

Molekulare und zellbiologische Mechanismen der Kreuzpräsentation

Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Lars Franken
aus
Bergisch Gladbach

Bonn 2013

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

Die vorliegende Arbeit wurde an den Instituten für Molekulare Medizin und
Experimentelle Immunologie am Universitätsklinikum Bonn angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Percy Knolle
Institut für Molekulare Medizin
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

2. Gutachter: Prof. Dr. Waldemar Kolanus
Life and Medical Science Institute
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Tag der mündlichen Prüfung: 16.7.2013

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 6 der Promotionsordnung vom 03.06.2011 im Zeitraum von Juni 2009 bis April 2013 von Herrn Prof. Dr. Knolle betreut.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass

- die vorgelegte Arbeit – abgesehen von den ausdrücklich bezeichneten Hilfsmitteln
- persönlich, selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde,
- die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht sind,
- die vorgelegte Arbeit oder ähnliche Arbeiten nicht bereits anderweitig als Dissertation eingereicht worden ist bzw. sind, sowie eine Erklärung über frühere Promotionsversuche und deren Resultate,
- für die inhaltlich-materielle Erstellung der vorgelegten Arbeit keine fremde Hilfe, insbesondere keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen wurde sowie keinerlei Dritte vom Doktoranden unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Tätigkeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Arbeit stehen.

Bonn, den 25.04.2013

FÜR
MARZENA
UND
MEINE ELTERN

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	1
1.1 DAS IMMUNSYSTEM.....	1
1.1.1 <i>Die innate Immunantwort</i>	1
1.1.2 <i>Die adaptive Immunantwort</i>	2
1.2 T-ZELLEN UND ANTIGENPRÄSENTATION	3
1.2.1 <i>Grundlagen der Antigenpräsentation</i>	3
1.2.2 <i>Professionelle Antigen Präsentierende Zellen</i>	4
1.2.3 <i>Klassische Antigenpräsentation und Kreuzpräsentation</i>	5
1.3 MOLEKULARE MECHANISMEN DER KREUZPRÄSENTATION.....	7
1.3.1 <i>Vakuoläre und zytosolische Kreuzpräsentation</i>	7
1.3.2 <i>Kreuzpräsentation in stabilen, frühen Endosomen</i>	9
1.3.3 <i>Die Rolle des MR in der Kreuzpräsentation durch BM-DC</i>	10
1.4 VIRALE „IMMUNE-ESCAPE“ MECHANISMEN	11
1.5 PROFESSIONELLE ANTIGEN-PRÄSENTIERENDE ZELLEN IN DER MURINEN MILZ	12
1.6 DIE <i>IN VIVO</i> RELEVANZ DER MR-ABHÄNGIGEN KREUZPRÄSENTATION.....	13
1.7 ZELLBIOLOGISCHE VORRAUSSETZUNGEN DER KREUZPRÄSENTATION	14
1.8 ZIELSETZUNG DER DOKTORARBEIT	16
2. MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 MATERIAL.....	17
2.1.1 <i>Verwendete Geräte</i>	17
2.1.2 <i>Software</i>	18
2.1.3 <i>Chemikalien und Reagenzien</i>	18
2.1.4 <i>Antikörper</i>	21
2.1.5 <i>Mauslinien</i>	22
2.1.6 <i>Puffer</i>	22
2.2 METHODEN.....	25
2.2.1 <i>Klonierung</i>	25
2.2.2 <i>Proteinanalyse</i>	32
2.2.3 <i>Zellkultur/isolation</i>	35
2.2.4 <i>Lentivirus</i>	37
2.2.5 <i>Embryonale Stammzellen</i>	39
2.2.6 <i>Durchflußzytometrie</i>	41
2.2.7 <i>Zellbiologie</i>	42
2.2.8 <i>In vivo Experimente</i>	44
2.9 STATISTIK.....	45
3. ERGEBNISSE	46
3.1 ROLLE DER MANNOSE-REZEPTOR VERMITTELTEN KREUZPRÄSENTATION <i>IN VIVO</i>	46
3.1.1 <i>Identifikation eines MR-positiven Zelltyps in der murine Milz</i>	46
3.1.2 <i>Identifikation des CD11c^{niedrig} F4/80^{hoch} Zellsubsets als Rote Pulpa Makrophagen</i>	49
3.1.3 <i>MR⁺ Rote Pulpa Makrophagen können lösliches Ovalbumin effektiv kreuzpräsentieren</i>	53
3.1.4 <i>Kreuzpräsentation durch RPM ist MR-abhängig</i>	55
3.1.5 <i>Batf3-unabhängige Kreuzpräsentation durch RPM</i>	56
3.1.6 <i>Molekulare Mechanismen der Kreuzpräsentation durch RPM</i>	58

3.1.7 RPM erschweren magnetische und durchflußzytometrische Zellaufreinigungen.....	64
3.1.8 Autofluoreszente RPM erschweren durchflußzytometrische Analysen.....	68
3.1.9 Immunologische Relevanz der Rote–Pulpa-Makrophagen.....	69
3.2 GENERIERUNG EINER MANNOSE-REZEPTOR TRANSGENEN MAUSLINIE	77
3.2.1 Übersicht.....	77
3.2.2 Klonierung der Mannose-Rezeptor Expressionskassette.....	77
3.2.3 Test der GFP2A-MR Expressionkassette in HEK293T-Zellen.....	84
3.2.4 Generierung und Test eines lentiviralen GFP2A-MR Vektors.....	86
3.2.5 Generierung von GFP2A-MR-transgenen embryonalen Stammzellen.....	90
3.2.6 Blastozysten-Injektion und Keimbahntransmission	92
3.2.7 Generierung einer Tie2-MR Mauslinie.....	93
4. DISKUSSION.....	98
4.1 ÜBERSICHT	98
4.2 IDENTIFIKATION DER RPM ALS MR-POSITIVER ZELLTYP IN MAGNETISCHEN ZELLAUFREINIGUNGEN.....	99
4.3 KREUZPRÄSENTATION DURCH ROTE PULPA MAKROPHAGEN	102
4.4 MOLEKULARE MECHANISMEN DER KREUZPRÄSENTATION DURCH RPM.....	105
4.5 IMMUNOLOGISCHE <i>IN VIVO</i> RELEVANZ DER RPM	108
4.6 GENERIERUNG EINER MR-TRANSGENEN MAUSLINIE	113
4.7 ZUSAMMENFASSUNG	118
5. LITERATUR	119
6. ANHANG.....	131
6.1 SEQUENZIERUNGEN	131
6.1.1 pCMV-GFP2A-MR: GFP2A-Fragment.....	131
6.1.2 pCMV-GFP2A-MR: MR1-Fragment.....	136
6.1.4 pCMV-GFP2A-MR: MR3-Fragment.....	146
6.1.5 pCMV-GFP2A-MR: MR4-Fragment.....	151
6.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	156
6.3 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	157
7. DANKSAGUNG	162

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Der Körper wird durch eine Vielzahl von Effektorzellen und –molekülen, die in ihrer Gesamtheit das Immunsystem ausmachen, vor den schädlichen Einflüssen von Mikroben, Pathogenen oder Toxinen geschützt. Obwohl Immunzellen besonders in lymphoiden Organen wie Milz, Knochenmark und Lymphknoten konzentriert sind, ist der komplette Körper von einem Netzwerk dieser Zellen durchzogen, die bei Bedarf eine Immunantwort anstoßen und den Körper schützen können.

Nach ihrer Funktion werden Immunzellen entweder dem innatem oder dem adaptiven Immunsystem zugerechnet. Das innaete Immunsystem wehrt Pathogene rapide und unspezifisch ab, während das adaptive Immunsystem hingegen einige Tage benötigt, um vollständig aktiv zu werden, dafür aber hochspezifisch ist und über eine Gedächtnisfunktion verfügt, die bei Reinfektion rapide und spezifisch verläuft^{1,2}.

1.1.1 Die innaete Immunantwort

Das innaete Immunsystem ist für die unspezifische und sofortige Abwehr von Pathogenen verantwortlich. Potenzielle Bedrohungen für den Körper werden hier über konservierte Muster auf Pathogenen erkannt und unschädlich gemacht, bevor sie dem Körper Schaden zufügen können³. Diese Aufgabe wird unter anderem von Granulozyten, NK-Zellen und Makrophagen wahrgenommen (Abb. 1), die in der Lage sind, in den Körper eingedrungene Pathogene zu phagozytieren und abzutöten. Durch Zellen der innaeten Immunabwehr wird ein Großteil der Pathogene unmittelbar nach Eintritt in den Körper beseitigt und so eine Infektion verhindert⁴. Gelingt es der innaeten Immunabwehr in den ersten Tagen nicht, die Pathogene vollständig zu eliminieren, so kommt es zur einer Infektion und zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems. Dies geschieht durch Zellen wie Makrophagen oder dendritische Zellen, die eine Schnittstelle zwischen dem innaeten und adaptiven Immunsystem darstellen (Abb. 1)^{5,6}.

1.1.2 Die adaptive Immunantwort

Das adaptive Immunsystem benötigt eine Latenzzeit von mehreren Tagen, bevor es eine protektive Wirkung entfalten kann. Dann allerdings ist die Immunantwort spezifisch für bestimmte Pathogene und bietet durch ihr immunologisches Gedächtnis einen Langzeitschutz vor wiederkehrenden Infektionen. Das adaptive Immunsystem besteht aus Zellen der humoralen und der zellassozierten Immunabwehr, den B- und T-Lymphozyten (Abb. 1-1). Die Funktion dieser Zellen wird von Makrophagen und dendritischen Zellen (DC) gesteuert, die sowohl dem innaten als auch dem adaptiven Immunsystem zugerechnet werden können. Welche Zellen des adaptiven Immunsystems aktiviert werden, hängt maßgeblich von der Lokalisation des Pathogens ab: Während Zellen der humoralen Immunantwort für die Abwehr von extrazellulären Pathogenen und Toxinen verantwortlich sind, dient die zellassozierte Immunantwort dem Schutz des Organismus vor intrazellulären Bedrohungen, wie beispielsweise Virusinfektionen, Tumoren oder bestimmten Parasiten². Die humorale Immunantwort wird durch Antikörper vermittelt, die von aktivierten B-Zellen produziert werden⁷. Antikörper binden Toxine sowie Pathogene, machen diese dadurch unschädlich⁸, erleichtern deren Phagozytose⁹ und tragen zur Aktivierung des Komplementsystems bei¹⁰.

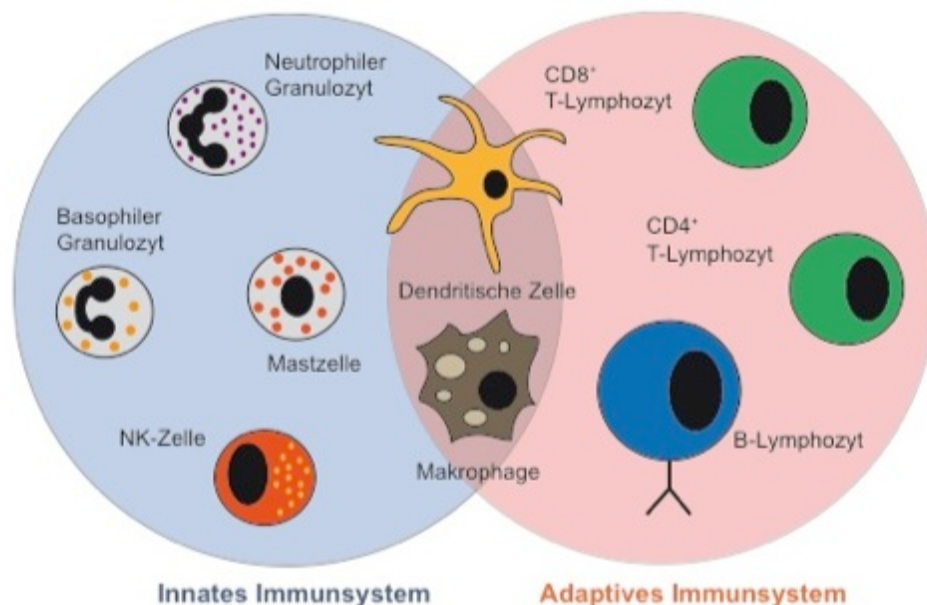


Abbildung 1-1: Vereinfachte Übersicht der Zellen des innaten und adaptiven Immunsystems. Zellen innerhalb des linken Kreises werden der innate Immunabwehr zugeordnet, während die Zellen die im rechten Kreis abgebildet sind zum adaptiven Immunsystem zählen. Dendritische Zellen und Makrophagen erfüllen sowohl innate als auch adaptive Funktionen und stellen ein Bindeglied zwischen den beiden Elementen des Immunsystems dar (modifiziert nach: Dranoff, Cytokines in cancer pathogenesis, Nature Reviews Cancer, 2004).

Da für eine effektive humorale Abwehr die Pathogene für Antikörper zugänglich sein müssen, ist diese gegen intrazelluläre Pathogene wie Viren, die bereits Zellen infiziert haben, Parasiten oder entartete Tumorzellen nicht effektiv. Diese Pathogene werden von der zellassozierten Immunabwehr bekämpft, die durch zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) vermittelt wird. Diese $CD8^+$ T-Lymphozyten können infizierte oder entartete Zellen erkennen und diese zusammen mit dem Pathogen eliminieren¹¹. Damit CTL infizierte Zellen wahrnehmen können, präsentiert jede Zelle auf MHC I-Molekülen Bruchstücke zelleigener, intrazellulärer Proteine. Dies ermöglicht es den T-Zellen, die zelluläre Proteinexpression zu kontrollieren. Infizierte oder entartete Zellen können so über die Expression von körperfremden oder nicht-natürlichen Proteinen identifiziert und anschließend eliminiert werden¹².

1.2 T-Zellen und Antigenpräsentation

1.2.1 Grundlagen der Antigenpräsentation

Mit Ausnahme von Erythrozyten und Thrombozyten degradieren alle körpereigenen Zellen durchgehend einen kleinen Teil ihrer Proteine und beladen MHC I-Moleküle mit den entstehenden Peptidbruchstücken. Die mit dem Peptid beladenen MHC I Moleküle werden anschließend auf die Oberfläche der Zelle transportiert, wo sie von T-Lymphozyten erkannt werden und diesen Informationen über die Proteinexpression der Zelle vermitteln (Abb. 1-2)^{2,12}.

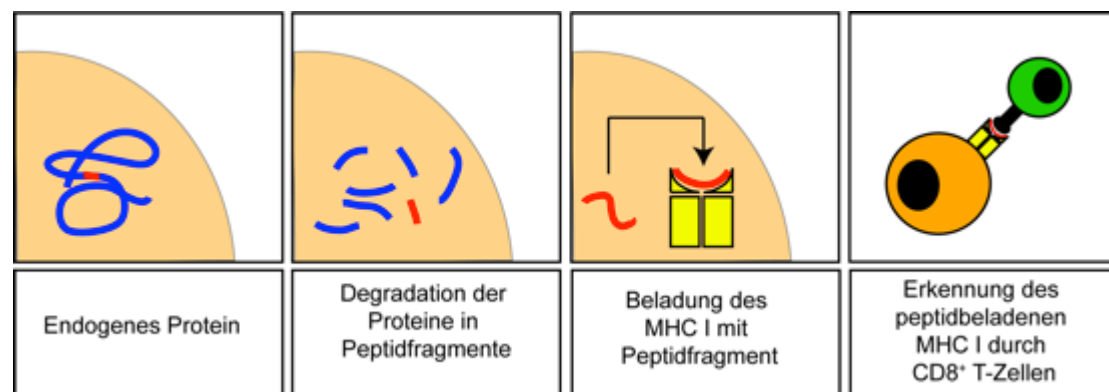


Abbildung 1-2: Funktionsweise zytotoxischer T-Lymphozyten. Zelleigene Proteine (blau) werden proteolytisch in Bruchstücke abgebaut, eines dieser Fragmente (rot) wird auf ein MHC I Molekül geladen, an die Zelloberfläche transportiert, und kann dort von einer CTL mit Hilfe ihres T-Zellrezeptors (schwarz) erkannt werden (modifiziert nach: Janeway, Immunobiology, 7. Edition, 2007)

T-Zellen erkennen diese MHC I-gebundenen Peptidbruchstücke mit ihrem T-Zellrezeptor (Abb. 1-2). Während ihrer Entwicklung entsteht in jeder T-Zelle durch genetische Rekombinationsvorgänge ein Rezeptor mit einer einzigartigen Spezifität^{2,13}. Durch die große Anzahl an T-Zellen im Körper, gibt es daher statistisch gesehen für nahezu jedes Peptidbruchstück mindestens eine T-Zelle die dieses erkennen kann². Da T-Zellen, die über einen Rezeptor mit einer hohen Affinität für körpereigene Peptide verfügen, bereits frühzeitig in ihrer Entwicklung im Thymus inaktiviert werden (Zentrale Toleranz)¹⁴ oder durch andere Zellen in ihrer Funktion unterdrückt werden (Periphere Toleranz)¹⁵, zirkulieren im Körper hauptsächlich T-Zellen die auf körperfremde oder entartete Peptide reagieren können. Dies stellt sicher, dass die CTL nur Zellen angreifen die körperfremde (wie z.B. virale) oder entartete Proteinbruchstücke (von mutierten Tumorgenen) auf ihren MHC I-Molekülen präsentieren².

Da zytotoxische T-Lymphozyten im Körper potentiell großen Schaden anrichten können, wenn gesunde bzw. nicht infizierte Zellen fälschlicherweise als Ziele erkannt und eliminiert werden, ist die Aktivität dieser Zellen streng kontrolliert. Wie wichtig diese Kontrolle der CTL-Aktivität ist, zeigen verschiedene Autoimmunerkrankungen die durch fehlerhaft aktivierte CTL entstehen, wie beispielsweise Diabetes mellitus Typ-I, bei der Insulinproduzierenden, pankreatische Inselzellen von CTL erkannt und getötet werden oder Multiple Sklerose, bei der Myelin-produzierende Gliazellen angegriffen werden^{16,17}.

Aus diesem Grund müssen alle T-Zellen aktiviert werden, bevor sie ihre zytotoxische Funktion ausüben können. Nicht-aktivierte T-Zellen werden als naive T-Zellen, aktivierte CD8⁺ T-Zellen die Effektorfunktionen ausüben können als zytotoxische T-Zellen bezeichnet. Diese Aktivierung übernehmen sogenannte professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APC)^{18-20,2}.

1.2.2 Professionelle Antigen Präsentierende Zellen

Die klassischen APC sind dendritische Zellen, ein Zelltyp der in vielen Ausprägungen in nahezu allen Organen vorkommt, besonders aber in sekundären lymphatischen Organen (SLO), wie Milz oder Lymphknoten, konzentriert ist. Neben den dendritischen Zellen zählen auch Makrophagen und B-Zellen zu den APC^{2,18-20}.

Die Aktivierung naiver T-Zellen findet in den SLO statt. Naive T-Zellen patrouillieren durchgehend die Lymphe und das Blut, passieren dabei die SLO und haben in diesen Kontakt zu zahlreichen APC. Wenn eine dieser APC ein Antigen präsentiert, das vom T-Zellrezeptor der T-Zelle erkannt wird, so bleibt diese in Kontakt mit der APC und es besteht je nach Stärke der stimulatorischen Signale die Möglichkeit dass die T-Zelle durch die APC aktiviert wird und proliferiert. Sämtliche T-Zellen die durch diese Proliferation entstehen sind Klone der ursprünglichen T-Zelle und haben daher die gleiche Spezifität. Aus diesem Grund wird in diesem Zusammenhang von klonaler Expansion gesprochen^{2,18,21}. Neben den CD8⁺ T-Zellen, die Antigene auf dem MHC I-Molekül erkennen, gibt es CD4⁺ T-Zellen die Peptide auf dem MHC II-Molekül wahrnehmen. Diese stehen jedoch nicht im Fokus dieser Arbeit².

1.2.3 Klassische Antigenpräsentation und Kreuzpräsentation

Zur Aktivierung einer T-Zelle präsentiert eine APC entweder ihr zelleigenes oder externes, phagozytiertes Antigen. Daher gibt es zwei klassische Wege der Antigen-Präsentation: Zelleigene Peptide werden auf MHC I-Moleküle geladen und an CD8⁺ T-Zellen präsentiert, während externe Antigene, die von der APC aufgenommen wurden, auf MHC II-Molekülen an CD4⁺ T-Zellen präsentiert werden (Abb. 1-3)²². Diese beiden klassischen Antigen-Präsentationswege haben allerdings eine grundsätzliche Schwachstelle: Da nur endogenes Antigen auf MHC I-Molekülen an CD8⁺ T-Zellen präsentiert werden kann, könnten APC nur eine zytotoxische T-Zellantwort gegen einen Virus induzieren wenn dieser die APC befallen hat. Entartete Tumorproteine oder Virusinfektionen in anderen Zellen könnten nicht zu einer solchen T-Zellantwort führen, da dieses Antigen niemals von einer APC auf MHC I-Molekülen präsentiert werden könnte²³. Aus diesem Grund existiert ein nicht-klassischer Antigenpräsentationsweg, der Kreuzpräsentation genannt wird. Die Aktivierung naiver T-Zellen durch Kreuzpräsentation und deren Differenzierung in zytotoxische T-Zellen bezeichnet man als „Cross-priming“. Dies wurde zum ersten Mal 1976 von Michael Bevan beschrieben²⁴. Bei kreuzpräsentiertem Antigen handelt es sich um exogenes Antigen, das von einer APC aufgenommen und nicht wie beim klassischen Weg auf MHC II-sondern auf MHC I-Molekülen an CD8⁺ T-Zellen präsentiert wird (Abb. 1-3). Dies ermöglicht es der kreuzpräsentierenden APC zytotoxische T-Zellantworten gegen Tumor- oder Virus-Antigene zu etablieren, die nicht aus einer APC stammen²³.

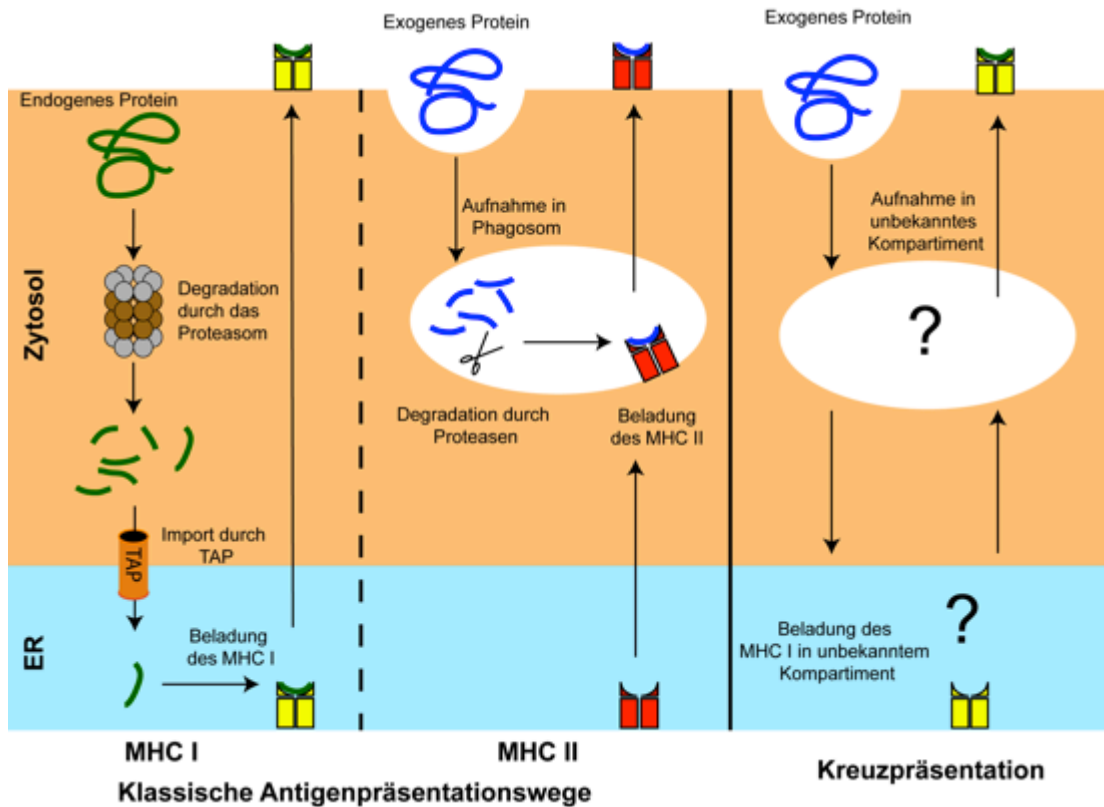


Abbildung 1-3: Klassische Antigenpräsentationswege und Kreuzpräsentation. Schematische Darstellung der klassischen Antigenpräsentation auf MHC I (links), MHC II (Mitte) oder der Kreuzpräsentation (rechts). Endogenes Protein ist grün dargestellt, exogenes blau. Das Zytosol der Zelle wird durch einen orangen Hintergrund verdeutlicht, während Prozesse die im endoplasmatischen Retikulum (ER) ablaufen, vor einem blauen Hintergrund dargestellt sind. Die Beladung der Peptide erfolgt entweder auf MHC I- (gelb) oder MHC II-Moleküle (rot). Modifiziert nach: Heath et al., Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance, Nature Reviews Immunology, 2001.

Nicht alle APC sind zu dieser speziellen Form der Antigenpräsentation fähig. Zwar können nahezu alle APC exogenes Antigen auf dem MHC II Komplex an $CD4^+$ T-Zellen präsentieren, es existieren jedoch nur einige spezielle APC-Subtypen, zu denen beispielsweise $CD8^+$ DEC205⁺ Milz-DC²⁵, oder $CD103^+$ Gewebe-DC zählen²⁶, die in der Lage sind Antigen zu kreuzpräsentieren. Die Beobachtungen der letzten Jahre weisen darauf hin, dass verschiedene APC-Subtypen auf die Aktivierung eines bestimmten T-Zelltyps spezialisiert sind, und den anderen Subtyp deutlich weniger effektiv aktivieren können. So können $CD8^+$ DEC205⁺ Milz-DC schon geringe Antigenmengen sehr effektiv an $CD8^+$ T-Zellen kreuzpräsentieren. $CD8^-$ $CD11b^+$ Milz-DC können dies hingegen nur sehr schlecht, sind dafür den $CD8^+$ DEC205⁺ DC in der Präsentation auf MHC II und der Aktivierung von $CD4^+$ T-Zellen deutlich überlegen²⁷.

1.3 Molekulare Mechanismen der Kreuzpräsentation

1.3.1 Vakuoläre und zytosolische Kreuzpräsentation

Warum es immunologisch sinnvoll ist dass bestimmte APC besonders effektiv kreuzpräsentieren, oder welche molekularen Mechanismen dieser Effektivität zur Grunde liegen ist zur Zeit noch relativ unklar. Wie bei der klassischen Antigenpräsentation sind auch bei der Kreuzpräsentation gewisse mechanistische Prozessierungsschritte zwingend notwendig: Diese beginnt mit der Aufnahme des Antigens in die APC und mit dem Transport in ein membranumschlossenes Kompartiment. Als nächstes muss das Antigen degradiert und auf den MHC-Komplex geladen werden, bevor dieser Komplex zurück an die Zelloberfläche transportiert wird^{28,29}.

Bezüglich dieser molekularen Abläufe werden aktuell zwei verschiedene Modelle kontrovers diskutiert: Dies ist zum einem das Modell der vakuolären Kreuzpräsentation und zum anderen das Modell der zytosolischen Degradierung. Die beiden Modelle unterscheiden sich vor allem bezüglich der Fragen, in welchem Kompartiment der Zelle die jeweiligen Schritte ablaufen, welche Proteine die Antigene degradieren und welche wiederum an den verschiedenen Transportvorgängen beteiligt sind.

Im Modell der **vakuolären Kreuzpräsentation** finden sämtliche Prozessierungsschritte der Antigenpräsentation in einem membranumschlossenen Kompartiment statt. Zunächst wird das Antigen in ein Phagosom oder Lysosom aufgenommen. Dort erfolgt die Generierung der Peptidbruchstücke durch lysosomale Proteasen und anschließend die Beladung des MHC I Komplexes. Die beladenen MHC I Komplexe werden daraufhin aus dem Phagosom zurück an die Zelloberfläche transportiert (Abb. 1-4)²⁸⁻³⁰. Diese Art der Antigenpräsentation kann aus diesem Grund durch Inhibitoren lysosomaler Proteasen, nicht aber durch Inhibition des zytosolischen Proteasoms geblockt werden³¹. Weiterhin ist die vakuoläre Form der Antigenpräsentation effektiver wenn das Phagosom angesäuert wird, da dies die Aktivität der Proteasen erhöht^{29,32}. Da kein Transport des Antigens über eine Kompartimentsgrenze notwendig ist, ist die Präsentation unabhängig von Antigentransportern, wie beispielsweise dem Molekül TAP (transporter associated with antigen processing)³³.

Vakuoläre Kreuzpräsentation wurde bisher vor allem in in vitro differenzierten APC beschrieben. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass primäre dendritische Zellen mit sinkendem phagosomalen pH-Wert schlechter und nicht besser kreuzpräsentieren³⁴⁻³⁷. Ausserdem wurde für dendritische Zellen eine Proteasom- und TAP-abhängige Kreuzpräsentation beschrieben³⁸⁻⁴⁰. Dies steht im Widerspruch zu dem Modell der vakuolären Kreuzpräsentation. Daher gibt es ein alternatives Modell, dass die angesprochenen Widersprüche adressiert.

Im Modell der **zytosolischen Degradierung** werden die Peptidfragmente nicht in den Phagosomen bzw Endosomen generiert. Stattdessen wird das Antigen in das Zytosol der Zelle transferiert und dort durch das Proteasom degradiert⁴¹⁻⁴⁴. Die entstandenen Fragmente werden dann durch das Protein TAP in ein Kompartiment importiert, in welchem die Peptide auf MHC I-Moleküle geladen werden (Abb. 1-4). In der Literatur gibt es zahlreiche Beispiele, die demonstrieren, dass Kreuzpräsentation durch dendritische Zellen sowohl vom Proteasom, als auch von TAP abhängt^{29,38-40}. Ebenso säuern dendritische Zellen im Gegensatz zu Makrophagen, die für gewöhnlich nicht so effektiv wie DC kreuzpräsentieren können, ihre Phagosomen/Endosomen kaum an. Wenn artifiziell eine Ansäuerung induziert wird, verlieren die Zellen ihre Fähigkeit zur Kreuzpräsentation³⁴⁻³⁷. Dies spricht gegen eine vakuoläre Kreuzpräsentation, bei der eine Degradation des Antigens durch lysosomale Proteasen erfolgt, die bei niedrigem pH-Wert besonders effektiv arbeiten würden. Unklar und äusserst kontrovers ist allerdings noch, in welches Kompartiment die Peptidfragmente nach der Degradierung durch das Proteasom TAP-abhängig importiert werden^{28,29}. Da sich die MHC I-Lademaschinerie im Endoplasmatischen Retikulum (ER) befindet, wurde lange Zeit angenommen, dass die generierten Peptide in das ER importiert werden. Diese Maschinerie importiert bei der klassischen Präsentation von endogenem Antigen zytosolische Peptide durch TAP in das ER, um sie dort auf ein MHC I-Molekül zu laden. Es ist also möglich, dass die Peptide nach dem Export aus dem Phagosom/Endosom und der Degradierung durch das Proteasom die bestehende ER-Maschinerie nutzen⁴⁵. Problematisch ist in diesem Zusammenhang jedoch die Entfernung zwischen den Phagosomen/Endosomen und dem ER. Antigene die aus einem Endosom exportiert wurden, das nicht in der Nähe des ER war, müssten eine erhebliche Entfernung durch das Zytosol zurücklegen um Kontakt zu TAP und damit zur ER-Lademaschinerie zu bekommen. Dies würde den Prozess der Kreuzpräsentation erschweren und seine Effektivität senken.

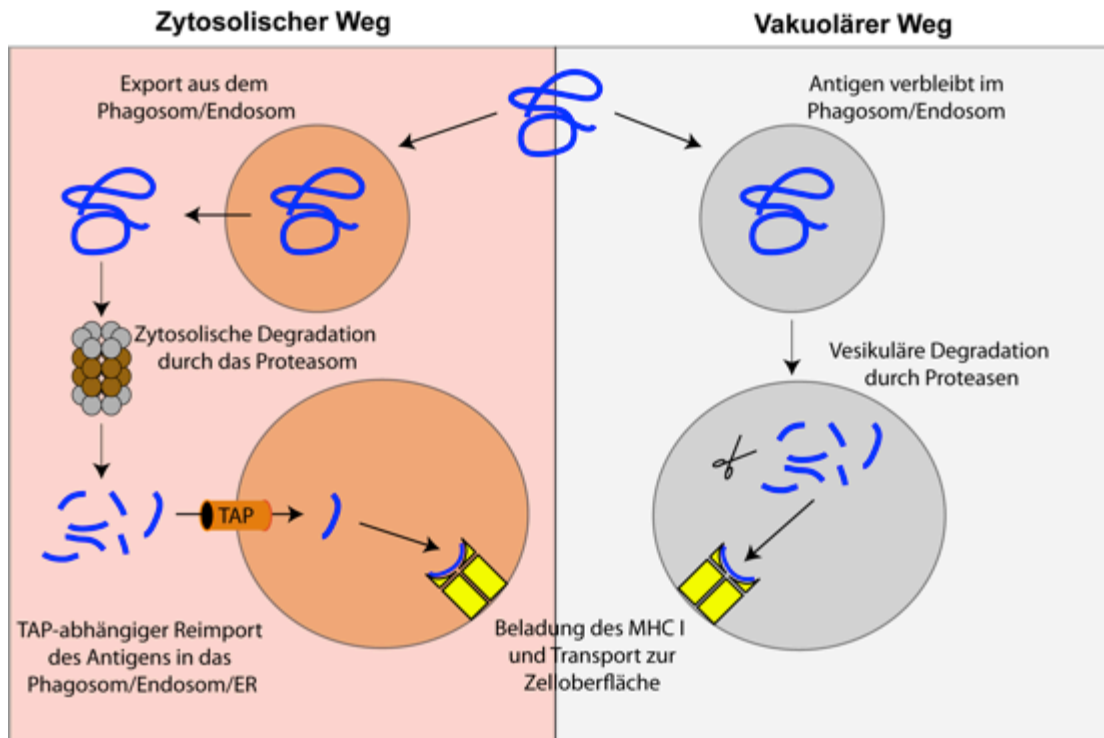


Abbildung 1-4: Molekulare Mechanismen der Kreuzpräsentation. Schematische Darstellung des zytoplasmatischen (links) oder vakuolären Präsentationsweges. Protein oder Peptid ist blau dargestellt, der gelbe Komplex stellt ein MHC I-Molekül dar. Modifiziert nach: Rock et al., Proteases in MHC Class I Presentation and Cross-Presentation, The Journal of Immunology, 2010.

1.3.2 Kreuzpräsentation in stabilen, frühen Endosomen

Wie bereits dargestellt, ist im Modell der zytoplasmatischen Degradierung unklar, in welches Kompartiment Peptidfragmente nach ihrer Generierung im Zytosol importiert werden. Es wird vermutet, dass die Peptide über den Antigenexporter TAP in das ER aufgenommen werden⁴⁵. Eine weitere Möglichkeit ist, dass der Reimport der Peptidfragmente nicht in das ER, sondern in das Endosom/Phagosom erfolgt, aus dem es ursprünglich exportiert wurde^{40,46}. Burgdorf et al. konnten demonstrieren, dass ein solcher Mechanismus von Knochenmark-DC (BM-DC) zur Kreuzpräsentation von löslichem Ovalbumin verwendet wird. Voraussetzung für die Kreuzpräsentation eines Antigens durch BM-DC war dessen Transport in ein spezialisiertes, endosomales Kompartiment. In diesem erfolgte später die Beladung der im Zytosol degradierten und reimportierten Peptide auf den MHC I Komplex^{47,48}. Auch andere Gruppen konnten in frühen Endosomen bzw. Phagosomen Komponenten der ER-Lademaschinerie nachweisen^{49,50}.

Burgdorf et al. konnten demonstrieren, dass der Zugang des Antigens zu diesem Kompartiment der entscheidende Schritt ist, der bestimmt ob ein Antigen kreuzpräsentiert wird. Der Zugang zu den verschiedenen Kompartimenten der Zelle wird in BM-DC über die Art der Antigen-Aufnahme diktiert: Lösliches Ovalbumin wird von BM-DC hauptsächlich über den Mannose-Rezeptor (MR) aufgenommen⁵¹. Parallel dazu nehmen die Zellen kleinere Mengen Antigen über Pinozytose auf. Ausschließlich das über den MR aufgenommene Ovalbumin wird an CD8⁺ T-Zellen mit einem transgenen, Ovalbumin-spezifischen T-Zellrezeptor (OT-I) kreuzpräsentiert. Pinozytiertes Antigen hingegen, wird ausschließlich an CD4⁺ T-Zellen mit einem transgenen, Ovalbumin-spezifischen T-Zellrezeptor (OT-II) präsentiert⁴⁷. *MR*^{-/-} BM-DC sind daher nicht in der Lage lösliches Ovalbumin zu kreuzpräsentieren⁵¹. Die klassische Präsentation auf MHC II ist in diesen Zellen hingegen nicht beeinflusst, da sie im Gegensatz zur Kreuzpräsentation lediglich auf die Aufnahme des Antigens durch Pinozytose angewiesen ist. Ebenso wie MR-abhängig endozytiertes Antigen gelangt auch das pinozytierte Antigen in ein spezialisiertes Kompartiment. Dabei handelt es sich um Lysosomen, die auf die Klasse II Antigenpräsentation spezialisiert sind (Abb. 1-5)⁴⁷. Bereits die Art der Antigenaufnahme entscheidet also, welchem Präsentationsweg das Antigen zugeführt wird. Weitere Veröffentlichungen beschreiben neben dem MR auch andere Rezeptoren, die das Antigen bevorzugt speziellen Präsentationswegen zuführen^{27,52-59}.

1.3.3 Die Rolle des MR in der Kreuzpräsentation durch BM-DC

Der MR transportiert gebundenes Ovalbumin nach Endozytose in ein stabiles, frühes endosomales Kompartiment, das auf Kreuzpräsentation spezialisiert ist, während pinozytiertes Antigen Phagolysosomen zugeleitet wird, in denen die klassische MHC Klasse II-Präsentation stattfindet.

Burgdorf et al. konnten zusätzlich zeigen dass das Antigen aus den frühen Endosomen in das Zytosol der Zelle exportiert wird. Eine Polyubiquitinierung des MR führt zur Rekrutierung der AAA-ATPase p97, welche die Energie liefert, um das Antigen aus dem Endosom in das Zytosol der Zelle zu exportieren⁶⁰. Im Zytosol wird das Antigen vom Proteasom degradiert und durch den Antigentransporter TAP in das frühe Endosom reimportiert. Anschließend erfolgt die Beladung der MHC I-Moleküle mit den im Zytosol generierten Peptiden und der Transport der MHC I-Peptid-Komplexe an die Zelloberfläche^{47,48}.

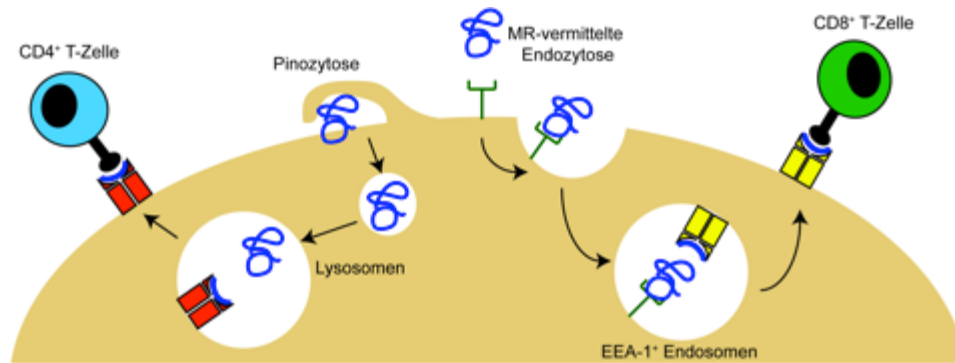


Abbildung 1-5: Antigenpräsentation in BM-DC. Dargestellt sind die Antigenpräsentation nach Aufnahme des Antigens über Pinozytose (links) oder MR-vermittelter Endozytose (rechts). Das exogene Antigen (blau) wird zunächst in ein lysosomales oder endosomales Kompartiment befördert. Die Degradierung des Antigens ist nicht dargestellt. Nach Beladung des MHC I (gelb) oder MHC II erfolgt der Transport der Komplexe an die Zelloberfläche und die Präsentation an $CD4^+$ T-Zellen (hellblau) oder $CD8^+$ T-Zellen (grün). Modifiziert nach: Burgdorf et al., *Distinct Pathways of Antigen Uptake and Intracellular Routing in $CD4$ and $CD8$ T Cell Activation*, *Science*, 2007.

Die Untersuchungen von Burgdorf et al. zeigen deutlich, dass in BM-DC die Art der Antigenaufnahme diktiert, in welches zelluläre Kompartiment das Antigen transportiert wird. Dieses Kompartiment bestimmt auf welche Art das Antigen präsentiert wird. Beispielsweise ist das frühe Endosom ein auf Kreuzpräsentation spezialisiertes Kompartiment, in dem sowohl Reimport der Peptide als auch Beladung der MHC I-Moleküle stattfinden. Bei BM-DC handelt es sich allerdings nicht um physiologisch relevante kreuzpräsentierende Zellen. Ob es in den SLO einen Zelltypen gibt der den von Burgdorf beschriebenen Mechanismus nutzt ist noch nicht bekannt. Daher ist noch nicht aufgeklärt ob alle Zellen über eine Kreuzpräsentationsmaschinerie in den frühen Endosomen verfügen und den nicht-kreuzpräsentierenden Zellen lediglich die passenden Oberflächen-Rezeptoren fehlen um diese mit Antigenen zu versorgen.

1.4 Virale „Immune-Escape“ Mechanismen

Viren nutzen zahlreiche Mechanismen um der Immunabwehr eines Wirtes zu entgehen. Dazu zählt unter anderem die Produktion von viralen Proteinen, welche die Induktion des Komplementsystems^{61,62}, die Interferon-Produktion^{61,63} oder eine Zytokin-Sekretion infizierter Zellen unterdrücken^{64,65}. Um zu verhindern, dass die im Zytosol von infizierten Zellen vorhandenen viralen Proteine an zytotoxische T-Zellen präsentiert werden, interferieren

zahlreiche Viren ebenfalls mit der klassischen Antigenpräsentation endogener Proteine. Hierbei verhindern virale Proteine wie beispielsweise das adenovirale U3 den Transport von MHC I Molekülen aus dem ER an die Zelloberfläche^{62,66}. Zusätzlich können sie, wie das vom HCMV-Virus produzierte US6-Protein⁶⁷, die Translokation von TAP-gebundenen Peptiden in das ER, verhindern. An Transferrin gebundene US6-Proteine wurde von Burgdorf et al. genutzt um spezifisch endosomale TAP-Komplexe zu inhibieren⁴⁸. Da dieses Protein zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Promotionsarbeit nicht mehr zur Verfügung stand, werden hier Transferrin-konjugierte UL49.5-Peptide⁶⁸ zur Inhibition endosomaler TAP-Komplexe genutzt.

1.5 Professionelle Antigen-präsentierende Zellen in der murinen Milz

Die Milz ist das größte, sekundäre lymphatische Organ und erfüllt wichtige immunologische Funktionen. Zu diesen zählen unter anderem die Induktion systemischer CTL-Antworten gegen Viren und Tumore durch Kreuzpräsentation, sowie die Phagozytose und Degradierung gealterter Erythrozyten und an diese gebundenes Komplement durch Makrophagen.

Die größte Population professioneller antigen-präsentierender Zellen in der Milz sind – neben den B-Zellen – die konventionellen dendritischen Zellen. Diese zeichnen sich durch eine hohe Expression des Markers CD11c aus und werden in zwei Subtypen unterteilt: Zum einen CD8⁺ DEC205⁺, zum anderen CD8⁻ CD11b⁺ dendritische Zellen^{29,69}. Während die CD8⁻ CD11b⁺ dendritische Zellen hauptsächlich für die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen verantwortlich sind, sind CD8⁺ DEC205⁺ dendritische Zellen auf die Kreuzpräsentation von zellassoziertem und löslichem Antigen spezialisiert^{25,27}

Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass diese Kreuzpräsentation essentiell für die Bekämpfung von viralen Infektionen, Parasiten und Tumoren ist. Weiterhin ist sie notwendig um im Rahmen der peripheren Toleranz die Aktivität selbst-reaktiver T-Zellen durch Kreuzpräsentation von Selbstantigen zu unterdrücken. Die Differenzierung dieser CD8⁺ DEC205⁺ DC ist vom Transkriptionsfaktor Batf3 abhängig. Batf3-defiziente Mäuse sind nicht in der Lage diese Zellen zu differenzieren und sind aus diesem Grund nicht in der Lage das Wachstum von Fibrosarkomen zu kontrollieren oder eine relevante CTL gegen West-Nil Virusinfektionen zu entwickeln. Da neben den CD8⁺ DEC205⁺ DC bisher kein weiterer kreuzpräsentierender Zelltyp in der murinen Milz beschrieben wurde, wird davon ausgegangen, dass der

Transkriptionsfaktor Batf3 essentiell für Kreuzpräsentation in der murinen Milz ist. Neben den konventionellen dendritischen Zellen gibt es in der Milz drei Makrophagen-Populationen. Zu diesen zählen die Marginalzonen (MZM)- und Metallophilen Makrophagen (MMM), sowie die Rote Pulpa Makrophagen (RPM)⁷⁰. Für die MZM und MMM sind zahlreiche immunologische Funktionen beschrieben, wie der Transfer von Antigen an CD8⁺ DCs oder die Suppression von Immunantworten gegen Antigen aus apoptotischen Zellen^{71,72}. Da allerdings beschrieben wurde, dass diese Zellen nicht in der Lage sind zu kreuzpräsentieren^{73,74}, stehe sie nicht im Fokus dieser Arbeit. Die RPM wurden bisher immunologisch kaum untersucht. Daher ist auch unklar ob diese Zellen in der Lage sind Antigen zu kreuzpräsentieren oder welche immunologische Funktion sie wahrnehmen. Ebenso wie bei den CD8⁺ DC ist auch die Differenzierung der RPM auf einen bestimmten Transkriptionsfaktor angewiesen. SpiC-defiziente Mäuse, bei denen der entsprechende Transkriptionsfaktor deletiert wurde, können daher keine RPM differenzieren⁷⁵.

1.6 Die *in vivo* Relevanz der MR-abhängigen Kreuzpräsentation

Eine *in vivo* Relevanz des MR in der *in vivo* Kreuzpräsentation konnte bereits 2006 von Burgdorf et al. für lösliches, nicht aber für zell-assoziiertes Ovalbumin beschrieben werden. Burgdorf et al konnten zeigen, dass in *MR*^{-/-} Mäusen, denen intravenös (i.v.) lösliches Ovalbumin injiziert wurde, die Aktivierung von adoptiv transferierten OT-I Zellen sowohl in Milz, als auch in Knochenmark und Lymphknoten verringert war⁵¹. Bisher konnte allerdings nicht festgestellt werden, welche Zellen für diesen Prozess verantwortlich sind oder in welchem immunologischen Kontext diese eine Rolle spielen. Eine Untersuchung von Burgdorf hat gezeigt, dass CD11c⁺ Zellen der murinen Milz den MR exprimieren und in der Lage sind MR-abhängig Ovalbumin aufzunehmen und zu kreuzpräsentieren. Die Beladung des MHC I-Komplexes erfolgt in diesen Zellen ähnlich wie in BM-DC in einem endosomalen Kompartiment^{47,76}. Diese Interpretation wird von einer Veröffentlichung in Frage gestellt, die berichtet, dass der MR weder in CD11c⁺ CD8⁺ noch in CD11c⁺ CD8⁻ dendritischen Zellen exprimiert wird und nicht für die Kreuzpräsentation von löslichem Ovalbumin durch diese Zellen notwendig ist. Segura et al. konnten in dieser Publikation demonstrieren, dass inflammatorische dendritischen Zellen im Gegensatz zu konventionellen dendritischen Zellen den MR exprimieren und zur Kreuzpräsentation nutzen⁷⁷.

Die Beobachtungen, dass der MR keine Rolle in der homöostatischen Kreuzpräsentation durch konventionelle dendritische Zellen spielt, stehen in direktem Gegensatz zu den Befunden von Burgdorf et al. Ein Großteil dieser Befunde wurde in mit GM-CSF differenzierten BM-DC erhoben, die tatsächlich ein besseres Modell für inflammatorische als für konventionelle DC sind. Diese Befunde wurden durch die Beobachtungen von Segura et al. bestätigt. Bezüglich der MR-Expression und Funktionalität in murinen CD11c-positiven Milzzellen in der Homöostase waren die Befunde allerdings kontrovers. Somit bleibt die Frage unbeantwortet, welcher Zelltyp *in vivo* den MR zur Kreuzpräsentation von löslichem Ovalbumin nutzt. Diese Frage soll im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden.

1.7 Zellbiologische Voraussetzungen der Kreuzpräsentation

Die molekularen Mechanismen der Kreuzpräsentation konnten bisher nicht vollständig aufgeklärt werden. Damit ist ebenfalls nicht klar, welche zellbiologischen Besonderheiten eine kreuzpräsentierende Zelle definiert und von ihrem nicht-kreuzpräsentierenden Gegenpart unterscheidet²⁸.

Da nur sehr wenige Zellen zur Antigenpräsentation auf MHC II fähig sind und dafür eine umfangreiche, intrazelluläre Maschinerie notwendig ist, wurde bisher vermutet, dass dies bei der Kreuzpräsentation ebenfalls der Fall sein kann^{78,79}. Demnach müssten kreuzpräsentierende Zellen bezüglich der Antigen-Präsentationsmaschinerie ein anderes Genexpressionsprofil aufweisen als nicht-kreuzpräsentierende Zellen. Veröffentlichungen, die diese These stützen, zeigen dass in CD8⁺ dendritischen Zellen mit Kreuzpräsentation assoziierte Moleküle wie TAP oder Sec61 stärker exprimiert werden als in CD8⁻ DC²⁷. Allerdings ist der Unterschied in der Expression der verschiedenen Moleküle zwischen den beiden Zelltypen zwar signifikant, aber nicht besonders groß. Weiterhin exprimieren auch CD8⁻ DC laut der IMMGEN Genexpressions-Datenbank vergleichbare Mengen TAP wie kreuzpräsentierende CD103⁺ Lungen-DC⁸⁰. Zusätzlich exprimieren alle nicht-kreuzpräsentierenden Zellen genügend TAP um die Präsentation von endogenem Antigen zu ermöglichen. Dies zeigt deutlich, dass es zwar Unterschiede in der endogenen Antigenpräsentationsmaschinerie gibt, diese aber möglicherweise nicht entscheidend sind, da auch kreuzpräsentierende Zelltypen ähnliche Variationen in der Expression dieser Moleküle aufweisen und über eine ausreichende Menge verfügen um die Präsentation von endogenem Antigen zu ermöglichen.

Daher ist es möglich, dass alle antigen-präsentierenden Zellen, möglicherweise sogar alle Körperzellen über eine endogene Maschinerie verfügen um Antigen zu kreuzpräsentieren. Die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation würde dann, wie von Burgdorf beschrieben⁴⁷, über die Expression endozytischer Rezeptoren reguliert, die den Zugang des Antigens zu dem auf Kreuzpräsentation spezialisierten Kompartiment ermöglichen. Demnach müsste es möglich sein nicht-kreuzpräsentierende Zellen, durch Expression der entsprechenden Rezeptoren, zur Kreuzpräsentation zu befähigen.

CD8⁻ dendritische Zellen werden als "nicht-kreuzpräsentierende" Zellpopulation angesehen, da die Zellen nicht in der Lage sind, lösliches Ovalbumin zu kreuzpräsentieren^{25,78}. Wenn das Antigen hingegen als Immunkomplex über den FcγRI aufgenommen wird, kann es effektiv kreuzpräsentiert werden. Da CD8⁻ dendritische Zellen vergleichbare Mengen lösliches und immunkomplexiertes Ovalbumin aufnehmen, ist nicht die Menge des aufgenommenen Antigens entscheidend⁸¹. Vielmehr deutet diese Beobachtung darauf hin, dass nicht der aufnehmende Zelltyp, sondern der zur Aufnahme des Antigen verwendete Rezeptor der entscheidende Faktor ist, der diktiert, ob das Antigen kreuzpräsentiert wird. Diese These wird auch durch Cresswell et al. gestützt, die durch artifizielle Expression eines FcγR nachweisen konnten, dass sogar nicht professionelle antigenpräsentierende Zellen wie HEK293T-Zellen effektiv kreuzpräsentieren können, wenn sie über den entsprechenden Rezeptor verfügen⁸².

Dabei ist es nach wie vor unklar, welches Kompartiment in diesen Zellen für die Kreuzpräsentation verantwortlich ist und ob alle Zelltypen auf diese Weise zur Kreuzpräsentation befähigt werden können²⁸. Es ist durchaus möglich, dass nur einige wenige Zelltypen durch die Expression des korrekten endozytischen Rezeptors zur Kreuzpräsentation fähig sind. Da bei den bisherigen Untersuchungen die endozytischen Rezeptoren in jeweils nur einem Zelltyp exprimiert wurden, haben diese Befunde keine Allgemeingültigkeit.

Um zu klären, ob dieses Phänomen auf eine Vielzahl von Zelltypen übertragbar ist und ob es sich bei dem kreuzpräsentierenden Kompartiment um die von Burgdorf beschriebenen frühen Endosomen handelt, sollte ein Mausmodell generiert werden, das Expression des MR in verschiedenen Zelltypen erlaubt. Mit diesem Modell könnte man dann in einer Vielzahl von

Zelltypen untersuchen ob die Anwesenheit eines mit Kreuzpräsentation assoziierten endozytischen Rezeptors die Zellen zur Kreuzpräsentation befähigt.

1.8 Zielsetzung der Doktorarbeit

Ziel dieser wissenschaftlichen Arbeit sollte sein, die *in vivo* Relevanz des MR zur Kreuzpräsentation aufzuklären. Dies sollte u.a. dadurch geschehen, dass eine MR-transgene Maus generiert wird, die eine Expression des MR in beliebigen Zelltypen ermöglichen sollte um zu unterscheiden, ob der Zelltyp oder die intrinsische Antigenprozessierungsfähigkeit der APC entscheidend ist.

Weiterhin sollte soll untersucht werden, ob in der murinen Milz eine CD11c-positive Zellpopulation existiert, die den MR exprimiert und zur Kreuzpräsentation von löslichem Ovalbumin nutzt.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Geräte

Gerät	Firma
Avanti J-20 XP Zentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld
Bechergläser, Messzylinder, Kolben	VWR, Darmstadt
Biofuge fresco	Thermo Scientific, Schwerte
Durchflußzytometer (FACS)	Becton Dickinson, Heidelberg
Durchlichtmikroskop	Leica, Wetzlar
Elektroporator GenePulser Xcell	BioRad, München
Entsorgungsbeutel	Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorfgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
FACS Röhrrchen	Sarstedt, Nümbrecht
FACS Röhrrchen (steril)	Becton Dickinson, Heidelberg
Falcon Röhrrchen (15ml und 50ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Feinwaage	Ohaus, Nänikon, Schweiz
Fluoreszenzmikroskop IX71	Olympus, Düsseldorf
Flüssigstickstofftank	MVE, Jüchen
Gefrierschrank (-20°C)	Thermo Scientific, Schwerte
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Scientific, Schwerte
Gelanalysersystem GelDoc	BioRad, München
Glasflaschen (200ml, 500ml und 1000ml)	Simax, Boca Raton, USA
Glaspipetten (5ml, 10ml und 20ml)	Hirschmann, Eberstadt
Heizblock	Unitek, Leutenbach
Inkubator (HERA cell 240)	Thermo Scientific, Schwerte
Inkubatoren	Thermo Scientific, Schwerte
Kanülen (23G, 26G und 27G)	Braun, Kronberg
Kryotom	
Kühlschrank (4°C)	Liebherr, Meinerzhagen
MACS Multistand (Magnet, Quadro MACS)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS Separation Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mauskäfige	Allentown, Aschaffenburg
Mauskäfige	Techniplast, Hohenpeissenberg
Multifuge 3 S-R	Thermo Scientific, Schwerte
Nanodrop Photometer	Thermo Scientific, Schwerte
Nitril Handschuhe (Micro touch)	Ansell, München

Nylon Filter (blau)	Becton Dickinson, Heidelberg
Objektträger und Deckgläser	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Parafilm	Bemis, Neenah, USA
PCR Cycler	PeqLab, Erlangen
Petrieschalen	Sarstedt, Nümbrecht
pH Meter	Heidolph, Schwabach
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Rotlichtlampe (für Injektion)	Philips, Hamburg
Scanner	Canon, Krefeld
Schüttler	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Skalpell	Feather Saftey Razor, Osaka, Japan
Spritzen (1ml)	Braun, Kronberg
Spritzen (2ml und 5ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilbank	Thermo Scientific, Schwerte
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Thermoschrank	Aqua Lytic, Dortmund
Tischwaage	Sartorius, Göttingen
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Vortexer	VWR, Darmstadt
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Western Blot Kammer	BioRad, München
Zellkulturplatte (6-, 24- und 96- Well Platten)	TPP, Trasadingen, Schweiz

2.1.2 Software

Adobe Acrobat	Adobe, San Jose, USA
Adobe Illustrator	Adobe, San Jose, USA
BD FACSDiva	BD Bioscience, Heidelberg
EndNote	Tomson Reuters, New York, USA
FlowJo	Tree Star, Ashland, USA
Image J	NIH, Bethesda, USA
Microsoft Office	Microsoft, Redmond, USA
Prism	Graph Pad, San Diego, USA

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Reagenzien	Firma/Hersteller
10% Tween	Roth, Karlsruhe
100 Basenpaar-Marker	Fermentas
1000 Basenpaar-Marker	NEB, Ipswich, USA
10x Zellysepuffer	Cell Signaling

1668 CpG Oligonukleotide	InvivoGen, San Diego, USA
Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, Darmstadt
Alpha-Galactosylceramid	Axxora, Lörach
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Ampicilin	Sigma, Hamburg
Anti-Biotin Microbeads	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Bacto-Trypton	Sigma-Aldrich, Hamburg
Bovine Serum Albumin (BSA)	PAA, Cölbe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Calibrate beads (APC)	Becton Dickinson, Heidelberg
CD11c microbeads	Miltenyi, Bergisch Gladbach
CD19 microbeads	Miltenyi, Bergisch Gladbach
CD4 T-Zellisoliationskit	Miltenyi, Bergisch Gladbach
CD8 T-Zellisoliationskit	Miltenyi, Bergisch Gladbach
CFSE	eBioscience
Destilliertes Wasser	Braun
Dextrose	Sigma-Aldrich, Hamburg
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, Hamburg
DMA	Sigma, Hamburg
DMEM GlutaMax	Gibco, Darmstadt
DNase I	Sigma-Aldrich, Hamburg
DNTPS	Promega, Fitchburg, USA
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Endotoxinfreies Ovalbumin	Hyglos, Bernried
Epoxomycin	Sigma, Hamburg
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
FCS	PAA, Cölbe
Flow Cytomix Zytokin-Kits	eBioscience, Frankfurt
Fotofilme	GE Healthcare, Chalfont, UK
G418	Invitrogen, Darmstadt
Gelatine	Roth, Karlsruhe
Gentamicin	Gibco, Darmstadt
Glycerin	Sigma-Aldrich, Hamburg
Glycin	Sigma-Aldrich, Hamburg
Golgi Plug (Protein-Transport-Inhibitor)	Becton Dickinson, Heidelberg
Hefeextrakt	Sigma-Aldrich, Hamburg
Hepes	Sigma-Aldrich, Hamburg
Höchst 33342	Invitrogen, Darmstadt
HTNC	AG Wunderlich, Köln
IMDM	Gibco, Darmstadt

Immumount	Genetex, Irvine, USA
Isofloran (100%)	Abbott, Wiesbaden
Kalium Acetat	Sigma-Aldrich, Hamburg
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, Hamburg
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, Hamburg
Kanamycin	Sigma, Hamburg
Kollagenase D	Sigma-Aldrich, Hamburg
Ligase	NEB, Ipswich, USA
LPS	InvivoGen, San Diego, USA
Mangandichlorid	Sigma-Aldrich, Hamburg
Mannan	Sigma, Hamburg
Methanol	Roth, Karlsruhe
Mitomycin C	Sigma-Aldrich, Hamburg
n – Ethylmaleimide (NEM)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Natrium Azid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Natrium Pyruvat	PAA, Cölbe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Nicht essentielle Aminosäuren	Gibco, Darmstadt
Nitrocellulose	GE Healthcare, Chalfont, UK
NucleoBond Plasmid-Aufreinigungskit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin DNA-Aufreinigungskit	Macherey-Nagel, Düren
Ovalbumin (Grade 5)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Ovalbumin Peptid 257-264 (SIINFEKL)	InvivoGen, San Diego, USA
Ovalbumin-AlexaFluor647	Invitrogen, Darmstadt
Page Ruler Plus Protein Ladder	Thermo Scientific, Schwerte
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Hamburg
PBS – Tabletten	Gibco, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	PAA, Cölbe
Phusion Polymerase	NEB, Ipswich, USA
PMSF (>99%)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Hamburg
Proteaseinhibitor	Roche, Penzberg
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Hamburg
Rekombinantes LIF	AG Wunderlich, Köln
Restriktionsenzyme	NEB, Ipswich, USA
RPMI (– Glutamin /+HEPES)	PAA, Cölbe
SDS ultra pure	Roth, Karlsruhe
β - Mercaptoethanol	Gibco, Darmstadt
Superscript III Reverse Transkriptase	Invitrogen, Darmstadt
T4 Ligase	NEB, Ipswich, USA
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tissue - Tek	Sakura, Leiden, Niederlande
TrisBase	Sigma-Aldrich, Hamburg
TrisHCl	Sigma-Aldrich, Hamburg

TritonX – 100	Roth, Karlsruhe
Trizol	Invitrogen, Darmstadt
UL49.5-Transferrin	AG Wirtz, Leiden
Vektoren	Addgene, Cambridge, UK
Whatmanpapier	Roth, Karlsruhe
XL10 Gold Bakterien	Invitrogen, Darmstadt

2.1.4 Antikörper

Antigen	Firma	Klon	Farbstoff	Verdünnung
Actin	Santa Cruz	Polyklonal	ungefärbt	1 - 10000
CCR3	BioLegend	J073E5	PE	1 - 200
CD4	BioLegend	GK1.5	PE-Cy7	1 - 800
CD11b	BioLegend	M1/70	PerCP-Cy5.5	1 - 200
CD40	BioLegend	1C10	ungefärbt	1 - 200
CD62L	eBioscience	MEL-14	FITC	1 - 200
CD86	eBioscience	GL1	FITC	1 - 400
EEA-1	Santa Cruz	H-300	ungefärbt	1 - 800
GFP	Cell Signaling	Polyklonal	ungefärbt	1 - 1000
Lamp-1	BD Pharmigen	1D4B	ungefärbt	1 - 800
MHC II	BD Bioscience	AF6-120.1	FITC, PE	1 - 400
TAP	Santa Cruz	H-120	ungefärbt	1 - 200
B220	eBioscience	RA3-6B2	PE	1 - 800
CD3	BioLegend	145-2C11	FITC	1 - 200
CD11c	eBioscience	N418	PB, FITC, PE, APC	1 - 400
CD44	eBioscience	IM7	PE	1 - 200
CD80	eBioscience	16-10A1	FITC	1 - 400
F4/80	BioLegend	Cl:A3-1	PE, PerCP-Cy5.5, PE-Cy7	1 - 400
Gr-1	BioLegend	RB6-8C5	PerCP-Cy5.5	1 - 400
MHC I	eBioscience	AF6-88.5	APC	1 - 200
MR	AbD Serotec	MR5D3	AF647	1-100
DEC205	eBioscience	205yekta	APC	1 - 200
CD69	eBioscience	H1.2F3	PerCP-Cy5.5	1 - 400
CD169	AbD Serotec	3D6.112	FITC	1 - 200
CD68	AbD Serotec	FA-11	FITC	1 - 400
MARCO	AbD Serotec	ED31	ungefärbt	1 - 200
Anti-Ratte	Invitrogen	A21470	AF488	1 - 1000
Anti-Kanninchen	Santa Cruz	sc-3745	PE	1 - 1000
Anti-Ziege	Santa Cruz	sc-3760	PE	1 - 1000
Anti-Ratte	Santa Cruz	sc-3740	PE	1 - 1000
Anti-Ratte	Santa Cruz	sc-2032	HRP	1 - 10000

Anti-Kanninchen	Santa Cruz	sc-2379	HRP	1 - 10000
Anti-Kanninchen	AbD Serotec	STAR36D 488	AF488	1 - 1000
CD25	eBioscience	PC61.5	PE, APC	1 - 400
CD40	eBioscience	3.23	PE	1 - 400
CD45.1	BD Bioscience	A20	APC	1 - 400
TNF α	eBioscience	MP6-XT22	APC	1 - 400
CD8a	BioLegend	53-6.7	BV421, BV605	1 - 800
CD8a	BD Pharmigen	53-6.7	PerCP-Cy5.5	1 - 800
Isotypen	eBioscience	Verwendet wurden die von eBioscience empfohlenen AKs mit gleichem Fluorophor und in gleicher Verdünnung wie der spezifische AK.		

