

**Die Rolle von NKT Zellen und
NKT Zell-vermitteltem Cross-Priming in der
Listerien-Infektion**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Elisabeth Mettke

aus Leipzig

Bonn, September 2015

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

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Experimentelle Immunologie der
Universität Bonn angefertigt.

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

Tag der Promotion: 21. März 2016

Erscheinungsjahr: 2016

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 6 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn vom 3. Juni 2011 im Zeitraum von September 2011 bis September 2015 von Herrn Prof. Dr. Christian Kurts betreut.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass

- die vorgelegte Arbeit – abgesehen von den ausdrücklich bezeichneten Hilfsmitteln – persönlich, selbstständig 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 Person) 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 16.09.2015

*„Tetris hat uns gelehrt, dass wir irgendwann verschwinden, wenn
wir versuchen irgendwo reinzupassen.“*

- All den Mäusen -

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Überblick über das Immunsystem	1
1.2	DZ-Lizensierung und klassisches Cross-Priming.....	3
1.2.1	Alternatives Cross-Priming	4
1.2.2	CCR4 und CCL17.....	6
1.3	Natürliche Killer T Zellen	8
1.3.1	Aktivierung von Natürlichen Killer T Zellen	9
1.3.2	Natürliche Killer T Zellen in Interaktion mit anderen Immunzellen.....	11
1.3.3	Mikrobiota und Natürliche Killer T Zellen	13
1.4	Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i> und Natürliche Killer T Zellen	14
1.4.1	Innate Immunantwort einer Listerien-Infektion	15
1.4.2	Adaptive Immunantwort einer Listerien-Infektion.....	17
1.4.3	Natürliche Killer T Zellen in der Listerien-Infektion	18
1.5	Zielsetzung der Arbeit	19
2.	Material und Methoden	20
2.1	Material.....	20
2.1.1	Geräte.....	20
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	22
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien.....	23
2.1.4	Puffer, Medien und Lösungen.....	25
2.1.5	Antikörper und Fluorochrome.....	26
2.1.6	Primer Sequenzen	27
2.1.7	Software	27
2.1.8	Kit-Systeme	27
2.2	Methoden.....	28
2.2.1	Tierexperimentelle Methoden	28
2.3	Zellbiologische Methoden.....	30

2.3.1	<i>Isolation primärer Zellen</i>	30
2.3.2	<i>in vitro T Zell-Aktivierung</i>	32
2.3.3	<i>Transwell-Assay</i>	32
2.3.4	<i>Magnetisch-aktivierte Zellsortierung (MACS)</i>	33
2.3.5	<i>Durchflusszytometrie</i>	33
2.3.6	<i>CFSE Proliferations-Assay</i>	35
2.3.7	<i>Luminex Analyse</i>	36
2.3.8	<i>Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung</i>	36
2.4	Molekularbiologische Methoden	36
2.4.1	<i>RNA Isolation</i>	36
2.4.2	<i>Reverse Transkription</i>	36
2.4.3	<i>Real-Time-PCR</i>	37
2.5	Immunologische Methoden	37
2.5.1	<i>Serumpräparation</i>	37
2.5.2	<i>ELISA (Enzyme linked immunosorbent Assay)</i>	37
2.5.3	<i>Immunhistochemische Färbung</i>	38
2.6	Statistik	38
3.	Ergebnisse	40
3.1	NKT Zell-vermitteltes Cross-Priming in der Listerien-Infektion	40
3.1.1	<i>Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i> induziert die Produktion von CCL17</i>	40
3.1.2	<i>CCL17-produzierende DZ zeigen einen erhöhten Aktivierungsstatus</i>	42
3.1.3	<i>CCL17-produzierende DZ können OT-1 Zellen stärker aktivieren</i>	43
3.1.4	<i>Die ZTL Generierung in Abwesenheit von alternativem Cross-Priming ist nach einer Listerien-Infektion nicht vermindert</i>	44
3.1.5	<i>Die gleichzeitige Abwesenheit von CCL17 und der Kreuzpräsentationskapazität von DZ vermindert nicht die ZTL Generierung</i>	46
3.1.6	<i>T Zell Gedächtnisantworten in der Abwesenheit von alternativem Cross-Priming sind nicht vermindert</i>	47
3.1.7	<i>CCR4-defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte bakterielle Last</i>	49
3.1.8	<i>CD8⁺ T Zellen zeigen nach Listerien-Infektion keine CCR4-Expression</i>	50
3.2	NKT Zellen und ihre Funktion in der Abwehr einer Listerien-Infektion	52

3.2.1	<i>NKT Zellen werden im Rahmen einer Listerien-Infektion aktiviert.....</i>	52
3.2.2	<i>Der Einfluss von iNKT oder NKT Zell Defizienz auf die bakterielle Last und die Etablierung von ZTL Antworten nach Listerien-Infektion.....</i>	53
3.2.3	<i>NK Zellen sind in Abwesenheit von NKT Zellen stärker aktiviert.....</i>	55
3.2.4	<i>IFN γ wird in der Abwesenheit von CD1d in der Milz vermehrt sezerniert.....</i>	58
3.2.5	<i>Dendritische Zellen zeigen eine verstärkte Aktivierung in der Abwesenheit von NKT Zellen.....</i>	59
3.2.6	<i>In Abwesenheit von iNKT Zellen zeigen Makrophagen eine verminderte Aktivierung... ..</i>	61
3.2.7	<i>Immunologische Regulatoren werden nicht von der Abwesenheit von iNKT Zellen beeinflusst.....</i>	63
3.2.8	<i>Co-Housing vermindert die IFN γ Produktion von NK Zellen in CD1d-defizienten Mäusen.....</i>	65
4.	Diskussion.....	68
4.1	CCL17 wird von Dendritischen Zellen in einer Listerien-Infektion sekretiert	69
4.2	CCL17⁺ Dendritische Zellen sind stärker aktiviert als CCL17⁻ DZ.....	71
4.3	Alternatives Cross-Priming besitzt keinen signifikanten Einfluss auf die Generierung einer ZTL Antwort während einer Listerien-Infektion	72
4.4	Die Abwesenheit von CCR4 verstärkt eine Gedächtnisantwort gegen <i>Listeria monocytogenes</i>	74
4.5	NKT Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Listerien-Infektion.....	75
4.6	NK Zellen produzieren in Abwesenheit von CD1d mehr IFN γ als in Anwesenheit von Typ II NKT Zellen	77
4.7	In Abwesenheit von CD1d sind DZ und Makrophagen stärker aktiviert.....	79
4.8	Co-Housing verhindert den erhöhten Aktivierungsstatus in CD1d^{-/-}-Mäusen	80
5.	Zusammenfassung	82
6.	Literaturverzeichnis.....	83
7.	Abkürzungsverzeichnis.....	98

1. Einleitung

1.1 Überblick über das Immunsystem

Das Immunsystem hat eine große Bandbreite an Abwehrmechanismen entwickelt, um den Organismus vor eindringenden Pathogenen wie Viren oder Bakterien zu schützen. Ebenfalls stellt das Immunsystem Mechanismen zur Verfügung, welche der Identifikation und Eliminierung von entarteten körpereigenen Zellen dienen. Die Antwort auf eine Infektion verläuft mithilfe der zwei Arme des Immunsystems: das innate Immunsystem, welches Pathogene sehr schnell und unspezifisch bekämpft und das adaptive Immunsystem, dass erst einige Tage nach Aktivierung seine volle Funktion entfaltet und sehr spezifisch das jeweilige Pathogen abwehrt (Murphy 2011). Das innate Immunsystem besteht aus Zellen und Komponenten, welche z.B. eindringende Pathogene über sogenannte Mustererkennungs-Rezeptoren (*engl. pattern recognition receptors, PRRs*), wie Toll-like Rezeptoren (TLRs) oder Scavenger-Rezeptoren, erkennen können (Medzhitov and Janeway 2000). Zu diesem Teil des Immunsystems, welches eine schnelle und effiziente Immunreaktion herbeiführt, gehören unter anderem Makrophagen, NK (natürliche Killer) Zellen, Dendritische Zellen (DZ) und auch Granulozyten (siehe Abb.1.1) (Delves and Roitt 2000). Hierbei werden Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*engl. pathogen-associated molecular patterns, PAMPs*), wie spezifische Oberflächenstrukturen oder Charakteristika von Pathogenen *erkannt*, welche im menschlichen Organismus normalerweise nicht vorzufinden sind. Dies können Lipopolysaccharide (LPS), doppelsträngige Ribonukleinsäure (RNA) oder unmethylierte CpG Desoxyribonukleinsäure (DNA) sein. PRRs werden von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen, Lymphozyten, Epithelzellen und auch Endothelzellen exprimiert und sind entweder auf der Zelloberfläche, im Zytoplasma oder in endosomalen Vesikeln lokalisiert. Die Bindung von z.B. LPS an seinen spezifischen TLR (TLR4) führt zu einer Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen, welche eine Entzündungsreaktion auslösen und dem Immunsystem somit einen Gefahrenstatus signalisieren. Gelingt es den Zellen und Zytokinen des innaten Immunsystems nicht, eine Infektion erfolgreich einzudämmen und zu eliminieren, so kommt es zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems (Murphy 2011; Palm and Medzhitov 2009).

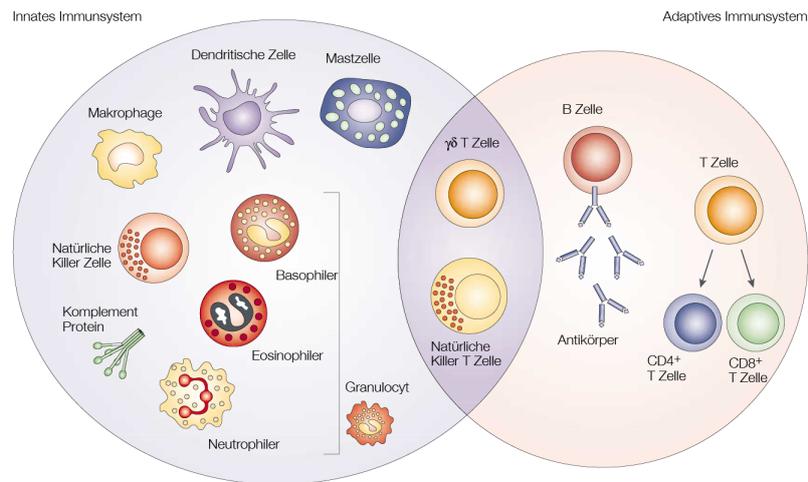


Abb.1.1: Überblick über das Immunsystem. Modifiziert nach Dranoff, 2004 (Nature Reviews Cancer)(Dranoff 2004).

Das adaptive Immunsystem stellt den zweiten Arm zur Bekämpfung von eindringenden Pathogenen dar. Es ist Antigen-spezifisch und kann in die durch B Zellen und deren Antikörper vermittelte humorale und eine Zell-vermittelte Immunantwort unterteilt werden. Träger der letzteren sind die T Zellen, die sich im Thymus entwickeln und in zwei Hauptklassen unterteilt werden: $CD4^+$ und $CD8^+$ T Zellen. $CD8^+$ T Zellen werden nach ihrer Aktivierung zytotoxische T Zellen (ZTL) genannt und induzieren Apoptose in ihren Zielzellen, welche mit einem Pathogen infiziert, beschädigt oder anderweitig nicht-funktional sind, wie z.B. Tumorzellen. ZTLs exprimieren einen T Zell-Rezeptor (TZR), welcher ein spezifisches Antigen im Kontext von MHC (*engl. major histocompatibility complex*)-I präsentiert, erkennen kann. Die zweite Hauptklasse an T Zellen stellen die $CD4^+$ T Zellen, deren größte Untergruppe Helfer T-Zellen sind, dar. Sie unterstützen die Funktion von ZTLs und B Zellen und können weiterhin in verschiedene Subtypen, je nach Zytokin Sekretionsmuster, unterteilt werden. $CD4^+$ T Zellen erkennen Antigen, welches im Kontext von MHC-II präsentiert wird. Wird ein Antigen unter inflammatorischen Bedingungen erkannt, so wird eine Immunreaktion ausgelöst, die durch die Aktivierung und Proliferation von Antigen-spezifischen T und B Zellen charakterisiert ist. Nach der Induktion einer Immunantwort differenzieren T Zellen in Effektorzellen, die der Bekämpfung der aktuell vorliegenden Infektion dienen, oder Gedächtniszellen, welche bei einem erneuten Kontakt mit dem Pathogen eine schnellere Immunantwort und Eradikation ermöglichen (Murphy 2011; Ahmed and Gray 1996).

1.2 DZ-Lizensierung und klassisches Cross-Priming

ZTLs sind in der Lage, sehr spezifisch und effektiv infizierte oder entartete Immunzellen im Rahmen einer adaptiven Immunantwort zu eliminieren. Die Initiierung der zytotoxischen Funktion von ZTLs muss allerdings einer separaten Kontrolle unterliegen, um zu verhindern, dass sie sich gegen gesunde körpereigene Zellen richten. Diese Funktion wird von dendritischen Zellen wahrgenommen, welche die Aktivierung der CD8⁺ T Zellen über drei Signale kontrollieren und somit sicherstellen, dass das von ihnen präsentierte Antigen auch im Rahmen einer Inflammation erkannt wird. Zum Einen wird das spezifische Antigen im Kontext von MHC-I auf der Oberfläche von Dendritischen Zellen präsentiert (Signal 1). Als zweite Ebene der T Zell Aktivierung werden Ko-Stimulatorische Moleküle benötigt, die aus der Immunglobulin Superfamilie (z.B. CD80 und CD86 auf Seite der DZ, die CD28 auf Seite der T Zelle (TZ) binden) oder aus der Tumor Nekrosis Superfamilie (z.B. CD40 auf Seite der DZ und CD40L auf Seite der TZ) stammen (Allison 1994; Thaiss et al. 2011). Als drittes wichtiges Signal gilt die Produktion von verschiedenen Zytokinen wie IL-12, IL-2 oder Typ I Interferon, die CD8⁺ T Zell-Differenzierung und klonale Expansion ermöglichen (Curtis, Johnson, and Mescher 2003). Um eine CD8⁺ T Zell-vermittelte Immunreaktion z.B. gegenüber intrazellulären Pathogenen, Viren oder gegen Tumore etablieren zu können, bedarf es eines molekularen Prozesses, bei dem exogen aufgenommene Antigene über den MHC-I Präsentationsweg an CD8⁺ T Zellen präsentiert werden. Dieser mechanistische Vorgang wird Kreuzpräsentation genannt (Kurts, Robinson, and Knolle 2010). Der zelluläre Effekt, bei dem eine immunogene ZTL Antwort durch ein Antigen hervorgerufen wird, welches nicht von der Antigen-präsentierenden Zelle (APZ) selbst produziert wurde, wird als Cross-Priming bezeichnet (Bevan 1976; Sigal et al. 1999). APZ, die am Besten für die Ausführung dieses Prozesses ausgerüstet sind, sind CD8⁺ XCR1⁺ DZ (Haan, Lehar, and Bevan 2000; Bachem et al. 2010). Eine Dendritische Zelle muss, um ZTL Antworten initiieren zu können, vollständig aktiviert sein, wie bereits durch die drei wichtigen Signale oben erläutert wurde. Eine solche, vollständig aktivierte DZ wird ‚lizensiert‘ genannt und bedarf der Hilfe von CD4⁺ T Zellen (Bennett et al. 1998; Banchereau and Steinman 1998; Lanzavecchia 1998). Dieser Vorgang der kognaten Lizensierung beruht auf dem Vier-Augen-Prinzip, sodass sowohl CD4⁺ T Zelle, als auch die zu aktivierende ZTL jeweils das gleiche Antigen über MHC-II (CD4⁺ T Zelle) oder über MHC-I (ZTL) präsentiert bekommen. Dieses ‚Einholen‘ einer zweiten Meinung dient der Sicherstellung der immunogenen Relevanz des Antigens und dem Ausschließen der Aktivierung von autoreaktiven T Zellen, welche trotz negativer Selektion im Thymus in der Peripherie vorzufinden sind. CD4⁺ T Zellen stellen hierbei

den aktivierenden CD40 Ligand auf ihrer Zelloberfläche zur Verfügung, der nach Kontakt mit CD40 auf der Oberfläche der Dendritischen Zelle zu einer Reifung der DZ in Form von Hochregulation von Adhäsions- und Ko-Stimulatorischen Molekülen und der Sezernierung von Zytokinen wie IL-12 führt (Cella et al. 1996). CD8⁺ zytotoxische T Zellen, die keine CD4 T Zell Hilfe während der Priming Phase erhalten, zeigen verminderte Effektorfunktionen und können keine adäquate Gedächtnisantwort generieren. Diese CD8⁺ T Zellen werden als ‚hilflose‘ ZTL bezeichnet (Qiu and Cui 2007). Um sicherzustellen, dass DZ, CD4⁺ T Zelle und CD8⁺ T Zelle mit der gleichen Pathogen-Spezifität möglichst schnell zueinander finden, produzieren DZ nach Lizenzierung durch CD4⁺ Helfer-Zellen Chemokine wie CCL3, CCL4 und CCL5, um somit naive ZTLs anzulocken, die ihrerseits den Rezeptor CCR5 auf der Zelloberfläche exprimieren (Castellino et al. 2006). ZTL besitzen die Fähigkeit nach ihrer Aktivierung auch CCR5 Liganden zu sezernieren, um somit weitere naive ZTL anzulocken, sodass diese DZ finden, die den Vorgang des klassischen Cross-Primings erfolgreich durchlaufen haben (Hugues et al. 2007).

1.2.1 Alternatives Cross-Priming

Als Grundlage für diese Dissertation wurde in unserem Labor der Mechanismus des alternativen Cross-Primings entdeckt. Hierbei konnte gefunden werden, dass NKT (natürliche Killer T) Zellen die Helfer-Funktion von CD4⁺ T Zellen übernehmen können, wenn das Lipidantigen α -Galactosyl-Ceramid (α GC) über das CD1d Molekül von DZ präsentiert wird. Anstelle der Produktion von Liganden für CCR5 konnte die Nutzung des Rezeptor Liganden Paares CCR4-CCL17/CCL22 ausgemacht werden (Semmling et al. 2010) (siehe **Abb.1.2**). Durch die Nutzung des Lipidantigens α GC konnte bereits im Vorfeld ermittelt werden, dass DZ nach NKT Zell Hilfe CD40-abhängig ZTLs aktivieren können, was wiederum von α GC vermittelt war (Nishimura et al. 2000). Das Lipidantigen besitzt die Fähigkeit Dendritische Zellen reifen zu lassen, indem es Oberflächenmoleküle wie CD40, CD80, CD86 oder auch MHC-II hochreguliert (Fujii et al. 2003). Die Erkennung des Lipidantigens führt bei NKT Zellen zur verstärkten Expression von CD40L, ähnlich wie bei CD4⁺ T Helferzellen beim klassischen Cross-Priming. In CD40-defizienten Mäusen konnte trotz Aktivierungsmarker Expression von DZ keine ZTL Antwort generiert werden. Ebenfalls führt die Aktivierung der NKT Zelle zu einer massiven Produktion von Zytokinen wie IFN γ und zur Hochregulation von Aktivierungsmarkern auf Seiten der DZ (Hermans et al. 2003; Fujii et al. 2004).

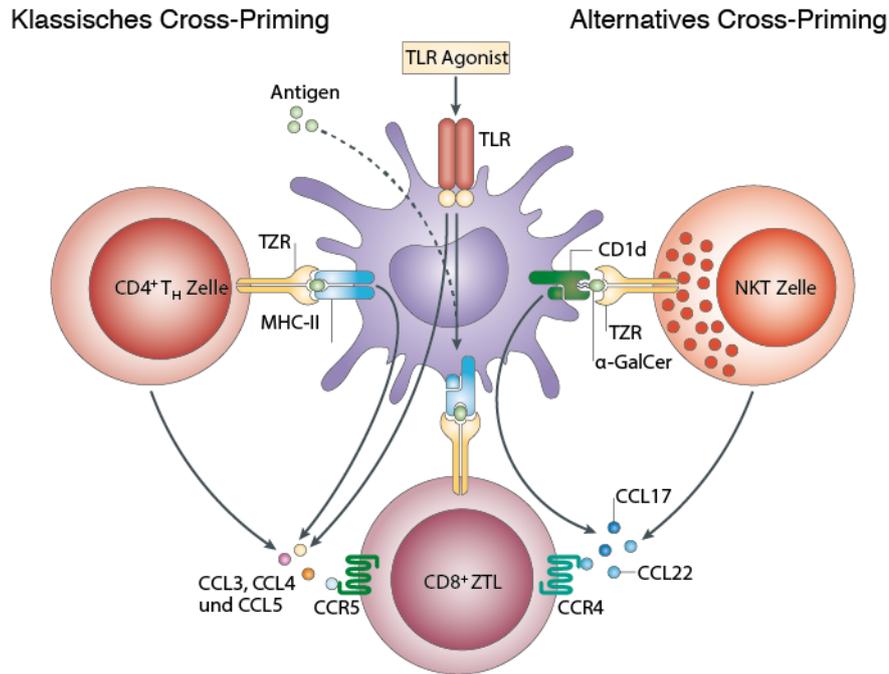


Abb.1.2: Klassisches und Alternatives Cross-Priming. Gezeigt ist der Mechanismus der DZ-Lizensierung entweder durch CD4⁺ T Zell-Hilfe (klassisches Cross-Priming, links) oder durch NKT Zell-Hilfe (alternatives Cross-Priming, rechts). Modifiziert nach Kurts et al., 2010 (Nature Reviews Immunology) (Kurts, Robinson, and Knolle 2010).

Die Studie von Semmling und Kollegen (Semmling et al. 2010) konnte zeigen, dass ein und dieselbe Dendritische Zelle Antigen an die NKT Zelle und an die ZTL präsentieren muss, um eine effiziente zytotoxische T Zell Antwort hervorzurufen. Alternatives Cross-Priming läuft dabei unabhängig vom klassischen Cross-Priming ab, da die Abwesenheit von CD4 T Zell Hilfe dieses nicht beeinträchtigt. Neben der Beteiligung von NKT Zellen als Helferzellen konnte vor allem eine Rolle von CCL17/CCL22 und CCR4 im alternativen Cross-Priming identifiziert werden. CCL17 wird hierbei von CD8⁺ DZ nach systemischer Gabe von αGC in der Milz produziert und kann naive CCR4-exprimierende ZTLs zu den Antigen-präsentierenden und lizensierten DZ leiten. Die CCL17-produzierende DZ war auch die APZ, die das kreuzpräsentierte Antigen den ZTLs auf ihrer Oberfläche via MHC-I präsentierte. Die Produktion des Chemokins CCL17 zur Rekrutierung von naiven CCR4-exprimierenden ZTLs ist dementsprechend eine spezifische Eigenschaft von lizensierten DZ.

1.2.2 CCR4 und CCL17

Chemokine sind chemotaktisch wirkende Zytokine und stellen somit wichtige Regulatoren der Migration von Immunzellen dar. Sie alle zeigen einen ähnlichen strukturellen Aufbau, der durch vier konservierte Cystein-Reste gekennzeichnet ist, die untereinander Disulfid-Brücken ausbilden können. Die sich ausbildende, charakteristische Sekundärstruktur mit sieben transmembran α -helikalen Domänen lässt sie zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehören (Rot and Andrian 2004; Zlotnik and Yoshie 2000). Chemokine sind durch ihre Redundanz gekennzeichnet, was bedeutet, dass verschiedene Chemokine an denselben Rezeptor binden können. Im klassischen Cross-Priming gibt es für den Rezeptor CCR5 gleich drei Liganden: CCL3, CCL4 und CCL5. Für den Rezeptor CCR4 konnten bis jetzt zwei Liganden identifiziert werden: CCL17 und CCL22 (Rot and Andrian 2004; Lieberam and Förster 1999). Der Rezeptor von CCL17 und CCL22, CCR4, wird auf einer großen Bandbreite an Zellen exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass CCR4 auf aktivierten T Zellen (vor allem T_H2 Zellen), Makrophagen, Monocyten, Blutplättchen, NK Zellen und Neutrophilen exprimiert wird (Biedermann et al. 2002; Maghazachi 2003; Andrew et al. 1998; Power et al. 1995; Mishalian et al. 2014). Für CCR4 wurde vor allem eine Rolle in T_H2 -medierten Entzündungen wie atopischer Dermatitis (Leung et al. 2003) oder auch in Autoimmunerkrankungen wie experimenteller autoimmun Enzephalomyelitis gefunden (Poppensieker et al. 2012). Hier sind sie für die Modulation von DZ Funktionen oder für die Migration von T_H2 Zellen an den Ort der Inflammation zuständig. Die Analyse von $CCR4^{-/-}$ -Mäusen zeigte, dass diese sich normal entwickeln können und das Fehlen von CCR4 keinen Einfluss auf die T_H2 Differenzierung *in vitro* hat. Allerdings konnte eine Rolle für CCR4 in LPS-induzierter Sepsis festgestellt werden, da hier $CCR4$ -defiziente Mäuse eine erhöhte Resistenz aufwiesen, was durch eine verringerte Anzahl von $F4/80^+$ Makrophagen in diesen Mäusen erklärt werden kann (Chvatchko et al. 2000). Neben der bereits beschriebenen Funktion von CCR4 konnten weitere in den folgenden Erkrankungsmodellen gefunden werden: Hodgkin Lymphome von T Zellen (Jones et al. 2000), Rheumatoider Arthritis (Katschke et al. 2001) oder auch in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Yuan et al. 2007).

CCL17 wird auch als TARC (*engl., thymus- and activation-regulated chemokine*) bezeichnet und gilt als vor allem DZ-spezifisches und sekretiertes Chemokin. In seiner Funktion als DZ-sezerniertes Chemokin ist es für die Migration von $CCR4$ -exprimierenden T Zellen zuständig (Lieberam and Förster 1999). Ein zweiter Ligand für CCR4, CCL22, wurde identifiziert, ist aber bislang nur wenig charakterisiert worden (Imai et al. 1998). CCL17 und CCL22 sind nicht auf dem Chemokin-Cluster auf Chromosom 11 lokalisiert, wie die meisten CC Chemokin-Gene,

sondern können zusammen mit CX₃CL1 auf dem Chromosom 8 detektiert werden (Zlotnik and Yoshie 2000). Die Expression von CCL17 konnte in verschiedenen Geweben wie Thymus, Lunge, Darm, Milz und Lymphknoten nachgewiesen werden und wird nicht von B oder T Zellen exprimiert (Lieberam and Förster 1999; Alferink et al. 2003; Semmling et al. 2010). CCL17 wurde eine Rolle in verschiedenen Krankheitsbildern zugeschrieben. Die prominenteste Funktion nimmt es in allergischen Reaktionen ein. In einem Modell zu allergischer, bronchialer Hyperreaktivität konnte in Abwesenheit von CCL17, durch den Einsatz eines blockierenden Antikörpers, das Krankheitsbild signifikant verbessert werden (Kawasaki et al. 2001). In CCL17-defizienten Mäusen wurde eine reduzierte T Zell-abhängige Kontakthypersensitivitätsreaktion festgestellt (Alferink et al. 2003) und Patienten mit atopischer Dermatitis wiesen eine erhöhte Produktion des Chemokins CCL17 auf (Horikawa et al. 2002). In anderen Autoimmunerkrankungen erfolgt eine Immunpathogenese durch die Rolle von DZ-sezernierten CCL17 in der Regulation von regulatorischen T Zellen (T_{reg}) Funktionen. So konnte in einem Kolitis-Modell gezeigt werden, dass CCL17 die Produktion von inflammatorischen Zytokinen von DZ fördert und die Expansion von T_{regs} reduziert, was in einem entzündlichen Th1-Phänotyp resultierte (Heiseke et al. 2012). Derselbe Mechanismus von DZ-produziertem CCL17, welcher zu einer verminderten T_{reg} Expansion führt, konnte in muriner Arteriosklerose nachgewiesen werden (Weber et al. 2011). Während einer Hepatitis C Virus (HCV) Infektion im Menschen wurde ermittelt, dass DZ nach Kontakt mit HCV-infizierten Zellen CCL17 produzieren und somit T_{regs} in der Leber akkumulieren (Riezu-Boj et al. 2011). Neben der Funktion von CCL17 T_{regs} zum Ort einer Inflammation zu leiten, konnten mehrere Studien eine Produktion von CCL17 nach Infektion mit einem Pathogen ermitteln. So wird CCL17 von murinen Langerhans Zellen nach der Stimulation mit Komponenten der Zellwand von *S. aureus* sezerniert (Matsui, Tofukuji, and Ikeda 2015) oder nach Stimulation von BMDCs (engl. bone marrow-derived DCs) mit Filarien-Extrakten (Specht et al. 2011). In einer Infektion mit Helminthen stieg der Gehalt von CCL17 im Serum von infizierten Patienten deutlich an (Geiger et al. 2013). Die Funktion der CCR4-CCL17 Achse in einer Immunreaktion ist sehr breit angelegt, kann pro- oder anti-inflammatorische Prozesse antreiben und somit einen wichtigen Einfluss auf den Ausgang von Immunreaktionen nehmen.

1.3 Natürliche Killer T Zellen

Natürliche Killer T Zellen stellen eine spezialisierte Untergruppe von Lymphozyten dar, welche sowohl Eigenschaften des innaten als auch des adaptiven Immunsystems in sich vereinigen. Sie spielen damit eine wichtige Rolle in verschiedenen immunologischen Szenarien wie zum Beispiel den Erhalt von Selbst-Toleranz oder in der effektiven Überwachung von Tumoren (Parekh, Wilson, and Van Kaer 2005). Ihre duale Rolle in der Ausführung von innaten und adaptiven Funktionen spiegelt sich auch in der Komposition ihrer Oberflächenrezeptoren wider. Diese beinhaltet sowohl phänotypische Marker von NK Zellen als auch von T Zellen. Der T Zell Rezeptor einer NKT Zelle kann mit einer breiten Auswahl an Selbst- und Fremdantigenen reagieren und innerhalb von kürzester Zeit in ihrer innaten Funktion Zytokine und Chemokine sekretieren. Ihre T Zell Rezeptor Komposition ist an ihre Rolle in der adaptiven Immunantwort angelehnt. Die jeweilige Zusammensetzung des TZR lässt die NKT Zellen in zwei verschiedene Subtypen unterteilen. Typ I oder invariante NKT Zellen (iNKT Zellen) besitzen einen semi-invarianten TZR bestehend aus einem in der Keimbahn kodierten V alpha Gen (V alpha 14 / J alpha 18 in Mäusen), wo hingegen Typ II NKT Zellen oligoklonale TZR tragen, die Antigene wie Sulfatid erkennen (Bendelac, Savage, and Teyton 2007; Godfrey and Kronenberg 2004; Kumar and Delovitch 2014). iNKT Zellen sowohl aus der Maus als auch aus dem Menschen reagieren auf das Glycolipid-Antigen α GC, welches aus einem marinen Schwamm (*Agelas mauritanus*) extrahiert wurde, mit einer Produktion von verschiedenen Zytokinen, welche wiederum Immunzellen wie NK Zellen, B Zellen, T Zellen oder auch Dendritische Zellen aktivieren können. In der Maus repräsentieren sie ca. 0.5 % aller T Zellen im Blut, 2 % in den sekundären lymphatischen Organen und über 30 % aller T Zellen in der Leber. Während einer Entzündungs- und Immunreaktion können die iNKT Zellen in verschiedenen Organen, wie dem Pankreas in Typ I Diabetes oder in der Lunge bei Asthma, in ihrer Anzahl stark ansteigen (Akbari et al. 2003; Sharif et al. 2001). Im menschlichen Blut sind nur 0.1 - 0.2 % der T Zellen iNKT Zellen, was einer 5-fach geringeren Menge verglichen mit den sekundären lymphatischen Organen oder der Leber entspricht (P. T. Lee et al. 2002). iNKT Zellen exprimieren eine invariante TZR alpha Kette (V α 24 J α 18 im Menschen oder V α 14 J α 18 in der Maus) und eine limitierte Zusammenstellung an TZR beta Ketten (V β 11 im Menschen oder V β 8.2, V β 7 oder V β 2 in Mäusen) (Godfrey et al. 2004). Der NKT TZR erkennt Lipidantigene, welche über das nicht-polymorphe MHC-I ähnliche Molekül CD1d präsentiert werden. Hierbei formen die schwere Kette des CD1 Moleküls und ein β_2 -Mikroglobulin einen Heterodimer-Komplex auf APZ und können dank Bildung einer

tiefen hydrophoben Tasche Lipidantigene binden (Zeng et al. 1997; Porcelli 1995). Durch die Etablierung von hilfreichen Techniken wie CD1d-Tetramere, CD1d-defiziente Mäuse (ohne NKT Zellen) oder α 18-defiziente Mäuse (ohne iNKT Zellen) (Benlagha et al. 2000; Matsuda et al. 2000; Kawano et al. 1997) konnte eine zuverlässige Identifikation von NKT Zellen erfolgen. Dies ist vor allem von höchster Wichtigkeit, wenn die große Menge an verschiedenen Zytokinen, die von NKT als auch von NK Zellen in inflammatorischen Umgebungen produziert werden, bedacht wird. NKT Zellen sind durch ihre mannigfaltigen Fähigkeiten in den Fokus bei der Behandlung von Krebs oder Autoimmun- und inflammatorischen Krankheiten gerückt. Hierbei stellen sie vielversprechende Untersuchungsobjekte für die Entwicklung von Vakzin-Adjuvantien und Immunotherapien dar. Verschiedene klinische Studien haben gezeigt, dass infolge der Aktivierung von iNKT Zellen durch ihren Liganden α GC robuste ZTL und Antikörper Antworten generiert werden können (siehe Review (Padte et al. 2011; Carreño, Kharkwal, and Porcelli 2014; Faveeuw and Trottein 2014)).

1.3.1 Aktivierung von Natürlichen Killer T Zellen

Die Aktivierung von NKT Zellen und die jeweilige anschließende Produktion von Zytokinen und Chemokinen ist abhängig von der initialen Signalherkunft: entweder durch TZR-Stimulation oder durch die Aktivierung mittels Zytokinen. Eine große Anzahl von Mikroorganismen besitzen keine NKT Zell-aktivierenden Antigene und somit findet meistens eine Aktivierung der NKT Zelle über Zytokin-vermittelte Signale in Kombination mit endogenen Antigenen statt. Es kann also unterschieden werden zwischen Infektionen, bei denen NKT Zellen durch ein Antigen des Pathogens aktiviert werden und solchen, bei denen eine Kombination aus inflammatorischen Zytokinen und körpereigenen NKT Zell-Liganden zu einer Aktivierung führt. Im Folgenden soll es zunächst um erstere Variante gehen. Die klassische Aktivierung von iNKT Zellen ist durch die Erkennung von Lipidantigenen präsentiert auf CD1d an den TZR vermittelt. Wie bereits erwähnt, wurden die meisten Erkenntnisse zur Aktivierung von iNKT Zellen durch die Nutzung von α GC gewonnen. Neben diesem starken und prototypischen Adjuvants konnten verschiedene mikrobielle Glykolipide ermittelt werden, welche iNKT Zellen zur Zytokin Produktion anregen. Glykolipide von Bakterien wie *Sphingomonas* (alpha-Glukuronosylceramid), *Helicobacter* (Cholesteryl alpha-Glukosid) oder *Borrelia* (Diacylglycerol-enthaltene Glykolipide) führen zu einer nachhaltigen Aktivierung von iNKT Zellen, welche anschließend inflammatorische Zytokine wie IFN- γ , IL-4 oder IL-17 sezernieren. Diese Zytokin Produktion ist unabhängig von TLR Stimulation, IL-12 oder der Erkennung von endogenen Antigenen (Y.-J. Chang et al. 2011; Y. Kinjo et al. 2011). Das in *Sphingomonas* vorhandene

Glykolipidantigen induziert die Sezernierung von IL-4 und IFN γ in iNKT Zellen, ähnlich der von α GC hervorgerufenen Reaktion (Y. Kinjo et al. 2005; Mattner et al. 2005; Y. Kinjo et al. 2006). Es konnte gezeigt werden, dass Dendritische Zellen beladen mit α GC oder *Sphingomonas* Glykolipiden die Freisetzung von IFN γ und IL-4 fördern, wobei hauptsächlich IFN γ von den iNKT Zellen sezerniert wird (Fujii et al. 2002; Y. Kinjo et al. 2005). Die Mehrheit der murinen und humanen iNKT Zellen können diese beiden Antigene erkennen, was auch an deren ähnlichem strukturellen Aufbau liegt (Kawano et al. 1997). Gram-negative Bakterien wie *Sphingomonas* kommen in der Umwelt reichlich vor und könnten somit die Schwammprobe besiedelt haben, aus welcher α GC identifiziert worden ist. Die Nutzung von synthetischen Versionen des exogenen iNKT Zell Adjuvanz α GC wurde intensiv studiert und zeigte die Funktion des invarianten TZR als einen Muster-Erkennungsrezeptor auf (Mallevaey and Selvanantham 2012). Diese Erkenntnisse gingen mit einer vermehrten Erforschung von therapeutischen und aktivierenden Funktionen von iNKT Zell Agonisten einher. Hierbei sollte stets bedacht werden, dass iNKT Zell Aktivierung auch allergischen Erkrankungen der Luftwege oder zur Anergie der Zellen infolge einer Überstimulation führen kann (Parekh et al. 2005; Oki and Miyake 2007). Neben der Aktivierung von iNKT Zellen durch die Erkennung von Lipidantigen über den TZR, können iNKT Zellen durch Zytokine aktiviert werden. Die meisten Mikroorganismen, welche in der Lage sind, iNKT Zellen zu stimulieren, besitzen kein passendes Antigen sondern Zytokine wie IL-12 oder IL-18 substituieren für diesen nicht vorhandenen Stimulus. Einige bakterielle und virale Infektionen können in der Abwesenheit von TZR Signalwegen eine robuste IL-12 Produktion in DZ generieren, welche ihrerseits iNKT Zellen *in vivo* aktivieren können (Brigl et al. 2003; Wesley et al. 2008). Die *in vitro* Stimulation oder Infektion mit verschiedenen bakteriellen Mikroorganismen von DZ resultierte in einer substantiellen IFN γ Produktion von iNKT Zellen, die vor allem IL-12 abhängig war. Dies konnte sogar für *Sphingomonas* oder *Streptococcus* gezeigt werden, bei denen man weiß, dass sie iNKT Zell stimulierende Antigene besitzen (Brigl et al. 2011). Durch eine hohe IL-12 Rezeptor Expression und eine nachfolgende IL-12 induzierte STAT-4 Aktivierung sind iNKT Zellen exzellent prädisponiert für eine schnelle, Zytokin-vermittelte Aktivierung. Bei MHC-I abhängigen T Zellen wird im Vergleich dazu die IL-12 Rezeptor Expression erst nach TZR-vermittelter Aktivierung hochreguliert. Dieser indirekte Weg der iNKT Zell-Aktivierung resultiert in einer verstärkten IFN γ Produktion und ist nicht vermittelt durch TLR Liganden wie TLR2, TLR4, TLR5, TLR8 oder TLR9 für die gezeigt wurde, dass sie iNKT Zellen *in vitro* und *in vivo* stimulieren können (Paget et al. 2007; Salio et al. 2007; Tyznik et al. 2008; Wesley et al. 2008) untersuchten die Immunantwort in CD1d-defizienten Mäusen gegen das Pathogen *Aspergillus fumigatus* und konnten zeigen, dass eine innate Erkennung von β -1,3 Glukan, einem Polysaccharid als Hauptbestandteil der Pilzzellwand, durch

NKT Zellen stattfindet und dies somit in den CD1d-defizienten Mäusen zu einer schlechteren Kontrolle der Pilzinfektion führt. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die iNKT Zell Polarisierung durch das inflammatorische Milieu bestimmt wird, wenn die Aktivierung unabhängig vom TZR stattfindet. Durch die mannigfaltigen Mechanismen, mit welchen iNKT Zellen aktiviert werden können und die darauf folgende Produktion von Zytokinen wurden funktionelle iNKT Zell Subtypen postuliert. Diese wurden analog zu den MHC-I abhängigen T Zell Subtypen gewählt: NKT1, NKT2, NKT17, NKT_{FH} und NKT10. Hierbei produzieren NKT1 Zellen vor allem IFN γ und sind der dominante Subtyp in C57BL/6 Mäusen. In Balb/c Mäusen wurde im Gegensatz dazu hauptsächlich der NKT2 Subtyp in Milz und Thymus gefunden, der vor allem IL-4 produziert (Crowe et al. 2005; Y. J. Lee et al. 2013). NKT17 Zellen sind charakterisiert durch die Produktion des Zytokins IL-17 und IL-22 und als ein Subtyp von hepatischen iNKT Zellen entdeckt worden. Sie werden durch α GC induziert und kommen vor allem in den Lymphknoten, in der Lunge und in der Haut von Mäusen mit Atemwegsneutrophilie vor (Michel et al. 2007). Ebenfalls ist bekannt, dass dieser iNKT Zell Subtyp IL-7 für seine Homöostase und sein Überleben benötigt (Webster et al. 2014) und die Aktivierung in der Anwesenheit von TGF- β und IL-1 β geschieht (Monteiro et al. 2013). Der kürzlich entdeckte NKT10 Subtyp kann durch die Sezernierung von IL-10 Immunantworten abschwächen und wird vor allem in adipösem Gewebe gefunden, in welchem iNKT Zellen vor Fettleibigkeit-induzierten Entzündungen und Stoffwechselerkrankungen schützen können (Lynch et al. 2012).

