

Molekulare Mechanismen der Kreuzpräsentation

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Catherine Gottschalk

aus

Gelsenkirchen

Bonn, Februar 2013

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Christian Kurts
2. Gutachter: Prof. Dr. Waldemar Kolanus

Tag der Promotion: 05.06.2013

Erscheinungsjahr: 2013

I	EINLEITUNG.....	1
1	Das adaptive Immunsystem in Immunität und Toleranz.....	1
1.1	Entwicklung und Funktion von CD8 ⁺ T-Zellen	2
1.2	Entwicklung und Funktion von B-Zellen	5
1.3	Entwicklung dendritischer Zellen.....	8
1.4	Dendritische Zellen in Toleranz und Immunität	10
1.5	Die Rolle der Niere im Immunsystem	12
1.6	Die Rolle inhibitorischer Rezeptoren in der Toleranzinduktion.....	14
2	Grundlagen der Kreuzpräsentation.....	19
2.1	Antigenaufnahme	19
2.2	Antigenpräsentation (klassisch)	20
2.3	Kreuzpräsentation	22
II	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	25
III	MATERIAL UND METHODEN	26
1	Material.....	26
1.1	Technisches Equipment	26
1.2	Chemikalien und Reagenzien.....	28
1.3	Software	30
1.4	Antikörper	31
1.5	Streptavidin-Konjugate	32
1.6	Antikörperbeschichtete magnetische Kügelchen (MACS Beads).....	33
1.7	Mauslinien	34
1.8	Puffer und Medien	35
1.8.1	Zellkulturmedien	35
1.8.2	Puffer und Lösungen	36
2	Methoden	40
2.1	Zellaufreinigung	40
2.1.1	Isolation von primären Lymphozyten	40
2.1.2	Isolation von dendritischen Zellen	40
2.1.3	Magnetbasierte Separation von Zellen	41
2.1.4	Aufreinigung von lebenden Lymphozyten.....	41

2.1.5	CFSE-Markierung	41
2.1.6	Zellzahlbestimmung	42
2.2	<i>in vivo</i> Experimente	42
2.2.1	Mausbehandlungen	42
2.2.2	Knochenmarkchimären	43
2.2.3	<i>in vivo</i> Antigenaufnahme	43
2.2.4	<i>in vivo</i> Zytotoxizität	44
2.3	Zellkultur	44
2.3.1	Kokultur von B-Zellen und T-Zellen	44
2.3.2	"OVA Schock"	45
2.3.3	Intrazelluläre Färbung für Mikroskopie	45
2.4	Analysemethoden	46
2.4.1	Apoptosebestimmung	46
2.4.2	Zytokin-ELISA	46
2.4.3	FACS-Analyse	48
2.5	Proteinbasierte Untersuchungen	49
2.5.1	Kovalente Kopplung von Proteinen	49
2.5.2	BCA Assay	49
2.5.3	Fluoreszenzmarkierung von Antikörpern und Proteinen	50
2.5.4	SDS- PAGE	50
2.5.5	Zellfraktionierung	51
2.5.6	Probenlyse für Western Blot	51
2.6	Statistik	52
IV	ERGEBNISSE	53
1	Mechanismen der B-Zellkreuzpräsentation	53
1.1	Antigenaufnahme und Präsentation	53
1.1.1	Aktivierungsstatus der B-Zellen nach Antigenaufnahme	53
1.1.2	B-Zellen präsentieren peptidbeladene MHC-I-Moleküle nach Antigenaufnahme	55
1.1.3	B-Zellen präsentieren exogene Antigene an CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen	55
1.2	Antigenprozessierung	57
1.2.1	Über den B-Zellrezeptor aufgenommene Proteine gelangen in stabile, frühendosomale Kompartimente	57
1.2.2	B-Zellen können für Präsentationsexperimente nicht fixiert werden	58

1.2.3	Kreuzpräsentiertes Antigen wird nicht in Lysosomen degradiert, sondern gelangt in Recycling-Endosomen	60
1.2.4	Über den B-Zellrezeptor aufgenommene Antigene gelangen in das Zytosol	61
1.2.5	MHC-I-Peptide für die Kreuzpräsentation werden von Proteasomen generiert....	63
1.3	Beladung der MHC-I-Komplexe.....	63
1.3.1	B-Zellkreuzpräsentation ist TAP-abhängig	64
1.4	Transport der beladenen MHC-I-Komplexe an die Zelloberfläche	65
1.4.1	Primaquin verbessert die B-Zellkreuzpräsentation	65
1.5	Über den Transferrinrezeptor aufgenommene Antigene können nach B-Zellrezeptorstimulation kreuzpräsentiert werden.....	67
2	Induktion von Kreuztoleranz gegen harmlose, zirkulierende Antigene im renalen Lymphknoten durch Batf3-abhängige, PD-L1⁺ dendritische Zellen	69
2.1	Toleranzinduktion im renalen Lymphknoten, aber nicht in der Milz ist PD-L1-abhängig.	69
2.1.1	Dendritische Zellen im renalen Lymphknoten und in der Milz nehmen lösliches Antigen in kurzer Zeit auf.....	69
2.1.2	PD-L1 verringert IFN- γ -Produktion und Proliferation und induziert Apoptose von CTL im renalen Lymphknoten.....	70
2.1.3	PD-1-Liganden spielen keine Rolle für die CTL-Toleranzinduktion in der Milz.....	74
2.1.4	PD-1 verursacht die Deletion von CTL im renalen Lymphknoten, aber nicht in der Milz	77
2.2	Antigenaufnehmende, Batf3-abhängige DC exprimieren PD-L1 im renalen Lymphknoten, aber nicht in der Milz.....	79
2.2.1	Filtrierbare Antigene werden im renalen Lymphknoten von XCR1 ⁺ Batf3-abhängigen DC aufgenommen, die PD-L1 exprimieren	79
2.2.2	Kreuzpräsentierende DC in der Milz zeigen keine distinkte PD-L1 Expression....	80
2.3	Kreuztoleranz im renalen Lymphknoten wird über Batf3-abhängige, PD-L1 ⁺ DC vermittelt.....	82
2.3.1	Apoptoseinduktion in CTL im renalen Lymphknoten findet über PD-L1 ⁺ und Batf3-abhängige Zellen statt	82
2.3.2	Generierung von Knochenmarkchimären	83
2.3.3	PD-L1 Expression auf Batf3-abhängigen DC ist notwendig für die Kreuztoleranzinduktion im renalen Lymphknoten.....	84

V DISKUSSION	86
1 B-Zellkreuzpräsentation	86
1.1 B-Zellkreuzpräsentation ist B-Zellrezeptorabhängig.....	86
1.2 Antigenpräsentation von B-Zellen ist empfindlich gegenüber Zellfixierung	88
1.3 Antigenprozessierung in B-Zellen.....	89
1.4 Beladung und Transport von MHC-I-Komplexen für die Kreuzpräsentation in B-Zellen	91
1.5 Etablierung einer B-Zellrezeptor-unabhängigen Kreuzpräsentation.....	94
2 Induktion von CTL-Kreuztoleranz im renalen Lymphknoten durch Batf3- abhängige DC	96
2.1 Rolle der verschiedenen DC-Unterarten in der Kreuztoleranz	96
2.2 Spezielle Rolle des renalen Lymphknotens.....	97
2.3 Induktion der Kreuztoleranz über PD-L1	98
2.4 Klinische Relevanz der Ergebnisse.....	101
VI ZUSAMMENFASSUNG	103
VII ABSTRACT	104
VIII REFERENZEN.....	105
IX ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	123
X ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	125
XI APPENDIX.....	127

I Einleitung

1 Das adaptive Immunsystem in Immunität und Toleranz

Das Immunsystem von Säugetieren dient der Bekämpfung gefährlicher Pathogene wie Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten. Es wird unterteilt in die angeborene (innate) Immunität und die erworbene (adaptive) Immunität. Beide Zweige des Immunsystems haben sich unabhängig voneinander entwickelt, sind aber eng miteinander verknüpft. Während das innate Immunsystem die erste Verteidigungslinie gegen eindringende Pathogene darstellt, kann das adaptive Immunsystem nach kurzer Aktivierungsphase spezifisch gegen Erreger vorgehen.

Bei der innate Immunantwort werden Pathogene über stark konservierte Rezeptoren erkannt und generalisierte Abwehrmechanismen abgerufen. Im Gegensatz dazu ist die adaptive Immunantwort durch Lymphozyten mit antigenspezifischen Rezeptoren auf den jeweiligen Erreger spezialisiert. Das adaptive Immunsystem lässt sich in den zellulären und den humoralen Arm unterteilen¹. Der zelluläre Teil des erworbenen Immunsystems wird von T-Lymphozyten repräsentiert. Diese erkennen mit Hilfe ihres T-Zellrezeptors Proteinfragmente, die an Haupthistokompatibilitätskomplexe (major histocompatibility complex, MHC) von antigenpräsentierenden Zellen (antigen presenting cell, APC) gebunden sind². Der humorale Teil des adaptiven Immunsystems wird von B-Lymphozyten gestellt, die ganze lösliche Proteine über ihren B-Zellrezeptor erkennen können.

Durch somatische Hypermutationen und genetische Rekombinationen des Antigenrezeptorsegments reicht eine kleine Anzahl von Genen aus, um eine hohe Diversität in den Antigenrezeptoren verschiedener Lymphozyten zu schaffen.

Nach Aktivierung antigenspezifischer Lymphozyten untergehen diese der klonalen Expansion und tragen zur Klärung der Infektion bei. Ein Teil der antigenspezifischen Lymphozyten kann sich zu Gedächtniszellen entwickeln, die bei Wiederkehren des Erregers eine schnelle und effektive Immunantwort initiieren können. Das immunologische Gedächtnis ist langlebig und ein wichtiger Bestandteil der erworbenen Immunität.

Fehler bei der Unterscheidung von Selbst und nicht-Selbst oder gefährlich und harmlos können einerseits zu anhaltenden Infektionen, andererseits zu Autoimmunerkrankungen und Allergien führen. Um Autoimmunerkrankungen zu limitieren, gibt es zentrale und periphere Mechanismen, die selbstreaktive Lymphozyten ausschalten sollen. Die Fähigkeit, körpereigene Bestandteile oder harmlose Substanzen als solche zu erkennen und Immunreaktionen dagegen zu unterdrücken, wird Toleranz genannt³.

1.1 Entwicklung und Funktion von CD8⁺ T-Zellen

T-Zellen sind Teil des zellulären Arms des adaptiven Immunsystems und wichtig in der Abwehr gegen virale, bakterielle und parasitäre Infektionen⁴. Es gibt verschiedene Arten von T-Zellen, die alle im Thymus aus hämatopoietischen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark generiert werden^{5, 6}. Die erste Vorstufe von T-Zellen im Thymus sind sogenannte "early thymic progenitors", aus denen neben T-Zellen noch dendritische Zellen, natürliche Killerzellen und Makrophagen entstehen können^{7, 8}. In ihrer nächsten Entwicklungsstufe entstehen im Kortex CD4⁻ CD8⁻ T-Zellen, die auch als doppelt-negative (DN) Zellen bezeichnet werden⁹. Diese DN Zellen unterlaufen einer T-Zellrezeptorrearrangierung, bei dem die $\gamma\delta$ T-Zellen und die Vorstufen der klassischen $\alpha\beta$ T-Zellen entstehen. Letztere reifen in der subkapsulären Zone des Thymus weiter aus, wandern wieder in den Kortex ein, rearrangieren dort die α -Kette des T-Zellrezeptors und werden zu CD4⁺ CD8⁺ T-Zellen⁹. Doppelt-positive T-Zellen untergehen an dieser Stelle einer Positivselektion, was bedeutet, dass nur T-Zellen mit mittlerer Avidität für Selbst-MHC überleben¹⁰. Anschließend differenzieren diese zu einzelpositiven CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen und untergehen in der Medulla einer Negativselektion. Hierbei werden alle Zellen eliminiert, die eine zu hohe Affinität für Selbstantigene aufweisen^{11, 12}. Die dazu notwendige Antigenpräsentation wird durch Thymusepithelzellen angeboten, die mit Hilfe des Transkriptionsfaktors "autoimmune regulator" (AIRE) körpereigene Proteine produzieren und zusammen mit MHC-II, CD40, CD80 und PD-L1 auf ihrer Oberfläche präsentieren (Schema siehe Abbildung I-1).

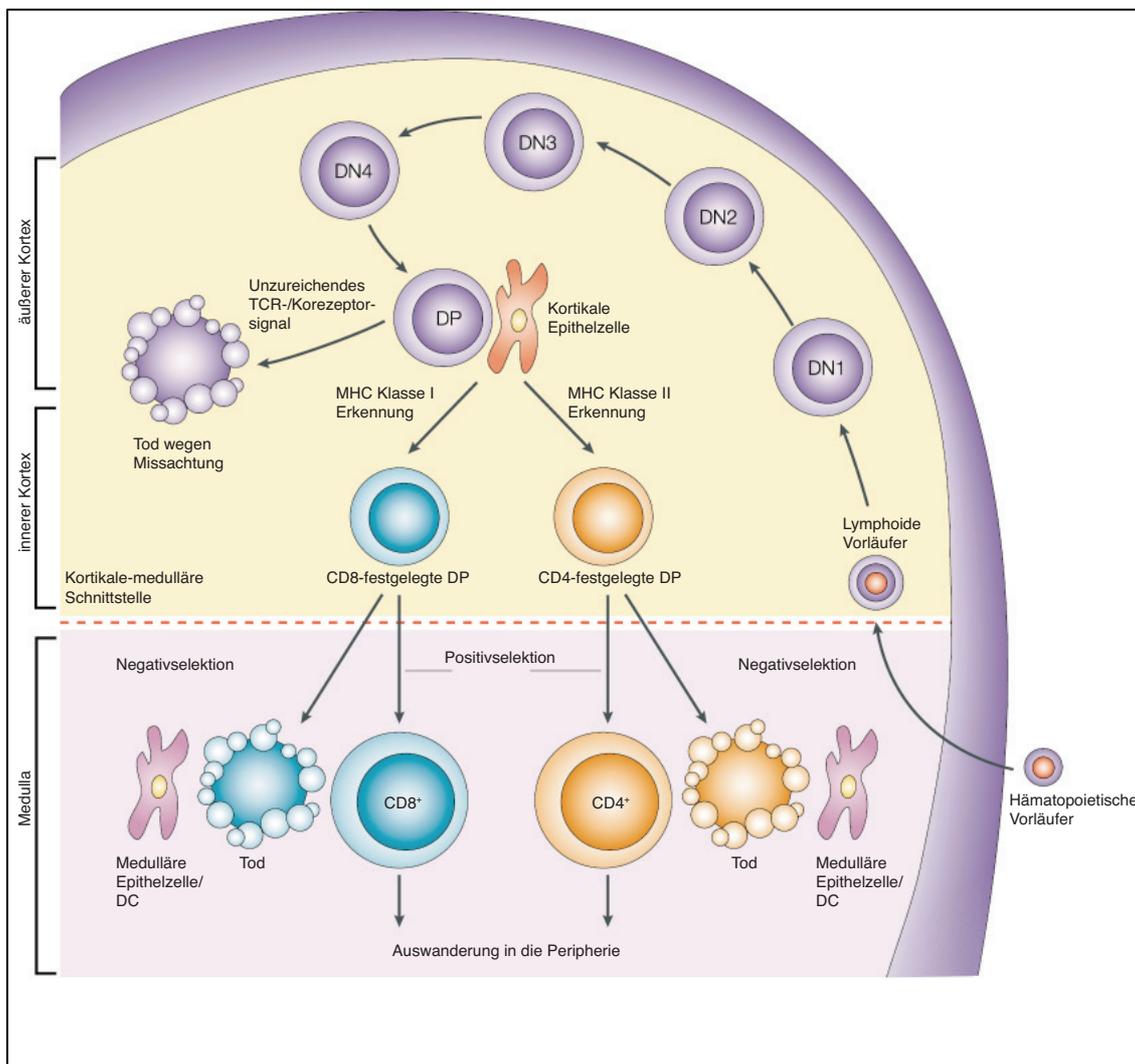


Abbildung I-1: Schematische Darstellung der T-Zellentwicklung

Übersetzt und nachgedruckt mit Erlaubnis von Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Immunology, R. N.Germain, T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision¹³, Copyright 2002

CD8⁺ T-Zellen sind die Killer des adaptiven Immunsystems und kritisch für die Resistenz gegen intrazelluläre Infektionen. Die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen erfolgt durch die Interaktion des T-Zellrezeptors mit einem 8-10 Aminosäuren langem Peptid auf MHC-I, sowie kostimulatorischen Molekülen, die von professionellen antigenpräsentierenden Zellen exprimiert werden¹⁴. Beim ersten Kontakt mit einem Pathogen, wofür eine CD8⁺ T-Zelle den spezifischen Rezeptor aufweist, untergeht diese einer klonalen Expansion, was zu einer rapiden und starken Zunahme der Zahl von spezifischen T-Zellklonen führt^{15, 16}. Die so entstehenden Effektorzellen sind zytotoxische T-Lymphozyten (cytotoxic T lymphocytes, CTL), die über verschiedene Mechanismen infizierte Zellen eliminieren bzw. lysieren können. Ein Zytolyse induzierender Signalweg läuft über Fas/Fas Ligand Interaktion mit infizierten Zellen, was zu aktivem Zelltod derselben führt^{17, 18}. Daneben können CD8⁺ T-Zellen Perforin produzieren, welches Porenbildung in der Zielzelle und Import von Granzym B einleitet, worüber Caspasen aktiviert werden, was in Apoptose der Zielzelle mündet^{19, 20}.

Neben diesen direkten Mechanismen können CD8⁺ T-Zellen auch inflammatorische Zytokine, wie IFN- γ und TNF α produzieren, die zur Aktivierung weiterer Effektorzellen oder zum Zelltod von infizierten Zellen führen²¹. Auch Chemokine, welche Infektionen beeinflussen können, werden von CD8⁺ T-Zellen produziert^{22, 23}.

Ein letzter Mechanismus, den sich CD8⁺ T-Zellen zur Bekämpfung von Pathogenen zu Nutze machen, ist die Produktion von Granulysin, was in *in vitro* Kulturen als Mikrobiozid fungiert^{24, 25}.

Die Spannweite von Effektorfunktionen trägt dazu bei, dass CD8⁺ T-Zellen in vielerlei verschiedenen Infektionen maßgeblich zur Klärung beitragen. Darunter fallen virale, bakterielle und parasitäre Infektionen, sofern sie intrazellulär vorliegen. Dabei ist je nach Pathogen eine andere Effektorfunktion oder eine Kombination von Effektorfunktionen der CD8⁺ T-Zellen ausschlaggebend für die Klärung⁴.

Da CD8⁺ T-Zellen ihr Antigen potentiell auf jeder kernhaltigen Zelle über MHC-I erkennen können, ist die Etablierung von Toleranzmechanismen hier besonders wichtig²⁶. Trotz relativ effektiver Negativselektion im Thymus sind periphere Toleranzmechanismen bedeutend, da harmlose Nahrungs-, Umgebungs- oder Selbstantigene, die nicht im Thymus exprimiert werden, ungewollte Immunreaktionen auslösen könnten²⁶. Die periphere Toleranz umfasst klonale Ignoranz, Anergie und Tod durch Deletion²⁷⁻²⁹. T-Zellen, deren T-Zellrezeptoravidität zu niedrig für die Negativselektion war und deren Affinität unter der Grenze zur T-Zellaktivierung liegt, werden zumeist ignorant²⁷. Klonale Deletion ist meistens ein Produkt von kontinuierlichem Antigenstimulus mit niedrigen Antigendosen³⁰. Ein vorgeschlagener Mechanismus hierbei ist die Herabregulation des IL-7 Rezeptors, der in naiven T-Zellen dazu beiträgt, anti-apoptotische Moleküle zu exprimieren. Die fehlende Kostimulation mit gleichzeitigem T-Zellrezeptorsignal führt somit zu Tod durch Deletion²⁶. Eine große Rolle kommt hier auch der Balance zwischen Kostimulation und Koinhibition zu. Funktionelle Unempfindlichkeit, auch Anergie genannt, tritt auf, wenn zwar eine MHC-Antigen-Interaktion zustande gekommen ist, dabei aber jegliche Kostimulation fehlt. Repetitive hohe Dosen von Antigen können zu T-Zellanergie führen, die sich durch verminderte Proliferation und zytolytische Aktivität nach Restimulation äußert³¹.

Auch in CD8⁺ T-Effektorzellen kann periphere Toleranz induziert werden, was Einfluss auf die laufende Immunreaktion und die Generierung einer Gedächtnisantwort hat³²⁻³⁴. In chronischen Infektionen können diese Mechanismen zu nicht funktionellen, erschöpften CD8⁺ T-Zellen führen³⁵⁻³⁷ (Übersicht siehe Abbildung I-2).

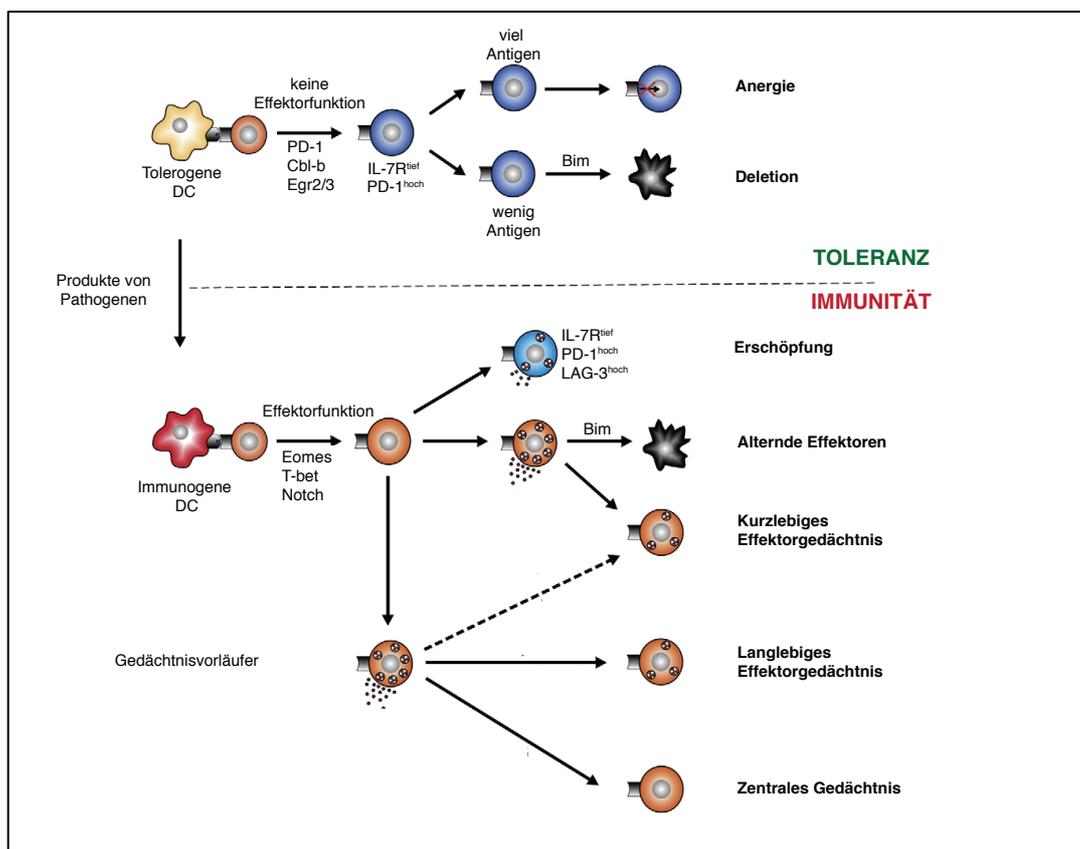


Abbildung I-2: Schematische Darstellung des Schicksals von aktivierten CD8⁺ T-Zellen
 Übersetzt und nachgedruckt mit Erlaubnis von ELSEVIER LTD., CURRENT OPINION JOURNALS,
 S. M. Kaech, Current Opinion in Immunology 2009^{ref38}

Die Aktivierung oder Tolerisierung von CD8⁺ T-Zellen gegen lösliche Antigene aus der Blutzirkulation findet hauptsächlich in den sekundären lymphatischen Organen, wie den Lymphknoten und der Milz statt³⁹⁻⁴¹. Auch in der Leber kann lösliches Antigen an T-Zellen mit tolerogenem Ergebnis präsentiert werden⁴². Dass die Niere durch den hohen Antigendurchsatz und ihre spezielle Anatomie auch eine Funktion in der peripheren Toleranzinduktion spielt wird vermutet⁴³. Um Autoimmunerkrankungen und persistierende Virusinfektionen besser bekämpfen zu können, ist es wichtig, die Bedeutung der verschiedenen Organe und kreuzpräsentierenden Zellpopulationen zu verstehen.

1.2 Entwicklung und Funktion von B-Zellen

Eine besondere Rolle im adaptiven Immunsystem nehmen B-Zellen ein, da sie zum einen als antikörperproduzierende Zelle Bestandteil des humoralen Arms des Immunsystems sind, sie zum anderen aber auch als antigenpräsentierende Zelle fungieren können⁴⁴⁻⁴⁶.

B2 B-Zellen bilden zusammen mit T-Zellen den Hauptteil der adaptiven Immunantwort^{47, 48}. Die Entwicklung von B2 B-Zellen findet bei Wirbeltieren in der fötalen Leber oder dem adulten Knochenmark statt⁴⁹⁻⁵¹.

Aus hämatopoietischen Stammzellen differenzieren zunächst sogenannte Pro-B-Zellen, welche sich weiter über das Prä-B-Zellstadium zu unreifen transitionalen B-Zellen entwickeln. Die Entwicklung zu reifen B-Zellen findet nicht mehr im Knochenmark, sondern in der Milz statt⁵². Naive B-Zellen zirkulieren durch Blut, Gewebe und Lymphe und sind ebenfalls wieder im Knochenmark zu finden^{53, 54}. Werden sie über den B-Zellrezeptor (B cell receptor, BCR) aktiviert, differenzieren sie in der Milz oder in peripheren Lymphknoten zu Prä-Plasmazellen. Diese können ins Knochenmark oder an mukosale Oberflächen wandern, wo sie zu Plasmazellen ausreifen^{55, 56}.

Der B-Zellrezeptor, mit dem B-Zellen Antigene erkennen und aufnehmen können, ist die membrangebundene Form des Antikörpers, welchen die B-Zelle nach Ausdifferenzierung zur Plasmazelle sezernieren kann⁵². Antikörper bestehen aus zwei über Disulfidbrücken gepaarten schweren und leichten Polypeptidketten, die jeweils aus einer konstanten und einer polymorphen Region bestehen⁵⁷. Mit der variablen (polymorphen) Region können Proteine oder Kohlenhydrate gebunden und als Antigen erkannt werden⁴⁷. Die folgende Effektorfunktion wird über die konstante Region vermittelt^{58, 59}. Eine Funktion der Antikörper besteht in der Neutralisierung von Toxinen, so dass es zu keinen Wechselwirkungen mit Körperzellen kommen kann⁶⁰. Zur Effektorfunktion zählt auch die Opsonierung von Pathogenen, durch die die Aufnahme des Pathogens durch phagozytierende Zellen verstärkt wird⁵⁸. Zusätzlich wird das Komplementsystem aktiviert, das aus Serumproteinen zusammengesetzt ist und durch Antikörper vermittelte Aktivierung zur Zerstörung der Pathogene führt⁶¹. Antikörper, die an körpereigene Zellen binden, können natürliche Killerzellen (NK Zellen) aktivieren, die diese Zellen schließlich abtöten. Dieser Prozess wird auch antikörpervermittelte Zytotoxizität genannt⁵⁹.

An Hand ihrer schweren Kette können Antikörper, die zur Immunglobulin-(Ig)-Superfamilie gehören, in fünf funktionell unterschiedliche Klassen unterteilt werden: IgM, IgD, IgG, IgA und IgE. Das anfänglich vorhandene IgM liegt als Pentamer vor und dient hauptsächlich der Komplementaktivierung⁶², während die Monomere der IgG-Subklassen zusätzlich Phagozytose über Fc-Rezeptoren vermitteln und zudem plazentagängig sind^{63, 64}.

IgD wird nur in geringen Mengen sezerniert, da es vor allem als Antigenrezeptor zur frühen Aktivierung der B-Zelle dient⁶⁵. IgD kann zusätzlich eine positive Aktivierungsschleife über die Anregung zur Sezernierung B-Zell-stimulierender Faktoren durch Basophile erzeugen⁶⁶. Das epithelgängige IgA liegt als Dimer vor und vermittelt mukosale Immunität, indem es Toxine und Mikroben neutralisiert⁶⁷. Globuline der Klasse IgE spielen eine Rolle bei allergischen Reaktionen, da sie die Degranulierung von Mastzellen nach Bindung an Fcε-Rezeptoren vermitteln⁶⁸. Die leichte Kette aller Subklassen kann als Lambda- oder Kappa-Kette vorkommen, die sich funktionell jedoch nicht unterscheiden⁴⁷.

Membrangebundenes Immunglobulin (mIg) ist bis auf eine kleine Region am Carboxylende der schweren Region mit sezernierten Antikörpern identisch und dient in erster Linie als Antigenrezeptor^{69, 70}. Nach Binden des Antigens und Kreuzvernetzung mehrerer B-Zellrezeptoren führt die Phosphorylierung des ITAM-Motivs im Iga-Igβ Heterodimer zur Rekrutierung und Aktivierung von Syk^{71, 72}. An ein anderes nicht-ITAM-Tyrosinmotiv von Iga bindet außerdem BLNK, an dem Grb2, PLCγ, Vav und Nck assembliert werden, welche zusammen mit Syk unter anderem zu einer für das Überleben der B-Zellen essentiellen NFκB Aktivierung führen^{71, 73, 74} (Übersicht siehe Abbildung I-3).

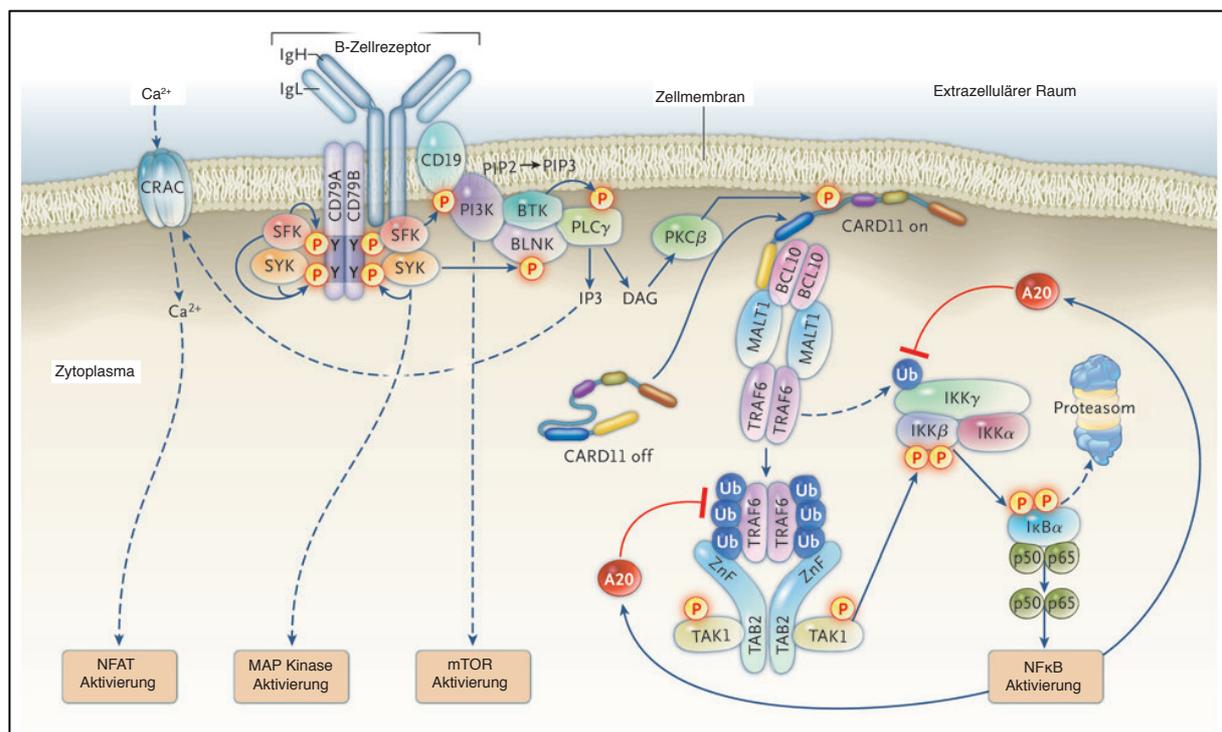


Abbildung I-3: Signalübertragung nach B-Zellrezeptoraktivierung
 Übersetzt und nachgedruckt mit Genehmigung von Lenz und Staudt, N Engl J Med 2010^{ref75}
 Copyright Massachusetts Medical Society

Neben der Signalübertragung dient der B-Zellrezeptor aber auch der Internalisierung des gebundenen Antigens. Unligierte B-Zellrezeptoren werden kontinuierlich über clathrin-vermittelte Endozytose aufgenommen und über transferrinpositive, frühendosomale Kompartimente zurück an die Oberfläche gebracht⁷⁶. Diese Internalisierung des B-Zellrezeptors ist vom ITAM-Motiv des Iga-Igβ Heterodimers und der Syk-Aktivierung abhängig^{76, 77}.

Die Kreuzvernetzung des B-Zellrezeptors mit seinem kognaten Antigen verstärkt die Rezeptorinternalisierung. Es bilden sich sogenannte "Caps", in denen die meisten Oberflächenrezeptorkomplexe enthalten sind und die innerhalb weniger Minuten internalisiert werden⁷⁸. Hierfür sind weder das ITAM-Motiv, noch das Igα-Igβ Heterodimer oder andere bekannte Motive notwendig. Nach Aufnahme des Antigen-B-Zellrezeptorkomplexes wird das Antigen vom Rezeptor abgespalten^{79, 80}. Während der Antigenrezeptor zurück an die Oberfläche gebracht werden kann, wird das Antigen in der Zelle degradiert und über MHC- II an CD4 T-Zellen präsentiert⁸¹ oder über MHC-I an CD8⁺ T-Zellen kreuzpräsentiert⁸². Auf welche Weise Kreuzpräsentation in B-Zellen funktioniert, ist derzeit noch unbekannt.

1.3 Entwicklung dendritischer Zellen

Dendritische Zellen (dendritic cells, DC) werden als Brücke zwischen dem innaten und adaptiven Immunsystem angesehen. Zuerst beschrieben wurden dendritische Zellen der Haut durch P. Langerhans, aber ihre Rolle und Funktion in der adaptiven Immunantwort wurde erst ca. 100 Jahre später von R. Steinman aufgedeckt⁸³. Die Differenzierung von dendritischen Zellen beginnt im Knochenmark aus hämatopoietischen Stammzellen, aus denen wiederum myeloide oder lymphoide Vorläuferzellen entstehen⁸⁴. Aus myeloiden Vorläuferzellen differenzieren sich Monozyten, Makrophagen und DC-Vorläufer, aus denen sich die allgemeinen DC-Vorläufer entwickeln können⁸⁵⁻⁸⁷. Immer noch im Knochenmark entstehen aus diesen ausdifferenzierte plasmazytoide dendritische Zellen und pre-konventionelle dendritische Zellen. Letztere werden in die Blutzirkulation entlassen und können in lymphoide Organe einwandern, wo aus ihnen CD8⁺ und CD8⁻ CD11b⁺ konventionelle DC entstehen^{85, 88}. Aus dem Blutkreislauf können pre-konventionelle DC ebenfalls in nicht-lymphoide Organe, wie z.B. die intestinale Lamina Propria einwandern, wo aus ihnen CD103⁺ DC werden^{89, 90}.

Die exakte Bestimmung der Herkunft und die Diskriminierung der Klassen von dendritischen Zellen durch verschiedene Oberflächenmoleküle ist zum Teil kontrovers diskutiert. Dennoch herrscht Einigkeit darüber, dass DC-Unterarten sich in ihren Aufgaben, den Kapazitäten zur Antigenpräsentation und T-Zellaktivierung unterscheiden.

In Milz und Lymphknoten können die so genannten konventionellen DC in CD8⁺ CD11b⁻ und CD8⁻ CD11b⁺ Unterklassen eingeteilt werden⁹¹. CD8⁺ CD11b⁻ DC sind spezialisiert auf Antigenaufnahme und -kruzpräsentation an CD8⁺ T-Zellen auch unter homöostatischen Bedingungen⁹². Kreuzpräsentierende DC sind vom Transkriptionsfaktor "basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 3" (Batf3) abhängig, der bei Defizienz durch Batf oder Batf2 substituiert werden kann^{93, 94}. Entgegen der traditionellen DC-Charakterisierung sind nicht alle CD8⁺ DC der Milz Batf3-abhängig, aber Batf3-unabhängige CD8⁺ DC sind nicht in der Lage, Antigen an CD8⁺ T-Zellen zu kruzpräsentieren⁹³. Unterstützend zu dieser neuen Einteilung können Batf3-abhängige, kruzpräsentierende DC durch den Chemokinrezeptor XCR1 auf der Oberfläche identifiziert werden, der nur auf kruzpräsentierenden CD8⁺ Milz-DC vorhanden ist⁹⁵. Auch CD8⁻ CD11b⁺ konventionelle DC können zusätzlich zur klassischen Einteilung in zwei Lager gespalten werden. Notch2-abhängige CD11b⁺ DC weisen typische DC-Morphologie auf und können CD4⁺ T-Zellen aktivieren, während Notch-2 unabhängige CD11b⁺ DC eher Monozyten ähneln und inflammatorische Zytokine produzieren^{96, 97}. Diese Unterteilungen zeigen die Heterogenität von DC Unterklassen in der Milz, die sich auch in der Peripherie fortführt.

In der intestinalen Lamina Propria z.B. finden sich Batf3-abhängige CD103⁺ CD11b⁻ DC, die funktionell den CD8⁺ XCR1⁺ DC der Milz entsprechen und ebenfalls über XCR1 identifiziert werden können⁹⁸. Notch-2 abhängige CD11b⁺ CD103⁺ Zellen können CD4⁺ T-Zellen im mesenterialen Lymphknoten aktivieren und sind DC-ähnlich^{90, 96, 99}, während CD11b⁺ CD103⁻ DC von Monozyten abstammen und mit Makrophagen verwandt sind^{89, 90, 100}. Diese von Monozyten abstammenden CD11b⁺ CD103⁻ DC in der Peripherie sekretieren inflammatorische Zytokine, wie ihr Gegenstück in der Milz (DC-Übersicht siehe Tabelle 1).

DC-Art	DC-Unterart	Phänotyp	Lokalisierung	Antigenpräsentation
Lymphoide DC	CD8 ⁺	CD11c ⁺ CD11b ⁻ CD8 ⁺ CD4 ⁻ CD103 ^{+/+}	Milz, Lymphknoten, Thymus	Kreuzpräsentation
	CD4 ⁺	CD11c ⁺ CD11b ⁺ CD8 ⁻ CD4 ⁺	Milz, Lymphknoten	MHC-II-Präsentation
	CD8 ⁻ CD4 ⁻ DN	CD11c ⁺ CD11b ^{+/+} CD8 ⁻ CD4 ⁻	Milz, Lymphknoten	MHC-II-Präsentation
Migratorische DC	Langerhans	CD11c ⁺ CD8 ⁻ CD103 ⁻ CD207 ⁺	Epidermis	Präsentation von Selbstantigenen zur Toleranzinduktion
	CD11b ⁺ DC	CD11c ⁺ CD11b ⁺ CD8 ⁻ CD103 ^{+/+}	diverse Organe	MHC-II-Präsentation
	CD103 ⁺ DC	CD11c ⁺ CD11b ^{+/+} CD8 ⁻	Interstitium, Lunge	Kreuzpräsentation
Inflammatorische DC	Tip-DC	CD11c ⁺ CD11b ⁺ Ly6C ⁺	Entzündungsort	Kreuzpräsentation

Tabelle 1: DC-Subtypen, modifiziert nach Turley *et al.*, Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Immunology, Copyright 2010^{ref101}

Dendritische Zellen in anderen nicht-lymphoiden Organen lassen sich nicht ohne Weiteres den klassischen Populationen zuordnen. So sind DC in der Niere z.B. dadurch gekennzeichnet, dass sie zwar MHCII⁺, CD11c⁺ und CD11b^{niedrig} sind, trotzdem weisen sie eine hohe F4/80 Expression auf, die normalerweise ein Charakteristikum für Makrophagen ist¹⁰².

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die ursprüngliche Unterteilung der CD8⁺ und CD8⁻ Unterarten durch neue Marker wie XCR1 zum Teil in Frage gestellt oder ergänzt wurde. Was bleibt, ist die Unterscheidung von organresidenten und migratorischen DC und die Tatsache, dass in der Milz und in Geweben distinkte DC-Populationen auf unterschiedliche Funktionen spezialisiert sind. Dazu gehören z.B. die Antigenpräsentation, Antigenkruzpräsentation oder die Produktion inflammatorischer Zytokine.

1.4 Dendritische Zellen in Toleranz und Immunität

Im Fall einer Infektion können dendritische Zellen Pathogene über so genannte "pathogen recognition receptors" (PRR) erkennen¹⁰³. Lange wurde vermutet, dass aktivierte DC Zytokine produzieren, in die T-Zellzone von lymphoiden Organen migrieren, dort das entsprechende Antigen präsentieren und T-Zellen aktivieren^{104, 105}. Unter homöostatischen Bedingungen ohne die Anwesenheit von Pathogenen würde präsentiertes (Selbst-)Antigen zu T-Zelltoleranz führen^{106, 107}. Dieses relativ simple Bild von Immunität und Toleranzinduktion durch DC wird durch die beschriebene Heterogenität der einzelnen DC Unterarten verkompliziert. Es wird angenommen, dass im Interstitium CD11b⁺ CD103⁻ und Notch-2 unabhängige DC eher dazu fähig sind, nach Antigenerkennung entsprechende Zytokine zu sekretieren^{96, 108}, während CD11b⁺ CD103⁺ DC von diesen Zytokinen profitieren und Antigen aufnehmen und präsentieren^{90, 91}. Für andere Organe konnte eine solche "Arbeitsteilung" noch nicht entsprechenden DC-Arten zugeordnet werden. Auch besteht weiterhin die Frage, ob diese Heterogenität bedeutet, dass es eine spezielle tolerogene Unterart von DC unter homöostatischen Bedingungen gibt. Es wurden zwar tolerogene und regulatorische DC-Varianten postuliert^{106, 107}, diese konnten aber durch genetische Analysen noch nicht bestätigt bzw. sogar widerlegt werden^{98, 99}. In artifiziellen Systemen, wie genetisch veränderten Mauslinien und in *in vitro* Kulturen konnten tolerogene DC jedoch entstehen^{109, 110}. Eine besondere Rolle scheint deswegen das Milieu und die Anwesenheit oder Abwesenheit von Pathogenen zu spielen.

Unter inflammatorischen Bedingungen wurde gezeigt, dass konventionelle DC essentiell für die Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen *in vivo* sind. Speziell wurde nachgewiesen, dass kreuzpräsentierende Batf3-abhängige DC die zytotoxische T-Zellantwort gegen das *West-Nile-Virus* und das *Sendai-Virus* initiieren^{93, 98}. Gleichzeitig sind diese DC auch für die T-Zell-medierte Antwort gegen *Toxoplasma gondii* Infektionen notwendig¹¹¹. Andererseits können Pathogene diese DC für ihre Zwecke ausnutzen. So transportieren Batf3-abhängige DC Listerien in die weiße Pulpa der Milz, wo es erst zu einer produktiven Infektion kommt¹¹².

Unter nicht-inflammatorischen Bedingungen spielen DC eine Rolle in der zentralen und peripheren Toleranzinduktion. In der zentralen Toleranz kreuzpräsentieren Thymus-DC Selbstantigene, die sie von medullären Thymusepithelzellen erhalten¹¹³⁻¹¹⁵. Auch periphere DC können in den Thymus einwandern und dort durch Antigenpräsentation Toleranz induzieren¹¹⁶. Es ist unklar, ob dieser Mechanismus auch unter natürlichen Bedingungen agiert oder nur in artifiziellen Systemen vorkommt.

Die Rolle von DC in der peripheren Toleranz konnte unter homöostatischen Bedingungen dadurch gezeigt werden, dass gezieltes Einbringen von Antigen in DC über DC-spezifische Antikörper zu T-Zelltoleranz führt¹¹⁷⁻¹¹⁹. Diese Ansätze sind allerdings kritisch zu betrachten, da ein vorrangig dazu genutzter Rezeptor, DEC205 (CD205), nicht nur auf konventionellen DC gefunden werden kann, sondern mittlerweile auch auf anderen Zellen, wie z.B. Makrophagen, Granulozyten und B-Zellen, identifiziert wurde¹²⁰. Ein anderer verwendeter Rezeptor, 33D1, ist zwar DC-spezifisch, aber nur für eine spezielle, funktionell distinkte DC-Unterart der CD11b⁺ konventionellen DC^{96, 97}. Auch konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor, über den das Antigen in die DC eingebracht wird, selbst eine Rolle spielt. So können plasmazytoide DC T-Zellen aktivieren oder tolerisieren, je nachdem, ob "bone marrow stromal cell Ag 2" (BST2) oder Siglec-H als Zielrezeptor verwendet wurde^{121, 122}.

Einen genetisch basierten Hinweis, dass DC periphere Toleranz induzieren, brachte die Cre-Rekombinase basierte Expression von Modellantigenen *in vivo*. Eine solche Expression von immundominanten Virusepitopen durch DC führt zu einer CD8⁺ T-Zellanergie, die nicht durch eine folgende Virusinfektion gebrochen werden kann. Die T-Zellanergie wird begleitet von der Expression von PD-1 und CTLA-4 auf CD8⁺ T-Zellen und der Induktion sogenannter regulatorischer T-Zellen (T_{regs})^{123, 124}.

Während die antikörpervermittelten und genetischen Ansätze darauf hindeuten, dass DC eine Rolle in der peripheren T-Zelltoleranz spielen, so führt die Deletion von konventionellen DC nicht zu einer Hyperaktivierung von T-Zellen¹²⁵. Daraus folgt, dass homöostatische DC die Fähigkeit besitzen, T-Zellen zu tolerieren, sie aber nicht zwingend notwendig zur Aufrechterhaltung dieser Toleranz sind. Da DC durch das Liefern tonischer Signale auch für das Überleben von T-Zellen gebraucht werden^{126, 127}, wird vermutet, dass autoreaktive T-Zellen immer zwei Signale erhalten. Ein tolerisierendes Signal über das Selbstantigen und ein tonisches schwach agonistisches Signal über den MHC-Peptid-Komplex. Depletiert man dendritische Zellen, so fallen beide Signale weg, was weiterhin zu fehlender Selbstreaktivität führt⁹¹.

Änderungen in der DC-Funktionalität durch Entfernen von Negativregulatoren oder durch erhöhte Aktivierung führen jedoch immer zu verstärkter Inflammation und/oder Autoimmunität^{128, 129}.

