



In vitro und *in vivo* Charakterisierung von IFN beta
exprimierenden Zellen mittels eines bicistronischen
Fluoreszenz-Reporter-Mausmodells

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Philipp Dresing
aus Solingen

Düsseldorf, Oktober 2010

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Frau Dr. Stefanie Scheu
Koreferent: Herr Prof. Dr. Peter Westhoff

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2010

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 ÜBERBLICK ÜBER DAS IMMUNSYSTEM	1
1.2 MONOZYTEN UND DENDRITISCHE ZELLEN	4
1.3 INTERFERONE	6
1.3.1 KLASSENEINTEILUNG	6
1.3.2 TYP I INTERFERONE IN VIRALEN UND NICHT VIRALEN INFESTIONEN.....	7
1.3.3 PRRs UND TYP I IFN INDUKTION.....	9
1.3.3.1 PRRs	9
1.3.3.2 Induktion von Typ I Interferonen	12
1.3.3.3 Die Initiierung der <i>lfnb</i> Transkription	15
1.4 LISTERIA MONOCYTOGENES	16
1.4.1 DER INFESTIONSZYKLUS VON <i>L. MONOCYTOGENES</i>	16
1.4.2 IMMUNABWEHR GEGEN <i>L. MONOCYTOGENES</i>	16
1.4.3 TYP I IFN IN DER MURINEN LISTERIOSE.....	17
1.5 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	18
2 MATERIAL UND METHODEN	19
2.1 BEZUGSQUELLENNACHWEIS	19
2.1.1 CHEMIKALIEN	19
2.1.2 RADIOCHEMIKALIEN	20
2.1.3 ENZYME	20
2.1.4 KITS UND VERBRAUCHSMATERIAL	21
2.1.5 GERÄTE UND SONSTIGE MATERIALIEN	21
2.2 MEDIEN UND PUFFER	22
2.2.1 STAMMLÖSUNGEN UND PUFFER	22
2.2.2 MEDIEN FÜR DIE ZELLKULTUR	24
2.3 BAKTERIENSTÄMME UND ZELLINIEN	24

2.3.1	BAKTERIENSTÄMME	24
2.3.2	ZELLINIEN UND ZELLEN	25
2.4	PRIMER UND ANTIKÖRPER	25
2.4.1	OLIGONUKLEOTIDE (PRIMER)	25
2.4.2	ANTIÖRPER	25
2.5	MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITSMETHODEN	26
2.5.1	PRÄPARATIVE ISOLIERUNG CHROMOSOMALER DNA AUS MURINEM GEWEBE	26
2.5.2	PRÄPARATION GESAMTZELLULÄRER RNA	27
2.5.3	AMPLIFIZIERUNG VON DNA MITTELS POLYMERASE-KETTEN-REAKTION (PCR)	27
2.5.4	AGAROSEGELELEKTROPHORESE	28
2.5.5	PHOTOMETRISCHE KONZENTRATIONS- UND REINHEITSBESTIMMUNG	28
2.6	TIERVERSUCHE	29
2.6.1	VERSUCHSTIERE	29
2.6.2	DIE IFN β -REPORTERMAUS	29
2.6.3	ORGANENTNAHME	30
2.6.4	PRÄPARATION VON KNOCHENMARK	30
2.6.5	<i>IN VIVO</i> TLR AGONIST STIMULATION	31
2.6.6	INFEKTIONEN MIT <i>L. MONOCYTOGENES</i>	31
2.6.7	ADOPTIVER TRANSFER VON ZELLEN	31
2.7	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	32
2.7.1	KULTIVIERUNG EUKARYOTISCHER ZELLEN	32
2.7.2	KRYOKONSERVIERUNG UND LAGERUNG EUKARYOTISCHER ZELLEN	32
2.7.3	GENERIERUNG UND AUSTESTUNG MCSF-HALTIGEN MEDIUMS	32
2.7.4	GENERIERUNG GMCSF-HALTIGEN MEDIUMS ZUR DC	33
2.7.5	DIFFERENZIERUNG VON MYELOIDEN ZELLEN AUS KNOCHENMARKSZELLEN	33
2.7.5.1	Generierung von BMDMs	33
2.7.5.2	Generierung von GMCSF-DCs	33
2.7.5.3	Generierung von Flt3L-DCs	33
2.7.6	STIMULATION UND INFEKTION VON <i>IN VITRO</i> DIFFERENZIIERTEN ZELLEN	34
2.7.7	AUFBEREITUNG VON ORGANEN FÜR NACHFOLGENDE FACS-ANALYSEN	35
2.7.7.1	Milz und Lymphknoten	35
2.7.7.2	Leber	35
2.8	IMMUNOLOGISCHE METHODEN	35
2.8.1	IMMUNHISTOLOGIE	35
2.8.1.1	Immunhistochemie zur Analyse am Fluoreszenz- oder Konfokalmikroskop	35
2.8.1.2	Anfertigung von Zytospin-Präparaten	36
2.8.2	ALLOGENE „GEMISCHTE LYMPHOZYTEN REAKTION“ (MLR)	36
2.8.3	DURCHFLUSSZYTOMETRIE (FACS-ANALYSE)	36

2.8.3.1	FACS-Analyse von Oberflächenantigenen	37
2.8.3.2	Intrazelluläre Antigenfärbung	38
2.8.3.3	Zellsortierung mittels FACS-Aria	38
2.8.3.4	FACS-Daten Analyse und Darstellung	38
3	ERGEBNISSE	40
3.1	VALIDIERUNG DER IFNβ REPORTERFUNKTION	40
3.2	<i>IN VITRO</i> UND <i>IN VIVO</i> ANALYSE DER IFNβ ANTWORT NACH STIMULATION MIT DEFINIERTEN MOLEKULAREN PATHOGEN-BESTANDTEILEN.....	42
3.2.1	IFN β INDUKTIONSKINETIK IN KNOCHENMARKSGENERIERTEN ZELLEN	42
3.2.2	SYNERGISTISCHE UND INHIBITORISCHE EFFEKTE EINER SIMULTANEN STIMULATION MIT DISTINKTEN TLR AGONISTEN AUF DIE IFN β EXPRESSION	44
3.2.3	STIMULATION VON FLT3L-DCs INDUZIERT EINE DICHOTOME IFN β ANTWORT	47
3.2.4	CHARAKTERISIERUNG DER IFN β ANTWORT NACH PAMP STIMULATION <i>IN VIVO</i>	48
3.2.4.1	Hauptsächlich CD8 α^+ cDCs exprimieren IFN β nach poly(I:C) Stimulation	49
3.2.4.2	pDCs sind die IFN β Produzenten nach CpG ODN Stimulation <i>in vivo</i>	55
3.3	DIFFERENTIELLE ANALYSE VON IFNβ^+ UND IFNβ^- PDCs MITTELS EINES MAUS GENOM MIKRO-ARRAYS.....	59
3.4	<i>IN VIVO</i> UND <i>IN VITRO</i> CHARAKTERISIERUNG DER IFNβ ANTWORT IM INFEKTIONSMODELL DER MURINEN LISTERIOSE	65
3.4.1	DIE MILZ IST DER ZELLULÄRE SCHWERPUNKT DER IFN β ANTWORT NACH <i>L. MONOCYTOGENES</i> INFEKTION ...	67
3.4.2	IFN β PRODUZIERENDE ZELLEN IN DER MURINEN LISTERIOSE WEISEN DEN PHÄNOTYP AKTIVIERTER INFLAMMATORISCHER MONOZYTEN AUF	68
3.4.3	ANALYSE DER IFN β ANTWORT IN MIT <i>L. MONOCYTOGENES</i> INFIZIERTEN KNOCHENMARKSZELLKULTUREN	69
3.4.4	CHARAKTERISIERUNG IFN β PRODUZIERENDER ZELLEN IM HISTOLOGISCHEN KONTEXT VON MILZ UND MLN ..	72
3.4.4.1	Die IFN β produzierenden Zellen der Milz befinden sich in den Foci der Infektion	72
3.4.4.2	In mLN sind <i>Listeria</i> $^+$ und YFP $^+$ Zellen nur nach i.p. Infektion zu detektieren.....	74
3.4.5	SIMULTANE <i>IN VITRO</i> UND <i>IN VIVO</i> VISUALISIERUNG VON YFP $^+$ UND <i>L. MONOCYTOGENES</i> INFIZIERTEN ZELLEN	75
3.4.5.1	<i>In vitro</i> Analyse des Infektionszustands YFP $^+$ und YFP $^-$ Zellen nach <i>L. monocytogenes</i> Infektion	76
3.4.5.2	Ko-Visualisierung IFN β^+ und <i>Listeria</i> $^+$ Zellen nach <i>L. monocytogenes</i> Infektion <i>in vivo</i>	78
3.4.6	IDENTIFIZIERUNG DER IFN β /YFP $^+$ ZELLEN ALS TIP-DCs	81
3.4.6.1	YFP $^+$ Zellen weisen eine mit Tip-DCs vergleichbare Morphologie, Bakterienlast und intrazelluläre Mac-3 Expression auf	81
3.4.6.2	IFN β /YFP $^+$ Zellen zeigen die höchste iNOS und TNF Expression	83
3.4.6.3	IFN β^+ Zellen lokalisieren in iNOS $^+$ Arealen der <i>L. monocytogenes</i> infizierten Milz	84
3.4.7	IFN β^+ TIP-DCs SIND T-ZELL „PRIMENDE“ APCs	85
3.4.8	ADOPTIVER TRANSFER VON TIP-DCs IN IFN β^- REZIPIENTEN	86

4	DISKUSSION	89
4.1	CHARAKTERISIERUNG DER IFN β ANTWORT NACH STIMULATION MIT DEFINIERTEN MIKROBIELLEN BESTANDTEILEN.....	89
4.2	ANALYSE DER DIFFERENZ ZWISCHEN IFN β^+ UND IFN β^- PDCs MITTELS EINES MIKROARRAYS.....	98
4.3	CHARAKTERISIERUNG DER IFN β ANTWORT IM INFektionsMODELL DER MURINEN LISTERIOSE	101
4.4	AUSBLICK	106
5	ZUSAMMENFASSUNG	108
	SUMMARY	109
6	LITERATURVERZEICHNIS	110
7	ANHANG	120
7.1	GO-MINER ANALYSEN	120
7.2	SIGNIFIKANT DIFFERENTIELL REGULIERTE GENE NACH AUSSCHLUSS EINER PROBE.....	123
7.3	DANKSAGUNG UND WIDMUNG	124
7.4	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	125

Abbildungsverzeichnis

ABB. 1.1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER MILZ.....	2
ABB. 1.2: MIKROARCHITEKTUR EINES LYMPHKNOTENS (LN).....	3
ABB. 1.3: DIFFERENZIERUNG VON DCs, MONOZYTEN UND MAKROPHAGEN IN DER MAUS	4
ABB. 1.4: EFFEKTE VON TYP I INTERFERONEN IN DER BAKTERIELLEN IMMUNABWEHR	9
ABB. 1.5: ÜBERSICHT DER PRR ABHÄNGIGEN FRÜHEN INDUKTION VON IFN β	13
ABB. 1.6: INITIAL SEKRETIERTES IFN β INDUZIERT MITTELS POSITIVER RÜCKKOPPLUNGSSCHLEIFE ALLE TYP I INTERFERONE	14
ABB. 2.1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES FUNKTIONSPRINZIPS DER IFN β ^{MOB/MOB} REPORTERMAUS	30
ABB. 3.1: VALIDIERUNG DER IFN β /YFP REPORTERMAUS DURCH INTRAZELLULÄRE ZYTOKINFÄRBUNG	41
ABB. 3.2: ANALYSE DER IFN β /YFP EXPRESSION IN BMDMs UND GMCSF-DCs NACH POLY(I:C) STIMULATION	43
ABB. 3.3: IFN β /YFP EXPRESSION IN BMDMs NACH STIMULATION MIT TLR-AGONISTEN.	45
ABB. 3.4: IFN β /YFP EXPRESSION IN GMCSF-DCs NACH STIMULATION MIT TLR- AGONISTEN	46
ABB. 3.5: ANALYSE DER IFN β /YFP EXPRESSION IN TLR-AGONIST STIMULIERTEN FLT3L-DCs	48
ABB. 3.6: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER EXPERIMENTE ZUR <i>IN VIVO</i> ANALYSE DER IFN β ANTWORT	49
ABB. 3.7: FACS CHARAKTERISIERUNG DER IFN β PRODUZENTEN NACH POLY(I:C) INJEKTION IN DER MILZ.....	50
ABB. 3.8: FACS ANALYSE DER IFN β ⁺ ZELLEN NACH POLY(I:C) INJEKTION IN DEN LN.....	50
ABB. 3.9: VERGLEICHENDE ANALYSE VON IFN β ⁺ ZELLPOPULATIONEN IN DER MILZ NACH POLY(I:C) STIMULATION	51
ABB. 3.10: LOKALISIERUNG VON IFN β /YFP ⁺ ZELLEN IN MILZ UND LN NACH I.V. INJEKTION VON POLY(I:C)	52
ABB. 3.11: ANALYSE DER IFN β /YFP EXPRESSION IN NAÏVEN IFN β ^{MOB/MOB} MÄUSEN	53
ABB. 3.12: LOKALISATION VON IFN β /YFP ⁺ ZELLEN IN RELATION ZU MOMA-1 ⁺ UND ER-TR9 ⁺ MAKROPHAGEN.....	54
ABB. 3.13: FACS CHARAKTERISIERUNG DER IFN β PRODUZENTEN NACH <i>IN VIVO</i> CPG 1668 STIMULATION	56
ABB. 3.14: VERGLEICHENDE ANALYSE VON IFN β ⁺ ZELLPOPULATIONEN IN DER MILZ NACH CPG STIMULATION	57
ABB. 3.15: LOKALISIERUNG VON IFN β /YFP ⁺ ZELLEN IN MILZ UND LN NACH I.V. INJEKTION VON CPG 1668.....	58
ABB. 3.16: ARBEITSABLAUF ZUR DURCHFÜHRUNG DER MIKRO-ARRAY EXPERIMENTE	59
ABB. 3.17: ZELLSORTIERSTRATEGIE ZUR ISOLIERUNG IFN β /YFP ⁺ BZW. IFN β /YFP ⁻ pDCs	60
ABB. 3.18: ANALYSE DER GESAMT-RNA PROBEN	60
ABB. 3.19: SCATTERPLOT DER GENEXPRESSIONS-INTENSITÄTEN.....	61
ABB. 3.20: FUNKTIONELLE ANALYSE DER MIKROARRAYDATEN	64
ABB. 3.21: SKIZZIERUNG DER EXPERIMENTE ZUR ANALYSE DER IFN β PRODUZENTEN IN DER MURINEN LISTERIOSE.....	65
ABB. 3.22: BESTIMMUNG DER LD ₅₀ DER <i>IN VIVO</i> VERWENDETEN <i>L. MONOCYTOGENES</i> STÄMME	66
ABB. 3.23: KINETIK DER IFN β /YFP EXPRESSION IN LEBER, MILZ UND MLN NACH <i>L. MONOCYTOGENES</i> INFektion	67
ABB. 3.24: FACS ANALYSE DER IFN β /YFP ⁺ ZELLEN ZUM ZEITPUNKT MAXIMALER YFP EXPRESSION	69
ABB. 3.25: IFN β /YFP EXPRESSION IN BMDMs NACH INFektion MIT <i>L. MONOCYTOGENES</i>	70
ABB. 3.26: IFN β /YFP EXPRESSION IN DCs NACH INFektion MIT <i>L. MONOCYTOGENES</i>	71
ABB. 3.27: CHARAKTERISIERUNG DER LOKALISATION VON IFN β /YFP ⁺ ZELLEN IM KONTEXT DER INFIZIERTEN MILZ.....	73
ABB. 3.28: KONFOKALE VISUALISIERUNG VON IFN β /YFP PRODUZIERENDEN BZW. INFIZIERTEN ZELLEN IN DER MILZ.....	74
ABB. 3.29: LOKALISIERUNG VON IFN β /YFP ⁺ ZELLEN IN MLN NACH I.V. BZW. I.P. INFektion MIT <i>L. MONOCYTOGENES</i>	75

ABB. 3.30: FACS ANALYSE DER BAKTERIELLEN LAST VON IFN β /YFP ⁺ UND IFN β /YFP ⁻ ZELLEN	76
ABB. 3.31: FACS KO-VISUALISIERUNG VON INFEKTIONSSTATUS UND IFN β /YFP EXPRESSION IN BMDMs UND BMDCs	78
ABB. 3.32: SIMULTANE ANALYSE DER KOLOKALISATION VON YFP ⁺ ZELLEN UND LISTERIEN IN DER MILZ	79
ABB. 3.33: ANALYSE DES INFEKTIONSSTATUS VON YFP ⁺ ZELLEN IN DER MILZ NACH INFEKTION MIT Δ ACTA LISTERIEN	80
ABB. 3.34: CHARAKTERISIERUNG VON <i>EX VIVO</i> FACS SORTIERTEN ZELLEN NACH <i>L. MONOCYTOGENES</i> INFEKTION	82
ABB. 3.35: ANALYSE VON TNF UND iNOS EXPRESSION IN SORTIERTEN ZELLPOPULATIONEN AUS INFIZIERTEN MILZEN	83
ABB. 3.36: LOKALISATION VON IFN β /YFP ⁺ UND iNOS ⁺ ZELLEN IN DER <i>L. MONOCYTOGENES</i> INFIZIERTEN MILZ	84
ABB. 3.37: ALLOGENE MLR MIT AUS <i>L. MONOCYTOGENES</i> INFIZIERTEN MILZEN FACS SORTIERTEN ZELLPOPULATIONEN	86
ABB. 3.38: ANALYSE DES EINFLUSS VON ADOPTIV TRANSFERIERTEN IFN β ⁺ UND IFN β ⁻ TIP-DCs AUF DIE BAKTERIENLAST	87

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1.1: ÜBERSICHT ÜBER WICHTIGE PRR SOWIE DEREN LIGANDEN UND AGONISTEN.....	10
TABELLE 2.1: ZUSAMMENSETZUNG DER ZELLKULTURMEDIENTEN.....	24
TABELLE 2.2: VERWENDETE BAKTERIENSTÄMME.....	24
TABELLE 2.3: VERWENDETE ZELLEN UND ZELLINIEN.....	25
TABELLE 2.4: IN DIESER ARBEIT VERWENDETE PRIMER.....	25
TABELLE 2.5: VERWENDETE ANTIKÖRPER.....	26
TABELLE 2.6: PCR BEDINGUNGEN.....	28
TABELLE 2.7: VERWENDETE MÄUSE.....	29
TABELLE 2.8: KONZENTRATIONEN DER EINGESETZTEN IN VITRO PRR AGONISTEN.....	34
TABELLE 2.9: VERWENDETE FLUORESCENZFARBSTOFFE FÜR DIE DURCHFLUSSZYTOMETRIE.....	37
TABELLE 3.1: ÜBERSICHT DER DIFFERENTIELL AM STÄRKSTEN REGULIERTEN GENE.....	62
TABELLE 3.2: <i>L. MONOCYTOGENES</i> INFektionsDOSEN.....	66
TABELLE 4.1: DIFFERENTIELL IN IFN β + pDCs EXPRIEMIERT E GENE MIT RELEVANZ FÜR CHEMOTAXIS UND ZELLAKTIVIERUNG.....	96
TABELLE 7.1: GEKÜRZTE ÜBERSICHT DIFFERENTIELL REGULIERTER GENE.....	123

Abkürzungsverzeichnis

-	negativ(e)	ko	knock out
+	positiv(e)	LD ₅₀	50%ige letale Dosis
Abb.	Abbildung	LN	Lymphknoten
AK	Antikörper	LPS	Lipopolysaccharid
APC	Antigen präsentierende Zelle	LSM	Laser Scanning Mikroskop
ATP	Adenosintriphosphat	M	Molar
BMDCs	aus Knochenmark gereifte dendritische Zellen	MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
BMDMs	aus Knochenmark gereifte Makrophagen	min	Minute(n)
bp	Basenpaar(e)	mLN	mesenteriale(r) Lymphknoten
BSA	Rinderserumalbumin	MLR	Gemischte Lymphozytenreaktion
bzw.	beziehungsweise	MOI	Multiplizität der Infektion
CD	Cluster of Differentiation	mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
cDC	konventionelle Dendritische Zelle	MZ	Marginalzone
cDNA	komplementäre DNA	NS	Nukleinsäure
CFU	Kolonie bildende Einheit	ODN	Oligonukleotide
Cy	Cyanin	p.i.	nach Infektion (post infectionem)
d	Tag	PAMP	Pathogen associated molecular pattern
DAPI	4',6'-Diamidin-2-phenylindol	PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
DC	Dendritische Zelle	PCR	Polymerase Kettenreaktion
DEPC	Diethylpyrocarbonat	pDC	plasmazytoide Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid	PE	Phycoerythrin
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein Complex
dNTP	Desoxyribonukleotide	PFA	Paraformaldehyd
DOTAP	N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniummethylsulfate	poly(I:C)	Polyriboinosinsäure-Polyribocytidylsäure
ds	doppelsträngig(e)	RG	Reaktionsgefäß (Eppendorf)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	PRR	Pattern recognition receptor
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure	RNA	Ribosenukleinsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	rpm	Umdrehung pro Minute
EtOH	Ethanol	RT	Raumtemperatur
FACS	fluorescent activated cell sorting (Durchflusszytometrie)	s.	siehe
Fc	Immunoglobulin-Fc Teil	SA	Streptavidin
FCS	Fötale Kälberserum	SDS	Sodium-Dodecylsulfat
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	ss	einzelsträngig(e)
FLT3L	FMS-like tyrosine kinase 3 ligand	Tip-DC	TNF und iNOS produzierende DC
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein	TLR	Toll-like Receptor
GMCSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor	TNF	Tumor Nekrose Faktor
GTP	Guanosintriphosphat	ÜN	über Nacht
h	Stunde(n)	v/v	Volumen/Volumen
H ₂ O	steriles Wasser	vgl.	vergleiche
i.p.	intraperitoneal	w/v	Gewicht/Volumen
i.v.	intravenös	RT-PCR	Reverse Transkription und PCR
IFN	Interferon	w/w	Gewicht/Gewicht
Ig	Immunoglobulin	wt	Wildtyp
IL	Interleukin	YFP	Gelb-fluoreszierendes Protein
iNOS	inducible nitric oxide synthase	β-ME	β-Mercaptoethanol
int	intermediär		
kb	Kilobasenpaare		

1 Einleitung

1.1 Überblick über das Immunsystem

Das Immunsystem erfüllt in höheren Organismen eine duale Funktion. Zum einen verhindert es das Eindringen und Einnisten von Krankheitserregern in den Körper und zum anderen bekämpft es etablierte Infektionen und erzeugt einen Schutz (Immunität) bei wiederholtem Kontakt mit bereits erfolgreich bekämpften Pathogenen. Es können zwei miteinander eng verflochtene Arme im Immunsystem unterschieden werden. Die stammesgeschichtlich sehr alte angeborene oder auch native „innate“ Immunität ist in gesunden Individuen stets vorhanden, bekämpft detektierte Pathogene unmittelbar und verhindert meist das Eindringen von Pathogenen in Gewebe. Der hochentwickelte adaptive (erworbene) Arm des Immunsystems ist in allen Kiefermäulern (Gnathostomata) ausgebildet und bekämpft durch klonale Expansion von spezifisch auf das jeweilige Pathogen ausgerichteten Effektorzellen Erreger, die der nativen Immunantwort widerstehen konnten. Allerdings benötigt das adaptive Immunsystem 4-7 Tage um eine volle Funktionalität zu entwickeln.

Zu den Bestandteilen des angeborenen Immunsystems gehören physiologische Barrieren wie Epithelgewebe, zahlreiche Plasmaproteine, unter anderen die des Komplementsystems, und auch zelluläre Komponenten wie Makrophagen, Granulozyten, Dendritische Zellen (DCs) und Natürliche Killer (NK)-Zellen, sowie die von ihnen sezernierten Botenstoffe (Zytokine). Das adaptive Immunsystem besteht aus T Lymphozyten (T-Zellen) und B-Lymphozyten (B-Zellen). T-Zellen vermitteln die zelluläre Immunantwort gegenüber intrazellulären Pathogenen und unterstützen B-Zellen, die durch die Sezernierung von antigenspezifischen Antikörpern extrazelluläre Mikroben neutralisieren und die humorale Immunität induzieren. Antigenpräsentierenden Zellen (APCs) sind essentiell für die Aktivierung naiver Lymphozyten und bilden die Schnittstelle zwischen dem nativen und adaptiven Immunsystem. Dabei gewährleistet die spezielle Organisation der sekundären lymphatischen Organe eine räumliche Konzentrierung von APCs und Lymphozyten, so dass Zell-Zell-Interaktionen optimal ablaufen und zu einer adaptiven Immunantwort führen können (Janeway *et al.*, 2005; Abbas und Lichtman, 2004).

Die Milz ist das größte sekundäre lymphatische Organ und besteht aus zwei funktional und morphologisch distinkten Bereichen: der roten und der weißen Pulpa. Die rote Pulpa ist ein effizienter Blutfilter, der seneszente Erythrozyten entfernt und Eisen recycelt. Daneben halten sich dort Antikörper produzierende B-Zellen (Plasmazellen) auf. Die weiße Pulpa der Milz besteht aus der B-Zell und der T-Zell-Zone. Zusammen mit der zwischen roter und weißer Pulpa lokalisierten Marginalzone werden dort Pathogene im Blut effizient erkannt und führen zur Induktion einer Immunantwort (Cesta, 2006; Mebius und Kraal, 2005); (Abb. 1.1).

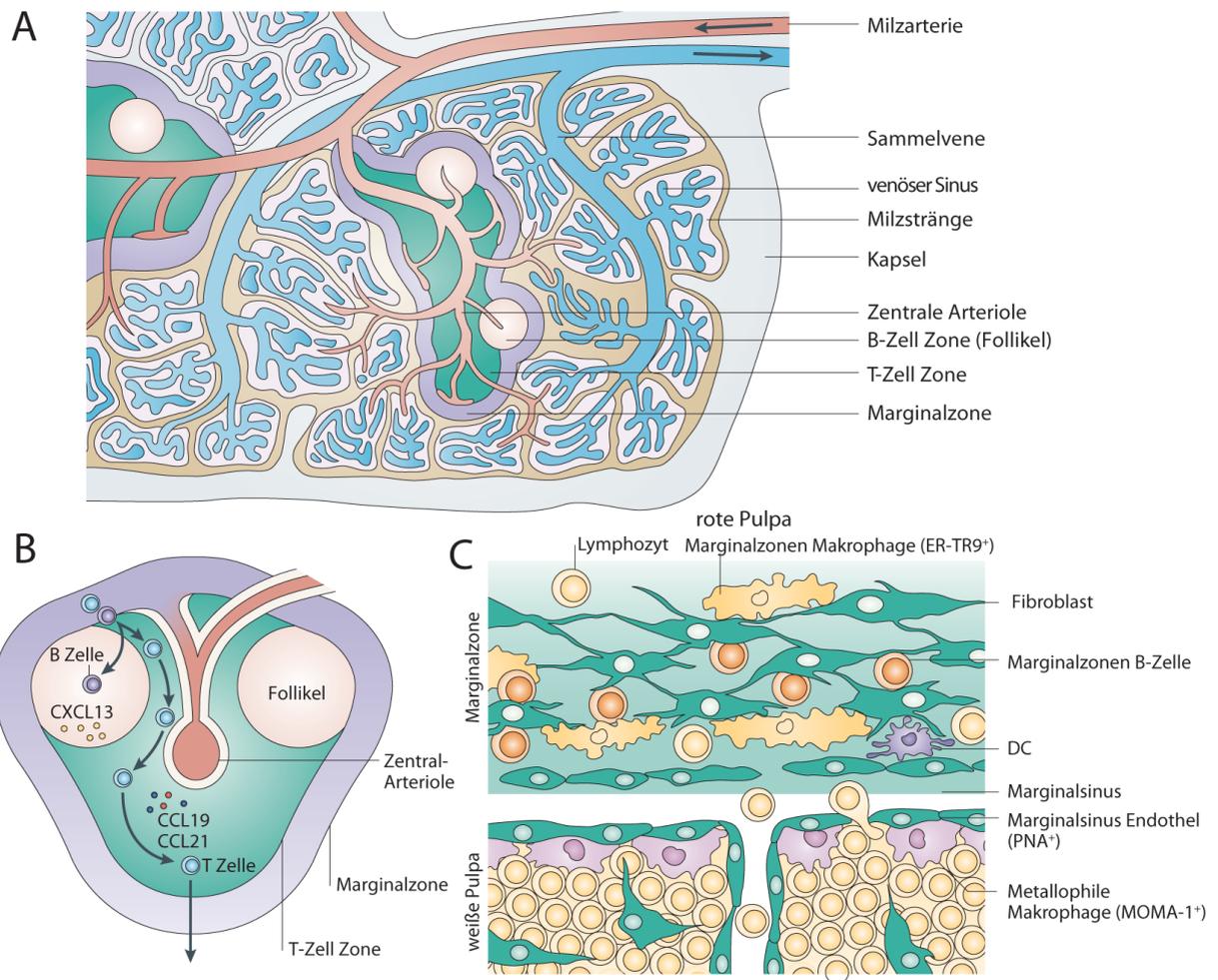


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Milz

[A] Die Milzarterie verzweigt sich in die von der weißen Pulpa ummantelten Zentralarteriolen. Die weiße Pulpa besteht aus der T-Zell Zone (oder PALS: periarterielle lymphatische Scheide), Arteriolen und B-Zell Follikeln (B-Zell Zone). Das Blut, der in den Milzsträngen der roten Pulpa endenden Arteriolen, fließt schließlich über die venösen Sinus in die Milzvene. [B] Lymphozyten migrieren ausgehend von der Marginalzone einem Chemokingradienten folgend in die B-Zell bzw. T-Zell Zonen. [C] Mikroarchitektur der Marginalzone. Neben residenten Marginalzonen B-Zellen und Makrophagen bewegen sich zahlreiche Lymphozyten und DCs durch den Blutfluss Richtung rote Pulpa. Lymphozyten und DCs gelangen nach Durchwandern des Marginalsinus Endothels in die weiße Pulpa. (Abgeändert nach Mebius *et al.*, 2005).

Lymphknoten (LN) sind hochgradig organisierte lymphatische Organe, die die Lymphe immunologisch überwachen. Die von den Geweben drainierte Lympheflüssigkeit beinhaltet auch Antigene von infizierten Geweben, die durch APCs in den LN als mikrobielle Bestandteile erkannt werden können. Auf diese Weise kann eine Immunantwort gegen Mikroben initiiert werden, die über Epithelien eindringen (Jane-way *et al.*, 2005; Abbas und Lichtman, 2004; von Andrian und Mempel, 2003); (Abb. 1.2).

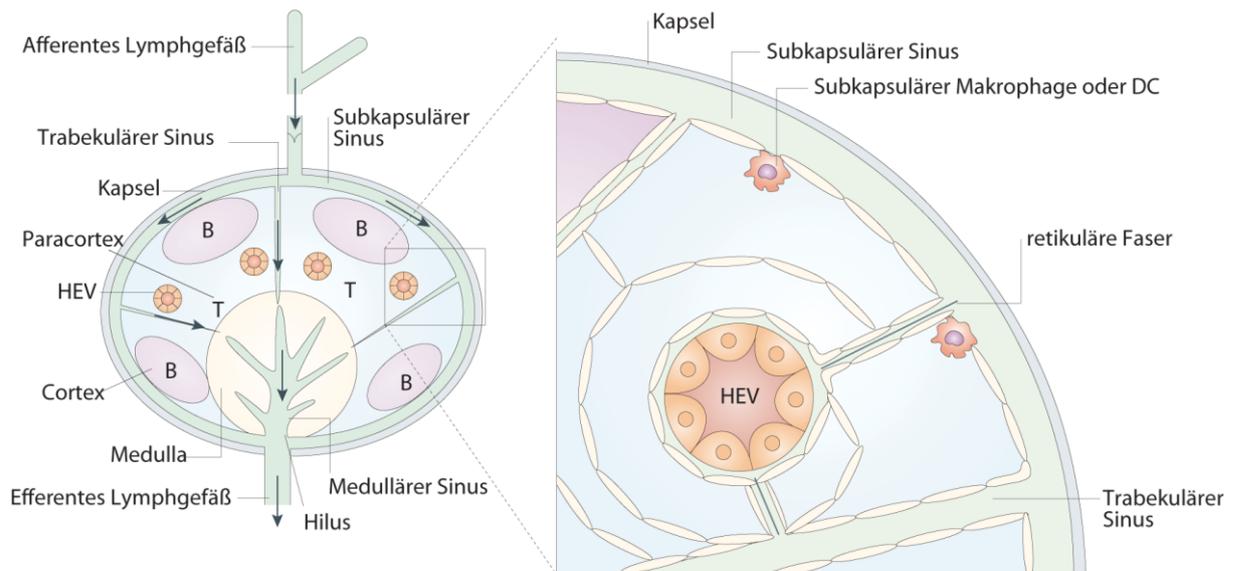


Abb. 1.2: Mikroarchitektur eines Lymphknotens (LN)

LN bestehen aus einer inneren Medulla und den äußeren Cortex- (B-Zell Zone) bzw. Paracortex- (T-Zell Zone) Bereichen. Den Körper drainierende Lymphe inklusive Antigen transportierender Phagozyten (DCs, Makrophagen) tritt über afferente Lymphgefäße in den subkapsulären Sinus in den LN ein (Pfeile). Von dort durchströmt die Lymphe das Sinussystem und wird schließlich über den Hilus aus dem LN abgeleitet. Naïve Lymphozyten migrieren aus dem Blut über spezielle hochendotheliale Venuolen (HEV) in den LN und verlassen ihn ebenfalls über efferente Lymphgefäße (verändert nach von Andrain et Mempel, 2003).

In dieser Arbeit werden Milz und LN als wichtige Aufenthaltsorte $\text{IFN}\beta$ produzierender myeloider Zellen identifiziert und die genaue Lokalisation der $\text{IFN}\beta$ exprimierenden Zellen innerhalb der Organmikroarchitektur charakterisiert.

Die während der frühen Phase der angeborenen Immunantwort von Phagozyten und APCs sezernierten Zytokine beeinflussen den weiteren Verlauf der initiierten adaptiven Immunantwort entscheidend und tragen dazu bei, dass eine speziell auf das jeweilige Pathogen abgestimmte Reaktion erfolgt. APCs präsentieren den T Zellen Antigene stets über die entsprechenden Proteine der Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC). Eine Aktivierung der T-Zellen geschieht aber nur, wenn das Antigen im Kontext einer mikrobiellen Gefahr erkannt wird, z.B. über Aktivierung von intra- und extrazellulären Rezeptoren, die spezifische und nicht veränderbare Charakteristika von Pathogenen, sogenannte PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns), erkennen. Man bezeichnet diese Rezeptoren als Mustererkennungs-Rezeptoren (Pattern Recognition Receptors, PRRs). Daraufhin exprimieren APCs kostimulatorische Proteine auf ihrer Oberfläche und beginnen Chemokine und inflammatorische Zytokine zu sezernieren. Rekrutierte antigenspezifische naïve CD4^+ T-Zellen bekommen das Antigen im Kontext von MHC Klasse II präsentiert und differenzieren in Abhängigkeit des Zytokinmilieus zu T-Helferzellen des Typs 1 ($\text{T}_{\text{H}1}$) oder zu $\text{T}_{\text{H}2}$ -Zellen. Während $\text{T}_{\text{H}1}$ -Zellen wichtig für die Etablierung einer adaptiven Immunantwort nach viralen und bakteriellen Infektionen sind, spielen $\text{T}_{\text{H}2}$ -Zellen bei der Bekämpfung von Helminthen-Infektionen eine Rolle. Durch Chemokine rekrutierte antigenspezifische naïve CD8^+ T-Zellen werden

durch Antigen im Kontext von MHC Klasse I, der Expression von Kostimulatoren durch APCs sowie IL-2 von T_H1 Zellen aktiviert. Die aktivierten antigenspezifischen T-Zell Klone proliferieren in einem als klonale Expansion bezeichneten Prozess sehr stark und bekämpfen effektiv infizierte Zellen (Abbas und Lichtman, 2004; Janeway *et al.*, 2005; Kurts *et al.*, 2010).