2.1.5 Mauslinien

Wildtyp C57BL/6, sowie **OT-I** und **OT-II** T-Zellrezeptor-transgene Mäuse auf C57BL/6-Hintergrund wurden von Charles River oder aus der Mauszucht des Hauses für Experimentelle Therapie (Bonn) erworben.

Mannose-Rezeptor-Knockout Mäuse auf C57BL/6 Hintergrund wurden freundlicherweise von Professor Sven Burgdorf (LIMES, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt.

Spic- und **Batf3-Knockout** Mäuse auf C57BL/6-Hintergrund wurden freundlicherweise von Professor Kenneth Murphy (Washington University, St. Louis School of Medicine) zur Verfügung gestellt.

2.1.6 Puffer

<u>BM-DC Medium</u>	500ml 50ml 5ml 2ml	IMDM FCS Penicillin/Streptomycin 50mM 2-Mercaptoethanol
<u>CaCl₂ (2,5M)</u>	500ml 138,7g	H ₂ O CaCl ₂
<u>CFSE (5mM)</u>	1ml 2.368mg	H ₂ O CFSE
<u>Dnase/Kollagenase-Lösung</u>	1ml 2 mg 40 Units	PBS Collagenase D DNase I

<u>EDTA (2mM)</u>	500ml 292,24mg	PBS EDTA
<u>ES-Zell Medium</u>	500ml 50ml 5ml 2ml 5ml 5ml 3ml	DMEM GlutaMax FCS Penicillin/Streptomycin 50mM 2-Mercaptoethanol 1x NEAA 1x Natrium Pyruvat LIF (AG Wunderlich)
<u>ES-Zell Lysis Puffer (DNA-Isolation)</u>	10 mM 10 mM 150 mM 0.2% 400 mg/ml	Tris-HCl EDTA NaCl SDS Proteinase K
<u>FACS Puffer</u>	500ml 1,67ml 5ml	PBS 30% NaN ₃ FCS
<u>Feeder Medium</u>	500ml 50ml 5ml 2ml	DMEM GlutaMax FCS Penicillin/Streptomycin 50mM 2-Mercaptoethanol
<u>HBSS 2x (Transfektion)</u>	200ml 3,2g 0,14g 0,08g 0,54g 2g pH 7,05	H ₂ O NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ Dextrose Hepes
<u>HEK293-Medium</u>	500ml 50ml 5ml	IMDM FCS Penicillin/Streptomycin
<u>Laufpuffer 1x (SDS-Page)</u>	1000ml 14,4g 3g 1g	H ₂ O Glycin Tris Base SDS
<u>LB-Medium</u>	1000ml 10g 5g 10g	H ₂ O Bacto-Trypton Hefeextrakt NaCl

<u>Lösung I (DNA-Isolation)</u>	100ml 0,601g 100µl	H ₂ O Tris Base 10mg/ml RNase A
<u>Lösung II</u>	100ml 0,8g 5ml	H ₂ O NaOH 20% SDS
<u>Lösung III</u>	100ml 29,45g	H ₂ O Kalium Acetat
<u>MACS Puffer</u>	500ml 292,24mg 5g	PBS EDTA BSA
<u>NEM</u>	660µl 330µl 25mg 1mg	H ₂ O Glycerin NEM Bromphenol-Blau
<u>PBS</u>	500ml 4g 0,5 3,6g 0,6g	H ₂ O NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄
<u>PBS + 1% BSA</u>	500ml 5g	PBS BSA
<u>PERM</u>	500ml 0,5ml 0,5g	PBS Triton X-100 BSA
<u>PFA (4%)</u>	100ml 4g	H ₂ O Paraformaldehyd
<u>Ponceau-Färbelösung 1x (Western Blot)</u>	29,7ml 0,3 ml 0,033 g	H ₂ O Eisessig Ponceau S
<u>Probenpuffer 6x (SDS-Page)</u>	43ml 48ml 9ml 5,91g 6g	H ₂ O Glycerol 14,7M 2-Mercaptoethanol Tris-HCl SDS
<u>SIINFEKL (1mg/ml)</u>	1ml 1mg 264,	H ₂ O Ovalbumin Peptide 257-264,

<u>TB</u>	420ml 62,5ml 13,75 3,75ml pH 6,7	H ₂ O 2M KCl 2M MnCl ₂ 2M CaCl ₂
<u>TBS (Western Blot)</u>	1000ml 6.05 g 8.76 g pH 7,6	H ₂ O Tris NaCl
<u>TBST (Western Blot)</u>	1000ml 6.05 g 8.76 g 10 ml pH 7,6	H ₂ O Tris NaCl 10% Tween 20
<u>TE (Gelelektrophorese)</u>	990ml 10ml 292,24mg	H ₂ O 1M Tris-HCl EDTA
<u>Transferpuffer 1x (Western Blot)</u>	800ml 200ml 3g 14,4g	H ₂ O Methanol Tris Base Glycin
<u>Zell-Lysis Puffer (Proteinisolation)</u>	1ml 9ml + 1 Roche EDTA-free Mini Tablette	10x Zellysepuffer H ₂ O

2.2 Methoden

2.2.1 Klonierung

2.2.1.1 Restriktionsverdau: Restriktionen wurden mit Restriktionsenzymen von NEB (Schwalbach, Deutschland) durchgeführt. Die Reaktionen wurden, wenn nicht anderes beschrieben nach dem unten stehenden Schema in einem Gesamtvolumen von 20µl in Eppendorfgefäßen für eine Stunde auf einem Heizblock bei 37°C durchgeführt. Als 10x Puffer wurde dabei der für das entsprechende Enzym von NEB empfohlene Puffer verwendet. Bei einer Restriktion mit zwei Enzymen wurde der 10x Puffer gewählt, in dem beide Enzyme die höchste Aktivität aufwiesen.

10x Puffer	2µl
Enzym A	0,5µl
Enzym B	0,5µl
10x BSA	2µl
DNA (1µg)	(x)µl
H ₂ O	(15-x)µl
Gesamtvolumen	20µl

2.2.1.2 Gelelektrophorese: DNA-Fragmente wurden je nach Größe auf 0,5-3%igen Agarosegelen analysiert. Zur Visualisierung der DNA-Banden wurde der Agarose SybrSafe (Invitrogen) in einer Verdünnung von 1:10.000 zugegeben. 20µl DNA-Probe wurden anschließend in einem Verhältnis von 1:2 mit Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Als Marker diente je nach Fragmentgröße eine 100bp- oder 1kB-Leiter. Die anschließende Gelelektrophorese erfolgte in TE-Puffer für eine Stunde bei 120 Volt. Die Analyse erfolgt danach an einem Gel Doc Dokumentationssystem.

2.2.1.3 Polymerasekettenreaktion (PCR): Die Fragmente des Mannose-Rezeptors und das GFP2A-Fragment wurden von cDNA (MR-Fragmente 2-4) oder Plasmid-DNA (MR-Fragment 1, GFP2A) amplifiziert. Für spätere Klonierungsschritte wurden wie in Tabelle 1 gezeigt durch Primerüberhänge Restriktionsschnittstellen an die PCR-Produkte angehängt. Da die PCR-Protokolle für die verschiedenen Fragmente unterschiedlich waren sind nachfolgend die Reaktionsansätze und die Cyclyer-Programme dargestellt. Alle PCR-Amplifikationen wurden in einem PeqLab-Cyclyer durchgeführt.

Amplifikation GFP2A-Fragment

Pipettierschema:

5x HF Puffer	20µl
500nM Fwd Primer (MRGFP_Fwd_SacI_AscI)	0,5µl
500nM Rev Primer (MRGFP_Rev_EcoRI_XmaI)	0,5µl
dNTPs	2µl
Phusion Polymerase	1µl
40ng pGD-MK	4µl
H ₂ O	72µl
Gesamtvolumen	100µl

Cycler-Programm: GFP2A-Fragment

Denaturierung	98°C	30sec	1x
Denaturierung	98°C	10sec	25x
Annealing	63°C	20sec	25x
Elongation	72°C	20sec	25x
Elongation	72°C	10min	1x
Storage	4°C	∞	

Amplifikation MR-Fragment 1

Pipettierschema:

5x HF Puffer		10µl
125nM Fwd Primer (MR3 oder 4 Fwd)		0,6µl
125nM Rev Primer (MR3 oder 4 Rev)		0,6µl
dNTPs		1µl
Phusion Polymerase		0,5µl
cDNA		1µl
H2O		36,3µl
Gesamtvolumen		50µl

Cycler-Programm: MR-Fragment 3 und 4

Denaturierung	98°C	1min	1x
Denaturierung	98°C	30sec	30x
Annealing	55°C	30sec	30x
Elongation	72°C	1min	30x
Elongation	72°C	7min	1x
Storage	4°C	∞	

Amplifikation MR-Fragment 2

Pipettierschema:

5x HF Puffer		10µl
200nM Fwd Primer (MR2 Fwd)		0,5µl
200nM Rev Primer (MR801Rev)		2,5µl
dNTPs		1µl
Phusion Polymerase		0,5µl
cDNA		1µl
H2O		34,5µl
Gesamtvolumen		50µl

Cycler-Programm: MR-Fragment 2

Denaturierung	95°C	2min	1x
Denaturierung	95°C	15sec	30x
Annealing	60°C	30sec	30x
Elongation	68°C	2min	30x
Elongation	68°C	10min	1x
Storage	4°C	∞	

Amplifikation MR-Fragment 3 und 4

Pipettierschema:

5x HF Puffer	10µl
200nM Fwd Primer (MR3 oder 4 Fwd)	1,6µl
200nM Rev Primer (MR3 oder 4 Rev)	1,6µl
dNTPs	1µl
Phusion Polymerase	0,5µl
cDNA	1µl
H2O	34,3µl
Gesamtvolumen	50µl

Cycler-Programm: MR-Fragment 3 und 4

Denaturierung	98°C	1min	1x
Denaturierung	98°C	30sec	30x
Annealing	60°C	30sec	30x
Elongation	72°C	1min	30x
Elongation	72°C	7min	1x
Storage	4°C	∞	

Primer	Sequenz	Legende
MR-GFP Fwd	5- gatcgaccgcgggggcgcgccaccatggtgagcaagggcg- 3	Rot=Ascl, Grau=SacII, Gelb=Guard
MR-GFP Rev	5-acgtggaagaaaaccccggggaattcagctcg-3	Rot=XmaI, Grau=EcoRI, Grün=2A, Gelb=Guard
MR1 Fwd	5-gatcgaaccgggtccatgaggcttctcctgcttctggc-3	Rot=AgeI, Grün=2A, Gelb=Guard
MR1 Rev	5-tgctaccggctgcccta-3	Keine Überhänge
MR2 Fwd	5-gatcgagaatttcattccctcagcaagcgatgtg-3	Gelb=Guard, Rot=EcoRI, Grau=BbvCI
MR2 Rev	5-taaccacccatctgcagtaactgg-3	Keine Überhänge (MR801)
MR3 Fwd	5-gatcgaagaattcacctgtccacaagacaatccac-3	Gelb=Guard, Rot=EcoRI
MR3 Rev	5-gcatggatgaaaatgcaccagtcgacgtcggc-3	Rot=Sall, Gelb=Guard
MR4 Fwd	5-ggtctagatgctagcaagc-3	Rot=XbaI (keine Überhänge)
MR4 Rev	5- Cagctggctcgacccccgggctaaatgatcgcacatgctcattctg- 3	Rot=SmaI, Grau=Sall, Gelb=Guard

Tabelle 2-1: Primer zur Amplifikation der GFP- und MR Fragmente. Dargestellt ist der Name des Primers, seine Sequenz sowie relevante Restriktionsschnittstellen innerhalb des Primers. Überschneidung des Primers mit der codierenden Sequenz sind mit kursiv dargestellt, Überhänge in normaler Schrift. Restriktionsschnittstellen und Schutzsequenzen sind farblich markiert. Die entsprechende Legende befindet sich in der rechten Spalte.

2.2.1.4 mRNA-Isolation: Adhärente BM-DC wurden mit 10ml kaltem PBS gewaschen und durch 5 Minuten Inkubation mit 10ml 2mM EDTA in PBS von der Petrischale abgelöst. Die Zellen wurden durch 5 Minuten Zentrifugation bei 1200 RPM pelletiert, der Überstand verworfen und in 1ml TRIZOL resuspendiert. Im nächsten Schritt wurden 200µl Chlorophorm pro 1ml TRIZOL zugegeben, die Lösung auf einem Vortex gemischt und 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 15 Minuten Zentrifugation bei 12.000 RPM und 4°C wurde die wässrige Phase abgenommen und in ein neues Eppendorf-Gefäß transferiert. Zu dieser wurden 500µl Isopropanol gegeben, die RNA durch 10 Minuten Zentrifugation bei 12000 RPM pelletiert und danach mit 70% Ethanol gewaschen. Die RNA wurde erneut durch Zentrifugation pelletiert, der Überstand abgenommen und das Pellett in 20µl DEPC-H₂O aufgenommen. Die RNA-Konzentration wurde dann an einem Nano-Drop Photometer bestimmt.

2.2.1.5 Reverse Transkription: Pro Ansatz wurde 1µg RNA mit folgendem Pipettiertschema und folgendem PCR-Programm in cDNA umgeschrieben.

cDNA Mastermix (1x)

RT-PCR Puffer		2µl
Random Primer		2µl
Dntps		0,8µl
Reverse Transkriptase		1µl
Inhibitor	1µl	
cDNA		x µl (1µg)
H ₂ O		13,2-x µl
Gesamtvolumen		20µl

PCR-Programm:

25°C	10 Minuten
37°C	120 Minuten
85°C	5 Minuten
4°C	∞

2.2.1.6 DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen: DNA-Fragmente oder Plasmide wurden mittels des NucleoSpin Extract Kits (Macherey Nagel) nach Herstellerprotokoll isoliert. Die gewünschten DNA-Fragmente wurden auf einem UV-Tisch mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Pro µg Gelstück wurden 2µl NT Puffer zugegeben und für 10 Minuten auf 50°C erhitzt. Die verflüssigte Probe wurde auf eine Aufreinigungssäule geladen und mit 12000 RPM für 1 Minute zentrifugiert. Die Aufreinigungssäule wurde mit 600µl NT3 Puffer gewaschen und zunächst für

1 Minute bei 12000 RPM zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen und die Säule durch 2 weitere Minuten Zentrifugation getrocknet. Die RNA wurde durch Zugabe von 50µl NE-Puffer auf die Säule und erneute Zentrifugation bei 12000 RPM eluiert.

2.2.1.7 Ligation: Für jeden Ligationsansatz wurden 50ng Vektor mit einem 3-fachen molaren Überschuß des zu ligierenden Fragments vermischt. Wenn nötig wurde das Volumen mit destilliertem Wasser auf 9µl aufgefüllt. Anschließend wurde 1µl 10x Ligasepuffer zugegeben und die Reaktion für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abschluß der Inkubation wurden die Ligationsprodukte in XL10 Gold Bakterien transformiert.

2.2.1.8 Transformation: XL10 Gold Bakterien wurden zunächst auf Eis aufgetaut und mit 3µl 2-Mercaptoethanol versetzt und 10 Minuten lang durch regelmässiges invertieren vermischt. 100ng der zu transformierenden DNA oder ein kompletter Ligationsansatz wurden zugegeben und vorsichtig mit den Bakterien vermischt. Die Mischung aus Zellen und DNA wurde für eine halbe Stunde auf Eis inkubiert, bevor sie für 30 Sekunden in ein 42°C heißes Wasserbad transferiert wurden. Danach wurde sie für 2 weitere Minuten auf Eis inkubiert und mit 1ml 37°C warmen NYZ-Medium vermengt. In diesem Medium wurden die Zellen auf einem Schüttler für eine Stunde bei 37°C inkubiert, bevor die komplette Lösung auf einer Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen wurde.

2.2.1.9 Übernachtkulturen: Zur Identifikation positiver Klone einer Transformation wurden Übernachtkulturen in 3ml LB-Medium kultiviert, während zur Gewinnung größerer DNA-Mengen nach Retransformation eines Plasmids Kulturen mit 400ml und mehr genutzt wurden. Je nach Plasmid wurde der Kultur entweder 100µg/ml Ampicillin oder 50µg/ml Kanamycin zugegeben. Die einzelnen Bakterienklone wurden mit einer sterilen Pipettenspitze von der Agarplatte in die Kultur transferiert und diese dann 12 bis 18 Stunden bei 37°C auf einem Schüttelinkubator inkubiert.

2.2.1.10 Plasmidpräparation durch alkalische Lyse: 2ml der Bakterienkultur wurden bei 12000 RPM für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Bakterienpellet in 150µl Lösung I resuspendiert. Danach wurden 200µl Lösung II zugegeben und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Zu dieser Lösung wurden 200µl Lösung III pipettiert und durch invertieren vermischt. Die Lösung wurde 10 Minuten bei 12000 RPM

zentrifugiert, der klare Überstand abgenommen und in ein neues Eppendorf-Gefäß transferriert. Abschließend folgte eine DNA-Fällung mit Isopropanol und eine Bestimmung der DNA-Konzentration mit einem Nano-Drop Photometer.

Übernachtskulturen ab einem Volumen von 400ml wurden mit dem NucleoBond Xtra Midi-Kit nach Herstellerprotokoll aufgereinigt. Die Bakterienkultur wurde bei 4000 RPM für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterienpellets in 8ml Puffer RES resuspendiert. Die Bakterien wurden durch Zugabe von 8ml Puffer LYS und 5 Minuten Inkubation bei RT lysiert. Anschließend wurde das Protein durch Zugabe von 8ml Puffer NEU gefällt und das Lysat auf eine Filter-Säule aufgetragen. Der Filter wurde einmal mit 5ml Puffer EQU gewaschen und verworfen. Die verbliebene Säule wurde mit 5ml Puffer WASH gewaschen, der Durchfluß verworfen und die DNA durch Zugabe von 5ml Puffer ELU eluiert. Danach folgte eine DNA-Fällung mit Isopropanol und eine Bestimmung der DNA-Konzentration mit einem Nano-Drop Photometer.

2.2.1.11 Sequenzierungen: Sequenzierungen der klonierten Plasmide erfolgten durch die Firma GATC Biotech (Konstanz). Jedes Fragment wurden sowohl vom 5' als auch vom 3'-Ende sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzierungen befinden sich im Anhang unter Punkt 5.1 Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2-2 aufgelistet.

Fragment	Vektor	Primer
GFP2A (5')	pCMV	ATTAACCCTCACTAAAGGGA
GFP2A (3')	pCMV/Serca/pLox	CAGCGCTTGTGATCTTC
MR1 (5')	pCMV/Serca/pLox	AGAAGCGCGATCACATG
MR1 (3')	pCMV/Serca/pLox	GGATCTTCTTCTCTTCCC
MR2 (5')	pCMV/Serca/pLox	ATCTGGAATGTGTTTCAG
MR2 (3')	pCMV/Serca/pLox	TCTTCTTGCAAATGCTCG
MR3 (5')	pCMV/Serca/pLox	CTCAACAACCTGGATTTGTC
MR3 (3')	pCMV/Serca/pLox	TATTGGTCAAGTTGCTG
MR4 (5')	pCMV/Serca/pLox	GCAGCTATTCCCTTATG
MR4 (3')	pCMV	TAATACGACTCACTATAGGG
GFP2A (5')	Serca/pLox	GTGGTTTGTCCAACTCATC
MR4 (3')	Serca/pLox	CGCTCTAGAACTAGTGGATC

Tabelle 2-2: Sequenzierungsprimer der pCMV-GFP2A-MR, Serca-GFP2A-MR und pLox-GFP2A-MR Vektoren. In der linken Spalte ist das sequenzierte Fragment und die Richtung der Sequenzierung angegeben. Die mittlere Spalte zeigt auf welche Vektoren mit den in der rechten Spalte dargestellten Primern sequenziert wurden.

2.2.1.12 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren: Die Messung der DNA- oder RNA-Konzentrationen erfolgten an einem Nanodrop-Spektrophotometer durch Analyse der Adsorption bei 260nm. Zusätzlich wurde zur Bestimmung der Reinheit der Quotient der Adsorption bei 260nm und 280nm gebildet. Proben mit einem Quotienten zwischen 1,7 bis 1,9 wurden als frei von Protein-Kontamination eingestuft.

2.2.1.13 Generierung chemokompetenter XL10 Gold E.Coli: XL10 Gold Bakterien wurden auf einer LB-Agarplatte ohne Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht in einem Brutschrank bei 37°C kultiviert. Nach 12 Stunden wurde eine Kolonie in eine 50ml LB-Kultur mit 50mM MgCl₂ überführt. Diese Kultur wurde 12 Stunden in einem Brutschrank bei 37°C inkubiert. Aus dieser Kultur wurde 1ml entnommen und eine weitere 400ml LB-Kultur mit 50mM MgCl₂ angeimpft. Diese wurde in einem Schüttelbrutschrank bei 24°C und 160 U/min kultiviert bis die Bakterienlösung eine OD₆₀₀ von 0,5 aufwies. Die Kultur wurde anschließend für 10 Minuten auf Eis gekühlt und die Bakterien durch 8 Minuten Zentrifugation bei 4000 RPM pelletiert. Die Pelletts wurden in 128ml kaltem TB Puffer aufgenommen, 10 Minuten auf Eis inkubiert und erneut für 8 Minuten bei 4000 RPM zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurden die Bakterien in 32ml kaltem TB Puffer resuspendiert, 2,3ml DMSO zu einer entgültigen Konzentration von 7% zugegeben und für weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert. Schließlich wurden die Zellen in 1,5ml Eppendorf-Gefäße aliquotiert, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.2 Proteinanalyse

2.2.2.1 Proteinisolation: Adhärente BM-DC oder HEK293-Zellen wurden mit kaltem PBS gewaschen, bevor sie durch Inkubation mit 2mM EDTA in PBS von der Zellkulturplatte abgelöst wurden. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 1200 RPM zentrifugiert und je nach Größe des Zellpelletts in 100 bis 250µl 1x Zell-Lyse Puffer resuspendiert. Die Zelllösung wurden für 30 Minuten bei 4°C regelmässig invertiert, anschließend wurden Zelltrümmer durch 30 Minuten Zentrifugation mit 13000 RPM bei 4°C abgetrennt. Der klare Proteinüberstand wurde abgenommen, in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und bei -20°C gelagert.

2.2.2.2 SDS-PAGE: 25-50µg Protein wurde mit 5µl 6x Probenpuffer versetzt und mit H₂O auf 30µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Das Protein wurde für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Nachdem die Lösung auf Eis abgekühlt war,

wurde 3µl NEM zugesetzt, vermengt und in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Sammel- und Trenngel wurden nach den unten stehenden Schemata angesetzt. Die Gele wurden in die Mini-Protean TetraCell Laufkammer eingesetzt und diese mit 1x Laufpuffer gefüllt.

Trenngel (12% Acrylamid)

1,6ml	H ₂ O
2 ml	30% Acrylamid
1,3ml	Tris 1,5M pH8,8
50µl	SDS 10%
50µl	APS 10%
2µl	TEMED

5ml

Sammelgel

1,2ml	H ₂ O
330µl	30% Acrylamid
250µl	Tris 1M pH 6,8
20µl	SDS 10%
20µl	APS 10%
2µl	TEMED

2ml

Nachdem das Gel mit Protein beladen war, wurde eine Spannung von 80V angelegt. Sobald das Protein das Sammelgel verlassen hatte wurde für 2 Stunden eine Spannung von 120V angelegt. Als Marker zur Identifikation der Proteingröße wurden 5µl Page Ruler Plus als Marker verwendet.

2.2.2.3 Western Blot: Western Blots wurden wie die SDS-Page in einer Mini-Protean TetraCell Blotkammer durchgeführt. Kalter 1x Transferpuffer mit 20% Methanol wurde vor jedem Blot-Vorgang frisch angesetzt. Die verwendeten SDS-Gele wurden aus der Laufkammer isoliert und einmal mit Transferpuffer gewaschen. Danach wurde das Gel wie in Abbildung 1 dargestellt in die Blotkammer eingesetzt.

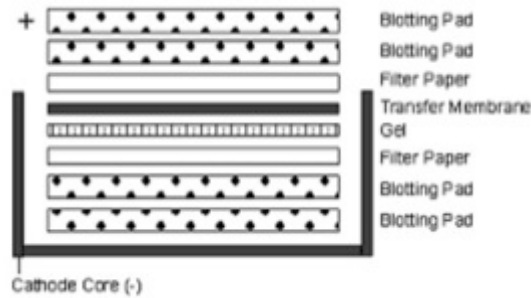


Abbildung 2-1: Aufbau der Western-Blotkammer: Schwämme und Filterpapiere wurden in Transferpuffer getränkt. Jeweils zwei Schwämme bildeten die Aussenseite des Blot-Sandwichs. Zwischen den beiden Filterpapieren befanden sich das Gel und eine Nitrozellulose-Membran. Das Gel befand sich auf der der Kathode zugewandten Seite. (Abb.: Invitrogen)

Nach Aufbau der Blotkammer wurden diese mit kaltem 1x Transferpuffer gefüllt und für 2 Stunden eine Spannung von 25V angelegt. Nach Abschluß des Blot-Vorgangs wurde die Membran kurz in kaltem Transpuffer gewaschen.

2.2.2.4 Ponceau-Färbung: Um den Proteintransfer durch das Western-Blot Protokoll zu überprüfen wurde transferriertes Protein auf der Nitrozellulose-Membran mit einer Ponceau-Färbung sichtbar gemacht. Dazu wurde die Membran unter Agitation 5 Minuten bei Raumtemperatur mit 1x Ponceau-Färbelösung inkubiert. Im nächsten Schritt wurde die Membran wiederholt mit H₂O gewaschen, bis das Bandenmuster einer Proteinfärbung erkennbar war. Nur Membranen die einen gleichmäßigen und sauberen Proteintransfer aufwiesen wurden für weitere Analysen verwendet.

2.2.2.5 Proteindetektion durch Immunfärbung: Proteine wurden auf der Membran durch eine Antikörperfärbung und Chemolumineszenz visualisiert. Zunächst wurde die Membran bei Raumtemperatur für eine Stunde durch Inkubation mit 5% Milchpulver in TBS-T geblockt, die Färbung mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C in TBS-T. Unspezifisch gebundener Antikörper wurden am nächsten Tag durch 3 fünfminütige Waschschrte mit TBS-T entfernt, bevor die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in TBS-T mit dem entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert wurde. Unspezifisch gebundener Antikörper wurden wie zuvor durch 3 fünfminütige Waschschrte mit TBS-T entfernt. Alle Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten unter sanfter Agitation der Membran. Nach der Antikörper-Färbung wurden verbleibendes TBS-T von der Membran entfernt und die Membran für eine Minute mit 1ml ECL-Lösung bedeckt. Danach wurde die ECL-Lösung entfernt und die Membran mit einer Plastihülle versiegelt. Detektion der Chemoluminiszenz erfolgte mit photosensitiven

Filmen. Die Belichtungszeit variierte je nach Protein zwischen 30 Sekunden und einer Stunde. Entwickelt wurden die Filme an einem AGFA Curix 60 Photofilm-Entwickler.

2.2.3 Zellkultur/isolation

2.2.3.1 Zelllinien: HEK293T-Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Andreas Jacobs (Max-Planck Institut für neurologische Forschung, Köln) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ in DMEM mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert. J558-Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Sven Burgdorf zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ in RPMI1680 mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert.

2.2.3.2 Generierung von BM-DC: BM-DC wurden wie in der Literatur beschrieben differenziert⁸³. Hierzu wurde Knochenmark aus Femur und Tibia der gewünschten Mauslinie ausgespült und über einen 40µm Filter aufgereinigt. Knochenmarkszellen wurden dann durch 5 Minuten Zentrifugation bei 1200 RPM pelletiert und pro Zellpräparation in 45ml IMDM mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, sowie 5mM 2-Mercaptoethanol resuspendiert. Zusätzlich wurde dem Medium 15% gefilterter, GM-CSF enthaltender Zellkulturüberstand zugesetzt. Pro Zellpräparation wurden die Zellen auf 3 10cm Petrischalen ausplattiert und bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. An Tag 3 oder 4 wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:2 gesplittet. An Tag 7 wurden die Zellen mit 2mM EDTA geerntet und für die gewünschten Experimente verwendet.

2.2.3.3 Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus murinen Milzen: Mäuse wurden unter Isofluran-Narkose mittels cervikaler Dislokation getötet. Die Milz wurde entnommen und in kaltem, sterilen PBS aufgenommen. Wenn nicht anders angegeben wurden pro Milz 2ml DNase/Kollagenase-Lösung injiziert, die Milz mit einem sterilen Skalpell in kleine Stücke geschnitten und für 20 Minuten im Brutschrank bei 37°C verdaut. Die verdauten Milzstücke wurden dann mit Hilfe eines Metallsiebes auf Eis zerkleinert und die entstehende Zellsuspension über eine 40µm-Filter von größeren Trümmern befreit. Die gefilterte Einzelzellsuspension konnte nun für weitere Experimente verwendet werden.

2.2.3.4 Zellaufreinigung durch Magnetische Zellseparation

2.2.3.4.1 Vorbereitung der Proben für positive Zellanreicherungen: Einzelzellsuspensionen von Milzzellen oder BM-DC wurden auf ein Gesamtvolumen von 400µl MACS-Puffer pro Milz oder Zellkulturplatte eingestellt. Pro Milz oder Zellkulturplatte wurden 20µl Microbeads der gewünschten Spezifität (α Biotin, CD4, CD11c oder CD19) zu der Zellsuspension gegeben, vermischt und die Zellen für 15 Minuten bei 4°C inkubiert.

2.2.3.4.2 Vorbereitung der Proben für OT-I/II Zellaufreinigungen: Einzelzellsuspensionen von Milzzellen und Lymphknoten wurden auf ein Gesamtvolumen von 400µl MACS-Puffer pro Maus eingestellt. Pro Milz oder Zellkulturplatte wurden 20µl Antikörper-Cocktail zu der Zellsuspension gegeben, vermischt und die Zellen für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Dann wurden pro Maus 40µl Anti-Biotin-Microbeads zugegeben und die Zellsuspension für weitere 15 Minuten bei 4°C inkubiert.

2.2.3.4.3 Vorbereitung der Proben für RPM-Depletion: Um die RPM aus den Milz-Einzelzellsuspensionen zu depletieren wurden die Milzzellen zunächst mit 5µg/ml Biotin-gekoppeltem α -MR Antikörper und 15 µg/ml Fc-Block inkubiert. Dann wurden den Zellen pro Milz 20µl magnetische α -Biotin Microbeads zugegeben. Diese wurden mit der Zellsuspension für weitere 15 Minuten bei 4°C inkubiert.

2.2.3.4.4 Magnetische Zellseparation: Parallel zur Vorbereitung der Proben wurde eine oder mehrere LS-Säule an einem Quadro-MACS Magneten (Miltenyi) mit je 5ml MACS-Puffer äquilibriert. Nach Ablauf der 15 Minuten wurde die jeweiligen Proben mit 10ml MACS-Puffer gewaschen, die Zellen durch 5 Minuten Zentrifugation bei 1200 RPM pelettiert und in 3ml MACS-Puffer resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde dann über einen 40µm-Filter auf die LS-Säule aufgetragen. Sobald die Flüssigkeit vollständig in die Säulenmatrix eingetreten war, wurde die Säule dreimal mit je 2ml MACS-Puffer gewaschen und der Durchfluß gesammelt. Im nächsten Schritt wurde die LS-Säule vom Magneten entfernt und an die Säule gebundene Zellen mit 5ml MACS-Puffer aus der LS-Säule eluiert. Je nach Protokoll wurde für Folgeanwendungen entweder der Durchfluß (RPM-Depletion oder OT-

Aufreinigung) oder die positive Zellfraktion (CD4-, CD11c- oder CD19-Zellanreicherung) weiterverwendet.

2.2.3.5 Calcium-Phosphat Transfektion von HEK293T-Zellen: Plasmid-DNA wurde mittels Calcium-Phosphat Transfektion wie in der Literatur beschrieben in HEK293T-Zellen eingebracht^{84,85}. Die Zellen wurden einen Tag vor Transfektion in einer Konzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml auf 10cm-Zellkulturschalen ausgesät, so dass die Zellen am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 70-80% aufwiesen. Pro 10cm-Schale wurden 10µg der zu transfizierende DNA und 100µl 2,5M CaCl₂ vermischt und mit H₂O auf 1ml aufgefüllt. Zu dieser Lösung wurde tropfenweise 2xHBSS zugegeben. Beide Lösungen wurden gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde das Gemisch tröpfchenweise auf die mit HEK-Zellen bewachsenen Zellkulturschalen gegeben. Anschließend wurden die Zellen für 8-12 Stunden mit dem Präzipitat inkubiert, bevor dieses durch mehrfaches Waschen mit PBS entfernt wurde. Je nach Experiment wurden die Zellen 24-48 Stunden später geerntet und für weitere Experimente weiterverwendet.

2.2.4 Lentivirus

2.2.4.1 Generierung lentiviraler Partikel: Replikationsdefiziente, lentivirale Partikel wurden mit Hilfe eines Verpackungssystems der zweiten Generation hergestellt. Hierzu wurden HEK293T-Zellen zeitgleich mit drei verschiedenen Vektoren transfiziert, die zusammen die nötigen Gene zur Produktion der Virenpartikel trugen. Die Transfektion der HEK293T-Zellen erfolgte nach dem unten stehenden Schema. Alle Arbeiten erfolgten an einer speziellen Virus-Arbeitsbank unter Bedingungen der Sicherheitsstufe 2.

<u>pLOX-GFP</u>	
10µg	pLOX-GFP
8µg	pMDG.2
14,5µg	psPAX2
<u>pLOX-GFP2A-MR</u>	
25µg	pLOX-GFP2A-MR
8µg	pMDG.2
14,5µg	psPAX2

Für 48 Stunden wurde alle 12 Stunde nach Transfektion der Zellen, der Überstand der Zellkultur gesammelt, durch frisches Medium ersetzt, gefiltert und bei 4°C gelagert. Nach der vierten Virusernte wurden die Überstände 2

Stunden bei 16°C in einer Ultrazentrifuge bei 47000 x g zentrifugiert und die Überstände verworfen. Der pelletierte Virus wurde dann pro Platte in einem Volumen von 100-200µl PBS aufgenommen und wie unter 2.2.4.2 dargestellt der Titer bestimmt.

2.2.4.2 Titerbestimmung Lentivirus: Zur Titerbestimmung wurden definierte Mengen HEK293T-Zellen ausplattiert und mit sequentiellen Verdünnungen des zu bestimmenden Lentivirus infiziert. 24 Stunden später wurden die HEK293T-Zellen gewaschen, geerntet und für 10 Minuten bei 4°C mit 4% PFA fixiert. Anschließend wurde die Anzahl GFP-positiver Zellen in jeder Probe durchflußzytometrisch bestimmt. Zur Bestimmung des Titers wurden nur Proben herangezogen in denen maximal 15% der Zellen GFP-Expression zeigten. Zur Bestimmung des Virustiters wurde angenommen, dass unter solchen Bedingungen jeder lentivirale Partikel nur eine Zelle infizierte und diese daraufhin GFP exprimierte. Anhand der bekannten Anzahl an HEK293T-Zellen und des bekannten Volumens des Lentivirus konnte so nach folgender Formel errechnet werden wie viele Infektiöse, virale Partikel in dem jeweiligen Virus-Stock enthalten waren:

$$LV\text{-Titer (Partikel/ml)} = [GFP\text{-positive Zellen (\%)} \times Gesamtzellzahl] / \text{Virusvolumen (ml)}$$

2.2.4.3 Lentivirale Infektion von BM-DC: BM-DC wurden wie beschrieben generiert. An Tag 3 nach Isolation wurden die Zellen geerntet und 2×10^6 Zellen pro 6cm-Schale ausplattiert. Zu diesen Zellen wurde je nach Experiment verschiedene MOI Lentivirus gegeben. Nach 4 weiteren Tagen wurden die BM-DC geerntet und für weitere Experimente verwendet. Vor einer durchflußzytometrischen Analyse wurden die Zellen für 10 Minuten bei 4°C mit 4% PFA fixiert um verbleibende Viren zu inaktivieren.

2.2.4.4 Lentivirale Infektion von HEK293T-Zellen: Eine definierte Menge HEK293T-Zellen wurden wie beschrieben in DMEM ausplattiert. Einige Stunden nachdem die Zellen umgesetzt wurden, wurde je nach Experiment verschiedene MOI Lentivirus gegeben. Nach 24 bis 48 Stunden wurden die HEK293T-Zellen geerntet und für weitere Experimente verwendet. Vor einer durchflußzytometrischen Analyse wurden die Zellen für 10 Minuten bei 4°C mit 4% PFA fixiert um verbleibende Viren zu inaktivieren.

2.2.5 Embryonale Stammzellen

2.2.5.1 Embryonale Stammzellkultur: Alle Transfektionen wurden mit JM8A3 ES-Zellen auf C57BL/6 J Hintergrund durchgeführt, die freundlicherweise von Dr. Thomas Wunderlich zur Verfügung gestellt wurden. G418-resistente Feeder-Zellen wurden ebenfalls von Dr. Thomas Wunderlich bereitgestellt. Kultivierung der ES-Zellen erfolgte auf einem konfluenten Layer aus Feeder-Zellen. Um ein Überwachsen der ES-Zellkultur zu verhindern, wurden die Feeder-Zellen einen Tag vor dem Auftauen der ES-Zellen durch 2 Stunden Inkubation mit 10µg/ml Mitomycin C inaktiviert. Um die Pluripotenz der ES-Zellen zu erhalten enthielt das ES-Zell Medium neben 15 % FCS, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 1 x nicht essentielle Aminosäuren und 0,1 mM 2-Mercaptoethanol zusätzlich 500-1000 U/ml "leukemia inhibitory factor" (LIF). Das verwendete FCS war zuvor getestet worden keine in vitro Differenzierung der ES-Zellen auszulösen. Feeder und ES-Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Um die ES-Zellen von den Zellkulturschalen abzulösen wurden die Zellen zweimal mit warmem PBS gewaschen und dann 5 Minuten bei 37°C mit 0,05% Trypsin in 0,02% EDTA in PBS inkubiert. Die Reaktion wurden mit ES-Zellmedium gestoppt, die Zellen in ein Falcon-Gefäß überführt und durch Zentrifugation bei 1200 RPM pelletiert. Je nach Anwendung wurden die Zellen dann passagiert oder für eine Transfektion benutzt. Wenn notwendig, wurden ES-Zellen 90% FCS und 10% DMSO resuspendiert und bei -80°C eingefroren. Die Langzeitlagerung erfolgte in Flüssigstickstoff.

2.2.5.2. Elektroporation von ES-Zellen: Für eine Transfektion wurden 1×10^7 ES-Zellen mit 40µg der gewünschten DNA in 800µl Transfektionspuffer (RPMI ohne Phenolrot) aufgenommen. Die Elektroporation erfolgte in einem GenePulser Xcell Elektroporationsystem in 0,4cm Küvetten mit 500mF und 240V. Nach Elektroporation wurden die Zellen in ES-Zellmedium resuspendiert und je Elektroporation auf 3 10cm-Schalen mit frisch ausgesähte und inaktivierte Feeder-Zellen ausgesäht.

2.2.5.3 ES-Zellselektion: 48 Stunden nach Elektroporation wurde das Medium der ES-Zellkultur gewechselt und durch ES-Zellmedium mit 300µg/ml G418 ersetzt. 9 Tage nach Transfektion wurden überlebende ES-Zellklone isoliert und in 0,05% Trypsin in PBS enthaltende 96-well Platten überführt. Die Zellen wurden 5 Minuten bei 37°C inkubiert, vereinzelt und auf 3 mit Feeder-Zellen beschichtete 96-well Platten verteilt. Zwei dieser Platten wurden wie

beschrieben nach 3 Tagen weggefroren und bei -80°C gelagert, während die Zellen auf der dritten Platte mit ES-Zellmedium ohne G418 expandiert und zur DNA-Isolierung genutzt wurden.

2.2.5.4 Isolation genomischer DNA aus ES-Zellen: ES-Zellen wurden über Nacht in Lysis Puffer (10mM Tris-HCl, pH8; 10mM EDTA, 150mM NaCl; 0,2% SDS; 400mg/ml Proteinase K) inkubiert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt. Aus dem Überstand wurde die DNA durch Zugabe eines gleichen Volumens Isopropanol präzipitiert, durch Zentrifugation pelletiert, einmalig mit 70% Ethanol gewaschen und in TE-Puffer resuspendiert.

2.2.5.5 Southern Blot und Blastozysten-Injektion: Beide Protokolle wurden freundlicherweise von Kooperationspartnern der AG Wunderlich durchgeführt.

2.2.5.6 Genotypisierung R26-MR transgener Mäuse: DNA zur Genotypisierung putativer R26-MR transgener Tiere wurden aus Schwanzbiopsien gewonnen. Dazu wurden die Schwanzbiopsien über Nacht bei 56°C in Lysepuffer mit 400µg/ml Proteinase K inkubiert. Gewebetrümmer wurden am nächsten Tag durch Zentrifugation entfernt und DNA durch Chlorform/Phenol-Isolation abgetrennt und anschließend durch Behandlung mit Isopropanol gefällt. Anschließend wurde die DNA in TE-Puffer resuspendiert und die Keimbahntransmission mit dem folgenden analytischen DNA-Protokoll überprüft:

Pipettierschema

H ₂ O	20.85µl
Puffer	2.5µl
dNTPs	0.2µl
je Primer	0.25µl
Phusion	0.2µl
Gesamtvolumen	25µl

Cycler-Programm: R26-MR Genotypisierung

Denaturierung	94°C	3min	1x
Denaturierung	94°C	30sec	44x
Annealing	56°C	45sec	44x
Elongation	72°C	1:30min	44x
Elongation	72°C	10min	1x
Storage	4°C	∞	

Primer	Sequenz
R26-MR Fwd	AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT C
R26-MR Rev WT	GAT ATG AAG TAC TGG GCT CTT
R26-MR Rev Flox	TGT CGC AAA TTA ACT GTG AAT C

Tabelle 2-3: Primer zur Analyse der Keimbahntransmission von R26-MR Mäusen. Dargestellt sind Primernamen (linke Spalte) und Primersequenzen (rechte Spalte).

2.2.6 Durchflußzytometrie

2.2.6.1 Oberflächenfärbungen: Einzelzellsuspensionen wurden zunächst in FACS-Puffer mit 5µg/ml Fc-Block für 20 Minuten bei 4°C geblockt, bevor die Zellen mit 2ml FACS-Puffer gewaschen und durch 5 Minuten Zentrifugation bei 1200 RPM und 4°C pellettiert wurden. Danach wurden die Zellen je nach Experiment mit verschiedenen Antikörpern für 25 Minuten bei 4°C in FACS-Puffer gefärbt, mit 2ml FACS-Puffer gewaschen und durch 5 Minuten Zentrifugation bei 1200 RPM und 4°C pellettiert. Je nach Größe der Pelletts wurden die Zellen in 200-800µl FACS-Puffer resuspendiert und durch einen 100µm Filter filtriert. Falls die verwendeten Antikörper es erlaubten, wurden tote Zellen durch Zugabe von 0,1µg Hoechst 33342 angefärbt. Die Analyse der Proben erfolgt an einem BD Canto II Durchflußzytometer.

2.2.6.2 Intrazellulärfärbungen: Zur Färbung intrazellulärer Proteine wurden die Zellen zunächst wie beschrieben auf Oberflächenmarker gefärbt. Danach wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen, durch 5 Minuten Zentrifugation bei 1200 RPM und 4°C pellettiert und durch 10 Minuten Inkubation mit 4% PFA fixiert. Das PFA wurde durch einen Waschschriff mit FACS-Puffer entfernt, die Zellen erneut durch Zentrifugation pellettiert, in PERM-Puffer resuspendiert und für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach einem erneuten Waschschriff mit FACS-Puffer wurden die Zellen in PERM-Puffer resuspendiert und für 20 Minuten bei 4°C mit 5µg/ml Fc-Block und den gewünschten Antikörpern inkubiert. Nach einem letzten Waschschriff mit FACS-Puffer wurden die Zellen dann in 200-800µl FACS-Puffer resuspendiert, und durch einen 100µm Filter filtriert. Die Analyse der Proben erfolgt an einem BD Canto II Durchflußzytometer. Bei Zytokinfärbungen wurden die Zellen vor der Färbung für 4 Stunden im entsprechenden Medium nach Herstellerangaben mit Golgi-Plug (BD Bioscience) behandelt.

2.2.6.3 Durchflußzytometrische Zellsortierung: Größere Volumina von Einzelzellsuspensionen wurden wie beschrieben in MACS-Puffer auf ihre Oberflächenmarker gefärbt und nach dem letzten Waschschrift auf eine Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml eingestellt. Tote Zellen wurden durch Zugabe von 0,1 µg Hoechst 33342 angefärbt und ausgeschlossen. Die Zellsortierung erfolgt steril und gekühlt an einem BD Aria III oder BD FACS DIVA Zellsortierer.

2.2.7 Zellbiologie

2.2.7.1 Ovalbumin-Aufnahme: Um die Endozytose von löslichem Ovalbumin in verschiedenen Primärzellen und Zelllinien zu untersuchen, wurden diese Zellen für 20 bis 45 Minuten mit 250 ng/ml AlexaFluor647-gekoppeltem Ovalbumin inkubiert. Mannose-Rezeptor-abhängige Endozytose wurde durch den Zusatz von 3 mg/ml Mannan geblockt, Pinocytose durch Inkubation mit 500 µM DMA inhibiert. Um verschiedene Zelltypen unterscheiden zu können wurden die Zellen wie beschrieben mit Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenmarker gefärbt. Die Analyse der Ovalbumin-Aufnahme erfolgte durchflußzytometrisch. Die Menge endocytisiertes Ovalbumin wurde anhand der mittleren Fluoreszenz-Intensität (MFI) des AlexaFluor647-Signals ermittelt.

2.2.7.2 Kokultur mit OT-I Zellen: Aktivierung und Proliferation von OT-I T-Zellen wurden als Surrogatmarker für Kreuzpräsentation von löslichem Ovalbumin verwendet. Wenn angegeben wurden die Zellen mit verschiedenen Endozytose-Inhibitoren oder endosomalem TAP-Inhibitor inkubiert. Nach Behandlung mit den Inhibitoren wurden die Zellen für 3 Minuten mit 0,008% Glutaraldehyd fixiert. Die Aktivierung der OT-I T-Zellen wurde 18 Stunden nach Beginn der Kokultur anhand der Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 durchflußzytometrisch bestimmt. Die Proliferation von OT-I T-Zellen wurde anhand einer Färbung der Zellen mit 1 µM CFSE und durchflußzytometrischer Analyse des CFSE-Signals 48 Stunden nach Beginn der Kokultur analysiert.

2.2.7.3 Immunocytochemie: Die zu untersuchenden Zellen wurden auf sterile Glas-Coverslips in 24-well Platten ausgesät. Wenn die Ovalbumin-Aufnahme der Zellen untersucht werden sollte wurden diese danach 45 Minuten mit 5 µg/ml löslichem, fluoreszenz-markiertem Ovalbumin inkubiert. Die Zellen wurden mit kaltem PBS gewaschen, 10 Minuten mit 4% PFA fixiert und zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Danach wurden sie für eine Stunde

mit 5% Milchpulver und 5µg/ml Fc-Block in PERM Puffer permeabilisiert und geblockt. Nach zwei weiteren Waschschritten mit 1% BSA in PBS wurden die Zellen in einer feuchten Kammer über Nacht mit den entsprechenden Primärantikörpern in 1% BSA in PBS inkubiert. 10-12 Stunden später wurden die Proben zweimal mit 1% BSA in PBS gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit den Sekundärantikörpern in 1% BSA in PBS inkubiert. Zellkerne wurden durch 5 Minuten Inkubation mit 1µg/ml Hoechst 33342 angefärbt, die Zellen zwei weitere Male gewaschen und die Coverslips kurz in eine Glasgefäß mit destilliertem Wasser getaucht um Salze zu entfernen. Die Coverslips wurden kurz getrocknet, mit Immumount bedeckt, auf einem Objektträger fixiert und dunkel gelagert. Am nächsten Tag erfolgte die Analyse der Färbungen an einem IX71 Fluoreszenz-Mikroskop.

2.2.7.4 Immunohistologie: Das zu untersuchende Gewebe wurde in TissueTek eingebettet und in Flüssigstickstoff schockgefroren. Danach wurden an einem Kryotom 5µm dicke Schnitte angefertigt und auf einen Objektträger transferiert. Die Schnitte wurden für 10 Minuten bei 70°C auf einem Heizblock dehydriert, für 10 Minuten bei Raumtemperatur in Aceton fixiert und für eine Stunden bei Raumtemperatur in 1% BSA in PBS geblockt. Über Nacht wurden die Schnitte dann mit Primärantikörpern in einer feuchten Kammer in 1% BSA in PBS inkubiert. 10-12 Stunden später wurden die Proben zweimal mit 1% BSA in PBS gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit den Sekundärantikörpern in 1% BSA in PBS inkubiert. Zellkerne wurden durch 5 Minuten Inkubation mit 1µg/ml Hoechst 33342 angefärbt, die Proben zwei weitere Male gewaschen und die Coverslips kurz in eine Glasgefäß mit destilliertem Wasser getaucht um Salze zu entfernen. Die Objektträger wurden kurz getrocknet, mit Immumount bedeckt, eingedeckelt und dunkel gelagert. Am nächsten Tag erfolgte die Analyse der Färbungen an einem IX71 Fluoreszenz-Mikroskop. Die Färbung des Mannose-Rezeptors benötigte eine alternatives Fixierung: Nach Anfertigung der Schnitte wurden die Proben kurz mit PBS rehydriert und dann für 10 Minuten mit 4% PFA fixiert. Das PFA wurde durch zweimaliges Waschen mit 1% BSA in PBS entfernt. Die Zellen wurden durch 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur mit PERM Puffer permeabilisiert, dieser zwei weitere Waschschriffe entfernt. Danach wurde das Gewebe wie zuvor beschrieben geblockt und gefärbt.

2.2.7.5 Durchflußzytometrische Analyse löslicher Botenstoffe: Die Analyse der Konzentration löslicher Botenstoffe in Zellkulturüberständen oder Organhomogenaten erfolgte mit einem Th1/Th2 sowie einem Maus-Zytokin-Multiplex Kit nach Herstellerprotokoll.

2.2.7.6 Ovalbumin-Transfer durch osmotischen Schock: 2×10^7 BM-DC wurden für 10 Minuten in 1ml hypertonen Medium (0,5M Sukrose, 10% Polyethylenglykol, 10mM Hepes, 10mg/ml Ovalbumin in RPMI 1640) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 13ml vorgewärmtes hypotones Medium zugesetzt (40% H₂O, 60% RPMI1640) und die Zellen für weitere 2 Minuten bei 37°C inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte mit kaltem PBS, bevor die Zellen für Folgeanwendungen verwendet wurden.

2.2.7.7 HTNC-Behandlung R26-transgener Zellen: 5×10^6 ES-Zellen oder BM-DC an Tag 3 nach Generierung wurden in FCS und Antibiotika-freiem Medium mit 1µg HTNC kultiviert. Nach 18 Stunden wurde das Medium entfernt und durch FCS- und Antibiotika-haltiges Medium ersetzt. Nach 3 bis 4 weiteren Tagen konnten die Zellen für Folgeexperimente verwendet werden.

2.2.8 In vivo Experimente

2.2.8.1 In vivo Aufnahme von fluoreszenz-markiertem Ovalbumin: Pro Maus wurden 5µg/g Körpergewicht AlexaFluor647 gekoppeltes Ovalbumin injiziert. 45 Minuten später wurden aus den Milzen der Tiere Einzelzellsuspensionen hergestellt und für eine durchflußzytometrische Analyse aufbereitet.

2.2.8.2 Adaptiver Transfer CFSE-gefärbter OT-I Zellen: OT-I Zellen wurden wie beschrieben isoliert und mit 5µM CFSE gefärbt. Pro Maus wurden 2×10^6 Zellen in PBS durch i.v. Injektion in die Schwanzvene transferiert. 18 Stunden später wurde den Tieren Ovalbumin und wenn angegeben ein zusätzliches Adjuvanz injiziert. Die Analyse der OT-I Proliferation erfolgte wenn nicht anders beschrieben 40 bis 48 Stunden nach Injektion des Antigens. Dazu wurden wie beschrieben Milzzellen isoliert, OT-I spezifische Oberflächenmarker gefärbt und das CFSE-Signal durchflußzytometrisch analysiert.

2.2.8.3 In vivo Zytotoxizitätsassay: Zur Analyse der Stärke einer Ovalbumin-spezifischen CTL-Antwort wurden den zu untersuchenden Mäusen 5×10^6 Zielzellen gespritzt, die mit $10 \mu\text{g/ml}$ des OVA-Peptids SIINFEKL und $5 \mu\text{g/ml}$ CFSE gefärbt markiert waren (CFSE^{high}). Zusätzlich wurden 5×10^6 Kontrollzellen injiziert, die mit $0,5 \mu\text{g/ml}$ CFSE gefärbt (CFSE^{low}) und nicht mit SIINFEKL markiert waren. Nach 4 Stunden wurden aus den Milzen der Mäuse wie beschrieben Einzelzellsuspensionen hergestellt und durchflußzytometrisch das Verhältniss von Ziel- zu Kontrollzellen analysiert. Da lediglich SIINFEKI-markierte Zielzellen, nicht aber die Kontrollzellen durch die CTL getötet wurde, konnte man durch die Abnahme der Zielzellzahl in Relation zur Kontrollzellzahl Aussagen über die Stärke einer zytotoxischen Antwort machen. Anhand der folgenden Formel wurde für jede Probe die Ovalbumin-spezifische Zytotoxizität berechnet:

$$\text{OVA-Spezifische Zytotoxizität (\%)} = 100 - \left(\frac{\text{Quotient}^{\text{Probe}} (\#high/\#low)}{\text{Quotient}^{\text{Unbehandelt}} (\#high/\#low)} \right) * 100$$

2.9 Statistik

Resultate wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mit Hilfe des ANOVAs plus anschließenden Bonferroni Test oder eines T-Tests, der Prism5 Software.

3. Ergebnisse

3.1 Rolle der Mannose-Rezeptor vermittelten Kreuzpräsentation in vivo

3.1.1 Identifikation eines MR-positiven Zelltyps in der murine Milz

Um zu klären, welcher Zelltyp in der murinen Milz den MR zur Kreuzpräsentation von löslichem Ovalbumin nutzt, wurde zunächst untersucht, welche Zellen MR-abhängig lösliches Ovalbumin aufnehmen. Da die Daten von Burgdorf et al nahelegten, dass es sich bei den MR⁺ Zellen um ein CD11c exprimierendes Zellsubset handelte⁷⁶, wurden CD11c⁺ Milzzellen aus Wildtyp- und MR^{-/-} Mäusen mittels magnetischer Zellaufreinigung angereichert und ihre Fähigkeit, MR-abhängig Ovalbumin aufzunehmen, durchflußzytometrisch untersucht.

Neben den konventionellen dendritischen Zellen mit hoher CD11c-Expression (CD11c^{hoch}) war in den magnetischen Zellaufreinigungen wie in Abb. 3-1A dargestellt ein zweites, stark F4/80-positives und leicht CD11c-exprimierendes Zellsubset enthalten. Die konventionellen dendritischen Zellen wurden wie in Abb. 3-1B dargestellt über die Oberflächenmarker CD11c, CD8 und CD11b in ein CD8⁺ CD11b⁻ sowie ein CD8⁻ CD11b⁺ Zellsubset unterteilt. Die Analyse der *in vitro* Ovalbumin-Aufnahme zeigte, dass beiden Arten konventioneller dendritischer Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen nur wenig Ovalbumin aufnahmen. Darüber hinaus war weder bei den CD8⁺ CD11b⁻, noch den CD8⁻ CD11b⁺ dendritischen Zellen ein Unterschied in der Antigenaufnahme zwischen Wildtyp und MR^{-/-} Zellen zu beobachten (Abb. 3-1C, E). Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen, nahmen Wildtyp, nicht aber MR^{-/-} CD11c^{niedrig} F4/80^{hoch} Zellen große Mengen Ovalbumin auf (Abb. 3-1C). Die Reduktion der Antigenaufnahme in MR^{-/-} CD11c^{niedrig} F4/80^{hoch} Zellen war statistisch signifikant. (Abb. 3-1D). Dies legt nahe, dass der gesuchte Milz-APC Typ den Phänotyp CD11c^{niedrig} F4/80^{hoch} aufweist.