Die letzten Jahrzehnte haben gezeigt, dass es für therapeutische Ansätze schwierig ist, DC als tolerogene Zellen einzusetzen, da keine distinkte tolerogene Unterart existiert und eine Vorhersage des Therapieergebnisses nahezu unmöglich ist. Die Möglichkeit, DC als effiziente Toleranzbrecher z.B. in der Tumorimmunität einzusetzen, ist allerdings gegeben. Ein Organ, in dem diese duale Rolle von dendritischen Zellen besonders deutlich wird, ist die Niere. Während renale DC in akuten Infektionen anti-inflammatorische Eigenschaften aufweisen und Effektor-T-Zellen tolerieren, können sie in chronischen Entzündungen pro-inflammatorisch und T-Zell-aktivierend wirken¹³⁰. Der dafür zuständige Mechanismus ist derzeit noch unklar.

1.5 Die Rolle der Niere im Immunsystem

Die Aufgaben der Niere umfassen die Regulierung des Wasserhaushalts des Körpers, die langfristige Regulierung des Blutdrucks und die Ausscheidung harnpflichtiger (z.B. Harnsäure, Harnstoff, Kreatinin) und giftiger Substanzen^{131, 132}. Zusätzlich gehören die Einstellung des Säure-Basen-Haushalts des Körpers und des Elektrolytgehalts im Blut, sowie die Bildung von Hormonen und eine Beteiligung an der Synthese von Zucker zum Aufgabenbereich der Niere^{131, 133}. Die Niere besteht aus einem komplexen Tubulussystem, das sich über Cortex und Medulla der Niere erstreckt¹³³. Die wichtigste funktionelle Untereinheit ist hierbei das Nephron, das aus Nierenkörperchen und Nierenkanälchen besteht.

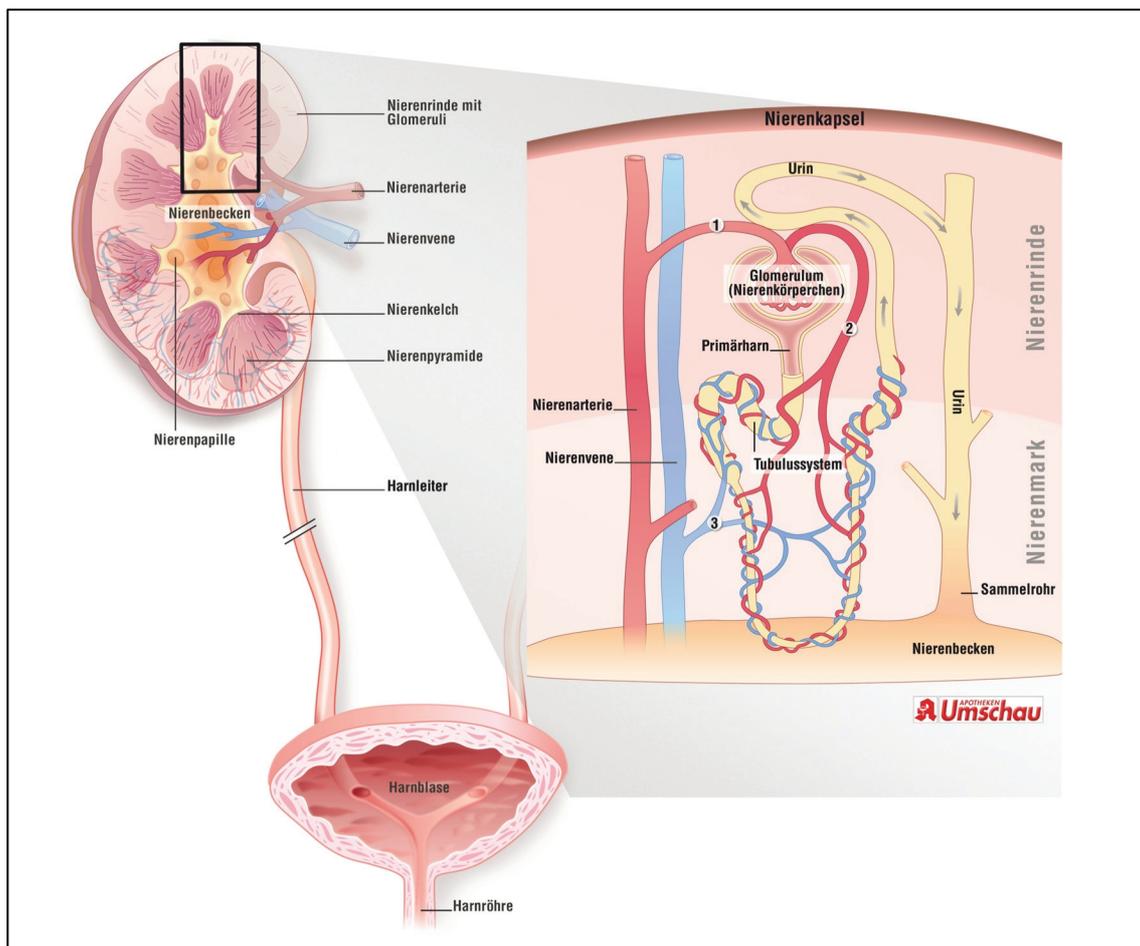


Abbildung I-4: Aufbau der Niere

Abbildung übernommen aus der Internetpräsenz der Apotheken-Umschau
 (<http://www.apotheken-umschau.de/Nierenbeckenentzündung>) mit Genehmigung durch den
 Wort&Bild Verlag

In den Nierenkörperchen findet die Filtration des Blutes statt, bei der alle Bestandteile unter einer Größe von 65 kDa die glomerulären Filter passieren können. Hierbei entsteht der sogenannte Primärharn, in dem alle kleinmolekularen Bestandteile des Blutplasmas enthalten sind. In den Nierenkanälchen werden anschließend Wasser und alle Bestandteile, die der Körper noch verwenden kann, resorbiert, was zu einer Aufkonzentration des Harns zum Endharn führt¹³³ (Aufbau der Niere siehe Abbildung I-4). Diese Prozedur ermöglicht auch eine Aufkonzentration von kleinmolekularen Nahrungsantigenen, welche über nierenresidente dendritische Zellen prozessiert und präsentiert werden können^{43, 134, 135}. Ebenso können diese Antigene über die Lymphe oder über zellvermittelten Transport in die drainierenden Nierenlymphknoten gelangen^{134, 136, 137} (Schema siehe Abbildung I-5).

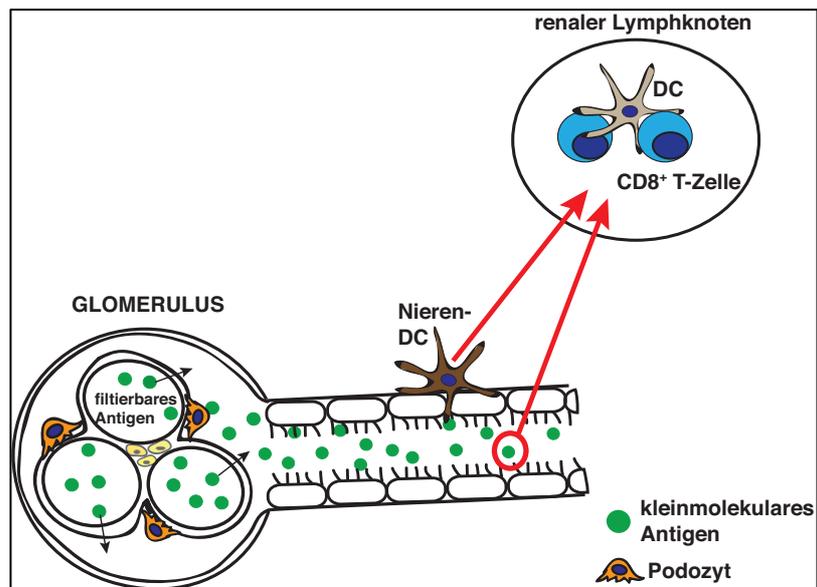


Abbildung I-5: Schematische Darstellung des Antigentransports in den renalen Lymphknoten

Da es sich meist um ungefährliche Nahrungs- oder Selbstantigene handelt, ist es wichtig, ungewollte Autoimmunität hier einzuschränken. In der Niere wird Toleranz gegen kleinmolekulare Nahrungsantigene vermutlich über kreuzpräsentierende Zellen vermittelt⁴³, welche Mechanismen dabei eine Rolle spielen ist allerdings unbekannt.

1.6 Die Rolle inhibitorischer Rezeptoren in der Toleranzinduktion

Die Induktion von Toleranz unter nicht-inflammatorischen Bedingungen ist von mehreren Faktoren abhängig. Nicht aktivierte DC produzieren keine pro-inflammatorischen Zytokine und exprimieren nur geringere Level kostimulatorischer Moleküle auf ihrer Zelloberfläche¹³⁸. Gleichzeitig werden koinhibitorische Moleküle hochreguliert, um die Balance endgültig auf Seiten der Toleranz zu verschieben^{139, 140}. Mittlerweile sind mehrere Moleküle bekannt, die wichtig für die Toleranzinduktion in T-Zellen sind. Eine besondere Bedeutung hat die CD28-Familie, zu der kostimulatorische und koinhibitorische Mitglieder zählen¹⁴¹. Die ersten Mitglieder dieser Familie waren B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86), die als kostimulatorische Moleküle auf APC identifiziert wurden¹⁴². Ihre Interaktion mit dem auf T-Zellen exprimierten Rezeptor CD28 ist für die T-Zellaktivierung essentiell¹⁴³. Später zeigte sich, dass über CTLA-4 auf T-Zellen, ein weiterer Rezeptor für B7-1 und B7-2, nicht nur aktivierende, sondern auch inhibierende Signale übermittelt werden können¹⁴⁴. Auch kommen B7-1 und B7-2 nicht nur auf APC vor, sondern wurden auch auf T-Zellen gefunden. Dort werden Alloantworten durch CTLA-4 Ligation herunterreguliert, was einen wichtigen Beitrag zur Toleranzinduktion leistet¹⁴⁵.

Neben CTLA-4, CD28 und ihren Liganden zählen mittlerweile weitere Moleküle, wie z.B. Programmed Death-1 (PD-1), zur CD28-Familie^{146, 147}. Während CTLA-4 und CD28 konstitutiv exprimiert werden, wird PD-1 auf T-Zellen, B-Zellen, natürlichen Killerzellen, dendritischen Zellen und Monozyten bei Aktivierung induziert^{148, 149}. PD-1 ist ein Oberflächenrezeptor und wurde zunächst als apoptoseinduzierendes Gen in einer T-Zellhybridomlinie identifiziert¹⁴⁶. Erste Hinweise auf die Funktion *in vivo* brachte die PD-1 defiziente Maus, die ein Lupus-ähnliches Syndrom entwickelte, welches auf eine disregulierte T-Zellaktivierung hindeutet¹⁵⁰. PD-1 ist ein zur Immunglobulinsuperfamilie gehörendes Transmembranprotein mit einer Größe von 55 kDa. Es ist verwandt mit CD28 und CTLA-4 und besteht aus einer 20-Aminosäurenbasis und einer Transmembrandomäne mit einem Immunrezeptor-Tyrosin-basierten inhibitorischen Motiv (ITIM) und einem Immunrezeptor-Tyrosin-basierten Wechselmotiv (ITSM)¹⁵¹. PD-1 wird durch das Gen *Pdcd1* kodiert, welches auf Chromosom 1 in Mäusen und Chromosom 2 im Menschen liegt¹⁵². Einzelnukleotidpolymorphismen wurden bereits als Ursache einiger Autoimmunerkrankungen erkannt und eine Spleißvariante konnte in Patienten mit rheumatoider Arthritis nachgewiesen werden¹⁵³. Obwohl eine Oberflächenexpression von PD-1 erst ca. 24 Stunden nach Aktivierung messbar ist, können funktionelle Effekte bereits wenige Stunden nach T-Zellaktivierung nachgewiesen werden¹⁵⁴. Bei Kreuzvernetzung von T-Zellrezeptor und PD-1 oder B-Zellrezeptor und PD-1 werden die Tyrosinmotive der zytoplasmatischen Domäne (ITIM und ITSM) phosphoryliert und SHP-2 wird rekrutiert. Die Rekrutierung von SHP-2 an die ITSM-Domäne führt zu einer Inhibierung des PI3K-Signalwegs und hemmt darüber auch das darauf folgende Molekül Akt, was zu einer verringerten Ca^{2+} Mobilisierung führt¹⁵⁵. Gleichzeitig wird durch Inhibierung des Antigenrezeptorsignalwegs die Produktion von Überlebensfaktoren, wie Bcl-XL und den Zytokinen IL-2 und IFN- γ vermindert^{152, 156, 157} (siehe Abbildung I-6). Alleinige Vernetzung von PD-1 ohne gleichzeitige Stimulation des B- oder T-Zellrezeptors hat keinen Effekt auf die Zelle. Bei gleichzeitiger Kostimulation der Zelle über CD28 können die inhibitorischen Effekte aufgehoben und Zytokinproduktion und Überleben der Zelle wiederhergestellt werden¹⁵⁸. Auch zusätzliches IL-2 kann zur Aufhebung der PD-1 vermittelten Inhibierung dienen¹⁵⁶.

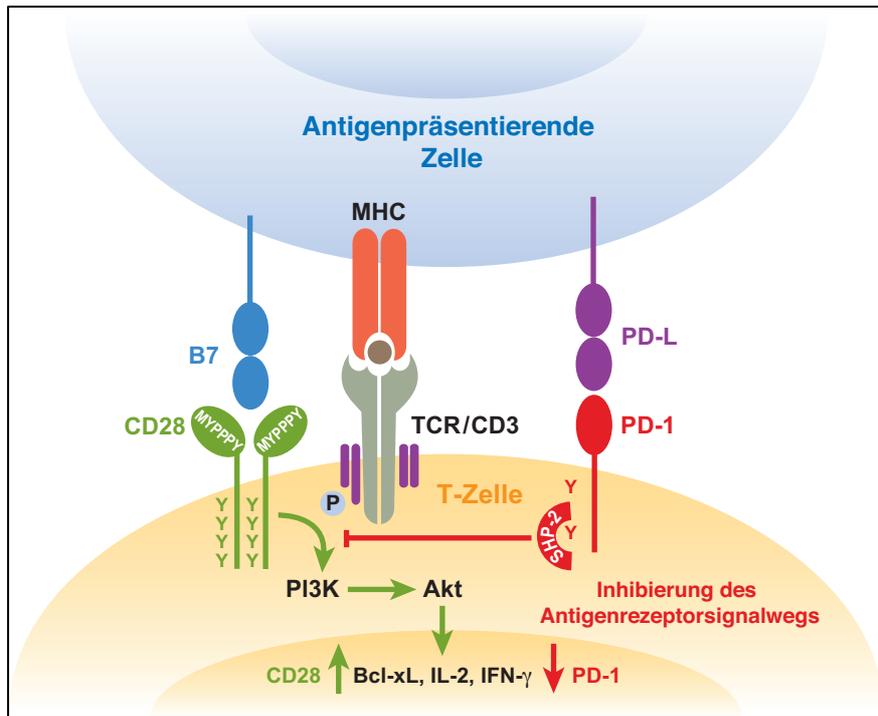


Abbildung I-6: Darstellung des PD-1-Signalwegs in T-Zellen
 Übersetzt und nachgedruckt mit Erlaubnis von ANNUAL REVIEWS,
 Keir *et al.*, Annual Reviews Immunology, 2008^{ref152}

Für PD-1 sind zwei Liganden bekannt: Programmed Death-1 Ligand-1 (PD-L1, auch bekannt unter B7-H1 oder CD274) und Programmed Death-1 Ligand-2 (PD-L2, auch B7-DC oder CD273)¹⁵⁹⁻¹⁶¹. Beide Liganden sind Transmembranglykoproteine bestehend aus IgC- und IgV-extrazellulären Domänen und einem kurzen zytoplasmatischen Ende. PD-L1 und PD-L2 werden von den Genen *Pdcd111* bzw. *Pdcd112* kodiert, welche nah beieinander auf Chromosom 19 in Mäusen und Chromosom 9 im Menschen liegen¹⁵².

PD-L1 wird konstitutiv auf T-Zellen, B-Zellen, dendritischen Zellen, Makrophagen, mesenchymalen Stammzellen, knochenmarkgenerierten Mastzellen und nicht-hämatopoietischen Zellen, wie z.B. vaskulären Endothelzellen, pankreatischen Inselzellen, renalen Tubulusepithelzellen, Keratinozyten, Astrozyten und in immunprivilegierten Organen wie dem Auge und der Plazenta, exprimiert¹⁶². Zusätzlich wird es unter inflammatorischen Bedingungen durch IFN- α , IFN- β oder IFN- γ hochreguliert, um Gewebeschäden einzudämmen¹⁶³. Ein zweiter Rezeptor für PD-L1 ist B7-1 (CD80), worüber durch bidirektionelle Signalvermittlung ebenfalls die T-Zellaktivierung inhibiert werden kann¹⁶⁴.

Der zweite Ligand von PD-1, PD-L2 wird weniger ubiquitär exprimiert. PD-L2 kann nur auf dendritischen Zellen, Makrophagen, Mastzellen und peritonealen B1-Lymphozyten induziert werden¹⁶⁵. IL-4 und IFN- γ führt zu einer erhöhten Expression von PD-L2 auf Makrophagen, während dendritische Zellen auf anti-CD40 Antikörper, GM-CSF, IL-4, IFN- γ und IL-12 mit einer Hochregulation von PD-L2 reagieren¹⁵³. PD-L2 besitzt im Vergleich zu PD-L1 eine ca. sechsfach höhere Affinität für PD-1 und ist essentiell für die Rekrutierung von PD-1 zur immunologischen Synapse¹⁶⁶.

Da PD-1 und seine Liganden sowohl auf APC als auch auf T- oder B-Zellen exprimiert werden, sind auch bidirektionelle Interaktionen wahrscheinlich. So kann z.B. lösliches PD-1 die Expression von DC-Aktivierungsmarkern wie CD40, B7-1 und B7-2 senken und die IL-10 Produktion erhöhen, was in einem suppressiven DC-Phänotyp resultiert¹⁶⁷⁻¹⁶⁹.

Wie wichtig diese inhibitorische Signalwege im Immunsystem sind, zeigen verschiedene Mausmodelle. CTLA-4 defiziente Mäuse entwickeln eine letale hyperlymphoproliferative Krankheit^{143, 169} und PD-1 defiziente Mäuse erkranken an Autoimmunerkrankungen, wie z.B. Lupus-ähnlicher Glomerulonephritis oder autoantikörpervermittelter Kardiomyopathie^{150, 170}.

Um funktionelle Unterschiede zwischen den beiden Molekülen CTLA-4 und PD-1 auf T-Zellen deutlich zu machen, wurde ihre regulatorische Rolle in NOD Mäusen näher untersucht. In diesem Modell zur spontan entwickelnden Typ I Diabetes wurde durch Blockade von PD-1 und CTLA-4 herausgefunden, dass CTLA-4 vor allem auf naive T-Zellen wirkt, während PD-1 die Aktivierung naiver T-Zellen, aber auch die Effektorfunktion bereits bestehender autoreaktiver T-Zellen beeinflusst¹⁷¹. Ebenfalls wurde gezeigt, dass beide Moleküle synergistisch wirken können¹²³.

In der Peripherie spielen PD-Ligand-positive dendritische Zellen eine kritische Rolle hinsichtlich der Toleranzinduktion. Ruhende bzw. nicht stimulierte dendritische Zellen können für das lymphozytische Choriomeningitisvirus (LCMV) spezifische CD8⁺ T-Zellen unterdrücken, solange diese PD-1 kompetent sind¹²³. PD-1 defiziente LCMV-spezifische CD8⁺ T-Zellen werden nicht toleriert. Dieser Effekt kann durch CTLA-4 Blockade noch verstärkt werden, während CTLA-4 Blockade alleine nur einen schwachen Effekt auf die Toleranzinduktion hat. Diese Befunde deuten ebenfalls auf einen synergistischen Effekt der beiden inhibitorischen Moleküle hin¹²³. Diese Versuche haben gezeigt, dass der PD-1 Signalweg eine wichtige Rolle in der peripheren CD8⁺ T-Zelltoleranz spielt und großteils über ruhende, nicht aktivierte dendritische Zellen läuft.

Nicht nur in der peripheren Toleranz spielen PD-1 und seine Liganden eine Rolle. Schon im Thymus wird im Kortex PD-L1 und im medullären Stroma PD-L2 exprimiert, während PD-1 auf doppelt-negativen Thymozyten zu finden ist und auf doppelt-positiven Thymozyten hochreguliert wird¹⁴⁸. Es konnte gezeigt werden, dass die PD-1-PD-L1 Interaktion für die Positivselektion bedeutend ist, während PD-1 alleine auch in der Negativselektion eine Rolle spielt. Der Phänotyp von PD-1 defizienten Mäusen reflektiert somit nicht nur das Fehlen peripherer Toleranz, sondern auch eine beeinträchtigte Selektion in der zentralen Toleranz¹⁵².

Da PD-1 an diversen Autoimmunerkrankungen beteiligt ist, wurde es als potentielles Ziel von Therapien ins Auge gefasst. Ding *et al.* konnten zeigen, dass adenoviral induzierte Expression von PD-L1 in renalen Tubulusepithelzellen die Pathologie in Mäusen mit spontanem Lupus-ähnlichem Syndrom verbessern konnte¹⁷². Andererseits ist erhöhte PD-L1 Expression bei einem Nierenzellkarzinom mit schlechterer Prognose korreliert¹⁷³. Beide Studien weisen auf CD8⁺ T-Zellen als hauptsächlich beeinflusste Zellpopulation hin. Dass speziell in der Niere vermehrt Befunde zur Rolle von PD-1 im Kontext von CD8⁺ T-Zelltoleranz gemacht werden, deutet auf eine besondere Stellung dieses Organs hin.

2 Grundlagen der Kreuzpräsentation

2.1 Antigenaufnahme

Immunzellen besitzen diverse Mechanismen, um Antigene unterschiedlicher Größe aufzunehmen¹⁷⁴⁻¹⁷⁶ (Übersicht siehe Abbildung I-7). Pinozytose beschreibt den Vorgang, in Flüssigkeit gelöstes Antigen aufzunehmen. Dabei wird die Flüssigkeit mit darin gelösten Substanzen aus der Umgebung der Zelle in kleine Vesikel (bis 150 nm Durchmesser) eingeschlossen und internalisiert^{177, 178}. Das Antigen gelangt so direkt ins Zellplasma. Ein ähnlicher Mechanismus liegt der Phagozytose zu Grunde. Partikel bis zur Größe einer Zelle können von Phagosomen umschlossen und in das Zytoplasma transportiert werden. Für den Einstülpungsvorgang ist häufig die Erkennung der Oberfläche notwendig, was z.B. durch Anlagerung von Antikörpern gewährleistet werden kann. Im Immunsystem phagozytieren vor allem Makrophagen, aber auch neutrophile Granulozyten; Monozyten und dendritische Zellen sind dazu in der Lage^{179, 180}. Die Vorgänge der Pinozytose und der Phagozytose werden auch unter dem Oberbegriff Endozytose zusammengefasst¹⁸¹. Neben dieser ungerichteten Endozytose gibt es rezeptorvermittelte Endozytose, bei der ein spezifischer Rezeptor auf der Zelloberfläche vorhanden sein muss, der nach Binden seines Substrats die Endozytose einleitet. Rezeptorvermittelte Endozytose ist häufig clathrinabhängig¹⁸². Clathrin ist ein Hexamer, welches aus drei schweren und drei leichten Untereinheiten besteht¹⁸³. Mehrere dieser Hexamere lagern sich zu einem komplexen Gerüst zusammen, wodurch die Aufnahmevesikel geformt werden. Nach der Aufnahme muss die Struktur ATP-abhängig aufgelöst werden, was bedeutet, dass dieser Aufnahmemechanismus ein aktiver Prozess ist¹⁸⁴.

Diese Peptide können weitaus effizienter auf MHC-Klasse-I präsentiert werden, da sie eine höhere Affinität aufweisen¹⁹¹.

Die aus endogenen Proteinen hergestellten Peptide werden aus dem Zytosol mit Hilfe des sogenannten "transporter associated with antigen processing" (TAP) in das endosomale Retikulum transportiert. TAP gehört zur ABC-Transporterfamilie und ist ein Heterodimer, welches aus den Untereinheiten TAP1 und TAP2 besteht^{192, 193}, die im ER und der *cis*-Golgi-Membran lokalisiert sind^{194, 195}. Im ER findet die Beladung der MHC-Moleküle statt, welche aus einer α -Kette und dem β 2-Mikroglobulin bestehen. Im unbeladenen Zustand sind diese allerdings instabil. Zur Stabilisierung bis zur Beladung mit Antigen dienen im ER die Chaperone Calnexin und Calreticulin. Der TAP-Transporter ist an der luminalen Seite mit Tapasin an MHC-I gebunden und hilft so bei der Beladung^{196, 197}. Nach Binden des Peptids wird der MHC-I-Komplex über den Golgiapparat zur Zellmembran transportiert, wo er dann von CD8⁺ T-Zellen erkannt werden kann⁴⁸.

Dendritische Zellen und B-Zellen gehören zu den professionellen antigenpräsentierenden Zellen, die neben der herkömmlichen Klasse-I-Präsentation auch über MHC-II-Peptide von potentiellen Pathogenen an CD4⁺ T-Zellen (T_H Zellen) präsentieren können^{44, 198, 199}. T_H Zellen sind zur Aktivierung anderer Immunzellen, wie B-Zellen oder Makrophagen, zur Initiierung der Immunantwort gegen Bakterien oder andere extrazelluläre Pathogene essentiell⁴⁷. Auf diesem Weg präsentiertes Antigen ist exogenes Antigen, welches rezeptorvermittelt aufgenommen und in Endosomen transportiert wurde. Endosomen fusionieren nach Ansäuerung mit Lysosomen, welche Lipasen, Carbohydrasen, Phosphatasen, Nukleasen und Proteasen wie z.B. Cathepsine enthalten, die bei niedrigem pH-Wert aktiv sind^{200, 201}. Diese Enzyme sorgen dafür, dass potentielle Pathogene getötet und degradiert werden²⁰². Durch Autophagie, dem Abbau zelleigener Bestandteile, können auch endogene Antigene in diesen Präsentationsweg gelangen, wegen der Depletion autoreaktiver T-Zellen im Thymus werden diese aber nicht als Pathogene erkannt²⁰³. Wie MHC-I werden auch die MHC-II-Moleküle im ER synthetisiert. Sie bestehen aus einer α - und einer β -Kette. Zur Stabilisierung des Komplexes assoziieren sie im ER mit einer invarianten Kette (Ii), welche außerdem eine Beladung mit Peptiden im ER verhindert. So gelangen keine Peptide aus dem Klasse-I-Präsentationsweg auf MHC-II. Zur Beladung werden Klasse-II-Proteine in Vesikeln zu den Lysosomen transportiert, die exogene Antigene enthalten und als Klasse-II-Vesikel bezeichnet werden (Class II vesicles, CIIV)²⁰⁴⁻²⁰⁶. Die Beladung findet statt, indem lysosomale, proteolytische Proteine die invariante Kette schneiden und den Rest als "class II associated invariant chain peptide" (CLIP) am MHC-II-Molekül zurücklassen²⁰⁷. CLIP wird mit Hilfe von H-2M, einem MHC-I-ähnlichen Protein, durch das zu präsentierende Peptid ausgetauscht. Das fertige und stabile MHC-II-Molekül wird schließlich an die Oberfläche transportiert und an T_H Zellen präsentiert²⁰⁸.

2.3 Kreuzpräsentation

Professionelle antigenpräsentierende Zellen können nicht nur die klassischen Präsentationswege nutzen, sondern besitzen auch die Fähigkeit, exogen aufgenommenes Antigen auf MHC-I zu prozessieren. Dieses Phänomen wurde zuerst 1976 von Bevan und Kollegen als "Kreuz-Priming"²⁰⁹ und 1997 von Kurts *et al.* als "Kreuz-Toleranz" beobachtet²¹⁰. Die zu Grunde liegenden zellbiologischen Mechanismen werden unter dem Begriff Kreuzpräsentation zusammengefasst²¹¹. Durch Kreuzpräsentation können APC Antigene, die nicht in den APC selber exprimiert werden, an CD8⁺ T-Zellen präsentieren. Dies betrifft vor allem Antigene, die von nicht hämatopoietischen Tumoren stammen oder von einer Virusinfektion, die die APC selbst nicht betrifft²¹². Dadurch ist es möglich, dennoch eine CD8⁺ T-Zellantwort zu initiieren. Andererseits ist es ebenfalls wichtig, ungefährliche oder körpereigene Antigene, die nicht im Thymus exprimiert werden, an CD8⁺ T-Zellen zu präsentieren, um diese in der Peripherie zu tolerisieren^{210, 212}. In Organen, die stetigen Kontakt zur Außenwelt haben, wie Lunge, Haut und Gastrointestinaltrakt, kommt der Kreuzpräsentation eine wichtige Rolle zur Erhaltung der Toleranz zu^{213, 214}, während gleichzeitig Immunität im Falle einer Infektion gewährleistet werden muss²¹⁵.

Hauptsächlich an der Kreuzpräsentation beteiligt sind CD8⁺ DC⁹². Darüber hinaus ist auch für bestimmte Endothelzellen, wie die Lebersinusoidalen Endothelzellen²¹⁶ oder Makrophagen^{217, 218} und B-Zellen^{46, 82, 219} die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation beschrieben worden. Auf Grund ihrer ausschließlich spezifischen Aufnahme von Antigen über den B-Zellrezeptor wird die Relevanz der Kreuzpräsentation für B-Zellen *in vivo* kontrovers diskutiert.

Obwohl Kreuzpräsentation seit mehreren Jahrzehnten bekannt ist, sind die dahinter verborgenen zellulären und molekularen Mechanismen noch nicht völlig aufgeschlüsselt. Für DC wurde bereits beschrieben, dass phagozytiertes oder lösliches Antigen unterschiedlich effektiv prozessiert wird²²⁰⁻²²². Nach Phagozytose des Antigens kann die Ansäuerung der Phagosomen aktiv verhindert werden, so dass keine lysosomalen Enzyme aktiv werden können²²³. Dieses verhindert die sofortige Degradierung des Antigens und ermöglicht gleichzeitig, dass es in das Zytosol gelangen kann und dort über Proteasomen abgebaut und in den Klasse-I-Präsentationsweg eingeschleust wird²²⁴. Hierfür scheint ein Rücktransport in die Phagosomen über TAP notwendig zu sein, um dort auf MHC- I geladen zu werden²²⁵⁻²²⁷. Die Klasse-II-Präsentation von phagozytiertem Antigen wird durch spätere Ansäuerung der Phagosomen und folgender lysosomaler Proteolyse des Antigens mediiert²²⁸. Die Mechanismen der Kreuzpräsentation von löslichem Antigen werden scheinbar auf anderem Weg reguliert.

Aktuelle Studien in DC haben gezeigt, dass bereits der Endozytosemechanismus und die Größe des Antigens darüber entscheidet, welcher Präsentationsweg anschließend eingeschlagen wird^{229, 230}. Wird lösliches Antigen durch Pinozytose oder scavengerrezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen und gelangt in lysosomale Kompartimente, wird es auf MHC-II präsentiert. Klasse-I-Präsentation kommt zustande, wenn das Antigen über den Mannoserezeptor aufgenommen wird, wie dies z.B. bei dem Modellantigen OVA der Fall sein kann²³¹. Nach mannoserezeptorvermittelter Aufnahme wird das Antigen in eine bestimmte Art von frühendosomalen Kompartimenten transportiert, von wo es weiter in das Zytosol gelangen kann und proteasomal degradiert wird²²⁹. Es wurde zunächst angenommen, dass nach Generierung der Peptide TAP dafür zuständig ist, diese für MHC- I Beladung in das ER zu bringen^{232, 233}. Neueste Studien zeigen allerdings, dass auch die frühen Endosomen TAP enthalten und somit ein Rücktransport dorthin wahrscheinlich ist^{226, 234}. Es wurde außerdem gezeigt, dass in den frühen Endosomen die Klasse-I-Beladung stattfinden kann. Dies bedeutet, dass es eine räumliche Trennung der Beladung von endogen und exogen erhaltenen Antigenen gibt²³⁴. Dieser Mechanismus hat den Vorteil, dass die Kreuzpräsentation strenger kontrolliert werden kann. So sorgt z.B. Lipopolysaccharid (LPS) dafür, dass TAP zu den endosomalen Kompartimenten rekrutiert wird²³⁴. LPS ist ein "toll-like receptor" 4 (TLR 4) Ligand, welcher auf bakteriellen Zellwänden zu finden ist. Eine Infektion scheint somit in diesem Fall die Kreuzpräsentation zu verstärken, während unter normalen Umständen die Präsentation von Selbstantigenen verhindert wird. Neben dem Mannoserezeptor gibt es weitere Rezeptoren, denen eine Rolle in der Kreuzpräsentation zugeschrieben wird. Bereits charakterisiert wurden DEC205^{235, 236}, DNGR-1^{237, 238} und CLEC9A²³⁹, aber es wird vermutet, dass es noch weitere unidentifizierte Rezeptoren hierfür gibt. Zusätzlich zu löslichem und phagozytiertem Antigen werden auch Teile apoptotischer Zellen kreuzpräsentiert²⁴⁰, die über so genannte Integrin- oder Scavengerrezeptoren, wie z.B. den Asialoglykoproteinrezeptor, SR-BI, Scavengerrezeptor A, den oxLDL-Rezeptor CD68/ Makrosialin, und LOX-1 aufgenommen werden können²⁴¹.

Ein letzter beschriebener Mechanismus, der Kreuzpräsentation generell ermöglicht, ist der Austausch von exogen aufgenommenen Antigen zwischen einzelnen Zellen über Zell-Zell-Kanäle, sogenannte „Gap-Junctions“²⁴².

Mittlerweile hat sich eine eher modulare Sicht auf die Antigenkruzpräsentation entwickelt, in der die Schritte der Antigenprozessierung, Beladung und des Transports unabhängig voneinander betrachtet werden (Übersicht siehe Abbildung I-8)²⁴³. Alle genannten Schritte der Kreuzpräsentation wurden bisher für DC und zum Teil Makrophagen beschrieben, im Kontext von B-Zellen allerdings noch nicht überprüft.

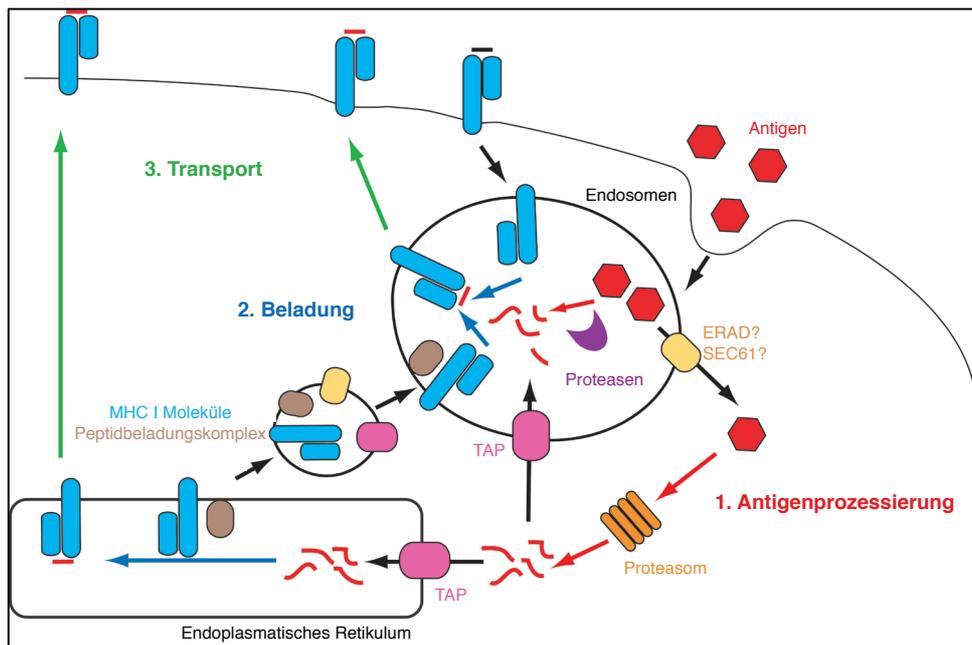


Abbildung I-8: Modulare Sicht auf die Schritte der Kreuzpräsentation
 Übersetzt und nachgedruckt mit Erlaubnis von John Wiley and Sons,
 Segura und Villadangos, Traffic 2011^{ref243}

II Zielsetzung der Arbeit

Zur Bekämpfung von Tumoren und intrazellulären Pathogenen, wie z.B. bei viralen Infektionen, sind zytotoxische CD8⁺ T-Zellantworten unabdingbar. Gleichzeitig muss der Körper vor überschießenden Immunreaktionen oder Autoimmunität geschützt werden. Ein Mechanismus, der dazu beiträgt, ist die Kreuzpräsentation. Kreuzpräsentation ist ein Terminus, der verwendet wird, um die Aufnahme, Prozessierung und Präsentation von exogenem Antigen auf MHC-I an CD8⁺ T-Zellen zu beschreiben. Durch Kreuzpräsentation werden zytotoxische CD8⁺ T-Zellen gegen Virus- oder Tumorantigene generiert, die nicht auf andere Art der MHC-I-Präsentation zugänglich gemacht werden können. Ferner verbirgt sich hinter der Kreuzpräsentation eine Möglichkeit, CD8⁺ T-Zelltoleranz in der Peripherie gegen Selbstantigene und harmlose Nahrungsantigene zu induzieren. Dies kann notwendig werden, wenn autoreaktive CD8⁺ T-Zellen nicht durch die thymische Selektion eliminiert wurden, oder wenn es sich um Antigene handelt, die nicht im Thymus exprimiert werden. Eine solche Situation liegt z.B. in der Niere vor, in der kontinuierlich Nahrungsantigene filtriert und konzentriert werden. Diese Aufkonzentration führt im renalen Lymphknoten zur Präsentation und damit zur CD8⁺ T-Zelltoleranz. Durch welche DC-Subtypen und beteiligten Moleküle diese Toleranzinduktion stattfindet, ist noch nicht geklärt. Obwohl dendritische Zellen *in vivo* den größten Beitrag zur Kreuzpräsentation zu leisten scheinen, werden in der Literatur auch Leberendothelzellen und B-Zellen die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation zugesprochen. Über welche zellulären Mechanismen B-Zellen Antigene kreuzpräsentieren ist allerdings noch unbekannt.

Die Kreuzpräsentation liefert vielversprechende Ansätze für neue Vakzinierungsstrategien, die auch CD8⁺ T-Zellen ansprechen. Daher wäre es von Vorteil, die zu Grunde liegenden zellulären Mechanismen kreuzpräsentierende Zellen zu kennen. Gleichzeitig müssen potentiell tolerisierende Eigenschaften dieser Zellen in Betracht gezogen werden. Aus diesem Grund sollen in dieser Arbeit folgende Fragen bearbeitet werden.

- Was sind die molekularen Mechanismen der Kreuzpräsentation von B-Zellen?
- Können Erkenntnisse aus transgenen B-Zellsystemen auf physiologische Situationen übertragen werden?
- Welche Moleküle sind in der Kreuztoleranzinduktion gegen filtrierte Antigene im renalen Lymphknoten involviert?
- Welche Zellpopulation induziert CD8⁺ T-Zelltoleranz im renalen Lymphknoten?

III Material und Methoden

1 Material

1.1 Technisches Equipment

Analysewaage; ED224S	Sartorius Stedim, Göttingen
Autoklav	Belimed, Köln
Bechergläser; 5-500 ml	Schott, Mainz
Durchflusszytometer; FACS Canto II	BD Bioscience, Heidelberg
Durchflusszytometerröhrchen; Polystyren, 12/75mm	Sarstedt, Nümbrecht
Eismaschine; MF 26	Scotsman, Sprockhoevel
ELISA Platten; Microlon 96-Loch	Greiner Bio-one, Solingen
ELISA Reader; sunrise	Tecan, Männedorf, Schweiz
Entsalzungssäulen; PD-10,	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Entsalzungssäulen; ZEBA Spin Desalting	Thermo Scientific Pierce, Bonn
Gefrierschrank (-20°C)	Siemens, München
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Scientific Pierce, Bonn
Gel Elektrophorese Kammer; Mini und Midi Gelsystem	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Heizblock; Thermomixer comfort	Eppendorf, Wesseling
Injektionsnadeln; 27G, 25G, 20G	BD Microlance, Heidelberg
Inkubator	Sanyo, München
Kühlschrank (4°C)	Siemens, München
MACS Zellseparator; Mini und MidiMACS	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Magnetrührer	IKA Laboratory Equipment, Staufen
Messzylinder; 50 - 1000 ml	Schott, Mainz
Metallsiebe	Universität Bonn, Abteilung Feinmechanik
Mikroskope; CKX31 und IX71	Olympus, Hamburg
Konfokales Laser-Scanning Mikroskop; Fluoview 1000	Olympus, Hamburg
Parafilm; Parafilm "M"	American National Can TM, Greenwich, USA
Pasteuripette; 150 mm	Roth, Karlsruhe
Petrischalen; 10 cm	Greiner Bio-one, Solingen

pH-Meter; Five easy	Mettler Toledo, Gießen
Pipetten; 10 μ l- 1000 μ l Eppendorf Research	Eppendorf, Hamburg
Pipetten; 12-Kanal Eppendorf Research	Eppendorf, Hamburg
Pipetten; Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen; 10 - 1000 μ l	Greiner Bio-one, Solingen
Pipettierhilfe; Pipetus	Hirschmann Labortechnik, Eberstadt
Plastikpipetten; 5- 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Präparationsbesteck	Labotec, Göttingen
Proteinaseinhibitor; Complete, Mini, EDTA-free Proteinase Inhibitor Tablets	Roche, Mannheim
PVDF Membran	Thermo Scientific Pierce, Bonn
Reaktionsgefäße; Polypropylen, 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-one, Solingen
Reinstwasseranlage; NANOpure Diamond	Werner Reinstwassersysteme, Leverkusen
Schnappdeckelgefäße, 0,5- 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Spritzen; 1 ml TBC-Spritzen	Servoprat, Wesel
Spritzen; 2- 20 ml BD Discardit II	BD Bioscience, Heidelberg
Sterilfilter; 0,2 μ m	Schleicher und Schuell, Dassel
Sterilwerkbank; MSC Advantage	Thermo Scientific Pierce, Bonn
Vivaspin 4 Säulen; 30.000 MWCO	Sartorius Stedim, Göttingen
Vortexer; VWR Reagenzschüttler	VWR International GmbH, Darmstadt
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Whatmanpapier; Pierce Western Blotting Filter Papers	Thermo Scientific Pierce, Bonn
Zählkammer; Neubauer	Brand, Wertheim
Zellkulturplatten; 6-96-Loch, U-Boden und F-Boden	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugen; 5810R und 5439R	Eppendorf, Wesseling

1.2 Chemikalien und Reagenzien

2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
2-Methylbutan	Merck, Darmstadt
Alexa-647 labeling Kit	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS) ((NH ₄) ₂ S ₂ O ₈)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Annexin V FITC	Biolegend, Fell
Annexin V Puffer	eBioscience, Frankfurt a. M.
BCA Protein Assay Reagent	Thermo Scientific Pierce, Bonn
Bovines Serum Albumin	Gerbu, Gaiberg
Brefeldin A	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Carboxyfluorescein Diazetat	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Succinimidylester (CFDA-SE)	
Chloroquin-bisphosphat	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
Chlorwasserstoffsäure (HCl)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
CpG Oligodeoxynukleotide (CpG ODN 1668)	TIB MolBiol, Berlin
Cytochrom C from equine heart	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Diaminophenylindol (DAPI)	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogencarbonat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DNase I	Roche, Mannheim
EndoGrade Ovalbumin	Hyglos GmbH, Bernried
Epoxomicin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Essigsäure (C ₂ H ₄ O ₂)	Roth, Karlsruhe
Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
FAM FLICA Caspase 3& 7 Assay Kit	Immunochemistry (Biomol), Hamburg
Flüssigstickstoff	Linde, Wiesbaden
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA, Cölbe
Glutardialdehyd 25%	Merck, Darmstadt
Golgi Plug (Brefeldin A)	BD Bioscience, Heidelberg
Golgi Stop (Monensin)	BD Bioscience, Heidelberg
Hoechst 33342	Molecular Probes, Leiden, Niederlande

holo-Transferrin human	Merck, Darmstadt
Hühnereiweißlysozym	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hydroxylamin*HCl	Thermo Scientific Pierce, Bonn
Hydroxylethyl Piperazinethansulfonsäure (HEPES)	Invitrogen, Karlsruhe
Interferon- γ Duoset ELISA	RnD Systems, Wiesbaden
Interleukin-2 ELISA Standard	BD Biosciences, Heidelberg
Kalziumchlorid (CaCl_2)	Merck, Darmstadt
Ketamin (Ketanest)	Parke-Davis GmbH, Karlsruhe
Kollagenase Typ I	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Glutamin (200 mM)	Invitrogen, Karlsruhe
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Lymphoprep	AXIS-SHIELD PoC AS, Norwegen
Lysotracker Probes, gelb und grün	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Milchpulver	Granovita, Lüneburg
N-Ethylmaleimid (NEM)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumazid (NaN_3)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumbicarbonat (NaHCO_3)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
O-Phenylendiamin (OPD)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ovalbumin Grad VII	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Paraformaldehyd (PFA)	Serva, Heidelberg
Penizillin/Streptomycin (Pen/Strep)	PAA, Cölbe
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Invitrogen, Karlsruhe
Piceatannol	Merck, Darmstadt
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific Pierce, Bonn
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protein Assay Kit	Thermo Scientific Pierce, Bonn
Protein Leiter "Precision Plus Protein Standards Dual Color"	BioRad, München
Pseudomonas Exotoxin A von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rotiphorese Polyacrylamid Mix 30%	Roth, Karlsruhe

RPMI 1640 Medium	Invitrogen, Karlsruhe
SATA	Thermo Scientific Pierce, Bonn
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Merck, Darmstadt
SIINFEKL (OVA ₂₅₇₋₂₆₄)	Abcam, Berlin
SMCC	Thermo Scientific Pierce, Bonn
Streptavidin Meerrettich Peroxidase	Natutec, Frankfurt a. M.
Subcellular Protein Fractionation Kit	Thermo Scientific Pierce, Bonn
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Transferrin-Alexa568	Invitrogen, Karlsruhe
Transferrin-Alexa647	Invitrogen, Karlsruhe
Trinatriumcitrat* 2H ₂ O	Roth, Karlsruhe
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypanblau (0,4%)	Lonza, Ratingen
Tween-20	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt
X-Vivo 15 Medium	Lonza, Ratingen
Xylazinhydrochlorid 2% (Rompun)	Bayer AG, Leverkusen
Zellysepuffer; Cell Lysis Buffer (10x)	New England Biolabs, Frankfurt a. M.

Alle aufgelisteten Kits wurden gemäß den Herstellerangaben verwendet.