1.2 Monozyten und Dendritische Zellen

Sowohl Monozyten als auch DCs leiten sich von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen (HSC) ab. HSC differenzieren zunächst jedoch in die Vorläuferzellen der myeloiden (MP) und lymphoiden (LP) Zellen, wobei sich aus letzterer im Wesentlichen T-, B- und NK-Zellen ableiten. Aus der myeloiden Vorläuferzelle entwickeln sich über den Makrophagen und DC Vorläufer (MDP) schließlich Monozyten und Dendritische Zellen (Abb. 1.3)

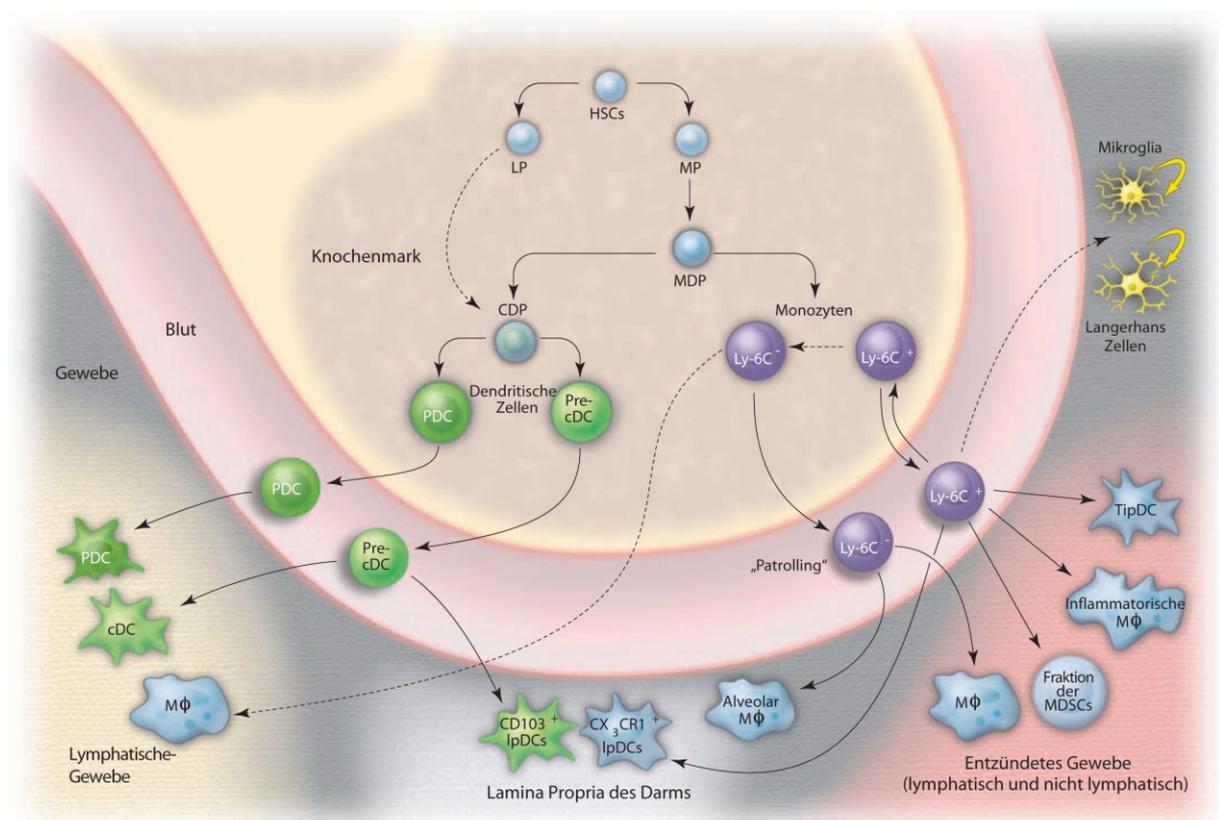


Abb. 1.3: Differenzierung von DCs, Monozyten und Makrophagen in der Maus
Gezeigt sind die Entwicklungswege und -Orte verschiedener Typen von DCs, Monozyten und Makrophagen. Langerhans-Zellen sind migratorische DCs in der Epidermis der Haut (angepasst aus Geissmann *et al.*, 2010).

Monozyten besitzen vielfältige Aufgaben im stationären Zustand als auch im immunologischen Kontext. Sie sind in die Beseitigung von apoptotischen Zellen und toxischen Komponenten involviert und sind

wichtige Hilfszellen im Verknüpfen von Entzündungsreaktionen des angeborenen Immunsystems mit der adaptiven Immunantwort. Hierzu exprimieren sie ein großes Repertoire an PRRs und können potente antimikrobielle Effektormechanismen aktivieren. Monozyten stellen ein Reservoir an Vorläuferzellen zur Erneuerung von Makrophagen in verschiedenen Geweben des Organismus und DCs zur Verfügung und differenzieren insbesondere bei Infektionsreaktionen zu inflammatorischen Makrophagen und DCs.

Im murinen System können zwei Monozyten-Arten unterschieden werden: Ly6C⁺ und Ly6C⁻ Monozyten. Ly6C⁺ inflammatorische Monozyten exprimieren den Chemokinrezeptor CCR2 und das Glykosyl-Phosphatidylinositol-Anker Glykoprotein Ly6C in hohem Maße auf ihrer Zelloberfläche, den Chemokinrezeptor CX3CR1 dagegen nur sehr schwach, so dass sich ihr Phänotyp als Ly6C⁺ CCR2⁺ CX3CR1^{low} (kurz: Ly6C⁺) kennzeichnen lässt. In Entzündungsreaktionen emigrieren Ly6C⁺ Monozyten CCR2 abhängig aus dem Knochenmark und werden zu den Entzündungsherden rekrutiert. Dort differenzieren sie zu inflammatorischen Makrophagen bzw. DCs und sekretieren proinflammatorische Zytokine sowie reaktive Stoffwechselintermediate.

Ly6C⁻ (CCR2⁻ CX3CR1⁺) Monozyten patrouillieren konstitutiv entlang luminaler Seiten von Endothelgeweben und Blutgefäßen und reagieren auf Verletzungen oder Infektionen in Geweben oder dem Intra-peritonealraum. Dort können sie je nach Situation rasch proinflammatorische Zytokine wie den Tumor Nekrose Faktor (TNF) sezernieren oder zu bestimmten Makrophagen differenzieren (Auffray et al., 2009b; Geissmann et al., 2010).

DCs sind wie auch Monozyten eine heterogene Zellklasse. Obwohl alle DC Subtypen die Fähigkeit der Antigenaufnahme, -prozessierung und -präsentation an naive T-Zellen besitzen, unterscheiden sich die einzelnen DC Typen deutlich in Lokalisation, Aktivierbarkeit und immunologischer Funktion. DCs werden grob in plasmazytoide DCs (pDCs) und konventionelle DCs (cDCs), die weiter in migratorische und residente DCs differenzieren können, eingeteilt. Zu den migratorischen DCs gehören die Langerhans-Zellen der Haut und der Epithelien des Darmes, der Atemwege und des Fortpflanzungstraktes. Diese patrouillieren in den Geweben und migrieren nach Detektion von PAMPs über die Lymphe in drainierende Lymphknoten, wo sie eine Immunantwort induzieren.

Residente cDCs überwachen lokal die lymphatischen Organe selbst und können an Hand der Expression von CD8 α (und CD11b) weiter unterschieden werden. CD8 α ⁺ (CD11b⁻) cDCs befinden sich hauptsächlich in den T-Zell Zonen lymphatischer Organe, während sich die CD8 α ⁻ (CD11b⁺) cDCs an den Antigen-Eintrittspforten in der Marginalzone bzw. dem subkapsulären Sinus der Milz bzw. der LN positionieren. Weiter unterscheiden sich CD8 α ⁺ und CD8 α ⁻ cDCs auch in ihrer Fähigkeit, bestimmte T-Zellen zu aktivieren. CD8 α ⁺ cDCs sind aufgrund ihres Potentials, extrazelluläres (infektiöses) Material via

MHC Klasse I an CD8⁺ T-Zellen kreuz zu präsentieren, für die Induktion einer antiviralen zytotoxischen T-Zell Antwort notwendig. CD8 α ⁻ cDCs präsentieren dagegen hauptsächlich über MHC Klasse II an CD4⁺ T-Zellen und sind deswegen für eine Immunantwort gegen extrazelluläre Pathogene wichtig (Dudziak *et al.*, 2007; Lopez-Bravo und Ardavin, 2008; Shortman und Naik, 2007).

pDCs sind auch als natürliche bzw. professionelle Interferon (IFN) produzierende Zellen (IPC) bekannt, da sie nach Erkennung von Viren oder anderer mikrobieller Infektionen große Mengen an Typ I Interferonen sekretieren. Hierdurch können pDCs das angeborene und adaptive Immunsystem aktivieren sowie einen antiviralen Zustand induzieren. Durch Hochregulation von MHC Proteinen und kostimulatorischen Proteinen agieren pDCs als Aktivatoren naiver T-Zellen. In dieser Eigenschaft sind sie jedoch cDCs deutlich unterlegen. In der Milz sind pDCs in der T-Zell Zone sowie verstreut in der Marginalzone und der roten Pulpa zu finden. Ihre Stimulation induziert eine Clusterbildung von pDCs entweder in der Marginalzone oder der T-Zell Zone der Milz. pDCs können durch die Expression von Ly6C, B220 und Siglec-H bei intermediärer Expression von CD11c identifiziert werden. Daneben kann der Antikörper mPDCA-1 genutzt werden, der selektiv pDCs erkennt (Liu, 2005; Fitzgerald-Bocarsly *et al.*, 2008; Colonna *et al.*, 2004). Die Frage, ob neben pDCs noch weitere myeloide Zelltypen in physiologisch relevanten Situationen zur Initiation einer Typ I IFN Antwort fähig sind, konnte ohne effektive Typ I IFN Reportermausmodelle nicht geklärt werden. Ein Befund aus jüngerer Vergangenheit zeigt aber, dass selbst in bestimmten Virusinfektionen mit cDCs und Makrophagen auch andere Zellen als pDCs für die *in vivo* Typ I IFN Expression verantwortlich sind (Kumagai *et al.*, 2007). Ob in Abhängigkeit des gewählten Infektionsmodells oder der Applikationsroute des Stimulus weitere Zelltypen Typ I Interferone produzieren können ist ungeklärt, aber gerade im Hinblick auf die Entwicklung wirkungsvoller Adjuvantien für Impfstoffe sehr interessant.

1.3 Interferone

1.3.1 Klasseneinteilung

Interferone gehören zu einer Familie strukturell verwandter Zytokine, die ausschließlich in Wirbeltieren zu finden sind. Sie sind pleiotrope Zytokine, die über ihr Hauptcharakteristikum, der antiviralen Aktivität hinaus vielfältige weitere Funktionen in Immunmodulation, Tumorabwehr und Organogenese tragen. Interferone werden in drei Klassen eingeteilt: Typ I, Typ II und Typ III Interferone. Typ I Interferone beinhalten neben multiplen IFN α s (13 im Menschen, 14 in der Maus), ein IFN β , sowie die Interferone ω , ϵ , κ , δ (nur in Schweinen), τ (nur in Huftieren) und ζ (Limitin, nur in der Maus). IFN γ stellt das einzige Typ II Interferon dar und wird von aktivierten T- und NK-Zellen, nicht jedoch von virusinfizierten Zellen ex-

primiert. Es ist kritisch für die Aktivierung von antimikrobiellen Effektormechanismen in Makrophagen. $\text{IFN}\gamma$ induziert in stärkerem Umfang als Typ I Interferone Gene mit antibakterieller Wirkung. Typ III Interferone beinhalten die $\text{IFN}\lambda$ s, die auch als IL-28 und IL-29 bezeichnet werden. Ähnlich wie Typ I Interferone werden sie nach Erkennen einer viralen Infektion exprimiert und vermitteln über die Induktion von Interferon stimulierten Genen (ISG) antivirale Eigenschaften. Sie unterscheiden sich aber hinsichtlich Struktur und genutztem Rezeptorkomplex von Typ I Interferonen (Takaoka und Yanai, 2006).

1.3.2 Typ I Interferone in viralen und nicht viralen Infektionen

Die Typ I Interferone, die sowohl in viralen als auch in nicht viralen Infektionen die wichtigsten immunologischen Funktionen ausüben, sind die zahlreichen $\text{IFN}\alpha$ s sowie $\text{IFN}\beta$. $\text{IFN}\alpha$ s und $\text{IFN}\beta$ sind kleine Proteine aus 165-166 Aminosäuren, die als Monomere bioaktiv sind und an einen gemeinsamen heterodimeren $\text{IFN}\alpha/\text{IFN}\beta$ Rezeptorkomplex (IFNAR) binden. Welche Zell(sub)typen genau unter verschiedenen *in vivo* Stimulations- und Infektionsbedingungen für die Initiation der Typ I IFN Antwort verantwortlich sind und wo diese Zellen im Organismus lokalisieren, war zu Beginn der vorliegenden Arbeit noch völlig ungeklärt.

Typ I Interferone modulieren zahlreiche Aspekte der Immunabwehr. Sie aktivieren NK- und T-Zellen und induzieren eine Maturierung von DCs und B-Zellen, wodurch sie den nativen mit dem adaptiven Arm des Immunsystems verknüpfen. Darüber hinaus spielen Typ I Interferone eine essentielle Rolle in der Bekämpfung von Tumorzellen (Takaoka und Yanai, 2006; Bogdan *et al.*, 2004; Decker *et al.*, 2005). Ihr namensgebendes Charakteristikum ist jedoch die Fähigkeit, mit der Replikation von Viren zu interferieren, indem sie nach Erkennung von viralen Infektionen einen antiviralen Zellzustand aktivieren. Hierbei werden nach Binden der Interferone an den IFNAR über 300 Interferon stimulierte Gene (ISG) exprimiert. Die meisten induzierten Proteine sind dabei PRRs oder sind an der IFN Signalmodulation bzw. der Errichtung einer positiven Rückkopplungsschleife beteiligt, einige der ISG besitzen jedoch direkte oder indirekte virostatistische Wirkung.

Typ I IFN induzierte Mx GTPasen binden an virale Nukleocapside oder andere virale Komponenten und neutralisieren sie somit. Die 2'5'Oligoadenylatsynthetase polymerisiert ATP zu Adenosinoligomeren. Diese Oligomere aktivieren die Enzymtätigkeit der RNaseL, die durch Degradation von RNA die virale Replikation unterdrückt und durch die Degradationsprodukte spezifische PRRs aktiviert. Ein weiteres wichtiges Effektorprotein stellt die Proteinkinase PKR dar. Diese phosphoryliert den eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor eIF2 α und führt somit zu einem Stopp der Proteintranslationsmaschinerie

(Sadler und Williams, 2008). Aufgrund der pleiotropen immunmodulatorischen Funktionen dienen Typ I Interferone als wertvolle Therapeutika bei schweren chronischen Virusinfektionen und bei bestimmten Krebsarten. Daneben erfolgt die palliative Behandlung von Multipler Sklerose durch regelmäßige Applikation von rekombinantem IFN β (Cooksley, 2004; Goldstein und Laszlo, 1988; Paolicelli *et al.*, 2009). Um nebenwirkungsarme Therapien neu entwickeln zu können, ist eine exakte Kenntnis der Typ I IFN produzierenden Zellen und der Auswirkung der Zytokinexpression auf den Organismus essentiell. Bisher war es lediglich möglich über globale Messungen auf Protein- oder mRNA Ebene die Produktion der Typ I Interferone zu betrachten. Ein zelltypspezifisches Stimulationsprofil, das zur Initiation einer Typ I IFN Antwort führt, konnte daher auf zellulärer Ebene *in vitro* und *in vivo* nicht erstellt werden.

Während Typ I Interferone essentiell für die immunologische Kontrolle viraler Infektionen sind, ist ihre Wirkung in nicht viralen Infektionen sehr heterogen. In Infektionsmodellen mit den Bakterien *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus anthracis*, *Escherichia coli*, *Legionella pneumophila*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* sowie den Chlamyphilaspezies *C. pneumoniae*, *C. trachomatis* und *C. psittaci* ist die Induktion von Typ I Interferonen für den Wirt von Vorteil (Decker *et al.*, 2005; Mancuso *et al.*, 2007). Dem gegenüber steht eine Typ I IFN vermittelte Steigerung der Suszeptibilität in Infektionen mit *Listeria monocytogenes*, *C. muridarum* und gegenüber eines LPS induzierten septischen Schocks (Decker *et al.*, 2005; Qiu *et al.*, 2008). In mykobakteriellen Infektionen ist die Datenlage kontrovers. So zeigte exogen appliziertes Typ I IFN sowohl protektive als auch infektionsfördernde Wirkungen. Darüber hinaus konnte in IFNAR Deletionsmäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren kein Unterschied in der Resistenz festgestellt werden (Turner und Orme, 2004; Denis, 1991; Manca *et al.*, 2001).

Ein Erklärungsansatz für die protektive Wirkung von Typ I Interferonen in bestimmten bakteriellen Infektionen ist die Induktion der Expression von IFN γ durch NK- und T-Helferzellen, wodurch eine starke Aktivierung antimikrobieller Effektormechanismen in Makrophagen erfolgt. Durch eine Erhöhung der Zellsensitivität gegenüber apoptotischer Stimuli kann einerseits zwar eine Ausbreitung der Infektion verhindert werden, andererseits können aber auch wertvolle Effektorzellen wie Makrophagen depletiert werden. Diese fehlen zur Eindämmung der Infektion und bedingen dadurch einen akutereren Krankheitsverlauf (Decker *et al.*, 2005). Letzteres ist daher eine Erklärungsmöglichkeit für eine Typ I IFN bedingte erhöhte Suszeptibilität des Wirtes in nicht viralen Infektionen (Abb. 1.4).

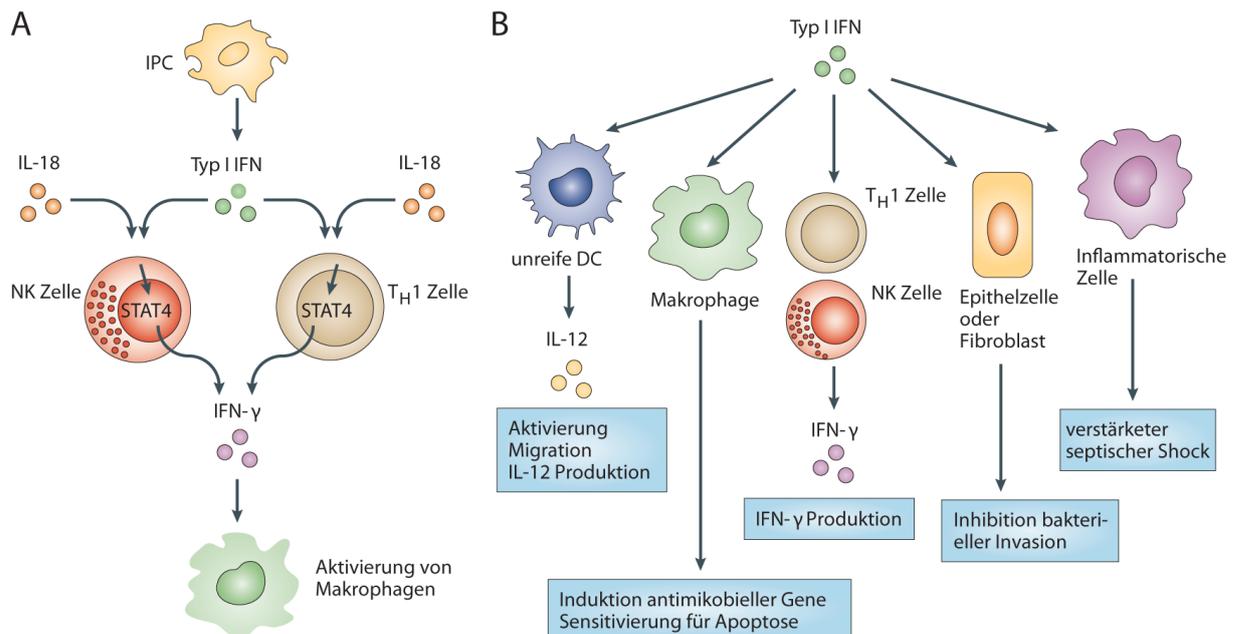


Abb. 1.4: Effekte von Typ I Interferonen in der bakteriellen Immunabwehr

[A] Freigesetztes Typ I IFN aktiviert STAT4, induziert zusammen mit IL-18 die Expression von IFN γ und führt zu einer Aktivierung antibakterieller Mechanismen in Makrophagen. **[B]** Zusammenfassung der direkten Typ I IFN induzierten Effekte. Angepasst aus Decker *et al.*, 2005.

Bei Infektionen mit Protozoen ist die Wirkung von Typ I IFN ebenfalls heterogen. In *Leishmania major* Infektionsmodellen wurden vor- und nachteilige Folgen einer Typ I IFN Induktion beschrieben, und auch die von *Trypanosoma cruzi* induzierte frühe Typ I IFN Antwort scheint keine eindeutige Auswirkung auf den Wirt zu besitzen. Gleichsam spielen auch in Pilz- und Helminthen-Infektionen Typ I Interferone eine ambivalente Rolle. Während der Effekt der IFN-Induktion in Pilzinfektionen je nach Erreger unterschiedlich ausfällt, überwiegen in Infektionen mit Schistosomen und Nematoden die nachteiligen Effekte (Bogdan *et al.*, 2004).

1.3.3 PRRs und Typ I IFN Induktion

1.3.3.1 PRRs

Das angeborene Immunsystem erkennt Pathogene und distinkte mikrobielle Bestandteile über eine begrenzte Anzahl Keimbahn-kodierter PRRs, die von den Zellen des Organismus konstitutiv und unabhängig von Vorinfektionen und vom immunologischen Gedächtnis exprimiert werden. PRRs detektieren jeweils ein gewisses Repertoire an Liganden (PAMPs), die für die Mikroben essentiell und deshalb nur schwer veränderbar sind. Da diese PAMPs normalerweise nicht in den PRR überwachten Kompartimenten eines gesunden Organismus vorhanden sind, diskriminieren PRRs hierüber „selbst“ und „fremd“ (Akira *et al.*, 2006). Neben den auf der Zelloberfläche auf Makrophagen, NK- und Endothelzellen expri-

mierten Scavenger-, β -Glukan- und Mannose-Rezeptoren, die eine Rolle in der Endozytose spielen, aber auch Zymosan bzw. Mannoseglykokonjugate erkennen (Gordon, 2002), sind in erster Linie Mitglieder der TLR (Toll-like receptors) Familie und zytoplasmatische PRRs an der Erkennung von PAMPs und der Induktion einer nativen Immunantwort beteiligt (Tabelle 1.1).

PRR	Ligand	Herkunft	Synthetische Agonisten	Verteilung des PRR
TLR2	Peptidoglykane	Gram-positive Bakterien		Zelloberfläche
	Porine	<i>Neisseria</i>		
	Hämagglutinin	Masern Virus		
	Lipoarabinomannan	Mykobakterien		
	Phospholipomannan	<i>Candida albicans</i>		
	tGPI-Mutin	<i>Trypanosoma</i>		
TLR2/TLR1	Triacyl-Lipopeptide	Bakterien	Pam ₃ Cys-Ser-(Lys) ₄	
TLR6/TLR2	Diacyl-Lipopeptide	<i>Mycoplasma</i>		
	Lipoteichonsäure	Gruppe B <i>Streptococcus</i>	Pam ₂ Cys-Ser-(Lys) ₄	
	Zymosan	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
TLR4	LPS	Gram-negative Bakterien		
	Mannan	<i>Candida albicans</i>		
	Glykoinositolphospholipide	<i>Trypanosoma</i>		
	Hüllproteine	RS-Virus, MMT-Virus		
	HSP 60, HSP 70	Wirt		
	Fibrinogen	Wirt		
	Ni ²⁺ Verbindungen	Wirt		
TLR5	Flagellin	bakterielle Flagellen		
TLR11	Profilin-ähnliche Moleküle	<i>Toxoplasma gondii</i>		
TLR3	dsRNA	Viren	poly(I:C)	Intrazelluläre Kompartimente
TLR7 und TLR8	ssRNA	virale NS	Imidazoquinoline	
TLR9	unmethylierte CpG DNA Hämозoin	virale und bakterielle NS <i>Plasmodium</i>	CpG Oligonukleotide	
RIG-I	kurze dsRNA, 5'ppp RNA	virale NS	5'ppp-dsRNA	Zytoplasma
MDA-5	lange dsRNA	virale NS	poly(I:C)	
LRRFIP1	dsDNA, dsRNA	virale und bakterielle NS		
DAI	dsDNA	virale und bakterielle NS		
IFI16	dsDNA	virale und bakterielle NS		

Tabelle 1.1: Übersicht über wichtige PRR sowie deren Liganden und Agonisten
Angepasst und ergänzt nach Akira *et al.*, 2006.

TLRs sind Typ I Transmembran Glykoproteine, die über die zahlreichen LRR (leucine-rich repeats) Motive ihrer Ektodomäne PAMPs erkennen und über die intrazelluläre TIR (Toll IL-1 receptor) Domäne intrazelluläre Signalwege aktivieren. Bisher konnten 10 bzw. 12 funktionelle TLRs in der Maus bzw. dem Menschen identifiziert werden. Studien mit TLR defizienten Mauslinien belegen, dass jeder TLR distink-

te Eigenschaften hinsichtlich PAMP Erkennung und Immunantwort besitzt (Bowie und O'Neill, 2000; Kawai und Akira, 2010). Die Mitglieder der TLR Familie werden weiterhin in Abhängigkeit ihrer zellulären Lokalisation und jeweiligen PAMP Liganden in zwei Gruppen eingeteilt. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR11 sind auf der Zelloberfläche exprimiert und erkennen im Wesentlichen mikrobielle Membranbestandteile wie Lipide, Lipoproteine und Proteine. Die andere Gruppe beinhaltet TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9, die exklusiv in intrazellulären Zellkompartimenten wie dem Endoplasmatischen Retikulum (ER), Endosomen und Lysosomen exprimiert werden und mikrobielle Nukleinsäuren detektieren (Kawai und Akira, 2010).

Die zytoplasmatischen PRRs werden grob in die Klasse der NLRs (NOD (nucleotide-binding oligomerization domain) containing-like receptors) und der CARD (caspase-recruitment domain)-Helikasen (auch als retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors (RLRs) bezeichnet) eingeteilt (Takeuchi und Akira, 2009). Die Mitglieder der NLR Familie induzieren nach Erkennen von mikrobiellen Bestandteilen und Stressindikatoren wie ATP, Harnsäure-Kristallen und Membranpermeabilisierung eine Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β , induzieren aber bis auf NOD2 kein Typ I IFN (Fritz *et al.*, 2006; Takeuchi und Akira, 2009; Sabbah *et al.*, 2009). Die CARD-Helikasen RIG-I und MDA-5 (melanoma differentiation-associated gene 5) detektieren virale Nukleinsäuren im Zytoplasma und initiieren die Expression von Typ I IFN. Während MDA-5 lange doppelsträngige (ds)RNA sowie das synthetische Analogon poly(I:C) erkennt, ist RIG-I ein Sensor für kurze dsRNA und 5' Triphosphat einzelsträngige (ss)RNA. Da Wirtszellen keine dsRNA produzieren und eine modifizierte 5' Guanin-Cap mRNA bilden, können CARD-Helikasen effizient virale RNA erkennen (Takeuchi und Akira, 2009).

Neben den RLR existieren weitere zytoplasmatisch exprimierte Nukleinsäure-Sensoren, die dsDNA detektieren können, bislang aber nicht vollständig charakterisiert sind. Hierzu gehören AIM2, DAI, IFI16 und LRRFIP1. AIM2 (absent in melanoma 2) bindet dsDNA und führt zu einer Caspase-1 abhängigen Aktivierung von IL-1 β und IL-18. Der DNA abhängige Aktivator von IRFs (DNA depending activator of IRFs, DAI) bindet DNA in der Z-Konformation (linksgängig) und induziert die Expression von Typ I Interferonen (Takaoka *et al.*, 2007). Das LRR enthaltende Protein LRRFIP1 bindet sowohl dsDNA, als auch dsRNA und führt über eine Interaktion mit β -Catenin zur Expression von IFN β (Yang *et al.*, 2010). IFI16 ist ein dsDNA bindendes PYHIN Protein, welches nach Bindung von DNA in STING abhängiger Weise Typ I Interferone induziert (Unterholzner *et al.*, 2010). Darüber hinaus kann die zytosolische RNA Polymerase III AT-reiche dsDNA in AU-reiche 5' Triphosphat dsRNA konvertieren, die dann in Abhängigkeit von RIG-I zur Induktion von Typ I IFN führt (Hornung und Latz, 2010).

1.3.3.2 Induktion von Typ I Interferonen

Nach Erkennen von mikrobiellen Bestandteilen durch TLRs oder zytoplasmatische PRRs wird über intrazelluläre Signalkaskaden die Typ I IFN Expression induziert. Dabei erfolgt in einem ersten Schritt die Interaktion mit Adapterproteinen. Im TLR Signalweg wird dabei zwischen den TLRs unterschieden, die MyD88 (myeloid differentiation primary-response protein 88) als Adapterprotein nutzen und denen, die TRIF (TIR domain containing adapter protein inducing IFN β) rekrutieren. Bis auf TLR3 aktivieren alle TLRs den MyD88 abhängigen Signalweg, während TLR3 exklusiv und TLR4 kompartimentabhängig TRIF als Adapterprotein nutzen.

Im zytosolischen PRR Signalweg dient in erster Linie das in der äußeren mitochondrialen bzw. ER Membran lokalisierte Protein IPS-1 (interferon β promoter stimulator 1) bzw. STING (stimulator of IFN genes) als Adapterprotein. Bis auf den TLR7/TLR9 Signalweg in pDCs, der einige Besonderheiten aufweist, konvergieren die TLR- und CARD-Helikase Signalwege in der Aktivierung von TBK1 (TANK (TNF receptor associated factor (TRAF) family associated NF- κ B activator) binding kinase 1). TBK1 phosphoryliert die Transkriptionsfaktoren der IRF (interferon regulatory factor) Familie. Von entscheidender Bedeutung sind hier IRF3 und IRF7. IRF3 wird konstitutiv exprimiert und liegt in einer latenten Form im Zytosol vor. IRF7 wird dem hingegen nur in geringen Mengen exprimiert, wobei pDCs auch hier eine Ausnahme bilden. Die durch TBK1 phosphorylierten IRF3 und IRF7 Proteine bilden daraufhin Homo- und Heterodimere, translozieren in den Nukleus und induzieren dort die Initiation der Typ I IFN Antwort. Hierbei wird zunächst nur IFN β sowie IFN α 4 exprimiert. Unabhängig hiervon erfolgt über Aktivierung des MAPK- (mitogen activated protein kinase) und des NF- κ B Signalwegs eine Induktion von inflammatorischen Zytokinen (Akira *et al.*, 2006; Honda und Taniguchi, 2006; Kawai und Akira, 2010); (Abb. 1.5).

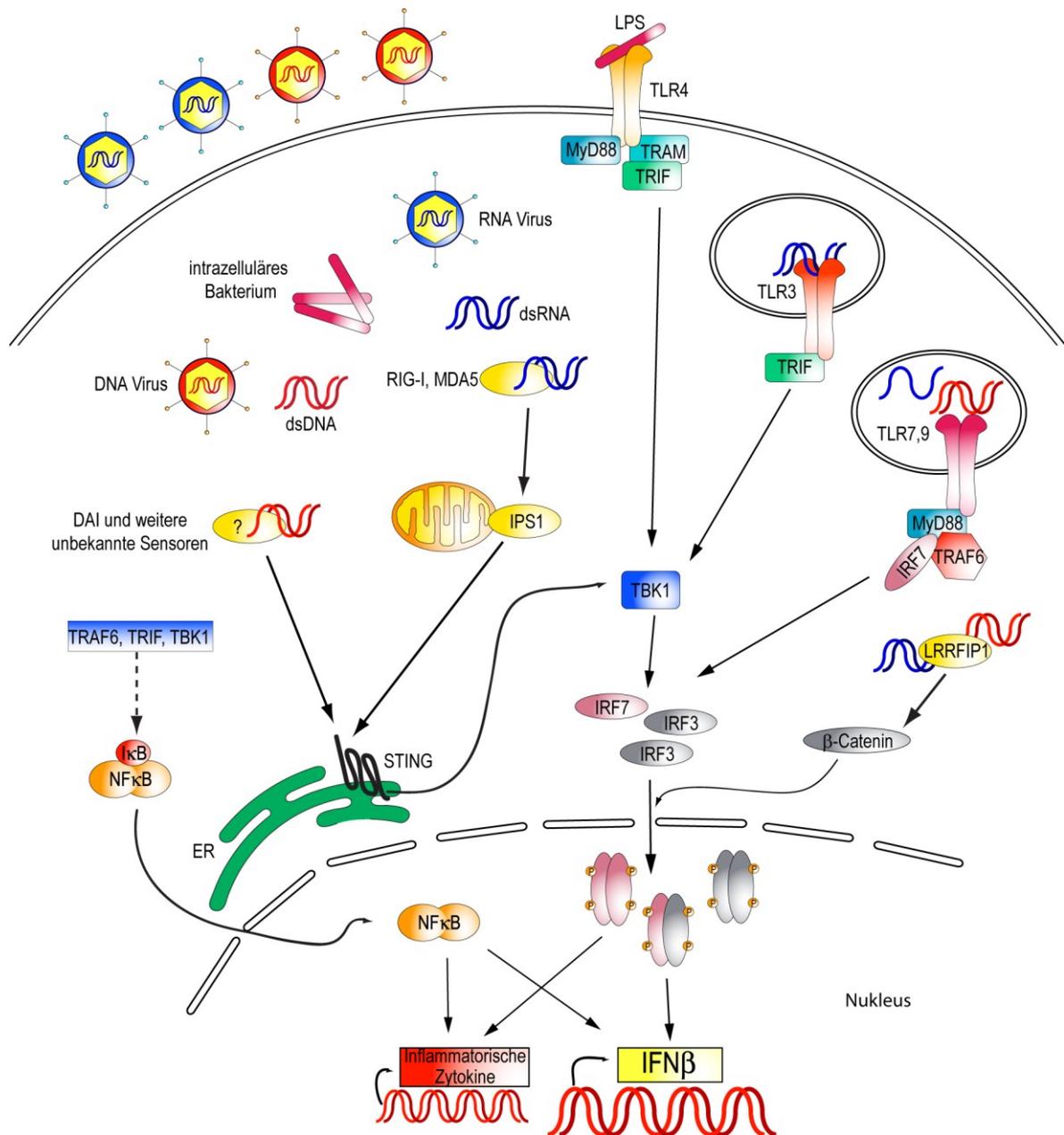


Abb. 1.5: Übersicht der PRR abhängigen frühen Induktion von IFN β

Die Signaltransduktionswege wurden vereinfacht dargestellt. Grafik angepasst nach Hornung et Latz, 2010; Honda et Taniguchi, 2006; Kawai et Akira, 2010 und Yang et al., 2010.

Initial sekretiertes IFN α 4 und IFN β bindet in auto- und parakriner Weise an den IFNAR Komplex und aktiviert dadurch eine positive Rückkopplungsschleife (Abb. 1.6). Hierbei phosphorylieren die Janus Kinase JAK1 und die Tyrosinkinase TYK2 die Transkriptionsfaktoren STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) 1 und STAT2. Die beiden phosphorylierten STAT Moleküle bilden Heterodimere und translozieren nach Rekrutierung von IRF9 als ISGF3 (interferon stimulated gene factor 3) in den Nucleus, wo er eine starke Expression von IRF7 induziert. IRF7 wird anschließend TBK1 abhängig phosphoryliert und es erfolgt über gebildete IRF7 Dimere eine Amplifikation der *Irf7* Transkription sowie die Transkription der bisher kaum exprimierten IFN α s (Honda et al., 2006; Platanius, 2005).

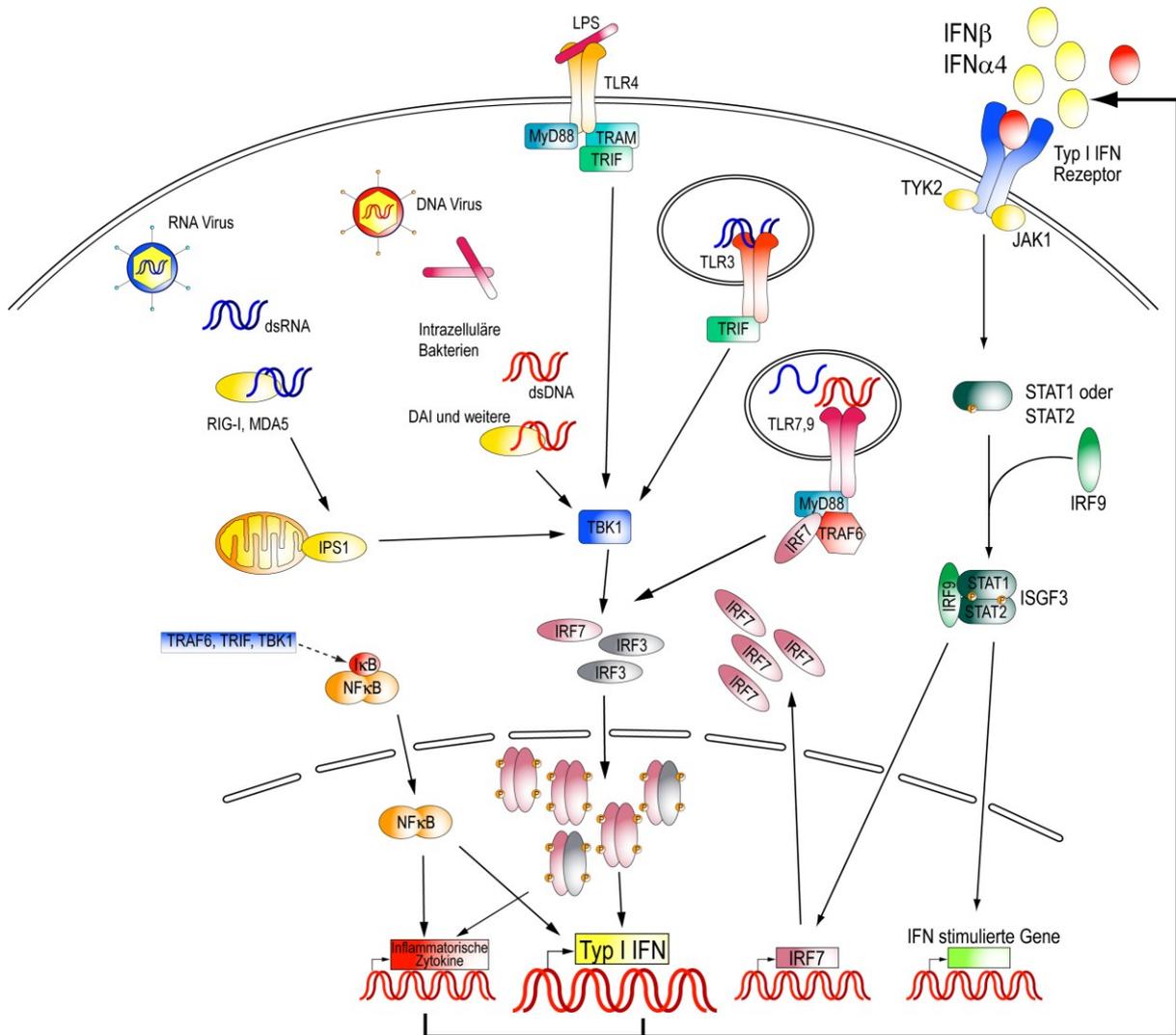


Abb. 1.6: Initial sekretiertes IFNβ induziert mittels positiver Rückkopplungsschleife alle Typ I Interferone
 Erstellt nach Abb. 1.5 ; Platanius, 2005 und Honda *et al.*, 2006.