1.3.2 Natürliche Killer T Zellen in Interaktion mit anderen Immunzellen

iNKT Zellen sezernieren während einer Immunreaktion viele verschiedene Zytokine und Chemokine, welche wiederum andere Zellen des innaten und adaptiven Immunsystems beeinflussen können. Nachfolgend soll ein kurzer Überblick über die Interaktionsmöglichkeiten von iNKT Zellen mit anderen Immunzellen gegeben werden (siehe **Abb.1.3**). Ein äußerst wichtiger Interaktionspartner von iNKT Zellen stellen Dendritische Zellen dar. Durch ihre konstitutive Expression von CD1d sind sie in der Milz der Hauptzelltyp für die Aktivierung von iNKT Zellen (Brennan, Brigl, and Brenner 2013). Nach der Aktivierung von iNKT Zellen durch die Erkennung von Lipidantigenen präsentiert über CD1d sekretieren diese große Mengen IFN γ , welches der Aktivierung von NK Zellen dienen kann (Fujii et al. 2004). Nach der Erkennung von mikrobiellen PAMPS produzieren Dendritische Zellen IL-12 und erhöhen die Präsentation von Selbst-Lipid-Antigenen, was zu einer verstärkten Aktivierung von iNKT Zellen führt (Paget et al. 2007; Salio et al. 2007). Die Produktion von IL-12 nach Interaktion von iNKT TZR und CD1d-

Lipid-Komplex wird zudem weiter durch eine Interaktion zwischen CD40- und CD40L-Molekülen erhöht, welche von den DZ beziehungsweise den NKT Zellen exprimiert werden.

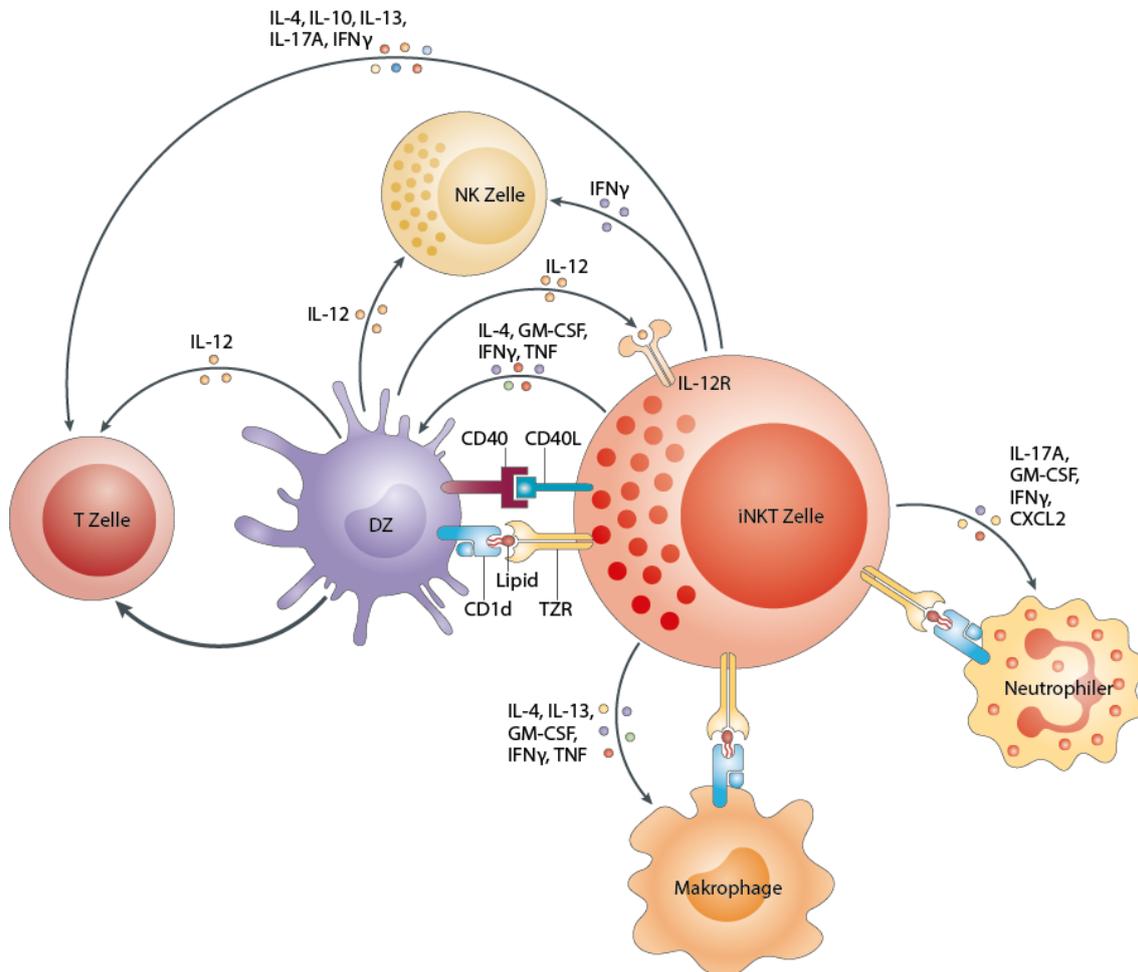


Abb.1.3: Interaktionsmöglichkeiten von iNKT Zellen mit anderen Zellen des innaten und adaptiven Immunsystems. Gezeigt sind verschiedene Wechselbeziehungen von iNKT Zellen mit T Zellen, NK Zellen, Dendritischen Zellen (DZ), Makrophagen und Neutrophilen. Modifiziert nach Brennan et al., 2013 (Nature Reviews Immunology) (Brennan, Brigl, and Brenner 2013).

Diese Interaktion kann zu der Lizenzierung von DZ und somit zum alternativen Cross-Priming führen, so wie in Abschnitt 1.3.2 beschrieben. Die Lizenzierung der DZ führt zu der Aktivierung von ZTL und somit zur Induktion einer zytotoxischen T Zell-Antwort (Semmling et al. 2010). Sowohl durch die Produktion von IL-12 von Dendritischen Zellen als auch von IFN γ ausgehend von iNKT Zellen, können NK Zellen aktiviert werden, sodass sie z.B. in einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* selbst verstärkt IFN γ produzieren können (siehe Abschnitt 1.4.1). Neben Dendritischen Zellen können auch Makrophagen Lipidantigene an iNKT Zellen

präsentieren und befinden sich in großer Anzahl in der Leber, hier als Kupffer- und Sternzellen, wo sie in der Blutbahn sich befindende Pathogene aufnehmen und eliminieren können (Schmiege et al. 2005; Winau et al. 2007). Im Gegenzug kann das von iNKT Zellen sezernierte Repertoire an Zytokinen, wie z.B. IFN γ , Makrophagen aktivieren und in einer Infektion mit *P. aeruginosa* die bakteriozide Aktivität von Lungenmakrophagen steigern (Nieuwenhuis et al. 2002). Die Produktion von IL-4 und IL-13 von iNKT Zellen kann zur Polarisierung zu dem anti-inflammatorischen M2-Phänotyp von Makrophagen führen, was z.B. bei Erkrankungen der Lunge einer erfolgreichen Bekämpfung der Infektion entgegenstehen kann (E. Y. Kim et al. 2008). iNKT Zellen spielen ebenfalls eine essentielle Rolle in der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten während einiger bakterieller Infektionen. Dies geschieht durch die Sekretion von CXCL12 durch iNKT Zellen z.B. nach Infektion mit *S. pneumoniae* (Kawakami et al. 2003). iNKT Zellen können mit einer Vielzahl von Immunzellen auf verschiedene Arten interagieren und spielen somit eine wichtige Rolle in der Initiation und Regulation von Immunantworten.

1.3.3 Mikrobiota und Natürliche Killer T Zellen

Vor allem im Gastrointestinaltrakt befinden sich verschiedenste Populationen an sogenannten kommensalen Bakterien. Diese stehen immer häufiger im Fokus von wissenschaftlichen Untersuchungen, da diese sogenannten Mikrobiota einen starken Einfluss auf die Kontrolle von Wirtsimmunität und der Verhinderung von immunvermittelten Krankheiten, wie z.B. Asthma, haben (Hooper, Littman, and Macpherson 2012). Mäuse, welche von keinerlei Bakterien kolonialisiert wurden (germ-free Mäuse) oder welche in der Neugeborenen-Phase mit einem Breitbandantibiotikum behandelt wurden, zeigten eine starke Veränderung verschiedener Komponenten des innate und adaptiven Immunsystems (Zeissig and Blumberg 2014a). Hierbei stellte sich heraus, dass NKT Zellen eine essentielle Rolle in der Regulierung von Wirt-Mikrobiota Interaktionen an Schleimhäuten einnehmen und sowohl CD1d als auch NKT Zellen die Kolonisierung mit Kommensalen beeinflussen können. Ebenso wird die Entwicklung und Reifung von NKT Zellen stark von der mikrobiellen Besiedlung des Gastrointestinaltrakts beeinflusst (Zeissig and Blumberg 2014b). Somit besteht die Möglichkeit, dass in der Abwesenheit von NKT Zellen oder von CD1d die Mikrobiota in ihrer Zusammensetzung verändert wird und damit Einfluss auf den Ausgang einer Immunreaktion nehmen kann. Analysiert man germ-free Mäuse, wird deutlich, dass diese mehr iNKT Zellen in Lunge und Darm aufweisen. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass iNKT Zellen aus der Milz von germ-free Mäusen eine reduzierte Expression von Aktivierungsmarkern auf ihrer Zelloberfläche und eine verringerte Zytokinproduktion aufwiesen (Olszak et al. 2012; Wingender et al. 2012). In

der Publikation von Wingender (2012) (Wingender et al. 2012) wurde ein Unterschied sowohl in der Anzahl an NKT Zellen als auch in der Menge an Zytokinen, die diese produziert haben deutlich, wenn man WT (Wildtyp) Mäuse von verschiedenen Herstellern untersuchte. Dieser Unterschied war nach dem gemeinsamen Co-Housing nicht mehr ermittelbar. Beim Co-Housing (gemeinsame Haltung von Mäusen verschiedenen Genotyps in einem Käfig) von Mäusen mit verschiedenen Mikrobiota kann nach vier Wochen davon ausgegangen werden, dass sich die Mikrobiota zwischen den Mäusen angeglichen hat. In einer weiteren Studie wurde die epigenetische Struktur des CXCL16 Locus untersucht und es zeigte sich, dass dieser in germ-free Mäusen hypermethyliert ist und diese Mäuse folglich eine erhöhte CXCL16 Expression aufweisen, was zu einer verstärkten CXCL16-abhängigen Migration von iNKT Zellen in Schleimhäuten führte (Olszak et al. 2012). Neben dem nachgewiesenen Einfluss der Mikrobiota auf die Differenzierung und Aktivierung von NKT Zellen, können wiederum diese einen Einfluss auf die Mikrobiota und ihre Zusammensetzung nehmen. In einer Studie in CD1d-defizienten Mäusen konnte 2009 gezeigt werden, dass die Lungen der NKT Zell-defizienten Tiere stärker mit *P. aeruginosa* besiedelt sind und dies auch im Gastrointestinaltrakt der Fall ist. Es wurde ebenfalls nachgewiesen, dass in germ-free Mäusen CD1d für die Kolonialisierung durch Gram-positive und Gram-negative kommensale Bakterien mitverantwortlich ist, indem die Paneth-Zellfunktion von NKT Zellen reguliert wird. Ein gravierender Unterschied in der Zusammensetzung der kommensalen Mikrobiota zwischen CD1d^{-/-}-Mäusen und WT Mäusen unter SPF (*engl. specific pathogen free*) Bedingungen wurde ebenso detektiert (Nieuwenhuis et al. 2009). Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sowohl die Mikrobiota die Entwicklung und Differenzierung von NKT Zellen als auch NKT Zellen und CD1d die Zusammensetzung der Mikrobiota beeinflussen können.

1.4 Infektion mit *Listeria monocytogenes* und Natürliche Killer T Zellen

Listeria monocytogenes (Lm) ist ein gram-positives Bakterium und wurde erstmals in den späten 1970er Jahren als humanpathogenes Bakterium nach einem ersten epidemischen Ausbruch anerkannt (Stavru, Archambaud, and Cossart 2011). 1986 wurde es als eine Lebensmittelinfektion identifiziert (Schlech et al. 1983), die vor allem Immunkomprimierte - wie Schwangere oder Kleinkinder - besonders bedroht und sich in einer Sepsis oder einer Meningitis äußern kann (Gellin and Broome 1989). In gesunden Individuen kann ein Befall mit Listerien zu einer Gastroenteritis führen. So wurden bei einer Epidemie im Jahr 2011 in

Colorado, USA 146 Menschen infiziert, wobei es zu einer Sterblichkeit von ca. 20% kam (Williams, Schmidt, and Lenz 2012). Eine Kontamination von Lebensmitteln mit Lm ist vor allem der Möglichkeit des Bakteriums bei einer großen Bandbreite an Lebensbedingungen, wie Temperaturen unter 4°C oder hohen Salzkonzentrationen zu überleben und sich replizieren zu können, geschuldet (Cossart 2011). Das gram-positive Bakterium repliziert im Zytosol von eukaryotischen Zellen und durch die Hilfe von verschiedenen zellbiologischen Techniken und transgenen Mauslinien ist der Ablauf einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* mittlerweile gut erforscht: Nach der Aufnahme von kontaminierten Lebensmitteln befällt Lm das intestinale Epithelium und wird durch den Blutstrom in die Leber und Milz getragen (Czuprynski and Haak-Frendscho 1997). Eine Besonderheit von Lm ist seine Fähigkeit, den Kontakt mit Bestandteilen des Immunsystems - wie Komplement oder Antikörper - durch Zell-Zell-Ausbreitung zu vermeiden und die Möglichkeit aus dem hydrolytischen Phagosom mittels Sekretion des Poren-formenden Toxins LLO (Listeriolysin O) nach Infektion einer Zielzelle zu entkommen (Portnoy, Jacks, and Hinrichs 1988; Lara-Tejero and Pamer 2004). Die Ausbreitung von Zelle zu Zelle und die Bewegung innerhalb der Wirtszelle wird durch Aktin-Polymerisation ermöglicht. Bereits 30 Minuten nach einer Infektion können freie Pathogene im Zytosol der Zelle detektiert werden (Beauregard et al. 1997; Cossart 2002). Durch die genauen Kenntnisse des Infektionsmechanismus von Lm stellt es einen guten Modellorganismus zur Aufklärung von wichtigen immunologischen Fragestellungen dar. Durch die systemische Infektion in Mäusen kann sowohl die innate als auch die adaptive Immunantwort untersucht werden. In den folgenden Abschnitten soll auf die eingeleitete Immunantwort nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* eingegangen werden; mit besonderem Fokus auf die Rolle von NKT Zellen während der Bekämpfung dieses Pathogens.

1.4.1 Innate Immunantwort einer Listerien-Infektion

Viele Zelltypen des innaten Immunsystems beteiligen sich an der Abwehr intrazellulärer Pathogene. So können sie auch die Infektion mit Lm eindämmen, allerdings sind innate Mechanismen allein nicht in der Lage eine bakterielle Infektion mit diesem Pathogen komplett zu eliminieren. Hierfür bedarf es der adaptiven Immunantwort (siehe Abschnitt **1.4.2**). Vor allem Neutrophile, Makrophagen, NK Zellen und Dendritische Zellen spielen eine wichtige Rolle in der initialen Immunantwort. Durch Studien an transgenen Mäusen, denen wichtige Komponenten des innaten Immunsystems wie IFN γ und TNF α fehlen, konnte gezeigt werden, dass diese eine elementare Rolle in der Bekämpfung einer Listerien-Infektion spielen, da diese Mäuse besonders anfällig sind (Harty and Bevan 1995; White et al. 2000). Das in der initialen

Infektion von NK Zellen produzierte IFN γ führt zu einer Aktivierung von Makrophagen, die unter anderem NOS und ROS produzieren und bakteriozide Funktionen ausüben (Tripp, Wolf, and Unanue 1993; Stavru, Archambaud, and Cossart 2011). Auf zellulärer Ebene sind Neutrophile und Makrophagen vor allem für das Töten von eindringenden Bakterien verantwortlich (Conlan and North 1994; Czuprynski et al. 1994). In der Milz werden eindringende Pathogene aus dem Blut durch myeloide Zellen in der Marginalzone gefiltert, wie zum Beispiel Marginalzonen Makrophagen (MZ MOs), F4/80⁺ Makrophagen (Rote Pulpa Makrophagen, RPMs) oder Dendritische Zellen (Conlan 1996; Neuenhahn et al. 2006; Aoshi et al. 2009). Makrophagen, die mit Lm infiziert sind, produzieren die Signalstoffe TNF α und IL-12, die ihrerseits NK Zellen aktivieren. Infizierte Dendritische Zellen können IL-12 und auch IL-18 sezernieren, was ebenfalls zur Aktivierung von NK Zellen und T Zellen beiträgt. Hierbei wird IL-12 vor allem von CD8⁺ DZ sezerniert (Tripp, Wolf, and Unanue 1993; Humann and Lenz 2010; Mitchell et al. 2011). 24 Stunden nach Infektion mit Lm produzierten über 70% der NK Zellen IFN γ , was den Höhepunkt der NK Zell Aktivierung und IFN γ Sezernierung darstellt (Humann et al. 2007). Werden DZ während einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* depletiert, ist die NK Zell Aktivierung eingeschränkt, jedoch bedarf es keines direkten Kontakts mit DZ, um eine vollständige NK Zell Aktivierung zu gewährleisten (Humann et al. 2007; Lucas et al. 2007; Kang et al. 2008). Ebenfalls 24 Stunden nach Infektion befinden sich die meisten Bakterien in der T Zell Zone und sind mit CD8⁺ DZ assoziiert (Neuenhahn et al. 2006), die somit einen entscheidenden Eintrittspunkt des Pathogens in den Organismus darstellen. Neuenhahn und Kollegen konnten außerdem zeigen, dass eine große Anzahl an CD8⁺ DZ, aber nicht CD8⁻ DZ, schon ein bis drei Stunden nach Infektion einen Großteil der lebenden Bakterien enthielt und diese sich vor der Infektion in der Marginalzone und Roten Pulpa der Milz aufhielten. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass in Mäusen, die defizient für den Haupttranskriptionsfaktor für CD8⁺ DZs *batf3* waren, eine 10-fach geringere Menge an Listerien einen Tag nach Infektion vorhanden war. Zusätzlich zu der verringerten bakteriellen Last verminderte die Abwesenheit von CD8⁺ DZ den Transport von Bakterien in die T Zell-Zone (Edelson et al. 2011). CD8⁺ Dendritische Zellen spielen somit eine wichtige Rolle in der Etablierung einer systemischen Lm Infektion und dienen als initialer Replikationsort. Sie haben ebenfalls einen großen Anteil an der Induktion der adaptiven Immunantwort, die die eindringenden Bakterien nach ca. 4-10 Tagen eliminieren kann und ein langlebiges immunologisches Gedächtnis gegenüber einer Listerien-Infektion etabliert.

1.4.2 Adaptive Immunantwort einer Listerien-Infektion

Eine Infektion mit *Listeria monocytogenes* wird als Modellsystem vor allem für Zell-vermittelte adaptive Immunität verwendet. Die adaptive Immunantwort nach einer Listerien-Infektion ist T Zell-vermittelt, wobei sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T Zellen eine essentielle Rolle spielen. Sie führt zu einer vollständigen Eliminierung des Pathogens (Stavru, Archambaud, and Cossart 2011). CD8⁺ Dendritische Zellen können am effizientesten Listeria-Antigene präsentieren (Belz et al. 2002). Ihre Fähigkeiten zum Cross-Priming sind essentiell für die Generierung einer optimalen Immunantwort (Reinicke et al. 2009; Mitchell et al. 2011). Ebenfalls ist es denkbar, dass exogene Listerien-Antigene über MHC-I kreuzpräsentiert werden (Edelson 2012). Jung und Kollegen (2002) (Jung et al. 2002) konnten zeigen, dass die in vivo Depletion von DZ zu einem Verlust der ZTL Antwort führt. Dies wurde von einer weiteren Gruppe im Jahr 2005 bestätigt (Muraille et al. 2005). Allerdings muss bedacht werden, dass in diesen Mäusen eine viel geringere bakterielle Last vorliegt, sodass mit der Applikation von äquivalenten Mengen infektiöser Bakterien gezeigt werden konnte, dass eine robuste T Zell-vermittelte Immunantwort in *Batf3*^{-/-}-Mäusen generiert werden kann (Edelson et al. 2011). Demgegenüber steht eine Studie, welche in Mäusen durchgeführt wurde, die defizient für den Chemokinrezeptor XCR1 sind, der spezifisch auf CD8⁺ DZ exprimiert wird. Hierbei wurde gezeigt, dass diese Mäuse nach Infektion mit *Listeria* keine frühe T Zell-Antwort generieren können, trotz einer hohen bakteriellen Last in der Milz (Croizat et al. 2010). Somit ist derzeit noch unklar, wie wichtig CD8⁺ DZ für die Generierung der anti-*Listeria* T Zellantwort sind. CD8⁺ T Zellen sind effektiv in der Bekämpfung einer Listerien-Infektion, was vor allem an deren Fähigkeit liegt, infizierte Zellen durch die Sekretion von Perforin und Granzym zu lysieren. Ebenfalls können sie IFN γ sekretieren und somit die bakteriozide Aktivität von Makrophagen aktivieren (Stavru, Archambaud, and Cossart 2011). ZTLs sind verantwortlich für die letztendliche Eliminierung der Listerien-Infektion. Sie sorgen bei gleichzeitiger Anwesenheit von CD4⁺ T Helferzellen für eine langanhaltende Immunität gegenüber einer Zweitinfektion mit demselben Pathogen. Es findet eine gleichwertige Expansion der CD4⁺ T Zellen im Vergleich mit ZTLs nach *Listeria*-Infektion statt (Skoberne et al. 2002) allerdings kann eine normale ZTL Antwort bei erstmaligem Kontakt mit *Listeria* in Abwesenheit von CD4⁺ T Zellen generiert werden. T Zell Hilfe ist nach einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* vor allem für die Etablierung einer langlebigen ZTL Gedächtnisantwort von Nöten (Shedlock and Shen 2003; Sun and Bevan 2003).

1.4.3 Natürliche Killer T Zellen in der Listerien-Infektion

Die Rolle von NKT Zellen in einer Listerien-Infektion konnte bis jetzt noch nicht ausreichend analysiert werden. In anderen bakteriellen Infektionen hingegen konnte die Rolle von NKT Zellen sehr präzise aufgeklärt werden. In einer Infektion mit *S. pneumoniae* haben iNKT Zellen einen sehr großen Anteil an dem Ausgang der bakteriellen Infektion. Während einer Infektion mit *S. pneumoniae* werden mikrobielle Lipid-Antigene über CD1d von APZ an NKT Zellen präsentiert. Die Sekretion von IL-12 von DZs zusammen mit der IFN γ Produktion durch die aktivierten NKT Zellen führt zu einer Aktivierung von NK Zellen (Brigl et al. 2011; Y. Kinjo et al. 2011). In α 18-defizienten Mäusen konnte eine erhöhte Sterblichkeit nach Infektion mit *S. pneumoniae* aufgrund höherer bakterieller Last, weniger Neutrophilen und verringerten Level verschiedener Zytokine in der Lunge festgestellt werden (Kawakami et al. 2003). Ebenfalls sind iNKT Zellen in der Lage mittels des nach Aktivierung produzierten IFN γ Makrophagen zu aktivieren, welche in anderen bakteriellen Infektionen wie *M. tuberculosis* (Sada-Ovalle et al. 2008) oder *P. aeruginosa* (Nieuwenhuis et al. 2002) diese erfolgreich bekämpfen können. Gleichermäßen gibt es allerdings auch Studien, die zeigen, dass in iNKT Zell-defizienten Mäusen nach Infektion mit *P. aeruginosa* keine höhere Empfänglichkeit gegenüber der Infektion zu verzeichnen war, wenn die Infektion intratracheal erfolgte (T. Kinjo et al. 2006). Für andere intrazelluläre Pathogene wie *S. typhimurium* konnte in Studien mit CD1d-defizienten Mäusen keine Rolle für NKT Zellen festgestellt werden (Berntman et al. 2005). Experimente zur Erforschung der Rolle von NKT Zellen in einer Listerien-Infektion führten je nach verwendeter Methode zu unterschiedlichen Resultaten. Nach Behandlung mit einem anti-CD1 Antikörper verbesserte sich die vorhandene Listeriose, was auf einen nachteiligen Effekt von NKT Zellen in der Infektion schließen lässt (Szalay et al. 1999). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass in α 18^{-/-}-Mäusen eine statistisch signifikant reduzierte Anzahl an Bakterien sowohl in Leber als auch in Milz vier Tage nach Infektion mit Listeria im Vergleich zu heterozygoten α 18^{+/-}-Mäusen vorzufinden war (Emoto et al. 2006). In einer Studie von Arrunategui-Correa (2004) (Arrunategui-Correa and Kim 2004) konnte im Gegensatz dazu gezeigt werden, dass in CD1d-defizienten Mäusen eine höhere bakterielle Last und Zeichen von Immunopathologie bereits zwei Tage nach oraler Infektion deutlich waren. Eine andere Studie zeigte hingegen, dass in α 18-defizienten Mäusen sowohl in einer Primärinfektion, als auch in einer Sekundärinfektion die Immunantwort auf Listeria in der Abwesenheit von iNKT Zellen nicht verändert ist und der Immunantwort in Wildtyp Mäusen ähnelt (Ranson et al. 2005). Neben dem direkten Einfluss von NKT Zellen auf den Ausgang einer bakteriellen Infektion konnte sowohl in vivo als auch in vitro gezeigt werden, dass die Infektion von DZ und Makrophagen mit *Listeria monocytogenes* zu einer IFN β -abhängigen, erhöhten Expression von

CD1d auf der Zelloberfläche der APZ führt (Raghuraman, Geng, and Wang 2006). Nach einer Infektion mit *Lm* regulieren iNKT Zellen den Aktivierungsmarker CD69 hoch und produzieren große Mengen an IFN γ , aber kein IL-4. In diesen Studien konnte außerdem ermittelt werden, dass nach der Infektion mit *Listeria* die Anzahl an iNKT Zellen stark reduziert ist, sowohl in Leber als auch in Milz. Die verbleibenden Zellen zeigten ein hyporesponsives Verhalten gegenüber α GC, was sich in einer verminderten Expansion und Zytokinproduktion äußerte. Diese Funktionsstörung der iNKT Zellen blieb bis zu einem Monat nach Infektion mit dem Pathogen erhalten (Choi et al. 2008; E. Y. Kim et al. 2008). Kürzlich publizierte Daten zeigen, dass die aus *Listeria monocytogenes* isolierten Lipidantigene Phosphatidylglycerol und Diphosphatidylglycerol in der Lage sind, Typ II NKT Zellen zu aktivieren, jedoch nicht Typ I NKT Zellen (B. J. Wolf et al. 2015). Es kann festgehalten werden, dass NKT Zellen eine Rolle in bakteriellen Infektionen spielen, hier jedoch je nach Pathogen unterschiedliche Funktionen übernehmen können.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Alternatives Cross-Priming konnte in unserem Labor durch die Immunisierung mittels des Antigens OVA und des Adjuvanz α GC entdeckt werden (Semmling et al. 2010). Hierbei werden CCR4-exprimierende ZTL durch von NKT Zellen-lizensierte Dendritische Zellen aktiviert. Die nach Lizenzierung produzierten Chemokine CCL17 und CCL22 locken die ZTL zum Ort der Immuninteraktion und gewährleisten eine schnelle Aktivierung der ZTL. In dieser Arbeit soll ermittelt werden, ob alternatives Cross-Priming in einer bakteriellen Infektion zur Verbesserung der Immunabwehr beitragen kann. Ebenfalls soll die Rolle von NKT Zellen nach Infektion mit dem intrazellulären Pathogen *Listeria monocytogenes* untersucht werden, da diesem Zelltypus in der Literatur verschiedene Rollen in der Eindämmung einer bakteriellen Infektion zugeschrieben werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Firma
Analysewaage Explorer	Ohaus, MA Bredford, USA
Autoklav	Belimed, Köln
Inkubator Heraeus cell 240	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer, FACS Canto II	Becton-Dickinson, Heidelberg
Durchflusszytometer, FACS Fortessa	Becton-Dickinson, Heidelberg
ELISA Analysegerät Safire 2	Tecan, Männedorf, CH
Eppendorfpipetten	Eppendorf, Hamburg
Gamma-Bestrahlungsgerät Biobeam 2000	MCP-STs, Braunschweig
Gefrier-Container Nalge Nunc Cryo	Nunc, Wiesbaden
Gefrierschrank -20°C	Bosch, München
Gefrierschrank -80°C	Heraeus, Hanau
Heizblock ThermoStat Plus	Eppendorf, Hamburg
Homogenisator Precellys 24	Peqlab, Erlangen
Eismaschine Icematic Scotsman®	Frimont Bettolinc, Pogliano, Italien
IVC Mausekäfige	Tecniplast, Hohenpeißenberg
Kühlschrank 4°C	Bosch, München

Luminex Analysegerät SD	Invitrogen, Carlsbad, USA
MACS-Separator QuadroMACS	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Mikroskop LSM 710	Zeiss, Jena
Mikrotiter-Waschhilfe ImmunoWash 12	Nunc International
Mikrotom	Leica, Hamburg
Nanodrop Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
Pipette-Boy Pipetus	Hirschmann Labortechnik, Eberstadt
Präparierbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg
PCR-Gerät Peqstar 2x Gradient	Peqlab, Erlangen
Real-Time Gerät LightCycler® 480II	Roche, Grenzach-Wyhlen
Rotlichtlampe Infracil	Phillips, Hamburg
Sterilwerkbank HeraSafe HS15 Air	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge Spectrafuge	neoLab, Heidelberg
Vortex Genie 2	Bender&Hobein, Zürich, CH
Wasserdeionisierungsanlage EASYPURE®II	Barnstead, Boston, USA
Zell Sortierer, FACS-Aria	Becton-Dickinson, Heidelberg
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
CaliBRITE beads	BD Biosciences, Heidelberg
Einmalkanülen Sterican	Braun, Melsungen
Einmalspitzen Sterican 5ml	Braun, Melsungen
ELISA-Platten	Maxi-Sorp, Nunc, Wiesbaden
Eppendorfreaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Falcon-Röhrchen	Becton-Dickinson, Heidelberg
Keramik Tubes Precellys 1.4mm, 2ml	Peqlab, Erlangen
Mikro-Hämatokrit-Kapillaren	Brand GmbH, Wertheim
Mikrotom Klingen	Leica, Hamburg
Parafilm	American National Can, USA
Pipettenspitzen	Roth, Karlsruhe
Plastikpipetten 5-25ml	Greiner, Nürtingen
Sterilfilter 0,45µm, steril	Schleicher&Schuell, Dassel
Transwell Insert 5µm	Corning, Labomedic Bonn
Zellkultur-Rundbodenplatten, 96 Vertiefungen	Corning Costar, Bodenheim
Skalpell	Labomedic, Bonn
Objektträger	Labomedic, Bonn
Deckgläser	Labomedic, Bonn

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Reagenz	Firma
β-Merkaptoethanol	Sigma, München
Brain-Heart-Infusion (BHI)	Merck, Darmstadt
Brain-Heart-Infusion Agar	AppliChem, Darmstadt
BSA Fraktion V	PAA, Darmstadt
Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE)	Invitrogen, Karlsruhe
CCL17 rekombinant, Maus	RnD Systems, Wiesbaden
Collagenase D	Roche, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
DNase I	Roche, Mannheim
DEPC	AppliChem, Darmstadt
Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)	Sigma, München
Ethanol (EtOH)	AppliChem, Darmstadt
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Flüssigstickstoff	Linde, Wiesbaden
fetales Kälberserum	PAN Systems GmbH, Nürnberg
Glukose	Roth, Karlsruhe
Golgi Plug	BD Biosciences, Heidelberg
Humanes Immunglobulin (Fc-Block)	Privigen, Marburg
Immu-Mount	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe

Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Roth, Karlsruhe
L-Glutamat	Merck, Darmstadt
Natrium-Azid (NaN_3)	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natrium-Citrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{x H}_2\text{O}$)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Roth, Karlsruhe
OVA ₂₅₇₋₂₆₄ Peptid (SIINFEKL)	Pineda, Berlin
o-Phenylendiamin (OPD)	Sigma, München
Penicilin/Streptomycin	Merck, Darmstadt
Percoll	Amersham Pharmacia, Freiburg
Schwefelsäure (H_2SO_4)	Merck, Darmstadt
Streptavidin-Meerrettichperoxidase	Natutec, Frankfurt/Main
SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
Tissue-Tek® OCT	Sakura, Niederlande
Triton X-100	Promega, Madison, USA
Trypanblau	Sigma, München
Tween® 20 (Polyoxyethylsorbitan-Monolaurat)	GERBU, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (H_2O_2)	Merck, Darmstadt
Zellkulturmedium RPMI 1640	Gibco, Paisley, UK

2.1.4 Puffer, Medien und Lösungen

BHI-Agar	ddH ₂ O, 50g/l BHI-Agar
BHI-Medium	ddH ₂ O, 37g/l BHI-Medium
CFU - Puffer	PBS, 0.1 % Triton X-100
ELISA-Blocking	PBS, 1 % BSA
ELISA-Coating	ddH ₂ O, 0.1M NaHCO ₃ , pH=8.2
ELISA Waschpuffer	PBS, 0.1 % Tween20
Erythrozyten-Lyse	ddH ₂ O, 145mM NH ₄ Cl , 100µm EDTA, 12mM, pH=7.3
FACS-FIX	PBS, 2 % Glukose, 0.02 % NaN ₃ , 1 % Formaldehyd
FACS-Puffer	PBS, 0.1 % BSA, 0.1 % NaN ₃
MACS-Puffer	PBS, 0.5 % BSA, 2mM EDTA
OPD-Substratpuffer	ddH ₂ O, 31.2g/l NaH ₂ PO ₄ , 29.4g/l Natrium-Citrat, pH=5.0
PBS	ddH ₂ O, 136.89 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH ₂ PO ₄ , 8.05 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7.3
T Zell-Medium	RPMI 1640, 10% FCS, 10 ⁵ U Penicillin, 0.1g/l Streptomycin, 2mM L-Glutamin, 50 µm β-Mercaptoethanol
Verdaumedium	PBS, 2mg/ml Kollagenase, 100 µg/ml DNase

2.1.5 Antikörper und Fluorochrome

Tabelle 1: Verwendete Antikörper für Histologie, ELISA und Durchflusszytometrie

Alle verwendeten monoklonalen oder polyklonalen Antikörper sind in nachfolgender Tabelle gelistet.

Antigen	Klon	Konjugat	Verwendung
CD1d	3C11	Biotin	FACS
CD3ε	145-2CII	bv421	FACS
CD4	GK1.5	bv421	FACS
CD8α	53-6.7	FITC bv421 PerCpCy5.5	FACS FACS FACS
CD11b	MI/70	PE	FACS
CD11c	HL3	bv510 Eisenoxid	FACS MACS
CD25	PC61.5	PE	FACS
CD80	16-10AI	FITC	FACS
CD86	GL-1	APC	FACS
TCRβ	H57-597	FITC	FACS
NK1.1	PK136	PE PeCy7	FACS FACS
Granzym B	GB11, human	PE	FACS
F4/80	BM8	PE bv421	FACS Immunhistologie
TNFα	MP6-XT22	APC	FACS
GR-1	RB6-8C5	PerCpCy5.5	FACS
Ly6G	IA8	APC	FACS
Ly6C	HK1.4	APC	FACS
CD69	H1.2F3	PerCpCy5.5	FACS
FoxP3	FJk-16s	FITC	FACS
CTLA-4	UC10-4B9	PE	FACS
Streptavidin		HRP PE	ELISA FACS
IL-12	C15.6	APC Biotin	FACS ELISA
CD1d Tetramer		PE	FACS
IFNγ	XMG1.2 C37801/37875	APC Biotin	FACS ELISA ELISA
GFP	polyklonal	AF488	FACS Immunhistologie
CD40	3/23	PE	FACS
CD45R (B220)	RA3-6B2	AF647	Immunhistologie
H-2K ^b		PE	FACS

2.1.6 Primer Sequenzen

IFN γ	3' CTGGACCTGTGGGTTGTGAC
	5' CAGCAACAGCAAGGCGAAA
CCR4	3' AGGTCTGTGCAAGATCGTTTCATGG
	5' ATCCTGAAGGACTTCAAGCTCCA

2.1.7 Software

Software	Firma
FlowJo V8.8.6	Tree Star Inc., USA
FACS Diva V6.1.1	BD Biosciences, Heidelberg
GraphPad Prism 5	GraphPad Software Inc., USA
Office 2011	Microsoft, USA
Illustrator CS3	Adobe, USA
Photoshop CS4	Adobe, USA

2.1.8 Kit-Systeme

Gekaufte Kits wurden entsprechend, wenn nicht anders angegeben, der Anweisungen der Firmen nach verwendet.

Kit-System	Firma
FoxP3 Transcription Factor Staining Buffer Set	eBioscience, San Diego, USA
LIVE/DEAD [®] Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
Luminex ProcartaPlex, 26plex	eBioscience, San Diego, USA
MACS CD8 ⁺ T cell isolation Kit II	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
MACS Anti-CD11c ⁺ MicroBeads	Miltenyi, Bergisch-Gladbach

Nucleo Spin RNA II	Macherey-Nagel, Düren
Reverse-Transkriptions-Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
SYBR® Green	Applied Biosystems, Darmstadt

2.2 Methoden

2.2.1 Tierexperimentelle Methoden

2.2.1.1 Mäuse

Alle Mäuse wurden unter spezifisch-pathogenfreien Bedingungen im Haus für Experimentelle Therapie (HET) im Universitätsklinikum Bonn gehalten, bevor sie zur Durchführung der Experimente in den Mausstall der Versuchsräume transferiert worden sind. Alle Experimente wurden jeweils mit Mäusen gleichen Alters und Geschlechts gemäß den Richtlinien des Bundeslandes Nordrhein-Westfalen durchgeführt.

2.2.1.2 verwendete Mauslinien

C57/BL6	Diese Mauslinie stellt die WT (Wildtyp) Gruppe in allen durchgeführten Experimenten dar und ist eine durch Inzucht erzeugte Mauslinie mit dem MHC Haplotyp H2 ^b .
bm1	Diese Mauslinie besitzt eine Punktmutation im MHC Klasse I Molekül, was zu einer Verhinderung der Präsentation des OVA-Peptids SIINFEKL an CD8 ⁺ T-Zellen führt.
CCL17 ^{-/-}	Diese Mauslinie exprimiert das fluoreszierende Molekül eGFP unter dem CCL17 Promoter, wodurch sie als CCL17-defiziente Mauslinie genutzt werden kann. Heterozygote Tiere besitzen die Fähigkeit, CCL17 zu exprimieren und können gleichzeitig als CCL17-Reportermause verwendet werden.
CCR4 ^{-/-}	Diese Mauslinie ist defizient für den Chemokinrezeptor CCR4.
CCR5 ^{-/-}	Diese Mauslinie ist defizient für den Chemokinrezeptor CCR5.
OT-1	Diese Mauslinie besitzt einen transgenen T Zell-Rezeptor, welcher das OVA (Ovalbumin) ₂₅₇₋₂₆₄ -spezifische Peptid (SIINFEKL) im Kontext von H-

	2K ^b erkennt. CD8 ⁺ T-Zellen dieser Mäuse sind antigen-spezifisch für das SIINFEKL Peptid.
OT-1 x CCR4 ^{-/-}	Diese OT-1 Mauslinie ist defizient für den Chemokin Rezeptor CCR4.
CD1d ^{-/-}	Diese Mauslinie ist defizient für das Molekül CD1d, das zu den nicht-klassischen MHC I Proteinen gehört und Lipide präsentieren kann. Aufgrund von entwicklungs-genetischen Effekten des CD1d Moleküls besitzen diese Mäuse keine NKT Zellen.
Jα18 ^{-/-}	Diese Mauslinie ist defizient in dem TCR Molekül Jα18 und besitzt deswegen keine Typ I NKT Zellen.

