011). Dies ist entscheidend, da nach Durchführung einer Organtransplantation im transplantierten Organ selbst sowie im gesamten Organismus des Empfängers ein inflammatorisches Milieu vorherrscht. *In vitro* gezüchtete tolerogene Dendritische Zellen sind bei der Erzeugung immunologischer Toleranz effektiver als physiologisch vorkommende, phänotypisch unreife Dendritische Zellen (Vassalli G, 2013; Švajger U, Rožman P, 2014).

Im Tierexperiment wurde erfolgreich gezeigt, dass durch die Applikation tolerogener Dendritischer Zellen eine spenderspezifische Transplantattoleranz induziert wird (Ezzelarab M, Thomson AW, 2011), die zu einem signifikant verlängerten Überleben allogener Organtransplantate sowohl bei Nagern (Lutz MB et al., 2000), als auch bei Primaten (Ezzelarab MB et al., 2013) führt. Es bleibt zu hoffen, dass im Rahmen der ONE Study die vielversprechenden Ergebnisse zum Einsatz Dendritischer Zellen in tierexperimentellen Transplantationsmodellen auf den Menschen übertragbar sein werden (Moreau A et al., 2012(1); Riquelme P et al., 2012).

6.3 Alloantigenerkennung und Transplantatabstoßung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in gemischten (allogenen) Leukozytenkulturen Dendritische Zellen und T-Lymphozyten von zwei unterschiedlichen Mauslinien *in vitro* inkubiert. Das Aufeinandertreffen von vitalen Zellen verschiedener Individuen kommt *in vivo* physiologisch nicht vor. Dagegen führt eine Transplantation zwangsläufig zu dieser Konstellation. Durch Transplantation von Zellen oder Geweben genetisch nicht identischer Individuen derselben Spezies wird eine allogene Immunantwort induziert, die ohne den Einsatz immunsuppressiver Medikamente zur raschen Zerstörung des transplantierten Organs führt, was als Abstoßung bezeichnet wird (Otto Ch, Ulrichs K, 2004; Lakkis FG, Lechler RI, 2013).

Ausgelöst wird eine allogene Immunantwort durch die Alloantigenerkennung. Der Begriff Alloantigenerkennung beschreibt das immunologische Erkennen von Alloantigenen durch T-Lymphozyten des Transplantatempfängers mit nachfolgender Aktivierung (Otto Ch, Ulrichs K, 2004). Alloantigene sind solche Antigene, die nicht bei allen Individuen einer Spezies vorkommen. Kommt ein Individuum mit einem ihm fehlenden Alloantigen in Kontakt, so kann dieses bei ihm eine Immunantwort auslösen.

Zentrale Bedeutung für das Überleben eines Transplantats haben die Alloantigene des major histocompatibility complex (MHC) (Otto Ch, Ulrichs K, 2004; Ayala García MA et al., 2012; Lakkis FG, Lechler RI, 2013), die in drei Klassen eingeteilt werden (Ayala García MA et al., 2012). Als antigen-präsentierende, auf der Zelloberfläche exprimierte Proteine verfügen MHC-Klasse-I- und -II-Moleküle über eine entscheidende Funktion bei der Generierung von Immunantworten (Kap. 1.1). Die Gruppe der mH-Antigene (*minor histocompatibility antigens*; auch als Nebenhistokompatibilitätsantigene bezeichnet), die zahlreiche intrazelluläre Proteine unterschiedlichster Funktion umfasst, ist ebenfalls wichtig für die Auslösung allogener Immunantworten; die Immunogenität der mH-Antigene ist jedoch deutlich geringer als die der MHC-Antigene (Lakkis FG, Lechler RI, 2013). Das bekannteste mH-Antigen ist das auf dem Y-Chromosom befindliche H-Y-Antigen (Simpson E et al., 1997).

Man unterscheidet bei der Alloantigenerkennung drei verschiedene Konstellationen der Interaktion: den direkten, den indirekten und den semidirekten Weg (Turnquist HR, Thomson AW, 2008; Ezzelarab M, Thomson AW, 2011; Moreau A et al., 2012(1); Ali JM et al., 2013; Lakkis FG, Lechler RI, 2013). Analog spricht man von direkter, indirekter und semidirekter Alloantigenerkennung.

Bei der direkten Alloantigenerkennung (Abb. 6.3a) interagiert der T-Zell-Rezeptor eines körpereigenen T-Lymphozyten mit einem allogenen MHC-Molekül auf einer transplantierten Zelle und wird dadurch aktiviert (Otto Ch,

Ulrichs K, 2004; Moreau A et al., 2012(1); Ali JM et al., 2013; Lakkis FG, Lechler RI, 2013). Das allogene MHC-Molekül präsentiert dabei ein meist körpereigenes Peptid (D'Orsogna LJ et al., 2012; Lakkis FG, Lechler RI, 2013). Die direkte Alloreaktivität eines T-Zell-Rezeptors wird durch dessen Kreuzreaktivität (auch als Degeneration bezeichnet) bedingt (Lakkis FG, Lechler RI, 2013). Teilweise werden die Begriffe Kreuzreaktivität, Degeneration und Alloreaktivität sogar als Synonyme verwendet (Yin Y, Mariuzza RA, 2009). Kreuzreaktivität bezeichnet die Fähigkeit eines T-Zell-Rezeptors, mehrere Kombinationen aus MHC und Peptid zu erkennen (D'Orsogna LJ et al., 2012). Auf molekularer Ebene wurden verschiedene, häufig zusammenwirkende Mechanismen beschrieben, die der Kreuzreaktivität zugrundeliegen (Yin Y, Mariuzza RA, 2009). Direkt alloreaktive T-Lymphozyten werden im Thymus nicht negativ selektiert (D'Orsogna LJ et al., 2012) und sind daher sehr häufig. Ihr Anteil wird mit 1 bis 10 Prozent, von Yates sogar mit bis zu 24 Prozent aller (peripheren) T-Lymphozyten eines Individuums angegeben (Mendiratta SK et al., 1999; D'Orsogna LJ et al., 2012; Lakkis FG, Lechler RI, 2013; Yates AJ, 2014).

Bei der indirekten Alloantigenerkennung (Abb. 6.3b) wird ein Alloantigen von einer körpereigenen antigenpräsentierenden Zelle auf einem körpereigenen MHC-Molekül präsentiert (Otto Ch, Ulrichs K, 2004; Turnquist HR, Thomson AW, 2008; Moreau A et al., 2012(1); Lakkis FG, Lechler RI, 2013). Ein indirekt alloreaktiver T-Lymphozyt erkennt die Kombination aus Selbst-MHC und Allopeptid auf der antigenpräsentierenden Zelle und wird zur Auslösung einer Immunantwort gegen das allogene Peptidantigen stimuliert (Ali JM et al., 2013; Lakkis FG, Lechler RI, 2013). Indirekt alloreaktive T-Lymphozyten sind wesentlich seltener als direkt alloreaktive; ihr Anteil am T-Lymphozytenpool eines Individuums liegt bei weniger als 0,1 Prozent (Lakkis FG, Lechler RI, 2013). Antigenpeptide aus prozessierten Allo-MHC-Molekülen sind bei der Erzeugung indirekter Alloimmunität dominierend; jedoch können auch mH-Antigene auf dem indirekten Weg eine allogene Immunantwort auslösen (Benichou G et al., 1999; Ali JM et al., 2013).

Bei der semidirekten Alloantigenerkennung (Abb. 6.3c) gelangt allogenes MHC unprozessiert, d.h. als ganzes Molekül, auf die Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen des Empfängers (Turnquist HR, Thomson AW, 2008; Ezzelarab M, Thomson AW, 2011; Moreau A et al., 2012(1); Ali JM et al., 2013). Der Austausch der MHC-Moleküle zwischen Spender- und Empfängerzellen wird u.a. durch Exosomen vermittelt (Smyth LA et al., 2007; Montecalvo A et al., 2008; Lakkis FG, Lechler RI, 2013). Auf diese Weise kann allogenes MHC auf Zellen des Empfängers zur Aktivierung derselben T-Lymphozyten führen, die auch beim Vorgang der direkten Alloantigenerkennung durch allogenes MHC auf der Oberfläche von Spenderzellen aktiviert würden.

Die Möglichkeit, immunologische Prozesse experimentell *in vitro* nachvollziehen zu können, hat maßgeblich zum heutigen Verständnis von Alloantigenerkennung und Transplantatabstoßung beigetragen. So findet bei der allogenen gemischten Leukozytenkultur der Vorgang der direkten Alloantigenerkennung *in vitro* statt (Côté I et al., 2001; Game DS, Lechler RI, 2002). Dabei stammen die verwendeten Dendritischen Zellen und T-Lymphozyten jeweils von Tieren genetisch unterschiedlicher Mauslinien. Im Gegensatz zur allogenen gemischten Leukozytenkultur stammen bei der syngenen gemischten Leukozytenkultur Dendritische Zellen und T-Lymphozyten von Tieren derselben Inzuchtlinie. Aufgrund der hohen Frequenz direkt alloreaktiver T-Lymphozyten wird bei der allogenen gemischten Leukozytenkultur eine wesentlich stärkere Aktivierung und Proliferation von T-Lymphozyten erreicht als bei der syngenen gemischten Leukozytenkultur. Inaba und Kollegen erzielten bei der Verwendung allogener Dendritischer Zellen eine etwa um den Faktor 5 höhere T-Lymphozyten-Proliferation als bei der Verwendung der gleichen Anzahl syngener Dendritischer Zellen (Inaba K et al., 1994). Nach Nussenzweig und Steinman stimulieren allogene Dendritische Zellen die gemischte Leukozytenkultur sogar um den Faktor 10 besser als syngene Dendritische Zellen (Nussenzweig MC, Steinman RM, 1980).

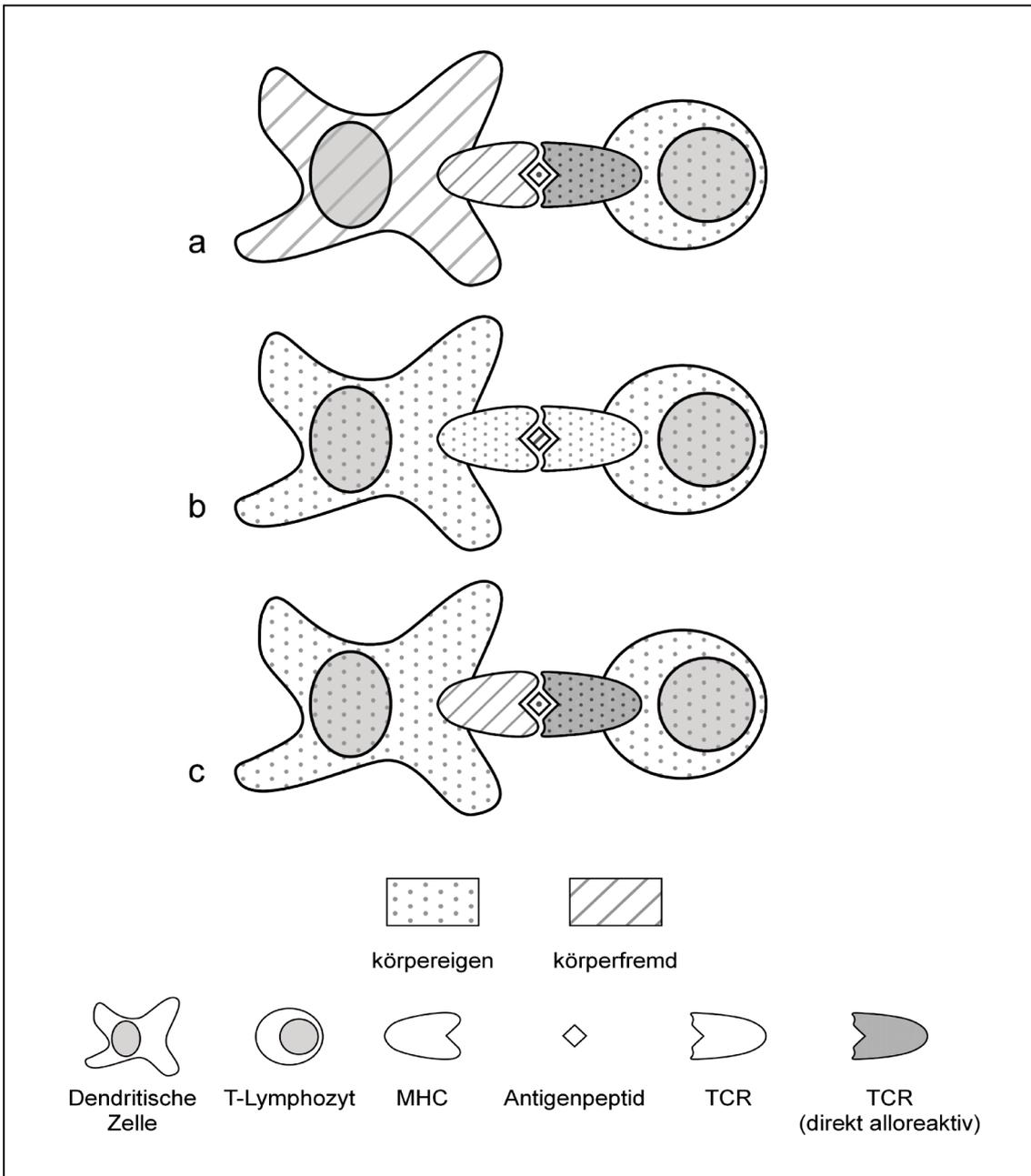


Abb. 6.3: Mögliche Interaktionen zwischen Dendritischen Zellen und T-Lymphozyten bei der Alloantigenerkennung. a: direkte Alloantigenerkennung: Eine Dendritische Zelle des Spenders trägt auf ihrer Oberfläche allogenem MHC mit daran gebundenem, körpereigenem Antigenpeptid. Ein T-Lymphozyt mit direkt alloreaktivem T-Zell-Rezeptor erkennt diese Kombination von allogenem MHC und körpereigenem Peptid. b: indirekte Alloantigenerkennung: Eine Dendritische Zelle des Empfängers präsentiert allogenem Antigenpeptid auf körpereigenem MHC. Ein indirekt alloreaktiver T-Lymphozyt bindet mit seinem T-Zell-Rezeptor an das körpereigene MHC-Molekül und erkennt darauf das allogene Antigenpeptid. c: semidirekte Alloantigenerkennung: Eine Dendritische Zelle des Empfängers trägt auf ihrer Oberfläche allogenem MHC mit daran gebundenem, körpereigenem Antigenpeptid. Dieser MHC-Peptid-Komplex wird von einem direkt alloreaktiven T-Lymphozyten erkannt.