Abweichend hiervon erfolgt in pDCs die massive Induktion einer Typ I IFN Antwort unabhängig von dem Rückkopplungsmechanismus. Ein Grund hierfür ist, dass in pDCs IRF7 bereits konstitutiv stark exprimiert vorliegt und so auch ohne Rückkopplungs-Schleife genügend IRF7 Dimere bereitgestellt werden können. Der Hauptunterschied von pDCs zu cDCs und Makrophagen besteht in der Sequestration von TLR7 und TLR9 Agonisten in distinkten zellulären Kompartimenten. pDCs halten CpG Oligonukleotide (ODNs) vom Typ A lange Zeit in den TLR7 und TLR9 tragenden endosomalen Kompartimenten zurück und ermöglichen hierdurch eine robuste Induktion von Typ I Interferonen. Im Gegensatz hierzu erfolgt in Makrophagen und cDCs eine rasche Lokalisation von A-Typ CpG ODNs in Lysosomen. Daher kann dort keine ausreichende Interaktion zwischen TLR9 und den CpG ODNs stattfinden und folglich auch keine potente Typ I IFN Antwort erfolgen. B-Typ CpG ODNs lokalisieren sowohl in pDCs, als auch in cDCs und Makrophagen in Lysosomen und induzieren weniger Typ I IFN. Eine Komplexierung der CpG

ODNs mit kationischen Liposomen forciert eine endosomale Lokalisation und kann somit eine starke Typ I IFN Antwort hervorrufen (Guiducci et al., 2006; Honda et al., 2005a; Honda und Taniguchi, 2006). Auf Grund der zentralen Bedeutung der initialen IFN β Expression für die subsequente kanonische und rückkopplungsbasierte Induktion der Gesamt Typ I IFN Antwort, stellt die Visualisierung der IFN β produzierenden Zellen die optimale Lösung zur Identifikation der die Typ I IFN Antwort initiiierenden Zellen dar.

1.3.3.3 Die Initiierung der *Ifnb* Transkription

Die Produktion von Typ I Interferonen ist vor allem auf Ebene der Gentranskription kontrolliert. Für eine effektive Initiierung der *Ifnb* Transkription ist eine koordinierte Aktivierung von *cis* regulatorischen Verstärkerelementen (*enhancern*) nötig, die die zusammenlaufenden Signale verschiedener Signalwege integrieren und prozessieren (Ptashne und Gann, 2002). Der *Ifnb enhancer* beinhaltet vier positive regulatorische Domänen (PRDs) (Kim und Maniatis, 1997). Nach einer viralen Infektion binden diese PRDs in einem kooperativen Prozess die Transkriptionsfaktoren der IRF-Familie (PRD I und III), NF- κ B (PRD II) und AP1 (PRD IV) (Gyory et al., 2004). Zusammen wird dieser Komplex als *Ifnb* Enhanceosom bezeichnet (Kim und Maniatis, 1997). Eine IFN β Expression kann daher nur durch komplexe Signale ausgelöst werden, die alle nötigen Transkriptionsfaktoren simultan induzieren, wie etwa eine Virusinfektion (Thanos und Maniatis, 1995; Munshi et al., 2001; Maniatis et al., 1998; Lomvardas und Thanos, 2002).

Ein Charakteristikum der IFN β Expression ist, dass selbst unter optimalen Stimulations- und Infektionsbedingungen nur eine Subpopulation der Zellen das Zytokin exprimiert (Senger et al., 2000; Hu et al., 2007). Für die IFN β -Expression konnte gezeigt werden, dass diese einer interchromosomalen Interaktion verschiedener Loci bedarf, die den limitierenden Transkriptionsfaktor NF- κ B binden. Dadurch wird die Assemblierung des *Ifnb* Enhanceosoms induziert und die *Ifnb* Transkription initiiert (Apostolou und Thanos, 2008). Ob weitere Unterschiede im Transkriptom zwischen den Zytokin exprimierenden- und nicht exprimierenden Zellen existieren, kann über eine globale Analyse der gesamten Zellpopulation nicht detailliert erfolgen. Hierzu müssen auf zellulärer Ebene die IFN β Produzenten identifiziert und von den restlichen Zellen durch FACS Sort Technologie diskriminiert werden. Die Gegenüberstellung von Transkriptionsprofilen IFN β^+ und IFN β^- Zellen in dieser Arbeit soll neue Erkenntnisse über die stochastische Typ I IFN Antwort zu Tage fördern.

1.4 *Listeria monocytogenes*

Ein etabliertes Infektionsmodell zum Studium der zellulären Immunantwort sowie der Wirts-Pathogen Interaktion ist die murine Listeriose (Hamon *et al.*, 2006). *L. monocytogenes* ist ein Gram-positives, stäbchenförmiges und fakultativ intrazellulär replizierendes bakterielles Pathogen, dessen Wirtsspektrum sich neben dem Menschen auch auf andere Säugetiere erstreckt (Sixl *et al.*, 1978; Jakowski und Wyand, 1971). Die Listeriose verläuft in erster Linie in immunkompromittierten Personen und älteren Menschen akut. Auch schwangere Frauen sind bedroht, da sich in Ihnen die Infektion auf den Fötus ausbreiten und zu schwerwiegenden Komplikationen führen kann (Gellin und Broome, 1989).

1.4.1 Der Infektionszyklus von *L. monocytogenes*

Der normale Infektionsweg ist die orale Aufnahme von mit *L. monocytogenes* kontaminierten Lebensmitteln. Nach Aufnahme der Bakterien erfolgt eine erste Infektion von Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes. Hierzu ist eine Interaktion von bakteriellem Internalin A (InIA) mit E-Cadherinen auf der Wirtszelloberfläche nötig. Die Internalisierung des Bakteriums in die Wirtszelle erfolgt schließlich über einen Clathrin vermittelten Zipper-Mechanismus (Hamon *et al.*, 2006). Aufgrund einer Punktmutation zwischen humanen und murinen E-Cadherinen sind Mäuse relativ resistent gegenüber einer oral induzierten Listerieninfektion (Lecuit *et al.*, 2001). Es werden daher in der Maus alternative systemische Infektionsrouten wie die intravenöse und intraperitoneale Inokulation bevorzugt verwendet. Die Bakterien durchbrechen nach oraler Aufnahme die epitheliale Zellschicht des Darmes, breiten sich über den Blutkreislauf im Organismus aus und befallen Zellen in Milz und Leber. In den infizierten Wirtszellen befindet sich das Bakterium zunächst in einem membranumschlossenen Phagosom. Durch Expression des Hämolytins Listeriolysin O (LLO) wird die Phagosomenmembran zerstört und die Listerien können in das Wirtszellzytoplasma eindringen. Nach der Flucht in das Wirtszellzytoplasma exprimieren die Listerien ActA auf ihrer Oberfläche. ActA polymerisiert Wirtszell-Aktin, wodurch die Bakterien in der Zelle motil werden und intrazellulär in andere Zellen vorstoßen können (Pamer, 2004).

1.4.2 Immunabwehr gegen *L. monocytogenes*

Essentiell für das Überleben des Wirts ist zu frühen Infektionszeitpunkten eine rasche Aktivierung der Zellen des angeborenen Immunsystems (Unanue, 1997). Hier spielen Makrophagen, NK-Zellen und neutrophile Zellen eine wichtige Rolle (Tripp *et al.*, 1993; Unanue, 1997; Yin und Ferguson, 2009). Infizierte Makrophagen sekretieren die Zytokine TNF sowie IL-12 und aktivieren bzw. steigern die IFN γ -Synthese von NK-Zellen (Havell, 1987; Hsieh *et al.*, 1993). IFN γ aktiviert und steigert weiterhin die bak-

teriziden Mechanismen von Makrophagen durch Produktion bakterizider freier Sauerstoffradikale und Stickstoffintermediate, wodurch es zu einem Abtöten der intrazellulären Bakterien kommt (Endres *et al.*, 1997; Shiloh *et al.*, 1999; Serbina *et al.*, 2003b).

Daneben werden Chemokine wie CCL2 sezerniert, das insbesondere inflammatorische Ly6C⁺ Monozyten aus dem Knochenmark zu den Infektionsherden rekrutiert (Serbina und Pamer, 2006; Tsou *et al.*, 2007). In einem MyD88 abhängigen Mechanismus differenzieren diese Monozyten zu TNF und iNOS produzierenden DCs (Tip-DCs) (Serbina *et al.*, 2003b). Durch ihre hohe Syntheseleistung an TNF, dem für die Bildung von Stickstoffmonoxid wichtigen iNOS und ihrer Nähe zu infizierten Zellen tragen Tip-DCs wesentlich zur frühen Bereinigung der Infektion bei (Serbina *et al.*, 2003a). Nach der Flucht der Listerien aus dem Phagosom in das Wirtszellzytoplasma wird eine robuste Expression von IFN β induziert. Die hierfür verantwortlichen zytoplasmatischen PRRs sind bisher nicht vollständig charakterisiert, eine Beteiligung von LRRFIP1 und des von den Listerien produzierten zyklischen Diadenosin-Monophosphats gilt aber als wahrscheinlich (Yang *et al.*, 2010; Woodward *et al.*, 2010).

1.4.3 Typ I IFN in der murinen Listeriose

Im Gegensatz zu der initial beschriebenen protektiven Wirkung von systemisch appliziertem rekombinantem IFN β in der murinen Listeriose (Fujiki und Tanaka, 1988), zeigen neuere Studien, dass die im Verlauf der *L. monocytogenes* Infektion induzierte Typ I IFN Antwort für den Wirt von Nachteil ist. IFNAR-, IRF3- oder IFN β -defiziente Mäuse sind gegenüber einer Listerien-Infektion deutlich resistenter als Wildtypiere und tragen in infizierten Organen eine signifikant reduzierte Bakterienlast (Auerbuch *et al.*, 2004; Carrero *et al.*, 2004; O'Connell *et al.*, 2004; Stockinger *et al.*, 2009). Mechanistisch ist für den nachteiligen Effekt eine Priorisierung des Typ I IFN Signalwegs gegenüber dem Typ II IFN Weg verantwortlich. Durch eine Typ I IFN induzierte Expressionsinhibition des IFN γ -Rezeptors auf DCs und Makrophagen verlieren diese Zellen die Fähigkeit IFN γ aktivierte antibakterielle Effektor-Programme zu initiieren (Rayamajhi *et al.*, 2010). Die infektionsverschlimmernde Wirkung von Typ I Interferonen äußert sich auf multiple Weisen. Zum einen steigern Typ I Interferone die lytische Wirkung des LLO auf T-Zellen. Makrophagen phagozytieren diese apoptotischen T-Zellen und inhibieren daraufhin die Immunantwort durch Expression des anti-inflammatorischen IL-10. Eine verringerte Anzahl TNF-produzierender CD11b⁺ Phagozyten führt ebenfalls zu einer Verschlechterung der Immunabwehr. Mäuse mit intaktem Typ I IFN Signalweg exprimieren darüber hinaus stärker pro-apoptische Proteine und Typ I IFN induziertes iNOS wirkt sich nachteilig auf die Überlebensfähigkeit von Makrophagen aus (Stockinger und Decker, 2008).

Aufgrund fehlender Analysemethoden konnte die zelluläre Quelle des hier schädlich wirkenden Typ I Interferons bisher weder genau identifiziert und lokalisiert werden, noch ließen sich die IFN β produzierenden Zellen funktionell charakterisieren. Quantitative RT-PCR Analysen mit FACS-sortierten Zellpopulationen legten bisher den Schluss nahe, dass Makrophagen für die Expression von Typ I Interferonen nach *L. monocytogenes* Infektion in der Maus verantwortlich sind (Stockinger *et al.*, 2009).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Wie dargelegt, war auf Grund technischer Einschränkungen bisher lediglich eine Betrachtung der globalen Typ I IFN Expression mittels ELISA oder RT-PCR möglich. Eine detaillierte Charakterisierung der IFN β Produzenten und damit der Initiatoren der Typ I IFN Expression auf zellulärer Ebene war zu Beginn der Arbeit *in vitro* schwer und *in vivo* gar nicht zu realisieren. Aus demselben Grund war auch eine funktionelle Charakterisierung IFN β exprimierender Zellen in bestimmten Infektionsmodellen nicht möglich, und grundlegende Fragen zur Transkriptionsinduktion blieben unbeantwortet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten mit Hilfe eines bicistronischen IFN β /YFP Reportermausmodelles die für die initiale Typ I IFN Expression verantwortlichen Zelltypen *in vitro* und *in vivo* charakterisiert werden. Nach abschließender Validierung des Reportersystems soll zuerst in *in vitro* differenzierten myeloiden Zellen durch Stimulationsexperimente mit definierten PAMPs das zelltypspezifische IFN β Expressionsprofil charakterisiert werden. In einem nächsten Schritt soll zunächst in einem reduktiven Ansatz die Frage beantwortet werden, welche Zelltypen nach *in vivo* Stimulation mit distinkten PRR Agonisten die Typ I IFN Antwort initiieren und wo diese Zellen lokalisieren. Nach der Etablierung geeigneter FACS-Sortier Strategien ist eine zentrale Aufgabe in diesem Projekt IFN β^+ und IFN β^- Zellen *ex vivo* aus identischen Zellpopulationen zu isolieren und mit Hilfe eines Transkriptom-Mikroarrays herauszufinden, ob und durch welche Gene sich diese phänotypisch stochastische Zytokinexpression in homogenen Zellpopulationen erklären lässt. Schließlich soll die Typ I IFN Expression im Infektionsmodell der murinen Listeriose analysiert werden. Im wissenschaftlichen Fokus steht dabei insbesondere die funktionelle Charakterisierung der identifizierten IFN β Produzenten isoliert *in vitro* und *in vivo* im Kontext des Wirtes.

2 Material und Methoden

2.1 Bezugsquellennachweis

Sämtliche Chemikalien wurden in pro Analysis Qualität bezogen. Zum Ansetzen der Lösungen wurde entweder hochreines Wasser aus der MilliQ-Anlage (Millipore, Schwalbach) oder destilliertes Wasser (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

2.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
2-Methylbutan	Fluka, Ulm
Agarose	Biozym, Hamburg
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Avidin/Biotin Blockierlösungen	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Baclight Red	Invitrogen, Karlsruhe
BD Cytotfix/Cytoperm plus Kit	BD Biosciences, Heidelberg
BSA	Sigma, Taufkirchen
CpG ODNs	TIB Molbiol, Berlin
DEPC	Sigma, Taufkirchen
Desoxynukleotide	Roche, Mannheim
destilliertes Wasser	Invitrogen, Karlsruhe
DMEM Medium VLE	Biochrom, Berlin
DMSO	Sigma, Taufkirchen
DNA Größenleiter Mix	Fermentas, St.Leon-Rot
DOTAP	Roche, Mannheim
EGTA	Sigma, Taufkirchen
Esel-Normal Serum	Jackson Immuno Research, Suffolk, UK
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Boehringer; Mannheim
FACS Clean Lösung	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Flow Lösung	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Rinse Lösung	BD Biosciences, Heidelberg
FCS	PAN, Aidenbach
Fugene HD	Roche, Mannheim
Gentamicin	Sigma, Taufkirchen
Glutamin	Biochrom, Berlin
Golgi Stop, Golgi Plug	BD Biosciences, Heidelberg
HEPES	Invitrogen, Karlsruhe
Imiquimod	Invivogen, San Diego, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Sigma, Taufkirchen
LPS <i>Salmonella Minnesota</i> R595	List Laboratories, Campbell, USA
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Maus-Normal Serum	Jackson Immuno Research, Suffolk, UK

Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS Chemikalienpulver	Biochrom, Berlin
PBS, 0,5 l, steril	Invitrogen, Karlsruhe
PBS, 10 l, steril	PAA, Cölbe
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Percoll	GE Healthcare, Freiburg
poly(I:C)	Amersham, Braunschweig
R848	Enzo Life Sciences, Lörrach
Ratten-Normal Serum	Jackson Immuno Research, Suffolk, UK
Rediload Ladepuffer	Invitrogen, Karlsruhe
Rekombinantes murines FLT3L	R&D Systems, Mainz
RNase Zap	Applied Biosystems/Ambion, Darmstadt
RPMI Medium VLE	Biochrom, Berlin
SA APC Alexa 750	Invitrogen, Karlsruhe
SA-APC	BD Biosciences, Heidelberg
Saccharose	Serva, Heidelberg
SA-Cy3	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
SA-PE Cy7	BD Biosciences, Heidelberg
SA-PerCP Cy5.5	BD Biosciences, Heidelberg
Saponin	Sigma, Taufkirchen
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva, Heidelberg
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Sigma, Taufkirchen
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin
Vectashield Eindeckelmedium mit DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Wasserstoffperoxid 30%ig	Merck, Darmstadt
Ziege-Normal Serum	DaKoCytomation, Hamburg
β-Mercaptoethanol	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.2 Radiochemikalien

[³H]-Thymidin wurde von der Firma Perkin Elmer (Rodgau) bezogen und vor Ablauf der ersten Halbwertszeit verwendet.

2.1.3 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Collagenase Typ VIII	Sigma, Taufkirchen
DNA Taq-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
DNase I	Roche, Mannheim
Proteinase K	Sigma, Taufkirchen

2.1.4 Kits und Verbrauchsmaterial

Reagenz oder Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
αBiotin MACS Beads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
BD AccuDrop Beads	BD Biosciences, Heidelberg
BD Compensation Beads	BD Biosciences, Heidelberg
BetaPlate Scint (Szintillationsflüssigkeit)	LKB Wallac, Finnland
CD4 T-Zell Isolationskit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
COS Blutagarplatten	Biomerieux, Nürtingen
Cryomolds	Sakura Finetek, Staufen
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
DakoCytomation Pen	DakoCytomation, Hamburg
Hemacolor Färbekit	Merck, Darmstadt
LS MACS Säulen und Magnete	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Microtom Klingen	Jung-Histo Service, Nussloch
mirVana miRNA Isolationskit	Applied Biosystems/Ambion, Darmstadt
Objekträger Super Frost	Roth, Karlsruhe
Parafilm M	American National Can, Chicago, USA
Plastikwaren	NUNC, Wiesbaden
	BD Falcon, Heidelberg
	Eppendorf, Hamburg
	Greiner Bio-One, Frickenhausen
	Corning, Amsterdam, Niederlande
	Neolab, Heidelberg
	Millipore, Schwalbach
	BD Biosciences, Heidelberg
Siebgewebe MW= 40 & 70 µm	Neolab, Heidelberg
Spritzen und Injektionskanülen	B. Braun, Melsungen
Tissue Tek Einbettmedium	Sakura Finetek, Staufen
TSA FITC /Biotin System	Perkin Elmer, Rodgau

2.1.5 Geräte und sonstige Materialien

Gerät	Bezugsquelle
1205 Betaplate (Szintillationszähler)	LKB Wallac, Finnland
Abfallbeutel	Sarstedt, Nümbrecht
Axiovert 100 (Mikroskop)	Zeiss, Jena
Basic 96 Harvester (Zellerntegerät)	Zinser Analytic Skatron, Frankfurt
Bestrahlungsgerät (IBL 437 C)	Oris Industrie, Ontario, Canada
BioDocAnalyzer (Geldokumentation)	Biometra, Göttingen
Biofuge A (Tischzentrifuge)	Heraeus, Hanau
Biofuge fresco (Tischzentrifuge)	Heraeus, Hanau
Brutschrank (Heraeus Heracell 240)	Heraeus, Hanau
Cellspin II (Zentriuge)	Tharmac, Waldsolms
Chirurgische Instrumente	Roboz, Gaithersburg, USA
Clean Air (Sterilbank)	Kendro, Wien, Österreich
CM 3050 (Cryostat)	Leica, Wetzlar

Einkanal und Multikanal Pipetten	Thermo Fischer Scientific, Bonn
Elektrophorese Gelkammern	Hoefer, Holliston, USA
FACS Aria I	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg
Hand-Dispenser Handystep	Brand, Wertheim
Heidolph Polymax 1040 (Plattformschüttler)	Heidolph Instruments, Schwabach
Heizblock Techne DB3	Biostep, Jahnsdorf
Heizrührer IKAMAG RCT	IKA, Staufen
LSM510Meta (Konfokalmikroskop)	Zeiss, Jena
Mikrowelle	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe
Millipore Anlage	Millipore, Schwalbach
NanoDrop 1000 (Photometer)	Peqlab, Erlangen
Neubauer Zellzählkammer	LO-Laboroptik, Friedrichsdorf
PCR Softstripes, 0,2ml	Biozym Scientific, Oldendorf
pH Meter MP 225	Mettler-Toledo, Giessen
Phero-Stab 200 (Netzteil)	Biotec Fischer, Reiskirchen
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Rotana 46 RC (Stand Kühl-Zentrifuge)	Hettich, Tuttlingen
Speedvac DNA 110	Thermo Fisher Scientific, Bonn
TE2000 (Mikroskop)	Nikon, Düsseldorf
Thermocycler T1 (PCR-Gerät)	Biometra, Göttingen
Thermomixer (Schüttel-Heiz-Inkubator)	Eppendorf, Hamburg
Ultra Turrax T25	IKA, Staufen
UV Mini 1240 (Photometer)	Shimadzu, Duisburg
Vortex Schüttler VVR	VWR, Darmstadt
Waage Precisa 600c	Oehmen Labortechnik, Essen
Wasserbad	Köttermann Labortechnik, Uetze/Hänigsen

2.2 Medien und Puffer

2.2.1 Stammlösungen und Puffer

PBS	13,7 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	80,9 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
		pH = 7,4
TE-Puffer	10 mM	Tris-HCl, pH = 8,0
	1 mM	EDTA
Proteinase K	10 mg/ml	Proteinase K in H ₂ O gelöst

Mausschwanz-Verdaulösung	100	mM	Tris-HCl, pH = 8,5
	5	mM	EDTA
	0,2	%	SDS
	200	mM	NaCl
	1	% (v/v)	Proteinase K
TAE Elektrophoresepuffer	40	mM	Tris-HCl, pH = 8,0
	20	mM	Eisessig
	2	mM	EDTA
dNTP-Mix	je 1	mM	dATP, dCTP, dTT, dGTP
10 x PCR-Puffer	500	mM	KCl
	100	mM	Tris-HCl, pH = 8,3
	15,20,25	mM	MgCl ₂
	0,1	% (w/v)	Gelatine
Erythrozyten-Lysepuffer	150	mM	NH ₄ Cl
	10	mM	KHCO ₃
	0,1	mM	EDTA pH = 7,2-7,4
FACS Puffer	1 x		PBS
	2	% (v/v)	FCS
	2	mM	EDTA
MACS Puffer	1 x		PBS
	0,5	% (w/v)	BSA
	2	mM	EDTA steril filtriert, entgast
PFA Fixierpuffer	4	% (w/v)	Paraformaldehyd
	2	mM	MgCl ₂
	1,25	mM	EGTA
	10	% (v/v)	10 x PBS pH = 7,5 (HCl, NaOH) steril filtriert
Collagenase Typ VIII	100	mg/ml	Collagenase Typ VIII in PBS
DNase I	3000	U/ml	DNase I in PBS gelöst
Organverdaupuffer	6	% (v/v)	Collagenase Typ VIII Lösung
	1	% (v/v)	DNase I Lösung
	93	% (v/v)	PBS steril filtriert
Stopp-Puffer	1 x		PBS
	10	mM	EDTA
HBS	20	mM	HEPES
	150	mM	NaCl
			pH = 7,4

TNB	0,1 M	Tris-HCl, pH = 7,5
	0,15 M	NaCl
	0,5 % (w/v)	Block Reagenz aus TSA Kits

2.2.2 Medien für die Zellkultur

	Zelltypen			
	BMDMs	GMCSF-DCs	FLT3L-DCs	T-Zell MLR
Grundmedium	RPMI 1640 VLE	DMEM VLE	DMEM VLE	RPMI 1640
Zusätze				
FCS	10 %	10 %	10 %	10 %
GMCSF ¹		1,5 %		
MCSF ²	15 %			
FLT3L			100 ng/ml	
L-Glutamin	enthalten	enthalten	enthalten	2 mM
β-ME	0,05 mM	0,05 mM	0,05 mM	0,05 mM
HEPES			10 mM	
Penicillin				100 U/ml
Streptomycin				100 µg/ml

¹GMCSF wurde als Kulturüberstand der GMCSF produzierenden P3X63/O-GMCSF Hybridomzellen zugesetzt.

²MCSF wurde als Kulturüberstand der MCSF produzierenden L929 Zelllinie zugesetzt.

Tabelle 2.1: Zusammensetzung der Zellkulturmedien.

2.3 Bakterienstämme und Zelllinien

2.3.1 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Details	Referenz, Quelle
<i>L. monocytogenes</i>	Wildtyp-Stamm	ATCC Stamm 43251
<i>L. monocytogenes</i> $\Delta actA$	ActA Deletionsmutante, im Wirtszellzytoplasma immobilisiert	Mathias Hornef, Hannover
<i>L. monocytogenes</i> Δhly	LLO Deletionsmutante, unfähig aus dem Phagosom zu entfliehen	Mathias Hornef, Hannover
<i>L. monocytogenes</i> GFP	konstitutiv GFP exprimierender Listerienstamm	Klaus Pfeffer, Düsseldorf

Tabelle 2.2: Verwendete Bakterienstämme.

2.3.2 Zelllinien und Zellen

Zellen/-linie	Details	Referenz
P3X63/O-GMCSF	murine Myelom Zelllinie, produziert GMCSF	(Karasuyama und Melchers, 1988)
L929	sekretieren MCSF, Fibroblasten, Ursprung: Bindegewebe einer C3H/An Maus	ECACC Nummer: 85011425
DC	GMSCF-DCs: Kultivierung aus Knochenmarkszellen mit GMCSF FLT3L-DCs: Kultivierung aus Knochenmarkszellen mit rekombinantem FLT3L	(Inaba <i>et al.</i> , 1992) (Gilliet <i>et al.</i> , 2002)
Splenozyten	primäre Milzzellen, kultiviert nach Organhomogenisierung und Erythrozytenlyse	
Makrophagen	Kultivierung aus Knochenmarkszellen mit L929 konditioniertem Medium	(Boltz-Nitulescu <i>et al.</i> , 1987)
naïve T-Zellen	Kultiviert nach MACS Aufreinigung aus primären Splenozyten	

Tabelle 2.3: Verwendete Zellen und Zelllinien

2.4 Primer und Antikörper

2.4.1 Oligonukleotide (Primer)

Die Primer wurden von der Firma Metabion (Martinsried) als Lyophilisat bezogen, in H₂O resuspendiert und auf eine Endkonzentration von 20 µM eingestellt (Tabelle 2.4).

Bezeichnung	Primersequenz (5'→3')	Spezifität
p63	TGG TCC TGC TGG AGT TCG TGA CCG C	<i>Yfp</i>
p67	CAA TCC CAT AGC AGG TGA TGC C	<i>Ifnb</i> 3' Bereich
p69	CCC TAT GGA GAT GAC GGA GAA GAT GC	<i>Ifnb</i> 5' Bereich

Tabelle 2.4: In dieser Arbeit verwendete Primer

2.4.2 Antikörper

Für durchflusszytometrische- und histologische Untersuchungen wurden Antikörper (AK) der Firmen BD Biosciences (Heidelberg), Jackson Immuno Research (Suffolk, UK), SantaCruz (Heidelberg), AnaSpec (Fremont, USA), BioLegend (Uithoorn, Niederlande), Abcam (Cambridge, UK), BMA (Augst, Schweiz), eBioscience (San Diego, USA), AbD Serotec (Düsseldorf) und Chemicon/Millipore (Schwalbach) bezogen und in austitrierten Konzentrationen verwendet (Tabelle 2.5).

Antikörper	Klon	Verwendung	Bezugsquelle
Esel α Hase	Polyklonal	FACS/Histologie	Jackson Immuno Research
Esel α Ziege	Polyklonal	Histologie	Jackson Immuno Research
Isotyp-Kontrollen		FACS	BD Biosciences, SantaCruz
Ziege α Ratte	Polyklonal	Histologie	Jackson Immuno Research
α B220	Ra3-6B2	FACS/Histologie	BD Biosciences
α CD11b	M1/70	FACS/Histologie	BD Biosciences
α CD11c	HL3	FACS	BD Biosciences
α CD16/CD32 (Fc-Block)	2.4G2	FACS/Histologie	BioLegend
α CD19	1D3	FACS	BD Biosciences
α CD3 ϵ	145-2C11	FACS	BD Biosciences
α CD4	RM4-5	FACS	BD Biosciences
α CD40	3/23	FACS	BD Biosciences
α CD45.1	A20	FACS	BioLegend
α CD45.2	104	FACS	BioLegend
α CD69	H1.2F3	FACS	BD Biosciences
α CD80	16.10A1	FACS	BD Biosciences
α CD86	GL1	FACS	BD Biosciences
α CD8 α	53-6.7	FACS	BD Biosciences
α F4/80	BM8	FACS	BioLegend
α GFP	Polyklonal	Histologie	Abcam
α Gr1	RB6-8C5	FACS/Histologie	BD Biosciences
α I-A ^b (MHC Klasse II)	AF6-120.1	FACS	BD Biosciences
α IFN β	Polyklonal	FACS	Chemicon/Millipore
α iNOS	Polyklonal	Histologie	AnaSpec
α iNOS	M-19	FACS	SantaCruz
α Listeria	Polyklonal	Histologie	Abcam
α Ly6C	AL-21	FACS	BD Biosciences
α Ly6G	1A8	FACS	BioLegend
α Mac-3	M3/84	FACS	BD Biosciences
α MOMA-1	MOMA-1	FACS/Histologie	BMA
α NK1.1	PK136	FACS	BD Biosciences
α pDCs (mPDCA-1)	JF05-1C2.4.1	FACS	Miltenyi Biotec
α SIGN-R1	ER-TR9	FACS/Histologie	AbD Serotec/Abcam
α TNF α	MP6-XT22	FACS	eBioscience

Tabelle 2.5: Verwendete Antikörper

2.5 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

2.5.1 Präparative Isolierung chromosomaler DNA aus murinem Gewebe

Aus Proteinase K verdauten Mausschwanz-Biopsien wurde die genomische DNA nach Abtrennen von Festbestandteilen gewonnen. Die Schwanzprobe (ca. 0,4 cm) wurde in ein RG gegeben, mit 500 μ l der Mausschwanz-Verdauung versetzt und ÜN bei 55 °C in einem Heizblock inkubiert. Die Probe wurde

anschließend kurz gevortext und mit 16.000 g für 10 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues RG transferiert und mit 400 µl Isopropanol versetzt. Das RG wurde bis zum Sichtbarwerden des DNA Präzipitates invertiert. Anschließend erfolgte die Pelletierung des Präzipitates durch Zentrifugation (16.000 g, 10 min, RT). Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit 500 µl 70 % EtOH gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (16.000 g, 10 min, RT) wurde der Überstand komplett abgenommen und das luftgetrocknete Pellet in 100-500 µl TE resuspendiert. Nach 3 h Inkubation bei 55 °C wurde die DNA durch Schütteln des RG vollständig gelöst. 1-2 µl wurden als Template in einer PCR verwendet.

2.5.2 Präparation gesamtzellulärer RNA

Die Isolierung gesamtzellulärer RNA aus FACS sortierten Zellen erfolgte mit Hilfe des mirVana miRNA Isolationskits nach Angaben des Herstellers (Ambion).

2.5.3 Amplifizierung von DNA mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) beruht auf der Eigenschaft von DNA-Polymerasen, einzelsträngige DNA als Matrize für die Synthese eines Komplementärstranges zu benutzen, um spezifische DNA-Sequenzen beliebig zu vervielfältigen (Mullis und Faloona, 1987). Die Reaktion verläuft zyklisch. In einem ersten Denaturierungsschritt werden die DNA-Stränge durch Erhitzen auf 95 °C voneinander getrennt. Im Hybridisierungsschritt wird die Temperatur auf die Hybridisierungstemperatur gesenkt bei der spezifische Primer an die 5'- und 3'-flankierenden Sequenzen des zu amplifizierenden Fragments hybridisieren können. Als Nächstes wird die Temperatur auf das Temperaturoptimum der zugesetzten thermostabilen Polymerase angehoben. Sie verlängert die 3'OH Enden der Oligonukleotide komplementär zum Matrizenstrang (Elongationsschritt). Am Ende des Elongationsschrittes hat sich die Anzahl an DNA-Molekülen verdoppelt, und es kann ein neuer Reaktionszyklus initiiert werden.

Reaktionsansatz Typisierungs-PCR	2,0 µl	DNA (ca. 100 ng)
	0,5 µl	10 mM dNTPs
	2,5 µl	25 mM 10 x PCR Puffer
	2,5 µl	Rediload
	0,5 µl	Primer p67: wt und mob
	0,5 µl	Primer p69: wt bzw. p63: mob
	1,0 µl	Taq Polymerase (5 U/µl)
	ad 25 µl	H ₂ O

Der Reaktionsansatz wurde ohne DNA auf Eis hergestellt, kurz gevortext und abzentrifugiert (Master-Mix). Zu der in PCR-Reaktionsgefäße vorgelegten DNA wurde dann der Mastermix hinzu pipettiert. Die Reaktionsgefäße wurden fest verschlossen und in ein PCR-Gerät mit vorgeheiztem Deckel zum Durchführen der PCR gestellt (Tabelle 2.6).

Schritt	Funktion	Dauer	Temperatur
1	DNA Denaturierung	5 min	94 °C
2	DNA Denaturierung	15 sec	94 °C
3	Primerhybridisierung	1 min	60 °C
4	Primerverlängerung	1 min 40 sec	72 °C
5	Wiederholung: Schritte 2 – 4, 33 Zyklen		
6	finale Primerverlängerung	7 min	72 °C
7	Lagerung	∞	4 °C

Tabelle 2.6: PCR Bedingungen

2.5.4 Agarosegelelektrophorese

Analytische Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Standardmethode, die zur Auftrennung von DNA-Fragmenten verwendet wird. Im elektrischen Feld wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren zur Anode. Hierbei erfolgt im Agarosegel eine Auftrennung der Fragmente nach ihrer Größe, wobei die Migrationsgeschwindigkeit dem Logarithmus des Molekulargewichtes invers proportional ist. Durch die Verwendung von Ethidiumbromid in der Gelmischung fluoreszieren die DNA-Banden bei Bestrahlung mit UV-Licht im Transilluminator. Das Muster kann dadurch auch photographisch festgehalten und analysiert werden.

0,8-2 % (w/v) Agarose wurde in TAE Puffer aufgekocht, bis eine klare homogene Lösung entstand. Nach Abkühlung der Lösung auf Handwärme erfolgte eine Zugabe von Ethidiumbromid (1 µg/ml) und das Gießen des Gels in Gelkammern mit den gewünschten Kämmen. Das erstarrte Gel wurde in eine Elektrophorese-Apparatur eingesetzt und mit TAE-Puffer überschichtet. Die DNA Proben aus PCR Reaktionen mit Rediload Additiv benötigten keinen weiteren Auftragspuffer und wurden unmittelbar aus dem PCR-Reaktionsgefäß in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde in Abhängigkeit von der Gelgröße bei 80-120 Volt für ca. 1 h durchgeführt. Anschließend erfolgte die photographische Dokumentation des Bandenmusters

Durch Aufrufen eines DNA-Längenstandards konnte die Größe der DNA-Moleküle nach der Gelelektrophorese bestimmt werden.

2.5.5 Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung

Die Konzentrationen reiner RNA-Lösungen wurden photometrisch mit einem NanoDrop (Paqlab) bestimmt. Die Proben wurden mit RNase-freiem Wasser verdünnt, um im linearen Bereich des Photometers zu arbeiten. Eine Kalibrierung des Photometers erfolgte vor jeder Messreihe gegen das jeweilige Lösungsmittel. Nach Bestimmung der Absorption bei 260 nm konnte unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors der Probe die Konzentration der RNA-Lösung bestimmt werden. Es gilt:

$$1,0 A_{260} \cong 40 \mu\text{g RNA/ml}$$

Die Reinheit der RNA-Lösung wurde durch Bestimmung des Quotienten der Absorptionswerte bei 260 und 280 nm bestimmt. Reine Präparationen sollten A_{260}/A_{280} Werte zwischen 1,8 und 2,0 aufweisen.