2.2.1.3 Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Grundlage für alle Experimente war die Verwendung des Stammes *Listeria monocytogenes*-OVA (Lm-OVA), der gentechnisch verändert wurde, sodass diese Bakterien das Protein Ovalbumin exprimieren. Die Bakterien wurden bei -80°C in sterilem BHI-Medium in 10% DMSO (Dimethylsulfoxid, Einfriermedium) gelagert. Hierfür wurde eine Übernachtskultur von Lm-OVA in 10ml BHI-Medium (*engl. brain heart infusion*) angesetzt, über Nacht bei 37°C im Brutschrank kultiviert und am folgenden Morgen 500µl der Kultur in vorgewärmtes BHI-Medium (10ml) überführt. Sobald die Bakterienkultur in die log-Phase eingetreten war (OD₆₀₀ von 0.1-0.5) (optische Dichte, OD) wurde sie bei 4000 rpm (*engl. rounds per minute*) für 10min bei 21°C zentrifugiert und in Einfriermedium aufgenommen und aliquotiert. Für Infektionsversuche wurde eine Übernachtskultur bei 37°C im Brutschrank mit BHI-Medium angesetzt, am folgenden Morgen 500µl der Kultur in vorgewärmtes BHI-Medium (10ml) überführt und bei einer OD₆₀₀ von 0.1-0.5 die Listerien entsprechend der gewünschten Endkonzentration verdünnt. Bei einer Applikation von mehr als 1 x 10⁶ Listerien pro Maus wurde die Kultur bei 4000 rpm für 10min zentrifugiert, in PBS (Phosphat-gepufferte Saline) aufgenommen, erneut OD gemessen und entsprechend verdünnt. Bei dem genutzten Lm-OVA Stamm entsprach eine OD₆₀₀ von 0.5 gleich 7 x 10⁸ CFU (*engl. colony forming units*) pro ml.

2.2.1.4 Bestimmung der bakteriellen Last

Für die Bestimmung der bakteriellen Last (CFU) wurde 1/3 der Leber abgewogen, die gesamte Milz aus infizierten Tieren entnommen und bei -80°C gelagert. Die Organe wurden aufgetaut und mit 1ml CFU-Puffer in Precellys Keramik Röhrchen überführt. Im Precellys 24 Homogenisator wurden die Röhrchen zwei mal je 30sec bei einer Geschwindigkeit von 6.5 m/sec homogenisiert. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe von bis zu 1:10⁴ (Leber)

und $1:10^5$ (Milz) auf Eis hergestellt, wovon jeweils 100 μ l auf BHI-Agar Platten ausplattiert wurden. Die Agar Platten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert, um am folgenden Tag die gewachsenen Kolonien zu zählen, die anschließend als bakterielle Last pro Organ berechnet wurden (CFU/Organ).

2.2.1.5 Generierung von Knochenmarks-Chimären

Spendermäuse wurden unter Isoflurannarkose durch zervikale Dislokation getötet und die Hinterläufe als Knochenmarksquelle entnommen. Den Empfängerermäusen wurde intraperitoneal in 150 μ l eine Kombination aus Ketamin (93.75 mg/kg KG) und Xylazin (6.225 mg/kg KG) in Kochsalzlösung injiziert, damit betäubt und anschließend mit einer Cäsiumquelle bestrahlt (7 Gy). Die Augen wurden mit Augensalbe vor der Bestrahlung geschützt und die Tiere bis zum Aufwachen warm gehalten. Die vorbehandelten Tiere wurden in spezielle, für die Bestrahlung von Mäusen vorgesehene Behälter eingebracht und anschließend im Biobeam 2000 Bestrahlungsgerät vier Minuten bei 7 Gy bestrahlt. Vier Stunden nach dem Aufwachen wurden den Empfängerermäusen die aufgereinigten Knochenmarkszellen (2×10^6 bis zu 10×10^6 Zellen pro Tier) in 100 μ l physiologischer Kochsalzlösung intravenös appliziert. Die Mäuse verblieben für acht Wochen bis zur Rekonstitution der Immunzellen ohne weitere Behandlung.

2.2.1.6 Co-Housing

Um auszuschließen, dass Unterschiede in den Haltungsbedingungen von Mäusen zwischen HET (Haus für experimentelle Therapie) und Versuchseinheit im Institut für Experimentelle Immunologie bestehen, wurden weibliche Mäuse verschiedenen genetischen Hintergrunds für vier Wochen in einem Käfig zusammengesetzt. Nach dieser Zeit ist davon auszugehen, dass sich die Mikrobiota der Tiere untereinander angepasst hat.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Isolation primärer Zellen

Zur Gewinnung primärer Zellen aus Mäusen wurden diese unter Isoflurannarkose durch cervikale Dislokation getötet, mit Ethanol auf der Bauchseite gereinigt und anschließend mit Präparierbesteck geöffnet, um die Zielorgane im jeweiligen Versuch zu entnehmen. Die Zählung von Zellen erfolgte durch die Verdünnung der Zellsuspension 1:10 in Trypan Blau, wovon 10 μ l in eine Neubauer-Zählkammer gegeben wurden. Nach dem Auszählen von

lebenden (ungefärbten) Zellen in vier Großquadraten konnte mittels der folgenden Formel die Gesamtzellzahl in der Suspension ermittelt werden:

(Zellzahl) / 4 x 20 (Verdünnungsfaktor) x 10.000 (Neubauer-Verdünnungsfaktor)

2.3.1.1 Generierung einer Milzzellsuspension

Zur Generierung einer Milzzellsuspension wurde die entnommene Milz mit dem Stempel einer 5ml Spritze durch ein Metallsieb gedrückt und mit PBS gewaschen (Zentrifugation bei 1400 rpm, 6min bei 21°C). Anschließend wurde das Pellet in 1ml Erythrozyten-Lyse Puffer resuspendiert, um Erythrocyten aus der Milzsuspension zu entfernen. Hierauf wurde die Suspension 3min inkubiert und mit PBS gewaschen (Zentrifugation bei 1400 rpm, 6min bei 4°C). Die erhaltene Einzelzellsuspension wurde für nachfolgende FACS-Färbung (*engl. fluorescent-activated cell sorting, FACS*) in FACS-Puffer aufgenommen, für anschließendes MACSen (*engl. magnetic-activated cell sorting, MACS*) in MACS-Puffer und für Ko-Kultur Versuche oder Restimulation der Zellen in vitro in T Zell-Medium aufgenommen. Um Makrophagen oder Dendritische Zellen aus einer Milzzellsuspension zu untersuchen, wurden die entsprechenden Organe direkt nach der Entnahme verdaut. Hierfür wurde mithilfe einer Injektionsnadel Verdaumedium in die Kapsel injiziert, die Milz zerkleinert und für 15min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde eine Einzelzellsuspension, wie oben beschrieben, hergestellt.

2.3.1.2 Isolation von Lymphozyten aus der Leber

Zur Isolation von Lymphozyten aus der Leber wurde diese entnommen, die Gallenblase entfernt, durch ein Metallsieb mit dem Stempel einer 5ml Spritze gedrückt und das Homogenisat in einen 15ml Falcon überführt. Nach einer Sedimentationszeit von 3min auf Eis wurde der Überstand in ein neues 15ml Falcon überführt und mit PBS gewaschen (Zentrifugation bei 1500 rpm für 10min 4°C). Das Zellpellet wurde in 3.5ml 40 % Percoll-Lösung in PBS bei Raumtemperatur aufgenommen, mit 2ml 80% Percoll-Lösung in PBS unterlegt und für 20min bei 2000 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Die entstandene oberste Zellphase aus Hepatocyten und Zellschrott wurde verworfen. Die Interphase, in der sich die Lymphocyten befanden, wurde entnommen und erneut mit PBS gewaschen (Zentrifugation 1500 rpm, 10min bei 4°C). Das Zellpellet wurde für die weitere Behandlung entweder in T Zell-Medium oder FACS-Puffer aufgenommen.

2.3.1.3 Isolation von Lymphocyten aus dem Blut

Zur Untersuchung von Lymphocyten aus dem Blut wurden pro Analyse 35µl Blut aus der Schwanzvene der Mäuse mit einer Mikro-Hämatokrit Kapillare entnommen, in ein

Reaktionsgefäß überführt, in PBS gewaschen (Zentrifugation bei 1500 rpm, 5min bei 4°C) und anschließend in 1ml Erythrozyten-Lyse Puffer aufgenommen. Nach einer Inkubationszeit von 5min wurde die Suspension in PBS gewaschen (Zentrifugation bei 1500 rpm, 5min bei 4°C) und das entstandene Zellpellet in FACS-Puffer für die anschließende FACS-Färbung aufgenommen.

2.3.1.4 Isolation von Zellen aus dem Knochenmark

Von entnommenen Tibia und Femora der Maus wurden überschüssiges Fleisch und Sehnen entfernt, der Knochen mit einer Spritze ausgespült und durch Nylongaze gefiltert. Anschließend wurde die Zellsuspension in PBS gewaschen (Zentrifugation bei 1500 rpm, 8min bei 4°C) und erneut in PBS aufgenommen. Die Zellzahl wurde auf $10\text{-}50 \times 10^6$ Zellen /ml eingestellt und hiervon 200µl pro Empfängermaus transferiert.

2.3.2 *in vitro* T Zell-Aktivierung

Für die Aktivierung von T Zellen *in vitro* wurde eine Ko-Kultur von Dendritischen Zellen (isoliert mittels MACS-Technik) aus den entsprechenden Mäusen und OT-1 T Zellen aus OT-1 Mäusen etabliert. Hierfür wurden CD8^+ T Zellen aus den OT-1 Mäusen mittels MACS-Technologie isoliert und mit CFSE (Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester) markiert. In einem Gesamtvolumen von 100µl in einer Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen wurden 1.5×10^5 OT-1 T Zellen zusammen mit 7.5×10^4 Dendritischen Zellen in T Zell-Medium in Kultur gegeben und in einem Brutschrank bei 37°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90% und einem CO_2 -Gehalt von 5% über vier Tage kultiviert. Zur Antigen-spezifischen Stimulation, welche als Kontrolle für die Proliferationsfähigkeit der OT-1 T Zellen herangezogen werden kann, wurden OT-1 T Zellen mit 3µg/Vertiefung SIINFEKL inkubiert. Nach vier Tagen wurden die Zellen in PBS gewaschen (Zentrifugation bei 1500 rpm, 6min bei 4°C) und anschließend in FACS-Puffer für weitere Analysen aufgenommen.

2.3.3 Transwell-Assay

Splenocyten aus Lm-OVA infizierten Mäusen wurden mit einer Gesamtanzahl von 5×10^5 in den oberen Teil eines Transwell-Inserts (Porengröße 5µm) gegeben. In den unteren Teil des Transwells wurde entweder T Zell-medium allein oder T Zell-Medium mit CCL17 (10ng/ml) gegeben. Nach sechs Stunden Inkubation im Brutschrank bei 37°C wurden Zellen im unteren Teil des Transwells mit PBS gewaschen (Zentrifugation bei 1400 rpm, 5min 4°C) und anschließend in FACS-Puffer aufgenommen, um CD8^+ T Zellen zu detektieren. Durch die

Zugabe von 10.000 CaliBRITE Zähl-Partikeln konnte die Zellzahl der migrierten Zellen bestimmt werden. Die Anzahl an tatsächlich migrierten Zellen wurde durch den Abzug von Zellen, die nur auf Medium ohne Zugabe von CCL17 migrierten, ermittelt.

2.3.4 Magnetisch-aktivierte Zellsortierung (MACS)

Die Anreicherung von speziellen Zelltypen konnte durch die MACS Technologie erreicht werden (Miltenyi et al. 1990). Hierfür wurde jeweils eine Einzelzellsuspension der Splenocyten hergestellt und in 600µl MACS-Puffer resuspendiert (bis zu drei Milzen). Für eine Anreicherung von CD8⁺ T Zellen wurde das CD8a⁺ T Zell-Isolations Kit II von Miltenyi verwendet. Dafür wurden 20µl des Biotin-Antikörper Cocktails pro Milz hinzugefügt, 20min im Kühlschrank inkubiert und anschließend 30µl anti-Biotin MicroBeads für weitere 20min im Kühlschrank der Lösung hinzugegeben. Nach einem Waschschrift mit MACS-Puffer (Zentrifugation bei 1400 rpm, 10min bei 4°C) wurde das Pellet in 3ml MACS-Puffer aufgenommen und auf die vorher mit 3ml MACS-Puffer equilibrierten MACS LS Säulen aufgetragen. Die Säule wurde drei mal mit 3ml MACS-Puffer gespült und das Eluat aufgefangen, da es die CD8⁺ T Zellen enthielt. Nach einem erneuten Waschschrift in MACS-PBS (Zentrifugation bei 1400 rpm, 10min bei 4°C) wurden die Zellen für ihre weitere Verwendung in T Zell-Medium aufgenommen. Für die Anreicherung von CD11c⁺ Dendritischen Zellen wurde die Splenocyten-Suspension (bis zu drei Milzen in 600µl MACS-PBS) mit 20µl CD11c⁺ Micro-Beads pro Milz für 1min im Kühlschrank inkubiert. Nach einem Waschschrift mit MACS-Puffer (Zentrifugation bei 1400 rpm, 10min bei 4°C) wurde das Zellpellet in 3ml MACS-Puffer aufgenommen und auf die vorher mit 3ml MACS-Puffer equilibrierte MACS LS Säule aufgetragen. Die Säule wurde drei mal mit 3ml MACS-Puffer gewaschen und anschließend mit 7ml MACS-Puffer in ein 15ml Falcon eluiert. Die aufgefangene positive Fraktion wurde erneut mit MACS-Puffer gewaschen (Zentrifugation bei 1400 rpm, 10min bei 4°C) und anschließend für weitere Analysen in T Zell-Medium aufgenommen.

2.3.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie stellt ein wichtiges Analyseelement in der Immunologie dar, da dadurch die Expression von Proteinen auf Einzelzellebene untersucht werden kann (Thiel et al. 2000). Neben Oberflächenmolekülen können auch intrazelluläre Proteine, wie Zytokine, analysiert werden. Fluorophor-konjugierte monoklonale Antikörper binden an Zielstrukturen

und können mittels Durchflusszytometer detektiert werden (Sander, Andersson, and Andersson 1991). Für die Analyse von Mehrparameter-Färbungen wurden die in Tabelle 1 gelisteten Antikörper verwendet. Die Nutzung der Durchflusszytometrie erlaubt die gleichzeitige Analyse verschiedener Zellen. Die Dichte der exprimierten Antigene auf einer einzelnen Zelle kann mittels durchschnittlicher Fluoreszenz-Intensität (*engl. mean fluorescence intensity*, MFI) dargestellt werden.

2.3.5.1 Oberflächenfärbung

Für die Färbung von Oberflächenmolekülen mittels Durchflusszytometrie wurden die jeweiligen Organe entnommen, eine Einzelzellsuspension hergestellt und je nach Zielzelle mit Verdaumedium behandelt oder nicht. Nach einem Waschschrift mit PBS (Zentrifugation bei 1400 rpm, 5min 4°C) folgte die Erythrozyten-Lyse (siehe **2.3.1.1**) mit anschließender Aufnahme der Zellen in FACS-Puffer. Pro Färbereaktion wurde in einem Volumen von 50µl gefärbt und in einer Verdünnung von 1:66 humanes Immunglobulin (Fc-Block) hinzugefügt. Dies dient dem Blockieren von unspezifischen Bindungen und Fc-Rezeptoren. Im gleichen Schritt wurden die jeweiligen Antikörper (siehe **Tabelle 1**) in einer Verdünnung von 1:200, falls nicht anders angegeben, zu der Lösung hinzugegeben und 30min auf Eis inkubiert. Nach einem Waschschrift mit FACS-Puffer (Zentrifugation bei 1400 rpm, 6min 4°C) wurde das Zellpellet zur Messung am Durchflusszytometer in FACS-Fix aufgenommen und für 15 min vor der Messung in FACS-Fix inkubiert. Zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen wurde das LIVE/DEAD fixable near-IR Kit von Invitrogen verwendet, das gleichzeitig mit den Antikörpern zur Färbereaktion hinzugegeben wurde.

2.3.5.2 Intrazelluläre Färbung

Für die Analyse von Transkriptionsfaktoren oder Zytokinen erfolgte eine intrazelluläre Färbung. Hierfür wurde eine Einzelzellsuspension, wie oben beschrieben, hergestellt und für vier Stunden in T Zell-Medium mit 1µl/ml Golgi Plug im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Dies verhindert die Sekretion von neu-synthetisierten Proteinen und deren Anreicherung im Zellinneren. Für die Färbung von IFN γ in CD8⁺ T Zellen an Tag sieben nach Infektion mit Lm-OVA wurde eine Stunde vor der Zugabe von Golgi-Plug SIINFEKL Peptid in einer Konzentration von 20µg/ml der Kultur hinzugegeben, um die CTLs zu restimulieren. Anschließend wurden die Zellen je nach Analyseform auf ihrer Oberfläche angefärbt und mittels des FoxP3 Staining Buffer Kits fixiert und permeabilisiert. Die Färbung von Granzym B wurde in einer Verdünnung von 1:70 für eine Stunde auf Eis durchgeführt. Zur Analyse wurden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen und am Durchflusszytometer eingemessen.

2.3.5.3 ROS Färbung

Für die Färbung von reaktiven oxidativen Spezies (ROS) in Makrophagen und Dendritischen Zellen wurden diese mit Verdaumedium inkubiert, eine Einzelzellsuspension hergestellt und die Oberflächenfärbung in T Zell-Medium durchgeführt. Anschließend wurde die Zellsuspension in 1:300 DCFDA (2',7' –Dichlorofluorescin Diacetat) verdünnt, welches zell-permeabel ist und innerhalb der Zelle durch ROS oxidiert wird zu DCF (2',7'-Dichlorofluorescein). Dieses kann anschließend im Durchflusszytometer im FITC-Kanal analysiert werden. Die Inkubation mit DCFDA fand bei Raumtemperatur für 30min im Dunkeln statt.

2.3.5.4 H-2K^b-spezifische Dextramer-Färbung

Für die Färbung von OVA-spezifischen CD8⁺ T Zellen wurden diese mit einer H-2K^b-spezifischen Dextramer Färbung detektiert. Hierfür wurde eine Milzzellsuspension hergestellt, Erythrozyten-Lyse durchgeführt und die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen. Wie bei einer Oberflächenfärbung wurde der Färbereaktion im Verhältnis von 1:66 humanes Immunglobulin zum Blockieren unspezifischer Bindungen in einem Volumen von 25µl FACS-Puffer und 5µl Dextramer-Färbereagenz hinzugefügt. Diese wurden 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die restlichen Antikörper ohne einen dazwischenliegenden Waschschrift in einem Volumen von 20µl der Färbereaktion hinzugefügt. Nach einem Waschschrift mit FACS-Puffer (Zentrifugation bei 1400 rpm, 6min 4°C) wurde die Zellsuspension in FACS-Fix aufgenommen, 15 min inkubiert und am Durchflusszytometer eingemessen.

2.3.6 CFSE Proliferations-Assay

Für die Analyse der in vitro Proliferation von T Zellen wurden diese mit CFSE gefärbt. CFSE ist Membran-permeabel und bindet innerhalb der Zelle mit ihrer Succinimidyl Gruppe an intrazelluläre Moleküle. Es wird verwendet, um eine Zellproliferation durch die Verdünnung des CFSE Signals nach jeder Zelldivision deutlich zu machen (Parish 1999; Parish et al. 2009). Für die Färbung von T Zellen mit CFSE wurden diese in 10ml proteinfreiem PBS mit 5µM CFSE versetzt und für 10min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Färbereaktion wurde durch die Zugabe von 10ml T Zell-Medium gestoppt und anschließend wurden die Zellen nach einem Waschschrift (Zentrifugation bei 1500 rpm, 6min 4°C) in T Zell-Medium aufgenommen und im Ko-Kultur Assay eingesetzt.

2.3.7 Luminex Analyse

Zur Analyse von verschiedenen Zytokinen und Signalstoffen wurde eine Multiplex-Analyse mit dem Luminex-System durchgeführt. Hierfür wurde jeweils die Hälfte einer Milz in 1ml und die Leber einer Maus in 2ml PBS homogenisiert. Nach Zentrifugation bei 1500 rpm, 10min 4°C wurden vom Überstand 25µl entnommen und zusammen mit ebenfalls 25µl Blutserum im Luminex Assay eingesetzt, welches nach Protokoll durchgeführt wurde.

2.3.8 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung

Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung wurde etabliert, um in ihrer Anzahl sehr gering vorkommende Zellpopulationen (0.5-2% aller lebenden Zellen) mit hoher Reinheit isolieren zu können (Bonner et al. 1972). Dies erlaubt eine Auftrennung einzelner Populationen nach den gewünschten Eigenschaften. Hierfür wurde eine Einzelzellsuspension mit Erythrozyten-Lyse hergestellt, die Zellen mittels Oberflächenfärbung behandelt und nach einem Waschschrift mit FACS-PBS (Zentrifugation bei 1400 rpm, 8min 4°C) in FACS-Puffer aufgenommen. Vor dem Sortieren wurden sie durch ein Sieb mit einer Maschenweite von 50µm filtriert. Die sortierten Zellen wurden zur weiteren Verwendung in T Zell-Medium aufgenommen.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 RNA Isolation

Die Isolation von RNA aus Gewebestücken von Leber und Milz, welche nach Entnahme in Flüssigstickstoff eingefroren wurden, erfolgte mittels des Nucleo Spin RNA II Kit. Die eluierte Menge RNA wurde am NanoDrop ermittelt und je nach Gehalt auf eine Konzentration von 0.0076µg/µl verdünnt, um sie weiter in die Reverse Transkriptions-Reaktion einzusetzen.

2.4.2 Reverse Transkription

In der Reversen Transkriptions-Reaktion wurde die isolierte mRNA in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde das Capacity Reverse Transcription Kit verwendet. Die Reaktion zum Umschreiben in cDNA wurde wie folgt auf Eis angesetzt: 13.2µl RNA, 2µl 10xRT-PCR Puffer, 2µl RT-Primer, 0.8µl dNTPs, 1µl Reverse Transkriptase und 1µl RNase-Inhibitor. Die cDNA Synthese erfolgte im LightCycler® 480 II mit nachfolgendem Programm: Denaturierung bei 110°C, Bindung der zufällig angeordneten Hexamer-Nukleotide (Primer) bei 25°C für 10min,

Elongation bei 37°C für 2h, Denaturierung bei 85°C für 5s und abschließend eine Abkühlphase bei 8°C. Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei 4°C gelagert.

2.4.3 Real-Time-PCR

Die quantitative Analyse von Transkripten verschiedener Proteine kann mittels einer RT-PCR durchgeführt werden. Hierfür wurde das SYBR® Green Kit-System verwendet, welches mittels Normalisierung auf ein Housekeeping-Gen (hier GAPDH) eine relative, quantitative Aussage zu den untersuchten Transkripten liefert. In einer 384-well Platte erfolgte folgender Reaktionsansatz in Triplikaten:

1µl cDNA (1:5 verdünnt in DEPC-Wasser), 5µl 2 x Mastermix, 0.5µl 3'-Primer, 0.5µl 5'-Primer (jeweils 1µM konzentriert) und 3µl DEPC-Wasser. Für die erfolgte PCR wurden nach einer initialen Denaturierung bei 95°C für 10min, 45 Zyklen mit Denaturierungsschritten bei 95°C für 15s mit anschließender Amplifikation bei 60°C für 1min durchgeführt. Die relative, quantitative Transkriptanzahl wurde durch eine Schmelzkurvenanalyse mittels der Programmsoftware im LightCycler erstellt.

2.5 Immunologische Methoden

2.5.1 Serumpräparation

Blutserumproben wurden durch die Entnahme von 500µl Herzblut hergestellt. Dafür wurde das Blut 2h bei Raumtemperatur zur Koagulation inkubiert, der Überstand (Serum) nach einem Zentrifugationsschritt bei 1500 rpm, 10min 4°C in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für die weitere Verwendung bei -20°C gelagert.

2.5.2 ELISA (*Enzyme linked immunosorbent Assay*)

Um Zytokine im Homogenisat von Organen nachweisen zu können, wurde ein Sandwich ELISA (*engl., enzyme linked immunosorbent assay*) durchgeführt. Hierfür wurde über Nacht der Capture-Antikörper (IFN γ 57.6µg/ml, IL-12 0.5µg/ml) in einem Volumen von 50µl pro Vertiefung in einer 96-fachen Mikrotiter Platte bei 4°C inkubiert. Die über Nacht Inkubation bei dem IFN γ -ELISA erfolgte in PBS, bei dem IL-12 ELISA in ELISA-Coating Puffer. Die Platte wurde anschließend drei mal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und mit 1% BSA in 150µl PBS zum

Blockieren von unspezifischen Bindungen 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit ELISA-Waschpuffer wurde der jeweilige Standard (IFN γ 2ng/ml, IL-12 20ng/ml) in einer seriellen Verdünnung in Duplikaten in Blockierungspuffer und 50 μ l Volumen auf die Platte aufgetragen. Die Homogenisatproben wurden unverdünnt - wie in **2.3.7** beschrieben - generiert und auf die Platte in Duplikaten aufgetragen. Nach einer einstündigen Inkubationszeit im Brutschrank bei 37°C wurde die Platte drei Mal mit dem ELISA-Waschpuffer gewaschen und der Detektions-Antikörper in einem Volumen von 50 μ l pro Vertiefung (IFN γ 1.152 μ g/ml, IL-12 2.77 μ g/ml) aufgetragen. Die Proben des IL-12 ELISAs wurden nach 1h Inkubationszeit dreimal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen, währenddessen die Proben des IFN γ -ELISA 2h inkubierten. Nach dem erneuten Waschschrift wurde Meerrettich-Peroxidase gekoppelt an Streptavidin (1 μ g/ml) in Blockierungspuffer aufgetragen und 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Platte viermal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen. 1mg/ml OPD wurde in OPD-Substratpuffer gelöst und mit 1 μ l/ml H $_2$ O $_2$ ergänzt. Sobald eine optische Gelbfärbung bei der fünften Verdünnung der Standardreihe eintrat, wurde die Reaktion mit 1M H $_2$ SO $_4$ gestoppt und am ELISA-Lesegerät bei 490nm eingemessen.

2.5.3 Immunhistochemische Färbung

Für die Analyse von histologischen Schnitten wurde eine immunhistochemische Färbung von Organschnitten durchgeführt. Hierfür wurden die entnommenen Milzen in 1% PFA in PBS für 30min inkubiert und anschließend in 30% Saccharose in PBS für 1h überführt. Anschließend wurden die Milzen in Tissue-Tek OCT in Flüssigstickstoff eingefroren und am Microtom in 30 μ m starken Organschnitte weiter verarbeitet, welche bei -20°C gelagert wurden. Die Organschnitte wurden 1h bei Raumtemperatur in Histo-Blockierpuffer inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Über Nacht wurden die jeweiligen Antikörper in Blockierpuffer auf den Schnitten inkubiert und nach einem Waschschrift mit PBS unter zur Hilfenahme von Immu-Mount und einem Deckgläschen eingedeckelt. Die Proben wurden am Konfokalmikroskop LSM 710 eingelesen.

2.6 Statistik

Die durchgeführten Experimente wurden in ihrer Analyse auf statistische Signifikanz untersucht. Diese Analysen wurden mittels des Programms GraphPad Prism 5 erstellt. Die

dargestellten Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (SD). Die Berechnung der Signifikanzen bei dem Vergleich von zwei Gruppen geschah mittels T-Test und bei drei und mehr Gruppen mittels ANOVA und bonferroni Post-Test. P Werte unter 0.05 wurden als statistisch signifikant gewertet und wie nachfolgend dargestellt: *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$.

3. Ergebnisse

3.1 NKT Zell-vermitteltes Cross-Priming in der Listerien-Infektion

Zur Aktivierung von naiven zytotoxischen T Zellen müssen die Dendritischen Zellen, welche das korrespondierende Antigen an die ZTLs kreuz-präsentieren, vorher durch Helferzellen lizenziert werden (Bennett et al. 1998; Ridge, Di Rosa, and Matzinger 1998; Schoenberger et al. 1998). Die Rolle der Helferzellen kann von NKT-Zellen übernommen werden, wobei Glycolipid-Antigene wie α GC auf CD1d Molekülen von DZ an die NKT Zellen präsentiert werden, um anschließend eine vollständige, CD40-vermittelte Aktivierung der DZ durch die NKT Zellen zu ermöglichen (Nishimura et al. 2000). Dieser Prozess der DZ Lizenzierung wiederum gewährleistet eine vollumfängliche Generierung einer ZTL Antwort. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob in einer bakteriellen Infektion mit dem intrazellulären Pathogen *Listeria monocytogenes* alternatives Cross-Priming zu deren Klärung beitragen kann. Es konnte bereits ermittelt werden, dass eine Infektion mit *Listeria monocytogenes* die CD1d-Expression in Makrophagen und DZ *in vitro* und *in vivo* induziert (Raghuraman, Geng, and Wang 2006). Ob die Bekämpfung einer Listerien-Infektion mittels ZTLs abhängig von T Zell Hilfe ist, wurde in verschiedenen Studien unterschiedlich beantwortet. Marzo (2004) (Marzo et al. 2004) zeigten eine CD40-abhängige Primärantwort, welche auf T Zell-Hilfe angewiesen war. Zwei weitere Studien konnten diesen Zusammenhang nicht bestätigen (Hamilton, Tvinnereim, and Harty 2001; Lauvau et al. 2001). Die folgenden Experimente sollten die Frage beantworten, ob NKT Zell-vermitteltes Cross-Priming einen Einfluss auf die Klärung einer bakteriellen Infektion mit *Listeria monocytogenes* hat.

3.1.1 Infektion mit *Listeria monocytogenes* induziert die Produktion von CCL17

Es konnte gezeigt werden, dass der Verlauf des alternativen Cross-Primings durch das Chemokin CCL17 und dessen Chemokinrezeptor CCR4 geleitet wird (Semmling et al. 2010). Tatsächlich wird das Chemokin CCL17 auch im Rahmen einer bakteriellen Infektion mit *Listeria monocytogenes* von Dendritischen Zellen sezerniert (**Abb.3.1-A**). In den heterozygoten CCL17^{+/-} Reportertermäusen waren 48 Stunden nach Infektion mit Lm-OVA ca. 12% aller DZ der Milz positiv für CCL17. Es ist bekannt, dass CD8⁺ DZ der initiale Replikationsort für Listerien sind (Edelson et al. 2011). Diese sind darauf spezialisiert, Antigene zu kreuzpräsentieren, um eine

Immunantwort gegen Tumore, Viren und intrazelluläre Bakterien zu etablieren (Kurts, Robinson, and Knolle 2010). Außerdem wurde gezeigt, dass vor allem $CD8^+$ $DEC-205^+$ DZ αGC via CD1d an iNKT Zellen präsentieren können (Arora et al. 2014). Wird die CCL17 Produktion für beide DC Subtypen getrennt betrachtet, produzierten 3.5 mal mehr Zellen unter den $CD8^-$ DZ (ca. 3.5%) CCL17 als unter den $CD8^+$ DZ. (**Abb.3.1-B**). Um analysieren zu können, wo die CCL17-produzierenden Zellen innerhalb der Milz lokalisiert sind, wurde 18 Stunden nach Infektion mit Lm-OVA die Milz der heterozygoten $CCL17^{+/-}$ Reportermause immunhistologisch untersucht. Hierbei ist erkennbar, dass die Dichte der CCL17-produzierenden Zellen in der roten Pulpa ($F4/80^+$) um ein 6-faches höher ist, verglichen mit der weißen Pulpa ($B220^+$) (**Abb.3.1-C**). Zusammenfassend lässt sich zeigen, dass das Chemokin CCL17 nach einer bakteriellen Infektion mit *Listeria monocytogenes* von Dendritischen Zellen in der Milz exprimiert wird, wobei es eine höhere Anzahl $CD8^-$ CCL17-produzierende DZ gibt.

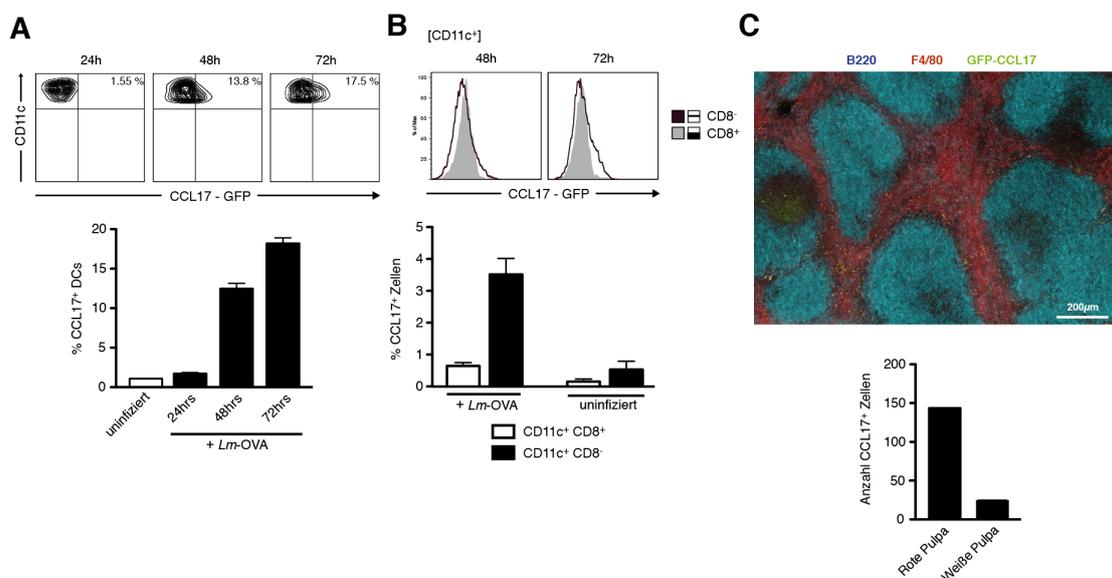


Abb.3.1: CCL17 wird von Dendritischen Zellen nach einer Listerien-Infektion sezerniert. **A** FACS-Plot (oben) von CD11c⁺ DZ in ihrer Produktion von CCL17-GFP in heterozygoten $CCL17^{+/-}$ Reportermäusen in der Milz 24 h, 48 h und 72 h nach Infektion mit 2×10^4 Lm-OVA. Graph (unten) zeigt den Anteil an CCL17⁺ DZ in % aller DZ. **B** FACS-Histogramm (oben) von $CD8^+$ (graue Fläche) und $CD8^-$ (schwarze Linie) DZ mit jeweiliger CCL17-GFP Produktion in heterozygoten $CCL17^{+/-}$ Reportermäusen in der Milz 48 h und 72 h nach Infektion mit 2×10^4 Lm-OVA. Der Graph (unten) zeigt CCL17⁺ CD11c⁺ Zellen separat für $CD8^+$ DZ (weiß) und $CD8^-$ DZ (schwarz) zum Zeitpunkt 48h. **C** Immunhistologische Analyse (oben) der CCL17-GFP Expression (grün) in heterozygoten $CCL17^{+/-}$ Reportermäusen (B220 in blau und F4/80 in rot). Graph (unten) zeigt die Anzahl CCL17-GFP⁺ Zellen in roter oder weißer Pulpa der Milz im gewählten Ausschnitt.

3.1.2 CCL17-produzierende DZ zeigen einen erhöhten Aktivierungsstatus

Es konnte gezeigt werden, dass DZ nach einer Listerien-Infektion CCL17 in der Milz sezernieren. Hierbei ist unklar, warum nur ein geringer Teil der DZ das Chemokin produziert, da alle lizenzierten DZ CCL17 produzieren können. Es sollte untersucht werden, ob sich eine CCL17 Produktion in einer verstärkten Kostimulation der DZ widerspiegelt. Die Produktion des Chemokins CCL17 dient der zielgerichteten Migration von CCR4-exprimierenden ZTLs hin zu den Antigen-präsentierenden DZ. Die Aktivierung der ZTLs erfolgt über den T Zell-Rezeptor und mittels kostimulatorischer Moleküle, wie z.B. CD80 oder CD86 auf der DC-Oberfläche in Kontakt mit CD28 auf der T Zelle (Gimmi et al. 1991). CCL17 dient zur chemotaktischen Anlockung der CCR4-exprimierenden ZTLs, die anschließend über Kostimulation durch DZ aktiviert werden. Im Folgenden sollte ermittelt werden, ob die DZ, welche CCL17 sezernieren, stärker aktiviert sind als DZ, welche kein CCL17 produzieren. Ebenfalls sollte analysiert werden, ob es einen Unterschied im Aktivierungsstatus von CD8⁺ und CD8⁻ CCL17 produzierenden DZ gibt. Dendritische Zellen, die CCL17 produzieren, wiesen eine höhere MFI für die kostimulatorischen Moleküle CD86 und CD40 auf als DZ, die kein CCL17 produzieren (**Abb.3.2-A**).

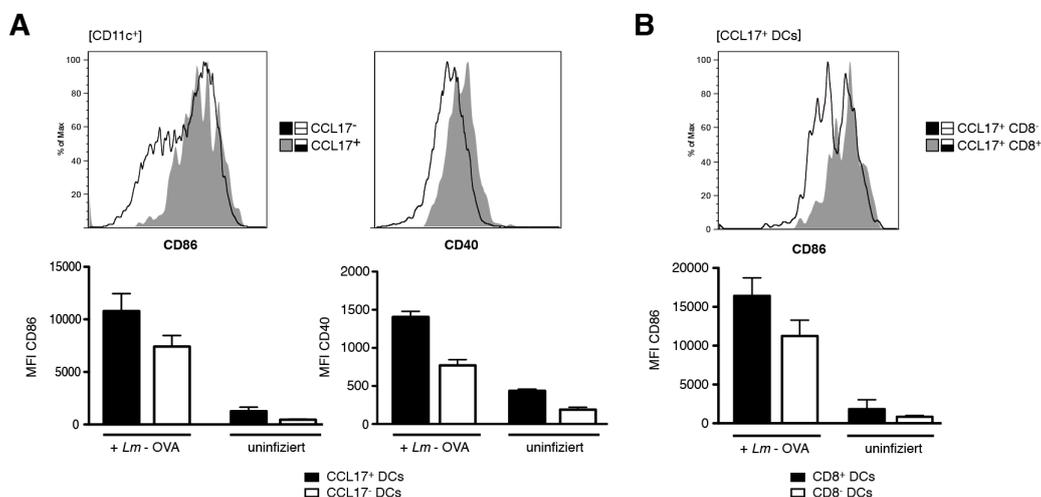


Abb.3.2: CCL17-produzierende DZ zeigen eine stärkere Aktivierung **A** FACS-Analyse der MFI von CD86 und CD40 von CD11c⁺ DZ in heterozygoten CCL17^{+/-} Reporter-mäusen in der Milz 24h nach Infektion mit 2x10⁴ Lm-OVA. Histogramme (oben) zeigen exemplarisch CCL17⁺ (graue Fläche) und CCL17⁻ DZ (schwarze Linie) in ihrer CD86 und CD40 Expression. Graphen (unten) zeigen die Quantifizierung der MFI von CD86 und CD40 von CCL17⁺ (schwarz) und CCL17⁻ (weiß) DZ. **B** FACS-Analyse des MFI von CD86 von CCL17⁺ DZ in heterozygoten CCL17^{+/-} Reporter-mäusen in der Milz 24h nach Infektion mit 2x10⁴ Lm-OVA. Histogramm (oben) zeigt CCL17⁺ CD8⁺ (graue Fläche) und CCL17⁺ CD8⁻ DZ (schwarze Linie) in ihrer CD86 Expression. Graph (unten) zeigt MFI von CD86 von CCL17⁺ CD8⁺ (schwarz) und CCL17⁺ CD8⁻ (weiß) DZ.