7 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden Dendritische Zellen aus Milzen von Mäusen unterschiedlicher Linien isoliert und charakterisiert. Dabei zeigten sich phänotypische Unterschiede zwischen Dendritischen Zellen der thymuslosen Mauslinie NMRI^{nude} und Dendritischen Zellen der anderen Mauslinien. NMRI^{nude}-Dendritische Zellen wiesen nach 24-stündiger Kultivierung *in vitro* ein weniger stark ausgeprägtes Reifungsstadium auf und exprimierten neben den Reifungsmarkern auch andere Oberflächenmarker deutlich schwächer, beispielsweise CD11c um mehr als die Hälfte (Kap. 4.2, Abb.10.1-12). Die Ursache dieser Unterschiede bleibt letztlich spekulativ (Kap. 6.2), zumal die wissenschaftliche Literatur zu Dendritischen Zellen aus Nacktmäusen bislang lückenhaft ist. Die in dieser Arbeit etablierte Methode zur Isolierung Dendritischer Zellen ist auch geeignet, Dendritische Zellen aus Milzen der Mauslinie NMRI^{nude} für systematische Analysen zu isolieren. Die in weiteren Arbeiten durchzuführenden Analysen sollten über die in dieser Arbeit untersuchten Oberflächenmarker hinaus weitere Parameter erfassen. Insbesondere sollten die von den Zellen produzierten Zytokine untersucht werden, um das von ihnen vermittelte Signal 3 im Konzept der drei Signale (Kap. 6.2) bestimmen zu können. Sollten sich die in dieser Arbeit beobachteten Abweichungen zum Phänotyp Dendritischer Zellen der Mauslinie NMRI^{nude} bestätigen, sollten ebenfalls Dendritische Zellen anderer Nacktmauslinien untersucht werden, da zwischen den verschiedenen Nacktmauslinien deutliche immunologische Unterschiede vermutet werden (Lawetzky A, Hünig T, 1988).

8 Zusammenfassung

Dendritische Zellen stellen eine Gruppe morphologisch, phänotypisch und funktionell einzigartiger Leukozyten dar, die eine zentrale Rolle bei der Regulation des Immunsystems spielen. Als die mit Abstand effektivsten antigen-präsentierenden Zellen besteht ihre Funktion sowohl in der Auslösung als auch in der Verhinderung spezifischer Immunantworten, wobei diese Fähigkeiten von ihrem jeweiligen Reifungsstadium abhängig sind. In der vorliegenden Arbeit wurden Dendritische Zellen aus Milzen von Mäusen verschiedener Linien mittels Dichtegradientenzentrifugation unter Verwendung von OptiPrep (Iodixanol) isoliert und phänotypisch sowie funktionell charakterisiert. Die gewonnenen Zellsuspensionen bestanden durchschnittlich zu 41 Prozent aus residenten konventionellen Dendritischen Zellen. Die isolierten Dendritischen Zellen waren unabhängig von der untersuchten Mauslinie bis zu 26 Prozent CD8 α -positiv und bis zu 81 Prozent CD8 α -negativ. Dendritische Zellen wiesen unmittelbar nach der Zellgewinnung einen unreifen Phänotyp auf mit starker Expression von MHC-Klasse-II, aber schwacher bis fehlender Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40. Eine 24- bzw. 48-stündige Kultivierung *in vitro* führte zur Reifung der Dendritischen Zellen mit Zunahme der Expression von MHC-Klasse-II, CD80, CD86 und CD40 um den Faktor 2 bis 4. Diese Zellen wiesen zudem immunstimulatorische Eigenschaften in der gemischten (allogenen) Leukozytenkultur auf. Dendritische Zellen der Mauslinie NMRI^{nude} exprimierten nach der *In-vitro*-Kultur ebenfalls zahlreiche Oberflächenmarker, darunter die Reifungsmarker. Die Stärke der Expression war jedoch um bis zu 50 Prozent schwächer als bei Dendritischen Zellen der anderen Mauslinien. Dieser Befund weist auf potentielle Unterschiede zwischen Dendritischen Zellen der thymuslosen Mauslinie NMRI^{nude} und Dendritischen Zellen von Wildtyp-Mäusen hin. Es wurde gezeigt, dass OptiPrep zur Isolierung Dendritischer Zellen aus Mäusemilzen bei geringem Arbeitsaufwand und niedrigen Kosten verwendet werden kann. Die isolierten Dendritischen Zellen weisen die zu erwartenden phänotypischen und funktionellen Eigenschaften auf und scheinen somit für den Einsatz in weiterführenden Experimenten geeignet.

9 Literaturverzeichnis

- Ali JM, Bolton EM, Bradley JA, Pettigrew GJ. **Allorecognition pathways in transplant rejection and tolerance.** *Transplantation.* 2013; **96**(8): 681-8
- Anjuère F, Martín P, Ferrero I, Fraga ML, del Hoyo MG, Wright N, Avarán C. **Definition of Dendritic Cell Subpopulations Present in Spleen, Peyer's Patches, Lymph Nodes, and Skin of the Mouse.** *Blood.* 1999; **93**(2): 590-598
- Ayala García MA, González Yebra B, López Flores AL, Guaní Guerra E. **The major histocompatibility complex in transplantation.** *J Transplant.* 2012; **2012**: 842141
- Banchereau J, Steinman RM. **Dendritic cells and the control of immunity.** *Nature.* 1998; **392**(6673): 245-52
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu, Y-J, Pulendran B, Palucka K. **Immunobiology of Dendritic Cells.** *Annu Rev Immunol.* 2000; **18**: 767-811
- Bar-On L, Birnberg T, Lewis KL, Edelson BT, Bruder D, Hildner K, Buer J, Murphy KM, Reizis B, Jung S. **CX3CR1+ CD8alpha+ dendritic cells are a steady-state population related to plasmacytoid dendritic cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; **107**(33): 14745-50
- Bar-On L, Jung S. **Defining dendritic cells by conditional and constitutive cell ablation.** *Immunol Rev.* 2010; **234**(1): 76-89
- Benichou G, Valujskikh A, Heeger PS. **Contribution of Direct and Indirect T Cell Alloreactivity During Allograft Rejection in Mice.** *J Immunol.* 1999; **162**(1): 352-58
- Beriou G, Moreau A, Cuturi MC. **Tolerogenic dendritic cells: applications for solid organ transplantation.** *Curr Opin Organ Transplant.* 2012; **17**(1): 42-7.
- Chung Y, Chang J-H, Kim B-S, Lee J-M, Kim H-J, Kang C-Y. **Anatomic location defines antigen presentation by dendritic cells to T cells in response to intravenous soluble antigens.** *Eur J Immunol.* 2007; **37**(6): 1453-62

- Colonna M, Trinchieri G, Liu Y-J. **Plasmacytoid dendritic cells in immunity.** *Nat Immunol.* 2004; **5**(12): 1219-26
- Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, Berneman ZN. **Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells.** *J Leukoc Biol.* 2007; **82**(6): 1365-74
- Côté I, Rogers NJ, Lechler RI. **Allorecognition.** *Transfus Clin Biol.* 2001; **8**(3): 318-23
- Crowley MT, Inaba K, Witmer-Pack MD, Gezelter S, Steinman RM. **Use of the fluorescence activated cell sorter to enrich dendritic cells from mouse spleen.** *J Immunol Methods.* 1990; **133**(1): 55-66
- De Smedt T, Butz E, Smith J, Maldonado-López R, Pajak B, Moser M, Maliszewski C. **CD8 α ⁻ and CD8 α ⁺ subclasses of dendritic cells undergo phenotypic and functional maturation *in vitro* and *in vivo*.** *J Leukoc Biol.* 2001; **69**(6): 951-58
- De Smedt T, Pajak B, Muraille E, Lespagnard L, Heinen E, De Baetselier P, Urbain J, Leo O, Moser M. **Regulation of Dendritic Cell Numbers and Maturation by Lipopolysaccharide In Vivo.** *J Exp Med.* 1996; **184**(4): 1413-24
- den Haan JMM, Bevan MJ. **Constitutive versus activation-dependent cross-presentation of immune complexes by CD8(+) and CD8(-) dendritic cells in vivo.** *J Exp Med.* 2002; **196**(6): 817-27
- den Haan JMM, Lehar SM, Bevan MJ. **CD8⁺ but Not CD8⁻ Dendritic Cells Cross-prime Cytotoxic T Cells In Vivo.** *J Exp Med.* 2000; **192**(12): 1685-96
- D'Orsogna LJ, Roelen DL, Doxiadis II, Claas FH. **TCR cross-reactivity and allorecognition: new insights into the immunogenetics of allorecognition.** *Immunogenetics.* 2012; **64**(2): 77-85
- Dudziak D, Kamphorst AO, Heidkamp GF, Buchholz VR, Trumpheller C, Yamazaki S, Cheong C, Liu K, Lee HW, Park CG, Steinman RM, Nussenzweig MC. **Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo.** *Science.* 2007; **315**(5808): 107-11

- Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ. **Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system.** *Immunol Rev.* 2009; **229**(1): 152-72
- Ezzelarab M, Thomson AW. **Tolerogenic dendritic cells and their role in transplantation.** *Semin Immunol.* 2011; **23**(4): 252-63
- Ezzelarab MB, Zahorchak AF, Lu L, Morelli AE, Chalasani G, Demetris AJ, Lakkis FG, Wijkstrom M, Murase N, Humar A, Shapiro R, Cooper DK, Thomson AW. **Regulatory dendritic cell infusion prolongs kidney allograft survival in nonhuman primates.** *Am J Transplant.* 2013; **13**(8): 1989-2005
- Gad M, Kristensen NN, Kury E, Claesson MH. **Characterization of T-regulatory cells, induced by immature dendritic cells, which inhibit enteroantigen-reactive colitis-inducing T-cell responses *in vitro* and *in vivo*.** *Immunology.* 2004; **113**(4): 499-508
- Game DS, Lechler RI. **Pathways of allorecognition: implications for transplantation tolerance.** *Transpl Immunol.* 2002; **10**(2-3): 101-08
- Giannoukakis N, Phillips B, Finegold D, Harnaha J, Trucco M. **Phase I (safety) study of autologous tolerogenic dendritic cells in type 1 diabetic patients.** *Diabetes Care.* 2011; **34**(9): 2026-32
- Gordon JR, Ma Y, Churchman L, Gordon SA, Dawicki W. **Regulatory Dendritic Cells for Immunotherapy in Immunologic Diseases.** *Front Immunol.* 2014; **5**: 7
- Grabbe S, Gallo RL, Lindgren A, Granstein RD. **Deficient antigen presentation by Langerhans cells from athymic (nu/nu) mice. Restoration with thymic transplantation or administration of cytokines.** *J Immunol.* 1993; **151**(7): 3430-9
- Green J, Jotte R. **Interactions Between T Helper Cells and Dendritic Cells During the Rat Mixed Lymphocyte Reaction.** *J Exp Med.* 1985; **162**(5): 1546-60
- Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. **The B7 Family Revisited.** *Annu Rev Immunol.* 2005; **23**: 515-48

- Hey YY, O'Neill HC. **Murine spleen contains a diversity of myeloid and dendritic cells distinct in antigen presenting function.** *J Cell Mol Med.* 2012; **16**(11): 2611-9
- Hildner K, Edelson BT, Purtha WE, Diamond M, Matsushita H, Kohyama M, Calderon B, Schraml BU, Unanue ER, Diamond MS, Schreiber RD, Murphy TL, Murphy KM. **Batf3 Deficiency Reveals a Critical Role for CD8 α ⁺ Dendritic Cells in Cytotoxic T Cell Immunity.** *Science.* 2008; **322**(5904): 1097-100
- Inaba K, Witmer-Pack M, Inaba M, Hathcock KS, Sakuta H, Azuma M, Yagita H, Okumura K, Linsley PS, Ikehara S, Muramatsu S, Hodes RJ, Steinman RM. **The Tissue Distribution of the B7-2 Costimulator in Mice: Abundant Expression on Dendritic Cells In Situ and During Maturation In Vitro.** *J Exp Med.* 1994; **180**(5): 1849-60
- Iyoda T, Shimoyama S, Liu K, Omatsu Y, Akiyama Y, Maeda Y, Takahara K, Steinman RM, Inaba K. **The CD8⁺ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo.** *J Exp Med.* 2002; **195**(10): 1289-302
- Jensen PE. **Recent advances in antigen processing and presentation.** *Nat Immunol.* 2007; **8**(10): 1041-8
- Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. **Cross-presentation by dendritic cells.** *Nat Rev Immunol.* 2012; **12**(8): 557-69
- Jonuleit H, Schmitt E, Steinbrink K, Enk AH. **Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells.** *Trends Immunol.* 2001; **22**(7): 394-400
- Kamath AT, Henri S, Battye F, Tough DF, Shortman K. **Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs.** *Blood.* 2002; **100**(5): 1734-41
- Kamath AT, Pooley J, O'Keeffe MA, Vremec D, Zhan Y, Lew AM, D'Amico A, Wu L, Tough DF, Shortman K. **The Development, Maturation, and Turnover Rate of Mouse Spleen Dendritic Cell Populations.** *J Immunol.* 2000; **165**(12): 6762-70