2.6 Tierversuche

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche erfolgten gemäß des Tierschutzgesetzes § 8 und wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW der Bezirksregierung Düsseldorf genehmigt.

2.6.1 Versuchstiere

Die verwendeten Mäuse wurden in dem spezifisch pathogenfreien (SPF)- Bereich der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf gehalten und gezüchtet. $IFN\beta^{mob/mob}$ Mäuse waren zum Zeitpunkt der Arbeitsaufnahme mindestens über 5 Generationen auf den C57Bl/6 Hintergrund zurückgekreuzt (Tabelle 2.7).

verwendete Mäuse	Details	Hintergrund
$IFN\beta^{mob/mob}$	$IFN\beta$ Reportermaus, $CD45.1^- CD45.2^+$	C57BL/6
$IFN\beta^{-/-}$	<i>ifnb</i> defiziente Maus (Erlandsson <i>et al.</i> , 1998)	C57BL/6
B6.SJL-Ptprc<a> Pepc/BoyJ	kongener Mäuseinzuchtstamm, $CD45.1^+ CD45.2^-$	C57BL/6
$IFN\beta^{mob/mob} CD45.1^+ CD45.2^-$	Verkreuzung von $IFN\beta^{mob/mob}$ Mäusen mit dem B6.SJL-Ptprc<a> Pepc/BoyJ Stamm	C57BL/6
BALB/c	MHC Haplotyp different zu C57BL/6 Mäusen	BALB/c

Tabelle 2.7: Verwendete Mäuse

2.6.2 Die $IFN\beta$ -Reportermaus

Zur Analyse der $IFN\beta$ Antwort wurde ein bicistronisches $IFN\beta$ /YFP Reportermausmodell genutzt (Scheu *et al.*, 2008). Bei Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation war die $IFN\beta$ Reportermaus bereits generiert und 5-fach auf den Hintergrund des Mausinzuchtstammes C57BL/6 zurückgekreuzt. In dem $IFN\beta$ Reporterallel wurde eine für das verbesserte gelb fluoreszierende Protein (eYFP) kodierende Expressionskassette mit separater IRES (interne ribosomale Eintrittsstelle) bicistronisch mit dem endogenen *ifnb* Locus gekoppelt. Um eine Dysregulation der $IFN\beta$ Produktion zu vermeiden, wurden die Expressions-Kontrollelemente und Polyadenylierungssignale des endogenen *ifnb* erhalten (Scheu *et al.*, 2008). Bei Expression des Reporter-Allels, das im Folgenden als *mob* für „messenger of interferon beta“ bezeichnet wird, wird neben $IFN\beta$ simultan der Fluoreszenzmarker YFP exprimiert. Während das Zytokin sekretiert wird, akkumuliert das YFP im Zytoplasma der Zelle und ermög-

licht die Analyse der IFN β Antwort auf zellulärer Ebene mittels durchflusszytometrischer und immunhistologischer Methoden (Abb. 2.1).

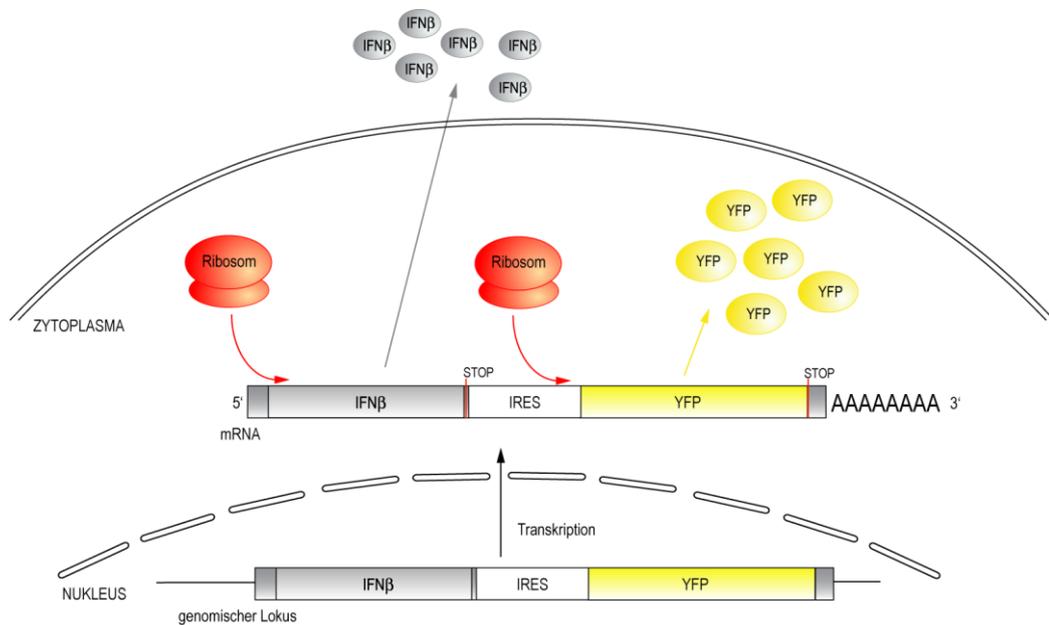


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips der IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ Reportermaus

2.6.3 Organentnahme

Nach erfolgter zervikaler Dislokation der Maus und anschließender Desinfektion des Operationsgebietes mit 70 % EtOH wurden die jeweiligen Organen semisteril entnommen.

2.6.4 Präparation von Knochenmark

Aus 4-12 Wochen adulten Tieren wurden Femur und Tibia entnommen und vom umgebenden Muskelgewebe befreit. Die unversehrten Knochen wurden für 2-5 min mit 70% EtOH desinfiziert, anschließend mit PBS gewaschen und in eine Petrischale (\varnothing 5cm) mit kaltem Medium überführt. Nach Abtrennen der Knochenenden wurde das Knochenmark mit einer Medium gefüllten Einwegspritze und einer 20 Gauge Kanüle aus den Knochen in eine Petrischale gespült. Das Knochenmark wurde in 50 ml Spitzbodenröhrchen überführt und durch repetitives Auf- und Ab-Pipettieren zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet. Die Zellen wurden bei 4 °C für 10 min mit 300 g pelletiert und Erythrozyten durch Resuspendierung des Zellpellets in Erythrozyten-Lysepuffer 2 min bei RT lysiert. Nach Abstoppen der Lysereaktion mit FCS-haltigem Medium wurden die Zellen abzentrifugiert (300 g, 4 °C, 10 min), und das erhaltene Zellpellet zur Zellzahlbestimmung (s. Abschnitt 2.7.1) in 5 ml Medium resuspendiert. Die Knochenmarkszellen wurden anschließend zu myeloiden Zellen differenziert.

2.6.5 *in vivo* TLR Agonist Stimulation

6-12 Wochen alte adulte Mäuse wurden mit poly(I:C) und DOTAP komplexiertem CpG ODN 1668 stimuliert. Die Injektionslösungen pro Maus wurden auf folgende Weise zubereitet:

poly(I:C)

- 200 µg poly(I:C)
- ad 400 µl mit PBS

CpG 1668

- 1,5 nM (~10 µg) CpG ODNs ad 100 µl mit HBS, mischen
 - 30 µl DOTAP mit 70 µl HBS mischen
 - ODN Lösung mit Liposomen-Lösung durch repetitives pipettieren vermischen und 15 min bei RT inkubieren
- hierbei Glas- oder Polystyrol-Reaktionsgefäße nutzen

I.p. Injektionen erfolgten in den unteren Peritonealraum. Vor i.v. Injektion in die laterale Schwanzvene, wurde die Versuchsmaus 2-3 min mit einer Rotlichtlampe bestrahlt, um eine Dilatation der Schwanzvene zu induzieren. Nach Desinfektion des Einstichbereiches erfolgte die zügige Injektion der Lösungen mit sterilen Einwegspritzen und 27-30 Gauge Kanülen.

2.6.6 Infektionen mit *L. monocytogenes*

Ein Impfring mit dem jeweiligen *L. monocytogenes* Stamm (vgl. Tabelle 2.2) wurde ÜN in 5 ml Brain-Heart Infusion (BHI)-Medium bei 37 °C auf dem Schüttelinkubator inkubiert. 5 ml frisches BHI-Medium wurden mit 1 ml der ÜN-Kultur angeimpft und bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0,7 bei 600 nm (OD_{600}) bei 37 °C inkubiert. 0,1 OD_{600} entspricht etwa 10^8 Listerien/ml. 4×10^8 Listerien wurden der Kultur entnommen, mit PBS gewaschen (1 min, 10.000 g, RT) und in 1 ml PBS resuspendiert. Die Infektionskonzentration wurde mit PBS ad 200 µl eingestellt. Die Versuchsmäuse wurden wie unter Abschnitt 2.6.5 beschrieben infiziert. Die tatsächliche Infektionsdosis wurde durch Ausplattieren von 10 µl Aliquots einer seriellen 10-fach Verdünnungsreihe auf Blutagar-Platten bestimmt. Die Platten wurden ÜN bei 37 °C inkubiert und die injizierte Anzahl an Kolonie bildenden Einheiten (CFU) nach Auszählen der Kolonien berechnet. Das Überleben der Versuchsmäuse wurde während des Versuchszeitraums täglich zweimal kontrolliert.

Zur Bestimmung der Bakterienlast in Leber und Milz wurden die Organe entnommen, gewogen und mittels Ultra-Turrax in PBS homogenisiert. 10 µl Aliquots aus einer seriellen 10-fach Verdünnungsreihe in PBS, wurden auf Blutagarplatten ausplattiert und aus der Koloniezahl wurde nach 24 bis 48 h Inkubationszeit bei 37 °C die Bakterienlast errechnet.

2.6.7 Adoptiver Transfer von Zellen

Mittels FACS sortierte Zellen wurden für 10 min mit 300 g bei 4 °C pelettiert und anschließend in PBS resuspendiert. Gegebenenfalls wurde der Zellsuspension noch eine definierte Anzahl Listerien zugesetzt. Die Injektion der auf RT erwärmten Suspensionen erfolgte über die laterale Schwanzvene wie unter Abschnitt 2.6.5 angegeben.

2.7 Zellbiologische Methoden

2.7.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Kultivierung der Zelllinien und primären Zellen erfolgte in Petrischalen oder Zellkulturflaschen mit entsprechendem Kulturmedium in Inkubatoren bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 10 % CO₂. Die Zellkultur wurde an einer Sterilwerkbank unter Verwendung steriler Materialien und Lösungen durchgeführt. Zur Sterilisation von Lösungen und Puffern wurden diese durch eine 0,2 µm Membran sterilfiltriert. Das für die Zellkulturmedien genutzte FCS wurde zuvor für 30 min bei 56 °C erhitzt, um Komplementproteine zu inaktivieren. Das Passagieren von Zellen erfolgte in der Regel zwei- bis dreimal pro Woche. Adhärenz wachsenden Zellen wurde dazu das Kulturmedium entfernt, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und für 2-5 min mit einer Trypsin/EDTA-Lösung im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in FCS-haltigem Medium resuspendiert und - bezogen auf die Ausgangszellzahl - 1:2 bis 1:10 verdünnt in eine neue Petrischale überführt. Zellen in Suspension wurden pelletiert (10 min, 300 g, RT) und mit frischem Medium 1:5 bis 1:10 verdünnt resuspendiert und in neue Zellkulturflaschen überführt. Zellzahlen wurden durch Auszählen in einer Neubauerkammer bestimmt, wobei tote Zellen durch Anfärben mit Trypanblau visualisiert und ausgeschlossen wurden.

2.7.2 Kryokonservierung und Lagerung eukaryotischer Zellen

Für die Langzeitkonservierung wurden die abtrypsinierten adhärenz wachsenden Zellen oder Suspensionszellen bei 300 g, 10 min, RT zentrifugiert, in Einfriermedium (Kulturmedium 40 % (v/v) FCS, 10% DMSO (v/v)) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden 1 h bei -20 °C gelagert, dann ÜN in Isopropanol-gefüllten Einfriercontainern (Nalgene Labware, Rochester, USA) vorerst bei -80°C eingefroren und am folgenden Tag in mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tanks weiter aufbewahrt.

2.7.3 Generierung und Austestung MCSF-haltigen Mediums

Generierung von MCSF-haltigem Medium (L-Sup)

Zur Generierung von MCSF-haltigem Medium wurden L929 Zellen als adhärenz wachsende Zellen kultiviert. 5x10⁶ Zellen wurden in 225 cm² Zellkulturflaschen mit 35 ml BMDM-Medium ohne MCSF-Zusatz ausgesät (vgl. Tabelle 2.1) und nach 2 Tagen mit 20 ml frischem Medium supplementiert. 7 Tage nach der Aussaat wurde der Überstand abgenommen und durch zweimalige Zentrifugation (15 min, 4 °C, 1200 bzw. 3000 rpm) von zellulären Rückständen befreit. Der zellfreie Überstand wurde über einen 0,2 µm Filter sterilfiltriert und in 45 ml Aliquots bei -80 °C tiefgefroren gelagert

Bestimmung der MCSF-Aktivität

2x10⁶ Knochenmarkszellen wurden in 10 ml BMDM Medium mit 30 % L-Sup in Petrischalen ausgesät und für 3 Tage inkubiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers geerntet und nach Zentrifugation (300 g, 10 min, 4 °C) auf eine Zellkonzentration von 4 x 10⁴/ml mit

Medium ohne L-Sup eingestellt. Je 100 µl von 1:2 Verdünnungsreihen der zu testenden L-Sup Überstände wurden pro Loch in einer 96-Loch Flachbodenplatte in Triplikaten vorgelegt. Die 96-Loch Platte wurde nach Zugabe von je 100 µl der Zellsuspension pro Loch für 48 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 18-24 h mit 1 µCi/Loch [³H]-Thymidin gepulst und die Inkorporation von [³H]-Thymidin als Maß für die Zellproliferation über einen Szintillationszähler bestimmt.

2.7.4 Generierung GMCSF-haltigen Mediums zur DC

Zur Generierung von GMCSF haltigen Mediums wurde die Myelom-Zelllinie P3X63/O-GMCSF verwendet und in DC Medium (ohne GMCSF-Sup, vgl. Tabelle 2.1) kultiviert. 2×10^6 Suspensionszellen wurden in 50 ml Medium in eine 225 cm² Zellkulturflasche ausgesät. Nach 7 Tagen wurde der Kulturüberstand wie unter Abschnitt 2.7.3 erläutert geerntet.

Die Austestung des GMCSF-Überstandes erfolgte durch Kultivierung von Knochenmarkszellen in mit unterschiedlichen Konzentrationen an GMCSF-Sup angereichertem GMCSF-DC-Medium analog zu Abschnitt 2.7.3.

2.7.5 Differenzierung von myeloiden Zellen aus Knochenmarkszellen

2.7.5.1 Generierung von BMDMs

Zur Generierung und Differenzierung von BMDMs wurden $1,5 \times 10^6$ Zellen pro 10 cm unbeschichteter Petrischale in 10 ml BMDM (vgl. Tabelle 2.1) ausgesät und nach 3 Tagen mit 5 ml frischem Medium supplementiert. Nach 6-7 Tagen waren die Zellen vollständig ausdifferenziert und wurden nach 30 min Inkubation bei 4°C mit Hilfe eines Zellschabers vorsichtig abgekratzt. Nach einer Zellzahlbestimmung wurden $0,5 \times 10^6$ BMDMs/ml für die nachfolgenden Experimente verwendet.

2.7.5.2 Generierung von GMCSF-DCs

$2-3 \times 10^6$ Knochenmarkszellen wurden pro 10 cm unbeschichteter Petrischale in 10 ml GMCSF-DC Medium (vgl. Tabelle 2.1) ausgesät und nach 3 Tagen mit 10 ml frischem Medium supplementiert. Nach 6 Tagen erfolgte ein Austausch von 10 ml Kulturüberstand. Der abgenommene Kulturüberstand wurde zentrifugiert (300 g, 10 min, RT) und das Zellpellet mit 10 ml frischem Medium resuspendiert und anschließend zur Zellkultur zurückgegeben. Nach insgesamt 9-10 Tagen waren die Zellen zu unreifen GMCSF-DCs differenziert. Zur Gewinnung von GMCSF-DCs wurden die nicht adhärenen Zellen geerntet und nach Zentrifugation (300 g, 10 min, 4°C) in frischem Medium resuspendiert. Für nachfolgende Experimente wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingesetzt.

2.7.5.3 Generierung von Flt3L-DCs

2×10^7 Knochenmarkszellen wurden in 10 ml Flt3L-DC Medium (vgl. Tabelle 2.1) pro 10 cm unbeschichteter Petrischale ausgesät. Am 5. Differenzierungstag wurden 5 ml Kulturüberstand durch frisches Me-

dium ersetzt, wozu der abgenommene Überstand abzentrifugiert wurde (300 g, 10 min, RT) und die Zellen des Pellets nach Resuspendierung in 5 ml Medium zurück in die Zellkultur gegeben wurden. Nach 9-10 Tagen waren die Flt3L-DCs ausdifferenziert und konnten nach 30 min Inkubation der Kulturschalen auf Eis, mit Hilfe eines Zellschabers geerntet werden. Die Zellen wurden abzentrifugiert (300 g, 10 min, 4 °C), in frischem Medium resuspendiert und mit einer Konzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml für anschließende Experimente verwendet.

2.7.6 Stimulation und Infektion von *in vitro* differenzierten Zellen

Die Stimulation von *in vitro* differenzierten myeloiden Zellen mit PRR Agonisten erfolgte mit den unter angegebenen Stimulus-Konzentrationen (Tabelle 2.8).

Agonist	stimulierter PRR	Konzentration
poly(I:C)	TLR3, MDA-5	50 µg/ml
LPS (<i>S. minnesota</i>)	TLR4	100 µg/ml
Resiquimod (R848)	TLR7/TLR8	10 µg/ml
Imiquimod (R837)	TLR7	10 µg/ml
CpG ODNs	TLR9	6 µg/ml

Tabelle 2.8: Konzentrationen der eingesetzten *in vitro* PRR Agonisten

Die Agonisten wurden unmittelbar in den Zellkulturüberstand gegeben und durch vorsichtiges Schwenken der Kulturschalen vermischt.

Zur endosomalen Applikation wurden CpG ODNs bzw. Imiquimod und poly(I:C) mit den Transfektionsreagenzien DOTAP bzw. Fugene HD (Roche, Mannheim) wie folgt vermischt:

DOTAP

- 6 µg ODN *ad* 100 µl mit HBS
- 20 µl DOTAP *ad* 100 µl mit HBS
- beide Lösungen miteinander mischen und 15 min bei RT inkubieren
- mit 200 µl Medium mischen und zur Zellkultur geben

Fugene

- 2 µg poly(I:C) bzw. 10 µg Imiquimod *ad* 100 µl mit zusatzfreiem Medium
- 6 µl Fugene HD hinzufügen, vortexen
- 15 min bei RT inkubieren
- zur Zellkultur geben

Zur *in vitro* Infektion mit Listerien wurden die Zellen mit der gewünschten Bakterienzahl versetzt. Nach 1 h wurden extrazelluläre Bakterien durch Zugabe von Gentamicin getötet. In BMDM Kulturen wurde 50 µg/ml Gentamicin zugesetzt und das Medium nach 1 h gegen Medium mit 20 µg/ml Gentamicin ersetzt. In DC Kulturen wurden extrazelluläre Bakterien 1 h p.i. durch Zugabe von 20 µg/ml Gentamicin getötet.

2.7.7 Aufbereitung von Organen für nachfolgende FACS-Analysen

2.7.7.1 Milz und Lymphknoten

Den entnommenen Organen wurde nach Überführung in 5 cm Petrischalen an mehreren Stellen mit einer dünnen Injektionskanüle Organverdaupuffer (Abschnitt 2.2.1) injiziert. Nachdem die Organe mit Hilfe einer Pinzette grob zerteilt wurden, wurde 3 ml Organverdaupuffer zugegeben und die Suspension anschließend für 25-30 min bei 37 °C inkubiert. Die verdauten Organe wurden durch repetitives Auf- und Ab-pipettieren homogenisiert und nach Überführung in 50 ml Spitzbodenröhrchen mit 30 ml Stopp-Puffer versetzt. Die Zellen wurden bei 300 g für 10 min bei 4 °C pelletiert und nach Lyse der Erythrozyten (vgl. Abschnitt 2.6.4) in 10 ml PBS resuspendiert und über ein 70 µm Zellsieb filtriert.

2.7.7.2 Leber

Nach Entfernen der Gallenblase wurde die Leber in einer Petrischale mit Hilfe einer Rasierklinge fein zerhackt und in ein 50 ml Spitzbodenröhrchen überführt. Anschließend wurden 10 ml Organverdaupuffer hinzugegeben und die Probe 30 min bei 37 °C und 60 rpm auf einem Schüttelinkubator verdaut. Nachdem das Organ durch Auf- und Ab-Pipettieren homogenisiert war, wurden 30 ml Stopp-Puffer zugesetzt und nach Zentrifugation (6 min, 300 g, 4 °C) die Erythrozyten lysiert. Die Zellen wurden anschließend über einen 70 µm Zellfilter filtriert und nach erneuter Zentrifugation (10 min, 300 g, 4 °C) in 10 ml 35 % Percoll (35 % Percoll, 1x PBS) aufgenommen. Das Leukozytenpellet wurde nach Zentrifugation (10 min, 360 g, 20 °C) einmal mit PBS gewaschen und anschließend in 1 ml PBS resuspendiert.

2.8 Immunologische Methoden

2.8.1 Immunhistologie

2.8.1.1 Immunhistochemie zur Analyse am Fluoreszenz- oder Konfokalmikroskop

Nach Entnahme wurden die Organe 1 h pro mm Gewebedicke in PFA-Fixierpuffer bei RT fixiert, mit PBS gewaschen und ÜN in 30 % Saccharose (30 % Saccharose in PBS) bei 4 °C inkubiert. Die Organe wurden anschließend in Einbettmedium eingeschlossen, in mit Trockeneis gekühltem 2-Methylbutan eingefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Gefrierschnitte wurden in einer Dicke von 6-8 µm angefertigt, auf Objektträger aufgebracht und ebenfalls bei -80 °C gelagert. Unmittelbar vor der Färbeprozedur wurden die Schnitte 10 min aufgetaut und getrocknet, 2 min in PBS rehydriert und die Organe mit einem Fettstift umrandet. Alle weiteren Färbeschritte wurden, wenn nicht anders vermerkt, in einer feuchten Kammer bei RT im Dunkeln durchgeführt und sind durch jeweils 2 Waschschrirte für 1 min in PBS unterbrochen. Falls während der Färbeprozedur Peroxidasen eingesetzt wurden, erfolgte eine Inkubation in 1% H₂O₂, 0,1 % NaN₃ in PBS bei RT unter Schwenken. Bei Verwendung biotinylierter AK wurde endogenes Biotin mit einem Avidin/Biotin Blockierkit (Vector Laboratories) abgebunden. Zur Blockierung unspezifischer Bindestellen wurden die Gewebeschnitte für 25 min mit 0-2 % Fc-Block, 1 % Maus-Normal Serum, 0-1 % Ratte-Normal Serum, 1-3 % Esel-Normal Serum in TNB inkubiert, wobei die Zusammensetzung der Blockierlösung je nach Speziespezifität der verwendeten AK angepasst

wurde. Spezifische Primär- und Sekundär-AK wurden in austitrierten Konzentrationen in TNB für 30-60 min, Fluorochrom konjugiertes Biotin bindendes Streptavidin (SA) in TNB für 20-30 min angewendet. In der Regel wurde eine Verstärkung des Signals mittels eines Tyramid-Signalverstärkungs-Kits (Perkin Elmer) durchgeführt. Hierzu wurden die Organschnitte nach Inkubation mit einem biotinylierten AK mit SA konjugierter Meerrettichperoxidase (HRP) 1:200 in TNB für 25 min inkubiert. Das Verstärkungsreagenz Tyramid wurde als Biotin- oder FITC Konjugat 1:100 in Verstärkungspuffer verdünnt und mit den Organschnitten 6-8 min inkubiert. Bei Mehrfachfärbungen wurden Peroxidasen mit H₂O₂ und NaN₃ erneut inaktiviert und der Biotin/Avidin Blockierschritt durchgeführt. Nach der Färbung wurden die Schnitte mit DAPI beinhaltsendem Vectashield eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt.

Sämtliche fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen eines Experimentes wurden mit Adobe Photoshop CS1 in identischer Weise nachbearbeitet und ggf. zu einem Gesamtbild zusammengefügt. Mit dem Zeiss LSM Image Browser (Zeiss) wurden konfokalmikroskopische Aufnahmen bearbeitet und Einzelprojektionen von 3D Bildstapel berechnet.

2.8.1.2 Anfertigung von Zytospin-Präparaten

Die FACS sortierten Zellen wurden mit PBS gewaschen und in 200-400 µl PBS resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer Zytospin-Zentrifuge (Cellspin II, Tharmac) 10 min bei 1500 rpm und RT auf 2-Feld Objektträger zentrifugiert. Nach dem Trocknen der Präparate erfolgte eine Eosin-G/Azur-B Färbung mittels eines Schnelfärbekits (Hemacolor, Merck) nach Angaben des Herstellers. Nach der Färbung wurden die Präparate am Hellfeld-Mikroskop analysiert und aufgenommene Bilder mit Adobe Photoshop CS1 nachbearbeitet.

2.8.2 Alloge „Gemischte Lymphozyten Reaktion“ (MLR)

Als MLR wird die Proliferation von kultivierten T Lymphozyten als Antwort auf Zellen bezeichnet, die allogene MHC Moleküle exprimieren. FACS sortierte Donorzellen (C57BL/6, MHC Haplotyp H-2b) wurden bestrahlt (3000 rad) und dienen als Stimulator Zellen. Diese waren nun nicht mehr in der Lage auf eine Stimulation durch eine zweite Population durch Proliferation zu antworten. Als Effektorzellen wurden CD4⁺ CD62L⁺ naive T-Zellen eingesetzt, die aus peripheren LN von BALB/c Mäusen (MHC Haplotyp H-2d) mittels MACS Aufreinigungskit (Miltenyi Biotec) isoliert wurden. 2x10⁵/Loch T-Zellen wurden in Triplikat- bis Quadruplikat Ansätzen in eine 96-Loch Rundboden Platte in T-Zell MLR Medium (vgl. Tabelle 2.1) ausgesät. Nach Zugabe von 4000 oder 8000 Stimulatorzellen wurden die Zellen für insgesamt 5 Tage kultiviert. Für die letzten 18 h der Kultur wurde pro Loch 1 µCi [³H]-Thymidin zugegeben. [³H]-Thymidin wird während der Zellteilung in die sich replizierende DNA inkorporiert. Die Stärke der Proliferation kann somit nach Binden der zellulären DNA an einen Glasfaserfilter und Überschichten mit Szintillationsflüssigkeit im β-Counter direkt bestimmt werden.

2.8.3 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Das Durchflusszytometer dient der qualitativen und quantitativen Untersuchung unterschiedlichster Zellpopulationen. Da es in einigen Fällen mit einem zusätzlichen Zellseparator ausgestattet ist, wird das Durchflusszytometer im allgemeinen Sprachgebrauch auch kurz als FACS (Fluorescence-activated cell

sorter) bezeichnet. Hierbei werden die fluoreszenzmarkierten Zellen durch eine Düse gepresst, die einen feinen Flüssigkeitsstrahl generiert, in dem die Zellen vereinzelt vorliegen. Die Zellen passieren nacheinander mehrere Laserstrahlen und streuen hierbei das Laserlicht. Dabei werden die, an die Zelle gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe angeregt und emittieren Licht einer bestimmten Wellenlänge. Sensible Photomultiplier (PMTs) detektieren sowohl die Lichtstreuung, ein Parameter zur Bestimmung der Größe und Granularität der passierenden Zellen, als auch die Fluoreszenz-Emissionen, durch an die Zelle gebundene AK. Durch Verwendung von Detergenzien wird die Zellmembran permeabilisiert, sodass die Anfärbung von intrazellulären Antigenen z.B. Zytokinen ermöglicht wird. Die simultane Analyse multipler Antigene erfolgt durch Kombination von geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen. Voraussetzung sind Fluorochrome, die das Durchflusszytometer an Hand ihrer Emissionsspektren unterscheiden kann und die deshalb getrennt voneinander detektiert werden können.

In Tabelle 2.9 sind die verwendeten Fluorochrome sowie deren Anregungs- und Emissionscharakteristika im FACS aufgeführt.

Fluorochrom	Exzitationslaserwellenlänge	Emissionsmaximum
FITC	488 nm	519 nm
eYFP	488 nm	528 nm
GFP	488 nm	510 nm
PE	488 nm	576 nm
PerCP-Cy5.5	488 nm	696 nm
PerCP	488 nm	678 nm
PE-Cy7	488 nm	778 nm
APC	635 nm	660 nm
APC-Cy7	635 nm	779 nm
DAPI	405 nm	461 nm

Tabelle 2.9: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe für die Durchflusszytometrie

Die Wellenlängen der Emissionsmaxima wurden der „Fluorescence Spectrum Viewer“ Software von BD Biosciences entnommen. Durch eine entsprechende Filterwahl können auch ähnliche Fluorochrome wie eYFP und GFP separiert und simultan detektiert werden.

2.8.3.1 FACS-Analyse von Oberflächenantigenen

Alle Antikörper für die FACS Analyse wurden im Überschuss eingesetzt. Die Proben wurden im Dunkeln inkubiert.

Zunächst wurden die Fc-Rezeptoren CD16/32 blockiert. Dazu wurden bis zu 10^7 Zellen in 25 μ l FACS Puffer mit Fc-Block für 10-20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 25 μ l FACS-Puffer mit direkt Fluorochrom konjugierten AK und/oder (biotinyliertem) Primär-AK zugesetzt und die Zellen erneut für 10-20 min auf Eis inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen mit 3 ml FACS-Puffer (10 min, 300 g, 4 °C) wurden diese, falls erforderlich, in 50 μ l FACS-Puffer mit Sekundärreagenz (SA-Fluorochrom, Sekundär-AK) resuspendiert, für 10-20 min auf Eis inkubiert und abschließend mit 3 ml FACS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden in 200-500 μ l FACS-Puffer resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert.

2.8.3.2 Intrazelluläre Antigenfärbung

Um eine intrazelluläre Akkumulation der normalerweise sekretierten Antigene (IFN β , TNF) zu erreichen, wurden die Zellen für 4 h mit Proteintransportinhibitoren (Golgi Plug und Golgi Stop) im Brutschrank inkubiert. Nach erfolgter Oberflächenfärbung wurden die Zellen mit 4 % PFA in PBS fixiert (20 min, RT) und mit 0,5% Saponin haltigem FACS Puffer (20 min, RT) permeabilisiert. Die nachfolgenden Färbeschritte (20 min, RT) und Waschschriffe wurden mit Permeabilisierungspuffer durchgeführt. Abschließend wurden die Zellen zweimal mit Permeabilisierungspuffer und einmal mit FACS-Puffer gewaschen, in FACS-Puffer resuspendiert und analysiert. Alternativ hierzu wurde das Cytotfix/Cytoperm Kit nach Angaben des Herstellers genutzt (BD Biosciences).

Zur FACS Analyse wurde ein FACS Canto II mit der FACS Diva Software (BD Biosciences) verwendet.

2.8.3.3 Zellsortierung mittels FACS-Aria

Mittels Durchflusszytometer mit Sortiervorrichtung können verschiedene Zellpopulationen voneinander separiert werden. Dazu wird der Probenstrahl nach der laserbasierten Zellcharakterisierung in bis zu 87.000 einzelne Tropfen pro Sekunde eingeteilt. Durch die vorhergehende Analyse werden die Zellen den einzelnen Tropfen zugeordnet und die Tropfen mit den Zielzellen elektrostatisch beim Tropfenabriss geladen. Diese Zieltropfen können im elektrischen Spannungsfeld von zwei Elektroden in bis zu vier verschiedene Probenröhrchen simultan sortiert werden. Zur Zellsortierung werden die Zielpopulationen stringent definiert und anschließend sortiert. Die Zellsortierung erfolgte auf einem BD FACS Aria I mit FACS Diva Software (BD Biosciences).

2.8.3.4 FACS-Daten Analyse und Darstellung

Die generierten FACS-Daten wurden mit Hilfe der FlowJo Software (Tree Star, Ashland, USA) ausgewertet. Während der Auswertung können die Zellen hinsichtlich aller analysierten Charakteristika unterschiedlich visualisiert werden. 2-Dimensionale Punktediagramme (Dot-Plots) stellen jede Zelle hinsichtlich der gemessenen Signalintensität der beiden gewählten Parameter (Größen-, Granularitäts- und Fluoreszenzparameter) als Punkt dar. Bei hohen Zellzahlen können Zellen mit ähnlichen Eigenschaften topographisch als Höhenlinien visualisiert werden. Mittels Histogramm wird eine Zellpopulation hinsichtlich der Signalintensität eines einzelnen Parameters analysiert. Durch Überlagerung der Histogramme verschiedener Proben können Unterschiede sichtbar gemacht werden. Durch das Setzen von Analysefenstern (Gates) oder Quadranten werden die Zielzellen elektronisch selektiert („Gaten“). Die selektierten Zellen können nun unabhängig betrachtet und durch weiteres Gaten charakterisiert werden.

Sofern nicht anders vermerkt, wurden die FACS-Daten in der vorliegenden Arbeit bei der Auswertung wie folgt elektronisch vorselektiert:

- *in vitro* generierte myeloide Zellen: Tote Zellen (DAPI⁺) wurden ausgeschlossen und es wurde auf den spezifischen Marker der Zellart gegatet. Für BMDMs war dies CD11b sowie CD11c für GMCSF- und Flt3L-DCs.

- *ex vivo* FACS Analysen entnommener Organe: DAPI⁺ Zellen sowie CD19⁺ B- und CD3 ϵ ⁺ T-Zellen wurden ausgeschlossen. Bei der Zellsortierung wurden B- und T-Zellen bereits vor der Zelloberflächenfärbung durch MACS Depletion entfernt.
- Nach intrazellulären Färbungen wurde keine Lebend/Tod Diskriminierung vorgenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Validierung der IFN β Reporterfunktion

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe war durch einen IFN β ELISA mit Zellkulturüberständen von mit dem TLR3/MDA-5 Agonisten poly(I:C) stimulierten knochenmarksgenerierten DCs bestätigt worden, dass durch das Einfügen der YFP-Reporterkassette keine Dysregulation der endogenen IFN β Produktion erfolgt. Die Sensitivität der Reporterfunktion war durch *Ifnb* RT-PCR auf FACS sortierten YFP⁺ und YFP⁻ Flt3L-DC nach poly(I:C) Stimulation getestet und in dieser Hinsicht für ausreichend befunden worden (Scheu *et al.*, 2008).

Als letzter Schritt der Validierungsprozedur wurde nun als Teil dieser Arbeit an Hand knochenmarksgenerierter BMDMs und GMCSF-DCs untersucht, ob die Frequenz an YFP⁺ Zellen mit der Frequenz an IFN β -Protein produzierenden Zellen nach Stimulation übereinstimmt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit poly(I:C) stimuliert und die IFN β Produktion über eine intrazelluläre Färbung gegen das Protein oder durch die YFP-Fluoreszenz durchflusszytometrisch quantifiziert (Abb. 3.1).

Während in unstimulierten BMDMs und GMCSF-DCs weder über die YFP Fluoreszenz noch über die intrazelluläre Zytokinfärbung IFN β detektiert werden konnte, zeigte ein jeweils vergleichbarer Prozentsatz an IFN $\beta^{wt/wt}$ und IFN $\beta^{mob/mob}$ Zellen beider Zelltypen nach Stimulation ein positives Signal in der IFN β Zytokinfärbung. Die Frequenz an YFP⁺ Zellen in den stimulierten IFN $\beta^{mob/mob}$ Zellen lag sowohl in BMDMs als auch in GMCSF-DCs leicht über der jeweiligen Frequenz an IFN β^+ Zellen (vgl. Abb. 3.1). Dieses legt nahe, dass die Messung der YFP Fluoreszenz eine höhere Sensitivität zur Detektion der IFN β Expression bietet, als die intrazelluläre Zytokinfärbung. Aufgrund einer technischen Inkompatibilität der intrazellulären Färbung mit der YFP Fluoreszenzmessung war es nicht möglich beide Parameter simultan in denselben Zellen zu messen.