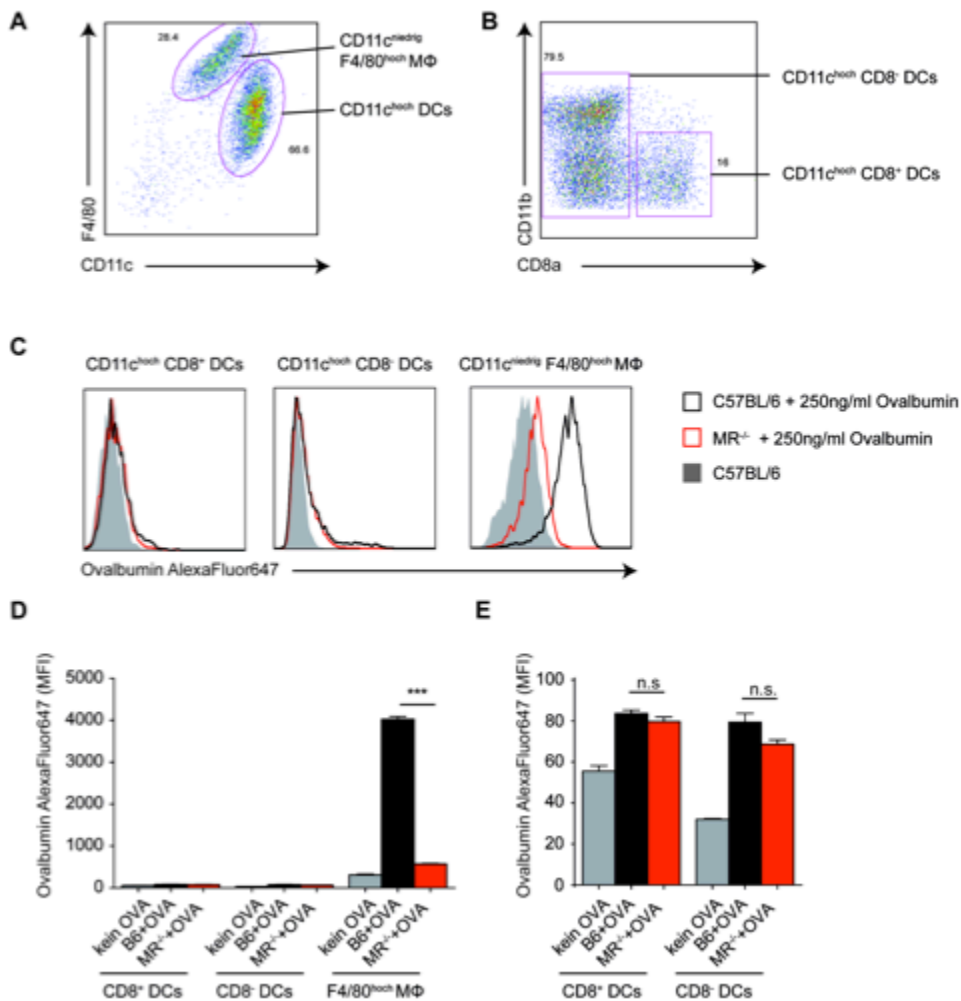


Abbildung 3-1: *In vitro* Ovalbumin-Aufnahme in CD11c⁺ Milzzellen. (A) Identifikation der verschiedenen Zellsubsets. Konventionelle dendritische Zellen wurden als CD11c^{hoch} F4/80^{niedrig} identifiziert. CD11c exprimierende Makrophagen wurden als CD11c^{niedrig} F4/80^{hoch} bestimmt (linker Dotplot). Konventionelle dendritische Zellen wurde weiter in CD8⁺ und CD8⁻ Zellsubsets unterteilt (rechter Dotplot). (B) Aufnahme von löslichem Ovalbumin. Dargestellt sind Histogramme der Signalstärke von AlexaFluor647-gekoppeltem Ovalbumin in CD11c^{hoch} CD8⁺ (Links), CD11c^{hoch} CD8⁻ dendritischen Zellen (Mitte), sowie CD11c^{niedrig} F4/80^{hoch} Makrophagen (Rechts). Wildtyp-Zellen sind durch die schwarze Linie repräsentiert, MR-defiziente Zellen durch die gestrichelte rote Linie und unbehandelte Zellen durch den grauen Hintergrund. (C) Statistische Auswertung der Mittleren Fluoreszenz-Intensität (MFI) des AlexaFluor647-gekoppeltem Ovalbumin in den verschiedenen Zelltypen. Unbehandelte Zellen sind durch graue Balken dargestellt, Wildtyp-Zellen durch schwarze und MR-defiziente Zellen durch die rote Balken. ($p=0,05$)

Um zu klären ob sich die *in vitro* erhobenen Daten auf die Situation *in vivo* übertragen ließen, wurde in einem weiteren Experiment die MR-abhängige Aufnahme von löslichem Ovalbumin *in vivo* untersucht. Dazu wurde Wildtyp- oder MR^{-/-} Mäusen intravenös Ovalbumin injiziert und die zuvor beschriebenen Zelltypen durchflußzytometrisch auf Antigenaufnahme untersucht. Wie zuvor *in vitro* beobachtet, ergaben sich keinen Unterschiede bezüglich der Antigen-Aufnahme zwischen Wildtyp- oder MR^{-/-}

konventionellen dendritischen Zellen, weder für das CD8⁺, noch für das CD8⁻ Zellsubset. Verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen nahmen dendritische Zellen insgesamt deutlich mehr Ovalbumin auf als *in vitro* (Abb. 3-2A, C). In Übereinstimmung mit den *in vitro* gemachten Beobachtungen nahmen WT CD11c^{niedrig} F4/80^{hoch} Zellen auch *in vivo* mehr lösliches Ovalbumin auf als MR^{-/-} Zellen des gleichen Typs (Abb. 3-2A). Diese Reduktion war statistisch hoch signifikant (Abb. 3-2B). Verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen nahmen jedoch auch MR^{-/-} CD11c^{niedrig} F4/80^{hoch} Zellen noch geringe Mengen Ovalbumin auf. (Abb. 3-2A).

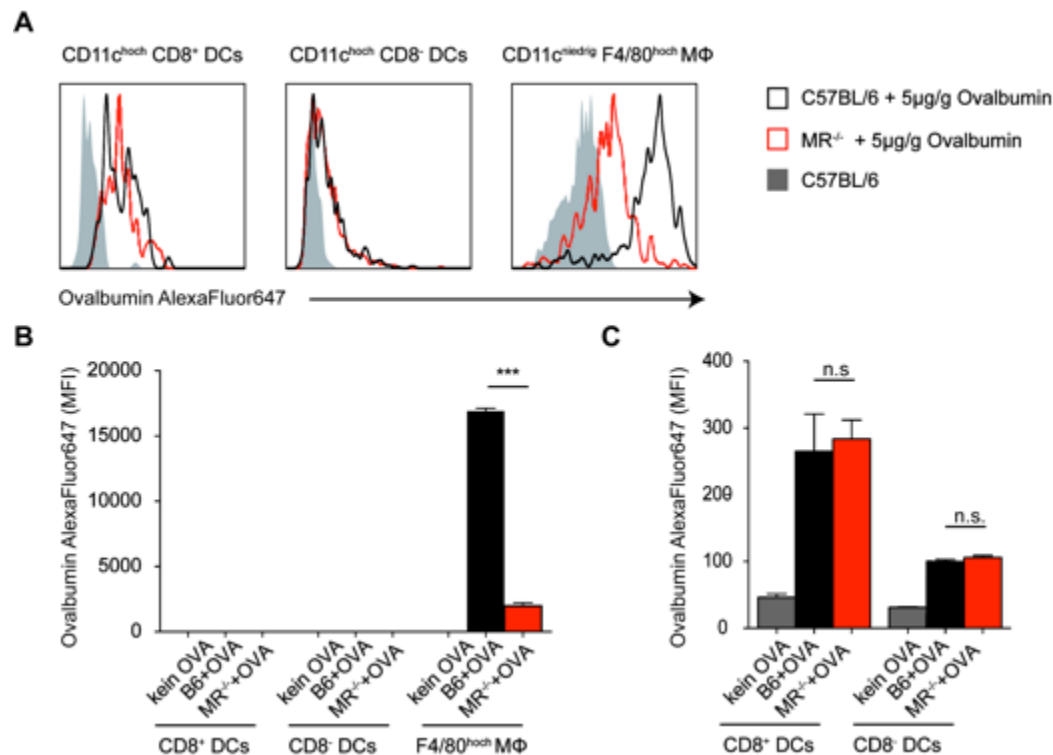


Abbildung 3-2: *In vivo* Ovalbumin-Aufnahme in CD11c⁺ Milzzellen. (A) Aufnahme von löslichem Ovalbumin. Dargestellt sind Histogramme der Signalstärke von AlexaFluor647-gekoppeltem Ovalbumin in CD11c^{hoch} CD8⁺ (Links), CD11c^{hoch} CD8⁻ dendritischen Zellen (Mitte), sowie CD11c^{niedrig} F4/80^{hoch} Makrophagen (Rechts). Wildtyp-Zellen sind durch die schwarze Linie repräsentiert, MR-defiziente Zellen durch die gestrichelte rote Linie und unbehandelte Zellen durch den grauen Hintergrund. (B) Statistische Auswertung der Mittleren Fluoreszenz-Intensität (MFI) des AlexaFluor647-gekoppeltem Ovalbumin in den verschiedenen Zelltypen. Unbehandelte Zellen sind durch graue Balken dargestellt, Wildtyp-Zellen durch schwarze und MR-defiziente Zellen durch rote Balken. ($p=0,01$)

Da es sich bei der Aufnahme von Ovalbumin um einen indirekten Nachweis der MR-Expression handelte, wurde diese zusätzlich direkt mit einer Intrazellulärfärbung in Einzelzellsuspensionen von Wildtyp oder MR^{-/-} Milzzellen untersucht. Die in Abb. 3-3A dargestellten Färbungen machten deutlich, dass weder in den CD8⁺ CD11b⁻ noch in den CD8⁻ CD11b⁺ dendritischen Zellen ein MR-Signal detektierbar war. Das CD11c^{niedrig} F4/80^{hoch} Zellsubset zeigte in Wildtyp-, nicht jedoch in MR^{-/-} Zellen eine

deutliche Färbung (Abb. 3-3A). Eine statistische Auswertung der MFI des MR-Signals ergab, dass dieses in WT $CD11c^{\text{niedrig}} F4/80^{\text{hoch}}$ Zellen signifikant stärker war als in $MR^{-/-}$ Zellen (Abb. 3-3B). Dieses Ergebnis bestätigte die durch die Antigen-Aufnahme gewonnenen Daten (Abb. 1 und 2), und identifizierte die $CD11c^{\text{niedrig}} F4/80^{\text{hoch}}$ Zellen als das MR-exprimierende Zellsubset der murinen Milz.

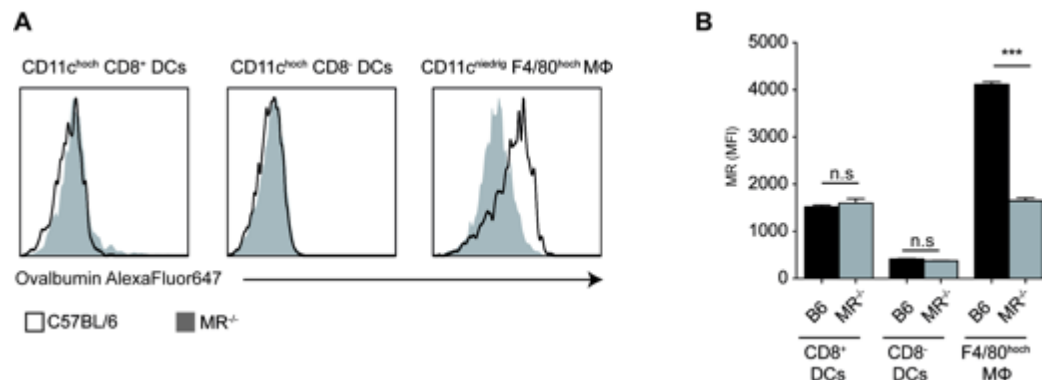


Abbildung 3-3: Intrazelluläre MR-Färbung in $CD11c^+$ Milzzellen. Dargestellt sind Histogramme der Signalstärke der MR-Färbung in $CD11c^{\text{hoch}} CD8^+$ (Links), $CD11c^{\text{hoch}} CD8^-$ dendritischen Zellen (Mitte), sowie $CD11c^{\text{niedrig}} F4/80^{\text{hoch}}$ Makrophagen (Rechts). Wildtyp-Zellen sind durch schwarze Linien repräsentiert, MR-defiziente Zellen durch den grauen Hintergrund.

3.1.2 Identifikation des $CD11c^{\text{niedrig}} F4/80^{\text{hoch}}$ Zellsubsets als Rote Pulpa Makrophagen

Da die $CD11c^{\text{niedrig}} F4/80^{\text{hoch}}$ Zellen große Mengen des Markers F4/80 exprimierten, wurde vermutet, dass es sich bei diesen Zellen um einen Makrophagen-Subtyp handelte. Daher wurden auf den MR-positiven Zellen zahlreiche Oberflächenmarker gefärbt und diese mit den bekannten Oberflächenmarkern der drei Makrophagen-Populationen der Milz abgeglichen.

Die Färbungen bestätigten, dass die Zellen geringe Mengen $CD11c$ und sehr viel $F4/80$ exprimierten. Zusätzlich konnten die Oberflächenmarker MHC II, $CD80$, $CD86$, sowie $CD68$ nachgewiesen werden. Die Zellen exprimierten kein $CD4$, $CD8$, $CD11b$, $CD169$, MARCO oder Gr-1 (Abb. 3-4A). Außerdem zeigten die Zellen eine starke Autofluoreszenz (Abb. 3-4B).

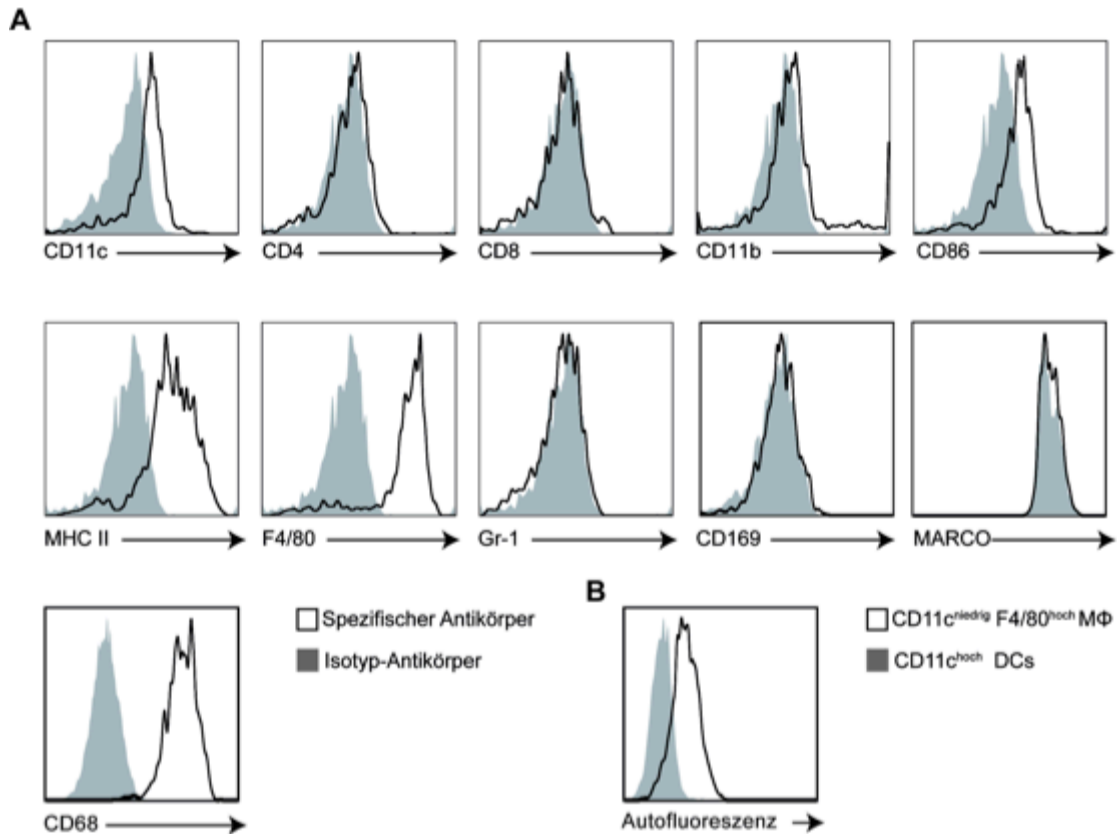


Abbildung 3-4: Oberflächenmarker auf MR-positiven Zellen. MR-positive Zellen wurden über die MR-abhängige Ovalbumin-Aufnahme identifiziert (CD11c und F4/80-Färbungen), oder über die Expression von CD11c und F4/80 (alle anderen Färbungen). Dargestellte sind Histogramme von Färbungen der MR-positiven Zellen mit Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenmarker (schwarze Linien) oder mit den jeweiligen Isotypen-Kontrollen (grauer Hintergrund).

Um zu analysieren, in welcher Region der Milz sich die MR⁺ Zellen befanden, wurden Kryoschnitte von Milzen aus Wildtyp- und MR^{-/-} Mäusen angefertigt und der MR gefärbt. In Schnitten von Milzen aus Wildtyp Mäusen war eine deutliches MR-Signal zu erkennen (Abb. 3-5A). Da dieses auf Schnitten von Milzen aus MR^{-/-} Mäusen nicht detektierbar war, handelte es sich um eine spezifische MR-Färbung (Abb. 3-5B). Anhand der Zelldichte, die durch eine Kernfärbung mittels DAPI visualisiert wurde, konnte deutlich gemacht werden, dass sich die MR-positiven Zellen fast ausschließlich im lockeren Zellverbund der roten Pulpa und nicht in der dicht gepackten weißen Pulpa befanden. Eine Färbung mit dem Makrophagen-Marker MARCO⁷¹ – der ausschließlich metallophile- und Marginalzonen-Makrophagen in der Marginalzone färbt – verdeutlichte dass sich die MR-positiven Zellen zum Großteil in der roten Pulpa und nicht in der mittels der MARCO-Färbung definierten Marginalzone, oder in der von ihr umgebenen weißen Pulpa befanden (Abb. 3-5C).

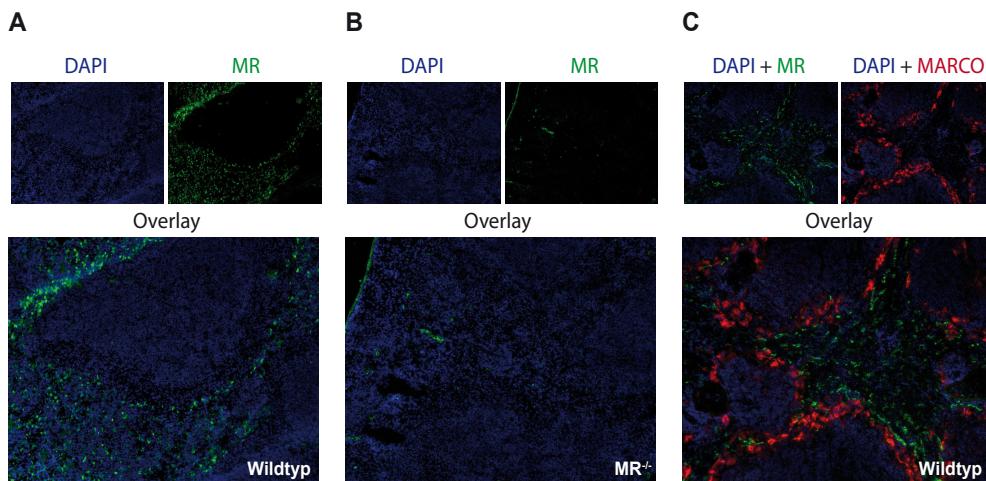


Abbildung 3-5: Lokalisation von MR-positiven Zellen in der murinen Milz. Gezeigt sind Kryoschnitte von Milzen aus Wildtyp (A, C) oder $MR^{-/-}$ Mäusen (B). Die Schnitte wurden entweder mit α -MR Antikörper und DAPI (A, B) oder mit α -MR, α -MARCO, sowie DAPI gefärbt (C). Die oberen Bilder zeigen Einzelfärbungen (A, B), bzw. Färbungen eines Antikörpers zusammen mit DAPI (C). Die unteren Bilder zeigen eine Kombination aller Färbungen in einem Bild.

Die Oberflächenmarker auf den MR-positiven Zellen, sowie ihre Lokalisation in der roten Pulpa schloss aus, dass es bei den $CD11c^{\text{niedrig}} F4/80^{\text{hoch}}$ Zellen um Marginalzonen- oder metallophile Makrophagen handelte. Der dritte Makrophagentyp der Milz, Rote-Pulpa-Makrophagen (RPM), wies hingegen Oberflächenmarker ($CD11c^{\text{niedrig}}$, $F4/80^{\text{hoch}}$, $CD11b^{-/\text{niedrig}}$, Autofluoreszenz^{hoch}) auf, die denen der MR-positiven Zellen ähnelten. Aus diesem Grund wurde vermutet, dass es sich bei den MR-positiven Zellen um RPM handelte. Daher wurden Milzzellen aus $SpiC^{-/-}$ Mäusen analysiert, die keine RPM bilden können⁷⁵. Eine in Abb. 3-6A dargestellte durchflußzytometrische Analyse zeigte, dass der Anteil der $CD11c^{\text{niedrig}} F4/80^{\text{hoch}}$ Zellen an der Gesamtzellzahl in $SpiC^{-/-}$ Mäusen um 90% reduziert war, während der Anteil konventioneller dendritischer Zellen nicht verändert war. Eine durchflußzytometrische Analyse mit dem Oberflächenmarker CD11b anstelle von CD11c zeigte eine vergleichbare Reduktion von MR-positiven Zellen, die als $CD11b^{\text{niedrig/-}}$ und $F4/80^{\text{hoch}}$ identifiziert wurden (Abb. 3-6A). Statistische Auswertungen ergaben, dass die Reduktion der MR-positiven Zellen signifikant war, unabhängig davon ob die Zellen über die Marker F4/80 und CD11c oder F4/80 und CD11b identifiziert wurden (Abb. 3-6B). Zusätzlich wurden Kryoschnitte von *WT* oder $SpiC^{-/-}$ Milzen auf MR und F4/80 gefärbt. Während in Schnitten von *WT*-Milzen ein deutliches Signal sowohl für MR als auch für F4/80 detektierbar war (Abb. 3-6C), fehlten beide Signal in den Milzschnitten aus $SpiC^{-/-}$ Mäusen fast komplett (Abb. 3-6D). Außerdem zeigten die MR- und F4/80-Färbungen

auf Schnitten aus *WT*-Milzen eine deutliche Kolo-kalisation und eine Lokalisierung in der roten Pulpa (Abb. 3-6C).

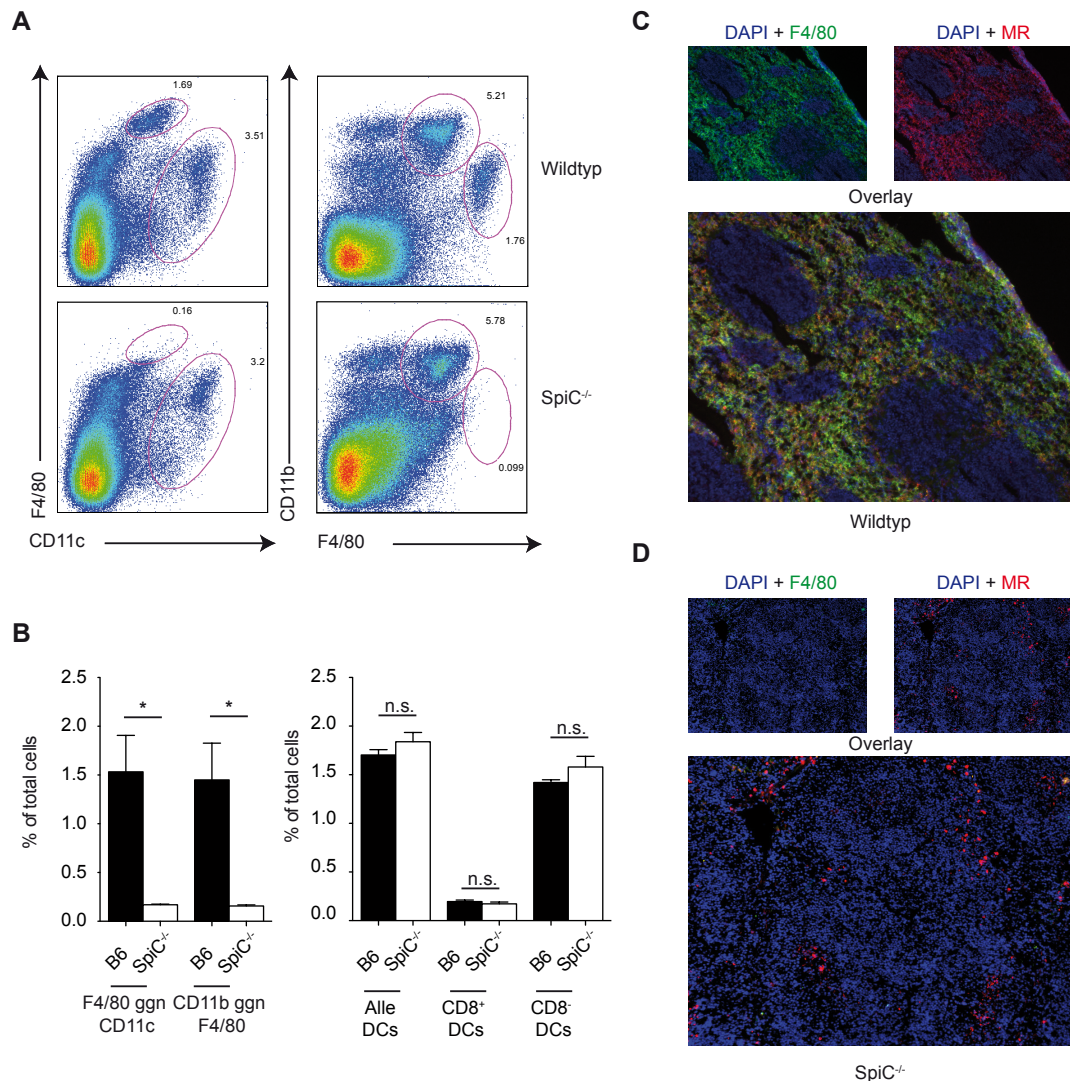


Abbildung 3-6: Anzahl und Lokalisation MR-positiver Zellen in Wildtyp- und *SpiC*^{-/-} Mäusen. (A) Durchflußzytometrische Analyse von konventionellen dendritischen und MR-positiven Zellen in Wildtyp (oben) oder *SpiC*^{-/-} Mäusen (unten). Dargestellt sind zwei alternative Gating-Strategien. In den linken Diagrammen ist CD11c gegen F4/80 aufgetragen, während in den rechten Diagrammen F4/80 gegen CD11b dargestellt ist. (B) Statistische Auswertung der Zellzahlen in Einzelzellsuspensionen von Milzzellen aus Wildtyp oder *SpiC*^{-/-} Mäusen. Dargestellt ist der Anteil der Zellen an der Gesamtzellzahl in Wildtyp (schwarzer Balken) oder *SpiC*^{-/-} Mäusen (weißer Balken). Das obere Diagramm zeigt den Anteil MR-positiver Zellen je nach verwendeter Gating-Strategie. Das untere Diagramm zeigt die Anteile konventioneller dendritischer Zellen (CD11c^{hoch}), sowie der einzelnen Unterpopulationen (CD8⁺ und CD8⁻) an der Gesamtzellzahl. (C) Kryoschnitte aus Wildtyp (oben)- und *SpiC*^{-/-} Mäusen (unten), gefärbt mit α -MR (rot) und α -F4/80 (grün) Antikörpern, sowie DAPI (blau).

Neben Oberflächenmarkern und Lokalisation der MR-positiven Zellen in der Milz demonstrierte die Abwesenheit dieses Zelltyps in *SpiC*^{-/-} Mäusen, dass es sich bei den von uns als MR⁺ beschriebenen Zellen um Rote Pulpa Makrophagen handelte.

3.1.3 MR⁺ Rote Pulpa Makrophagen können lösliches Ovalbumin effektiv kreuzpräsentieren

Nachdem das MR-positive Zellsubset in der murinen Milz als Rote Pulpa Makrophagen identifiziert wurde, sollte nun geklärt werden, ob diese Zellen ebenso wie andere MR-exprimierende Zelltypen zur Kreuzpräsentation von löslichem Antigen in der Lage waren. Dazu wurde Wildtyp-Mäusen lösliches Ovalbumin injiziert, mittels durchflußzytometrischer Zellsortierung RPM und konventionelle DCs isoliert und diese mit CFSE-gefärbten OT-I T-Zellen kokultiviert. 48 Stunden später wurde die Proliferation der OT-I T-Zellen als indirekter Nachweis für Kreuzpräsentation durchflußzytometrisch bestimmt.

In der Tat zeigten OT-I T-Zellen, die mit CD8⁺ dendritischen Zellen kultiviert worden waren, eine starke Proliferation (71,8% aller T-Zellen proliferiert), während CD8⁻ dendritische Zellen nur eine sehr schwache T-Zell Proliferation auslösen konnten (19,4% aller T-Zellen proliferiert). OT-I T-Zellen die mit RPM kokultiviert wurden, zeigten hingegen eine starke Proliferation (77,8% aller T-Zellen proliferiert), die mit der T-Zell Aktivierung durch CD8⁺ dendritische Zellen vergleichbar war. Als Negativ-Kontrolle dienten OT-I Zellen die mit CD8⁺ dendritische Zellen kultiviert wurden, welche kein lösliches Ovalbumin erhalten hatten. Diese Zellen zeigten keine Proliferation (Abb. 3-7A, C).

Wurden die primären APC erst 18 Stunden nach Injektion des löslichen Ovalbumins isoliert und sortiert, war die Fähigkeit der RPM OT-I T-Zellen zu aktivieren erheblich beeinträchtigt. Während nach 3 Stunden 77,8% der mit RPM kokultivierten T-Zellen proliferierten, wurden nach 18 Stunden nur noch 12,7% der Zellen aktiviert. CD8⁺ dendritische Zellen hingegen aktivierten nach 18 Stunden die T-Zellen etwas effektiver (88,2% aller T-Zellen proliferiert) als nach 3 Stunden (71,8% aller T-Zellen proliferiert) (Abb. 3-7B, C). Diese Daten zeigten, dass Rote-Pulpa-Makrophagen in der Lage, waren lösliches Antigen zu kreuzpräsentieren. Anders als dendritische Zellen konnten sie Antigen jedoch nicht über einen längeren Zeitraum speichern.

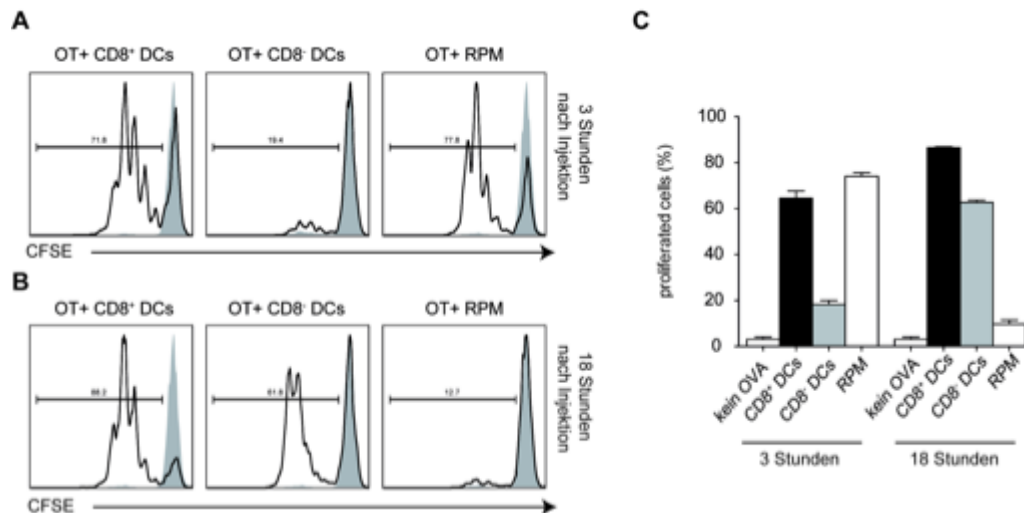


Abbildung 3-7: Kreuzpräsentation durch konventionelle dendritische Zellen und RPM. (A) Proliferation von OT-I T-Zellen nach Kokultur mit dem jeweils dargestellten Zelltyp. Die APC wurde 3 Stunden nach Injektion von 200µg löslichem Ovalbumin isoliert und mit den OT-I Zellen kokultiviert. Abgebildet sind durchflußzytometrische Analysen der CFSE-Profile von OT-I Zellen aus Kokulturen mit Ovalbumin behandelten (schwarze Linie) und von unbehandelten Zellen (grauer Hintergrund). **(B)** Durchflußzytometrische Analyse der CFSE-Profile von kokultivierten OT-I Zellen wie in A. Die APC wurde 18 Stunden nach Injektion von 200µg löslichem Ovalbumin isoliert und mit OT-I Zellen kokultiviert. **(C)** Statistische Auswertung der T-Zellproliferation aus A und B. Anteil proliferierter OT-I Zellen nach Kokultur mit CD8⁺ DCs (schwarze Balken), CD8⁻ DCs (graue Balken) oder RPM (weiße Balken). Die linke Gruppe repräsentiert Kokulturen mit APCs die 3 Stunden nach Ovalbumin-Injektion isoliert wurden, der rechte Gruppe Kokulturen mit APCs die nach 18 Stunden aufgereinigt wurden.

Um eine Kontamination der durchflußzytometrisch sortierten RPM mit einem anderen Zellsubset auszuschließen, wurden die Kreuzpräsentations-Assays mit Zellen aus *SpiC*^{-/-} Mäusen wiederholt. In durchflußzytometrischen Analysen von Einzelzellsuspensionen aus RPM-defizienten *SpiC*^{-/-} Mäusen waren noch vereinzelt Zellen mit RPM-ähnlichen Oberflächenmarkern detektierbar. Es war also möglich, dass nicht die RPM, sondern diese *SpiC*-unabhängigen Zellen für die zuvor beobachtete Kreuzpräsentation des löslichen Ovalbumins verantwortlich waren.

Im Vergleich zu WT-RPM waren die Zellen, die in *SpiC*^{-/-} Mäusen im RPM-Gate verblieben waren, kaum in der Lage OT-I Zellen zu aktivieren (69,1% T-Zellproliferation durch WT RPM, 25,1% T-Zellproliferation durch *SpiC*^{-/-} "RPM"). Die Fähigkeit der CD8⁺ dendritischen Zellen OT-I Zellen zu aktivieren war hingegen unbeeinträchtigt (69,8% T-Zellproliferation durch WT CD8⁺ DCs, 61,5% T-Zellproliferation durch *SpiC*^{-/-} CD8⁺ DCs) (Abb. 3-8).

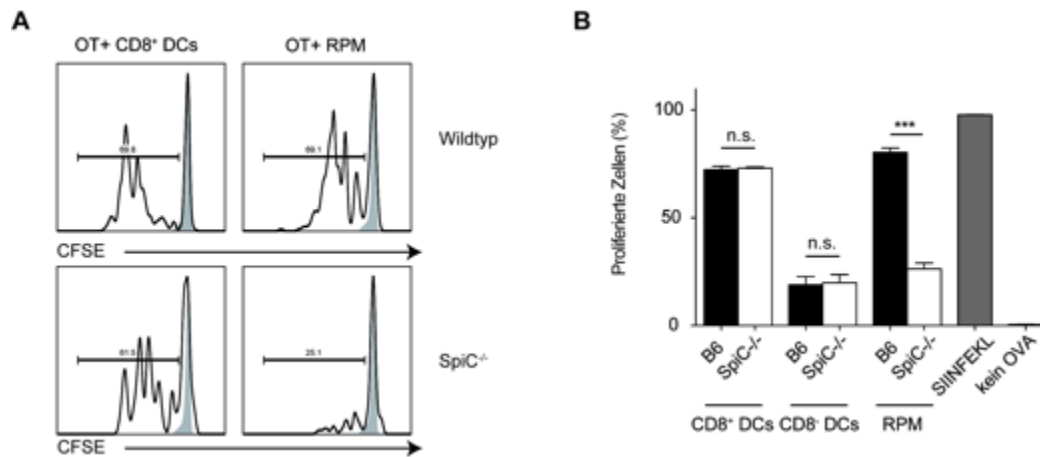


Abbildung 3-8: Kreuzpräsentation durch WT und SpiC^{-/-} dendritische Zellen und RPM. (A) Proliferation von OT-I T-Zellen nach Kokultur mit den dargestellten WT- oder SpiC^{-/-} Zellen. Die APC wurde 3 Stunden nach Injektion von 200µg löslichem Ovalbumin isoliert und mit den OT-I Zellen kokultiviert. Abgebildet sind durchflußzytometrische Analysen der CFSE-Profile von OT-I Zellen aus Kokulturen mit Ovalbumin behandelten (schwarze Linie) und von unbehandelten Zellen (grauer Hintergrund). (B) Statistische Auswertung der in A und B dargestellten CFSE-Profile. Dargestellt ist der Anteil proliferierter OT-I Zellen aus Kokulturen mit CD8⁺ DCs (links), CD8⁻ DCs (Mitte) oder RPM (rechts). Die APC wurden entweder aus WT- (schwarze Balken) oder SpiC^{-/-} Mäusen isoliert. SIINFEKL behandelte Positiv-Kontrollen und nicht-behandelte Negativ-Kontrollen sind durch graue Balken dargestellt.

Die Daten in Abb. 3-7 und 3-8 zeigten deutlich, dass neben den CD8⁺ dendritischen Zellen mit den RPM ein weiteres Zellsubset in der murinen Milz existierte, das in der Lage war lösliches Ovalbumin zu kreuzpräsentieren.

3.1.4 Kreuzpräsentation durch RPM ist MR-abhängig

Um zu klären, ob Kreuzpräsentation von löslichem Ovalbumin durch die RPM – ähnlich wie von Burgdorf et al für BM-DC beschrieben – von der Expression des MR abhing, wurden *Wildtyp*- und *MR*^{-/-} Mäuse wie zuvor beschrieben mit löslichem Ovalbumin injiziert, DCs oder RPM durchflußzytometrisch sortiert und mit CFSE-gefärbten OT-I Zellen kokultiviert. Wie in Abb. 3-9 zu erkennen, zeigten *MR*^{-/-} konventionelle DCs keinen Defekt in der T-Zellaktivierung. Kokultur mit Wildtyp CD8⁺ DCs führte in 70,2% der T-Zellen zu Proliferation, während *MR*^{-/-} CD8⁺ DCs in 64,5% der OT-I T-Zellen Proliferation induzierten. Die Proliferation der OT-I Zellen war mit 19,3% bzw 27,3% deutlich schwächer, wenn diese mit *WT* oder *MR*^{-/-} CD8⁻ DCs kokultiviert wurden. RPM die aus *MR*^{-/-} Mäusen gewonnen wurde, zeigten hingegen eine erheblich reduzierte Kapazität zur Aktivierung von OT-I Zellen: Während nach Kokultur mit *WT*-RPM 74,2% aller T-Zellen proliferierten, waren nach Kokultur mit *MR*^{-/-} RPM lediglich 6,22% aller T-Zellen proliferiert (Abb. 3-9).

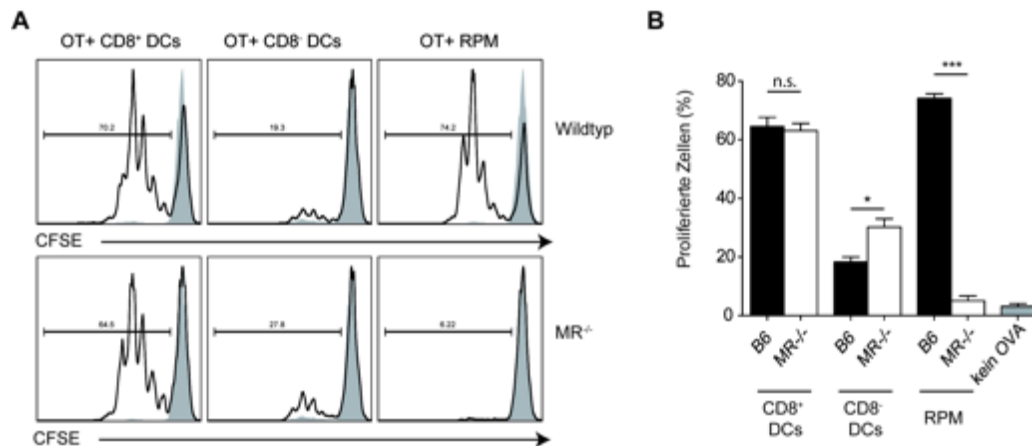


Abbildung 3-9: Kreuzpräsentation durch WT und MR^{-/-} dendritische Zellen und RPM. (A) Proliferation von OT-I T-Zellen nach Kokkultur mit den dargestellten WT (obere Reihe) oder MR^{-/-} Zellen (untere Reihe). Die APC wurde 3 Stunden nach Injektion von 200µg löslichem Ovalbumin isoliert und mit den OT-I Zellen kokultiviert. Abgebildet sind durchflußzytometrische Analysen der CFSE-Profile von OT-I Zellen aus Kokulturen mit Ovalbumin behandelten (schwarze Linie) und von unbehandelten Zellen (grauer Hintergrund). (B) Statistische Auswertung der in A und B dargestellten CFSE-Profile. Dargestellt ist der Anteil proliferierter OT-I Zellen aus Kokulturen mit CD8⁺ DCs (links), CD8⁻ DCs (Mitte) oder RPM (rechts). Die APC wurden entweder aus WT- (schwarze Balken) oder MR^{-/-} Mäusen isoliert. SIINFEKL behandelte Positiv-Kontrollen sind durch graue Balken dargestellt.

Diese Experimente zeigten, dass RPM, ähnlich wie die von Burgdorf et al. beschriebenen BM-DC^{47,48}, den MR zur Kreuzpräsentation von löslichem Ovalbumin benötigen.

3.1.5 *Batf3*-unabhängige Kreuzpräsentation durch RPM

Die Identifikation eines weiteren kreuzpräsentierenden Zelltyps in der murinen Milz warf die Frage auf, ob diese Zellen ebenso wie CD8⁺ dendritische Zellen auf den Transkriptionsfaktor *Batf3* angewiesen waren⁸⁶. Um zu klären, ob die Kreuzpräsentation durch RPM ebenfalls von *Batf3* abhängig war, sollte untersucht werden ob die Differenzierung von RPM oder ihre Fähigkeit, OT-I T-Zellen zu aktivieren, in *Batf3*^{-/-} Mäusen gestört war.

Wie in Abb. 3-10A zu sehen ist, war der RPM-Anteil an der Gesamtzellzahl mit ca. 2,5% in den Milzen von *Batf3*^{-/-} Mäusen nicht reduziert. Die Anzahl CD8⁺ dendritischer Zellen war von 0,79% auf 0,26% reduziert, während es bezüglich der CD8⁻ dendritischen Zellen mit einem Anteil von knapp 3% keine Veränderungen gab. Somit war die Differenzierung der RPM anders als die der CD8⁺ dendritischen Zellen nicht vom Transkriptionsfaktor *Batf3* abhängig. Dies schloss nicht aus, dass die Funktionalität der RPM in *Batf3*^{-/-} Mäusen eingeschränkt war. Um zu klären ob RPM *Batf3*-unabhängig kreuzpräsentieren konnten, wurden wie bereits beschrieben Zellen aus

Ovalbumin-injizierten *Wildtyp*- und *Batf3*^{-/-} Mäusen isoliert, DCs und RPM durchflußzytometrisch sortiert und mit OT-I Zellen kokultiviert. Während die *WT* CD8⁺ DCs 75,6% der T-Zellen aktivieren konnten, induzierten die in *Batf3*^{-/-} Mäusen verbliebenen CD8⁺ DCs nur 25,9% der Zellen. Hingegen induzierten RPM die aus *Batf3*^{-/-} Mäusen gewonnen wurden genauso effektiv wie ihre *Wildtyp*-Gegenstücke OT-I Proliferation (86,4% T-Zellproliferation *WT*, 91,5% T-Zellproliferation *Batf3*^{-/-}). In den Kokulturen mit CD8⁻ DCs wurde mit weniger als 3% proliferierter Zellen nahezu keine T-Zellaktivierung festgestellt (Abb. 3-10B, C).

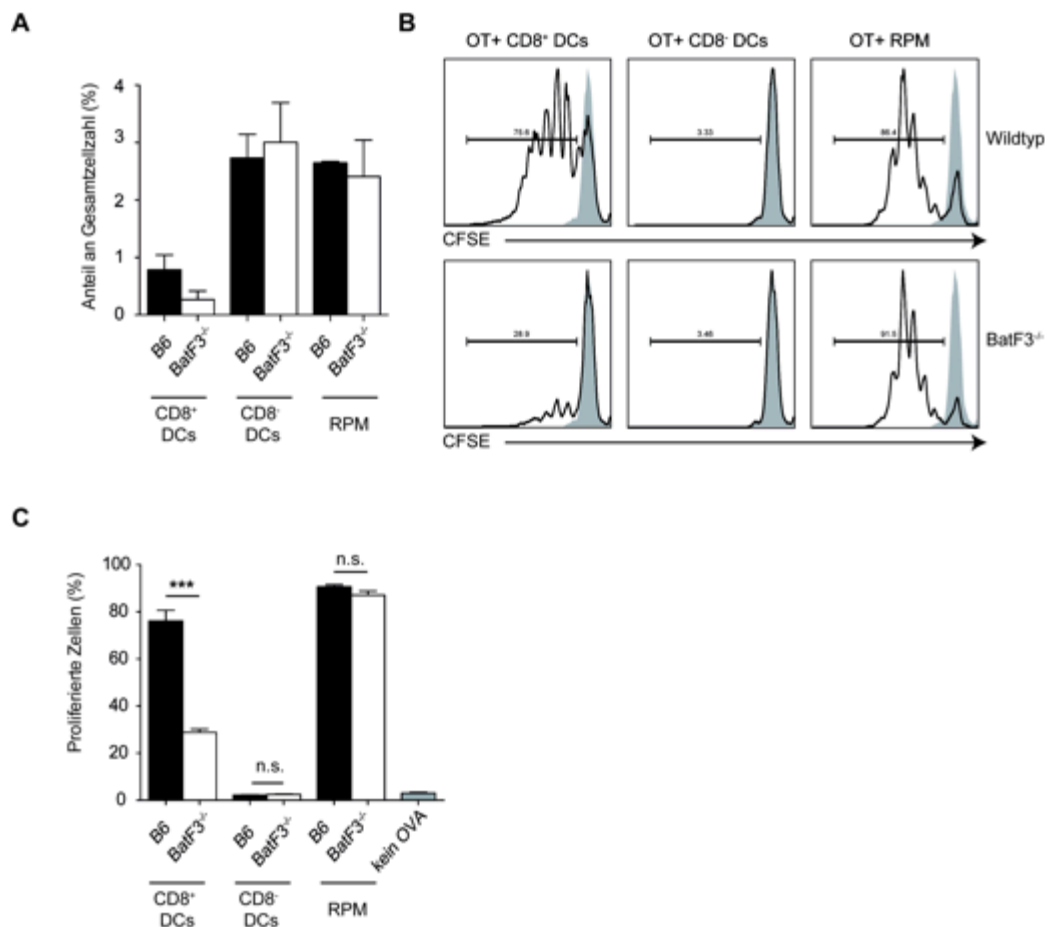


Abbildung 3-10: Kreuzpräsentation durch *WT* und *Batf3*^{-/-} dendritische Zellen und RPM. (A) Statistische Auswertung des Abteils von CD8⁺ DCs (links), CD8⁻ DCs (Mitte) oder RPM (rechts) an der Gesamtzellzahl in Milzen von B6 (schwarze Balken) oder *Batf3*^{-/-} Mäusen (weiße Balken). (B) Proliferation von OT-I T-Zellen nach Kokultur mit den dargestellten *WT* (obere Reihe) oder *Batf3*^{-/-} Zellen (untere Reihe). Die APC wurde 3 Stunden nach Injektion von 200µg löslichem Ovalbumin isoliert und mit den OT-I Zellen kokultiviert. Abgebildet sind durchflußzytometrische Analysen der CFSE-Profile von OT-I Zellen aus Kokulturen mit Ovalbumin behandelten (schwarze Linie) und unbehandelten Zellen (grauer Hintergrund). (C) Statistische Auswertung der in A und B dargestellten CFSE-Profile. Dargestellt ist der Anteil proliferierter OT-I Zellen aus Kokulturen mit CD8⁺ DCs (links), CD8⁻ DCs (Mitte) oder RPM (rechts). Die APC wurden entweder aus *WT*- (schwarze Balken) oder *Batf3*^{-/-} Mäusen isoliert. Nicht behandelte Negativ-Kontrollen sind durch graue Balken dargestellt.

3.1.6 Molekulare Mechanismen der Kreuzpräsentation durch RPM

Die RPM sind das erste bekannte APC-Subset, das in der Homöostase den MR zur Kreuzpräsentation von löslichem Ovalbumin *in vivo* nutzt. Es war daher von großem Interesse, ob die RPM einen ähnlichen molekularen Mechanismus zur Kreuzpräsentation nutzen wie BM-DC. Zunächst wurde untersucht, ob RPM das Antigen ebenfalls in ein EEA-1⁺ und MR⁺ frühes, endosomales Kompartiment transportieren. Dazu wurden durch magnetische Zellanreicherung isolierte RPM und BM-DC Kontrollen *in vitro* mit fluoreszenzgekoppeltem Ovalbumin inkubiert und die Lokalisation des Antigens an einem Fluoreszenzmikroskops untersucht. Sowohl in BM-DC als auch in RPM kolokalisierte das fluoreszenz-gekoppelte Ovalbumin mit dem endosomalen Marker EEA-1, nicht aber mit dem lysosomalen Marker Lamp-1. (Abb. 3-11A, B). Zahlreiche antigen-enhaltende Kompartimente in RPM waren darüber hinaus MR-positiv. Zudem lokalisierte der MR in RPM nahezu ausschließlich in EEA-1⁺ frühen Endosomen, nicht aber mit Lamp-1⁺ Lysosomen (Abb. 3-11C). Kontrollfärbungen mit F4/80 zeigten, dass es sich bei den isolierten Zellen tatsächlich um F4/80⁺ RPM handelte (Abb. 3-11D).

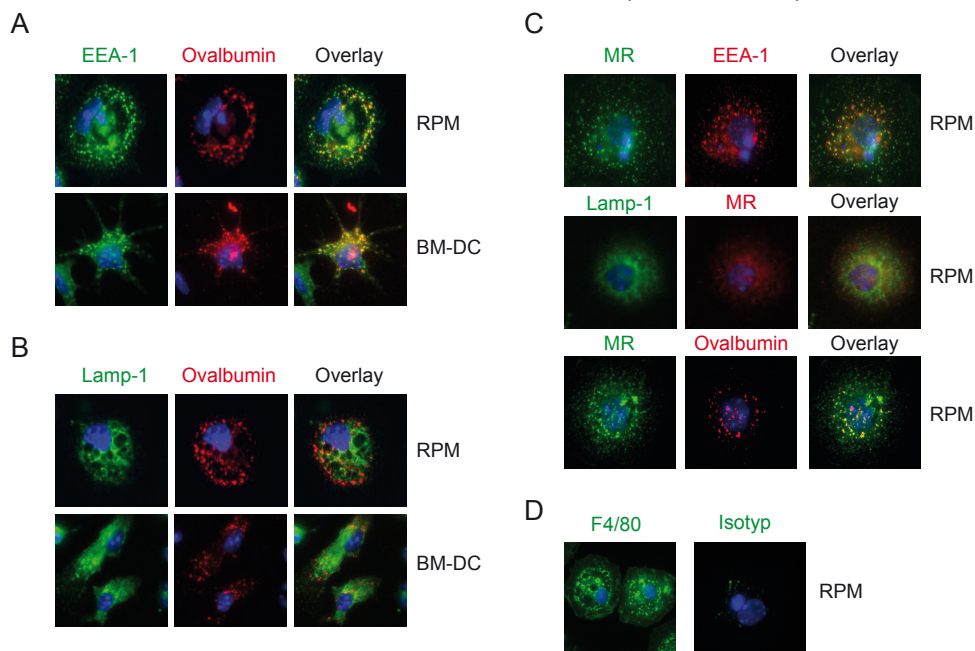


Abbildung 3-11: Antigen transport in BM-DC und RPM. (A, B) Immunzytochemische Färbungen von BM-DC (obere Reihen) oder RPM (untere Reihen) mit EEA-1 (A), Lamp-1 (B), Ovalbumin (rot) und Dapi (blau). Auf der linken Seite ist die EEA-1/Lamp-1 Färbung mit Dapi dargestellt, in der Mitte das Ovalbumin-Signal mit Dapi. Rechts ist ein Overlay der jeweiligen beiden Signale mit Dapi gezeigt. (C) Immunzytochemische Färbungen von RPM mit MR und EEA-1/Lamp-1 (obere Reihen) oder MR und Ovalbumin (unterste Reihe). Auf der linken Seite ist das MR/OVA-Signal (rot) mit Dapi dargestellt, in der Mitte die EEA-1/MR-Färbung (grün) mit Dapi. Rechts ist ein Overlay der jeweiligen beiden Signale mit Dapi gezeigt. (D) Immunzytochemische Färbung von RPM mit F4/80 und Dapi (links) oder der entsprechenden Isotypkontrolle mit Dapi (rechts)

Neben der MR-vermittelten Endozytose waren RPM auch in der Lage, Antigen über Pinozytose aufzunehmen: Während die MR-vermittelte Endozytose mit Mannan blockiert werden konnte, war die Pinozytose DMA-sensitiv. Behandlung der RPM entweder mit Mannan oder DMA erlaubte es selektiv MR-abhängige Endozytose oder Pinozytose zu blockieren (Abb. 3-12).

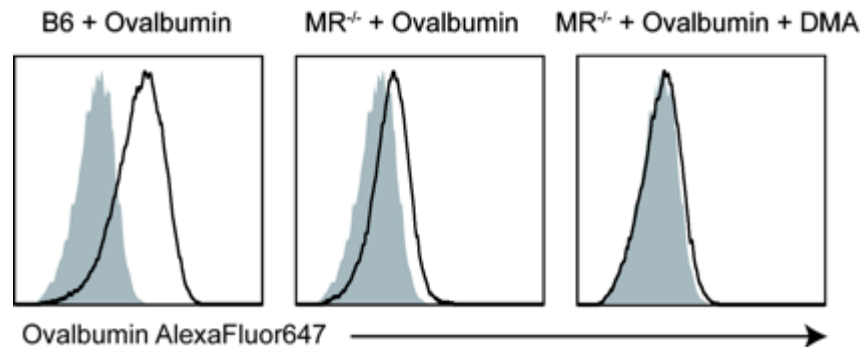


Abbildung 3-12: Inhibition der Ovalbumin-Aufnahme durch RPM. Dargestellt sind durchflußzytometrische Analysen der Aufnahme von AlexaFluor647-gekoppeltem Ovalbumin in F4/80^{hoch} CD11c^{niedrig} RPM. Zellen die mit Ovalbumin inkubiert wurden sind durch eine schwarze Linie dargestellt, Zellen ohne Ovalbumin mit einem grauen Hintergrund. Im linken Histogramm sind B6 Zellen dargestellt, im mittleren und rechten MR^{-/-} RPM. Die Zellen die im rechten Histogramm dargestellt werden, wurden zusätzlich mit 500µM DMA inkubiert.

RPM deren MR-abhängige Antigen-Aufnahme durch Mannan blockiert wurde, waren im Gegensatz zu unbehandelten RPM, *in vitro* kaum noch in der Lage OT-I T-Zellen zu aktivieren. Wenn Pinozytose in RPM durch DMA inhibiert wurde, konnten diese im Gegensatz dazu genauso effektiv T-Zellen aktivieren wie RPM die lediglich mit Ovalbumin inkubiert wurden (Abb. 3-13A). Für diese Beobachtungen war es unerheblich, ob die Isolation der RPM durch magnetische Zellaufreinigung oder mittels durchflußzytometrischer Zellsortierung erfolgte (Abb. 3-13C). BM-DC, die parallel den gleichen experimentellen Prozeduren unterworfen wurden, zeigten vergleichbare Abhängigkeiten: Kreuzpräsentation von löslichem Ovalbumin in BM-DC war abhängig von Antigen-Aufnahme durch den MR und unabhängig von Antigen-Aufnahme durch Pinozytose (Abb. 3-13A). In MR-negativen CD8⁺ dendritischen Zellen hatte Inkubation mit Mannan keinen negative Einfluss auf die T-Zellaktivierung. Auch Inhibierung der Pinozytose mittels DMA beeinflusste die OT-I Aktivierung durch CD8⁺ DCs nicht (Abb 3-13B).

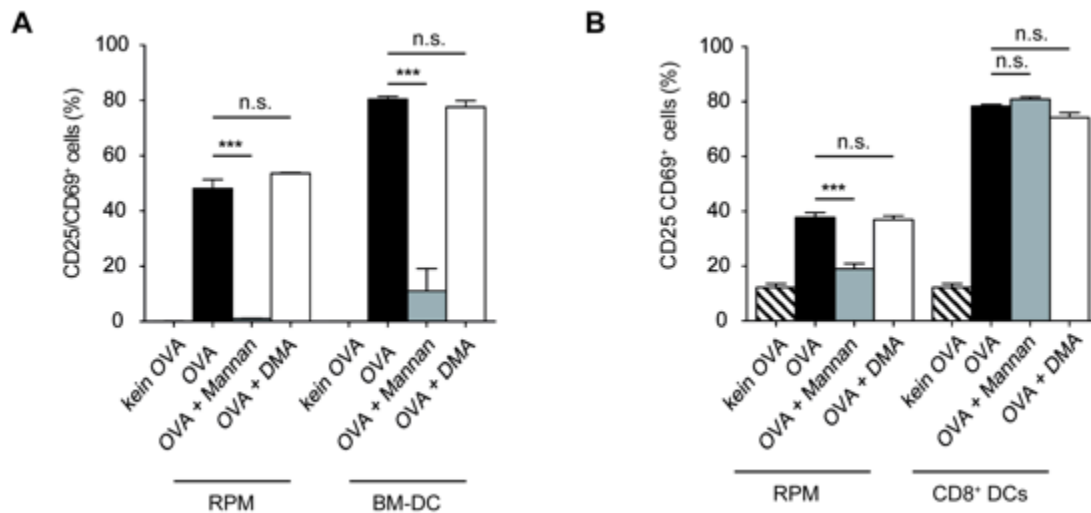


Abbildung 3-13: RPM und BM-DC, nicht aber $CD8^+$ DCs benötigen den MR zur Kreuzpräsentation von löslichem Ovalbumin. Dargestellt ist der prozentuale Anteil aktivierter OT-I T-Zellen nach Kokultur mit RPM, BM-DC oder $CD8^+$ DCs. Aufnahme von löslichem Ovalbumin durch die APC erfolgt *in vitro*. T-Zellen aus mit Ovalbumin behandelten Kokulturen sind durch schwarze Balken dargestellt. Wenn angegeben, wurden die Zellen zusätzlich Mannan (graue Balken) oder DMA (weiße Balken) behandelt. T-Zellen aus Kulturen ohne Ovalbumin sind durch schwarz gemusterte Balken dargestellt (A, B) T-Zellaktivierung nach Kokultur mit MACS-angereicherten RPM (A) oder BM-DC (B). (C) T-Zellaktivierung nach Kokultur mit durchflußzytometrisch sortierten RPM oder $CD8^+$ DCs.

Diese Daten demonstrierten, dass anders als $CD8^+$ DCs, sowohl RPM als auch BM-DC hauptsächlich durch den MR endozytiertes, nicht aber pinozytiertes Antigen zur Kreuzpräsentation nutzen. Da Burgdorf et al. zeigen konnten, dass die Aktivierung von OT-II Zellen trotz einer Inhibierung der MR-abhängigen Endozytose in BM-DC nicht beeinflusst wurde, sollte untersucht werden ob RPM einen ähnlichen Phänotyp zeigten. Daher wurde zunächst analysiert, ob RPM in der Lage waren OT-II Zellen zu aktivieren. Dazu wurden *in vivo* mit löslichem Ovalbumin beladene dendritische Zellen oder RPM mit OT-II T-Zellen kokultiviert. Nach 18 Stunden wurden die T-Zellaktivierungsmarker CD25 und CD69 auf den T-Zellen bestimmt, nach 48 Stunden die T-Zellproliferation durch Analyse des CFSE-Profiles der Zellen.

Während $CD8^+$ ($30\% CD25^+/CD69^+$ OT-II Zellen) und $CD8^-$ DCs ($25\% CD25^+/CD69^+$ OT-II Zellen) wie beschrieben in der Lage waren OT-II Zellen zu aktivieren, waren nur 6% der mit RPM kokultivierten OT-II Zellen nach 18 Stunden aktiviert (Abb. 3-14A). Dieser Trend war nach 48 Stunden anhand der CFSE-Proliferation der OT-II Zellen noch deutlicher zu erkennen: Am effektivsten proliferierten die mit $CD8^-$ DCs kokultivierten OT-II Zellen (30% proliferierte Zellen), nach Kokultur mit $CD8^+$ DCs war dies hingegen nur für 5% der T-Zellen der Fall (Abb. 3-14B). Bei den OT-II Zellen, die mit RPM kokultiviert wurde, war keinerlei Proliferation detektierbar. Diese Befunde

demonstrierten dass RPM zwar sehr effizient Antigen kreuzpräsentieren konnten, aber kaum zu klassischer MHC II Präsentation in der Lage waren. Daher konnte nicht überprüft werden ob Inhibierung der MR-abhängigen Endozytose in RPM einen Einfluß auf die Klasse II Präsentation hatte.

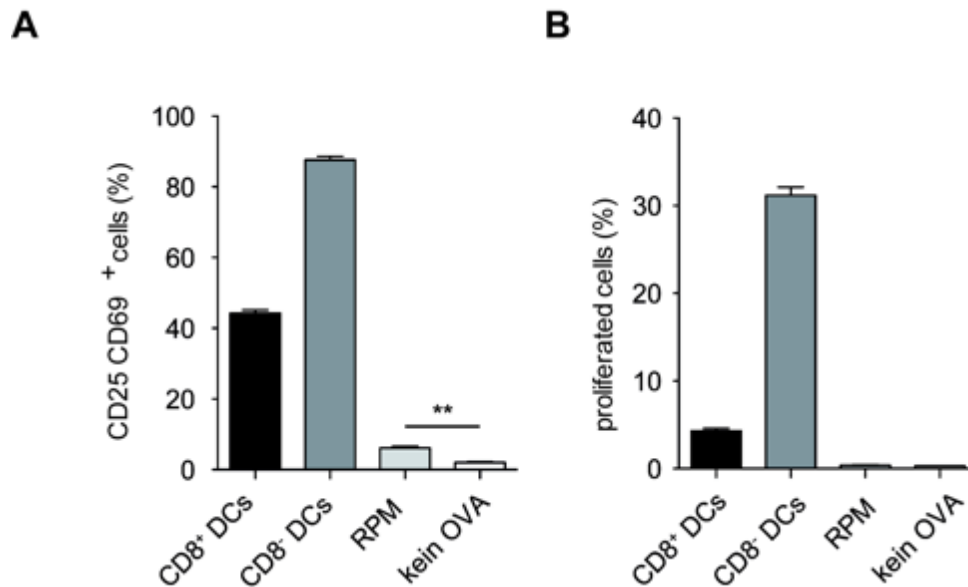


Abbildung 3-14: Konventionelle DCs, nicht aber RPM sind in der Lage OT-II T-Zellen zu aktivieren. Dargestellt sind statistische Auswertungen durchflußzytometrischer Analysen von OT-II T-Zellen aus Kokulturen mit konventionellen DCs oder RPM 18 Stunden (links) oder 48 Stunden (rechts) nach Beginn der Kokultur. (A) Analyse der T-Zellaktivierung durch Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69. Dargestellt ist der Prozentsatz CD25⁺/CD69⁺ Zellen bezogen auf die totale OT-II Zellzahl. (B) Analyse der OT-II T-Zellproliferation durch der CFSE-Profile. Dargestellt ist der Prozentsatz proliferierter OT-II T-Zellen bezogen auf die totale OT-II Zellzahl.