- Kamphorst AO, Guermonprez P, Dudziak D, Nussenzweig MC. **Route of antigen uptake differentially impacts presentation by dendritic cells and activated monocytes.** *J Immunol.* 2010; **185**(6): 3426-35
- Kasahara S, Clark EA. **Dendritic cell-associated lectin 2 (DCAL2) defines a distinct CD8 α - dendritic cell subset.** *J Leukoc Biol.* 2012; **91**(3): 437-48
- Kleindienst P, Wieth C, Lutz MB, Brocker T. **Simultaneous induction of CD4 T cell tolerance and CD8 T cell immunity by semimature dendritic cells.** *J Immunol.* 2005; **174**(7): 3941-7
- Kornete M, Piccirillo CA. **Functional crosstalk between dendritic cells and Foxp3(+) regulatory T cells in the maintenance of immune tolerance.** *Front Immunol.* 2012; **3**: 165
- Kreer C, Rauen J, Zehner M, Burgdorf S. **Cross-presentation: how to get there - or how to get the ER.** *Front Immunol.* 2012; **2**: 87
- Kyewski B, Klein L. **A central role for central tolerance.** *Annu Rev Immunol.* 2006; **24**: 571-606
- Lakkis FG, Lechler RI. **Origin and biology of the allogeneic response.** *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013; **3**(8): a014993
- Larmonier N, Fraszczak J, Lakomy D, Bonnotte B, Katsanis E. **Killer dendritic cells and their potential for cancer immunotherapy.** *Cancer Immunol Immunother.* 2010; **59**(1): 1-11.
- Larsen CP, Ritchie SC, Hendrix R, Linsley PS, Hathcock KS, Hodes RJ, Lowry RP, Pearson TC. **Regulation of Immunostimulatory Function and Costimulatory Molecule (B7-1 and B7-2) Expression on Murine Dendritic Cells.** *J Immunol.* 1994; **152**(11): 5208-19
- Lawetzky A, Hünig T. **Analysis of CD3 and antigen receptor expression on T cell subpopulations of aged athymic mice.** *Eur J Immunol.* 1988; **18**(3): 409-16
- Leenen PJM, Radosević K, Voerman JSA, Salomon B, van Rooijen N, Klatzmann D, van Ewijk W. **Heterogeneity of Mouse Spleen Dendritic Cells: In Vivo Phagocytic Activity, Expression of Macrophage**

- Markers, and Subpopulation Turnover.** *J Immunol.* 1998; **160**(5): 2166-73
- Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. **CD28/B7 System of T Cell Costimulation.** *Annu Rev Immunol.* 1996; **14**: 233-58
- Lewis KL, Caton ML, Bogunovic M, Greter M, Grajkowska LT, Ng D, Klinakis A, Charo IF, Jung S, Gommerman JL, Ivanov II, Liu K, Merad M, Reizis B. **Notch2 receptor signaling controls functional differentiation of dendritic cells in the spleen and intestine.** *Immunity.* 2011; **35**(5): 780-91
- Lewis KL, Reizis B. **Dendritic cells: arbiters of immunity and immunological tolerance.** *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012; **4**(8): a007401
- Liu K, Vitora GD, Schwickert TA, Guermonprez P, Meredith MM, Yao K, Chu F-F, Randolph G J, Rudensky A Y, Nussenzweig M. **In Vivo Analysis of Dendritic Cell Development and Homeostasis.** *Science.* 2009; **324**(5925): 392-97
- Liu Y-J, Kanzler H, Soumelis V, Gilliet M. **Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation.** *Nat Immunol.* 2001; **2**(7): 585-9
- Lutz MB. **How quantitative differences in dendritic cell maturation can direct TH1/TH2-cell polarization.** *Oncoimmunology.* 2013; **2**(2): e22796
- Lutz MB. **Therapeutic potential of semi-mature dendritic cells for tolerance induction.** *Front Immunol.* 2012; **3**: 123
- 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): 2325-30
- Lutz MB, Schuler G. **Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?** *Trends Immunol.* 2002; **23**(9): 445-49
- Lutz MB, Suri RM, Niimi M, Ogilvie ALJ, Kukutsch NA, Rössner S, Schuler G, Austyn JM. **Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival *in vivo*.** *Eur J Immunol.* 2000; **30**(7): 1813-22

- Ma DY, Clark EA. **The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells.** *Semin Immunol.* 2009; **21**(5): 265-72
- MacDonald HR, Blanc C, Lees RK, Sordat B. **Abnormal distribution of T cell subsets in athymic mice.** *J Immunol.* 1986; **136**(12): 4337-9
- MacDonald HR, Lees RK, Bron C, Sordat B, Miescher G. **T cell antigen receptor expression in athymic (nu/nu) mice. Evidence for an oligoclonal beta chain repertoire.** *J Exp Med.* 1987; **166**(1): 195-209
- Maldonado RA, von Andrian UH. **How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells.** *Adv Immunol.* 2010; **108**: 111-65
- Mathieu M, Cotta-Grand N, Daudelin JF, Boulet S, Lapointe R, Labrecque N. **CD40-activated B cells can efficiently prime antigen-specific naïve CD8⁺ T cells to generate effector but not memory T cells.** *PLoS One.* 2012; **7**(1): e30139
- McAdam AJ, Schweitzer AN, Sharpe AH. **The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells.** *Immunol Rev.* 1998; **165**: 231-47
- McLellan AD, Kapp M, Eggert A, Linden C, Bommhardt U, Bröcker E-B, Kämmerer U, Kämpgen E. **Anatomic location and T-cell stimulatory functions of mouse dendritic cell subsets defined by CD4 and CD8 expression.** *Blood.* 2002; **99**(6): 2084-93
- Mendiratta SK, Kovalik J-P, Hong S, Singh N, Martin WD, Van Kaer L. **Peptide dependency of alloreactive CD4⁺ T cell responses.** *Int Immunol.* 1999; **11**(3): 351-60
- Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. **The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting.** *Annu Rev Immunol.* 2013; **31**: 563-604
- Metlay JP, Witmer-Pack MD, Agger R, Crowley MT, Lawless D, Steinman RM. **The Distinct Leukocyte Integrins of Mouse Spleen Dendritic Cells as Identified with New Hamster Monoclonal Antibodies.** *J Exp Med.* 1990; **171**(5): 1753-71

- Miloud T, Hämmerling GJ, Garbi N. **Review of Murine Dendritic Cells: Types, Location, and Development.** *Methods Mol Biol.* 2010; **595**: 21-42
- Montecalvo A, Shufesky WJ, Stolz DB, Sullivan MG, Wang Z, Divito SJ, Papworth GD, Watkins SC, Robbins PD, Larregina AT, Morelli AE. **Exosomes as a short-range mechanism to spread alloantigen between dendritic cells during T cell allorecognition.** *J Immunol.* 2008; **180**(5): 3081-90
- Moran AE, Hogquist KA. **T-cell receptor affinity in thymic development.** *Immunology.* 2012; **135**(4): 261-7
- Moreau A, Varey E, Bériou G, Hill M, Bouchet-Delbos L, Segovia M, Cuturi MC. **Tolerogenic dendritic cells and negative vaccination in transplantation: from rodents to clinical trials.** *Front Immunol.* 2012(1); **3**: 218
- Moreau A, Varey E, Bouchet-Delbos L, Cuturi MC. **Cell therapy using tolerogenic dendritic cells in transplantation.** *Transplant Res.* 2012(2); **1**: 13
- Naranjo-Gómez M, Raich-Regué D, Oñate C, Grau-López L, Ramo-Tello C, Pujol-Borrell R, Martínez-Cáceres E, Borràs FE. **Comparative study of clinical grade human tolerogenic dendritic cells.** *J Transl Med.* 2011; **9**: 89
- Neefjes J, Jongstra ML, Paul P, Bakke O. **Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation.** *Nat Rev Immunol.* 2011; **11**(12): 823-36
- Nussenzweig MC, Steinman RM. **Contribution of Dendritic Cells to Stimulation of the Murine Syngeneic Mixed Leukocyte Reaction.** *J Exp Med.* 1980; **151**(5): 1196-212
- Otto Ch, Ulrichs K. **The Immunology of Allograft Rejection: A Survey of Current Knowledge and a Discussion of Peptide-Specific Anti-Rejection Strategies.** *Tx Med.* 2004; **16**: 158-171
- Palucka K, Banchereau J. **Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines.** *Immunity.* 2013; **39**(1): 38-48

- Pantelouris EM. **Absence of Thymus in a Mouse Mutant.** *Nature* 1968; **217**(5126): 370-1
- Pillarisetty VG, Katz SC, Bleier JI, Shah AB, DeMatteo RP. **Natural Killer Dendritic Cells Have Both Antigen Presenting and Lytic Function and in Response to CpG Produce IFN- γ via Autocrine IL-12.** *J Immunol.* 2005; **174**(5): 2612-18
- Reis e Sousa C. **Dendritic cells in a mature age.** *Nat Rev Immunol.* 2006; **6**(6): 476-83
- Riquelme P, Geissler EK, Hutchinson JA. **Alternative approaches to myeloid suppressor cell therapy in transplantation: comparing regulatory macrophages to tolerogenic DCs and MDSCs.** *Transplant Res.* 2012; **1**(1): 17
- Robbins SH, Walzer T, Dembélé D, Thibault C, Defays A, Bessou G, Xu H, Vivier E, Sellars M, Pierre P, Sharp FR, Chan S, Kastner P, Dalod M. **Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling.** *Genome Biol.* 2008; **9**(1): R17
- Romagnani S. **Regulation of the T cell response.** *Clin Exp Allergy.* 2006; **36**(11): 1357-66
- Sansom DM, Manzotti CN, Zheng Y. **What's the difference between CD80 and CD86?** *Trends Immunol.* 2003; **24**(6): 314-19
- Satpathy AT, Wu X, Albring JC, Murphy KM. **Re(de)fining the dendritic cell lineage.** *Nat Immunol.* 2012; **13**(12): 1145-54
- Segovia M, Louvet C, Charnet P, Savina A, Tilly G, Gautreau L, Carretero-Iglesia L, Beriou G, Cebrian I, Cens T, Hepburn L, Chiffolleau E, Floto RA, Anegon I, Amigorena S, Hill M, Cuturi MC. **Autologous dendritic cells prolong allograft survival through Tmem176b-dependent antigen cross-presentation.** *Am J Transplant.* 2014; **14**(5): 1021-31
- Segura E, Kapp E, Gupta N, Wong J, Lim J, Ji H, Heath WR, Simpson R, Villadangos JA. **Differential expression of pathogen-recognition molecules between dendritic cell subsets revealed by plasma membrane proteomic analysis.** *Mol Immunol.* 2010; **47**(9): 1765-73

- Sharpe AH, Freeman GJ. **The B7-CD28 Superfamily.** *Nat Rev Immunol.* 2002; **2**(2): 116-26
- Shortman K, Heath WR. **The CD8⁺ dendritic cell subset.** *Immunol Rev.* 2010; **234**(1): 18-31
- Shortman K, Liu Y-J. **Mouse and Human Dendritic Cell Subtypes.** *Nat Rev Immunol.* 2002; **2**(3): 151-61
- Shortman K, Naik SH. **Steady-state and inflammatory dendritic-cell development.** *Nat Rev Immunol.* 2007; **7**(1): 19-30
- Shurin GV, Chatta GS, Tourkova IL, Zorina TD, Esche C, Shurin MR. **Regulation of dendritic cell expansion in aged athymic nude mice by FLT3 ligand.** *Exp Gerontol.* 2004; **39**(3): 339-48
- Simpson E, Scott D, Chandler P. **The male-specific histocompatibility antigen, H-Y: a history of transplantation, immune response genes, sex determination and expression cloning.** *Annu Rev Immunol* 1997; **15**: 39-61
- Smyth LA, Afzali B, Tsang J, Lombardi G, Lechler RI. **Intercellular transfer of MHC and immunological molecules: molecular mechanisms and biological significance.** *Am J Transplant.* 2007; **7**(6): 1442-9
- 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): 1142-62
- Steinman RM, Nussenzweig MC. **Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; **99**(1): 351-8
- Steinman RM, Pack M, Inaba K. **Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs.** *Immunol Rev.* 1997; **156**: 25-37.
- Steinman RM, Witmer MD. **Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978; **75**(10): 5132-6
- Suciu-Foca N, Berloco P, Cortesini R. **Tolerogenic dendritic cells in cancer, transplantation, and autoimmune diseases.** *Hum Immunol.* 2009; **70**(5): 277-80