1.3 Software

Adobe Creative Suite 5	Adobe, USA
Cell F	Olympus, Hamburg
Endnote X5	Thomson Reuters,
FACS Diva V6.1.1	BD Biosciences, Heidelberg
FlowJo V9.5	Tree Star Inc., USA
Image J	NIH Bethesda, USA
Image Lab	Bio-Rad, München
Magellan V6.6	Tecan, Männedorf
Microsoft Office 2011 für Macintosh	Microsoft, USA
Prism5 für Macintosh	GraphPad Software, USA

1.4 Antikörper

Bezeichnung	Klon	Konjugat	Verwendung	Konzentration
anti-IgM μ -Kette	F(ab) ₂	unkonj.	<i>in vitro</i>	20 μ g/ml
anti-Kaninchen	polyklonal	DyLight549, DyLight488	Mikroskopie	2,0 μ g/ml
anti-Ratte	polyklonal	DyLight549	Mikroskopie	2,0 μ g/ml
anti-Ziege	polyklonal	Alexa647	Mikroskopie	2,0 μ g/ml
CD4	GK1.5	APC	FACS	0,5 μ g/ml
CD8a	53-6.7	APC, Alexa405	FACS	0,5 μ g/ml
CD11b	M1/70	PE, FITC	FACS	0,5 μ g/ml
CD11c	HL3, N418	PE, APC, FITC	FACS	0,5 μ g/ml
CD19	MCA1439	Alexa450	FACS	0,5 μ g/ml
CD25	PC61.5	PE, APC, bio.,	FACS	0,5 μ g/ml
CD40	3/23	PE	FACS	0,5 μ g/ml
CD44	IM7	PE, Pacific Blue	FACS	0,5 μ g/ml
CD45	30-F11	APCCy7	FACS	0,5 μ g/ml
CD45.1	A20	APC	FACS	0,5 μ g/ml
CD45.2	104	PerCPCy5.5	FACS	0,5 μ g/ml
CD45R (B220)	RA3-6B2	PE, PECy7	FACS	0,5 μ g/ml
CD62L	MEL-14	PECy7, bio.	FACS	0,5 μ g/ml
CD69	H1.2F3	PerCPCy5.5, bio.	FACS	0,5 μ g/ml
CD80	16-10A1, 3H5	FITC, bio., PE	FACS	0,5 μ g/ml
CD86	GL1	APC, FITC, bio.	FACS	0,5 μ g/ml
CD273 (PD-L2)	TY25	PE, unkonj.	FACS, <i>in vivo</i>	0,5 μ g/ml 250 μ g
CD274 (PD-L1)	MIH5	PE, unkonj.	FACS, <i>in vivo</i>	0,5 μ g/ml 250 μ g

Material und Methoden

CD279 (PD-1)	J43	PE	FACS	0,5 µg/ml
EEA-1	PA1-063A	unkonj.	Mikroskopie	2,0 µg/ml
FcR-Block	2.4G2	unkonj.	FcR-Block	0,5 µg/ml
H2K ^b -SIINFEKL	25-D1.16	APC, PE	FACS	0,5 µg/ml
H2Kb (MHC-I)	AF6-88.5	Alexa488, Alexa647	FACS	0,5 µg/ml
I-A/I-E (MHC-II)	AF6-120.1	FITC, Pacific Blue	FACS	0,5 µg/ml
IFN-γ	XMG1.2	APC, PE	FACS	0,5 µg/ml
IL-2	JES6-5H4	APC, PE	FACS	0,5 µg/ml
		bio.	ELISA	1,0 µg/ml
IL-2	JES6-1A12	unkonj.	ELISA	1,0 µg/ml
LAMP-1	1D4B	unkonj.	Mikroskopie	2,0 µg/ml
NK1.1	PK136	unkonj.	<i>in vivo</i>	250 µg
TAP1	polyklonal	unkonj.	Mikroskopie	2,0 µg/ml
Va2 TCR	B20.1	FITC, PEcy7	FACS	0,5 µg/ml
Vb5.1 TCR	MR9-4	PE, bio.	FACS	0,5 µg/ml
XCR1	MARX10	bio.	FACS	0,5 µg/ml

Alle fluorochrommarkierten Erstantikörper stammten von eBioscience oder BD Bioscience. Antikörper für ELISA wurden von eBioscience erworben. In der Mikroskopie eingesetzte Erstantikörper stammten von Santa Cruz Biotech (TAP1) oder Abcam (EEA-1, LAMP-1). Sekundärantikörper gegen Ratte und Kaninchen stammten von Rockland, gegen Ziege von Invitrogen. Das IgM μ -Ketten-spezifische F(ab)₂-Fragment wurde von Dianova erworben. Der XCR1 Antikörper wurde freundlicherweise von R. Kroczeck zur Verfügung gestellt.

1.5 Streptavidin-Konjugate

Streptavidin-Alexa647	Invitrogen, Karlsruhe
Streptavidin-APC-Cy7	Invitrogen, Karlsruhe
Streptavidin-Pacific Blue	eBioscience, Frankfurt a. M.

1.6 Antikörperbeschichtete magnetische Kügelchen (MACS Beads)

anti-CD11c Microbeads	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
B Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
CD4 ⁺ T Cell Isolation Kit II	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
CD8 ⁺ T Cell Isolation Kit II	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach

1.7 Mauslinien

Alle genutzten Mauslinien wurden unter "specific pathogen free" (SPF) Bedingungen in Übereinstimmung mit den Tierschutzrichtlinien des Landes NRW im Haus für experimentelle Therapie (HET) verpaart und gehalten. Die folgenden transgenen, Knockout- und Wildtypenlinien wurden für diese Arbeit verwendet.

Linie	Beschreibung
Batf3 ^{-/-}	Mauslinie, in der der Transkriptionsfaktor Batf3 fehlt
bm1	Mauslinie mit Punktmutation im MHC-Klasse-I-Molekül; kann SIINFEKL nicht an CD8 ⁺ T-Zellen präsentieren
C57BL/6	Inzuchtstamm mit dem MHC-I-Haplotyp H2K ^b
C57BL/6.CD45.1/2	Inzuchtstamm mit dem kongenen Marker CD45.1/2
IgHEL	B-Zelltransgene Mauslinie, mit einem HEL-spezifischen B-Zellrezeptor des Typs IgM _a ; kein Isotypenwechsel möglich
OT-I	CD8 ⁺ T-Zelltransgene Mauslinie. H2K ^{b-SIINFEKL} -restringierter Vα2 Vβ5 T-Zellrezeptor
OT-I.CD45.1	Mausstamm mit OT-I Zellen mit dem kongenen Marker CD45.1
OT-I.PD-1 ^{-/-}	Transgene Mauslinie mit PD-1-defizienten OT-I Zellen
OT-II	CD4 ⁺ T-Zell-transgene Mauslinie. I-A ^{b-OVA323-339} -restringierter Vα2 Vβ5 T-Zellrezeptor
PD-1 ^{-/-}	Mauslinie, die defizient für PD-1 ist
PD-L1 ^{-/-}	Mausstamm mit Defizienz des PD-1-Liganden 1 (PD-L1)

1.8 Puffer und Medien

1.8.1 Zellkulturmedien

Schockmedium	RPMI 1640 10 mM HEPES 10% (w/v) PEG1000 0,5 M Saccharose
T-Zellmedium	X-Vivo 15 10% (v/v) FCS 100 U/ml Penizillin 100 μ g/ml Streptomycin 50 μ M 2-Mercaptoethanol
Verdaumedium	Vollmedium 100 μ g/ml DNase I 2 mg/ml Kollagenase Typ I
Vollmedium	RPMI 1640 10% (v/v) FCS 2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penizillin 100 μ g/ml Streptomycin 50 μ M 2-Mercaptoethanol
Waschmedium	RPMI 1640 2% (v/v) FCS

1.8.2 Puffer und Lösungen

2-Mercaptoethanol (5 mM)	178 μ l 2-Mercaptoethanol (14,3 M) 500 ml PBS
20% Paraformaldehyd (PFA)	200 ml PBS 40 g PFA bei 60°C lösen pH 7,4
Beschichtungspuffer (ELISA)	50 mM NaHCO ₃ H ₂ O pH 8,2
Blockierungspuffer (ELISA)	PBS 1% (w/v) BSA
Coomassie-Färbelösung (SDS PAGE)	40% (v/v) MeOH 10% (v/v) C ₂ H ₄ O ₂ 0,1% (w/v) Coomassie
Deazetylierungslösung (Proteinkopplung)	PBS 0,5 M Hydroxylamin 25 mM EDTA pH mit NaOH-Plätzchen einstellen pH 7,2- 7,5
EDTA (0,5 M)	186,1 g EDTA ca. 20 g NaOH 1000 ml H ₂ O pH 7,8- 8,0
Entfärbelösung (SDS-PAGE)	40% (v/v) EtOH 10% (v/v) C ₂ H ₄ O ₂ H ₂ O

Entwicklungslösung (ELISA)	OPD-Substratpuffer 1 mg/ml O-Phenylendiamin (OPD) 0,1% (v/v) H ₂ O ₂
Erythrozytenlysepuffer	146 mM NH ₄ Cl 2 mM EDTA-Dinatriumsalz 10 mM KHCO ₃ H ₂ O pH 7,2- 7,4
FACS-Puffer	PBS 0,1% (w/v) BSA 0,1% (w/v) NaN ₃
Laufpuffer (10x) (SDS-PAGE)	1,5 M Glycin 250 mM Tris 1% (w/v) SDS H ₂ O
MACS-Puffer	PBS 0,5% (w/v) BSA 2 mM EDTA
NEM (6x)	0,33 ml Glycerin 0,66 ml H ₂ O 25 mg N-Ethylmaleimid (NEM) Bromphenolblau
OPD-Substratpuffer	0,1 M NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O 50 mM Trinatriumzitat*2H ₂ O H ₂ O pH 5,0

Material und Methoden

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	80 g/l NaCl 0,2 g/l KCl 1,44 g/l NaHPO ₄ *2H ₂ O 0,2 g/l KH ₂ PO ₄ pH 7,4 1 Tablette auf 500 ml H ₂ O; Gibco
Permeabilisierungslösung (Mikroskopie)	PBS 0,1% (v/v) Triton X-100
Probenpuffer (2x) (SDS-PAGE)	660 µl SDS (10% w/v) 250 µl Tris (1 M, pH 6,8) 90 µl H ₂ O
Sammelgel (SDS-PAGE)	1,2 ml H ₂ O 330 µl Rotiphorese Polyacrylamid Mix (30%) 250 µl Tris (1 M, pH 6,8) 50 µl SDS (10% w/v) 20 µl APS (10% w/v) 2 µl TEMED
Saponin-Puffer	PBS 0,5% (w/v) Saponin 1,0% (w/v) BSA
Stopplösung (ELISA)	1 M H ₂ SO ₄ H ₂ O
TBS (10x) (Western Blot)	20 mM Tris 1,36 mM NaCl H ₂ O pH 7,6
TBST (Western Blot)	TBS 1% (v/v) Tween-20

Transferpuffer (Western Blot)	H ₂ O 25 mM Tris 192 mM Glycin 10% (v/v) MeOH
Trenngel 10% (SDS-PAGE)	1,9 ml H ₂ O 1,7 ml Rotiphorese Polyacrylamid Mix (30%) 1,3 ml Tris (1,5 M, pH 8,8) 50 μ l SDS (10% w/v) 20 μ l APS (10% w/v) 2 μ l TEMED
Tris-Puffer (1 M, pH 6,8)	12,114 g Tris 100 ml H ₂ O pH 6,8
Tris-Puffer (1,5 M, pH 8,8)	18,171 g Tris 100 ml H ₂ O pH 8,8
Trypanblaulösung	PBS 10% (v/v) Trypanblau
Waschpuffer (ELISA)	PBS 0,01% Tween 20

2 Methoden

2.1 Zellaufreinigung

2.1.1 Isolation von primären Lymphozyten

Zur Aufreinigung von B- und T-Lymphozyten wurden Milz und Lymphknoten (LK) einer Maus entnommen, die einen Tag zuvor mit 250 μg NK1.1-Antikörper zur Depletierung von natürlichen Killerzellen (NK) i.p. behandelt wurde. Unter der Sterilwerkbank wurden die Organe mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein Metallsieb gepresst. Sollten Lymphozyten nur aus bestimmten Lymphknoten aufgereinigt werden, so wurden diese mit Hilfe von zwei Objektträgern zerrieben. Die so hergestellte Suspension wurde über ein 100 μm Nylonsieb in ein 50 ml Reaktionsgefäß filtriert und bei 300*g für 5 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet nach dem Resuspendieren mit 1 ml Erythrozytenlysepuffer für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Nach anschließendem Waschen wurden die Zellen für eine Negativselektion (*CD8⁺ T Cell Isolation Kit II* bzw. *B Cell Isolation Kit*; Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach) der magnetbasierten Separation vorbereitet.

2.1.2 Isolation von dendritischen Zellen

Um dendritische Zellen (DC) aus Milz und LK zu isolieren, wurden Milz und LK in eine 12-Loch Zellkulturplatte mit Verdaumedium gelegt und in die Milz ca. 500 μl Verdaumedium injiziert. Die Organe wurden 20 Min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Milz mit Hilfe eines Spritzenstempels zerdrückt und die LK zwischen Objektträgern zerrieben. Die so erhaltene Suspension wurde für weitere 20 Min. bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Suspension durch ein 100 μm Nylonsieb in ein 15 ml Reaktionsgefäß filtriert und für 5 Min. bei 300*g abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen für eine positiv Selektion (*CD11c⁺ Microbeads*; Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach) der magnetbasierten Separation vorbereitet.

2.1.3 Magnetbasierte Separation von Zellen

Die nach der Zellpräparation (2.1.1 und 2.1.2) erhaltenen Zellen wurden mit MACS-Puffer gewaschen und für 15 Min. mit 30 µl direktmarkierten magnetischen *CD11c⁺ Microbeads* (Positivselektion; DC Separation) oder für 10 Min. mit 20 µl eines biotinkonjugierten Antikörpercocktails (Negativisolation; B-Zellen und T-Zellen) bei 4°C inkubiert. Zu den biotinkonjugierten Antikörpern wurden anschließend 30 µl *anti-Biotin Microbeads* gegeben und erneut für 15 Min. bei 4°C inkubiert. Die Suspension wurde in MACS-Puffer aufgenommen, abzentrifugiert (5 Min., 300*g) und anschließend in 3 ml MACS-Puffer resuspendiert. Zur Separation wurden Zellaggregate durch Filtrierung durch ein 50 µm Nylonsieb entfernt und die Zellsuspension auf MACS Säulen (LS) aufgetragen. Die Säule wurde zweimal mit 2 ml MACS-Puffer gewaschen. Bei einer Negativisolation enthielt der Durchfluss die gewünschten Zellen. Für eine Positivisolation musste die Säule vom Magneten entfernt und die Zellen mit MACS-Puffer (zweimal 3 ml) heruntergespült werden. Nach der Aufreinigung wurde die Reinheit der Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie überprüft.

2.1.4 Aufreinigung von lebenden Lymphozyten

Um lebende Lymphozyten aus *in vitro* Kulturen zur weiteren Verwendung aufzureinigen zu können, wurde das Lymphozytentrennmedium *Lymphoprep* benutzt. In ein 15 ml Reaktionsgefäß wurden 2 ml Lymphozytentrennmedium vorgelegt und mit 5 ml der Zellsuspension vorsichtig überschichtet. Danach wurde die Lösung für 20 Min. bei 800*g zentrifugiert. Lebende Lymphozyten konnten als weiße Phase zwischen Lymphozytentrennmedium und Vollmedium identifiziert und vorsichtig mit Hilfe einer Pipette abgenommen werden.

2.1.5 CFSE-Markierung

Zur Proliferationsanalyse antigenspezifischer T-Zellen wurden diese mit dem Farbstoff Carboxyfluorescein-Succinimidylester (CFSE) markiert. Dazu wurde Carboxyfluorescein-Diazetat-Succinimidylester (CFDA-SE) verwendet, welcher gut membrangängig ist und nach Eindringen in die Zelle mit intrazellulären Esterasen reagiert, so dass das fluoreszente CFSE entsteht. Gleichzeitig kann CFSE an intrazelluläre Moleküle binden, womit keine Diffusion über die Membran mehr möglich ist.

Bei Zellteilung entsteht ein distinktes Proliferationsmuster, da gleiche Anteile des Farbstoffs an Tochterzellen weitergegeben werden.

Nach Isolation von Lymphozyten (2.1.1) wurden die Zellen in 5 ml PBS pro Milz aufgenommen und mit 1 μ M CFDA-SE (in DMSO) für *in vitro* Kulturen, bzw. 5 μ M CFDA-SE (in DMSO) für *in vivo* Experimente versetzt. Die Zellen wurden für 10 Min. bei 37°C inkubiert und die Reaktion mit dem zweifachen Volumen PBS mit 10% (v/v) FCS gestoppt. Nach Zentrifugation für 5 Min. bei 300*g wurde das Pellet noch einmal mit PBS gewaschen (5 Min., 300*g). Die Zellen wurden in PBS oder Vollmedium aufgenommen, gezählt und anschließend in der entsprechenden Zellzahl ausplattiert bzw. gespritzt. Die Proliferationsanalyse erfolgte nach zwei bis vier Tagen am Durchflusszytometer.

2.1.6 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung von Zellzahlen wurde die Zellsuspension 1:20 (10 μ l in 190 μ l) mit einer 0,4%igen Trypanblaulösung verdünnt und 10 μ l davon wurden auf die Neubauerzählkammer aufgetragen. Die Anzahl der ungefärbten, lebenden Zellen wurde in vier Großquadraten gezählt und die Gesamtzellzahl der Suspension folgendermaßen kalkuliert:

lebene Zellen/4*Verdünnungsfaktor*Volumen Zellsuspension (in ml)*Kammerfaktor (10^4).

Wurde vor der Zellzahlbestimmung keine Erythrozytenlyse durchgeführt, so wurden diese vor dem Zählen mit 4% Essigsäure entfernt.

2.2 *in vivo* Experimente

2.2.1 Mausbehandlungen

2.2.1.1 *adoptiver Zelltransfer*

Um Zellen adoptiv zu transferieren wurde die entsprechende Zellzahl in 300 μ l PBS aufgenommen und über die Schwanzvene der Maus intravenös injiziert.

2.2.1.2 *Antikörperbehandlung*

Die Applikation blockierender Antikörper erfolgte intraperitoneal in einem Volumen von 250 μ l. Von den blockierenden Antikörpern TY25 und MIH5 und dem depletierendem Antikörper NK1.1 wurden jeweils 250 μ g je Maus eingesetzt.

2.2.1.3 Immunisierung

Zur *in vivo* Untersuchung des Aktivierungstatus von OVA spezifischen T-Zellen wurden 10 µg OVA pro Gramm Körpergewicht intravenös in die Schwanzvene gespritzt.

Um OVA spezifische T-Zellen immunogen zu aktivieren, wurden 50 µg OVA mit 10 µg CpG ODN1668 subkutan in die Flanke injiziert. Als drainierender Lymphknoten wurden axilläre und inguinale LK entnommen.

2.2.1.4 Betäubung

Zur Betäubung von Mäusen wurden Ketamin (10% v/v) und Xylazin (20 ng/ml) im Verhältnis 3:1 gemischt und im 10-fachen Volumen PBS aufgenommen. Von dieser Lösung wurden 250 µl pro Maus intraperitoneal verabreicht.

2.2.2 Knochenmarkchimären

Zur Herstellung von Knochenmarkchimären wurden die Empfängermause durch die Xylazin/Ketamin Lösung betäubt und in den Bestrahlungsbecher gelegt. Zum Schutz der Augen wurde Bepanthensalbe aufgetragen. Mit dem Programm "Maus" erfolgte die Bestrahlung über 4 Min. mit 9 Gray. Die bestrahlten Mäuse wurden bis zum Aufwachen warm gelagert. Spendermäusen wurden die Beine entnommen und das Knochenmark (KM) mit Hilfe einer Spritze ausgespült. Die Zellen wurden abzentrifugiert (300*g, 5 Min.), in PBS aufgenommen und filtriert. Für gemischte Knochenmarkchimären wurde das Knochenmark der Spendermause 1:1 gemischt. Die Zellen einer Spendermaus reichten für drei Empfängermause und wurden 4 h nach Bestrahlung intravenös über die Schwanzvene injiziert. Um Infektionen zu vermeiden, wurde den Mäusen mit HCl angesäuertes Wasser (pH 2,6) bis zu ihrem Lebensende verabreicht.

2.2.3 *in vivo* Antigenaufnahme

Zur Untersuchung der Antigenaufnahme von DC *in vivo* wurden den Mäusen 10 µg endotoxinfreies OVA-Alexa647 pro Gramm Körpergewicht intravenös injiziert. Um eine Kinetik zu erstellen, wurden die Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten durch zervikale Dislokation getötet und diverse Lymphknoten und die Milz getrennt voneinander analysiert.

2.2.4 *in vivo* Zytotoxizität

In vivo Zytotoxizitätstests wurden wie folgt durchgeführt. Zielzellen wurden aus den Milzen von Wildtypmäusen gewonnen und auf zwei gleiche Aliquots verteilt. Ein Aliquot wurde mit 2 μM SIINFEKL für 15 Min. bei 37°C beladen und mit 1 μM CFSE (CFSE^{hoch}) markiert. Das andere Aliquot blieb unbeladen und wurde mit 0,1 μM CFSE (CFSE^{niedrig}) markiert. CFSE^{hoch} und CFSE^{niedrig} Zellen wurden 1:1 gemischt und 1×10^7 Zellen dieses Gemischs wurden intravenös injiziert. Nach 4 h wurde das Überleben der Zellen durchflusszytometrisch untersucht und die spezifische Lyse wie folgt kalkuliert:

Prozent spezifische Zytotoxizität =

$$100 - (100 \times (\text{CFSE}^{\text{hoch}}/\text{CFSE}^{\text{niedrig}})_{\text{Versuchsgruppe}}/(\text{CFSE}^{\text{hoch}}/\text{CFSE}^{\text{niedrig}})_{\text{Kontrolle}}).$$

2.3 Zellkultur

2.3.1 Kokultur von B-Zellen und T-Zellen

Für eine Kokultur wurden die zuvor aufgereinigten B-Zellen zunächst je nach Anzahl der Ansätze auf 24-Loch Zellkulturplatten aufgeteilt. Um eine Behandlung mit Inhibitoren oder Stimuli durchzuführen, wurden die Substanzen in den entsprechenden Konzentrationen bei 37°C für die angegebene Zeit zu den B-Zellen gegeben. Anschließend wurden sie mit Waschmedium gewaschen und die B-Zellen mit 1 mg/ml OVA-HEL oder OVA bzw. 100 nM SIINFEKL für 30 Min. auf Eis beladen. Die beladenen Zellen wurden gewaschen, dann für 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend gezählt. 1×10^5 Zellen je Loch wurden ausplattiert. Zu jedem Ansatz wurden 1×10^5 OT-I bzw. OT-II Zellen gegeben und die Kokultur für 18 h bei 37°C inkubiert. Jeder Ansatz wurde als Quintett aufgetragen. Nach 18 h wurden die Überstände abgenommen und die Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

Substanz	eingesetzte Konzentration	Inkubationszeit
anti-IgM	20 $\mu\text{g/ml}$	2 h
Brefeldin A	0,25- 2,5 $\mu\text{g/ml}$	30 Min.
Chloroquin	5- 50 μM	30 Min.
Cytochrom C-HEL	100 $\mu\text{g/ml}$	5 h
Epoxomicin	0,1- 1 μM	30 Min.
Exotoxin A	0,1- 10 $\mu\text{g/ml}$	30 Min.
Piceatannol	50 μM	6-8 h
Primaquin	10- 100 μM	30 Min.
Tfr-UL49.5	60 μM	30 Min. + in Kultur

2.3.2 "OVA Schock"

Um OVA direkt in Zellen bringen zu können, ohne dass es über Rezeptoren aufgenommen werden muss, wurde das Phänomen des osmotischen Schocks ausgenutzt. Dabei werden Zellen zunächst in stark hypertoner OVA-haltiger Lösung, inkubiert, so dass diese auf Grund des osmotischen Gesetzes Wasser abgeben und schrumpfen. Auf die Zellen wird dann hypotones Medium dazugegeben und durch die rasche Ausdehnung der Zellen werden Wasser und OVA direkt in das Zytosol der Zelle befördert.

Schockmedium wurde mit 10 mg/ml OVA versetzt und über 0,2 μm Filter sterilfiltriert. Isolierte B-Zellen aus 1-2 Milzen wurden in 1 ml Schockmedium mit OVA resuspendiert und für 10 Min. bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden sofort mit 15 ml vorgewärmter hypotoner Lösung (60% v/v PBS, 40% v/v H₂O) verdünnt und für 2 Min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (300*g, 5 Min.) und in Kulturmedium aufgenommen.

2.3.3 Intrazelluläre Färbung für Mikroskopie

Für die intrazellulären Färbungen zur Mikroskopie wurden zunächst B-Zellen wie beschrieben aufgereinigt (2.1.3). Die gewünschte Zellzahl wurde in FACS-Röhrchen gegeben und abzentrifugiert (300*g, 5 Min.). Zuerst wurden die Zellen mit HEL-Alexa647 oder Transferrin-Alexa568 für 30 Min. auf Eis inkubiert. Die Konzentration wurde um Faktor 2 höher als für FACS Färbungen gewählt (1,25 - 2,5 $\mu\text{g/ml}$). Anschließend wurden die Zellen gewaschen (300*g, 5 Min.), in 500 μl Waschmedium aufgenommen und für 0-120 Min. bei 37°C inkubiert. Für intrazelluläre Färbungen wurden die Zellen zunächst in PBS gewaschen und anschließend für 15 Min. auf Eis mit 4% PFA fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen gewaschen und für 1 h mit Permeabilisierungspuffer (Mikroskopie) permeabilisiert. Das enthaltene BSA diente dem Blockieren unspezifischer Bindungen. Nach erneutem Waschen wurden die Erstantikörper (anti-EEA-1 bzw. anti-LAMP-1 oder direktmarkierte Antikörper; 2 $\mu\text{g/ml}$) in PBS mit 0,1% Triton X-100 angesetzt und für 30 Min. bei Raumtemperatur zu den Zellen gegeben. Nach anschließendem Waschen wurde die Prozedur mit den entsprechenden Zweitantikörpern (anti-Ratte bzw. anti-Kaninchen, fluorophorgekoppelt; 2 $\mu\text{g/ml}$) wiederholt. Die Zellen wurden erneut gewaschen und falls erwünscht mit 1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI in PBS für 15 Min. bei Raumtemperatur gefärbt. Nach einem letzten Waschschrift wurde die Zellsuspension auf Objektträger aufgetropft und direkt mit einem Tropfen Einschlussmittel mit Ausbleichschutz versehen.

Das Deckglas wurde vorsichtig aufgesetzt und alles wurde für 2-3 Tage bei 4°C aushärten gelassen, bevor die Zellen unter dem konfokalen Mikroskop betrachtet und analysiert wurden.

2.4 Analysemethoden

2.4.1 Apoptosebestimmung

Um die Apoptoseinduktion bestimmen zu können, wurde die Aktivität der Caspase 3 mit Hilfe des *Apoptosis Detection Kit* bestimmt. Der Inhibitor FLICA (Fluorochrome Inhibitor of Caspases) FAM-DEVD-FMK bindet kovalent an Caspase 3, inhibiert diese und verbleibt in der Zelle, während ungebundener Inhibitor gewaschen werden kann. Durch die Fluoreszenz des Inhibitors kann dieser durchflusszytometrisch gemessen werden, wobei die Fluoreszenzintensität mit der Menge von aktiver Caspase 3 korreliert. Um bereits tote oder nekrotische Zellen abtrennen zu können, kann mit Propidiumiodid oder Hoechst 33342 gegengefärbt werden.

Zellen wurden in Medium auf eine Konzentration von 1×10^6 /ml eingestellt und 200 μ l pro FACS-Röhrchen verwendet. Der FLICA-Inhibitor wurde nach Protokoll in DMSO gelöst, so dass eine 150x Stammlösung vorlag. Diese wurde mit PBS auf eine 30x Lösung verdünnt, von welcher 6,6 μ l pro Röhrchen eingesetzt wurden. Die Zellen wurden nun für 1 h bei 37°C in Medium inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen (5 Min., 300*g) und einer Oberflächenfärbung unterzogen. Direkt vor dem Einmessen wurden Hoechst 33342 oder Propidiumiodid auf die Zellen gegeben. Die Analyse erfolgte am Durchflusszytometer.

2.4.2 Zytokin-ELISA

Zur Bestimmung von Zytokinkonzentrationen im Überstand der *in vitro* Kulturen wurde ein sogenannter *Sandwich*-ELISA verwendet. Dabei wird ein Primärantikörper mit Spezifität gegen das gesuchte Protein an eine beschichtete 96-Loch ELISA-Platte gebunden, an den das Zielprotein aus einem Gemisch binden kann. Anschließend wird ein biotinylierter Zweitantikörper dazugegeben, der nicht-kompetitiv ebenfalls an das Protein binden kann. Als nächstes wird Meerrettichperoxidase dazugegeben, welche an Streptavidin gekoppelt ist und somit an das Biotin den Sekundärantikörpers binden kann.

Meerrettichperoxidase ist ein Enzym, welches u.a. OPD als Substrat umsetzen kann, so dass es zu einer Farbreaktion kommt. Diesen Farbumschlag kann man über die Lichtabsorption bei einer bestimmten Wellenlänge ($\lambda = 492 \text{ nm}$) messen. Mit Hilfe einer Standardkurve kann man so die Menge des gebundenen Proteins bestimmen. Durch das *Sandwich*-Prinzip wird außerdem das Signal amplifiziert, so dass auch kleine Proteinmengen ein gutes Signal geben.

Zur Beschichtung der 96-Loch ELISA-Platte wurde der unmarkierte Primärantikörper in Beschichtungspuffer verdünnt und 50 μl pro Loch aufgetragen. Die Platte wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Platte ausgeschlagen und mit 200 μl Blockierungspuffer eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Die Platte wurde erneut ausgeschlagen und mit Waschpuffer gewaschen. Der Standard wurde in Blockierungspuffer verdünnt und in Doppelwerten aufgetragen. In 1:2 Verdünnungsschritten wurde eine Standardreihe mit 10 Werten erstellt. Jeweils 50 μl des Standards, der Probe oder eines Leerwerts (Blockierungspuffer) wurden aufgetragen und die Platte bei Raumtemperatur für 2 h inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Platte zweimal gewaschen, der biotinylierte Zweitantikörper in Blockierungspuffer verdünnt und 50 μl pro Loch auf die Platte pipettiert. Nach zwei Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte wieder gewaschen. Anschließend wurde Streptavidin-Meerrettichperoxidase in Blockierungspuffer auf die Platte aufgetragen und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Platte zweimal gewaschen. Zum Entwickeln wurde 1 mg/ml OPD in Substratpuffer gelöst und mit 1 $\mu\text{g/ml}$ H_2O_2 versetzt. Es wurden 50 μl pro Loch aufgetragen und die Farbentwicklung mit 1 M H_2SO_4 gestoppt (50 μl pro Loch). Der fertige ELISA wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 490 \text{ nm}$ eingemessen. Die Standardkurve und Zytokinkonzentration der Proben wurden mit Hilfe der Magellan-Software ermittelt.

ELISA	Primärantikörper	Sekundärantikörper	1. Standard
IL-2	1,0 $\mu\text{g/ml}$	1,0 $\mu\text{g/ml}$	80 ng/ml
IFN- γ	4,0 $\mu\text{g/ml}$	0,4 $\mu\text{g/ml}$	2,0 ng/ml

2.4.3 FACS-Analyse

2.4.3.1 Oberflächenfärbung

Um die Expression von Oberflächenmolekülen bestimmen zu können, wurden Zellen aus Milz und/oder Lymphknoten in FACS-Puffer aufgenommen und auf eine Konzentration von 5×10^6 eingestellt. Fluoreszenzmarkierte Antikörper (siehe Tabelle 1.4) wurden in der entsprechenden Konzentration dazugegeben und für 20 Min. bei 4°C inkubiert. War ein Antikörper nicht direkt markiert, sondern biotinyliert, wurden die Zellen gewaschen (300*g, 5 Min.) und anschließend für 20 Min. mit der entsprechenden Konzentration Streptavidin-Fluorophor (siehe 1.4) inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift, nach dem die Zellen in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen wurden. Wurde Hoechst 33342 zur lebend/tot Diskriminierung eingesetzt, so wurde dieses direkt vor der Messung dazugegeben.

2.4.3.2 Intrazellulärfärbung

Zur durchflusszytometrischen Analyse von intrazellulären Transkriptionsfaktoren wurden Zellen von Milz und Lymphknoten zuvor einer Oberflächenfärbung unterzogen (siehe 2.4.3.1) und anschließend mit 2% PFA in FACS-Puffer für 10 Min. auf Eis fixiert. Nach Fixierung erfolgten alle Wasch-/Zentrifugationsschritte bei 400*g. Um Transkriptionsfaktoren im Kern für Antikörper zugänglich zu machen, mussten die Zellen mit einem stärkeren Detergenz permeabilisiert werden.

Dazu wurden die Antikörper in Permeabilisierungspuffer (0,1% Triton X in PBS) verdünnt und für 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Waschschrift mit FACS-Puffer waren die Zellen bereit zur Analyse.

Sollten Zytokine intrazellulär bestimmt werden, so musste zunächst deren Produktion durch Restimulation der Zellen für 4 h mit 1 µg/ml SIINFEKL angeregt werden und gleichzeitig das Ausschleusen derselben mit 1 µg/ml Golgi Plug (Brefeldin A) und/oder Golgi Stop (Monensin) verhindert werden. Auch hier wurde zunächst eine Oberflächenfärbung durchgeführt und anschließend wurden die Zellen fixiert. Zur Permeabilisierung wurde Saponinpuffer eingesetzt, da stärkere Detergenzien ein Austreten der Zytokine aus der Zelle zur Folge haben könnten. Nach 20 Min. Inkubation mit Saponinpuffer bei Raumtemperatur wurden die Antikörper ebenfalls in Saponinpuffer verdünnt und für weitere 30 Min. inkubiert. Gewaschen wurde einmal mit Saponinpuffer, um überschüssige Antikörper aus der Zelle zu entfernen und einmal mit FACS-Puffer. Anschließend erfolgte die Analyse am Durchflusszytometer.

2.5 Proteinbasierte Untersuchungen

2.5.1 Kovalente Kopplung von Proteinen

Zur Kovalenten Kopplung von Proteinen wurden *Bioconjugate Toolkit Reagents* von *Thermo Scientific* benutzt. Hierbei werden die zu koppelnden Proteine chemisch modifiziert, so dass über N-Hydroxysuccinimidylester und Maleimidgruppen mit Amin- und Sulfhydrylgruppen eine kovalente Bindung erfolgen kann. Hierbei handelt es sich um heterobifunktionelle Kreuzvernetzer, was bedeutet, dass die Gruppen miteinander, nicht jedoch untereinander reagieren können.

Die in der Zellkultur eingesetzten Proteine OVA-HEL und OVA-Transferrin wurden jeweils frisch vor den Versuchen gekoppelt. Die Kopplungspartner OVA und HEL wurden in einem molaren Verhältnis von 1:2 eingesetzt, OVA und Transferrin wurden 1:1 gekoppelt. Die Kopplung wurde mit 5×10^6 Mol OVA und jeweils 1×10^7 Mol HEL bzw. 5×10^6 Mol Transferrin, gelöst in jeweils 1 ml PBS, durchgeführt. Zum Einbringen von Sulfhydrylgruppen wurden $10 \mu\text{l}$ SATA einer 1×10^8 molaren Lösung (1 mg SATA in $30 \mu\text{l}$ DMSO) auf 4 mg OVA (1 mg/ml) gegeben. Nach 30 Min. bei Raumtemperatur wurde die Lösung über eine *ZEBA Spin desalt column* entsalzt ($1000 \times g$, 2 Min.). Zum Entschützen der reaktiven Gruppen wurden $100 \mu\text{l}$ Deazetylierungslösung pro ml Proteinlösung dazugegeben. Nach 2 h bei Raumtemperatur (RT) wurde erneut entsalzt.

Um HEL oder Transferrin mit Maleimidgruppen zu versehen, wurden $15 \mu\text{l}$ einer 10 mg/ml Lösung SMCC auf 3 mg HEL bzw. Transferrin gegeben. Nach 30 Min. bei RT wurden die Proteine entsalzt und konnten mit dem vorbereiteten OVA-SATA zusammengegeben werden. Nach ca. 18 h bei 4°C war die Kopplungsreaktion abgeschlossen. Die gekoppelten Proteine wurden über $0,2 \mu\text{m}$ Filter sterilfiltriert und die Konzentration wurde mit Hilfe des BCA Assays bestimmt. Zur Überprüfung der Kopplungseffizienz wurden die Proteine auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen, welches anschließend mit Coomassie gefärbt wurde.

2.5.2 BCA Assay

Da durch die Modifikation mit Kopplungsreagenzien die Konzentration von gekoppelten Proteinen nicht mit einem UV-Spektrometer bestimmt werden konnte, wurde diese mit Hilfe des *BCA Protein Assay Reagent* (Bicinchonin Säure) gemessen. Cu^{+2} Ionen können unter alkalischen Bedingungen von Proteinen zu Cu^{+1} Ionen reduziert werden.

Bicinchonin Säure wirkt als Chelator und reagiert mit zwei Cu^{+1} Molekülen, was in einem Farbumschlag resultiert. Dieser Farbumschlag kann bei einer Wellenlänge von $\lambda = 562 \text{ nm}$ gemessen werden und verhält sich linear zur steigenden Proteinkonzentrationen.

Zur Messung der Proteinkonzentration mit dem *BCA Protein Assay Reagent* wurde zunächst eine Standardreihe erstellt, die von $25 \mu\text{g/ml}$ - $2000 \mu\text{g/ml}$ BSA rangierte. Die Arbeitslösung der Reagenzien wurde hergestellt, indem 50 Teile Reagenz A mit 1 Teil Reagenz B gemischt wurden. Dabei entstand eine grüne Lösung. $25 \mu\text{l}$ der Standardreihe und der zu messenden Proben wurden in Triplikaten in eine 96-Loch ELISA-Platte (Flachboden) pipettiert. Darauf wurden $200 \mu\text{l}$ Arbeitslösung gegeben. Die Platte wurde leicht geschüttelt und 30 Min. bei 37°C inkubiert. Je nach Proteinkonzentration veränderte sich die Farbe ins violette. Dieser Farbumschlag wurde photometrisch gemessen und die Proteinkonzentration an Hand der Standardkurve ermittelt.

2.5.3 Fluoreszenzmarkierung von Antikörpern und Proteinen

Unmarkierte Antikörper und Proteine wurden nach Protokoll des Herstellers mit dem *Alexa Fluor 647 Protein Labeling Kit* fluoreszenzmarkiert. Dazu wurde das Protein bzw. der Antikörper in einer Konzentration von 2 mg/ml in $0,5 \text{ ml}$ PBS gelöst und mit 10% (v/v) 1 M Bicarbonatpuffer versetzt. Ein Röhrchen mit dem reaktiven Farbstoff wurde auf Raumtemperatur gebracht und die vorbereitete Proteinlösung hineingegeben. Nach durchmischen der Lösung wurde sie für 1 h bei Raumtemperatur unter Rühren inkubiert. Um freien Farbstoff und entstandene Salze zu entfernen wurde eine *ZEBA Spin desalt column* verwendet. Die Lösung wurde auf die Säule aufgetragen und für 2 Min. bei $1000 \times g$ zentrifugiert. Der Durchfluss enthielt das fluoreszenzmarkierte Protein, während Bestandteile $< 7 \text{ kDa}$ in der Säule verblieben.

2.5.4 SDS- PAGE

Zur Kontrolle des Kopplungserfolges und der Aufreinigung wurde ein 10% SDS-Gel benutzt. Das Gel wurde entsprechend den Angaben (1.8.2) gegossen. Die Proben wurden im Verhältnis $1:1$ mit Probenpuffer gemischt und bei $99 \text{ }^\circ\text{C}$ für 5 Min. aufgekocht. Anschließend wurde $1:6$ NEM dazugegeben und die Proben in die Taschen pipettiert. Das Gel wurde bei 17 mA bis zum Rand des Trenngels laufengelassen. Anschließend wurde die Stromstärke auf 30 mA erhöht. Um Proteine sichtbar zu machen, wurde das Gel mit einer Coomassie-Lösung gefärbt und um den Hintergrund zu verringern, mit Entfärberlösung entfärbt. Anschließend wurde das Gel photographisch dokumentiert.

2.5.5 Zellfraktionierung

Zur Fraktionierung von Zytoplasma und Zellmembran wurde das *Subcellular Protein Fractionation Kit* von Thermo Scientific verwendet. Hierbei wird zunächst die Zellmembran permeabilisiert, so dass das Zytoplasma austritt. Dieses wird so weiter behandelt, dass Plasma, Mitochondrien und ER/Golgi-Membranen aufgelöst werden, nicht aber die Kernmembran. Letztere kann durch einen Zentrifugationsschritt abgetrennt und wiederum solubilisiert werden. Weitere Auftrennungen sind mit Hilfe des Kits möglich, wurden aber nicht durchgeführt.

5×10^6 Suspensionszellen wurden in eiskaltem PBS aufgenommen, in ein Schnappdeckelgefäß überführt und durch Zentrifugation bei $500 \times g$ für 3 Min. pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die verbleibenden ca. $50 \mu l$ Zellvolumen mit $500 \mu l$ eiskaltem, Proteaseinhibitor enthaltendem, CEB (*Cytoplasmic Extraction Buffer*) für 10 Min. bei $4^\circ C$ inkubiert. Nach Zentrifugation bei $500 \times g$ für 5 Min. wurde der Überstand, welcher nun das zytoplasmische Extrakt enthielt, in ein neues, gekühltes Schnappdeckelgefäß überführt. Auf das Pellet wurden nun $500 \mu l$ eiskalter, Proteaseinhibitor enthaltender, MEB (*Membrane Extraction Buffer*) gegeben. Nach 5 Sek. vortexen auf der höchsten Stufe folgten 30 Min. Inkubation bei $4^\circ C$ unter leichtem Schütteln. Nach der Inkubation wurde die Probe für 5 Min. bei $3000 \times g$ abzentrifugiert und der Überstand, welcher nun das Membranextrakt enthielt wurde in ein neues, gekühltes Schnappdeckelgefäß überführt. Auf weitere Aufreinigung der Kernkomponenten im Pellet wurde verzichtet. Für die zytoplasmatischen und membranären Fraktionen wurden Western Blots durchgeführt.

2.5.6 Probenlyse für Western Blot

Um Western Blots von Gesamtzelllysaten durchführen zu können, wurden Zellen mit kaltem PBS gewaschen und in $100 \mu l$ 1x Zelllysepuffer aufgenommen. Nach Inkubation von 10 Min. auf Eis folgte ein 10-minütiger Zentrifugationsschritt bei $20.000 \times g$. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und die Proteinmenge konnte am UV-Spektrometer bestimmt werden.

Um die Menge von HEL-Biotin im Zytoplasma oder Gesamtzelllysat von B-Zellen im Western Blot nachweisen zu können, wurde zunächst wie unter 2.5.4 beschrieben ein SDS-Gel laufen gelassen. Danach wurde das Gel kurz in *aqua dest.* gewaschen und in Transferpuffer äquilibriert. Eine PVDF Membran wurde kurz mit Methanol benetzt und Whatmanpapier und Blotschwämmchen wurden in Transferpuffer angefeuchtet.

Anschließend wurde das Blotsandwich wie folgt aufgebaut: Rote Seite der Halterung, Schwämmchen, Whatman Papier, Membran, Gel, Whatman Papier, Schwämmchen, Schwarze Seite der Halterung. Der Blot wurde 2 h bei 25 V durchgeführt und die Membran danach mit TBST gewaschen. Zur Detektierung von Proteinen wurde die Membran zunächst für 2 h mit 5% Milchpulver in TBST blockiert und dann für 1 h mit 0,2 $\mu\text{g/ml}$ Streptavidin-Meerrettichperoxidase in 5% Milchpulver in TBST inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST wurde die Membran abgetropft und auf eine Folie gelegt. Zur Entwicklung des Blots wurde das *ECL Kit* von *Thermo Scientific* verwendet. Die Komponenten des *ECL Kits* wurden 1:1 gemischt und für 1 Min. auf die Membran aufgebracht. Überflüssiges Reagenz wurde vorsichtig ausgetrichen und die Membran in der Folie in die Entwicklerkammer gelegt. Je nach Stärke der Banden wurde für verschiedene Zeitintervalle belichtet und entwickelt. Die Bandenstärke wurde mit der Image Lab Software von Bio-Rad quantifiziert.

2.6 Statistik

Alle Resultate wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. Zur Berechnung der Signifikanzen mit Hilfe der Prism5 Software wurde ein ANOVA mit anschließenden Bonferroni-Test verwendet.

IV Ergebnisse

1 Mechanismen der B-Zellkreuzpräsentation

Kreuzpräsentation hat im Zusammenhang mit Immuntherapien in den letzten Jahren stetig an Bedeutung gewonnen. Im Fokus der Wissenschaft lagen hierbei dendritische Zellen, da diesen bisher die größte Bedeutung in der Kreuzpräsentation *in vivo* zugesprochen wird. Neben DC machen B-Zellen, auch als APC, einen essentiellen Teil der adaptiven Immunantwort aus. Dieser Teil der Arbeit beschäftigt sich deswegen mit der Aufklärung der Mechanismen der B-Zellkreuzpräsentation und den Möglichkeiten, diese für *in vivo* Versuche zu instrumentalisieren.

Ein gravierender Unterschied zwischen B-Zellen und dendritischen Zellen liegt in den Aufnahmemechanismen. Während dendritische Zellen über diverse Rezeptoren alle möglichen Antigene aufnehmen können, sind B-Zellen auf die Aufnahme über den B-Zellrezeptor beschränkt. Das führt dazu, dass für das kreuzpräsentierende Antigen eine Spezifität der B-Zelle vorliegen muss. In den folgenden Experimenten wurde dazu die B-Zellrezeptor-transgene Mauslinie IgHEL verwendet, deren B-Zellen alle einen spezifischen Rezeptor für das Modellantigen Hühnereiweißlysozym (HEL) exprimieren. Als CD8⁺ T-Zellen dienten OT-I Zellen, die spezifisch das 257-264 Peptid (SIINFEKL) des Modellantigens Ovalbumin (OVA) auf MHC-I erkennen. Damit Antigenpräsentationsexperimente mit diesen, für verschiedene Antigene spezifischen, B- und T-Zellen durchgeführt werden konnten, wurde OVA über eine chemische Reaktion kovalent an HEL gebunden.