Analysiert man die Expression des Oberflächenmoleküls CD86 auf CCL17-produzierenden Dendritischen Zellen, wird deutlich, dass 24 Stunden nach Listeria-Infektion CD8⁺ CCL17⁺ DZ diesen Aktivierungsmarker stärker auf ihrer Oberfläche exprimierten als CD8⁻ CCL17⁺ DZ (**Abb.3.2-B**). Somit konnte gezeigt werden, dass Dendritische Zellen, die das Chemokin CCL17 nach Listeria-Infektion sezernieren, einen stärkeren Aktivierungsstatus durch die Hochregulation von CD40 und CD86 besitzen, verglichen mit DZ, die kein CCL17 sezernieren. Ebenfalls wird evident, dass die auf Kreuzpräsentation spezialisierten CD8⁺ DZ, die CCL17 sezernieren, stärker aktiviert sind als die CCL17-produzierenden CD8⁻ DZ.

3.1.3 CCL17-produzierende DZ können OT-1 Zellen stärker aktivieren

Bei dem Prozess des alternativen Cross-Primings werden durch die Lizenzierung von DZ durch NKT-Zellen kostimulatorische Moleküle (z.B. CD80 und CD86) auf der Oberfläche der Dendritischen Zellen hochreguliert. Diese können im Gegenzug durch Interaktion mit CD28 auf der CD8⁺ T Zelle diese aktivieren und Proliferation induzieren. Um zu überprüfen, ob die Fähigkeit von Dendritischen Zellen CCL17 zu produzieren mit einer verstärkten T Zell-Aktivierung korreliert, wurden aus Lm-OVA infizierten, heterozygoten CCL17^{+/-} Reporter-mäusen Dendritische Zellen anhand ihrer CCL17-Produktion sortiert und mit naiven, CFSE-markierten OT-1 T Zellen für vier Tage in Ko-Kultur gegeben.

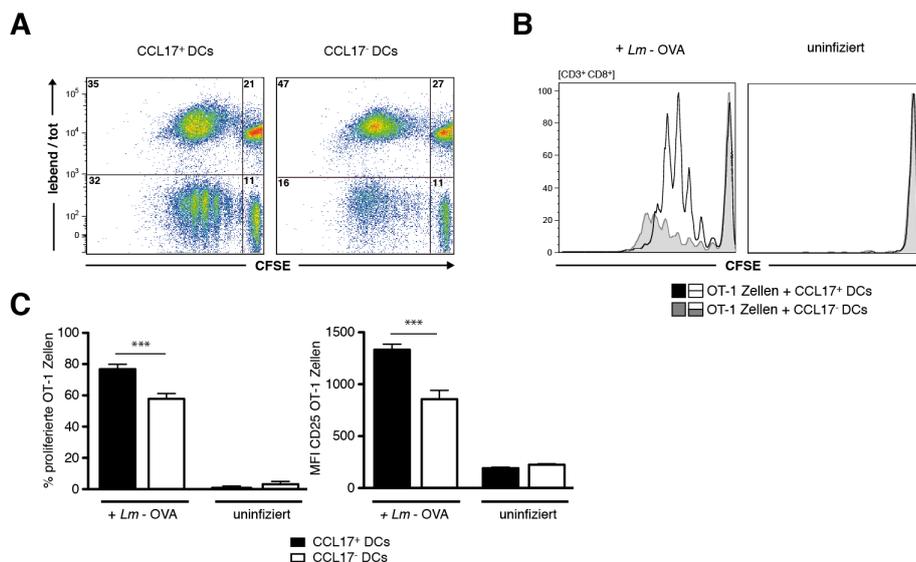


Abb.3.3: CCL17⁺ DZ aktivieren OT-1 T Zellen stärker als CCL17⁻ DZ. Einen Tag nach Infektion mit 2x10⁴ Lm-OVA aus CCL17-GFP^{+/-} Reporter-mäusen mittels FACS-Sortierung gewonnene CCL17⁺ oder CCL17⁻ DZ wurden mit naiven mittels MACS-Technologie gewonnenen, CFSE-markierten OT-1 T Zellen für vier Tage in Kultur genommen. **A** FACS-Plots der CFSE-Proliferations-Profile von OT-1 T Zellen an Tag 4 der Ko-Kultur aufgetragen gegen einen Lebend-Tot Farbstoff. Zahlen zeigen in % den Anteil an der

Gesamtpopulation OT-1 T Zellen. **B** Histogramme der CFSE-Proliferations Profile von OT-1 T Zellen in Ko-Kultur mit CCL17⁺ DZ (schwarze Linie) oder CCL17⁻ DZ (graue Fläche) aus infizierten und uninfizierten heterozygoten Reporter-mäusen. **C** Graphen zur Anzahl proliferierter OT-1 T Zellen in % (links) und MFI von CD25 (rechts) von OT-1 T Zellen in Ko-Kultur mit CCL17⁺ (schwarz) und CCL17⁻ (weiß) DZ aus infizierten und uninfizierten heterozygoten Reporter-mäusen.

Nach einer Ko-Kultur von naiven OT-1 T Zellen mit CCL17-exprimierenden oder nicht-exprimierenden DZ zeigte sich, dass die Antigen-spezifischen T Zellen stärker proliferieren, wenn die DZ CCL17 produzieren. Ebenfalls war eine geringere Anzahl (56%) der OT-1 T Zellen nach Ko-Kultur mit CCL17⁺ DZ tot, im Vergleich mit 74% toten OT-1 T Zellen nach Ko-Kultur mit CCL17⁻ DZ (**Abb.3.3-A**). Dendritische Zellen aus einer uninfizierten Reporter-maus waren nicht in der Lage die Proliferation von OT-1 T Zellen zu stimulieren. Ein direkter Vergleich der Proliferationsprofile zeigte, dass OT-1 T Zellen aktiviert durch CCL17⁺ DZ in größerer Anzahl proliferierten als durch CCL17⁻ DZ aktivierte OT-1 T Zellen. Beide wiesen jedoch ein ähnliches Generationenprofil auf (**Abb.3.3-B**). Die Analyse der Anzahl an proliferierten OT-1 T Zellen in Prozent zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied von ca. 80% proliferierten ZTLs nach Ko-Kultur mit CCL17⁺ DZ verglichen mit ca. 60% proliferierten ZTLs nach Ko-Kultur mit CCL17⁻ DZ. Ebenfalls statistisch signifikant reduziert war die Expression des Aktivierungsmarkers CD25 auf den ZTL, wenn die Ko-Kultur in Anwesenheit von CCL17⁻ DZ stattfand. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Produktion von CCL17 in Dendritischen Zellen mit der Fähigkeit korrelierte OT-1 T Zellen zu aktivieren. Dies wurde durch die erhöhte Anzahl proliferierter OT-1 T Zellen und verstärkter Expression des Aktivierungsmarkers CD25 auf der Zelloberfläche der ZTLs deutlich, wenn sie von CCL17-produzierenden DZ aktiviert worden sind. Da dieser Versuch aus technischen Gründen nur ein Mal durchgeführt worden ist, können diese Ergebnisse nur als vorläufige Tendenz angesehen werden.

3.1.4 Die ZTL Generierung in Abwesenheit von alternativem Cross-Priming ist nach einer Listerien-Infektion nicht vermindert

Ein wichtiger Parameter bei der Bekämpfung einer bakteriellen Infektion mit *Listeria monocytogenes* stellt die Etablierung einer ZTL Antwort dar. Diese führt nach Eindämmung des bakteriellen Wachstums durch innate Faktoren zu der endgültigen Eliminierung des Pathogens durch die Tötung der infizierten Zielzellen (McGregor, Koster, and Mackaness 1970; Ladel et al. 1994). Die Generierung einer wirksamen ZTL Antwort geschieht nach Lizenzierung der Antigen-präsentierenden DZ durch die NKT Zellen (oder T Helfer Zellen). Die DZ produziert daraufhin

CCL17 und lockt CCR4-exprimierende ZTL an, welche durch diese aktiviert werden und zu proliferieren beginnen. Die vorhergehenden Experimente deuten darauf hin, dass dies bei einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* der Fall sein könnte. Es sollte analysiert werden, ob die Abwesenheit verschiedener Faktoren des alternativen Cross-Primings wie CCL17 und CCR4 zu einer Veränderung der ZTL Antwort beitragen. Sieben Tage nach Infektion mit dem Pathogen Lm-OVA wurden die Milzen der infizierten Tiere mittels Dextramer-Färbung und intrazellulärer FACS-Färbung auf Anwesenheit von OVA-spezifischen ZTLs und Produktion von IFN γ durch CD8⁺ ZTLs untersucht. Das Zytokin IFN γ wird als Indikator für die Stärke der zytotoxischen Immunantwort der CD8⁺ T Zellen genutzt, da dieses nach Aktivierung der T Zellen verstärkt sezerniert wird. Vergleicht man den prozentualen Anteil an OVA-spezifischen ZTL an der Gesamtpopulation aller ZTL in infizierten WT (4%) und CCL17- (4.5%) oder CCR4-defizienten (5%) Mäusen, so ist kein statistisch signifikanter Unterschied aufzeigbar. Gleiches gilt für die Produktion von IFN γ in den jeweiligen Gruppen (**Abb.3.4-A**).

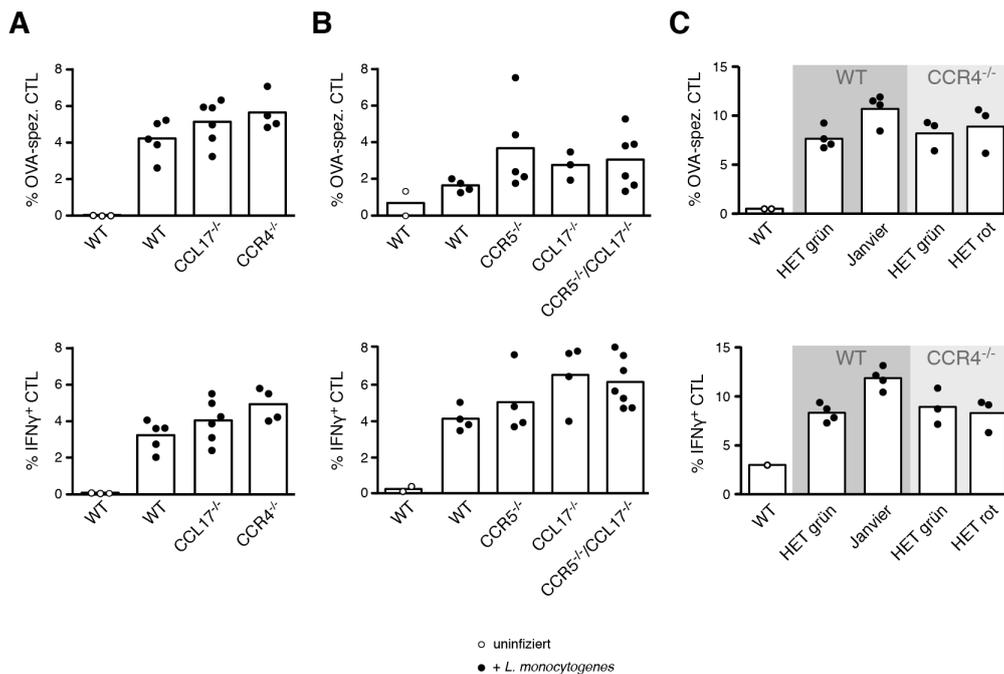


Abb.3.4: Die Generierung von OVA-spezifischen ZTL ist nicht beeinflusst durch die Abwesenheit von Chemokin-Komponenten des alternativen Cross-Primings. WT- oder KO-Mäuse wurden mit 5×10^3 Lm-OVA infiziert und an Tag 7 p.i. anhand ihrer Anzahl an OVA-spezifischen ZTL und IFN γ Produktion von CD8⁺ T Zellen in der Milz analysiert. **A** Anzahl OVA-spez. ZTL in % aller CD8⁺ T-Zellen (oben) und CD8⁺ IFN γ -produzierender T Zellen in % (unten) von WT uninfizierten (weiß) und WT, CCL17^{-/-} und CCR4^{-/-} infizierten Mäusen (schwarz). **B** Anzahl OVA-spez. ZTL in % (oben) und CD8⁺ IFN γ -produzierender T Zellen in % (unten) von WT uninfizierten (weiß) und WT, CCR5^{-/-}, CCL17^{-/-} und CCR5^{-/-}/CCL17^{-/-} infizierten Mäusen (schwarz). **C** Anzahl OVA-spez. ZTL in % (oben) und CD8⁺ IFN γ -produzierender T Zellen in % (unten) von WT uninfizierten (weiß) und WT (dunkelgrauer Kasten) und CCR4^{-/-} (hellgrauer Kasten) infizierten Mäusen (schwarz) aus verschiedenen Bereichen (HET grün, HET rot und bei Janvier gekauft) der Tierhaltung.

Allerdings ist die Höhe der hier ermittelten Antigen-spezifischen ZTL als sehr niedrig anzusehen (**Abb.3.4-A,B**) verglichen mit **Abb.3.4-C**. Dementsprechend könnten eventuelle Unterschiede durch die allgemein geringe Anzahl an Antigen-spezifischen ZTL maskiert werden. Da kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen infizierten WT und infizierten Mäusen defizient für Komponenten des alternativen Cross-Primings vorhanden war, sollte die Möglichkeit ausgeschlossen werden, dass in einer Listerien-Infektion die Abwesenheit des alternativen Cross-Primings durch die Anwesenheit des klassischen Cross-Primings kompensiert werden kann. Hierfür wurden Mäuse analysiert, welchen sowohl eine Komponente des alternativen Cross-Primings (CCL17) als auch eine Komponente des klassischen Cross-Primings (CCR5) fehlten. Als Positivkontrollen dienten jeweils die Einzel-defizienten Tiere. Wie in **Abb.3.4-B** ersichtlich, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den zu analysierenden Gruppen ermittelt werden, weder in der Anzahl OVA-spezifischer noch in der Anzahl IFN γ -produzierender ZTL. Als nächstes sollte untersucht werden, ob verschiedene Haltungsbedingungen der Mäuse einen Einfluss auf die Generierung der OVA-spezifischen Immunantwort haben. Zu diesem Zweck wurden infizierte WT Mäuse aus dem Haus für experimentell Therapie (HET) am Universitätsklinikum Bonn aus der Barriere grün (saubere Haltung) mit von Janvier gekauften Mäusen verglichen. Ebenfalls wurden CCR4-defiziente Mäuse aus Barriere grün (saubere Haltung) und Barriere rot (sehr saubere Haltung) zusammen mit diesen WT Mäusen analysiert. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den zu analysierenden Gruppen festgestellt werden hinsichtlich der Anzahl an OVA-spezifischen ZTL und der Anzahl IFN γ -produzierender ZTL (**Abb.3.4-C**). Anzumerken ist der Unterschied zwischen den erworbenen WT Janvier Mäusen und den WT Mäusen aus der Barriere grün HET. Es kann festgehalten werden, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen Mäusen befähigt und Mäusen defizient in Komponenten des alternativen Cross-Primings in der Generierung einer Antigen-spezifischen T Zellantwort gibt. Diese Daten deuten darauf hin, dass Kreuzpräsentation für die Ausbildung der primären ZTL-Antwort keine Rolle spielt.

3.1.5 Die gleichzeitige Abwesenheit von CCL17 und der Kreuzpräsentationskapazität von DZ vermindert nicht die ZTL Generierung

Nachdem ermittelt worden ist, dass die gleichzeitige Abwesenheit der CCL17-CCR4-Chemokinachse des alternativen Cross-Primings (**Abb.3.4-A**) sowie der CCL3/4/5-CCR5-Achse des klassischen Cross-Primings (**Abb.3.4-B**) keine Verminderung in der Generierung von ZTL Antworten hervorrief, sollte zur Bestätigung abschließend untersucht werden, ob dies auch der Fall ist, wenn DZ entweder CCL17 produzieren können oder die Fähigkeit zur

Kreuzpräsentation von Antigen besitzen, aber nicht beides gleichzeitig. Für diese Analyse wurden gemischte Knochenmarkschimären aus CCL17-defizientem Knochenmark und bm1-Knochenmark in CD45.1 WT Rezipienten in einem Verhältnis von 1:1 transferiert, nachdem diese bestrahlt worden waren. Bm1 Mäuse besitzen eine Punktmutation in ihrem MHC-I Komplex und sind somit nicht in der Lage, das immundominante OVA-Epitop SIINFEKL an CD8⁺ T Zellen zu präsentieren. Die DZ aus den rekonstituierten Knochenmarkschimären können entweder CCL17 produzieren oder OVA-Peptid präsentieren, nicht beides gleichzeitig. Es wurde kein Unterschied in der adaptiven Immunantwort an Tag 7 nach Infektion mit Lm-OVA in den bm1/CCL17^{-/-} Knochenmarkschimären - verglichen mit den Kontrollchimären WT/bm1 und WT/CCL17^{-/-} - festgestellt (**Abb.3.5-A,B**).

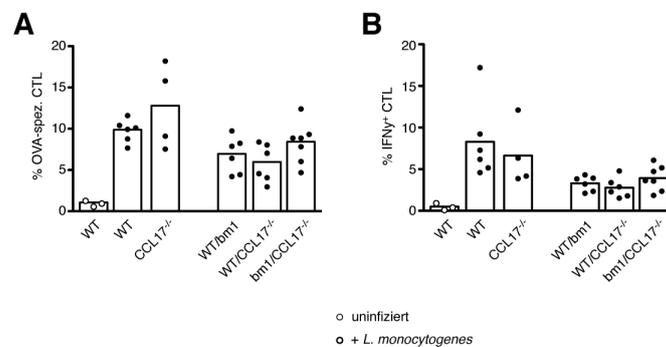


Abb.3.5: Die nicht gleichzeitige Anwesenheit von CCL17 und der Kreuzpräsentationskapazität auf DZ vermindert nicht die ZTL Generierung. FACS-Analyse an Tag 7 p.i. mit 5×10^3 Lm-OVA der OVA-spezifischen ZTL Antwort (A) und IFN γ Produktion von CD8⁺T Zellen (B). Analyse von WT uniniziert (weiß) und WT, CCL17^{-/-} (jeweils ohne Knochenmarkstransfer und unbestrahlt), WT/bm1, WT/CCL17^{-/-} und bm1/CCL17^{-/-} infiziert (schwarz). Knochenmarkschimären mit jeweils 50% WT od. bm1 und 50% bm1 od. CCL17^{-/-} Knochenmark transferiert in bestrahlte CD45.1 WT Rezipienten. 8 Wochen nach Rekonstitution erfolgte die Infektion mit Lm-OVA und die Analyse an Tag 7 p.i..

Das nicht gleichzeitige Vorhandensein auf einer DZ von CCL17 Produktion und der Fähigkeit OVA-Peptid zu präsentieren führt nicht zu einer Verminderung der ZTL Antwort. Somit sind beide Mechanismen nicht gleichzeitig auf einer DZ notwendig, um eine effektive adaptive Immunantwort zu generieren und bestätigen die vorangegangenen Daten.

3.1.6 T Zell Gedächtnisantworten in der Abwesenheit von alternativem Cross-Priming sind nicht vermindert

Während der Generierung einer primären Immunantwort gegen ein Pathogen entstehen auch sogenannte Gedächtniszellen, welche bei einem erneuten Kontakt mit dem Pathogen eine

schnellere Eradikation des eindringenden Pathogens ermöglichen sollen. In dem Modell des klassischen Cross-Primings konnte gezeigt werden, dass je nach Pathogen und inflammatorischer Umgebung, T Zell-Hilfe für die Generierung einer nachhaltigen Gedächtnisantwort essentiell ist (Wiesel and Oxenius 2012). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Gedächtnisantwort nach einer primären Infektion mit *Listeria monocytogenes* beeinflusst ist, wenn Komponenten des alternativen Cross-Primings fehlen. Hierfür wurde 56 Tage nach einer Erstinfektion mit dem Pathogen Lm-OVA eine Zweitinfektion mit dem gleichen Pathogen in einer höheren Dosis appliziert und die OVA-spezifische ZTL Antwort und IFN γ Produktion von CD8⁺ T Zellen analysiert. Die Analyse der Antigen-spezifischen ZTL an Tag 56 im Blut ergab eine gleichmäßige Etablierung einer Gedächtnisantwort in den untersuchten WT, CCR4^{-/-}, CCL17^{-/-} und CD1d^{-/-}-Mäusen (**Abb.3.6-A**). Die Sekundärinfektion generierte eine robuste OVA-spezifische ZTL Antwort mit einer Anzahl von ca. 25% Antigen-spezifischen ZTL in der WT Gruppe (**Abb.3.6-B**). Verglichen mit einer Primärantwort (siehe **Abb. 3.4-A**), wo nur ca. 5% Antigen-spezifische ZTL entstehen, wird erkennbar, wie effektiv und schnell die Gedächtnisantwort nach einem sekundären Eindringen eine spezifische Immunantwort ausbilden kann.

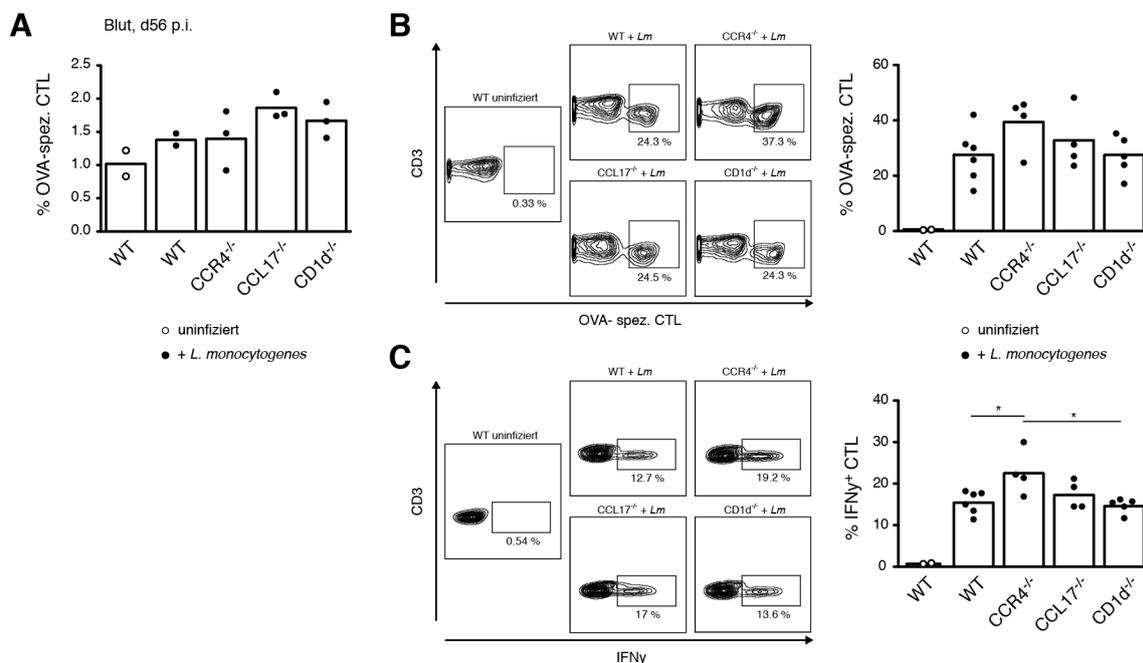


Abb.3.6: T Zell Gedächtnisantworten sind nicht vermindert in der Abwesenheit des alternativen Cross-Primings. WT und KO-Mäuse wurden mit 2×10^4 Lm-OVA i.p. infiziert (Primärinfektion) und an Tag 56 p.i. analysiert (**A**). Nach einer Sekundärinfektion mit 1×10^6 Lm-OVA an Tag 67 wurde 5 Tage später die ZTL Antwort in der Milz analysiert (**B** und **C**). Dargestellt sind WT uninfiziert (weiß) und WT, CCR4^{-/-}, CCL17^{-/-} und CD1d^{-/-} infiziert (schwarz). **A** OVA-spezifische ZTL im Blut 56 Tage nach Primärinfektion. **B** FACS-Plots

(links) und Graph (rechts) zeigt OVA-spez. ZTL 5 Tage nach Sekundärinfektion. **C** FACS-Plots (links) und Graph (rechts) zeigt die IFN γ Produktion von CD8⁺ T Zellen.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen in der Ausbildung einer OVA-spezifischen ZTL Antwort ermittelt werden. Im Vergleich der IFN γ Produktion der CD8⁺ T Zellen 5 Tage nach Sekundärinfektion wurde ein signifikanter Unterschied zwischen CCR4-defizienten Mäusen und WT bzw. CD1d^{-/-}-Mäusen festgestellt. Hierbei produzieren mehr ZTLs aus CCR4-defizienten Mäusen IFN γ (ca. 22%) verglichen mit ZTLs aus WT und CD1d^{-/-}-Mäusen (beide ca. 15%) (**Abb.3.6-C**). Dies könnte ein Hinweis auf eine veränderte Sekundärantwort in CCR4-defizienten Mäusen sein, welche sich allerdings nicht in der Generierung einer Antigen-spezifischen ZTL Antwort statistisch widerspiegelte. Zusammenfassend konnte eine starke Sekundärantwort nach Infektion mit Lm-OVA in allen Gruppen detektiert werden. Die Analyse der OVA-spezifischen ZTL Antwort und der IFN γ Produktion von CD8⁺ T Zellen ergab keine Verminderung der Sekundärantwort in Gruppen defizient für Komponenten des alternativen Cross-Primings verglichen mit der WT Gruppe. Eher wurde eine Verstärkung dieser beiden Mechanismen in Abwesenheit des Chemokin-Rezeptors CCR4 festgestellt und konnte für die Produktion von IFN γ im Vergleich mit der WT und CD1d-defizienten Gruppe statistisch nachgewiesen werden.

3.1.7 CCR4-defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte bakterielle Last

Zur effektiven Bekämpfung einer bakteriellen Infektion steht am Anfang einer jeden Immunantwort das innate Immunsystem mit Komponenten wie Makrophagen, Monocyten und NK Zellen zur Verfügung. Für die Infektion mit *Listeria monocytogenes* konnte gezeigt werden, dass das durch NK Zellen und Makrophagen produzierte IFN γ und TNF α essentiell für die primäre Abwehr gegen das Pathogen sind (Tripp, Wolf, and Unanue 1993). Für die Klärung der bakteriellen Infektion ist ebenfalls die Rekrutierung von Monocyten ein wichtiger Parameter (North 1970). Es ist bekannt, dass CCR4 auch auf Zellen des innaten Immunsystems exprimiert ist. Sowohl Makrophagen, als auch Monocyten und Blutplättchen exprimieren den Chemokinrezeptor (Power et al. 1995; Andrew et al. 1998; Maghazachi 2003). Da die initiale Stärke einer auftretenden Infektion auch die Stärke der später einsetzenden adaptiven Immunantwort beeinflusst, sollte untersucht werden, ob eine CCR4- oder CCL17-Defizienz die bakterielle Last verändert. Wie in **Abb.3.7-A** deutlich wird, konnte ein statistisch signifikanter Unterschied in der bakteriellen Last zwischen CCR4-defizienten und CCL17-defizienten Mäusen

an Tag 1 nach Infektion in der Milz beobachtet werden, wobei CCR4^{-/-}-Mäuse eine erhöhte bakterielle Last zeigten. Bei der Analyse an Tag 3 nach Infektion in der Milz war dieser Unterschied stärker ausgeprägt und auch im Vergleich von CCR4-defizienten mit Wildtypmice statistisch signifikant. Überraschenderweise konnte kein Unterschied zwischen CCL17-defizienten und WT Mäusen in ihrer bakteriellen Last an Tag 3 nach Infektion in der Milz ermittelt werden (**Abb.3.7-B**).

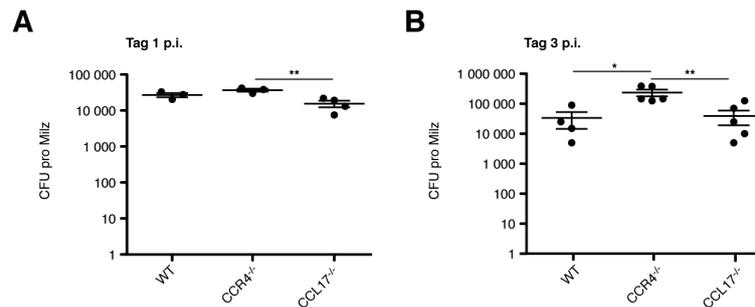


Abb.3.7: CCR4-defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte bakterielle Last. WT, CCR4^{-/-} und CCL17^{-/-}-Mäuse wurden mit 2×10^4 Lm-OVA infiziert und an Tag 1 p.i. (A) oder Tag 3 p.i. (B) auf ihre bakterielle Last (CFU) in der Milz hin untersucht.

An Tag 7 konnte in keiner der Gruppen nach Infektion in der Milz eine bakterielle Besiedlung detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

3.1.8 CD8⁺ T Zellen zeigen nach Listerien-Infektion keine CCR4-Expression

Um auf das von DZ sezernierte Chemokin CCL17 reagieren zu können, müssen ZTLs den korrespondierenden Chemokinrezeptor CCR4 exprimieren. Dies ermöglicht eine zielgerichtete und effiziente Migration hin zu den Antigen-exprimierenden Zellen. Nach Applikation von α GC mit dem Modellantigen OVA verbesserte die Sezernierung von CCL17 durch DZ die directionale Migration der ZTLs und deren Kontaktzeit mit den Chemokin-produzierenden DZ (Semmling et al. 2010). Es sollte folglich untersucht werden, ob nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* ZTLs den Chemokinrezeptor CCR4 auf ihrer Oberfläche exprimieren und sie somit in der Lage sind, zielgerichtet auf einen CCL17-Stimulus hin zu migrieren. Aufgrund der Abwesenheit eines funktionalen Färbereagens für CCR4 auf der Zelloberfläche, sollte indirekt über die Migration hin zu CCL17 und die Messung der Transkriptmenge nach Lm-OVA Infektion von ZTL die Anwesenheit von CCR4 bestimmt werden. Die Untersuchung zur Transkriptmenge des CCR4 Chemokinrezeptors nach Infektion mit Lm-OVA blieb ergebnislos, da entweder, wie in **Abb.3.8-**

A zeigt, eine falsch-positive Expression im Vergleich mit CCR4^{-/-} OT-1 T Zellen ermittelt werden konnte oder andere für CCR4 spezifische Primer-Paare keinerlei Amplifikation erzielen (Daten nicht gezeigt). Eine valide Aussage lässt sich ausgehend von diesen Daten nicht tätigen. Für die Analyse der zielgerichteten Migration hin zu CCL17 wurde das transgene OT-1 System genutzt, um sicherzugehen, dass möglichst viele im Transwell-Assay untersuchten CD8⁺ T Zellen durch die Infektion mit Lm-OVA aktiviert sind.

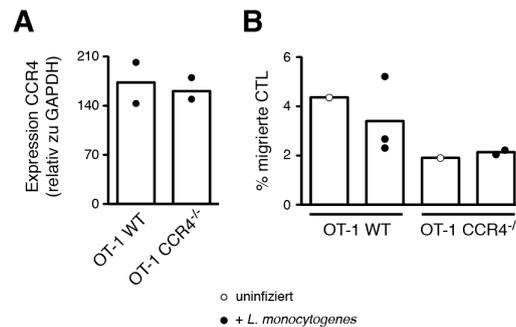


Abb.3.8: ZTLs migrieren nach Lm-OVA Infektion nicht zielgerichtet auf CCL17 und zeigen keine CCR4-Transkript Expression. OT-1 und CCR4^{-/-} OT-1 Mäuse wurden mit 2x10⁴ Lm-OVA infiziert, CD8⁺ T Zellen ein Tag p.i. mittels MACS-Technologie isoliert und entweder im Transwell Assay eingesetzt (**B**) oder ihre mRNA isoliert und die Expression von CCR4 mittels qPCR untersucht (**A**). **A** Expression von CCR4 in Relation zu GAPDH 24 Stunden nach Infektion mit Lm-OVA. **B** Prozent migrierter CD8⁺ T Zellen 6 Stunden nach Inkubation im Transwell (5µm Insert-Größe) auf CCL17 (10ng/ml) hin.

Die CD8⁺ T Zellen aus OT-1 Mäusen besitzen einen transgenen T Zellrezeptor, welcher das OVA-Peptid SIINFEKL im Kontext von MHC-I auf der Oberfläche von Antigen-exprimierenden Zellen erkennen kann. Es konnte kein Unterschied in der Anzahl an migrierten ZTLs zwischen infizierten und uninfizierten Mäusen festgestellt werden. Als Negativkontrolle diente das Migrationsverhalten aus CCR4-defizienten Mäusen isolierter ZTLs (**Abb.3.8-B**). Die Untersuchung mithilfe des Transwell-Assays ergab keine zielgerichtete Migration von ZTLs hin zu dem Chemokin CCL17. Aus der nicht vorhandenen zielgerichteten Migration von ZTLs hin zu CCL17 nach Infektion mit Lm-OVA lässt sich eine funktionale Abwesenheit von CCR4 auf der Zelloberfläche ableiten. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass nach Infektion mit dem Pathogen *Listeria monocytogenes* Dendritische Zellen CCL17 produzierten. CCL17-produzierende Antigen-präsentierende Zellen waren stärker aktiviert, messbar anhand ihrer Expression der Oberflächenmarker CD40, CD80 und CD86 und konnten in vitro im besonderen Maße naive OT-1 T Zellen aktivieren und sie somit zur Proliferation befähigen. Das Fehlen des Chemokins CCL17 und des korrespondierenden Chemokinrezeptors CCR4 verminderte nicht die ZTL-Antwort nach einer Primär- oder Sekundärinfektion in vivo. Auch die Abwesenheit der

Fähigkeit gleichzeitig CCL17 zu produzieren und OVA-Peptid zu präsentieren auf einer DZ führte nicht zu einer Reduktion der adaptiven Immunantwort. Wird die bakterielle Last in der Frühphase der Immunantwort untersucht, so führt das Fehlen des Chemokinrezeptors CCR4 zu einer erhöhten Anzahl an Bakterien in der Milz. Nach einer Listerien-Infektion konnte keine zielgerichtete Migration von ZTLs hin zu CCL17 festgestellt werden.

3.2 NKT Zellen und ihre Funktion in der Abwehr einer Listerien-Infektion

NKT Zellen sind mit der Fähigkeit ausgestattet, schnell auf eindringende Pathogene zu reagieren, indem sie nach Aktivierung rasant eine große Menge und Vielzahl an Zytokinen produzieren können (Lawson 2012). Ebenso können sie eine elementare Rolle in der Etablierung von adaptiven Immunantworten einnehmen, z.B. durch die Lizenzierung von Dendritischen Zellen. In ihrer Rolle als Lymphozyten mit Ähnlichkeiten zu Gedächtniszellen und der infolgedessen IFN γ Produktion aktivieren sie Makrophagen und leisten einen Beitrag zur bakteriellen Klärung (Nieuwenhuis et al. 2002). Die protektive Rolle von NKT Zellen in einer bakteriellen Abwehr gegen verschiedene Mikroorganismen wird neben der IFN γ Produktion durch die Aktivierung anderer Zelltypen wie DZ, NK Zellen oder ZTLs erreicht (Van Kaer, Parekh, and Wu 2013). Die Rolle von NKT Zellen in der Listerien-Infektion konnte noch nicht ausreichend geklärt werden. So zeigten Studien, dass die Listeriose in CD1d^{-/-}-Mäusen verschlimmert ist (Arrunategui-Correa and Kim 2004), während dies in Ja18^{-/-}-Mäusen nicht der Fall ist (Ranson et al. 2005). Die folgenden Experimente sollten die Frage klären, ob und inwiefern NKT Zellen einen Beitrag zur Klärung der bakteriellen Infektion mit *Listeria monocytogenes* leisten.

3.2.1 NKT Zellen werden im Rahmen einer Listerien-Infektion aktiviert

Nachdem die Rolle von NKT Zellen in der Infektion mit dem Pathogen *Listeria monocytogenes* in der Literatur verschiedenartig beschrieben ist, sollte initial untersucht werden, ob NKT Zellen nach Infektion mit dem Pathogen aktiviert werden. Die Aktivierung von NKT Zellen lässt sich anhand ihrer IFN γ Produktion (Matsuda et al. 2003) und Expression des Oberflächenmoleküls CD69, als Marker für Aktivierung (Chackerian et al. 2002), untersuchen. Um diese Faktoren zu ermitteln, wurden WT Mäuse mit Lm-OVA infiziert und 24 Stunden später die NKT Zellen in Milz und Leber analysiert.

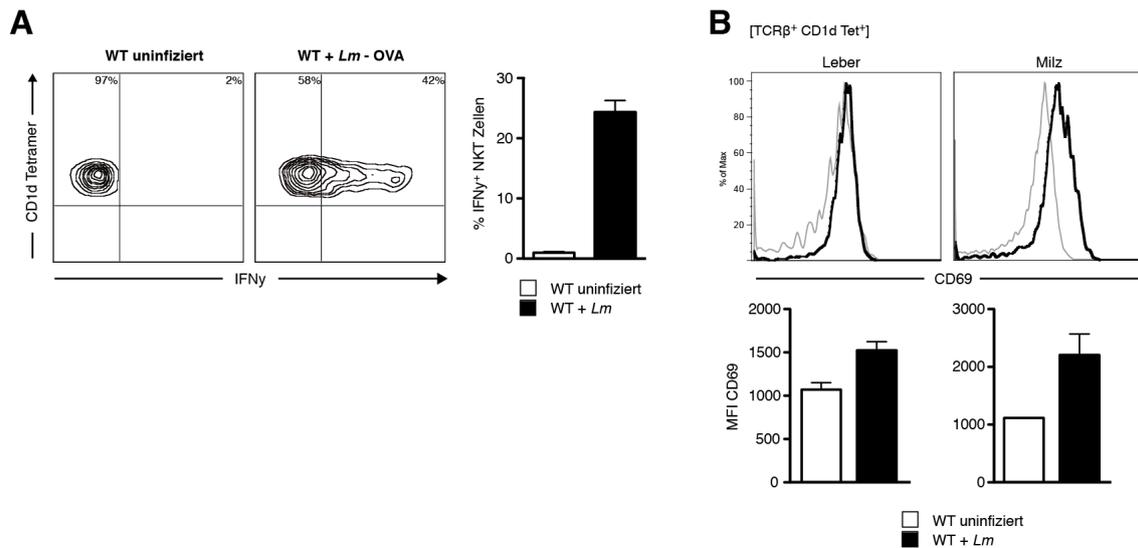


Abb.3.9: NKT Zellen in Leber und Milz sind nach Infektion mit *Lm*-OVA aktiviert. WT Mäuse wurden mit 2×10^4 *Lm*-OVA infiziert und NKT Zellen ein Tag p.i. in Milz und Leber analysiert. Gezeigt sind uninfierte (weiß) und infizierte (schwarz) WT Mäuse. **A** Histogramm (links) und Graph (rechts) zeigen die IFN γ Produktion von NKT Zellen in der Milz. **B** Histogramm (oben) zeigt Expression von CD69 auf NKT Zellen in Leber (links) und Milz (rechts). Graph (unten) zeigt MFI von CD69 in Leber (links) und Milz (rechts).

Sowohl in Leber als auch in Milz zeigten die untersuchten NKT Zellen einen aktivierten Phänotyp. Dies spiegelte sich in der Produktion von IFN γ in der Milz wider. 25% aller NKT Zellen exprimierten IFN γ nach Infektion mit *Lm*-OVA (**Abb.3.9-A**). Der Aktivierungsmarker CD69 wurde jeweils in Milz und Leber von NKT Zellen nach Infektion mit *Lm*-OVA stärker exprimiert verglichen mit einer uninfierten WT Kontrolle. Hierbei wurde die Expression in der Milz verdoppelt, wohingegen dies in der Leber nur um 50% gesteigert war (**Abb.3.9-B**). Sowohl in Milz und Leber wurden NKT Zellen aktiviert, messbar anhand einer gesteigerten IFN γ Produktion und erhöhten Expression des Aktivierungsmarkers CD69.