- Švajger U, Rožman P. **Tolerogenic dendritic cells: molecular and cellular mechanisms in transplantation.** *J Leukoc Biol.* 2014; **95**(1): 53-69
- Tan JKH, O'Neill HC. **Haematopoietic stem cells in spleen have distinct differentiative potential for antigen presenting cells.** *J Cell Mol Med.* 2010; **14**(8): 2144-50
- Tiurbe G, Matuschek A, Kämmerer U, Schneider M, Thiede A, Ulrichs K, Otto C. **Inhibitory effects of rat bone marrow-derived dendritic cells on naïve and alloantigen-specific CD4+ T cells: a comparison between dendritic cells generated with GM-CSF plus IL-4 and dendritic cells generated with GM-CSF plus IL-10.** *BMC Res Notes.* 2009; **2**: 12
- Turnquist HR, Thomson AW. **Taming the lions: manipulating dendritic cells for use as negative cellular vaccines in organ transplantation.** *Curr Opin Organ Transplant.* 2008; **13**(4): 350-7
- Valdor R, Macian F. **Induction and stability of the anergic phenotype in T cells.** *Semin Immunol.* 2013; **25**(4): 313-20
- Vassalli G. **Dendritic Cell-Based Approaches for Therapeutic Immune Regulation in Solid-Organ Transplantation.** *J Transplant.* 2013; **2013**: 761429
- Vitali C, Mingozi F, Broggi A, Barresi S, Zolezzi F, Bayry J, Raimondi G, Zanoni I, Granucci F. **Migratory, and not lymphoid-resident, dendritic cells maintain peripheral self-tolerance and prevent autoimmunity via induction of iTreg cells.** *Blood.* 2012; **120**(6): 1237-45
- Vlad G, Cortesini R, Suciuc-Foca N. **License to heal: bidirectional interaction of antigen-specific regulatory T cells and tolerogenic APC.** *J Immunol.* 2005; **174**(10): 5907-14
- 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): 2978-86
- Vremec D, Shortman K. **Dendritic Cell Subtypes in Mouse Lymphoid Organs Cross-Correlation of Surface Markers, Changes with Incubation, and Differences Among Thymus, Spleen, and Lymph Nodes.** *J Immunol.* 1997; **159**(2): 565-73

- Vremec D, Zorbas M, Scollay R, Saunders DJ, Ardavin CF, Wu L, Shortman K. **The Surface Phenotype of Dendritic Cells Purified from Mouse Thymus and Spleen: Investigation of the CD8 Expression by a Subpopulation of Dendritic Cells.** *J Exp Med.* 1992; **176**(1): 47-58
- Vyas JM, Van der Veen AG, Ploegh HL. **The known unknowns of antigen processing and presentation.** *Nat Rev Immunol.* 2008; **8**(8): 607-18
- Wilson NS, El-Sukkari D, Belz GT, Smith CM, Steptoe RJ, Heath WR, Shortman K, Villadangos JA. **Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature.** *Blood.* 2003; **102**(6): 2187-94
- Wilson NS, El-Sukkari D, Villadangos JA. **Dendritic cells constitutively present self antigens in their immature state in vivo and regulate antigen presentation by controlling the rates of MHC class II synthesis and endocytosis.** *Blood.* 2004; **103**(6): 2187-95
- Wood KJ, Bushell A, Hester J. **Regulatory immune cells in transplantation.** *Nat Rev Immunol.* 2012; **12**(6): 417-30
- Xiang J, Gu X, Qian S, Chen Z. **Graded function of CD80 and CD86 in initiation of T-cell immune response and cardiac allograft survival.** *Transpl Int.* 2008; **21**(2): 163-68
- Xing Y, Hogquist KA. **T-cell tolerance: central and peripheral.** *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012; **4**(6): a006957
- Yates AJ. **Theories and Quantification of Thymic Selection.** *Front Immunol.* 2014; **5**: 13
- Yin Y, Mariuzza RA. **The multiple mechanisms of T cell receptor cross-reactivity.** *Immunity.* 2009; **31**(6): 849-51
- Zelenay S, Reis e Sousa C. **Adaptive immunity after cell death.** *Trends Immunol.* 2013; **34**(7): 329-35

10 Appendix

Tabelle 10.1: Für die Durchflusszytometrie verwendete Antikörper.

Antikörper (Klon)	Antigen	Isotyp	Konzentration	Konjugat
MOPC-31C	(Isotyp)	Maus IgG1, κ	0,5 µg auf 50 µl	FITC
MOPC-21	(Isotyp)	Maus IgG1, κ	0,2 µg auf 50 µl	PE
N418	CD11c	Hamster IgG1	0,09 µg auf 50 µl	PE
M1/70.15.11.5	CD11b	Ratte IgG2b	0,07 µg auf 50 µl	FITC
53-6.7	CD8α	Ratte IgG2a	0,09 µg auf 50 µl	FITC
M5/114.15.2	MHC-Klasse-II	Ratte IgG2b	0,08 µg auf 50 µl	FITC
RMMP-1	CD80	Ratte IgG2a	0,3 µg auf 50 µl	FITC
RMMP-2	CD86	Ratte IgG2a	0,3 µg auf 50 µl	FITC
3/23	CD40	Ratte IgG2a	0,3 µg auf 50 µl	FITC
RA3-6B2	CD45R	Ratte IgG2a	0,09 µg auf 50 µl	FITC
H57-597	TCR-β-Kette	Hamster IgG2, λ1	1,5 µg auf 50 µl	FITC
1D3	CD19	RattelgG2a, κ	1,5 µg auf 50 µl	FITC
DX5	CD49b (Pan-NK)	Ratte IgM, κ	1,5 µg auf 50 µl	FITC

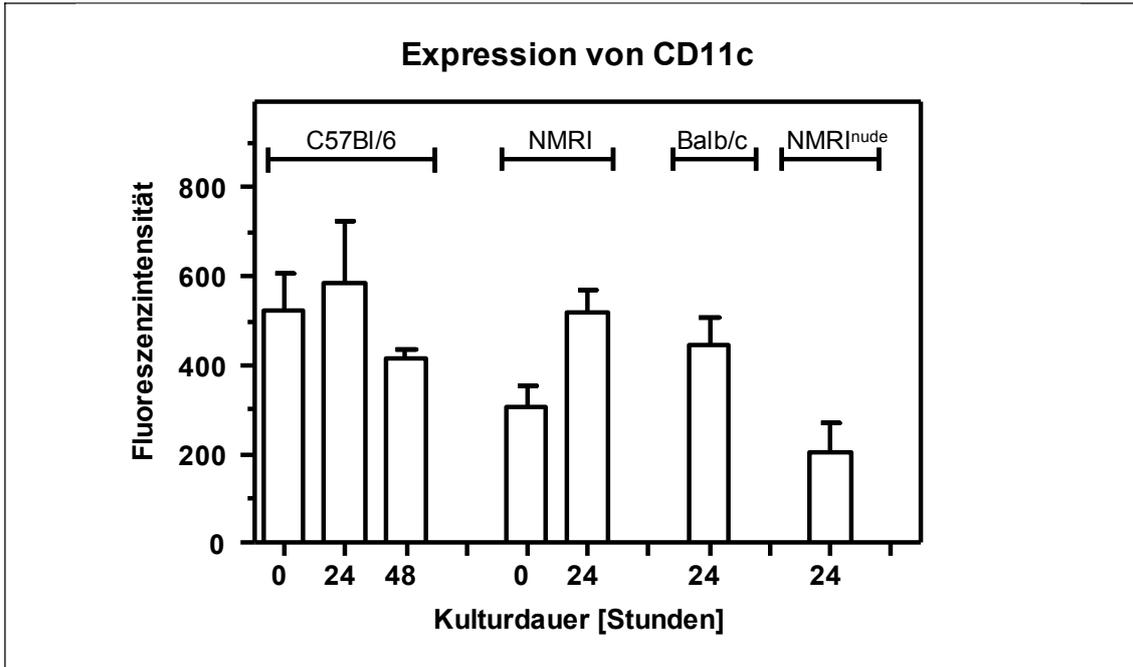


Abb. 10.1: Expressionsstärke von CD11c auf Dendritischen Zellen. Gezeigt sind die Ergebnisse für unterschiedliche Mauslinien in Abhängigkeit von der Kulturdauer *in vitro*. Eine statistische Analyse wurde nicht durchgeführt, da die Anzahl der Daten für die einzelnen Messzeitpunkte mit 2 bis 7 Isolierungen zu gering war.

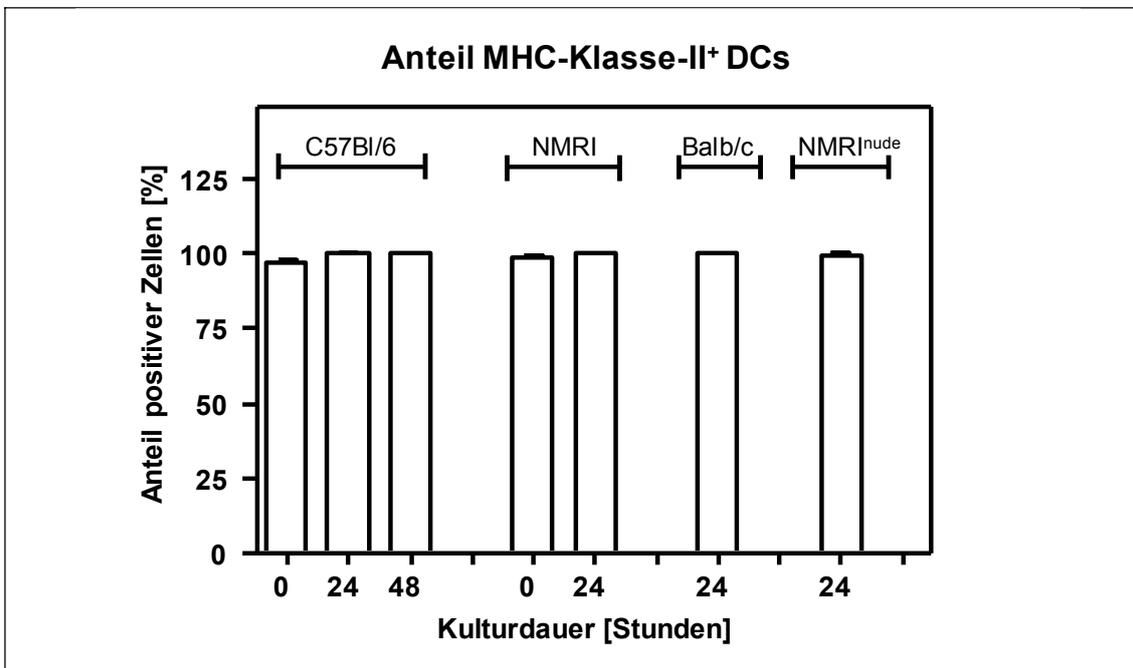


Abb. 10.2: Anteil MHC-Klasse-II-positiver Zellen an der Fraktion CD11c-positiver Dendritischer Zellen. Gezeigt sind die Ergebnisse für unterschiedliche Mauslinien in Abhängigkeit von der Kulturdauer *in vitro*. Wie erwartet sind sowohl unreife als auch reife Dendritische Zellen für MHC-Klasse-II positiv (Kap. 6.2). Eine statistische Analyse wurde nicht durchgeführt, da die Anzahl der Daten für die einzelnen Messzeitpunkte mit 2 bis 6 Isolierungen zu gering war.

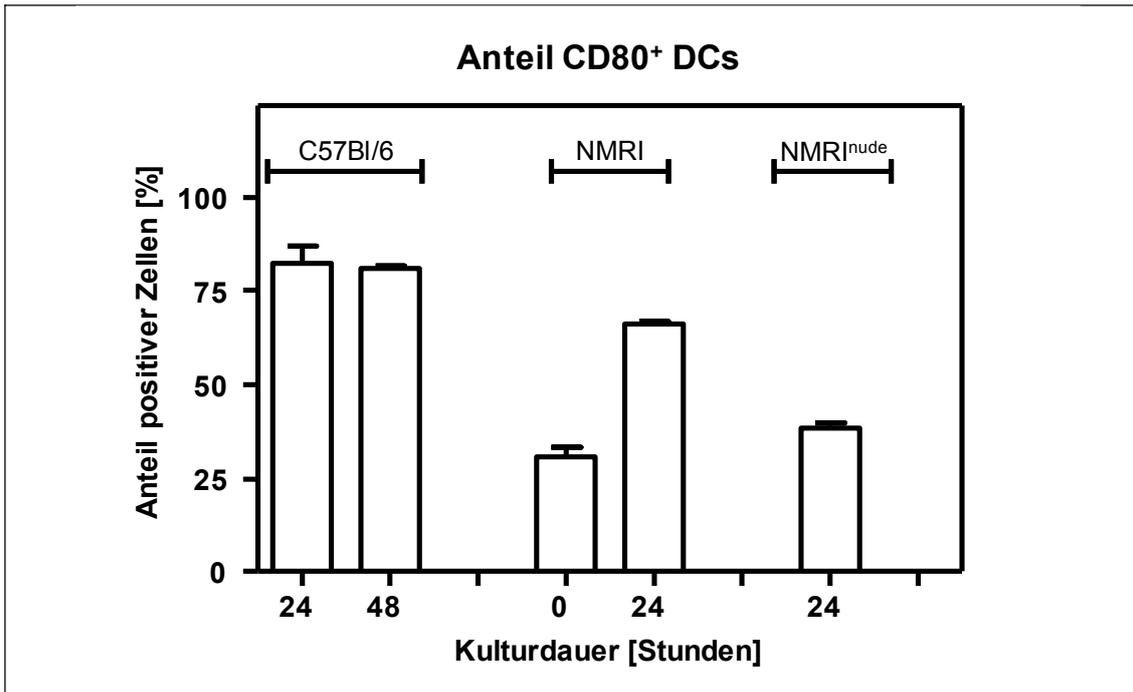


Abb. 10.3: Anteil CD80-positiver Zellen an der Fraktion CD11c-positiver Dendritischer Zellen. Gezeigt sind die Ergebnisse für unterschiedliche Mauslinien in Abhängigkeit von der Kulturdauer *in vitro*. Eine statistische Analyse wurde nicht durchgeführt, da die Anzahl der Daten für die einzelnen Messzeitpunkte mit 2 bis 5 Isolierungen zu gering war.