Diese Daten legen nahe, dass RPM sich zwar in ihrer Fähigkeit zur MHC II-Präsentation von BM-DC unterscheiden, möglicherweise aber eine ähnliche Maschinerie zur Kreuzpräsentation von löslichem Antigen nutzen. Daher wurde untersucht ob Kreuzpräsentation in RPM von der Aktivität des Proteasoms und vom endosomalen TAP-Komplexes abhängig war.

Wenn die Proteasom-Aktivität in RPM durch Epoxomycin geblockt wurde, so waren RPM, ebenso wie BM-DC, nicht mehr in der Lage, OT-I T-Zellen zu aktivieren. Während durch unbehandelte RPM 32% der OT-I T-Zellen aktiviert wurden, waren nach Behandlung der RPM mit 8µM Epoxomycin weniger als 1% der Zellen aktiviert. Unbehandelte BM-DC waren in der Lage 38% der OT-I Zellen zu aktivieren, nach Behandlung mit 8µM Epoxomycin war ebenfalls weniger als 1% der Zellen CD25⁺/CD69⁺ (Abb. 3-15A). Außerdem konnte mittels Immunfluoreszenz nach Aufnahme von fluoreszenz-markiertem Ovalbumin eine Kolokalisation von TAP mit Ovalbumin-enthaltenden

Endosomen nachgewiesen werden. Wenn hingegen endotoxin-freies Ovalbumin aufgenommen wurde, war keine Kolo-kalisation nachweisbar (Abb. 3-15B). Ebenso wie BM-DC⁴⁸ schienen RPM also in der Lage zu sein TAP-Komplexe nach TLR-Stimulus an Ovalbumin-enthaltende Endosomen zu rekrutieren.

Um nachzuweisen, ob diese endosomalen TAP-Komplexe für die Kreuzpräsentation von löslichem Ovalbumin notwendig waren, wurden diese Komplexe mit einem viralen UL49.5 Peptid inhibiert⁸⁷. Anschließend wurde die Fähigkeit der RPM getestet durch Kreuzpräsentation von löslichem Ovalbumin OT-I T-Zellen zu aktivieren. Um das virale Peptid in die Endosomen zu transportieren, wurde das Peptid kovalent an Transferrin gebunden. Dieser Komplex wurde durch den Transferrin-Rezeptor aufgenommen und in die EEA-1⁺ Endosomen transportiert. Wurden die endosomalen TAP-Komplexe in RPM oder BM-DC auf diese Weise inhibiert, reduzierte dies die Fähigkeit der beiden Zelltypen, lösliches Ovalbumin an OT-I T-Zellen zu präsentieren. Unbehandelte RPM konnten nach Inkubation mit 100µg/ml Ovalbumin knapp 25% der T-Zellen aktivieren. Wenn die Zellen jedoch zusätzlich mit 1mM des Transferrin-UL49.5 Peptids inkubiert wurden, so konnten diese RPM nur noch 8% der T-Zellen aktivieren. BM-DC die mit dem Inhibitor behandelt wurden zeigten eine vergleichbare Tendenz: Unbehandelte BM-DC konnten rund 35% der OT-I T-Zellen aktivieren, während diese Prozentsatz nach Inkubation der BM-DC mit dem Inhibitor auf 15% sank (Abb. 3-15C). Diese Reduktion war nicht auf eine Inhibition der im ER lokalisierten TAP-Komplexe zurückzuführen, da sowohl RPM als auch BM-DC endogenes Ovalbumin, dass den Zellen über osmotischen Schock zugeführt wurden, nach Inkubation mit dem TAP-Inhibitor vergleichbar effektiv an OT-I Zellen präsentierten wie unbehandelte Zellen (Abb. 3-15D).

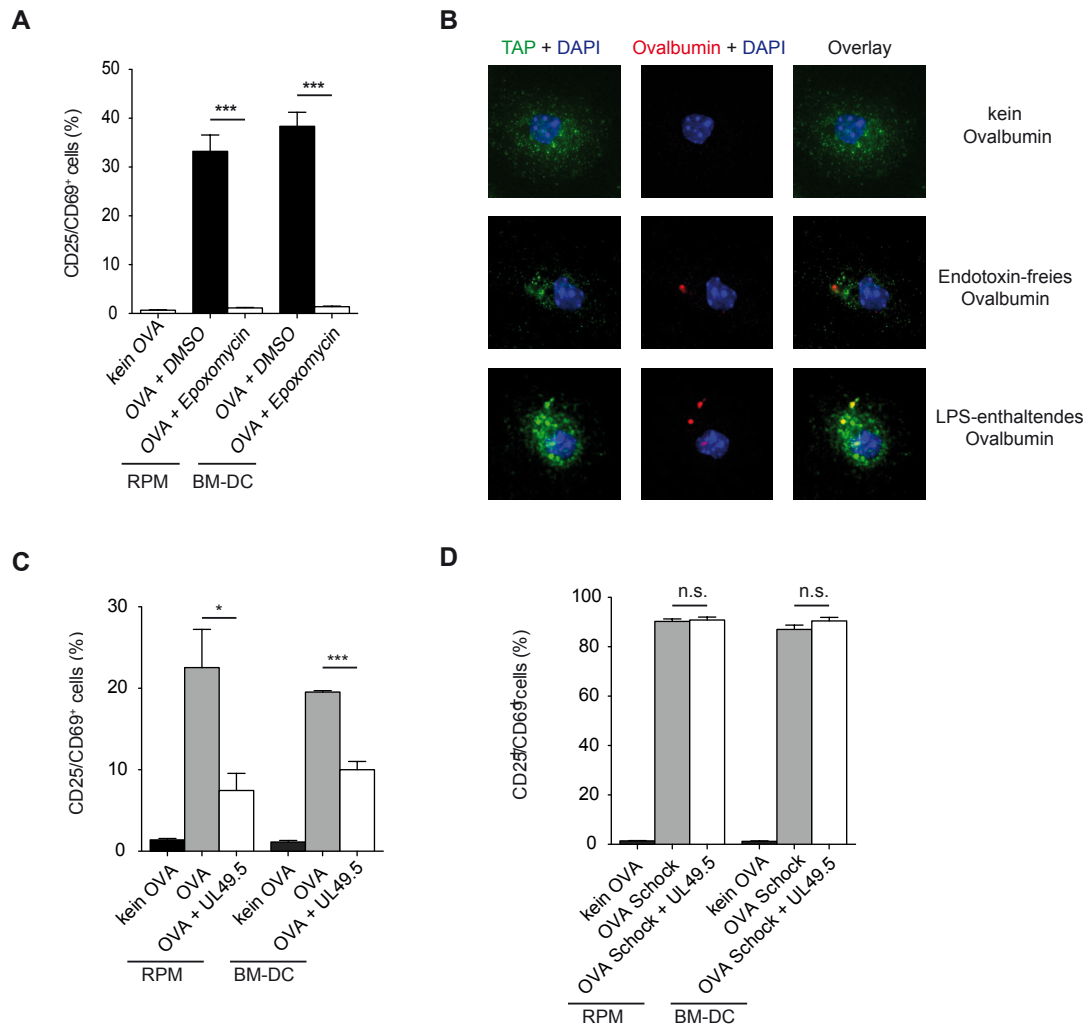


Abbildung 3-15: Kreuzpräsentation von löslichem Ovalbumin durch RPM ist vom Proteasom und endosomalen TAP-Komplexen abhängig. (A,C,D) Statistische Auswertungen durchflußzytometrischer Analysen von OT-I T-Zellen aus Kokulturen mit BM-DCs oder RPM 18 Stunden nach Beginn der Kokultur. Die Analyse der T-Zellaktivierung durch Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69. Dargestellt ist der Prozentsatz CD25⁺/CD69⁺ Zellen bezogen auf die totale OT-I Zellzahl. (A) T-Zellaktivierung nach Behandlung der RPM oder BM-DC mit DMSO oder 8µM Epoxomycin. (B) Immunfluoreszenzaufnahmen von RPM nach Endozytose von PBS (Obere Reihe), Ovalbumin-AlexaFluor647 (Mittlere Reihe) oder endotoxin-freiem Ovalbumin-Alexa647 (untere Reihe). In der linken Spalte ist das Ovalbumin-Signal dargestellt (rot), in der mittleren Spalte die TAP-Färbung (grün), in der rechten Spalte ein Overlay der beiden Färbungen. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). (C) T-Zellaktivierung nach Aufnahme von 100µg/ml löslichem Ovalbumin und Behandlung der RPM oder BM-DC mit PBS (schwarze Balken) oder 1mM Transferrin-gekoppeltem TAP-Inhibitor (weiße Balken). (D) T-Zellaktivierung nach osmotischem Schock mit 1mg/ml Ovalbumin und Behandlung der RPM oder BM-DC mit PBS (schwarze Balken) oder 1mM Transferrin-gekoppeltem TAP-Inhibitor (weiße Balken).

Diese Experimente zeigten deutlich, dass RPM ähnliche molekulare Mechanismen zur Kreuzpräsentation von löslichem Antigen nutzen wie BM-DC.

3.1.7 RPM erschweren magnetische und durchflußzytometrische Zellaufreinigungen

Gemeinhin wird CD11c als typischer DC-Maker genutzt, und Protokolle zur Aufreinigung von DCs durch magnetischen Anreicherung von CD11c-positiven Zellen sind in der Literatur akzeptiert⁸⁸⁻⁹⁰. Daher ist es möglich, dass durch RPM-Kontaminationen in magnetischen CD11c-Zellaufreinigungen Eigenschaften der RPM wie beispielsweise MR-Expression oder MR-abhängige Ovalbuminaufnahme fälschlicherweise den DCs zugeschrieben werden.

Um dies später untersuchen zu können, wurde eine Methode entwickelt um die RPM von den angereicherten CD11c-positiven Zellen abzutrennen. Dazu wurde der eigentlichen Aufreinigung eine weitere Zellaufreinigung vorschaltetet. In dieser wurden die RPM mit einer gegen den MR gerichteten magnetischen Zellanreicherung aus der Milz-Einzelzellsuspension depletiert. Mittels einer zweiten magnetischen Anreicherung wurden dann wie gewohnt CD11c⁺ DCs aufgereinigt. Eine durchflußzytometrische Analyse der aufgereinigten Zellen zeigte eine massive Anreicherung der RPM in der abgetrennten Fraktion, während in der verbleibenden Zellsuspension nahezu keine RPM mehr zu finden waren (Abb. 3-16A). Eine Zellfraktion, die nach dieser Depletion für CD11c-positive Zellen angereichert wurde, war zum Großteil frei von RPM, während in der positive-Fraktion solchen Anreicherung ohne eine vorgeschaltete Depletion RPM fast 30% der Gesamtzellzahl ausgemachten (Abb. 3-16B).

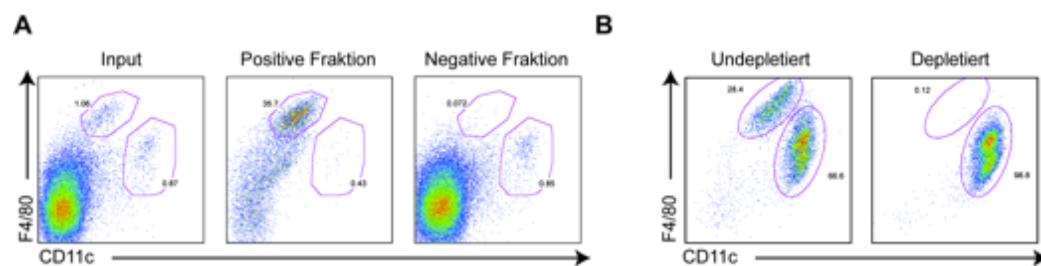


Abbildung 3-16: Anreicherung von RPM durch MR-MACS. Dargestellt sind Diagramme durchflußzytometrischer Analysen von verschiedenen magnetisch aufgereinigten Zellsuspensionen und der Input-Fraktion. Die Identifikation der RPM erfolgte über die Marker F4/80^{hoch} und CD11c^{niedrig}, DCs wurden als F4/80^{niedrig}- und CD11c^{hoch} identifiziert. (A) Anreicherung von RPM durch MR-MACS: Das linke Diagramm zeigt eine unbehandelte Milzzellsuspension, der mittlere die mittels MR-MACS aufgereinigte Positiv-Fraktion, während der rechte die Negativ-Fraktion darstellt. (B) Mittels magnetischer Zellaufreinigung angereicherte CD11c-positive Zellen, auf der linken Seite ohne vorhergehende Depletion der RPM, auf der rechten Seite nach Depletion der RPM durch MR-MACS.

Kontrollversuche bei denen die Depletion nur mit α -Biotin Mikropartikeln durchgeführt wurde, zeigten dass ohne spezifischen Antikörper ebenfalls RPM angereichert wurden. Diese Anreicherung entfernte allerdings nicht alle RPM aus der Negativ-Fraktion (Abb. 3-17A). Um zu überprüfen, ob die RPM unspezifisch an die Mikropartikel binden, wurden Milzzellen ohne Mikropartikel inkubiert und auf eine LS-Aufreinigungssäule geladen. Auch in diesem Fall fand sich in der Positiv-Fraktion eine erhebliche Anreicherung an RPM (Abb. 3-17B)

Dies deutet darauf hin, dass die Mikropartikel nicht unspezifisch an die RPM banden, sondern vielmehr unspezifische Bindungen der Zellen an die Aufreinigungssäule vorlagen.

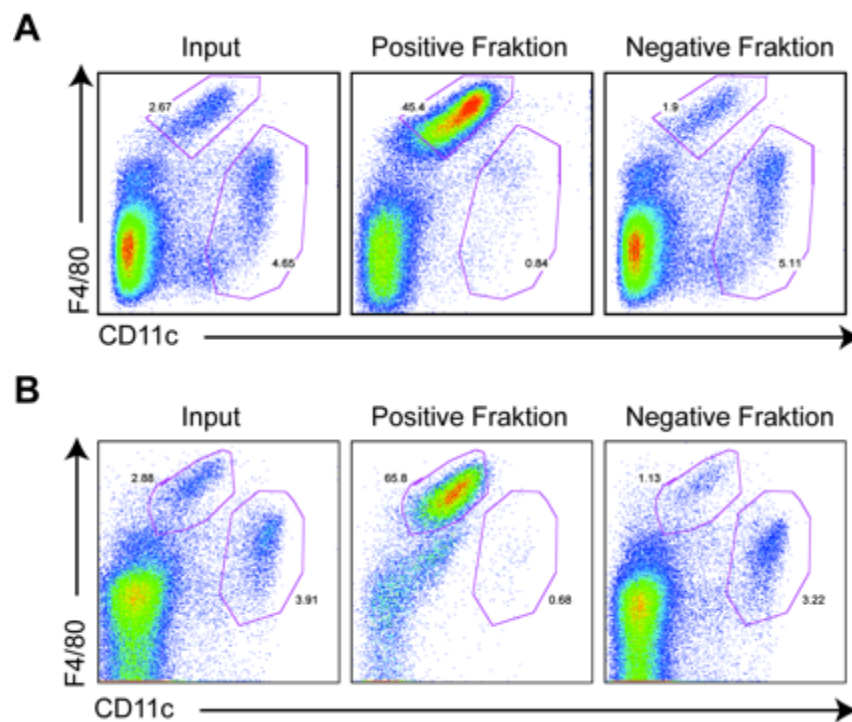


Abbildung 3-17: RPM binden unspezifisch an LS-Aufreinigungssäulen. Durchflußzytometrische Analyse von Milzzellpopulationen vor und nach Aufreinigung auf einer LS-Aufreinigungssäule. RPM wurden als F4/80^{hoch} CD11c^{niedrig} Zellen identifiziert. Gezeigt sind die unbehandelten (linke Spalte), positive (mittlere Spalte) und negative Fraktionen (rechts Spalte). (A) Aufreinigung von Milzzellen nach Inkubation der Zellen mit α -Biotin-Mikropartikel. (B) Aufreinigung un behandelter Milzzellen.

Da RPM große Mengen gealterter Erythrozyten und damit große Mengen Eisen aufnahmen, war es möglich, dass die Zellen durch diese Eisenanreicherung unter dem Einfluß eines äußeren Magnetfelds paramagnetische Eigenschaften aufwiesen.

Um diese Vermutung zu prüfen, wurden unbehandelte Milzzellsuspensionen auf zwei LS-Aufreinigungssäulen aufgetragen. Eine dieser Aufreinigungssäulen befand sich an einem Magneten, die andere kam zu keinem Zeitpunkt des Protokolls mit diesem in Kontakt. Wie in Abb. 3-18 dargestellt, fand nur dann eine Anreicherung der RPM statt wenn die Säule während des Protokolls an einem Magneten befestigt war. Ohne Einwirkung des Magneten verblieben nahezu keine Zellen in der Säule. Die Anteile der verschiedenen Zelltypen in dieser Probe unterschieden sich darüber hinaus nicht von der Zellverteilung in der unbehandelten Milzzellen (Abb. 3-18A, B).

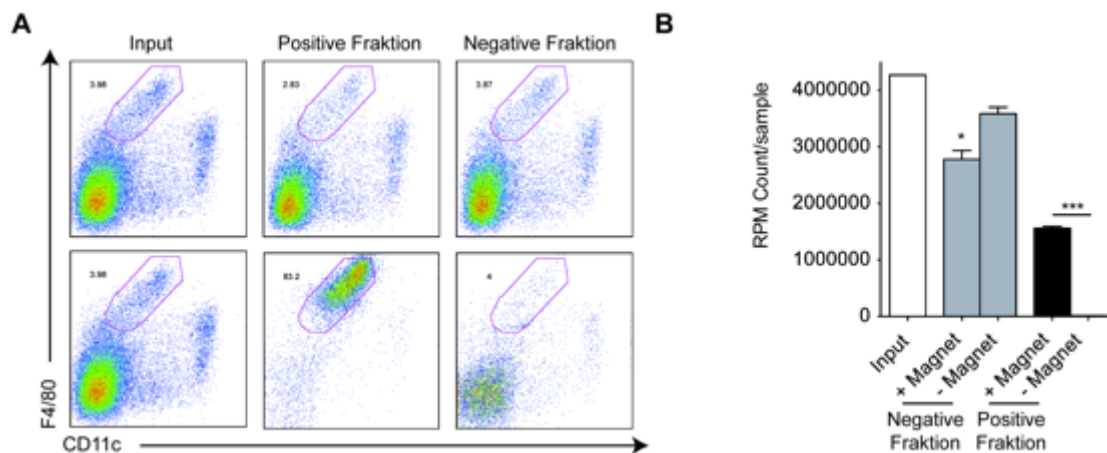


Abbildung 3-18: RPM binden MACS-Aufreinigungssäulen auf Grund ihrer magnetischen Eigenschaften. (A) Durchflußzytometrische Analyse von Milzzellpopulationen vor und nach Aufreinigung auf einer LS-Aufreinigungssäule. RPM wurden als F4/80^{hoch} CD11c^{niedrig} Zellen identifiziert. Gezeigt sind die unbehandelten (linke Spalte), positive (mittlere Spalte) und negative Fraktionen (rechts Spalte). Die obere Reihe zeigt eine Aufreinigung während die LS-Säule am Magneten befestigt war, die untere Reihe eine Aufreinigung ohne Kontakt der Säule zum Magneten. (B) Statistische Analyse der RPM-Anzahl in der oben beschriebenen Proben. Die RPM-Anzahl in der unbehandelten Probe ist durch einen weißen Balken dargestellt. Die Anzahl in den positive Fraktionen ist durch hellgraue Balken wiedergegeben, die in den negative Fraktionen durch weiße Balken. Aufreinigung unter Einfluß eines Magneten wird durch die jeweils linke Säule repräsentiert, Aufreinigung ohne Magnet durch die rechte.

Dies zeigte dass die RPM auf Grund ihrer paramagnetischen Eigenschaften durch magnetische Zellaufreinigungen angereichert wurden. Dieser Prozess war unabhängig von der Art des Antigens, gegen das sich die Aufreinigung richtete. Auch in der Positiv-Fraktion einer magnetischen Anreicherung von CD4⁺ Zellen fanden sich neben den erwarteten CD4⁺ T-Zellen zahlreiche RPM (Abb. 3-19D). Ebenso waren in aufgereinigten CD19⁺ Zellen neben B-Zellen eine erhebliche Menge RPM detektierbar (Abb. 3-19A). Diese Kontaminationen konnte beseitigt werden, wenn die Zellsuspensionen vor der eigentlichen Aufreinigung wie beschrieben von RPM depletiert wurden. Bei diesem Aufreinigungsprotokoll gingen nahezu keine T- oder B-Zellen verloren (Abb. 3-19).

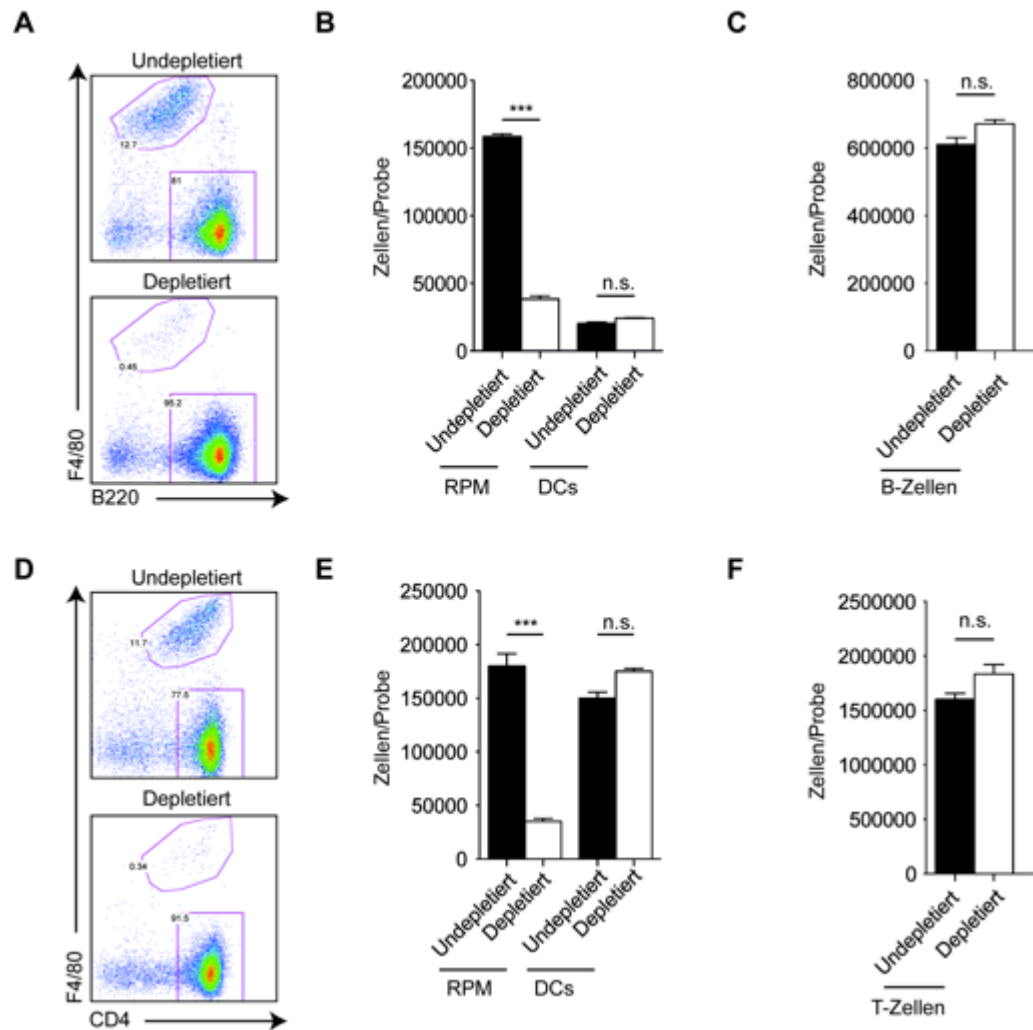


Abbildung 3-19: RPM kontaminieren durch CD19- und CD4-MACS aufgereinigte Zellen. Dargestellt sind durchflußzytometrische Analysen des Anteils von $F4/80^{hoch} CD11c^{niedrig}$ RPM an der Gesamtzellpopulation (A, C) oder statistische Analysen der RPM-, B-Zell- und T-Zellzahlen (B, D). (A) Kontamination von durch CD19-MACS aufgereinigten B-Zellkulturen durch RPM. Die DotPlots zeigen den Anteil an RPM und B-Zellen nach einem CD19-MACS ohne (oben), oder nach vorhergegangener Depletion der RPM (unten). (B) Obere Grafik: Statistische Analyse der RPM- (linke Balken) und DC-Kontamination (rechte Balken) in durch CD19-MACS aufgereinigten B-Zellkulturen. Weiße Balken repräsentieren RPM-depletierte, schwarze Balken nicht-depletierte Proben. Unteres Diagramm: Anzahl an B-Zellen in den Kulturen nach Depletion (weißer Balken) oder ohne Depletion der RPM (schwarzer Balken) (C) Kontamination von durch CD4-MACS aufgereinigten T-Zellkulturen durch RPM. Die Diagramme zeigen den Anteil an RPM und T-Zellen nach einem CD4-MACS ohne (oben), oder nach vorhergegangener Depletion der RPM (unten). (D) Obere Grafik: Statistische Analyse der RPM- (linke Balken) und DC-Kontamination (rechte Balken) in durch CD4-MACS aufgereinigten T-Zellkulturen. Weiße Balken repräsentieren RPM-depletierte, schwarze Balken nicht-depletierte Proben. Unteres Diagramm: Anzahl an T-Zellen in den Kulturen nach Depletion (weißer Balken) oder ohne Depletion der RPM (schwarzer Balken).

3.1.8 Autofluoreszente RPM erschweren durchflußzytometrische Analysen

Neben ihren paramagnetischen Eigenschaften, die zur unspezifischen Anreicherung der Zellen in magnetischen Zellaufreinigungen führten, zeigten die Zellen zusätzlich eine starke Autofluoreszenz. Da Burgdorf in $CD8^+$ DCs eine MR-Färbung detektieren konnte⁴⁷, sollte untersucht werden, ob diese Beobachtung auf die Autofluoreszenz der RPM zurückzuführen war.

Tatsächlich war die Autofluoreszenz der Zellen stark genug um ein falsch-positives Signal in durchflußzytometrischen Analysen zu liefern. Wie in Abb. 3-20A dargestellt, wurden die RPM auf Grund ihrer Autofluoreszenz fälschlicherweise als $CD8^+$ Zellen identifiziert. Die Daten zeigten deutlich, dass die RPM einen Großteil der putativen $CD8^+$ DC-Population ausmachen, und dass die tatsächliche Anzahl $CD8^+$ DCs sehr viel geringer war, wenn die RPM vorher ausgeschlossen wurden: Ohne Ausschluß der RPM waren 59,2% der $CD11c^+$ Zellen $CD8^-$ und 40,9% $CD8^+$. Wurden die RPM ausgeschlossen zeigte sich, dass das $CD8^+$ DC-Subset lediglich 19,6% der Gesamt-DCs ausmacht, während 80,5% der Zellen $CD8^-$ waren (Abb. 3-20A). Wurden die verschiedenen DC-Populationen auf MR-abhängige Ovalbumin-Aufnahme untersucht, nahmen putative $CD8^+$ DCs MR-abhängig Ovalbumin auf. Wurden die RPM vorher aus dem Gate entfernt, so konnte keine MR-abhängige Ovalbumin-Aufnahme mehr detektiert werden (Abb. 3-20B).

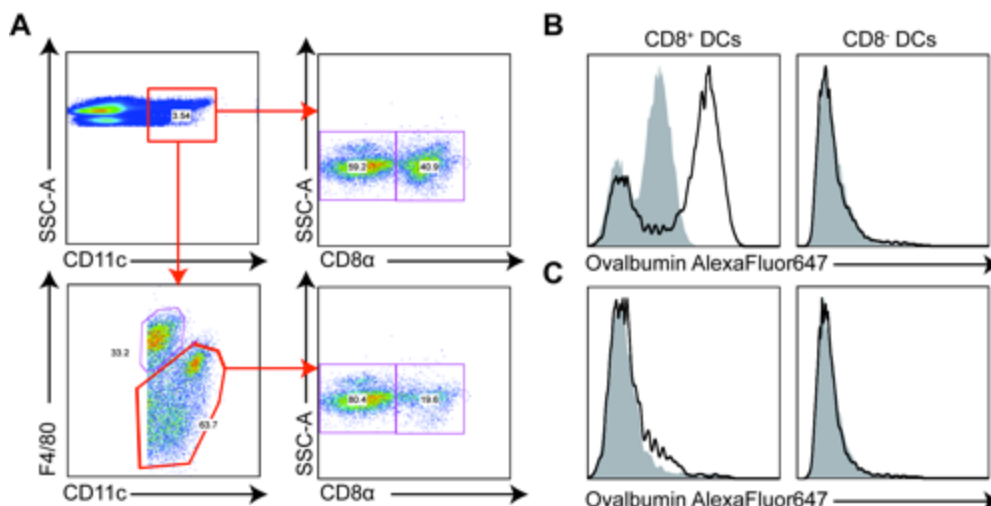


Abbildung 3-20: Beeinträchtigung durchflußzytometrischer Analysen durch RPM. (A) Diagramme von $CD11c^-$, $F4/80$ und $CD8$ -gefärbten Milzzellsuspensionen. Obere Reihe: Identifikation $CD11c^+$ Zellen (links, rot umrahmt), Unterteilung der $CD11c^+$ Zellen in $CD8^+$ und $CD8^-$ DCs (rechts). Untere Reihe: Exklusion der RPM als $F4/80^{\text{hoch}}$ $CD11c^{\text{niedrig}}$ Verbliebene $CD11c^+$ Zellen wurden als DCs identifiziert (links, rot umrahmt) und in ein $CD8^+$ und $CD8^-$ Zellsubset unterteilt (rechts). (B, C) Die dargestellten Histogramme zeigen die Aufnahme von löslichem, fluoreszenz-gekoppeltem Ovalbumin durch putative $CD8^+$ und $CD8^-$ DCs ohne/mit Exklusion der RPM. Wildtyp-Zellen sind durch schwarze Linien dargestellt, Zellen deren MR-Aufnahme mit 3mg/ml Mannan geblockt wurde, durch grauen Hintergrund.

Dieses Experiment zeigte deutlich, dass die spezifischen Eigenschaften von RPM nicht nur magnetische Zellaufreinigungen, sondern auch durchflußzytometrische Analysen erschweren. Außerdem demonstrierte es, dass die von Burgdorf et al in CD11c-positiven Zellen beobachtete Ovalbumin-Aufnahme und MR-Färbung sehr wahrscheinlich durch die oben beschriebene RPM-Kontamination zustande kam.

3.1.9 Immunologische Relevanz der Rote-Pulpa-Makrophagen

Obwohl RPM lösliches Ovalbumin *in vitro* sehr effektiv an OT-I T-Zellen kreuzpräsentieren konnten, war auf Grund der Lokalisation der Zellen in der Milz unklar ob diese Aktivierung auch *in vivo* relevant war. Im Gegensatz zu konventionellen dendritischen Zellen, die in der T-Zell reichen weißen Pulpa lokalisiert waren, befanden sich ein Großteil der RPM in der T-Zell-armen roten Pulpa. Daher wurde zunächst untersucht, ob RPM mit adoptiv transferierten OT-I Zellen in Kontakt kamen und ob die T-Zellaktivierung in RPM-defizienten *SpiC*^{-/-} Mäusen gestört war. Dazu wurde die Lokalisation adoptiv transferierter CFSE-gefärbte OT-I T-Zellen in der Milz analysiert. Wie in Abb. 3-21A und B dargestellt zeigten Kryoschnitte, dass eine Stunde nach Transfer fast 80% der OT-I Zellen in der roten Pulpa zu finden waren. Dieser Trend kehrte sich nach einem Tag um: Nach 30 Stunden befanden sich mit 96% nahezu alle T-Zellen in der weißen Pulpa (Abb. 3-21A). Die in der roten Pulpa lokalisierten T-Zellen befanden sich zum Großteil im Kontakt mit F4/80-positiven Zellen, bei denen es sich sehr wahrscheinlich um RPM handelte (Abb. 3-21B). Dieses Daten zeigte somit, dass adoptiv transferierte OT-I Zellen *in vivo* mit RPM in Kontakt treten konnten.

Im darauf folgenden Schritt wurde analysiert, ob RPM *in vivo* zur Aktivierung von OT-I T-Zellen beitragen. Dazu wurden CFSE-gefärbte OT-I Zellen adoptiv in *Wildtyp* oder *SpiC*^{-/-} Mäuse transferiert und die Proliferation der OT-I Zellen nach der Injektion von Ovalbumin untersucht. Um eine T-Zellaktivierung unter inflammatorischen Bedingungen zu simulieren, wurden Ovalbumin und LPS als Adjuvanz injiziert, zur Simulierung einer tolerogenen Umgebung wurde dagegen endotoxin-freies Ovalbumin injiziert.

Nach der Injektion von endotoxin-freiem Ovalbumin war der Anteil der proliferierten OT-I Zellen in *SpiC*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu *Wildtyp*-Mäusen um etwa 25% verringert. Während in *Wildtyp*-Mäusen 79,1% der OT-I Zellen mindestens eine Zellteilung durchlaufen hatten, war dies in *SpiC*^{-/-} Mäusen für lediglich 59% der Fall (Abb. 3-21 C, E). Die OT-I T-Zellen hatten in *Wildtyp*-

Mäusen im Schnitt 2,5 Teilungszyklen durchlaufen, in *SpiC*^{-/-} Mäusen lediglich 1,8. Dies entsprach einer Reduktion von ungefähr 25% (Abb. 3-21D).

Nach der Injektion von LPS-enthaltendem Ovalbumin proliferierten sowohl in *Wildtyp*- (96,2%), als auch in *SpiC*^{-/-} Mäusen (95%) ein vergleichbarer prozentualer Anteil der OT-I Zellen (Abb. 3-21F, H). Ein Vergleich der CFSE-Profile und des Divisions-Index zeigten jedoch, dass in *SpiC*^{-/-} im Vergleich zu *Wildtyp*-Mäusen die OT-I Zellen im Durchschnitt 20% weniger Teilungen durchlaufen hatten (3,5 Proliferationszyklen in *Wildtyp*-, 2,8 in *SpiC*^{-/-} Mäusen)(Abb. 3-21G). Diese Befunde zeigten, dass RPM *in vivo* zur Aktivierung von OT-I Zellen beitragen und dass dieser Effekt nach Injektion von endotoxin-freiem Ovalbumin etwas stärker ausgeprägt war als unter inflammatorischen Bedingungen.

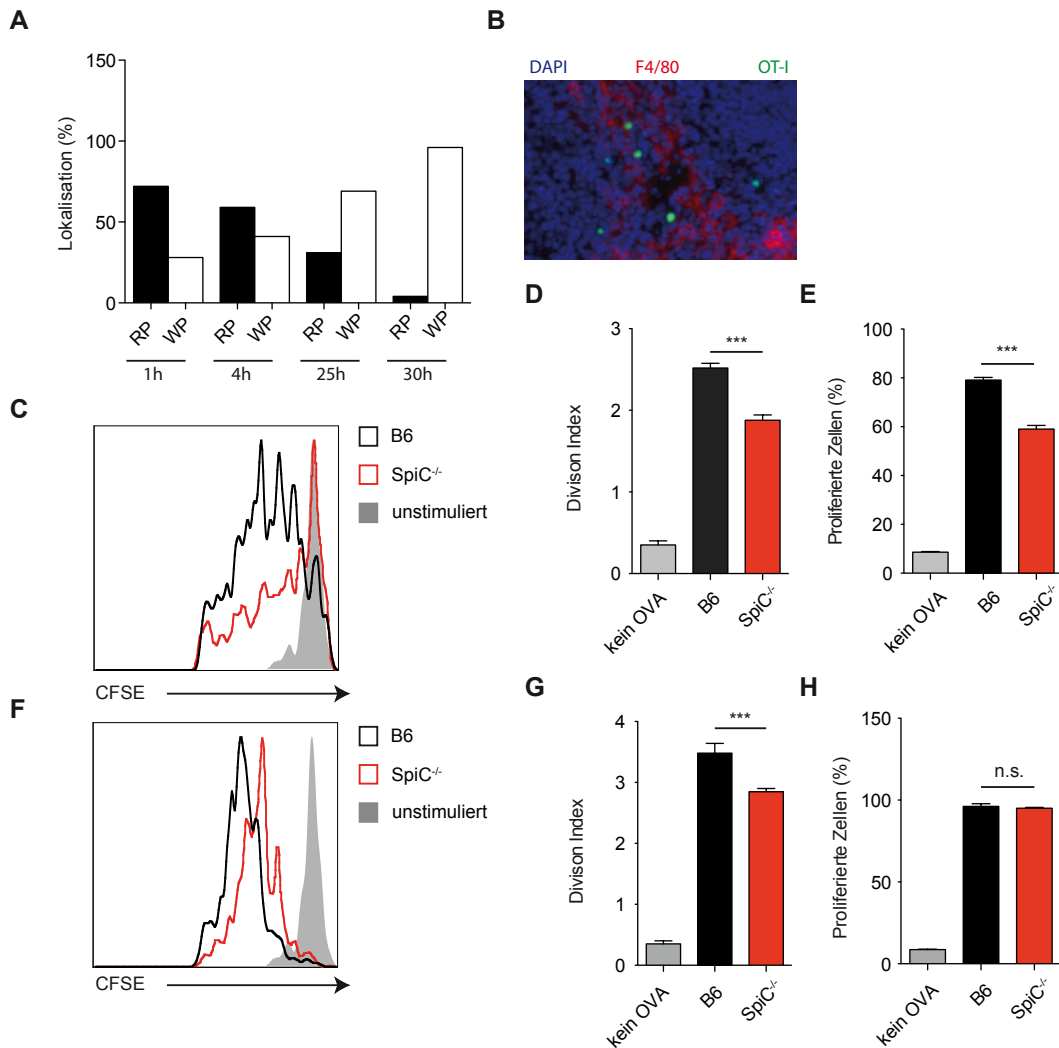


Abbildung 3-21: OT-I T-Zellokalisierung und -aktivierung in Wildtyp- und SpiC^{-/-} Mäusen. (A) Statistische Auswertung der Lokalisation adoptiv transferierter OT-I T-Zellen in der murinen Milz. WP = Weiße Pulpa, RP = Rote Pulpa. **(B)** Repräsentative Immunfluoreszenz-Aufnahme eines Kyroschnittes der murinen Milz eine Stunde nach adoptivem Transfer von CFSE-gefärbten OT-I Zellen. RPM sind mit F4/80 (rot), OT-I Zellen mit CFSE gefärbt (grün). Zellkerne wurden durch DAPI (blau) markiert. **(C, F)** CFSE-Profile adoptiv transferierter OT-I Zellen 48 Stunden nach Aktivierung mit endotoxin-freiem Ovalbumin (C) oder Ovalbumin+LPS (F). Zellen aus Wildtyp-Mäusen sind durch die schwarze Linie dargestellt, Zellen aus SpiC^{-/-} durch die rote, gestrichelte Linie. Zellen aus uninjizierten Mäusen sind durch einen grauen Hintergrund abgebildet. **(D, G)** Statistische Auswertung des Divisions Index adoptiv transferierter OT-I Zellen 48 Stunden nach Aktivierung mit endotoxin-freiem Ovalbumin (D) oder Ovalbumin+LPS (G). **(E, H)** Statistische Auswertung der Anzahl proliferierter adoptiv transferierter OT-I Zellen 48 Stunden nach Aktivierung mit endotoxin-freiem Ovalbumin Ovalbumin+LPS (E) oder Ovalbumin+LPS (H). Zellen aus Wildtyp-Mäusen sind durch schwarze Balken dargestellt, Zellen aus SpiC^{-/-} Mäusen durch weiße Balken. Zellen aus uninjizierten Mäusen sind durch einen grauen Balken abgebildet

Nachdem aufgeklärt wurde, dass RPM *in vivo* zur Aktivierung von naiven T-Zellen beitragen konnten, sollte analysiert werden, für welchen immunologischen Vorgang dies eine Relevanz hatte.

Zunächst wurde überprüft, ob die RPM eine Rolle bei der Induktion von zytotoxischen T-Zellantworten spielten. Um zu analysieren, ob die RPM in *Batf3*^{-/-} Mäusen unabhängig von CD8⁺ DCs eine Immunantwort induzieren konnten, wurden die folgenden Experimente sowohl mit *Spic*^{-/-}, als auch mit *Batf3*^{-/-} Mäusen durchgeführt. Zur Unterscheidung des klassischen und des alternativen „Cross-priming“, wurden als Adjuvantien CpG-Oligonukleotide (klassisch) und das Lipid α -Galactosylceramide (alternativ) verwendet⁹¹. Um auszuschließen, dass die RPM einen Effekt auf die Lizenzierung und nicht auf die Kreuzpräsentation des Antigens hatten wurde zusätzlich ein α -CD40 Antikörper verwendet, der das CD40-Molekül auf der Zelloberfläche der APC bindet, die Zelle auf diese Weise aktiviert und so die Lizenzierung der APC substituiert.

In beiden Knockout-Mäuse konnte sowohl für das klassische, als auch für das alternative „Cross-priming“ eine erheblich reduzierte zytotoxische T-Zellantwort beobachtet werden. In beiden Fällen war der Effekt in *Batf3*^{-/-} stärker ausgeprägt als in *Spic*^{-/-} Mäusen: Nach dem Priming mit Ovalbumin und CpG war die Ovalbumin-spezifische Zytotoxizität von 55,6% im Wildtyp auf 21% in *Spic*^{-/-} bzw. 11,9% in *Batf3*^{-/-} Mäusen reduziert (Abb. 3-22A). Nach dem Priming mit Ovalbumin und α GC dagegen war diese von 95,3% im Wildtyp auf 51,5% in *Spic*^{-/-} bzw. 2,3% in *Batf3*^{-/-} Mäusen reduziert (Abb. 3-22B). Diese Verminderung der Ovalbumin-spezifischen Zytotoxizität war nicht auf eine verringerte Effektorfunktion der T-Zellen, sondern auf eine Reduktion der T-Zellzahl zurückzuführen. Durchflußzytometrische Analysen der Anzahl an Ovalbumin-spezifischen T-Zellen ergaben, dass diese nach dem Priming mit Ovalbumin und CpG sowohl in *Spic*^{-/-} (3,14% aller CD8⁺ T-Zellen), als auch in *Batf3*^{-/-} Mäusen (1,5% aller CD8⁺ T-Zellen) im Vergleich zum Wildtypen (6,5% aller CD8⁺ T-Zellen) im gleichen Maße wie die zytotoxische T-Zellantwort reduziert waren (Abb. 3-22C). Wurden die Mäuse hingegen mit Ovalbumin und α -CD40 Antikörper injiziert, so war in *Spic*^{-/-} Mäusen kein Defekt in der Ovalbumin-spezifische Zytotoxizität zu beobachten (62,55% in Wildtyp- 62,35% in *Spic*^{-/-} Mäusen). In *Batf3*^{-/-} Mäusen war hingegen die Zytotoxizität auf 4,75% reduziert (Abb. 3-22D). Dieses spiegelte sich ebenfalls in der Anzahl von Ovalbumin-spezifischen T-Zellen wieder: Während ihr prozentualer Anteil an den CD8⁺ T-Zellen in Wildtyp- und *Spic*^{-/-} Mäusen mit ca. 13% nahezu identisch war, zeigte sich dagegen in *Batf3*^{-/-} Mäusen eine Reduktion auf 0,4% (Abb. 3-22E). Diese Daten zeigten somit deutlich, dass sowohl RPM, als auch CD8⁺ DCs eine erhebliche Rolle in der Induktion zytotoxischer T-Zellantworten spielten.

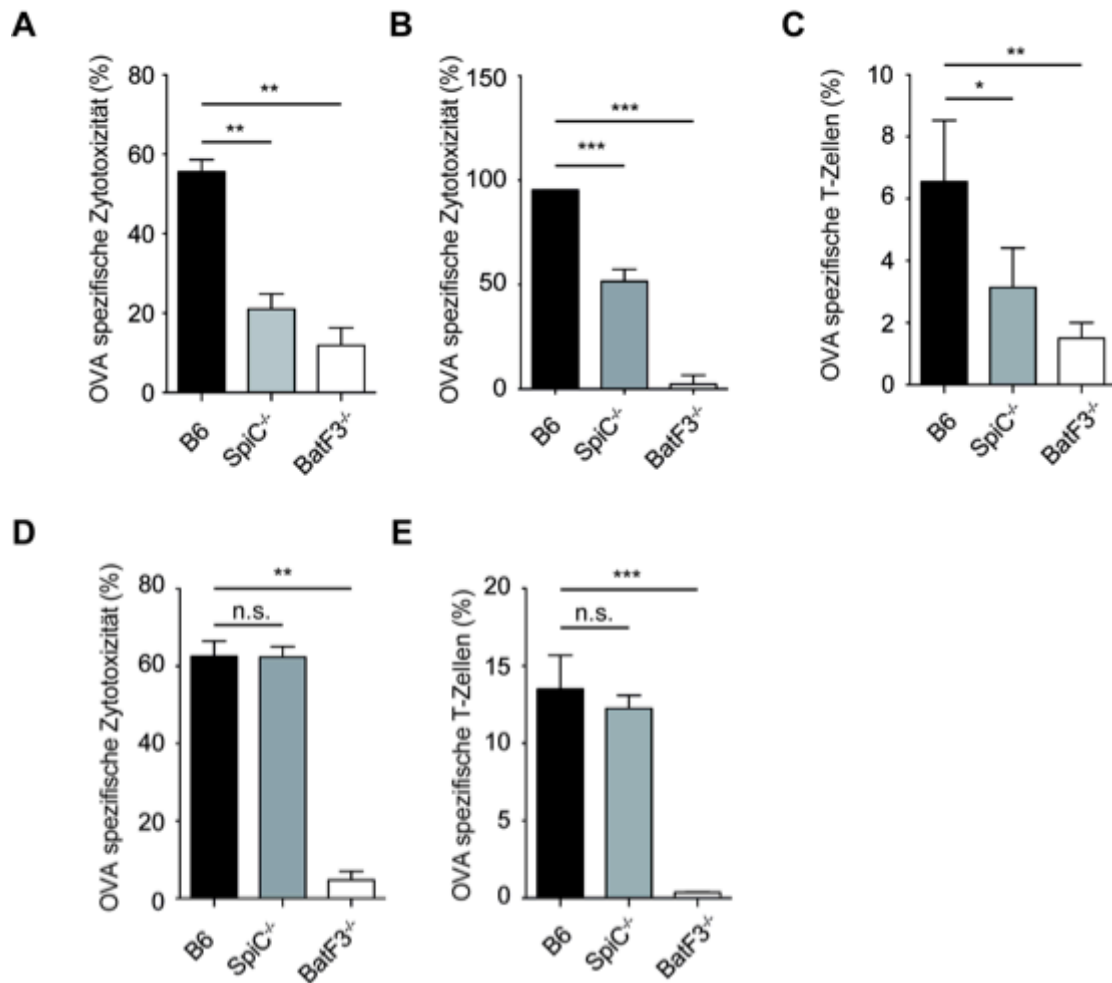


Abbildung 22: Ovalbumin-spezifische Zytotoxizität in *SpiC*^{-/-} und *Batf3*^{-/-} Mäusen. Dargestellt sind statistische Auswertungen der Ovalbumin-spezifische Zytotoxizität (A, B, D) oder des Anteils Ovalbumin-spezifischer CD8⁺ T-Zellen an der Gesamtzahl CD8⁺ T-Zellen (C, E). Die Induktion der T-Zellantwort erfolgte mit Ovalbumin + CpG (A, C), Ovalbumin + α -Galactosylceramide (B) oder Ovalbumin + α -CD40 Antikörper (D, E). Wildtyp-Mäuse sind durch schwarze Balken dargestellt, *SpiC*^{-/-} durch graue, *Batf3*^{-/-} Mäuse durch weiße Balken.

Die in Abb. 3-22 dargestellten Daten deuteten darauf hin, dass RPM auf eine bisher unbekannte Weise mit CD8⁺ DCs zur Induktion einer zytotoxischen T-Zellantwort kooperierten. Es war unklar, ob für diese Induktion Kreuzpräsentation des löslichen Antigens durch die RPM notwendig war. Da MR-defiziente RPM lösliches Ovalbumin nicht kreuzpräsentieren konnten, wurde die zytotoxische T-Zellantwort gegen dieses in MR^{-/-} Mäusen analysiert. Im Gegensatz zu *SpiC*^{-/-} Mäusen (20% Ovalbumin-spezifische Zytotoxizität) zeigten MR^{-/-} Mäuse (44,9% Ovalbumin-spezifische Zytotoxizität) jedoch nur eine leichte und nicht signifikante Reduktion der T-Zellantwort im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen (51,24% Ovalbumin-spezifische Zytotoxizität). Dies zeigte deutlich, dass der beobachtete Phänotyp in *SpiC*^{-/-} Mäusen wahrscheinlich

nicht auf die fehlende Kreuzpräsentation von löslichem Ovalbumin durch RPM zurückzuführen war (Abb. 3-23).

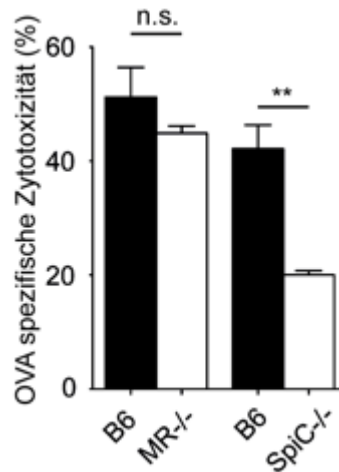


Abbildung 3-23: Ovalbumin-spezifische Zytotoxizität in *SpiC*^{-/-} und *MR*^{-/-} Mäusen. Dargestellt sind statistische Auswertungen der Ovalbumin-spezifische Zytotoxizität in. Die Induktion der T-Zellantwort erfolgte mit Ovalbumin + CpG. Wildtyp-Mäuse sind durch schwarze Balken dargestellt, *MR*^{-/-} (linke Seite) und *SpiC*^{-/-} Mäuse (rechte Seite) durch weiße Balken. Die Zytotoxizität der Wildtyp-Mäuse weicht voneinander ab, da verschiedene Mäuse als Kontrolltiere verwendet wurden: C57/Bl6 J Mäuse als Kontrolle für die *MR*^{-/-} Mäuse, homozygote Wildtyp-Geschwister Tiere als Kontrolle für die auf C57/Bl6 zurückgekreuzten *SpiC*^{-/-} Mäuse.

Die bisherigen Beobachtungen deuteten darauf hin, dass es eine Kooperation zwischen CD8⁺ DCs und RPM bei der Induktion zytotoxischer T-Zellantworten gab. Da die Kreuzpräsentation von löslichem Antigen durch die RPM keine Rolle in der vollständigen Induktion einer T-Zellantwort spielte, wurde vermutet, dass ein von den RPM produziertes Zytokin möglicherweise die Aktivität der CD8⁺ DCs regulierte.

Durchflußzytometrische Analysen zeigten, dass RPM, nicht aber CD8⁺ DCs nach der Injektion von Ovalbumin und CpG große Mengen an TNF- α produzierten (Abb. 3-24A). Erniedrigte TNF- α Level im Milzhomogenat von *SpiC*^{-/-} Mäusen nach der Injektion von Ovalbumin und CpG bestätigten dies (50,3pg/mg Gewebe in *Wildtyp*-, 13pg/mg Gewebe ins *SpiC*^{-/-} Mäusen). Im Gegensatz zu den TNF- α Leveln waren die Typ-I Interferon Level in *SpiC*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu denen der *Wildtyp*-Mäusen nur unsignifikant reduziert (15,7pg/mg Gewebe in *Wildtyp*-, 13,2pg/g Gewebe ins *SpiC*^{-/-} Mäusen) (Abb. 3-24B, C). Weiterhin zeigten sowohl *TNF α* ^{-/-}, als auch *TNFR*^{-/-} Mäuse nach der Injektion von Ovalbumin und CpG einen Defekt in der zytotoxischen T-Zellantwort, der dem beobachteten Defekt in *SpiC*^{-/-} Mäusen entsprach. Während die Ovalbumin-spezifische Zytotoxizität in *Wildtyp*-

Mäusen bei 73,8% lag, was sie in *SpiC*^{-/-} auf 11,5%, in *TNFα*^{-/-} auf 16,7% und in *TNFR*^{-/-} Mäusen auf 18% reduziert (Abb. 3-24D). Zusätzlich wurden die Level der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 auf CD8⁺ DCs nach der Stimulation mit Ovalbumin und CpG in *Wildtyp*- und *SpiC*^{-/-} Mäusen analysiert. In *SpiC*^{-/-} Mäusen wurden CD80 und CD86, im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen, nur minimal hochreguliert. In Wildtypmäusen war hingegen eine deutliche Hochregulation dieser Moleküle zu beobachten.

Lediglich für den Marker CD40 konnte auf CD8⁺ DCs in *SpiC*^{-/-} Mäusen nach der Stimulation eine Hochregulation beobachtet werden. Diese war allerdings deutlich schwächer als in den Wildtypkontrollen (Abb. 3-24E). Auf CD8⁻ DCs war für die Moleküle CD40 und CD80 kein Unterschied zwischen *Wildtyp*- und *SpiC*^{-/-} Mäusen festzustellen. Die Hochregulation von CD86 war etwas verringert, allerdings nicht signifikant (Abb. 3-24F).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die RPM tatsächlich durch eine Aktivierung der DCs in der Lage waren, das Priming zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen zu regulieren. Diese Regulation erfolgte möglicherweise durch pro-inflammatorische Zytokine wie beispielsweise TNFα.

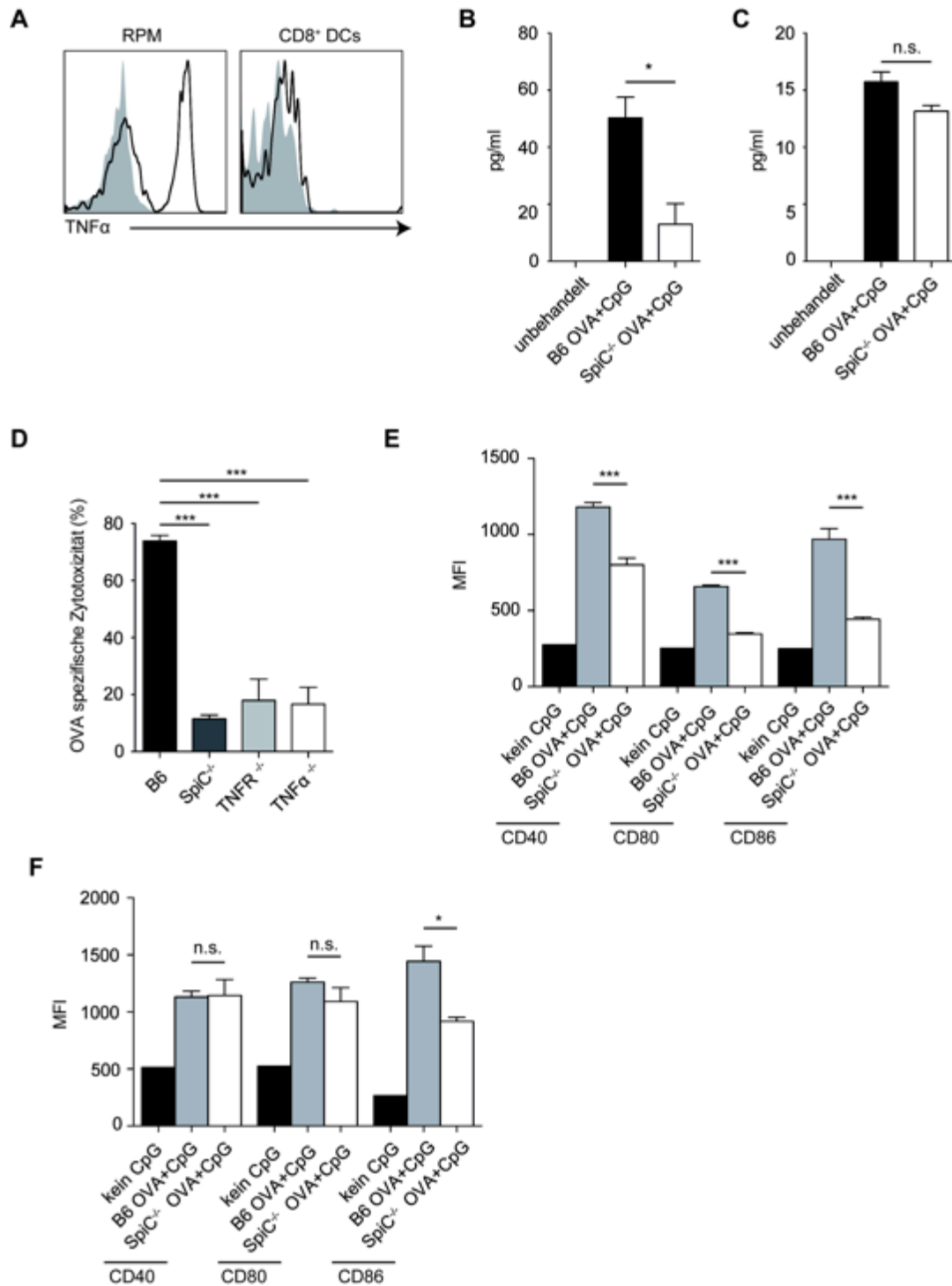


Abbildung 3-24: Rolle TNF- α in der Regulation zytotoxischer T-Zellantworten. (A) Durchflußzytometrische Analyse der TNF- α Produktion in RPM (links) und CD8⁺ DCs (rechts). Zellen aus nicht-injizierten Mäusen sind durch den grauen Hintergrund dargestellt, Zellen aus Ovalbumin+CpG injizierten Mäusen durch die schwarze Linie. (B, C) TNF- α (B) und IFN- α/β (C) Konzentrationen in Milchhomogenaten aus uninjizierten und 6 Stunden zuvor mit Ovalbumin+CpG gespritzten Wildtyp- und SpiC^{-/-} Mäusen. (D). Dargestellt sind statistische Auswertungen der Ovalbumin-spezifische Zytotoxizität in Wildtyp- (schwarzer Balken), SpiC^{-/-} (dunkelgrauer Balken), TNFR^{-/-} (hellgrauer Balken) und TNF- α ^{-/-} (weißer Balken) Mäusen. (E,F) Durchflußzytometrische Analyse der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 auf CD8⁺ (E) und CD8⁻ DCs (F) 6 Stunden nach Injektion von Ovalbumin + CpG.

3.2 Generierung einer Mannose-Rezeptor transgenen Mauslinie

3.2.1 Übersicht

Der zweite Abschnitt des Ergebnisteils beschäftigt sich mit der zweiten Fragestellung dieser Arbeit. Dabei handelte es sich um die Generierung einer MR-transgenen Mauslinie. Dazu wurde der MR in eine Expressionskassette kloniert und diese in HEK293T Zellen und BM-DC auf ihre Funktionsfähigkeit getestet. Über homologe Rekombination wurde sie dann in das Genom murine ES-Zellen eingebracht. Diese ES-Zellen wurden dann in murine Blastozysten injiziert und auf dieser Art und Weise chimäre Tiere generiert. Aus den chimären Tieren wurde dann durch Verkreuzungen mit Wildtyp-Mäusen eine homozygote, MR-transgene Mauslinie etabliert. Verkreuzung dieser Mauslinie mit einer Cre-Rekombinase transgenen Mauslinie zeigte, dass die Expressionskassette in allen untersuchten Zellen in der MR-transgenen Mauslinie zur Expression eines funktionalen MR führte.

3.2.2 Klonierung der Mannose-Rezeptor Expressionskassette

Um zu untersuchen ob Expression des Mannose-Rezeptors nicht-kreuzpräsentierende Zellen zur Kreuzpräsentation befähigt, musste ein System geschaffen werden, das eine ektope Expression des Rezeptors ermöglichte. Da der MR in einer Vielzahl verschiedener Zelltypen exprimiert werden sollte, war ein System wünschenswert, das keine schwierige und aufwändige Etablierung verschiedener Transfektionsprotokolle voraussetzte. Aus diesem Grund sollte eine transgene Maus mit einem durch Cre-Rekombinase induzierbaren Rezeptor generiert werden. Durch Verkreuzung dieser Mauslinie mit entsprechenden Cre-Rekombinase transgenen Mauslinien wäre es dann möglich, den Rezeptor in nahezu jedem gewünschten Zellsubset zu exprimieren. Um dieses Ziel zu erreichen, musste zunächst eine Expressionskassette kloniert werden, die neben dem Gen des murinen Mannose Rezeptors ein eGFP als Marker-Gen zur Identifikation transgener Zellen enthielt. Diese Expressionskassette wurde zunächst in einem Subklonierungsvektor konstruiert und in HEK293-Zellen und BM-DCs auf MR-Expression und –Funktion getestet. Nach Abschluß dieser Tests wurde die Expressionskassette in einen "Targeting"-Vektor kloniert und dieser durch homologe Rekombination in das Genom murine ES-Zellen eingefügt. Die aus diesen ES-Zellen generierte transgene Maus, wurde nach

Verkreuzung mit einer Cre-Rekombinase transgenen Mauslinie auf MR-Expression und Funktion getestet.