1.1 Antigenaufnahme und Präsentation

1.1.1 Aktivierungsstatus der B-Zellen nach Antigenaufnahme

Zunächst sollte getestet werden, welchen Aktivierungsstatus IgHEL B-Zellen nach Antigenaufnahme haben und ob Peptide von diesem Antigen auf MHC-I-Moleküle geladen werden. Als Modellantigen diente kovalent gekoppeltes OVA-HEL, welches später auch in Kokulturen verwendet werden sollte. Nach 4 h Inkubation mit OVA-HEL konnte eine Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf den IgHEL B-Zellen durchflusszytometrisch gemessen werden, während CD40 keine veränderte Expression zeigte (Abbildung IV-1A).

Die vermehrte Expression des C-Typ Lektins CD69 impliziert eine leichte Aktivierung der B-Zellen. Während MHC-II bereits vor Antigenaufnahme auf den B-Zellen hoch exprimiert war und nicht wesentlich anstieg, konnte eine starke Erhöhung der MHC-I-Expression gemessen werden (Abbildung IV-1B).

Diese Daten zeigen, dass IgHEL B-Zellen OVA-HEL aufnehmen können, dabei selber aktiviert werden und kostimulatorische Moleküle sowie MHC-I hochregulieren.

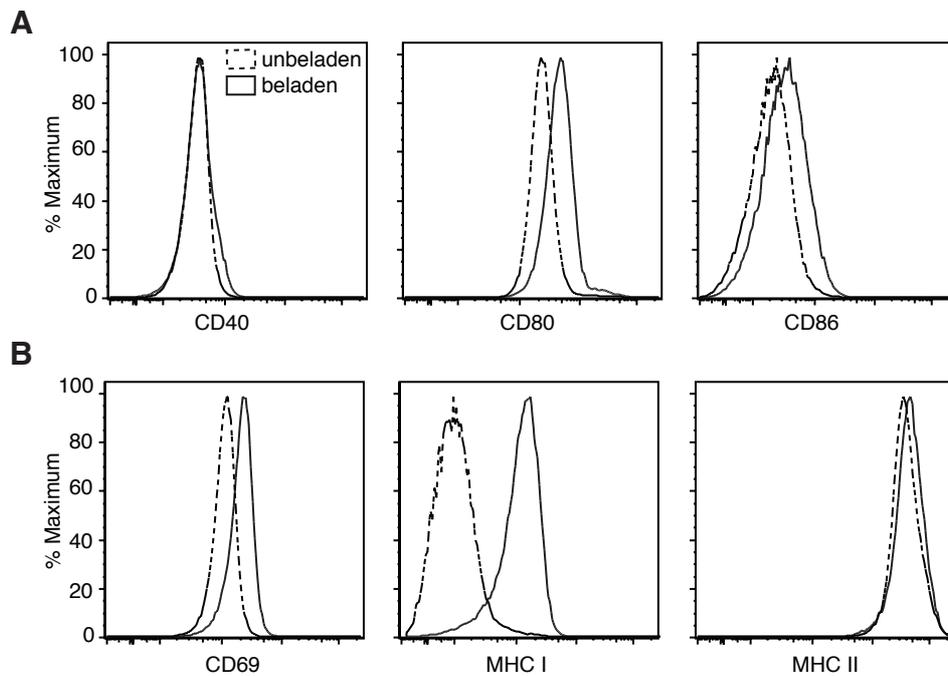


Abbildung IV-1: B-Zellen exprimieren kostimulatorische Moleküle und mehr MHC-I nach Antigenaufnahme

(A), (B) Oberflächenexpression von CD40, CD80, CD86, CD69, MHC-I und MHC-II vor und nach Antigenaufnahme. Aufgereinigte IgHel B-Zellen wurden für 4 h mit 1 mg/ml OVA-HEL bei 37°C inkubiert (schwarze Linie) oder naiv belassen (gestrichelte Linie) und anschließend für die Oberflächenexpression der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80, CD86 (A), bzw. des Aktivierungsmarkers CD69 und der MHC-I- und MHC-II-Moleküle (B) gefärbt. Abgebildet sind repräsentative Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse.

1.1.2 B-Zellen präsentieren peptidbeladene MHC-I-Moleküle nach Antigenaufnahme

Es sollte weiterhin untersucht werden, ob die zusätzlich vorhandenen MHC-I-Moleküle auch mit Peptiden beladen wurden. Dazu wurde eine Färbung mit dem Antikörper 25.D1-16 durchgeführt, der SIINFEKL, gebunden an K^b, erkennt. Die intrazelluläre Färbung ergab, dass, verglichen mit der Isotypkontrolle, nach 5 Minuten noch keine SIINFEKL beladenen MHC-I-Moleküle detektierbar sind, während nach 15 Minuten durchaus eine messbare Menge an MHC-I-Molekülen mit SIINFEKL beladen wurden (Abbildung IV-2).

Dies galt sowohl für den Anteil der Zellen mit mehr beladenen MHC-I-Molekülen (Abbildung IV-2A) als auch für die Menge SIINFEKL-beladener MHC-I-Moleküle pro Zelle (Abbildung IV-2B). Das bedeutet, dass IgHEL B-Zellen nach Aufnahme von OVA-HEL das OVA-Peptid SIINFEKL intrazellulär auf MHC-I laden.

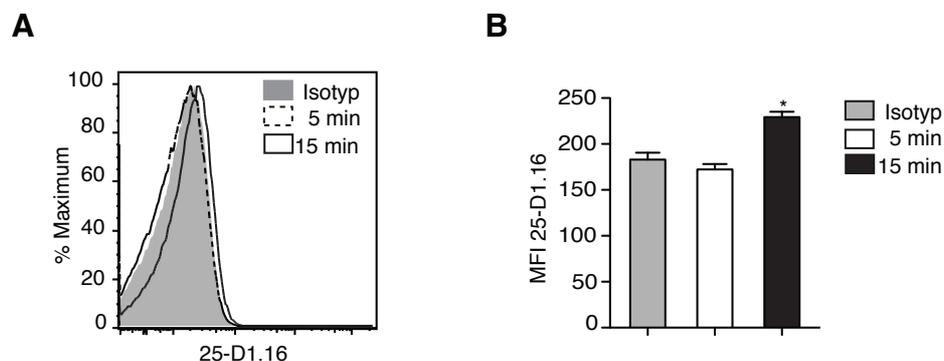


Abbildung IV-2: Nach OVA-HEL Inkubation beladen B-Zellen höhere Mengen von MHC-I-Molekülen intrazellulär mit SIINFEKL

(A) Intrazelluläre Beladung von MHC-I-Molekülen mit SIINFEKL. Aufgereinigte IgHEL B-Zellen wurden für 5 Min. (gestrichelte Linie) oder 15 Min. (schwarze Linie) mit OVA-HEL bei 37°C inkubiert und anschließend intrazellulär für 25-D1.16 (gestrichelte und schwarze Linie) oder die Isotypkontrolle (graue Fläche) gefärbt. Dargestellt ist ein repräsentatives Histogramm der durchflusszytometrischen Analyse. (B) Quantifizierung der SIINFEKL-beladenen MHC-I-Moleküle aus (A) mit Hilfe der mittleren Fluoreszenzintensität der 25-D1.16 (weißer und schwarzer Balken) bzw. Isotypfärbung (grauer Balken).

1.1.3 B-Zellen präsentieren exogene Antigene an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

Ob die Kombination aus Kostimulation und MHC-I-Beladung auch zu einer CD8⁺ T-Zellaktivierung führen kann, sollte in *in vitro* Kulturen getestet werden. Dazu wurden IgHEL B-Zellen mit OVA-HEL beladen und anschließend mit OVA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen, den OT-I Zellen, kokultiviert (Schema siehe Abbildung IV-3).

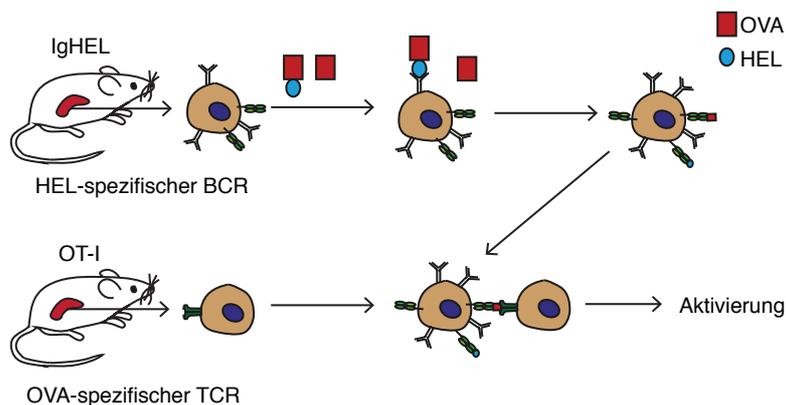


Abbildung IV-3: Schematische Darstellung der *in vitro* Kultur

B-Zellen wurden aus der Milz von IgHEL Mäusen isoliert, für 30 Min. auf Eis mit OVA-HEL beladen und anschließend für 2 h bei 37°C inkubiert. OVA-spezifische CD8⁺T-Zellen wurden aus Milz und Lymphknoten von OT-I Mäusen isoliert. Jeweils 1×10^5 beladene B-Zellen und T-Zellen wurden kokultiviert. Die Aktivierung der OT-I Zellen wurde über IL-2 und IFN- γ -Produktion, sowie über die Hochregulation der Moleküle CD25 und CD69 bestimmt.

Die Aktivierung der T-Zellen wurde nach 18 Stunden über IFN- γ und IL-2-Produktion gemessen. Als Positivkontrolle für erfolgreiche Beladung diente eine Kokultur mit OVA spezifischen CD4⁺ T-Zellen, OT-II Zellen, da diese nachgewiesenermaßen durch B-Zellen aktiviert werden können^{199, 244}. Mit OVA-HEL-beladenen IgHEL B-Zellen kultivierte OT-II Zellen produzierten auch bei großen Mengen Antigen kaum IFN- γ (Abbildung IV-4A). Im Gegensatz dazu war im Überstand der Kokultur mit OT-I Zellen bei Beladung mit 1000 $\mu\text{g/ml}$ OVA-HEL eine hohe IFN- γ -Produktion nachweisbar (Abbildung IV-4A). Auch bei nur einem Zehntel der Menge Protein (100 $\mu\text{g/ml}$) konnte IFN- γ im Überstand gemessen werden. Erst bei 10 $\mu\text{g/ml}$ OVA-HEL war keine IFN- γ -Produktion der OT-I Zellen mehr sichtbar (Abbildung IV-4A). Die im Überstand gemessene IL-2-Produktion zeigte dagegen, dass IgHEL B-Zellen auch bei geringen Mengen OVA-HEL noch OT-II Zellen aktivieren können. Bei jeder getesteten Antigenkonzentration wurden OT-II Zellen zu einer hohen IL-2-Produktion angeregt (Abbildung IV-4B). OT-I Zellen produzierten bei der maximalen Antigendosis vergleichbare Mengen IL-2, wie OT-II Zellen. Diese IL-2-Produktion nahm aber bereits bei 100 $\mu\text{g/ml}$ OVA-HEL um über 50% ab und war bei 10 $\mu\text{g/ml}$ kaum noch messbar. Somit kann man sagen, dass B-Zellen Antigen dosisabhängig kreuzpräsentieren und CD8⁺ T-Zellen aktivieren können. Im Vergleich zur MHC-II-Präsentation sind aber höhere Antigenmengen erforderlich.

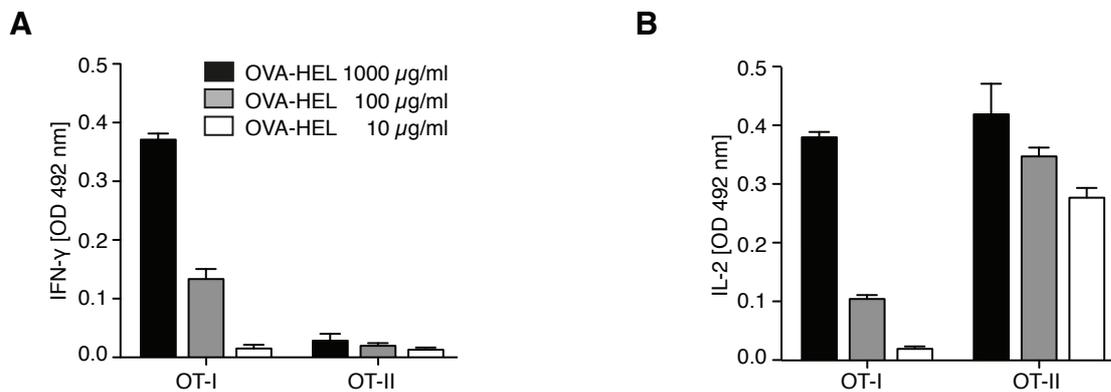


Abbildung IV-4: OT-I und OT-II Zellen produzieren IL-2 und IFN- γ nach Kokultur mit beladenen IgHEL B-Zellen

(A) IFN- γ -Produktion und (B) IL-2-Produktion von OT-I und OT-II Zellen nach 18 h Kokultur mit IgHEL B-Zellen. Die B-Zellen wurden mit den angegebenen Mengen OVA-HEL beladen und die Zytokinproduktion wurde im Überstand mit Hilfe eines ELISA bestimmt.

1.2 Antigenprozessierung

1.2.1 Über den B-Zellrezeptor aufgenommene Proteine gelangen in stabile, frühendosomale Kompartimente

Um die molekularen Mechanismen der B-Zellkreuzpräsentation aufzuklären, musste zunächst untersucht werden, in welche intrazellulären Kompartimente das aufgenommene Antigen gelangt. Zur Untersuchung dieser Frage wurde eine Kinetik der Antigenaufnahme in frühendosomale und lysosomale Kompartimente mit Hilfe konfokaler Mikroskopie erstellt. HEL-Alexa647 wurde 5 Min. nach Aufnahme über den B-Zellrezeptor zunächst in EEA-1-positive, also frühendosomale Kompartimente aufgenommen (Abbildung IV-5A). Nach einer Stunde bei 37°C konnte es weiter in EEA-1-positiven Kompartimenten oder bereits in lysosomalen, LAMP-1-positiven Kompartimenten detektiert werden (Abbildung IV-5A, unten). Ob die in der Kinetik beobachteten frühen Endosomen stabil blieben, wurde durch eine weitere Färbung untersucht. Dazu wurden B-Zellen zunächst mit einem fluoreszenzmarkierten HEL beladen und anschließend für 15 Min. bzw. 2 h inkubiert. Nach dieser ersten Inkubationszeit wurde ein mit einer anderen Farbe markiertes HEL auf die Zellen gegeben und ebenfalls für 15 Min. inkubiert. Dann wurde mikroskopisch untersucht, in welchen Kompartimenten HEL akkumulieren konnte. Wie in Abbildung IV-5B zu sehen ist, befanden sich beide verschieden markierte HEL Proteine bei langer und bei kurzer Inkubationszeit im selben, EEA-1-positiven Kompartiment. Dies bedeutet, dass in B-Zellen Protein nach Aufnahme in stabile frühe Endosomen gelangen kann, wie es auch für DC gezeigt wurde²²⁹.

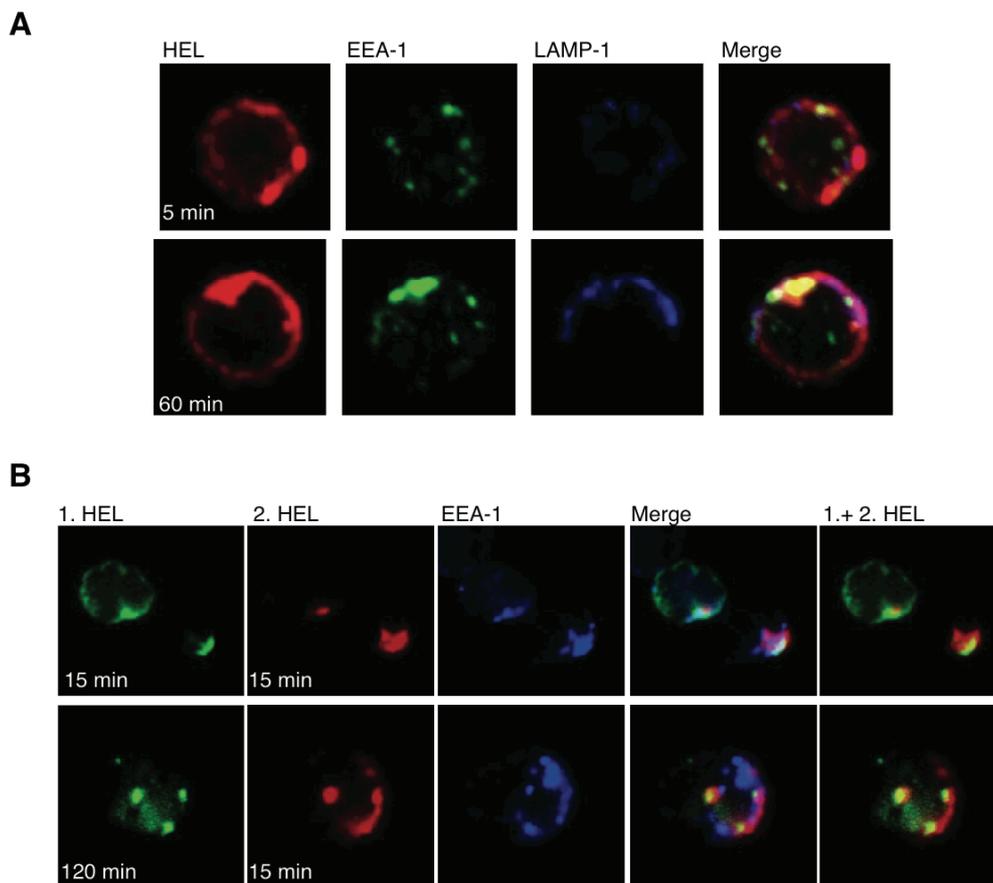


Abbildung IV-5: Vom B-Zellrezeptor aufgenommenes Protein gelangt in stabile frühe Endosomen

(A) Kolokalisation von HEL und den Kompartimentmarkern EEA-1 und LAMP-1. Aufgereinigte IgHEL B-Zellen wurden für 5 Min. (oben) bzw. 60 Min. (unten) mit HEL-Alexa647 bei 37°C inkubiert und anschließend intrazellulär für EEA-1 und LAMP-1 gefärbt. Kolokalisation der verschiedenen Marker wurde mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops bestimmt. (B) Kolokalisation von zeitlich versetzt aufgenommenen Proteinen. Aufgereinigte IgHEL B-Zellen wurden für 15 Min. (oben) bzw. 120 Min. (unten) mit HEL-Alexa488 bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 15 Min. mit HEL-Alexa647 bei 37°C inkubiert. Die Lokalisation der beiden HEL-Varianten wurde an einem konfokalen Mikroskop bestimmt. Alle Bilder sind repräsentative Aufnahmen.

1.2.2 B-Zellen können für Präsentationsexperimente nicht fixiert werden

Da die Lokalisierung von Antigenen in B-Zellen mit der in DC vergleichbar war, sollte weiterhin überprüft werden, ob auch die Antigenprozessierung sich ähnlich gestaltet. Dazu wurden Kokulturen mit verschiedenen Inhibitoren der Zelltransportwege und Antigenendegradierung behandelt. Um bei einigen Inhibitoren auszuschließen, dass die Effekte in Kultur reversibel sind oder dass diese Inhibitoren weitere Nebeneffekte vermitteln, sollten die B-Zellen nach Beladung mit Antigen fixiert werden.

Zur Überprüfung, ob eine solche Fixierung möglich ist, wurden die Fixanzien Paraformaldehyd und Glutardialdehyd in verschiedenen Konzentrationen 6 Stunden nach Beladen getestet. Unfixierte B-Zellen konnten wie bisher OT-I Zellen aktivieren. Dagegen konnten weder PFA-fixierte B-Zellen noch Glutardialdehyd-fixierte B-Zellen Antigen kreuzpräsentieren (Abbildung: IV-6A). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass zu wenig MHC-I-Moleküle zu dem gewählten Zeitpunkt auf der Oberfläche waren. Deswegen wurden B-Zellen mit SIINFEKL-Peptid beladen und ebenfalls fixiert. Vor Fixierung konnte eine Aktivierung der OT-I Zellen gemessen werden, nach Fixierung war diese aber stark verringert (Abbildung: IV-6B). Anschließend wurde noch die MHC-II-Präsentation überprüft. Auch diese wurde, verglichen mit MHC-II-Peptid-Beladung ohne Fixieren, auf nicht mehr detektierbare Werte reduziert (Abbildung: IV-6B). Möglicherweise sind von B-Zellen produzierte lösliche Faktoren essentiell, oder die Fixierung von B-Zellen reduziert auch ihre kostimulatorischen Kapazitäten.

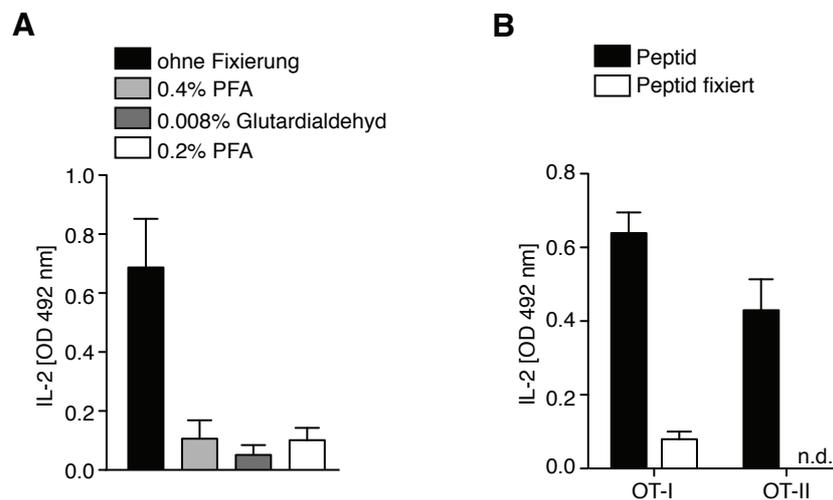


Abbildung: IV-6: Fixierte B-Zellen können keine T-Zellen stimulieren

(A),(B) IL-2-Produktion von OT-I Zellen und OT-II Zellen (B) nach Kokultur mit fixierten B-Zellen. (A) IgHEL B-Zellen wurden mit 1 mg/ml OVA-HEL beladen und für 6 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die B-Zellen mit den angegebenen Mitteln fixiert oder unfixiert gelassen und für 18 h in Kokultur mit OT-I Zellen gegeben. Die Aktivierung der OT-I Zellen wurden über die IL-2-Menge im Überstand per ELISA bestimmt. (B) IgHEL B-Zellen wurden mit SIINFEKL (links) oder MHC-II-Peptid (rechts) beladen, mit 0.2% PFA fixiert oder unfixiert gelassen und mit OT-I oder OT-II Zellen kokultiviert. Aktivierung der OT-I und OT-II Zellen nach 18 h Kultur wurde wie in (A) bestimmt.

Aus den Daten folgt, dass die Fixierung von B-Zellen für Kokulturrexperimente nicht realisierbar war und die Analyse der Effekte verschiedener Inhibitoren somit an unfixierten B-Zellen stattfinden musste.

1.2.3 Kreuzpräsentiertes Antigen wird nicht in Lysosomen degradiert, sondern gelangt in Recycling-Endosomen

Zunächst sollte untersucht werden, ob B-Zellkreuzpräsentation von lysosomalen Kompartimenten abhängig ist. Dazu wurden IgHEL B-Zellen nach Antigenaufnahme mit Chloroquin behandelt, was die Ansäuerung von Lysosomen verhindert. Während die MHC-Klasse-II-Präsentation nach dieser Behandlung stark vermindert war, konnte kein Einfluss auf die Kreuzpräsentation festgestellt werden (Abbildung IV-7A).

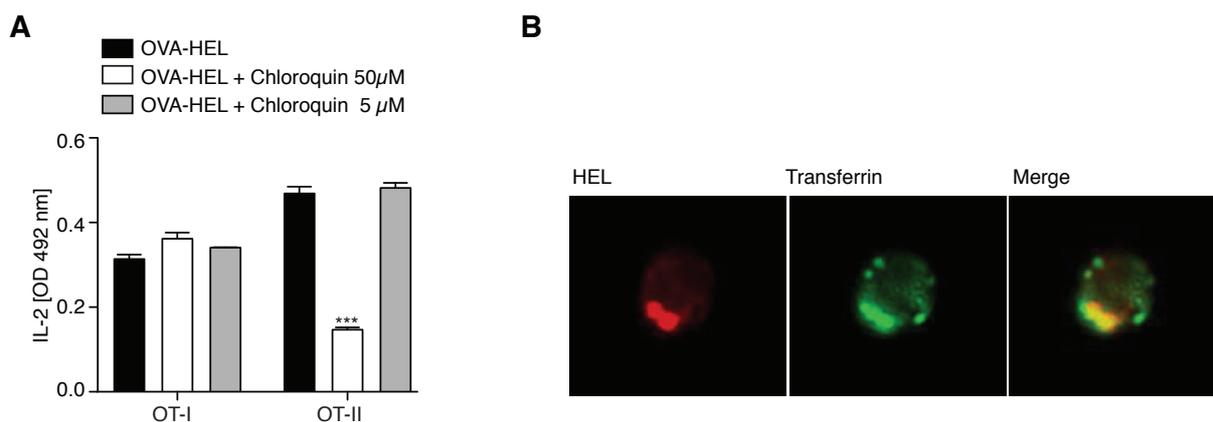


Abbildung IV-7: Degradierung von kreuzpräsentiertem Antigen findet nicht in lysosomalen Kompartimenten statt

(A) IL-2-Produktion von OT-I und OT-II Zellen nach Kokultur mit Chloroquin-behandelten B-Zellen. Aufgereinigte IgHEL B-Zellen wurden mit OVA-HEL beladen und während der Inkubation bei 37°C mit der angegebenen Konzentration Chloroquin behandelt. Die Aktivierung der OT-I und OT-II Zellen nach Kokultur wurde über IL-2-Produktion im Überstand durch ELISA bestimmt. (B) Kolokalisierung von HEL und Transferrin 30 Min. nach Aufnahme. Aufgereinigte IgHEL B-Zellen wurden für 30 Min. mit HEL-Alexa647 und Transferrin-Alexa568 inkubiert und anschließend mikroskopiert. Die dargestellten Bilder sind repräsentative Aufnahmen.

Die für DC-Kreuzpräsentation beschriebenen stabilen frühen Endosomen sind nicht nur EEA-1-positiv, sondern zeigen auch Charakteristika von Recycling-Endosomen. So kolokalisiert z.B. in Recycling-Endosomen aufgenommenes Transferrin ebenfalls mit EEA-1 und aufgenommenem OVA²³⁴. Ob es sich auch in B-Zellen um vergleichbare Endosomen handelt, sollte zunächst mit Hilfe konfokaler Mikroskopie festgestellt werden. Eine Inkubation von IgHEL B-Zellen mit HEL und Transferrin über 30 Min. führte zu einer Kolokalisation der beiden Proteine (Abbildung IV-7B).

Die in Kreuzpräsentation involvierten Endosomen scheinen somit auch in B-Zellen sogenannte Recycling-Endosomen und keine Lysosomen zu sein.

1.2.4 Über den B-Zellrezeptor aufgenommene Antigene gelangen in das Zytosol

Für dendritische Zellen wurde gezeigt, dass ein möglicher Weg der Kreuzpräsentation in der Ausschleusung der Proteine aus den frühen Endosomen in das Zytosol der Zelle liegt, wo Proteasomen das Protein zu MHC-I-Peptiden degradieren²⁴⁵. Um zu testen, ob tatsächlich endosomale Proteine in das Zytosol transportiert werden, wurde exogenes Cytochrom C genutzt²⁴⁶. Cytochrom C befindet sich normalerweise innerhalb der Mitochondrien und löst Apoptose aus, wenn es in das Zytosol relokalisiert wird. Nimmt nun eine Zelle Cytochrom C auf und bringt es in das Zytosol ein, so wird diese apoptotisch. Für DC wurde bereits gezeigt, dass selektiv kreuzpräsentierende Unterarten in den Zelltod gehen, wenn sie mit Cytochrom C inkubiert werden²⁴⁶. Da B-Zellen Cytochrom C nicht unspezifisch aufnehmen, wurde dieses kovalent an HEL gebunden. Ungekoppeltes Cytochrom C diente als Negativkontrolle. In IgHEL B-Zellen, die für 18 h mit HEL oder Cytochrom C alleine inkubiert wurden, konnte eine Apoptoserate von 43-52% gemessen werden. Diese lag im Bereich von unbehandelten IgHEL B-Zellen, bei denen ebenfalls ca 48% der Zellen starben. Die Inkubation von IgHEL B-Zellen mit Cytochrom C-HEL, führte zu einer Sterberate von über 60% der Zellen, was einer leichten Erhöhung von ca. 10% entsprach (Abbildung IV-8A). B-Zellen sind somit in der Lage, exogen aufgenommene Proteine in das Zytosol einzubringen. Da B-Zellen Proteine als Ganzes aufnehmen und diese nicht unerheblich groß sind, muss ein aktiver Transportmechanismus an dem Ausschleusen beteiligt sein. Als vielversprechender Kandidat für diesen Mechanismus gilt der Translokationskomplex Sec61. Ein Inhibitor der Proteintranslokation durch Sec61 ist *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A. Die Behandlung von IgHEL B-Zellen mit Exotoxin A vor und während der Kokultur führte dosisabhängig zu einer verringerten Kreuzpräsentation von OVA-HEL, beeinflusste die Klasse-II-Präsentation aber nicht (Abbildung IV-8B). Da es sich bei Exotoxin A um ein potentes Toxin handelt, musste überprüft werden, ob die verminderte Antigenpräsentation tatsächlich auf schlechtere Translokation des Proteins zurückzuführen ist oder auf toxische oder andere unspezifische Effekte. Dazu wurde das Protein OVA mit Hilfe eines osmotischen Schocks direkt in das Zytosol der B-Zellen eingebracht und anschließend eine Kokultur mit OT-I Zellen angesetzt. Die Aktivierung von OT-I Zellen nach 18 h Kokultur wurde über die Expression von CD25 und CD69 bestimmt. IgHEL B-Zellen konnten nach der Schockprozedur an OT-I Zellen kreuzpräsentieren, was sich in einem erhöhten Anteil CD25⁺ CD69⁺ doppelpositiver Zellen darstellte (Abbildung IV-8C). Die Kreuzpräsentation fand über das Zytosol statt, da der Proteasomeninhibitor Epoxomicin in der Lage war, diese wieder zu blockieren (Abbildung IV-8C).

Anders als bei über den B-Zellrezeptor aufgenommenem Antigen war im Fall des OVA-Schocks die MHC-I-Präsentation allerdings nicht anfällig für den Effekt von Exotoxin A (Abbildung IV-8C). Um dieses Ergebnis weiter zu festigen, wurden B-Zellen mit HEL und Exotoxin A inkubiert und anschließend lysiert. Aus diesem Lysat wurde das Zytosol aufgereinigt und für einen "Western Blot" verwendet. Verglichen wurde die Menge von HEL, die sich in der zytosolischen Fraktion von IgHEL B-Zellen befand, die nur mit HEL inkubiert wurden mit der Menge von HEL im Zytosol von IgHEL B-Zellen, die mit HEL und Exotoxin A inkubiert wurden. Während sich in den Gesamtzelllysaten vergleichbare Mengen von HEL befanden (100% zu 102% relative Menge), konnten im Zytosol von Exotoxin A behandelten B-Zellen nur 86% statt 100% der HEL-Menge detektiert werden (Abbildung IV-8D). Insgesamt belegen die Versuche mit Exotoxin A, dass der Transport von Proteinen aus Endosomen stattfindet und dass dieser essentiell für die Kreuzpräsentation von B-Zellen ist.

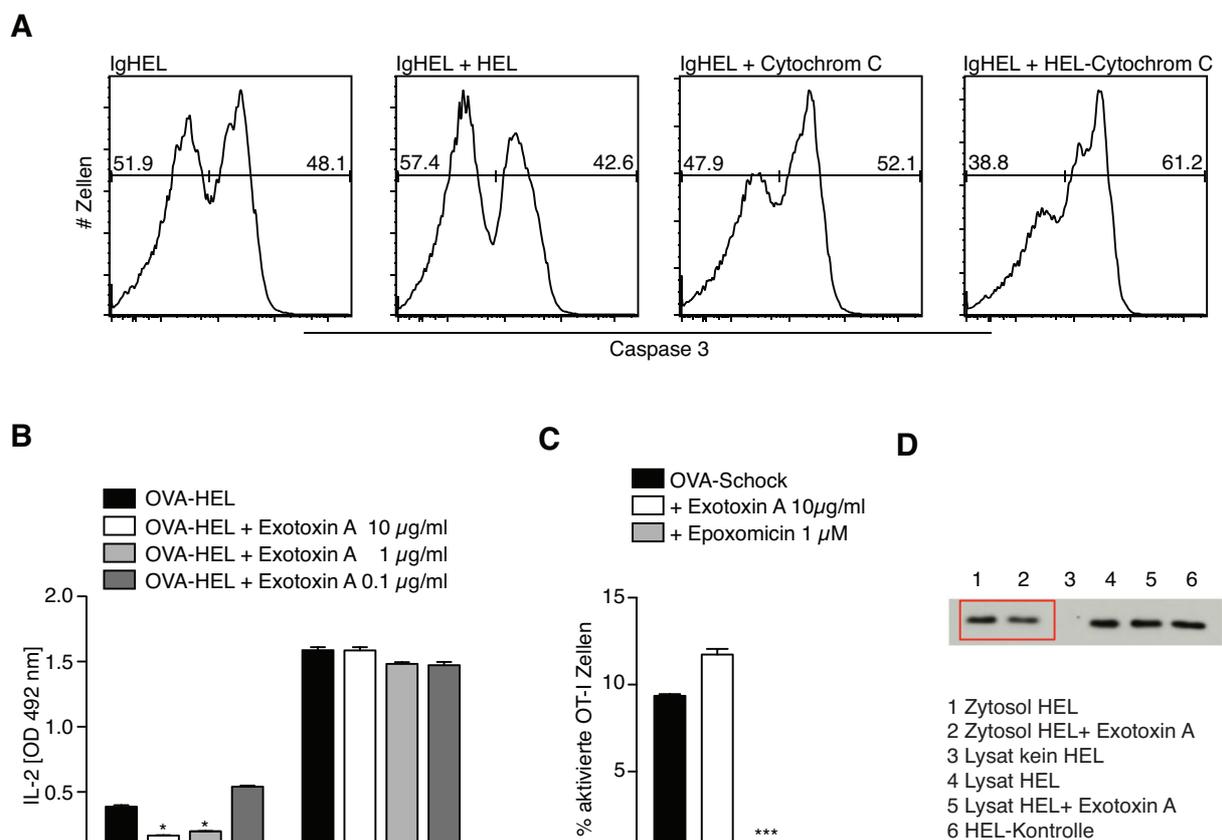


Abbildung IV-8: Über den B-Zellrezeptor aufgenommenes Protein kann in das Zytosol transloziert werden

(A) Apoptoseinduktion in IgHEL B-Zellen nach Cytochrom C-HEL Behandlung. IgHEL B Zellen wurden für 18 h mit HEL, Cytochrom C oder Cytochrom C-HEL inkubiert. Die Rate apoptotischer Zellen wurde durchflusszytometrisch über Caspase 3 Aktivierung gemessen. (B) IL-2-Produktion von OT-I und OT-II Zellen nach Kokultur mit Exotoxin A behandelten B-Zellen. Die Aktivierung der T-Zellen nach Kokultur wurde über die Menge an produziertem IL-2 im Überstand per ELISA gemessen. (C) Anteil CD25⁺ CD69⁺ doppelpositiver OT-I Zellen nach Kokultur mit Exotoxin A oder Epoxomicin behandelten B-Zellen nach osmotischem OVA-Schock. (D) Western Blot im Zytosol oder Gesamtzelllysat von IgHEL B-Zellen nach Inkubation mit HEL-Biotin und Behandlung mit Exotoxin A.

1.2.5 MHC-I-Peptide für die Kreuzpräsentation werden von Proteasomen generiert

Damit zytosolisches Protein präsentiert werden kann, wird es von Proteasomen in Peptide zerlegt. Um die Beteiligung von Proteasomen an der Kreuzpräsentation zu überprüfen, wurde der Proteasomeninhibitor Epoxomicin angewendet. Epoxomicin inhibierte in jeder eingesetzten Konzentration die Kreuzpräsentation (Abbildung IV-9A). Auf die Präsentation des Peptids SIINFEKL hatte Epoxomicin in der höchsten Dosis keinen Einfluss.

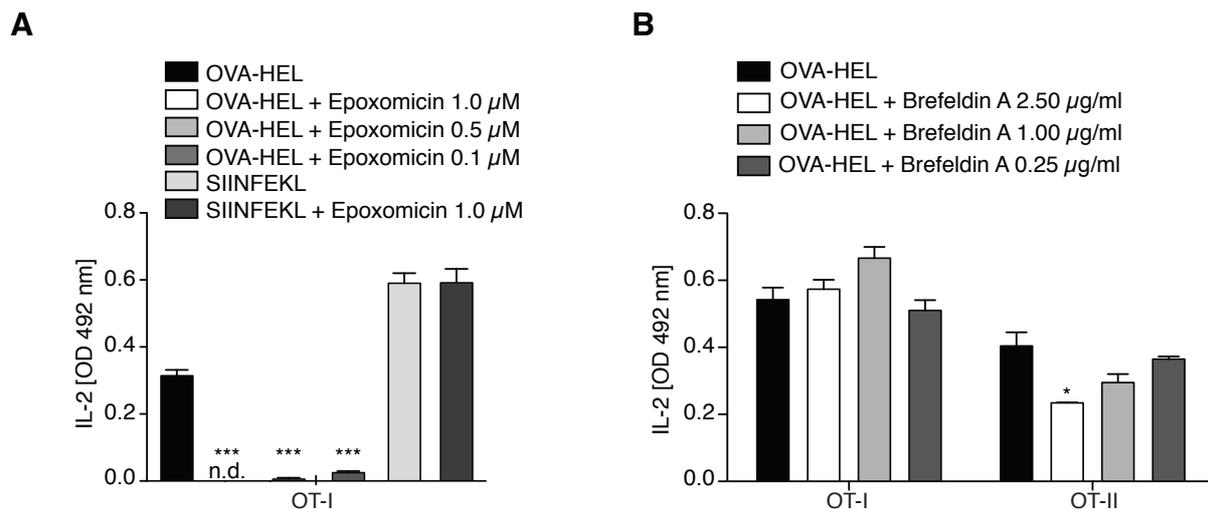


Abbildung IV-9: B-Zellen generieren MHC-I-Peptide für die Kreuzpräsentation im Zytosol, bringen diese aber nicht in den ER-abhängigen Beladungsweg ein

(A) IL-2-Produktion von OT-I Zellen, die mit Epoxomicin behandelten B-Zellen kokultiviert wurden. OT-I Zellaktivierung wurde über IL-2 Menge im Überstand mit Hilfe eines ELISA bestimmt. (B) IL-2-Produktion von OT-I und OT-II Zellen nach Kokultur mit Brefeldin A behandelten B-Zellen. Versuchsdurchführung wie in (A), die B-Zellen wurden aber mit Brefeldin A behandelt. Die anschließende Kokultur fand mit OT-I oder OT-II Zellen statt, deren Aktivierung wie in (A) bestimmt wurde.

1.3 Beladung der MHC-I-Komplexe

Im weiteren Verlauf sollte geklärt werden, über welchen Weg die generierten Peptide auf MHC-I-Komplexe beladen werden und welche Rolle dabei klassische Antigenpräsentationskompartimente spielen. Nach der Generierung von Peptiden im Zytosol könnten diese in das ER transportiert werden, wo sie mit endogenen Peptiden konkurrieren würden um in den MHC-I-Präsentationsweg zu gelangen. Eine andere Möglichkeit wäre der Rücktransport der Peptide in die Endosomen und die dortige Beladung von wiederverwertetem MHC-I. Um die Bedeutung des retrograden Transports von Proteinen vom Golgi zum endoplasmatischen Retikulum (ER) und damit den Weg der klassischen MHC-I-Präsentation in der Kreuzpräsentation zu analysieren, wurde dieser mit Hilfe von Brefeldin A blockiert.

Hier konnte kein Einfluss auf die Kreuzpräsentation von B-Zellen festgestellt werden, während die Klasse-II-Präsentation dosisabhängig reduziert wurde (Abbildung IV-9B). Zusammen bedeuten diese Ergebnisse, dass Peptide für die B-Zellkreuzpräsentation im Zytosol über Proteasomen generiert werden, aber nicht den endogenen MHC-I-Beladungsweg nehmen.

1.3.1 B-Zellkreuzpräsentation ist TAP-abhängig

Für den Rücktransport endogener Peptide in das ER ist der MHC-I-Beladungskomplex verantwortlich, insbesondere TAP. Auch Endosomen bzw. Phagosomen können den MHC-I-Beladungskomplex durch Fusion mit ER Komponenten enthalten. Um zu untersuchen, ob in der B-Zellkreuzpräsentation ein Rücktransport der Peptide in Endosomen stattfindet, wurde zunächst das Vorhandensein des Transporters TAP überprüft. Die mit konfokaler Mikroskopie angefertigten Aufnahmen zeigten, dass sowohl TAP und Transferrin (Tfr) als auch TAP und HEL in IgHEL B-Zellen kolokalisierten (Abbildung IV-10A). Alle drei Komponenten konnten im selben Endosom angefärbt werden. Das bedeutet, dass ein Rücktransport in frühe Endosomen theoretisch möglich ist.

Zur funktionellen Analyse wurde der TAP-Inhibitor des bovinen Herpesvirus, UL49.5, synthetisiert und kovalent an Transferrin gebunden. Das diente dazu, dass der TAP-Inhibitor über den Transferrinrezeptor internalisiert werden konnte und nur spezifisch in den Transferrin-positiven Endosomen und nicht im ER wirken würde. In der Kultur eingesetzt, konnte die Kreuzpräsentation der IgHEL B-Zellen durch UL49.5-Transferrin blockiert werden (Abbildung IV-10B). Dagegen zeigte der Inhibitor keinen Effekt auf die Präsentation von Peptiden (Abbildung IV-10B). Als zusätzliche Kontrolle wurde OVA direkt über osmotischen Schock in das Zytosol eingebracht. Diese pseudo-endogene Präsentation konnte nicht durch UL49.5-Transferrin inhibiert werden (Abbildung IV-10B).

Damit konnte gezeigt werden, dass die MHC-I-Beladung für die Kreuzpräsentation von exogenem Antigen in Recycling-Endosomen stattfindet und TAP-abhängig ist.

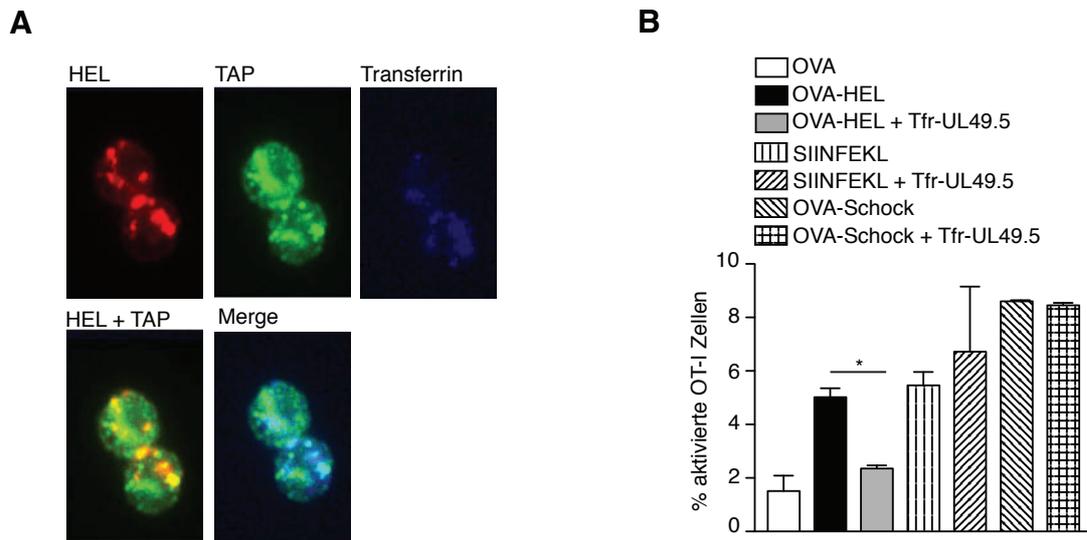


Abbildung IV-10: B-Zellkruzpräsentation findet über Recycling-Endosomen statt

(A) Kolokalisierung von HEL, TAP und Transferrin in IgHEL B-Zellen nach 30 Min. Inkubation. IgHEL B-Zellen wurden für 30 Min. mit HEL-Alexa647 und Transferrin-Alexa568 inkubiert und nach Fixierung intrazellulär für TAP gefärbt. Die B-Zellen wurden konfokal mikroskopiert und repräsentative Bilder sind dargestellt. (B) Anteil aktivierter OT-I Zellen nach Kokultur mit Tfr-UL49.5 behandelten B-Zellen. IgHEL B-Zellen wurden mit OVA als Negativkontrolle, OVA-HEL oder SIINFEKL inkubiert und anschließend mit dem an Transferrin gebundenen Inhibitor UL49.5 behandelt. Als weitere Kontrolle wurde OVA über osmotischen Schock direkt in das Zytosol der B-Zellen eingebracht und ebenfalls mit Tfr-UL49.5 behandelt. Der Einfluss auf die Kreuzpräsentation wurde über die Aktivierung von OT-I Zellen nach 18 h Kokultur über die Hochregulierung von CD25 und CD69 bestimmt und als Prozentsatz aktivierter OT-I Zellen dargestellt.

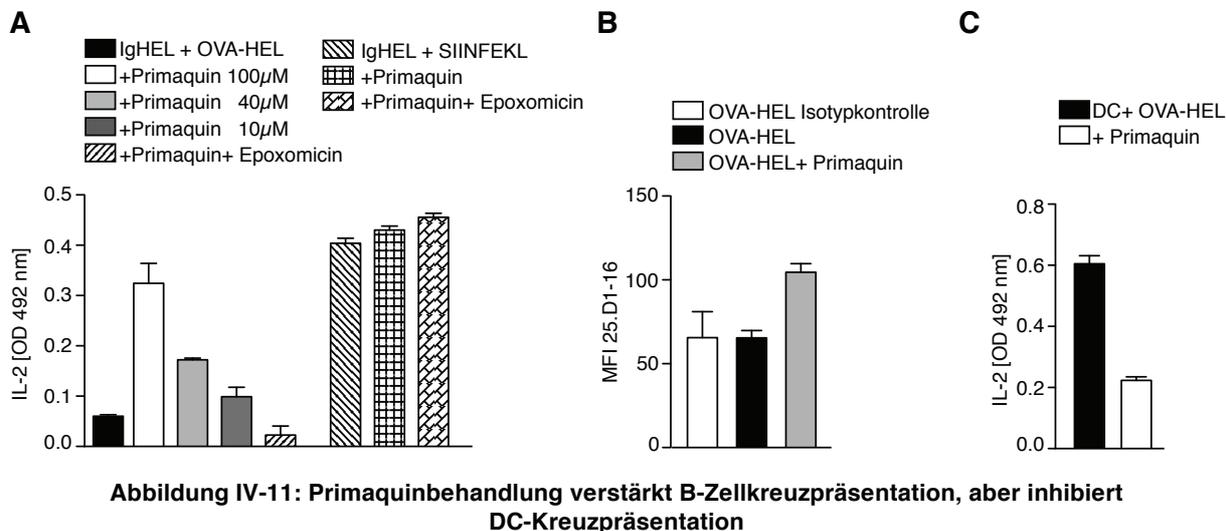
1.4 Transport der beladenen MHC-I-Komplexe an die Zelloberfläche

Der letzte Schritt zur Antigenpräsentation liegt im Transport der beladenen MHC-I-Moleküle aus den Endosomen an die Zelloberfläche. Um diesen Schritt eindeutig nachzuvollziehen, wurde mit Hilfe des Inhibitors Primaquin der Transport aus Endosomen zur Zellmembran blockiert.