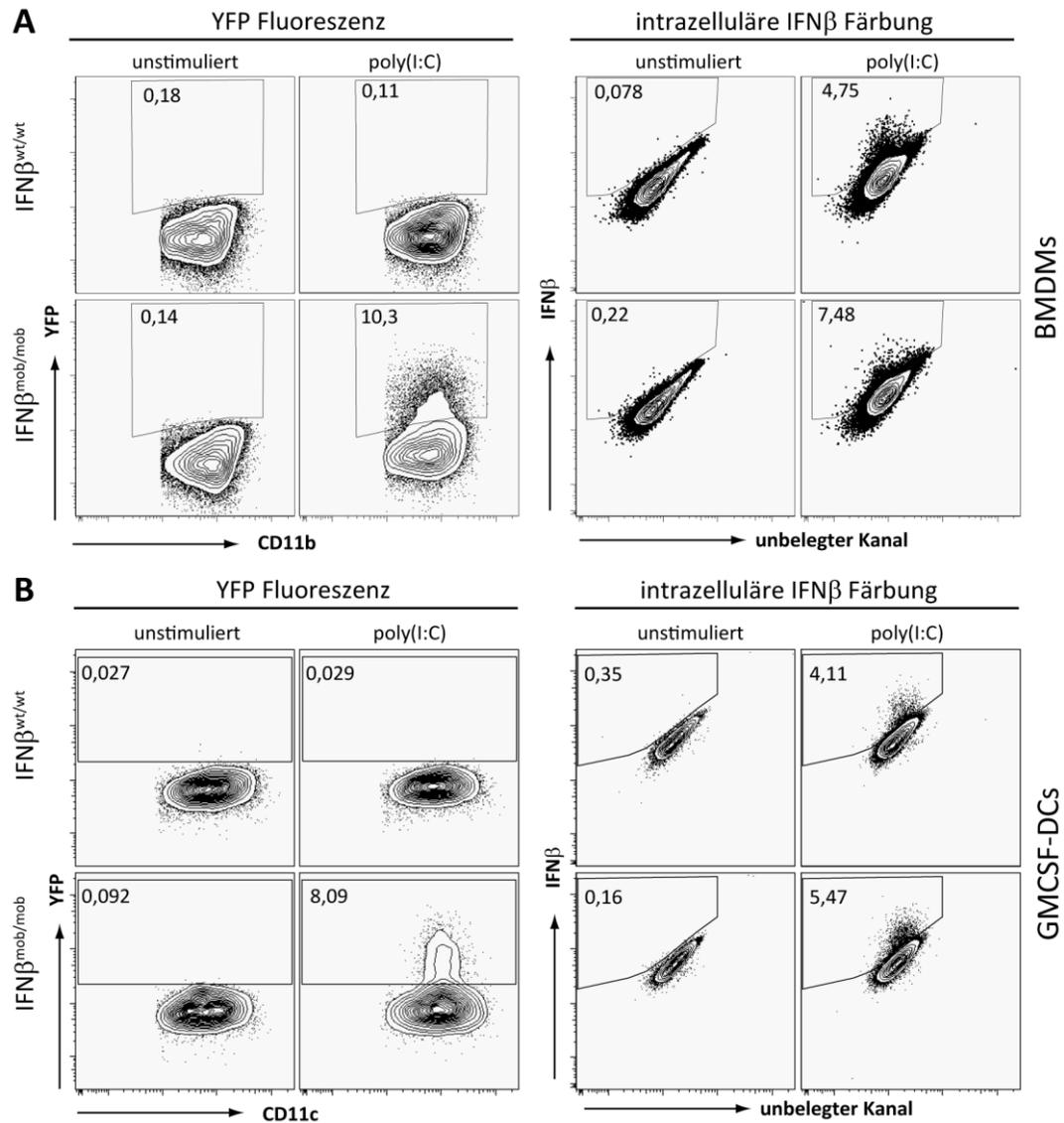


Abb. 3.1: Validierung der IFN β /YFP Reportermaus durch intrazelluläre Zytokinfärbung
 BMDMs [A] bzw. GM-CSF-DCs [B] wurden für 24 h mit poly(I:C) stimuliert oder unstimuliert belassen. Die Zellen wurden durchflusszytometrisch auf ihre YFP Fluoreszenz und nach intrazellulärer Färbung auf Expression von IFN β untersucht. Angegeben ist der Prozentsatz an YFP⁺ bzw. IFN β ⁺ Zellen innerhalb der Auswertefenster bezogen auf die gezeigten Zellpopulationen

Das Ergebnis belegte, dass das Reportersystem nicht dysreguliert war, sondern zur akkuraten Charakterisierung der IFN β Expression genutzt werden konnte.

3.2 *In vitro* und *in vivo* Analyse der IFN β Antwort nach Stimulation mit definierten molekularen Pathogen-Bestandteilen

Ein Pathogen besitzt eine Vielzahl an konservierten Strukturen, sogenannten Pathogen assoziierten molekularen Mustern (PAMPs), die von speziellen extra- und intrazellulären Mustererkennungs-Rezeptoren (PRRs) erkannt werden und so eine IFN β Expression auslösen können. Eine weitere Beeinflussung der Initiation der Typ I IFN Expression kann durch die Aktivität des Pathogens selbst erfolgen, indem es z.B. aus membranumschlossenen Phagosomen entkommt und in das Wirtszellzytoplasma eindringt. Um dieses komplexe System so weit wie möglich zu vereinfachen, erfolgte zunächst eine Charakterisierung der IFN β Antwort nach Stimulation mit definierten PRRs Agonisten (vgl. Tabelle 2.8).

3.2.1 IFN β Induktionskinetik in knochenmarksgenerierten Zellen

Zu Beginn der Arbeit sollte der *in vitro* Verlauf der IFN β /YFP Antwort analysiert werden, um zum einen den Initiationszeitpunkt der IFN β /YFP Expression sowie den optimalen Stimulationszeitpunkt für die nachfolgenden Versuche zu bestimmen und zum anderen, um die IFN β Antwort an späten Zeitpunkten nach Stimulation zu charakterisieren. Hierzu wurden BMDMs sowie GM-CSF-DCs mit poly(I:C) stimuliert (Abb. 3.2). Poly(I:C) stellt ein Analogon zu viraler doppelsträngiger RNA (dsRNA) dar und stimuliert die IFN β Induktion über TLR3 und MDA-5 (Alexopoulou *et al.*, 2001).

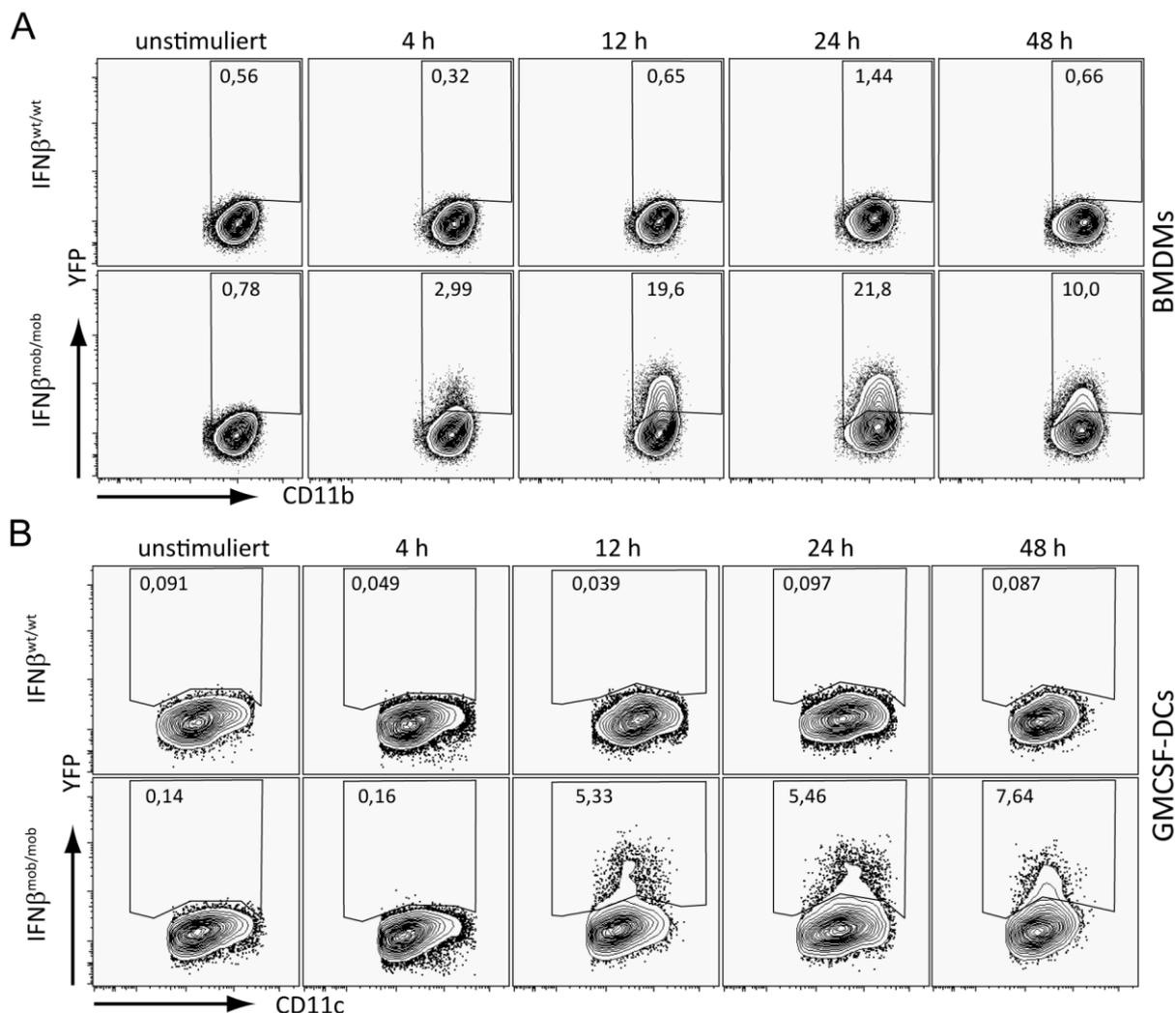


Abb. 3.2: Analyse der IFN β /YFP Expression in BMDMs und GMCSF-DCs nach poly(I:C) Stimulation
 BMDMs [A] oder GMCSF-DCs [B] von IFN β ^{wt/wt} und IFN β ^{mob/mob} Mäusen wurden über die angegebenen Zeiträume mit poly(I:C) stimuliert oder unbehandelt belassen. Der Prozentsatz an IFN β /YFP⁺ Zellen innerhalb der dargestellten Populationen wurde anhand der abgebildeten Gates bestimmt, hierbei dienen die entsprechenden IFN β ^{wt/wt} Proben als Referenz.

In BMDMs konnte die IFN β /YFP Expression in ~ 3 % der Zellen bereits 4 h nach Stimulation nachgewiesen werden, während ohne Stimulation keine Zellen für YFP positiv waren. Zum Höhepunkt der IFN β Antwort zwischen 12 und 24 h nach Stimulationsbeginn waren ~ 20 % der BMDMs YFP⁺ (Abb. 3.2 A). GMCSF-DCs induzierten IFN β im Vergleich zu BMDMs verzögert. Die Frequenz YFP⁺ DCs wuchs beginnend vom 12 h Zeitpunkt an, erreichte 48 h nach Stimulation mit ~ 8 % der Zellen den Höhepunkt und fiel über den 72 h Wert schließlich wieder ab. (Abb. 3.2 B und Daten nicht gezeigt). Dieses zeigte, dass BMDMs schneller und in größerer Anzahl als GMCSF-DCs nach poly(I:C) Stimulation IFN β exprimierten und deutete auf ein zelltypspezifisches IFN β Induktionsverhalten hin.

3.2.2 Synergistische und inhibitorische Effekte einer simultanen Stimulation mit distinkten TLR Agonisten auf die IFN β Expression

Die gleichzeitige Stimulation mit distinkten TLR Agonisten kann zu einer Inhibition oder einer synergistischen Induktion der IFN β Expression führen. Verantwortlich hierfür ist vielfach eine Interferenz der Signalwege der angesprochenen TLRs (Re und Strominger, 2004). Eine Hypothese ist, dass Stimuli, die sowohl MyD88 abhängige (alle TLRs außer TLR3) als auch MyD88 unabhängige (TLR3, TLR4) Signalwege induzieren zu einer synergistischen Zytokin-Induktion führen, während bei Aktivierung nur eines Signalweges eine Tolerisierung oder Inhibition der Immunantwort erfolgen kann (Bagchi *et al.*, 2007; Berghofer *et al.*, 2007).

Um die Auswirkung einer simultanen Stimulation mit verschiedenen TLR Agonisten im Vergleich zur Stimulation mit einem Agonisten auf die IFN β Antwort zu eruieren, wurden BMDMs und GM-CSF-DCs entweder mit einem oder gleichzeitig mit zwei verschiedenen Agonisten stimuliert und die IFN β /YFP Expression analysiert.

In BMDMs führte die Stimulation mit poly(I:C) zur höchsten Frequenz (~13 %) YFP⁺ Zellen, während LPS eine YFP Expression in ~1 % der Zellen induzierte (Abb. 3.3). Die Stimulation mit Resiquimod (R848) einem TLR7 Liganden führte ebenso wenig zu einer signifikanten Induktion von IFN β /YFP wie die Stimulation mit den TLR9 Agonisten zweier CpG Klassen. CpG 1668 ist ein Vertreter der B-Typ CpG ODNs und induziert im Gegensatz zu A-Typ CpG ODNs wie CpG 2216 in pDCs nur eine sehr schwache Typ I IFN Antwort. (Krieg *et al.*, 1995; Kerkmann *et al.*, 2003); (Abb. 3.3 A). Die simultane paarweise Applikation der Stimuli führte in den meisten Fällen weder zu einer erhöhten noch zu einer attenuierten IFN β Induktion (Abb. 3.3 A, B). Jedoch resultierte die Kombination von poly(I:C) und CpG 1668 im Vergleich zu den Einzelstimulationen in einer synergistischen Steigerung der Anzahl IFN β /YFP⁺ Zellen (~23 % YFP⁺ Zellen). Interessanter Weise trat nach der Kombination poly(I:C) und CpG 2216 eine deutliche Reduzierung der YFP Expression auf. Mit ~6 % YFP⁺ Zellen konnten hier weniger als halb so viele YFP⁺ Zellen beobachtet werden wie nach der Stimulation mit poly(I:C) allein (Abb. 3.3 B).

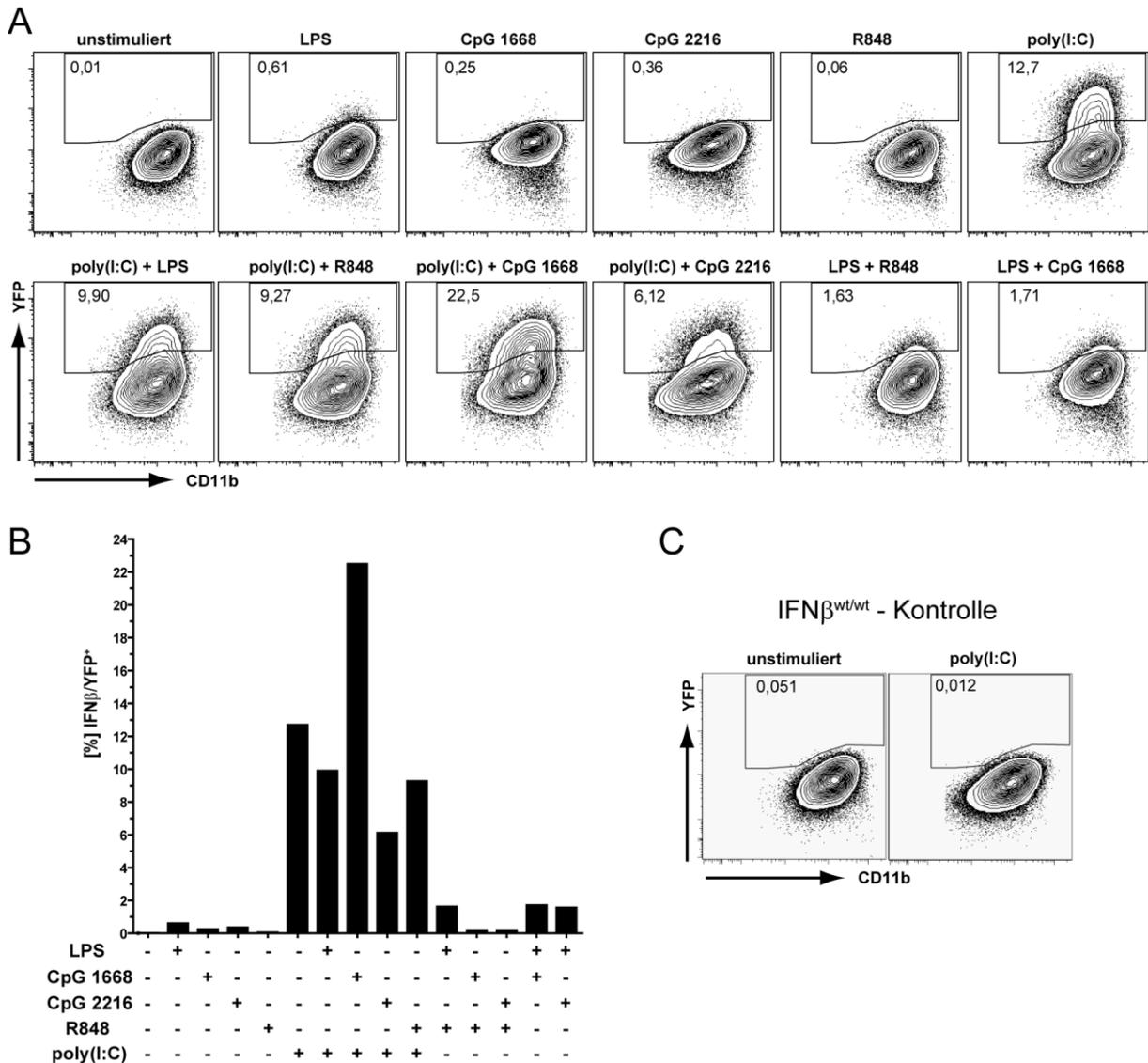


Abb. 3.3: IFNβ/YFP Expression in BMDMs nach Stimulation mit TLR-Agonisten.

BMDMs von IFNβ^{wt/wt} oder IFNβ^{mob/mob} Mäusen wurden für 24 h mit poly(I:C), CpG ODNs, LPS und R848 als Einzelstimuli oder simultan mit den angegebenen TLR-Agonisten stimuliert. [A] Resultate der Einzelstimulation sowie ausgewählter Doppelstimulationen von IFNβ^{mob/mob} BMDMs. Identisch behandelte IFNβ^{wt/wt} BMDMs [C und nicht gezeigt] dienten als Referenz zum korrekten Setzen der Auswertegates. [B] Balkendiagramm der Prozentsätze YFP⁺ Zellen innerhalb der CD11b⁺ BMDM Population nach TLR-Agonist Stimulation wie in [A].

Die Stimulation von GM-CSF-DCs mit den gleichen Agonisten führte zu einem anderen Resultat (Abb. 3.4). Die höchste Frequenz an YFP⁺ Zellen (~5 %) nach Einzel-Stimulation konnte hier mit CpG 2216 erzielt werden, gefolgt von LPS, poly(I:C) und CpG 1668 (je ~1 % YFP⁺ Zellen). Auch in GM-CSF-DCs konnte keine Induktion von IFNβ/YFP nach Applikation von R848 festgestellt werden. Eine synergistische Steigerung der Frequenz an YFP⁺ Zellen erfolgte nach simultaner Inkubation der Zellen mit poly(I:C) und CpG 2216 (~12 % YFP⁺) sowie nach Behandlung der Zellen mit LPS und einem der beiden CpG ODNs (~8 % YFP⁺ Zellen). Die Kombination von poly(I:C) und CpG 1668 führte, anders als in BMDMs, nicht zu einer erhöhten Frequenz an YFP⁺ Zellen. Das TLR-Agonisten-Paar R848 und CpG

2216 zeigte eine Inhibition der IFN β Produktion im Vergleich zur Stimulation mit CpG 2216 allein (Abb. 3.4 A, B).

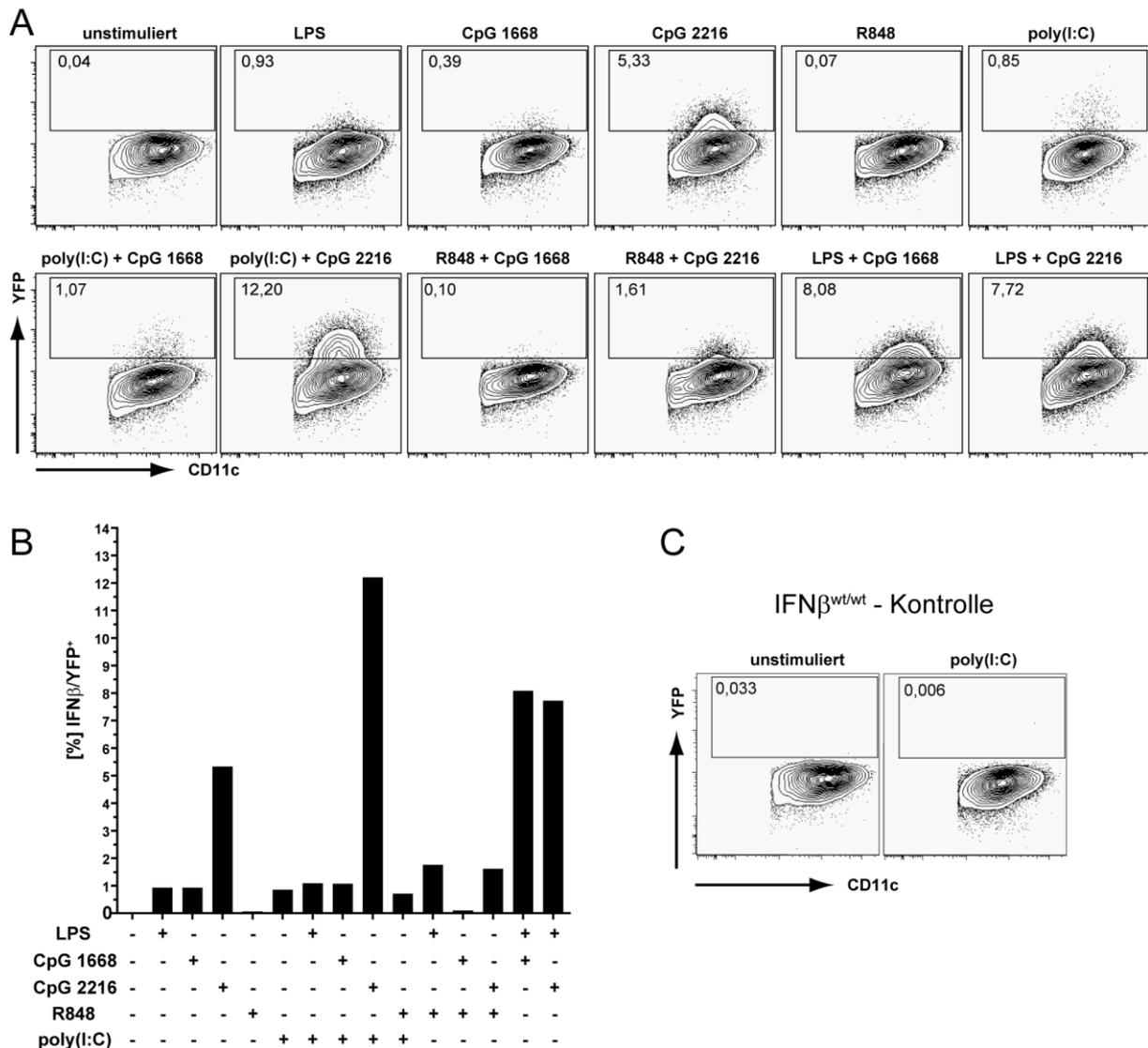


Abb. 3.4: IFN β /YFP Expression in GMCSF-DCs nach Stimulation mit TLR- Agonisten

GMCSF-DCs von IFN $\beta^{wt/wt}$ oder IFN $\beta^{mob/mob}$ Mäusen wurden für 24 h analog zu Abb. 3.3 stimuliert. Angegeben ist die Frequenz YFP⁺ Zellen in den gezeigten Populationen bezogen auf das gesetzte Auswerte-Gate. Als Referenz dienen identisch behandelte IFN $\beta^{wt/wt}$ Zellen.

Sowohl in BMDMs als auch in GMCSF DCs induzierte die kombinierte Aktivierung von MyD88 abhängigen und MyD88 unabhängigen Signalwegen eine synergistische IFN β Expression. Die *in vitro* generierten Zelltypen unterschieden sich jedoch deutlich in ihrer Antwort auf die verschiedenen Agonisten. Dieses zeigte, dass BMDMs und GMCSF-DCs die PRR Agonisten-Stimulation auf zelltypspezifische Weise integrierten und in Abhängigkeit des Stimulationsprofils eine distinkte IFN β Antwort induzierten.

3.2.3 Stimulation von Flt3L-DCs induziert eine dichotome IFN β Antwort

Plasmazytoide Dendritische Zellen (pDCs) stellen den Prototypen einer Typ I IFN sekretierenden Zelle dar. *In vitro* lassen sich pDCs durch Kultur von Knochenmarkszellen in Medium mit Flt3L (fms-like tyrosine kinase 3 Ligand) generieren. Am Ende der Flt3L induzierten Zelldifferenzierung wird eine heterogene DC Mischpopulation (Flt3L-DCs) erhalten, die in etwa zu gleichen Anteilen aus B220⁺ CD11b⁻ pDCs und B220⁻ CD11b⁺ konventionellen DCs (cDCs) besteht (Naik *et al.*, 2005; Gilliet *et al.*, 2002). Zur *in vitro* Charakterisierung der IFN β Antwort in pDCs wurden Flt3L-DCs mit verschiedenen TLR Agonisten entweder direkt oder nach Komplexierung mit DOTAP bzw. Fugene HD stimuliert (Abb. 3.5).

Bemerkenswerter Weise zeigte sich nach Stimulation zwischen den pDCs und cDCs der Flt3L Kultur eine dichotome Verteilung der IFN β Expression. Während LPS (~1 % YFP⁺ Zellen) und poly(I:C) (~2 % YFP⁺ Zellen) ausschließlich in einer Subpopulation der B220⁻ CD11b⁺ cDCs IFN β /YFP induzierte, konnte nach Applikation des B-Typ ODN CpG 1668 (~1 % YFP⁺) und vor allem des A-Typ ODN CpG 2216 (~5 % YFP⁺) eine IFN β Expression vorwiegend in Zellen der B220⁺ CD11b⁻ pDC Fraktion beobachtet werden (Abb. 3.5 A). Zur spezifischen Transfektion endosomaler Zellkompartimente wurden beide CpG ODNs mit DOTAP komplexiert. Es konnte hier im Vergleich zur Stimulation mit unkomplexiertem CpG 1668 bzw. CpG 2216 eine 10- bzw. 2-fache Steigerung der YFP⁺ Zellfrequenz und ein deutlicheres Auftreten der Dichotomie beobachtet werden. Die Fugene HD basierte Zelltransfektion von Flt3L-DCs mit poly(I:C) bzw. Imiquimod zeigte ebenfalls eine Dichotomie in der IFN β Antwort. Im Gegensatz zu poly(I:C) (~2 % YFP⁺ cDCs) induzierte Imiquimod IFN β /YFP exklusiv in der B220⁺ pDC Zellfraktion (~1 % YFP⁺); (Abb. 3.5 B).

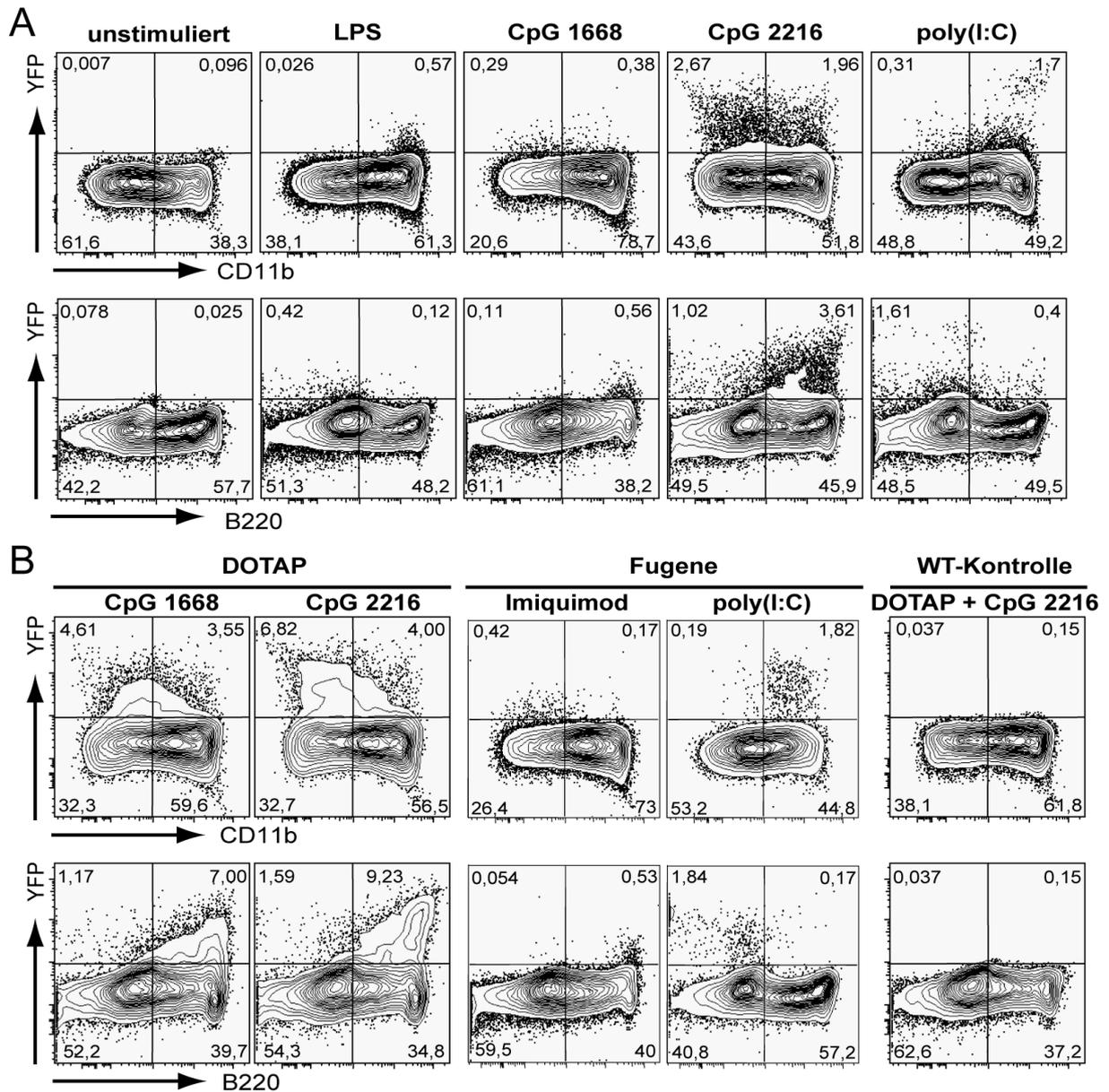


Abb. 3.5: Analyse der IFN β /YFP Expression in TLR-Agonist stimulierten Flt3L-DCs
 Flt3L-DCs von IFN $\beta^{wt/wt}$ und IFN $\beta^{mob/mob}$ Mäusen wurden für 24 h mit poly(I:C), CpG ODNs, LPS und Imiquimod stimuliert [A]. Zur Transfektion von Flt3L-DCs wurden CpG ODNs, Imiquimod oder poly(I:C) mit DOTAP bzw. Fugene HD gemischt und die Zellen für 24 h stimuliert [B]. Als Referenz für das korrekte Platzieren der Auswertquadranten dient die entsprechenden IFN $\beta^{wt/wt}$ Proben (gezeigt für DOTAP + CpG 2216).

Dieses Experiment zeigte, dass distinkte TLR Agonisten eine IFN β Antwort in verschiedenen DC Typen aktivierten. TLR7 und 9 Liganden induzierten IFN β vorwiegend in pDCs, während TLR3 und 4 Agonisten eine Reaktion in der cDC Fraktion generierten.

3.2.4 Charakterisierung der IFN β Antwort nach PAMP Stimulation *in vivo*

Zur Analyse der Initiation der Typ I IFN Antwort *in vivo* erfolgte eine systemische Stimulation von IFN $\beta^{mob/mob}$ Mäusen mit dem TLR3/MDA-5 Liganden poly(I:C) und dem TLR9 Liganden CpG 1668.

Neben der robusten *in vitro* Induktion von IFN β /YFP durch diese Stimuli, legte speziell die dichotome IFN β Antwort in Flt3L-DC eine *in vivo* Gegenüberstellung dieser Stimuli nahe (Abb. 3.6).

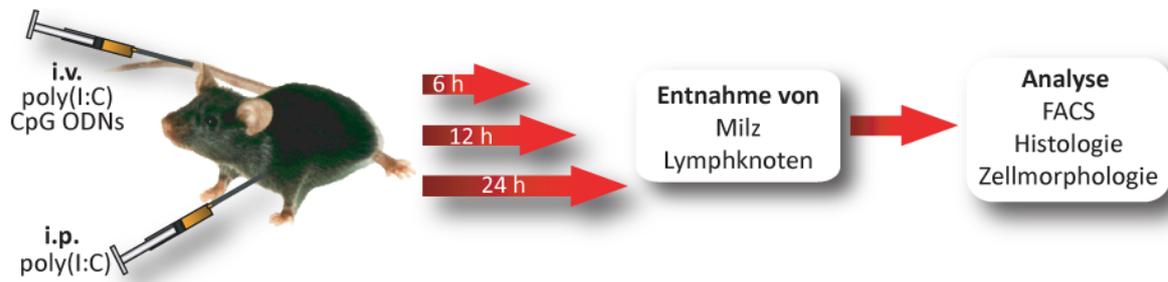


Abb. 3.6: Schematische Darstellung der Experimente zur *in vivo* Analyse der IFN β Antwort

6, 12 und 24 h nach intravenöser (i.v.) Injektion von poly(I:C) bzw. CpG ODNs über die laterale Schwanzvene oder intraperitonealer (i.p.) Injektion von poly(I:C) erfolgte die Charakterisierung IFN β produzierender Zellen in den drainierenden sekundären lymphatischen Organen. Neben der FACS-basierten Zellmarker-Analyse erfolgte durch Mikroskopie immunhistologischer Färbungen eine Lokalisation der YFP $^+$ Zellen in den Organen sowie eine zellmorphologische Charakterisierung aufgereinigter YFP $^+$ Zellen.

3.2.4.1 Hauptsächlich CD8 α^+ cDCs exprimieren IFN β nach poly(I:C) Stimulation

Bereits 6 h nach i.v. oder i.p. Injektion von poly(I:C) konnten YFP $^+$ Zellen in der Milz und den Lymphknoten (LN) von IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ Mäusen, jedoch nicht in stimulierten IFN $\beta^{\text{wt/wt}}$ bzw. naiven IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ Mäusen nachgewiesen werden (Abb. 3.7 bzw. Abb. 3.11) Obwohl die Frequenz an IFN β /YFP $^+$ Zellen im Verlauf der Stimulation über 12 und 24 h zunahm, blieb die Zellmarker-Verteilung der analysierten YFP $^+$ Zellen konstant (Daten nicht gezeigt). Unabhängig von der Applikationsroute konnten 12 h nach poly(I:C) Stimulation $\sim 1\%$ YFP $^+$ Zellen in der CD3 ϵ^- CD19 $^-$ Splenozyten-Population beobachtet werden. Dieses entsprach bezogen auf die gesamte Milz $\sim 10^5$ YFP $^+$ Zellen (Abb. 3.7 A). Die IFN β produzierenden Zellen waren zum überwiegenden Teil CD11c $^+$ und zeigten einen CD8 α^+ CD11b $^-$ CD4 $^-$ Phänotyp. Hierdurch konnten diese Zellen konventionellen Dendritischen Zellen zugeordnet werden. Eine Abgrenzung zu pDCs bzw. zu Natürlichen Killer (NK)-Zellen, (NK)T-Zellen und IFN produzierenden Killer DCs erfolgte durch Analyse der Expression von BST2 (mPDCA-1) und CD45R (B220) bzw. des Integrins CD49b (DX5) (Abb. 3.7 bzw. Daten nicht gezeigt). Der zur Identifikation von pDCs genutzte Zellmarker mPDCA-1 (mouse plasmacytoid DC antigen 1) war insofern problematisch, als dass er unter naiven Bedingungen nur auf CD11c $^{\text{int}}$ Ly6C $^+$ B220 $^+$ pDCs, jedoch nach Stimulation unter anderem auch auf cDCs verstärkt exprimiert wird (Teixeira *et al.*, 2010; Bochtler *et al.*, 2008). Durch Zurückgaten der IFN β /YFP $^+$ Zellen und Analyse ihrer CD11c-mPDCA-1 Marker-Verteilung konnten die YFP $^+$ Zellen zweifelsfrei als cDCs (CD11c $^{\text{hi}}$) identifiziert und von *bona fide* pDCs (CD11c $^{\text{int}}$) unterschieden werden (Abb. 3.7 B).