3.2.2.1 Konstruktdesign

Um eine möglichst robuste Expression des MR und des eGFP sicherzustellen sollten beide über eine virale 2A-Sequenz verbunden werden (Abb. 3-25). Dadurch wurden beide Gene in Form einer mRNA transkribiert und in Protein umgeschrieben. Während dieses Translationsprozesses sollte es dabei in der 2A-Sequenz zu einem Bruch der Polypeptidkette kommen. Von der 20 Aminosäure langen 2A-Sequenz verblieben dabei 19 Aminosäuren am C-Terminus des zuerst translatierten Proteins, sowie ein Prolin am N-Terminus des zweiten Proteins^{92,93}. Es war bekannt, dass eGFP durch diese 19 Aminosäuren nicht in seiner Funktion beeinträchtigt wurde⁹⁴. Auch der Mannose-Rezeptor sollte durch die 2A-Sequenz nicht in seiner Funktion gestört werden, da die N-terminale Region eine Signalsequenz für die Translokation des Rezeptors in das ER trug⁹⁵. Diese sollte zusammen mit dem Prolin entfernt werden sobald sich der Rezeptor in der ER-Membran befand. Daher sollte eine 2A-Sequenz die Funktion von keinem der beiden Protein beeinflussen und gleichzeitig eine starke und equimolare Expression sicherstellen. Auf beiden Seiten der Expressionskassette wurden zusätzlich Restriktionsschnittstellen angefügt, die ein unkompliziertes umklonieren der kompletten Kassette erlaubten.

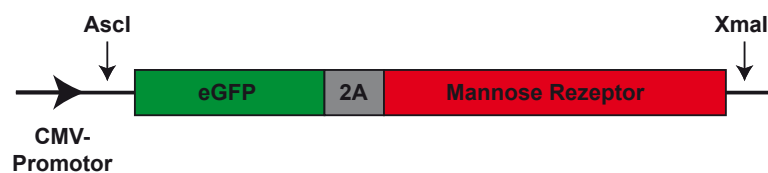


Abbildung 3-25: Schematische Darstellung der GFP2A-Mannose Rezeptor Expressionskassette. Der schwarze Pfeilkopf symbolisiert die Position des Promotors. Vor und hinter der Kassette sind die Ascl und Xmal-Restriktionsschnittstellen zum Umklonieren des Kassettes kenntlich gemacht.

3.2.2.2 Klonierungsstrategie

Die Klonierungsschritte zur Generierung der Kassette erfolgten im pCMV-Flag2B Subklonierungsvektor. Dieser Expressionsvektor trug ein Kanamycin-Resistenzgen zur Selektion positiv transformierter Bakterienklone und einen Cytomegalievirus-Promotor zur Expression des klonierten Konstrukts. Die Klonierung des GFP2A-MR erfolgte in sechs Schritten. Zunächst wurden die einzelnen Fragmente des Konstrukts mittels PCR amplifiziert. Dabei wurden an die 5'- und 3'-Enden der Fragmente mittels Primerüberhänge die benötigten Restriktionsschnittstellen angefügt. Die Fragmente zwei bis vier des MR wurden aus BM-DC cDNA, MR-Fragment 1 und das GFP-2A-Fragment von Plasmid-DNA amplifiziert. Diese Fragmente wurden in fünf Klonierungsschritten in den pCMV-Flag2B-Vektor ligiert. Nach jedem Klonierungsschritt wurde die korrekte Insertion des Fragments mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung überprüft.

Um diese komplexe Klonierung durchzuführen, mussten die Fragmente in einer bestimmten Reihenfolge in den Vektor eingefügt werden, da es initial noch zahlreiche identische Schnittstellen im Vektor und den verschiedenen Fragmenten gab. Diese Schnittstellen hätten die Klonierung erheblich erschwert, da sie bei einer Restriktion zu zahlreichen ungewünschten Produkten geführt hätten. Daher wurden zuerst Fragmente einkloniert, die die entsprechenden Schnittstellen im Vektor ersetzten und so die problemlose Klonierung späterer Fragmente ermöglichten. Die exakte Reihenfolge der Klonierungsschritte ist in Abb. 3-26 dargestellt.

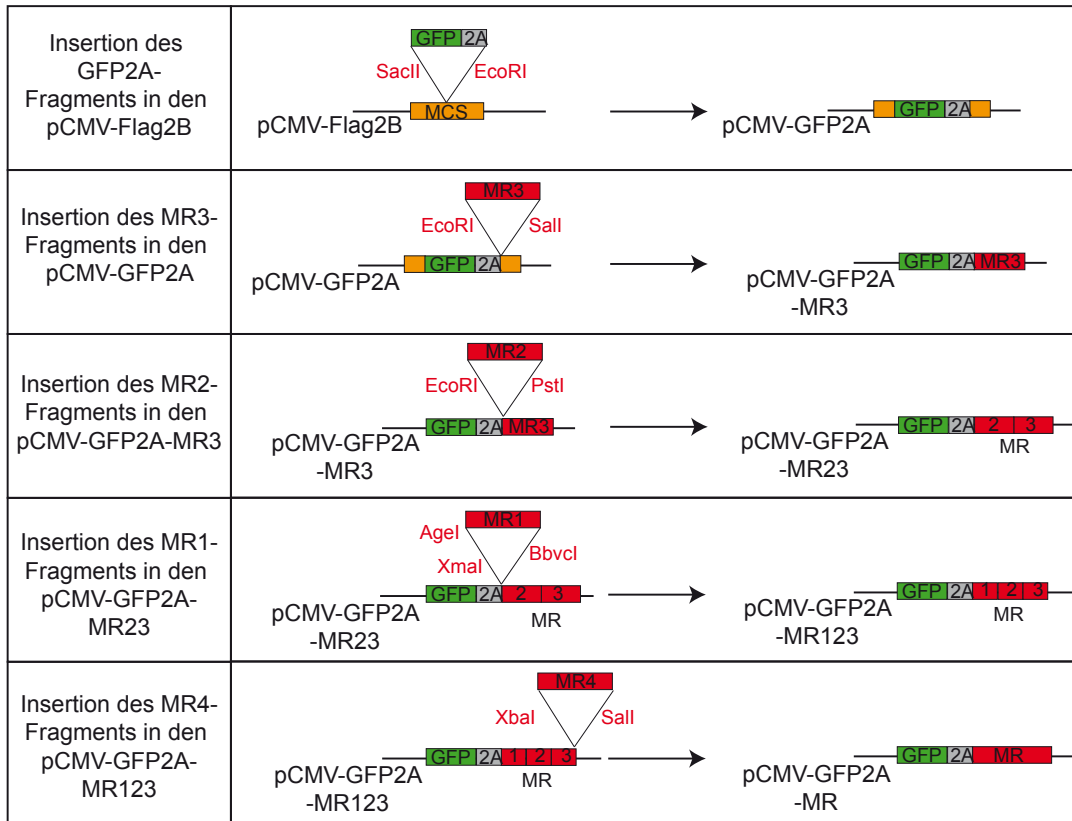


Abbildung 3-26: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie des pCMV-GFP2A-MR Vektors. Auf der linken Seite sind die jeweiligen Arbeitsschritte benannt. Die Grafik zeigt Ausgangsvektor, einkloniertes Fragment, die verwendeten Restriktionsenzyme und den resultierenden Vektor. Die Multiple Cloning Site (MCS) ist orange dargestellt, die Komponenten der Expressionskassette sind grün (GFP), grau (2A) oder rot (MR) wiedergegeben. Vor jedem Vektorausschnitt sind die Namen des jeweilige Fragments angegeben. Zusätzlich sind die Restriktionsenzyme die zur Klonierung des entsprechenden Fragments verwendet wurden rot hervorgehoben.

3.2.2.3 Klonierung des pCMV-GFP2A-MR

Zunächst wurde aus murinen BM-DC sieben Tage nach Generierung mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Aus dieser cDNA wurden mittels PCR die MR-Fragmente 2 bis 4 amplifiziert. Das GFP2A-Fragment und das MR-Fragment 1 wurden von Vektoren amplifiziert, die freundlicherweise von Dr. Andreas Limmer und Dr. Sven Burgdorf zur Verfügung gestellt wurden. Im Rahmen der PCR-Reaktion wurden durch Primerüberhänge die benötigten Restriktionsschnittstellen an die Fragmente angefügt (siehe Tab. 3-1).

Fragment	Erwartete Größe	Angefügte Schnittstellen 5'	Angefügte Schnittstellen 3'
GFP2A	815	SacII, AscI	EcoRI, XmaI
MR1	1105	AgeI	-
MR2	1377	EcoRI, BbvCI	-
MR3	1090	EcoRI	Sall
MR4	994	-	Sall, XmaI

Tabelle 3-1: Übersicht über die zur Klonierung verwendeten Fragmente. Dargestellt ist Name und Größe des Fragments in Basenpaaren, sowie die mittels Primerüberhängen angefügten Schnittstellen 5'- und 3' des Fragments.

Eine gelelektrophoretische Analyse der PCR-Reaktionen zeigte für jede Reaktion ein Produkt der gewünschten Größe. Die PCR die das GFP2A-Fragment amplifizieren sollte ergab ein Produkt von knapp 800BP bei einer erwarteten Größe von 815BP (Abb. 3-27A). Die PCRs für die MR-Fragmente 1 und 3 lieferten Produkte einer Größe von knapp 1100BP (Abb. 3-27B, D). Dies entsprach ebenfalls den erwarteten Produktlängen von 1105BP (MR1) und 1090BP (MR3). Die Amplifikation des MR-Fragments 2 resultierte in einem Produkt von knapp 1400BP bei einer berechneten Länge von 1380BP (Abb. 3-27C). Abschließend zeigte einer Analyse des PCR-Produkts der Amplifikation von MR-Fragment 4 eine Bande bei 1000BP bei einer erwarteten Größe von 994BP (Abb. 3-27E). Da alle Fragmente die korrekte Größe aufwiesen wurden diese aus den Agarosegelen isoliert, aufgereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

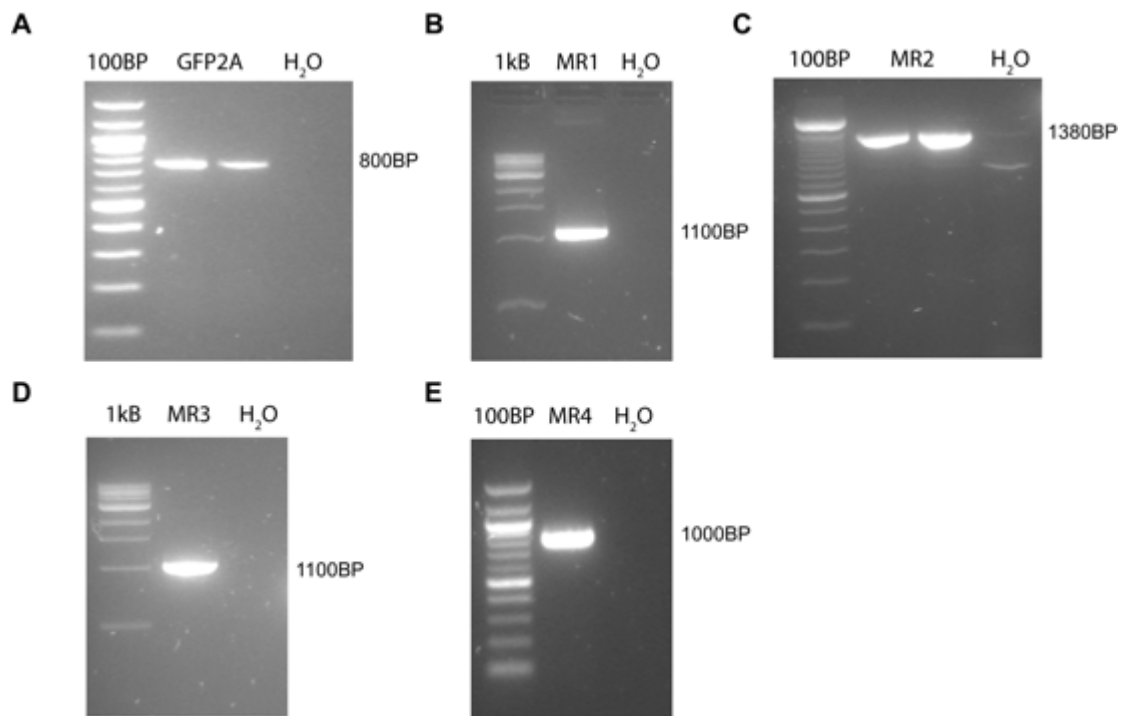


Abbildung 3-27: Gelelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte. Jedes PCR-Produkt wurde zusammen mit einem Größenmarker (100BP oder 1kB), sowie einer Negativ-Kontrolle analysiert. Die Größe der PCR-Produkte ist jeweils rechts neben dem Gelbild dargestellt.

Die Klonierung der Fragmente erfolgte indem Fragmente und Vektor mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten, über ein Agarosegel aufgereinigt, ligiert und in XL10 Gold Bakterien transformiert wurden. Diese wurden auf Kanamycin-Agarplatten selektiert, eine zufällige Auswahl überlebender Klone gepickt und in einer Übernachtskultur vermehrt. Aus diesen wurde Plasmid-DNA isoliert und Klone die das gewünschte Fragment enthielten mittels Restriktionsverdau identifiziert. Von positive Klonen wurde in einer 400ml Übernachts-Bakterienkultur eine größere Menge des Vektors hergestellt und das einklonierte Fragment und die angrenzenden Bereiche des Vektors sequenziert (siehe Anhang). Erst dann wurde der neu generierte Vektor für die jeweils nachfolgenden Klonierungsschritte verwendet.

Zunächst wurde das GFP2A-Fragment mit den Restriktionsenzymen SacII und EcoRI in den pCMV-Flag2B einkloniert. Restriktionsanalyse der resultierenden Klone mit den zur Einklonierung verwendeten Enzymen identifizierte positive Klone anhand des 800BP großen Fragments (Abbildung 3-28A). In den nun pCMV-GFP2A genannten Vektor wurde im nächsten Schritt das MR-Fragment 3 eingefügt. Hierzu wurden Vektor und Fragment sowohl für die Ligation, als auch für die folgende Restriktionsanalyse der Klone mit EcoRI und Sall verdaut. Positive Klone zeigten nach Verdau und

Analyse der Gelelektroporese eine Bande von 1100BP (Abbildung 3-28B). Als nächstes wurde das MR-Fragment 2 in den pCMV-GFP2A-MR3 eingefügt. Auch hier wurden die gleichen Restriktionsenzyme zur Einklonierung des Fragments und zur Analyse der positiven Klone verwendet. Eine Restriktionsanalyse der Klone mit EcoRI und PstI zeigt anhand einer 1400BP großen Bande, dass auch diese Ligation erfolgreich war (Abbildung 3-28C).

Zur Einklonierung des MR-Fragments 1 wurden Fragment und Vektor mit unterschiedlichen Enzymen behandelt: Das Fragment wurde mit AgeI und BbvCI verdaut, während der Vektor mit BbvCI und XmaI geschnitten wurde. AgeI und XmaI lieferten kompatible Enden, die ligiert werden konnten, nach Ligation allerdings nicht mehr als Restriktionsschnittstelle erkannt wurden. Auf diese Weise wurde die XmaI-Schnittstelle am Ende der 2A-Sequenz inaktiviert, die spätere Klonierungsschritte behindert hätte. Da die XmaI-Schnittstelle nach der Ligation unbrauchbar war, erfolgte die Restriktionsanalyse der Klone mit den Enzymen Sall und BbvCI. Positive Klone lieferten Restriktionsprodukte einer Größe von knapp 1100BP (Abbildung 3-28D).

Als letzter Schritt erfolgte die Insertion des MR-Fragments 4 in den pCMV-GFP2A-MR1-3. Hier erfolgten Klonierung und Restriktionsanalyse der Klone mit XbaI und Sall. Der letzte Klonierungsschritt erwies sich als sehr schwierig, da die positiven Bakterienkulturen sehr langsam wuchsen und oft von negative Kolonien überwachsen wurden. Nach einer Vielzahl analysierter Klone konnte durch Restriktionsanalyse mit PstI und Sall schließlich ein positiver Klon identifiziert werden. Negative Klone lieferten Produkte einer Größe von 6600 und 1000BP, während positive Klone anhand der Produktgröße von 6600 und 1800BP identifiziert wurden (Abbildung 3-28E).

Anschließend wurde aus einer 400ml Übernacht-Bakterienkultur eine größere Menge des fertigen pCMV-GFP2A-MR isoliert. Die Expressionskassette wurde von beiden Seiten komplett sequenziert um sicherzustellen dass alle Fragmente korrekt inseriert und frei von Punktmutationen waren. Da dies der Fall war, wurde die Expressionskassette im nächsten Schritt in HEK293T-Zellen auf ihre Funktionsfähigkeit getestet.

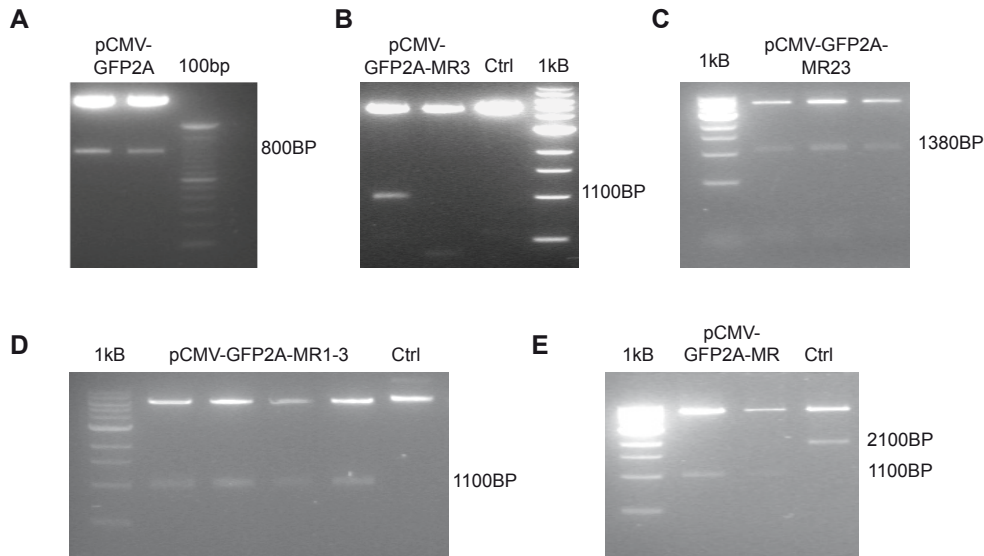


Abbildung 3-28: Gelelektrophoretische Auswertung der Restriktionsanalyse verschiedener Ligationsprodukte. (a) Verdau des pCMV-GFP2A mit *SacII* und *EcoRI*. Bei beiden Klonen ist eine Bande bei 800BP sichtbar. (b) Verdau des pCMV-GFP2A-MR3 mit *Sall* und *EcoRI*. Bei den Klonen 1,3 und 8 ist eine Bande bei 1100BP sichtbar. (c) Verdau des pCMV-GFP2A-MR23 mit *PstI* und *EcoRI*. Bei allen Klonen wurde eine knapp 1400BP große Bande detektiert. (d) Verdau des pCMV-GFP2A-MR123 mit *Sall* und *BbvCI*. Alle Klone zeigen eine 1100BP große Bande. (e) Verdau des pCMV-GFP2A mit *PstI* und *Sall*. Sichtbar sind Banden bei 1100 und 2100BP.

3.2.3 Test der GFP2A-MR Expressionkassette in HEK293T-Zellen

Um die Funktionsfähigkeit der Expressionkassette zu kontrollieren wurde der pCMV-GFP2A-MR und als Kontrolle der pCMV-GFP mittels Calcium-Phosphat-Transfektion in HEK293T-Zellen eingebracht. Zellen die mit pCMV-GFP2A-MR und dem Kontrollvektor pCMV-GFP transfiziert wurden, zeigten eine robuste GFP-Expression sowohl unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (Abb. 3-29A), als auch nach durchflußzytometrischer Analyse (Abb. 3-29B). Das GFP-Signal war stärker in pCMV-GFP transfizierten Zellen (Abb. 3-29A, B). Auch die Anzahl GFP-positiver, also transfizierter Zellen war in der pCMV-GFP-Probe reproduzierbar größer, als in der pCMV-GFP2A-MR Probe (Abb. 3-29B: 61,5% zu 37,8%). Dies war nicht unerwartet, da der pCMV-GFP2A-MR Vektor mit knapp 9400 Basenpaaren fast doppelt so groß war wie der pCMV-GFP. Während die Größe des Vektors zum einen die Transfektion erschwerte, sorgte die 2A-Sequenz dafür, dass gleiche Mengen MR und GFP hergestellt wurden. Da der MR ein großes Protein war, von dem vermutlich geringere Mengen translatiert wurden, schränkte die Kopplung des GFPs an den MR die Expression des GFP2A im Vergleich zu einem ungekoppelten GFP ein.

Expression des MR konnte in den mit pCMV-GFP2A-MR transfizierten HEK293T Zellen mittels einer Intrazellulärfärbung und eines Western Blots nachgewiesen werden während in den Zellen die mit dem Kontrollvektor pCMV-GFP behandelt wurden kein MR-Signal detektiert werden konnte (Abb. 3-29C, E).

Diese Daten gaben jedoch keinen Aufschluß darüber, ob die 2A-Sequenz zwischen dem GFP und dem MR wie gewünscht während der Translation brach und somit die Proteine trennte. Es war also nicht auszuschließen dass ein Teil der Proteine als GFP-MR Fusionsprotein vorlag. Diese Komplexe wären mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht funktional. Daher wurde geprüft ob der MR in transfizierten HEK293T Zellen funktional war. Tatsächlich konnten MR-exprimierende HEK-Zellen in Zellkultur im Gegensatz zu den pCMV-GFP-transfizierten Zellen große Mengen fluoreszenz-markiertes Ovalbumin aufnehmen (Abb 3-29D). Außerdem waren auf einem Western Blot nur getrennte GFP- (27kDa) und MR-Proteine (180kDa) detektierbar und kein Fusionsprotein (207kDa) (Abb. 3-29E). Dies demonstrierte dass die Expressionskassette bezüglich der GFP- und MR-Expression funktional war, und dass der exprimierte MR in der Lage war lösliches Ovalbumin zu binden und zu endozytieren.

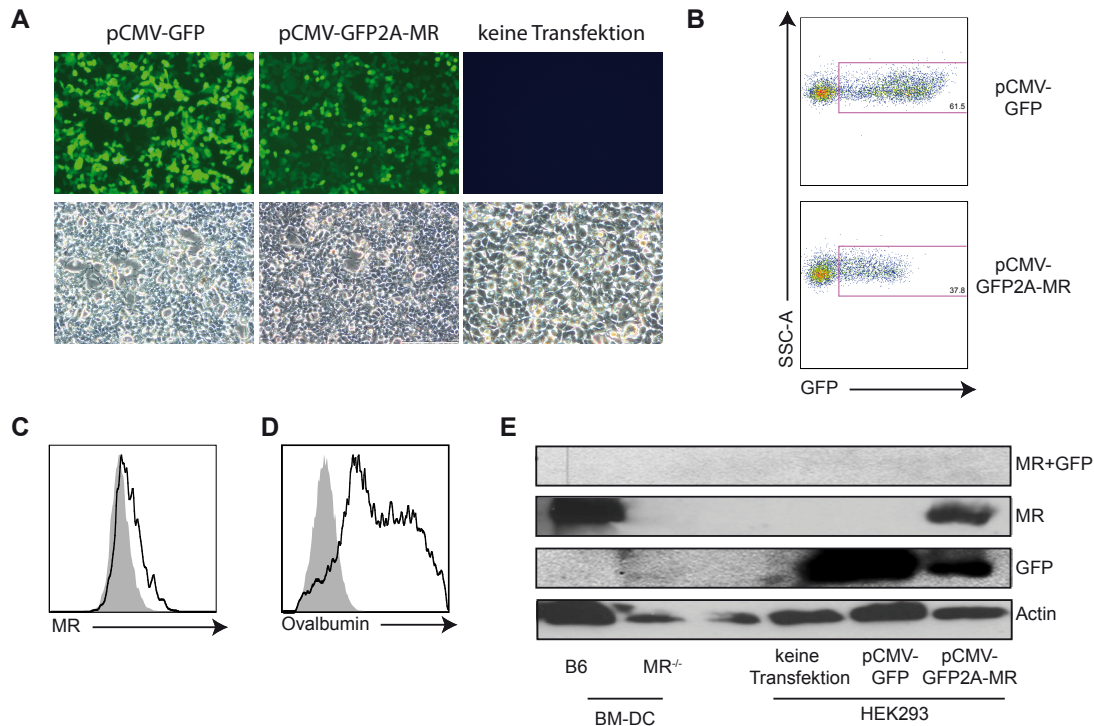


Abbildung 3-29: Transfektion von HEK293T-Zellen und Funktionstest des pCMV-GFP2A-MR Vektors. (A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HEK293T Zellen die mit pCMV-GFP2A-MR (links), pCMV-GFP (Mitte) oder nicht transfiziert wurden (rechts). In der oberen Reihe ist das GFP-Signal dargestellt, in der unteren der Durchlichtkanal. (B) GFP-Expression in mit pCMV-GFP2A-MR (oben) oder pCMV-GFP (unten) transfizierten HEK293T-Zellen. (C) MR-Expression in mit pCMV-GFP2A-MR (schwarze Linie) oder pCMV-GFP (graues Feld) transfizierten HEK293T-Zellen. (D) Aufnahme von fluoreszenz-markiertem löslichem Ovalbumin in mit pCMV-GFP2A-MR (schwarze Linie) oder pCMV-GFP (graues Feld) transfizierten HEK293T-Zellen. (E) Western Blot mit Protein aus C57BL/6 BM-DC, MR^{-/-} BM-DC, sowie mit pCMV-GFP2A-MR (schwarze Linie), pCMV-GFP (graues Feld) oder untransfizierten HEK293T-Zellen. Die Art des detektierten Proteins ist neben den Bildausschnitten vermerkt.

3.2.4 Generierung und Test eines lentiviralen GFP2A-MR Vektors

Im Gegensatz zu HEK293T-Zellen kann DNA nicht mittels Calcium-Phosphat Transfektion in dendritische Zellen eingebracht werden. Um die Expressionskassette in primären BM-DC zu testen, musste die Expressionskassette daher in einen lentiviralen Expressionsvektor umkloniert werden. Gleichzeitig wurde die Expressionskassette in den Serca-Targeting Vektor kloniert, der die homologe Rekombination der Expressionskassette in den Rosa26-Lokus von murinen Stammzellen erlauben sollte.

Hierzu wurden der pCMV-GFP2A-MR, der lentivirale Expressionsvektor pLox-IRES-GFP (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Achmet Imam Chasan) und der Serca-Targeting Vektor mit den Restriktionsenzymen Xmal

und *Ascl* geschnitten. Die Restriktionen wurden über ein Agaorsegel aufgetrennt und die gewünschten DNA-Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten und über eine Nucleospin-Säule aufgereingt. Die GFP2A-MR Fragmente wurden anschließend mit dem geschnittenen pLox-IRES-GPF oder Serca ligiert und in XL10 Gold Bakterien transformiert, die dann auf einer Ampicilin-Agarplatte ausgestrichen wurden.

Am nächsten Tag wurden von jeder Platte 5 willkürlich gewählte Klone in 3ml Übernachtkulturen angeimpft. Aus diesen wurde dann Plasmid-DNA isoliert, mittels *Ascl* und *Xmal* verdaut und gelelektrophoretisch analysiert. Positive Klone des pLox-GFP2A-MR sollten nach Restriktion mit *Bbvcl* ein 10927BP sowie ein 3109BP großes Fragment ergeben. Eine gelelektrophoretische Analyse der Restriktionen zeigte in vier Klonen Fragmente der erwarteten Größe von knapp 11 und 3kB (Abb. 3-30A). Eine Restriktionsanalyse der Plasmid-DNA aus potentiell positiven Serca-GFP2A-MR Klonen mit *Ascl* und *Xmal* zeigte ebenfalls Fragmente der erwarteten Größe von 14,5 und 5kB (Abb. 3-30B). Von jedem Vektor wurde DNA eines Klones in XL10 Gold Bakterien retransformiert um mittels einer größeren Übernachtkultur eine größere Menge Plasmid-DNA für weitere Anwendungen zu gewinnen. Zusätzlich wurde die Expressionskassette in beiden Vektoren von beiden Seiten komplett sequenziert um sicherzustellen dass alle Fragmente korrekt inseriert und frei von Punktmutationen waren.

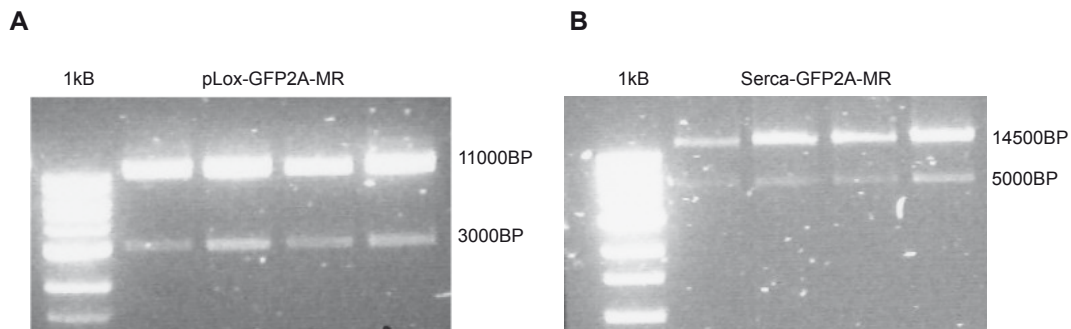


Abbildung 3-30: Umklonierung der GFP2A-MR Expressionskassette. Gezeigt ist die gelelektrophoretische Analyse verdauter Plasmid-DNA verschiedener Klone. Alle Klone sind positive für die GFP2A-MR Expressionskassette, da sowohl das 11kB große Vektorrückgrat als auch die 5kB Expressionskassette sichtbar sind. (A) Verdau pLoxGFP2A mit *Bbvcl*. (B) Verdau Serca-GFP2A-MR mit *Ascl* und *Xmal*.

Bevor mittels des Serca-GFP2A-MR die Insertion der Expressionskassette in das Genom muriner Stammzellen erfolgte, wurde die Funktionsfähigkeit der Expressionskassette in primären murinen BM-DC getestet. Dazu sollten $MR^{-/-}$ BM-DC mit einem GFP2A-MR Lentivirus infiziert und anschließend ihre Fähigkeit MR-abhängig Ovalbumin aufzunehmen analysiert werden. Vor der

Infektion der BM-DC wurde die Funktionsfähigkeit des Virus zunächst an HEK293T Zellen überprüft. Wenn gleiche Volumina Überstände aus den Viruskulturen zu HEK293T-Zellen geben wurden, zeigte die GFP-Expression der infizierten Zellen, dass der GFP2A-MR Lentivirus deutlich weniger Zellen infizierte als der GFP-Kontrollvirus (10,5% im Vergleich zu 76%) (Abb. 3-31A).

Die Infektion der HEK293T-Zellen mit Lentiviren erhöhte nicht die Autofluoreszenz der Zellen im AlexaFluor647-Kanal (Abb. 3-31B). Daher war davon auszugehen das eine Signalzunahme in diesem Kanal tatsächlich aus der Aufnahme von löslichem Ovalbumin durch die HEK293T-Zellen resultierte. Eine kleine Population der mit GFP2A-MR-Virus behandelten Zellen nahm im Vergleich zu den mit Kontrollvirus behandelten Zellen erhebliche Mengen Ovalbumin auf (Abb. 3-31C). Der geringe Anteil Ovalbumin-aufnehmender Zellen war auf die geringe Infektionseffizienz des GFP2A-MR Virus zurückzuführen. Vergleich man GFP2A-MR virusinfizierte GFP⁺ Zellen mit den virusinfizierten GFP⁺ Kontrollzellen zeigte sich, dass die mit GFP2A-MR-Virus infizierten Zellen erhebliche Mengen lösliches Ovalbumin aufnahmen (Abb. 3-31D).

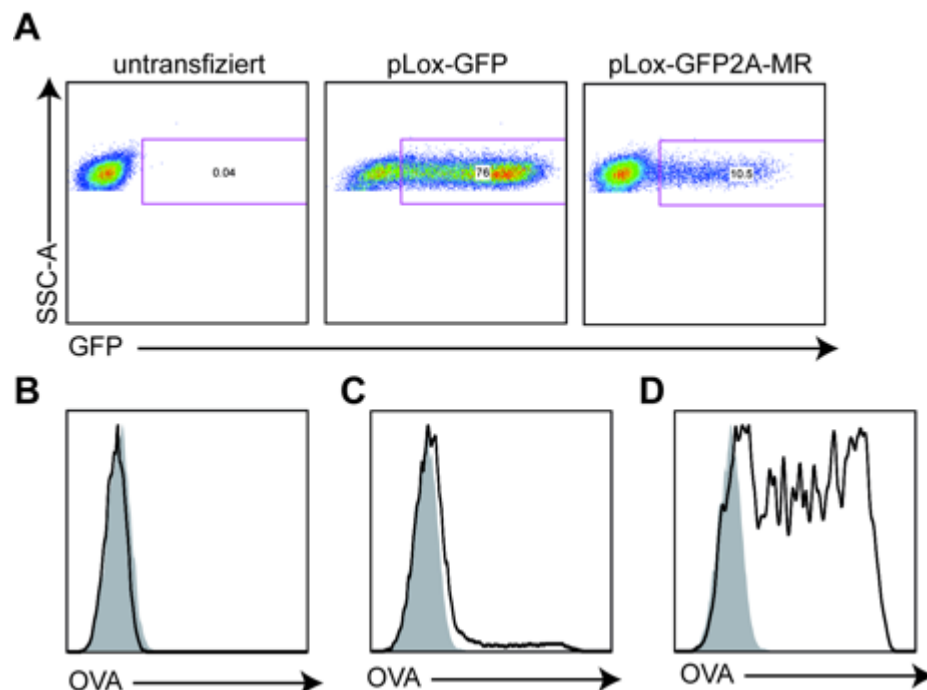


Abbildung 3-31: Test des pLOX-GFP2A-MR in HEK293T-Zellen. (A) GFP-Expression in HEK293T-Zellen ohne Infektion (links) oder nach Infektion mit pLox-GFP (Mitte) oder pLox-GFP2A-MR. (B-D) Aufnahme von löslichem Ovalbumin in HEK293T-Zellen. (B) pLox-GFP infizierte (grau) gegen plox-GFP2A-MR infizierte HEK293T-Zellen (schwarze Linie). (C) pLox-GFP infizierte (grau) gegen GFP⁺ plox-GFP2A-MR infizierte HEK293T-Zellen (schwarze Linie). (D) pLox-GFP infizierte (grau) gegen uninfizierte HEK293T-Zellen (schwarze Linie).

Abschließend sollte der Lentivirus in murinen, dendritischen Zellen getestet werden. Da Milz-DCs *in vitro* nur eine sehr geringe Lebenserwartung haben, wurden zu diesem Zweck $MR^{-/-}$ BM-DCs verwendet. Diese wurden an Tag 3 nach Isolation aus dem Knochenmark mit pLox-GFP und pLox-GFP2A-MR infiziert. Da die Versuche an HEK293T-Zellen gezeigt hatten, dass der pLox-GFP deutlich effizienter war als der pLox-GFP2A-MR, wurden zur Infektion unterschiedliche MOI (multiplicity of infection) verwendet (MOI pLoX-GFP: 2,5, MOI pLox-GFP2A-MR: 25). Trotz der erheblich größeren MOI konnten mit dem pLox-GFP2A-MR deutlich weniger BM-DCs infiziert werden (3,57%) als mit dem pLox-GFP (71,7%) (Abb. 3-32A). Die GFP⁺ Zellen der pLox-GFP2A-MR Probe nahmen mehr lösliches Ovalbumin auf als mit pLox-GFP infizierte B6 (Abb. 3-32B) oder $MR^{-/-}$ BM-DC (Abb. 8C). Außerdem konnte diese erhöhte Ovalbumin-Aufnahme mittels Mannan geblockt werden (Abb. 3-32D). Da Mannan den MR blockiert und die $MR^{-/-}$ BM-DC keinen endogenen MR exprimierten, zeigte dies das die $MR^{-/-}$ BM-DC den transgenen MR exprimierten und diesen zur Aufnahme von löslichem Ovalbumin nutzten.

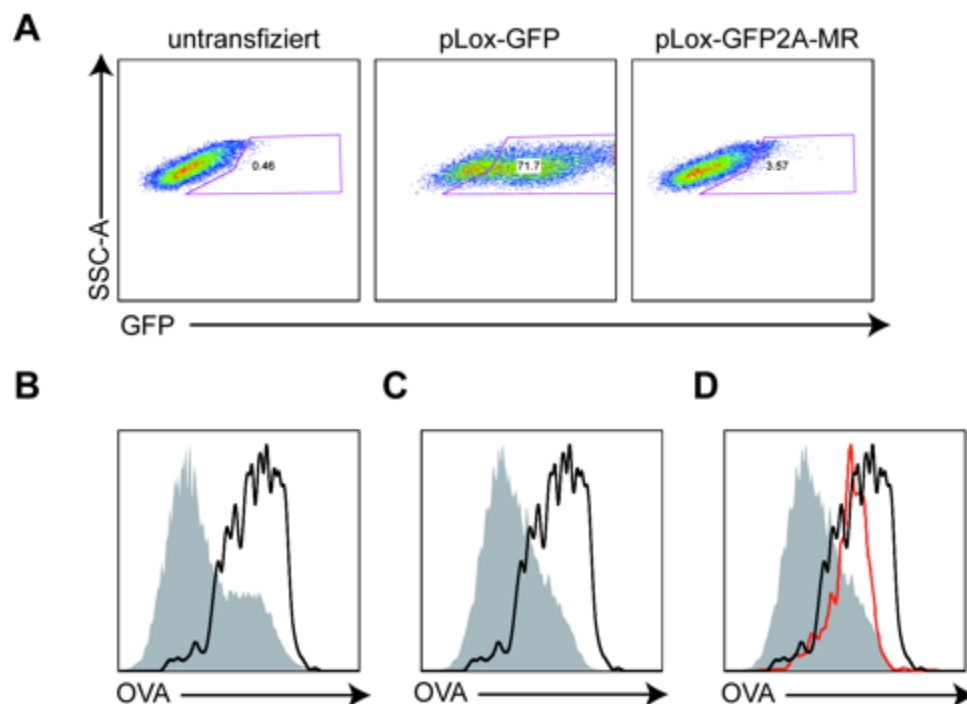


Abbildung 3-32: GFP-Expression und Ovalbumin-Aufnahme in pLox-infizierten BM-DC. (A) B6 und $MR^{-/-}$ BM-DC wurden nicht (Links), mit pLox-GFP (Mitte) oder pLox-GFP2A-MR (Rechts) infiziert, GFP-Expression von lebenden, $CD11c^{+}$ Zellen wurde durchflußzytometrisch bestimmt. (B-D) Aufnahme von löslichem Ovalbumin in lentivirus-infizierten BM-DC. (B) Aufnahme von Ovalbumin durch lebende, $CD11c^{+}$, GFP⁺ mit pLox-GFP infizierten B6 BM-DC (grau) oder durch pLox-GFP2A-MR infizierten $MR^{-/-}$ BM-DC (schwarze Linie). (C) Aufnahme von Ovalbumin durch lebende, $CD11c^{+}$, GFP⁺ mit pLox-GFP infizierten $MR^{-/-}$ BM-DC (grau) oder durch pLox-GFP2A-MR infizierten $MR^{-/-}$ BM-DC (schwarze Linie). (D) Aufnahme von Ovalbumin durch lebende, $CD11c^{+}$, GFP⁺ mit pLox-GFP infizierten B6 BM-DC (grau), durch pLox-GFP2A-MR infizierten $MR^{-/-}$ BM-DC (schwarze Linie), oder durch pLox-GFP2A-MR infizierten $MR^{-/-}$ BM-DC die zuvor mit 3mg/ml Mannan behandelt wurden (rote Linie).

3.2.5 Generierung von GFP2A-MR-transgenen embryonalen Stammzellen

Nachdem die Funktionalität der Expressionskassette überprüft wurde, sollte diese nun zur Generierung der GFP2A-MR transgenen Maus mittels homologer Rekombination in den Rosa26-Lokus muriner Stammzellen eingefügt werden. Dies sollte mit dem zuvor generierten Serca-GFP2A-MR Vektor erreicht werden, der an beiden Seiten der Expressionskassette Homologiearme enthielt, die eine spezifische Rekombination in das Genom der embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) ermöglichten. Um eine ubiquitäre Expression des MR zu verhindern war die Expressionskassette im Serca-Vektor hinter einem von LoxP-Seiten flankierten Stop-Codon eingefügt worden. Dieses sorgte dafür, dass in Zellen der transgenen Maus das Gen der Expressionskassette zwar vorhanden war, dieses aber nicht in Protein umgeschrieben wurde. Erst wenn die transgene Maus mit einer Maus verkreuzt wurde, die eine Cre-Rekombinase exprimiert, sollte das Stop-Codon entfernt und die Expressionskassette abgelesen werden. Da es zahlreiche Mauslinien gab, die zelltypspezifische Cre-Rekombinasen herstellten, war es durch Kreuzung mit diesen Mauslinien möglich eine transgene Maus zu züchten, die den MR nur in bestimmten Zelltypen exprimiert.

Zur homologen Rekombination wurden JM8A3 ES-Zellen⁹⁶ auf C57BL/6-Hintergrund verwendet. Pro Transfektion wurden 60µg Serca-GFP2A-MR in 1×10^6 JM8A3-ES-Zellen elektroporiert. Zwei Tage nach Elektroporation formten die ES-Zellen in allen Kulturen typische Kolonien. Dies war ein Zeichen dafür, dass die Zellen die Elektroporation überstanden hatten, ohne auszdifferenzieren und dadurch ihre Pluripotenz zu verlieren. Nach Ablauf der zwei Tage wurden die Zellen über sieben Tage einer Positivselektion durch 100µg/ml G418 unterworfen. Acht Tage nach Beginn der Selektion wurden überlebende Kolonien unter der Sterilwerkbank mit einer Pipette vorsichtig abgelöst, vereinzelt und in ein mit Feederzellen bewachsenes 96-Loch Platte überführt. Insgesamt wurden drei Transfektionen durchgeführt, von denen 468 potentiell positive Klone gepickt wurden.

Die Klone wurden dann auf den 96-well Platten expandiert und im Verhältniss 1:3 aufgeteilt sobald die Kolonien eine gewisse Größe erreicht hatten. Zwei dieser Platten wurden kurz danach bei -80°C weggefroren, die Zellen der dritte Platte erneut 1:3 aufgeteilt und expandiert. Aus den ersten beiden

Platten sollten später Zellen für die Blastozysten-Injektion gewonnen werden, aus der letzten Platte DNA zur Detektion positiver Klone durch Southern Blot. Zur Detektion positive Klone wurde aus den ES-Zellen genomische DNA isoliert. Der Southern Blot selbst wurde freundlicherweise von Dr. Thomas Wunderlich durchgeführt. Insgesamt wurden 3 positive Klone identifiziert. Diese wurden nach der Position ihrer DNA-Probe auf dem Agarosegel C1, E4 und G2 benannt.

Bevor die ES-Zellen zur Blastozysten-Injektion an unsere Kooperationspartner der AG Wunderlich weitergegeben wurde, musste getestet werden ob die Expressionskassette in den ES-Zellen funktional war. Da das vorgeschaltete Stop-Codon die Expression des GFP2A-MR in den ES-Zellen wie geplant stilllegte, musste das Stop-Codon durch Behandlung der Zellen mit einer löslichen Form der Cre-Rekombinase entfernt werden (His-Tat-N-Cre, im folgenden HTNC)⁹⁷.

Um das durch loxP-Seiten flankierte Stop-Codon zu entfernen, wurden 1×10^6 ES-Zellen des jeweiligen Klons für 18 Stunden mit $1 \mu\text{M}$ HTNC inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen gewaschen und weitere zwei Tage in normalem ES-Zell-Medium kultiviert damit die Zellen sich erholen und die Proteine der Expressionskassette herstellen konnten. Zunächst wurde mittels einer Fluoreszenz-Mikroskops überprüft ob die ES-Zell Kolonien in den mit HTNC behandelten Proben GFP herstellten. Tatsächlich waren zahlreiche ES-Zell-Kolonien nach Behandlung mit HTNC GFP-positiv, während in den unbehandelten Proben keine GFP-Signal sichtbar war (Abb. 3-33A). Weiterhin wurden mittels Durchflußzytometrie die GFP- und Mannose-Rezeptor-Expression der ES- und Feederzellen untersucht. Nur ES-Zellen zeigten nach HTNC-Behandlung eine Population GFP-positiver Zellen (Abb. 3-33B), während in Feeder-Zellen, die die Expressionskassette nicht trugen, oder in unbehandelten Zellen diese Population nicht sichtbar war. Bei den Zellen handelte es sich nicht um tote oder autofluoreszente Zellen, da diese zuvor mittels einer Lebend-Tot-Färbung und eines Autofluoreszenz-Kanals ausgeschlossen wurden. Des weiteren war nur in den GFP-positiven ES-, nicht aber in Feeder-Zellen eine MR-Färbung detektierbar (Abb. 3-33C).

Um letzte Zweifel an der Funktionsfähigkeit der Expressionskassette auszuräumen wurde mit Protein aus HTNC-behandelten und nicht behandelten ES-Zellkulturen ein Western Blot durchgeführt. Dieser zeigte deutlich, dass nur in HTNC-behandelten ES-Zellkulturen ein MR- und GFP-Signal detektierbar waren (Abb. 3-33D).

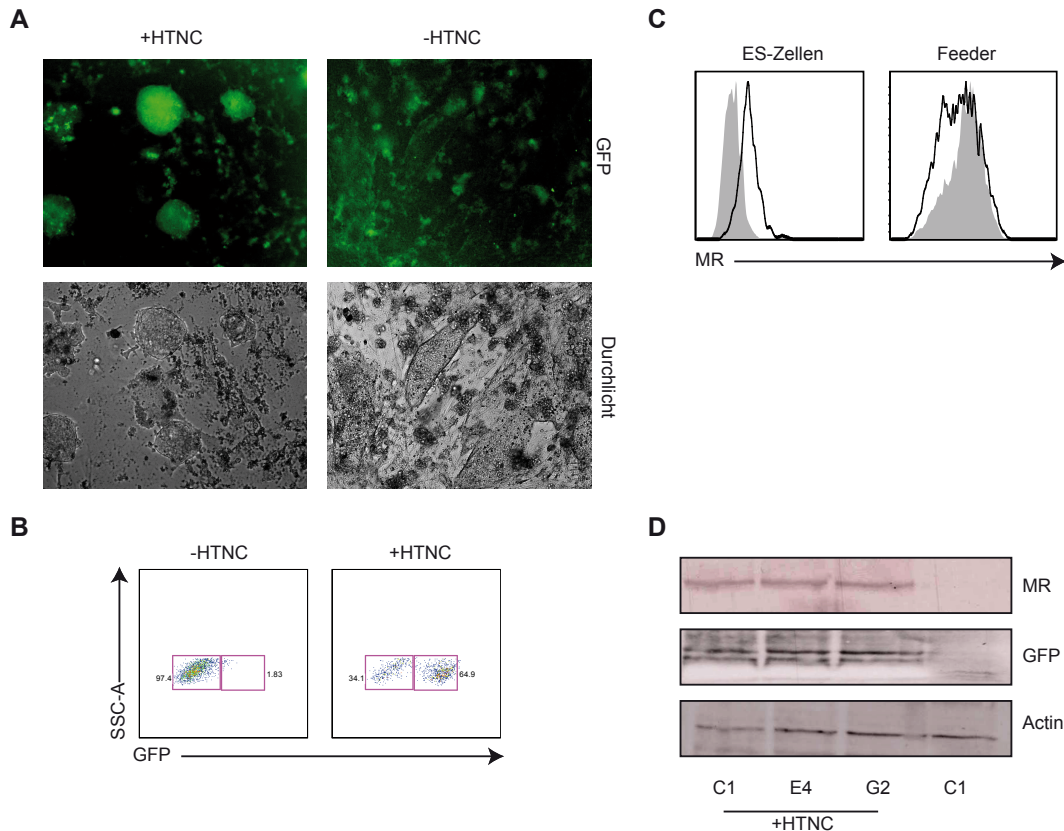


Abbildung 3-33: Funktionalität der GFP2A-MR Expressionskassette in JM8A3-ES-Zellen. **(A)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von HTNC-behandelten oder –unbehandelten ES-Zellen. Auf der linken Seite ist der GFP-Kanal sichtbar, Durchlichtaufnahmen auf der rechten Seite. **(B)** Durchflußzytometrische Analyse der GFP-Expression in HTNC-behandelter oder –unbehandelter ES-Zellen. **(C)** Intrazelluläre Mannoserezeptor-Färbung in HTNC-behandelten (schwarz) oder –unbehandelten (grau) ES-Zellen (links) oder Feederzellen (rechts). **(D)** Western Blot-Analyse von MR- (Oben), Actin- (Mitte) und GFP-Expression (Unten) in Proteinlysaten von HTNC-behandelten oder –unbehandelten ES-Zellkulturen.

3.2.6 Blastozysten-Injektion und Keimbahntransmission

Nachdem die Funktionsfähigkeit der GFP2A-MR Expressionskassette getestet wurde, wurden zwei der Klone zur Blastozysteninjektion an die AG Wunderlich übergeben. Insgesamt wurden von Klon E4 47 Blastocysten, von Klon C1 41 Blastozysten transferiert. Aus Blastozysten des Klons E4 wurden 19 Jungtiere geboren von denen 18 chimär waren. Aus den Blastozysten des Klons C1 wurden 20 Jungtiere geboren von denen 15 chimär waren. 9 Tiere waren zu über 90% chimär. Diese Tiere wurden mit C57BL/6 Tieren verpaart und die Jungtiere mittels PCR genotypisiert. Sämtliche getesteten Chimären zeigten Keimbahntransmission (Abb. 3-34B). Aus den heterozygoten der F1-Generation wurden in der Folge homozygote GFP2A-MR transgene Tiere gezüchtet. Diese Mauslinie wurden wegen des Transgens und seiner Lokalisation im Rosa26-Lokus *R26-MR* genannt.

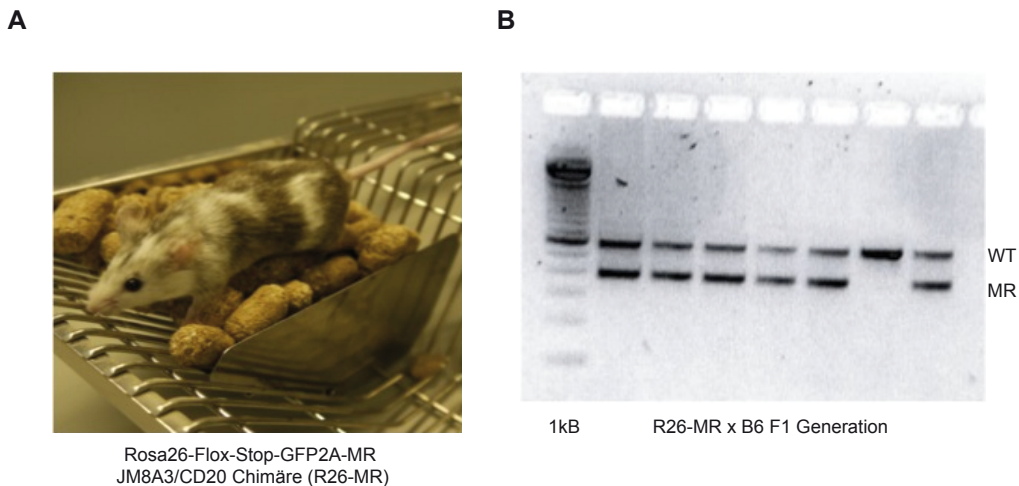


Abbildung 3-34: Keimbahntransmission in R26-MRxB6 Mäusen. (A) Exemplarisches Bild einer CB20/JM8A3 Chimäre. Die weiße Fellfarbe entsteht aus Wildtyp CB20-Zellen, während GFP2A-MR transgene JM8A3 ES-Zellen das Gen für dunkle Fellfarbe tragen. (B) Gelelektrophoretische Analyse einer Genotypisierungs-PCR von Schwanzbiopsien der F1-Jungtiere aus einer R26-MR Chimäre x B6-Verpaarung. Ein Wildtyp-Allel resultiert in einer Bande bei 570 Basenpaaren, während ein R26-transgenes Allel eine Bande bei 380 Basenpaaren ergibt.

3.2.7 Generierung einer *Tie2-MR* Mauslinie

Um festzustellen wie effizient die Expressionskassette nach Verkreuzung mit einer Cre-transgenen Maus exprimiert wurde, wurde eine *R26-MR* Maus mit einer Cre-transgenen Maus verkreuzt. *Tie2* ist ein endothel-spezifisches Gen, das allerdings auch in Vorläuferzellen von DCs, Makrophagen und T-Zellen exprimiert wird^{98,99}. Um die Effizienz der MR-Expression in den oben genannten Zelltypen zu analysieren wurde eine homozygote *R26-MR* Maus mit einer homozygoten *Tie2-Cre* Maus verpaart und die Jungtiere auf GFP- und MR-Expression sowie MR-Funktionalität in den entsprechenden Zelltypen untersucht. Dazu wurde die MR- und GFP-Expression in DCs, Makrophagen und T-Zellen aus einer *Tie2-MR* Maus untersucht. In allen untersuchten Zelltypen war in einem erheblichen Anteil der Zellen ein starkes GFP-Signal zu beobachten, was darauf schließen lässt, dass das Stop-Codon effektiv entfernt und die Expressionskassette abgelesen wird. In $CD11c^+ CD8^+$ und $CD8^-$ dendritischen Zellen lag der Anteil GFP-positiver Zellen bei 82,9% bzw 80,3% (Abb. 3-35A), während $F4/80^+ CD11c^+$ Rote Pulpa Makrophagen einen etwas geringeren Anteil an GFP-positiven Zellen aufwiesen (72,5%). In $CD8^+ CD3e^+$ bzw $CD4^+ CD3e^+$ T-Zellen waren jeweils 83,9% der Zellen GFP-positiv. In einer *R26-MR* Maus in der keine Cre-Rekombinase exprimiert wurde, war kein GFP-Signal in den entsprechenden Zelltypen zu beobachten (Abb. 3-35B).

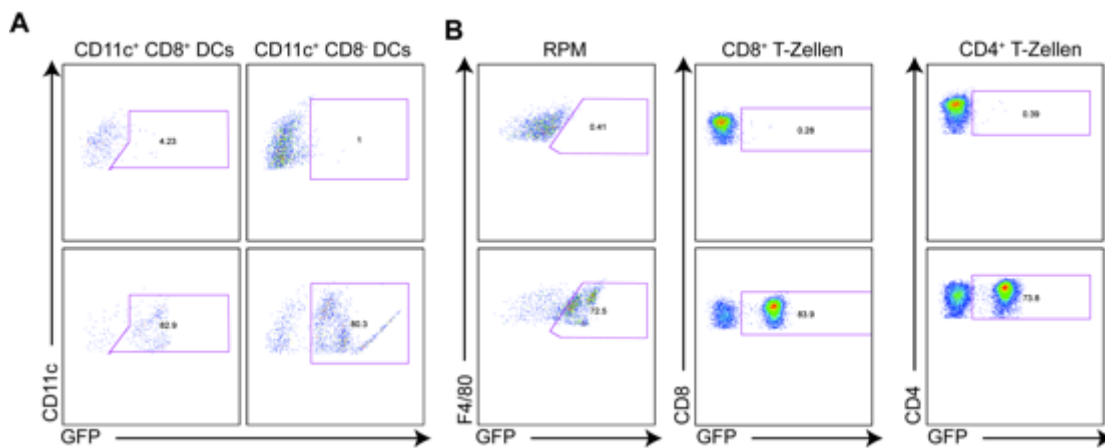


Abbildung 3-35: Rekombinationseffizienz in DCs, Makrophagen und T-Zellen von *R26-MR* (obere Reihe) oder *Tie2-MR* (untere Reihe) Milzzellsuspensionen. Dargestellt ist die GFP-Expression in $CD8^+ DEC205^+ CD11c^+$ und $CD8^- CD11b^+ CD11c^+$ dendritischen Zellen (links Seite), sowie $F4/80^+ CD11c^+$ Rote Pulpa Makrophagen (Mitte) und $CD8^+ CD3e^+$ bzw. $CD4^+ CD3e^+$ T-Zellen (rechte Seite).

Da das GFP-Signal nur ein Surrogatmarker für die MR-Expression war, wurde zusätzlich eine intrazelluläre MR-Färbung in den oben genannten Zelltypen durchgeführt und das Signal zwischen GFP-positiven *Tie2-MR* Zellen und GFP-negativen *R26-MR* Zellen verglichen. Zusätzlich wurden als Negativkontrolle *R26-MR* Zellen mit einem Isotyp-Antikörper gefärbt um abschätzen zu können ob die Zellen eine endogene MR-Expression aufwiesen.

Wie erwartet war in allen untersuchten Zelltypen in den GFP-positiven *Tie2-MR* Zellen ein stärkeres MR-Signal sichtbar als in den vergleichbaren *R26-MR* Zellen. Diese Signalzunahme war in $CD11c^+ CD8^+$ und $CD11b^+$ konventionellen dendritischen Zellen besonders deutlich. In $F4/80^+ CD11c^+$ Rote Pulpa Makrophagen war die Signalzunahme weniger ausgeprägt. Rote Pulpa Makrophagen waren allerdings auch die einzigen Zellen in denen das Signal der Isotypen-Färbung von dem der MR-Färbung in *R26-MR* Zellen abwich, da diese Zellen endogenen MR exprimierten. In allen anderen Zelltypen waren MR- und Isotypenfärbung in *R26-MR* Zellen identisch, was die Annahme bestätigt, dass lediglich Rote Pulpa Makrophagen in einer Wildtyp-Maus den MR exprimieren. In T-Zellen war das MR-Signal trotz eines starken GFP-Signals relativ schwach, wobei die MR-Expression in $CD8^+$ T-Zellen etwas stärker zu sein scheint als in $CD4^+$ T-Zellen (Abb. 3-36).

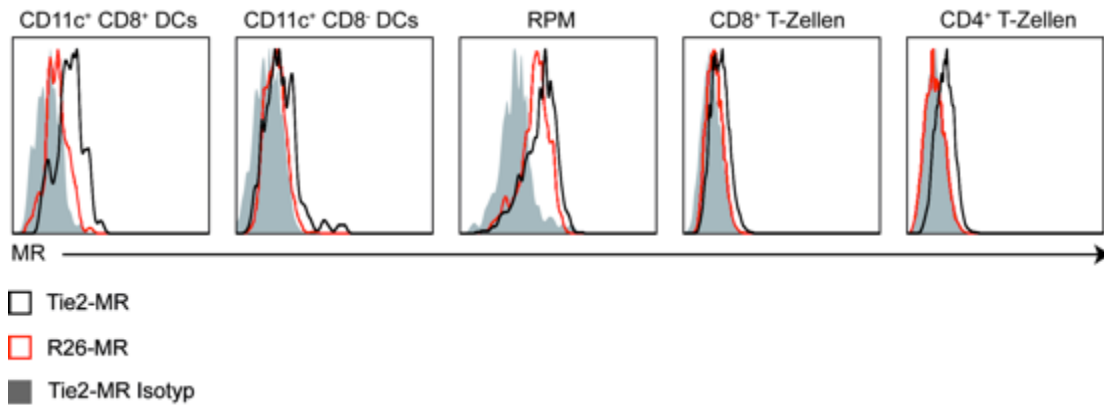


Abbildung 3-36: MR-Expression in *Tie2-MR* und *R26-MR* Milzzellen. Intrazelluläre Färbung des MR in GFP⁺ *Tie2-MR* (Schwarze Linie) oder *R26-MR* Zellen (Rote Linie). Isotypenfärbung in *R26-MR* Zellen ist grau hinterlegt. Analysiert wurden CD8⁺ DEC205⁺ CD11c⁺ und CD8⁻ CD11b⁺ CD11c⁺ dendritische Zellen, F4/80⁺ CD11c⁺ Rot Pulpa Makrophagen, sowie CD8⁺ CD3e⁺ und CD4⁺ CD3e⁺ T-Zellen.

Abschließend sollte geklärt werden ob der exprimierte MR in den untersuchten Zelltypen auch funktionsfähig war. Dazu wurden Milzzellen isoliert und *in vitro* mit fluoreszenzmarkiertem Ovalbumin inkubiert. Ein funktionsfähiger MR sollte lösliches Ovalbumin endozytieren und auf diese Art die Ovalbumin-Aufnahme der transgenen Zellen steigern. Tatsächlich nahmen alle GFP-positiven *Tie2-MR* Zellen mehr Ovalbumin auf als vergleichbare *R26-MR* Zellen. In allen Zelltypen konnte diese erhöhte Aufnahme durch den MR-Inhibitor Mannan geblockt werden. Besonders ausgeprägt war die erhöhte Ovalbumin-Aufnahme in CD11c⁺ konventionellen dendritischen Zellen. Sowohl CD8⁺ als auch CD8⁻ dendritische Zellen die aus einer *R26-MR* Maus gewonnen wurden, nahmen *in vitro* kaum lösliches OVA auf. Diese minimale Aufnahme ließ sich auch nicht durch Mannan blocken und war daher MR-unabhängig. In Zellen die aus seiner *Tie2-MR* Maus gewonnen wurden, war hingegen eine starke Aufnahme von löslichem Ovalbumin sichtbar, die sich durch Mannan inhibieren ließ und damit MR-abhängig war. In Rot –Pulpa-Makrophagen war die Aufnahme von löslichem Ovalbumin bereits in *R26-MR* Zellen sehr stark und in *Tie2-MR* Zellen nur leicht erhöht. In beiden Fällen ließ sich die Aufnahme durch Mannan nahezu komplett blocken, was mit der Annahme übereinstimmt, dass Rote Pulpa Makrophagen endogenen MR exprimierten. In T-Zellen gab es in *R26-MR* Zellen keine detektierbare OVA-Aufnahme. In *Tie2-MR* Zellen war eine schwache Ovalbumin-Aufnahme zu beobachten, die sich durch Mannan komplett inhibieren ließ. (Abb. 3-37).