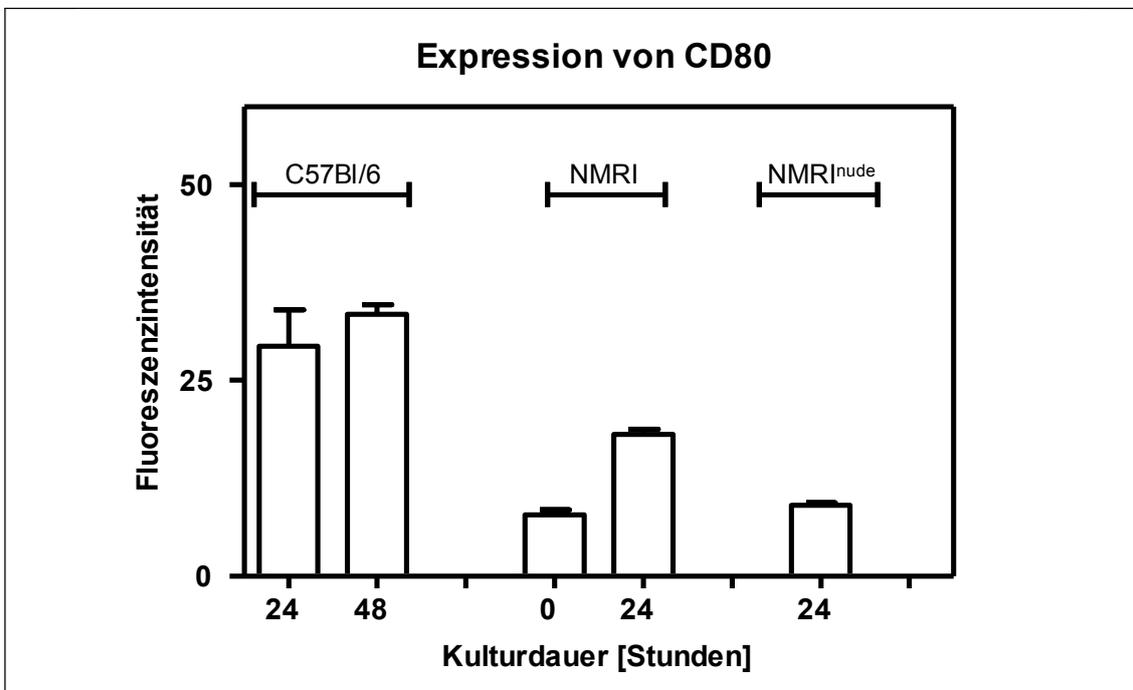


Abb. 10.4: Expressionsstärke von CD80 auf CD11c-positiven Dendritischen Zellen. Gezeigt sind die Ergebnisse für unterschiedliche Mauslinien in Abhängigkeit von der Kulturdauer *in vitro*. Eine statistische Analyse wurde nicht durchgeführt, da die Anzahl der Daten für die einzelnen Messzeitpunkte mit 2 bis 5 Isolierungen zu gering war.

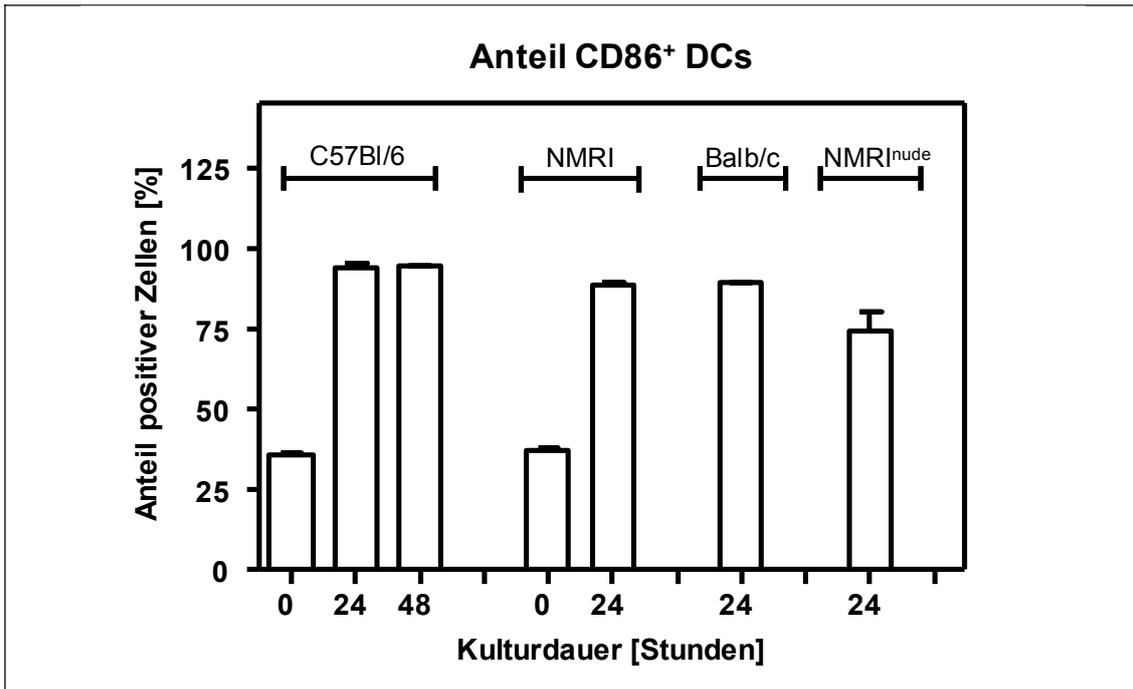


Abb. 10.5: Anteil CD86-positiver Zellen an der Fraktion CD11c-positiver Dendritischer Zellen. Gezeigt sind die Ergebnisse für unterschiedliche Mauslinien in Abhängigkeit von der Kulturdauer *in vitro*. Eine statistische Analyse wurde nicht durchgeführt, da die Anzahl der Daten für die einzelnen Messzeitpunkte mit 2 bis 5 Isolierungen zu gering war.

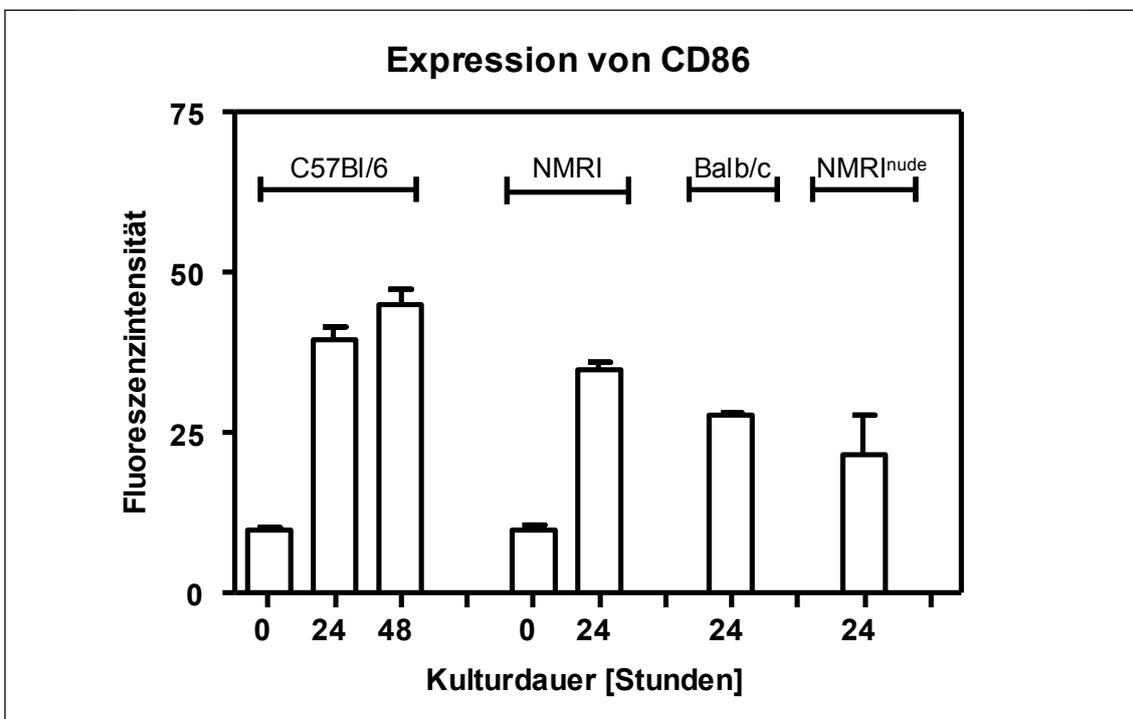


Abb. 10.6: Expressionsstärke von CD86 auf CD11c-positiven Dendritischen Zellen. Gezeigt sind die Ergebnisse für unterschiedliche Mauslinien in Abhängigkeit von der Kulturdauer *in vitro*. Eine statistische Analyse wurde nicht durchgeführt, da die Anzahl der Daten für die einzelnen Messzeitpunkte mit 2 bis 5 Isolierungen zu gering war.

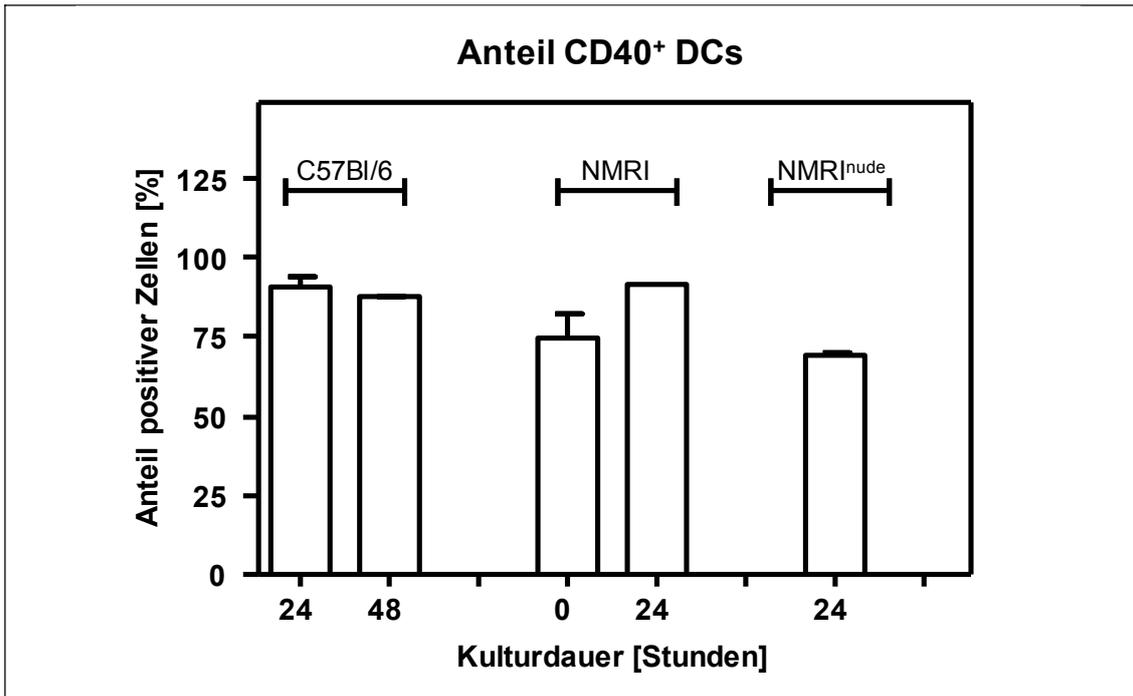


Abb. 10.7: Anteil CD40-positiver Zellen an der Fraktion CD11c-positiver Dendritischer Zellen. Gezeigt sind die Ergebnisse für unterschiedliche Mauslinien in Abhängigkeit von der Kulturdauer *in vitro*. Eine statistische Analyse wurde nicht durchgeführt, da die Anzahl der Daten für die einzelnen Messzeitpunkte mit 2 bis 5 Isolierungen zu gering war.

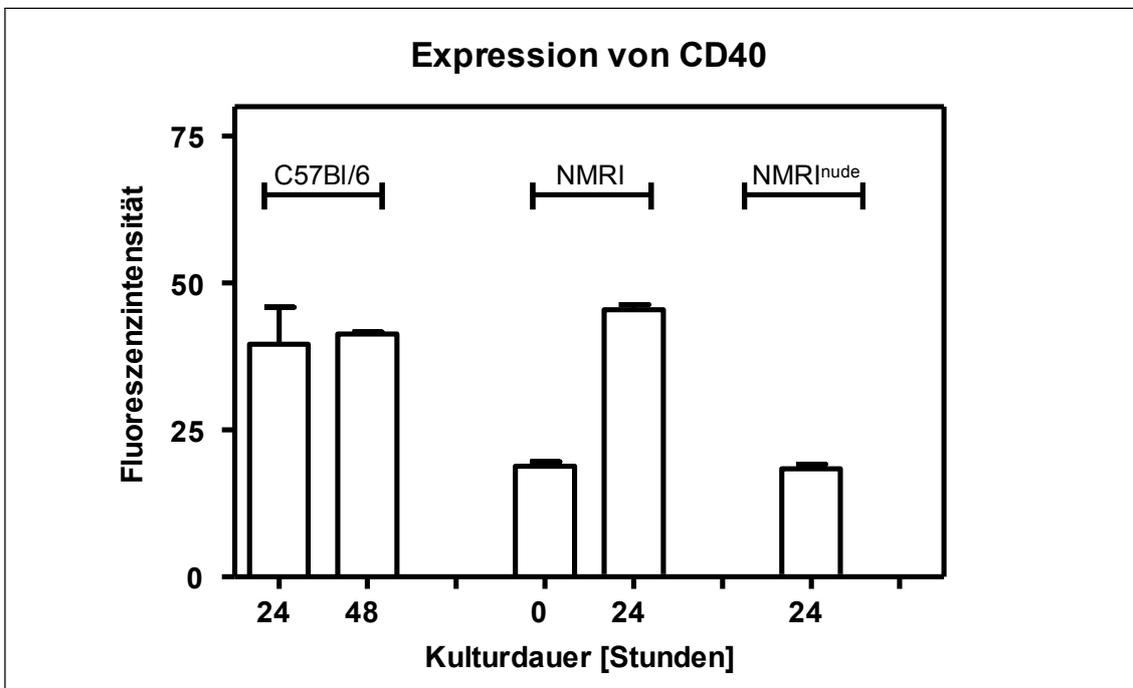


Abb. 10.8: Expressionsstärke von CD40 auf CD11c-positiven Dendritischen Zellen. Gezeigt sind die Ergebnisse für unterschiedliche Mauslinien in Abhängigkeit von der Kulturdauer *in vitro*. Eine statistische Analyse wurde nicht durchgeführt, da die Anzahl der Daten für die einzelnen Messzeitpunkte mit 2 bis 5 Isolierungen zu gering war.