3.2.2 Der Einfluss von iNKT oder NKT Zell Defizienz auf die bakterielle Last und die Etablierung von ZTL Antworten nach Listerien-Infektion

Im Folgenden wurden zwei verschiedene genetisch modifizierte Mauslinien für die Untersuchung des Einflusses von NKT Zellen auf den Ausgang einer Listerien-Infektion verwendet: zum Einen CD1d^{-/-}-Mäuse, in denen alle NKT Zellen fehlen, und zum Anderen J α 18^{-/-}-Mäuse, in denen nur die iNKT Zellen fehlen. Zunächst sollte untersucht werden, ob die Abwesenheit von iNKT Zellen oder aller NKT Zellen einen Einfluss auf die bakterielle Last nach Infektion mit *Lm*-OVA hat. Hierfür wurden die jeweiligen Mäuse mit 2×10^4 *Lm*-OVA infiziert und nach drei Tagen die CFU in Milz und Leber analysiert. Weder in der Milz noch in der Leber konnte ein Unterschied in der bakteriellen Last zwischen den verschiedenen Gruppen an Tag 3

nach Infektion festgestellt werden. Allerdings wurden in unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten verschiedene Ergebnisse erzielt, sodass in einem hier nicht gezeigten Experiment eine Erhöhung der bakteriellen Last in CD1d-KO Mäusen verglichen mit WT Mäusen ermittelt werden konnte. In der Milz zeigte sich eine 10-fach höhere bakterielle Last verglichen mit der Leber (**Abb.3.10-A**). Wird die Etablierung einer ZTL Antwort an Tag 7 nach Infektion untersucht, so wurde deutlich, dass sowohl in der Produktion von Antigen-spezifischen ZTL als auch in der Sezernierung des zytotoxischen Moleküls IFN γ von CD8⁺ T Zellen ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Abwesenheit von iNKT Zellen und allen NKT Zellen bestand. Fehlten alle NKT Zellen (CD1d^{-/-}-Mäuse, rot), so wurden ca. 4% Antigen-spezifische ZTL generiert, verglichen mit ca. 7% in der Abwesenheit von iNKT Zellen (J α 18^{-/-}-Mäuse, blau) und ca. 6% OVA-spezifische ZTL in der Anwesenheit von NKT Zellen (WT Mäuse, schwarz).

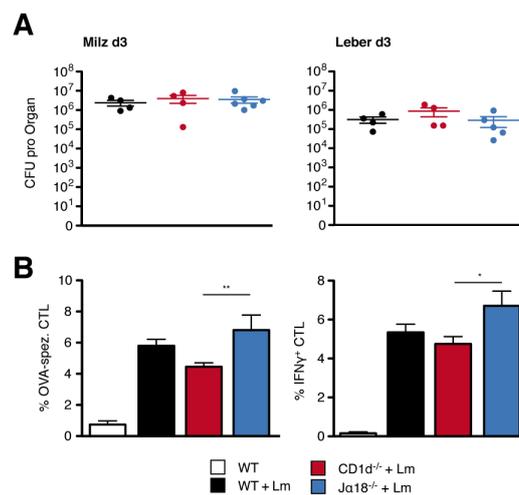


Abb.3.10: Einfluss von iNKT oder NKT Zell Defizienz auf die bakterielle Last und Etablierung von ZTL Antworten. Dargestellt sind WT uninferiert (weiß), WT infiziert (schwarz), CD1d^{-/-} infiziert (rot) und J α 18^{-/-} infiziert (blau). **A** Bakterielle Last in CFU pro Organ an Tag 3 nach Infektion mit 2×10^4 Lm-OVA in Milz (links) und Leber (rechts). **B** % OVA-spezifische ZTL (links) und % IFN γ Produktion von ZTL (rechts) an Tag 7 p.i. mit 5×10^3 Lm-OVA in der Milz.

Die gleichen Unterschiede ließen sich auch in der Produktion des zytotoxischen Moleküls IFN γ ermitteln. Hierbei produzierten ca. 5% der WT CD8⁺ ZTLs IFN γ , wohingegen ca. 4.5% ZTLs aus CD1d^{-/-}-Mäusen und ca. 6.5% ZTLs aus J α 18^{-/-}-Mäusen IFN γ sezernierten (**Abb.3.10-B**). Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass ein konstanter Unterschied in der bakteriellen Last an Tag drei nach Infektion in An- oder Abwesenheit von NKT Zellen nicht ermittelt werden konnte. Ein statistisch signifikanter Unterschied sowohl in der prozentualen Menge an Antigen-spezifischen ZTL als auch in der Produktion von IFN γ konnte zwischen

Mäusen defizient in iNKT Zellen und defizient in allen NKT Zellen festgestellt werden. Ausgehend von diesen Daten könnte das bedeuten, dass iNKT Zellen die ZTL Generierung inhibieren, während Typ II NKT Zellen einen positiven Beitrag leisten.

3.2.3 NK Zellen sind in Abwesenheit von NKT Zellen stärker aktiviert

Um einen genauen Einblick in mögliche Veränderungen zu bekommen, welche mit der Abwesenheit von NKT Zellen in einer Listerien-Infektion verbunden sind, wurden verschiedene Zelltypen des innate Immunsystems in der frühen Phase der Immunantwort untersucht. NK Zellen spielen eine essentielle Rolle in der frühen Bekämpfung der bakteriellen Infektion, da sie nach Aktivierung durch TNF α und IL-12, ausgeschüttet von Lm-infizierten Makrophagen, große Mengen IFN γ sezernieren. Dieses IFN γ wiederum aktiviert die bakterizide Aktivität der Makrophagen (Tripp, Wolf, and Unanue 1993; Humann and Lenz 2010). Für die Untersuchung des Verhaltens von NK Zellen in der Abwesenheit von NKT Zellen, wurden die entsprechenden Mäuse mit Lm-OVA infiziert und an Tag 1-4 anhand ihrer IFN γ Produktion und Expression des Aktivierungsmarkers CD69 analysiert. In Abwesenheit von NKT Zellen in CD1d^{-/-}-Mäusen war die IFN γ Produktion von NK Zellen 24 Stunden nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* statistisch signifikant höher als in WT Mäusen. Hierbei sezernierten ca. 20% der NK Zellen in Anwesenheit von NKT Zellen IFN γ im Vergleich zu ca. 40% in Abwesenheit von NKT Zellen. An Tag 2 nach Infektion waren diese Unterschiede wieder ausgeglichen und ca. 10% der NK Zellen aus beiden Gruppen produzierten IFN γ (**Abb.3.11-A**). Ein weiterer Parameter zur Untersuchung der Aktivierung von NK Zellen ist wie bei NKT Zellen das Oberflächenmolekül CD69. Auch hier konnten statistisch signifikante Unterschiede in der Expression anhand des MFIs von CD69 24 Stunden nach Infektion zwischen NK Zellen aus WT oder aus CD1d-defizienten Mäusen detektiert werden. In Abwesenheit von NKT Zellen exprimierten NK Zellen CD69 doppelt so stark auf Zellebene verglichen mit NK Zellen aus WT Mäusen. Ein weiterer Anstieg des MFIs an Tag 2 konnte beobachtet werden. Allerdings war dieser in beiden untersuchten Gruppen nicht statistisch signifikant unterschiedlich. Anschließend fielen in beiden Gruppen bis Tag 4 die MFI Werte nahe Ausgangsniveau an Tag 0 zurück (**Abb.3.11-B**). Eine mögliche Ursache für die vermehrte Produktion von IFN γ kann in einer erhöhten Anzahl an NK Zellen nach der beginnenden Infektion liegen. Wie in **Abb.3.11-C** deutlich wird, war die prozentuale Anzahl an NK Zellen gemessen an der Gesamtzellpopulation in beiden Gruppen zu den Analysezeitpunkten identisch. Ein deutlicher Abfall an NK Zellen konnte von ca. 3% an Tag 0 zu 2% an Tag 1 relativ zur Gesamtzellzahl festgestellt werden. Dies könnte für ein Absterben der NK Zellen nach Infektionsbeginn oder eine verstärkte Expansion anderer Immunzellen

sprechen. Diese Anzahl fiel auf 1% an Tag 2 und erreichte das Ausgangsniveau an Tag 4 nach Infektion.

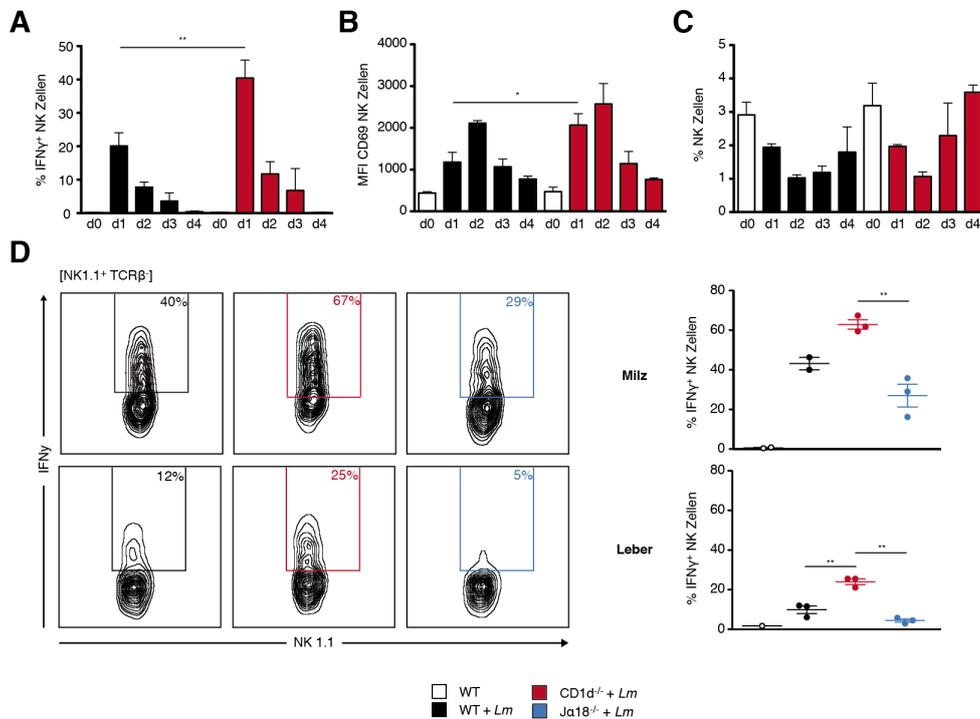


Abb.3.11: NK Zellen sezernieren mehr IFN γ in Abwesenheit aller NKT Zellen. NK Zellen aus uninferzierten WT Mäusen (weiß) oder mit 2×10^4 Lm-OVA infizierten WT Mäusen (schwarz), infizierten CD1d^{-/-}-Mäusen (rot) und infizierten J α 18^{-/-}-Mäusen (blau) analysiert in Leber oder Milz. **A** % IFN γ ⁺ NK Zellen an Tag 0-4 in der Milz. **B** MFI CD69 von NK Zellen an Tag 0-4 in der Milz. **C** % NK Zellen an Gesamtzellen an Tag 0-4 in der Milz. **D** Histogramme (links) und Graphen (rechts) zeigen IFN γ Produktion von NK Zellen in Milz (oben) und Leber (unten).

Zieht man zur Analyse auch Mäuse heran denen nur iNKT Zellen fehlen so wurde deutlich, dass in diesen Mäusen weniger als halb so viele NK Zellen IFN γ sezernieren (ca. 25%) verglichen mit NK Zellen aus CD1d-defizienten Tieren (ca. 60%). Ein Vergleich zwischen WT, CD1d-defizienten und J α 18-defizienten Mäuse zeigte, dass die IFN γ Produktion in der Leber das gleiche Muster aufwies, allerdings viel schwächer ausgeprägt war. In der Leber waren NK Zellen aus WT Mäusen zu ca. 10%, aus CD1d^{-/-}-Mäusen zu ca. 20% und aus J α 18^{-/-}-Mäusen zu ca. 5% positiv für IFN γ (**Abb.3.11-D**). Es kann festgehalten werden, dass NK Zellen aus NKT Zell-defizienten Mäusen stärker aktiviert waren. Dies wird 24 Stunden nach Infektion an ihrer CD69 Expression und verstärkten IFN γ Produktion verglichen mit NK Zellen aus WT- oder J α 18^{-/-}-Mäusen deutlich. Eine weitere mögliche Erklärung für eine erhöhte Produktion des Moleküls IFN γ durch NK Zellen in Abwesenheit aller NKT Zellen könnte an einer verstärkten bakteriellen Last in CD1d^{-/-}-Mäusen liegen. Um dies zu überprüfen, wurden Mäuse aus den respektiven Gruppen

mit Lm-OVA infiziert und 24 Stunden nach Infektion anhand ihrer bakteriellen Last in Milz und Leber analysiert.

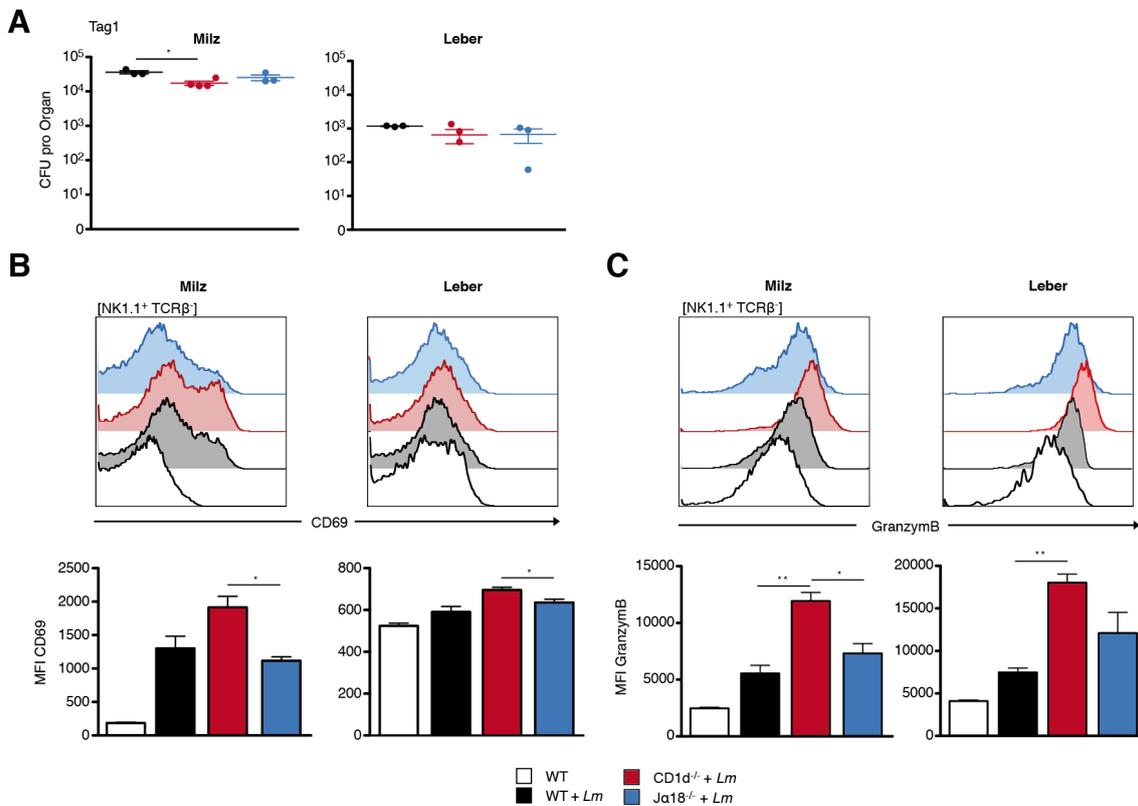


Abb.3.12: NK Zellen besitzen einen erhöhten Aktivierungsstatus in CD1d^{-/-}-Mäusen. NK Zellen aus uninfizierten WT Mäusen (weiß) oder mit 2x10⁴ Lm-OVA infizierten WT Mäusen (schwarz), infizierten CD1d^{-/-}-Mäusen (rot) und infizierten Ja18^{-/-}-Mäusen (blau) analysiert in Leber oder Milz 1 Tag p.i.. **A** CFU pro Organ aus Milz (links) oder Leber (rechts). **B** Histogramme (oben) und Graphen (unten) zeigen den MFI von CD69 von NK Zellen aus Milz (links) oder Leber (rechts). **C** Histogramme (oben) und Graphen (unten) zeigen den MFI von Granzym B von NK Zellen aus Milz (links) oder Leber (rechts).

Ein statistisch signifikanter Unterschied in der bakteriellen Last konnte ein Tag nach Infektion mit Lm-OVA in der Milz zwischen WT und CD1d^{-/-}-Mäusen nachgewiesen werden. In Abwesenheit von NKT Zellen war eine geringere bakterielle Last in der Milz detektierbar. Dieser Unterschied konnte in der Leber nicht gefunden werden. Hier war die bakterielle Last in allen Gruppen um mehr als ein 10-faches geringer verglichen mit der Milz (**Abb.3.12-A**). Neben der Analyse des Oberflächenmarkers CD69 auf der Zelloberfläche der NK Zellen, kann ebenfalls die Produktion des zytotoxischen Moleküls Granzym B zur Bestimmung der Stärke der Aktivierung von NK Zellen analysiert werden. Hierbei liegt Granzym B in seiner inaktiven Form in zytotoxischen Granula in ZTLs, NKT und NK Zellen vor. Die Freisetzung von Granzym B und Perforin nach Formation der immunologischen Synapse und anschließender Fusion der Granula mit der Zielzellmembran führt zur Apoptose der Zielzelle (Cullen, Brunet, and Martin

2010; Fang, Herrick, and Nicholl 2012). Sowohl die Expression von CD69 als auch die Sezernierung von Granzym B war in NK Zellen der Milz in CD1d-defizienten Mäusen signifikant erhöht im Vergleich mit α 18-defizienten Mäusen. In der Leber traf dieser Umstand nur für die Analyse des MFIs von CD69 zu (**Abb.3.12-B,C**). Ein statistisch signifikanter Unterschied in der Produktion von Granzym B konnte in der Leber und in der Milz zwischen NK Zellen aus infizierten WT und CD1d-defizienten Mäusen gezeigt werden (**Abb.3.12-C**). Nach einer Infektion mit dem Pathogen *Listeria monocytogenes* wiesen NK Zellen der Milz und der Leber in Abwesenheit von NKT Zellen eine stärkere Aktivierung auf, als in Abwesenheit von iNKT Zellen oder in Anwesenheit aller NKT Zellen. Dies konnte durch eine verstärkte Expression von CD69, IFN γ und Granzym B von NK Zellen in CD1d^{-/-}-Mäusen gezeigt werden. Dieser Effekt ist nicht durch eine mögliche erhöhte Anzahl an NK Zellen oder einer verstärkten bakteriellen Besiedlung der untersuchten Organe zu erklären.

3.2.4 IFN γ wird in der Abwesenheit von CD1d in der Milz vermehrt sezerniert

Es konnte gezeigt werden, dass mehr NK Zellen in der Abwesenheit von CD1d IFN γ produzieren, was durch FACS-Analysen ermittelt worden ist. Dies lässt allerdings keinen Rückschluss auf die Gesamtmenge des im jeweiligen Organ produzierten Zytokins zu. Um die erhöhte Produktion von IFN γ mittels anderer Methoden nachweisen zu können und um die Gesamtmenge des zytotoxischen Moleküls in Milz und Leber zu bestimmen, wurde die Transkriptmenge auf mRNA Ebene und die direkte Sezernierung des Moleküls durch ELISA und eine Multiplex-Analyse (Luminex-System) untersucht. Hierfür wurden die jeweiligen Gruppen mit Lm-OVA infiziert und einen Tag nach Infektion entweder der Überstand von Organhomogenisaten (ELISA und Luminex) oder extrahierte RNA aus dem Gesamtgewebe (RT-PCR) analysiert. Auf der Ebene der Transkriptmenge konnte nachgewiesen werden, dass in der Milz von CD1d-defizienten Tieren mehr IFN γ Transkripte zu finden waren, verglichen mit WT Tieren (**Abb.3.13-A**). Wird die Gesamtproduktion des Zytokins im Überstand von Milz- oder Leberhomogenisat mittels ELISA untersucht, konnte jedoch kein Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen festgestellt werden (**Abb.3.13-B,C**). Es lässt sich ermitteln, dass die uninfizierte WT Kontrolle das gleiche Level an IFN γ im Überstand von Leberhomogenisat zeigte, verglichen mit den infizierten Gruppen (**Abb.3.13-C**). Durch eine Analyse im Luminex-System, was eine Bestimmung von bis zu 30 gleichzeitigen Parametern im Überstand von Homogenisaten oder im Serum ermöglicht, konnte ein statistisch signifikanter Unterschied in der Produktion von IFN γ in der Milz zwischen CD1d- und α 18-defizienten Tieren nachgewiesen werden, wobei CD1d-defiziente Tiere nach *Listeria*-Infektion eine erhöhte IFN γ Menge im

Milzhomogenisat aufwiesen. Dieser Trend war auch in den Leber- und Serumproben zu erkennen, jedoch nicht statistisch signifikant (**Abb.3.13-D**). Neben einer erhöhten Anzahl an NK Zellen in CD1d-defizienten Mäusen, welche IFN γ produzieren, wurde durch die Analyse der Transkriptmenge und der Gesamtzytokinmenge durch Multiplex-Untersuchung bestätigt, dass infizierte WT und J α 18-defiziente Tiere eine geringere Menge IFN γ nach Listerien-Infektion sezernieren, verglichen mit CD1d-defizienten Tieren bzw. dass CD1d-defiziente Tiere mehr IFN γ sezernieren als WT Tiere.

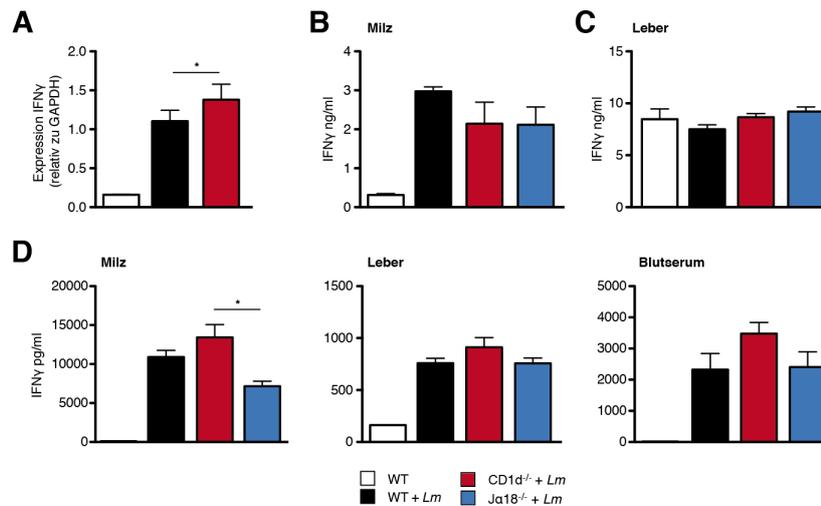


Abb.3.13: IFN γ wird in der Abwesenheit von CD1d in der Milz vermehrt sezerniert. Dargestellt sind uninferierte WT Mäuse (weiß) oder mit 2×10^4 Lm-OVA infizierte WT Mäuse (schwarz), infizierte CD1d^{-/-}-Mäuse (rot) und infizierte J α 18^{-/-}-Mäuse (blau). **A** Expression IFN γ relativ zu GAPDH in der Milz auf mRNA-Ebene durch RT-PCR 1 Tag p.i.. **B** Level von IFN γ (ng/ml) im Überstand von Milzhomogenisat 1 Tag p.i. durch ELISA-Analyse. **C** Level von IFN γ (ng/ml) im Überstand von Leberhomogenisat 1 Tag p.i. durch ELISA-Analyse. **D** Level von IFN γ (pg/ml) im Überstand von Blutserum, Milz- und Leberhomogenisat 1 Tag p.i. durch Multiplex-Analyse (Luminex).

3.2.5 Dendritische Zellen zeigen eine verstärkte Aktivierung in der Abwesenheit von NKT Zellen

Im Rahmen der vorangegangenen Versuche konnte gezeigt werden, dass Dendritische Zellen nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* CCL17 produzierten und diese auch stärker aktiviert waren, gemessen an ihrer Expression der Oberflächenmarker CD80 und CD86 (siehe **Abb.3.2**). Studien haben gezeigt, dass CD8⁺ DZ wichtig für die initiale Expansion von Listerien sind, da in der Abwesenheit von DZ die bakterielle Last in der Milz nach 3 Tagen um das 500-fache reduziert war (Neuenhahn et al. 2006). In dem Modell der DZ-Depletion wurde ebenfalls ermittelt, dass NK Zellen in der Abwesenheit von DZ weniger aktiviert sind (Lucas et al. 2007). Die Zytokine IL-12 und IL-18 sind essentiell für die Aktivierung von NK Zellen (Walzer et al.

2005) und können auch von Dendritischen Zellen produziert werden. Für IL-12, sezerniert von DZ, wurde eine Rolle in der Listerien-Infektion nachgewiesen (Edelson 2012). Es sollte untersucht werden, ob in Abwesenheit von NKT Zellen Dendritische Zellen einen anderen Phänotyp aufweisen und somit eine verstärkte Aktivierung von NK Zellen erklärt werden könnte. Um dies zu untersuchen, wurden einen Tag nach Infektion mit Lm-OVA DZ auf die Expression der Oberflächenmarker CD80 und CD86, sowie die Produktion der Zytokine IL-12 und IL-18 analysiert. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in der Expression der Aktivierungsmarker CD86 und CD80 auf der Oberfläche von Dendritischen Zellen ein Tag nach Infektion mit Lm-OVA festgestellt werden. Allerdings konnte eine Tendenz erkannt werden, dass DZ aus CD1d-defizienten Mäusen stärker aktiviert sind als DZ aus $\text{J}\alpha 18$ -defizienten Mäusen (**Abb.3.14-A**). Wird die Produktion des Zytokins IL-12p70 untersucht, kann ein statistisch signifikanter Unterschied in der Sezernierung dieses Signalmoleküls zwischen NKT Zell- und iNKT Zell-defizienten Mäusen nach Listeria-Infektion festgestellt werden. Dies ist bezogen auf die Gesamtmenge an IL-12p70 in der Milz. In Abwesenheit von CD1d und in WT Mäusen wurde eine höhere Menge IL-12p70 in der Milz detektiert, verglichen mit Mäusen defizient in iNKT Zellen (**Abb.3.14-B**).

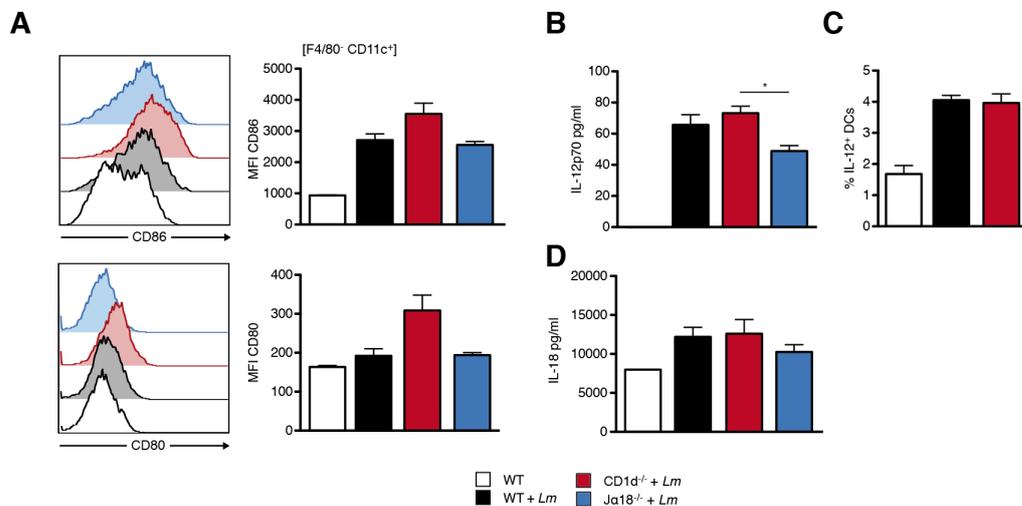


Abb.3.14: Dendritische Zellen zeigen eine verstärkte Aktivierung in der Abwesenheit von NKT Zellen. Dargestellt sind uninfizierte WT Mäuse (weiß) oder mit 2×10^4 Lm-OVA infizierte WT Mäuse (schwarz), infizierte CD1d^{-/-}-Mäuse (rot) und infizierte $\text{J}\alpha 18$ ^{-/-}-Mäuse (blau). **A** Histogramme (links) und Graphen (rechts) zeigen die MFI von CD86 (oben) und CD80 (unten) von F4/80⁺CD11c⁺ Zellen 1 Tag p.i.. **B** Menge IL-12p70 (pg/ml) im Überstand von Milzhomogenisat 1 Tag p.i. mittels Multiplex-Analyse (Luminex). **C** % IL-12⁺ DZ in der Milz 1 Tag p.i. mittels FACS-Analyse. **D** Menge IL-18 (pg/ml) im Überstand von Milzhomogenisat 1 Tag p.i. mittels Multiplex-Analyse (Luminex).

Wird die IL-12 Produktion von DZ mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht, wird kein Unterschied zwischen WT und CD1d-defizienten Tieren festgestellt (**Abb.3.14-C**). Die Analyse des Zytokins IL-18 im Multiplex-Assay von Luminex im Überstand des Leberhomogenisats ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen. Eine Tendenz in der geringeren Produktion von IL-18 in iNKT Zell-defizienten Mäusen im Vergleich mit den beiden anderen Gruppen war erkennbar (**Abb.3.14-D**). Dendritische Zellen wiesen nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* einen leicht verstärkten Aktivierungstyp in ihrer Expression der Oberflächenmoleküle CD80 und CD86 auf, welcher jedoch nicht statistisch signifikant war. Die Produktion von IL-12p70 in der Milz ist in α 18-defizienten Mäusen verringert, verglichen mit WT und CD1d-defizienten Mäusen.

3.2.6 In Abwesenheit von iNKT Zellen zeigen Makrophagen eine verminderte Aktivierung

Neben Dendritischen Zellen stellen Makrophagen eine wichtige Zellart des innate Immunsystems dar, welche in einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* diese initial eindämmen können. Zellen der Marginalzone in der Milz kommen als erstes mit Pathogenen aus dem Blutstrom in Kontakt. Hier sind myeloide Zellen wie DZ, Marginalzonen- und metallophile Makrophagen oder auch $F4/80^+$ Makrophagen (Rote Pulpa Makrophagen, RPM) lokalisiert (Conlan 1996; Neuenhahn et al. 2006; Aoshi et al. 2009). Als Reaktion auf eine Infektion mit *Listeria* sezernieren Makrophagen $TNF\alpha$ und IL-12, welche wiederum die IFN γ Produktion von NK Zellen stimulieren. Durch einen Feedback-Loop führt das von NK Zellen produzierte IFN γ zu einer weiteren Aktivierung von Makrophagen (Tripp, Wolf, and Unanue 1993; Humann and Lenz 2010). Da Makrophagen eine essentielle Rolle in der Aktivierung von NK Zellen einnehmen und das IL-12 nicht von DZ zu stammen scheint, sollte untersucht werden, ob dieser Zelltyp in der Abwesenheit von NKT Zellen möglicherweise stärker aktiviert ist und somit die erhöhte IFN γ Produktion von NK Zellen stimulieren kann. Hierfür wurden $CD11b^+ F4/80^{int}$ Marginalzonenmakrophagen (MZ MOs) und $CD11b^- F4/80^+$ Rote Pulpa Makrophagen (RPMs) untersucht. Wird die Expression des Aktivierungsmarkers CD86 auf der Zelloberfläche von MZ MOs untersucht, wurde ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Zellen aus CD1d-defizienten und jeweils Zellen aus WT oder α 18-defizienten Tieren ermittelt. MZ MOs aus WT und α 18-defizienten Tieren wiesen einen MFI von CD86 in Höhe von ca. 1500 auf. Einen deutlich gesteigerten MFI von ca. 2000 hingegen konnte bei MZ MOs aus CD1d-defizienten Tieren ermittelt werden (**Abb.3.15-A**). Für RPMs konnte mittels FACS-Analyse kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. Eine ähnliche Tendenz wie bei MZ MOs in der Expression des Aktivierungsmarkers CD86 war aber ersichtlich

(Abb.3.15-B). Die Analyse der bakterioziden reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied in den Gruppen, weder bei MZ MOs noch bei RPMs. Allerdings wurde eine Neigung ermittelt, welche eine verringerte Produktion von ROS in den beiden Makrophagen Subtypen in $\text{J}\alpha 18$ -defizienten Tieren verglichen mit WT und CD1d-defizienten Tieren aufwies (Abb.3.15-A,B).

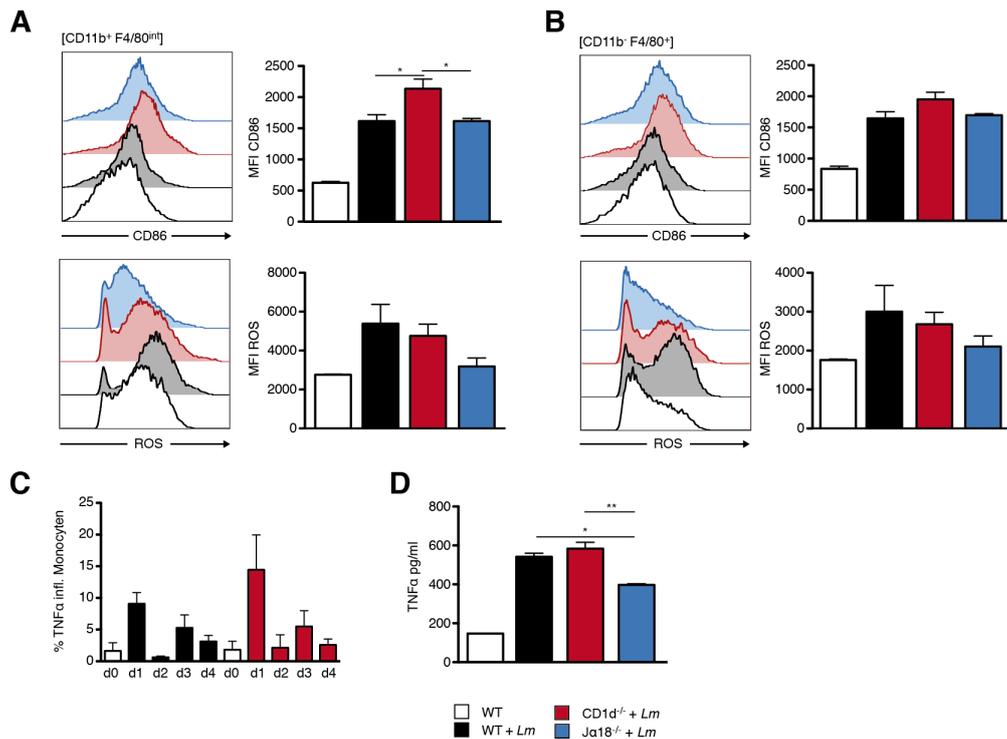


Abb.3.15: In Abwesenheit von iNKT Zellen zeigen Makrophagen eine verminderte Aktivierung. Dargestellt sind uninferierte WT Mäuse (weiß) oder mit 2×10^4 Lm-OVA infizierte WT Mäuse (schwarz), infizierte CD1d^{-/-}-Mäuse (rot) und infizierte $\text{J}\alpha 18$ ^{-/-}-Mäuse (blau). **A** MFI CD86 (oben) und MFI ROS (unten) von Marginalzonenmakrophagen ein Tag p.i. mit 2×10^4 Lm-OVA in der Milz im Histogramm (links) und Graph (rechts). **B** MFI CD86 (oben) und MFI ROS (unten) von Rote Pulpa Makrophagen ein Tag p.i. mit 2×10^4 Lm-OVA in der Milz im Histogramm (links) und Graph (rechts). **C** % TNFα in inflammatorischen Monocyten an Tag 0-4 p.i. mit 2×10^4 Lm-OVA. **D** Menge TNFα (pg/ml) im Überstand von Milzhomogenisat 1 Tag p.i. mit 2×10^4 Lm-OVA mittels Multiplex-Analyse (Luminex-System).

Wurde die Produktion des Zytokins TNFα in inflammatorischen Monocyten ermittelt, konnte eine erhöhte Produktion sowohl in WT als auch in CD1d-defizienten Tieren an Tag 1 nach Infektion festgestellt werden. Diese Produktion fiel bis Tag 4 auf den Grundzustand zurück (Abb.3.15-C). In der Multiplex-Analyse mittels des Luminex-Systems konnte eine statistisch signifikant verringerte TNFα Sezernierung im Überstand von Milzhomogenisat 1 Tag nach Infektion in $\text{J}\alpha 18$ -defizienten Tieren ermittelt werden, verglichen mit WT und CD1d-defizienten Tieren (Abb.3.15-D). Die Analyse von verschiedenen Makrophagen Subtypen zeigte, dass

sowohl Marginalzonen Makrophagen als auch Rote Pulpa Makrophagen in einer Infektionssituation mit dem Pathogen *Listeria monocytogenes* aktiviert wurden und CD86 als auch ROS verstärkt exprimierten. In Abwesenheit von iNKT Zellen regulierten die beiden Makrophagen Subtypen die Expression von CD86 und ROS herab und es wurde weniger TNF α in der Milz sezerniert.

3.2.7 Immunologische Regulatoren werden nicht von der Abwesenheit von iNKT Zellen beeinflusst

Als eine Option, um die Erhöhung pro-inflammatorischer Parameter des innate Immunsystems in der Abwesenheit von iNKT Zellen zu erklären, ist eine verminderte Aktivität von immunologischen Regulatoren wie T_{regs} oder MDSCs (*engl. myeloid-derived suppressor cells*, Myeloide Suppressor Zellen) denkbar. Diese Regulatoren des Immunsystems können durch die Ausschüttung von inhibierenden Stoffen oder durch direkten Zell-Zell-Kontakt aktiv eine Immunreaktion abmindern. Es konnte gezeigt werden, dass aktivierte iNKT Zellen mit MDSCs kooperieren, um in einem Modellsystem für murine multiples Sklerose vor dieser Autoimmunerkrankung zu schützen, indem nach α GC Gabe die Expansion und Aktivierung von MDSCs verstärkt war (Parekh et al. 2013). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass NKT Zellen *in vitro* die Entwicklung von T_{regs} inhibieren (Oh et al. 2011). Es sollte untersucht werden, ob in Abwesenheit von NKT oder iNKT-Zellen immunologische Regulatoren wie T_{regs} oder MDSCs einen veränderten Phänotyp aufweisen, welcher zu der erhöhten Aktivierung des innate Immunsystems nach *Listeria*-Infektion in CD1d-defizienten Tieren beitragen könnte. MDSCs sind CD11c⁻ und CD11b⁺ und können weiterhin durch die Oberflächenmarker Ly6C und Ly6G in granulocytäre MDSCs (Ly6G⁺, Ly6C^{low}) und monocytäre MDSCs (Ly6G⁻, Ly6C^{hi}) eingeteilt werden. Eine Analyse der Zusammensetzung des MDSCs-Repertoires in den untersuchten Gruppen führte keine statistisch signifikanten Unterschiede zu Tage (**Abb.3.16-A**). Granulocytäre MDSCs expandierten nach *Listeria*-Infektion, da in den uninfizierten Kontrollen ca. 6% und in den infizierten zwischen 10 und 12% granulocytäre MDSCs vorhanden waren (**Abb.3.16-B**). Den größten Anteil an CD11b⁺ CD11c⁻ MDSCs machten die monocytären MDSCs mit 40-50% in allen untersuchten Gruppen aus sowohl im Grundzustand als auch einen Tag nach Infektion mit Lm-OVA (**Abb.3.16-C**).

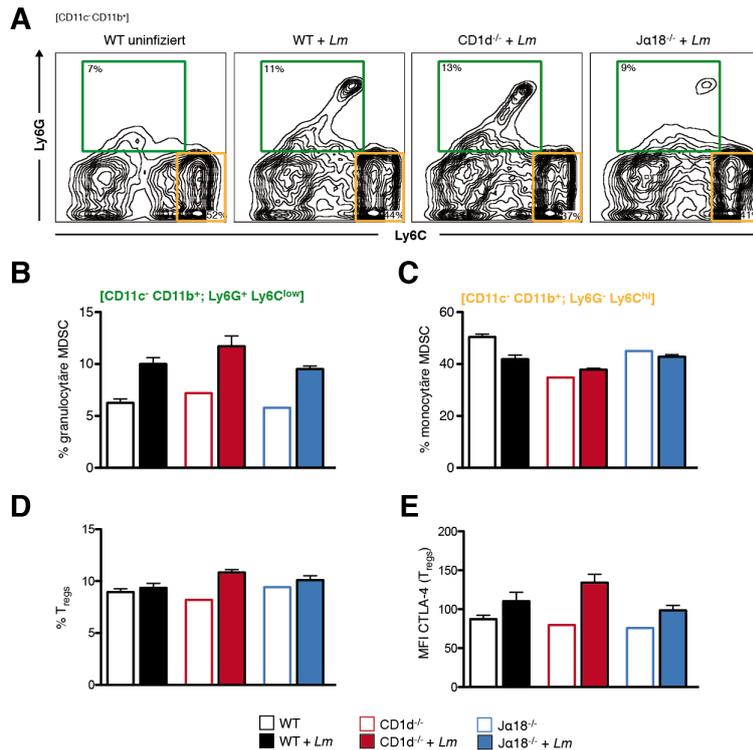


Abb.3.16: Immunologische Regulatoren werden nicht von der Abwesenheit von iNKT Zellen beeinflusst. Dargestellt sind uninfizierte WT Mäuse (weiß) oder mit 2×10^4 Lm-OVA infizierte WT Mäuse (schwarz), infizierte CD1d^{-/-}-Mäuse (rot) und infizierte Ja18^{-/-}-Mäuse (blau). Granulocytäre MDSCs sind in grün und monocytäre MDSCs in gelb gezeigt (A-C). A FACS-Plots 1 Tag p.i. in der Milz von MDSCs analysiert anhand der Expression von Ly6G und Ly6C. B % granulocytäre MDSCs in der Milz 1 Tag p.i.. C % monocytäre MDSCs in der Milz 1 Tag p.i.. D % T_{regs} von CD4⁺ T Zellen in der Milz 1 Tag p.i.. E MFI CTLA-4 von T_{regs} in der Milz 1 Tag p.i..