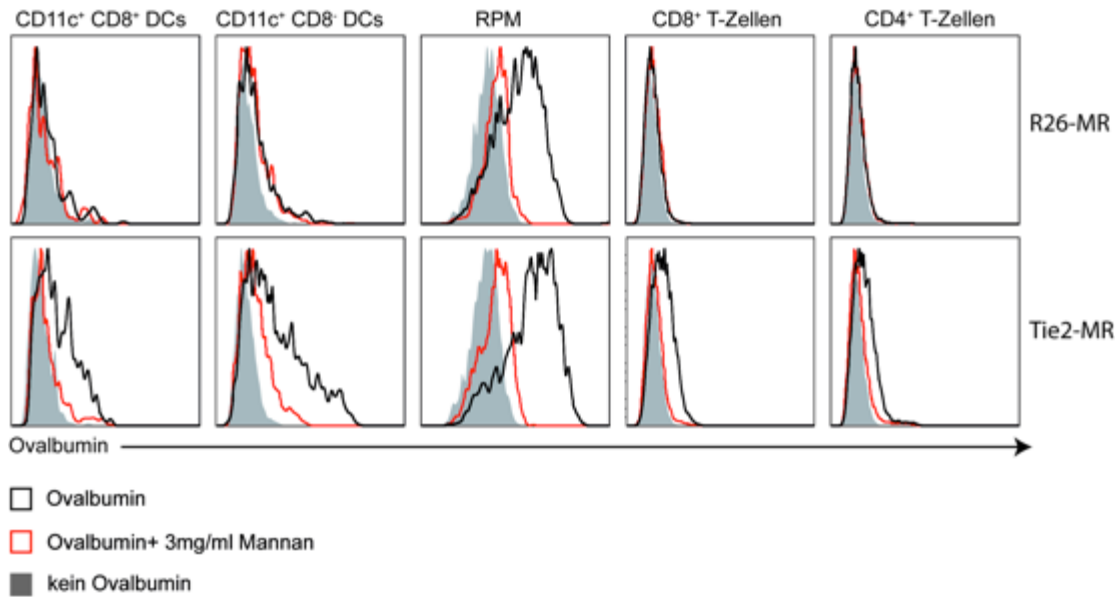


Abbildung 3-37: Aufnahme von löslichem Ovalbumin durch R26-MR (obere Reihe) oder Tie2-MR Milzzellen (untere Reihe). Dargestellt ist die Ovalbumin-Aufnahme in $CD8^+ DEC205^+ CD11c^+$ und $CD8^- CD11b^+ CD11c^+$ dendritischen Zellen (links Seite), sowie $F4/80^+ CD11c^+$ Rot Pulpa Makrophagen (Mitte) und $CD8^+ CD3e^+$ bzw. $CD4^+ CD3e^+$ T-Zellen (rechte Seite). Die Zellen wurden entweder mit 250ng/ml Ovalbumin-AlexaFluor647 (schwarze Linie), 250ng/ml Ovalbumin-AlexaFluor647 und 3mg/ml Mannan (rote Linie) oder ohne Zusätze (grauer Hintergrund) kultiviert.

Weitere Untersuchungen ergaben darüber hinaus, dass $CD8^-$ dendritische Zellen, die *in vivo* mit Ovalbumin beladen wurden, OT-I T-Zellen deutlich effektiver aktivieren konnten, wenn sie den Mannose-Rezeptor exprimierten. Während $CD8^-$ DCs, die aus einer R26-MR Maus isoliert wurden 47% aller OT-I Zellen aktivieren konnten, induzierten $MR^+ CD8^-$ DCs aus einer Tie2-MR Maus in 81,5% der T-Zellen Proliferation (Abb. 3-38). Obwohl es sich hierbei um vorläufige Ergebnisse handelte, so zeigen diese Befunde, dass Expression des MR tatsächlich für eine verbesserte Kreuzpräsentation in $CD8^-$ dendritischen Zellen sorgte.

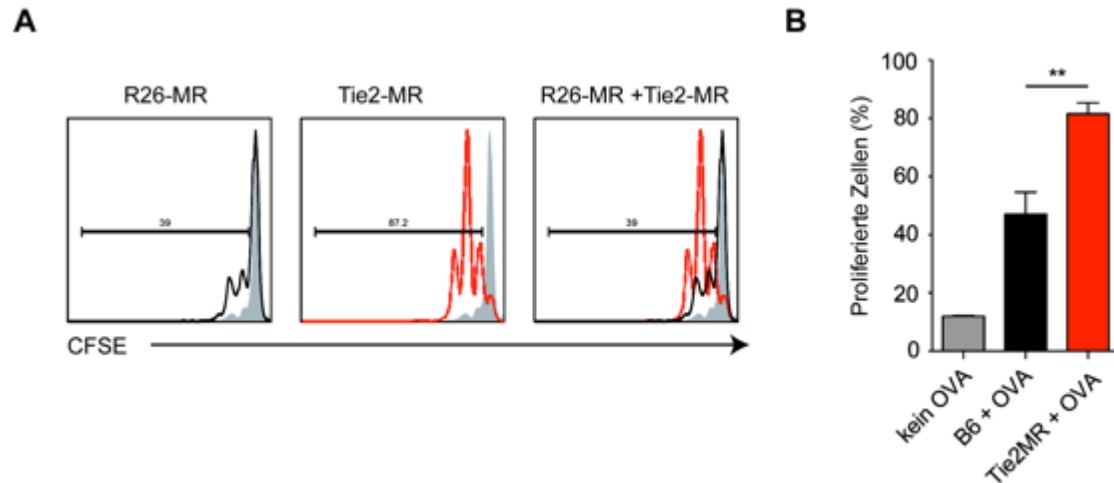


Abbildung 3-38: MR⁺ CD8⁻ dendritische Zellen können effektiver kreuzpräsentieren als vergleichbare Wildtyp DCs. (A) Durchflußzytometrische Analyse der CFSE-Signalstärke von nicht aktivierten (grauer Hintergrund) OT-I Zellen, oder OT-I Zellen die mit R26-MR (schwarze Linie) bzw. Tie2-MR CD8⁻ DCs (rote Linie) kokultiviert wurden. (B) Statistische Auswertung der in A gezeigten CFSE-Profile. Dargestellt ist der Anteil proliferierter Zellen für nicht aktivierte (grauer Hintergrund) OT-I Zellen, oder OT-I Zellen die mit R26-MR (schwarze Balken) bzw. Tie2-MR CD8⁻ DCs (rote Balken) kokultiviert wurden

Zusammenfassend kann man feststellen, dass die GFP2A-MR Expressionskassette erfolgreich in den Rosa26-Lokus der R26-MR Mäuse eingebracht wurde, in Cre-transgenen Mäusen effektiv aktiviert wurde und zur Expression eines endozytisch aktiven Mannose-Rezeptors und des eGFP-Markergens führte. Diese Expression des MR in CD8⁻ DCs aus Tie2-MR Mäusen konnte die Kreuzpräsentationsfähigkeit dieser Zellen deutlich verbessern. Damit wurde gezeigt, dass die Fähigkeit einer DC von der Expression eines geeigneten Rezeptors abhängt, und nicht von besonderen Antigenprozessierungseigenschaften. Damit war das zweite Ziel der Promotion erreicht.

4. Diskussion

4.1 Übersicht

In dieser Arbeit sollte die *in vivo* Rolle des Mannoserezeptors bei der Kreuzpräsentation geklärt werden. Dies umfasste die Identifikation einer MR- und CD11c-positiven Zellpopulation in der murinen Milz, die Analyse deren immunologischer *in vivo* Relevanz und die Untersuchung der von diesem Zelltyp benutzten Kreuzpräsentations-Mechanismen. Mit den RPM konnte eine CD11c- und MR-positives Zellpopulation identifiziert werden, welche den MR zur Kreuzpräsentation von löslichem Ovalbumin nutzt. Meine weitere Analyse zeigte, dass diese Zellen einen ähnlichen Mechanismus zur Kreuzpräsentation nutzen wie BM-DC, nämlich die Beladung in frühen Endosomen wie von Burgdorf beschrieben^{47,48}. Weiterhin konnte demonstriert werden, dass die RPM *in vivo* in der Lage sind, Antigen an T-Zellen zu kreuzpräsentieren und zusammen mit CD8⁺ DCs kritisch für die Induktion einer zytotoxischen T-Zellantwort gegen lösliches Antigen sind. Eine genauere Analyse der Eigenschaften der RPM zeigte, dass diese Zellen auf Grund ihrer CD11c-Expression, ihrer Autofluoreszenz und ihrer paramagnetischen Eigenschaften verschiedene Aufreinigungsprotokolle kontaminieren können. Zu diesen gehörten unter anderem durchflußzytometrische Analysen, sowie magnetische und durchflußzytometrische Zellsortierungen und deren Folgeanwendungen. Diese Befunde bewiesen die *in vivo* Relevanz des von Burgdorf beschriebenen Modells der Kreuzpräsentation. Zudem konnten sie die Kontroverse zwischen Burgdorf⁷⁶ und Segura⁷⁷ klären, wie weiter unten näher erläutert.

Um diese Fragen besonders elegant bearbeiten zu können, wurde eine Mannose-Rezeptor (MR) transgene Maus generiert, welche die Expression des MR in verschiedenen Zelltypen erlaubt. Diese transgene Maus trägt eine Expressionskassette, bestehend aus einer induzierbaren Form des MR sowie eines *eGFP*-Markergens. Kreuzung dieser Tiere mit Cre-Rekombinase transgenen Mauslinien ermöglichte eine zelltypspezifische Expression des MR. Mit Hilfe dieses Mausmodells konnte demonstriert werden, dass die Expression des MR in nicht-kreuzpräsentierenden, CD8⁻ DCs ausreichend war, um diese zur Kreuzpräsentation von lösliche Ovalbumin zu befähigen.

Im folgenden wird zunächst die Identifikation der RPM als kreuzpräsentierende, MR-positive APC der murinen Milz, ihre molekularen Mechanismen der Kreuzpräsentation, sowie ihre immunologische in vivo Relevanz diskutiert. Im Anschluß daran wird die Generierung der MR-transgenen Maus dargestellt sowie die Konsequenzen der MR-Expression für die Kreuzpräsentation in CD8⁻ DCs besprochen.

4.2 Identifikation der RPM als MR-positiver Zelltyp in magnetischen Zellaufreinigungen

Burgdorf et al. beschrieben in ihren Veröffentlichungen eine CD11c-positive Zellpopulation in der murinen Milz, welche den MR exprimiert und zur Aufnahme von löslichem Ovalbumin nutzt. Durch magnetische Zellaufreinigung angereicherte CD11c-positive Zellen zeigen eine MR-abhängige Kreuzpräsentation und immunozytochemische Aufnahmen demonstrierten, dass in diesen Zellen der MR in endosomen-ähnlichen Kompartimenten mit Peptid-beladenem MHC I kolokalisierte. Des Weiteren zeigten CD8⁺ DCs in durchflußzytometrischen Analysen ein stärkeres MR-Signal als CD8⁻ DCs. Diese Beobachtungen wurden so interpretiert, dass möglicherweise die kreuzpräsentierenden CD8⁺ DCs, in jedem Fall aber CD11c-positive Zellen, den MR ähnlich wie BM-DC zur Aufnahme und Kreuzpräsentation von löslichen Ovalbumin nutzen^{47,76}. In einer Veröffentlichung von Segura et al. wurden diese Beobachtungen jedoch angezweifelt. Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Burgdorf et al. konnte in durchflußzytometrisch aufgereinigten CD8⁺ und CD8⁻ DCs keine MR-Expression und keine funktionelle Relevanz des Rezeptors für die Kreuzpräsentation von löslichem Ovalbumin festgestellt werden⁷⁷.

Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz dieser Beobachtungen waren die verwendeten Aufreinigungsprotokolle: Während Segura et al. die konventionellen dendritischen Zellen durchflußzytometrisch aufreinigten, nutzten Burgdorf et al. dagegen ein Protokoll zur magnetischen Anreicherung CD11c-positiver Zellen. Letzteres erlaubte es allerdings nicht, zwischen verschiedenen CD11c-positiven Zellen zu unterscheiden. Neben konventionellen dendritischen Zellen wurden in der Milz verschiedene Makrophagen-Subtypen wie beispielsweise die Marginalzonen-Makrophagen als CD11c-positiv beschrieben^{100,101}. Obwohl die magnetische Aufreinigung CD11c-positiver Zellen ein akzeptiertes Protokoll zur Aufreinigung von dendritischen Zellen aus der murinen Milz ist, ist es somit möglich, dass die

von Burgdorf gesammelten Daten auf eine anderen CD11c-exprimierende APC-Typ zurückzuführen sind.

Tatsächlich exprimierten CD11c-positive Zellen den MR und nutzen ihn zur Aufnahme und Kreuzpräsentation von löslichem Ovalbumin. Dabei handelte es sich allerdings nicht wie zunächst vermutet um konventionelle dendritische Zellen, sondern um eine Makrophagen-Population die zwischen 20 und 30% der Gesamtzellzahl in den magnetischen Zellaufreinigungen ausmachten. Verschiedene Untersuchungen in dieser Promotionsarbeit belegten, dass es sich bei diesen Zellen um Rote Pulpa Makrophagen (RPM) handelte: Zum einen zeigten histologische Analysen das die MR-positiven Zellen hauptsächlich in der roten Pulpa, nicht aber in der Marginalzone und weißen Pulpa lokalisiert waren. Daher konnte es sich bei diesen Zellen nicht um DC, Marginalzonen- oder metallophile Makrophagen handeln^{27,71,102}. Des Weiteren exprimierten die MR-positiven Zellen Oberflächenmarker die als typisch für RPM beschrieben wurden⁷⁵. Eine Analyse der Milzzellpopulationen in RPM-defizienten *Spic*^{-/-} Mäusen belegte schließlich zweifelsfrei, dass es sich bei den MR-positiven Zellen um RPM handelte.

Bei der Untersuchung von kreuzpräsentationsrelevanten APC werden, wie bei Segura et al. geschehen⁷⁷, sehr häufig nur konventionelle dendritische Zellen betrachtet, da gezeigt werden konnte, dass nach Depletion von CD11c-positiven Zellen die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen gegen zellassoziertes Antigen nahezu komplett aufgehoben ist¹⁰³. Daher wird oft fälschlicherweise angenommen, dass lediglich konventionelle dendritische Zellen eine Rolle in der Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen spielen¹⁰³. Es konnte jedoch gezeigt werden dass durch Injektion von Diphtheria-Toxin in CD11c-DTR Mäuse sowohl Marginalzone-, Metallophile-Makrophagen als auch RPM depletiert werden^{100,104}. Diese Untersuchungen decken sich mit der hier dargestellten Beobachtung, dass RPM CD11c exprimieren und bestätigen Veröffentlichungen die nahelegen, dass CD11c kein spezifischer Marker für dendritische Zellen ist^{19,105,106}. Ein von Meredith et al. generiertes *Zbtb46*-DTR-Mausmodell erlaubt im Gegensatz zur CD11c-DTR Mauslinie eine spezifische Depletion von konventionellen dendritischen Zellen, während andere CD11c-positive Zellen wie RPM erhalten bleiben¹⁰¹. Die hier vorgestellten Daten unterstreichen, dass es zur Untersuchung DC-abhängiger Kreuzpräsentation notwendig ist, das *Zbtb46*-DTR Mausmodell und nicht wie bisher oft üblich CD11c-DTR Mäuse zu nutzen.

Weiterhin zeigen diese Ergebnisse deutlich, dass prinzipiell sowohl die Annahmen von Burgdorf, als auch die von Segura korrekt waren. Der MR ist wichtig zur Kreuzpräsentation von löslichem Antigen und zwar auch in der Homeostase. Dies ist zurückzuführen auf eine CD11c- und MR-positive Zellpopulation in der Milz^{47,76}. Hierbei handelte es sich aber nicht um einen der konventionellen Typen dendritischer Zellen, die ausschliesslich von Segura betrachtet wurden⁷⁷, sondern um RPM.

Neben den wissenschaftlichen Konsequenzen gab es durch die beobachteten Eigenschaften der RPM zusätzlich eine methodische Relevanz dieser Entdeckung: Die RPM kontaminierten in erheblicher Anzahl (20 bis 30% der Gesamtzellzahl) magnetische Zellaufreinigungen von CD11c-positiven Zellen. Dies konnte darauf zurückgeführt werden, dass die RPM paramagnetische Eigenschaften haben. Bei magnetischen Zellaufreinigungen führt dies zur Verunreinigung der Positiv-Fraktion mit RPM auch wenn keine paramagnetischen, Antikörper-gekoppelten Mikropartikel eingesetzt werden. Es ist also gleichgültig gegen welches Antigen sich die Aufreinigung richtet. Wenn statt der magnetischen Aufreinigung eine durchflusszytometrische Sortierung durchgeführt wird, dann erschwert die starke Autofluoreszenz der RPM die durchflußzytometrische Analyse und Sortierung von Milzzellkulturen. Wenn die autofluoreszenten RPM nicht aus den Analysen ausgeschlossen werden, so können diese kontaminierenden Zellen falsch-positive Signale liefern. Dies führte unter anderem dazu, dass Burgdorf et al. in Zellen bei denen es sich scheinbar um CD8⁺ DCs handelte, eine MR-Expression detektieren konnten⁴⁷. Andere Veröffentlichungen zeigten zudem, dass auch durchflußzytometrische Sortierungen und die Folgeanwendungen durch RPM-Kontaminationen beeinträchtigt werden können: So enthielt eine Population durchflußzytometrisch sortierter und später für eine Genexpressionsstudie verwendeter $\gamma\delta$ -T-Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit RPM, da während der Sortierung die autofluoreszenten Zellen nicht ausgeschlossen wurden. Die Konsequenz war, dass in der Auswertung der Genexpressionsprofile die $\gamma\delta$ -T-Zellen scheinbar positiv für zahlreiche RPM-Marker, wie den *MR*, *CCR3*, *F4/80* oder *Spic* ist⁸⁰. Diese falsch positiven Signale sind umso fataler, da es sich bei dieser Studie um einen Beitrag zu einer öffentlichen Genexpressions-Datenbank handelt, deren Daten möglicherweise als Grundlage für weitere wissenschaftliche Projekte verwendet werden. Es ist möglich, dass in anderen Veröffentlichungen ähnliche Fehlinterpretationen zu finden sind, da die magnetische Anreicherung von CD11c-positiven Zellen bis heute von vielen Arbeitsgruppen zur Aufreinigung von DCs aus der murinen Milz benutzt wird^{35,107-109}. Da die aufgereinigten Zellpopulationen neben den DC aber eine

erhebliche Kontamination durch RPM enthalten, ist es sehr wahrscheinlich, dass in der Vergangenheit einige RPM-Attribute fälschlicherweise DCs zugeschrieben wurden. Diese Kontamination betraf in geringerem Ausmaß auch andere magnetische Zellaufreinigungen aus der murinen Milz, so dass auch in diesen Fällen die RPM-Kontamination zu einer falschen Interpretation der Befunde führen konnte.

Um diese Problematik zu umgehen, und um nachzuweisen, dass die von Burgdorf beobachteten Phänotypen tatsächlich auf eine RPM-Kontamination der aufgereinigten DCs zurückzuführen war, wurde ein Protokoll entwickelt, mit dem die RPM aus den Zellisolaten entfernt werden konnten. Für diese Methode wurden zunächst durch eine magnetischen Zellaufreinigung die MR-positiven Zellen aus der Zellsuspension entfernt. Mit der negativen Fraktion dieser Aufreinigung, die alle Milzzellen außer den RPM enthielt, wurde danach die eigentlich gewünschte magnetische Zellaufreinigung durchgeführt, die nicht mehr durch RPM kontaminiert wurde. Dieses Protokoll erlaubte es, kontaminierende RPM aus allen untersuchten Zellaufreinigungen zu eliminieren. Gleichzeitig hatte es keine negativen Auswirkungen auf die Viabilität oder Ausbeute der verbleibenden Zellen. Wie erwartet waren die von Burgdorf beobachteten Phänotypen tatsächlich auf eine Kontamination der DCs mit RPM zurückzuführen. Nach RPM-Depletion war in aufgereinigten DCs keine MR-abhängige Aufnahme von löslichem Ovalbumin detektierbar. Diese Beobachtungen zeigen, dass RPM auf Grund ihrer paramagnetischen und autofluoreszenten Eigenschaften magnetische und durchflußzytometrische Zellaufreinigungen kontaminieren und Folgeanwendungen erschweren können. Damit in Zukunft mögliche Fehlinterpretation verhindert werden können, wurde in dieser Arbeit ein Protokoll entwickelt um die RPM aus den entsprechenden Zellaufreinigungen zu entfernen.

4.3 Kreuzpräsentation durch Rote Pulpa Makrophagen

Mit den RPM konnte eine MR-exprimierende Zellpopulation der murinen Milz identifiziert werden. Als nächstes wurde untersucht, ob RPM in der Lage waren lösliches Ovalbumin MR-abhängig zu kreuzpräsentieren.

Um diese Frage zu adressieren, wurde zunächst die Antigenaufnahme durch RPM und konventionelle DC genauer untersucht. Die RPM waren in der Lage, *in vitro* große Mengen lösliches Ovalbumin MR-abhängig aufzunehmen. Dies

stand im Gegensatz zu konventionellen dendritischen Zellen, die keine MR-abhängige Ovalbumin-Aufnahme zeigten und im Vergleich zu RPM nur sehr geringe Mengen Antigen aufnahmen. Untersuchungen der *in vivo* Antigenaufnahme bestätigten, dass lediglich RPM MR-abhängig Ovalbumin aufnahmen. Interessanterweise schien die Funktionsfähigkeit beider Zellpopulationen *in vitro* eingeschränkt zu sein, da sowohl DC als auch RPM *in vivo* im Vergleich deutlich größere Mengen Ovalbumin aufnahmen. Dies war vermutlich auf das Aufreinigungsprotokoll zurückzuführen, das ein mechanisches Aufbrechen der Milzstruktur und einen 20-minütigen enzymatischen Verdau, sowie mehrere Zentrifugationsschritte beinhaltete. Mit großer Wahrscheinlichkeit wurden die Zellen durch dieses Protokoll sehr stark beansprucht und in ihrer Fähigkeit lösliches Antigen aufzunehmen beeinträchtigt. Weiterhin wurde bereits beschrieben das Kollagen-Fragmente, die durch den enzymatischen Verdau freigesetzt werden, die Fähigkeit der Zellen löslichen Ovalbumin aufzunehmen beeinträchtigen.⁷⁶ Um die experimentellen Bedingungen so natürlich wie möglich zu halten, erfolgte die Antigenaufnahme in den folgenden Experimenten wenn möglich *in vivo*.

Um zu testen, ob die RPM in der Lage waren, Ovalbumin zu kreuzpräsentieren, wurden Mäuse intravenös mit geringen Mengen löslichen Ovalbumins injiziert, dendritische Zellen und RPM durchflußzytometrisch sortiert und mit CFSE-gefärbten OT-I T-Zellen kokultiviert. Die Aktivierung und Proliferation der OT-I T-Zellen wurde als Surrogatmarker für die Kreuzpräsentation von löslichem Ovalbumin verwendet. Als Antigen wurde eine geringe Menge von zuvor von Peptidfragmenten befreitem Ovalbumin verwendet. Burgdorf hatte zuvor demonstriert, dass kommerziell erwerbliches Ovalbumin Peptidfragmente enthielt, die zu einer stärkeren und unspezifischeren Aktivierung der OT-I Zellen führten⁷⁶. Des Weiteren wurden je Maus nur 200µg Antigen injiziert, was eine deutlich physiologischere Dosis war als die von Segura et al. verwendete Menge von 2mg je Maus⁷⁷. Dies verhinderte, dass große Mengen Antigen Rezeptor-unspezifisch aufgenommen wurden was eine mögliche funktionelle Relevanz des MR verschleiern konnte⁷⁶. Unter Berücksichtigung dieser Vorgaben konnte gezeigt werden, dass RPM ebenso wie CD8⁺ dendritische Zellen in der Lage waren, lösliches Ovalbumin zu kreuzpräsentieren. CD8⁻ dendritische Zellen waren hingegen deutlich ineffektiver und konnten in den meisten Versuchen, wie auch von anderen Gruppen beschrieben wurde, nur wenige OT-I Zellen aktivieren^{25,27}. Die Kreuzpräsentation durch RPM war, wenn die Zellen einige Stunden nach Injektion des Antigens aufgereinigt wurden, fast ebenso effektiv wie die Kreuzpräsentation durch CD8⁺ dendritischen Zellen. Wurden die

Zellen hingegen am Tag nach der Antigeninjektion isoliert, waren RPMs im Gegensatz zu CD8⁺ DCs kaum noch in der Lage zu kreuzpräsentieren. Dies ist ein klassischer Unterschied in der Antigen-Handhabung zwischen Makrophagen und dendritischen Zellen: Während dendritische Zellen Antigen in pH-neutralen Kompartimenten für gewöhnlich lange vorhalten und kreuzpräsentieren können, bauen Makrophagen das Antigen in ihren stark sauren, lysosomalen Kompartimenten sehr schnell ab^{35,110}.

In den RPM-defizienten *Spic*^{-/-} Mäusen wurde beobachtet, dass es noch immer eine kleine Anzahl an Zellen gab, die RPM-typische Oberflächenmarker aufwiesen. Um sicherzugehen, dass die Kreuzpräsentation des löslichen Ovalbumins tatsächlich durch RPM stattfand und nicht durch diese in *Spic*^{-/-} Mäusen verbliebene Zellpopulation, wurden diese Zellen isoliert und mit OT-I T-Zellen kokultiviert. Im Gegensatz zu den RPM, die aus einer Wildtyp-Maus gewonnen wurden, waren die Zellen allerdings kaum in der Lage OT-I Zellen zu aktivieren. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Kreuzpräsentation und die Aktivierung der OT-I T-Zellen tatsächlich durch die RPM stattfand. Diese Versuche zeigten, dass es neben den CD8⁺ DCs einen zweiten Zelltyp in der Milz gab, der lösliches Antigen effektiv kreuzpräsentieren konnte.

Da Hildner et al. zeigen konnten, dass die Differenzierung der kreuzpräsentierenden CD8⁺ DCs von dem Transkriptionsfaktor *Batf3* abhängt⁸⁶ und da die CD8⁺ DCs das einzige beschriebene kreuzpräsentierende Zellsubset der murinen Milz waren, wurde angenommen, dass in den Milzen von *Batf3*^{-/-} Mäusen keine Kreuzpräsentation mehr stattfindet. Drastisch reduzierte CTL-Antworten gegen Tumor- oder Virusantigene in *Batf3*^{-/-} Mäusen schienen diese These zu bestätigen. Die Identifikation der RPM warf nun die Frage auf, ob diese Annahme falsch war, oder ob die RPM oder deren Funktionalität in irgendeiner Weise mit der Expression des Transkriptionsfaktors *Batf3* verknüpft sind. Es zeigte sich, dass im Gegensatz zu CD8⁺ DCs die Differenzierung der RPM nicht von *Batf3* abhängt. RPM aus *Batf3*^{-/-} Mäusen waren ebenso wie RPM aus Wildtyp-Mäusen in der Lage lösliches Ovalbumin zu kreuzpräsentieren. Diese Experimente deuteten darauf hin, dass in den Milzen von *Batf3*^{-/-} Mäusen Kreuzpräsentation durch RPM stattfindet. Welche Rolle diese *Batf3*-unabhängige Kreuzpräsentation hat, ist allerdings unklar.

Dieser Befund ist unerwartet, da Milz-Makrophagen bislang als ineffektive APC gelten. Zahlreiche Veröffentlichungen konnten demonstrieren, dass Milz-

Makrophagen wie MMM und MZM nicht an der Generierung von CD8⁺ T-Zellantworten gegen Listerien oder VSV beteiligt sind^{73,74,111}. Des Weiteren wurde demonstriert, dass RPM Antigen nur sehr ineffektiv an CD4⁺ T-Zellen präsentieren können^{112,113}. Allerdings handelte es sich bei diesen Studien entweder um indirekte Nachweise der Kreuzpräsentation^{73,74,111} oder um klassische Antigen-Präsentation an CD4⁺ T-Zellen^{112,113}. Studien die eine Kreuzpräsentation von Milz-Makrophagen unmittelbar durch Kokultur mit transgenen T-Zellen untersuchen wurden ausserhalb dieser Promotionsarbeit bisher nicht durchgeführt. Lediglich Ciavarra et al. konnten nachweisen, dass RPM, nicht aber MMM oder MZM, für die Induktion von CD8⁺ T-Zellantworten gegen VSV notwendig sind⁷³. Letzteres ist im Einklang mit den in dieser Promotionsarbeit dargestellten Experimenten, die zeigen, dass RPM ebenso wie Thioglykolat-induzierte Makrophagen¹¹⁴, CD169⁺ Lymphknoten-Makrophagen²⁰, Knochenmarks-Makrophagen⁴⁷ oder zahlreiche Makrophagen-Zelllinien⁴⁰ Antigen effektiv kreuzpräsentieren können.

Neben den RPM wurden *in vivo* bisher zwei weitere MR-positive Zelltypen beschrieben, die ebenfalls zur Kreuzpräsentation fähig sind: Die sinusoidalen Endothelzellen der Leber (LSEC)¹¹⁵ und inflammatorische Ly6C^{hoch} Monozyten⁷⁷. Während es sich bei den LSEC nicht um Leukozyten, sondern Endothelzellen handelte, spielten die Ly6C^{hoch} Monozyten hauptsächlich in inflammatorischen Prozessen eine Rolle. Damit sind die RPM der erste bekannte Leukozyten-Subtyp, der MR-anhängig, unter homöostatischen Bedingungen lösliches Ovalbumin kreuzpräsentieren kann.

4.4 Molekulare Mechanismen der Kreuzpräsentation durch RPM

Im nächsten Schritt wurden die molekularen Kreuzpräsentations-Mechanismen der RPM untersucht und mit den für BM-DC beschriebenen verglichen. Da bisher keine primäre APC-Population bekannt war, die unter homöostatischen Bedingungen den MR zur Kreuzpräsentation nutzte, konnte bisher nicht untersucht werden, ob die von Burgdorf et al. in BM-DC beschriebenen Mechanismen der Kreuzpräsentation ein valides Modell für die *in vivo* verwendeten Kreuzpräsentations-Mechanismen sind^{47,48}. Dies war notwendig, da es sich bei BM-DC zwar um kreuzpräsentierende Zellen handelt, diese aber keine *in vivo* relevante Zellpopulation sind. Die Identifikation der RPM ermöglichte daher die Untersuchung MR-abhängiger Kreuzpräsentationsmechanismen in einer *in vivo* relevanten APC-Population.

Zunächst wurde analysiert, durch welche Mechanismen RPM Antigen aufnehmen konnten und welche Auswirkungen eine Blockierung der verschiedenen Aufnahmewege auf die Kreuzpräsentation von löslichem Ovalbumin hatte. Ebenso wie BM-DC endozytierten RPM den Großteil des löslichen Antigens MR-abhängig, während gleichzeitig eine kleinere Menge durch Pinozytose aufgenommen wurde. Wurde die MR-abhängige Antigenaufnahme *in vitro* blockiert, war die Kreuzpräsentation von löslichem Ovalbumin durch RPM und BM-DC reduziert, während Blockade der Pinozytose durch DMA in beiden Zelltypen keinen Einfluß auf die Kreuzpräsentation hatte. Dies deutete darauf hin, dass in RPM, ebenso wie in BM-DC, lediglich MR-endozytiertes Ovalbumin kreuzpräsentiert wurde. Kreuzpräsentation in CD8⁺ DC hingegen ließ sich weder durch MR- noch Pinozytose-Blockade inhibieren, was zeigte dass die CD8⁺ DCs einen anderen Mechanismus zur Aufnahme des löslichem Ovalbumins nutzen.

Einer der zentralen Punkte des von Burgdorf vorgestellten Modells ist die Abhängigkeit der Art der Antigenpräsentation vom Aufnahmemodus: In BM-DC wurde ausschließlich über den MR aufgenommenes Antigen kreuzpräsentiert, während ausschließlich pinozytiertes Antigen auf MHC II präsentiert wurde. Eine Inhibition eines der beiden Aufnahmewege störte deshalb die Antigenpräsentation des jeweils anderen Weges nicht. Das bedeutet, dass eine Blockade der MR-abhängigen Ovalbumin-Aufnahme die Kreuzpräsentation komplett inhibiert, während die Präsentation auf MHC II nicht beeinflusst wird^{47,48}. Im Gegensatz zu BM-DC waren RPM allerdings nicht in der Lage, lösliches Antigen an OT-II Zellen zu präsentieren. Dies deckte sich mit den Beobachtungen von Wang et al. die ebenfalls eine geringe Fähigkeit der RPM zur klassischen Antigenpräsentation beobachtet hatten¹¹². Dies war ein deutlicher Unterschied zu BM-DC, die in der Lage waren OT-II Zellen sehr effektiv zu aktivieren. Unglücklicherweise erschwerte diese Tatsache das von Burgdorf aufgestellte Modell in RPM zweifelsfrei zu belegen, da nicht demonstriert werden konnte, dass die Blockade der MR-abhängigen Aufnahme von löslichem Ovalbumin keinen Einfluss auf die Klasse II-Präsentation hatte. Daher waren weitergehende Analysen notwendig um festzustellen ob BM-DC und RPM vergleichbare molekulare Mechanismen zur Kreuzpräsentation nutzen. Daher wurde im nächsten Schritt untersucht in welches Kompartiment das Antigen transportiert wurde, ob zur Kreuzpräsentation endosomale TAP-Komplexe und ob Degradierung des Antigens durch das Proteasom notwendig waren.

Tatsächlich transportierten RPM, ebenso wie BM-DC, MR-endozytiertes Antigen ausschließlich in ein stabiles, MR⁺ und EEA-1⁺ endosomales Kompartiment. Wie in BM-DC kolokalisierte TAP mit dem Antigen in den EEA-1⁺ Endosomen. Eine Blockierung dieser endosomalen TAP-Komplexe reduzierte die Kreuzpräsentation von löslichem Ovalbumin sowohl in RPM als auch in BM-DC erheblich. Endogenes Ovalbumin wurde auch nach Behandlung der Zellen mit dem TAP-Inhibitor unverändert präsentiert. Dies zeigte, dass der TAP-Inhibitor lediglich die endosomalen, nicht aber die im ER lokalisierten TAP-Komplexe blockierte. Zwar war die Inhibition der Kreuzpräsentation durch diesen Inhibitor nicht vollständig, dies ist jedoch vermutlich auf die Tatsache zurückzuführen, dass ein anderer Inhibitor verwendet wurde als von Burgdorf. Burgdorf verwendete ein unstabiles, aber sehr effektives, an Transferrin gekoppeltes US6-Protein⁴⁸, das zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht mehr verfügbar war. Daher wurde als Alternative ein UL49.5-Peptid⁸⁷ verwendet, das ebenfalls an Transferrin gekoppelt wurde. Dieses Peptid schien die endosomale TAP allerdings weniger effektiv zu inhibieren als das US6-Protein, da die Blockade der Kreuzpräsentation auch in BM-DC nicht vollständig war. Da die Kreuzpräsentation sowohl in RPM, als auch in BM-DC durch das UL49.5-Peptid vergleichbar stark blockiert wurde und für BM-DC von Burgdorf mit einem wirksameren Inhibitor bereits eine vollständige Inhibition nachgewiesen wurde⁴⁸, kann angenommen werden, dass Kreuzpräsentation in RPM, ebenso wie BM-DC, von der Funktion dieser endosomalen TAP abhängt. Des Weiteren zeigte die Behandlung der Zellen mit dem Proteasom-Inhibitor Epoxomycin, dass Kreuzpräsentation von löslichem Ovalbumin sowohl in RPM als auch in BM-DC fast vollständig Proteasom-abhängig ist.

Diese Befunde demonstrierten, dass RPM und BM-DC einen ähnlichen, molekularen Mechanismus zur Kreuzpräsentation von löslichem Ovalbumin nutzen und dass dieser soweit experimentell überprüfbar dem von Burgdorf in BM-DC beschriebenen Modell der Kreuzpräsentation entsprach. Diese Beobachtungen sind in Übereinstimmung mit zahlreichen Veröffentlichungen, die beschreiben, dass Antigen aus frühen endosomalen Kompartimente sehr effektiv kreuzpräsentiert wird. Antigen welches dagegen in späte endosomale oder lysosomale Kompartimente transportiert wird, wird bis zu 1000 Mal weniger effektiv kreuzpräsentiert^{116,117}. Diese Form der Kreuzpräsentation ist darüber hinaus abhängig von funktionellen, endosomalen TAP-Komplexen¹¹⁸. Zusammen mit dem in dieser Promotionsarbeit dargestellten Kreuzpräsentations-Mechanismus der RPM zeigen diese Veröffentlichungen, dass es sich bei dem von Burgdorf et al. in

BM-DC beschriebenen Model nicht um ein *in vitro* Artefakt, sondern um einen *in vivo* relevanten Mechanismus handelt.

Da CD8⁺ DC eine zentrale Rolle in der *in vivo* Kreuzpräsentation einnehmen, ist es von großem Interesse welchen Kreuzpräsentations-Mechanismus diese Zellen nutzen^{28,78}. Die Befunde von Segura et al. zeigen lediglich, dass der MR nicht in der Kreuzpräsentation von löslichem Antigen durch konventionelle dendritische Zellen beteiligt ist⁷⁷. Diesen Befund konnte hier bestätigt werden. Dies bedeutete allerdings nicht notwendigerweise, dass diese Zellen einen anderen, als den von Burgdorf beschriebenen, Mechanismus nutzen. Die Funktion des MR könnte in diesen Zellen durch einen anderen Rezeptor wahrgenommen werden, der das Antigen in ein vergleichbares frühes endosomales Kompartiment dirigiert. Der Transport von Antigen in frühe Endosomen ist für zahlreiche von CD8⁺ DC exprimierte Rezeptoren wie DC-SIGN¹¹⁶ oder Langerin⁵⁷ beschrieben. Eine solche Funktion wurde ebenfalls für den DNDR-1-Rezeptor beschrieben, der notwendig für die Kreuzpräsentation von zellassoziertem Antigen ist und nekrotisches Antigen - ähnlich wie lösliches Ovalbumin durch den MR in BM-DC und RPM - in ein frühes, endosomales Kompartiment transportiert^{119,120}. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Kreuzpräsentation durch CD8⁺ DC Proteasom- und TAP-abhängig ist^{29,39,121}. Diese Befunde zeigen, dass das von Burgdorf beschriebene, endosomale Kompartiment möglicherweise generell von kreuzpräsentierenden Zellen zur Prozessierung von exogenem Antigen für die Präsentation an CD8⁺ T-Zellen genutzt wird.

4.5 Immunologische *in vivo* Relevanz der RPM

Nach der Identifikation der RPM und der Analyse ihrer molekularen Kreuzpräsentationsmechanismen, sollte im nächsten Schritt ihre immunologische Funktion untersucht werden. Die einzige bekannte, aber nicht primär immunologische Funktion der RPM, war die Phagozytose und Degradierung von gealterten Erythrozyten^{75,122}. Da RPM *in vitro* in der Lage waren Antigen an CD8⁺ T-Zellen zu präsentieren, wurde zunächst untersucht, ob dies auch *in vivo* möglich war.

Tatsächlich war die Aktivierung von adaptiv transferierten OT-I T-Zellen in SpiC^{-/-} Mäusen vermindert. Mit Gewebeschnitten konnte darüber hinaus demonstriert werden, dass transferierte OT-I T-Zellen in der roten Pulpa kurzfristig in Kontakt mit F4/80⁺ Zellen kamen. Diese Daten demonstrierten,

dass RPM auch *in vivo* zur Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen beitragen konnten. Als nächstes wurde geprüft, ob die Induktion zytotoxischer T-Zellen in RPM-defizienten Mäusen gestört war. Interessanterweise zeigten RPM-defiziente SpiC^{-/-} Mäuse eine deutliche Reduktion der zytotoxischen T-Zellantworten gegen löslichen Ovalbumin. Dies war sowohl für das klassische „Cross-priming“ (Ovalbumin + CpG), sowie für das von Semmling et al. beschriebene alternative „Cross-priming“ (Ovalbumin + α GC) der Fall⁹¹. Diese Defizienz war nicht auf einen Defekt der T-Zellen in SpiC^{-/-} Mäusen zurückzuführen, da keine Reduktion in der Zytotoxizität beobachtet werden konnte, wenn die Mäuse mit einem CD40-ligierenden Antikörper als Adjuvanz injiziert wurden. Die CD40-Ligation ist ein sehr starkes Aktivierungssignal für APC und sollte in dem verwendeten Model zu vollständigen Maturierung der DCs führen¹²³. Zusammen mit der Beobachtung, dass aus SpiC^{-/-} Mäusen isolierte DCs keinen Defekt in der Kreuzpräsentation von löslichem Ovalbumin hatten, zeigte dieses Experiment weiterhin, dass ebenfalls kein grundsätzlicher Defekt der DCs für den Phänotyp in SpiC^{-/-} Mäusen verantwortlich war. Der Defekt war also mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Abwesenheit der RPM und nicht auf einen durch die SpiC-Defizienz bedingten zellintrinsic Defekt eines anderen Zelltyps zurückzuführen.

Um die Rolle der RPM im klassischen „Cross-priming“ aufzuklären, wurde zunächst untersucht, ob RPM unabhängig von CD8⁺ DCs in der Lage waren, eine zytotoxische T-Zellantwort zu initiieren. Untersuchungen in CD8⁺ DC-defizienten *Batf3*^{-/-} Mäusen zeigten jedoch, dass ohne CD8⁺ DC keine zytotoxische T-Zellantwort induziert werden konnte. Dies war nicht auf einen Defekt der RPM durch die *Batf3*-Defizienz zurückzuführen, da bereits *in vitro* demonstriert wurde, dass RPM aus *Batf3*^{-/-} Mäusen uneingeschränkt kreuzpräsentieren konnten. Ein selbstständiges Priming der CD8⁺ T-Zellen durch die RPM konnte daher nahezu ausgeschlossen werden. Wäre ein Teil der T-Zellaktivierung durch die RPM durchgeführt worden, so müssten diese auch unabhängig von CD8⁺ DCs in *Batf3*^{-/-} Mäusen in der Lage sein eine zytotoxische T-Zellantwort zu induzieren.

Diese Untersuchungen zeigten, dass CD8⁺ DCs und RPM kooperieren müssen, um eine vollständige Aktivierung von CD8⁺ zytotoxischen-T-Zellen zu erreichen. Die Defizienz einer der beiden Zellpopulationen reichte aus um die T-Zellaktivierung deutlich zu unterdrücken. Weitergehende Analysen sollten aufklären auf welche Art diese beiden Zellpopulation zur Induktion einer zytotoxischen T-Zellantwort miteinander wechselwirkten. Diese Untersuchungen demonstrierten, dass Kreuzpräsentation durch RPM für eine

vollständige Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen nicht notwendig war, da MR^{-/-} Mäuse im klassischen „Cross-priming“ keinen Defekt aufwiesen. Da RPM zur Kreuzpräsentation von löslichem Ovalbumin aber auf die Expression des MR angewiesen waren, konnte davon ausgegangen werden, dass RPM in MR^{-/-} Mäusen kaum in der Lage waren, lösliches Ovalbumin zu kreuzpräsentieren.

Dass die direkte Kreuzpräsentation durch die RPM keine Rolle bei der Induktion des klassischen „Cross-priming“ spielt, war möglicherweise auf die Lokalisation der RPM zurückzuführen. Ihre Lage in der roten Pulpa erschwerte ihren Kontakt mit anderen Zelltypen des adaptiven Immunsystems, wie DC und naiven T-Zellen, die sich vornehmlich in der weißen Pulpa befanden. Obwohl RPM lösliches Ovalbumin äußerst effektiv kreuzpräsentieren konnten, hatten sie auf Grund ihrer Lage deutlich weniger Kontakt zu T-Zellen, als CD8⁺ dendritische Zellen in der weißen Pulpa. Die OT-I-T-Zellaktivierung zeigte zwar, dass RPM einen Teil der transferierten T-Zellen aktivieren konnten, durch die Lokalisation in der roten Pulpa war für einen Großteil der T-Zellen die Kreuzpräsentation der RPM aber vermutlich nicht relevant. Es konnten darüber hinaus kein Beweis für die Migration der RPM in die weiße Pulpa gefunden werden, weswegen man davon ausgehen muss, dass die RPM auch nach Aktivierung in der roten Pulpa verblieben und kaum Kontakt zu T-Zellen haben.

Aus diesem Grund wurde vermutet, dass der beobachtete Phänotyp auf einen von den RPM produzierten, löslichen Faktor zurückzuführen ist. Die Lage der RPM direkt an dem offenen Blutsinus der roten Pulpa⁷⁰ ermöglichte es ihnen eventuelle Pathogene im Blutstrom schneller zu detektieren als die tief in der T-Zellzone der weißen Pulpa sitzenden DCs. Analysen der Genexpression der RPM zeigten, dass diese mit einer Vielzahl von Mustererkennungs-Rezeptoren, wie beispielsweise TLR2, TLR4, TLR6 und TLR7 bis TLR9 ausgestattet sind. Abgesehen von TLR9 exprimierten die RPM von allen Rezeptoren größere Mengen als konventionellen DCs⁸⁰.

Vorläufige Daten bestätigten die Vermutung, dass RPM einen löslichen Faktor produzieren, der den DC das „Cross-priming“ von CD8⁺ T-Zellen erleichterte. Einer der vielversprechendsten Kandidaten ist das Zytokin TNF-alpha, von dem bekannt ist dass es unter inflammatorischen Bedingungen von Makrophagen hergestellt wird¹²⁴ und zur Reifung von DC beitragen kann¹²⁵⁻¹²⁷. Erste Experimente zeigten, dass DC aus SpiC^{-/-} Mäusen 18 Stunden nach Stimulation mit Ovalbumin und CpG deutlich niedrigere Level an

kostimulatorischen Molekülen exprimierten als in vergleichbaren Wildtyp-Mäusen. Dies unterstützte die Vermutung, dass in SpiC^{-/-} Mäusen die fehlende Produktion eines löslichen, proinflammatorischen Zytokins durch die RPM, für die verringerte DC-Aktivierung und damit für den beobachteten Defekt in SpiC^{-/-} Mäusen verantwortlich ist.

Es ist bekannt, dass neben TNF-alpha ebenfalls IL12p70 und Typ-I Interferone eine große Rolle beim Priming von zytotoxischen T-Zellen spielen^{78,128,129}. Außerdem aktivierte das von uns verwendete 1668-CpG Oligonukleotid unter anderem die Typ-I Interferon-Produktion^{130,131}. Allerdings waren die Konzentrationen an Typ-I Interferonen im Serum und im Milzhomogenat von SpiC^{-/-} Mäusen im Vergleich zu denen von Wildtyp-Mäusen kaum reduziert. Neben CpG war auch LPS als Adjuvanz in der Injektionslösung vorhanden, da kommerziell erwerbliches Ovalbumin Endotoxinkontaminationen aufweist. LPS induziert im Gegensatz zu CpG eine Produktion von IL12p70 und TNF-alpha^{124,132-134}. Während kaum IL12p70 im Serum oder in Milzhomogenaten von Wildtyp oder SpiC^{-/-} Mäusen detektiert werden konnte fanden sich erhebliche Mengen TNF-alpha im Milzhomogenat von Wildtyp-Mäusen. Im Gegensatz dazu war die TNF-alpha Konzentration im Milzhomogenat aus von SpiC^{-/-} Mäusen deutlich reduziert. Außerdem konnte demonstriert werden, dass RPM, nicht aber CD8⁺ DCs, nach Stimulation mit Ovalbumin und CpG große Mengen TNF-alpha produzierten. TNF-alpha war darüber hinaus für die Induktion zytotoxischer T-Zellantworten durch klassisches „Cross-priming“ essentiell, da die Zytotoxizität sowohl in TNF-alpha^{-/-} als auch in TNFR1/2^{-/-} Mäusen stark reduziert war. Diese Beobachtungen waren ein erster Hinweis, dass der in SpiC^{-/-} Mäusen beobachtete Defekt im klassischen „Cross-priming“ möglicherweise auf die fehlender RPM-abhängige Zytokin-Produktion zurückzuführen war.

Zusammenfassend zeigen die hier dargestellten Daten eine *in vivo* Relevanz der RPM auf. Zusammen mit CD8⁺ DCs sind RPM essentiell zur vollständigen Induktion einer zytotoxischen T-Zellantwort. Auch wenn die beteiligten Mechanismen noch nicht gänzlich aufgeklärt sind, so konnten erste Untersuchungen die Rolle der beiden Zelltypen bereits eingrenzen: Die Daten deuten darauf hin, dass die RPM auf Grund ihrer Lokalisation nicht in der Lage sind zytotoxische T-Zellen selbstständig zu primen. Des Weiteren war keine Kreuzpräsentation durch die RPM zur vollständigen Induktion von zytotoxischen T-Zellantworten notwendig, weswegen die *in vivo* Rolle der Kreuzpräsentation durch RPM noch unklar ist. Nach dem derzeitigen Wissensstand werden die Beobachtungen am besten durch folgendes Modell

erklärt: *Batf3*-abhängige CD8⁺ DC in der weißen Pulpa treten in direkten Kontakt zu naiven CD8⁺ T-Zellen und aktivieren diese. Dieser Prozess ist jedoch unabhängig von den RPM, daher kann in *SpiC*^{-/-} Mäusen eine schwache, aber eindeutig detektierbare Zytotoxizität induziert werden. Zur vollständigen Aktivierung der T-Zellen benötigen CD8⁺ DC allerdings ein Lizenzierungssignal. Dieses wird in Form eines löslichen Faktors, möglicherweise durch TNF-alpha, von den RPM bereitgestellt. Die mit zahlreichen Gefahren-Rezeptoren ausgestatteten RPM sind in der roten Pulpa direkt am Blutstrom lokalisiert und sind aus diesem Grund in der Lage Gefahrensignale in der Zirkulation sehr schnell und effizient zu detektieren. Sollte ein Gefahrensignal detektiert werden, so wird ein löslicher Botenstoff produziert, freigesetzt und über Lymphkanäle der Milz an die in der weißen Pulpa sitzenden DC vermittelt. Diese werden durch den Botenstoff lizenziert, worauf sie die Expression ihrer kostimulatorischen Moleküle steigern und deutlich effizienter zytotoxischen T-Zellen induzieren können.

Kooperationen zwischen Antigen-präsentierenden Zellen wurden bereits mehrfach demonstriert. In der Milz konnte beispielsweise ein für zytotoxische T-Zellantworten relevanter Antigentransfer von Marginalzonen- und Metallophilen Makrophagen auf CD8⁺ DC nachgewiesen werden⁷¹. Ein solcher Antigentransfer findet auch in drainierenden Lymphknoten zwischen residenten und migratorischen dendritischen Zellen statt. Migratorische DC nehmen hierbei Antigen in infiziertem Gewebe auf und transportieren es nach ihrer Maturierung in die drainierenden Lymphknoten. Hier geben sie dieses an residente DCs weiter, welche dann eine T-Zellaktivierung anstoßen^{135,136}. Allenspach et al. konnten zusätzlich demonstrieren, dass in drainierenden Lymphknoten die Kooperation der beiden DC-Typen über Antigentransfer hinaus geht: Nach subkutaner Injektion von Ovalbumin waren Antigenprozessierung und -präsentation sowohl von residenten als auch migratorischen DC notwendig, um eine vollständige Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen zu ermöglichen¹³⁷. Eine andere Studie konnte zeigen, dass lösliche Faktoren von Makrophagen, die mit *Mycobacterium tuberculosis* infiziert waren, in der Lage waren humane DC zu maturieren¹³⁸. Zusammenfassend zeigen diese Veröffentlichungen, dass eine Kooperation zwischen verschiedenen APC, wie hier für RPM und CD8⁺ DC demonstriert, ein üblicher Vorgang während der Induktion von Immunantworten ist. Weiterhin wurde demonstriert, dass Makrophagen, wie in dieser Promotionsarbeit vermutet, durch lösliche Faktoren eine DC-Maturierung induzieren können.

An dieser Stelle muss festgehalten werden, dass die hier vorgestellten Beobachtungen kein formeller Beweis für das oben dargestellte Modell sind. Zwar ist dieses Modell die wahrscheinlichste und plausibelste Erklärung für die erhobenen Daten, dennoch sind weiterführende Experimente notwendig, die dazu dienen werden, die Rolle der RPM und ihre Kooperation mit den CD8⁺ DC im klassischen „Cross-priming“ weiter zu beleuchten. Allerdings zeigt bereits die Tatsache, dass die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen nicht wie angenommen vom CD8⁺ DC komplett selbstständig durchgeführt wird, dass die Induktion von Immunantworten in der Milz deutlich schlechter verstanden ist als bisher angenommen.

4.6 Generierung einer MR-transgenen Mauslinie

Wie bereits beschrieben, war es unklar, ob die Fähigkeit einer Zelle zur Kreuzpräsentation auf die Anwesenheit einer spezialisierten zellinternen Maschinerie oder lediglich auf den Zugang des Antigens zu dieser zurückzuführen ist. Zahlreiche Veröffentlichungen zeigen, dass stabile, frühe Endosomen ein auf Kreuzpräsentation spezialisiertes Kompartiment sind^{47,48,60,117,119}. Ob alle kreuzpräsentierenden Zellen dieses nutzen, ist allerdings nicht bekannt. Ebenso ist unklar, ob ein solches Kompartiment in nicht-kreuzpräsentierenden Zellen vorhanden ist und ob diesen Zellen lediglich der Rezeptor fehlte es mit Antigenen zu versorgen. Aktuell sind drei verschiedene Zelltypen bekannt, die dieses Kompartiment zur Kreuzpräsentation nutzen. Dies sind die von Burgdorf charakterisierten BM-DC, CD8⁺ DC und die in dieser Arbeit untersuchten RPM. Während BM-DC und RPM den MR nutzen um lösliches Ovalbumin in dieses Kompartiment zu transportieren, scheint in CD8⁺ DC der DNGR-1 Rezeptor eine ähnliche Funktion für nekrotisches Antigen zu besitzen¹¹⁹. Für humane DC wurde ebenfalls beschrieben, dass in frühe Endosomen eingebrachtes Antigen äusserst effektiv kreuzpräsentiert wird. Da murine Ly6C^{hoch} Monozyten den MR zur Aufnahme von löslichem Ovalbumin nutzen ist es sehr wahrscheinlich dass auch diese Zellen die frühen Endosomen zur Kreuzpräsentation des Antigens benötigen. Neben diesen Beobachtungen wurde bereits von verschiedenen Gruppen gezeigt, dass durch Ligation oder ektope Expression verschiedener Rezeptoren auch nicht-kreuzpräsentierende und sogar nicht-professionelle antigenpräsentierende Zellen in der Lage waren externes Antigen auf dem MHC I zu präsentieren. Bevan et al. konnten beispielsweise bereits 2002 zeigen, dass CD8⁻ konventionelle DCs der murinen Milz nach Aufnahme von Immunkomplexen über den Fc-Gamma-Rezeptor dieses Antigen kreuzpräsentieren konnten, während Fc-Gamma-Rezeptor-defiziente

Zellen dazu nicht in der Lage waren. Da auch Fc-Gamma-Rezeptor-defiziente DCs noch immer Immunkomplexe aufnehmen konnten, war der Defekt in der Kreuzpräsentation als nicht auf einen Mangel an Antigen innerhalb der Zellen zurückzuführen⁸¹. Dies zeigte deutlich, dass auch in kanonisch nicht-kreuzpräsentierenden Zellen eine solche erfolgen konnte, wenn das Antigen über den entsprechenden Rezeptor aufgenommen wurde. Dies wiederum implizierte, dass die Art der Antigenaufnahme und nicht die endogene Maschinerie der Zellen bestimmen könnte, ob ein Antigen kreuzpräsentiert wird. Selbst nicht-professionelle APC wie HEK293T-Zellen oder $\gamma\delta$ -T-Zellen waren in der Lage Antigen zu kreuzpräsentieren wenn es den Zellen über den entsprechenden (artifizial exprimierten) Rezeptor zugeführt wurde^{82,139}.

Alle diese Befunde deuten darauf hin, dass die meisten Zelltypen, eine endogene Maschinerie besitzen, mit der die Zelle theoretisch in der Lage ist exogenes Antigen zu prozessieren und auf MHC I Moleküle zu laden. Entscheidend scheint der Zugang des Antigens zu dieser Maschinerie durch endozytische Rezeptoren zu sein. Um diese Annahme zu prüfen fehlte, bis zu diesem Zeitpunkt allerdings ein Modellsystem, das es erlaubt, einen mit Kreuzpräsentation assoziierten Rezeptor in einer großen Anzahl verschiedener Zelltypen zu exprimieren.

Daher sollte ein Modellsystem geschaffen werden, das die Expression eines kreuzpräsentations-assoziierten Rezeptors in jedem gewünschten Zelltyp erlaubt. In einer Vielzahl von Zelltypen soll in diesem einheitlichen Modellsystem untersucht werden ob Antigenaufnahme über den Rezeptor die Zellen zur Kreuzpräsentation befähigt und welche intrazelluläre Maschinerie an diesem Vorgang beteiligt ist. Um die Versuche möglichst einfach zu gestalten, soll Ovalbumin als Modellantigen und der MR als Rezeptor verwendet werden. Die cNDA des MR wurde dafür zunächst in einem äußerst aufwendigen Klonierungsprozess einen Subklonierungsvektor eingebracht. Zur besseren Identifikation von MR-transgenen Zellen wurde vor die MR-cNDA ein eGFP-Markergen einkloniert, welches durch eine virale 2A-Sequenz an den MR fusioniert wurde⁹²⁻⁹⁴. Wie erwartet war die Expressionskassette funktionsfähig und führte in HEK293T-Zellen zu einer starken GFP- und MR-Expression, sowie zu einer extrem starken, MR-abhängigen Aufnahme von löslichem Ovalbumin. Außerdem konnte beobachtet werden, dass die gemeinsam transkribierte mRNA nach der Translation, wie geplant, in zwei Proteine zerfiel und keine GFP-MR Fusionsproteine in der Zelle vorlagen.

Da es sich bei den HEK293T-Zellen um eine humane Zelllinie handelte, sollte die Expressionskassette vor der Transfektion in ES-Zellen zunächst in einer murinen Zelle getestet werden. Da die Expression des MR später vor allem in Leukozyten erfolgen sollte, wurden leicht *in vitro* zu kultivierende MR^{-/-} BM-DC als Zielzellen gewählt. Da BM-DC, im Gegensatz zu HEK293T-Zellen, nicht mit der Calcium-Phosphat-Methode zu transfizieren waren, wurde die Expressionskassette in einen lentiviralen Vektor umkloniert. Dieser wurde genutzt um lentivirale Partikel zu produzieren, mit denen daraufhin BM-DC infiziert werden konnten. Auf Grund der enormen Größe der Expressionskassette wurde durch die Infektion mit dem MR-enthaltenden lentiviralen pLOX-GFP2A-MR nur eine sehr geringe Anzahl von BM-DC infiziert. Diese geringe Anzahl erlaubte zwar keine Detektion des MR durch Western Blot, sehr wohl aber einen indirekten Nachweis über eine erhöhte und Mannan-inhibierbare Ovalbumin-Aufnahme der GFP-positiven Zellen. Dies zeigte, dass die Expressionskassette auch in primären, murinen APC funktionsfähig war.

Nachdem die Funktionalität der Expressionskassette überprüft wurde, wurde sie aus dem Subklonierungsvektor in den Serca-Vektor umkloniert und durch Elektroporation des resultierenden Serca-GFP2A-MR in JM8A3 ES-Zellen eingebracht⁹⁶. Eine Analyse der ES-Zell-DNA ergab, dass drei Klone eine Insertion des GFP2A-MR im Rose26-Lokus aufwiesen.

Vor der Injektion der ES-Zellen wurden diese erneut auf Expression und Funktionalität des MR geprüft. Da sich die Expressionskassette nach der homologen Rekombination hinter einem von loxP-Sequenzen flankierten Stop-Codon befindet, wurde in MR-transgenen ES-Zellen kein GFP- oder MR-Protein hergestellt. Um das loxP-flankierte Stop-Codon zu entfernen wurden ES-Zellen daher mit einem löslichen His-Tat-Cre-Protein (HTNC)⁹⁷ behandelt, welches das Stop-Codon entfernt. In allen drei ES-Zellklonen, nicht aber in Feeder-Zellen, war zwei Tage nach Inkubation der Zellen mit HTNC, in einer durchflußzytometrischen Analyse, ein GFP-Signal sichtbar. Zudem war in GFP-positiven Zellen eine MR-Färbung detektierbar. Diese war nicht auf eine erhöhte Autofluoreszenz der GFP-positiven Zellen zurückzuführen, da die Signalstärke einer Isotypen-Färbung in behandelten und unbehandelten Zellen identisch war. Zusätzlich wurde die Expression von GFP- und MR-Protein durch einen Western Blot verifiziert. Die im Western Blot beobachtete geringe Signalstärke war dadurch zu erklären, dass nur ein Bruchteil der für den Western Blot verwendeten Zellen tatsächlich GFP- und MR-positiv war. Bei einem Großteil der ES-Zellkultur handelte es sich um Feederzellen und

nur ein Teil der ES-Zellen war durch die HTNC-Behandlung aktiviert worden. Diese Daten zeigten, dass die Klonierung der MR-Expressionskassette erfolgreich war und dass es gelungen war, diese durch homologe Rekombination in den Rosa26-Lokus von C57BL/6 ES-Zellen einzubringen. Zwei der ES-Zellklone wurden im Maushaus der Universität Köln in, aus CB20-Mäusen entnommene Blastozysten, injiziert. In beiden Fällen wurden chimäre Jungtiere mit einem sehr hohen Chimerismusgrad (>95%) geboren. Diese wurden mit C57BL/6 Tieren verpaart und die Nachkommen durch PCR genotypisiert. Alle verpaarten Mäuse zeigten Keimbahntransmission.