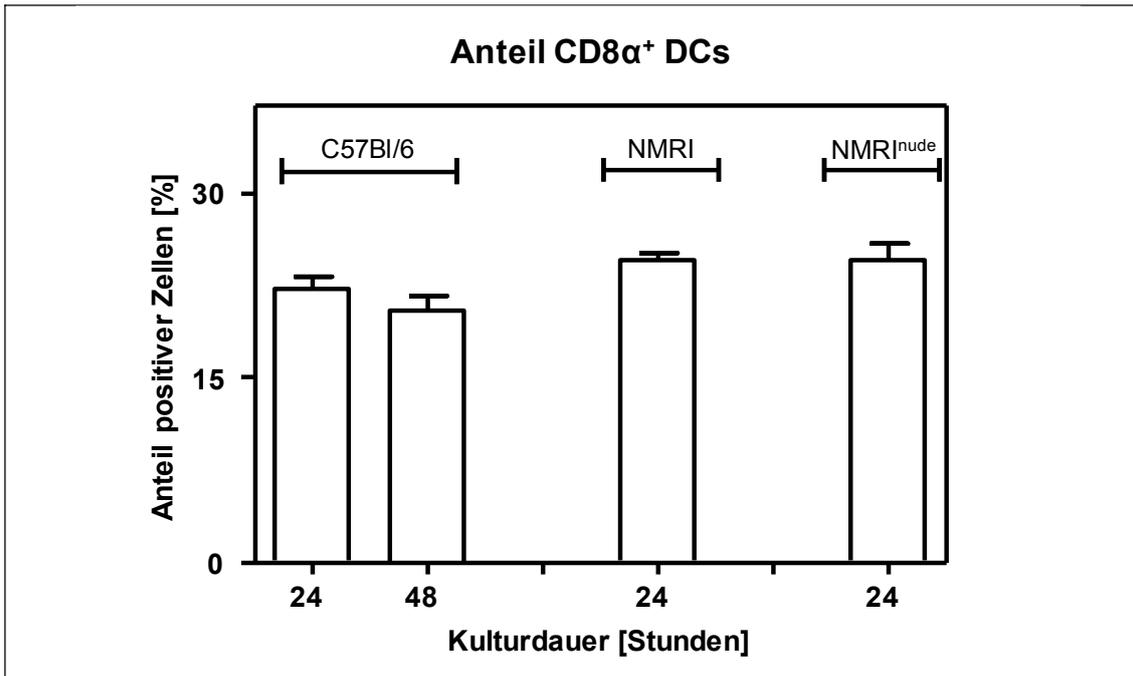


Abb. 10.9: Anteil CD8α-positiver Zellen an der Fraktion CD11c-positiver Dendritischer Zellen. Gezeigt sind die Ergebnisse für unterschiedliche Mauslinien in Abhängigkeit von der Kulturdauer *in vitro*. Eine statistische Analyse wurde nicht durchgeführt, da die Anzahl der Daten für die einzelnen Messzeitpunkte mit 2 bis 4 Isolierungen zu gering war.

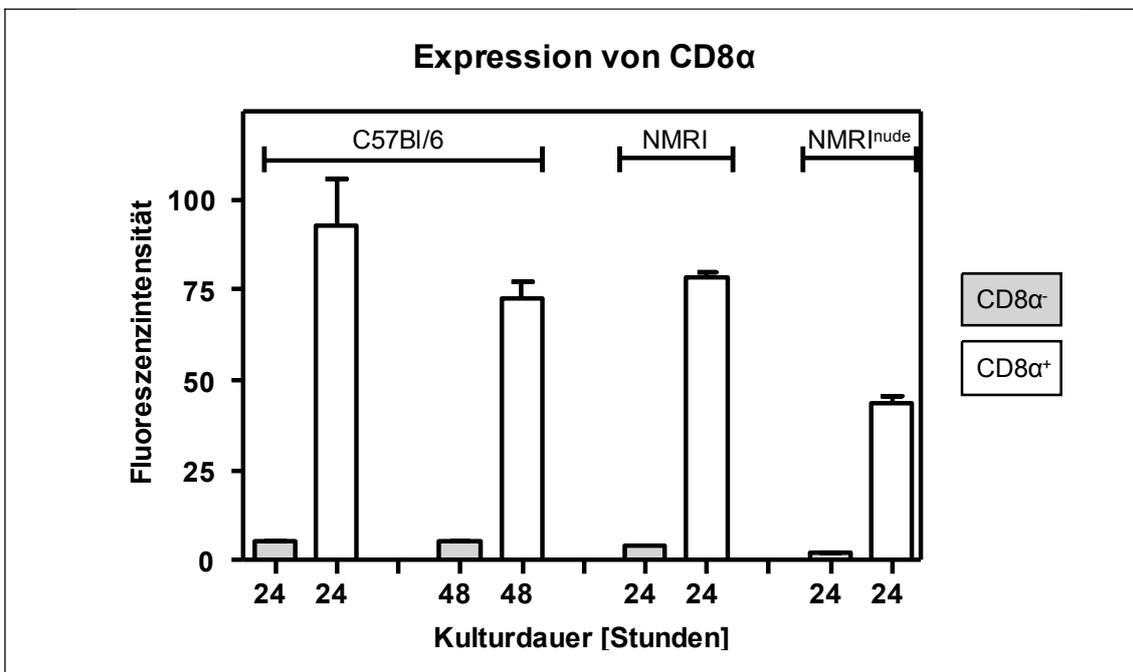


Abb. 10.10: Expressionsstärke von CD8α auf auf CD11c-positiven Dendritischen Zellen. Gezeigt sind die Ergebnisse für CD8α-positiv und CD8α-negativen Dendritischen Zellen unterschiedlicher Mauslinien in Abhängigkeit von der Kulturdauer *in vitro*. Bei CD8α-negativen Dendritischen Zellen liegt die Fluoreszenzintensität für CD8α im Bereich der Isotypenkontrollen. Eine statistische Analyse wurde nicht durchgeführt, da die Anzahl der Daten für die einzelnen Messzeitpunkte mit 2 bis 4 Isolierungen zu gering war.

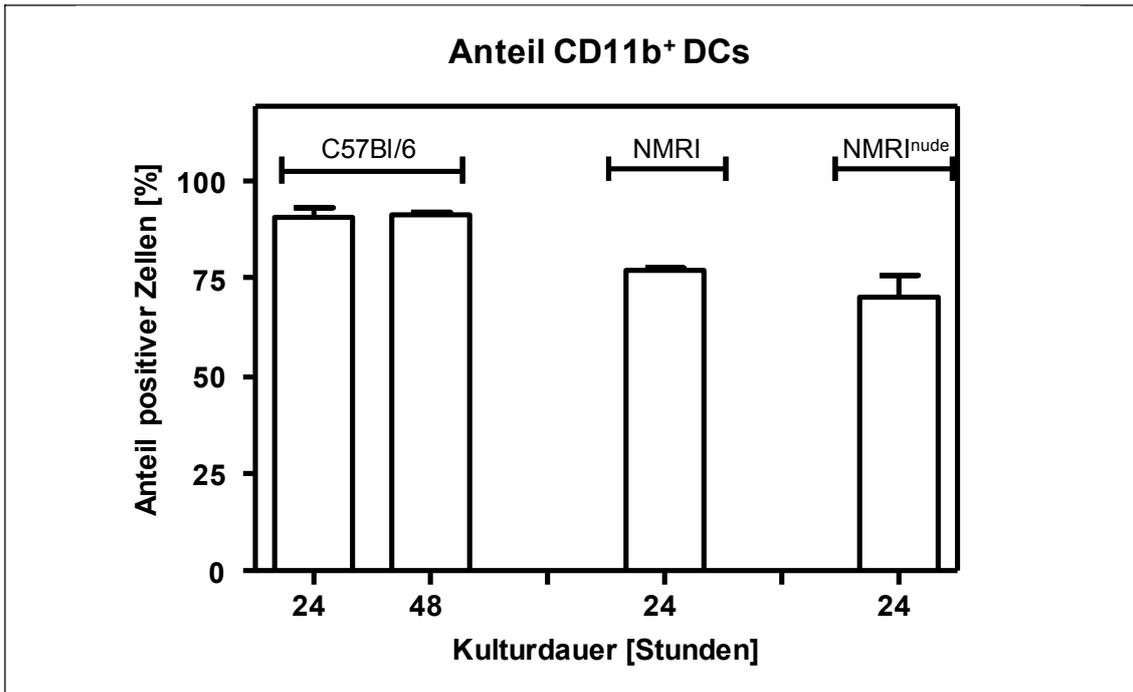


Abb. 10.11: Anteil CD11b-positiver Zellen an der Fraktion CD11c-positiver Dendritischer Zellen. Gezeigt sind die Ergebnisse für unterschiedliche Mauslinien in Abhängigkeit von der Kulturdauer *in vitro*. Eine statistische Analyse wurde nicht durchgeführt, da die Anzahl der Daten für die einzelnen Messzeitpunkte mit 2 bis 4 Isolierungen zu gering war.

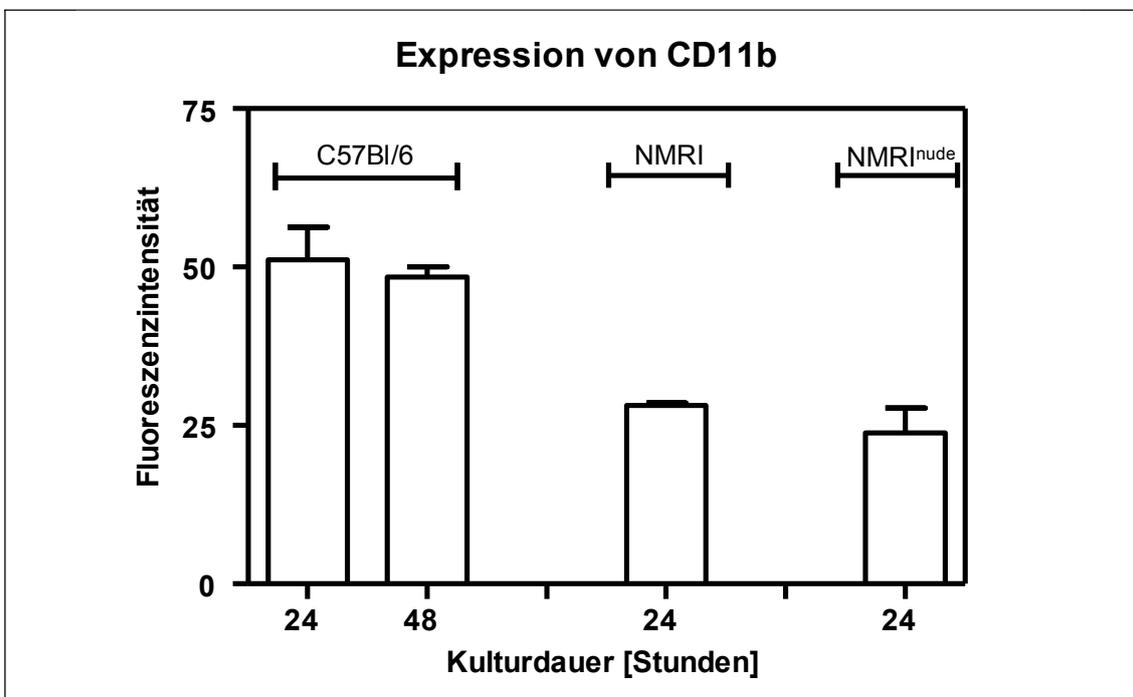


Abb. 10.12: Expressionsstärke von CD11b auf CD11c-positiven Dendritischen Zellen. Gezeigt sind die Ergebnisse für unterschiedliche Mauslinien in Abhängigkeit von der Kulturdauer *in vitro*. Eine statistische Analyse wurde nicht durchgeführt, da die Anzahl der Daten für die einzelnen Messzeitpunkte mit 2 bis 4 Isolierungen zu gering war.