1.4.1 Primaquin verbessert die B-Zellkruzpräsentation

Die Behandlung von IgHEL B-Zellen mit Primaquin während der Beladung mit OVA-HEL führte nicht zu einer dosisabhängigen Inhibierung der Kreuzpräsentation, sondern zu einem signifikanten und hohen Anstieg (Abbildung IV-11A). Dieser Effekt war bei einer Konzentration von 100 μ M Primaquin am stärksten. Zusätzlich wurde eine größere Menge an SIINFEKL-beladenen MHC-I-Molekülen auf der Oberfläche von Primaquin behandelten B-Zellen im Vergleich mit unbehandelten B-Zellen und der Isotypkontrolle detektiert (Abbildung IV-11B).

Die Präsentation von exogenem Protein auf MHC-I von DC wurde unter gleichen Bedingungen nicht verstärkt, sondern inhibiert, was bedeutet, dass der Primaquineffekt auf B-Zellen einzigartig ist (Abbildung IV-11C).



(A) IL-2-Produktion von OT-I Zellen nach Kokultur mit Primaquin-behandelten B-Zellen. Die IL-2 Menge im Überstand wurde durch ELISA bestimmt. (B) Oberflächenexpression von SIINFEKL-beladenen MHC-I-Molekülen. IgHEL B-Zellen wurden mit OVAHEL beladen und für 60 Min. mit oder ohne Primaquin bei 37°C inkubiert. Das Vorhandensein von SIINFEKL-beladenen MHC-I-Molekülen auf der Oberfläche wurde über Färbung mit 25-D1.16 oder Isotypfärbung bestimmt und als mittlere Fluoreszenzintensität dargestellt. (C) IL-2-Produktion von OT-I Zellen nach Kokultur mit Primaquin-behandelten DC. Dendritische Zellen wurden mit OVA-HEL beladen und in An- oder Abwesenheit von Primaquin inkubiert. Der Einfluss von Primaquin auf die DC-Kreuzpräsentation wurde wie in (A) beschrieben bestimmt.

Die von Primaquin hervorgerufene Veränderung der Kreuzpräsentation ließ sich ebenfalls durch den Proteasomeninhibitor Epoxomicin blockieren und wirkte nicht auf reine Peptidbeladung der Zellen von außen (Abbildung IV-11A). Die verstärkte Kreuzpräsentation nach reversibler Blockade des Rücktransports von endosomalen Bestandteilen an die Zelloberfläche lässt sich also vermutlich durch eine bessere Beladung von MHC-I-Molekülen innerhalb der Endosomen erklären.

1.5 Über den Transferrinrezeptor aufgenommene Antigene können nach B-Zellrezeptorstimulation kreuzpräsentiert werden

Ein Grund, warum B-Zellkreuzpräsentation *in vivo* nicht genutzt werden kann, liegt darin, dass B-Zellen in nicht transgenen Organismen zu viele unterschiedliche und vor allem unbekannte Spezifitäten des B-Zellrezeptors haben. Damit wird ein gezieltes Einbringen von Antigenen in B-Zellen stark erschwert. Durch die Entdeckung, dass B-Zellkreuzpräsentation über Transferrinrezeptor-positive Recycling-Endosomen läuft, eröffnete sich die Möglichkeit, Antigen direkt in das Kreuzpräsentationskompartiment einzubringen.

Um die Hypothese zu testen, dass so internalisiertes Antigen kreuzpräsentiert werden kann, wurde OVA kovalent an Transferrin gebunden und in IgHEL Kokulturen eingesetzt. Im Vergleich zu dem sonst eingesetzten OVA-HEL und der Negativkontrolle OVA führte OVA-Transferrin alleine nicht zu messbarer OT-I Aktivierung (Abbildung IV-12A). Da unter physiologischen Bedingungen über den Transferrinrezeptor aufgenommene Substanzen ebenfalls keine Immunreaktion auslösen, sollte getestet werden, ob OVA-Transferrin bei gleichzeitiger Stimulation der B-Zellen über den B-Zellrezeptor kreuzpräsentiert wird. Hierfür wurde die Aktivierung von OT-I Zellen nach 18-stündiger Kokultur über IL-2-Produktion und CD25 und CD69 Hochregulation gemessen. Die Kombination aus OVA-Transferrin mit löslichem HEL führte zu einer signifikant erhöhten Aktivierung von OT-I Zellen (Abbildung IV-12A). Die Kombination von OVA mit löslichem HEL zeigte dagegen keine Erhöhung der T-Zellaktivierung, was einen "Bystander Effekt" ausschließen ließ (Abbildung IV-12A). Da diese Art der Anwendung erneut die Kenntnis der B-Zellrezeptorspezifität voraussetzte, wurde untersucht, ob die Stimulation durch HEL auch durch Stimulation mit einem anti-IgM-Antikörper ersetzt werden kann. Die Aktivierung von OT-I Zellen nach Kokultur mit OVA-Tfr und anti-IgM beladenen IgHEL B-Zellen war um ein 4-faches höher als nach Kultur mit nur OVA-Tfr beladenen IgHEL B-Zellen (Abbildung IV-12B). Weiterhin wurde getestet, ob auch Wildtyp-B-Zellen auf die Stimulation ansprechen und OVA-Transferrin kreuzpräsentieren können.

In den Kokulturen mit Wildtyp-B-Zellen war der Effekt von OVA-Tfr-Beladung mit anti-IgM Stimulus im Vergleich zur reinen OVA-Tfr-Beladung nur um ein 2.5-faches höher, aber deutlich vorhanden (Abbildung IV-12B). Dieser Effekt war vom B-Zellrezeptorsignalweg abhängig, da durch Blockieren des BCR-Signals mit Hilfe des Syk-Kinase-Inhibitors Piceatannol die Kreuzpräsentation wieder aufgehoben werden konnte (Abbildung IV-12C).

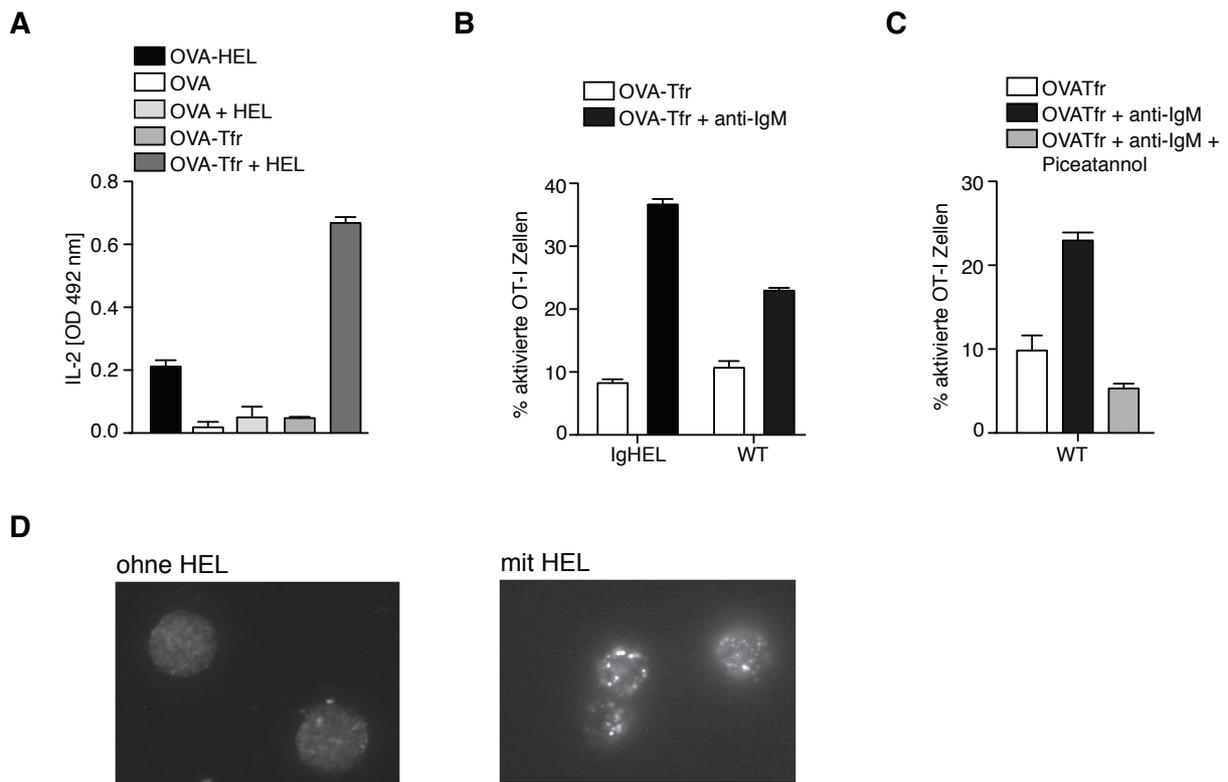


Abbildung IV-12: Aktivierung des B-Zellrezeptors führt zu TAP-Rekrutierung und ist ausreichend, Kreuzpräsentation zu initiieren

(A) IL-2-Produktion von OT-I Zellen nach Kokultur mit beladenen B-Zellen. Die Aktivierung von OT-I Zellen wurden nach 18 h Kokultur über IL-2 im Überstand mit Hilfe eines ELISA gemessen. (B) Anteil aktivierter OT-I Zellen nach Kokultur mit OVA-Tfr beladenen B-Zellen. IgHEL B-Zellen wurden mit OVA-Transferrin beladen und mit einem anti-IgM-Antikörper stimuliert oder unstimuliert gelassen. Der Anteil aktivierter OT-I Zellen wurde über den Prozentsatz CD25 CD69 doppelpositiver Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. (C) Anteil aktivierter OT-I Zellen nach Kokultur mit OVA-Tfr beladenen B-Zellen und Inkubation mit Piceatannol. Durchführung und Analyse fand wie in (B) statt, eine Gruppe OVA-Transferrin beladener B-Zellen wurde zusätzlich zur IgM Stimulierung außerdem mit dem Syk-Kinase-Inhibitor Piceatannol behandelt. (D) Färbung von TAP in B-Zellen vor und nach HEL Beladung. TAP wurde intrazellulär gefärbt und am Mikroskop analysiert. Die abgebildeten Bilder sind repräsentative Aufnahmen.

Da von Burgdorf *et al.* bereits gezeigt wurde, dass in DC eine TLR4-Aktivierung zur Rekrutierung von TAP an frühe Endosomen notwendig ist²³⁴, könnte es sein, dass die B-Zellrezeptoraktivierung ebenfalls zu einer TAP-Rekrutierung führen könnte. Zur Analyse dieses Phänomens wurden IgHEL B-Zellen mit und ohne HEL für 4 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend für TAP gefärbt. Während in unbehandelten B-Zellen nur eine diffuse TAP-Färbung zu erkennen war, war nach HEL Beladung eine punktuelle und klar definierte Färbung zu sehen (Abbildung IV-12D). Dies deutet darauf hin, dass auch der B-Zellrezeptorsignalweg zur TAP-Rekrutierung in der Lage ist.

Insgesamt bedeuten die Befunde, dass man tatsächlich B-Zellkreuzpräsentation einleiten kann, indem man Antigen über den Transferrinrezeptor einbringt und die B-Zelle anschließend spezifisch über ihren Rezeptor stimuliert. Dies eröffnet neue Möglichkeiten, B-Zellkreuzpräsentation *in vivo* zu erforschen und für Therapien auszunutzen.

2 Induktion von Kreuztoleranz gegen harmlose, zirkulierende Antigene im renalen Lymphknoten durch Batf3-abhängige, PD-L1⁺ dendritische Zellen

Kreuzpräsentation wurde ursprünglich im Kontext der Kreuzaktivierung von CD8⁺ T-Zellen entdeckt. Kurz darauf wurde aber auch die Bedeutung kreuzpräsentierender dendritischer Zellen für die periphere Toleranzinduktion erkannt. Dabei sind vor allem CD8⁺ DC in der Milz untersucht worden, aber auch DC aus Organen mit erhöhtem Kontakt mit der Außenwelt, wie der Lunge und dem Verdauungstrakt, wurden auf ihre tolerisierenden Eigenschaften analysiert. Kürzlich konnte zusätzlich für die Niere bzw. den Nierenlymphknoten gezeigt werden, dass CD8⁺ T-Zellen dort nach Antigenkontakt eine verkürzte Lebensspanne haben und nicht zytotoxisch werden⁴³. Dieser Effekt war abhängig von der Antigendosis und dem Transport von Antigen aus der Niere in den Nierenlymphknoten.

In dieser Arbeit sollte aufgeklärt werden, welche antigenpräsentierenden Zellen im Nierenlymphknoten Toleranz induzieren und welche Moleküle beteiligt sind.

2.1 Toleranzinduktion im renalen Lymphknoten, aber nicht in der Milz ist PD-L1-abhängig

2.1.1 Dendritische Zellen im renalen Lymphknoten und in der Milz nehmen lösliches Antigen in kurzer Zeit auf

Um zu untersuchen, in welchen sekundären lymphatischen Organen harmlose Antigene aus dem Blut akkumulieren, wurde Wildtypmäusen das fluoreszenzmarkierte, endotoxinfreie Modellantigen Ovalbumin (OVA) intravenös appliziert. Anschließend wurde die Anreicherung des OVA in dendritischen Zellen aus Milz und Lymphknoten zu verschiedenen Zeitpunkten durchflusszytometrisch analysiert. Bereits zehn Minuten nach intravenöser Gabe des Antigens konnte dieses in den sekundären lymphatischen Organen detektiert werden (Abbildung IV-13A). In den außerhalb der Körperhöhle liegenden axillären und inguinalen Lymphknoten hatten zwischen 6% und 7% aller MHC-II⁺ CD11c⁺ Zellen OVA aufgenommen. In den mesenterischen und pylorischen Lymphknoten des Verdauungstrakts waren nur 2% bis 5% der Zellen OVA-positiv. Eine starke Akkumulation von OVA in DC konnte hingegen mit 17% bzw. 18% in der Milz bzw. im renalen Lymphknoten bereits nach 10 Min. beobachtet werden. Zur Quantifizierung der OVA-Aufnahme wurde die mittlere Fluoreszenzintensität bezogen auf die absolute Anzahl OVA-positiver Zellen nach 10 und nach 30 Minuten bestimmt (Abbildung IV-13B). Hierbei bestätigte sich, dass nicht nur prozentual mehr OVA in Milz und renalem Lymphknoten (RLK) gefunden werden konnte, sondern auch absolut mehr Zellen größere Mengen Antigen aufgenommen haben.

Ohne Antigen war für MFI* Zellzahl in allen Lymphknoten und der Milz kein Wert bestimmbar. Bereits nach 10 Min. ergab sich für den renalen Lymphknoten ein Mittelwert von 256.711 und für die Milz 231.753, während die restlichen Lymphknoten im Schnitt bei 65.000 lagen. Diese Tendenz blieb mit Werten von 307.797 für den renalen Lymphknoten und 327.567 für die Milz gegenüber 82.000 für alle anderen Lymphknoten auch nach 30 Min. bestehen. Diese Daten lassen den Schluss zu, dass kleinmolekulare, systemische Antigene bei der verwendeten Dosis vor allem in der Milz und im renalen Lymphknoten akkumulieren.

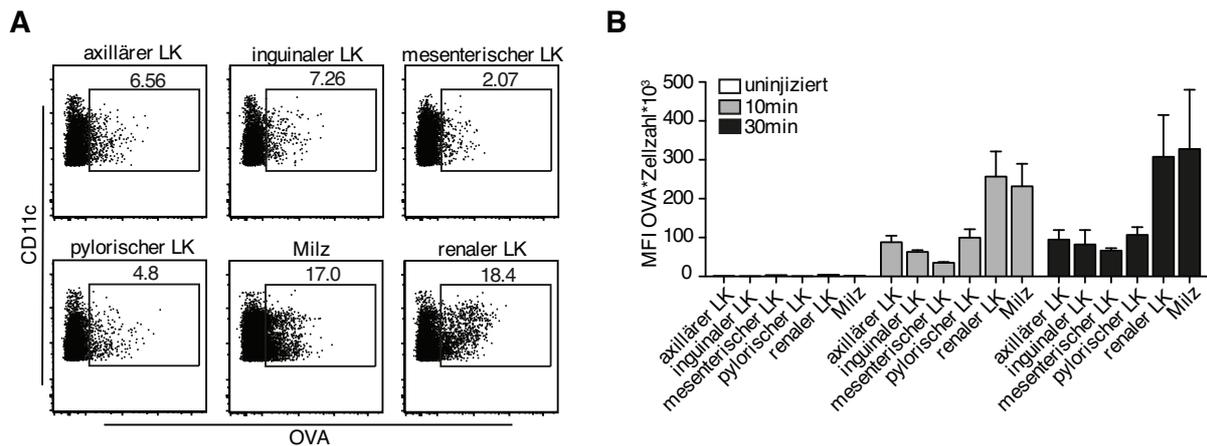


Abbildung IV-13: Akkumulation von filterbarem Antigen in Milz und renalen Lymphknoten

(A) OVA-Alexa647-Aufnahme von MHCII⁺ CD11c⁺ dendritischen Zellen in diversen Lymphknoten (LK) und der Milz 10 Min. nach i.v. Injektion. Zahlen repräsentieren den durchflusszytometrisch bestimmten prozentualen Anteil OVA-positiver Zellen. (B) Quantitative Analyse der OVA-Aufnahme in uninjizierten Mäusen (weiß) und 10 Min. (grau) bzw. 30 Min. (schwarz) nach OVA-Alexa647 Injektion: die absolute Anzahl OVA⁺ DC wurde mit ihrer mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) bei 647 nm multipliziert, die mit der Menge aufgenommenen OVAs pro OVA⁺ DC korreliert.

2.1.2 PD-L1 verringert IFN- γ -Produktion und Proliferation und induziert Apoptose von CTL im renalen Lymphknoten

Von Lukacs-Kornek *et al.* wurde gezeigt, dass Akkumulation und Präsentation von harmlosen Antigenen im renalen Lymphknoten zu einer verringerten Lebensdauer und eingeschränkten Funktionalität zytotoxischer T-Zellen führt. Der zu Grunde liegende Mechanismus ist aber weitgehend unbekannt. Ein mittlerweile gut charakterisierter Signalweg, über den Toleranz induziert werden kann, ist der PD-1-PD-Ligand Signalweg. Um zu testen, ob dieser eine Rolle in der von Lukacs-Kornek *et al.* gezeigten Toleranzvermittlung spielt, wurden Effektorfunktion, Zytokinproduktion, Proliferation und Apoptose von OT-I Zellen im renalen Lymphknoten nach OVA Injektion mit und ohne Gabe von blockierenden PD-L1 und PD-L2 Antikörpern ermittelt.

Eine Effektorfunktion von CTL ist die Produktion von inflammatorischen Zytokinen, wie IFN- γ , welche die Immunantwort verstärken. Um diese zu überprüfen, wurden Wildtypmäusen 2×10^6 CFSE-markierte OT-I Zellen injiziert. Diese Mäuse wurden anschließend mit $8 \mu\text{g/g}$ Körpergewicht endotoxinfreiem OVA i.v. oder OVA/CpG s.c. immunisiert. Als Negativkontrolle dienten naiv belassene Tiere. Die Zytokinproduktion wurde zusammen mit der Proliferation der OT-I Zellen gemessen (Abbildung IV-14A). Wie in Abbildung IV-14B zu sehen ist, proliferierten naive OT-I Zellen nicht und produzierten auch kein IFN- γ . Dagegen proliferierten OVA/CpG-aktivierte OT-I Zellen zu fast 55% und alle sich teilenden Zellen produzierten IFN- γ (Abbildung IV-14B). Wurden die Zellen nur mit OVA aktiviert, konnte nur eine verminderte Zellteilungskapazität von 38% mit begleitender IFN- γ -Produktion beobachtet werden. Der zusätzliche Einsatz von blockierendem PD-L1 Antikörper zur intravenösen OVA-Gabe erhöhte die Proliferation und IFN- γ -Produktion über das Level von OVA/CpG aktivierten OT-I Zellen. Die Applikation des PD-L2-blockierenden Antikörpers führte ebenfalls zu einer leichten Erhöhung der Proliferation und IFN- γ -Produktion auf 49%, blieb aber unter der Positivkontrolle. Zusätzlich zeigte die gemeinsame Gabe von PD-L1- und PD-L2-blockierenden Antikörpern einen synergistischen Effekt, der mit 66% in der stärksten IFN- γ -Produktion und Proliferation resultierte (Abbildung IV-14B). Die gesonderte quantitative Analyse der IFN- γ -Produktion durch Ermitteln der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) zeigte ein noch deutlicheres Bild. Naive Zellen wiesen eine MFI von unter 500 auf (weißer Balken), während die Positivkontrolle auf ca. 2.000 anstieg (grauer Balken). Nur mit OVA immunisierte Zellen lagen bei etwas über 1.000, während die Blockade von PD-L1 die IFN- γ -MFI auf über 1.500 ansteigen ließ. Blockade von PD-L2 alleine zeigte in der MFI keinen positiven Effekt auf die IFN- γ -Produktion, die MFI blieb bei unter 1.000. Der synergistische Effekt der Blockade beider PD-1-Liganden zeigte sich auch hier, da mit einer MFI von über 2.000 die IFN- γ -Produktion über der der Positivkontrolle lag (Abbildung IV-14C).

Eine weitere wichtige Effektorfunktion von zytotoxischen T-Zellen ist die spezifische Lyse von Peptid-beladenen Zielzellen. Um diese Funktion zu testen, wurden erneut OT-I Zellen in Wildtypmäuse transferiert. Anschließend wurden diese naiv belassen, mit OVA/CpG oder mit endotoxinfreiem OVA aktiviert. Nach 5 Tagen wurden Peptid-beladene Zielzellen und unbeladene Kontrollzellen transferiert und die spezifische Lyse durch OT-I Zellen durch das Verhältnis von überlebenden Zielzellen zu Kontrollzellen kalkuliert (vgl. Experimentenschema Abbildung IV-14A). Nicht aktivierte CTL konnten in diesem Versuchsaufbau keine Zielzellen lysieren. Waren die CTL durch Gabe von OVA mit dem Stimulus CpG aktiviert, wurden über 35% der Zielzellen lysiert (Abbildung IV-14C, grauer Balken). Endotoxinfreies OVA ohne jeglichen Stimulus führte zu einer spezifischen Lyse von weniger als 5%. Die Gabe von PD-L1 und/oder PD-L2 blockierendem Antikörper vor und während der Immunisierung hatte hier keinen Effekt auf die Fähigkeit der OT-I Zellen, Zielzellen zu eliminieren (Abbildung IV-14C, schwarze Balken). Hier zeigte sich also, dass im renalen Lymphknoten PD-1-Liganden einen Einfluss auf die Zytokinproduktion und Proliferation von CD8⁺ T-Zellen haben können, aber nicht auf ihre Zytotoxizität.

Da Lukacs-Kornek *et al.* eine verkürzte Lebensspanne von toleranten T-Zellen im renalen Lymphknoten zeigen konnten, wurde hier weiterhin der Einfluss des PD-1 Signalwegs auf den induzierten Zelltod in CTL untersucht. Zur Analyse des induzierten Zelltods wurde 18 h nach Aktivierung der transferierten OT-I Zellen die Aktivierung der Caspase 3 mit Hilfe eines fluoreszenten Caspase 3 Substrats durchflusszytometrisch bestimmt. Naive OT-I Zellen (Abbildung IV-14E, weißer Balken) und OVA/CpG aktivierte OT-I T-Zellen (Abbildung IV-14E, grauer Balken) im renalen Lymphknoten starben zu ca 10%, während nur mit OVA aktivierte Zellen zu fast 25% in Apoptose gingen (Abbildung IV-14E, schwarze Balken). Blockierte man PD-L1 mit einem Antikörper, wurde die Apoptose der OT-I Zellen auf das Level der naiven bzw. OVA/CpG aktivierten Zellen reduziert. Die Blockade von PD-L2 alleine zeigte keinen Effekt. Wurden beide blockierende Antikörper verwendet, konnte außerdem kein synergistischer Effekt festgestellt werden, da die Apoptose wie bei alleiniger Blockade von PD-L1 auf das Hintergrundniveau gesenkt wurde.

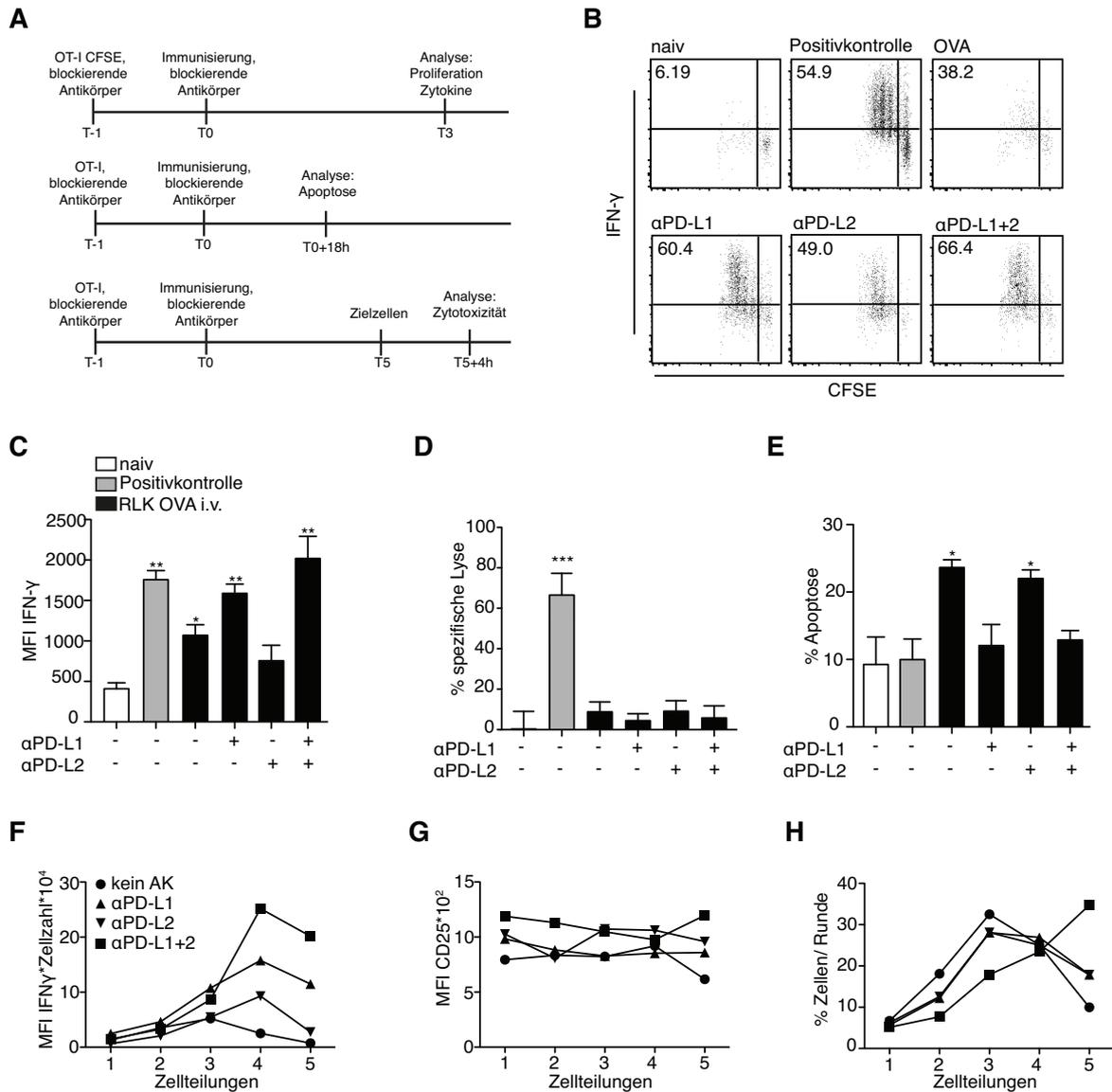


Abbildung IV-14: PD-L1 Blockade führt zu erhöhter IFN-γ-Produktion und Proliferation sowie zu verminderter Apoptose von OT-I Zellen im renalen Lymphknoten

(A) Zeitabläufe der in (B)-(H) dargestellten Experimente. (B) 2×10^6 CFSE markierte OT-I Zellen wurden in Wildtypmäuse transferiert. Blockierende Antikörper wurden zu den in (A) angegebenen Zeitpunkten i.p. appliziert und 1 Tag nach Zelltransfer wurden die Mäuse mit $8 \mu\text{g/g}$ Maus OVA i.v. oder mit OVA/CpG s.c. (Positivkontrolle) immunisiert. IFN γ -Produktion und CFSE-Verdünnung als Messgröße für Proliferation wurden im renalen Lymphknoten (RLK) durchflusszytometrisch bestimmt. (C) Quantitative Bestimmung der IFN γ -Produktion aus (B), dargestellt als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von IFN- γ . (D) Versuchsdurchführung wie in (B) beschrieben, aber nur 1×10^5 unmarkierte OT-I Zellen wurden pro Maus transferiert. Die Zytotoxizität der OT-I Zellen im renalen LK wurde 5 Tage nach Immunisierung über die spezifische Lyse von OVA-Peptid beladenen Zielzellen im Verhältnis zu unbeladenen Zellen bestimmt. (E) 2×10^6 CFSE unmarkierte OT-I Zellen wurden transferiert und die Mäuse wie in (B) beschrieben behandelt. 18 h nach Immunisierung wurde die Rate apoptotischer OT-I Zellen im RLK durchflusszytometrisch über Caspase 3 Aktivierung bestimmt. (F)-(H) Quantitative Darstellung der in (B) bestimmten Parameter pro Teilungszyklus der OT-I Zellen. (F) MFI von IFN- γ multipliziert mit der Zellzahl als Messgröße für die produzierte Zytokinmenge, (G) Expression des Aktivierungsmoleküls CD25 und (H) Anteil der OT-I Zellen, die sich im jeweiligen Teilungszyklus befinden.

Als Letztes sollte bestimmt werden, wie sich die Einflüsse auf Apoptose, Proliferation und Zytokinproduktion aufaddieren. Dazu wurde analysiert, wieviele Zellteilungen die OT-I Zellen insgesamt unterlaufen haben und wie die Expression von Aktivierungsmarkern und die Produktion von IFN- γ je Teilungszyklus variiert. Hier zeigte sich, dass die Blockade beider PD-1-Liganden dazu führte, dass hier mehr Zellen bereits 5 Teilungszyklen durchlaufen hatten, während sich in den anderen Gruppen der Großteil der Zellen im 3. Zellteilungszyklus befanden (Abbildung IV-14F). Während der Aktivierungsmarker CD25 ab der 1. Zellteilung hochreguliert wurde und sich in seiner Expression in keiner Gruppe geändert hat (Abbildung IV-14G), stieg die IFN- γ -Produktion mit den Zellteilungen in der mit anti-PD-L1 und anti-PD-L2 behandelten Gruppe an (Abbildung IV-14H). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass PD-L1 und PD-L2 zusammen synergistisch auf Zytokinproduktion und Proliferation wirkten, während PD-L1 alleine einen Einfluss auf die frühe Apoptose der OT-I Zellen hatte. Die Zytotoxizität der OT-I Zellen wurde durch PD-1-Liganden nicht beeinflusst.

2.1.3 PD-1-Liganden spielen keine Rolle für die CTL-Toleranzinduktion in der Milz

Da die Milz ein zentraler Ort der Toleranzinduktion ist, der sich ebenfalls durch die Akkumulation von zirkulierenden Antigen auszeichnet, sollte untersucht werden, ob die im renalen Lymphknoten beobachteten Mechanismen hier auch zutreffen. Unter gleichen Versuchsbedingungen (vgl. Abbildung IV-15A) wurden ebenfalls Proliferation, Zytokinproduktion und Zytotoxizität von in der Milz aktivierten OT-I Zellen analysiert. OT-I Zellen aus naiv belassenen Mäusen fingen weder an zu proliferieren, noch produzierten sie IFN- γ (Abbildung IV-15B). Mit OVA/CpG aktivierte OT-I Zellen waren zu ca. 53% IFN- γ -positiv und proliferierten auch. Die Immunisierung mit endotoxinfreiem OVA führte zwar zur Proliferation der OT-I Zellen in der Milz, aber nur zu 34% auch zur IFN- γ -Produktion (Abbildung IV-15B). Im Gegensatz zum renalen Lymphknoten verbesserte die Applikation von blockierenden PD-L1 und/oder PD-L2 Antikörpern die Proliferation und IFN- γ -Produktion der OT-I Zellen nicht (Abbildung IV-15B). Die Blockade von PD-L1 allein führte, verglichen mit alleiniger OVA-Gabe, zu einer Verringerung des Anteils IFN- γ -produzierender, proliferierender Zellen auf 10%. Die Blockade von PD-L2 führte im Vergleich mit OVA-Gabe mit 31% IFN- γ -produzierender, proliferierender Zellen zu keiner Änderung und die Applikation beider blockierender Antikörper zeigte, ähnlich wie die Gabe von PD-L1 alleine, eine schlechtere Kapazität der IFN- γ -Produktion und auch geringere Proliferation (Abbildung IV-15B). Auch die quantitative Analyse der IFN- γ -Produktion mit Hilfe der MFI bestätigte diese Ergebnisse.

Naive OT-I Zellen zeigten in der Milz eine MFI von ca. 500 (Abbildung IV-15C, weißer Balken), während die MFI OVA/CpG-aktivierter OT-I Zellen auf ca. 1.800 anstieg (Abbildung IV-15C, grauer Balken). Die Gabe von endotoxinfreiem OVA führte zu einer leichten Erhöhung der IFN- γ -Produktion, was sich in einer MFI von ca. 1.000 ausdrückte.

Weder die Gabe des blockierenden PD-L1 Antikörpers noch die des blockierenden PD-L2 Antikörpers oder die gemeinsame Applikation führten zu einer Erhöhung der IFN- γ -MFI im Vergleich zur OVA-Gabe alleine (Abbildung IV-15C, schwarze Balken). Auch die Überprüfung der zytotoxischen Kapazität der OT-I Zellen in der Milz zeigte, dass zwar OVA/CpG-aktivierte Zellen bis zu 60% der Zielzellen lysieren konnten (Abbildung IV-15D, grauer Balken), aber weder naive (Abbildung IV-15D, weißer Balken) noch mit endotoxinfreiem OVA immunisierte oder zusätzlich mit PD-L1- und/oder PD-L2-blockierenden Antikörpern behandelte OT-I Zellen waren dazu in der Lage (Abbildung IV-15D, schwarze Balken). Die Untersuchung, ob OT-I Zellen in der Milz nach OVA-Applikation vermehrt Apoptose untergehen ergab ebenfalls, dass im Vergleich zu naiven oder OVA/CpG immunisierten Zellen kein Unterschied vorlag. Auch die Gabe der blockierenden PD-L1 und/oder PD-L2 Antikörper zeigte keinen Einfluss. In allen Gruppen war der Prozentsatz apoptotischer OT-I Zellen mit ca. 5%- 10% relativ niedrig (Abbildung IV-15E). Abschließend wurde auch für die OT-I Zellen der Milz ermittelt, wieviel IFN- γ in Korrelation zur Zellzahl pro Zyklus produziert wurde (Abbildung IV-15F). Hier produzierte die Gruppe ohne Antikörperbehandlung in Zyklus 4 noch am meisten IFN- γ , während die Blockade mit PD-L1 und/oder PD-L2 blockierenden Antikörpern keinen positiven Effekt zeigte (Abbildung IV-15F). Auch die Analyse, wieviele Zellen sich in welchem Zellteilungszyklus befanden (Abbildung IV-15G) und wie sich die CD25 Expression pro Zellzyklus verhielt (Abbildung IV-15H), ergab keinen positiven Effekt der PD-1-Ligandenblockade gegenüber alleiniger OVA-Immunisierung. Zusammen zeigte die Analyse der OT-I Zellen in der Milz, dass die Gabe von endotoxinfreiem OVA nicht zu einer erhöhten Apoptoserate der Zellen führte, diese aber funktionell eingeschränkt waren. Im Gegensatz zum renalen Lymphknoten spielen die PD-1-Liganden keine Rolle in der Toleranzinduktion gegen kleinmolekulare systemische Antigene in der Milz.

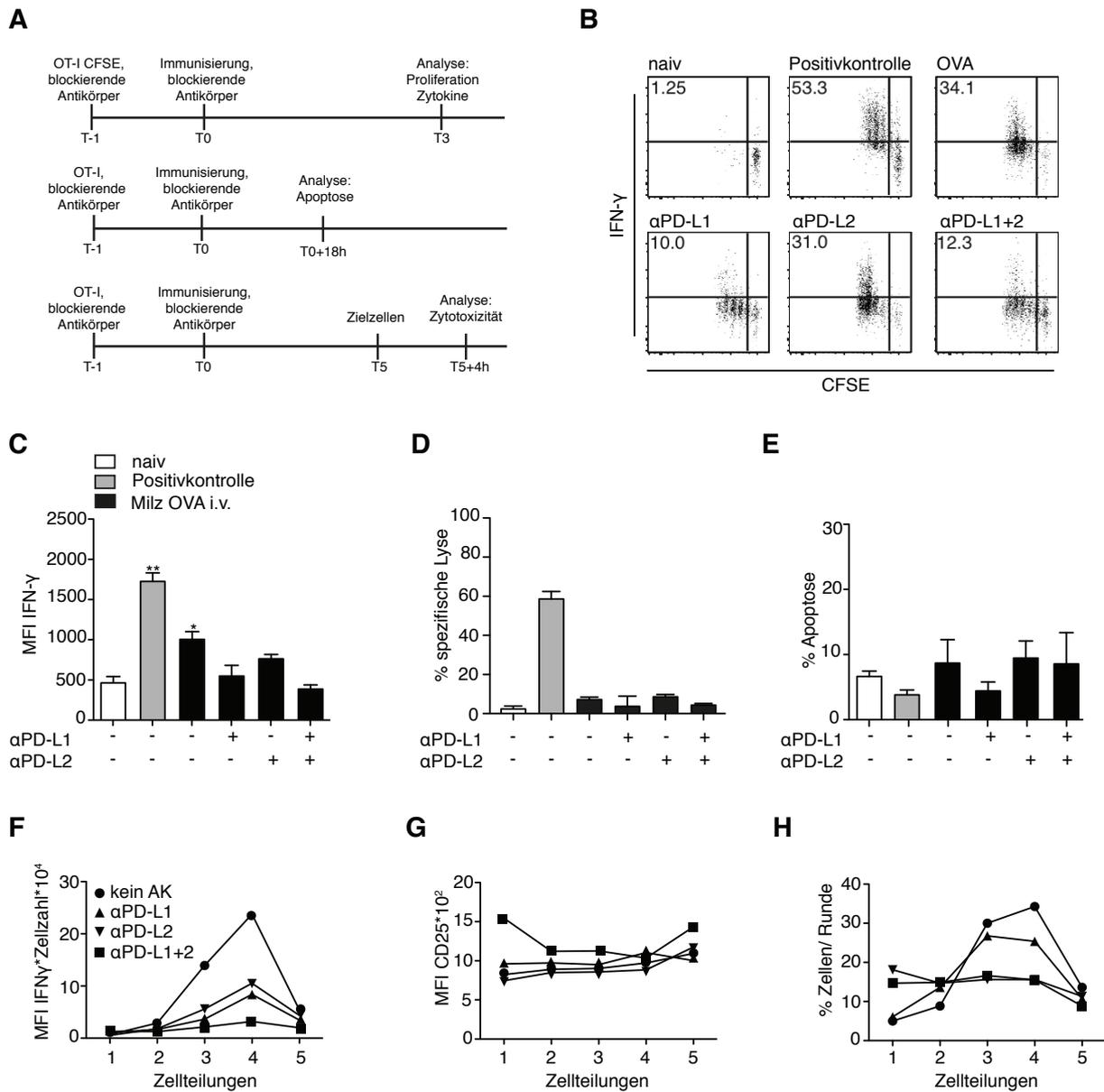


Abbildung IV-15: PD-L1 Blockade hat keinen Einfluss auf Apoptose, Proliferation und IFN γ -Produktion von OT-I Zellen in der Milz

(A) Zeitabläufe der in (B)-(H) dargestellten Experimente. (B) 2×10^6 CFSE markierte OT-I Zellen wurden in Wildtypmäuse transferiert. Blockierende Antikörper wurden zu den in (A) angegebenen Zeitpunkten i.p. appliziert und ein Tag nach OT-I Transfer wurden die Mäuse mit $8 \mu\text{g/g}$ Maus OVA i.v. oder mit OVA/CpG s.c. (Positivkontrolle) immunisiert. IFN γ -Produktion und CFSE-Verdünnung als Messgröße für Proliferation wurden in der Milz durchflusszytometrisch bestimmt. (C) Quantitative Bestimmung der IFN- γ -Produktion aus (B), dargestellt als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von IFN- γ . (D) Versuchsdurchführung wie in (B) beschrieben, aber nur 1×10^5 unmarkierte OT-I Zellen wurden pro Maus transferiert. Die Zytotoxizität der OT-I Zellen in der Milz wurde 5 Tage nach Immunisierung über die spezifische Lyse von OVA-Peptid beladenen Zielzellen im Verhältnis zu unbeladenen Zellen bestimmt. (E) 2×10^6 CFSE unmarkierte OT-I Zellen wurden transferiert und die Mäuse wie in (B) beschrieben behandelt. 18 h nach Immunisierung wurde die Rate apoptotischer OT-I Zellen in der Milz durchflusszytometrisch über Caspase 3 Aktivierung bestimmt. (F)-(H) Quantitative Darstellung der in (B) bestimmten Parameter pro Teilungszyklus der OT-I Zellen. (F) MFI von IFN- γ multipliziert mit der Zellzahl als Messgröße für die produzierte Zytokinmenge, (G) Expression des Aktivierungsmoleküls CD25 und (H) Anteil der OT-I Zellen, die sich im jeweiligen Teilungszyklus befinden.

2.1.4 PD-1 verursacht die Deletion von CTL im renalen Lymphknoten, aber nicht in der Milz

Da mit Hilfe blockierender Antikörper gegen PD-1-Liganden gezeigt werden konnte, dass diese eine Rolle in der Toleranzinduktion im renalen Lymphknoten, nicht aber in der Milz spielen, sollte durch Einsatz von PD-1-defizienten OT-I Zellen gezeigt werden, ob die Liganden direkt über PD-1 auf OT-I T-Zellen wirken, oder ob der Effekt anders vermittelt wird. Mit einem doppelten Transferexperiment sollte die Lebensspanne der OT-I Zellen ermittelt werden, die in unterschiedlichen Organen aktiviert wurden. Dazu wurden CFSE-markierte OT-I Zellen und OT-I.PD1^{-/-} Zellen in Wildtypmäuse transferiert und mit OVA/CpG oder OVA alleine immunisiert. Ein Tag nach Immunisierung wurden Milz und Lymphknoten entnommen, zu Einzelzellsuspensionen verarbeitet und die Anzahl der OT-I Zellen in diesen bestimmt. Die kompletten Suspensionen wurden in verschiedene sekundäre Empfängermäuse transferiert. Durch diesen zweiten Transfer sollte ausgeschlossen werden, dass noch systemisch vorhandenes Antigen weitere Zellen aktiviert. Außerdem wurde ein Einfluss der Rezirkulation verhindert. Nach 5 Tagen wurden alle Lymphknoten und die Milz der sekundären Empfängermäuse entnommen und die Anzahl der überlebenden OT-I Zellen sowie deren IFN- γ -Produktion bestimmt (Schema siehe Abbildung IV-16A). Wenn die Erstempfängermäuse mit OVA/CpG immunisiert wurden, überlebten bis zu 25% der in sekundären Empfängermäuse transferierten OT-I Zellen (Abbildung IV-16B). Außerdem produzierten 40% der wiedergefundenen Zellen IFN- γ nach Restimulation (Abbildung IV-16C). Wurden die Erstempfängermäuse nicht immunisiert, so konnten 12,5% der OT-I Zellen und 20% der OT-I.PD1^{-/-} Zellen wiedergefunden werden (Abbildung IV-16B). Jedoch konnte keine IFN- γ -Produktion nach Restimulation in OT-I oder OT-I.PD1^{-/-} Zellen nachgewiesen werden (Abbildung IV-16C). OT-I Zellen, die aus den renalen Lymphknoten von OVA-immunisierten Erstempfängermäusen in sekundäre Empfängermäuse transferiert wurden, konnten nur in geringer Anzahl wiedergefunden werden und von den 2% Überlebenden wurde kein IFN- γ nach Restimulation erzeugt (Abbildung IV-16B, C). Im Gegensatz dazu konnten fast 20% der OT-I.PD1^{-/-} T-Zellen nach dem sekundären Transfer der renalen Lymphknoten von OVA-immunisierten Mäusen detektiert werden (Abbildung IV-16B). Nach Restimulation produzierten über 20% von diesen IFN- γ , was darauf hindeutet, dass es sich nicht lediglich um nicht aktivierte Zellen, wie in der naiven Kontrolle handelte (Abbildung IV-16C). Für OT-I Zellen, die aus der Milz der Erstempfängermäuse transferiert wurden, zeigte sich ein anderes Bild. Hier konnten nach Immunisierung mit OVA nur ca. 2% der OT-I Zellen in den sekundären Empfängern wiedergefunden werden (Abbildung IV-16B). Aber die OT-I Zellen, die überlebt hatten, konnten zu über 10% zur IFN- γ -Produktion angeregt werden (Abbildung IV-16C).

OT-I.PD1^{-/-} Zellen transferiert aus der Milz konnten mit 2,5% ebensowenig wie die PD-1-kompetenten Zellen nach sekundärem Transfer wiedergefunden werden (Abbildung IV-16B). Die wenigen gefundenen Zellen zeigten aber mit bis zu 40% eine erheblich höhere IFN- γ -Produktion (Abbildung IV-16C).