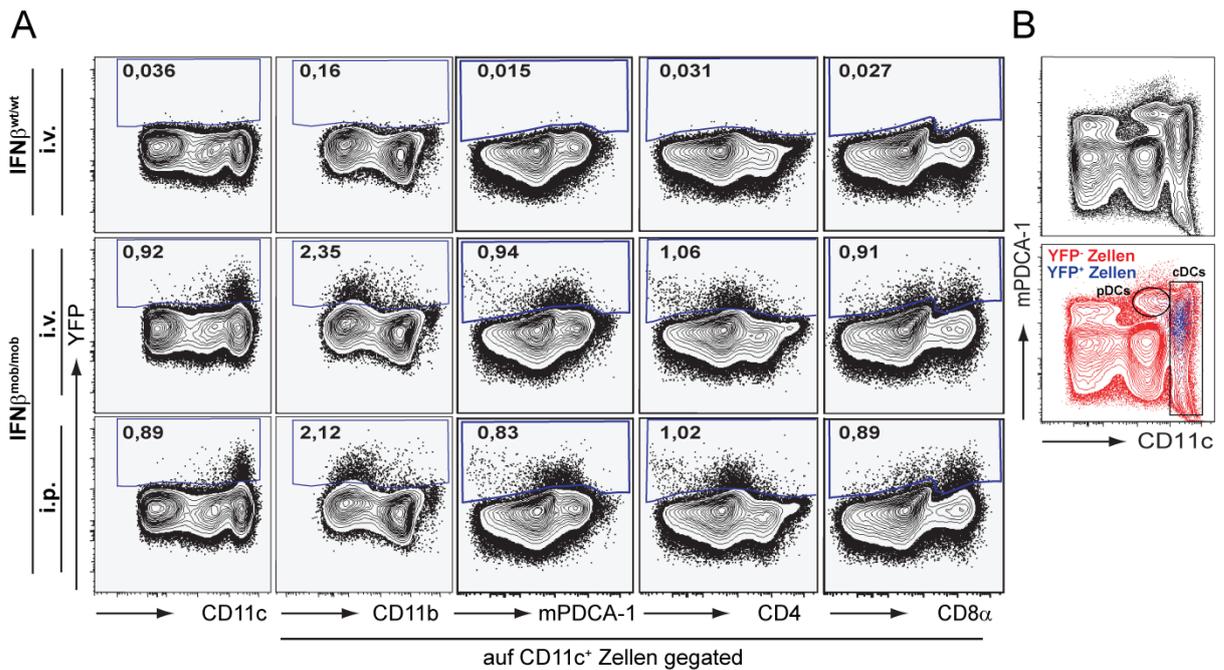


Abb. 3.7: FACS Charakterisierung der IFN β Produzenten nach poly(I:C) Injektion in der Milz
 IFN $\beta^{mob/mob}$ oder IFN $\beta^{wt/wt}$ Mäuse wurden für 12 h mit poly(I:C) i.v. oder i.p. stimuliert. [A] In den gezeigten FACS-Plots der Milz wurde die IFN β /YFP Expression gegen die angegebenen Zellmarker analysiert. Das Analysegate der YFP⁺ Zellen wurde der entsprechenden IFN $\beta^{wt/wt}$ Referenz angepasst. [B] Darstellung der cDC und pDC Verteilung in der Milz einer IFN $\beta^{mob/mob}$ Maus nach i.v. Applikation von poly(I:C). YFP⁺ Zellen (blau) wurden den übrigen YFP⁻ Zellen (rot) überlagert.

Die durchflusszytometrische Analyse der LN von IFN $\beta^{mob/mob}$ Mäusen 12 h nach poly(I:C) Stimulation erbrachte ein vergleichbares Resultat. Auch hier konnte die überwiegende Mehrheit der IFN β /YFP⁺ Zellen CD11c^{hi} CD11b⁻ CD8 α ⁺ cDCs zugeordnet werden (Abb. 3.8).

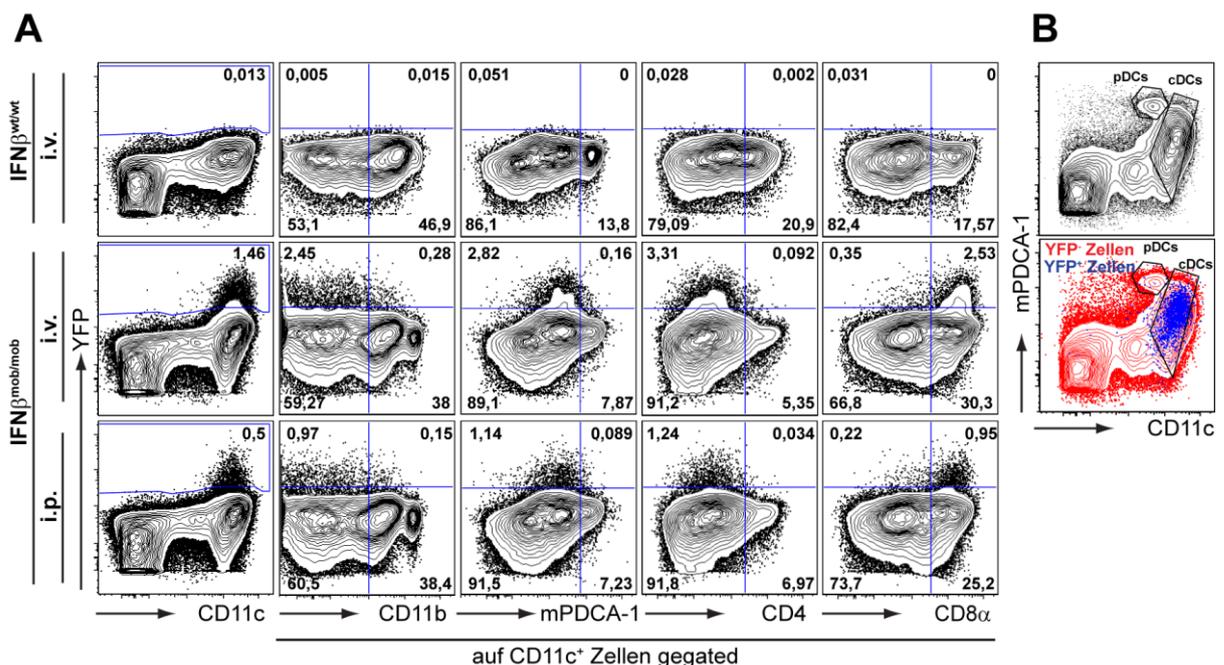


Abb. 3.8: FACS Analyse der IFN β ⁺ Zellen nach poly(I:C) Injektion in den LN
 Die Stimulation der Mäuse mit poly(I:C) und die Analyse der FACS-Plots erfolgte wie in Abb. 3.7 beschrieben.

Neben cDCs, die ~80 % der IFN β produzierenden Zellen in der Milz darstellten, konnte eine weitere YFP⁺ Zellfraktion beobachtet werden, welche ein niedrigeres CD11c Expressionsniveau aufwies und im Gegensatz zu den YFP⁺ cDCs kein CD8 α exprimierte. Um diese Zellen phänotypisch zu charakterisieren, wurden Vielfarben-FACS Analysen durchgeführt, die einen genaueren Vergleich von Zellpopulation miteinander ermöglichen. Darüber hinaus wurden YFP⁺ Zellen beider Populationen mit über 98 % Reinheit FACS sortiert (Daten nicht gezeigt) und zur Beurteilung der Zellmorphologie nach Zentrifugation auf Objektträger Eosin-G/Azur-B gefärbt (Abb. 3.9). Zellmorphologisch konnten die Zellen beider Populationen jedoch nicht unterschieden werden. Sie zeigten einen runden bis bohnenförmigen Nukleus der von relativ wenig Zytoplasma umgeben war. Teilweise konnten auch Zellfortsätze beobachtet werden (Abb. 3.9 B). Während die IFN β produzierende cDC Population in hohem Maße kostimulatorische Moleküle (CD40, CD86) bzw. MHC Klasse II (I-A^b) auf der Zelloberfläche exprimierte, fehlten diese Marker auf den Zellen der YFP⁺ Nebenpopulation. Allerdings exprimierten diese Zellen das Glykoprotein F4/80, das im Wesentlichen auf Gewebemakrophagen beschränkt ist. Interessanterweise ist es auch auf einigen DC Sub-Populationen zu finden (Leenen *et al.*, 1998). Da auf den meisten Zellen der YFP⁺ Nebenpopulation weder CD8 α noch das Integrin CD11b detektiert werden konnte, ließ sich zusammenfassend deren Oberflächenmarker-Phänotyp als CD11c^{int} CD11b⁻ CD8 α ⁻ F4/80⁺ und MHC-II⁻ beschreiben (Abb. 3.9 C).

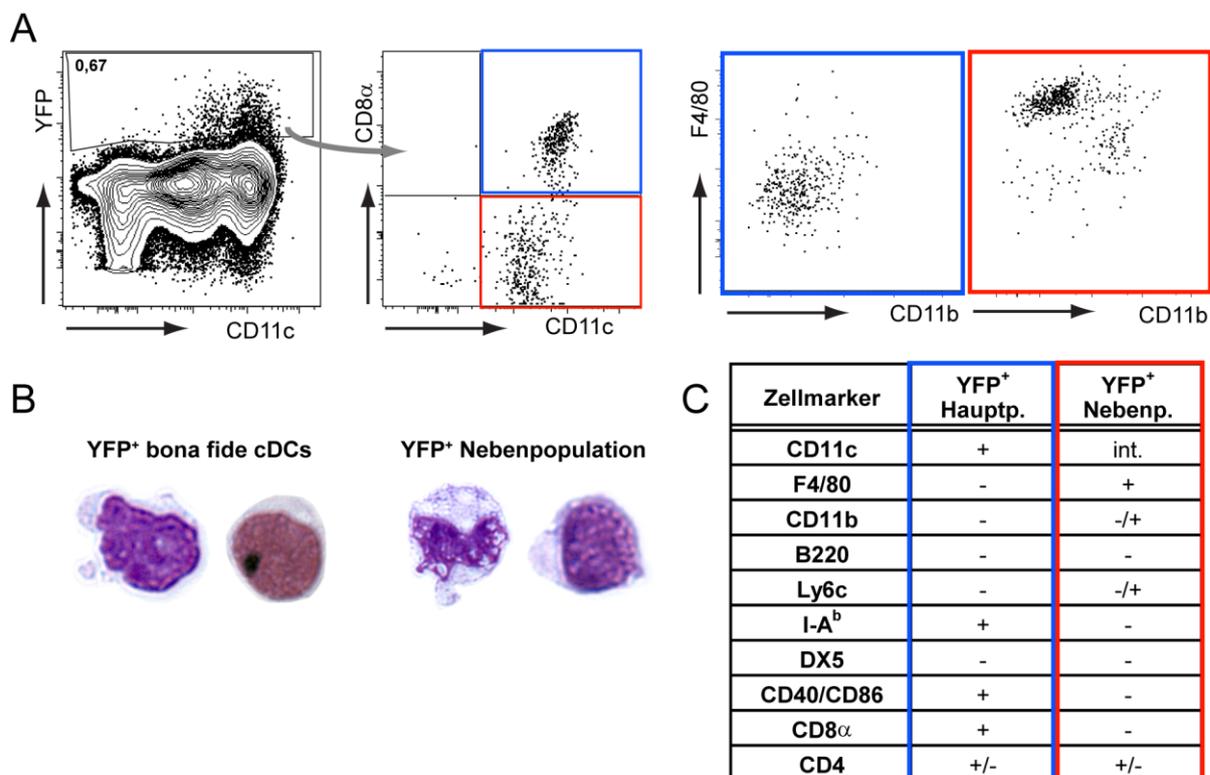


Abb. 3.9: Vergleichende Analyse von IFN β ⁺ Zellpopulationen in der Milz nach poly(I:C) Stimulation

IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ Mäuse wurden wie beschrieben für 12 h mit poly(I:C) i.v. stimuliert. [A] Die Splenozyten wurden durchflusszytometrisch auf Expression von YFP untersucht und die YFP $^+$ Zell-Populationen anhand der gefärbten Zellmarker charakterisiert. YFP $^+$ Zellen (links) wurden durch Analyse der Zelloberflächenexpression von CD11c und CD8 α in zwei Populationen aufgeteilt. Diese wurden in den weiteren FACS-Plots blau (YFP $^+$ Hauptpopulation) bzw. rot (YFP $^+$ Nebenpopulation) umrandet dargestellt. [B] Zellen beider IFN β /YFP $^+$ Populationen wurden FACS sortiert und nach Zytospin mit einem Eosin-G/Azur-B Färbekit gefärbt und mit 100-facher Objektivvergrößerung mikroskopiert. [C] Oberflächenmarkerverteilung der untersuchten Populationen. int.= intermediär; +/- = uneinheitliche Expression

Immunhistologisch konnten die IFN β /YFP $^+$ Zellen 6 h nach i.p. (Daten nicht gezeigt) und i.v. Injektion von poly(I:C) überwiegend in der roten Pulpa der Milz bzw. dem Paracortex und subkapsulären Sinus der peripheren und mesenterialen Lymphknoten nachgewiesen werden (Abb. 3.10). Während die Lokalisierung der YFP $^+$ Zellen in den Lymphknoten konstant blieb, konnte in der Milz über 12 und 24 h eine Akkumulierung der IFN β produzierenden Zellen um die Marginalzone und ein Auftreten an der T-/B-Zellgrenze der weißen Pulpa beobachtet werden.

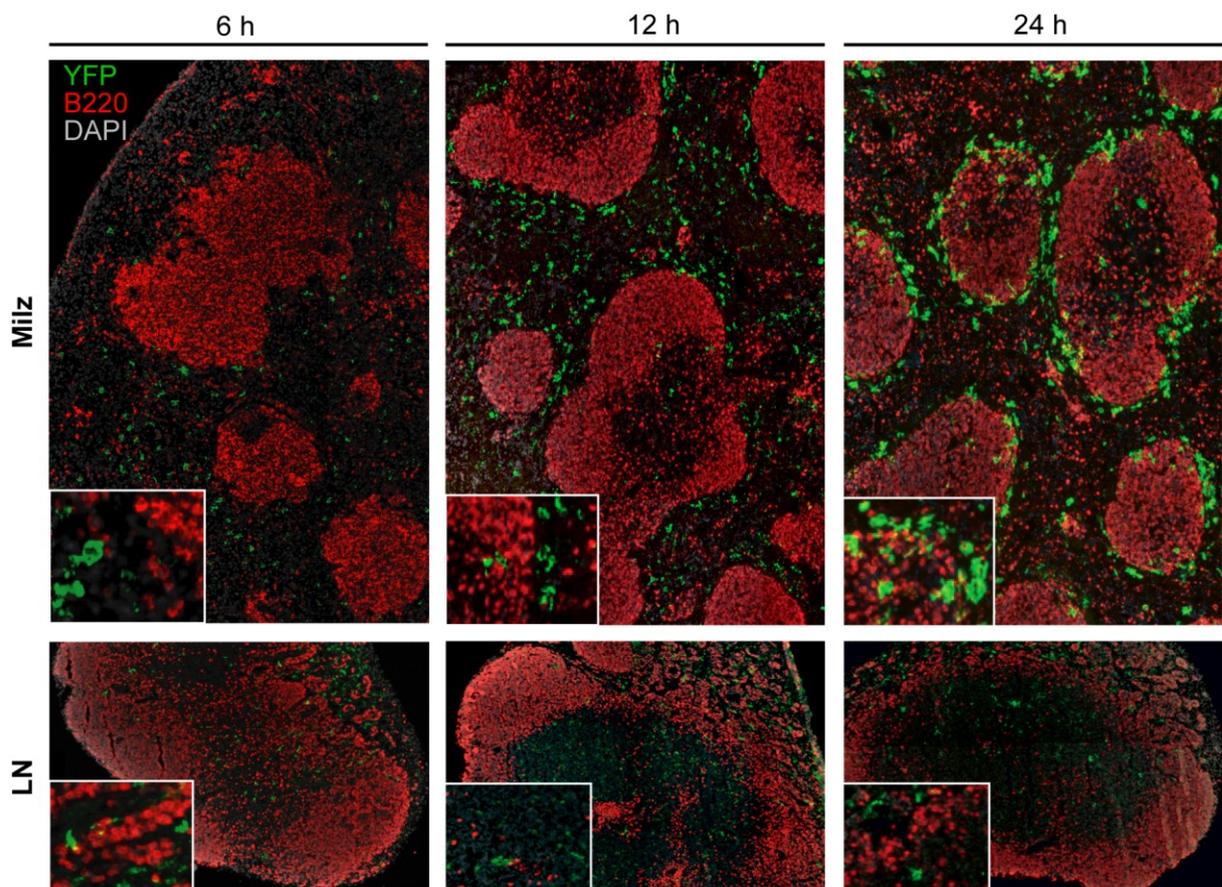


Abb. 3.10: Lokalisierung von IFN β /YFP $^+$ Zellen in Milz und LN nach i.v. Injektion von poly(I:C) IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ Mäuse wurden durch i.v. Injektion von poly(I:C) stimuliert. Gewebeschnitte von Organen wurden mit einem kreuzreagierenden, polyklonalen α -GFP Serum gegen YFP $^+$ Zellen gefärbt. B220 $^+$ Zellen wurden mit α -B220-bio gefärbt. Die Signale wurden mit Tyramid-FITC für YFP bzw. Tyramid-bio und Streptavidin-Cy3 für B220 verstärkt. Nuklei wurden mit DAPI angefärbt. Als Färbekontrollen dienten über sämtliche Bearbeitungsschritte identisch behandelte IFN $\beta^{\text{wt/wt}}$ Mäuse.

In $\text{IFN}\beta^{\text{wt/wt}}$ oder naiven $\text{IFN}\beta^{\text{mob/mob}}$ Mäusen konnte kein YFP Signal detektiert werden (Abb. 3.11).

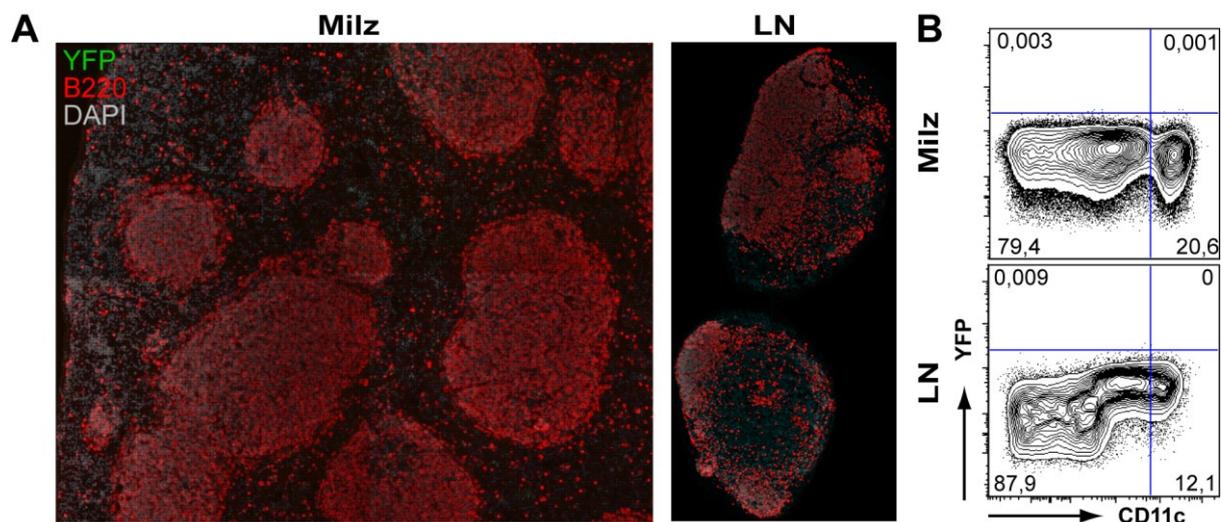


Abb. 3.11: Analyse der $\text{IFN}\beta/\text{YFP}$ Expression in naiven $\text{IFN}\beta^{\text{mob/mob}}$ Mäusen

Milz und LN von naiven $\text{IFN}\beta^{\text{mob/mob}}$ Mäusen wurden immunhistologisch [A] und durchflusszytometrisch [B] auf Expression von $\text{IFN}\beta/\text{YFP}$ untersucht. [A] 6-7 μm dicke Längsschnitte wurden wie beschrieben gefärbt. [B] FACS-Plots von Zellen der Milz und LN, gegatet auf lebende Zellen.

Die Marginalzone der Milz bildet eine Grenzschicht zwischen der roten und weißen Pulpa und ist reich an Makrophagen, die mit Hilfe von PRRs und Scavenger Rezeptoren zur Beseitigung von Pathogenen aus dem Blut beitragen (vgl. Abb. 1.1); (Mebius und Kraal, 2005; Gordon und Taylor, 2005). Marginalzonen-Makrophagen bilden den äußeren Ring der Marginalzone und lassen sich durch Färbung des Lektins ER-TR9 (SIGN-R1) visualisieren. Metallophile Makrophagen befinden sich angrenzend an die weiße Pulpa und bilden so den inneren Ring der Marginalzone. Sie lassen sich durch Färben von Siglec-1 (Sialinsäure bindenden Immunglobulin ähnlichem Lektin) mit dem monoklonalen Antikörper MOMA-1 von anderen Makrophagen der Milz unterscheiden. Zwischen diesen beiden Ringen aus Makrophagen liegt der durch das Erdnuss-Agglutinin (PNA) darstellbare Marginal-Sinus sowie Marginalzonen B-Zellen und DCs. In Lymphknoten werden Makrophagen im subkapsulären Sinus und in den medullären Strängen durch MOMA-1 und ER-TR9 detektiert (Kraal und Janse, 1986; Kang *et al.*, 2003).

Aufgrund der beobachteten Akkumulation $\text{IFN}\beta/\text{YFP}^+$ Zellen im Bereich der Marginalzone der Milz, wurde durch Anfärben der Marginalzonen-Makrophagen bzw. der metallophilen Makrophagen eine genauere Lokalisierung der $\text{IFN}\beta$ produzierenden Zellen ermöglicht (Abb. 3.12). 24 h nach poly(I:C) Stimulation befanden sich die YFP^+ Zellen außerhalb des Ringes MOMA-1⁺ metallophiler Makrophagen und des PNA⁺ Marginal-Sinus der Milz (Abb. 3.12 A bzw. Daten nicht gezeigt). Vielmehr konnte eine 12 h nach Stimulation einsetzende Akkumulation YFP^+ Zellen im Ring der ER-TR9⁺ Marginalzonen-

Makrophagen beobachtet werden (Abb. 3.12 B). In den Lymphknoten lokalisierte ein Teil der YFP⁺ Zellen in dem Bereich des subkapsulären Sinus, in dem sich ebenfalls MOMA-1⁺ bzw. ER-TR9⁺ Makrophagen befanden (Abb. 3.12).

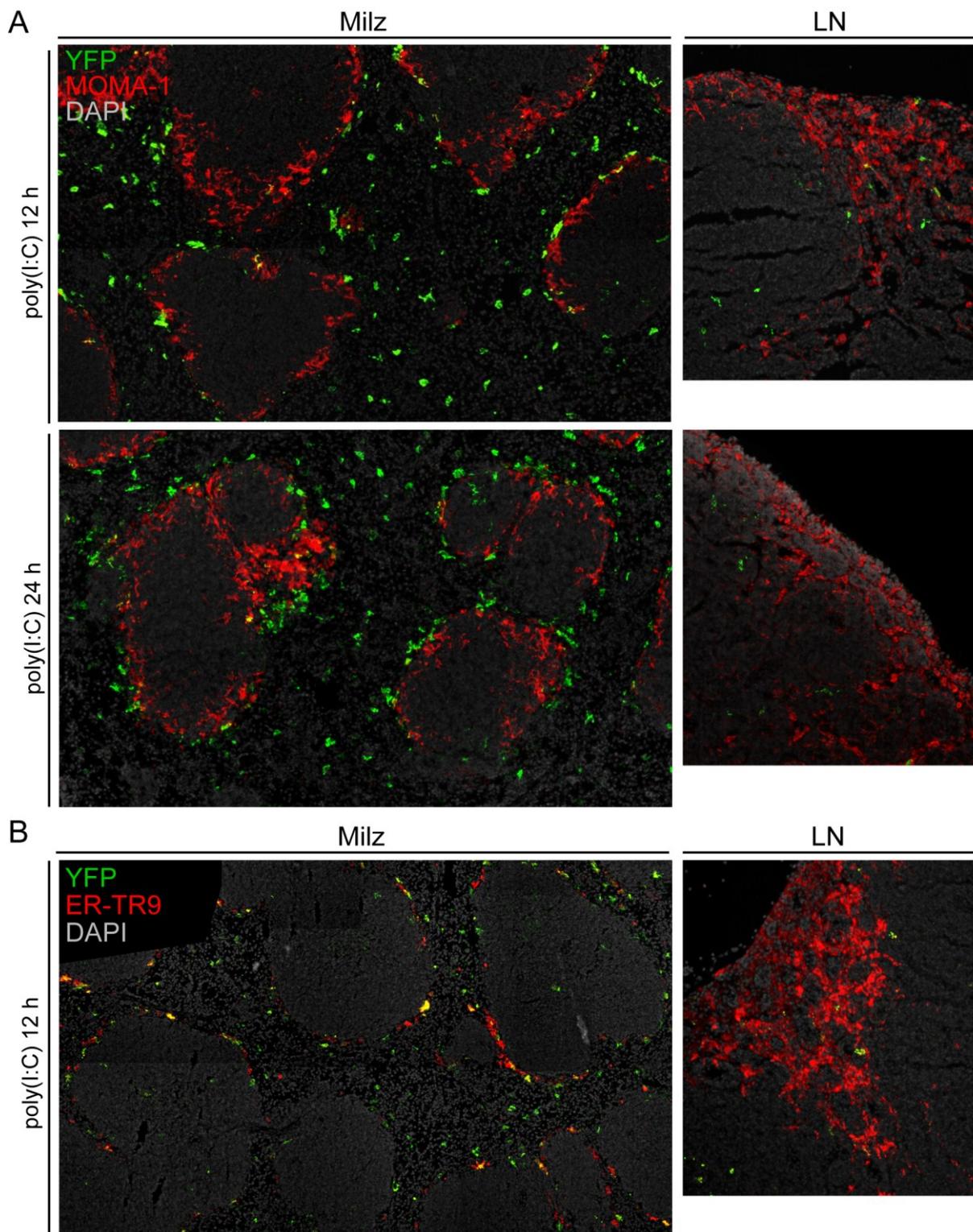


Abb. 3.12: Lokalisation von IFN β /YFP⁺ Zellen in Relation zu MOMA-1⁺ und ER-TR9⁺ Makrophagen

Die dargestellten Organschnitte von IFN β ^{mob/mob} Mäusen nach i.v. poly(I:C) Injektion wurden wie beschrieben für YFP gefärbt. MOMA-1 [A] bzw. ER-TR9 [B] wurde mit einem Ratte- α -MOMA-1 bzw. α -ER-TR9-bio Antikörper detektiert und mit α -Ratte-Cy3 bzw. Tyramid-bio und Streptavidin-Cy3 gegengefärbt. Nuklei wurden mit DAPI gefärbt.

Nach *in vivo* poly(I:C) Stimulation stellte eine Subpopulation cDCs den Hauptanteil der IFN β produzierenden Zellen dar. Diese Zellen befanden sich in der T-Zell Zone und dem subkapsulären Sinus der Lymphknoten bzw. relokalisieren in der Milz im Laufe der Stimulation von der roten Pulpa in den Bereich der Marginalzonen-Makrophagen und der T-Zell Areale der weißen Pulpa.

3.2.4.2 pDCs sind die IFN β Produzenten nach CpG ODN Stimulation *in vivo*

Zur Charakterisierung der frühen Typ I IFN Antwort nach Injektion von CpG ODNs wurde die Induktion von YFP⁺ Zellen nach *in vivo* Applikation von CpG 1668 sowie CpG 2216 getestet. DOTAP komplexiertes CpG 1668 induzierte die robusteste IFN β Antwort und wurde daher für die weiteren Versuche verwendet (Daten nicht gezeigt). In der Milz erhöhte sich im Laufe der Stimulation der Anteil der YFP⁺ Zellen von ~0,5 % (6 h) auf ~0,7 % (12 h) gegattet auf nicht B/T-Zellen und verringerte sich 24 h nach Stimulation schließlich auf ~0,05 % (Abb. 3.13 und Daten nicht gezeigt). In den Lymphknoten konnte zu allen analysierten Zeitpunkten nur eine sehr geringe Frequenz IFN β produzierender Zellen festgestellt werden. Über den Stimulationsverlauf blieb der Phänotyp der YFP⁺ Zellen identisch, weshalb hier repräsentativ der 12 h Zeitpunkt dargestellt wurde (Abb. 3.13).

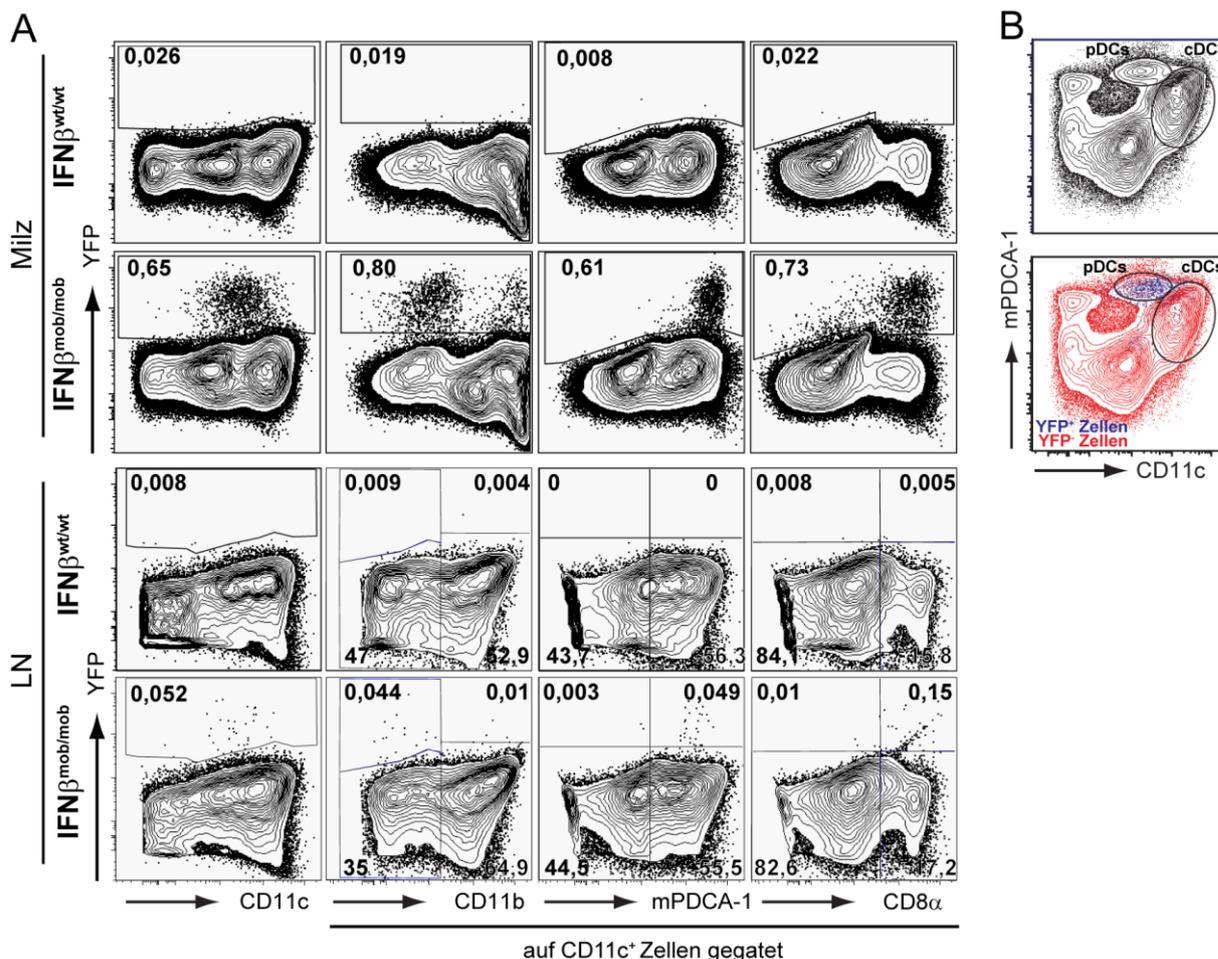


Abb. 3.13: FACS Charakterisierung der IFN β Produzenten nach *in vivo* CpG 1668 Stimulation

IFN $\beta^{mob/mob}$ oder IFN $\beta^{wt/wt}$ Mäuse wurden i.v. für 12 h mit DOTAP komplexiertem CpG 1668 stimuliert. [A] Dargestellt sind FACS-Plots von Milz und LN. Das Setzen der Analysegates erfolgte gemäß der IFN $\beta^{wt/wt}$ Referenzen. [B] FACS Plots von IFN $\beta^{mob/mob}$ Milzzellen nach CD11c und mPDCA-1 Färbung (oben). YFP⁺ Zellen (blau) gated wie unter [A] wurden den YFP⁻ Zellen (rot) überlagert (unten).

12 h nach CpG 1668 Stimulation konnten in der Milz YFP⁺ Zellen exklusiv im nicht B-/T-Zell Kompartiment festgestellt werden. Hochgerechnet auf die Gesamtzellzahl einer Milz ($\sim 10^8$ Zellen) produzierten etwa 5×10^4 Zellen IFN β . Die Mehrheit der IFN β /YFP⁺ Zellen in Milz und Lymphknoten zeigte eine intermediäre Expression von CD11c sowie eine starke Expression des pDC Markers mPDCA-1 und CD8 α (Abb. 3.13 A). Daneben exprimierten die YFP⁺ Zellen zum einen B220 (Daten nicht gezeigt) und wiesen zum anderen die für *bona fide* pDCs typische Lage innerhalb der CD11c-mPDCA-1 Verteilung auf (Abb. 3.13 B). Hierdurch konnten die IFN β produzierenden Zellen als aktivierte pDCs identifiziert werden. Markanter Weise exprimierten $\sim 20\%$ der YFP⁺ mPDCA-1⁺ Zellen das Integrin CD11b, welches normalerweise nicht auf pDCs zu finden ist (Abb. 3.13 A, Abb. 3.14). Aus diesem Grund erfolgte eine weitergehende histologische und durchflusszytometrische Charakterisierung dieser YFP⁺ Nebenpopulation (Abb. 3.14).

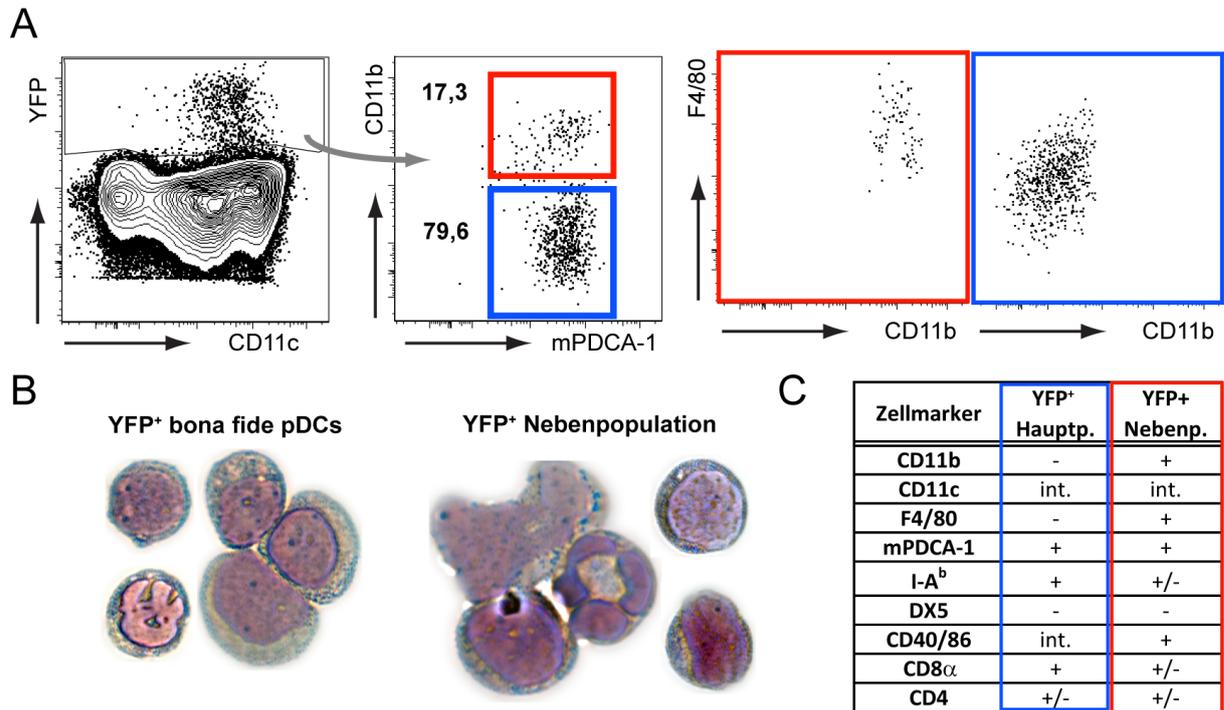


Abb. 3.14: Vergleichende Analyse von IFN β ⁺ Zellpopulationen in der Milz nach CpG Stimulation
 IFN β ^{mob/mob} Mäuse wurden für 12 h mit DOTAP komplexiertem CpG 1668 stimuliert. Die Splenozyten wurden analog zu Abb. 3.9 analysiert.

Ähnlich zu der Charakterisierung IFN β exprimierender Zellen nach *in vivo* poly(I:C) Stimulation (Abb. 3.9), konnten auch nach CpG Stimulation morphologisch keine Unterschiede zwischen der YFP⁺ Haupt- und Nebenpopulation festgestellt werden (Abb. 3.14 C). Neben der erhöhten Expression der Aktivierungsmarker CD40 und CD86 sowie von CD11b konnte, analog zu der YFP⁺ Nebenpopulation nach poly(I:C) Stimulation, eine Expression von F4/80 nachgewiesen werden. Da kein Zelltyp mit dem beschriebenen Marker-Expressionsprofil bekannt war, konnte keine eindeutige Identifizierung der YFP⁺ Nebenpopulation erfolgen.

Im histologischen Kontext konnten YFP⁺ Zellen nach CpG 1668 Stimulation an der T-/B-Zell Grenze in der weißen Pulpa der Milz und der LN beobachtet werden (Abb. 3.15). Die Koexpression von B220 auf den YFP⁺ Zellen deutete ebenfalls auf pDCs als IFN β Produzenten hin. Im Gegensatz zu der Situation nach poly(I:C) Stimulation, blieb die Lokalisierung der YFP⁺ Zellen nach CpG Applikation konstant.