Neben MDSCs können auch T_{regs} inhibitorische Funktionen übernehmen. Sowohl in der Frequenz an regulatorischen T Zellen als auch in der Expression des Oberflächenmarkers CTLA-4, welcher als Aktivierungsmarker von T_{regs} gilt (Corthay 2009), konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden. Allerdings scheint auch hier eine erhöhte Aktivierung der T_{regs} in infizierten CD1d-defizienten Tieren im Vergleich mit Ja18-defizienten Tieren anhand der ZTLA-4 Expression vorzuliegen (Abb.3.16-D,E). Dies war allerdings nicht statistisch signifikant. Die Untersuchung der prozentualen Anzahl und des Aktivierungsstatus von inhibitorischen Zelltypen, wie MDSCs und T_{regs} in Abwesenheit von NKT und iNKT Zellen ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied in den analysierten Gruppen nach einer Listerien-Infektion und kann die beobachteten Effekte somit nicht erklären.

3.2.8 Co-Housing vermindert die IFN γ Produktion von NK Zellen in CD1d-defizienten Mäusen

In den vorangegangenen Experimenten konnte ermittelt werden, dass in Abwesenheit von CD1d, NK Zellen stärker aktiviert sind und mehr IFN γ sezernieren im Vergleich mit J α 18-defizienten Tieren (siehe **Abb.3.11, 3.12**). Einen erhöhten Aktivierungsstatus wiesen ebenfalls DZ und Makrophagen auf (**Abb.3.14, 3.15**). Die ermittelte verstärkte Immunreaktion in Abwesenheit von CD1d war nicht abhängig von immunologischen Regulatoren, da weder T_{regs} noch MDSCs eine veränderte Frequenz oder Phänotyp in CD1d-defizienten, verglichen mit J α 18-defizienten Tieren, zeigten. Somit scheinen vor allem bei pro-inflammatorischen Parametern Unterschiede zwischen CD1d- und J α 18-defizienten Tieren nach einer Listerien-Infektion zu liegen. Mehrere Studien haben gezeigt, dass kommensale Bakterien einen Einfluss auf die Entwicklung von NKT Zellen haben (Zeissig and Blumberg 2014b). Neben der Regulation von NKT Zell Aktivierung und Proliferation wurde in weiteren Studien gezeigt, dass die Abwesenheit von CD1d einen Einfluss auf die vorhandene Mikrobiota besitzt, die sich wiederum auf Immunreaktionen auswirken kann. In Studien von Bakterien-freien Mäusen wurde demonstriert, dass CD1d für die Kontrolle der intestinalen Kolonialisierung durch Gram-negative als auch Gram-positive Bakterien benötigt wird (Nieuwenhuis et al. 2009). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob der gefundene Effekt der erhöhten IFN γ Produktion von NK Zellen und die verstärkte Aktivierung der innate Immunzellen wie Makrophagen und DZ in Abwesenheit von CD1d auf eine veränderte Mikrobiota zurückzuführen sein kann. Hierfür wurden jeweils zwei Mäuse der drei verschiedenen Gruppen (WT, J α 18- und CD1d-defiziente Mäuse) für vier Wochen im selben Käfig gehalten, sodass nach dieser Zeit davon ausgegangen werden konnte, dass sich die Mikrobiota durch das koprophage Verhalten der Mäuse untereinander angepasst hat. Die Kontrolltiere wurden separat in Käfigen pro jeweilige Gruppe, aber für die gleiche Dauer von vier Wochen im Institut für experimentelle Immunologie gehalten (IEI-adaptiert). Die Analyse bei Infektion vier Wochen nach Zusammensetzen der Mäuse zeigte, dass sowohl NK Zellen aus CD1d- als auch aus J α 18-defizienten Tieren statistisch signifikante geringere Mengen IFN γ sezernierten im Vergleich mit NK Zellen aus WT Mäusen. Ein statistisch signifikanter Unterschied in der IFN γ Produktion, Expression von Granzym B und Expression von CD69 zwischen NK Zellen aus NKT und iNKT Zell-defizienten Tieren konnte nicht ausgemacht werden, egal ob die Mäuse zusammen in einem Käfig oder vier Wochen lang in getrennten Käfigen im IEI gehalten wurden. Allerdings war die Reduktion der IFN γ Sezernierung und der Granzym B Expression in NK Zellen aus J α 18-defizienten Tieren, verglichen mit WT Tieren, statistisch signifikant (**Abb.3.17-A**). In der Analyse von DZ vier Wochen nach Zusammensetzen der Mäuse und ein Tag nach Infektion mit

Lm-OVA konnte kein Unterschied zwischen Mäusen defizient in $\text{J}\alpha 18$ oder $\text{CD}1d$ ermittelt werden (**Abb.3.17-B**). Eine statistisch signifikante Abweichung in der Expression von $\text{CD}86$ konnte zwischen WT Mäusen und Mäusen ohne NKT Zellen festgestellt werden. DZ aus IEI-adaptierten Mäusen zeigten einen statistisch signifikanten Unterschied in der Expression des Aktivierungsmarkers $\text{CD}86$ im Vergleich von WT Mäusen und Mäusen defizient für iNKT Zellen. Ein ähnliches Muster der Expression von $\text{CD}86$ zeigte sich bei DZ aus $\text{CD}1d$ - und $\text{J}\alpha 18$ -defizienten Mäusen, welche einen MFI von ca. 1000 aufwiesen, verglichen mit einem MFI von ca. 2000 bei DZ aus WT Mäusen (**Abb.3.17-B**). Sowohl für Marginalzonenmakrophagen, als auch für Rote Pulpa Makrophagen konnte eine gleich starke Expression des Aktivierungsmarkers $\text{CD}86$ in Abwesenheit von iNKT oder NKT Zellen festgestellt werden, wenn Mäuse zusammen oder IEI-adaptiert gehalten worden sind. Ein statistisch signifikanter Unterschied in MZ MO zwischen WT und iNKT Zell-defizienten Tieren in ihrer Expression von $\text{CD}86$ war deutlich, wenn Tiere IEI-adaptiert waren (**Abb.3.17-C,D**). Abschließend kann festgehalten werden, dass verschiedene Haltungsbedingungen, wie eine separate Haltung der Mäuse für vier Wochen im IEI oder Co-Housing der verschiedenen Gruppen in einem gemeinsamen Käfig, einen Einfluss auf die Produktion des Zytokins IFN γ und den MFI von Granzym B in NK Zellen besitzen.

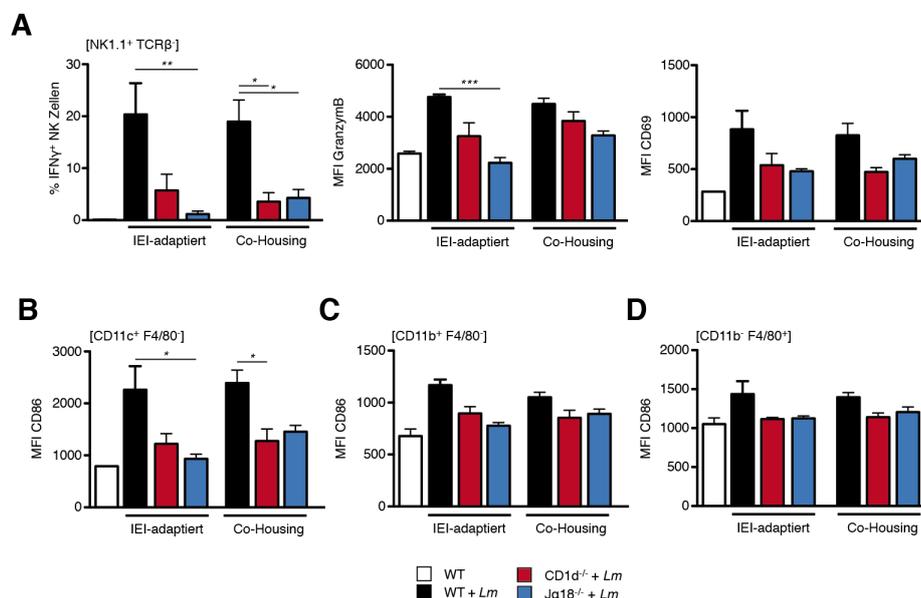


Abb.3.17: Co-Housing verringert die IFN γ Produktion von NK Zellen in $\text{CD}1d$ -defizienten Mäusen. Dargestellt sind uninfierte WT Mäuse (weiß) oder mit 2×10^4 Lm-OVA infizierte WT Mäuse (schwarz), infizierte $\text{CD}1d^{-/-}$ -Mäuse (rot) und infizierte $\text{J}\alpha 18^{-/-}$ -Mäuse (blau). Zwei Mäuse von jeder Gruppe (bis auf WT uninferiert) wurden entweder vier Wochen lang im gleichen Käfig gehalten (Co-Housing) oder separat in einzelnen Käfigen (IEI-adaptiert). 24h nach Infektion mit 2×10^4 Lm-OVA wurde die Milz untersucht. **A** Graphen zeigen % IFN γ^+ NK Zellen (links), MFI Granzym B (Mitte) und MFI $\text{CD}69$ (rechts)

von NK Zellen. **B** MFI CD86 von DZ. **C** MFI CD86 von Marginalzonenmakrophagen. **D** MFI CD86 von Rote Pulpa Makrophagen.

NK Zellen aus WT Mäusen wiesen einen stärkeren Aktivierungsstatus auf, als NK Zellen aus iNKT oder NKT-defizienten Mäusen. Die gleiche Tendenz konnte für Dendritische Zellen, Marginalzonenmakrophagen und Rote Pulpa Makrophagen festgestellt werden. Abschließend ist anzumerken, dass es bemerkenswert ist, dass bei Tieren, die vier Wochen nach Genotypen getrennt in der institutseigenen Tierhaltung verbrachten (siehe **Abb.3.17**), andere Muster im NK Zell Phänotyp nach Listeria-Infektion beobachtet werden konnten, als bei Tieren, die unmittelbar nach dem Transfer aus dem HET infiziert wurden (siehe **Abb.3.11** und **Abb.3.12**). Dies lässt Spekulationen zu, dass die ‚Instituts-Mikrobiota‘ dominant über die Genotyp-spezifische Mikrobiota die Immunreaktion nach Infektion mit einem Pathogen beeinflusst.

4. Diskussion

Natürliche Killer T Zellen sind aufgrund ihrer mannigfaltigen Funktionen in den letzten Jahren verstärkt in den Fokus der immunologischen Forschung gerückt. Ihnen konnte in einer Vielzahl von immunologischen Erkrankungen, wie zum Beispiel Typ I Diabetes oder Asthma, eine Rolle zugewiesen werden (Sharif et al. 2001; Akbari et al. 2003). Gleichmaßen konnten NKT Zellen in den verschiedensten Infektionskrankheiten - wie bei bakteriellem Befall mit *Pseudomonas aeruginosa*, *Borrelia burgdorferi* oder parasitärem Befall mit *Leishmania major* - als agierender Zelltyp ermittelt werden (Tupin, Kinjo, and Kronenberg 2007). NKT Zellen können eine breite Auswahl an Selbst- und Fremdartigen erkennen und nach deren Aktivierung innerhalb kürzester Zeit Zytokine und Chemokine sekretieren, welche wiederum andere Immunzellen - wie NK Zellen, B und T Zellen und Dendritische Zellen - aktivieren. Funktionsgewinn-Studien zur Eigenschaft von iNKT Zellen werden vornehmlich mit dem iNKT Zell-aktivierenden Adjuvanz α GC durchgeführt, dem prototypischen iNKT Zell-Agonisten, der in der Tumorbekämpfung (D. H. Chang et al. 2005) oder Kontext einer Influenzainfektion (Ko et al. 2005) vielversprechende Ergebnisse gezeigt hat. In vorangegangenen Studien zum Wirkmechanismus konnte bereits gezeigt werden, dass α GC die CD40-abhängige Aktivierung von ZTL durch DZs vermittelt initialisiert (Nishimura et al. 2000) und dass gleichzeitige CD40 Aktivierung und α GC Gabe zu einer starken IL-12 Produktion führt (Hermans et al. 2003). Eine wichtige Erkenntnis und Grundlage für diese Dissertation war die Entdeckung des alternativen Cross-Primings in unserem Labor. Hierbei konnte in der Studie von Semmling (2010) (Semmling et al. 2010) gezeigt werden, dass die gleichzeitige Administration von OVA und α GC zu einer starken NKT Zell-abhängigen ZTL Generierung führt, wenn ein und dieselbe DZ sowohl der NKT Zelle als auch der ZTL das jeweilige Antigen präsentieren muss. Ebenfalls konnte ermittelt werden, dass die APZ nach Lizenzierung durch die T Helferzelle Chemokine sekretiert, allen voran das Chemokin CCL17, welches im Gegenzug CCR4-exprimierende $CD8^+$ T Zellen anlockt. Beim Aufeinandertreffen von DZ und $CD8^+$ T Zellen werden diese in ihrer zytotoxischen Funktion aktiviert. In dieser Dissertation sollte untersucht werden, ob neben der Nutzung von α GC zur Induktion von alternativem Cross-Priming auch eine bakterielle Infektion, hier *Listeria monocytogenes*, zu der NKT Zell-abhängigen Lizenzierung von DZ und anschließender ZTL Aktivierung führt. Des Weiteren sollte die Rolle von NKT und iNKT Zellen in einer Listerien-Infektion analysiert werden, da hier in der Literatur bisher wenig bekannt ist und zum Teil je nach Methode unterschiedliche Ergebnisse publiziert worden sind.

4.1 CCL17 wird von Dendritischen Zellen in einer Listerien-Infektion sekretiert

CCL17 und CCL22 aktivieren beide den Chemokinrezeptor CCR4 und leisten einen essentiellen Beitrag bei der Rekrutierung von naiven CCR4-exprimierenden CD8⁺ T Zellen nach der Gabe von α GC und OVA im System des alternativen Cross-Primings (Semmling et al. 2010). CCL17 wird in verschiedenen Geweben wie Thymus, Darm, Milz oder auch Lunge vor allem von aktivierten Dendritischen Zellen und nicht von T und B Zellen sezerniert (Lieberam and Förster 1999; Alferink et al. 2003; Semmling et al. 2010). Vor allem in immunologischen Erkrankungen wie allergischer, bronchialer Hyperreaktivität (Kawasaki et al. 2001), atopischer Dermatitis (Horikawa et al. 2002) oder in einem Kolitis-Modell (Heiseke et al. 2012) konnte eine Produktion von CCL17 nachgewiesen werden. Hierbei führt die Produktion von CCL17 zu einem verschlechterten Krankheitsbild, zum Beispiel im Falle von muriner Arteriosklerose, durch eine verminderte T_{reg} Expansion und gleichzeitiger Förderung eines entzündlichen T_{H1} Phänotyps (Weber et al. 2011). Unter infektiösen Bedingungen konnte eine Produktion von CCL17 nach Stimulation von Langerhans Zellen mit *Staphylococcus aureus* Zellwand-Komponenten oder nach Helminthen-Infektion im Serum von *Schistosoma mansoni* infizierten Patienten ermittelt werden (Geiger et al. 2013; Matsui, Tofukuji, and Ikeda 2015). Die Hauptfunktion von CCL17 zur Attraktion von CCR4 exprimierenden, naiven ZTL nach Gabe von α GC und OVA im System des alternativen Cross-Primings konnte in unserem Labor gezeigt werden (Semmling et al. 2010). Hierbei produzieren von NKT Zellen-aktivierte CD8⁺ Dendritische Zellen große Mengen des Chemokins und locken somit CCR4-exprimierende ZTL zu den bereits lizenzierten DZ, um diese zu funktionsfähigen zytotoxischen Effektor-T Zellen aktivieren zu können. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob CCL17 nach einer Listerien-Infektion von Dendritischen Zellen produziert wird und ob es hier eine ähnliche Funktion durch Anlockung von naiven, CCR4-exprimierenden ZTL übernimmt. Bis jetzt gab es keinen Hinweis darauf, dass CCL17 nach einer Listerien-Infektion produziert wird, da dies noch nicht untersucht worden ist. In der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass nach einer Infektion mit *Listeria* CCL17 sezerniert wird. Hierbei wird CCL17 bereits nach 24 Stunden sekretiert und die Anzahl an CCL17⁺ Zellen steigt nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* bis zu drei Tage nach Infektion weiter an. Sowohl CD8⁺ als auch CD8⁻ DZ produzieren CCL17, wobei CD8⁻ Dendritische Zellen den größten Anteil an CCL17 produzieren, diese aber auch in größerer Anzahl in der Milz vorhanden sind. Wird der Ort innerhalb der Milz histologisch analysiert, an dem CCL17 produziert wird, so konnte festgestellt werden, dass ein Tag nach Infektion CCL17 vor allem in der Marginalzone und der roten Pulpa sekretiert wird und weniger in der weißen Pulpa, wo T

Zell Priming stattfindet (siehe **Abb.3.1**). In der Studie von Semmling (2010) (Semmling et al. 2010) konnte gezeigt werden, dass bereits fünf Stunden nach Injektion von α GC plus Antigen Dendritische Zellen CCL17 produzieren und hier $CD8^+$ DZ die Hauptproduzenten des Chemokins sind. Ebenfalls waren diese CCL17 produzierenden Zellen vor allem in der T Zell Zone der Milz vorzufinden. Hierbei sollte bedacht werden, dass α GC ein sehr starker Stimulus zur NKT Zell Aktivierung ist. Es wird in erster Linie von $CD8^+$ DZs präsentiert (Arora et al. 2014) und daher wahrscheinlich eine andere Kinetik der CCL17 Sekretion hervorrufen als replizierende Bakterien. Die Produktion von CCL17 vornehmlich in der Marginalzone und der roten Pulpa kann den Schluss zulassen, dass eine Produktion des Chemokins ebenfalls durch andere Zellen neben den Dendritischen Zellen möglich ist, da in dieser Zone der Milz vor allem Makrophagen zu finden sind. Hierfür spricht, dass erst kürzlich eine Produktion von CCL17 durch $RANK^+$ M2 Makrophagen nach Stimulation durch *RANKL in vitro* gezeigt werden konnte (Fujimura et al. 2015). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass $CD169^+$ Makrophagen, diese sind vor allem in der Marginalzone angesiedelt, im Lymphknoten Lipidantigen an NKT Zellen präsentieren (Barral et al. 2010). Weitere Studien zeigten, dass eine Interaktion von NKT Zellen, Makrophagen und auch Dendritischen Zellen vor allem in der Marginalzone und der roten Pulpa in der Milz stattfindet und hier die NKT Zellen aktiviert werden (Barral et al. 2012). Somit ist denkbar, dass nach einer Infektion mit *Listeria*, Dendritische Zellen und Makrophagen CCL17 produzieren, um CCR4-exprimierende NKT Zellen anzulocken, sodass diese aktiviert werden. Hierfür müsste die Produktion von CCL17 in Makrophagen nach Infektion mit *Listeria* in den CCL17-Reporter-mäusen mittels FACS und auch histologisch, zur Identifizierung der Lokalisation von Makrophagen und CCL17, untersucht werden. Eine funktionale CCR4 Expression auf NKT Zellen der Maus konnte bisher nicht auf Proteinebene gezeigt werden. Allerdings zeigen Daten des *Immunological Genome Projects* eine Expression auf mRNA Ebene von CCR4 auf Vorläuferzellen von iNKT Zellen im Thymus sowie iNKT Zellen in der Milz (www.immgen.org). Im Menschen konnte eine Expression von CCR4 in gesunden Probanden auf $CD4^+$ NKT Zellen festgestellt werden (Thomas et al. 2003). Die Produktion von CCL17 dient in dem Modell des alternativen Cross-Primings der Migration von CCR4-exprimierenden ZTL hin zu den bereits lizenzierten Dendritischen Zellen, um eine schnelle Aktivierung der zytotoxischen T Zellen zu gewährleisten. In der vorliegenden Dissertation konnte mit den durchgeführten Experimenten keine CCR4 Expression von naiven ZTL nach *Listeria*-Infektion festgestellt werden (siehe **Abb.3.8**). Die erhobenen Parameter waren jedoch indirekter Natur, da eine direkte Färbung von CCR4 aufgrund des Mangels eines funktionierenden CCR4 Färbereagens nicht möglich ist. Hierbei besteht die Möglichkeit, dass die für die Analyse der CCR4 Expression mittels qPCR verwendeten Primer nicht funktional waren, da sowohl in der Negativkontrolle mit CCR4-

Defizienz als auch in der eigentlichen Untersuchungsprobe eine gleiche, starke Expression von CCR4 mRNA festgestellt worden ist. Bei der Überprüfung der Funktionalität von CCR4 auf ZTL konnte keine zielgerichtete Migration von CD8⁺ T Zellen aus *Listeria*-infizierten Mäusen auf CCL17 hin ermittelt werden (siehe **Abb.3.8**). Allerdings hätte hier eine Positivkontrolle mit der Injektion von α GC und OVA in WT OT-1 Mäusen einen Hinweis auf die Funktionsfähigkeit des experimentellen Setup liefern können. Die Expression von CCR4 auf zytotoxischen T Zellen nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* sollte bestmöglich durch einen direkten Beweis geklärt werden. Hierfür könnten zum Beispiel eine CCR4-Reportermaus oder ein funktionaler CCR4 Antikörper zum Einsatz kommen. In einem späteren Abschnitt wird die Rolle von CCL17 in der ZTL Generierung genauer besprochen. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass CCL17 von Dendritischen Zellen nach einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* in der Milz produziert wird.

4.2 CCL17⁺ Dendritische Zellen sind stärker aktiviert als CCL17⁻ DZ

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit ermittelt werden, dass nach einer Infektion mit dem Pathogen *Listeria monocytogenes* CCL17 von Dendritischen Zellen produziert wird. Nun sollte untersucht werden, ob die CCL17-sekretierenden DZ einen anderen Phänotyp aufweisen, als Dendritische Zellen, die kein CCL17 sekretieren. Im Rahmen des alternativen Cross-Primings zeigten von NKT Zellen lizenzierte Dendritische Zellen eine verstärkte Expression der Oberflächenmarker CD80 und CD86. Allerdings hatte CCL17 selbst keinen direkten Einfluss auf eine verstärkte Aktivierung der DZ (Semmling et al. 2010). Davon ausgehend kann vermutet werden, dass die CCL17-Produktion als Surrogatparameter für die Lizenzierung von DZ durch NKT Zellen herangezogen werden kann. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* Dendritische Zellen, welche CCL17 produzieren, stärker aktiviert sind, gemessen an den Aktivierungsmarkern CD86 und CD40, als DZ, die kein CCL17 produzieren (siehe **Abb.3.2**). Die Analyse der beiden Subtypen von Dendritischen Zellen in der Milz, CD8⁺ und CD8⁻ DZ zeigte, dass unter den CCL17-produzierenden Dendritischen Zellen, CD8⁺ DZ eine stärkere Expression an CD86 aufwiesen, verglichen mit CD8⁻ DZ. Ebenfalls waren CCL17-sekretierende Dendritische Zellen nach einer Listerien-Infektion besser in der Lage, Antigen-spezifische naive CD8⁺ T Zellen in einem in vitro System zu aktivieren, als CCL17⁻ DZ. Dies äußerte sich in einer verstärkten Proliferation und Expression des Aktivierungsmarkers CD25 der ZTL (siehe **Abb.3.3**). Es scheint also, dass die

Produktion von CCL17 mit einem erhöhten Aktivierungsstatus korreliert und diese DZ eine dominante Funktion der T Zell Aktivierung gegenüber nicht CCL17-produzierenden Dendritischen Zellen einnehmen. Die Studie von Semmling (2010) (Semmling et al. 2010) konnte zeigen, dass nur Dendritische Zellen CCL17 sekretieren, welche vorher physischen Kontakt mit NKT Zellen hatten. Hier waren die Hauptproduzenten des Chemokins kreuzpräsentierende DZ, die nur eine effektive ZTL Antwort generieren konnten, wenn eine gleichzeitige Antigen-Kreuzpräsentation und CCL17 Produktion vorlagen. In der vorliegenden Dissertation kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die CCL17-produzierenden DZ gleichzeitig Antigen kreuzpräsentieren und somit dem Modell in Semmling et al. entsprechen. Dafür müsste die CCL17-Expression in NKT Zell-defizienten Tieren untersucht werden. Es ist bekannt, dass $CD8^+$ DZ der initiale Eintritts- und Replikationsort für Listerien sind (Neuenhahn et al. 2006) und dass dieser Subtyp der Dendritischen Zellen die Fähigkeit besitzt, Antigen zu kreuzpräsentieren (Shortman and Naik 2007). Allerdings besteht die Möglichkeit, dass sowohl exogen aufgenommenes Antigen von abgestorbenen Listerien-infizierten Zellen kreuzpräsentiert wird, als auch dass endogenes Antigen von DZ, welche selbst infiziert sind, über den MHC-I Weg an ZTL präsentiert wird. Histologische Untersuchungen könnten Aufschluss darüber geben, ob die CCL17-Produktion und die verstärkte Aktivierung mit der Infektion derselben Zellen durch Listeria einhergeht. Es kann festgehalten werden, dass CCL17-produzierende $CD8^+$ DZ besser ZTL Antworten *in vitro* generieren können und einen verstärkten Aktivierungsstatus aufweisen.

4.3 Alternatives Cross-Priming besitzt keinen signifikanten Einfluss auf die Generierung einer ZTL Antwort während einer Listerien-Infektion

Die Rolle der Kreuzpräsentation in der Listerien-Infektion ist nicht abschließend geklärt, da Studien zeigten, dass in *batf3*^{-/-}-Mäusen (ohne $CD8^+$ DZ) eine robuste ZTL Antwort generiert werden konnte, wenn Listerien-Mengen angepasst worden sind. Da sich in Abwesenheit von $CD8^+$ DZ die Listerien weniger gut replizieren können, müssen hier mehr Listerien appliziert werden, um gleich hohe Infektionsraten zu erzielen (Edelson et al. 2011). Dem entgegen steht eine Untersuchung, welche zeigt, dass in XCR1-defizienten Mäusen (ohne kreuzpräsentierende DZ) keine primäre T Zell Antwort trotz hoher bakterieller Last etabliert werden konnte (Crozat et al. 2010). Vorarbeiten aus unserem Labor zeigten eine Reduktion der ZTL Antwort nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* in Mäusen, denen das CCR4-CCL17-System oder NKT

Zellen, beides sind essentielle Komponenten des alternativen Cross-Primings, fehlen. Im Rahmen dieser Dissertation sollten diese Erkenntnisse weiter untersucht und aufgeschlüsselt werden, da sie eine physiologische Rolle für das alternative Cross-Priming aufzeigen könnten. In dieser Dissertation konnte keine veränderte ZTL Antwort in Abwesenheit der verschiedenen Chemokin-Komponenten festgestellt werden (siehe **Abb.3.4**). Sowohl in CCR4-, CCL17-, als auch in CCR5-defizienten Mäusen wurde weder eine Reduktion der ZTL noch der CD8⁺ T Zell IFN γ Antwort ermittelt. Auch die Verwendung von Mäusen defizient sowohl in CCL17 als auch in CCR5 zum Ausschluss einer möglichen Redundanz der beiden Cross-Priming Systeme, ergab keine Veränderungen in der ZTL und IFN γ Antwort. Die Publikation von Semmling (2010) (Semmling et al. 2010) konnte zeigen, dass Kreuzpräsentation und CCL17-Produktion in der gleichen DZ stattfinden müssen, damit eine robuste ZTL Generierung zustande kommen kann. Dies wurde ebenfalls in der vorliegenden Arbeit - wie zuvor durch die Verwendung von gemischten Knochenmarkschimären - untersucht, wobei die DZ entweder kreuzpräsentieren oder CCL17-sekretieren konnte, aber nicht beides gleichzeitig. Auch dies ergab keinerlei Unterschiede zwischen Kontrolltieren und den untersuchten Chimären (siehe **Abb.3.5**). Im Ergebnis der Untersuchungen konnten die in unserem Labor vorher erhobenen Daten nicht reproduziert werden, was verschiedene Gründe haben könnte: Zum Einen kann sich der Immunstatus der Mäuse in den Tierhaltungsräumen verändert haben. So besteht seit Dezember 2013 in den Tierhaltungsräumen im Institut für Experimentelle Immunologie eine Infektion mit dem murinen Norovirus. Allerdings ist nicht klar, ob alle Mäuse infiziert sind. Ebenfalls wurde in den Jahren vor 2013 auf das Norovirus nicht getestet. Dementsprechend könnte auch vorher schon eine Infektion vorgelegen haben. Eine akute oder abklingende virale Infektion könnte einen Einfluss auf eine sekundäre bakterielle Infektion besitzen. Es konnte gezeigt werden, dass vor allem durch virale Infektionen wie LCMV, Influenza A oder HIV eine erhöhte Anfälligkeit für sekundäre bakterielle Infektionen provoziert wird (Mehta et al. 2015). Dies sollte allerdings sowohl die WT als auch die in den Komponenten des alternativen Cross-Primings defizienten Mäuse betreffen. Zum Anderen kann der Einsatz von verschiedenen WT Mäusen einen möglichen Effekt maskieren. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass in genetisch identischen WT Tieren aus dem HET oder von einem externen Züchter (Janvier) nach Lm-Infektion unterschiedlich viele Antigen-spezifische ZTL generiert werden (siehe **Abb.3.4**). Hierbei konnte allerdings nur ein Trend festgestellt werden, da das Experiment nur ein Mal durchgeführt worden ist. Es ist bekannt, dass Versuchstiere trotz gleichen genetischen Hintergrunds eine unterschiedliche Immunantwort generieren, was sich auf unterschiedliche Mikrobiota zurückführen lässt. Auf diesen Aspekt wird in einem späteren Abschnitt noch genauer eingegangen. Insgesamt konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in der

Generierung Antigen-spezifischer ZTL oder der IFN γ Produktion von CD8⁺ T Zellen in der Abwesenheit von Komponenten des alternativen Cross-Primings ermittelt werden. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass CCL17 während einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* sezerniert wird, die Abwesenheit dieser und anderer Komponenten des alternativen Cross-Primings eine ZTL-Primärantwort jedoch nicht vermindert.

4.4 Die Abwesenheit von CCR4 verstärkt eine Gedächtnisantwort gegen *Listeria monocytogenes*

Nach einer erfolgreich bekämpften bakteriellen Infektionskrankheit bildet sich ein immunologisches Gedächtnis aus, welches bei einem erneuten Auftreten der Krankheit eine schnellere Eradikation des Pathogens ermöglichen soll. Das immunologische Gedächtnis kann mittels der Bildung langlebiger Antikörper und Antikörper-produzierender Zellen oder Zell-vermittelt durch die Generierung von Gedächtnis T Zellen etabliert werden. Nur ein kleiner Teil der in einer Immunantwort aktivierten CD8⁺ T Zellen bildet sich tatsächlich zu Gedächtniszellen aus (W. Cui and Kaech 2010). Somit kann zwischen kurzlebigen Effektorzellen und langlebigen Gedächtniszellen unterschieden werden (Joshi and Kaech 2008). Eine Rolle von CCR4 in der Migration von Gedächtniszellen konnte vor allem in T_{H2}-induzierten inflammatorischen Umgebungen beobachtet werden. So ist CCR4 auf CD4⁺ Gedächtniszellen exprimiert und spielt eine Rolle bei der atopischen Dermatitis im Menschen (Nakatani et al. 2001), sowie bei Morbus Crohn, bei dem die Expression von CCR4 auf Gedächtniszellen mit der Schwere der Krankheit korrelierte (Jo et al. 2003). Während einer entzündlichen Reaktion in der Haut konnte ermittelt werden, dass CCR4 für die Migration von CD4⁺ T Gedächtniszellen an den Ort der Inflammation nach Stimulus durch IFN γ , TNF oder TLR Agonisten verantwortlich war (Gehad et al. 2012). Neben CD4⁺ T Gedächtniszellen konnte eine CCR4 Expression auch auf humanen CD8⁺ T Gedächtniszellen festgestellt werden, wobei diese Zellen eine große Bandbreite an T_{H1}- und T_{H2}-assoziierten Zytokinen wie IL-4, IL-2, IFN γ oder auch TNF α produzieren können (Kondo and Takiguchi 2009). In der vorliegenden Arbeit konnte ermittelt werden, dass nach einer Sekundärinfektion mit dem Pathogen *Listeria monocytogenes* eine statistisch signifikant verstärkte IFN γ Produktion von ZTL in CCR4-defizienten Mäusen verglichen mit WT und NKT Zell-defizienten Mäusen vorhanden war (siehe **Abb.3.6**). Die prozentuale Menge an Antigen-spezifischen ZTL nach Sekundärinfektion war in CCR4-defizienten Mäusen ebenfalls erhöht, verglichen mit WT Mäusen, allerdings nicht statistisch signifikant. Es scheint, als ob CCR4 eine

Rolle in Gedächtnisantworten einnimmt, aber keinen Einfluss auf die Primärantwort einer Immunantwort besitzt. Es wäre interessant zu untersuchen, ob die Unterschiede in der Gedächtnisantwort durch veränderte Abläufe in der Primärantwort determiniert sind oder erst in der Gedächtnisantwort ausgebildet werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass in der initialen Phase der Bekämpfung des Pathogens *Listeria monocytogenes* drei Tage nach Infektion CCR4-defiziente Mäuse eine statistisch signifikant verstärkte bakterielle Last aufwiesen, verglichen mit WT und CCL17-defizienten Mäusen (siehe **Abb.3.7**). Diese erhöhte bakterielle Last könnte zu einer stärkeren inflammatorischen Umgebung führen und somit zu einer Entwicklung einer größeren Anzahl an Gedächtniszellen beitragen. Allerdings ließ sich an Tag 56 nach Primärinfektion im Blut der infizierten Tiere keine vermehrte Anzahl an Antigen-spezifischen Gedächtniszellen in CCR4-defizienten Tieren nachweisen (siehe **Abb.3.6**). Eine Untersuchung der Funktionalität dieser Gedächtniszellen und ihre Differenzierung hin zu TEM (*engl. T effector memory cells*) bzw. TCM (*engl. T central memory cells*) konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden. In einer Infektion mit *Mycobacterium bovis* konnte gezeigt werden, dass CCR4 eine wichtige Rolle in der innate Funktion von NK Zellen spielt und somit in der Abwesenheit von CCR4 eine verlangsamte bakterielle Klärung stattfand. Allerdings wurde in diesem Modell ebenfalls ermittelt, dass CCR4-defiziente Mäuse in einer Sekundärinfektion weniger IFN γ -produzierende T_{H1}-Zellen aufwiesen (Stolberg et al. 2011). Eine weitere Studie mit Mycobacterium-Infektion bestätigte diese Ergebnisse (Freeman et al. 2006). Damit stehen die dort publizierten Ergebnisse im Widerspruch zu denen in der vorliegenden Dissertation gefundenen Aussagen hinsichtlich ZTL in einer Lm-Infektion. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass CCR4 eine Rolle in der Sekundärinfektion mit dem Pathogen *Listeria monocytogenes* einnimmt und in Abwesenheit des Chemokins eine verstärkte bakterielle Last in der initialen Phase der Infektion auftritt. Im Folgenden soll auf diese initiale Phase der Infektion mit dem Pathogen *Listeria monocytogenes* eingegangen werden.

4.5 NKT Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Listerien-Infektion

In immunologischen Prozessen übernehmen NKT Zellen sowohl innate als auch adaptive Aufgaben. Sie können eine breite Anzahl an Selbst- und Fremddantigen erkennen und sind in der Lage in kürzester Zeit Zytokine und Chemokine zu sekretieren (Bendelac, Savage, and Teyton 2007). Die Rolle von NKT Zellen während einer Listerien-Infektion ist bisher unklar. Die

Verwendung eines CD1-blockierenden Antikörpers verbesserte eine bestehende Listeriose, was sich in vermehrtem Überleben der behandelten mit nicht-behandelten Mäusen widerspiegelte (Szalay et al. 1999). CD1d-defiziente Mäuse wiesen dagegen eine erhöhte bakterielle Last zwei Tage nach Infektion und Zeichen einer Immunpathologie auf (Arrunategui-Correa and Kim 2004). In $\alpha 18^{-/-}$ -Mäusen, welche defizient für iNKT Zellen sind, konnte eine verminderte Anzahl an Listerien vier Tage nach Infektion in Milz und Leber nachgewiesen werden (Emoto et al. 2006). Im Gegensatz dazu steht eine Studie, welche zeigt, dass in $\alpha 18^{-/-}$ -Mäusen sowohl in einer Primär- als auch Sekundärinfektion kein Unterschied zwischen KO Mäusen und heterozygoten Kontrollmäusen vorhanden war (Ranson et al. 2005). Somit sollte zu Beginn der Untersuchungen geklärt werden, welche Rolle NKT und iNKT Zellen in einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* einnehmen und ob die Abwesenheit von allen NKT Zellen (in CD1d-defizienten Mäusen) oder nur von iNKT Zellen (in $\alpha 18$ -defizienten Mäusen) einen Einfluss auf den Verlauf einer Listerien-Infektion besitzt. In der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass NKT Zellen nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* aktiviert werden, was sich in einer starken Expression des Aktivierungsmarkers CD69 und Produktion von IFN γ sowohl in Milz als auch in Leber widerspiegelte (siehe **Abb.3.9**). Obwohl die NKT Zellen aktiviert werden und somit anscheinend eine wichtige Rolle in der Bekämpfung der Infektion spielen, war die bakterielle Last drei Tage nach Infektion mit *Listeria* im Vergleich von WT Mäusen mit CD1d- oder $\alpha 18$ -defizienten Mäusen nicht unterschiedlich (siehe **Abb.3.10**). Dementsprechend scheinen NKT Zellen in dem hier untersuchten System in der Summe keinen Einfluss auf das bakterielle Wachstum bzw. die innate Klärung zu besitzen, obwohl sie eine antimikrobielle Antwort durch IFN γ -Produktion fördern. Allerdings muss beachtet werden, dass es in einem durchgeführten Experiment (Daten hier nicht gezeigt) eine erhöhte bakterielle Last an Tag 3 in CD1d-KO Mäusen verglichen mit WT-Mäusen gab. Als Maß für den Einfluss von NKT Zellen auf die adaptive Immunantwort wurde die Generierung von Antigen-spezifischen ZTL Antworten untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass in Abwesenheit von iNKT Zellen eine statistisch signifikant erhöhte Anzahl an ZTL - verglichen mit CD1d-defizienten Mäusen - vorlag (siehe **Abb.3.10**). Dies traf ebenfalls auf die Produktion von IFN γ bei der Untersuchung von CD8⁺ T Zellen zu. Ein Trend in der Reduktion von ZTL Antworten in CD1d-defizienten Mäusen, verglichen mit WT Tieren, konnte ermittelt werden. Dieser war allerdings nicht statistisch signifikant, wenn alle durchgeführten Experimente gemeinsam betrachtet worden sind. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass NKT Zellen durch die Produktion von IFN γ eine Rolle in der Listerien-Infektion spielen können, ein Verlust von NKT Zellen aber weder innate noch adaptive Immunantworten gegenüber einer WT Situation verschlechterte. Die hier erhobenen Daten können somit die publizierten Aussagen, dass die

Abwesenheit von NKT Zellen einen Einfluss auf die bakterielle Klärung einer Listerien-Infektion besitzt, nicht bestätigen. Allerdings muss bedacht werden, dass in der Studie von Arrunategui-Correa (2004) (Arrunategui-Correa and Kim 2004) ein System der oralen Infektion mit *Listeria* verwendet wird, was einen anderen Einfluss auf die bakterielle Last haben kann als die in dieser Dissertation verwendete intravenöse Infektionsroute. Der hier ermittelte Unterschied in der Anzahl an ZTL und deren Menge produzierten IFN γ zwischen NKT Zell- und iNKT Zell-defizienten Mäusen lässt die Spekulation zu, dass Typ II NKT Zellen einen Einfluss auf die adaptive Immunantwort nach einer Listerien-Infektion besitzen. Diese sind in J α 18-defizienten Mäusen anders als in CD1d-defizienten Mäusen vorhanden, welche weder Typ I noch Typ II NKT Zellen besitzen. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass Typ II NKT Zellen durch aus *Listeria monocytogenes* isolierte Lipidantigene (Phosphatidylglycerol und Diphosphatidylglycerol) aktiviert werden, was bei Typ I NKT Zellen nicht der Fall war (B. J. Wolf et al. 2015). Eine weitere Möglichkeit den bestehenden Unterschied zu erklären, liegt in einer unterschiedlichen Zusammensetzung der Mikrobiota beider NKT-Zell defizienter Maustypen. Diese Variante wird später noch ausführlicher diskutiert. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass NKT Zellen durch die Produktion von IFN γ und eine erhöhte Expression des Aktivierungsmarkers CD69 eine Rolle in der Listerien-Infektion spielen können, ein Verlust von NKT Zellen aber weder innate noch adaptive Immunantworten gegenüber einer WT Situation verschlechterte.