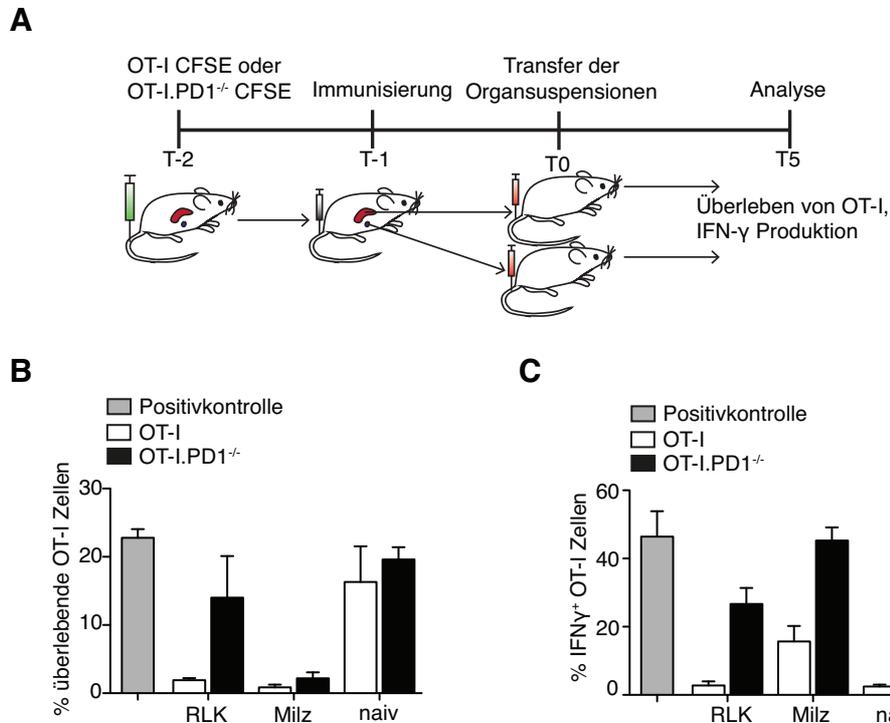


Abbildung IV-16: PD-1 vermittelt die Deletion zytotoxischer T-Zellen im renalen Lymphknoten, aber nicht in der Milz

(A) Experimentelles Schema zur OT-I Überlebensanalyse. 5×10^6 CFSE markierte OT-I (weiß) oder OT-I.PD1^{-/-} (schwarz) Zellen wurden in Wildtypmäuse transferiert, die anschließend mit 8 $\mu\text{g/g}$ Körpergewicht endotoxinfreiem OVA i.v. oder OVA/CpG s.c. (Positivkontrolle, grau) immunisiert wurden. Einen Tag später wurden die absoluten Zellzahlen von OT-I Zellen in den Einzelzellsuspensionen von Milz oder renalen Lymphknoten (RLK) durchflusszytometrisch bestimmt. Die Suspensionen wurden in separate sekundäre Empfängermäuse transferiert und Überleben (B) und IFN- γ -Produktion (C) der OT-I Zellen wurden 5 Tage später in den vereinigten Lymphknoten und Milz der sekundären Empfängermäuse durchflusszytometrisch bestimmt. Abgebildete Daten sind repräsentativ für vier unabhängige Experimente.

Zusammenfassend wurde gefunden, dass PD-1 essentiell für die Toleranzinduktion im renalen Lymphknoten ist, indem es sowohl Überleben als auch IFN- γ -Produktion der zytotoxischen T-Zellen beeinflusst. In der Milz scheint PD-1 eine Aufgabe in der Regulation der IFN- γ -Produktion von zytotoxischen T-Zellen zu haben, aber nicht der maßgebliche Faktor für die Deletion dieser Zellen zu sein.

2.2 Antigenaufnehmende, Batf3-abhängige DC exprimieren PD-L1 im renalen Lymphknoten, aber nicht in der Milz

2.2.1 Filtrierbare Antigene werden im renalen Lymphknoten von XCR1⁺ Batf3-abhängigen DC aufgenommen, die PD-L1 exprimieren

Nachdem gezeigt werden konnte, dass im renalen Lymphknoten harmloses Antigen nach intravenöser Gabe akkumuliert und dass dort der PD-1-Signalweg maßgeblich zur CTL-Toleranzinduktion gegenüber diesem Antigen beiträgt, sollte die verantwortliche antigenpräsentierende Zellpopulation charakterisiert werden. Diese Zellpopulation muss drei Kriterien erfüllen: Sie muss das Antigen aufnehmen, an CD8⁺ T-Zellen kreuzpräsentieren und außerdem müssen PD-1-Liganden zur Toleranzinduktion auf ihrer Oberfläche zu finden sein. Um diese Kriterien gerichtet zu untersuchen, wurde endotoxinfreies, fluoreszenzmarkiertes OVA in Wildtyp- und Batf3^{-/-} Mäuse injiziert und die verschiedenen DC-Populationen wurden durchflusszytometrisch analysiert.

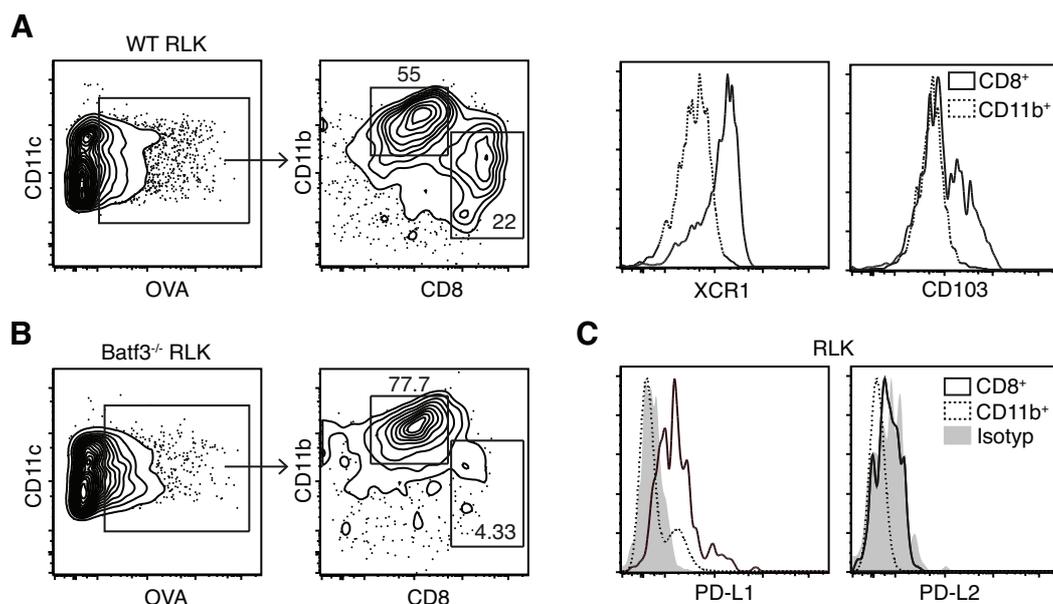


Abbildung IV-17: CD8⁺ DC im renalen Lymphknoten nehmen OVA auf und exprimieren PD-L1

(A),(B) OVA-Aufnahme von CD11c⁺ MHCII⁺ DC Unterarten, die entweder CD11b oder CD8 exprimieren, und CD103 und XCR1 Expression auf diesen Unterarten im renalen Lymphknoten (RLK) von Wildtypmäusen (A) oder Batf3^{-/-} Mäusen (B) nach Injektion mit 8 µg/g endotoxinfreiem OVA-Alexa647. Zahlen geben die Anteile OVA⁺ Zellen innerhalb des markierten Bereichs an. (C) Oberflächenexpression von PD-L1 (links) und PD-L2 (rechts) auf CD8⁺ DC (schwarze Linie) und CD11b⁺ DC (gepunktete Linie) im RLK verglichen mit der Isotypkontrollfärbung (graue Fläche). Abgebildete Punktdiagramme sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Zunächst wurden dendritische Zellen, charakterisiert durch MHCII⁺ und CD11c^{int} oder CD11c⁺ Expression, ausgewählt. Von diesen Zellen haben nach 30 Min. bereits ca. 30% OVA aufgenommen.

Eine weitere Analyse der OVA⁺ Zellen ergab, dass mit 55% über die Hälfte CD11c⁺ CD11b⁺ DC waren und weitere 22% den durch CD8⁺ CD11c⁺ charakterisierten DC entsprachen. Der Vergleich bezüglich ihrer Fähigkeit zur Kreuzpräsentation zeigte, dass nur die CD11c⁺ CD8⁺ DC eine hohe XCR1 und eine teilweise CD103 Expression aufwiesen, während CD11b⁺ CD11c⁺ DC für beide Kreuzpräsentationsmarker negativ waren (Abbildung IV-17A). Das Expressionsprofil in Batf3^{-/-} Mäusen, denen der Transkriptionsfaktor "basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 3" (BATF3) und damit die Population kreuzpräsentierender DC fehlt, zeigte, dass zwar ebenfalls ca. 30% der DC OVA nach 30 Min. aufgenommen haben, aber dieses fast ausschließlich in CD11b⁺ CD11c⁺ DC zu finden war. Die CD11c⁺ CD8⁺ DC-Population fehlte in den Batf3^{-/-} Mäusen fast vollständig (Abbildung IV-17B). Um die Möglichkeit zur Toleranzinduktion zu adressieren, wurde auf den kreuzpräsentierenden, OVA aufnehmenden DC nach der Expression der PD-1-Liganden PD-L1 und PD-L2 geschaut. Während nicht kreuzpräsentierende CD11b⁺ CD11c⁺ DC im Vergleich zur Isotypenkontrolle keine erhöhte PD-L1 Expression aufwiesen, exprimierten CD11c⁺ CD8⁺ DC verstärkt PD-L1 (Abbildung IV-17C). Keine der DC-Populationen wies unter den hier vorliegenden Bedingungen eine PD-L2 Expression auf (Abbildung IV-17C). Diese Charakterisierung zeigte, dass kreuzpräsentierende DC im renalen Lymphknoten in Wildtypmäusen OVA effizient aufnehmen und durch die Expression von PD-L1 PD-1 vermittelte Toleranz induzieren könnten.

2.2.2 Kreuzpräsentierende DC in der Milz zeigen keine distinkte PD-L1 Expression

Da für die Milz keine eindeutige Rolle des PD-1-Signalwegs in der CTL-Toleranzinduktion gezeigt werden konnte, sollten die beteiligten DC-Populationen zum Vergleich mit renalen Lymphknoten-DC-Populationen charakterisiert werden. Auch in der Milz nahmen ca. 30% der MHCII⁺ CD11c^{int} und CD11c⁺ DC OVA auf. Die OVA aufnehmenden DC ließen sich ebenfalls wie im renalen LK in CD11c⁺ CD11b⁺ und CD11c⁺ CD8⁺ DC unterteilen, welche auch zu ähnlichen Prozenten wie im renalen Lymphknoten vorlagen. Die CD11c⁺ CD8⁺ DC in der Milz entsprachen in der XCR1 Expression den renalen LK DC, waren aber nicht CD103⁺ (Abbildung IV-18A). Auch die Batf3^{-/-} Mäusen zeigten in der Milz einen Phänotyp wie im renalen Lymphknoten. Während die CD11b⁺ CD11c⁺ Population unverändert vorlag, fehlte die CD11c⁺ CD8⁺ Population fast vollständig (Abbildung IV-18B).

Bemerkenswert war aber die PD-L1 Expression, die im Gegensatz zum renalen Lymphknoten keine klare Unterscheidung zwischen den kreuzpräsentierenden CD11c⁺ CD8⁺ und den CD11b⁺ CD11c⁺ DC zuließ. Beide Populationen lagen in der Expression leicht über der Isotypkontrolle, exprimierten aber gleiche Mengen an PD-L1.

Genauso wie im renalen Lymphknoten exprimierte keine der Populationen PD-L2 (Abbildung IV-18C). Die Milz wies somit im Bezug auf die Unterarten einen vergleichbaren Phänotyp der beteiligten DC auf, die PD-L1 Expression war aber nicht so distinkt wie im renalen Lymphknoten.

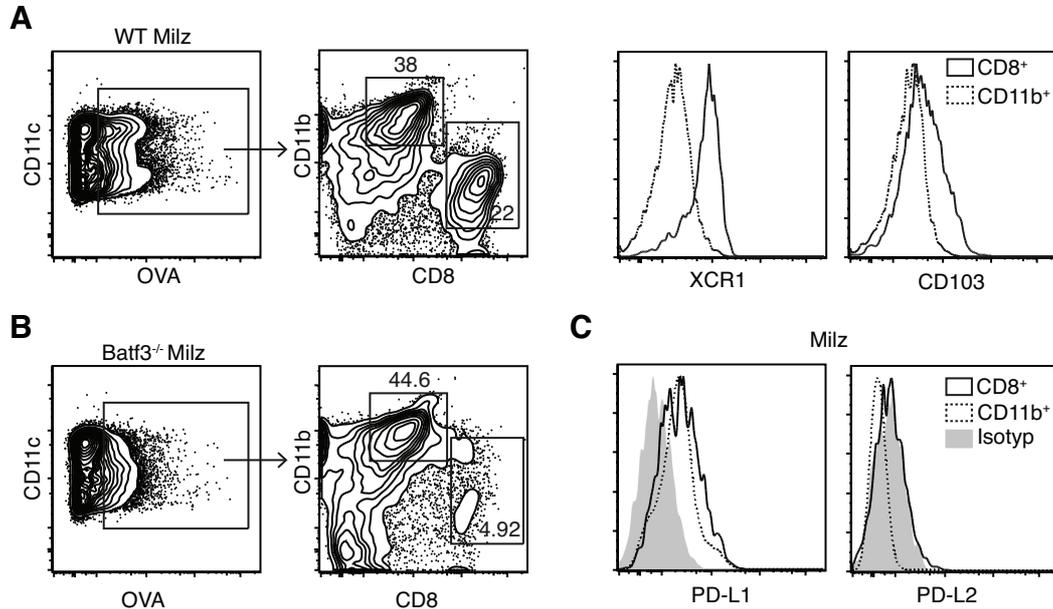


Abbildung IV-18: Keine distinkte Expression von PD-L1 oder PD-L2 auf OVA-aufnehmenden DC-Unterarten in der Milz

(A),(B) OVA-Aufnahme von CD11c⁺ MHCII⁺ DC-Unterarten, die entweder CD11b oder CD8 exprimieren, und CD103 und XCR1 Expression auf diesen Unterarten in der Milz von Wildtypmäusen (A) oder Batf3^{-/-} Mäusen (B) nach Injektion mit 8 µg/g endotoxinfreiem OVA-Alexa647. Zahlen geben die Anteile OVA⁺ Zellen innerhalb des markierten Bereichs an. (C) Oberflächenexpression von PD-L1 (links) und PD-L2 (rechts) auf CD8⁺ DC (schwarze Linie) und CD11b⁺ DC (gepunktete Linie) in der Milz verglichen mit der Isotypkontrollfärbung (graue Fläche). Abgebildete Punktdiagramme sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

2.3 Kreuztoleranz im renalen Lymphknoten wird über Batf3-abhängige, PD-L1⁺ DC vermittelt

2.3.1 Apoptoseinduktion in CTL im renalen Lymphknoten findet über PD-L1⁺ und Batf3-abhängige Zellen statt

Die Tatsache, dass DC im renalen Lymphknoten Antigen aufnehmen und PD-L1 exprimierten, bewies noch nicht, dass diese Zellen auch für die beobachtete Toleranzinduktion der zytotoxischen T-Zellen verantwortlich waren. Um diesen Zusammenhang zu belegen, wurde zunächst gezeigt, wie wichtig Batf3-abhängige Zellen und die PD-L1 Expression in den Empfängermäusen für die Apoptoseinduktion in OT-I Zellen war.

Während im renalen Lymphknoten von Wildtypmäusen fast 10% der transferierten OT-I Zellen apoptotisch wurden, halbierte sich die Zahl der apoptotischen Zellen in Batf3^{-/-} Mäusen (Abbildung IV-19A). In der Milz konnte in keiner der Gruppen ein signifikanter Anstieg der Caspase-3-Aktivität gemessen werden (Abbildung IV-19A). Auch in PD-L1^{-/-} Mäusen halbiert sich der Anteil apoptotischer Zellen im renalen Lymphknoten im Vergleich zu Wildtypmäusen, während in der Milz in keiner Gruppe vermehrt Apoptose gemessen werden konnte (Abbildung IV-19B). Dieser Versuch zeigte, dass sowohl Batf3-abhängige DC als auch PD-L1 in den Empfängermäusen für eine effektive Toleranzinduktion durch Apoptose vorhanden sein müssen.

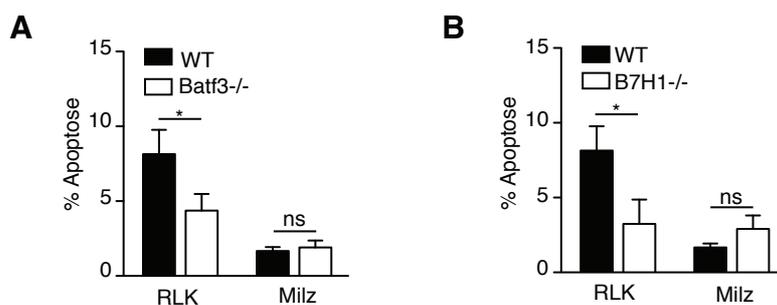


Abbildung IV-19: OT-I-Apoptoseinduktion im renalen Lymphknoten, aber nicht in der Milz hängt von Batf3⁺ Zellen und PD-L1 ab

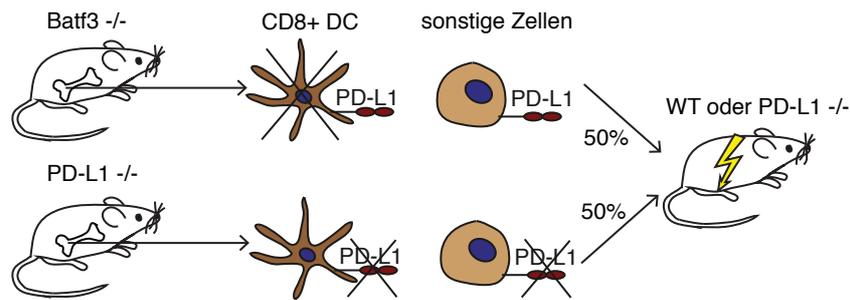
(A), (B) 2×10^6 OT-I Zellen wurden in Batf3^{-/-} (A, weiß), PD-L1^{-/-} (B, weiß) oder Wildtypmäuse (A,B; schwarz) gespritzt. Einen Tag später wurden die Mäuse mit 8 $\mu\text{g/g}$ Körpergewicht OVA i.v. immunisiert und der Anteil apoptotischer OT-I Zellen wurde nach 18 h über Caspase 3 Expression durchflusszytometrisch bestimmt.

2.3.2 Generierung von Knochenmarkchimären

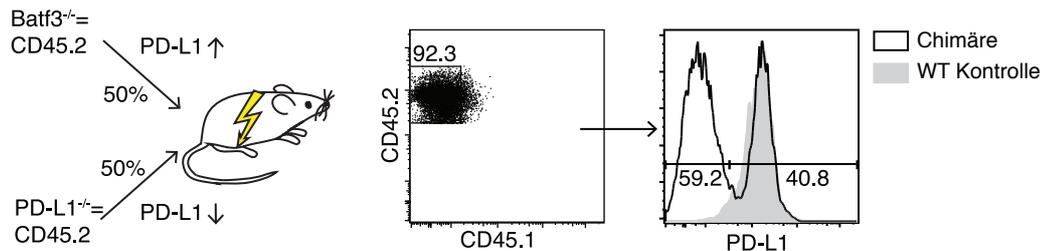
Ob PD-L1 zwingend auf den Batf3-abhängigen Zellen oder auf anderen Zellen vorhanden sein muss, sollte durch gemischte Knochenmarkchimären adressiert werden. Dazu wurden mehrere Arten von Chimären hergestellt. Für eine Gruppe wurden Wildtypempfängermäuse verwendet, in die nach Bestrahlung gemischtes Knochenmark im Verhältnis 1:1 von Batf3^{-/-} und PD-L1^{-/-} Mäusen zur Rekonstitution gegeben wurde. Als Kontrolle dazu wurden Chimären mit 50% Wildtyp und 50% Batf3^{-/-} Knochenmark hergestellt. In den Batf3^{-/-}/PD-L1^{-/-} Chimären waren nun DC vorhanden, die kreuzpräsentieren konnten und Batf3-abhängig waren, die aber kein PD-L1 exprimieren konnten. Alle anderen Zellen waren PD-L1-kompetent, konnten aber nicht kreuzpräsentieren. In den Kontrolltieren waren 50% des Knochenmarks wildtypisch, so dass hier eine normale Toleranz- bzw. Apoptoseinduktion stattfinden sollte (siehe Schema Abbildung IV-20A).

Als zweite Gruppe wurden PD-L1^{-/-} Empfängermäuse verwendet, um den Einfluss von strahlenresistenten Zellen der Empfänger ausschließen zu können. Auch hier wurden Batf3^{-/-}/PD-L1^{-/-} und Batf3^{-/-}/Wildtyp Knochenmarkchimären generiert. Zur Überprüfung des Chimärismus wurde für Batf3^{-/-}/PD-L1^{-/-} Chimären Blut für 18 h mit LPS stimuliert und anschließend die PD-L1 Expression auf CD45.2⁺ Zellen gemessen. Etwa 59,2% der Zellen hatten kein PD-L1 hochreguliert, während 40,8% positiv für PD-L1 waren (Abbildung IV-20B). Da in der Wildtypkontrolle alle Zellen PD-L1 hochreguliert hatten, konnte somit von einem Chimärismus von ca. 60:40 in Batf3^{-/-}/PD-L1^{-/-} Chimären ausgegangen werden. Die Batf3^{-/-}/Wildtyp Chimären wurde über die kongenen Marker CD45.1 und CD45.2 überprüft. Da als Wildtypmäuse CD45.1/2 Mäuse verwendet wurden, sind Zellen, die aus diesem Knochenmark generiert wurden, doppelpositiv, während Zellen aus dem Batf3-Knochenmark nur CD45.2 positiv waren. Hier zeigt sich eine Rekonstitution von ca 50:50 und alle Zellen konnten PD-L1 nach LPS Stimulation hochregulieren (Abbildung IV-20C).

A



B



C

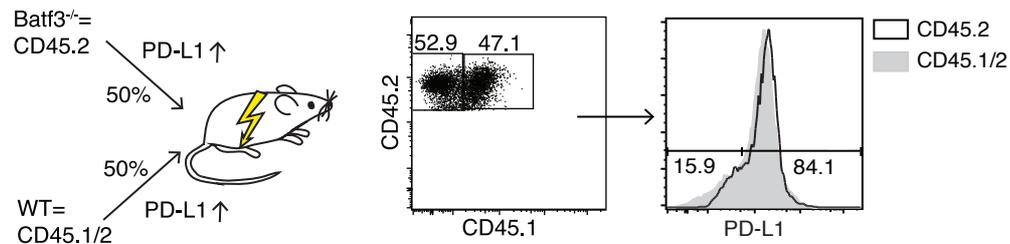


Abbildung IV-20: Generierung von Knochenmarkchimären

(A) Schema für die Generierung von Knochenmarkchimären. Bestrahlte PD-L1^{-/-} oder Wildtypempfängermäuse wurden mit einer 1:1 Mischung aus PD-L1^{-/-} und Batf3^{-/-} oder PD-L1^{-/-} und Wildtypknochenmark rekonstituiert. (B),(C) Die Rekonstitution wurde mit einer Färbung für CD45.1, CD45.2 und PD-L1 überprüft. Für die Färbung mit PD-L1 wurden die Zellen über Nacht mit 1 µg/ml LPS stimuliert, Zellen aus PD-L1^{-/-} Knochenmark sind PD-L1-negativ. Zellen, die aus Batf3^{-/-} oder PD-L1^{-/-} Knochenmark generiert wurden, sind CD45.2⁺, Zellen aus Wildtypmäusen sind CD45.1⁺ und CD45.2⁺.

2.3.3 PD-L1 Expression auf Batf3-abhängigen DC ist notwendig für die Kreuztoleranzinduktion im renalen Lymphknoten

Die Analyse der chimären Wildtypempfängermäuse ergab, dass 50% Wildtypknochenmark in der Batf3^{-/-}/Wildtyp-Kontrollgruppe ausreichte, um nach intravenöser OVA-Injektion im renalen Lymphknoten mit etwa 20% eine Apoptoseinduktion der selben Stärke wie in nicht-chimären Wildtypmäusen hervorzurufen (Abbildung IV-21A). In den Batf3^{-/-}/PD-L1^{-/-}-Chimären hingegen sank der Anteil an apoptotischen Zellen signifikant ab (Abbildung IV-21B), lag mit fast 10% aber noch etwas über der Apoptoserate von etwa 4% in naiven Wildtypmäusen. In der Milz war kein Unterschied zwischen den beiden Chimärengruppen zu detektieren (Abbildung IV-21B).

Die Apoptoserate von OT-I Zellen in der Milz lag in beiden Gruppen mit 10% leicht über dem Niveau der Apoptoserate von unbehandelten Mäusen, aber signifikant unter der Rate des renalen Lymphknotens von OVA-behandelten Mäusen (Abbildung IV-21B).

Die Quote apoptotischer Zellen in den chimären PD-L1^{-/-} Empfänger-mäusen war in allen Gruppen niedriger als in den vergleichbaren Gruppen der chimären Wildtypempfänger-mäuse (Abbildung IV-21C). Trotzdem ist zu sehen, dass OT-I Zellen aus naiven Tieren kaum apoptotisch wurden, während signifikant mehr OT-I Zellen im renalen Lymphknoten von OVA-immunisierten Mäusen starben (Abbildung IV-21C). OT-I Zellen aus dem renalen Lymphknoten in Batf3^{-/-}/Wildtyp-Chimären wiesen die gleiche Apoptoserate auf, wie die korrespondierende OVA-Kontrolle aus nicht-chimären Mäusen, während OT-I Zellen aus dem renalen Lymphknoten in Batf3^{-/-}/PD-L1^{-/-} Chimären signifikant weniger starben. In der Milz war hier ebenfalls kein Unterschied zwischen beiden Gruppen zu sehen und die Apoptoserate von OT-I Zellen in der Milz war generell niedrig und vergleichbar mit dem Level der naiven Kontrolle (Abbildung IV-21C).

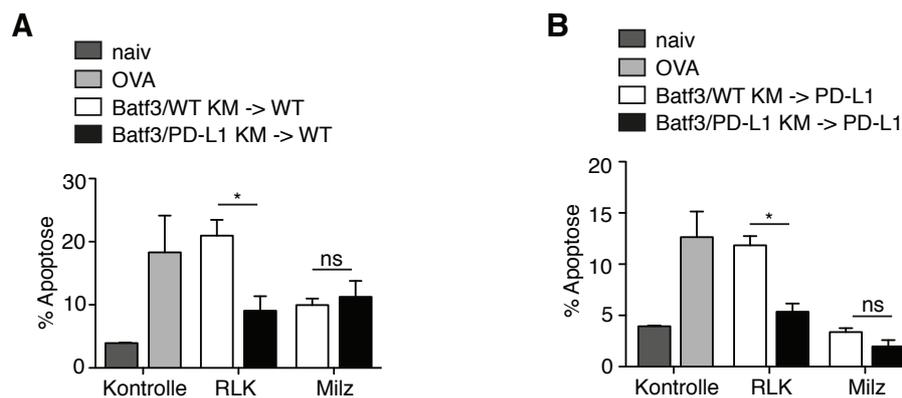


Abbildung IV-21: PD-L1 auf Batf3^{-/-} DC ist essentiell für Kreuztoleranzinduktion im renalen Lymphknoten

(A) Anteil apoptotischer OT-I Zellen im RLK und der Milz von Batf3^{-/-}/WT (weiße Balken) oder Batf3^{-/-}/PD-L1^{-/-} (schwarze Balken) Knochenmarkchimären 18 h nach Injektion von 8 µg/g OVA i.v.. Kontrollen sind OVA-injizierte (hellgraue Balken) oder uninjizierte Wildtypmäuse (dunkelgraue Balken). (B) Wie in (A) außer, dass PD-L1^{-/-} Mäuse als Knochenmarkempfänger benutzt wurden. Die Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente mit vier Mäusen pro Gruppe. KM: Knochenmark

Diese Daten zeigen zusammengenommen, dass im renalen Lymphknoten Batf3-abhängige, hämatopoietische Zellen PD-L1 dazu nutzen, Apoptose in CTL zu induzieren. Diese Zellen sind im renalen Lymphknoten hinreichend und notwendig für die Toleranzinduktion. In der Milz dagegen scheint ein anderer Mechanismus für die Toleranzinduktion von CTL operativ zu sein, da hier kein Einfluss von PD-L1 auf Batf3-abhängigen DC gezeigt werden konnte. Die Ergebnisse der Studie unterstreichen die Notwendigkeit, alle sekundären lymphatischen Organe in die Analysen einzubeziehen, wenn Therapien mit PD-1 modulierenden Substanzen begutachtet werden.

V Diskussion

1 B-Zellkreuzpräsentation

In der Vergangenheit hat sich die Kreuzpräsentation als wichtiger Mechanismus in der Toleranzinduktion, aber auch im Kampf gegen virale Infektionen herausgestellt²¹². Um Kreuzpräsentation für Therapiezwecke ausnutzen zu können, ist es notwendig, die zu Grunde liegenden zellulären Mechanismen zu verstehen. Für dendritische Zellen konnten die einzelnen Schritte, die zur Kreuzpräsentation eines Antigenes führen, bereits teilweise entschlüsselt werden. Da B-Zellen neben DC eine starke Population professioneller Antigen präsentierender Zellen stellen, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, welche Voraussetzungen für B-Zellkreuzpräsentation erfüllt werden müssen und welche Kreuzpräsentationsmechanismen in B-Zellen operativ sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass B-Zellen Antigene spezifisch über ihren B-Zellrezeptor aufnehmen und über frühe Endosomen in Recycling-Endosomen transportieren. Anschließend wird das Antigen über den Sec61 Komplex in das Zytosol transloziert und durch Proteasomen in Peptide zerlegt. Diese gelangen über den Transporter TAP zurück in Recycling-Endosomen, wo sie auf MHC-I geladen und zur Oberfläche transportiert werden. Neben der Aufschlüsselung der Mechanismen wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass man B-Zellkreuzpräsentation auch ohne Kenntnis der Rezeptorspezifität untersuchen und für weitere Zwecke instrumentalisieren kann, indem man Antigen über den Transferrinrezeptor einbringt und die B-Zellen über Rezeptorstimulation aktiviert.

1.1 B-Zellkreuzpräsentation ist B-Zellrezeptorabhängig

B-Zellkreuzpräsentation ist kein unumstrittenes Phänomen. Bereits 1996 wurde in ersten *in vitro* Versuchen nachgewiesen, dass B-Zellen kreuzpräsentieren können⁴⁶, was später von anderen Gruppen bestätigt werden konnte^{219, 247}. Auch in der vorliegenden Studie wurde nachgewiesen, dass B-Zellen Antigene spezifisch über den B-Zellrezeptor aufnehmen, unter Hochregulation kostimulatorischer Signale an CD8⁺ T-Zellen kreuzpräsentieren und diese aktivieren. Andere Studien konnten *in vivo* im Zusammenhang mit Diabetes und entzündlichen Darmerkrankungen eine Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen durch B-Zellen zeigen^{82, 248, 249}. Diese Befunde stehen im Widerspruch mit einer Studie, in der gezeigt wurde, dass folliculäre und Marginalzonen B-Zellen nicht in der Lage sind, MHC-I-restringierte Virusepitope kreuzzupräsentieren²⁵⁰. Die Autoren schlussfolgerten, dass B-Zellen die nötige Maschinerie zu Kreuzpräsentation fehlt, ähnlich wie für CD8⁻ DC beschrieben^{92, 251}.

Diese Gegensätzlichkeit zur vorliegenden und anderen Arbeiten könnte daraus resultieren, dass die verwendeten sogenannten "Virus like particles" nicht über den B-Zellrezeptor von Wildtyp-B-Zellen aufgenommen wurden, und somit nicht in die passenden Kompartimente gelangen konnten.

Dendritische Zellen können über verschiedene Wege Antigene aufnehmen. Dazu zählen rezeptorvermittelte Endozytose, wie z.B. über den Mannoserezeptor, Fcγ- und Scavengerrezeptoren^{241, 252, 253}. Dazu kommen Phagozytose und Pinozytose²⁵⁴. In dendritischen Zellen ist der Rezeptor, über den Antigene aufgenommen werden, ein wichtiger Faktor für die anschließende kompartimentelle Lokalisation der Antigene und die Art der Präsentation^{229, 244}. B-Zellen dagegen nutzen zur Antigenaufnahme nur ihren B-Zellrezeptor und - bei Komplementaktivierung - den Komplementrezeptor Typ 2^{ref255}. Sie können nicht phagozytieren und besitzen nur einen Fcγ-Rezeptor, der wegen eines inhibitorischen zytoplasmischen Motivs nicht endozytiert werden kann²⁵⁶. Außerdem haben sie schlechte Pinozytoseeigenschaften. Daraus ergibt sich, dass lösliches, nicht komplementgebundenes Antigen nur über den B-Zellrezeptor aufgenommen werden kann.

Über den BCR aufgenommene Antigene können dafür gleichzeitig auf MHC-I und MHC-II an CD8⁺ bzw CD4⁺ T-Zellen präsentiert werden, wobei der Hauptanteil in die klassische MHC-II-Präsentation fließt. Da der Transport in die distinkten Antigenprozessierungswege nicht über unterschiedliche Aufnahmemechanismen gesteuert werden kann, stellt sich die Frage, ob MHC-II-Präsentation und Kreuzpräsentation in B-Zellen in gemeinsamen Kompartimenten abläuft. Mit konfokalmikroskopischen Untersuchungen der Aufnahmekinetik von fluoreszenzmarkiertem HEL Protein in IgHEL B-Zellen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass anfänglich das gesamte Protein in ein frühendosomales, transferrinpositives Kompartiment transportiert wird. Anschließend gelang ein Teil davon in spätendosomale bzw. lysosomale Kompartimente, während jedoch ein anderer Teil in transferrinpositiven Kompartimenten bleibt. Diese augenscheinliche Separierung des Proteins wird auch dadurch bestätigt, dass Inhibitoren der lysosomalen Ansäuerung zwar die MHC-II-Präsentation hemmen, aber keinen Einfluss auf die Kreuzpräsentation der B-Zellen haben. Dies lässt darauf schließen, dass über den B-Zellrezeptor aufgenommene Proteine in unterschiedliche Kompartimente gelangen können. Das für die Kreuzpräsentation verantwortliche Kompartiment scheint, auf Grund der Unempfindlichkeit gegenüber Chloroquin, ein frühendosomales, transferrinpositives Kompartiment zu sein. Eine mögliche Erklärung für die Lokalisation in separate Kompartimente trotz gleicher Aufnahme könnten die Igα- und Igβ-Untereinheiten des B-Zellrezeptors liefern. Neben der Aktivierung von Syk spielen das ITAM-Motiv der Igα-Untereinheit eine Rolle bei der B-Zellrezeptor-vermittelten Signaltransduktion^{76, 77}.

Ig α und Ig β sind aber nicht nur unabdinglich für die Weiterleitung des BCR Signals, sie sind auch essentiell für die Aufnahme des Rezeptors und die effiziente Antigenpräsentation^{76, 77}. Huo *et al.* behaupten, dass Antigenaufnahme und Signalweiterleitung über den B-Zellrezeptor sich gegenseitig ausschließende Ereignisse sind²⁵⁷. Es wurde beschrieben, dass der B-Zellrezeptor Ig α /Ig β -abhängig kontinuierlich clathrinvermittelt internalisiert wird und unligierte Rezeptorkomplexe schnell durch frühe Endosomen wieder an die Oberfläche gelangen⁷⁶. Ig α und Ig β formen ein Heterodimer, welches nicht-kovalent gebunden mit membranständigem Immunglobulin (mIg) assoziiert²⁵⁸. Mit Hilfe von Ig α - bzw. Ig β -chimären Proteinen wurde festgestellt, dass die zytoplasmatischen Domänen beider Untereinheiten unabhängig voneinander die Internalisierung von Antigen und auch anschließende MHC-II-Präsentation vermitteln können²⁵⁹. Im Zuge dieser Experimente wurde jedoch ebenfalls gezeigt, dass sich die Ig α - und Ig β -Untereinheit in ihrer Endozytosekinetik und der Lokalisation des aufgenommenen Komplexes unterscheiden. Während zusammen mit Ig β aufgenommenes Antigen langsam degradiert wurde und vollständig mit transferrinpositiven Kompartimenten kolokalisierte, führte Ig α zu einer schnellen Antigendegradation in einem nicht identifizierten Kompartiment mit neu synthetisierten MHC-II-Molekülen. Ig β schleuste das Antigen in frühe Endosomen mit geringer proteolytischer Aktivität und hoher Recyclingrate. Im Kontext der B-Zellkreuzpräsentation könnte dies bedeuten, dass die Signaltransduktion der Ig α - und/oder Ig β -Untereinheiten für die räumliche Trennung der MHC-I- und MHC-II-Präsentation sorgen. Um diese Hypothese zu bestätigen, müsste die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation in Ig α - bzw. Ig β -defizienten B-Zellen adressiert werden. Da allerdings Ig α bzw. Ig β defiziente B-Zellen in ihrer Entwicklung auf der Stufe der Vorläufer B-Zellen stehen bleiben²⁶⁰, müsste man, um Ig α - bzw. Ig β -defiziente B-Zellen für Kreuzpräsentationsexperimente nutzen zu können, konditionale "knockouts" von diesen herstellen. Die in den funktionellen Studien verwendeten FcR-Ig α - und FcR-Ig β -Chimären wurden in humane B-Zelllinien kloniert, so dass hier eine Adaptierung für murine Zellen oder eine Änderung der Kreuzpräsentationsexperimente für weiterführende Studien notwendig wäre.

1.2 Antigenpräsentation von B-Zellen ist empfindlich gegenüber Zellfixierung

Über den B-Zellrezeptor aufgenommenes Antigen gelangte in ein vergleichbares Kompartiment, wie das, was von Burgdorf *et al.* für Kreuzpräsentation in DC postuliert wurde. Deswegen wurde in dieser Arbeit untersucht, ob es weitere Gemeinsamkeiten zwischen der B-Zell- und der DC-Kreuzpräsentation gibt.

Um die einzelnen Abschnitte der Antigenprozessierung und Beladung der MHC-Moleküle zu untersuchen, wurden diverse Inhibitoren verwendet. Ein generelles Problem in diesem Zusammenhang ist, dass es nicht möglich war, B-Zellen für Präsentationsexperimente zu fixieren. Eine Fixierung der Zellen wäre jedoch notwendig, um Nebeneffekte von Inhibitoren ausschließen zu können, da diese von den B-Zellen in die Kultur abgegeben werden könnten und damit auch die T-Zellen beeinflussen könnten. Außerdem kann eine längere Einwirkzeit von Inhibitoren durch toxische Effekte auf B-Zellen die Ergebnisse in funktionalen Untersuchungen verfälschen. Eine erfolgreiche Fixierung von B-Zellen hätte auch dazu beitragen können, reversible Inhibitoren zuverlässig einzusetzen.

So musste für alle Ergebnisse in Betracht gezogen werden, dass toxische Effekte auf die B-Zellen oder ungewollte Effekte auf die T-Zellen auftreten konnten. Außerdem hätte ein reversibler Effekt schwacher Inhibitoren leicht übersehen werden können.

Schon die Präsentation von MHC-II-Peptiden, die normalerweise zu einer Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen führt, wurde durch die Fixierung beeinträchtigt. Auch äußeres Beladen durch SIINFEKL-Peptide führt nach Fixierung nicht mehr zu einer CD8⁺ T-Zellaktivierung. Es wurden unterschiedliche Fixierungsmethoden getestet, dennoch konnte mit keiner die CD8⁺ T-Zellaktivierung erhalten bleiben. Ein Grund dafür könnte zu schwache Kostimulation oder zu geringe Anzahl an MHC-Antigen Komplexen auf den B-Zellen sein. Eine weitere häufig angewandte Praxis in Präsentationsexperimenten ist es, die APC zu bestrahlen. Wie Ashwell *et al.* gezeigt haben, konnten kleine ruhende B-Zellen nach Bestrahlung allerdings nicht mehr als APC fungieren, während Makrophagen und DC nach denselben und auch weitaus höheren Strahlendosen weiterhin T-Zellen aktivieren konnten²⁶¹. Bemerkenswert ist, dass in den wenigsten Publikationen, die sich mit B-Zellen als APC befassen, fixierte Zellen verwendet wurden. Bei der Bewertung der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente, in denen Inhibitoren verwendet wurden, muss die fehlende Fixierung jedoch mit einbezogen werden.

1.3 Antigenprozessierung in B-Zellen

Die einzelnen Schritte der Kreuzpräsentation können in die Generierung und Prozessierung von Peptiden aus dem aufgenommenen Antigen, die Beladung der MHC-I-Moleküle und den Transport des beladenen Komplexes an die Zelloberfläche unterteilt werden²⁴³. Diese Schritte können auf zytosolischem oder endozytischem Weg stattfinden. Im zytosolischen Weg wird exogenes Antigen in endosomale Kompartimente aufgenommen, aus denen es in das Zytosol transloziert wird, von wo es in den endogenen Klasse-I-Beladungsweg gelangen kann²⁴⁵.

Dagegen verbleibt im endozytischen Weg das aufgenommene Antigen im Endosom und wird dort cathepsinabhängig degradiert und anschließend auf MHC-I-Moleküle geladen²⁶². Diese dichotome Sicht ist nicht umfassend, da der zytosolische und der endozytische Weg auch kombiniert werden können^{234, 263}. In dieser Arbeit wurde deswegen jeder Schritt einzeln untersucht.

Zunächst wurde adressiert, ob in Endosomen aufgenommenes Antigen dort oder im Zytosol prozessiert wird. Für eine Prozessierung im Zytosol ist das Ausschleusen des Proteins aus dem Endosom unabdingbar. Diese Studie zeigt, dass ein solcher Export in das Zytosol erfolgt. Über den B-Zellrezeptor eingeschleustes Cytochrom C induziert Apoptose, während nicht in das Zytosol gelangendes Cytochrom C nicht toxisch wirkt. Dieser Befund ist konform mit einem Artikel, in dem Cytochrom C *in vivo* zum Entfernen von kreuzpräsentierenden DC verwendet wurde²⁴⁶.

Neuere Studien haben gezeigt, dass der Sec61-Kanal für einen solchen Transport zuständig sein könnte²⁶⁴. Sec61 ist ein bidirektionaler Transporter im ER, der sowohl für den Transport von Proteinen aus dem Zytosol in das ER Lumen als auch für den Transfer ER-ständiger Proteine ins Zytosol zur proteasomalen Degradierung zuständig ist^{265, 266}. Neben Komponenten der MHC-I-Beladungsmaschinerie konnte Sec61 auch in Phagosomen gefunden werden²²⁶. *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A wurde bereits als blockierendes Agens für den Sec61-Kanal eingesetzt²⁶⁷. So wurde z.B. gefunden, dass Exotoxin A die Kreuzpräsentation von löslichem OVA in DC-ähnlichen Zellen inhibiert. Durch passende Kontrollen wurde auch gezeigt, dass diese Beobachtung nicht auf einen Nebeneffekt des Exotoxin A zurückzuführen war²⁶⁷. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass Exotoxin A auch die Kreuzpräsentation von B-Zellen hemmt. Da Exotoxin A keinerlei Effekt auf die Präsentation von direkt in das Zytosol eingebrachtem Protein, auf SIINFEKL Beladung und auch keinen auf die klassische MHC-II-Präsentation zeigt, kann auch hier von einer spezifischen Wirkung auf den Transport durch den Sec61-Kanal ausgegangen werden. Auch die Tatsache, dass es sich um unfixierte B-Zellen gehandelt hat, scheint für den Einsatz von Exotoxin A keine Rolle gespielt zu haben. Eine Toxizität oder verringerte MHC-I-Expression konnte durch die o.g. Kontrollen bereits ausgeschlossen werden. Der Nachweis, dass tatsächlich weniger Protein im Zytosol der B-Zellen nach Exotoxin A Behandlung vorhanden ist, müsste durch weitere Analysen unterstützt werden. Da die Trennung von Endosomen und Zytosol durch den Einsatz verschiedener Lysepuffer erzielt wurde, ist es möglich, dass die einzelnen Kompartimente nicht vollständig aufgetrennt wurden.

Der nächste Schritt in der Prozessierungskette, die Degradierung des ausgeschleusten Proteins durch Proteasomen, wurde mit Hilfe des Inhibitors Epoxomicin untersucht. B-Zellkreuzpräsentation wurde durch diesen Proteasomeninhibitor komplett unterdrückt. Da bekannt ist, dass der Proteasomeninhibitor Bortezomib Apoptose in B-Zelllymphomen über die Induktion reaktiver Sauerstoffspezies ("reactive Oxygen species", ROS) induziert²⁶⁸, könnte natürlich auch der Effekt von Epoxomicin auf die B-Zellkreuzpräsentation, über eine solche Toxizität erklärt werden. Der hier verwendete Inhibitor Epoxomicin ist zwar ein spezifischer Proteasomeninhibitor, da es die LMP7, X, Z und MECL1 katalytischen β -Untereinheiten des Proteasoms, aber keine anderen Proteasen inhibiert, trotzdem ist allein die Blockierung von Proteasomen über einen längeren Zeitraum ein Todessignal für Zellen²⁶⁹. Da in den gezeigten Experimenten das prozessierungsunabhängige Peptid SIINFEKL unbeeinflusst an CD8⁺ T-Zellen präsentiert wurde, scheint nach Epoxomicinbehandlung die Fähigkeit der B-Zellen CD8⁺ T-Zellen zu aktivieren allerdings nicht beeinträchtigt gewesen zu sein.

1.4 Beladung und Transport von MHC-I-Komplexen für die Kreuzpräsentation in B-Zellen

Die im Zytosol generierten Peptide konnten theoretisch über den endogenen ER-abhängigen Klasse-I-Weg präsentiert oder zurück in Endosomen mit der MHC-I-Beladungsmaschinerie transportiert werden. Brefeldin A blockiert den retrograden Golgitransport und hält so Proteine im ER zurück²⁷⁰. Nüchtern *et al.* haben gezeigt, dass daher die endogene MHC-I- und MHC-II-Präsentation durch Brefeldin A blockiert wird²⁷¹.

Da in der hier untersuchten B-Zell Kreuzpräsentation Brefeldin A keinen negativen Einfluss zeigt, scheinen die Peptide für die MHC-I-Beladung in Endosomen zurücktransportiert zu werden. Die dargestellten Ergebnisse lassen somit vermuten, dass durch Proteasomen generierte Peptide zur Kreuzpräsentation wieder in Endosomen transportiert werden müssen. Dies würde implizieren, dass Peptide von aufgenommenen Antigenen zur Kreuzpräsentation nicht mit harmlosen, endogenen Peptiden konkurrieren müssten.

Ein im Zusammenhang mit dem Peptidtransport in das ER erforschter Transporter ist TAP, der zusammen mit der gesamten MHC-I-Beladungsmaschinerie auch in Phagosomen nachgewiesen werden konnte²²⁶. Seine Funktionalität in der Kreuzpräsentation wurde ebenfalls bereits beschrieben^{227, 272}. Um TAP spezifisch in Endosomen inhibieren zu können und die ER-Funktion unbeeinflusst zu lassen, wird ein luminal wirkender TAP-Inhibitor benötigt, der über Transferrin direkt in transferrinpositive Endosomen eingebracht werden kann.