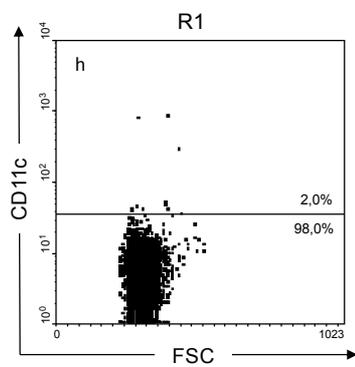
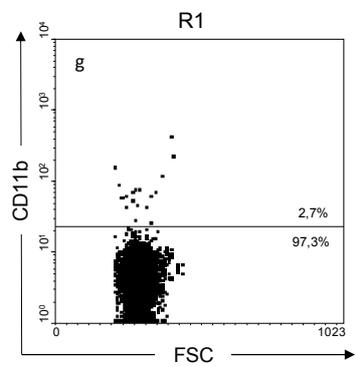
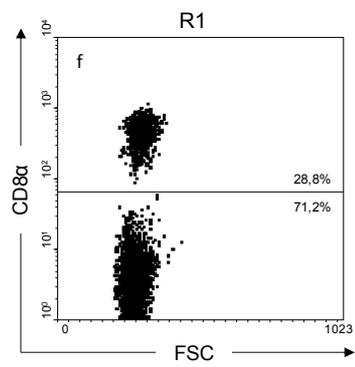
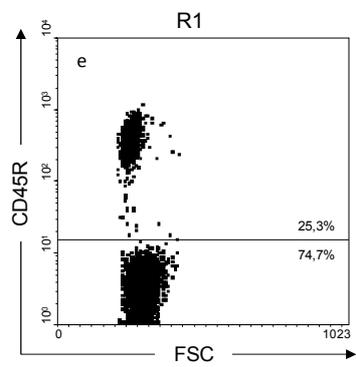
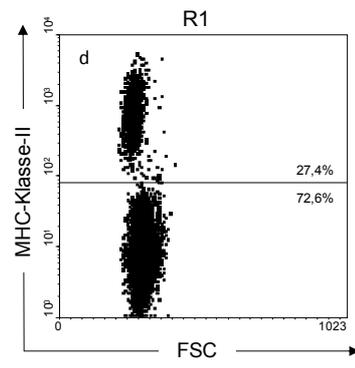
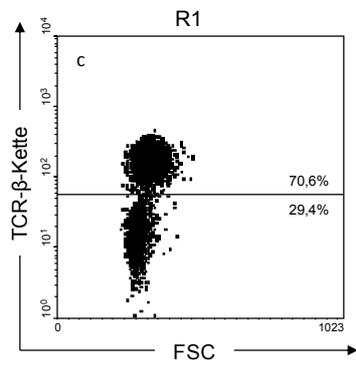
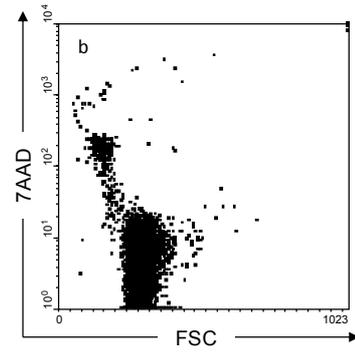
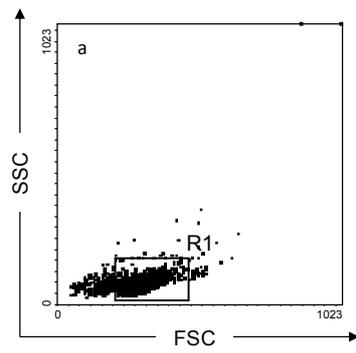


Abb. 10.13 (S. 95): Phänotypisierung unaufgereinigter Leukozyten aus zervikalen Lymphknoten der Mauslinie C57Bl/6. Zur Analyse wurden die Lymphknotenzellen von zwei Tieren gepoolt. a: Zellgröße (FSC) und Zellgranularität (SSC); b: 7-AAD-positive, avitale Zellen; c-h: Expression der Marker TCR- β -Kette, MHC-Klasse-II, CD45R, CD8 α , CD11b bzw. CD11c. Die Fluoreszenzintensitäten der Isotypenkontrollen lagen im Bereich von 10^0 bis 10^1 .

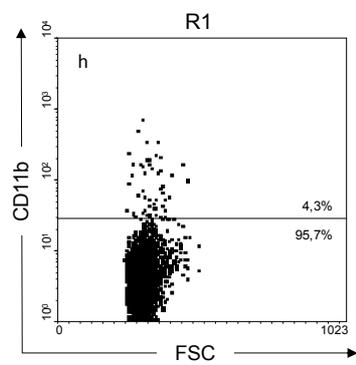
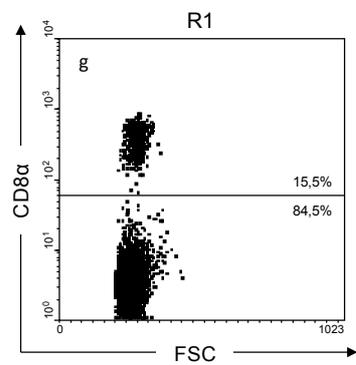
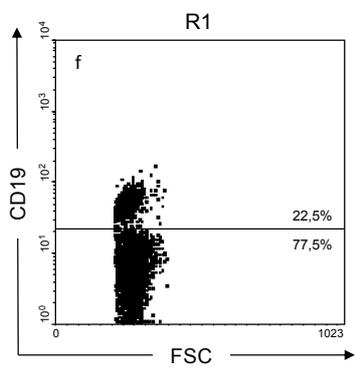
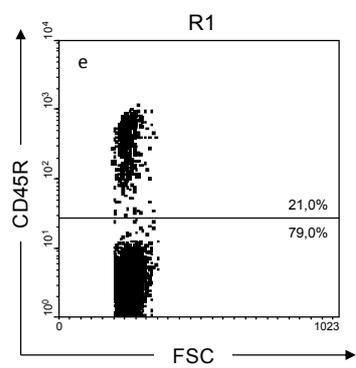
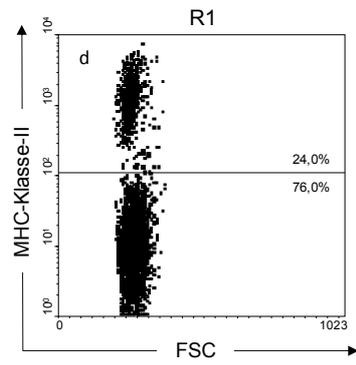
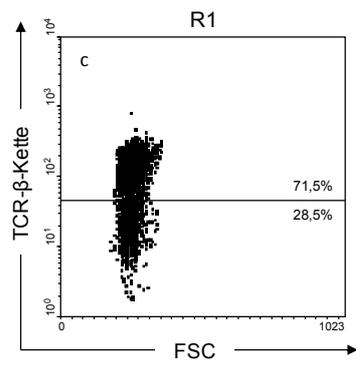
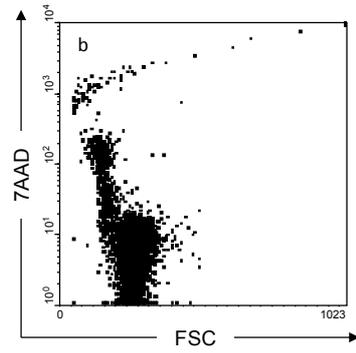
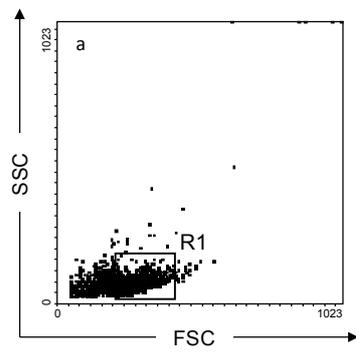


Abb. 10.14 (S. 97): Phänotypisierung unaufgereinigter Leukozyten aus zervikalen Lymphknoten der Mauslinie Balb/c. Zur Analyse wurden die Lymphknotenzellen von drei Tieren gepoolt. a: Zellgröße (FSC) und Zellgranularität (SSC); b: 7-AAD-positive, avitale Zellen; c-h: Expression der Marker TCR- β -Kette, MHC-Klasse-II, CD45R, CD19, CD8 α bzw. CD11b. Die Fluoreszenzintensitäten der Isotypenkontrollen lagen im Bereich von 10^0 bis 10^1 .

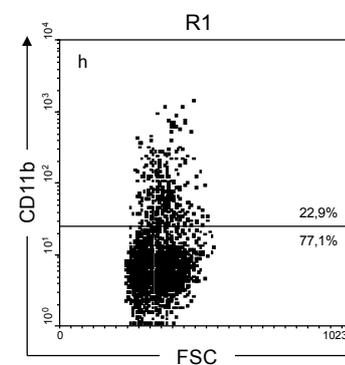
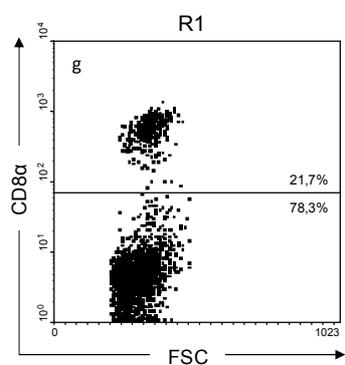
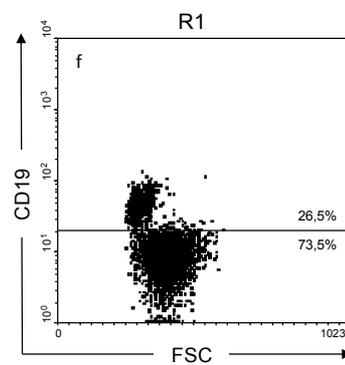
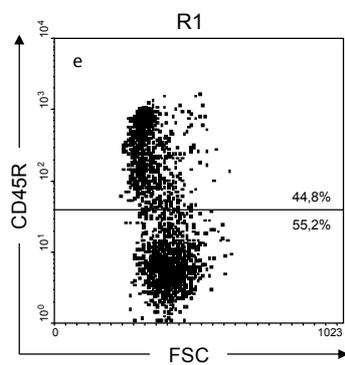
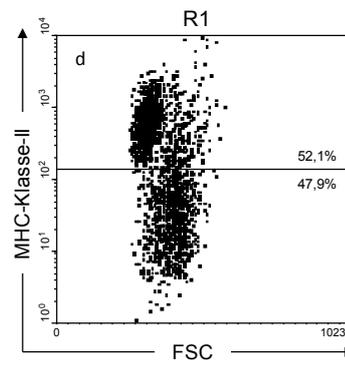
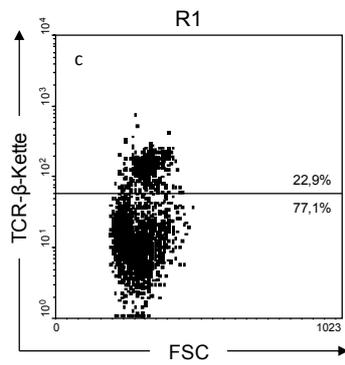
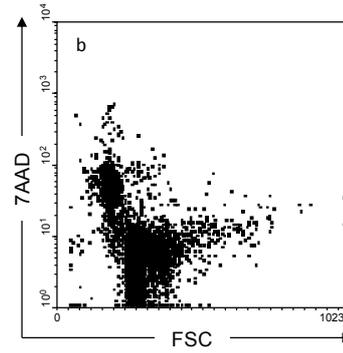
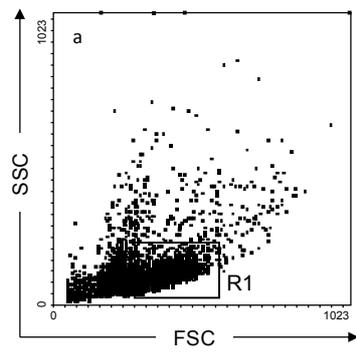


Abb. 10.15 (S. 99): Phänotypisierung unaufgereinigter Leukozyten aus zervikalen Lymphknoten der Mauslinie NMRI^{nude}. Zur Analyse wurden die Lymphknotenzellen von zwei jeweils 12 Wochen alten Tieren gepoolt (Isolierungsnummer 1 aus Tab. 10.2). a: Zellgröße (FSC) und Zellgranularität (SSC); b: 7-AAD-positive, avitale Zellen; c-h: Expression der Marker TCR- β -Kette, MHC-Klasse-II, CD45R, CD19, CD8 α bzw. CD11b. Die Fluoreszenzintensitäten der Isotypenkontrollen lagen im Bereich von 10^0 bis 10^1 .

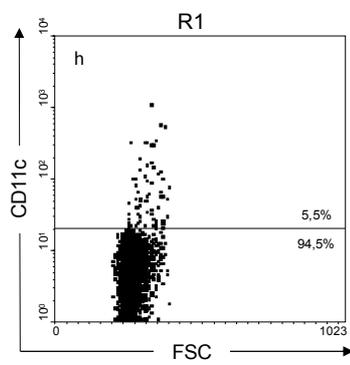
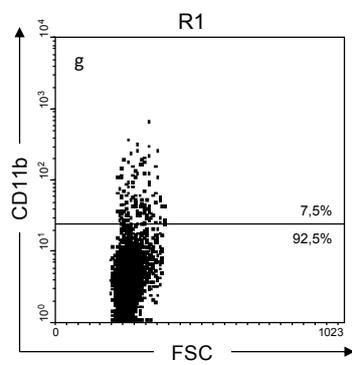
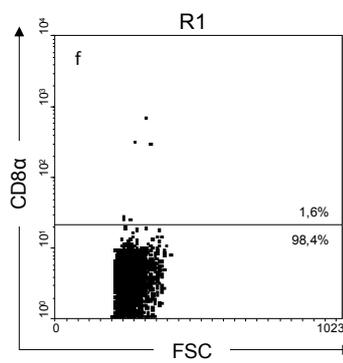
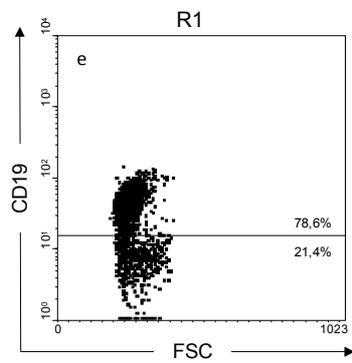
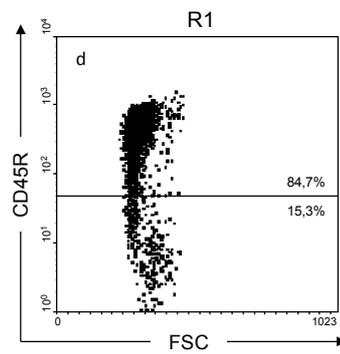
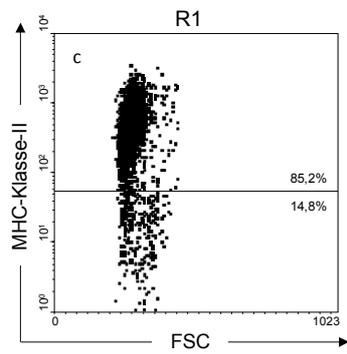
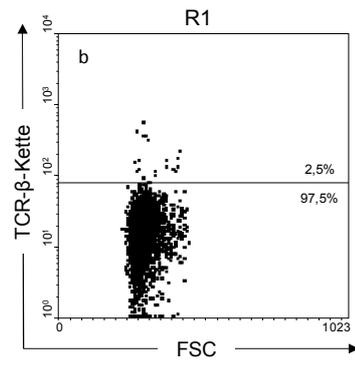
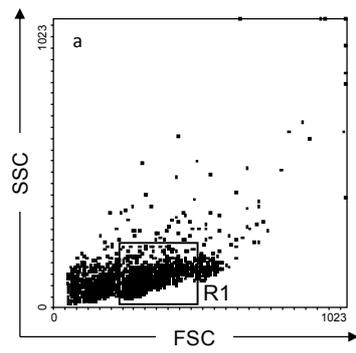


Abb. 10.16 (S. 101): Phänotypisierung unaufgereinigter Leukozyten aus zervikalen Lymphknoten der Mauslinie NMRI^{nude}. Zur Analyse wurden die Lymphknotenzellen von zwei jeweils 7 Wochen alten Tieren gepoolt (Isolierungsnummer 3 aus Tab. 10.2). a: Zellgröße (FSC) und Zellgranularität (SSC); b-h: Expression der Marker TCR- β -Kette, MHC-Klasse-II, CD45R, CD19, CD8 α , CD11b bzw. CD11c. Die Fluoreszenzintensitäten der Isotypenkontrollen lagen im Bereich von 10^0 bis 10^1 .