4.6 NK Zellen produzieren in Abwesenheit von CD1d mehr IFN γ als in Anwesenheit von Typ II NKT Zellen

Da im vorangegangenen Abschnitt gezeigt wurde, dass NKT Zellen durch die Produktion von IFN γ antibakterielles Potential besitzen, dies sich aber nicht in einer stärkeren bakteriellen Last in Abwesenheit von NKT Zellen widerspiegelt, sollte untersucht werden, ob möglicherweise andere Zellen zu einer Bekämpfung der Listeriose mit der Produktion von IFN γ beitragen, wenn NKT Zellen abwesend sind. In der innate Immunabwehr gegen eine Infektion mit dem Pathogen *Listeria monocytogenes* spielen NK Zellen, Neutrophile und Makrophagen eine essentielle Rolle. Hierbei sorgen Neutrophile und Makrophagen durch Phagozytose für das Abtöten von eindringenden Pathogenen (Conlan and North 1994; Czuprynski et al. 1994). Die Produktion von IFN γ ausgehend von NK Zellen aktiviert Makrophagen in ihrer Produktion von ROS und NOS (Tripp, Wolf, and Unanue 1993; Stavru, Archambaud, and Cossart 2011). Es

konnte bereits eine Rolle von NKT Zellen in der Aktivierung und Migration von NK Zellen ermittelt werden. So führt iNKT Zell-sekretiertes IFN γ zur Rekrutierung von NK und CD8⁺ T Zellen in einem Tumormodell (Smyth et al. 2002). In verschiedenen Studien unter Verwendung von α GC konnte ein Einfluss von NKT auf NK Zellen durch aktivierendes IFN γ ausgehend von NKT Zellen ermittelt werden (Carnaud et al. 1999; Eberl and MacDonald 2000). In einem Modell einer viralen Infektion mit mCMV konnte wiederum gezeigt werden, dass NKT Zellstimulierung zu der Generierung von hochfunktionalen NK Zellen führt, gezeigt durch IFN γ Produktion und verstärkte Degranulation (Riese et al. 2015). Im Folgenden liegt der Fokus auf einer statistisch signifikant vermehrten Produktion von IFN γ durch NK Zellen, die in der Abwesenheit von CD1d sowohl in Milz als auch in Leber - verglichen mit WT und α 18^{-/-}-Mäusen - detektiert wurde (siehe **Abb.3.11**). Dieser Effekt war sehr kurzlebig und nur am ersten, nicht aber an den folgenden Tagen nach der Infektion nachweisbar. Allerdings ist anzufügen, dass die IFN γ Produktion von NK Zellen 24 Stunden nach Infektion am größten ist (Humann et al. 2007). Dies lag weder an einer erhöhten Anzahl an NK Zellen in CD1d-defizienten Mäusen noch an einer verstärkten bakteriellen Last einen Tag nach Infektion mit dem Pathogen (siehe **Abb.3.11** und **3.12**). Neben einer verstärkten Produktion von IFN γ konnte ebenfalls eine erhöhte Expression des Aktivierungsmarkers CD69 und des zytotoxischen Markers Granzym B auf NK Zellen in CD1d-defizienten Mäusen festgestellt werden (siehe **Abb.3.12**). Die erhöhte IFN γ Produktion wurde mittels RT-PCR und Durchführung eines Luminex-Assays in Milzhomogenisat bestätigt (siehe **Abb.3.13**). In Folge ist die verstärkte IFN γ Produktion in CD1d-defizienten Mäusen in der Milz in der Summe erhöht und nicht nur Zell-spezifisch. Es gibt mehrere Möglichkeiten, warum diese verstärkte Produktion von IFN γ in der Abwesenheit von Typ I und Typ II NKT Zellen im Vergleich zur Abwesenheit von Typ I NKT Zellen in α 18^{-/-}-Mäusen stattfindet. So ist denkbar, dass NK Zellen die Abwesenheit von NKT Zellen und damit eine verminderte Produktion von IFN γ ausgleichen. Hierfür wäre eine Depletion von NK Zellen in NKT Zell-defizienten Mäusen und einer möglicherweise damit einhergehenden verschlechterten bakteriellen Abwehr ein guter Nachweis für solch einen Kompensationsmechanismus. In einer Chlamydien-Infektion wurde jedoch das Gegenteil gezeigt. Hier produzierten NK Zellen weniger IFN γ und exprimierten eine geringere Menge an CD69 in Abwesenheit von NKT Zellen (Zhao et al. 2011). In einer Studie nach Pneumococcus-Infektion konnten ähnliche Resultate wie in dieser Dissertation ermittelt werden. Nach Blockade von CD1d durch einen Antikörper konnte eine erhöhte bakterielle Last und eine erhöhte Menge an IFN γ im Serum und von Splenozyten festgestellt werden. Diese verstärkte Produktion von IFN γ wurde in der durchgeführten Studie aber nicht auf NK Zellen zurückgeführt (Christaki et al. 2015). Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass NK

Zellen stärker aktiviert waren, mehr IFN γ produzierten und eine gesamt erhöhte Menge an IFN γ in der Milz zu ermitteln war, wenn alle NKT Zellen fehlten verglichen mit der Abwesenheit von Typ I NKT Zellen.

4.7 In Abwesenheit von CD1d sind DZ und Makrophagen stärker aktiviert

Um zu ermitteln, warum NK Zellen in Abwesenheit von NKT Zellen einen stärker aktivierten Phänotyp aufzeigen, sollten Zellen untersucht werden, die für eine NK Zell Aktivierung in Frage kommen und ob diese ebenfalls durch die Abwesenheit von CD1d beeinflusst sind. Es konnte gezeigt werden, dass Dendritische Zellen und Makrophagen durch die Produktion von IL-12 und jeweils TNF α von Makrophagen sowie IL-18 von DZ NK Zellen in einer Listerien-Infektion aktivieren können (Tripp, Wolf, and Unanue 1993; Humann and Lenz 2010; Mitchell et al. 2011). Im Rahmen dieser Arbeit konnte ermittelt werden, dass einen Tag nach einer Listerien-Infektion Dendritische Zellen und Makrophagen in CD1d^{-/-}-Mäusen einen erhöhten Aktivierungsstatus aufwiesen, gemessen als vermehrte Expression der Oberflächenmarker CD80 und CD86 (siehe **Abb.3.14** und **3.15**). Ebenfalls ergab die Analyse der Sekretion verschiedener Zytokine, dass im Milzhomogenisat IL-12 in größeren Mengen in CD1d^{-/-}-Mäusen vorhanden ist als in α 18^{-/-}-Mäusen (siehe **Abb.3.14**). Dies konnte allerdings nicht auf zellulärer Ebene der Dendritischen Zellen festgestellt werden. Neben dem inflammatorischen Zytokin IL-12 konnte auch eine erhöhte Sekretion von TNF α im Überstand des Milzhomogenisats von CD1d-defizienten verglichen mit α 18-defizienten Mäusen ermittelt werden (siehe **Abb.3.15**). Es scheint, als ob Immunzellen, die in der Lage sind die Aktivierung von NK Zellen zu stimulieren, ebenfalls einen erhöhten Aktivierungsstatus aufweisen. Eine Möglichkeit, dieses Phänomen zu erklären, wäre eine verminderte Anwesenheit von Regulatoren des Immunsystems wie T_{regs} oder MDSCs in Abwesenheit von CD1d. Dies könnte zur Folge haben, dass das proinflammatorische Milieu verstärkt wird, wenn eine Regulation unterbunden wird. Eine CD40- und CD1d-abhängige Interaktion zwischen MDSCs und iNKT Zellen konnte in einer Influenza A Infektion gefunden werden. Allerdings führte dies in Abwesenheit von iNKT und aller NKT Zellen gleichermaßen zu einer Erhöhung der Anzahl an MDSCs (De Santo et al. 2008). In der Leber von CD1d-defizienten Mäusen wurde eine erhöhte Anzahl an T_{regs} gefunden und diese waren weniger effektiv bei der Suppression von NKT Zell Proliferation (Hua et al. 2011). Weder T_{regs} noch MDSCs waren in der Abwesenheit von CD1d oder α 18 in ihrem Aktivierungsstatus verändert (siehe **Abb.3.16**). Dies kann nicht als Erklärung für den

verstärkten proinflammatorischen Status in CD1d^{-/-}-Mäusen nach Infektion mit dem Pathogen *Listeria monocytogenes* dienen. In der Summe konnte ermittelt werden, dass in der Abwesenheit von allen NKT Zellen Makrophagen und DZ stärker aktiviert waren verglichen mit Zellen aus WT und Jα18^{-/-}-Mäusen und dies nicht durch eine erhöhte Aktivität von immunologischen Regulatoren wie T_{regs} oder MDSCs zu erklären war.

4.8 Co-Housing verhindert den erhöhten Aktivierungsstatus in CD1d^{-/-}-Mäusen

In den letzten Jahren wurden neue Erkenntnisse zum Einfluss der Mikrobiota im Gastrointestinaltrakt auf verschiedenste Immunzellen erzielt. Es konnte gezeigt werden, dass die Lunge und der Gastrointestinaltrakt in Mäusen defizient für CD1d stärker mit dem Bakterium *P.aeruginosa* besiedelt waren. Ebenfalls war eine unterschiedliche Zusammensetzung der Mikrobiota im Rahmen dieser Publikation zwischen WT und CD1d-defizienten Mäusen festgestellt (Nieuwenhuis et al. 2009). Eine Studie bei HIV-infizierten Patienten ergab eine erhöhte systemische Aktivierung des Immunsystems, nachdem CD4⁺ NKT Zellen im Gastrointestinaltrakt depletiert waren (Ibarrondo et al. 2013). Nachdem in Experimenten zu dieser Dissertation ein erhöhter Aktivierungsstatus des Immunsystems in Form von verstärkter NK Zell, Makrophagen und DZ Aktivierung in Abwesenheit von CD1d verglichen mit Jα18^{-/-}-Mäusen gezeigt wurde, sollte die Möglichkeit überprüft werden, ob eine veränderte Mikrobiota diesen Phänotyp hervorruft. Zu der Interaktion zwischen Typ II NKT Zellen und der Mikrobiota liegen bislang noch keine Aussagen vor. Nach vier Wochen Co-Housing sollte ein Angleichen der Mikrobiota zwischen den verschiedenen Genotypen stattgefunden haben. Die Analyse der NK Zell Aktivierung, sowie der Aktivierung von Dendritischen Zellen und Makrophagen ergab keinen Unterschied mehr zwischen Jα18^{-/-}- und CD1d^{-/-}-Mäusen nach Co-Housing (siehe **Abb.3.17**). Dies spricht für die Hypothese, dass möglicherweise verschiedene Mikrobiota zwischen den beiden NKT-Zell defizienten Mäusen für die verstärkte Aktivierung des Immunsystems in CD1d-defizienten Tieren zuständig sind. Der gleiche Phänotyp war allerdings auch in den sogenannten IEI-adaptierten Mäusen zu sehen. Diese Mäuse wurden ebenfalls vier Wochen vor dem durchzuführenden Experiment in dem Institut für Experimentelle Immunologie gehalten, allerdings in getrennten Käfigen. In allen vorangegangenen Experimenten wurden die Tiere erst einen Tag vor Start des Experiments in die Tierhaltung des IEIs transferiert. Somit fehlt in diesem Versuch die wichtige Kontrollgruppe, welche nur einen Tag vorher aus dem HET geholt wurde. Es ist beachtenswert,

dass auch in den IEI-adaptierten Tieren solch ein unterschiedlicher Phänotyp zu den vorangegangenen Experimenten detektiert wurde. Grundlage dafür kann sein, dass entweder im HET ein anderer Immunstatus der Tiere vorliegt und somit Immunantworten anders verlaufen oder die Tiere durch die vierwöchige Haltung im IEI aufgrund von veränderten Umgebungsbedingungen auch eine andersartige Mikrobiota entwickelt haben. Weiterhin ist interessant zu beobachten, dass in der Abwesenheit von CD1d und J α 18 eine verschlechterte innate Immunabwehr in Form von weniger stark aktivierten Immunzellen zu finden war. Dieses Experiment sollte mit der wichtigen Kontrolle erneut durchgeführt werden, um eine differenzierte Aussage treffen zu können. Insgesamt kann festgehalten werden, dass durch Co-Housing kein Unterschied im Aktivierungsstatus von NK Zellen, Makrophagen und DZ zwischen CD1d- und J α 18-defizienten Mäusen ermittelt werden konnte, weswegen ein Einfluss der unterschiedlichen Mikrobiota beider Mausstämme auf den Verlauf einer Immunantwort nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* denkbar ist.

5. Zusammenfassung

Zytotoxische T Zellen sind essentiell an der Bekämpfung und Eliminierung von Virus- infizierten und Tumorzellen beteiligt. Ihre zytotoxische Funktion muss strikt kontrolliert werden, da sie sonst zu Immunpathologie führen kann. Die Kontrolle der Induktion einer ZTL Antwort kann durch den Mechanismus des Cross-Primings erfolgen. Hier müssen APZ von CD4⁺ T Helferzellen unter anderem über Interaktion von CD40 und CD40L lizenziert werden. Diese Hilfsfunktion kann von NKT Zellen übernommen werden und wird als alternatives Cross-Priming bezeichnet. Die von DZ produzierten Chemokine wie CCL17 führen zu einer schnellen Migration von CCR4-exprimierenden CD8⁺ T Zellen hin zu den lizenzierten DZ, dass zur Aktivierung ihrer zytotoxischen Funktion führt. In dieser Arbeit sollte die Bedeutung des alternativen Cross-Primings in einer bakteriellen Infektion mit dem Pathogen *Listeria monocytogenes* untersucht werden. Es konnte ermittelt werden, dass CCL17 nach einer bakteriellen Infektion von CD8⁺ Dendritischen Zellen in der Milz produziert wird und dass diese Zellen einen höheren Aktivierungsstatus aufwiesen. Sie waren ebenfalls in der Lage naive OT-1 CD8⁺ T Zellen *in vitro*, in einem größeren Maße als CCL17⁻-DZ, zu aktivieren. Dies führte allerdings nicht zu einer reduzierten Anzahl an Antigen-spezifischen ZTL in CCR4- oder CCL17- defizienten Mäusen. Ein direkter Einfluss von alternativem Cross-Priming auf den Verlauf einer Listerien-Infektion konnte nicht ermittelt werden. Weiterhin sollte die Rolle von NKT Zellen während einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* untersucht werden. NKT Zellen spielen eine widersprüchliche Rolle in einer Lm-Infektion und können sowohl positiv als auch negativ auf den Verlauf der Infektion einwirken. Es konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit von allen NKT- Zellen eine verschlechterte ZTL Antwort verglichen mit iNKT Zell-defizienten Mäusen vorzufinden ist. In Abwesenheit von iNKT Zellen wiederum konnte ein verstärkter Aktivierungsstatus des Immunsystems in Form verstärkter Expression von IFN γ bei NK Zellen und Aktivierungsmarkern bei NK Zellen, Dendritischen Zellen und Makrophagen ermittelt werden. Nach dem Angleichen der Mikrobiota der iNKT oder NKT Zell- defizienten Mäuse durch Co-Housing konnte kein Unterschied zwischen den untersuchten iNKT oder NKT Zell-defizienten Mäusen im Aktivierungszustand von NK Zellen, DZ oder Makrophagen festgestellt werden. Diese Dissertation konnte zeigen, dass CCL17 während einer Listerien-Infektion produziert wird, alternatives Cross-Priming jedoch keinen entscheidenden Einfluss auf den Verlauf der Infektion auszuüben scheint. Innate Immunzellen zeigen eine erhöhte Aktivierung in der Abwesenheit von NKT Zellen verglichen mit iNKT Zell-defizienten Tieren.

6. Literaturverzeichnis

- Ahmed, R, and D Gray. 1996. "Immunological Memory and Protective Immunity: Understanding Their Relation.." *Science (New York, N.Y.)* 272 (5258): 54–60.
- Akbari, Omid, Philippe Stock, Everett Meyer, Mitchell Kronenberg, Stephane Sidobre, Toshinori Nakayama, Masaru Taniguchi, Michael J Grusby, Rosemarie H DeKruyff, and Dale T Umetsu. 2003. "Essential Role of NKT Cells Producing IL-4 and IL-13 in the Development of Allergen-Induced Airway Hyperreactivity.." *Nature Medicine* 9 (5): 582–88. doi:10.1038/nm851.
- Alferink, Judith, Ivo Lieberam, Wolfgang Reindl, Andrea Behrens, Susanne Weiss, Norbert Hüser, Klaus Gerauer, et al. 2003. "Compartmentalized Production of CCL17 in Vivo: Strong Inducibility in Peripheral Dendritic Cells Contrasts Selective Absence From the Spleen.." *The Journal of Experimental Medicine* 197 (5): 585–99.
- Allison, J P. 1994. "CD28-B7 Interactions in T-Cell Activation.." *Current Opinion in Immunology* 6 (3): 414–19.
- Andrew, D P, M S Chang, J McNinch, S T Wathen, M Rihaneck, J Tseng, J P Spellberg, and C G Elias. 1998. "STCP-1 (MDC) CC Chemokine Acts Specifically on Chronically Activated Th2 Lymphocytes and Is Produced by Monocytes on Stimulation with Th2 Cytokines IL-4 and IL-13.." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 161 (9): 5027–38.
- Aoshi, Taiki, Javier A Carrero, Vjollca Konjufca, Yukio Koide, Emil R Unanue, and Mark J Miller. 2009. "The Cellular Niche of *Listeria monocytogenes* Infection Changes Rapidly in the Spleen.." *European Journal of Immunology* 39 (2): 417–25. doi:10.1002/eji.200838718.
- Arora, Pooja, Andres Baena, Karl O A Yu, Neeraj K Saini, Shalu S Kharkwal, Michael F Goldberg, Shajo Kunnath-Velayudhan, et al. 2014. "A Single Subset of Dendritic Cells Controls the Cytokine Bias of Natural Killer T Cell Responses to Diverse Glycolipid Antigens.." *Immunity* 40 (1): 105–16. doi:10.1016/j.immuni.2013.12.004.
- Arrunategui-Correa, Victor, and Hyun Sil Kim. 2004. "The Role of CD1d in the Immune Response Against *Listeria* Infection.." *Cellular Immunology* 227 (2): 109–20. doi:10.1016/j.cellimm.2004.02.003.
- Bachem, Annabell, Steffen Güttler, Evelyn Hartung, Frédéric Ebstein, Michael Schaefer, Astrid Tannert, Abdulgabar Salama, et al. 2010. "Superior Antigen Cross-Presentation and XCR1 Expression Define Human CD11c+CD141+ Cells as Homologues of Mouse CD8+ Dendritic Cells.." *The Journal of Experimental Medicine* 207 (6): 1273–81. doi:10.1084/jem.20100348.
- Banchereau, J, and R M Steinman. 1998. "Dendritic Cells and the Control of Immunity.." *Nature* 392 (6673): 245–52. doi:10.1038/32588.
- Barral, Patricia, María Dolores Sánchez-Niño, Nico van Rooijen, Vincenzo Cerundolo, and Facundo D Batista. 2012. "The Location of Splenic NKT Cells Favours Their Rapid Activation by Blood-Borne Antigen.." *The EMBO Journal* 31 (10): 2378–90. doi:10.1038/emboj.2012.87.
- Barral, Patricia, Paolo Polzella, Andreas Bruckbauer, Nico van Rooijen, Gurdyal S Besra, Vincenzo Cerundolo, and Facundo D Batista. 2010. "CD169(+) Macrophages Present Lipid Antigens to Mediate Early Activation of iNKT Cells in Lymph Nodes.." *Nature Immunology* 11 (4): 303–12. doi:10.1038/ni.1853.
- Beauregard, K E, K D Lee, R J Collier, and J A Swanson. 1997. "pH-Dependent Perforation of Macrophage Phagosomes by Listeriolysin O From *Listeria monocytogenes*.." *Molecular Biology of the Cell* 8

(November): 680–80.

- Belz, Gabrielle T, Georg M N Behrens, Chris M Smith, Jacques F A P Miller, Claerwen Jones, Kristina Lejon, C Garrison Fathman, et al. 2002. "The CD8alpha(+) Dendritic Cell Is Responsible for Inducing Peripheral Self-Tolerance to Tissue-Associated Antigens.." *The Journal of Experimental Medicine* 196 (8): 1099–1104.
- Bendelac, Albert, Paul B Savage, and Luc Teyton. 2007. "The Biology of NKT Cells.." *Annual Review of Immunology* 25: 297–336. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141711.
- Benlagha, K, A Weiss, A Beavis, L Teyton, and A Bendelac. 2000. "In Vivo Identification of Glycolipid Antigen-Specific T Cells Using Fluorescent CD1d Tetramers.." *The Journal of Experimental Medicine* 191 (11): 1895–1903.
- Bennett, S R, F R Carbone, F Karamalis, R A Flavell, J F Miller, and W R Heath. 1998. "Help for Cytotoxic-T-Cell Responses Is Mediated by CD40 Signalling.." *Nature* 393 (6684): 478–80. doi:10.1038/30996.
- Berntman, Emma, Julia Rolf, Cecilia Johansson, Per Anderson, and Susanna L Cardell. 2005. "The Role of CD1d-Restricted NK T Lymphocytes in the Immune Response to Oral Infection with Salmonella Typhimurium.." *European Journal of Immunology* 35 (7): 2100–2109. doi:10.1002/eji.200425846.
- Bevan, M J. 1976. "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.." *The Journal of Experimental Medicine* 143 (5): 1283–88.
- Biedermann, Tilo, Christoph Schwärzler, Günther Lametschwandtner, Gebhard Thoma, Nicole Carballido-Perrig, Julia Kund, Jan E de Vries, Antal Rot, and José M Carballido. 2002. "Targeting CLA/E-Selectin Interactions Prevents CCR4-Mediated Recruitment of Human Th2 Memory Cells to Human Skin in Vivo.." *European Journal of Immunology* 32 (11): 3171–80. doi:10.1002/1521-4141(200211)32:11<3171::AID-IMMU3171>3.0.CO;2-4.
- Bonner, W A, H R Hulett, R G Sweet, and L A Herzenberg. 1972. "Fluorescence Activated Cell Sorting.." *The Review of Scientific Instruments* 43 (3): 404–9.
- Brennan, Patrick J, Manfred Brigl, and Michael B Brenner. 2013. "Invariant Natural Killer T Cells: an Innate Activation Scheme Linked to Diverse Effector Functions.." *Nature Reviews Immunology* 13 (2): 101–17. doi:10.1038/nri3369.
- Brigl, Manfred, Lynn Bry, Sally C Kent, Jenny E Gumperz, and Michael B Brenner. 2003. "Mechanism of CD1d-Restricted Natural Killer T Cell Activation During Microbial Infection.." *Nature Immunology* 4 (12): 1230–37. doi:10.1038/ni1002.
- Brigl, Manfred, Raju V V Tatituri, Gerald F M Watts, Veemal Bhowruth, Elizabeth A Leadbetter, Nathaniel Barton, Nadia R Cohen, Fong-Fu Hsu, Gurdyal S Besra, and Michael B Brenner. 2011. "Innate and Cytokine-Driven Signals, Rather Than Microbial Antigens, Dominate in Natural Killer T Cell Activation During Microbial Infection.." *The Journal of Experimental Medicine* 208 (6): 1163–77. doi:10.1084/jem.20102555.
- Carnaud, C, D Lee, O Donnars, S H Park, A Beavis, Y Koezuka, and A Bendelac. 1999. "Cutting Edge: Cross-Talk Between Cells of the Innate Immune System: NKT Cells Rapidly Activate NK Cells.." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 163 (9): 4647–50.
- Carreño, Leandro J, Shalu Sharma Kharkwal, and Steven A Porcelli. 2014. "Optimizing NKT Cell Ligands as Vaccine Adjuvants.." *Immunotherapy* 6 (3): 309–20. doi:10.2217/imt.13.175.
- Castellino, Flora, Alex Y Huang, Grégoire Altan-Bonnet, Sabine Stoll, Clemens Scheinecker, and Ronald N Germain. 2006. "Chemokines Enhance Immunity by Guiding Naive CD8+ T Cells to Sites of CD4+ T

- Cell-Dendritic Cell Interaction.." Nature 440 (7086): 890–95. doi:10.1038/nature04651.
- Cella, M, D Scheidegger, K Palmer-Lehmann, P Lane, A Lanzavecchia, and G Alber. 1996. "Ligation of CD40 on Dendritic Cells Triggers Production of High Levels of Interleukin-12 and Enhances T Cell Stimulatory Capacity: T-T Help via APC Activation.." The Journal of Experimental Medicine 184 (2): 747–52.
- Chackerian, Alissa, Jen Alt, Vaji Perera, and Samuel M Behar. 2002. "Activation of NKT Cells Protects Mice From Tuberculosis.." Infection and Immunity 70 (11): 6302–9.
- Chang, David H, Keren Osman, John Connolly, Anjli Kukreja, Joseph Krasovsky, Maggi Pack, Aisha Hutchinson, et al. 2005. "Sustained Expansion of NKT Cells and Antigen-Specific T Cells After Injection of Alpha-Galactosyl-Ceramide Loaded Mature Dendritic Cells in Cancer Patients.." The Journal of Experimental Medicine 201 (9): 1503–17. doi:10.1084/jem.20042592.
- Chang, Ya-Jen, Hye Young Kim, Lee A Albacker, Hyun Hee Lee, Nicole Baumgarth, Shizuo Akira, Paul B Savage, et al. 2011. "Influenza Infection in Suckling Mice Expands an NKT Cell Subset That Protects Against Airway Hyperreactivity.." Journal of Clinical Investigation 121 (1): 57–69. doi:10.1172/JCI44845.
- Choi, Hak-Jong, Honglin Xu, Yanbiao Geng, Angela Colmone, Hoonsik Cho, and Chyung-Ru Wang. 2008. "Bacterial Infection Alters the Kinetics and Function of iNKT Cell Responses.." Journal of Leukocyte Biology 84 (6): 1462–71. doi:10.1189/jlb.0108038.
- Christaki, Eirini, Evdoxia Diza, Evangelos J Giamarellos-Bourboulis, Nikoletta Papadopoulou, Aikaterini Pistiki, Dionysia-Irini Droggiti, Marianna Georgitsi, et al. 2015. "NK and NKT Cell Depletion Alters the Outcome of Experimental Pneumococcal Pneumonia: Relationship with Regulation of Interferon- γ Production.." Journal of Immunology Research 2015: 532717. doi:10.1155/2015/532717.
- Chvatchko, Y, A J Hoogewerf, A Meyer, S Alouani, P Juillard, R Buser, F Conquet, A E Proudfoot, T N Wells, and C A Power. 2000. "A Key Role for CC Chemokine Receptor 4 in Lipopolysaccharide-Induced Endotoxic Shock.." The Journal of Experimental Medicine 191 (10): 1755–64.
- Conlan, J W. 1996. "Early Pathogenesis of *Listeria monocytogenes* Infection in the Mouse Spleen.." Journal of Medical Microbiology 44 (4): 295–302.
- Conlan, J W, and R J North. 1994. "Neutrophils Are Essential for Early Anti-*Listeria* Defense in the Liver, but Not in the Spleen or Peritoneal Cavity, as Revealed by a Granulocyte-Depleting Monoclonal Antibody.." The Journal of Experimental Medicine 179 (1): 259–68.
- Corthay, A. 2009. "How Do Regulatory T Cells Work?." Scandinavian Journal of Immunology 70 (4): 326–36. doi:10.1111/j.1365-3083.2009.02308.x.
- Cossart, Pascale. 2002. "Molecular and Cellular Basis of the Infection by *Listeria monocytogenes*: an Overview.." International Journal of Medical Microbiology : IJMM 291 (6-7): 401–9.
- Cossart, Pascale. 2011. "Illuminating the Landscape of Host-Pathogen Interactions with the Bacterium *Listeria monocytogenes*.." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108 (49): 19484–91. doi:10.1073/pnas.1112371108.
- Crowe, Nadine Y, Jonathan M Coquet, Stuart P Berzins, Konstantinos Kyparissoudis, Rachael Keating, Daniel G Pellicci, Yoshihiro Hayakawa, Dale I Godfrey, and Mark J Smyth. 2005. "Differential Antitumor Immunity Mediated by NKT Cell Subsets in Vivo.." The Journal of Experimental Medicine 202 (9): 1279–88. doi:10.1084/jem.20050953.
- Crozat, Karine, Rachel Guiton, Vanessa Contreras, Vincent Feuillet, Charles-Antoine Dutertre, Erwan Ventre, Thien-Phong Vu Manh, et al. 2010. "The XC Chemokine Receptor 1 Is a Conserved Selective

- Marker of Mammalian Cells Homologous to Mouse CD8alpha+ Dendritic Cells.." The Journal of Experimental Medicine 207 (6): 1283–92. doi:10.1084/jem.20100223.
- Cui, Weiguo, and Susan M Kaech. 2010. "Generation of Effector CD8+ T Cells and Their Conversion to Memory T Cells.." Immunological Reviews 236 (July): 151–66. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00926.x.
- Cullen, S P, M Brunet, and S J Martin. 2010. "Granzymes in Cancer and Immunity.." Cell Death and Differentiation 17 (4): 616–23. doi:10.1038/cdd.2009.206.
- Curtsinger, Julie M, Christopher M Johnson, and Matthew F Mescher. 2003. "CD8 T Cell Clonal Expansion and Development of Effector Function Require Prolonged Exposure to Antigen, Costimulation, and Signal 3 Cytokine.." Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950) 171 (10): 5165–71.
- Czuprynski, C J, and M Haak-Frendscho. 1997. "Non-Specific Resistance Mechanisms to Listeriosis: Implications for Experimental and Naturally Occurring Infection.." Immunological Reviews 158 (August): 47–56.
- Czuprynski, C J, J F Brown, R D Wagner, and H Steinberg. 1994. "Administration of Antigranulocyte Monoclonal Antibody RB6-8C5 Prevents Expression of Acquired Resistance to *Listeria monocytogenes* Infection in Previously Immunized Mice.." Infection and Immunity 62 (11): 5161–63.
- De Santo, Carmela, Mariolina Salio, S Hajar Masri, Laurel Yong-Hwa Lee, Tao Dong, Anneliese O Speak, Stefan Porubsky, et al. 2008. "Invariant NKT Cells Reduce the Immunosuppressive Activity of Influenza a Virus-Induced Myeloid-Derived Suppressor Cells in Mice and Humans.." Journal of Clinical Investigation 118 (12): 4036–48. doi:10.1172/JCI36264.
- Delves, P J, and I M Roitt. 2000. "The Immune System. First of Two Parts.." The New England Journal of Medicine 343 (1): 37–49. doi:10.1056/NEJM200007063430107.
- Dranoff, Glenn. 2004. "Cytokines in Cancer Pathogenesis and Cancer Therapy.." Nature Reviews. Cancer 4 (1): 11–22. doi:10.1038/nrc1252.
- Eberl, G, and H R MacDonald. 2000. "Selective Induction of NK Cell Proliferation and Cytotoxicity by Activated NKT Cells.." European Journal of Immunology 30 (4): 985–92. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(200004)30:4<985::AID-IMMU985>3.0.CO;2-E.
- Edelson, Brian T. 2012. "Dendritic Cells in *Listeria monocytogenes* Infection.." Advances in Immunology 113: 33–49. doi:10.1016/B978-0-12-394590-7.00006-3.
- Edelson, Brian T, Tara R Bradstreet, Kai Hildner, Javier A Carrero, Katherine E Frederick, Wumesh KC, Roger Belizaire, et al. 2011. "CD8α(+) Dendritic Cells Are an Obligate Cellular Entry Point for Productive Infection by *Listeria monocytogenes*.." Immunity 35 (2): 236–48. doi:10.1016/j.immuni.2011.06.012.
- Emoto, Masashi, Izumi Yoshizawa, Yoshiko Emoto, Mamiko Miamoto, Robert Hurwitz, and Stefan H E Kaufmann. 2006. "Rapid Development of a Gamma Interferon-Secreting Glycolipid/CD1d-Specific Valpha14+ NK1.1- T-Cell Subset After Bacterial Infection.." Infection and Immunity 74 (10): 5903–13. doi:10.1128/IAI.00311-06.
- Fang, Yujiang, Elizabeth J Herrick, and Michael B Nicholl. 2012. "A Possible Role for Perforin and Granzyme B in Resveratrol-Enhanced Radiosensitivity of Prostate Cancer.." Journal of Andrology 33 (4): 752–60. doi:10.2164/jandrol.111.015164.
- Faveeuw, C, and F Trottein. 2014. "Optimization of Natural Killer T Cell-Mediated Immunotherapy in Cancer Using Cell-Based and Nanovector Vaccines.." Cancer Research 74 (6): 1632–38.

doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-3504.

- Freeman, Christine M, Valerie R Stolberg, Bo-Chin Chiu, Nicholas W Lukacs, Steven L Kunkel, and Stephen W Chensue. 2006. "CCR4 Participation in Th Type 1 (Mycobacterial) and Th Type 2 (Schistosomal) Anamnestic Pulmonary Granulomatous Responses.." *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 177 (6): 4149–58.
- Fujii, Shin-ichiro, Kanako Shimizu, Caroline Smith, Laura Bonifaz, and Ralph M Steinman. 2003. "Activation of Natural Killer T Cells by Alpha-Galactosylceramide Rapidly Induces the Full Maturation of Dendritic Cells in Vivo and Thereby Acts as an Adjuvant for Combined CD4 and CD8 T Cell Immunity to a Coadministered Protein.." *The Journal of Experimental Medicine* 198 (2): 267–79. doi:10.1084/jem.20030324.
- Fujii, Shin-ichiro, Kanako Shimizu, Mitchell Kronenberg, and Ralph M Steinman. 2002. "Prolonged IFN-Gamma-Producing NKT Response Induced with Alpha-Galactosylceramide-Loaded DCs.." *Nature Immunology* 3 (9): 867–74. doi:10.1038/ni827.
- Fujii, Shin-ichiro, Kang Liu, Caroline Smith, Anthony J Bonito, and Ralph M Steinman. 2004. "The Linkage of Innate to Adaptive Immunity via Maturing Dendritic Cells in Vivo Requires CD40 Ligation in Addition to Antigen Presentation and CD80/86 Costimulation.." *The Journal of Experimental Medicine* 199 (12): 1607–18. doi:10.1084/jem.20040317.
- Fujimura, Taku, Yumi Kambayashi, Sadanori Furudate, Masayuki Asano, Aya Kakizaki, and Setsuya Aiba. 2015. "Receptor Activator of NF- κ B Ligand Promotes the Production of CCL17 From RANK+ M2 Macrophages.." *The Journal of Investigative Dermatology*, June. doi:10.1038/jid.2015.209.
- Gehad, Ahmed, Nadia A Al-Banna, Maria Vaci, Andrew C Issekutz, Karkada Mohan, Markus Latta, and Thomas B Issekutz. 2012. "Differing Requirements for CCR4, E-Selectin, and A4 β 1 for the Migration of Memory CD4 and Activated T Cells to Dermal Inflammation.." *The Journal of Immunology* 189 (1): 337–46. doi:10.4049/jimmunol.1102315.
- Geiger, Stefan M, Anne Jardim-Botelho, Weston Williams, Neal Alexander, David J Diemert, and Jeffrey M Bethony. 2013. "Serum CCL11 (Eotaxin-1) and CCL17 (TARC) Are Serological Indicators of Multiple Helminth Infections and Are Driven by *Schistosoma Mansoni* Infection in Humans.." *Tropical Medicine & International Health : TM & IH* 18 (6): 750–60. doi:10.1111/tmi.12095.
- GELLIN, B G, and C V Broome. 1989. "Listeriosis." *Jama-Journal of the American Medical Association* 261 (9): 1313–20. doi:10.1001/jama.1989.03420090077035.
- Gimmi, C D, G J Freeman, J G Gribben, K Sugita, A S Freedman, C Morimoto, and L M Nadler. 1991. "B-Cell Surface Antigen B7 Provides a Costimulatory Signal That Induces T Cells to Proliferate and Secrete Interleukin 2.." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (15): 6575–79.
- Godfrey, Dale I, and Mitchell Kronenberg. 2004. "Going Both Ways: Immune Regulation via CD1d-Dependent NKT Cells.." *Journal of Clinical Investigation* 114 (10): 1379–88. doi:10.1172/JCI23594.
- Godfrey, Dale I, H Robson MacDonald, Mitchell Kronenberg, Mark J Smyth, and Luc Van Kaer. 2004. "NKT Cells: What's in a Name?." *Nature Reviews Immunology* 4 (3): 231–37. doi:10.1038/nri1309.
- Haan, den, J M, S M Lehar, and M J Bevan. 2000. "CD8(+) but Not CD8(-) Dendritic Cells Cross-Prime Cytotoxic T Cells in Vivo.." *The Journal of Experimental Medicine* 192 (12): 1685–96.
- Hamilton, S E, A R Tvinnereim, and J T Harty. 2001. "*Listeria monocytogenes* Infection Overcomes the Requirement for CD40 Ligand in Exogenous Antigen Presentation to CD8(+) T Cells.." *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 167 (10): 5603–9.

- Harty, J T, and M J Bevan. 1995. "Specific Immunity to *Listeria monocytogenes* in the Absence of IFN Gamma.." *Immunity* 3 (1): 109–17.
- Heiseke, Alexander F, Antonia C Faul, Hans-Anton Lehr, Irmgard Förster, Roland M Schmid, Anne B Krug, and Wolfgang Reindl. 2012. "CCL17 Promotes Intestinal Inflammation in Mice and Counteracts Regulatory T Cell-Mediated Protection From Colitis.." *Gastroenterology* 142 (2): 335–45. doi:10.1053/j.gastro.2011.10.027.
- Hermans, Ian F, Jonathan D Silk, Uzi Gileadi, Mariolina Salio, Bini Mathew, Gerd Ritter, Richard Schmidt, Adrian L Harris, Lloyd Old, and Vincenzo Cerundolo. 2003. "NKT Cells Enhance CD4+ and CD8+ T Cell Responses to Soluble Antigen in Vivo Through Direct Interaction with Dendritic Cells.." *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 171 (10): 5140–47.
- Hooper, Lora V, Dan R Littman, and Andrew J Macpherson. 2012. "Interactions Between the Microbiota and the Immune System.." *Science* (New York, N.Y.) 336 (6086): 1268–73. doi:10.1126/science.1223490.
- Horikawa, Tatsuya, Takashi Nakayama, Ichiro Hikita, Hidekazu Yamada, Ryuichi Fujisawa, Toshinori Bito, Susumu Harada, et al. 2002. "IFN-Gamma-Inducible Expression of Thymus and Activation-Regulated Chemokine/CCL17 and Macrophage-Derived Chemokine/CCL22 in Epidermal Keratinocytes and Their Roles in Atopic Dermatitis.." *International Immunology* 14 (7): 767–73.
- Hua, Jing, Shuwen Liang, Xiong Ma, Tonya J Webb, James P Potter, and Zhiping Li. 2011. "The Interaction Between Regulatory T Cells and NKT Cells in the Liver: a CD1d Bridge Links Innate and Adaptive Immunity.." *PloS One* 6 (11): e27038. doi:10.1371/journal.pone.0027038.
- Hugues, Stéphanie, Alix Scholer, Alexandre Boissonnas, Alexander Nussbaum, Christophe Combadière, Sebastian Amigorena, and Luc Fetler. 2007. "Dynamic Imaging of Chemokine-Dependent CD8+ T Cell Help for CD8+ T Cell Responses.." *Nature Immunology* 8 (9): 921–30. doi:10.1038/ni1495.
- Humann, Jessica, and Laurel L Lenz. 2010. "Activation of Naive NK Cells in Response to *Listeria monocytogenes* Requires IL-18 and Contact with Infected Dendritic Cells.." *The Journal of Immunology* 184 (9): 5172–78. doi:10.4049/jimmunol.0903759.
- Humann, Jessica, Ryan Bjordahl, Karl Andreasen, and Laurel L Lenz. 2007. "Expression of the P60 Autolysin Enhances NK Cell Activation and Is Required for *Listeria monocytogenes* Expansion in IFN-Gamma-Responsive Mice.." *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 178 (4): 2407–14.
- Ibarrondo, F J, S B Wilson, L E Hultin, R Shih, M A Hausner, P M Hultin, P A Anton, B D Jamieson, and O O Yang. 2013. "Preferential Depletion of Gut CD4-Expressing iNKT Cells Contributes to Systemic Immune Activation in HIV-1 Infection.." *Mucosal Immunology* 6 (3): 591–600. doi:10.1038/mi.2012.101.
- Imai, T, D Chantry, C J Raport, C L Wood, M Nishimura, R Godiska, O Yoshie, and P W Gray. 1998. "Macrophage-Derived Chemokine Is a Functional Ligand for the CC Chemokine Receptor 4.." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (3): 1764–68.
- Jo, Y, T Matsumoto, S Yada, K Fujisawa, M Esaki, N Onai, K Matsushima, and M Iida. 2003. "CCR4 Is an Up-Regulated Chemokine Receptor of Peripheral Blood Memory CD4+ T Cells in Crohn's Disease.." *Clinical and Experimental Immunology* 132 (2): 332–38.
- Jones, D, C O'Hara, M D Kraus, A R Perez-Atayde, A Shahsafaei, L Wu, and D M Dorfman. 2000. "Expression Pattern of T-Cell-Associated Chemokine Receptors and Their Chemokines Correlates with Specific Subtypes of T-Cell Non-Hodgkin Lymphoma.." *Blood* 96 (2): 685–90.
- Joshi, Nikhil S, and Susan M Kaech. 2008. "Effector CD8 T Cell Development: a Balancing Act Between Memory Cell Potential and Terminal Differentiation.." *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. :

1950) 180 (3): 1309–15.