Das Ausschließen des Effekts auf das ER sollte einerseits die Brefeldin A Daten unterstützen, andererseits unerwünschte Nebeneffekte minimieren. Bei UL49.5 handelt es sich um das luminal wirkende, TAP blockierende Peptid des bovinen Herpesvirus 1^{ref273}. Durch kovalentes Binden an Transferrin wurde dieser gezielt in die transferrinpositiven Endosomen von B-Zellen eingebracht. UL49.5-Transferrin konnte die B-Zellkreuzpräsentation hemmen, hatte aber keinen Einfluss auf die Präsentation von zytosolischem Protein oder von außen beladene Peptide. Da der TAP-Inhibitor einen schwachen Effekt zeigte, musste er während der gesamten Kultur im Medium sein. Dies hatte aber keinen Effekt auf die verwendeten T-Zellen, wie mit entsprechenden Kontrollen belegt werden konnte.

Der letzte Schritt in der Kette der Antigenpräsentation ist der Transport der beladenen MHC-Moleküle an die Zelloberfläche. Um hier stichfest nachzuweisen, dass MHC-I-Moleküle im Endosom mit Peptid beladen wurden und von dort direkt an die Oberfläche gelangen, wurde das Malariamedikament Primaquin eingesetzt. Primaquin wird allgemein als spezifischer Inhibitor für den Proteintransport aus Endosomen an die Zelloberfläche eingesetzt²⁷⁴.

Erstaunlicherweise zeigt Primaquin auf die B-Zellkreuzpräsentation einen gegenteiligen Effekt. Sie wird nicht nur nicht verringert, sondern erheblich erhöht. Diese Erhöhung ist weiterhin von Proteasomen abhängig und scheint somit vom selben Präsentationsweg abzuhängen. Diese widersprüchliche Wirkung kann durch mehrere Fakten zustande kommen. Zunächst handelt es sich bei dem Malariamedikament Primaquin keineswegs um einen spezifischen Inhibitor mit bekannter Wirkungsweise²⁷⁵. Bisher wurde unter anderem herausgefunden, dass Primaquin, wie das verwandte Chloroquin, den endo- und lysosomalen pH-Wert neutralisiert.

Dieser Effekt könnte schon einen positiven Einfluss auf die Kreuzpräsentation erklären, da weniger Antigen in den Klasse-II-Präsentationsweg gelangen könnte und somit mehr für die Kreuzpräsentation zur Verfügung stünde. Dagegen spricht allerdings, dass auch Chloroquin lysosomale Ansäuerung verhindert, es aber in der vorliegenden Studie keinen positiven Effekt auf die Kreuzpräsentation hatte. Außerdem sind Konzentrationen $> 150 \mu\text{M}$ notwendig, um die Ansäuerung effektiv zu verhindern²⁷⁶. Neben der Wirkung auf die Ansäuerung generiert Primaquin aber noch weitere Effekte. Van Weert *et al.* vermuten, dass der inhibitorische Effekt auf das Rezeptorrecycling durch den Einfluss von Primaquin auf Calmodulin hervorgerufen wird. Sie konnten ebenfalls beobachten, dass große endosomale Vakuolen nach Gabe von Primaquin entstehen²⁷⁷. Ob es auch zu einer Veränderung der endosomalen Strukturen in B-Zellen kommt, konnte in der vorliegenden Studie nicht untersucht werden, da dazu elektronenmikroskopische Analysen notwendig wären.

Eine Erklärung für die verbesserte Kreuzpräsentation von B-Zellen nach Primaquinbehandlung könnte die Tatsache sein, dass Primaquin zu einer Akkumulation von unbeladenen MHC-I-Molekülen in Endosomen führt²⁷⁸. Diese Akkumulation führt nach Entfernen von Primaquin aus der Kultur bereits nach einigen Minuten zu einem stark erhöhten und vor allem gleichzeitigen Rücktransport von MHC-I-Molekülen an die Zelloberfläche, wie auch hier beobachtet werden konnte. Gleichzeitig kann es durch Primaquin zu einer Ansammlung von undegradieren Proteinen in der Zelle kommen, die bis zu 24 h in der Zelle nachweisbar bleiben²⁷⁸. Es könnte also sein, dass in unfixierten B-Zellen mehr Proteine für die Kreuzpräsentation zur Verfügung stehen und außerdem MHC-I-Moleküle erst akkumulieren und dann gleichzeitig an die Oberfläche gebracht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde eine größere Menge von beladenen MHC-I-Molekülen auf der B-Zelloberfläche nach Primaquinbehandlung beobachtet. Das weist darauf hin, dass tatsächlich mehr MHC-I-Moleküle für die Beladung bereit stehen. Das Vorhandensein von undegradieren Proteinen scheint dagegen unwichtiger zu sein, da bereits 15- 30 Minuten nach Beladen erste beladene MHC-I-Komplexe zu detektieren sind und B-Zellkreuzpräsentation ein eher schnelles Phänomen zu sein scheint.

In unfixierten dendritischen Zellen konnte hier ein ähnlicher positiver Effekt von Primaquin nicht beobachtet werden. Möglicherweise spielt hier das wesentlich größere Zytosol und somit die größere Verteilung der Endosomen hier eine Rolle.

Zusammen genommen ergibt sich für die B-Zellkreuzpräsentation ein Modell, welches eine Mischung aus einem zytosolischen und einem endozytischen Kreuzpräsentationsweg zeigt (vgl. Abbildung V-1). Der Hauptteil der über den B-Zellrezeptor aufgenommenen Antigene wird klassisch über reifende, späte Endosomen und Lysosomen in die MHC-II-Präsentation eingebracht, aber ein anderer Teil kann in transferrinpositive frühe bzw. Recycling-Endosomen gelangen, aus denen sie über den Sec61-Komplex in das Zytosol der Zelle transportiert werden. Dort werden sie durch Proteasomen zu Peptiden degradiert, welche mit Hilfe des TAP-Transporters in Recycling-Endosomen reimportiert werden. In diesen werden MHC-I-Komplexe beladen, die an die Zelloberfläche gebracht und dort präsentiert werden.

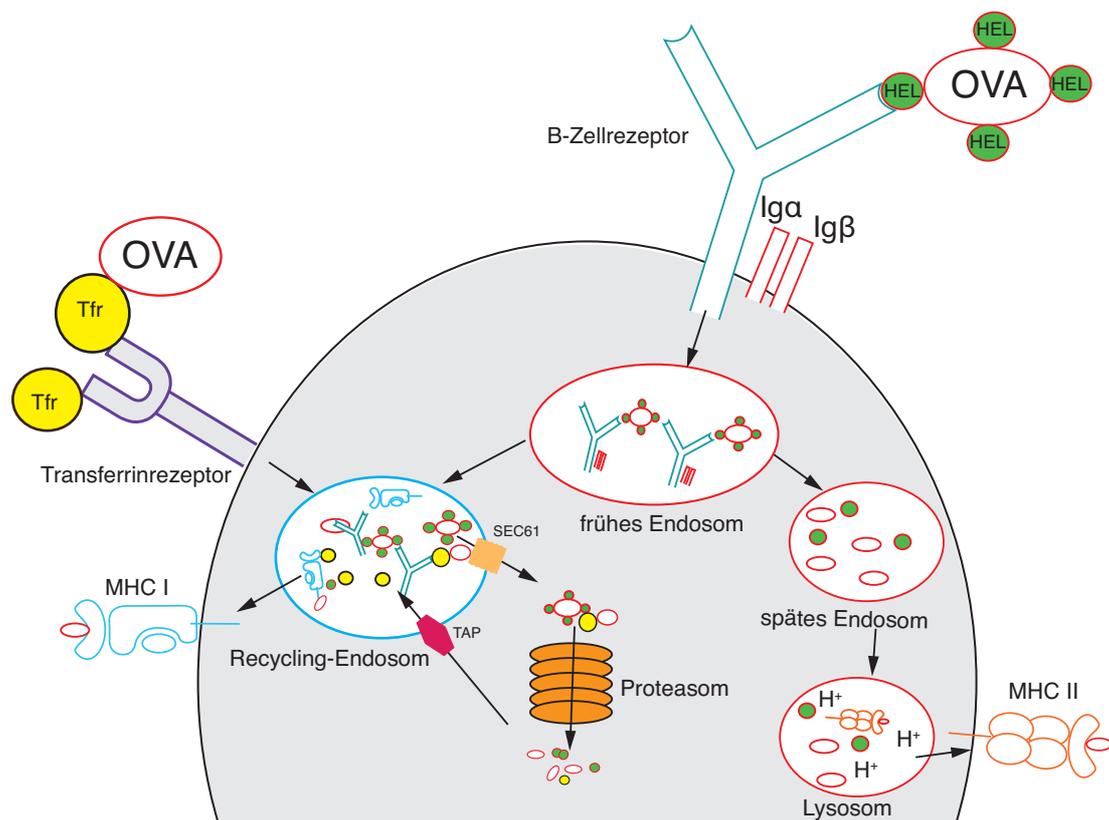


Abbildung V-1: Modell der B-Zellkreuzpräsentation

1.5 Etablierung einer B-Zellrezeptor-unabhängigen Kreuzpräsentation

Um B-Zellkreuzpräsentation *in vivo* weiter zu untersuchen oder diese für therapeutische Zwecke auszunutzen, wäre es nach bisherigem Erkenntnisstand notwendig, die Spezifität des B-Zellrezeptors zu kennen. Wesentlich besser wäre es, auch Wildtyp-B-Zellen für Untersuchungszwecke nutzen zu können. Da die Ergebnisse dieser Arbeit gezeigt haben, dass das essentielle Kreuzpräsentationskompartiment ein transferrinpositives, frühes Endosom ist, wurde in dieser Arbeit ein Ansatz gewählt, Antigen direkt über Transferrinrezeptoren aufnehmen zu lassen. Dies führte nur zur Kreuzpräsentation, wenn gleichzeitig der B-Zellrezeptor stimuliert wurde. Für *in vivo* Experimente kann dies sogar positiv sein, weil Transferrin auch von anderen Zellen aufgenommen werden kann, aber durch die anti-IgM Stimulierung nur B-Zellen aktiviert werden würden. Direktes Binden des Proteins an anti-IgM oder anti-IgG Antikörper wurde vermieden, da diese Komplexe auch über Fc-Rezeptoren anderer Zellen aufgenommen werden könnten.

De Wit *et al.* haben eine Rolle der Kreuzpräsentation in der Reaktivierung von Gedächtnis-T-Zellen vorgeschlagen²⁴⁷. Die Reaktivierung von Influenza-Gedächtniszellen scheint allerdings antikörpervermittelt und nicht kreuzpräsentationsabhängig zu sein²⁷⁹.

Mit Hilfe von Antigen-Transferrin Komplexen könnte nun die noch offene Frage adressiert werden, welche Rolle die B-Zellkreuzpräsentation *in vivo* tatsächlich einnimmt.

Eine andere interessante Weiterführung dieser Arbeit könnte darin liegen, zu ergründen, warum B-Zellrezeptorsignale notwendig sind, um die Kreuzpräsentationsfähigkeit der transferrinpositiven Endosomen herzustellen. Ein Denkansatz hierzu liegt in der TAP-Rekrutierung. In DC wurde bereits gezeigt, dass TLR4-Signaltransduktion notwendig ist, um die ER Komponenten der MHC-I-Beladungsmaschinerie an Endosomen zu rekrutieren²³⁴. In dieser Arbeit konnte konfokalmikroskopisch gezeigt werden, dass TAP erst nach B-Zellrezeptor-Engagement in Endosomen anfärbbar ist. Um TAP-Rekrutierung in B-Zellen detailliert zu untersuchen, sind aber noch einige Experimente notwendig. Eine große Hilfe wären transgene B-Zellen, in denen Reporter für TAP und endosomale Marker verwendet werden könnten, um die Rekrutierungsschritte in lebenden Zellen zu beobachten. Diese sollten am besten noch mit signalmoleküldefizienten Zellen kombiniert werden.

B-Zellrezeptorsignalwege und TLR-Signalwege ähneln und überkreuzen sich in einigen Schritten. Für den Klassenwechsel der Antikörper wurde bereits gezeigt, dass BCR- und TLR-Signale synergistisch über den nicht-kanonischen NFκB-Signalweg wirken²⁸⁰. Eine Rolle von NFκB2 in der Kreuzpräsentation von löslichem Antigen wurde auch schon in dendritischen Zellen beschrieben²⁸¹. Hier könnte also ein Zusammenhang zwischen notwendiger TLR 4-Aktivierung in DC und BCR-Aktivierung in B-Zellen bestehen.

Gleichzeitig könnte das auch bedeuten, dass auch TLR-Liganden in der Lage sind, B-Zellkreuzpräsentation zu initialisieren. Für die vorgeschlagenen *in vivo* Experimente wäre das allerdings nicht sehr attraktiv, weil damit auch andere Zellen aktiviert werden würden.

Insgesamt konnten in dieser Arbeit die grundlegenden Mechanismen der B-Zellkreuzpräsentation aufgedeckt und verifiziert werden. Die gewonnenen Erkenntnisse eröffnen neue Möglichkeiten, B-Zellen gezielt Antigene kreuzpräsentieren zu lassen und unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen.

2 Induktion von CTL-Kreuztoleranz im renalen Lymphknoten durch Batf3-abhängige DC

Zytotoxische CD8⁺ T-Zellen sind für die Elimination intrazellulärer Pathogene essentiell⁴. Ihre hohe Zytotoxizität kann, wenn sie sich gegen Selbst richten, jedoch auch in Autoimmunerkrankungen und Organzerstörung enden.

Damit autoreaktive CD8⁺ T-Zellen nicht in die Peripherie entlassen werden, findet im Thymus bereits bei der Generierung von T-Zellen eine Selektion statt. Da harmlose Nahrungsantigene jedoch nicht im Thymus exprimiert werden, entkommen einige potentiell autoreaktive CD8⁺ T-Zellen diesem ersten Kontrollpunkt. Um auch diese Zellen abzuschalten, müssen APC in den sekundären lymphoiden Organen Antigene aus dem Gewebe unter tolerisierenden Bedingungen präsentieren. Dieser Mechanismus wird Kreuztoleranz genannt.

Neben Leber und Milz ist die Niere ein Organ, durch das ständig ein hoher Durchsatz an harmlosen, zirkulierenden Antigenen stattfindet. Die spezielle Anatomie der Niere führt zu einer Anreicherung kleinmolekularer Antigene in den Tubulusepithelzellen^{133, 134} und zu einer rapiden Akkumulation dieser Proteine in den Nierenlymphknoten.

Lukacs-Kornek *et al.* konnten zeigen, dass CD8⁺ T-Zellen mit Spezifität gegen harmlose zirkulierende Nahrungsantigene in der Niere und dem zugehörigen Nierenlymphknoten eine verkürzte Lebensspanne haben⁴³. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die verkürzte Lebensspanne Resultat von aktivem Zelltod ist, der über eine PD-1-PD-L1 Interaktion zwischen CD8⁺ T-Zellen und Batf3-abhängigen dendritischen Zellen vermittelt wird. Dieser Mechanismus ist einzigartig für die Niere und den Nierenlymphknoten, da Toleranzinduktion gegen zirkulierende Antigene in der Milz weder Batf3-abhängige DC noch PD-1 Ligation erforderte.

2.1 Rolle der verschiedenen DC-Unterarten in der Kreuztoleranz

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Batf3-abhängige dendritische Zellen für die Toleranzinduktion im renalen Lymphknoten notwendig und ausreichend sind. Diese DC konnten weiter durch die Expression von CD11c, CD8 und XCR1 sowie das Fehlen von CD11b charakterisiert werden. Diese Markerkombination ist von Bachem *et al.* für lymphknotenresidente DC bereits beschrieben, aber nicht mit Kreuztoleranz in Zusammenhang gebracht worden⁹⁵.

CD8⁺ dendritischen Zellen wurde bereits 2002 von Belz und Kollegen die Induktion peripherer Selbsttoleranz im pankreatischen Lymphknoten gegen gewebeassoziierte Antigene zugesprochen²⁸².

Im gleichen Jahr erschienen Studien, die gezeigt haben, dass CD8⁺ DC sterbende Zellen endozytieren und Teile von diesen kreuzpräsentieren können^{240, 283}. Die Kreuzpräsentation apoptotischer Zellen führte in diesen Studien erst zu einer Proliferation von T-Zellen, die dann aber in Deletion resultierte²⁸⁴. Kreuwel *et al.* konnten nachweisen, dass im pankreatischen Lymphknoten sogar CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen peripherer Toleranz unterliegen, wenn sie dort auf kreuzpräsentierende DC treffen²⁸⁵.

Während CD8⁺ DC also im Zusammenhang mit Kreuztoleranz schon beschrieben worden sind, gibt es noch keine Berichte, die Batf3-abhängige DC damit in Verbindung bringen. Bisher wurden Batf3-abhängige DC ausschließlich im Zusammenhang immunogener Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen erwähnt. Als besonders kritisch sind sie für anti-virale Immunantworten genannt worden⁹³. Auch der Chemokinrezeptor XCR1, der mit der Unterart der kreuzpräsentierenden, Batf3-abhängigen CD8⁺ DC korreliert, wurde nicht für Kreuztoleranz induzierende DC beschrieben. Diese Arbeit ist die erste, in der ein Zusammenhang zwischen Toleranz induzierenden CD8⁺ DC, dem Transkriptionsfaktor Batf3 und der Expression von XCR1 hergestellt werden konnte.

2.2 Spezielle Rolle des renalen Lymphknotens

Es konnte gezeigt werden, dass in bestimmten Dosisbereichen kleinmolekulare, zirkulierende Antigene ausschließlich im renalen Lymphknoten und der Milz akkumulieren⁴³. Eine Anreicherung in anderen Lymphknoten findet erst bei höheren Dosen statt⁴³.

Systemisches Antigen kann über die Lymphe oder zellvermittelt transportiert werden²⁸⁶⁻²⁸⁸. Während Lymphknoten an afferente Lymphgefäße angeschlossen sind, kann die Milz Antigene direkt aus dem Blut filtrieren. Die schnelle Anreicherung von kleinmolekularen Antigenen im renalen Lymphknoten lässt eher auf direkten Transport über die Lymphe schließen.

Bisher gab es noch keinen visuellen Nachweis, dass kleinmolekulare Antigene aus der Niere tatsächlich zellunabhängig in renale Lymphknoten gelangen können. Lukacs-Kornek *et al.* konnten allerdings zeigen, dass eine Nephrektomie kurz nach Antigeninjektion den Transport von OVA in den renalen Lymphknoten nicht beeinflusst⁴³. Auch renale Lymphknoten-DC aus CCR7-defizienten Mäusen zeigten 5 Min. nach Injektion eine hohe OVA-Aufnahme. Dies lässt darauf schließen, dass der Antigentransport nicht über DC-Migration vermittelt ist.

Weitere Studien, auf welchem Weg Antigene aus der Niere in den renalen Lymphknoten gelangen, wären sicher interessant. Auch die Frage, wo genau diese Antigene aus den dichten Strukturen des Tubulussystems austreten können, ist ebenfalls noch offen.

Die Aussage der vorliegenden Arbeit, dass kleinemolekulare Antigene von CD11c⁺ CD8⁺ Batf3-abhängigen DC tolerogen kreuzpräsentiert werden, bleibt davon allerdings unbeeinflusst.

Hier wurde besonders gezeigt, dass die spezifische Aufkonzentration von kleinemolekularen Antigenen in den Nierenlymphknoten und der Milz stattfindet. Während aber im Nierenlymphknoten die Population antigenaufnehmender, kreuzpräsentierender DC durch eine distinkte PD-L1 Expression charakterisiert werden kann, konnte diese in der Milz nicht gefunden werden.

In anderen Lymphknoten wurde bereits gezeigt, dass die vorhandenen Stromazellen zur Toleranzinduktion fähig sind²⁸⁹. Möglicherweise sind diese zusätzlichen Mechanismen bei geringeren Antigenkonzentrationen notwendig. Es wäre interessant zu untersuchen, ob bei entsprechender Antigendosis oder Applikationsmethode in anderen peripheren Lymphknoten vergleichbare Mechanismen wie im renalen Lymphknoten greifen. Auch die absolute Bedeutung der Toleranzinduktion im jeweils drainierenden Lymphknoten im Vergleich zur Toleranzinduktion in der Milz wäre hochinteressant und könnte mit Hilfe von Splenektomie und verschieden applizierten Antigenen adressiert werden.

2.3 Induktion der Kreuztoleranz über PD-L1

Die Funktion von PD-1 und seinen Liganden in der Induktion und Aufrechterhaltung von T-Zelltoleranz wurde bereits ausführlich beschrieben¹⁵². In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass die Interaktion zwischen PD-1 und PD-L1, aber nicht die Interaktion zwischen PD-1 und PD-L2 für die Toleranzinduktion im renalen Lymphknoten verantwortlich ist. Die Blockade von PD-L1 alleine führte zu einer verminderten Apoptoserate und erhöhten Zytokinproduktion im renalen Lymphknoten, während die Blockade von PD-L2 keinen Effekt hatte. Dass PD-L1 alleiniger Regulator peripherer Toleranz sein kann, wurde in verschiedenen Studien bereits nachgewiesen. Im Mausmodell für Typ I Diabetes ist PD-L1 vermittelte Regulation autoreaktiver T-Zellen im pankreatischen Lymphknoten in der Aktivierungsphase der T-Zellen kritisch²⁹⁰. Nach Krankheitsbeginn exprimieren β -Zellen des Pankreas verstärkt PD-L1, wodurch zunächst Organschäden eingedämmt werden^{291, 292}.

Wird PD-L1 während der Aktivierungsphase auf den β -Zellen blockiert, so kommt es zu raschem Fortschreiten der Zerstörung der β -Zellen. Im Kollagen-induzierten Arthritismodell führt PD-1-Vernetzung mit PD-L1-Ig zu einer Verbesserung des Krankheitsbildes²⁹³. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass PD-L1, aber nicht PD-L2 in der Aufrechterhaltung der feto-maternalen Toleranz während Schwangerschaften beteiligt ist²⁹⁴. PD-L2, aber nicht PD-L1 wirkt an der oralen Toleranzinduktion mit²⁹⁵.

Auch bei allergischen oder asthmatischen Reaktionen der Atemwege nimmt PD-L2 Anteil^{296, 297}. Während PD-L1 also weitgehend mit Toleranz gegen Selbst-Antigene assoziiert ist, wird PD-L2 eine Aufgabe in der Toleranzinduktion gegen Umgebungsantigene zugeschrieben. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse weisen darauf hin, dass für die Niere bzw. den Nierenlymphknoten die Toleranzmechanismen gegen Selbst- und nicht gegen Umgebungsantigene greifen. Da die Niere keinen direkten Kontakt zur Außenwelt hat, wie der Gastrointestinaltrakt oder die Lunge, sondern Blutbestandteile filtriert, ist das kein widersprüchliches Ergebnis.

Publikationen über die molekularen Funktionsweisen von PD-L1 und PD-L2 haben gezeigt, dass PD-L2 eine höhere Affinität zu PD-1 hat und stärker für die Rekrutierung von PD-1 zur immunologischen Synapse zuständig ist¹⁶⁶. Die Interaktion von PD-1 und PD-L1 dagegen kann zur Aktivierung des pro-apoptischen Moleküls Bim und damit zum Zelltod führen²⁹⁸.

Diese Funktionsweise spiegelt sich in den in dieser Arbeit erhobenen Daten wider. Es besteht die Möglichkeit, dass der blockierende PD-L1 Antikörper nicht nur PD-L1-PD-1 Interaktion, sondern auch eine PD-L1-B7-1 Interaktion inhibiert und die beobachteten Effekte dadurch zu Stande kommen¹⁵². In der vorliegenden Studie wurden neben blockierenden Antikörpern für die Liganden auch PD-1-defiziente Mäuse verwendet. Da Experimente mit diesen PD-1^{-/-}-Mäusen und blockierenden Antikörpern vergleichbare Ergebnisse geliefert haben, scheinen diese allein durch die PD-L1-PD-1 Interaktion bedingt zu sein.

Goldberg *et al.* konnten zeigen, dass die alleinige Blockade von PD-L1 mit erhöhter Zytotoxizität von CD8 T-Zellen einhergeht¹⁵⁴. In der vorliegenden Studie konnte weder die PD-L1- noch die PD-L2- oder kombinierte Blockade die lytischen Eigenschaften CD8⁺ T-Zellen verbessern. Die Diskrepanz könnte auf Unterschiede in den betrachteten Zeitpunkten, der Antigen dosis oder dem anderen genetischen Hintergrund der verwendeten Mauslinien zurückzuführen sein. Die Schlussfolgerung von Goldberg *et al.*, dass PD-L1 Blockade beim ersten Antigenkontakt das Schicksal der T-Zellen entscheidet, trifft aber auch auf die vorliegende Studie zu.

In dieser Arbeit wurde im renalen Lymphknoten eine Toleranzinduktion durch Deletion und nicht durch funktionelle Anergie beobachtet. Die zusätzliche funktionelle Einschränkung der CD8⁺ T-Zellen könnte über andere Interaktionen, z.B. mit CTLA-4, herbeigeführt werden. Dass zusätzliche Mechanismen an der Toleranzinduktion gegen kleinmolekulare, zirkulierende Antigene operativ sind, zeigt sich auch in der Milz. Blockade des PD-1-Signalwegs durch Antikörper oder "knock-out" Modelle zeigte keinerlei Effekt auf die Deletion potentiell autoreaktiver T-Zellen in der Milz. Zwar war in PD-1-"knock-out"-T-Zellen aus der Milz die Zytokinproduktion erhöht, aber die Zahl überlebender Zellen wurde nicht gesteigert. Die Deletion der T-Zellen in der Milz scheint nicht von früh induzierter Apoptose abzuhängen. Insgesamt ist die Rate apoptotischer CD8⁺ T-Zellen in der Milz nach 18 Stunden sehr niedrig. Dass zu diesem frühen Zeitpunkt bereits ein Großteil der apoptotischen Zellen aus der Milz durch phagozytierende Zellen abgeräumt wurde, ist unwahrscheinlich. In dieser Studie wurde die Anzahl lebender Zellen ein Tag nach OVA-Injektion vor dem sekundären Transfer durchflusszytometrisch bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt waren noch zahlreiche lebende, proliferierende CD8⁺ T-Zellen in der Milz vorhanden. Die Deletion dieser Zellen fand erst nach dem zweiten Transfer statt. Welche Zellen und welche Moleküle an der Toleranzinduktion in der Milz beteiligt sind, bleibt zu klären. Ein Erklärungsansatz für die Unterschiede zwischen renalem Lymphknoten und Milz ist die distinkte Expression von PD-L1 auf Batf3-abhängigen DC. Der vorliegende Report ist der erste, in dem PD-L1 Expression mit dieser Art kreuzpräsentierender DC korreliert wird. Interessanterweise ist die PD-L1 Expression auf Batf3⁺ DC nur im renalen Lymphknoten, nicht aber in der Milz zu sehen. Dies könnte auf eine spezialisierte Rolle für die Toleranzinduktion der kreuzpräsentierenden DC im renalen Lymphknoten hindeuten. Batf3⁺ DC in der Milz exprimieren diese inhibitorischen Moleküle nicht und könnten daher, wie beschrieben, eine stärkere Funktion für die Kreuzaktivierung von CD8⁺ T-Zellen haben⁹³. In der Milz könnten andere Zellen Toleranz induzieren. Eine auf Toleranzinduktion spezialisierte Zellart sind regulatorische T-Zellen (T_{regs})²⁹⁹.

Da in der vorliegenden Arbeit vollständige Organsuspensionen transferiert wurden, könnten Tregs mit in die zweiten Empfängermäuse transferiert worden sein und dort CD8⁺ T-Zellen eliminiert haben. Eine *de novo* Generierung von T_{regs} ist über den kurzen Zeitraum aber eher unwahrscheinlich. Die Applikation von OVA müsste somit schon vorhandene Tregs aktivieren. Im murinen Modell für Multiple Sklerose wurde gezeigt, dass CD11c⁺ CD11b⁺ dendritische Zellen in der Milz nach intravenöser Antigenapplikation IL-10 produzieren und Tregs induzieren können²¹³. Dieser Mechanismus führte zu Toleranz und einem verbesserten Krankheitsbild. Die durchgeführten Versuche bezogen sich auf einen Zeitraum von 21 Tagen. Ob der PD-L1-unabhängige Toleranzmechanismus in der Milz T_{reg}-vermittelt ist, müsste noch genauer untersucht werden.

Dass T_{regs} auch eine Rolle in der Toleranzinduktion im renalen Lymphknoten spielen könnten, wurde nicht formell ausgeschlossen, ist aber unwahrscheinlich. Auch hier gilt, wie in der Milz, dass der gemessene Zeitraum von 18 h bis zur Apoptoseinduktion relativ kurz gefasst war, so dass eine Generierung von T_{regs} eher auszuschließen ist. Eine Aktivierung natürlich vorkommender T_{regs} wäre theoretisch möglich, wird durch die Ergebnisse der Chimärenexperimente aber in Frage gestellt. Die Apoptoseinduktion müsste hier im Gegensatz zur Milz PD-L1-vermittelt sein, da Blockade von PD-L1 die Apoptoseinduktion aufhebt. Die Knochenmarkchimären haben allerdings gezeigt, dass PD-L1 im renalen Lymphknoten ausschließlich auf Batf3-abhängigen Zellen wichtig ist. Die Möglichkeit, dass PD-L1 auf Batf3-abhängigen DC mit T_{regs} interagiert, die wiederum $CD8^+$ T-Zellen über PD-1 tolerisieren, ist dadurch auch eher unwahrscheinlich. In diesem hypothetischen Szenario müssten PD-L1⁺ DC mit T_{regs} interagieren, die wiederum weder PD-L1 noch PD-L2 benötigen dürften, um $CD8^+$ T-Zellen PD-1 vermittelt zu supprimieren. Ein indirekter Einfluss von T_{regs} über die DC in der Aktivierungsphase wird ebenfalls durch die Knochenmarkchimären ausgeschlossen. In den chimären Tieren sollten in jeder Gruppe natürlich vorkommende, PD-L1-kompetente T_{regs} vorhanden sein. Trotzdem gab es Unterschiede in der Apoptoseinduktion zwischen den Batf3^{-/-}/Wildtyp und Batf3^{-/-}/PD-L1^{-/-} Chimären.

Zusammenfassend konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass Batf3-abhängige DC im renalen Lymphknoten $CD8^+$ T-Zellen PD-L1-abhängig tolerisieren. Dieser Mechanismus greift nicht in der Milz und ist -innerhalb bestimmter Dosisbereiche- einzigartig für den renalen Lymphknoten.

2.4 Klinische Relevanz der Ergebnisse

Während fehlende Interaktion von toleranzvermittelnden Molekülen zu Autoimmunität führen können, nutzen Tumore und einige Pathogene diesen Mechanismus für sich, um eine Immunantwort zu umgehen. Viele Tumore verhindern eine Abstoßung durch Expression von PD-L1^{300, 301}. Patienten, in denen PD-L1⁺-Tumore diagnostiziert wurden, haben somit schlechtere Prognosen³⁰². Auch viele chronische Infektionen, wie z.B. LCMV und HIV, werden nicht geklärt, da durch ständige Stimulation der spezifischen T-Zellen PD-1 hochreguliert wird und sie darüber unfunktionell werden^{303, 304}. Andererseits können PD-1-defiziente $CD8^+$ T-Zellen Infektionen schneller klären, richten dabei aber zum Teil erhebliche Organschäden an³⁰³.

Im breiten Feld der Krebstherapie wurden bereits in klinischen Studien PD-L1- und PD-1-blockierende Antikörper eingesetzt, um nicht mehr behandelbare Tumore zu therapieren^{305, 306}, oder chronische Hepatitis zu behandeln (US ClinicalTrials.gov; identifier NCT00703469). In einigen Fällen führte dies auch zu einer Verkleinerung des Tumors oder zum Wachstumsstopp, aber nicht in allen Fällen konnten Erfolge verzeichnet werden. Einige Patienten entwickelten im Zuge der Therapie Autoimmunerkrankungen, die mit PD-1/PD-L1 Blockade assoziiert sind. Die Ergebnisse zu Behandlungserfolgen bei chronischer Hepatitis stehen noch aus. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Toleranz gegen kleinmolekulare, zirkulierende Antigene durch PD-L1-Blockade nicht systemisch gebrochen wird, so lange die Milz intakt bleibt. Dies kann einerseits protektiv gegen Autoimmunerkrankungen als Nebeneffekt der PD-L1-Behandlung wirken, andererseits könnte der Behandlungserfolg bei Vorhandensein kleiner zirkulierender Tumorantigene beeinträchtigt werden. Bei gesunden Menschen kann der gezeigte Toleranzmechanismus eine Rolle in der Toleranz gegen kleine, nicht im Thymus exprimierte Antigene, wie z.B. Nahrungsantigene oder Hormone, spielen. Ob dies auch eine Rolle in der Induktion von Toleranz gegen Tumorantigene impliziert, muss noch gezeigt werden. Des Weiteren ist unbekannt, ob inflammatorische Nierenerkrankungen auf ein Versagen der Toleranzinduktion gegen Autoantigene im renalen Lymphknoten zurückzuführen sein können.

Zusammengefasst hängt die Toleranzinduktion vom Organ, aber auch von Faktoren wie der Natur oder Menge des Antigens ab. Diese Arbeit konnte einen Beitrag zum besseren Verständnis der Toleranzmechanismen gegen kleine, zirkulierende Antigene leisten. Ein umfassendes Verständnis der einzelnen Schritte der Toleranzinduktion ist für effektive und nebenwirkungsarme Krebs- oder Autoimmunerkrankungstherapien notwendig.

In der vorliegenden Arbeit konnten somit sowohl wichtige zellbiologische Mechanismen der Kreuzpräsentation aufgeklärt werden als auch eine Rolle kreuzpräsentierender Zellen in der peripheren Toleranzinduktion gezeigt werden. Die vorliegenden Ergebnisse haben ein Puzzlestück zum Verständnis der Antigenkreuzpräsentation und ihrer Bedeutung *in vivo* hinzugefügt.

VI Zusammenfassung

Ein Schlüsselwerkzeug zur Aktivierung und Tolerisierung zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen ist die Kreuzpräsentation. Die Aufklärung zellulärer und molekularer Mechanismen der Kreuzpräsentation und ihrer Folgen ist notwendig, um Erkrankungen durch fehlgeleitete CD8⁺ T-Zellantworten besser zu verstehen und therapieren zu können.

Im ersten Teil der Arbeit wurden die zellulären Mechanismen der B-Zellkreuzpräsentation mit Hilfe B-Zellrezeptor-transgener B-Zellen näher untersucht. Zunächst konnte über den B-Zellrezeptor aufgenommenes Antigen in frühendosomalen, EEA-1⁺ Transferrin⁺ Kompartimenten detektiert werden, von wo es über den Sec61-Komplex in das Zytosol der B-Zelle transloziert wurde. Nach proteasomaler Degradierung zu Peptiden konnten diese über den Transporter TAP zurück in sog. Recycling-Endosomen gelangen, wo die MHC-I-Beladung stattfand. Das Wissen über die Transportwege der B-Zellkreuzpräsentation wurde dazu genutzt, Antigene unabhängig vom B-Zellrezeptor in Recycling-Endosomen einzuschleusen und nach separater B-Zellrezeptorstimulation kreuzpräsentieren zu lassen. Dabei konnte gezeigt werden, dass B-Zellkreuzpräsentation und möglicherweise die Rekrutierung der dazu nötigen ER-Komponenten zu den entsprechenden Kompartimenten vom B-Zellrezeptorsignal abhängt. Diese neuen Erkenntnisse über die Mechanismen ermöglichen zukünftige Untersuchungen der B-Zellkreuzpräsentation in Wildtyp-B-Zellen und die Aufklärung ihrer Bedeutung *in vivo*.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein peripherer Kreuztoleranzmechanismus aufgeschlüsselt. Kleinmolekulare, zirkulierende Antigene wurden in der Niere konstitutiv filtrierte und aufkonzentriert, im renalen Lymphknoten von residenten dendritischen Zellen aufgenommen und tolerogen an zytotoxische T-Zellen präsentiert. Hier wurde gezeigt, dass CD8⁺ T-Zellkreuztoleranz im renalen Lymphknoten, aber nicht in der Milz von CD8⁺ XCR1⁺ dendritischen Zellen induziert wurde, die vom Transkriptionsfaktor Batf3 abhängig waren und unter homöostatischen Bedingungen das koinhibitorische Oberflächenmolekül PD-L1 exprimierten. Transferexperimente konnten zeigen, dass PD-1-kompetente CD8⁺ T-Zellen im renalen Lymphknoten eine verkürzte Lebensspanne aufwiesen, während PD-1^{-/-} CD8⁺ T-Zellen nicht deletiert wurden. Mit Hilfe von Knochenmarkchimären wurde nachgewiesen, dass tatsächlich PD-L1 auf Batf3-abhängigen DC für die Kreuztoleranzinduktion im renalen Lymphknoten verantwortlich ist, während in der Milz andere Mechanismen funktionell sind. Zusammenfassend wurde damit die einzigartige Rolle des Nieren-Nierenlymphknotensystems in der Immunhomöostase demonstriert und die zu Grunde liegenden zellulären und molekularen Mechanismen der CD8⁺ T-Zelltoleranz im renalen Lymphknoten aufgeklärt.

VII Abstract

A key tool for activation and tolerisation of CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes is cross-presentation. The cellular and molecular mechanisms of cross-presentation and its consequences have to be elucidated for better understanding and treatment of erroneous T cell responses.

The focus of the first part of this work was on investigating the cellular mechanisms of B cell cross-presentation with the help of B cell receptor transgenic B cells. Antigen taken up by the B cell receptor could be detected in EEA-1⁺ Transferrin⁺ early endosomes and was subsequently translocated into the cytoplasm via the Sec61 complex. After proteasomal degradation of the antigen the generated peptides were reintroduced into recycling endosomes by the transporter TAP and presented on MHC I. The knowledge about antigen routing for B cell cross-presentation enabled me to induce cross-presentation through B cell receptor stimulation after B cell receptor independent antigen uptake. Thereby I could demonstrate that B cell cross-presentation and possibly the recruitment of the required ER components to recycling endosomes is B cell receptor signaling dependent. These findings are important for future studies of cross-presentation in wildtype B cells and its *in vivo* relevance.

The second part of my work unraveled a new peripheral cross-tolerance mechanism. Circulating antigens below albumin molecular size were constitutively filtered and concentrated in the kidney, reached the renal lymph node by bulk drainage, were taken up by renal lymph node resident dendritic cells and were presented to cytotoxic T cells in a tolerogenic fashion. Here I demonstrated that dendritic cells of the CD8⁺ XCR1⁺ subset, which depend on the transcription factor Batf3, mediated CD8⁺ T cell cross-tolerance in the renal lymph node, but not in the spleen. Batf3-dependent renal lymph node DC expressed the co-inhibitory cell surface molecule PD-L1 under homeostatic conditions and induced apoptosis in PD-1 competent CD8⁺ T cells in the renal lymph node, while PD-1 deficient CD8⁺ T cells were not impaired. With mixed bone marrow chimeras I verified that PD-L1 on Batf3 dependent DC was responsible for cross-tolerance induction in the renal lymph node, while other mechanisms operated in the spleen. These results clarified the cellular and molecular mechanisms underlying a novel immune-homeostatic role and showed that it is unique to the kidney-renal lymph node system.

VIII Referenzen

1. Janeway, C.A., Jr. How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect* 3, 1167-71 (2001).
2. Doherty, P.C. & Zinkernagel, R.M. T-cell-mediated immunopathology in viral infections. *Transplant Rev* 19, 89-120 (1974).
3. Murphy, K. et al. Janeway Immunologie (ed. Janeway, C.) (Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, 2009).
4. Harty, J.T., Tvinnereim, A.R. & White, D.W. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu Rev Immunol* 18, 275-308 (2000).
5. Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F. & Weissman, I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-11 (2001).
6. Kondo, M., Weissman, I.L. & Akashi, K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91, 661-72 (1997).
7. Bell, J.J. & Bhandoola, A. The earliest thymic progenitors for T cells possess myeloid lineage potential. *Nature* 452, 764-7 (2008).
8. Wada, H. et al. Adult T-cell progenitors retain myeloid potential. *Nature* 452, 768-72 (2008).
9. Koch, U. & Radtke, F. Mechanisms of T cell development and transformation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27, 539-62 (2011).
10. Sleckman, B.P. Lymphocyte antigen receptor gene assembly: multiple layers of regulation. *Immunol Res* 32, 253-8 (2005).
11. Baldwin, T.A., Hogquist, K.A. & Jameson, S.C. The fourth way? Harnessing aggressive tendencies in the thymus. *J Immunol* 173, 6515-20 (2004).
12. Peterson, P., Org, T. & Rebane, A. Transcriptional regulation by AIRE: molecular mechanisms of central tolerance. *Nat Rev Immunol* 8, 948-57 (2008).
13. Germain, R.N. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* 2, 309-22 (2002).
14. Germain, R.N. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 76, 287-99 (1994).
15. Butz, E.A. & Bevan, M.J. Massive expansion of antigen-specific CD8+ T cells during an acute virus infection. *Immunity* 8, 167-75 (1998).
16. Murali-Krishna, K. et al. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* 8, 177-87 (1998).
17. Berke, G. The CTL's kiss of death. *Cell* 81, 9-12 (1995).
18. Shresta, S., Pham, C.T., Thomas, D.A., Graubert, T.A. & Ley, T.J. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr Opin Immunol* 10, 581-7 (1998).
19. Heusel, J.W., Wesselschmidt, R.L., Shresta, S., Russell, J.H. & Ley, T.J. Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* 76, 977-87 (1994).

20. Ebnet, K. et al. Granzyme A-deficient mice retain potent cell-mediated cytotoxicity. *EMBO J* 14, 4230-9 (1995).
21. Harty, J.T. & Bevan, M.J. Responses of CD8(+) T cells to intracellular bacteria. *Curr Opin Immunol* 11, 89-93 (1999).
22. Ordway, D. et al. XCL1 (lymphotactin) chemokine produced by activated CD8 T cells during the chronic stage of infection with *Mycobacterium tuberculosis* negatively affects production of IFN-gamma by CD4 T cells and participates in granuloma stability. *J Leukoc Biol* 82, 1221-9 (2007).
23. Cocchi, F. et al. Higher macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta levels from CD8+ T cells are associated with asymptomatic HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13812-7 (2000).
24. Stenger, S. et al. Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. *Science* 276, 1684-7 (1997).
25. Stenger, S. et al. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 282, 121-5 (1998).
26. Redmond, W.L. & Sherman, L.A. Peripheral tolerance of CD8 T lymphocytes. *Immunity* 22, 275-84 (2005).
27. Ohashi, P.S. et al. Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice. *Cell* 65, 305-17 (1991).
28. Schwartz, R.H. T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 21, 305-34 (2003).
29. Redmond, W.L., Hernandez, J. & Sherman, L.A. Deletion of naive CD8 T cells requires persistent antigen and is not programmed by an initial signal from the tolerogenic APC. *J Immunol* 171, 6349-54 (2003).
30. Hernandez, J., Aung, S., Redmond, W.L. & Sherman, L.A. Phenotypic and functional analysis of CD8(+) T cells undergoing peripheral deletion in response to cross-presentation of self-antigen. *J Exp Med* 194, 707-17 (2001).
31. Choi, S. & Schwartz, R.H. Molecular mechanisms for adaptive tolerance and other T cell anergy models. *Semin Immunol* 19, 140-52 (2007).
32. Williams, M.A. & Bevan, M.J. Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol* 25, 171-92 (2007).
33. Kaech, S.M., Hemby, S., Kersh, E. & Ahmed, R. Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell* 111, 837-51 (2002).
34. Kaech, S.M., Wherry, E.J. & Ahmed, R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 2, 251-62 (2002).
35. Wherry, E.J., Barber, D.L., Kaech, S.M., Blattman, J.N. & Ahmed, R. Antigen-independent memory CD8 T cells do not develop during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16004-9 (2004).
36. Shin, H. & Wherry, E.J. CD8 T cell dysfunction during chronic viral infection. *Curr Opin Immunol* 19, 408-15 (2007).

37. Fuller, M.J., Khanolkar, A., Tebo, A.E. & Zajac, A.J. Maintenance, loss, and resurgence of T cell responses during acute, protracted, and chronic viral infections. *J Immunol* 172, 4204-14 (2004).
38. Parish, I.A. & Kaech, S.M. Diversity in CD8(+) T cell differentiation. *Curr Opin Immunol* 21, 291-7 (2009).
39. Li, M. et al. Cell-associated ovalbumin is cross-presented much more efficiently than soluble ovalbumin in vivo. *J Immunol* 166, 6099-103 (2001).
40. Gutgemann, I., Darling, J.M., Greenberg, H.B., Davis, M.M. & Chien, Y.H. A blood-borne antigen induces rapid T-B cell contact: a potential mechanism for tolerance induction. *Immunology* 107, 420-5 (2002).
41. Nolte, M.A. et al. A conduit system distributes chemokines and small blood-borne molecules through the splenic white pulp. *J Exp Med* 198, 505-12 (2003).
42. Limmer, A. et al. Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med* 6, 1348-54 (2000).
43. Lukacs-Kornek, V. et al. The kidney-renal lymph node-system contributes to cross-tolerance against innocuous circulating antigen. *J Immunol* 180, 706-15 (2008).
44. Constant, S., Schweitzer, N., West, J., Ranney, P. & Bottomly, K. B lymphocytes can be competent antigen-presenting cells for priming CD4+ T cells to protein antigens in vivo. *J Immunol* 155, 3734-41 (1995).
45. Cassell, D.J. & Schwartz, R.H. A quantitative analysis of antigen-presenting cell function: activated B cells stimulate naive CD4 T cells but are inferior to dendritic cells in providing costimulation. *J Exp Med* 180, 1829-40 (1994).
46. Ke, Y. & Kapp, J.A. Exogenous antigens gain access to the major histocompatibility complex class I processing pathway in B cells by receptor-mediated uptake. *J Exp Med* 184, 1179-84 (1996).
47. Janeway, K.M.W.a.t.C., Travers, P., Walport, M. & Murphy, K.P. Janeway's immunobiology (eds. Janeway, C., Travers, P. & Walport, M.) (Garland Science, London [u.a.], 2012).
48. Abbas, A.K. et al. Cellular and molecular immunology (Elsevier Saunders, Philadelphia, 2012).
49. Rolink, A. & Melchers, F. B-cell development in the mouse. *Immunol Lett* 54, 157-61 (1996).
50. Rolink, A.G. et al. B cell development in the mouse from early progenitors to mature B cells. *Immunol Lett* 68, 89-93 (1999).
51. LeBien, T.W. Fates of human B-cell precursors. *Blood* 96, 9-23 (2000).
52. LeBien, T.W. & Tedder, T.F. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 112, 1570-80 (2008).
53. Howard, J.C., Hunt, S.V. & Gowans, J.L. Identification of marrow-derived and thymus-derived small lymphocytes in the lymphoid tissue and thoracic duct lymph of normal rats. *J Exp Med* 135, 200-19 (1972).
54. Nieuwenhuis, P. & Ford, W.L. Comparative migration of B- and T-Lymphocytes in the rat spleen and lymph nodes. *Cell Immunol* 23, 254-67 (1976).