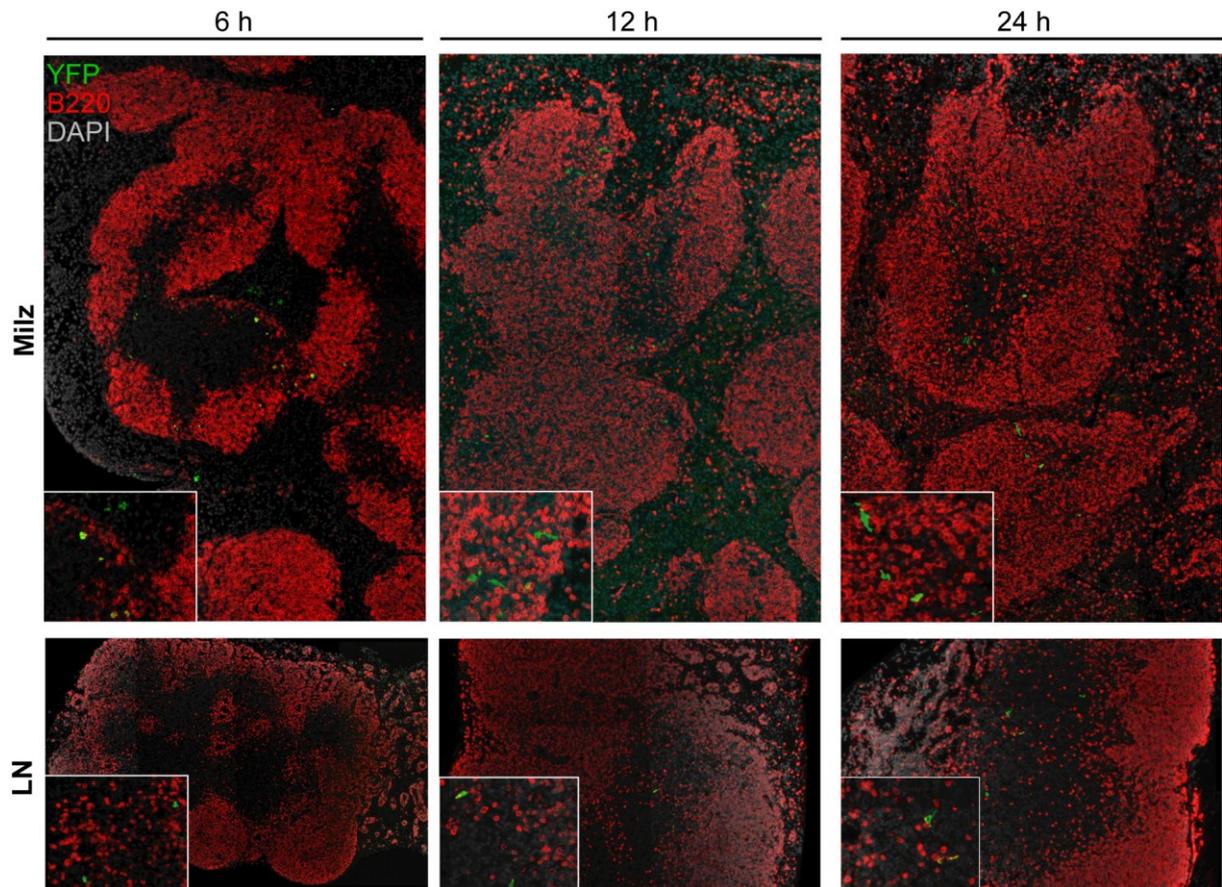


Abb. 3.15: Lokalisierung von IFN β /YFP⁺ Zellen in Milz und LN nach i.v. Injektion von CpG 1668
 Lokalisation von YFP⁺ Zellen in der Milz und in LN 6, 12 und 24 h nach i.v. Injektion von DOTAP komplexiertem CpG 1668 in IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ Mäusen. Die immunhistochemischen Färbungen erfolgten analog zu Abb. 3.10.

IFN β wurde nach *in vivo* CpG Stimulation hauptsächlich von *bona fide* pDCs exprimiert, die in den T-Zell Zonen sekundärer lymphatischer Organe lokalisiert waren. Die *in vivo* nachgewiesene Aufteilung der IFN β Produktion zwischen cDCs und pDCs nach poly(I:C) und CpG Stimulation reflektiert in treffender Weise den *in vitro* Befund der dichotomen IFN β Expression in Flt3L-DCs.

3.3 Differentielle Analyse von IFN β ⁺ und IFN β ⁻ pDCs mittels eines Maus Genom Mikro-Arrays

In allen bisher durchgeführten Experimenten - sei es nach Stimulation von *in vitro* generierten Zellen oder nach systemischer *in vivo* Stimulation mit definierten TLR Agonisten - konnte immer nur eine kleine Sub-Population an Zellen eines bestimmten Phänotyps beobachtet werden, die zur Produktion von IFN β in der Lage waren. Es ist unklar durch welche Faktoren sich bis auf die Produktion von IFN β identische Zellen auf transkriptioneller Ebene voneinander unterscheiden. Aus diesem Grund wurden aus den Milzen von IFN β ^{mob/mob} Mäusen 6 h nach systemischer Stimulation mit CpG 1668 *bona fide* YFP⁺ und YFP⁻ pDCs aufgereinigt, die gesamtzelluläre RNA beider Populationen isoliert und hiermit in Zusammenarbeit mit der Fa. Miltenyi Biotec ein Maus-Genom Mikro-Array durchgeführt (Abb. 3.16). Zur Zellaufreinigung wurde ein FACS Aria I System etabliert und durch stringente Zellsortierstrategien eine hohe Reinheit (> 98 %) der FACS sortierten Zellpopulationen sichergestellt.

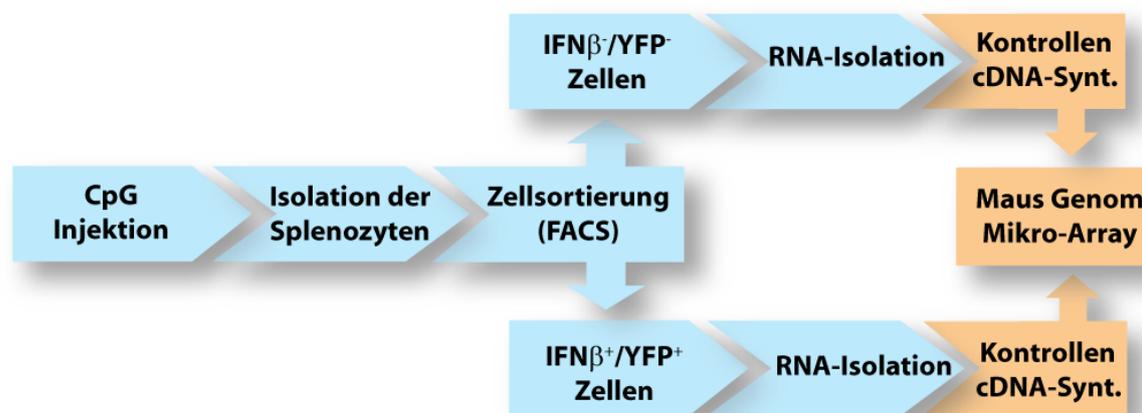


Abb. 3.16: Arbeitsablauf zur Durchführung der Mikro-Array Experimente

Die Darstellung skizziert schematisch die Schritte von der Injektion des TLR-Agonisten CpG 1668 über die Zellsortierung und RNA-Isolation zur Durchführung des Maus Transkriptom-Arrays. Orange gefärbte Felder kennzeichnen die Service-Leistungen der Fa. Miltenyi Biotec

IFN β ^{mob/mob} Mäuse wurden mit dem CpG 1668 in DOTAP-komplexierter Form i.v. für 6 h stimuliert, um die an der Initiation der Typ I IFN Antwort beteiligten YFP⁺ pDCs sowie die YFP⁻ pDCs aus Splenozyten zu isolieren (Abb. 3.17).

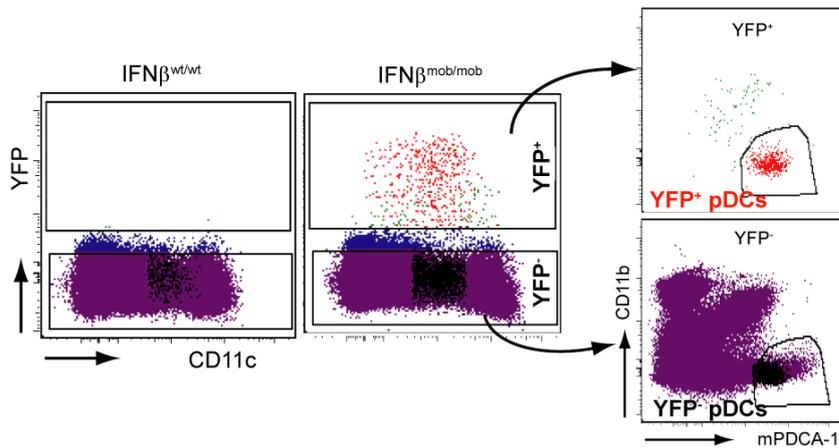


Abb. 3.17: Zellsortierstrategie zur Isolierung IFN β /YFP⁺ bzw. IFN β /YFP⁻ pDCs

IFN $\beta^{wt/wt}$ bzw. IFN $\beta^{mob/mob}$ Mäuse wurden für 6 h mit DOTAP komplexiertem CpG 1668 stimuliert. Die Milzen wurden entnommen und YFP⁻ bzw. YFP⁺ pDCs FACS sortiert. Die IFN $\beta^{wt/wt}$ Probe diente in der Sortierstrategie als Referenz für das korrekte Gaten der IFN $\beta^{mob/mob}$ Zellen. Die in den Dot-Plots rot bzw. schwarz dargestellten Punkte repräsentieren die zu sortierende YFP⁺ bzw. YFP⁻ pDC Zielzellpopulation. Zur besseren Übersicht wurden die jeweiligen Nichtzielzellen in den Dot-Plots andersfarbig dargestellt.

Aus zwei voneinander unabhängigen biologischen Replikaten konnte genügend gesamtzelluläre RNA beider pDC Populationen isoliert werden, um die weiteren Arbeitsschritte durch die Fa. Miltenyi Biotec durchführen zu lassen (Abb. 3.18).

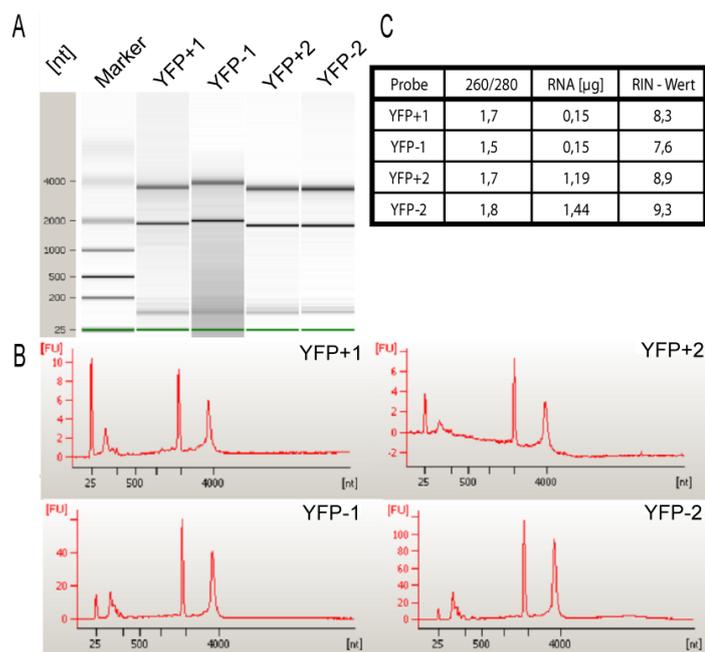


Abb. 3.18: Analyse der Gesamt-RNA Proben

Dargestellt ist das Resultat der Bioanalyzer Analyse als Gelbild [A] und als Elektropherogramm [B]. Die unterste grüne Bande im Gelbild zeigt den internen Standard. Die beiden prominenten oberen Banden zeigen 28S (obere Bande) und 18S ribosomale RNA. Neben diesen Kontrollen wurde eine RNA Integritätszahl (RIN) berechnet, die ein Maßstab für die Qualität der RNA darstellt. RNA mit RIN-Werten > 6 erfüllt die Voraussetzungen für die Erstellung von Genexpressionsprofilen [C]. Die Daten wurden durch Miltenyi Biotec generiert.

Die aus beiden Experimentalansätzen isolierte RNA der IFN β /YFP⁺ und IFN β /YFP⁻ pDCs wies die von Miltenyi Biotec geforderte Mindest-Integrität zur Durchführung der Array-Hybridisierung auf (Abb. 3.18). Aus den Proben wurde durch Miltenyi Biotec zunächst die mRNA extrahiert, diese in cDNA transkribiert und anschließend global amplifiziert. 200 ng cDNA jeder Probe wurden von Miltenyi Biotec Cy3 markiert und mit 4 x 44K Maus Genom Oligo-Mikroarrays der Fa. Agilent hybridisiert.

Die Fluoreszenzsignale der hybridisierten Agilent Mikroarrays wurden durch Scannen erfasst und die Daten mit dem „Rosetta Resolver gene expression data analysis system“ Software-Paket (Rosetta Bio-software) weitergehend analysiert. Die Arraydaten der beiden YFP⁺ bzw. YFP⁻ Proben wurden durch die Software miteinander verrechnet und auf Grundlage des Rosetta Fehlermodell Algorithmus normalisiert (Weng *et al.*, 2006). Anschließend konnten die normalisierten Signalintensitäten der IFN β ⁺ pDCs (Probe) mit denen der IFN β ⁻ pDCs (Kontrolle) verglichen werden (Abb. 3.19).

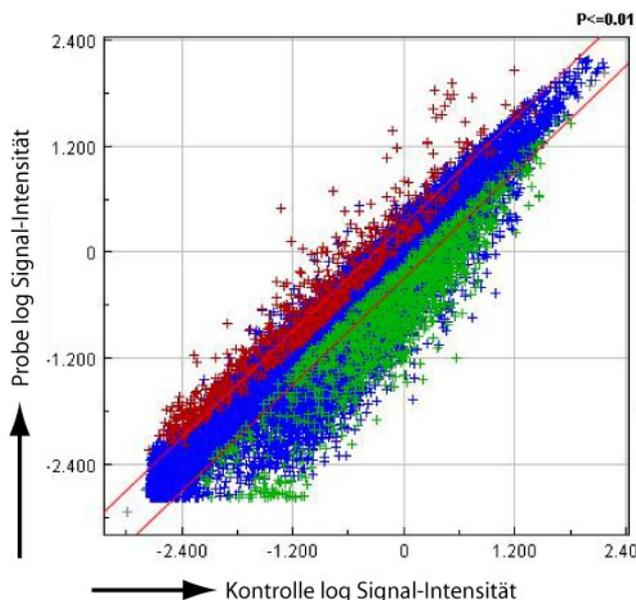


Abb. 3.19: Scatterplot der Genexpressions-Intensitäten

Die jeweils miteinander verrechneten Signalintensitäten der YFP⁺ (Probe) und YFP⁻ (Kontrolle) Proben wurden logarithmisch gegeneinander aufgetragen. Ein Punkt entspricht der relativen Transkriptionshöhe eines Gens aus der YFP⁺ und YFP⁻ pDC Population. Die roten Diagonalen definieren den Bereich der 2-fach differentiellen Signalintensität. Blaue Kreuze: nicht regulierte Gene; rote Kreuze: signifikant überrepräsentierte Transkripte ($p \leq 0,01$); grüne Kreuze: signifikant unterrepräsentierte Transkripte.

Signifikant ($p \leq 0,01$) um mehr als 2-fach differentiell regulierte Gene wurden von Miltenyi Biotec in tabellarischer Form zur weiteren Auswertung zur Verfügung gestellt. Die Gene wurden unterteilt in signifikant überrepräsentierte bzw. unterrepräsentierte Transkripte und entsprechend der Expressionsstärke angeordnet. Die jeweils 50 am stärksten unterschiedlich zwischen IFN β ⁺ und IFN β ⁻ pDCs transkribier-

ten Gene sind in Tabelle 3.1 dargestellt bzw. nach Ausschluss der IFN β - Probe YFP-1 im Anhang unter Abschnitt 7.2.

überrepräsentiert				unterrepräsentiert			
Gen	Δ	Gen	Δ	Gen	Δ	Gen	Δ
<i>Dlg2</i>	52,91	<i>Ccl5</i>	7,31	<i>Gm2a</i>	-10,83	<i>Senp7</i>	-23,24
<i>ifna6</i>	27,87	<i>Ankrd33b</i>	7,27	<i>Upb1</i>	-10,84	<i>AK169873</i>	-23,25
<i>ifna4</i>	27,26	<i>Actn1</i>	7,11	<i>Ankrd44</i>	-11,07	<i>AK028908</i>	-25,11
<i>ifna5</i>	22,33	<i>Fam46c</i>	7,11	<i>Fyb</i>	-11,65	<i>AK030700</i>	-25,15
<i>ifnb1</i>	19,99	<i>Cdk6</i>	7,08	<i>Cxxc5</i>	-11,71	<i>AK047729</i>	-26,01
<i>ifna2</i>	18,43	<i>Cd44</i>	6,95	<i>Mgl1</i>	-11,98	<i>AK084281</i>	-26,69
<i>Retn</i>	17,58	<i>Sema6d</i>	6,93	<i>Wrm</i>	-13,22	<i>Wbp11</i>	-28,69
<i>ifna12</i>	17,13	<i>Adra2a</i>	6,87	<i>Jarid1a</i>	-13,42	<i>AK079279</i>	-29,17
<i>Xcl1</i>	16,45	<i>Fggy</i>	6,76	<i>Cask</i>	-13,85	<i>Aurkb</i>	-29,21
<i>ifna9</i>	16,31	<i>Cdgap</i>	6,76	<i>Rnd1</i>	-14,66	<i>9230114K14Rik</i>	-29,76
<i>Il28b</i>	15,42	<i>AK048971</i>	6,32	<i>AK045332</i>	-14,68	<i>Rp2h</i>	-30,08
<i>ifnab</i>	14,97	<i>Tgfbra1</i>	6,32	<i>Lrrtm3</i>	-14,93	<i>EG622976</i>	-30,53
<i>ifna13</i>	14,04	<i>AK037636</i>	6,32	<i>P2ry12</i>	-15,04	<i>Lama5</i>	-32,03
<i>ifna2</i>	13,75	<i>Cdk5r1</i>	6,25	<i>Chek2</i>	-16,00	<i>Nck1</i>	-33,01
<i>ifna6</i>	11,72	<i>Il12a</i>	6,14	<i>AK012436</i>	-16,18	<i>Raver2</i>	-34,27
<i>Retn</i>	9,94	<i>AK032741</i>	6,12	<i>AK084624</i>	-16,69	<i>Araf</i>	-35,37
<i>Ccl5</i>	9,91	<i>Rhob</i>	6,05	<i>5730601F06Rik</i>	-17,26	<i>LOC665931</i>	-35,39
<i>Tnfsf4</i>	9,77	<i>A1504432</i>	6,04	<i>Phf21a</i>	-17,28	<i>Ubxn4</i>	-35,52
<i>Zbtb10</i>	9,42	<i>Ebi3</i>	5,97	<i>Pdcl3</i>	-17,48	<i>C1ca1</i>	-41,97
<i>Tnfsf15</i>	9,21	<i>Steap4</i>	5,76	<i>Tlr3</i>	-18,03	<i>Gatm</i>	-47,92
<i>Ranbp6</i>	8,55	<i>Kcnab3</i>	5,47	<i>2900022M07Rik</i>	-18,19	<i>Klhl2</i>	-50,39
<i>Ehf</i>	8,32	<i>AK050110</i>	5,43	<i>2510009E07Rik</i>	-20,62	<i>Map4k3</i>	-55,65
<i>Lmo4</i>	7,81	<i>AK089343</i>	5,41	<i>Tmem56</i>	-20,78	<i>Pdgfb</i>	-56,15
<i>Cdk6</i>	7,78	<i>Olfml2a</i>	5,40	<i>Tlr3</i>	-21,05	<i>1700016F12Rik</i>	-56,83
<i>Pdcd1lg2</i>	7,54	<i>Kcna3</i>	5,30	<i>Nid1</i>	-21,63	<i>Arhgap11a</i>	-62,67

Tabelle 3.1: Übersicht der differentiell am stärksten regulierten Gene

Der Δ Wert gibt den Faktor an um wie viel stärker bzw. schwächer ein Gen in YFP⁺ pDCs im Vergleich zu YFP⁻ pDCs transkribiert wird.

Unter den differentiell am stärksten exprimierten Genen waren neben zwei Mitgliedern der TNF Liganden Superfamilie (*Tnfsf4*, *Tnfsf15*), Interleukinen (IL-12, IL-28), Chemokinen (CCL5, XCL1) auch zahlreiche Typ I Interferone (7 IFN α s, IFN β) vertreten (Tabelle 3.1). Darüber hinaus sind viele der aufgelisteten Transkripte in Prozessen des Immunsystems und der Inflammation involviert (*Cd44*, *Ebi3*, *Sema6d*, *Steap4*, *Tgfbra1*, *Pdcd1lg2*) oder besitzen mit Kinase und GTPase Funktionen entscheidende, proteinmodifizierende Eigenschaften (*Rhob*, *Ranbp6*, *Cdk6*, *Cdc42*, *Cdk5r1*). Auf Seite der differentiell am schwächsten in YFP⁺ Zellen exprimierten Gene konnten unter anderem Kinasen (*Araf*, *Aurkb*, *Cask*, *Map4k3*), GTPase assoziierte Moleküle (*Arhgap11a*, *Rnd1*) und Adapterproteine in Signaltransduktionswegen (*Nck1*, *Fyb*) nachgewiesen werden. Auffallend war, dass mit *Tlr3*, ein IFN β induzierender PRR für dsRNA, runterreguliert war. Da in den vorangegangenen Analysen der einzige offensichtliche Unterschied der miteinander verglichenen pDC Populationen die IFN β Produktion der YFP⁺ Zellen war,

spiegelte das Auftreten der differentiell stärker exprimierten Typ I IFN Gene in der YFP⁺ pDC Population das Funktionieren des Reportermausmodelles wider und diente als interne Kontrolle der Mikroarray-Daten. Allerdings waren zahlreiche andere Gene differentiell reguliert, die ursächlich in keinem bekannten Zusammenhang zur Induktion einer Typ I IFN Antwort stehen. Deswegen konnte davon ausgegangen werden, dass es größere Unterschiede zwischen den zur IFN β Produktion befähigten und nichtbefähigten pDCs geben muss, als lediglich Differenzen im IFN β Induktionsweg.

Bezieht man sich ausschließlich auf die signifikant um mehr als Faktor 2 differentiell regulierten Gene, waren 1551 Transkripte (Daten nicht gezeigt) in den IFN β ⁺ pDCs im Vergleich zu IFN β ⁻ pDCs entweder über- oder unterrepräsentiert. Um aus der Datenvielfalt der Transkriptionsprofile biologisch relevante Folgerungen herleiten zu können, erfolgte die weitere Datenanalyse dieser Transkripte unter systembiologischen Aspekten.

Dazu wurden spezielle, auf die Analyse von Mikroarraydaten ausgerichtete internetbasierte Programme genutzt. In einem ersten Schritt wurden die identifizierten differentiell regulierten Gene funktionell durch Zuweisen von Attributen in den drei Kategorien „biologischer Prozess“, „zelluläre Komponenten“ und „molekulare Funktionen“ nach einem kontrollierten Vokabular annotiert. Diese Annotation wurde von den genutzten Programmen durch die Datenbank des GeneOntology (GO) Konsortiums vorgenommen (Ashburner *et al.*, 2000). Mit den so annotierten Daten wurde eine Analyse auf funktionelle Anreicherung durchgeführt. Die Anzahl der jeweiligen Gene in einer definierten GO Kategorie der differentiell exprimierten Gene wurde dabei mit der entsprechenden GO Liste für das gesamte murine Genom verglichen. Durch statistische Tests und Permutationsanalysen wurde sichergestellt, dass die errechnete Anreicherung signifikant war (Al Shahrour *et al.*, 2007; Al Shahrour *et al.*, 2006). Eine andere Annotierung erfolgte durch KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Hierbei wurden die differentiell regulierten Transkripte in Stoffwechsel- und Signaltransduktionswege (sog. Pathways) kategorisiert und ebenfalls auf eine funktionelle Anreicherung analysiert (Kanehisa *et al.*, 2010).

Zur Datenanalyse wurden die Programme FatiGo (<http://babelomics3.bioinfo.cipf.es>), FunNet (<http://www.funnet.info>) und GoMiner (<http://discover.nci.nih.gov/gominer/index.jsp>) eingesetzt, die kostenfrei im Internet zur Verfügung standen.

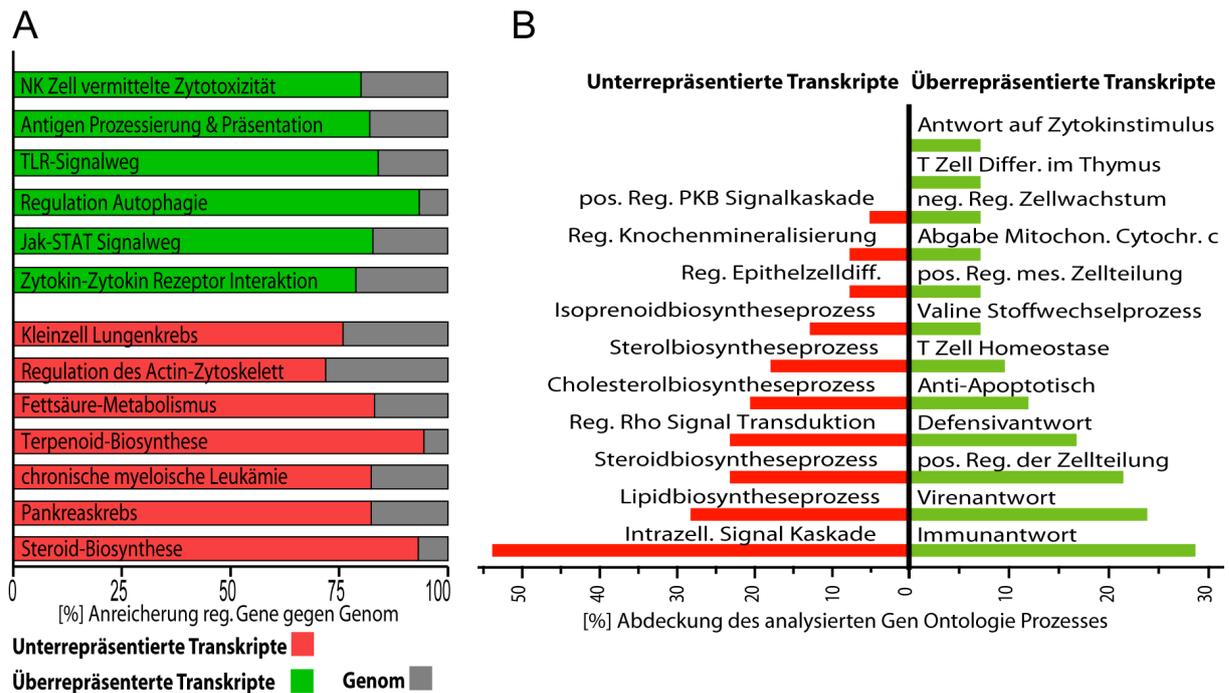


Abb. 3.20: Funktionelle Analyse der Mikroarraydaten

Mit den internetbasierten Analysewerkzeugen für Array-Daten FatiGO [A] und FunNet [B] wurden die signifikant regulierten Gene funktionell annotiert und hinsichtlich einer Anreicherung in Stoffwechsel- oder Signalwegen [A] oder in biologischen Prozessen [B] gegenüber des gesamten Genoms betrachtet.

Während die überrepräsentierten Gene vor allem an immunrelevanten Prozessen wie Zytokin-Zytokinrezeptor-Interaktion, TLR Signalweg und Jak-STAT Signalweg beteiligt waren, fällt für die unterrepräsentierten Transkripte die Beteiligung an intrazellulären Signalkaskaden, den Steroid/Lipid-Synthesewegen und der Regulation des Aktin-Zytoskeletts auf (Abb. 3.20). GoMiner führte eine Clustering der differentiell regulierten Gene nach GO biologischen Prozessen durch und berechnete darüber hinaus die ontologische Verwandtschaft der Gene und Prozesse. Die GoMiner Analyse der Daten erbrachte ein zu den anderen Analysen vergleichbares Resultat (s. Abschnitt 7.1).

Die Gegenüberstellung der Transkriptionsprofile $\text{IFN}\beta^+$ und $\text{IFN}\beta^-$ pDCs zeigte neben der differentiellen Regulation von Typ I Interferonen auch eine unterschiedliche Expression zahlreicher weiterer Gene in anderen funktionellen Signalwegen. Dieses deutete darauf hin, dass die Zellpopulationen, neben der unterschiedlichen Fähigkeit Typ I Interferone zu exprimieren, im Organismus distinkte Funktionen wahrnehmen.

3.4 *In vivo* und *in vitro* Charakterisierung der IFN β Antwort im Infektionsmodell der murinen Listeriose

Das opportunistische intrazelluläre Bakterium *Listeria monocytogenes* ist ein wichtiger Modell-Krankheitserreger, um die Interaktion zwischen Pathogen und Wirt sowie die Immunantwort gegen intrazelluläre Mikroben zu studieren (Hamon *et al.*, 2006). Beim Menschen erfolgt eine *L. monocytogenes* Infektion über eine orale Aufnahme von kontaminierten Nahrungsmitteln. Da dieser natürliche Infektionsweg in einer nicht humanisierten Maus nicht optimal darstellbar ist, wurden zur *in vivo* Identifizierung der IFN β produzierenden Zellen zwei systemische Infizierungsrouten gewählt: Zum einen die i.v. Injektion der Bakterien über die laterale Schwanzvene und zum anderen eine i.p. Injektion in den Peritonealraum der Mäuse (Abb. 3.21).

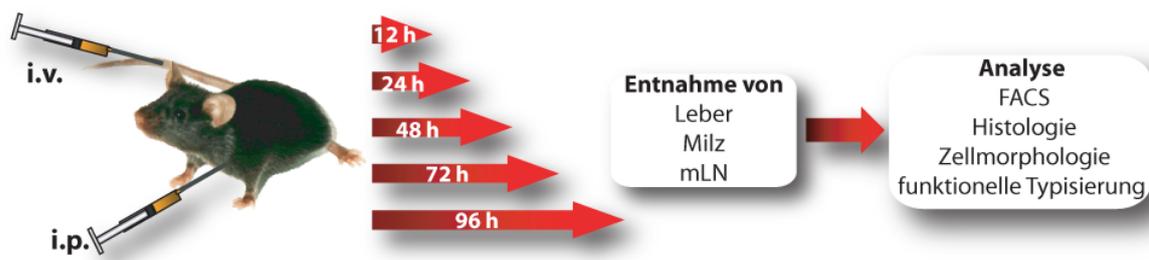


Abb. 3.21: Skizzierung der Experimente zur Analyse der IFN β Produzenten in der murinen Listeriose
Versuchstiere wurden i.v. oder i.p. mit der gewählten Anzahl koloniebildender Einheiten (colony-forming units, CFU) des Bakteriums für 12–96 h infiziert. Leber, Milz sowie mesenteriale (m)LN wurden entnommen und die IFN β produzierenden Zellen mittels Durchflusszytometrie, gefärbter Organschnitte sowie morphologisch und funktionell nach FACS-Sortierung charakterisiert.

Die für den jeweiligen Zeitpunkt injizierten Pathogen-Dosen wurden an die entsprechend für eine i.p. und i.v. Infektion determinierte letale Dosis 50 (LD_{50}) angepasst. So wurde gewährleistet, dass die Tiere im Versuchszeitraum zwar eine starke jedoch nicht letale Infektion entwickeln konnten (Abb. 3.22). Die ermittelte LD_{50} lag für den *L. monocytogenes wt* Stamm nach i.v. Infektion zwischen 10^4 und 10^5 CFU und nach i.p. Infektion bei $\sim 10^6$ CFU. Für den ebenfalls *in vivo* verwendeten $\Delta actA$ *L. monocytogenes* Stamm bzw. den GFP exprimierenden Listerienstamm ergab sich die LD_{50} zu 10^7 - 10^8 bzw. $\sim 10^4$ CFU (Abb. 3.22).

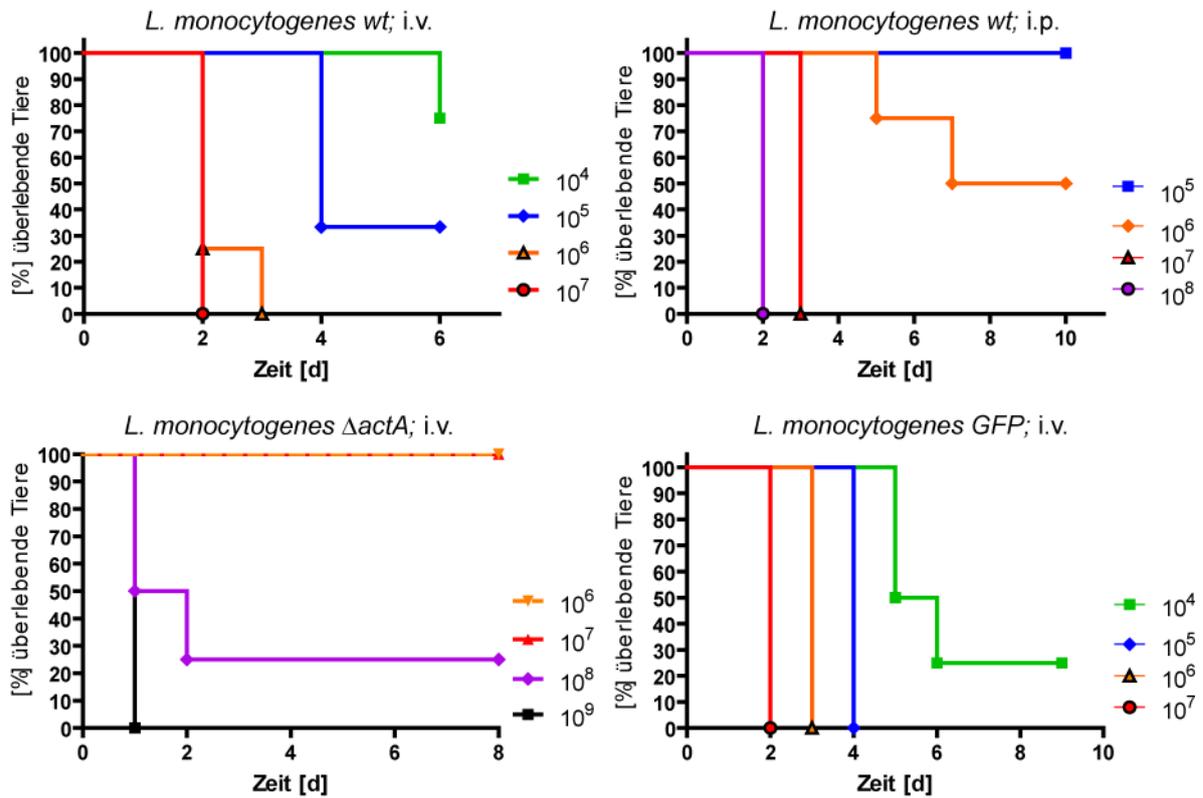


Abb. 3.22: Bestimmung der LD₅₀ der *in vivo* verwendeten *L. monocytogenes* Stämme
 C57BL/6 Mäuse ähnlichen Alters und Gewichts wurden mit den angegebenen *L. monocytogenes* Stämmen und CFUs infiziert. Es wurden pro Infektionsdosis und Experiment jeweils vier Mäuse eingesetzt.

Aus den Sterbekurven der LD₅₀ Bestimmungen wurden die einzusetzenden Infektionsdosen für die weiteren *in vivo* Experimente bestimmt (Tabelle 3.2).

Infektions-zeitraum	CFU i.v.	CFU i.p.
12 h	1x10 ⁶	1x10 ⁷
24 h	1x10 ⁶	1x10 ⁷
48 h	1x10 ⁵	1x10 ⁶
72 h	1x10 ⁵	1x10 ⁶
96 h	1x10 ⁴	1x10 ⁶

Tabelle 3.2: *L. monocytogenes* Infektionsdosen

3.4.1 Die Milz ist der zelluläre Schwerpunkt der IFN β Antwort nach *L. monocytogenes* Infektion

Um die IFN β produzierenden Zellen im Verlauf einer Infektion mit intrazellulären bakteriellen Pathogenen *in vivo* zu quantifizieren, wurden IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ Mäuse i.v. oder i.p. mit hohen, aber subletalen Dosen *L. monocytogenes* infiziert und über eine Zeitkinetik die Frequenz der IFN β /YFP $^+$ Zellen in der Milz, den mesenterialen (m) LN sowie der Leber mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Abb. 3.23).