- Jung, Steffen, Derya Unutmaz, Phillip Wong, Gen-Ichiro Sano, Kenia De los Santos, Tim Sparwasser, Shengji Wu, et al. 2002. "In Vivo Depletion of CD11c+ Dendritic Cells Abrogates Priming of CD8+ T Cells by Exogenous Cell-Associated Antigens.." *Immunity* 17 (2): 211–20.
- Kang, Suk-Jo, Hong-Erh Liang, Boris Reizis, and Richard M Locksley. 2008. "Regulation of Hierarchical Clustering and Activation of Innate Immune Cells by Dendritic Cells.." *Immunity* 29 (5): 819–33. doi:10.1016/j.immuni.2008.09.017.
- Katschke, K J, J B Rottman, J H Ruth, S Qin, L Wu, G LaRosa, P Ponath, C C Park, R M Pope, and A E Koch. 2001. "Differential Expression of Chemokine Receptors on Peripheral Blood, Synovial Fluid, and Synovial Tissue Monocytes/Macrophages in Rheumatoid Arthritis.." *Arthritis and Rheumatism* 44 (5): 1022–32. doi:10.1002/1529-0131(200105)44:5<1022::AID-ANR181>3.0.CO;2-N.
- Kawakami, Kazuyoshi, Natsuo Yamamoto, Yuki Kinjo, Kazuya Miyagi, Chikara Nakasone, Kaori Uezu, Takeshi Kinjo, Toshinori Nakayama, Masaru Taniguchi, and Atsushi Saito. 2003. "Critical Role of Valpha14+ Natural Killer T Cells in the Innate Phase of Host Protection Against Streptococcus Pneumoniae Infection.." *European Journal of Immunology* 33 (12): 3322–30. doi:10.1002/eji.200324254.
- Kawano, T, J Cui, Y Koezuka, I Toura, Y Kaneko, K Motoki, H Ueno, et al. 1997. "CD1d-Restricted and TCR-Mediated Activation of Valpha14 NKT Cells by Glycosylceramides.." *Science (New York, N.Y.)* 278 (5343): 1626–29.
- Kawasaki, S, H Takizawa, H Yoneyama, T Nakayama, R Fujisawa, M Izumizaki, T Imai, et al. 2001. "Intervention of Thymus and Activation-Regulated Chemokine Attenuates the Development of Allergic Airway Inflammation and Hyperresponsiveness in Mice.." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 166 (3): 2055–62.
- Kim, Edy Y, John T Battaile, Anand C Patel, Yingjian You, Eugene Agapov, Mitchell H Grayson, Loralyn A Benoit, et al. 2008. "Persistent Activation of an Innate Immune Response Translates Respiratory Viral Infection Into Chronic Lung Disease.." *Nature Medicine* 14 (6): 633–40. doi:10.1038/nm1770.
- Kinjo, Takeshi, Masashi Nakamatsu, Chikara Nakasone, Natsuo Yamamoto, Yuki Kinjo, Kazuya Miyagi, Kaori Uezu, et al. 2006. "NKT Cells Play a Limited Role in the Neutrophilic Inflammatory Responses and Host Defense to Pulmonary Infection with Pseudomonas Aeruginosa.." *Microbes and Infection / Institut Pasteur* 8 (12-13): 2679–85. doi:10.1016/j.micinf.2006.07.016.
- Kinjo, Yuki, Douglass Wu, Gisen Kim, Guo-Wen Xing, Michael A Poles, David D Ho, Moriya Tsuji, Kazuyoshi Kawahara, Chi-Huey Wong, and Mitchell Kronenberg. 2005. "Recognition of Bacterial Glycosphingolipids by Natural Killer T Cells.." *Nature* 434 (7032): 520–25. doi:10.1038/nature03407.
- Kinjo, Yuki, Emmanuel Tupin, Douglass Wu, Masakazu Fujio, Raquel Garcia-Navarro, Mohammed Rafii-El-Idrissi Benhnia, Dirk M Zajonc, et al. 2006. "Natural Killer T Cells Recognize Diacylglycerol Antigens From Pathogenic Bacteria.." *Nature Immunology* 7 (9): 978–86. doi:10.1038/ni1380.
- Kinjo, Yuki, Petr Illarionov, José Luis Vela, Bo Pei, Enrico Girardi, Xiangming Li, Yali Li, et al. 2011. "Invariant Natural Killer T Cells Recognize Glycolipids From Pathogenic Gram-Positive Bacteria.." *Nature Immunology* 12 (10): 966–74. doi:10.1038/ni.2096.
- Ko, Sung-Youl, Hyun-Jeong Ko, Woo-Sung Chang, Se-Ho Park, Mi-Na Kweon, and Chang-Yuil Kang. 2005. "Alpha-Galactosylceramide Can Act as a Nasal Vaccine Adjuvant Inducing Protective Immune Responses Against Viral Infection and Tumor.." *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 175 (5): 3309–17.
- Kondo, Takaaki, and Masafumi Takiguchi. 2009. "Human Memory CCR4+CD8+ T Cell Subset Has the

- Ability to Produce Multiple Cytokines.." *International Immunology* 21 (5): 523–32. doi:10.1093/intimm/dxp019.
- Kumar, Vipin, and Terry L Delovitch. 2014. "Different Subsets of Natural Killer T Cells May Vary in Their Roles in Health and Disease.." *Immunology* 142 (3): 321–36. doi:10.1111/imm.12247.
- Kurts, Christian, Bruce W S Robinson, and Percy A Knolle. 2010. "Cross-Priming in Health and Disease.." *Nature Reviews Immunology* 10 (6): 403–14. doi:10.1038/nri2780.
- Ladel, C H, I E Flesch, J Arnoldi, and S H Kaufmann. 1994. "Studies with MHC-Deficient Knock-Out Mice Reveal Impact of Both MHC I- and MHC II-Dependent T Cell Responses on *Listeria monocytogenes* Infection.." *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 153 (7): 3116–22.
- Lanzavecchia, A. 1998. "Immunology. Licence to Kill.." *Nature* 393 (6684): 413–14. doi:10.1038/30845.
- Lara-Tejero, María, and Eric G Pamer. 2004. "T Cell Responses to *Listeria monocytogenes*.." *Current Opinion in Microbiology* 7 (1): 45–50. doi:10.1016/j.mib.2003.12.002.
- Lauvau, G, S Vijh, P Kong, T Horng, K Kerksiek, N Serbina, R A Tuma, and E G Pamer. 2001. "Priming of Memory but Not Effector CD8 T Cells by a Killed Bacterial Vaccine.." *Science (New York, N.Y.)* 294 (5547): 1735–39. doi:10.1126/science.1064571.
- Lawson, Victoria. 2012. "Turned on by Danger: Activation of CD1d-Restricted Invariant Natural Killer T Cells.." *Immunology* 137 (1): 20–27. doi:10.1111/j.1365-2567.2012.03612.x.
- Lee, Peter T, Kamel Benlagha, Luc Teyton, and Albert Bendelac. 2002. "Distinct Functional Lineages of Human v(Alpha)24 Natural Killer T Cells.." *The Journal of Experimental Medicine* 195 (5): 637–41.
- Lee, You Jeong, Keli L Holzapfel, Jinfang Zhu, Stephen C Jameson, and Kristin A Hogquist. 2013. "Steady-State Production of IL-4 Modulates Immunity in Mouse Strains and Is Determined by Lineage Diversity of iNKT Cells.." *Nature Immunology* 14 (11): 1146–54. doi:10.1038/ni.2731.
- Leung, Ting Fan, Kwok Chiu Ma, Kam Lun Hon, Christopher W K Lam, Helene Wan, Chung Yi Li, and Iris H S Chan. 2003. "Serum Concentration of Macrophage-Derived Chemokine May Be a Useful Inflammatory Marker for Assessing Severity of Atopic Dermatitis in Infants and Young Children.." *Pediatric Allergy and Immunology : Official Publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 14 (4): 296–301.
- Lieberam, I, and I Förster. 1999. "The Murine Beta-Chemokine TARC Is Expressed by Subsets of Dendritic Cells and Attracts Primed CD4+ T Cells.." *European Journal of Immunology* 29 (9): 2684–94.
- Lucas, Mathias, William Schachterle, Karin Oberle, Peter Aichele, and Andreas Diefenbach. 2007. "Dendritic Cells Prime Natural Killer Cells by Trans-Presenting Interleukin 15.." *Immunity* 26 (4): 503–17. doi:10.1016/j.immuni.2007.03.006.
- Lynch, Lydia, Michael Nowak, Bindu Varghese, Justice Clark, Andrew E Hogan, Vasillis Toxavidis, Steven P Balk, Donal O'Shea, Cliona O'Farrelly, and Mark A Exley. 2012. "Adipose Tissue Invariant NKT Cells Protect Against Diet-Induced Obesity and Metabolic Disorder Through Regulatory Cytokine Production.." *Immunity* 37 (3): 574–87. doi:10.1016/j.immuni.2012.06.016.
- Maghazachi, Azzam A. 2003. "G Protein-Coupled Receptors in Natural Killer Cells.." *Journal of Leukocyte Biology* 74 (1): 16–24.
- Mallevaey, Thierry, and Thirumahal Selvanantham. 2012. "Strategy of Lipid Recognition by Invariant Natural Killer T Cells: 'One for All and All for One'.." *Immunology* 136 (3): 273–82. doi:10.1111/j.1365-2567.2012.03580.x.

- Marzo, Amanda L, Vaiva Vezys, Kimberly D Klonowski, Seung-Joo Lee, Guruprasadh Muralimohan, Meagan Moore, David F Tough, and Leo Lefrançois. 2004. "Fully Functional Memory CD8 T Cells in the Absence of CD4 T Cells.." *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 173 (2): 969–75.
- Matsuda, J L, O V Naidenko, L Gapin, T Nakayama, M Taniguchi, C R Wang, Y Koezuka, and M Kronenberg. 2000. "Tracking the Response of Natural Killer T Cells to a Glycolipid Antigen Using CD1d Tetramers.." *The Journal of Experimental Medicine* 192 (5): 741–54.
- Matsuda, Jennifer L, Laurent Gapin, Jody L Baron, Stephane Sidobre, Daniel B Stetson, Markus Mohrs, Richard M Locksley, and Mitchell Kronenberg. 2003. "Mouse v Alpha 14i Natural Killer T Cells Are Resistant to Cytokine Polarization in Vivo.." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (14): 8395–8400. doi:10.1073/pnas.1332805100.
- Matsui, Katsuhiko, Soichi Tofukuji, and Reiko Ikeda. 2015. "CCL17 Production by Mouse Langerhans Cells Stimulated with Staphylococcus Aureus Cell Wall Components.." *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 38 (2): 317–20. doi:10.1248/bpb.b14-00614.
- Mattner, Jochen, Kristin L Debord, Nahed Ismail, Randal D Goff, Carlos Cantu, Dapeng Zhou, Pierre Saint-Mezard, et al. 2005. "Exogenous and Endogenous Glycolipid Antigens Activate NKT Cells During Microbial Infections.." *Nature* 434 (7032): 525–29. doi:10.1038/nature03408.
- McGregor, D D, F T Koster, and G B Mackaness. 1970. "The Short Lived Small Lymphocyte as a Mediator of Cellular Immunity.." *Nature* 228 (5274): 855–56.
- Medzhitov, R, and C Janeway. 2000. "Innate Immune Recognition: Mechanisms and Pathways.." *Immunological Reviews* 173 (February): 89–97.
- Mehta, Divya, Carlene Petes, Katrina Gee, and Sameh Basta. 2015. "The Role of Virus Infection in Deregulating the Cytokine Response to Secondary Bacterial Infection.." *Journal of Interferon & Cytokine Research : the Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, August. doi:10.1089/jir.2015.0072.
- Michel, Marie-Laure, Alexandre Castro Keller, Christophe Paget, Masakazu Fujio, François Trottein, Paul B Savage, Chi-Huey Wong, Elke Schneider, Michel Dy, and Maria C Leite-de-Moraes. 2007. "Identification of an IL-17-Producing NK1.1(Neg) iNKT Cell Population Involved in Airway Neutrophilia.." *The Journal of Experimental Medicine* 204 (5): 995–1001. doi:10.1084/jem.20061551.
- Miltenyi, S, W Müller, W Weichel, and A Radbruch. 1990. "High Gradient Magnetic Cell Separation with MACS.." *Cytometry* 11 (2): 231–38. doi:10.1002/cyto.990110203.
- Mishalian, Inbal, Rachel Bayuh, Evgeniy Eruslanov, Janna Michaeli, Liran Levy, Lida Zolotarov, Sunil Singhal, Steven M Albelda, Zvi Granot, and Zvi G Fridlender. 2014. "Neutrophils Recruit Regulatory T-Cells Into Tumors via Secretion of CCL17--a New Mechanism of Impaired Antitumor Immunity.." *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 135 (5): 1178–86. doi:10.1002/ijc.28770.
- Mitchell, L M, K L Brzoza-Lewis, C J Henry, J M Grayson, M M Westcott, and E M Hiltbold. 2011. "Distinct Responses of Splenic Dendritic Cell Subsets to Infection with *Listeria monocytogenes*: Maturation Phenotype, Level of Infection, and T Cell Priming Capacity Ex Vivo.." *Cellular Immunology* 268 (2): 79–86. doi:10.1016/j.cellimm.2011.03.001.
- Monteiro, Marta, Catarina F Almeida, Ana Agua-Doce, and Luis Graca. 2013. "Induced IL-17-Producing Invariant NKT Cells Require Activation in Presence of TGF- β and IL-1 β .." *The Journal of Immunology* 190 (2): 805–11. doi:10.4049/jimmunol.1201010.
- Muraille, Eric, Rielle Giannino, Patrick Guirnalda, Ingrid Leiner, Steffen Jung, Eric G Pamer, and Grégoire

- Lauvau. 2005. "Distinct in Vivo Dendritic Cell Activation by Live Versus Killed *Listeria monocytogenes*." *European Journal of Immunology* 35 (5): 1463–71. doi:10.1002/eji.200526024.
- Murphy, K M. 2011. "Janeway's Immunobiology - Kenneth M. Murphy - Google Books."
- Nakatani, T, Y Kaburagi, Y Shimada, M Inaoki, K Takehara, N Mukaida, and S Sato. 2001. "CCR4 Memory CD4+ T Lymphocytes Are Increased in Peripheral Blood and Lesional Skin From Patients with Atopic Dermatitis.." *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 107 (2): 353–58. doi:10.1067/mai.2001.112601.
- Neuenhahn, Michael, Kristen M Kerksiek, Magdalena Nauerth, Michael H Suhre, Matthias Schiemann, Friedemann E Gebhardt, Christian Stemberger, et al. 2006. "CD8alpha+ Dendritic Cells Are Required for Efficient Entry of *Listeria monocytogenes* Into the Spleen.." *Immunity* 25 (4): 619–30. doi:10.1016/j.immuni.2006.07.017.
- Nieuwenhuis, Edward E S, Tetsuya Matsumoto, Dicky Lindenbergh, Rob Willemsen, Arthur Kaser, Ytje Simons-Oosterhuis, Sylvia Brugman, et al. 2009. "Cd1d-Dependent Regulation of Bacterial Colonization in the Intestine of Mice.." *Journal of Clinical Investigation* 119 (5): 1241–50. doi:10.1172/JCI36509.
- Nieuwenhuis, Edward E S, Tetsuya Matsumoto, Mark Exley, Robbert A Schleipman, Jonathan Glickman, Dan T Bailey, Nadia Corazza, Sean P Colgan, Andrew B Onderdonk, and Richard S Blumberg. 2002. "CD1d-Dependent Macrophage-Mediated Clearance of *Pseudomonas Aeruginosa* From Lung.." *Nature Medicine* 8 (6): 588–93. doi:10.1038/nm0602-588.
- Nishimura, T, H Kitamura, K Iwakabe, T Yahata, A Ohta, M Sato, K Takeda, et al. 2000. "The Interface Between Innate and Acquired Immunity: Glycolipid Antigen Presentation by CD1d-Expressing Dendritic Cells to NKT Cells Induces the Differentiation of Antigen-Specific Cytotoxic T Lymphocytes.." *International Immunology* 12 (7): 987–94.
- North, R J. 1970. "The Relative Importance of Blood Monocytes and Fixed Macrophages to the Expression of Cell-Mediated Immunity to Infection.." *The Journal of Experimental Medicine* 132 (3): 521–34.
- Oh, Kyu Heon, Changjin Lee, Sung Won Lee, Sung H Jeon, Se-Ho Park, Rho H Seong, and Seokmann Hong. 2011. "Activation of Natural Killer T Cells Inhibits the Development of Induced Regulatory T Cells via IFN γ .." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 411 (3): 599–606. doi:10.1016/j.bbrc.2011.06.193.
- Oki, Shinji, and Sachiko Miyake. 2007. "Invariant Natural Killer T (iNKT) Cells in Asthma: a Novel Insight Into the Pathogenesis of Asthma and the Therapeutic Implication of Glycolipid Ligands for Allergic Diseases.." *Allergology International : Official Journal of the Japanese Society of Allergology* 56 (1): 7–14. doi:10.2332/allergolint.R-06-137.
- Olszak, Torsten, Dingding An, Sebastian Zeissig, Miguel Pinilla Vera, Julia Richter, Andre Franke, Jonathan N Glickman, et al. 2012. "Microbial Exposure During Early Life Has Persistent Effects on Natural Killer T Cell Function.." *Science (New York, N.Y.)* 336 (6080): 489–93. doi:10.1126/science.1219328.
- Padte, Neal N, Xiangming Li, Moriya Tsuji, and Sandhya Vasan. 2011. "Clinical Development of a Novel CD1d-Binding NKT Cell Ligand as a Vaccine Adjuvant.." *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 140 (2): 142–51. doi:10.1016/j.clim.2010.11.009.
- Paget, Christophe, Thierry Mallevaey, Anneliese O Speak, David Torres, Josette Fontaine, Kathleen C F Sheehan, Monique Capron, et al. 2007. "Activation of Invariant NKT Cells by Toll-Like Receptor 9-Stimulated Dendritic Cells Requires Type I Interferon and Charged Glycosphingolipids.." *Immunity* 27 (4): 597–609. doi:10.1016/j.immuni.2007.08.017.

- Palm, Noah W, and Ruslan Medzhitov. 2009. "Pattern Recognition Receptors and Control of Adaptive Immunity.." *Immunological Reviews* 227 (1): 221–33. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00731.x.
- Parekh, Vrajesh V, Lan Wu, Danyvid Olivares-Villagómez, Keith T Wilson, and Luc Van Kaer. 2013. "Activated Invariant NKT Cells Control Central Nervous System Autoimmunity in a Mechanism That Involves Myeloid-Derived Suppressor Cells.." *The Journal of Immunology* 190 (5): 1948–60. doi:10.4049/jimmunol.1201718.
- Parekh, Vrajesh V, Michael T Wilson, and Luc Van Kaer. 2005. "iNKT-Cell Responses to Glycolipids.." *Critical Reviews in Immunology* 25 (3): 183–213.
- Parekh, Vrajesh V, Michael T Wilson, Danyvid Olivares-Villagómez, Avneesh K Singh, Lan Wu, Chyung-Ru Wang, Sebastian Joyce, and Luc Van Kaer. 2005. "Glycolipid Antigen Induces Long-Term Natural Killer T Cell Anergy in Mice.." *Journal of Clinical Investigation* 115 (9): 2572–83. doi:10.1172/JCI24762.
- Parish, C R. 1999. "Fluorescent Dyes for Lymphocyte Migration and Proliferation Studies.." *Immunology and Cell Biology* 77 (6): 499–508. doi:10.1046/j.1440-1711.1999.00877.x.
- Parish, Christopher R, Megan H Glidden, Ben J C Quah, and Hilary S Warren. 2009. "Use of the Intracellular Fluorescent Dye CFSE to Monitor Lymphocyte Migration and Proliferation.." *Current Protocols in Immunology* / Edited by John E. Coligan ... [Et al.] Chapter 4 (February): Unit4.9. doi:10.1002/0471142735.im0409s84.
- Poppensieker, Karola, David-Marian Otte, Britta Schürmann, Andreas Limmer, Philipp Dresing, Eva Drews, Beatrix Schumak, et al. 2012. "CC Chemokine Receptor 4 Is Required for Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Regulating GM-CSF and IL-23 Production in Dendritic Cells.." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (10): 3897–3902. doi:10.1073/pnas.1114153109.
- Porcelli, S A. 1995. "The CD1 Family: a Third Lineage of Antigen-Presenting Molecules.." *Advances in Immunology* 59: 1–98.
- Portnoy, D A, P S Jacks, and D J Hinrichs. 1988. "Role of Hemolysin for the Intracellular Growth of *Listeria monocytogenes*.." *The Journal of Experimental Medicine* 167 (4): 1459–71.
- Power, C A, J M Clemetson, K J Clemetson, and T N Wells. 1995. "Chemokine and Chemokine Receptor mRNA Expression in Human Platelets.." *Cytokine* 7 (6): 479–82. doi:10.1006/cyto.1995.0065.
- Qiu, Fu, and Zhengrong Cui. 2007. "CD4+ T Helper Cell Response Is Required for Memory in CD8+ T Lymphocytes Induced by a Poly(I:C)-Adjuvanted MHC I-Restricted Peptide Epitope.." *Journal of Immunotherapy* (Hagerstown, Md. : 1997) 30 (2): 180–89. doi:10.1097/01.cji.0000211330.61019.6f.
- Raghuraman, Gayatri, Yanbiao Geng, and Chyung-Ru Wang. 2006. "IFN-Beta-Mediated Up-Regulation of CD1d in Bacteria-Infected APCs.." *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 177 (11): 7841–48.
- Ranson, Thomas, Søren Bregenholt, Agnes Lehuen, Olivier Gaillot, Maria C Leite-de-Moraes, André Herbelin, Patrick Berche, and James P Di Santo. 2005. "Invariant v Alpha 14+ NKT Cells Participate in the Early Response to Enteric *Listeria monocytogenes* Infection.." *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 175 (2): 1137–44.
- Reinicke, Anna T, Kyla D Omilusik, Genc Basha, and Wilfred A Jefferies. 2009. "Dendritic Cell Cross-Priming Is Essential for Immune Responses to *Listeria monocytogenes*.." *PloS One* 4 (10): e7210. doi:10.1371/journal.pone.0007210.

- Ridge, J P, F Di Rosa, and P Matzinger. 1998. "A Conditioned Dendritic Cell Can Be a Temporal Bridge Between a CD4+ T-Helper and a T-Killer Cell.." *Nature* 393 (6684): 474–78. doi:10.1038/30989.
- Riese, Peggy, Stephanie Trittel, Tobias May, Luka Cicin-Sain, Benedict J Chambers, and Carlos A Guzmán. 2015. "Activated NKT Cells Imprint NK-Cell Differentiation, Functionality and Education.." *European Journal of Immunology* 45 (6): 1794–1807. doi:10.1002/eji.201445209.
- Riezu-Boj, José-Ignacio, Esther Larrea, Rafael Aldabe, Laura Guembe, Noelia Casares, Eva Galeano, Iciar Echeverria, et al. 2011. "Hepatitis C Virus Induces the Expression of CCL17 and CCL22 Chemokines That Attract Regulatory T Cells to the Site of Infection.." *Journal of Hepatology* 54 (3): 422–31. doi:10.1016/j.jhep.2010.07.014.
- Rot, Antal, and Ulrich H Von Andrian. 2004. "Chemokines in Innate and Adaptive Host Defense: Basic Chemokines Grammar for Immune Cells.." *Annual Review of Immunology* 22: 891–928. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104543.
- Sada-Ovalle, Isabel, Asako Chiba, Adaena Gonzales, Michael B Brenner, and Samuel M Behar. 2008. "Innate Invariant NKT Cells Recognize Mycobacterium Tuberculosis-Infected Macrophages, Produce Interferon-Gamma, and Kill Intracellular Bacteria.." *PLoS Pathogens* 4 (12): e1000239. doi:10.1371/journal.ppat.1000239.
- Salio, Mariolina, Anneliese O Speak, Dawn Shepherd, Paolo Polzella, Petr A Illarionov, Natacha Veerapen, Gurdyal S Besra, Frances M Platt, and Vincenzo Cerundolo. 2007. "Modulation of Human Natural Killer T Cell Ligands on TLR-Mediated Antigen-Presenting Cell Activation.." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (51): 20490–95. doi:10.1073/pnas.0710145104.
- Sander, B, J Andersson, and U Andersson. 1991. "Assessment of Cytokines by Immunofluorescence and the Paraformaldehyde-Saponin Procedure.." *Immunological Reviews* 119 (February): 65–93.
- Schlech, W F, P M Lavigne, R A Bortolussi, A C Allen, E V Haldane, A J Wort, A W Hightower, et al. 1983. "Epidemic Listeriosis--Evidence for Transmission by Food.." *The New England Journal of Medicine* 308 (4): 203–6. doi:10.1056/NEJM198301273080407.
- Schmieg, John, Guangli Yang, Richard W Franck, Nico van Rooijen, and Moriya Tsuji. 2005. "Glycolipid Presentation to Natural Killer T Cells Differs in an Organ-Dependent Fashion.." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (4): 1127–32. doi:10.1073/pnas.0408288102.
- Schoenberger, S P, R E Toes, E I van der Voort, R Offringa, and C J Melief. 1998. "T-Cell Help for Cytotoxic T Lymphocytes Is Mediated by CD40-CD40L Interactions.." *Nature* 393 (6684): 480–83. doi:10.1038/31002.
- Semmling, Verena, Veronika Lukacs-Kornek, Christoph A Thaiss, Thomas Quast, Katharina Hochheiser, Ulf Panzer, Jamie Rossjohn, et al. 2010. "Alternative Cross-Priming Through CCL17-CCR4-Mediated Attraction of CTLs Toward NKT Cell-Licensed DCs.." *Nature Immunology* 11 (4): 313–20. doi:10.1038/ni.1848.
- Sharif, S, G A Arreaza, P Zucker, Q S Mi, J Sondhi, O V Naidenko, M Kronenberg, et al. 2001. "Activation of Natural Killer T Cells by Alpha-Galactosylceramide Treatment Prevents the Onset and Recurrence of Autoimmune Type 1 Diabetes.." *Nature Medicine* 7 (9): 1057–62. doi:10.1038/nm0901-1057.
- Shedlock, Devon J, and Hao Shen. 2003. "Requirement for CD4 T Cell Help in Generating Functional CD8 T Cell Memory.." *Science (New York, N.Y.)* 300 (5617): 337–39. doi:10.1126/science.1082305.
- Shortman, Ken, and Shalin H Naik. 2007. "Steady-State and Inflammatory Dendritic-Cell Development.." *Nature Reviews Immunology* 7 (1): 19–30. doi:10.1038/nri1996.

- Sigal, L J, S Crotty, R Andino, and K L Rock. 1999. "Cytotoxic T-Cell Immunity to Virus-Infected Non-Haematopoietic Cells Requires Presentation of Exogenous Antigen.." *Nature* 398 (6722): 77–80. doi:10.1038/18038.
- Skoberne, Mojca, Simone Schenk, Herbert Hof, and Gernot Geginat. 2002. "Cross-Presentation of *Listeria monocytogenes*-Derived CD4 T Cell Epitopes.." *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 169 (3): 1410–18.
- Smyth, Mark J, Nadine Y Crowe, Daniel G Pellicci, Konstantinos Kyparissoudis, Janice M Kelly, Kazuyoshi Takeda, Hideo Yagita, and Dale I Godfrey. 2002. "Sequential Production of Interferon-Gamma by NK1.1(+) T Cells and Natural Killer Cells Is Essential for the Antimetastatic Effect of Alpha-Galactosylceramide.." *Blood* 99 (4): 1259–66.
- Specht, Sabine, Jutta K Frank, Judith Alferink, Bettina Dubben, Laura E Layland, Gaëlle Denece, Odile Bain, et al. 2011. "CCL17 Controls Mast Cells for the Defense Against Filarial Larval Entry.." *The Journal of Immunology* 186 (8): 4845–52. doi:10.4049/jimmunol.1000612.
- Stavru, Fabrizia, Cristel Archambaud, and Pascale Cossart. 2011. "Cell Biology and Immunology of *Listeria monocytogenes* Infections: Novel Insights.." *Immunological Reviews* 240 (1): 160–84. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00993.x.
- Stolberg, Valerie R, Bo-Chin Chiu, Brian M Schmidt, Steven L Kunkel, Matyas Sandor, and Stephen W Chensue. 2011. "CC Chemokine Receptor 4 Contributes to Innate NK and Chronic Stage T Helper Cell Recall Responses During Mycobacterium Bovis Infection.." *The American Journal of Pathology* 178 (1): 233–44. doi:10.1016/j.ajpath.2010.11.036.
- Sun, Joseph C, and Michael J Bevan. 2003. "Defective CD8 T Cell Memory Following Acute Infection Without CD4 T Cell Help.." *Science* (New York, N.Y.) 300 (5617): 339–42. doi:10.1126/science.1083317.
- Szalay, G, C H Ladell, C Blum, L Brossay, M Kronenberg, and S H Kaufmann. 1999. "Cutting Edge: Anti-CD1 Monoclonal Antibody Treatment Reverses the Production Patterns of TGF-Beta 2 and Th1 Cytokines and Ameliorates Listeriosis in Mice.." *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 162 (12): 6955–58.
- Thaiss, Christoph A, Verena Semmling, Lars Franken, Hermann Wagner, and Christian Kurts. 2011. "Chemokines: a New Dendritic Cell Signal for T Cell Activation.." *Frontiers in Immunology* 2: 31. doi:10.3389/fimmu.2011.00031.
- Thiel, A, P Wu, R Lauster, J Braun, A Radbruch, and J Sieper. 2000. "Analysis of the Antigen-Specific T Cell Response in Reactive Arthritis by Flow Cytometry.." *Arthritis and Rheumatism* 43 (12): 2834–42. doi:10.1002/1529-0131(200012)43:12<2834::AID-ANR25>3.0.CO;2-7.
- Thomas, Seddon Y, Runhua Hou, Jonathan E Boyson, Terry K Means, Christoph Hess, Douglas P Olson, Jack L Strominger, et al. 2003. "CD1d-Restricted NKT Cells Express a Chemokine Receptor Profile Indicative of Th1-Type Inflammatory Homing Cells.." *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 171 (5): 2571–80.
- Tripp, C S, S F Wolf, and E R Unanue. 1993. "Interleukin 12 and Tumor Necrosis Factor Alpha Are Costimulators of Interferon Gamma Production by Natural Killer Cells in Severe Combined Immunodeficiency Mice with Listeriosis, and Interleukin 10 Is a Physiologic Antagonist.." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (8): 3725–29.
- Tupin, Emmanuel, Yuki Kinjo, and Mitchell Kronenberg. 2007. "The Unique Role of Natural Killer T Cells in the Response to Microorganisms.." *Nature Reviews. Microbiology* 5 (6): 405–17. doi:10.1038/nrmicro1657.

- Tyznik, Aaron J, Emmanuel Tupin, Niranjana A Nagarajan, Min J Her, Chris A Benedict, and Mitchell Kronenberg. 2008. "Cutting Edge: the Mechanism of Invariant NKT Cell Responses to Viral Danger Signals.." *The Journal of Immunology* 181 (7): 4452–56.
- Van Kaer, Luc, Vrajesh V Parekh, and Lan Wu. 2013. "Invariant Natural Killer T Cells as Sensors and Managers of Inflammation.." *Trends in Immunology* 34 (2): 50–58. doi:10.1016/j.it.2012.08.009.
- Walzer, Thierry, Marc Dalod, Scott H Robbins, Laurence Zitvogel, and Eric Vivier. 2005. "Natural-Killer Cells and Dendritic Cells: "L'union Fait La Force".." *Blood* 106 (7): 2252–58. doi:10.1182/blood-2005-03-1154.
- Weber, Christian, Svenja Meiler, Yvonne Döring, Miriam Koch, Maik Drechsler, Remco T A Megens, Zuzanna Rowinska, et al. 2011. "CCL17-Expressing Dendritic Cells Drive Atherosclerosis by Restraining Regulatory T Cell Homeostasis in Mice.." *Journal of Clinical Investigation* 121 (7): 2898–2910. doi:10.1172/JCI44925.
- Webster, K E, H-O Kim, K Kyparissoudis, T M Corpuz, G V Pinget, A P Uldrich, R Brink, et al. 2014. "IL-17-Producing NKT Cells Depend Exclusively on IL-7 for Homeostasis and Survival.." *Mucosal Immunology* 7 (5): 1058–67. doi:10.1038/mi.2013.122.
- Wesley, Johnna D, Marlowe S Tessmer, Deanna Chaukos, and Laurent Brossay. 2008. "NK Cell-Like Behavior of Valpha14i NK T Cells During MCMV Infection.." *PLoS Pathogens* 4 (7): e1000106. doi:10.1371/journal.ppat.1000106.
- White, D W, V P Badovinac, X Fan, and J T Harty. 2000. "Adaptive Immunity Against *Listeria monocytogenes* in the Absence of Type I Tumor Necrosis Factor Receptor P55.." *Infection and Immunity* 68 (8): 4470–76.
- Wiesel, Melanie, and Annette Oxenius. 2012. "From Crucial to Negligible: Functional CD8⁺ T-Cell Responses and Their Dependence on CD4⁺ T-Cell Help.." *European Journal of Immunology* 42 (5): 1080–88. doi:10.1002/eji.201142205.
- Williams, Matthew A, Rebecca L Schmidt, and Laurel L Lenz. 2012. "Early Events Regulating Immunity and Pathogenesis During *Listeria monocytogenes* Infection.." *Trends in Immunology* 33 (10): 488–95. doi:10.1016/j.it.2012.04.007.
- Winau, Florian, Guido Hegasy, Ralf Weiskirchen, Stephan Weber, Cécile Cassan, Peter A Sieling, Robert L Modlin, Roland S Liblau, Axel M Gressner, and Stefan H E Kaufmann. 2007. "Ito Cells Are Liver-Resident Antigen-Presenting Cells for Activating T Cell Responses.." *Immunity* 26 (1): 117–29. doi:10.1016/j.immuni.2006.11.011.
- Wingender, Gerhard, Dariusz Stepniak, Philippe Krebs, Lin Lin, Sara McBride, Bo Wei, Jonathan Braun, Sarkis K Mazmanian, and Mitchell Kronenberg. 2012. "Intestinal Microbes Affect Phenotypes and Functions of Invariant Natural Killer T Cells in Mice.." *Gastroenterology* 143 (2): 418–28. doi:10.1053/j.gastro.2012.04.017.
- Wolf, Benjamin J, Raju V V Tatituri, Catarina F Almeida, Jérôme Le Nours, Veemal Bhowruth, Darryl Johnson, Adam P Uldrich, et al. 2015. "Identification of a Potent Microbial Lipid Antigen for Diverse NKT Cells.." *The Journal of Immunology*, August. doi:10.4049/jimmunol.1501019.
- Yuan, Qian, Shannon K Bromley, Terry K Means, Krister J Jones, Fumitaka Hayashi, Atul K Bhan, and Andrew D Luster. 2007. "CCR4-Dependent Regulatory T Cell Function in Inflammatory Bowel Disease.." *The Journal of Experimental Medicine* 204 (6): 1327–34. doi:10.1084/jem.20062076.
- Zeissig, Sebastian, and Richard S Blumberg. 2014a. "Life at the Beginning: Perturbation of the Microbiota by Antibiotics in Early Life and Its Role in Health and Disease.." *Nature Immunology* 15 (4): 307–10. doi:10.1038/ni.2847.

- Zeissig, Sebastian, and Richard S Blumberg. 2014b. "Commensal Microbial Regulation of Natural Killer T Cells at the Frontiers of the Mucosal Immune System.." FEBS Letters 588 (22): 4188–94. doi:10.1016/j.febslet.2014.06.042.
- Zeng, Z, A R Castaño, B W Segelke, E A Stura, P A Peterson, and I A Wilson. 1997. "Crystal Structure of Mouse CD1: an MHC-Like Fold with a Large Hydrophobic Binding Groove.." Science (New York, N.Y.) 277 (5324): 339–45.
- Zhao, Lei, Xiaoling Gao, Ying Peng, Antony G Joyee, Hong Bai, Shuhe Wang, Jie Yang, Weiming Zhao, and Xi Yang. 2011. "Differential Modulating Effect of Natural Killer (NK) T Cells on Interferon- Γ Production and Cytotoxic Function of NK Cells and Its Relationship with NK Subsets in Chlamydia Muridarum Infection.." Immunology 134 (2): 172–84. doi:10.1111/j.1365-2567.2011.03477.x.
- Zlotnik, A, and O Yoshie. 2000. "Chemokines: a New Classification System and Their Role in Immunity.." Immunity 12 (2): 121–27.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
α GC	alpha-Galactosylceramid
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
BHI	engl. brain heart infusion
BMDC	engl. bone marrow-derived dendritic cell
ca.	circa
CD	engl. cluster of differentiation
CFU	engl. colony-forming units
DNA	engl. deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DZ	Dendritische Zelle
ELISA	engl. enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	engl. fluorescence-activated cell sorting
GFP	engl. green fluorescent protein, grün-fluoreszierendes Protein
h	engl. hour, Stunde
HET	Haus für experimentelle Therapie
IEI	Institut für Experimentelle Immunologie
IFN	Interferon
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
KO	engl. knock-out
LPS	Lipopolysaccharid
Lm	<i>Listeria monocytogenes</i>
MACS	engl. magnetic-activated cell sorting
MDSC	engl. myeloid-derived suppressor cell
MFI	engl. mean fluorescence intensity
min	Minute

MHC	engl. major histocompatibility complex
MZ MO	Marginalzonenmakrophage
NKT Zelle	natürliche Killer T Zelle
NK Zelle	natürliche Killer Zelle
OD	optische Dichte
OVA	Ovalbumin
PAMP	engl. pathogen-associated pattern
PBS	engl. phosphate-buffered saline
PCR	engl. polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
p.i.	post-Infektion
PRR	engl. pattern recognition receptor, Mustererkennung-Rezeptor
RNA	engl. ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
ROS	engl. reactive oxygen species
RPM	Rote Pulpa Makrophage
rpm	engl. rounds per minutes
SPF	engl. specific-pathogen free
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrosis Faktor
T _{reg}	regulatorische T Zelle
TZ	T Zelle
TZR	T Zellrezeptor
WT	Wildtyp
ZTL	zytotoxischer T Lymphozyt