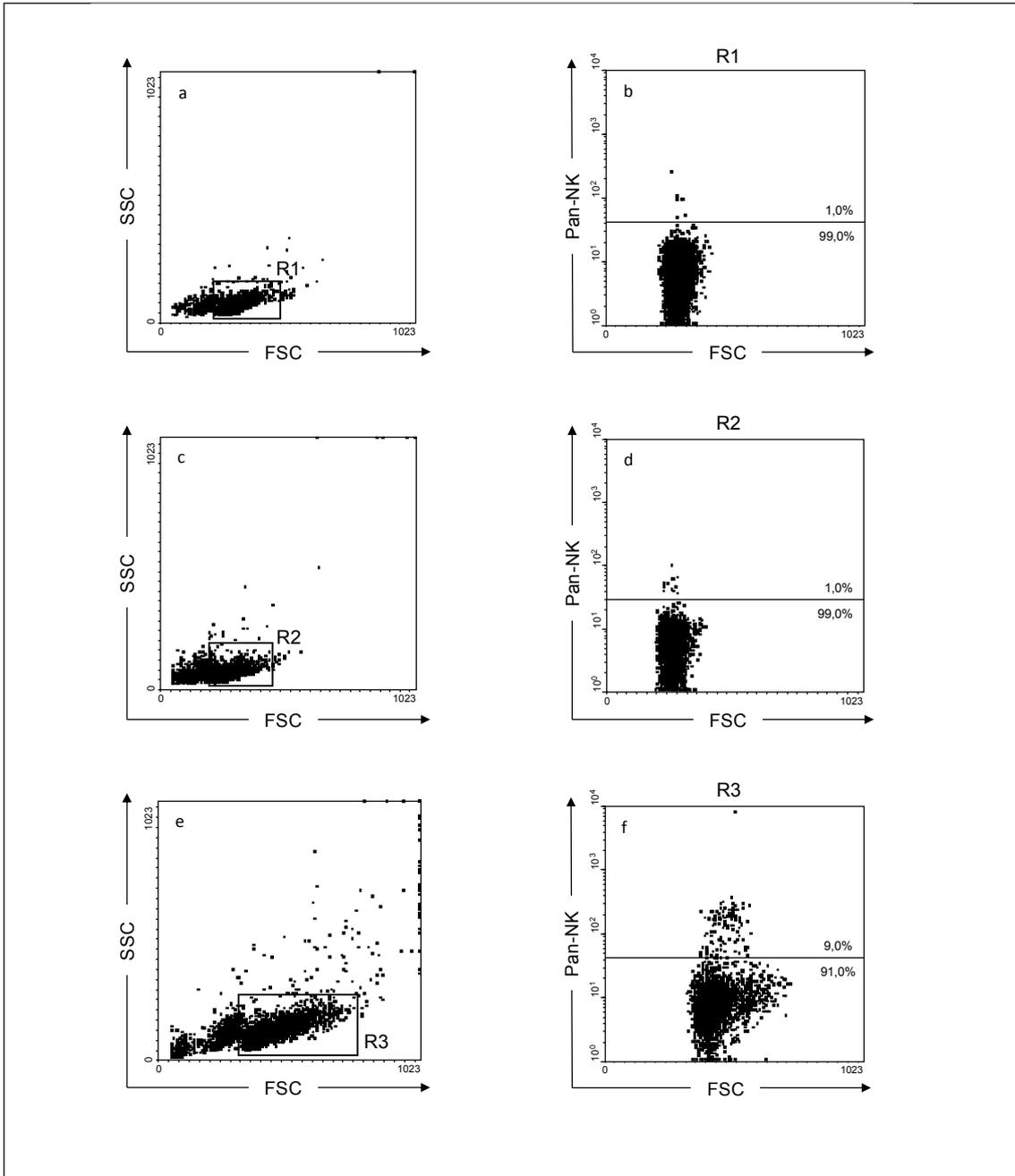


Abb. 10.17: Nachweis Natürlicher Killerzellen unter unaufgereinigten Leukozyten aus zervikalen Lymphknoten unterschiedlicher Mauslinien. 1. Zeile (a, b): Zellgröße (FSC), Zellgranularität (SSC) und Expression des Pan-NK-Markers CD49b auf Zellen der Mauslinie C57Bl/6; 2. Zeile (c, d): Zellgröße (FSC), Zellgranularität (SSC) und Expression des Pan-NK-Markers CD49b auf Zellen der Mauslinie Balb/c; 3. Zeile (e, f): Zellgröße (FSC), Zellgranularität (SSC) und Expression des Pan-NK-Markers CD49b auf Zellen der Mauslinie NMRI^{nude} (Isolierungsnummer 4 aus Tab. 10.2). Die Fluoreszenzintensitäten der Isotypenkontrollen lagen im Bereich von 10⁰ bis 10¹.

Tabelle 10.2: Typisierung unaufgereinigter Leukozyten aus zervikalen Lymphknoten von Mäusen der Linie NMRI^{nude}. Jede Isolierung enthielt gepoolte Zellen von zwei Tieren. Mit zunehmendem Alter der Tiere nahm der Anteil an T-Lymphozyten tendenziell zu. Abkürzungen: n. best. = nicht bestimmt.

Isolierungsnummer	1	2	3	4	
Alter der Tiere [Wochen]	12	13	7	11	
Anteil positiver Zellen	TCR- β -Kette	22,9 %	11,1 %	2,5 %	9,0 %
	MHC-II	52,1 %	78,0 %	85,2 %	81,5 %
	CD45R	44,8 %	69,0 %	84,7 %	75,8%
	CD19	26,5 %	64,0 %	78,6 %	n. best.
	CD8 α	21,7 %	5,9 %	1,6%	5,9%
	CD11b	22,9 %	12,3 %	7,5 %	14,6%
	CD11c	n. best.	11,3 %	5,5 %	14,1%
	Pan-NK	11,1 %	12,1 %	6,0 %	9,0 %

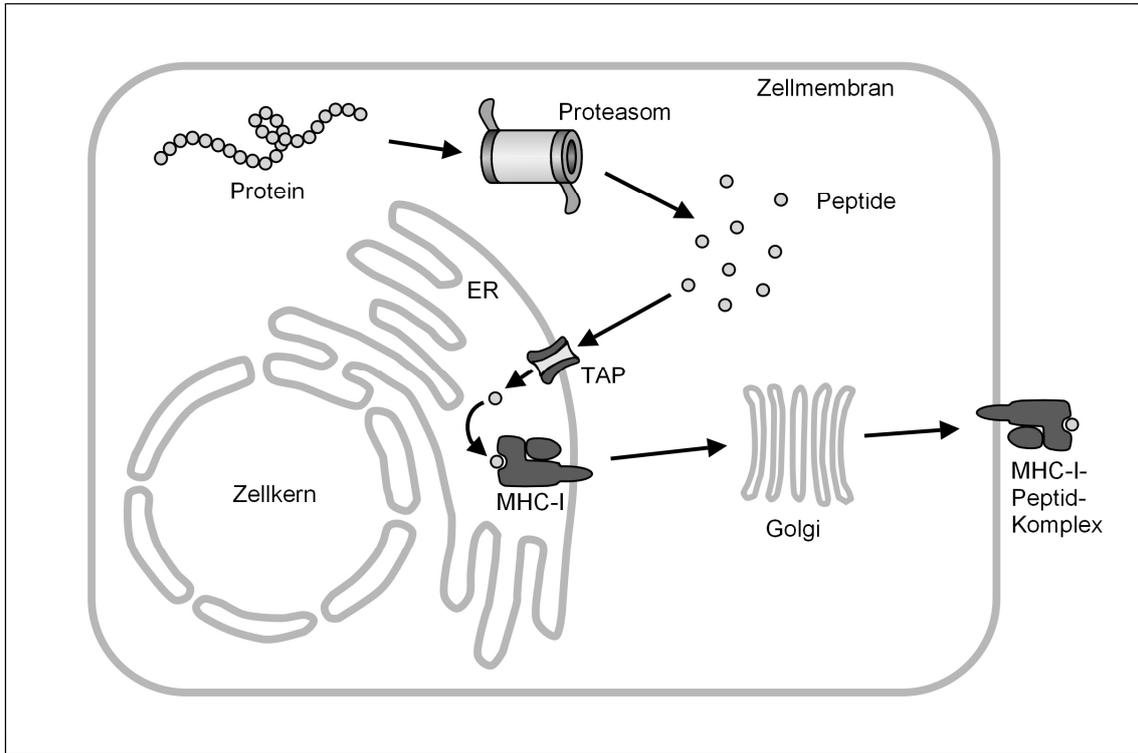


Abbildung 10.18: Antigenpräsentation durch eine kernhaltige Körperzelle. Zelleigene Proteine werden von Proteasomen zu Peptidfragmenten prozessiert. Die Peptide gelangen über TAP-Transporter in das endoplasmatische Retikulum, wo sie auf MHC-Klasse-I-Moleküle geladen werden. Die beladenen MHC-Klasse-I-Moleküle werden über den Golgi-Apparat auf die Zelloberfläche transferiert. Abkürzungen: ER = endoplasmatisches Retikulum; TAP = transporter associated with antigen presentation.

Danksagung

Diese Arbeit entstand in der Experimentellen Transplantations-Immunologie der Chirurgischen Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie (Chirurgische Klinik I) des Universitätsklinikums Würzburg unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christoph Otto.

Herrn Prof. Dr. med. Christoph-Thomas Germer, Direktor der Chirurgischen Klinik I des Universitätsklinikums Würzburg, danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für die finanzielle Unterstützung des Projektes.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christoph Otto, Leiter der Experimentellen Transplantations-Immunologie der Chirurgischen Klinik I, danke ich für die Überlassung des hochinteressanten, der immunologischen Grundlagenforschung zugehörigen Themas. Ich bin ihm überaus dankbar für die exzellente Betreuung und die vielen interessanten und lehrreichen Diskussionen. Seine Unterstützung und sein Engagement ermöglichten erst das Gelingen dieser Arbeit.

Frau Dr. rer. nat. Anja Matuschek danke für die praktische Unterstützung bei der Versuchsauswertung.

Frau Manuela Schneider und Frau Bettina Mühling danke ich für die Einarbeitung in die für diese Arbeit notwendigen Labortechniken und die Unterstützung bei technischen Problemen.

Weiterhin gilt mein Dank Frau Dr. Irina Chodnevskaja, Frau Sabine Gahn, Frau Monika Koospal, Frau Andrea Prappacher sowie Frau Lorraine Stevenson-Knebel.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir das Studium der Medizin und die Promotion ermöglicht haben. Für ihre stete, liebevolle Unterstützung gilt ihnen mein höchster Dank.

Lebenslauf

Hans Benno Leicht

Geboren am 29. April 1985 in Zweibrücken

1991 – 1995
1995 – 2004

Schulausbildung

Grundschule Sonnenfeld, Homburg/Saar

Gymnasium Johanneum, Homburg/Saar; Abschluss: Abitur

10/2004 – 03/2008

04/2008 – 03/2014

04/2014 – dato

Studium

Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Vorklinischer Studienabschnitt;

1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 12. März 2008

Klinischer Studienabschnitt;

2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 25. Oktober 2013

Promotionsstudium

09/2009

08/2010 – 09/2010

03/2011

03/2011 – 04/2011

Famulaturen

Experimentelle Mikrochirurgie in der Chirurgischen Klinik I des Universitätsklinikums Würzburg

Orthopädie in der Orthopädischen Klinik König-Ludwig-Haus, Würzburg

Allgemeinchirurgie in der Chirurgischen Klinik I des Universitätsklinikums Würzburg

Gastroenterologische Ambulanz in der Medizinischen Klinik und Poliklinik II des Universitätsklinikums Würzburg

02/2012 – 06/2012

06/2012 – 10/2012

10/2012 – 12/2012

Praktisches Jahr

Institut für Pathologie der Universität Würzburg

Innere Medizin am Universitätsklinikum Würzburg

Chirurgie am Universitätsklinikum Würzburg

11/2013

Approbation

Approbation als Arzt am 12. November 2013

Würzburg, den 15. Juli 2014

Hans Benno Leicht