55. Hargreaves, D.C. et al. A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J Exp Med* 194, 45-56 (2001).
56. Youngman, K.R. et al. Correlation of tissue distribution, developmental phenotype, and intestinal homing receptor expression of antigen-specific B cells during the murine anti-rotavirus immune response. *J Immunol* 168, 2173-81 (2002).
57. Neuberger, M.S. et al. The mouse B-cell antigen receptor: definition and assembly of the core receptor of the five immunoglobulin isotypes. *Immunol Rev* 132, 147-61 (1993).
58. Ogden, C.A., Kowalewski, R., Peng, Y., Montenegro, V. & Elkon, K.B. IGM is required for efficient complement mediated phagocytosis of apoptotic cells in vivo. *Autoimmunity* 38, 259-64 (2005).
59. Titus, J.A., Perez, P., Kaubisch, A., Garrido, M.A. & Segal, D.M. Human K/natural killer cells targeted with hetero-cross-linked antibodies specifically lyse tumor cells in vitro and prevent tumor growth in vivo. *J Immunol* 139, 3153-8 (1987).
60. Abboud, N. et al. A requirement for FcγR in antibody-mediated bacterial toxin neutralization. *J Exp Med* 207, 2395-405 (2010).
61. Belzer, C., Liu, Q., Carroll, M.C. & Bry, L. The role of specific IgG and complement in combating a primary mucosal infection of the gut epithelium. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* 1, 311-318 (2011).
62. Shulman, M.J., Collins, C., Pennell, N. & Hozumi, N. Complement activation by IgM: evidence for the importance of the third constant domain of the mu heavy chain. *Eur J Immunol* 17, 549-54 (1987).
63. Fridman, W.H. Fc receptors and immunoglobulin binding factors. *FASEB J* 5, 2684-90 (1991).
64. Hashira, S., Okitsu-Negishi, S. & Yoshino, K. Placental transfer of IgG subclasses in a Japanese population. *Pediatr Int* 42, 337-42 (2000).
65. Ohta, Y. & Flajnik, M. IgD, like IgM, is a primordial immunoglobulin class perpetuated in most jawed vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 10723-8 (2006).
66. Chen, K. et al. Immunoglobulin D enhances immune surveillance by activating antimicrobial, proinflammatory and B cell-stimulating programs in basophils. *Nat Immunol* 10, 889-98 (2009).
67. Macpherson, A.J., McCoy, K.D., Johansen, F.E. & Brandtzaeg, P. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol* 1, 11-22 (2008).
68. Pawankar, R. & Ra, C. IgE-Fc εRI-mast cell axis in the allergic cycle. *Clin Exp Allergy* 28 Suppl 3, 6-14 (1998).
69. Parker, D.C. T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol* 11, 331-60 (1993).
70. Wintrobe's clinical hematology ; 2 (eds. Greer, J.P. & Wintrobe, M.M.) (Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. [u.a.], 2009).
71. Saijo, K. et al. Essential role of Src-family protein tyrosine kinases in NF-κB activation during B cell development. *Nat Immunol* 4, 274-9 (2003).
72. Reth, M. & Wienands, J. Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol* 15, 453-79 (1997).

73. Kabak, S. et al. The direct recruitment of BLNK to immunoglobulin alpha couples the B-cell antigen receptor to distal signaling pathways. *Mol Cell Biol* 22, 2524-35 (2002).
74. Niiro, H. & Clark, E.A. Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol* 2, 945-56 (2002).
75. Lenz, G. & Staudt, L.M. Aggressive lymphomas. *N Engl J Med* 362, 1417-29 (2010).
76. Patel, K.J. & Neuberger, M.S. Antigen presentation by the B cell antigen receptor is driven by the alpha/beta sheath and occurs independently of its cytoplasmic tyrosines. *Cell* 74, 939-46 (1993).
77. Cassard, S. et al. A tyrosine-based signal present in Ig alpha mediates B cell receptor constitutive internalization. *J Immunol* 160, 1767-73 (1998).
78. Siemasko, K. et al. Ig alpha and Ig beta are required for efficient trafficking to late endosomes and to enhance antigen presentation. *J Immunol* 162, 6518-25 (1999).
79. Malhotra, S., Kovats, S., Zhang, W. & Coggeshall, K.M. B cell antigen receptor endocytosis and antigen presentation to T cells require Vav and dynamin. *J Biol Chem* 284, 24088-97 (2009).
80. Salisbury, J.L., Condeelis, J.S. & Satir, P. Role of coated vesicles, microfilaments, and calmodulin in receptor-mediated endocytosis by cultured B lymphoblastoid cells. *J Cell Biol* 87, 132-41 (1980).
81. Clark, M.R., Massenbun, D., Siemasko, K., Hou, P. & Zhang, M. B-cell antigen receptor signaling requirements for targeting antigen to the MHC class II presentation pathway. *Curr Opin Immunol* 16, 382-7 (2004).
82. Marino, E., Tan, B., Binge, L., Mackay, C.R. & Grey, S.T. B-cell cross-presentation of autologous antigen precipitates diabetes. *Diabetes* 61, 2893-905 (2012).
83. Steinman, R.M. & Cohn, Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137, 1142-62 (1973).
84. Fogg, D.K. et al. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* 311, 83-7 (2006).
85. Liu, K. et al. In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science* 324, 392-7 (2009).
86. Onai, N. et al. Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat Immunol* 8, 1207-16 (2007).
87. Naik, S.H. et al. Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat Immunol* 8, 1217-26 (2007).
88. Naik, S.H. et al. Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat Immunol* 7, 663-71 (2006).
89. Varol, C. et al. Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions. *Immunity* 31, 502-12 (2009).
90. Bogunovic, M. et al. Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity* 31, 513-25 (2009).

91. Lewis, K.L. & Reizis, B. Dendritic cells: arbiters of immunity and immunological tolerance. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, a007401 (2012).
92. den Haan, J.M., Lehar, S.M. & Bevan, M.J. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med* 192, 1685-96 (2000).
93. Hildner, K. et al. Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* 322, 1097-100 (2008).
94. Tussiwand, R. et al. Compensatory dendritic cell development mediated by BATF-IRF interactions. *Nature* 490, 502-7 (2012).
95. Bachem, A. et al. Expression of XCR1 Characterizes the Batf3-Dependent Lineage of Dendritic Cells Capable of Antigen Cross-Presentation. *Front Immunol* 3, 214 (2012).
96. Lewis, K.L. et al. Notch2 receptor signaling controls functional differentiation of dendritic cells in the spleen and intestine. *Immunity* 35, 780-91 (2011).
97. Kasahara, S. & Clark, E.A. Dendritic cell-associated lectin 2 (DCAL2) defines a distinct CD8alpha- dendritic cell subset. *J Leukoc Biol* 91, 437-48 (2012).
98. Edelson, B.T. et al. Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8alpha+ conventional dendritic cells. *J Exp Med* 207, 823-36 (2010).
99. Denning, T.L. et al. Functional specializations of intestinal dendritic cell and macrophage subsets that control Th17 and regulatory T cell responses are dependent on the T cell/APC ratio, source of mouse strain, and regional localization. *J Immunol* 187, 733-47 (2011).
100. Schulz, O. et al. Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *J Exp Med* 206, 3101-14 (2009).
101. Turley, S.J., Fletcher, A.L. & Elpek, K.G. The stromal and haematopoietic antigen-presenting cells that reside in secondary lymphoid organs. *Nat Rev Immunol* 10, 813-25 (2010).
102. Kruger, T. et al. Identification and functional characterization of dendritic cells in the healthy murine kidney and in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 15, 613-21 (2004).
103. Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801 (2006).
104. Steinman, R.M. & Witmer, M.D. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 5132-6 (1978).
105. Pierre, P. et al. Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* 388, 787-92 (1997).
106. Zhang, M. et al. Splenic stroma drives mature dendritic cells to differentiate into regulatory dendritic cells. *Nat Immunol* 5, 1124-33 (2004).
107. Hadeiba, H. et al. CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. *Nat Immunol* 9, 1253-60 (2008).
108. Varol, C., Zigmund, E. & Jung, S. Securing the immune tightrope: mononuclear phagocytes in the intestinal lamina propria. *Nat Rev Immunol* 10, 415-26 (2010).
109. Kriegel, M.A., Rathinam, C. & Flavell, R.A. Pancreatic islet expression of chemokine CCL2 suppresses autoimmune diabetes via tolerogenic CD11c+ CD11b+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 3457-62 (2012).

110. Morelli, A.E. & Thomson, A.W. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat Rev Immunol* 7, 610-21 (2007).
111. Mashayekhi, M. et al. CD8alpha(+) dendritic cells are the critical source of interleukin-12 that controls acute infection by *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Immunity* 35, 249-59 (2011).
112. Edelson, B.T. et al. CD8alpha(+) dendritic cells are an obligate cellular entry point for productive infection by *Listeria monocytogenes*. *Immunity* 35, 236-48 (2011).
113. Gallegos, A.M. & Bevan, M.J. Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *J Exp Med* 200, 1039-49 (2004).
114. Hubert, F.X. et al. Aire regulates the transfer of antigen from mTECs to dendritic cells for induction of thymic tolerance. *Blood* 118, 2462-72 (2011).
115. Klein, L., Hinterberger, M., von Rohrscheidt, J. & Aichinger, M. Autonomous versus dendritic cell-dependent contributions of medullary thymic epithelial cells to central tolerance. *Trends Immunol* 32, 188-93 (2011).
116. Proietto, A.I., van Dommelen, S. & Wu, L. The impact of circulating dendritic cells on the development and differentiation of thymocytes. *Immunol Cell Biol* 87, 39-45 (2009).
117. Hawiger, D. et al. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* 194, 769-79 (2001).
118. Hawiger, D., Masilamani, R.F., Bettelli, E., Kuchroo, V.K. & Nussenzweig, M.C. Immunological unresponsiveness characterized by increased expression of CD5 on peripheral T cells induced by dendritic cells in vivo. *Immunity* 20, 695-705 (2004).
119. Dudziak, D. et al. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* 315, 107-11 (2007).
120. Kato, M. et al. Expression of human DEC-205 (CD205) multilectin receptor on leukocytes. *Int Immunol* 18, 857-69 (2006).
121. Loschko, J. et al. Antigen delivery to plasmacytoid dendritic cells via BST2 induces protective T cell-mediated immunity. *J Immunol* 186, 6718-25 (2011).
122. Loschko, J. et al. Antigen targeting to plasmacytoid dendritic cells via Siglec-H inhibits Th cell-dependent autoimmunity. *J Immunol* 187, 6346-56 (2011).
123. Probst, H.C., McCoy, K., Okazaki, T., Honjo, T. & van den Broek, M. Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nat Immunol* 6, 280-6 (2005).
124. Schildknecht, A. et al. FoxP3+ regulatory T cells essentially contribute to peripheral CD8+ T-cell tolerance induced by steady-state dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 199-203 (2010).
125. Birnberg, T. et al. Lack of conventional dendritic cells is compatible with normal development and T cell homeostasis, but causes myeloid proliferative syndrome. *Immunity* 29, 986-97 (2008).
126. Hochweller, K. et al. Dendritic cells control T cell tonic signaling required for responsiveness to foreign antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 5931-6 (2010).

127. Garbi, N., Hammerling, G.J., Probst, H.C. & van den Broek, M. Tonic T cell signalling and T cell tolerance as opposite effects of self-recognition on dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 22, 601-8 (2010).
128. Chen, M. et al. Dendritic cell apoptosis in the maintenance of immune tolerance. *Science* 311, 1160-4 (2006).
129. Stranges, P.B. et al. Elimination of antigen-presenting cells and autoreactive T cells by Fas contributes to prevention of autoimmunity. *Immunity* 26, 629-41 (2007).
130. Teteris, S.A., Engel, D.R. & Kurts, C. Homeostatic and pathogenic role of renal dendritic cells. *Kidney Int* 80, 139-45 (2011).
131. Silbernagl, S., Desopoulos, A., Silbernagl, S. & Desopoulos, A. Taschenatlas Physiologie (Thieme, Stuttgart [u.a.], 2012).
132. Stevens, L.A., Coresh, J., Greene, T. & Levey, A.S. Assessing kidney function--measured and estimated glomerular filtration rate. *N Engl J Med* 354, 2473-83 (2006).
133. Renner, h.v.E. Farbatlanten der Medizin ; 2. Niere und Harnwege (eds. Renner, E. & Netter, F.H.) (Thieme, Stuttgart [u.a.], 1983).
134. Dong, X. et al. Antigen presentation by dendritic cells in renal lymph nodes is linked to systemic and local injury to the kidney. *Kidney Int* 68, 1096-108 (2005).
135. Austyn, J.M. et al. Isolation and characterization of dendritic cells from mouse heart and kidney. *J Immunol* 152, 2401-10 (1994).
136. Tryggvason, K. & Wartiovaara, J. Molecular basis of glomerular permselectivity. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10, 543-9 (2001).
137. Gekle, M. Renal Proximal Tubular Albumin Reabsorption: Daily Prevention of Albuminuria. *News Physiol Sci* 13, 5-11 (1998).
138. Steinman, R.M., Hawiger, D. & Nussenzweig, M.C. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21, 685-711 (2003).
139. Okazaki, T. & Honjo, T. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends Immunol* 27, 195-201 (2006).
140. Grosso, J.F. et al. LAG-3 regulates CD8+ T cell accumulation and effector function in murine self- and tumor-tolerance systems. *J Clin Invest* 117, 3383-92 (2007).
141. Greenwald, R.J., Freeman, G.J. & Sharpe, A.H. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 23, 515-48 (2005).
142. Sharpe, A.H. & Freeman, G.J. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2, 116-26 (2002).
143. Carreno, B.M. & Collins, M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol* 20, 29-53 (2002).
144. Waterhouse, P. et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl4. *Science* 270, 985-8 (1995).
145. Taylor, P.A. et al. B7 expression on T cells down-regulates immune responses through CTLA-4 ligation via T-T interactions [corrections]. *J Immunol* 172, 34-9 (2004).

146. Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K. & Honjo, T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* 11, 3887-95 (1992).
147. Finger, L.R. et al. The human PD-1 gene: complete cDNA, genomic organization, and developmentally regulated expression in B cell progenitors. *Gene* 197, 177-87 (1997).
148. Nishimura, H., Honjo, T. & Minato, N. Facilitation of beta selection and modification of positive selection in the thymus of PD-1-deficient mice. *J Exp Med* 191, 891-8 (2000).
149. Agata, Y. et al. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol* 8, 765-72 (1996).
150. Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N. & Honjo, T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 11, 141-51 (1999).
151. Zhang, X. et al. Structural and functional analysis of the costimulatory receptor programmed death-1. *Immunity* 20, 337-47 (2004).
152. Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J. & Sharpe, A.H. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 26, 677-704 (2008).
153. Okazaki, T. & Honjo, T. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *Int Immunol* 19, 813-24 (2007).
154. Goldberg, M.V. et al. Role of PD-1 and its ligand, B7-H1, in early fate decisions of CD8 T cells. *Blood* 110, 186-92 (2007).
155. Parry, R.V. et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol* 25, 9543-53 (2005).
156. Carter, L. et al. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur J Immunol* 32, 634-43 (2002).
157. Okazaki, T., Maeda, A., Nishimura, H., Kurosaki, T. & Honjo, T. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13866-71 (2001).
158. Freeman, G.J. et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 192, 1027-34 (2000).
159. Dong, H., Zhu, G., Tamada, K. & Chen, L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 5, 1365-9 (1999).
160. Latchman, Y. et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2, 261-8 (2001).
161. Tseng, S.Y. et al. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med* 193, 839-46 (2001).
162. Yamazaki, T. et al. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *J Immunol* 169, 5538-45 (2002).

163. Sharpe, A.H., Wherry, E.J., Ahmed, R. & Freeman, G.J. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol* 8, 239-45 (2007).
164. Butte, M.J., Keir, M.E., Phamduy, T.B., Sharpe, A.H. & Freeman, G.J. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* 27, 111-22 (2007).
165. Francisco, L.M., Sage, P.T. & Sharpe, A.H. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev* 236, 219-42 (2010).
166. Pentcheva-Hoang, T., Chen, L., Pardoll, D.M. & Allison, J.P. Programmed death-1 concentration at the immunological synapse is determined by ligand affinity and availability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 17765-70 (2007).
167. Kuipers, H. et al. Contribution of the PD-1 ligands/PD-1 signaling pathway to dendritic cell-mediated CD4+ T cell activation. *Eur J Immunol* 36, 2472-82 (2006).
168. Blocki, F.A. et al. Induction of a gene expression program in dendritic cells with a cross-linking IgM antibody to the co-stimulatory molecule B7-DC. *FASEB J* 20, 2408-10 (2006).
169. Van Keulen, V.P. et al. Immunomodulation using the recombinant monoclonal human B7-DC cross-linking antibody rHIgM12. *Clin Exp Immunol* 143, 314-21 (2006).
170. Nishimura, H. et al. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* 291, 319-22 (2001).
171. Ansari, M.J. et al. The programmed death-1 (PD-1) pathway regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *J Exp Med* 198, 63-9 (2003).
172. Ding, H. et al. Delivering PD-1 inhibitory signal concomitant with blocking ICOS co-stimulation suppresses lupus-like syndrome in autoimmune BXSB mice. *Clin Immunol* 118, 258-67 (2006).
173. Thompson, R.H. et al. Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17174-9 (2004).
174. Patterson, R., Suszko, I.M. & Pruzansky, J.J. In vitro uptake of antigen-antibody complexes by phagocytic cells. *J Immunol* 89, 471-82 (1962).
175. Lanzavecchia, A. Mechanisms of antigen uptake for presentation. *Curr Opin Immunol* 8, 348-54 (1996).
176. Allison, A.C. & Davies, P. Mechanisms of endocytosis and exocytosis. *Symp Soc Exp Biol*, 419-46 (1974).
177. Marshall, J.M. & Nachmias, V.T. Cell Surface and Pinocytosis. *J Histochem Cytochem* 13, 92-104 (1965).
178. De Terra, N. & Rustad, R.C. The dependence of pinocytosis on temperature and aerobic respiration. *Exp Cell Res* 17, 191-5 (1959).
179. Griffin, F.M., Jr., Griffin, J.A., Leider, J.E. & Silverstein, S.C. Studies on the mechanism of phagocytosis. I. Requirements for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane. *J Exp Med* 142, 1263-82 (1975).

180. Groves, E., Dart, A.E., Covarelli, V. & Caron, E. Molecular mechanisms of phagocytic uptake in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci* 65, 1957-76 (2008).
181. Jacques, P. [Lysosomes and endocytosis]. *Brux Med* 46, 1053-9 (1966).
182. Mousavi, S.A., Malerod, L., Berg, T. & Kjekken, R. Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem J* 377, 1-16 (2004).
183. Pearse, B.M. Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 1255-9 (1976).
184. Kirsch, T. & Beevers, L. Uncoating of clathrin-coated vesicles by uncoating ATPase from developing peas. *Plant Physiol* 103, 205-12 (1993).
185. Blasius, A.L. & Beutler, B. Intracellular toll-like receptors. *Immunity* 32, 305-15 (2010).
186. Zinkernagel, R.M. & Doherty, P.C. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248, 701-2 (1974).
187. Rock, K.L., York, I.A. & Goldberg, A.L. Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation. *Nat Immunol* 5, 670-7 (2004).
188. Driscoll, J., Frydman, J. & Goldberg, A.L. An ATP-stabilized inhibitor of the proteasome is a component of the 1500-kDa ubiquitin conjugate-degrading complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4986-90 (1992).
189. Kloetzel, P.M. Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. *Nat Immunol* 5, 661-9 (2004).
190. Tamura, T. & Tanaka, K. [Ubiquitin and proteasomes]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 39, 696-709 (1994).
191. Tanaka, K. Role of proteasomes modified by interferon-gamma in antigen processing. *J Leukoc Biol* 56, 571-5 (1994).
192. Hosken, N.A. & Bevan, M.J. Defective presentation of endogenous antigen by a cell line expressing class I molecules. *Science* 248, 367-70 (1990).
193. Neefjes, J.J., Momburg, F. & Hammerling, G.J. Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science* 261, 769-71 (1993).
194. Kleijmeer, M.J. et al. Location of MHC-encoded transporters in the endoplasmic reticulum and cis-Golgi. *Nature* 357, 342-4 (1992).
195. Meyer, T.H., van Endert, P.M., Uebel, S., Ehring, B. & Tampe, R. Functional expression and purification of the ABC transporter complex associated with antigen processing (TAP) in insect cells. *FEBS Lett* 351, 443-7 (1994).
196. Sadasivan, B., Lehner, P.J., Ortmann, B., Spies, T. & Cresswell, P. Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity* 5, 103-14 (1996).
197. Ortmann, B. et al. A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes. *Science* 277, 1306-9 (1997).
198. Banchereau, J. & Steinman, R.M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-52 (1998).

199. Lanzavecchia, A. & Bove, S. Specific B lymphocytes efficiently pick up, process and present antigen to T cells. *Behring Inst Mitt*, 82-7 (1985).
200. Maver, M.E. & Greco, A.E. The hydrolysis of nucleoproteins by cathepsins from calf thymus. *J Biol Chem* 181, 853-60 (1949).
201. Honey, K. & Rudensky, A.Y. Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 3, 472-82 (2003).
202. Villadangos, J.A. & Ploegh, H.L. Proteolysis in MHC class II antigen presentation: who's in charge? *Immunity* 12, 233-9 (2000).
203. Levine, B. & Deretic, V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 7, 767-77 (2007).
204. Viville, S. et al. Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain. *Cell* 72, 635-48 (1993).
205. Bikoff, E.K. et al. Defective major histocompatibility complex class II assembly, transport, peptide acquisition, and CD4+ T cell selection in mice lacking invariant chain expression. *J Exp Med* 177, 1699-712 (1993).
206. Karlsson, L., Peleraux, A., Lindstedt, R., Liljedahl, M. & Peterson, P.A. Reconstitution of an operational MHC class II compartment in nonantigen-presenting cells. *Science* 266, 1569-73 (1994).
207. Amigorena, S. et al. Invariant chain cleavage and peptide loading in major histocompatibility complex class II vesicles. *J Exp Med* 181, 1729-41 (1995).
208. Denzin, L.K. & Cresswell, P. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading. *Cell* 82, 155-65 (1995).
209. Bevan, M.J. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med* 143, 1283-8 (1976).
210. Kurts, C., Kosaka, H., Carbone, F.R., Miller, J.F. & Heath, W.R. Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *J Exp Med* 186, 239-45 (1997).
211. Carbone, F.R., Kurts, C., Bennett, S.R., Miller, J.F. & Heath, W.R. Cross-presentation: a general mechanism for CTL immunity and tolerance. *Immunol Today* 19, 368-73 (1998).
212. Heath, W.R. & Carbone, F.R. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat Rev Immunol* 1, 126-34 (2001).
213. Li, H. et al. CD11c+CD11b+ dendritic cells play an important role in intravenous tolerance and the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 181, 2483-93 (2008).
214. Chung, Y., Chang, J.H., Kweon, M.N., Rennert, P.D. & Kang, C.Y. CD8alpha-11b+ dendritic cells but not CD8alpha+ dendritic cells mediate cross-tolerance toward intestinal antigens. *Blood* 106, 201-6 (2005).
215. Fujimoto, K. et al. A new subset of CD103+CD8alpha+ dendritic cells in the small intestine expresses TLR3, TLR7, and TLR9 and induces Th1 response and CTL activity. *J Immunol* 186, 6287-95 (2011).

-
216. Limmer, A. et al. Cross-presentation of oral antigens by liver sinusoidal endothelial cells leads to CD8 T cell tolerance. *Eur J Immunol* 35, 2970-81 (2005).
217. Kovacsovics-Bankowski, M., Clark, K., Benacerraf, B. & Rock, K.L. Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 4942-6 (1993).
218. Ramirez, M.C. & Sigal, L.J. Macrophages and dendritic cells use the cytosolic pathway to rapidly cross-present antigen from live, vaccinia-infected cells. *J Immunol* 169, 6733-42 (2002).
219. Robson, N.C., Donachie, A.M. & Mowat, A.M. Simultaneous presentation and cross-presentation of immune-stimulating complex-associated cognate antigen by antigen-specific B cells. *Eur J Immunol* 38, 1238-46 (2008).
220. Graham, D.B. et al. ITAM signaling in dendritic cells controls T helper cell priming by regulating MHC class II recycling. *Blood* 116, 3208-18 (2010).
221. Flinsenberg, T.W., Compeer, E.B., Boelens, J.J. & Boes, M. Antigen cross-presentation: extending recent laboratory findings to therapeutic intervention. *Clin Exp Immunol* 165, 8-18 (2011).
222. Compeer, E.B., Flinsenberg, T.W., van der Grein, S.G. & Boes, M. Antigen processing and remodeling of the endosomal pathway: requirements for antigen cross-presentation. *Front Immunol* 3, 37 (2012).
223. Hotta, C., Fujimaki, H., Yoshinari, M., Nakazawa, M. & Minami, M. The delivery of an antigen from the endocytic compartment into the cytosol for cross-presentation is restricted to early immature dendritic cells. *Immunology* 117, 97-107 (2006).
224. Norbury, C.C. et al. CD8+ T cell cross-priming via transfer of proteasome substrates. *Science* 304, 1318-21 (2004).
225. Ackerman, A.L., Kyritsis, C., Tampe, R. & Cresswell, P. Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12889-94 (2003).
226. Houde, M. et al. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425, 402-6 (2003).
227. Gueronprez, P. et al. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 425, 397-402 (2003).
228. Ziegler, H.K. & Unanue, E.R. Decrease in macrophage antigen catabolism caused by ammonia and chloroquine is associated with inhibition of antigen presentation to T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 175-8 (1982).
229. Burgdorf, S., Kautz, A., Bohnert, V., Knolle, P.A. & Kurts, C. Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science* 316, 612-6 (2007).
230. Mant, A., Chinnery, F., Elliott, T. & Williams, A.P. The pathway of cross-presentation is influenced by the particle size of phagocytosed antigen. *Immunology* 136, 163-75 (2012).
231. Burgdorf, S., Lukacs-Kornek, V. & Kurts, C. The mannose receptor mediates uptake of soluble but not of cell-associated antigen for cross-presentation. *J Immunol* 176, 6770-6 (2006).

232. Kovacsovics-Bankowski, M. & Rock, K.L. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 267, 243-6 (1995).
233. Huang, A.Y., Bruce, A.T., Pardoll, D.M. & Levitsky, H.I. In vivo cross-priming of MHC class I-restricted antigens requires the TAP transporter. *Immunity* 4, 349-55 (1996).
234. Burgdorf, S., Scholz, C., Kautz, A., Tampe, R. & Kurts, C. Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation. *Nat Immunol* 9, 558-66 (2008).
235. Mahnke, K. et al. The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J Cell Biol* 151, 673-84 (2000).
236. Bonifaz, L. et al. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med* 196, 1627-38 (2002).
237. Zelenay, S. et al. The dendritic cell receptor DNGR-1 controls endocytic handling of necrotic cell antigens to favor cross-priming of CTLs in virus-infected mice. *J Clin Invest* 122, 1615-27 (2012).
238. Iborra, S. et al. The DC receptor DNGR-1 mediates cross-priming of CTLs during vaccinia virus infection in mice. *J Clin Invest* 122, 1628-43 (2012).
239. Schreibelt, G. et al. The C-type lectin receptor CLEC9A mediates antigen uptake and (cross-)presentation by human blood BDCA3+ myeloid dendritic cells. *Blood* 119, 2284-92 (2012).
240. Schulz, O. & Reis e Sousa, C. Cross-presentation of cell-associated antigens by CD8alpha+ dendritic cells is attributable to their ability to internalize dead cells. *Immunology* 107, 183-9 (2002).
241. Fadok, V.A., Bratton, D.L. & Henson, P.M. Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J Clin Invest* 108, 957-62 (2001).
242. Neijssen, J., Pang, B. & Neefjes, J. Gap junction-mediated intercellular communication in the immune system. *Prog Biophys Mol Biol* 94, 207-18 (2007).
243. Segura, E. & Villadangos, J.A. A modular and combinatorial view of the antigen cross-presentation pathway in dendritic cells. *Traffic* 12, 1677-85 (2011).
244. Kamphorst, A.O., Guermonprez, P., Dudziak, D. & Nussenzweig, M.C. Route of antigen uptake differentially impacts presentation by dendritic cells and activated monocytes. *J Immunol* 185, 3426-35 (2010).
245. Rodriguez, A., Regnault, A., Kleijmeer, M., Ricciardi-Castagnoli, P. & Amigorena, S. Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat Cell Biol* 1, 362-8 (1999).
246. Lin, M.L. et al. Selective suicide of cross-presenting CD8+ dendritic cells by cytochrome c injection shows functional heterogeneity within this subset. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3029-34 (2008).
247. de Wit, J. et al. Antigen-specific B cells reactivate an effective cytotoxic T cell response against phagocytosed Salmonella through cross-presentation. *PLoS One* 5, e13016 (2010).

-
248. Brodie, G.M., Wallberg, M., Santamaria, P., Wong, F.S. & Green, E.A. B-cells promote intra-islet CD8+ cytotoxic T-cell survival to enhance type 1 diabetes. *Diabetes* 57, 909-17 (2008).
249. McPherson, M. et al. Colitis immunoregulation by CD8+ T cell requires T cell cytotoxicity and B cell peptide antigen presentation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 295, G485-92 (2008).
250. Keller, S.A. et al. Follicular and marginal zone B cells fail to cross-present MHC class I-restricted epitopes derived from viral particles. *J Immunol* 182, 6261-6 (2009).
251. Schnorrer, P. et al. The dominant role of CD8+ dendritic cells in cross-presentation is not dictated by antigen capture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 10729-34 (2006).
252. Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. & Lanzavecchia, A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182, 389-400 (1995).
253. Woelbing, F. et al. Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and facilitates acquisition of protective immunity. *J Exp Med* 203, 177-88 (2006).
254. Steinman, R.M., Inaba, K., Turley, S., Pierre, P. & Mellman, I. Antigen capture, processing, and presentation by dendritic cells: recent cell biological studies. *Hum Immunol* 60, 562-7 (1999).
255. Perrin-Cocon, L.A., Villiers, C.L., Salamero, J., Gabert, F. & Marche, P.N. B cell receptors and complement receptors target the antigen to distinct intracellular compartments. *J Immunol* 172, 3564-72 (2004).
256. Ravetch, J.V. & Bolland, S. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 19, 275-90 (2001).
257. Hou, P. et al. B cell antigen receptor signaling and internalization are mutually exclusive events. *PLoS Biol* 4, e200 (2006).
258. Cambier, J.C. et al. The B-cell antigen receptor: structure and function of primary, secondary, tertiary and quaternary components. *Immunol Rev* 132, 85-106 (1993).
259. Bonnerot, C. et al. Role of B cell receptor Ig alpha and Ig beta subunits in MHC class II-restricted antigen presentation. *Immunity* 3, 335-47 (1995).
260. Pelanda, R., Braun, U., Hobeika, E., Nussenzweig, M.C. & Reth, M. B cell progenitors are arrested in maturation but have intact VDJ recombination in the absence of Ig-alpha and Ig-beta. *J Immunol* 169, 865-72 (2002).
261. Ashwell, J.D., DeFranco, A.L., Paul, W.E. & Schwartz, R.H. Antigen presentation by resting B cells. Radiosensitivity of the antigen-presentation function and two distinct pathways of T cell activation. *J Exp Med* 159, 881-905 (1984).
262. Shen, L., Sigal, L.J., Boes, M. & Rock, K.L. Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity* 21, 155-65 (2004).
263. Monu, N. & Trombetta, E.S. Cross-talk between the endocytic pathway and the endoplasmic reticulum in cross-presentation by MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol* 19, 66-72 (2007).

264. Rock, K.L. Exiting the outside world for cross-presentation. *Immunity* 25, 523-5 (2006).
265. Wilkinson, B.M., Critchley, A.J. & Stirling, C.J. Determination of the transmembrane topology of yeast Sec61p, an essential component of the endoplasmic reticulum translocation complex. *J Biol Chem* 271, 25590-7 (1996).
266. Wiertz, E.J. et al. Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* 384, 432-8 (1996).
267. Ackerman, A.L., Giodini, A. & Cresswell, P. A role for the endoplasmic reticulum protein retrotranslocation machinery during crosspresentation by dendritic cells. *Immunity* 25, 607-17 (2006).
268. Perez-Galan, P. et al. The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status. *Blood* 107, 257-64 (2006).
269. Meng, L. et al. Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10403-8 (1999).
270. Klausner, R.D., Donaldson, J.G. & Lippincott-Schwartz, J. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol* 116, 1071-80 (1992).
271. Nuchtern, J.G., Bonifacino, J.S., Biddison, W.E. & Klausner, R.D. Brefeldin A implicates egress from endoplasmic reticulum in class I restricted antigen presentation. *Nature* 339, 223-6 (1989).
272. Cresswell, P., Bangia, N., Dick, T. & Diedrich, G. The nature of the MHC class I peptide loading complex. *Immunol Rev* 172, 21-8 (1999).
273. Lipinska, A.D. et al. Bovine herpesvirus 1 UL49.5 protein inhibits the transporter associated with antigen processing despite complex formation with glycoprotein M. *J Virol* 80, 5822-32 (2006).
274. Hiebsch, R.R., Raub, T.J. & Wattenberg, B.W. Primaquine blocks transport by inhibiting the formation of functional transport vesicles. Studies in a cell-free assay of protein transport through the Golgi apparatus. *J Biol Chem* 266, 20323-8 (1991).
275. Vale, N., Moreira, R. & Gomes, P. Primaquine revisited six decades after its discovery. *Eur J Med Chem* 44, 937-53 (2009).
276. Reif, J.S., Schwartz, A.L. & Fallon, R.J. Low concentrations of primaquine inhibit degradation but not receptor-mediated endocytosis of asialoorosomuroid by HepG2 cells. *Exp Cell Res* 192, 581-6 (1991).
277. van Weert, A.W., Geuze, H.J., Groothuis, B. & Stoorvogel, W. Primaquine interferes with membrane recycling from endosomes to the plasma membrane through a direct interaction with endosomes which does not involve neutralisation of endosomal pH nor osmotic swelling of endosomes. *Eur J Cell Biol* 79, 394-9 (2000).
278. Reid, P.A. & Watts, C. Cycling of cell-surface MHC glycoproteins through primaquine-sensitive intracellular compartments. *Nature* 346, 655-7 (1990).
279. Rangel-Moreno, J. et al. B cells promote resistance to heterosubtypic strains of influenza via multiple mechanisms. *J Immunol* 180, 454-63 (2008).

-
280. Pone, E.J. et al. BCR-signalling synergizes with TLR-signalling for induction of AID and immunoglobulin class-switching through the non-canonical NF-kappaB pathway. *Nat Commun* 3, 767 (2012).
281. Lind, E.F. et al. Dendritic cells require the NF-kappaB2 pathway for cross-presentation of soluble antigens. *J Immunol* 181, 354-63 (2008).
282. Belz, G.T. et al. The CD8alpha(+) dendritic cell is responsible for inducing peripheral self-tolerance to tissue-associated antigens. *J Exp Med* 196, 1099-104 (2002).
283. Iyoda, T. et al. The CD8+ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J Exp Med* 195, 1289-302 (2002).
284. Liu, K. et al. Immune tolerance after delivery of dying cells to dendritic cells in situ. *J Exp Med* 196, 1091-7 (2002).
285. Kreuwel, H.T., Aung, S., Silao, C. & Sherman, L.A. Memory CD8(+) T cells undergo peripheral tolerance. *Immunity* 17, 73-81 (2002).
286. Sixt, M. et al. The conduit system transports soluble antigens from the afferent lymph to resident dendritic cells in the T cell area of the lymph node. *Immunity* 22, 19-29 (2005).
287. Randolph, G.J., Sanchez-Schmitz, G. & Angeli, V. Factors and signals that govern the migration of dendritic cells via lymphatics: recent advances. *Springer Semin Immunopathol* 26, 273-87 (2005).
288. Allan, R.S. et al. Migratory dendritic cells transfer antigen to a lymph node-resident dendritic cell population for efficient CTL priming. *Immunity* 25, 153-62 (2006).
289. Lee, J.W. et al. Peripheral antigen display by lymph node stroma promotes T cell tolerance to intestinal self. *Nat Immunol* 8, 181-90 (2007).
290. Guleria, I. et al. Mechanisms of PDL1-mediated regulation of autoimmune diabetes. *Clin Immunol* 125, 16-25 (2007).
291. Wang, J. et al. Establishment of NOD-Pdcd1-/- mice as an efficient animal model of type I diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 11823-8 (2005).
292. Keir, M.E. et al. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med* 203, 883-95 (2006).
293. Wang, G., Hu, P., Yang, J., Shen, G. & Wu, X. The effects of PDL-Ig on collagen-induced arthritis. *Rheumatol Int* 31, 513-9 (2011).
294. Guleria, I. et al. A critical role for the programmed death ligand 1 in fetomaternal tolerance. *J Exp Med* 202, 231-7 (2005).
295. Zhang, Y. et al. Regulation of T cell activation and tolerance by PDL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11695-700 (2006).
296. Matsumoto, K. et al. B7-DC regulates asthmatic response by an IFN-gamma-dependent mechanism. *J Immunol* 172, 2530-41 (2004).
297. Akbari, O. et al. PD-L1 and PD-L2 modulate airway inflammation and iNKT-cell-dependent airway hyperreactivity in opposing directions. *Mucosal Immunol* 3, 81-91 (2010).

Referenzen

298. Larrubia, J.R. et al. Bim-mediated apoptosis and PD-1/PD-L1 pathway impair reactivity of PD1(+)/CD127(-) HCV-specific CD8(+) cells targeting the virus in chronic hepatitis C virus infection. *Cell Immunol* 269, 104-14 (2011).
299. Sakaguchi, S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22, 531-62 (2004).
300. Hamanishi, J. et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 3360-5 (2007).
301. Inman, B.A. et al. PD-L1 (B7-H1) expression by urothelial carcinoma of the bladder and BCG-induced granulomata: associations with localized stage progression. *Cancer* 109, 1499-505 (2007).
302. Gao, Q. et al. Overexpression of PD-L1 significantly associates with tumor aggressiveness and postoperative recurrence in human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 15, 971-9 (2009).
303. Barber, D.L. et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439, 682-7 (2006).
304. Day, C.L. et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 443, 350-4 (2006).
305. Brahmer, J.R. et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 366, 2455-65 (2012).
306. Topalian, S.L. et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 366, 2443-54 (2012).

IX Abbildungsverzeichnis

Einleitung

Abbildung I-1: Schematische Darstellung der T-Zellentwicklung	3
Abbildung I-2: Schematische Darstellung des Schicksals von aktivierten CD8 ⁺ T-Zellen.....	5
Abbildung I-3: Signalübertragung nach B-Zellrezeptoraktivierung	7
Abbildung I-4: Aufbau der Niere	13
Abbildung I-5: Schematische Darstellung des Antigentransports in den renalen Lymphknoten	14
Abbildung I-6: Darstellung des PD-1-Signalwegs in T-Zellen	16
Abbildung I-7: Verschiedene Mechanismen der Antigenaufnahme	20
Abbildung I-8: Modulare Sicht auf die Schritte der Kreuzpräsentation.....	24

Ergebnisse

Abbildung IV-1: B-Zellen exprimieren kostimulatorische Moleküle und mehr MHC-I nach Antigenaufnahme	54
Abbildung IV-2: Nach OVA-HEL Inkubation beladen B-Zellen höhere Mengen von MHC-I-Molekülen intrazellulär mit SIINFEKL.....	55
Abbildung IV-3: Schematische Darstellung der <i>in vitro</i> Kultur.....	56
Abbildung IV-4: OT-I und OT-II Zellen produzieren IL-2 und IFN- γ nach Kokultur mit beladenen IgHEL B-Zellen	57
Abbildung IV-5: Vom B-Zellrezeptor aufgenommenes Protein gelangt in stabile frühe Endosomen	58
Abbildung: IV-6: Fixierte B-Zellen können keine T-Zellen stimulieren.....	59
Abbildung IV-7: Degradierung von kreuzpräsentiertem Antigen findet nicht in lysosomalen Kompartimenten statt	60
Abbildung IV-8: Über den B-Zellrezeptor aufgenommenes Protein kann in das Zytosol transloziert werden	62
Abbildung IV-9: B-Zellen generieren MHC-I-Peptide für die Kreuzpräsentation im Zytosol, bringen diese aber nicht in den ER-abhängigen Beladungsweg ein.....	63

Abbildung IV-10: B-Zellkreuzpräsentation findet über Recycling-Endosomen statt	65
Abbildung IV-11: Primaquinbehandlung verstärkt B-Zellkreuzpräsentation, aber inhibiert DC-Kreuzpräsentation.....	66
Abbildung IV-12: Aktivierung des B-Zellrezeptors führt zu TAP-Rekrutierung und ist ausreichend, Kreuzpräsentation zu initiieren	68
Abbildung IV-13: Akkumulation von filtrierbarem Antigen in Milz und renalen Lymphknoten	70
Abbildung IV-14: PD-L1 Blockade führt zu erhöhter IFN- γ -Produktion und Proliferation sowie zu verminderter Apoptose von OT-I Zellen im renalen Lymphknoten.....	73
Abbildung IV-15: PD-L1 Blockade hat keinen Einfluss auf Apoptose, Proliferation und IFN γ -Produktion von OT-I Zellen in der Milz.....	76
Abbildung IV-16: PD-1 vermittelt die Deletion zytotoxischer T-Zellen im renalen Lymphknoten, aber nicht in der Milz	78
Abbildung IV-17: CD8 ⁺ DC im renalen Lymphknoten nehmen OVA auf und exprimieren PD-L1	79
Abbildung IV-18: Keine distinkte Expression von PD-L1 oder PD-L2 auf OVA-aufnehmenden DC-Unterarten in der Milz.....	81
Abbildung IV-19: OT-I-Apoptoseinduktion im renalen Lymphknoten, aber nicht in der Milz hängt von Batf3 ⁺ Zellen und PD-L1 ab.....	82
Abbildung IV-20: Generierung von Knochenmarkchimären	84
Abbildung IV-21: PD-L1 auf Batf3 ^{-/-} DC ist essentiell für Kreuztoleranzinduktion im renalen Lymphknoten.....	85

Diskussion

Abbildung V-1: Modell der B-Zellkreuzpräsentation	94
---	----

Tabellen

Tabelle 1: DC-Subtypen	9
------------------------------	---

X Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
APC	antigenpräsentierende Zelle (engl. antigen presenting cell), Allophycocyanin
bidest.	bidestilliert
BMDC	Knochenmark DC (engl.: bone marrow DC)
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: bovine serum albumin)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD	Zelloberflächenmarker (engl. cluster of differentiation)
CFSE	Carboxyfluorescein di-amino Succinimidyl-Ester
CTL	zytotoxische T-Zelle (engl. cytotoxic T lymphocyte)
DC	Dendritische Zelle (engl.: dendritic cell)
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEA-1	engl. early endosome antigen 1
ELISA	engl. enzyme linked immunosorbent assay
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (engl. fluorescence activated cell sorting)
Fc	konstante Region eines Immunglobulins
FCS	Fötale Kälberserum (engl.: fetal calf serum)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	engl. forward scatter
g	Gramm, Erdbeschleunigung (engl. gravitation)
h	Stunde (lat. <i>hora</i>)
HEL	Hühnereiweißlysozym (engl. hen egg lysozyme)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KM	Knochenmark
l	Liter
LAMP-1	engl. lysosomal-associated membrane protein 1
LPS	Lipopolysaccharid

Abkürzungsverzeichnis

μ	mikro
m	milli, Meter
M	Molar
MACS	Magnetische Zellsortierung (engl. magnetic activated cell sorter)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. major histocompatibility complex)
mlg	membrangebundenes Immunglobulin
Min.	Minute
n	nano
o. g.	oben genannt
OVA	Ovalbumin
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PRR	engl. pattern-recognition receptors
Rag	engl. recombination activating gene
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung (engl. standard deviation)
Sek.	Sekunde
sog.	sogenannt
SSC	engl. sideward scatter
TCR	T-Zellrezeptor (engl. T cell receptor)
Tfr	Transferrin
TLR	engl. Toll-like receptor
T _{regs}	regulatorische T-Zellen
v/v	Verhältnis Volumen zu Volumen (engl. volume to volume)
vgl.	vergleiche
w/v	Verhältnis Masse zu Volumen (engl. weight to volume)
WT	wildtyp
z.B.	zum Beispiel

XI Appendix

Auszüge dieser Arbeit waren Bestandteil folgender Publikationen und Kongressbeiträge:

Publikation

Catherine Gottschalk, Vera Damuzzo, Janine Gotot, Richard Kroczeck, Hideo Yagita, Kenneth M. Murphy, Percy A. Knolle, Isis Ludwig-Portugall, Christian Kurts

"Batf3-Dependent Dendritic Cells in the Renal Lymph Node Induce Tolerance against Circulating Antigens" J Am Soc Nephrol. 2013 Feb 14

Wissenschaftliche Konferenzen

- | | |
|---------|--|
| 09/2009 | Vortrag auf dem European Congress of Immunology in Berlin
Titel: "Cell-biological mechanisms of cross-presentation by B cells" |
| 10/2009 | Poster auf dem EMBL International PhD Symposium in Heidelberg
Titel: "Cell-biological mechanisms of cross-presentation by B cells" |
| 04/2011 | Poster auf dem Keystone Symposium "B cells: new insights into normal versus dysregulated function"
Titel: "Cell-biological mechanisms of B cell cross-presentation" |
| 06/2012 | Teilnahme am LIMES Graduate School Chemical Biology Retreat |
| 09/2012 | Vortrag auf dem European Congress of Immunology in Glasgow
Titel: "Cross-presenting dendritic cells induce T cell tolerance towards filterable antigens in the kidney draining lymph node via PD-ligands" |

Weitere Publikationen

Kurz CM, **Gottschalk C**, Schlicker E, Kathmann M

"Identification of a presynaptic cannabinoid CB1 receptor in the guinea-pig atrium and sequencing of the guinea-pig CB1 receptor" J Physiol Pharmacol. 2008 Mar;59(1):3-15

Ludwig-Portugall I, Hamilton-Williams EE, **Gottschalk C**, Kurts C

"Cutting edge: CD25+ regulatory T cells prevent expansion and induce apoptosis of B cells specific for tissue autoantigens" J Immunol. 2008 Oct 1;181(7):4447-51.

Gotot J, **Gottschalk C**, Leopold S, Knolle PA, Yagita H, Kurts C, Ludwig-Portugall I

"Regulatory T cells use programmed death 1 ligands to directly suppress autoreactive B cells in vivo" Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Jun 26;109(26):10468-73