Um zu testen, ob die Expressionskassette, wie gewünscht, nach Verkreuzung der transgenen Tiere mit einer Cre-Rekombinanten Mauslinie abgelesen wurde, wurden die R26-MR Mäuse mit Mäusen aus der Tie2-Cre Linie gekreuzt. Diese Tie2-MR Mäuse sollten es erlauben, den MR in dendritischen Zellen, Makrophagen und T-Zellen zu exprimieren. Die Tie2-Cre Mäusen wurde ursprünglich als Endothel-spezifische Cre-Linie generiert, diese kann allerdings auch zur Expression von Genen in einer Vielzahl von Leukozyten verwendet werden, da Tie2 ebenfalls in einer frühen haematopoetischen Stammzelle exprimiert wird^{98,99}. Eine durchflußzytometrische Analyse dieser Zelltypen in Tie2-MR Mäusen zeigte in allen untersuchten Zelltypen ein starkes GFP-Signal. In RPM und konventionellen DCs der Milz war darüber hinaus ein starkes MR-Signal detektierbar. In RPM, die zusätzlich endogenen MR exprimierten, resultierte dieses Signal daher aus der Expression des endogenen und des transgenen MR und stellte nur eine Zunahme des MR-Signals im Vergleich zu Wildtyp-Zellen dar. Der transgene MR war funktional, da alle MR-exprimierenden Zellen in der Lage waren, lösliches Ovalbumin aufzunehmen und da diese Aufnahme mit Mannan komplett geblockt werden konnte. Obwohl in T-Zellen eine ebenso starke GFP-Expression wie in DCs und Makrophagen festgestellt werden konnte, war das MR-Signal und die Ovalbumin-Aufnahme deutlich schwächer. Dies ist möglicherweise auf den Phänotyp der Zellen zurückzuführen, die eigentlich keine endozytischen Rezeptoren exprimieren. Vorläufige Daten zeigten zusätzlich, dass MR⁺ CD8⁻ dendritische Zellen deutlich effektiver kreuzpräsentieren konnten, als vergleichbare Wildtyp-Zellen. Obwohl diese Versuche zunächst reproduziert werden müssen, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Expression des korrekten endozytischen Rezeptors ausreichend ist, um nicht-kreuzpräsentierenden Zellen zur Kreuzpräsentation zu befähigen. Eine ähnliche Abhängigkeit wurde auch von anderen Gruppen beobachtet. So konnte den Haan et al. zeigen, dass Antigenaufnahme über den FcγRI CD8⁻

DCs ebenfalls zur Kreuzpräsentation befähigt⁸¹. Tacken et al. konnten demonstrieren, dass Antigen-Bindung an unterschiedliche Domänen des DC-SIGN Rezeptors zum Transport des Antigens in verschiedene Kompartimente führt. Dabei wird lediglich Antigen effektiv kreuzpräsentiert, welches in frühe endosomale Kompartimente eingebracht wird¹¹⁶. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in primären, humanen DC gemacht¹¹⁷. Diese Befunde decken sich mit den in dieser Promotionsarbeit gemachten Beobachtungen und unterstützen die Vermutung, dass nicht die intrinsische Maschinerie einer Zelle, sondern der Zugang des Antigens über endozytische Rezeptoren darüber entscheidet, ob eine Zelle kreuzpräsentieren kann oder nicht.

4.7 Zusammenfassung

Die Kreuzpräsentation von Antigen in der Milz ist eine essentielle Voraussetzung für die Induktion von zytotoxischen T-Zellantworten gegen Viren oder Tumore. Aus welchem Grund nur einzelne APC-Subtypen zur Kreuzpräsentation fähig sind, ist wegen fehlendem Verständnis der beteiligten molekularen Mechanismen allerdings unklar. Beobachtungen von Burgdorf et al. zeigen, dass die Antigenpräsentation in BM-DC über die Art der Antigenaufnahme reguliert wird. Lediglich Antigen, welches über den MR aufgenommen und deshalb in ein frühes endosomales Kompartiment transportiert wird, kann kreuzpräsentiert werden. Es ist allerdings fraglich, ob die Kreuzpräsentation in anderen Zelltypen ebenfalls über die Expression von endozytischen Rezeptoren kontrolliert wird. Zudem wird die *in vivo* Relevanz dieses Modells kontrovers diskutiert.

In dieser Arbeit ist es gelungen, eine *in vivo* Relevanz für MR-vermittelte Kreuzpräsentation zu beschreiben. Hierzu konnte zunächst mit den RPM ein primärer Zelltyp identifiziert werden, der die von Burgdorf beschriebenen Mechanismen zur Kreuzpräsentation von löslichem Ovalbumin nutzt. Diese Zellpopulation entgeht den klassischen Analysen für DCs, was erklärt, warum Segura et al. in ihren Untersuchungen keine Relevanz des MR finden konnten. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass RPM *in vivo* in der Lage sind Antigen an OT-I T-Zellen zu präsentieren und zur Induktion einer zytotoxischen T-Zellantwort beitragen. Durch die starke Autofluoreszenz der Zellen und ihre paramagnetischen Eigenschaften kontaminierten diese des Weiteren durchflußzytometrische und magnetische Zellaufreinigungen. Diese Eigenschaften waren ein weiterer Grund, warum Segura zu anderen Schlüssen als Burgdorf et al. gekommen waren. Um dieses Problem in Zukunft zu vermeiden, konnte in dieser Arbeit ein Protokoll entwickelt werden, um Zellen aus Milzsuspensionen ohne RPM-kontaminationen aufzureinigen. Zukünftige Analysen sollen die Rolle der RPM in der *in vivo* Immunität aufklären und werden das Verständnis über die Induktion von adaptiven Immunantworten in der Milz erheblich erweitern.

Um aufzuklären, ob das Modell von Burgdorf auch für andere Zelltypen Gültigkeit hat, wurde eine transgene Maus generiert, die eine Cre-abhängige Induktion des MR erlaubt. Durch diese Tiere konnte gezeigt werden, dass die Kreuzpräsentation in CD8⁻ DCs durch die Expression des MR verbessert werden kann. Dies deutet darauf hin, dass die Regulation der Kreuzpräsentation durch endozytische Rezeptoren auch in anderen Zelltypen eine Rolle spielt. In weiterführenden Studien kann dieses Mausmodells genutzt werden, um die allgemeine Relevanz des von Burgdorf et al. beschriebenen Mechanismus für alle Zelltypen zu analysieren.

5. Literatur

1. Delves, J. & Roitt, I. The immune system - first part. *New England Journal of Medicine* 37–49 (2000).
2. Janeway, C. & Murphy, K. M. Immunobiology. (2012).
3. Beutler, B. a TLRs and innate immunity. *Blood* **113**, 1399–407 (2009).
4. Medzhitov, R. & Janeway, C. Innate Immunity. *New England Journal of Medicine* (2000).
5. Palm, N. W. & Medzhitov, R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunological reviews* **227**, 221–33 (2009).
6. Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science (New York, N.Y.)* **327**, 291–5 (2010).
7. Rajewski, K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* (1996).
8. Robbins, F. C. & Robbins, J. B. Current status and prospects for some improved and new bacterial vaccines. *Annual Review of Public Health* **7**, 105–25 (1986).
9. Gounni, A. & Capron, M. High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites. *Nature* (1994).
10. Cooper, N. The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component. *Advances in Immunology* (1985).
11. Squier, M. & Cohen, J. Cell-mediated cytotoxic mechanisms. *Current opinion in immunology* (1994).
12. Fremont, D. & Kozono, H. Biophysical studies of T cell receptors and their ligands. *Current opinion in immunology* (1996).
13. Hardardottir, F. & Janeway, C. T cells with two functional antigen-specific receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1995).
14. Kruisbeek, A. & Amsen, D. Mechanisms underlying T-cell tolerance. *Current opinion in immunology* (1996).

15. Mueller, D. L. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nature immunology* **11**, 21–7 (2010).
16. Friese, M. & Fuffer, L. Pathogenic CD8+ T cells in multiple sclerosis. *Annals of neurology* (2009).
17. Tsai, S. & Santamaria, P. CD8+ T cells in type 1 diabetes. *Advances in Immunology* (2008).
18. Banchereau, J. & Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* (1998).
19. Hume, D. a Macrophages as APC and the dendritic cell myth. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **181**, 5829–35 (2008).
20. Asano, K. *et al.* CD169-positive macrophages dominate antitumor immunity by crosspresenting dead cell-associated antigens. *Immunity* **34**, 85–95 (2011).
21. Vitetta, E. & XM, Y. Memory B and T Cells. *Annual review of immunology* (1991).
22. Braciale, T., Morrison, L. & Braciale, V. Antigen presentations pathways to class I and class II MHC-restricted T lymphocytes. *Immunological reviews* (1987).
23. Kurts, C., Robinson, B. W. S. & Knolle, P. a Cross-priming in health and disease. *Nature reviews. Immunology* **10**, 403–14 (2010).
24. Bevan, M. 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. *Journal of Experimental Medicine* (1976).
25. Den Haan, J. M., Lehar, S. M. & Bevan, M. J. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *The Journal of experimental medicine* **192**, 1685–96 (2000).
26. Desch, a N. *et al.* CD103+ pulmonary dendritic cells preferentially acquire and present apoptotic cell-associated antigen. *The Journal of experimental medicine* **208**, 1789–97 (2011).
27. Dudziak, D. *et al.* Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science (New York, N.Y.)* **315**, 107–11 (2007).
28. Amigorena, S. & Savina, A. Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells. *Current opinion in immunology* **22**, 109–17 (2010).

29. Joffre, O. P., Segura, E., Savina, A. & Amigorena, S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nature reviews. Immunology* **12**, 557–69 (2012).
30. Ramachandra, L. & Harding, C. MHC Molecules and Microbial Antigen Processing in Phagosomes. *Current opinion in immunology* **21**, 98–104 (2009).
31. 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. **21**, 155–165 (2004).
32. Belizaire, R. & Unanue, E. R. Targeting proteins to distinct subcellular compartments reveals unique requirements for MHC class I and II presentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 17463–8 (2009).
33. Bertholet, S. *et al.* Leishmania antigens are presented to CD8+ T cells by a transporter associated with antigen processing-independent pathway in vitro and in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **177**, 3525–33 (2006).
34. Accapezzato, D. *et al.* Chloroquine enhances human CD8+ T cell responses against soluble antigens in vivo. *The Journal of experimental medicine* **202**, 817–28 (2005).
35. Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I. & Trombetta, E. S. Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science (New York, N.Y.)* **307**, 1630–4 (2005).
36. Savina, A. *et al.* NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell* **126**, 205–18 (2006).
37. Savina, A. *et al.* The small GTPase Rac2 controls phagosomal alkalinization and antigen crosspresentation selectively in CD8(+) dendritic cells. *Immunity* **30**, 544–55 (2009).
38. Saveanu, L. *et al.* IRAP identifies an endosomal compartment required for MHC class I cross-presentation. *Science (New York, N.Y.)* **325**, 213–7 (2009).
39. Palmowski, M. J. *et al.* Role of immunoproteasomes in cross-presentation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **177**, 983–90 (2006).
40. Houde, M., Bertholet, S., Sacks, D. & Desjardins, M. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* **425**, (2003).

41. Kovacsovics-Bankowski, M. & Rock, K. L. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science (New York, N.Y.)* (1995).
42. Norbury, C. & Watts, C. Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages. *Immunity* (1995).
43. Rodriguez, A. & Amigorena, S. Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC I presentation in dendritic cells. *Nature cell biology* (1999).
44. Lin, M. L. *et al.* Selective suicide of cross-presenting CD8⁺ dendritic cells by cytochrome c injection shows functional heterogeneity within this subset. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 3029–34 (2008).
45. Ackerman, A. L., Kyritsis, C., Tampé, R. & Cresswell, P. Access of soluble antigens to the endoplasmic reticulum can explain cross-presentation by dendritic cells. *Nature immunology* **6**, 107–13 (2005).
46. Guermonprez, P. *et al.* ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* **425**, 397–402 (2003).
47. Burgdorf, S., Kautz, A., Böhnert, V., Knolle, P. a & Kurts, C. Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science (New York, N.Y.)* **316**, 612–6 (2007).
48. Burgdorf, S., Schölz, C., Kautz, A., Tampé, R. & Kurts, C. Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation. *Nature immunology* **9**, 558–66 (2008).
49. Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E. & Sommer, T. ERAD: the long road to destruction. *Nature cell biology* **7**, 766–72 (2005).
50. 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).
51. Burgdorf, S., Lukacs-kornek, V. & Kurts, C. The Mannose Receptor Mediates Uptake of Soluble but Not of. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 1–7 (2006).
52. Burgdorf, S. & Kurts, C. Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation. *Current opinion in immunology* **20**, 89–95 (2008).
53. Mitchell, D. a, Fadden, a J. & Drickamer, K. A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR.

- Subunit organization and binding to multivalent ligands. *The Journal of biological chemistry* **276**, 28939–45 (2001).
54. Carter, R. W., Thompson, C., Reid, D. M., Wong, S. Y. C. & Tough, D. F. Preferential induction of CD4+ T cell responses through in vivo targeting of antigen to dendritic cell-associated C-type lectin-1. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **177**, 2276–84 (2006).
 55. Van Vliet, S. J. *et al.* MGL-mediated internalization and antigen presentation by dendritic cells: a role for tyrosine-5. *European journal of immunology* **37**, 2075–81 (2007).
 56. 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. *The Journal of cell biology* **151**, 673–683 (2000).
 57. Yan, M. *et al.* Despite differences between dendritic cells and Langerhans cells in the mechanism of papillomavirus-like particle antigen uptake, both cells cross-prime T cells. *Virology* **324**, 297–310 (2004).
 58. Takahara, K. *et al.* Functional comparison of the mouse DC-SIGN, SIGNR1, SIGNR3 and Langerin, C-type lectins. *International immunology* **16**, 819–29 (2004).
 59. Howard, M. J. & Isacke, C. M. The C-type lectin receptor Endo180 displays internalization and recycling properties distinct from other members of the mannose receptor family. *The Journal of biological chemistry* **277**, 32320–31 (2002).
 60. Zehner, M. *et al.* Mannose receptor polyubiquitination regulates endosomal recruitment of p97 and cytosolic antigen translocation for cross-presentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 9933–8 (2011).
 61. Smith, G., Symons, J., Khanna, A., Vanderplasschen, A. & Alcami, A. Vaccinia virus immune evasion. *Immunological reviews* (1997).
 62. Tortorella, D., Gewurz, B. E., Furman, M. H., Schust, D. J. & Ploegh, H. L. VIRAL SUBVERSION OF THE IMMUNE SYSTEM. *Annual review of immunology* 861–926 (2000).
 63. Goodbourn, S., Didcock, L. & Randall, R. E. Interferons : cell signalling , immune modulation , antiviral responses and virus countermeasures. *Journal of general virology* 2341–2364 (2000).
 64. Dairaghi, D., Greaves, D. & Schall, T. Abduction of Chemokine Elements by Herpesviruses. *Seminars in Virology* (1998).

65. Lalani, A. S., Barrett, J. W. & Mcfadden, G. Modulating chemokines: more lessons from viruses. *Immunology Today* 100–106 (2000).
66. Früh, K., Gruhler, A., Krishna, R. & Schoenhals, G. A comparison of viral immune escape strategies targeting the MHC class I assembly pathway. *Immunological reviews* (1999).
67. Ahn, K. *et al.* The ER-luminal domain of the HCMV glycoprotein US6 inhibits peptide translocation by TAP. *Immunity* **6**, 613–21 (1997).
68. Koppers-Lalic, D. *et al.* Varicelloviruses avoid T cell recognition by UL49.5-mediated inactivation of the transporter associated with antigen processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 5144–9 (2005).
69. López-Bravo, M. & Ardavín, C. In vivo induction of immune responses to pathogens by conventional dendritic cells. *Immunity* **29**, 343–51 (2008).
70. Cesta, M. F. Normal structure, function, and histology of the spleen. *Toxicologic pathology* **34**, 455–65 (2006).
71. Backer, R. *et al.* Effective collaboration between marginal metallophilic macrophages and CD8⁺ dendritic cells in the generation of cytotoxic T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 216–21 (2010).
72. McGaha, T. L., Chen, Y., Ravishankar, B., Van Rooijen, N. & Karlsson, M. C. I. Marginal zone macrophages suppress innate and adaptive immunity to apoptotic cells in the spleen. *Blood* **117**, 5403–12 (2011).
73. Ciavarra, R. P., Buhner, K., Rooijen, N. Van & Tedeschi, B. T Cell Priming Against Vesicular Stomatitis Virus AnT Cell Priming Against Vesicular Stomatitis Virus Analyzed In Situ. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* (1997).
74. Aichele, P. *et al.* Macrophages of the splenic marginal zone are essential for trapping of blood-borne particulate antigen but dispensable for induction of specific T cell responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* (2003).
75. Kohyama, M. *et al.* Role for Spi-C in the development of red pulp macrophages and splenic iron homeostasis. *Nature* **457**, 318–21 (2009).
76. Burgdorf, S. *et al.* Steady-state cross-presentation of OVA is mannose receptor-dependent but inhibitable by collagen fragments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, E48–9; author reply E50–1 (2010).

77. Segura, E., Albiston, A. L., Wicks, I. P., Chai, S. Y. & Villadangos, J. a Different cross-presentation pathways in steady-state and inflammatory dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 20377–81 (2009).
78. Shortman, K. & Heath, W. R. The CD8+ dendritic cell subset. *Immunological reviews* **234**, 18–31 (2010).
79. Schnorrer, P. *et al.* The dominant role of CD8+ dendritic cells in cross-presentation is not dictated by antigen capture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 10729–34 (2006).
80. Consortium, T. I. G. Immunological Genome Project. (2008).
81. Den Haan, J. M. M. & Bevan, M. J. Constitutive versus Activation-dependent Cross-Presentation of Immune Complexes by CD8+ and CD8- Dendritic Cells In Vivo. *Journal of Experimental Medicine* **196**, 817–827 (2002).
82. Giodini, A., Rahner, C. & Cresswell, P. Receptor-mediated phagocytosis elicits cross-presentation in nonprofessional antigen-presenting cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 3324–9 (2009).
83. Inaba, K. & Steinman, R. M. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *Journal of Experimental Medicine* (1992).
84. Jordan, M., Schallhorn, a & Wurm, F. M. Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic acids research* **24**, 596–601 (1996).
85. Kingston, R. & Okayama, H. Calcium phosphat transfection. *Current protocols in immunology* (2001).
86. Hildner, K. *et al.* Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science (New York, N.Y.)* **322**, 1097–100 (2008).
87. Verweij, M. C. *et al.* The varicellovirus UL49.5 protein blocks the transporter associated with antigen processing (TAP) by inhibiting essential conformational transitions in the 6+6 transmembrane TAP core complex. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* (2013).
88. Hou, W.-S. & Van Parijs, L. A Bcl-2-dependent molecular timer regulates the lifespan and immunogenicity of dendritic cells. *Nature immunology* **5**, 583–9 (2004).

89. Iwasaki, a. & Kelsall, B. L. Freshly Isolated Peyer's Patch, but Not Spleen, Dendritic Cells Produce Interleukin 10 and Induce the Differentiation of T Helper Type 2 Cells. *Journal of Experimental Medicine* **190**, 229–240 (1999).
90. Schlecht, G., Mouriès, J., Poitrasson-Rivière, M., Leclerc, C. & Dadaglio, G. Purification of splenic dendritic cells induces maturation and capacity to stimulate Th1 response in vivo. *International immunology* **18**, 445–52 (2006).
91. Semmling, V. *et al.* Alternative cross-priming through CCL17-CCR4-mediated attraction of CTLs toward NKT cell-licensed DCs. *Nature immunology* **11**, 313–20 (2010).
92. Kim, J. H. *et al.* High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice. *PloS one* **6**, e18556 (2011).
93. Trichas, G., Begbie, J. & Srinivas, S. Use of the viral 2A peptide for bicistronic expression in transgenic mice. *BMC biology* **6**, 40 (2008).
94. Funston, G. M., Kallioinen, S. E., De Felipe, P., Ryan, M. D. & Iggo, R. D. Expression of heterologous genes in oncolytic adenoviruses using picornaviral 2A sequences that trigger ribosome skipping. *The Journal of general virology* **89**, 389–96 (2008).
95. East, L. & Isacke, C. M. The mannose receptor family. *Biochimica et biophysica acta* **1572**, 364–86 (2002).
96. Pettitt, S. J. *et al.* Agouti C57BL/6N embryonic stem cells for mouse genetic resources. *Nature methods* **6**, 493–5 (2009).
97. Peitz, M., Pfannkuche, K., Rajewsky, K. & Edenhofer, F. Ability of the hydrophobic FGF and basic TAT peptides to promote cellular uptake of recombinant Cre recombinase: a tool for efficient genetic engineering of mammalian genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 4489–94 (2002).
98. Kisanuki, Y. Y. *et al.* Tie2-Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo. *Developmental biology* **230**, 230–42 (2001).
99. Constien, R. *et al.* Characterization of a novel EGFP reporter mouse to monitor Cre recombination as demonstrated by a Tie2 Cre mouse line. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* **30**, 36–44 (2001).
100. Probst, H. C. *et al.* Histological analysis of CD11c-DTR/GFP mice after in vivo depletion of dendritic cells. *Clinical and experimental immunology* **141**, 398–404 (2005).

101. Meredith, M. M. *et al.* Expression of the zinc finger transcription factor zDC (Zbtb46, Btbd4) defines the classical dendritic cell lineage. *The Journal of experimental medicine* **209**, 1153–65 (2012).
102. Miyake, Y., Asano, K., Kaise, H. & Uemura, M. Critical role of macrophages in the marginal zone in the suppression of immune responses to apoptotic cell – associated antigens. **117**, (2007).
103. Jung, S. *et al.* In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* **17**, 211–20 (2002).
104. Bennett, C. L. & Clausen, B. E. DC ablation in mice: promises, pitfalls, and challenges. *Trends in immunology* **28**, 525–31 (2007).
105. Chieppa, M., Rescigno, M., Huang, A. Y. C. & Germain, R. N. Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement. *The Journal of experimental medicine* **203**, 2841–52 (2006).
106. Lindquist, R. L. *et al.* Visualizing dendritic cell networks in vivo. *Nature immunology* **5**, 1243–50 (2004).
107. Meredith, M. M. *et al.* Zinc finger transcription factor zDC is a negative regulator required to prevent activation of classical dendritic cells in the steady state. *The Journal of experimental medicine* **209**, 1583–93 (2012).
108. Iwai, Y. *et al.* An IFN-gamma-IL-18 signaling loop accelerates memory CD8+ T cell proliferation. *PloS one* **3**, e2404 (2008).
109. Mandaric, S. *et al.* IL-10 suppression of NK/DC crosstalk leads to poor priming of MCMV-specific CD4 T cells and prolonged MCMV persistence. *PLoS pathogens* **8**, e1002846 (2012).
110. Van Montfoort, N. *et al.* Antigen storage compartments in mature dendritic cells facilitate prolonged cytotoxic T lymphocyte cross-priming capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 6730–5 (2009).
111. Seiler, P. *et al.* Crucial role of marginal zone macrophages and marginal zone metallophil in the clearance of lymphocytic choriomeningitis virus infection. *European journal of immunology* **27**, 2626–33 (1997).
112. Wang, C. *et al.* Characterization of murine macrophages from bone marrow, spleen and peritoneum. *BMC immunology* **14**, 6 (2013).
113. Kurotaki, D. *et al.* CSF-1-dependent red pulp macrophages regulate CD4 T cell responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **186**, 2229–37 (2011).

114. Olazabal, I., Mittelbrunn, M., Del Hoyo, G., Alarcon, B. & Sanchez-Madrid, F. Activation Outcomes Induced in Naïve CD8 T-Cells by Macrophages Primed via “Phagocytic” and Nonphagocytic Pathways. *Molecular Biology of the Cell* **19**, 701–710 (2008).
115. Schurich, A. *et al.* Distinct kinetics and dynamics of cross-presentation in liver sinusoidal endothelial cells compared to dendritic cells. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **50**, 909–19 (2009).
116. Tacke, P. J. *et al.* Targeting DC-SIGN via its neck region leads to prolonged antigen residence in early endosomes, delayed lysosomal degradation, and cross-presentation. *Blood* **118**, 4111–9 (2011).
117. Chatterjee, B. *et al.* Internalization and endosomal degradation of receptor-bound antigens regulate the efficiency of cross presentation by human dendritic cells. *Blood* **120**, 2011–20 (2012).
118. Belizaire, R. & Unanue, E. R. Exogenous antigen enters the major histocompatibility complex (MHC) class I pathway via multiple endocytic compartments with distinct molecular and proteolytic requirements. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* (2009).
119. 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. *Journal of clinical investigation* **122**, 1615–1627 (2012).
120. Ahrens, S. *et al.* F-actin is an evolutionarily conserved damage-associated molecular pattern recognized by DNGR-1, a receptor for dead cells. *Immunity* **36**, 635–45 (2012).
121. 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).
122. Mebius, R. E. & Kraal, G. Structure and function of the spleen. *Nature reviews. Immunology* **5**, 606–16 (2005).
123. Bennett, S. R. M., Carbone, F. R. & Heath, W. R. Help for cytotoxic T-cell responses is mediated by CD40 signaling. *Nature* (1998).
124. Wall, E. & Fraser, D. Suppression of LPS-Induced TNF- α Production in Macrophages by cAMP Is Mediated by PKA-AKAP95-p105. *Science* (2009).
125. Summers deLuca, L. & Gommerman, J. L. Fine-tuning of dendritic cell biology by the TNF superfamily. *Nature reviews. Immunology* **12**, 339–51 (2012).

126. Ding, X. *et al.* TNF receptor 1 mediates dendritic cell maturation and CD8 T cell response through two distinct mechanisms. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **187**, 1184–91 (2011).
127. Van Lieshout, a W. T. *et al.* Inhibition of TNF alpha during maturation of dendritic cells results in the development of semi-mature cells: a potential mechanism for the beneficial effects of TNF alpha blockade in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* **64**, 408–14 (2005).
128. Thaiss, C. A., Semmling, V., Franken, L., Wagner, H. & Kurts, C. Chemokines: A New Dendritic Cell Signal for T Cell Activation. *Frontiers in Immunology* **2**, 1–9 (2011).
129. Montoya, M. Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation. *Blood* **99**, 3263–3271 (2002).
130. Gray, R. C., Kuchtey, J. & Harding, C. V CpG-B ODNs potently induce low levels of IFN- α and induce IFN- α -dependent MHC-I cross-presentation in DCs as effectively as CpG-A and CpG-C ODNs. *Journal of leukocyte biology* **81**, 1075–85 (2007).
131. Waibler, Z. *et al.* Excessive CpG 1668 stimulation triggers IL-10 production by cDC that inhibits IFN- α responses by pDC. *European journal of immunology* **38**, 3127–37 (2008).
132. Lu, Y.-C., Yeh, W.-C. & Ohashi, P. S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* **42**, 145–51 (2008).
133. Goodridge, H. S., Harnett, W., Liew, F. Y. & Harnett, M. M. Differential regulation of interleukin-12 p40 and p35 induction via Erk mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent mechanisms and the implications for bioactive IL-12 and IL-23 responses. *Immunology* **109**, 415–25 (2003).
134. Farrand, K. J. *et al.* Langerin⁺ CD8 α ⁺ dendritic cells are critical for cross-priming and IL-12 production in response to systemic antigens. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **183**, 7732–42 (2009).
135. Carbone, F. R., Belz, G. T. & Heath, W. R. Transfer of antigen between migrating and lymph node-resident DCs in peripheral T-cell tolerance and immunity. *Trends in immunology* **25**, 655–8 (2004).
136. 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).
137. Allenspach, E. J., Lemos, M. P., Porrett, P. M., Turka, L. a & Laufer, T. M. Migratory and lymphoid-resident dendritic cells cooperate to efficiently prime naive CD4 T cells. *Immunity* **29**, 795–806 (2008).

138. Mazurek, J., Ignatowicz, L., Källenius, G., Jansson, M. & Pawlowski, A. Mycobacteria-infected bystander macrophages trigger maturation of dendritic cells and enhance their ability to mediate HIV transinfection. *European journal of immunology* **42**, 1192–202 (2012).
139. Brandes, M. *et al.* Cross-presenting human gamma delta T cells induce robust CD8 T cell responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2009).

6. Anhang

6.1 Sequenzierungen

6.1.1 pCMV-GFP2A-MR: GFP2A-Fragment

pCMV-GFP2A-MR Final1 GFP2A 251109

		Section 109			
	(3997)	3997	4010	4020	4033
pCMV-GFP-MR Seq 251109 GFP2A-Front	(1)	-----			
pCMV-GFP2A-MR (3997)		AAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTGT			
Consensus (3997)		-----			
		Section 110			
	(4034)	4034	4040	4050	4070
pCMV-GFP-MR Seq 251109 GFP2A-Front	(1)	-----			
pCMV-GFP2A-MR (4034)		TGGCACCAAAATCAACGGGACTTCCAAAATGTCGTA			
Consensus (4034)		-----			
		Section 111			
	(4071)	4071	4080	4090	4107
pCMV-GFP-MR Seq 251109 GFP2A-Front	(1)	-----			
pCMV-GFP2A-MR (4071)		ACAACCTCCGCCCATGACGCAAAATGGGCGGTAGGCG			
Consensus (4071)		-----			
		Section 112			
	(4108)	4108	4120	4130	4144
pCMV-GFP-MR Seq 251109 GFP2A-Front	(1)	-----			
pCMV-GFP2A-MR (4108)		TGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTA			
Consensus (4108)		-----			
		Section 113			
	(4145)	4145	4150	4160	4181
pCMV-GFP-MR Seq 251109 GFP2A-Front	(1)	-----			
pCMV-GFP2A-MR (4145)		GTGAACCGTCAGATCCGCTAGCGATTACGCCAAGCTC			
Consensus (4145)		-----			
		Section 114			
	(4182)	4182	4190	4200	4218
pCMV-GFP-MR Seq 251109 GFP2A-Front	(1)	-----			
pCMV-GFP2A-MR (4182)		GAAATTAACCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGC			
Consensus (4182)		-----			
		Section 115			
	(4219)	4219	4230	4240	4255
pCMV-GFP-MR Seq 251109 GFP2A-Front	(1)	-----			
pCMV-GFP2A-MR (4219)		TCCACCGCGGGGCGCGCCACCA TGGTGAGCA A GGGCG			
Consensus (4219)		TGGTGAGCA GGGCG			
		Section 116			
	(4256)	4256	4270	4280	4292
pCMV-GFP-MR Seq 251109 GFP2A-Front	(15)	AGGAGCTGTTTACCCGGGTGGTGCCCATCC NNCN TCG			
pCMV-GFP2A-MR (4256)		AGGAGCTGTTTACCCGGGTGGTGCCCATCC TG-G TCG			
Consensus (4256)		AGGAGCTGTTTACCCGGGTGGTGCCCATCC TCG			
		Section 117			
	(4293)	4293	4300	4310	4329
pCMV-GFP-MR Seq 251109 GFP2A-Front	(52)	AGCTGGACGGCGACGTAACGGCCACAAGTTCAGCGT			
pCMV-GFP2A-MR (4292)		AGCTGGACGGCGACGTAACGGCCACAAGTTCAGCGT			
Consensus (4293)		AGCTGGACGGCGACGTAACGGCCACAAGTTCAGCGT			

pCMV-GFP2A-MR Final1 GFP2A 251109

					Section 127
	(4663)	4663	4670	4680	4699
pCMV-GFP-MR Seq 251109 GFP2A-Front	(422)	GCTGGAGTACAAC TACAACAGCCACAACGTCTATATC			
pCMV-GFP2A-MR	(4662)	GCTGGAGTACAAC TACAACAGCCACAACGTCTATATC			
Consensus	(4663)	GCTGGAGTACAAC TACAACAGCCACAACGTCTATATC			
					Section 128
	(4700)	4700	4710	4720	4736
pCMV-GFP-MR Seq 251109 GFP2A-Front	(459)	ATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACT			
pCMV-GFP2A-MR	(4699)	ATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACT			
Consensus	(4700)	ATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACT			
					Section 129
	(4737)	4737	4750	4760	4773
pCMV-GFP-MR Seq 251109 GFP2A-Front	(496)	TCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCA			
pCMV-GFP2A-MR	(4736)	TCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCA			
Consensus	(4737)	TCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCA			
					Section 130
	(4774)	4774	4780	4790	4800
pCMV-GFP-MR Seq 251109 GFP2A-Front	(533)	GCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACAACCCCATCGGC			
pCMV-GFP2A-MR	(4773)	GCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACAACCCCATCGGC			
Consensus	(4774)	GCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACAACCCCATCGGC			
					Section 131
	(4811)	4811	4820	4830	4847
pCMV-GFP-MR Seq 251109 GFP2A-Front	(570)	GACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACACTACCTGA			
pCMV-GFP2A-MR	(4810)	GACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACACTACCTGA			
Consensus	(4811)	GACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACACTACCTGA			
					Section 132
	(4848)	4848	4860	4870	4884
pCMV-GFP-MR Seq 251109 GFP2A-Front	(607)	GCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAA			
pCMV-GFP2A-MR	(4847)	GCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAA			
Consensus	(4848)	GCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAA			
					Section 133
	(4885)	4885	4890	4900	4910
pCMV-GFP-MR Seq 251109 GFP2A-Front	(644)	GCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCC			
pCMV-GFP2A-MR	(4884)	GCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCC			
Consensus	(4885)	GCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCC			
					Section 134
	(4922)	4922	4930	4940	4958
pCMV-GFP-MR Seq 251109 GFP2A-Front	(681)	GCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGG			
pCMV-GFP2A-MR	(4921)	GCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGG			
Consensus	(4922)	GCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGG			
					Section 135
	(4959)	4959	4970	4980	4995
pCMV-GFP-MR Seq 251109 GFP2A-Front	(718)	GTTCCGGAGCCACGAACTTCTCTGTAAAGCAAGC			
pCMV-GFP2A-MR	(4958)	GTTCCGGAGCCACGAACTTCTCTGTAAAGCAAGC			
Consensus	(4959)	GTTCCGGAGCCACGAACTTCTCTGTAAAGCAAGC			

pCMV-GFP2A-MR Final1 GFP2A 251109

		Section 136				
	(4996)	4996	5010	5020	5032	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 GFP2A-Front	(755)	AGGAGACGTGGAAGAAAACCCCGGTCCCATGAGGCTT				
pCMV-GFP2A-MR	(4995)	AGGAGACGTGGAAGAAAACCCCGGTCCCATGAGGCTT				
Consensus	(4996)	AGGAGACGTGGAAGAAAACCCCGGTCCCATGAGGCTT				
		Section 137				
	(5033)	5033	5040	5050	5069	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 GFP2A-Front	(792)	CTCCTGCTTCTGGCTTTTATCTCTGTTCATCCCTGTCT				
pCMV-GFP2A-MR	(5032)	CTCCTGCTTCTGGCTTTTATCTCTGTTCATCCCTGTCT				
Consensus	(5033)	CTCCTGCTTCTGGCTTTTATCTCTGTTCATCCCTGTCT				
		Section 138				
	(5070)	5070	5080	5090	5106	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 GFP2A-Front	(829)	CTGTTTCAGCTATTGGACGCGAGGCAATTTTAAATCTA				
pCMV-GFP2A-MR	(5069)	CTGTTTCAGCTATTGGACGCGAGGCAATTTTAAATCTA				
Consensus	(5070)	CTGTTTCAGCTATTGGACGCGAGGCAATTTTAAATCTA				
		Section 139				
	(5107)	5107	5120	5130	5143	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 GFP2A-Front	(866)	CAACGAAGATCACAAACGCTGCGTGGACGCTCTAAGT				
pCMV-GFP2A-MR	(5106)	TAAATGAAGATCACAAACGCTGCGTGGACGCTCTAAGT				
Consensus	(5107)	AA GAAGATCACAA CG TCGTGGACGCTCTAAGT				
		Section 140				
	(5144)	5144	5150	5160	5170	5180
pCMV-GFP-MR Seq 251109 GFP2A-Front	(903)	GCCATCTCAGTTCAGACGGCAACTTGCAACCCGGGAAG				
pCMV-GFP2A-MR	(5143)	GCCATCTCAGTTCAGACGGCAACTTGCAACCCGGGAAG				
Consensus	(5144)	GCCATCTCAGTTCAGACGGCAACTTGCAACCCGGGAAG				
		Section 141				
	(5181)	5181	5190	5200	5217	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 GFP2A-Front	(940)	CTGAATCCCAGAAATCCCGTGGGTGTCAGATTCTCA				
pCMV-GFP2A-MR	(5180)	CTGAATCCCAGAAATCCCGTGGGTGTCAGATTCTCA				
Consensus	(5181)	CTGAATCCCAGAAATCCCGTGGGTGTCAGATTCTCA				
		Section 142				
	(5218)	5218	5230	5240	5254	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 GFP2A-Front	(977)	GATCATGAGTGTGCTTTCAAATTATGTTGGGAGTG				
pCMV-GFP2A-MR	(5217)	GATCATGAGTGTGCTTTCAAATTATGTTGGGAGTG				
Consensus	(5218)	GATCATGAGTGTGCTTTCAAATTATGTTGGGAGTG				
		Section 143				
	(5255)	5255	5260	5270	5280	5291
pCMV-GFP-MR Seq 251109 GFP2A-Front	(1014)	CCATCAAAAAC TGACTGGGCTTCCGTCACCCTGTATG				
pCMV-GFP2A-MR	(5254)	CCATCAAAAAC TGACTGGGCTTCCGTCACCCTGTATG				
Consensus	(5255)	CCATCAAAAAC TGACTGGGCTTCCGTCACCCTGTATG				
		Section 144				
	(5292)	5292	5300	5310	5328	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 GFP2A-Front	(1051)	CCTGTGATTTCGAAAAGTGAATATCAGAAATGGNNA GT				
pCMV-GFP2A-MR	(5291)	CCTGTGATTTCGAAAAGTGAATATCAGAAATGGGA -GT				
Consensus	(5292)	CCTGTGATTTCGAAAAGTGAATATCAGAAATGG GT				

pCMV-GFP2A-MR Final1 GFP2A 251109

					Section 145
	(5329)	<u>5329</u>	<u>5340</u>	<u>5350</u>	<u>5365</u>
pCMV-GFP-MR Seq 251109 GFP2A-Front	(1088)	<u>GTAA</u>	-----		
pCMV-GFP2A-MR	(5327)	<u>GTAA</u>	GAATGACACACTCTTTGGAATCAAGGGCACAGA		
Consensus	(5329)	GTAA			
					Section 146
	(5366)	<u>5366</u>	<u>5380</u>	<u>5390</u>	<u>5402</u>
pCMV-GFP-MR Seq 251109 GFP2A-Front	(1092)	-----			
pCMV-GFP2A-MR	(5364)	GTTATATTTTAAATTATGGCAACAGACAAGAGAAGAAT			
Consensus	(5366)				
					Section 147
	(5403)	<u>5403</u>	<u>5410</u>	<u>5420</u>	<u>5439</u>
pCMV-GFP-MR Seq 251109 GFP2A-Front	(1092)	-----			
pCMV-GFP2A-MR	(5401)	ATCAAGCTTTTACAAAGGTTCCGGATTGTGGAGCAGAT			
Consensus	(5403)				
					Section 148
	(5440)	<u>5440</u>	<u>5450</u>	<u>5460</u>	<u>5476</u>
pCMV-GFP-MR Seq 251109 GFP2A-Front	(1092)	-----			
pCMV-GFP2A-MR	(5438)	GGAAGGTCTATGGAACCACGGATGACCTGTGCTCGAG			
Consensus	(5440)				
					Section 149
	(5477)	<u>5477</u>	<u>5490</u>	<u>5500</u>	<u>5513</u>
pCMV-GFP-MR Seq 251109 GFP2A-Front	(1092)	-----			
pCMV-GFP2A-MR	(5475)	AGGATATGAAGCCATGTACTCCTTACTGGGCAATGCA			
Consensus	(5477)				
					Section 150
	(5514)	<u>5514</u>	<u>5520</u>	<u>5530</u>	<u>5540</u>
pCMV-GFP-MR Seq 251109 GFP2A-Front	(1092)	-----			
pCMV-GFP2A-MR	(5512)	AATGGAGCCGTCGTGCATTTCCATTCAAGTTTGAAA			
Consensus	(5514)				
					Section 151
	(5551)	<u>5551</u>	<u>5560</u>	<u>5570</u>	<u>5587</u>
pCMV-GFP-MR Seq 251109 GFP2A-Front	(1092)	-----			
pCMV-GFP2A-MR	(5549)	ACAAGTGGTATGCAGACTGCACCTCTGCCGGGCGCTC			
Consensus	(5551)				
					Section 152
	(5588)	<u>5588</u>	<u>5600</u>	<u>5610</u>	<u>5624</u>
pCMV-GFP-MR Seq 251109 GFP2A-Front	(1092)	-----			
pCMV-GFP2A-MR	(5586)	GGACGGATGGCTCTGGTGTGGAACCACCACACTGACTAC			
Consensus	(5588)				
					Section 153
	(5625)	<u>5625</u>	<u>5630</u>	<u>5640</u>	<u>5650</u>
pCMV-GFP-MR Seq 251109 GFP2A-Front	(1092)	-----			
pCMV-GFP2A-MR	(5623)	GACAAAGACAAGCTGTTTGGATTTTGTCCATTGCACT			
Consensus	(5625)				

6.1.2 pCMV-GFP2A-MR: MR1-Fragment

pCMV-GFP2A-MR Final1 Fragment 1 251109

				Section 121		
	(4681)	4681	4690	4700	4719	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Front	(1)	-----	-----	-----	-----	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Rear	(1)	-----	-----	-----	-----	
pCMV-GFP2A-MR (4681)		AGCCACAACGTCATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAC				
Consensus (4681)						
				Section 122		
	(4720)	4720	4730	4740	4758	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Front	(1)	-----	-----	-----	-----	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Rear	(1)	-----	-----	-----	-----	
pCMV-GFP2A-MR (4720)		GGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAG				
Consensus (4720)						
				Section 123		
	(4759)	4759	4770	4780	4797	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Front	(1)	-----	-----	-----	-----	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Rear	(1)	-----	-----	-----	-----	
pCMV-GFP2A-MR (4759)		GACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAAC				
Consensus (4759)						
				Section 124		
	(4798)	4798	4810	4820	4836	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Front	(1)	-----	-----	-----	-----	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Rear	(1)	-----	-----	-----	-----	
pCMV-GFP2A-MR (4798)		ACCCCATCGGCGACGGCCCGTCTGCTGCCGACAAC				
Consensus (4798)						
				Section 125		
	(4837)	4837	4850	4860	4875	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Front	(1)	-----	-----	-----	-----	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Rear	(1)	-----	-----	-----	-----	
pCMV-GFP2A-MR (4837)		CACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCC				
Consensus (4837)						
				Section 126		
	(4876)	4876	4890	4900	4914	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Front	(1)	-----	-----	-----	-----	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Rear	(1)	-----	-----	-----	-----	
pCMV-GFP2A-MR (4876)		AACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTG				
Consensus (4876)						
				Section 127		
	(4915)	4915	4920	4930	4940	4953
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Front	(1)	-----	-----	-----	-----	GGACGAGCTGTNC
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Rear	(1)	-----	-----	-----	-----	-----
pCMV-GFP2A-MR (4915)		ACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTAC				
Consensus (4915)						
				Section 128		
	(4954)	4954	4960	4970	4980	4992
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Front	(14)	NAGGGTTCCGGAGCCACGAACCTCTCTGTAAAGCAA				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Rear	(1)	-----	-----	-----	-----	-----
pCMV-GFP2A-MR (4954)		AAGGGTTCCGGAGCCACGAACCTCTCTGTAAAGCAA				
Consensus (4954)		AGGGTTCCGGAGCCACGAACCTCTCTGTAAAGCAA				

pCMV-GFP2A-MR Final1 Fragment 1 251109

					Section 129	
	(4993)	4993	5000	5010	5020	5031
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Front	(53)	ECAGGAGACGTGGAAGAAAACCCCGGTCCCATGAGGCTT				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Rear	(1)	-----				
pCMV-GFP2A-MR	(4993)	ECAGGAGACGTGGAAGAAAACCCCGGTCCCATGAGGCTT				
Consensus	(4993)	GCAGGAGACGTGGAAGAAAACCCCGGTCCCATGAGGCTT				
						Section 130
	(5032)	5032	5040	5050	5060	5070
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Front	(92)	CTCCTGCTTCTGGCTTTTATCTCTGTCATCCCTGTCTCT				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Rear	(1)	-----				
pCMV-GFP2A-MR	(5032)	CTCCTGCTTCTGGCTTTTATCTCTGTCATCCCTGTCTCT				
Consensus	(5032)	CTCCTGCTTCTGGCTTTTATCTCTGTCATCCCTGTCTCT				
						Section 131
	(5071)	5071	5080	5090		5109
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Front	(131)	ETTTCAGCTATTGGACGCGAGGCCAATTTTTAATCTAAC				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Rear	(1)	-----				
pCMV-GFP2A-MR	(5071)	ETTTCAGCTATTGGACGCGAGGCCAATTTTTAATCTAATA				
Consensus	(5071)	GTTTCAGCTATTGGACGCGAGGCCAATTTTTAATCTA AA				
						Section 132
	(5110)	5110	5120	5130		5148
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Front	(170)	GAAGATCACAAACGTTGGCGTGGACGCTCTAAGTGCCATC				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Rear	(1)	-----				
pCMV-GFP2A-MR	(5110)	GAAGATCACAAACGTTGGCGTGGACGCTCTAAGTGCCATC				
Consensus	(5110)	GAAGATCACAAACGTTGGCGTGGACGCTCTAAGTGCCATC				
						Section 133
	(5149)	5149	5160	5170		5187
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Front	(209)	TCAGTTTCAGACGGCAACTTGCAACCCGGAAGCTGAATCC				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Rear	(1)	-----				
pCMV-GFP2A-MR	(5149)	TCAGTTTCAGACGGCAACTTGCAACCCGGAAGCTGAATCC				
Consensus	(5149)	TCAGTTTCAGACGGCAACTTGCAACCCGGAAGCTGAATCC				
						Section 134
	(5188)	5188	5200	5210		5226
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Front	(248)	CAGAAATTCGCTGGGTGTCAGATTCTCAGATCATGAGT				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Rear	(1)	-----				
pCMV-GFP2A-MR	(5188)	CAGAAATTCGCTGGGTGTCAGATTCTCAGATCATGAGT				
Consensus	(5188)	CAGAAATTCGCTGGGTGTCAGATTCTCAGATCATGAGT				
						Section 135
	(5227)	5227	5240	5250		5265
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Front	(287)	ETTGCSTTTCAAATTATGTTGGGAGTGCCATCAAAAAC				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Rear	(1)	-----GGGAGTGCCATCAAAAAC				
pCMV-GFP2A-MR	(5227)	ETTGCSTTTCAAATTATGTTGGGAGTGCCATCAAAAAC				
Consensus	(5227)	GTTGCSTTTCAAATTATGTTGGGAGTGCCATCAAAAAC				
						Section 136
	(5266)	5266	5280	5290		5304
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Front	(326)	GACTGGGCTTCCGTACCCCTGTATGCCTGTGATTCGAAA				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Rear	(20)	GACTGGGCTTCCGTACCCCTGTATGCCTGTGATTCGAAA				
pCMV-GFP2A-MR	(5266)	GACTGGGCTTCCGTACCCCTGTATGCCTGTGATTCGAAA				
Consensus	(5266)	GACTGGGCTTCCGTACCCCTGTATGCCTGTGATTCGAAA				

pCMV-GFP2A-MR Final1 Fragment 1 251109

				Section 137		
	(5305)	5305	5310	5320	5330	5343
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Front	(365)	AGTGAATATCAGAAATGGGAGTGTAAAGAATGACACACTC				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Rear	(59)	AGTGAATATCAGAAATGGGAGTGTAAAGAATGACACACTC				
pCMV-GFP2A-MR	(5305)	AGTGAATATCAGAAATGGGAGTGTAAAGAATGACACACTC				
Consensus	(5305)	AGTGAATATCAGAAATGGGAGTGTAAAGAATGACACACTC				
						Section 138
	(5344)	5344	5350	5360	5370	5382
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Front	(404)	TTTGGAAATCAAGGGCACAGAGTTATATTTTAAATTATGGC				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Rear	(98)	TTTGGAAATCAAGGGCACAGAGTTATATTTTAAATTATGGC				
pCMV-GFP2A-MR	(5344)	TTTGGAAATCAAGGGCACAGAGTTATATTTTAAATTATGGC				
Consensus	(5344)	TTTGGAAATCAAGGGCACAGAGTTATATTTTAAATTATGGC				
						Section 139
	(5383)	5383	5390	5400	5410	5421
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Front	(443)	AACAGACAAGAGAAGAATATCAAGCTTTACAAAGGTTCCG				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Rear	(137)	AACAGACAAGAGAAGAATATCAAGCTTTACAAAGGTTCCG				
pCMV-GFP2A-MR	(5383)	AACAGACAAGAGAAGAATATCAAGCTTTACAAAGGTTCCG				
Consensus	(5383)	AACAGACAAGAGAAGAATATCAAGCTTTACAAAGGTTCCG				
						Section 140
	(5422)	5422	5430	5440	5450	5460
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Front	(482)	GGATTGTGGAGCAGATGGAAGGTCTATGGAACACGGAT				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Rear	(176)	GGATTGTGGAGCAGATGGAAGGTCTATGGAACACGGAT				
pCMV-GFP2A-MR	(5422)	GGATTGTGGAGCAGATGGAAGGTCTATGGAACACGGAT				
Consensus	(5422)	GGATTGTGGAGCAGATGGAAGGTCTATGGAACACGGAT				
						Section 141
	(5461)	5461	5470	5480		5499
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Front	(521)	GACCTGTGCTCGAGAGGATATGAAGCCATGTACTCCTTA				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Rear	(215)	GACCTGTGCTCGAGAGGATATGAAGCCATGTACTCCTTA				
pCMV-GFP2A-MR	(5461)	GACCTGTGCTCGAGAGGATATGAAGCCATGTACTCCTTA				
Consensus	(5461)	GACCTGTGCTCGAGAGGATATGAAGCCATGTACTCCTTA				
						Section 142
	(5500)	5500	5510	5520		5538
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Front	(560)	CTGGGCAATGCAAATGGAGCCGCTGTGCATTTCCATT				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Rear	(254)	CTGGGCAATGCAAATGGAGCCGCTGTGCATTTCCATT				
pCMV-GFP2A-MR	(5500)	CTGGGCAATGCAAATGGAGCCGCTGTGCATTTCCATT				
Consensus	(5500)	CTGGGCAATGCAAATGGAGCCGCTGTGCATTTCCATT				
						Section 143
	(5539)	5539	5550	5560		5577
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Front	(599)	AAGTTTGAAAACAAGTGGTATGCAGACTGCACCTCTGCC				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Rear	(293)	AAGTTTGAAAACAAGTGGTATGCAGACTGCACCTCTGCC				
pCMV-GFP2A-MR	(5539)	AAGTTTGAAAACAAGTGGTATGCAGACTGCACCTCTGCC				
Consensus	(5539)	AAGTTTGAAAACAAGTGGTATGCAGACTGCACCTCTGCC				
						Section 144
	(5578)	5578	5590	5600		5616
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Front	(638)	GGGCGCTCGGACGGATGGCTCTGGTGTGGAACCACT				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Rear	(332)	GGGCGCTCGGACGGATGGCTCTGGTGTGGAACCACT				
pCMV-GFP2A-MR	(5578)	GGGCGCTCGGACGGATGGCTCTGGTGTGGAACCACT				
Consensus	(5578)	GGGCGCTCGGACGGATGGCTCTGGTGTGGAACCACT				

pCMV-GFP2A-MR Final1 Fragment 1 251109

		Section 145				
	(5617)	5617	5630	5640	5655	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Front	(677)	GACTACGACAAAGACAAGCTGTTTGGATTTTGTCCATTG				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Rear	(371)	GACTACGACAAAGACAAGCTGTTTGGATTTTGTCCATTG				
pCMV-GFP2A-MR	(5617)	GACTACGACAAAGACAAGCTGTTTGGATTTTGTCCATTG				
Consensus	(5617)	GACTACGACAAAGACAAGCTGTTTGGATTTTGTCCATTG				
		Section 146				
	(5656)	5656	5670	5680	5694	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Front	(716)	CACTTTGAGGGAAGCGAGAGATTATGGAACAAAGATCCA				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Rear	(410)	CACTTTGAGGGAAGCGAGAGATTATGGAACAAAGATCCA				
pCMV-GFP2A-MR	(5656)	CACTTTGAGGGAAGCGAGAGATTATGGAACAAAGATCCA				
Consensus	(5656)	CACTTTGAGGGAAGCGAGAGATTATGGAACAAAGATCCA				
		Section 147				
	(5695)	5695	5700	5710	5733	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Front	(755)	CTGACTGGCATTCTTTACCAGATAAACTCCAAGTCTGCT				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Rear	(449)	CTGACTGGCATTCTTTACCAGATAAACTCCAAGTCTGCT				
pCMV-GFP2A-MR	(5695)	CTGACTGGCATTCTTTACCAGATAAACTCCAAGTCTGCT				
Consensus	(5695)	CTGACTGGCATTCTTTACCAGATAAACTCCAAGTCTGCT				
		Section 148				
	(5734)	5734	5740	5750	5760	5772
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Front	(794)	TTAACCTGGCATCAGGCAAGGGCAAGCTGCAAGCAGCAG				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Rear	(488)	TTAACCTGGCATCAGGCAAGGGCAAGCTGCAAGCAGCAG				
pCMV-GFP2A-MR	(5734)	TTAACCTGGCATCAGGCAAGGGCAAGCTGCAAGCAGCAG				
Consensus	(5734)	TTAACCTGGCATCAGGCAAGGGCAAGCTGCAAGCAGCAG				
		Section 149				
	(5773)	5773	5780	5790	5800	5811
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Front	(833)	AATGCTGACCTCCTGAGTGTACGGAGATCCACGAGCAA				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Rear	(527)	AATGCTGACCTCCTGAGTGTACGGAGATCCACGAGCAA				
pCMV-GFP2A-MR	(5773)	AATGCTGACCTCCTGAGTGTACGGAGATCCACGAGCAA				
Consensus	(5773)	AATGCTGACCTCCTGAGTGTACGGAGATCCACGAGCAA				
		Section 150				
	(5812)	5812	5820	5830	5840	5850
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Front	(872)	ATGTACCTCACAGGATTAACCAGTTCCTTGAGCTCGGGA				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Rear	(566)	ATGTACCTCACAGGATTAACCAGTTCCTTGAGCTCGGGA				
pCMV-GFP2A-MR	(5812)	ATGTACCTCACAGGATTAACCAGTTCCTTGAGCTCGGGA				
Consensus	(5812)	ATGTACCTCACAGGATTAACCAGTTCCTTGAGCTCGGGA				
		Section 151				
	(5851)	5851	5860	5870	5889	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Front	(911)	CTCTGGATTGGACTCAACAGTCTGAGTGTACGCAGTGGT				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Rear	(605)	CTCTGGATTGGACTCAACAGTCTGAGTGTACGCAGTGGT				
pCMV-GFP2A-MR	(5851)	CTCTGGATTGGACTCAACAGTCTGAGTGTACGCAGTGGT				
Consensus	(5851)	CTCTGGATTGGACTCAACAGTCTGAGTGTACGCAGTGGT				
		Section 152				
	(5890)	5890	5900	5910	5928	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Front	(950)	TGGCAGTGGGCTGGANNAGCCCATTCGGGTATCTGAAC				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Rear	(644)	TGGCAGTGGGCTGGAGAGCCCATTCGGGTATCTGAAC				
pCMV-GFP2A-MR	(5890)	TGGCAGTGGGCTGGAGAGCCCATTCGGGTATCTGAAC				
Consensus	(5890)	TGGCAGTGGGCTGGAGGGAAGCCCATTCGGGTATCTGAAC				

pCMV-GFP2A-MR Final1 Fragment 1 251109

		Section 153				
	(5929)	5929	5940	5950	5967	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Front	(989)	TGGCTACCAGGAAGTCCATCATCAGAGCCTGGAAAGAGC				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Rear	(683)	TGGCTACCAGGAAGTCCATCATCAGAGCCTGGAAAGAGC				
pCMV-GFP2A-MR	(5929)	TGGCTACCAGGAAGTCCATCATCAGAGCCTGGAAAGAGC				
Consensus	(5929)	TGGCTACCAGGAAGTCCATCATCAGAGCCTGGAAAGAGC				
		Section 154				
	(5968)	5968	5980	5990	6006	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Front	(1028)	TGTGTGTCACTAAACCCTGGAAAAAATGCCAAGTGGGAA				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Rear	(722)	TGTGTGTCACTAAACCCTGGAAAAAATGCCAAGTGGGAA				
pCMV-GFP2A-MR	(5968)	TGTGTGTCACTAAACCCTGGAAAAAATGCCAAGTGGGAA				
Consensus	(5968)	TGTGTGTCACTAAACCCTGGAAAAAATGCCAAGTGGGAA				
		Section 155				
	(6007)	6007	6020	6030	6045	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Front	(1067)	AATCTGGAATGTGTTCA NAAGCTTGGCTANN TTTGTAAA				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Rear	(761)	AATCTGGAATGTGTTCA GAAGCTTGGCTACA TTTGTAAA				
pCMV-GFP2A-MR	(6007)	AATCTGGAATGTGTTCA GAAGCTTGGCTACA TTTGTAAA				
Consensus	(6007)	AATCTGGAATGTGTTCAGAAGCTTGGCTACATTTGTAAA				
		Section 156				
	(6046)	6046	6060	6070	6084	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Front	(1106)	AAGGGAAACAATAACCTTGAACCATTATCATTCCCTC -				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Rear	(800)	AAGGGAAACAATAACCTTGNNNC NNNNNNTCATTCCCTCA				
pCMV-GFP2A-MR	(6046)	AAGGGAAACAATAACCTTGAACCATTATCATTCCCTCA				
Consensus	(6046)	AAGGGAAACAATAACCTTGAACCCATTTATCATTCCCTCA				
		Section 157				
	(6085)	6085	6090	6100	6110	6123
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Front	(1144)	-----				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Rear	(839)	GCAAGCGATGTGCCTACCGGCTGCCCTAATCAGTG----				
pCMV-GFP2A-MR	(6085)	GCAAGCGATGTGCCTACCGGCTGCCCTAATCAGTGGTGG				
Consensus	(6085)	GCAAGCGATGTGCCTACCGGCTGCCCTAATCAGTG				
		Section 158				
	(6124)	6124	6130	6140	6150	6162
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Front	(1144)	-----				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Rear	(874)	-----				
pCMV-GFP2A-MR	(6124)	CCCTATGCAGGCCACTGCTACAGGATCCATAGGGAAGAG				
Consensus	(6124)	-----				
		Section 159				
	(6163)	6163	6170	6180	6190	6201
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Front	(1144)	-----				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Rear	(874)	-----				
pCMV-GFP2A-MR	(6163)	AAGAAGATCCAGAAATATGCTTTGCAAGCTTGTAGGAAG				
Consensus	(6163)	-----				
		Section 160				
	(6202)	6202	6210	6220	6230	6240
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Front	(1144)	-----				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR1-Rear	(874)	-----				
pCMV-GFP2A-MR	(6202)	GAGGGTGGGGACCTGGCAAGTATCCACAGCATTGAGGAG				
Consensus	(6202)	-----				

6.1.3 pCMV-GFP2A-MR: MR2-Fragment

pCMV-GFP2A-MR Final1 Fragment 2 251109

				Section 153		
	(5929)	5929	5940	5950	5967	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Front	(1)	-----				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Rear	(1)	-----				
pCMV-GFP2A-MR (5929)		TGGCTACCAGGAAGTCCATCATCAGAGCCTGGAAAGAGC				
Consensus (5929)		-----				
				Section 154		
	(5968)	5968	5980	5990	6006	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Front	(1)	-----				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Rear	(1)	-----				
pCMV-GFP2A-MR (5968)		TGTGTGTCACTAAACCCTGGAAAAATGCCAAGTGGGAA				
Consensus (5968)		-----				
				Section 155		
	(6007)	6007	6020	6030	6045	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Front	(1)	-----				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Rear	(1)	-----				
pCMV-GFP2A-MR (6007)		AATCTGGAATGTGTTTCAGAAGCTTGGCTACATTTGTAA				
Consensus (6007)		-----				
				Section 156		
	(6046)	6046	6060	6070	6084	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Front	(1)	-----				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Rear	(1)	-----				
pCMV-GFP2A-MR (6046)		AAGGGAAACAATACCTTGAACCCATTTATCATTC CCTCA				
Consensus (6046)		ATACCTTGAACCCATTTATCATTC CCTCA				
				Section 157		
	(6085)	6085	6090	6100	6110	6123
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Front	(30)	-----				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Rear	(1)	-----				
pCMV-GFP2A-MR (6085)		GCAAGCGATGTGCCTACCGGCTGCCCTAA TCAGTGGTGG				
Consensus (6085)		GCAAGCGATGTGCCTACCGGCTGCC TCAGTGGTGG				
				Section 158		
	(6124)	6124	6130	6140	6150	6162
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Front	(69)	-----				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Rear	(1)	-----				
pCMV-GFP2A-MR (6124)		CCCTATGCAGGCCACTGCTACAGGATCCATAGGGAAGAG				
Consensus (6124)		CCCTATGCAGGCCACTGCTACAGGATCCATAGGGAAGAG				
				Section 159		
	(6163)	6163	6170	6180	6190	6201
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Front	(108)	-----				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Rear	(1)	-----				
pCMV-GFP2A-MR (6163)		AAGAAGATCCAGAAATATGCTTTGCAAGCTTGTAGGAAG				
Consensus (6163)		AAGAAGATCCAGAAATATGCTTTGCAAGCTTGTAGGAAG				
				Section 160		
	(6202)	6202	6210	6220	6230	6240
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Front	(147)	-----				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Rear	(1)	-----				
pCMV-GFP2A-MR (6202)		GAGGGTGGGGACCTGGCAAGTATCCACAGCATTGAGGAG				
Consensus (6202)		GAGGGTGGGGACCTGGCAAGTATCCACAGCATTGAGGAG				

pCMV-GFP2A-MR Final1 Fragment 2 251109

				Section 169		
	(6553)	6553	6560	6570	6580	6591
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Front	(498)	CATGGGTTTTA	CTGCTACTTGATTGGATCCACTC	TATGC		
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Rear	(1)	-----	CTGCTACTTGATTGGATCCACTC	NATCN		
pCMV-GFP2A-MR	(6553)	CATGGGTTTTA	CTGCTACTTGATTGGATCCACTC	TATGC		
Consensus	(6553)	CATGGGTTTTACTGCTACTTGATTGGATCCACTCTATCC				
				Section 170		
	(6592)	6592	6600	6610	6620	6630
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Front	(537)	ACCTTCACCTGATGCA	AACCAACACATGCACAAATGAAAAG			
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Rear	(29)	ACCTTCACCTGATGCANNNN	ACACATGCACAAATGAAAAG			
pCMV-GFP2A-MR	(6592)	ACCTTCACCTGATGCA	AACCAACACATGCACAAATGAAAAG			
Consensus	(6592)	ACCTTCACCTGATGCAAACCAACACATGCACAAATGAAAAG				
				Section 171		
	(6631)	6631	6640	6650	6669	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Front	(576)	GCTTATTTAACAACAGTTGAAGACAGATATGAACAAGCA				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Rear	(68)	GCTTATTTAACAACAGTTGAAGACAGATATGAACAAGCA				
pCMV-GFP2A-MR	(6631)	GCTTATTTAACAACAGTTGAAGACAGATATGAACAAGCA				
Consensus	(6631)	GCTTATTTAACAACAGTTGAAGACAGATATGAACAAGCA				
				Section 172		
	(6670)	6670	6680	6690	6708	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Front	(615)	TTCTGACTAGTTTGGTTGGATTGAGGCCTGAAAAATAT				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Rear	(107)	TTCTGACTAGTTTGGTTGGATTGAGGCCTGAAAAATAT				
pCMV-GFP2A-MR	(6670)	TTCTGACTAGTTTGGTTGGATTGAGGCCTGAAAAATAT				
Consensus	(6670)	TTCTGACTAGTTTGGTTGGATTGAGGCCTGAAAAATAT				
				Section 173		
	(6709)	6709	6720	6730	6747	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Front	(654)	TTTGGACAGGACTCTCAGATGTTCAAAACAAAGGGACG				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Rear	(146)	TTTGGACAGGACTCTCAGATGTTCAAAACAAAGGGACG				
pCMV-GFP2A-MR	(6709)	TTTGGACAGGACTCTCAGATGTTCAAAACAAAGGGACG				
Consensus	(6709)	TTTGGACAGGACTCTCAGATGTTCAAAACAAAGGGACG				
				Section 174		
	(6748)	6748	6760	6770	6786	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Front	(693)	TTTCGGTGGACTGTGGACGAGCAGGTGCAGTTTACACAC				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Rear	(185)	TTTCGGTGGACTGTGGACGAGCAGGTGCAGTTTACACAC				
pCMV-GFP2A-MR	(6748)	TTTCGGTGGACTGTGGACGAGCAGGTGCAGTTTACACAC				
Consensus	(6748)	TTTCGGTGGACTGTGGACGAGCAGGTGCAGTTTACACAC				
				Section 175		
	(6787)	6787	6800	6810	6825	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Front	(732)	TGGAATGCCGACATGCCAGGACGAAAGGCGGGATGTGTT				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Rear	(224)	TGGAATGCCGACATGCCAGGACGAAAGGCGGGATGTGTT				
pCMV-GFP2A-MR	(6787)	TGGAATGCCGACATGCCAGGACGAAAGGCGGGATGTGTT				
Consensus	(6787)	TGGAATGCCGACATGCCAGGACGAAAGGCGGGATGTGTT				
				Section 176		
	(6826)	6826	6840	6850	6864	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Front	(771)	GCCATGAAAACCGGAGTGGCAGGTGGCTTATGGGATGTT				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Rear	(263)	GCCATGAAAACCGGAGTGGCAGGTGGCTTATGGGATGTT				
pCMV-GFP2A-MR	(6826)	GCCATGAAAACCGGAGTGGCAGGTGGCTTATGGGATGTT				
Consensus	(6826)	GCCATGAAAACCGGAGTGGCAGGTGGCTTATGGGATGTT				

pCMV-GFP2A-MR Final1 Fragment 2 251109

					Section 177	
	(6865)	6865	6870	6880	6890	6903
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Front	(810)	TTGAGTTGTGAAGAAAAGGCCAAAATTTGTGTGCAAACAT				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Rear	(302)	TTGAGTTGTGAAGAAAAGGCCAAAATTTGTGTGCAAACAT				
pCMV-GFP2A-MR	(6865)	TTGAGTTGTGAAGAAAAGGCCAAAATTTGTGTGCAAACAT				
Consensus	(6865)	TTGAGTTGTGAAGAAAAGGCCAAAATTTGTGTGCAAACAT				
						Section 178
	(6904)	6904	6910	6920	6930	6942
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Front	(849)	TGGGCAGAAGGAGTGACTCGCCCACCAGAGCCACACA---				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Rear	(341)	TGGGCAGAAGGAGTGACTCGCCCACCAGAGCCACACAACA				
pCMV-GFP2A-MR	(6904)	TGGGCAGAAGGAGTGACTCGCCCACCAGAGCCACACAACA				
Consensus	(6904)	TGGGCAGAAGGAGTGACTCGCCCACCAGAGCCACACAACA				
						Section 179
	(6943)	6943	6950	6960	6970	6981
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Front	(885)	-----				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Rear	(380)	ACTCCTGAACCCAAATGTCCAGAAAACCTGGGGTACCACC				
pCMV-GFP2A-MR	(6943)	ACTCCTGAACCCAAATGTCCAGAAAACCTGGGGTACCACC				
Consensus	(6943)	ACTCCTGAACCCAAATGTCCAGAAAACCTGGGGTACCACC				
						Section 180
	(6982)	6982	6990	7000	7010	7020
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Front	(885)	-----				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Rear	(419)	AGTAAAACCAGCATGTGTTTCAAACCTGTATGCAAAAAGGA				
pCMV-GFP2A-MR	(6982)	AGTAAAACCAGCATGTGTTTCAAACCTGTATGCAAAAAGGA				
Consensus	(6982)	AGTAAAACCAGCATGTGTTTCAAACCTGTATGCAAAAAGGA				
						Section 181
	(7021)	7021	7030	7040		7059
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Front	(885)	-----				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Rear	(458)	AAGCATGAAAAGAAAACGTGGTTTGAATCTCGAGATTTT				
pCMV-GFP2A-MR	(7021)	AAGCATGAAAAGAAAACGTGGTTTGAATCTCGAGATTTT				
Consensus	(7021)	AAGCATGAAAAGAAAACGTGGTTTGAATCTCGAGATTTT				
						Section 182
	(7060)	7060	7070	7080		7098
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Front	(885)	-----				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Rear	(497)	TGCAAAGCTATAGGTGGAGAGCTGGCGAGCATCAAGAGT				
pCMV-GFP2A-MR	(7060)	TGCAAAGCTATAGGTGGAGAGCTGGCGAGCATCAAGAGT				
Consensus	(7060)	TGCAAAGCTATAGGTGGAGAGCTGGCGAGCATCAAGAGT				
						Section 183
	(7099)	7099	7110	7120		7137
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Front	(885)	-----				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Rear	(536)	AAAGATGAACAGCAAGTGATTTGGAGGCTGATTACGAGC				
pCMV-GFP2A-MR	(7099)	AAAGATGAACAGCAAGTGATTTGGAGGCTGATTACGAGC				
Consensus	(7099)	AAAGATGAACAGCAAGTGATTTGGAGGCTGATTACGAGC				
						Section 184
	(7138)	7138	7150	7160		7176
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Front	(885)	-----				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Rear	(575)	AGTGGAAAGCTACCATGAGCTGTTTTGGTTGGGACTGACC				
pCMV-GFP2A-MR	(7138)	AGTGGAAAGCTACCATGAGCTGTTTTGGTTGGGACTGACC				
Consensus	(7138)	AGTGGAAAGCTACCATGAGCTGTTTTGGTTGGGACTGACC				

pCMV-GFP2A-MR Final1 Fragment 2 251109

			Section 161
	(6241)	6241 6250 6260 6279	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Front	(186)	TTTGACTTCATCTTCTCCAGCTCGGATATGAGCCAAAT	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Rear	(1)	-----	
pCMV-GFP2A-MR	(6241)	TTTGACTTCATCTTCTCCAGCTCGGATATGAGCCAAAT	
Consensus	(6241)	TTTGACTTCATCTTCTCCAGCTCGGATATGAGCCAAAT	
			Section 162
	(6280)	6280 6290 6300 6318	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Front	(225)	GATGAGCTGTGGATTGGTTTAAATGACATCAAGATTGAG	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Rear	(1)	-----	
pCMV-GFP2A-MR	(6280)	GATGAGCTGTGGATTGGTTTAAATGACATCAAGATTGAG	
Consensus	(6280)	GATGAGCTGTGGATTGGTTTAAATGACATCAAGATTGAG	
			Section 163
	(6319)	6319 6330 6340 6357	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Front	(264)	ATGTACTTTGAGTGGAGTGATGGAACCCAGTGACATTT	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Rear	(1)	-----	
pCMV-GFP2A-MR	(6319)	ATGTACTTTGAGTGGAGTGATGGAACCCAGTGACATTT	
Consensus	(6319)	ATGTACTTTGAGTGGAGTGATGGAACCCAGTGACATTT	
			Section 164
	(6358)	6358 6370 6380 6396	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Front	(303)	ACTAAATGGCTTCCTGGAGAGCCAAGCCATGAGAACAAC	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Rear	(1)	-----	
pCMV-GFP2A-MR	(6358)	ACTAAATGGCTTCCTGGAGAGCCAAGCCATGAGAACAAC	
Consensus	(6358)	ACTAAATGGCTTCCTGGAGAGCCAAGCCATGAGAACAAC	
			Section 165
	(6397)	6397 6410 6420 6435	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Front	(342)	AGACAGGAGGACTGCGTGGTTATGAAAGGCAAGGATGGA	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Rear	(1)	-----	
pCMV-GFP2A-MR	(6397)	AGACAGGAGGACTGCGTGGTTATGAAAGGCAAGGATGGA	
Consensus	(6397)	AGACAGGAGGACTGCGTGGTTATGAAAGGCAAGGATGGA	
			Section 166
	(6436)	6436 6450 6460 6474	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Front	(381)	TACTGGGCGGACAGAGCCTGTGAGCAACCCTAGGTTAC	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Rear	(1)	-----	
pCMV-GFP2A-MR	(6436)	TACTGGGCGGACAGAGCCTGTGAGCAACCCTAGGTTAC	
Consensus	(6436)	TACTGGGCGGACAGAGCCTGTGAGCAACCCTAGGTTAC	
			Section 167
	(6475)	6475 6480 6490 6500 6513	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Front	(420)	ATCTGTAAGATGGTATCACAAAGCCATGCTGTAGTACCG	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Rear	(1)	-----	
pCMV-GFP2A-MR	(6475)	ATCTGTAAGATGGTATCACAAAGCCATGCTGTAGTACCG	
Consensus	(6475)	ATCTGTAAGATGGTATCACAAAGCCATGCTGTAGTACCG	
			Section 168
	(6514)	6514 6520 6530 6540 6552	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Front	(459)	GAGGGTGCAGACAAAGGCTGCCGAAAGGCTGGAACCGG	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Rear	(1)	-----	
pCMV-GFP2A-MR	(6514)	GAGGGTGCAGACAAAGGCTGCCGAAAGGCTGGAACCGG	
Consensus	(6514)	GAGGGTGCAGACAAAGGCTGCCGAAAGGCTGGAACCGG	

pCMV-GFP2A-MR Final1 Fragment 2 251109

					Section 185
	(7177)	7177	7190	7200	7215
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Front	(885)	-----			
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Rear	(614)	TATGGAAGTCCTTCAGAGGGGTTACCTGGAGTGATGGT			
pCMV-GFP2A-MR	(7177)	TATGGAAGTCCTTCAGAGGGGTTACCTGGAGTGATGGT			
Consensus	(7177)	TATGGAAGTCCTTCAGAGGGGTTACCTGGAGTGATGGT			
					Section 186
	(7216)	7216	7230	7240	7254
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Front	(885)	-----			
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Rear	(653)	TCTCCCGTTTCCCTATGAAAATTGGGCTTACGGTGAACCA			
pCMV-GFP2A-MR	(7216)	TCTCCCGTTTCCCTATGAAAATTGGGCTTACGGTGAACCA			
Consensus	(7216)	TCTCCCGTTTCCCTATGAAAATTGGGCTTACGGTGAACCA			
					Section 187
	(7255)	7255	7260	7270	7293
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Front	(885)	-----			
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Rear	(692)	AATAATTACCAAAATGTTGAATATTGTGGTGAGCTGAAA			
pCMV-GFP2A-MR	(7255)	AATAATTACCAAAATGTTGAATATTGTGGTGAGCTGAAA			
Consensus	(7255)	AATAATTACCAAAATGTTGAATATTGTGGTGAGCTGAAA			
					Section 188
	(7294)	7294	7300	7310	7320
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Front	(885)	-----			
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Rear	(731)	GGTGACCCCTGGCATGTCTGGAATGATATCAACTGTGAA			
pCMV-GFP2A-MR	(7294)	GGTGACCCCTGGCATGTCTGGAATGATATCAACTGTGAA			
Consensus	(7294)	GGTGACCCCTGGCATGTCTGGAATGATATCAACTGTGAA			
					Section 189
	(7333)	7333	7340	7350	7360
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Front	(885)	-----			
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Rear	(770)	CACCTCAACAACCTGGATTTGTCAGATACAAAAGGGAAA			
pCMV-GFP2A-MR	(7333)	CACCTCAACAACCTGGATTTGTCAGATACAAAAGGGAAA			
Consensus	(7333)	CACCTCAACAACCTGGATTTGTCAGATACAAAAGGGAAA			
					Section 190
	(7372)	7372	7380	7390	7400
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Front	(885)	-----			
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Rear	(809)	ACACTACTACCTGAGCCACACCTGCTCCACAAGACA			
pCMV-GFP2A-MR	(7372)	ACACTACTACCTGAGCCACACCTGCTCCACAAGACA			
Consensus	(7372)	ACACTACTACCTGAGCCACACCTGCTCCACAAGACA			
					Section 191
	(7411)	7411	7420	7430	7449
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Front	(885)	-----			
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Rear	(848)	NNNCCAGTTACTGCAGATGGGTGGGTTATTTACA			
pCMV-GFP2A-MR	(7411)	CCAACAGTTACTGCAGATGGGTGGGTTATTTACA			
Consensus	(7411)	CCAGTTACTGCAGATGGGTGGGTTATTTACA			
					Section 192
	(7450)	7450	7460	7470	7488
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Front	(885)	-----			
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR2-Rear	(882)	-----			
pCMV-GFP2A-MR	(7450)	TACCAGTACTATTTTAGCAAAGAGAAGGAAACCATGGAC			
Consensus	(7450)	TACCAGTACTATTTTAGCAAAGAGAAGGAAACCATGGAC			

6.1.4 pCMV-GFP2A-MR: MR3-Fragment

pCMV-GFP2A-MR Final1 Fragment 3 251109

					Section 185
	(7177)	7177	7190	7200	7215
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Front	(1)	-----	-----	-----	-----
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Rear	(1)	-----	-----	-----	-----
pCMV-GFP2A-MR (7177)		TATGGAAGTCCTTCAGAGGGGTTACCTGGAGTGATGGT			
Consensus (7177)		-----			
					Section 186
	(7216)	7216	7230	7240	7254
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Front	(1)	-----	-----	-----	-----
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Rear	(1)	-----	-----	-----	-----
pCMV-GFP2A-MR (7216)		TCTCCCGTTTCTATGAAAATTGGGCTTACGGTGAACCA			
Consensus (7216)		-----			
					Section 187
	(7255)	7255	7260	7270	7280
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Front	(1)	-----	-----	-----	-----
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Rear	(1)	-----	-----	-----	-----
pCMV-GFP2A-MR (7255)		AATAATTACCAAAATGTTGAATATTGTGGTGAGCTGAAA			
Consensus (7255)		-----			
					Section 188
	(7294)	7294	7300	7310	7320
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Front	(1)	-----	-----	-----	-----
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Rear	(1)	-----	-----	-----	-----
pCMV-GFP2A-MR (7294)		GGTGACCCCTGGCATGTCTGGAATGATATCAACTGTGAA			
Consensus (7294)		-----			
					Section 189
	(7333)	7333	7340	7350	7360
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Front	(1)	-----	-----	-----	-----
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Rear	(1)	-----	-----	-----	-----
pCMV-GFP2A-MR (7333)		CACCTCAACAACCTGGATTTGTTCAGATACAAAAGGGAAA			
Consensus (7333)		-----			
					Section 190
	(7372)	7372	7380	7390	7400
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Front	(1)	-----	-----	-----	-----
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Rear	(1)	-----	-----	-----	-----
pCMV-GFP2A-MR (7372)		ACACTACTACCTGAGCCCACACCTGCTCCACAAGACAAT			
Consensus (7372)		ACACTACTACCTGAGCCCACACCTGCTCCACAAGACAAT			
					Section 191
	(7411)	7411	7420	7430	7449
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Front	(22)	CCACCAGTTACTGCAGATGGGTGGGT	NNNNNNNN	AAGAC	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Rear	(1)	-----	-----	-----	-----
pCMV-GFP2A-MR (7411)		CCACCAGTTACTGCAGATGGGTGGGT	TATTTACA	AAGAC	
Consensus (7411)		CCACCAGTTACTGCAGATGGGTGGGT		AAGAC	
					Section 192
	(7450)	7450	7460	7470	7488
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Front	(61)	TACCAGTACTATTTTAGCAAAGAGAAGGAAACCATGGAC			
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Rear	(1)	-----	-----	-----	-----
pCMV-GFP2A-MR (7450)		TACCAGTACTATTTTAGCAAAGAGAAGGAAACCATGGAC			
Consensus (7450)		TACCAGTACTATTTTAGCAAAGAGAAGGAAACCATGGAC			

pCMV-GFP2A-MR Final1 Fragment 3 251109

			Section 193
	(7489)	7489 7500 7510 7527	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Front	(100)	AACGCGCGAGCATTGCAAGAAGATTTGGTGATCTT	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Rear	(1)	-----	
pCMV-GFP2A-MR	(7489)	AACGCGCGAGCATTGCAAGAAGATTTGGTGATCTT	
Consensus	(7489)	AACGCGCGAGCATTGCAAGAAGATTTGGTGATCTT	
			Section 194
	(7528)	7528 7540 7550 7566	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Front	(139)	GCTACAATTTAAAAGTGAAAAGTGAAAAGAAGTTCTATGG	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Rear	(1)	-----CTATGG	
pCMV-GFP2A-MR	(7528)	GCTACAATTTAAAAGTGAAAAGTGAAAAGAAGTTCTATGG	
Consensus	(7528)	GCTACAATTTAAAAGTGAAAAGTGAAAAGAAGTTCTATGG	
			Section 195
	(7567)	7567 7580 7590 7605	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Front	(178)	AAATATATAAACAAGAATGGTGGGCAGTCACCATATTTT	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Rear	(7)	AAATATATAAACAAGAATGGTGGGCAGTCACCATATTTT	
pCMV-GFP2A-MR	(7567)	AAATATATAAACAAGAATGGTGGGCAGTCACCATATTTT	
Consensus	(7567)	AAATATATAAACAAGAATGGTGGGCAGTCACCATATTTT	
			Section 196
	(7606)	7606 7620 7630 7644	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Front	(217)	ATTGGCATGTTAATCAGCATGGATAAGAAATTCATTTGG	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Rear	(46)	ATTGGCATGTTAATCAGCATGGATAAGAAATTCATTTGG	
pCMV-GFP2A-MR	(7606)	ATTGGCATGTTAATCAGCATGGATAAGAAATTCATTTGG	
Consensus	(7606)	ATTGGCATGTTAATCAGCATGGATAAGAAATTCATTTGG	
			Section 197
	(7645)	7645 7650 7660 7670 7683	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Front	(256)	ATGGATGGGAGCAAAGTAGATTTTGTGGCTTGGGCTACA	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Rear	(85)	ATGGATGGGAGCAAAGTAGATTTTGTGGCTTGGGCTACA	
pCMV-GFP2A-MR	(7645)	ATGGATGGGAGCAAAGTAGATTTTGTGGCTTGGGCTACA	
Consensus	(7645)	ATGGATGGGAGCAAAGTAGATTTTGTGGCTTGGGCTACA	
			Section 198
	(7684)	7684 7690 7700 7710 7722	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Front	(295)	GGAGAACCCAACCTTTGCAAATGATGATGAAAACCTGTGTA	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Rear	(124)	GGAGAACCCAACCTTTGCAAATGATGATGAAAACCTGTGTA	
pCMV-GFP2A-MR	(7684)	GGAGAACCCAACCTTTGCAAATGATGATGAAAACCTGTGTA	
Consensus	(7684)	GGAGAACCCAACCTTTGCAAATGATGATGAAAACCTGTGTA	
			Section 199
	(7723)	7723 7730 7740 7750 7761	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Front	(334)	ACGATGTACACAAATTCAGGGTCTGGAATGACATCAAC	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Rear	(163)	ACGATGTACACAAATTCAGGGTCTGGAATGACATCAAC	
pCMV-GFP2A-MR	(7723)	ACGATGTACACAAATTCAGGGTCTGGAATGACATCAAC	
Consensus	(7723)	ACGATGTACACAAATTCAGGGTCTGGAATGACATCAAC	
			Section 200
	(7762)	7762 7770 7780 7790 7800	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Front	(373)	TGTGGTTATCCAAATAACTTCATCTGCCAGAGACATAAC	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Rear	(202)	TGTGGTTATCCAAATAACTTCATCTGCCAGAGACATAAC	
pCMV-GFP2A-MR	(7762)	TGTGGTTATCCAAATAACTTCATCTGCCAGAGACATAAC	
Consensus	(7762)	TGTGGTTATCCAAATAACTTCATCTGCCAGAGACATAAC	

pCMV-GFP2A-MR Final1 Fragment 3 251109

		Section 201				
	(7801)	7801	7810	7820	7839	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Front	(412)	AGCAGCATCAATGCCACTGCCATGCCATACCACACCCACG				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Rear	(241)	AGCAGCATCAATGCCACTGCCATGCCATACCACACCCACG				
pCMV-GFP2A-MR	(7801)	AGCAGCATCAATGCCACTGCCATGCCATACCACACCCACG				
Consensus	(7801)	AGCAGCATCAATGCCACTGCCATGCCATACCACACCCACG				
		Section 202				
	(7840)	7840	7850	7860	7878	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Front	(451)	ACACCAGGTGGCTGCAAGGAAGGTTGGCATTGTGACAAG				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Rear	(280)	ACACCAGGTGGCTGCAAGGAAGGTTGGCATTGTGACAAG				
pCMV-GFP2A-MR	(7840)	ACACCAGGTGGCTGCAAGGAAGGTTGGCATTGTGACAAG				
Consensus	(7840)	ACACCAGGTGGCTGCAAGGAAGGTTGGCATTGTGACAAG				
		Section 203				
	(7879)	7879	7890	7900	7917	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Front	(490)	AACAAGTGCTTTAAAAATTTTGGATTTGCTAATGAAGAA				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Rear	(319)	AACAAGTGCTTTAAAAATTTTGGATTTGCTAATGAAGAA				
pCMV-GFP2A-MR	(7879)	AACAAGTGCTTTAAAAATTTTGGATTTGCTAATGAAGAA				
Consensus	(7879)	AACAAGTGCTTTAAAAATTTTGGATTTGCTAATGAAGAA				
		Section 204				
	(7918)	7918	7930	7940	7956	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Front	(529)	AAAAAAAAAGCTGGCAAGACGCACGGCAAGCTTGCAAAGGA				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Rear	(358)	AAAAAAAAAGCTGGCAAGACGCACGGCAAGCTTGCAAAGGA				
pCMV-GFP2A-MR	(7918)	AAAAAAAAAGCTGGCAAGACGCACGGCAAGCTTGCAAAGGA				
Consensus	(7918)	AAAAAAAAAGCTGGCAAGACGCACGGCAAGCTTGCAAAGGA				
		Section 205				
	(7957)	7957	7970	7980	7995	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Front	(568)	CTGAAAGGAAACCTGGTGTCCATAGAAAATGCACAAGAG				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Rear	(397)	CTGAAAGGAAACCTGGTGTCCATAGAAAATGCACAAGAG				
pCMV-GFP2A-MR	(7957)	CTGAAAGGAAACCTGGTGTCCATAGAAAATGCACAAGAG				
Consensus	(7957)	CTGAAAGGAAACCTGGTGTCCATAGAAAATGCACAAGAG				
		Section 206				
	(7996)	7996	8010	8020	8034	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Front	(607)	CAAGCATTGTGTACCTATCACATGAGAGACTCCACTTTC				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Rear	(436)	CAAGCATTGTGTACCTATCACATGAGAGACTCCACTTTC				
pCMV-GFP2A-MR	(7996)	CAAGCATTGTGTACCTATCACATGAGAGACTCCACTTTC				
Consensus	(7996)	CAAGCATTGTGTACCTATCACATGAGAGACTCCACTTTC				
		Section 207				
	(8035)	8035	8040	8050	8073	
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Front	(646)	AATGCCTGGACTGGGCTGAATGATATCAACGCAGAACAC				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Rear	(475)	AATGCCTGGACTGGGCTGAATGATATCAACGCAGAACAC				
pCMV-GFP2A-MR	(8035)	AATGCCTGGACTGGGCTGAATGATATCAACGCAGAACAC				
Consensus	(8035)	AATGCCTGGACTGGGCTGAATGATATCAACGCAGAACAC				
		Section 208				
	(8074)	8074	8080	8090	8100	8112
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Front	(685)	ATGTTCCCTGTGGACAGCTGGACAAGGAGTTCATTATACA				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Rear	(514)	ATGTTCCCTGTGGACAGCTGGACAAGGAGTTCATTATACA				
pCMV-GFP2A-MR	(8074)	ATGTTCCCTGTGGACAGCTGGACAAGGAGTTCATTATACA				
Consensus	(8074)	ATGTTCCCTGTGGACAGCTGGACAAGGAGTTCATTATACA				

pCMV-GFP2A-MR Final1 Fragment 3 251109

		Section 209				
	(8113)	8113	8120	8130	8140	8151
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Front	(724)	AACTGGGGGAAAGGCTATCCTGGTGGGAAGAAGAAGTAGC				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Rear	(553)	AACTGGGGGAAAGGCTATCCTGGTGGGAAGAAGAAGTAGC				
pCMV-GFP2A-MR	(8113)	AACTGGGGGAAAGGCTATCCTGGTGGGAAGAAGAAGTAGC				
Consensus	(8113)	AACTGGGGGAAAGGCTATCCTGGTGGGAAGAAGAAGTAGC				
		Section 210				
	(8152)	8152	8160	8170	8180	8190
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Front	(763)	CTATCTTATGAAGATGCTGACTGTGTAGTTGTGATTGGT				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Rear	(592)	CTATCTTATGAAGATGCTGACTGTGTAGTTGTGATTGGT				
pCMV-GFP2A-MR	(8152)	CTATCTTATGAAGATGCTGACTGTGTAGTTGTGATTGGT				
Consensus	(8152)	CTATCTTATGAAGATGCTGACTGTGTAGTTGTGATTGGT				
		Section 211				
	(8191)	8191	8200	8210		8229
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Front	(802)	GGCAATTCACGAGAGGCAGGGACCTGGATGGATGACACC				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Rear	(631)	GGCAATTCACGAGAGGCAGGGACCTGGATGGATGACACC				
pCMV-GFP2A-MR	(8191)	GGCAATTCACGAGAGGCAGGGACCTGGATGGATGACACC				
Consensus	(8191)	GGCAATTCACGAGAGGCAGGGACCTGGATGGATGACACC				
		Section 212				
	(8230)	8230	8240	8250		8268
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Front	(841)	TGTGACAGTAAACAAGGCTATATATGTCAAACACAGACT				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Rear	(670)	TGTGACAGTAAACAAGGCTATATATGTCAAACACAGACT				
pCMV-GFP2A-MR	(8230)	TGTGACAGTAAACAAGGCTATATATGTCAAACACAGACT				
Consensus	(8230)	TGTGACAGTAAACAAGGCTATATATGTCAAACACAGACT				
		Section 213				
	(8269)	8269	8280	8290		8307
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Front	(880)	GACCCTTCCTGCCTGTTTCTC-----				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Rear	(709)	GACCCTTCCTGCCTGTTTCTCCAACCCTACTCCAAAA				
pCMV-GFP2A-MR	(8269)	GACCCTTCCTGCCTGTTTCTCCAACCCTACTCCAAAA				
Consensus	(8269)	GACCCTTCCTGCCTGTTTCTCCAACCCTACTCCAAAA				
		Section 214				
	(8308)	8308	8320	8330		8346
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Front	(902)	-----				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Rear	(748)	GATGGCTTTGTTACATATGGGAAAAGCAGCTATTCCCTT				
pCMV-GFP2A-MR	(8308)	GATGGCTTTGTTACATATGGGAAAAGCAGCTATTCCCTT				
Consensus	(8308)	GATGGCTTTGTTACATATGGGAAAAGCAGCTATTCCCTT				
		Section 215				
	(8347)	8347	8360	8370		8385
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Front	(902)	-----				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Rear	(787)	ATGAAATTGAAGCTACCATGGCATGAAGCAGAGACATAT				
pCMV-GFP2A-MR	(8347)	ATGAAATTGAAGCTACCATGGCATGAAGCAGAGACATAT				
Consensus	(8347)	ATGAAATTGAAGCTACCATGGCATGAAGCAGAGACATAT				
		Section 216				
	(8386)	8386	8400	8410		8424
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Front	(902)	-----				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Rear	(826)	TGCAAGGATCATACTNNNNNNNNNGCTAGCATTCTAGA				
pCMV-GFP2A-MR	(8386)	TGCAAGGATCATACTTCCCTGCTTGCTAGCATTCTAGA				
Consensus	(8386)	TGCAAGGATCATACTCTAGCATTCTAGA				

pCMV-GFP2A-MR Final1 Fragment 3 251109

					Section 217	
	(8425)	8425	8430	8440	8450	8463
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Front	(902)	-----				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Rear	(865)	-----				
pCMV-GFP2A-MR	(8424)	CCCTACAGTAATGCATTTGCATGGATGAAAATGCAC				CC
Consensus	(8425)	CCCTACAGTAATGCATTTGCATGGATGAAAATGCAC				
					Section 218	
	(8464)	8464	8470	8480	8490	8502
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Front	(902)	-----				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Rear	(902)	-----				
pCMV-GFP2A-MR	(8463)	ATTTAATGTACCCATATGGATTGCCCTGAACAGCAACTT				
Consensus	(8464)	ATTTAATGTACCCATATGGATTGCCCTGAACAGCAACTT				
					Section 219	
	(8503)	8503	8510	8520	8530	8541
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Front	(902)	-----				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Rear	(902)	-----				
pCMV-GFP2A-MR	(8502)	GACCAATAATGAATATACTTGGACGGATAGATGGAGGGT				
Consensus	(8503)	GACCAATAATGAATATACTTGGACGGATAGATGGAGGGT				
					Section 220	
	(8542)	8542	8550	8560	8570	8580
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Front	(902)	-----				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Rear	(902)	-----				
pCMV-GFP2A-MR	(8541)	GCGGTACACTAACTGGGGTGCTGACGAGCCGAAGCTTAA				
Consensus	(8542)	GCGGTACACTAACTGGGGTGCTGACGAGCCGAAGCTTAA				
					Section 221	
	(8581)	8581	8590	8600		8619
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Front	(902)	-----				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Rear	(902)	-----				
pCMV-GFP2A-MR	(8580)	GTCAGCATGTGTTTACATGGATGTTGATGGCTACTGGAG				
Consensus	(8581)	GTCAGCATGTGTTTACATGGATGTTGATGGCTACTGGAG				
					Section 222	
	(8620)	8620	8630	8640		8658
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Front	(902)	-----				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Rear	(902)	-----				
pCMV-GFP2A-MR	(8619)	AACATCATACTGCAATGAAAGTTTTTATTTTCTCTGCAA				
Consensus	(8620)	AACATCATACTGCAATGAAAGTTTTTATTTTCTCTGCAA				
					Section 223	
	(8659)	8659	8670	8680		8697
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Front	(902)	-----				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Rear	(902)	-----				
pCMV-GFP2A-MR	(8658)	AAAATCAGACGAAATCCCTGCTACTGAACCTCCTCAACT				
Consensus	(8659)	AAAATCAGACGAAATCCCTGCTACTGAACCTCCTCAACT				
					Section 224	
	(8698)	8698	8710	8720		8736
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Front	(902)	-----				
pCMV-GFP-MR Seq 251109 MR3-Rear	(902)	-----				
pCMV-GFP2A-MR	(8697)	GCCTGGCAAGTGTCAGAGTCAGAACAGACTGCGTGGAT				
Consensus	(8698)	GCCTGGCAAGTGTCAGAGTCAGAACAGACTGCGTGGAT				

6.1.5 pCMV-GFP2A-MR: MR4-Fragment

pCMV-GFP2A-MR_10to1-3_241109_MR4-Front+T7

				Section 249	
	(8185)	8185	8190	8200	8217
	pCMV-GFP2A-MR	(8185)	ATTGGTGGCAATTCACGAGAGGCAGGGACCTGG		
	pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seg 241109 T7	(1)	-----		
	pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seq 241109 MR4-Front	(1)	-----		
	Consensus	(8185)	-----		
				Section 250	
	(8218)	8218	8230	8240	8250
	pCMV-GFP2A-MR	(8218)	ATGGATGACACCTGTGACAGTAAACAAGGCTAT		
	pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seg 241109 T7	(1)	-----		
	pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seq 241109 MR4-Front	(1)	-----		
	Consensus	(8218)	-----		
				Section 251	
	(8251)	8251	8260	8270	8283
	pCMV-GFP2A-MR	(8251)	ATATGTCAAACACAGACTGACCCCTCCCTGCCT		
	pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seg 241109 T7	(1)	-----		
	pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seq 241109 MR4-Front	(1)	-----		
	Consensus	(8251)	-----		
				Section 252	
	(8284)	8284	8290	8300	8316
	pCMV-GFP2A-MR	(8284)	GTTTCTCCAACCACTACTCCAAAAAG-ATGGCTT		
	pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seg 241109 T7	(1)	-----		
	pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seq 241109 MR4-Front	(1)	-----		
	Consensus	(8284)	TCCAAAA ATGGCTT		
				Section 253	
	(8317)	8317	8330		8349
	pCMV-GFP2A-MR	(8316)	TGTTACATATGGGAAAAGCAGCTATTCCCTTAT		
	pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seg 241109 T7	(17)	TGTTACATATGGGAAAAGCAGCTATTCCCTTAT		
	pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seq 241109 MR4-Front	(1)	-----		
	Consensus	(8317)	TGTTACATATGGGAAAAGCAGCTATTCCCTTAT		
				Section 254	
	(8350)	8350	8360	8370	8382
	pCMV-GFP2A-MR	(8349)	GAAATTGAAGCTACCATGGCATGAAGCAGAGAC		
	pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seg 241109 T7	(50)	GAAATTGAAGCTACCATGGCATGAAGCAGAGAC		
	pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seq 241109 MR4-Front	(1)	-----		
	Consensus	(8350)	GAAATTGAAGCTACCATGGCATGAAGCAGAGAC		
				Section 255	
	(8383)	8383	8390	8400	8415
	pCMV-GFP2A-MR	(8382)	ATATTGCAAGGATCATACTTCCCTGCTTGCTAG		
	pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seg 241109 T7	(83)	ATATTGCAAGGATCATACTTCCCTGCTTGCTAG		
	pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seq 241109 MR4-Front	(1)	--ATTGCANGGNTCATACTTCCCTGCTTGCTAG		
	Consensus	(8383)	ATATTGCAAGGATCATACTTCCCTGCTTGCTAG		
				Section 256	
	(8416)	8416	8430		8448
	pCMV-GFP2A-MR	(8415)	CATTCTAGACCCCTACAGTAATGCATTTGCATG		
	pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seg 241109 T7	(116)	CATTCTAGACCCCTACAGTAATGCATTTGCATG		
	pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seq 241109 MR4-Front	(32)	CATTCTAGACCCCTACAGNNNNNNNNNNNNATG		
	Consensus	(8416)	CATTCTAGACCCCTACAGTAATGCATTTGCATG		

pCMV-GFP2A-MR_10to1-3_241109_MR4-Front+T7

		Section 257			
	(8449)	8449	8460	8470	8481
pCMV-GFP2A-MR	(8448)	GATGAAAATGCACCCATTTAATGTACCCATATG			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seg 241109 T7	(149)	GATGAAAATGCACCCATTTAATGTACCCATATG			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seq 241109 MR4-Front	(65)	GATGAAAATGCACCCATTTAATGTACCCATATG			
Consensus	(8449)	GATGAAAATGCACCCATTTAATGTACCCATATG			
		Section 258			
	(8482)	8482	8490	8500	8514
pCMV-GFP2A-MR	(8481)	GATTGCCCTGAACAGCAACTTGACCAATAATGA			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seg 241109 T7	(182)	GATTGCCCTGAACAGCAACTTGACCAATAATGA			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seq 241109 MR4-Front	(98)	GATTGCCCTGAACAGCAACTTGACCAATAATGA			
Consensus	(8482)	GATTGCCCTGAACAGCAACTTGACCAATAATGA			
		Section 259			
	(8515)	8515	8520	8530	8547
pCMV-GFP2A-MR	(8514)	ATATACTTGGACGGATAGATGGAGGGTGCCGTA			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seg 241109 T7	(215)	ATATACTTGGACGGATAGATGGAGGGTGCCGTA			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seq 241109 MR4-Front	(131)	ATATACTTGGACGGATAGATGGAGGGTGCCGTA			
Consensus	(8515)	ATATACTTGGACGGATAGATGGAGGGTGCCGTA			
		Section 260			
	(8548)	8548	8560	8570	8580
pCMV-GFP2A-MR	(8547)	CACTAACTGGGGTGCTGACGAGCCGAAGCTTAA			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seg 241109 T7	(248)	CACTAACTGGGGTGCTGACGAGCCGAAGCTTAA			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seq 241109 MR4-Front	(164)	CACTAACTGGGGTGCTGACGAGCCGAAGCTTAA			
Consensus	(8548)	CACTAACTGGGGTGCTGACGAGCCGAAGCTTAA			
		Section 261			
	(8581)	8581	8590	8600	8613
pCMV-GFP2A-MR	(8580)	GTCAGCATGTGTTTACATGGATGTTGATGGCTA			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seg 241109 T7	(281)	GTCAGCATGTGTTTACATGGATGTTGATGGCTA			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seq 241109 MR4-Front	(197)	GTCAGCATGTGTTTACATGGATGTTGATGGCTA			
Consensus	(8581)	GTCAGCATGTGTTTACATGGATGTTGATGGCTA			
		Section 262			
	(8614)	8614	8620	8630	8646
pCMV-GFP2A-MR	(8613)	CTGGAGAACATCATACTGCAATGAAAGTTTTTA			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seg 241109 T7	(314)	CTGGAGAACATCATACTGCAATGAAAGTTTTTA			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seq 241109 MR4-Front	(230)	CTGGAGAACATCATACTGCAATGAAAGTTTTTA			
Consensus	(8614)	CTGGAGAACATCATACTGCAATGAAAGTTTTTA			
		Section 263			
	(8647)	8647	8660	8679	
pCMV-GFP2A-MR	(8646)	TTTTCTCTGCAAAAAATCAGACGAAATCCCTGC			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seg 241109 T7	(347)	TTTTCTCTGCAAAAAATCAGACGAAATCCCTGC			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seq 241109 MR4-Front	(263)	TTTTCTCTGCAAAAAATCAGACGAAATCCCTGC			
Consensus	(8647)	TTTTCTCTGCAAAAAATCAGACGAAATCCCTGC			
		Section 264			
	(8680)	8680	8690	8700	8712
pCMV-GFP2A-MR	(8679)	TACTGAACCTCCTCAACTGCCTGGCAAGTGTC			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seg 241109 T7	(380)	TACTGAACCTCCTCAACTGCCTGGCAAGTGTC			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seq 241109 MR4-Front	(296)	TACTGAACCTCCTCAACTGCCTGGCAAGTGTC			
Consensus	(8680)	TACTGAACCTCCTCAACTGCCTGGCAAGTGTC			

pCMV-GFP2A-MR_10to1-3_241109_MR4-Front+T7

				Section 265	
	(8713)	8713	8720	8730	8745
	pCMV-GFP2A-MR	(8712)	AGAGTCAGAACAGACTGCGTGGATTCCCTTTCTA		
	pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seg 241109 T7	(413)	AGAGTCAGAACAGACTGCGTGGATTCCCTTTCTA		
	pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seq 241109 MR4-Front	(329)	AGAGTCAGAACAGACTGCGTGGATTCCCTTTCTA		
	Consensus	(8713)	AGAGTCAGAACAGACTGCGTGGATTCCCTTTCTA		
					Section 266
	(8746)	8746	8760		8778
	pCMV-GFP2A-MR	(8745)	TGGCCATTGCTACTATTTTGAATCTTCTTTTAC		
	pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seg 241109 T7	(446)	TGGCCATTGCTACTATTTTGAATCTTCTTTTAC		
	pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seq 241109 MR4-Front	(362)	TGGCCATTGCTACTATTTTGAATCTTCTTTTAC		
	Consensus	(8746)	TGGCCATTGCTACTATTTTGAATCTTCTTTTAC		
					Section 267
	(8779)	8779	8790	8800	8811
	pCMV-GFP2A-MR	(8778)	GAGAAGTTGGGGTCAGGCTTCTCTGGAATGCCT		
	pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seg 241109 T7	(479)	GAGAAGTTGGGGTCAGGCTTCTCTGGAATGCCT		
	pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seq 241109 MR4-Front	(395)	GAGAAGTTGGGGTCAGGCTTCTCTGGAATGCCT		
	Consensus	(8779)	GAGAAGTTGGGGTCAGGCTTCTCTGGAATGCCT		
					Section 268
	(8812)	8812	8820	8830	8844
	pCMV-GFP2A-MR	(8811)	TCGAATGGGTGCCTCCCTGGTTTCCATCGAGAC		
	pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seg 241109 T7	(512)	TCGAATGGGTGCCTCCCTGGTTTCCATCGAGAC		
	pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seq 241109 MR4-Front	(428)	TCGAATGGGTGCCTCCCTGGTTTCCATCGAGAC		
	Consensus	(8812)	TCGAATGGGTGCCTCCCTGGTTTCCATCGAGAC		
					Section 269
	(8845)	8845	8850	8860	8877
	pCMV-GFP2A-MR	(8844)	TGCTGCTGAGTCCAGTTTCTGTGATACCGTGT		
	pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seg 241109 T7	(545)	TGCTGCTGAGTCCAGTTTCTGTGATACCGTGT		
	pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seq 241109 MR4-Front	(461)	TGCTGCTGAGTCCAGTTTCTGTGATACCGTGT		
	Consensus	(8845)	TGCTGCTGAGTCCAGTTTCTGTGATACCGTGT		
					Section 270
	(8878)	8878	8890	8900	8910
	pCMV-GFP2A-MR	(8877)	TGAACCTCTTAAAAGTAAAACCAATTTTGGAT		
	pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seg 241109 T7	(578)	TGAACCTCTTAAAAGTAAAACCAATTTTGGAT		
	pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seq 241109 MR4-Front	(494)	TGAACCTCTTAAAAGTAAAACCAATTTTGGAT		
	Consensus	(8878)	TGAACCTCTTAAAAGTAAAACCAATTTTGGAT		
					Section 271
	(8911)	8911	8920	8930	8943
	pCMV-GFP2A-MR	(8910)	AGGCATGTTCCGAAATGTTGAAGGGAAGTGGCT		
	pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seg 241109 T7	(611)	AGGCATGTTCCGAAATGTTGAAGGGAAGTGGCT		
	pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seq 241109 MR4-Front	(527)	AGGCATGTTCCGAAATGTTGAAGGGAAGTGGCT		
	Consensus	(8911)	AGGCATGTTCCGAAATGTTGAAGGGAAGTGGCT		
					Section 272
	(8944)	8944	8950	8960	8976
	pCMV-GFP2A-MR	(8943)	TTGGTTGAACGACAATCCTGTCTCCTTTGTCAA		
	pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seg 241109 T7	(644)	TTGGTTGAACGACAATCCTGTCTCCTTTGTCAA		
	pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seq 241109 MR4-Front	(560)	TTGGTTGAACGACAATCCTGTCTCCTTTGTCAA		
	Consensus	(8944)	TTGGTTGAACGACAATCCTGTCTCCTTTGTCAA		

pCMV-GFP2A-MR_10to1-3_241109_MR4-Front+T7

				Section 273	
	(8977)	8977	8990	9009	
pCMV-GFP2A-MR	(8976)	CTGGAAAACAGGCGATCCCTCTGGTGAACGGAA			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seg 241109 T7	(677)	CTGGAAAACAGGCGATCCCTCTGGTGAACGGAA			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seq 241109 MR4-Front	(593)	CTGGAAAACAGGCGATCCCTCTGGTGAACGGAA			
Consensus	(8977)	CTGGAAAACAGGCGATCCCTCTGGTGAACGGAA			
				Section 274	
	(9010)	9010	9020	9030	9042
pCMV-GFP2A-MR	(9009)	TGATTGTGTAGTTCTAGCTTCATCTTCGGGCGCT			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seg 241109 T7	(710)	TGATTGTGTAGTTCTAGCTTCATCTTCGGGCGCT			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seq 241109 MR4-Front	(626)	TGATTGTGTAGTTCTAGCTTCATCTTCGGGCGCT			
Consensus	(9010)	TGATTGTGTAGTTCTAGCTTCATCTTCGGGCGCT			
					Section 275
	(9043)	9043	9050	9060	9075
pCMV-GFP2A-MR	(9042)	TTGGAATAATATCCACTGTTCTTCGTACAAAGG			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seg 241109 T7	(743)	TTGGAATAATATCCACTGTTCTTCGTACAAAGG			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seq 241109 MR4-Front	(659)	TTGGAATAATATCCACTGTTCTTCGTACAAAGG			
Consensus	(9043)	TTGGAATAATATCCACTGTTCTTCGTACAAAGG			
					Section 276
	(9076)	9076	9090		9108
pCMV-GFP2A-MR	(9075)	ATTTATTTGTAAAAATGCCAAAAATATTGATCC			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seg 241109 T7	(776)	ATTTATTTGTAAAAATGCCAAAAATATTGATCC			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seq 241109 MR4-Front	(692)	ATTTATTTGTAAAAATGCCAAAAATATTGATCC			
Consensus	(9076)	ATTTATTTGTAAAAATGCCAAAAATATTGATCC			
					Section 277
	(9109)	9109	9120	9130	9141
pCMV-GFP2A-MR	(9108)	TGTAACACTACACTCATCCATTACAACCAAAGC			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seg 241109 T7	(809)	TGTAACACTACACTCATCCATTACAACCAAAGC			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seq 241109 MR4-Front	(725)	TGTAACACTACACTCATCCATTACAACCAAAGC			
Consensus	(9109)	TGTAACACTACACTCATCCATTACAACCAAAGC			
					Section 278
	(9142)	9142	9150	9160	9174
pCMV-GFP2A-MR	(9141)	TGACCAAAGGAAGATGGATCCTCAACCCAAGGG			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seg 241109 T7	(842)	TGACCAAAGGAAGATGGATCCTCAACCCAAGGG			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seq 241109 MR4-Front	(758)	TGACCAAAGGAAGATGGATCCTCAACCCAAGGG			
Consensus	(9142)	TGACCAAAGGAAGATGGATCCTCAACCCAAGGG			
					Section 279
	(9175)	9175	9180	9190	9207
pCMV-GFP2A-MR	(9174)	CTCTTCTAAAGCAGCAGGAGTGGTCACCGTGGT			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seg 241109 T7	(875)	CTCTTCTAAAGCAGCAGGAGTGGTCACCGTGGT			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seq 241109 MR4-Front	(791)	CTCTTCTAAAGCAGCAGGAGTGGTCACCGTGGT			
Consensus	(9175)	CTCTTCTAAAGCAGCAGGAGTGGTCACCGTGGT			
					Section 280
	(9208)	9208	9220	9230	9240
pCMV-GFP2A-MR	(9207)	CCTCCTGATTGTGATAGGTGCCGGCGTTGCAGC			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seg 241109 T7	(908)	CCTCCTGATTGTGATAGGTGCCGGCGTTGCAGC			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seq 241109 MR4-Front	(824)	CCTCCTGATTGTGATAGGTGCCGGCGTTGCAGC			
Consensus	(9208)	CCTCCTGATTGTGATAGGTGCCGGCGTTGCAGC			

pCMV-GFP2A-MR_10to1-3_241109_MR4-Front+T7

				Section 281	
	(9241)	9241	9250	9260	9273
pCMV-GFP2A-MR	(9240)	CTATTTCTTTTATAAGAAAAGGCATGCGTTGCA			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seg 241109 T7	(941)	CTATTTCTTTTATAAGAAAAGGCATGCGTTGCA			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seq 241109 MR4-Front	(857)	CTATTTCTTTTATAAGAAAAGGCATGCGTTGCA			
Consensus	(9241)	CTATTTCTTTTATAAGAAAAGGCATGCGTTGCA			
				Section 282	
	(9274)	9274	9280	9290	9306
pCMV-GFP2A-MR	(9273)	CATACCTCAAGAGGCCACCTTTGAAAACACTCT			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seg 241109 T7	(974)	CATACCTCAAGAGGCCACCTTTGAAAACACTCT			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seq 241109 MR4-Front	(890)	CATACCTCANGA-----			
Consensus	(9274)	CATACCTCAAGAGGCCACCTTTGAAAACACTCT			
				Section 283	
	(9307)	9307	9320		9339
pCMV-GFP2A-MR	(9306)	CTACTTCAACAGTAATCTGAGTCCAGGAACAAG			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seg 241109 T7	(1007)	CTACTTCAACAGTAATCTGAGTCCAGGAACAAG			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seq 241109 MR4-Front	(902)	-----			
Consensus	(9307)	CTACTTCAACAGTAATCTGAGTCCAGGAACAAG			
				Section 284	
	(9340)	9340	9350	9360	9372
pCMV-GFP2A-MR	(9339)	TGACACGAAAGATCTCATGGGCAACATCGAGCA			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seg 241109 T7	(1040)	TGACACGAAAGATCTCATGGGCAACATCGAGCA			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seq 241109 MR4-Front	(902)	-----			
Consensus	(9340)	TGACACGAAAGATCTCATGGGCAACATCGAGCA			
				Section 285	
	(9373)	9373	9380	9390	9405
pCMV-GFP2A-MR	(9372)	GAATGAGCATGCGATCATTTAGCCCGGGG-----			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seg 241109 T7	(1073)	GAATGNNC ¹ NNGCGATCATTTAGCCCGGGGTCGA			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seq 241109 MR4-Front	(902)	-----			
Consensus	(9373)	GAATG C GCGATCATTTAGCCCGGGG			
				Section 286	
	(9406)	9406	9420		9438
pCMV-GFP2A-MR	(9401)	-----			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seg 241109 T7	(1106)	CCTCGAGGGGGGGCCCGGTACCNTAATAATAAG			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seq 241109 MR4-Front	(902)	-----			
Consensus	(9406)	-----			
				Section 287	
	(9439)	9439	9446		
pCMV-GFP2A-MR	(9401)	-----			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seg 241109 T7	(1139)	TACCAGNA			
pCMV-GFP2A-MR 10:1-3 Seq 241109 MR4-Front	(902)	-----			
Consensus	(9439)	-----			

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
1-1	Übersicht der Zellen des innaten und adaptiven Immunsystems	2
1-2	Funktionsweise zytotoxischer T-Lymphozyten	3
1-3	Klassische Antigenpräsentationswege und Kreuzpräsentation	6
1-4	Molekulare Mechanismen der Kreuzpräsentation	9
1-5	Antigenpräsentation in BM-DC	11
2-1	Aufbau der Western-Blotkammer	33
3-1	In vitro Ovalbumin-Aufnahme in CD11c ⁺ Milzzellen	47
3-2	In vivo Ovalbumin-Aufnahme in CD11c ⁺ Milzzellen	48
3-3	Intrazelluläre MR-Färbung in CD11c ⁺ Milzzellen	49
3-4	Oberflächenmarker auf MR-positiven Zellen	50
3-5	Lokalisation von MR-positiven Zellen in der murinen Milz	51
3-6	Anzahl und Lokalisation MR-positiver Zellen in Wildtyp- und SpiC ^{-/-} Mäusen	52
3-7	Kreuzpräsentation durch konventionelle dendritische Zellen und RPM	54
3-8	Kreuzpräsentation durch WT und SpiC ^{-/-} dendritische Zellen und RPM	55
3-9	Kreuzpräsentation durch WT und MR ^{-/-} dendritische Zellen und RPM	56
3-10	Kreuzpräsentation durch WT und Batf3 ^{-/-} dendritische Zellen und RPM	57
3-11	Antigentransport in BM-DC und RPM	58
3-12	Inhibition der Ovalbumin-Aufnahme durch RPM	59
3-13	RPM und BM-DC, nicht aber CD8 ⁺ DCs benötigen den MR zur Kreuzpräsentation von löslichem Ovalbumin	60
3-14	Konventionelle DCs, nicht aber RPM sind in der Lage OT-II T-Zellen zu aktivieren	61
3-15	Kreuzpräsentation von löslichem Ovalbumin durch RPM ist vom Proteasom und endosomalen TAP-Komplexen abhängig	63
3-16	Anreicherung von RPM durch MR-MACS	64
3-17	RPM binden unspezifisch an LS-Aufreinigungssäulen	65
3-18	RPM binden MACS-Aufreinigungssäule auf Grund ihrer magnetischen Eigenschaften	66
3-19	RPM kontaminieren durch CD19- und CD4-MACS aufgereinigte Zellen	67
3-20	Beeinträchtigung durchflußzytometrischer Analysen durch RPM	68
3-21	OT-I T-Zelllokalisierung und -aktivierung in Wildtyp- und SpiC ^{-/-} Mäusen	71
3-22	Ovalbumin-spezifische Zytotoxizität in SpiC ^{-/-} und Batf3 ^{-/-} Mäusen	73
3-23	Ovalbumin-spezifische Zytotoxizität in SpiC ^{-/-} und MR ^{-/-} Mäusen	74
3-24	Rolle TNF- α in der Regulation zytotoxischer T-Zellantworten	76
3-25	Schematische Darstellung der GFP2A-Mannose Rezeptor Expressionskassette	78
3-26	Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie des	80

pCMV-GFP2A-MR Vektors		
3-27	Gelelektrophoretische Analyse der PCR-Produkte	82
3-28	Gelelektrophoretische Auswertung der Restriktionsanalyse verschiedener Ligationsprodukte	84
3-29	Transfektion von HEK293T-Zellen und Funktionstest des pCMV-GFP2A-MR Vektors	86
3-30	Umklonierung der GFP2A-MR Expressionskassette	87
3-31	Test des pLOX-GFP2A-MR in HEK293T-Zellen	88
3-32	GFP-Expression und Ovalbumin-Aufnahme in pLox-infizierten BM-DC	89
3-33	Funktionalität der GFP2A-MR Expressionskassette in JM8A3-ES-Zellen	92
3-34	Keimbahntransmission in R26-MRxB6 Mäusen	93
3-35	Rekombinationseffizienz in DCs, Makrophagen und T-Zellen von R26-MR oder Tie2-MR Milzzellsuspensionen	94
3-36	MR-Expression in Tie2-MR und R26-MR Milzzellen	95
3-37	Aufnahme von löslichem Ovalbumin durch R26-MR oder Tie2-MR Milzzellen	96
3-38	MR ⁺ CD8 ⁻ dendritische Zellen können effektiver kreuzpräsentieren als vergleichbare Wildtyp DCs	97

6.3 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
AF	Autofluoreszenz
APC	Antigen-Präsentierende Zelle (engl. "Antigen-presenting cell")
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BM-DC	Knochenmark-Dendritische Zelle (engl. Bone-marrow derived DC)
BP	Basenpaare
BSA	„Bovine serum albumin“
CaCl ₂	Calciumchlorid
CD	engl. „cluster of differentiation“
cDNA	engl. "complementary desoxyribonucleic acid"
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidylester
cm	Zentimeter
CpG	Cytosin-Guanin Oligonukleotid

CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten (engl. "Cytotoxic T-Lymphocytes")
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Dendritische Zelle (engl. "dendritic cell")
DEPC	Diethylcarbonat
DMA	Dimethylamilorid
DMEM	engl. "Dulbecco's Modified Eagle Medium"
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. "Desoxyribonucleic acid"
dNTPs	Desoxynucleosid-Triphosphate
DTR	Diphtheriatoxin-Rezeptor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEA-1	engl. "Early-endosomal antigen-1"
ELU	Elutionspuffer
EQU	Äquibrierungspuffer
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ES	Embryonale Stammzelle
FACS	engl. „ Fluorescence-activated cell Sorting“
FCS	<i>engl. „Fetal calf serum“</i>
FCγR	Fc-Gamma Rezeptor
FSC	engl. "Forward scatter channel"
Fwd	engl. "Forward"
GFP	<i>engl. „Green fluorescent protein“</i>
GM-CSF	„Granulocyte/macrophages colony stimulating factor“
GM-CSF	engl. "Granulocyte macrophage colony-stimulating factor"
HCl	Salzsäure

HTNC	His-Tat-N-Cre-Rekombinase
IL	Interleukin
IMDM	engl. "Iscove's Modified Dulbecco's Medium"
IMMGEN	engl. "Immunological Genome Consortium"
INF γ	Interferon γ
IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle
kB	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kalium Dihydrogenphosphat
L	Liter
Lamp-1	engl. "Lysosome-associated membrane protein-1"
LIF	engl. "Leukemia inhibiting factor"
LPS	Lipopolysaccharide
LS-Aufreinigungssäulen	engl. "large scale"
LSEC	engl. "Liver sinusoidal endothelial cells"
LYS	Lysispuffer
M	Molar
MACS	engl. „Magnetic-activated cell sorting“
MARCO	engl. "Macrophage receptor with collagenous structure"
MCS	engl. "Multiple cloning site"
MFI	Mittlere Fluoreszenz-Intensität
mg	Mikrogramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. "Major Histocompatibility Complex")
Min.	Minute(n)

ml	Milliliter
μl	Mikroliter
mm	Mikrometer
MMM	Metallophile Makrophagen
MnCl ₂	Mangan Dichlorid
MOI	engl. "Multiplicity of infection"
MR	Mannose Rezeptor
mRNA	engl. "messenger ribonucleic acid"
MZM	Marignalzonen Makrophagen
Na ₂ HPO ₄	Di-Natrium Hydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natrium Azid
NEM	n – Ethylmaleimide
NEU	Neutralisationspuffer
ng	Nanogramm
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
nm	Nanometer
OT-I	Ovalbumin-spezifischer T-Zell Rezeptor transgene CD8+ T-Zelle
OT-II	Ovalbumin-spezifischer T-Zell Rezeptor transgene CD4+ T-Zelle
OVA	Ovalbumin
PBS	engl. „Phosphat – buffered saline“
PCR	engl. "Polymerase chain reaction"
PERM	Permeabilisierungspuffer
PFA	<i>Paraformaldehyd</i>
pg	Pikogramm
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RCB - Puffer	engl. „Red Blood Cell“ - Puffer
RES	Resuspendierungspuffer

Rev	engl. "Reverse"
RPM	Rote Pulpa Makrophagen
rpm	engl. "rounds per minute"
RPMI	<i>engl. „Roswell Park Memorial Institute medium“</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
Sek.	Sekunde(n)
SIINFEKL	Ovalbumin Peptid 257-264
SLO	Sekundäre Lymphatische Organe
SSC	engl. "Side scatter channel"
TAP	engl. "Transporter associated with antigen processing"
TBS	engl. "Tris buffered saline"
TBS-T	engl. "Tris buffered saline tween"
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TLR	„Toll like“ - Rezeptor
TNF α	„Tumor necrosis factor alpha“
TNFR	„Tumor Nekrose Faktor alpha rezeptor 1 und 2“
Tris	Tris(hydroxymethyl) - aminomethan
WT	Wildtyp
α GC	α -Galactosylceramide

7. Danksagung

Zunächst möchte ich Prof. Christian Kurts für die Möglichkeit danken diese Promotionsarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Darüber hinaus möchte ich mich aber vor allem für die von Ihm eingeräumten wissenschaftlichen Freiräume, die zahllosen konstruktiven Besprechungen und das Vertrauen in meine Arbeit bedanken.

Ebenfalls möchte ich mich bei meiner Prüfungskommission, bestehend aus Prof. Percy Knolle, Prof. Waldemar Kolanus und Prof. Albert Haas, bedanken, dass Sie die Mühe auf sich genommen haben diese Promotionsarbeit zu begutachten.

Ein spezieller Dank gilt allen Mitarbeitern des IMMEI, die durch ihre offene und freundschaftliche Art dazu beigetragen haben eine angenehme Arbeitsatmosphäre zu schaffen, die für viele kreative, unterhaltsame und erinnerungswürdige Stunden im Labor gesorgt hat. Im Besonderen möchte ich Jessica Gonyer und Lukas Heineck für ihre tatkräftige Hilfe im Labor sowie Dr. Andreas Limmer für die zahlreichen, wissenschaftlichen Diskussionen danken. Ein großes Dankeschön auch an Verena Semmling und Catherine Gottschalk für die Korrektur dieser Arbeit. Ein großer Dank geht auch an die Mitarbeiter der Core-Facility, die Tierpfleger im IMMEI und im HET sowie den Mitarbeitern der Spülküche.

Auch möchte ich meinen Freunden danken, die mich in schwierigen Zeiten immer aufgebaut und mir Halt gegeben haben. Ganz besonderer Dank geht hierbei an Giuliano, Thomas und Andreas.

Trotz allem wäre diese Arbeit aber nicht ohne die bedingungslose Unterstützung durch meine Familie möglich gewesen. Daher möchte ich ganz besonders meinen Eltern danken, dass Sie mich immer unterstützt und immer an mich geglaubt haben. Ohne euch dürfte ich diese Zeilen nicht unter meine Promotion schreiben.

Das größte Dankeschön geht an Marzena, die mir nicht nur Halt und Vertrauen geschenkt und immer an mich geglaubt hat, sondern mir auch täglich im Labor zur Seite stand. Danke dass Du für mich da bist!