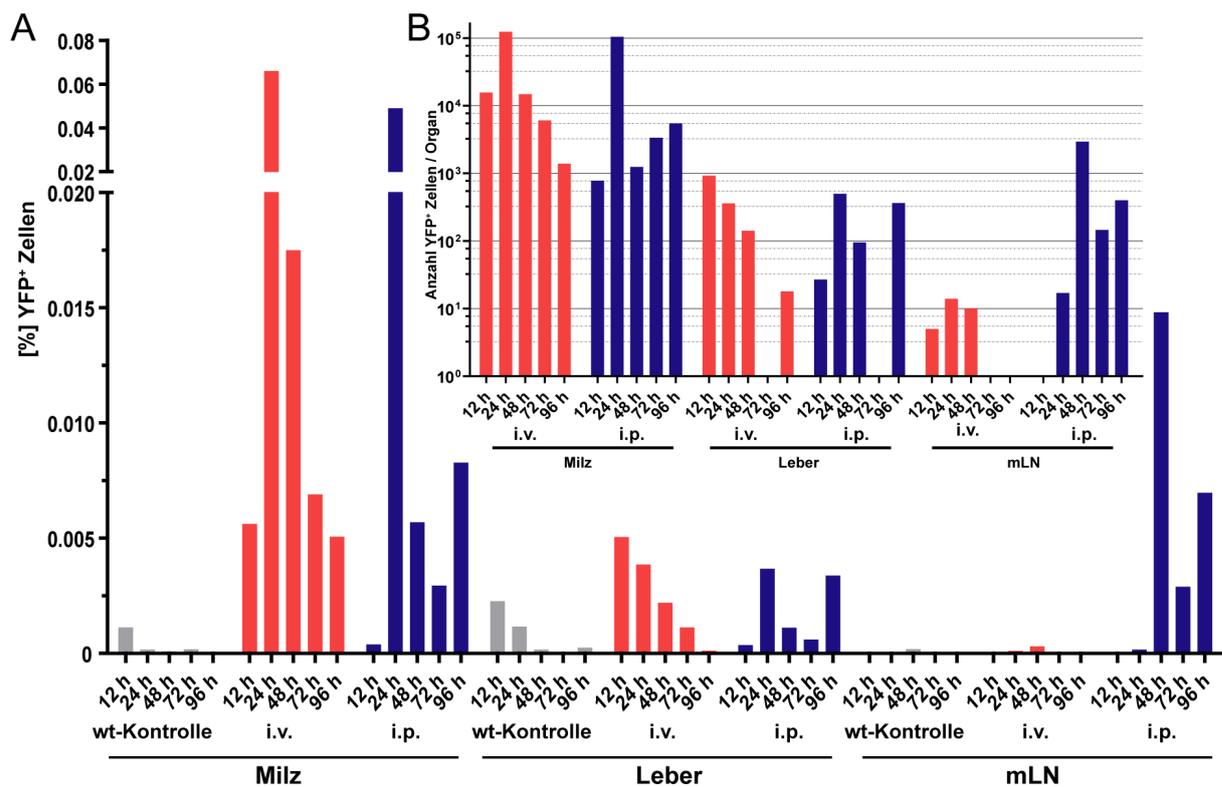


Abb. 3.23: Kinetik der IFN β /YFP Expression in Leber, Milz und mLN nach *L. monocytogenes* Infektion
 IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ oder IFN $\beta^{\text{wt/wt}}$ (wt-Kontrolle) Mäuse wurden gemäß Tabelle 3.2 über den angegebenen Zeitraum mit *L. monocytogenes* infiziert. Die Balkendiagramme zeigen die prozentuale [A] bzw. die absolute Anzahl [B] an YFP $^+$ Zellen in den jeweiligen Organen. Die Anzahl der YFP $^+$ Zellen innerhalb der Organe wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

Unabhängig von der gewählten Infektionsroute wurde sowohl die höchste Frequenz als auch die größte Anzahl an YFP $^+$ Zellen 24 h *post infektionem* (p.i.) in der Milz gemessen. Im Durchschnitt produzierten 0,06 % der Splenozyten IFN β /YFP, was einer Gesamtzellzahl von 10⁵ pro Milz entsprach (Abb. 3.23). Wie in der Milz konnten YFP $^+$ Zellen auch in der Leber nach i.v. und i.p. Infektion detektiert werden, aber selbst am Höhepunkt der YFP Expression 12–24 h p.i. war die Gesamtzahl der IFN β /YFP $^+$ Zellen mit ~10³ pro Organ 100-fach gegenüber der Milz verringert. Da die meisten Hepatozyten während der Organaufbereitungsprozedur starben, wurde in den durchgeführten Experimenten lediglich der Leukozy-

ten-Anteil der Leber untersucht. Während die i.v. Infektionsroute in den mLN keine signifikante IFN β /YFP Expression induzierte, wurden 48 h nach i.p. Infektion 0,015 % der Zellen als YFP⁺ identifiziert. Dieses implizierte für den mLN eine Abhängigkeit zwischen der Expression von IFN β und der Infektionsroute. Die Daten belegen, dass die Milz den Hauptort für die murine IFN β Expression nach *L. monocytogenes* Infektion darstellt und das dort selbst zum Höhepunkt der Antwort gerade einmal 10⁵ Zellen für die Bereitstellung von biologisch wirksamen Mengen des Zytokins verantwortlich sind.

3.4.2 IFN β produzierende Zellen in der murinen Listeriose weisen den Phänotyp aktivierter inflammatorischer Monozyten auf

Durch eine direkte *ex vivo* FACS Analyse von Milz, Leber und mLN sollte der genaue Phänotyp der IFN β /YFP⁺ Zellen nach *L. monocytogenes* Infektion definiert werden (Abb. 3.24). Die Mehrheit der YFP⁺ Zellen der analysierten Organe zeigten keine Expression von CD3 ϵ , CD19, B220, Ly6G und NK1.1. Dieses schloss eine Beteiligung von T-Zellen, B-Zellen, pDCs, Granulozyten und NK Zellen an der Produktion von IFN β aus (Abb. 3.24 und Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz hierzu waren die IFN β ⁺ Zellen positiv für F4/80, MHC Klasse II (I-A^b), CD11b und zeigten ein hohes Expressionsniveau von Ly6C und der Zellaktivierungsmarker CD40, CD80, CD86 und CD69 (Abb. 3.24 und Daten nicht gezeigt). Dieser Oberflächenmarker-Phänotyp legte nahe, dass es sich bei den YFP⁺ Zellen um eine Subpopulation aktivierter inflammatorischer Monozyten handelte (Geissmann *et al.*, 2003; Geissmann *et al.*, 2010). Interessanterweise zeigten diese YFP⁺ Zellen eine intermediäre Expression des klassischen DC Markers CD11c.

Der beobachtete Phänotyp der YFP⁺ Zellen war in dieser Form identisch in den untersuchten Organen und analysierten Infektionszeitpunkten. Neben diesen myeloiden IFN β Produzenten, konnte zusätzlich in der Leber eine YFP⁺ Nebenpopulation durch die Expression von B220, Ly6C und CD11c als *bona fide* pDCs identifiziert werden (Abb. 3.24).

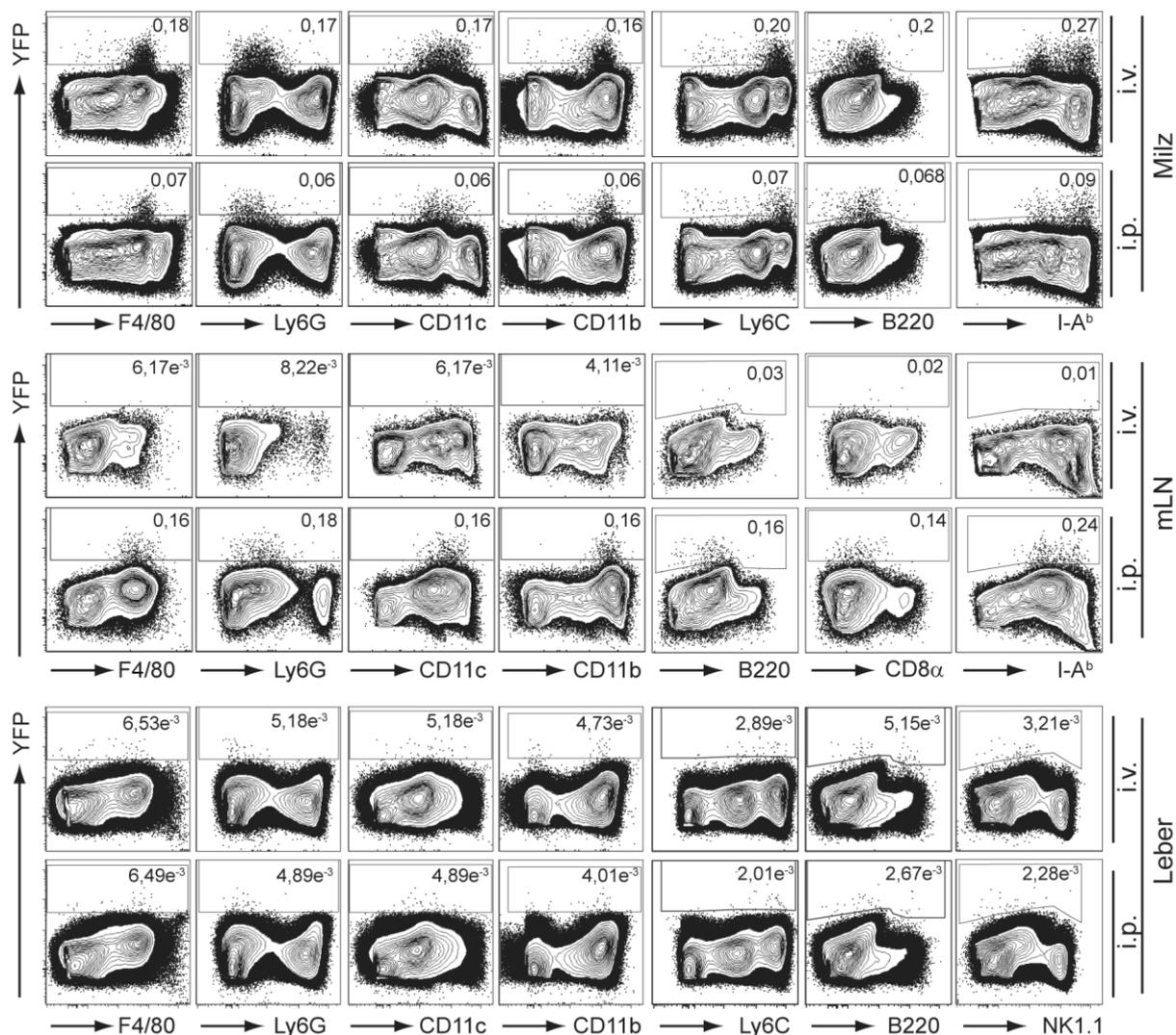


Abb. 3.24: FACS Analyse der IFN β /YFP⁺ Zellen zum Zeitpunkt maximaler YFP Expression

Die Höhepunkte der IFN β Produktion in Milz, mLN und Leber wurden durch eine Infektionskinetik bestimmt (Abb. 3.23). Die gezeigten Milz und Leber FACS-Daten wurden 24 h nach Infektion mit *L. monocytogenes* erhoben. IFN β ⁺ Zellen der mLN sind 48 h nach Infektion mit *L. monocytogenes* gezeigt. Die Analyse-Gates wurden an identisch behandelte IFN β ^{wt/wt} Proben angepasst (Daten nicht gezeigt).

3.4.3 Analyse der IFN β Antwort in mit *L. monocytogenes* infizierten Knochenmarkszellkulturen

Da inflammatorische Monozyten zu Makrophagen und zu DCs zu differenzieren vermögen (Chomarat *et al.*, 2000), wurde dieses Differenzierungspotential durch die Generierung von DCs (GM-CSF-DCs und Flt3L-DCs) oder Makrophagen (BMDMs) aus Knochenmarkszellen *in vitro* rekapituliert und die erzeugten Zelltypen anschließend entweder mit dem wt *L. monocytogenes* Stamm oder mit Δhly bzw. $\Delta actA$ Mutanten-Stämmen infiziert. Die Bakterien des Δhly Stamm sind defizient für das *hly* kodierte Listeriolysin O (LLO) und daher unfähig aus dem Phagosom zu entfliehen. Dieses führt zu einer raschen Elimination.

nierung der Bakterien, ohne eine Typ I IFN Antwort zu induzieren (O'Riordan *et al.*, 2002; Stockinger *et al.*, 2002). $\Delta actA$ Listerien sind im Wirtszellzytoplasma immobilisiert und daher *in vivo* attenuiert, dennoch induzieren sie eine protektive CD8 T-Zell basierte Immunität (Goossens und Milon, 1992).

Nach Infektion der BMDMs mit wt Listerien konnte in einer Subpopulation (2-3%) der BMDMs IFN β /YFP detektiert werden (Abb. 3.25).

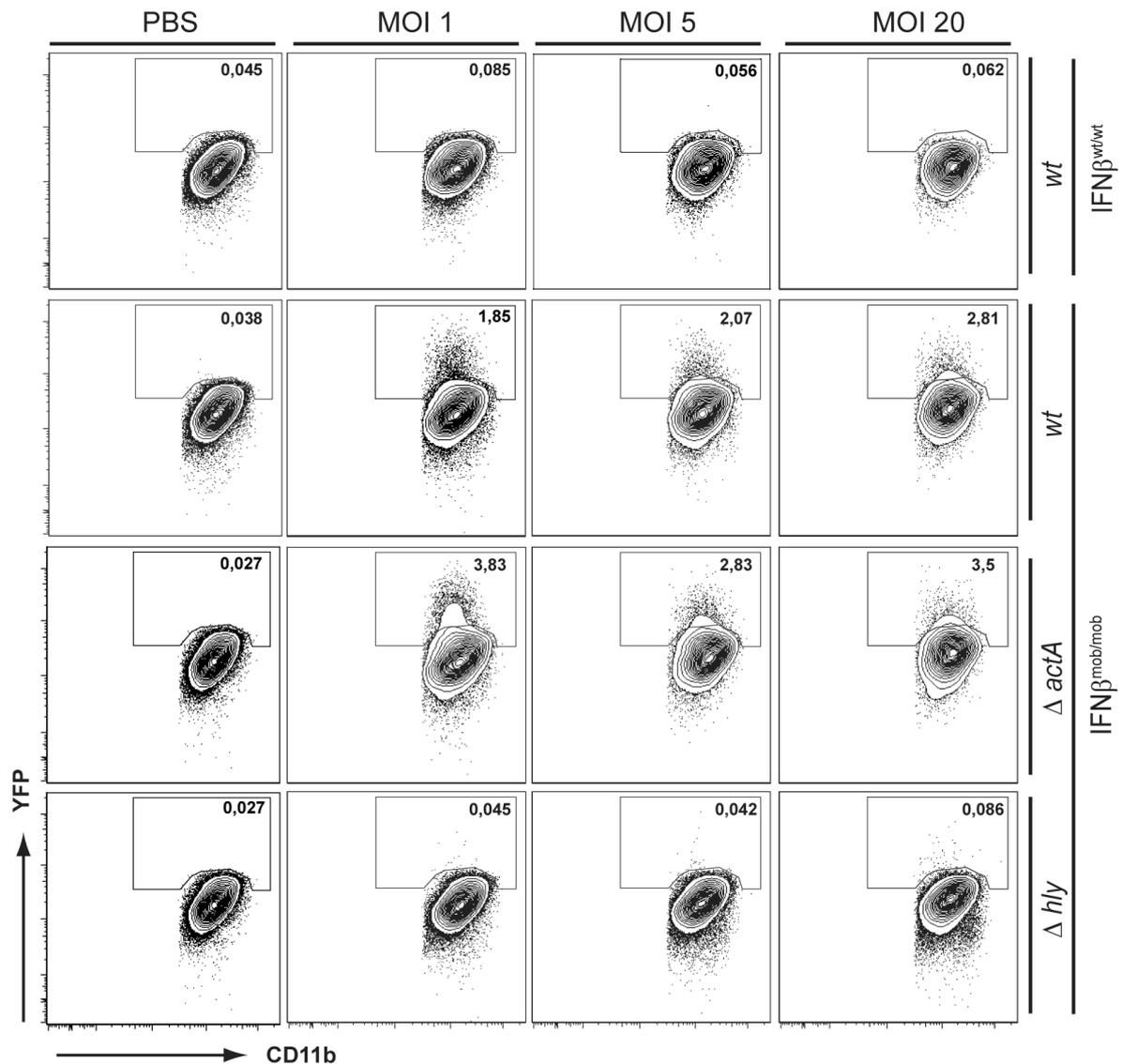


Abb. 3.25: IFN β /YFP Expression in BMDMs nach Infektion mit *L. monocytogenes*

BMDMs wurden mit dem *L. monocytogenes* wt-Stamm bzw. den Δhly - und $\Delta actA$ *L. monocytogenes* Stämmen mit der angegebenen Multiplizität der Infektion (multiplicity of infection, MOI) infiziert oder aber mit PBS behandelt. Die Gesamt-Infektionsdauer betrug 12 h. Die Analysegates wurden an die IFN $\beta^{wt/wt}$ Kontrollen angepasst (gezeigt für *L. monocytogenes* wt).

Während ebenfalls eine Infektion mit *actA* defizienten *L. monocytogenes* in geringer Inokulationsdosis (MOI 1) IFN β induzierte, konnte selbst nach einer hochdosierten Infektion (MOI 20) mit Δhly Listerien keine nennenswerte YFP Expression in den BMDMs beobachtet werden (Abb. 3.25).

Eine Infektion von knochenmarksgenerierten DCs mit *L. monocytogenes* zeigte ein ähnliches Resultat (Abb. 3.26). Die Frequenz YFP⁺ Zellen in Flt3L-DCs war verglichen mit der in GMCSF-DCs allerdings deutlich geringer. Interessanterweise konnte auch in einer geringen Anzahl B220⁺ Flt3L-DCs, dem *in vitro* pDC Analogon, IFN β /YFP detektiert werden, was somit die in der Leber vorgefundene *in vivo* Situation gut widerspiegelte.

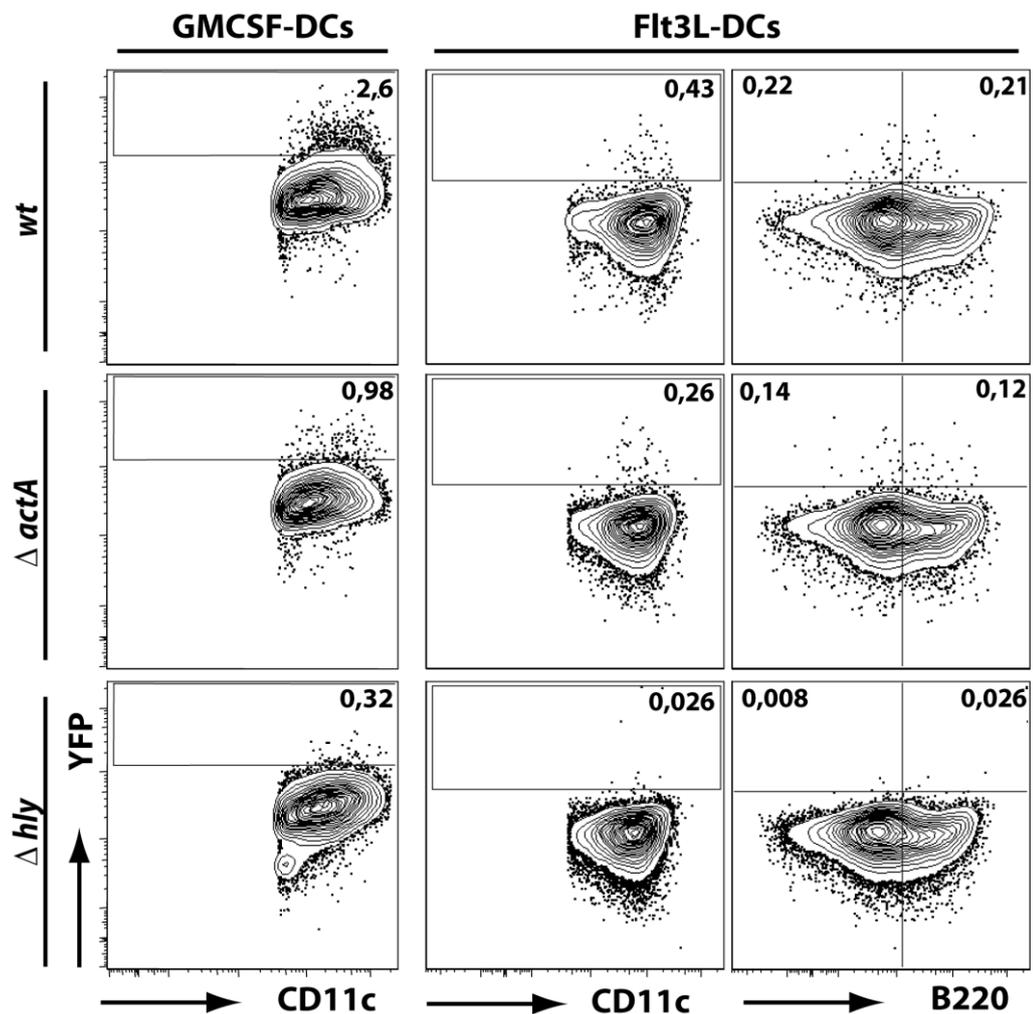


Abb. 3.26: IFN β /YFP Expression in DCs nach Infektion mit *L. monocytogenes*
Flt3L-DCs bzw. GMCSF-DCs von IFN $\beta^{mob/mob}$ Mäusen wurden mit den genannten *L. monocytogenes* Stämmen mit MOI 20 für 12 h infiziert. Als Referenz für das Setzen von Analyse-Gates dienten identisch behandelte Zellen von IFN $\beta^{wt/wt}$ Mäusen (nicht gezeigt).

Mit aus Knochenmark abgeleiteten BMDMs und DCs produzierten die Zelltypen *in vitro* IFN β , in die Monozyten nach *L. monocytogenes* Infektion *in vivo* differenzieren können. Somit deuteten die bisherigen Resultate auf aktivierte inflammatorische Monozyten als Hauptproduzenten von IFN β nach *L. monocytogenes* Infektion *in vivo* hin.

3.4.4 Charakterisierung IFN β produzierender Zellen im histologischen Kontext von Milz und mLN

In den durchgeführten Infektionskinetiken war stets die Milz das Organ mit dem höchsten Prozentsatz IFN β produzierender Zellen. Aus diesem Grund lag der Fokus der weiteren *in vivo* Experimente in erster Linie auf den YFP exprimierenden Splenozyten. Daneben sollte aber auch versucht werden auf histologischer Basis eine Erklärung für die durchflusszytometrisch beobachtete Korrelation der IFN β Expression in den mLN zur i.p. Infektionsroute zu finden.

3.4.4.1 Die IFN β produzierenden Zellen der Milz befinden sich in den Foci der Infektion

Zur Visualisierung der IFN β /YFP⁺ Zellen im zellulären Kontext der infizierten Milz wurden Immunfluoreszenz-Präparate von Organschnitten angefertigt und mikroskopisch die Lokalisation der YFP⁺ Zellen in der Milzarchitektur analysiert. Im Einklang mit publizierten Färbungen *L. monocytogenes* infizierter Milzen konnten 24 h nach Infektion die Mehrheit der *Listeria*⁺ Zellen innerhalb der T-Zell Zone der weißen Pulpa der Milz sowie zu einem Teil, in der diese umgebende Marginalzone detektiert werden (Aoshi *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2008; Muraille *et al.*, 2005). Dem hingegen war die Bakterienlast in der B-Zell Zone bzw. der roten Pulpa der Milz eher niedrig. Die IFN β /YFP⁺ Zellen kolokalisierten mit Clustern von zu den *Listeria*⁺ Infektionsherden rekrutieren CD11b⁺ und Gr-1⁺ Zellen (Abb. 3.27). Auffallend war die sich mikroskopisch manifestierende enge Interaktion von YFP⁺ Zellen und B220⁺ Zellen innerhalb der T-Zell Zone bzw. das vereinzelte und auch konfokal zu beobachtende Auftreten der Zytokin produzierenden Zellen im Marginalzonen-Ring der MOMA-1⁺ metallophilen Makrophagen (Abb. 3.27 bzw. Daten nicht gezeigt).

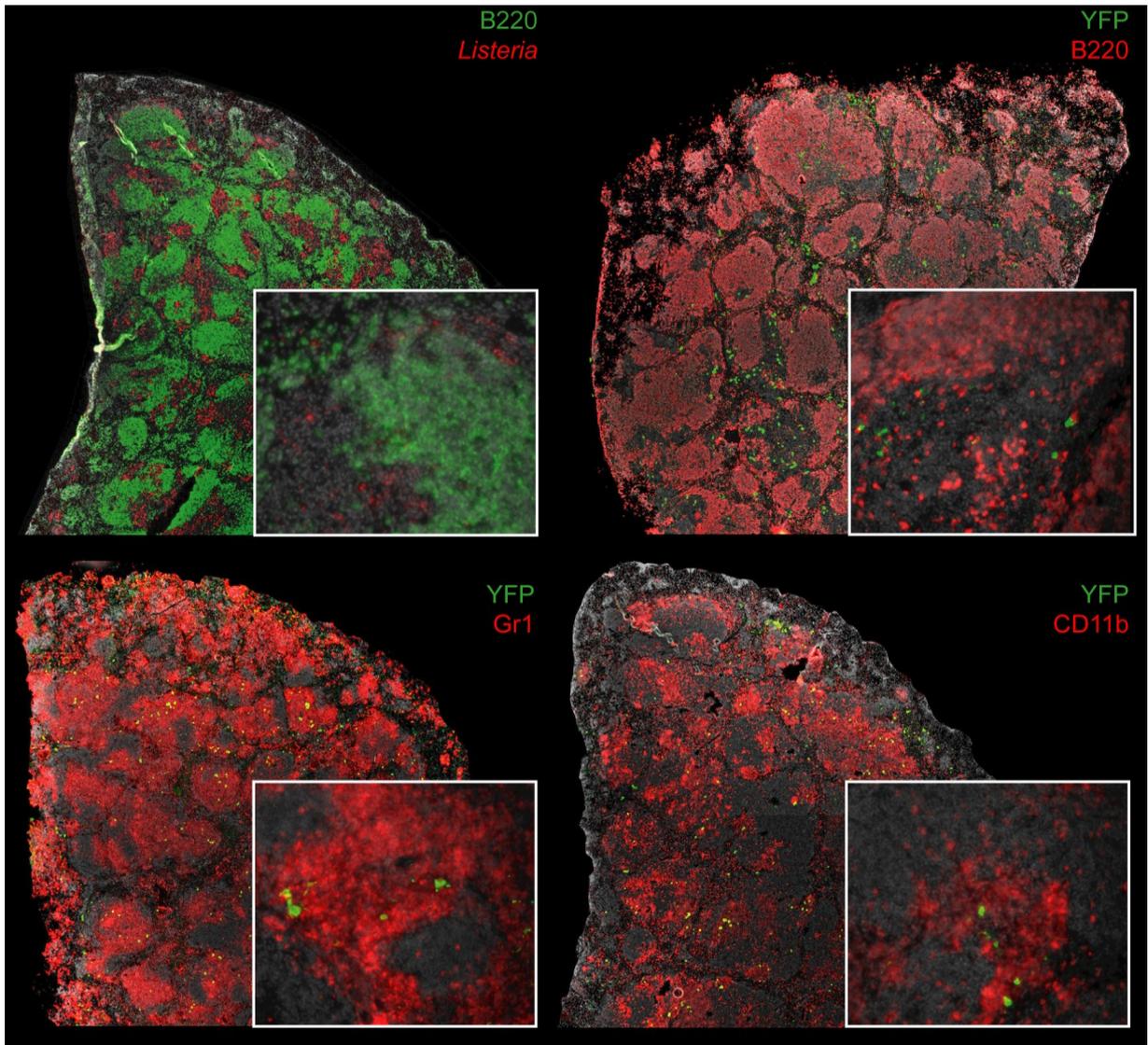


Abb. 3.27: Charakterisierung der Lokalisation von IFN β /YFP⁺ Zellen im Kontext der infizierten Milz
 Gezeigt sind Milzgewebeschnitte von IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ Mäusen 24 h nach i.v. Infektion mit *L. monocytogenes*. YFP⁺ Zellen wurden mittels eines kreuzreagierenden α -GFP Antikörpers detektiert. Die Färbungen wurden mit Tyramid-FITC (grün) bzw. Biotin konjugiertem Tyramid und Streptavidin-Cy3 (rot) verstärkt. Die Nuklei wurden mit DAPI gefärbt und sind in grau dargestellt. YFP- und Listerien Signale wurden in den Übersichtsaufnahmen der Milz elektronisch selektiert und vergrößert, in den Ausschnitts-Vergrößerungen aber unverändert belassen.

Konfokale Aufnahmen ermöglichten es die YFP⁺ Zellen höher auflösend darzustellen und damit deren Lokalisierung und Zell-Zell Interaktionsrepertoire innerhalb der Infektionsfoci exakter zu bestimmen (Abb. 3.28).

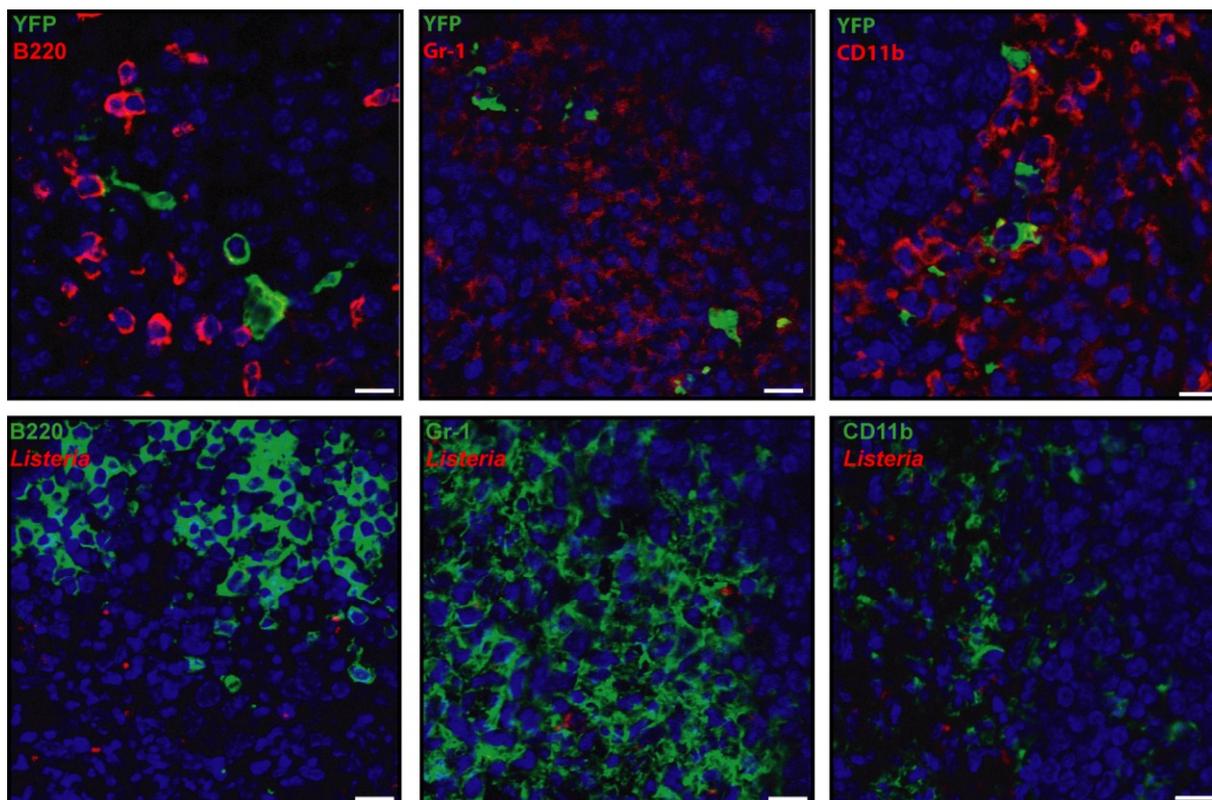


Abb. 3.28: Konfokale Visualisierung von IFN β /YFP produzierenden bzw. infizierten Zellen in der Milz
 Dargestellt sind konfokale LSM Aufnahmen von Milzschnitten von IFN $\beta^{mob/mob}$ Mäusen 24 h nach i.v. Infektion mit *L. monocytogenes*. Die Färbung der Schnitte erfolgte wie in Abb. 3.27 beschrieben. Der angegebene Maßstab entspricht 10 μ m.

Die konfokalen Bilder zeigten deutlich die enge Interaktion von YFP⁺ Zellen mit B220⁺ B-Zellen in der weißen Pulpa der Milz sowie die Kolo-kalisierung der IFN β produzierenden Zellen mit CD11b⁺ Gr-1⁺ Zellen innerhalb der Infektionsfoci (Abb. 3.28). Da α -Gr-1 sowohl an Ly6C als auch Ly6G bindet, konnte ebenfalls der durchflusszytometrisch festgestellte CD11b⁺ Ly6C⁺ Phänotyp der IFN β /YFP⁺ Zellen an Hand der konfokalen Aufnahmen verifiziert werden.

3.4.4.2 In mLN sind *Listeria*⁺ und YFP⁺ Zellen nur nach i.p. Infektion zu detektieren

Mikroskopisch konnten YFP⁺ Zellen in den analysierten mLN in sehr geringer Anzahl ausschließlich in den mLN der i.p. mit *L. monocytogenes* infizierten IFN $\beta^{mob/mob}$ Mäuse beobachtet werden (Abb. 3.29). Diese Zellen lokalisierten im Paracortex der mLN zusammen mit *Listeria*⁺ Zellen. Nach i.v. *L. monocytogenes* Infektion konnten histologisch kaum infizierte Zellen und keine YFP⁺ Zellen detektiert werden.

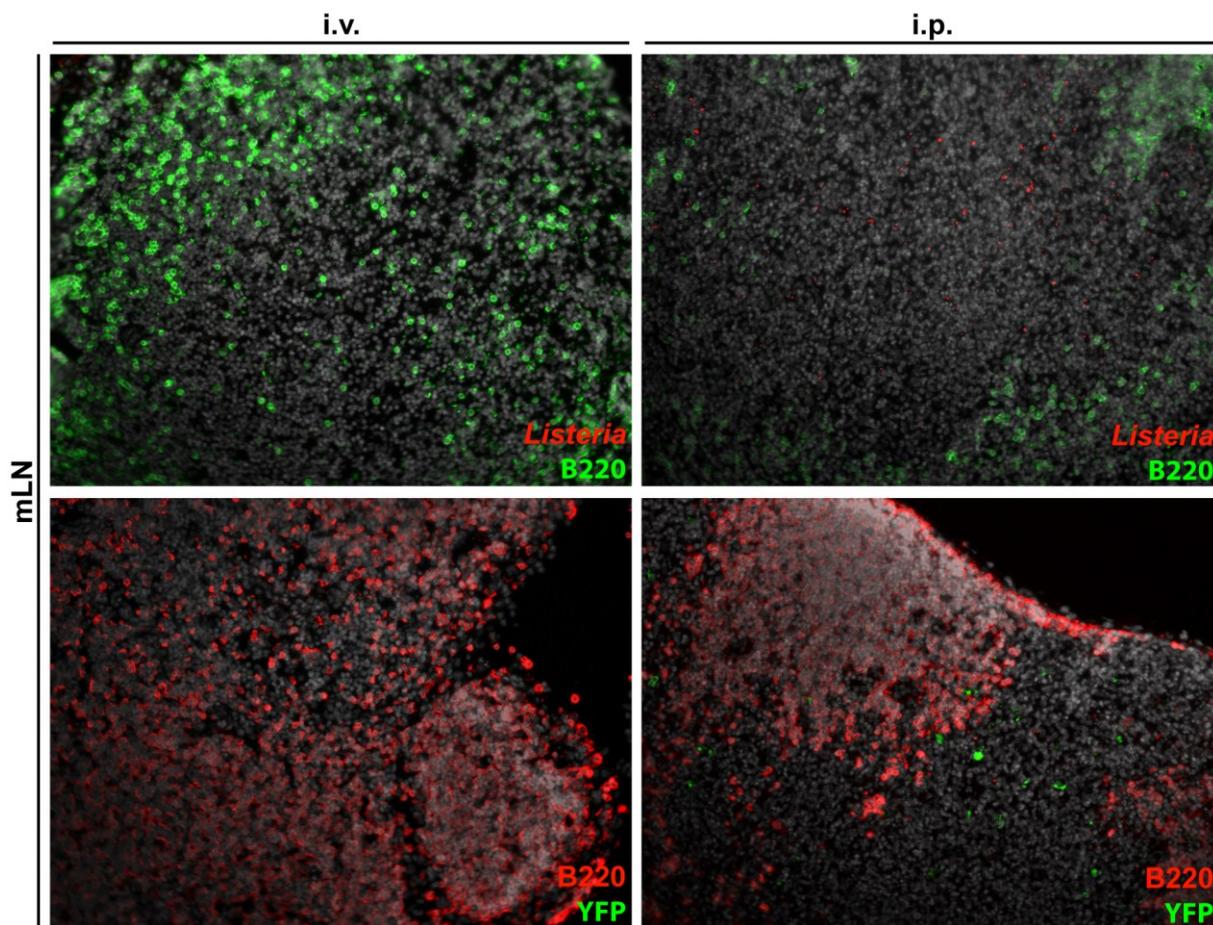


Abb. 3.29: Lokalisierung von IFN β /YFP⁺ Zellen in mLN nach i.v. bzw. i.p. Infektion mit *L. monocytogenes*. IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ Mäuse wurden für 48 h mit *L. monocytogenes* infiziert. Die gezeigten Gewebeschnitte von mesenterialen Lymphknoten wurden wie in Abb. 3.27 beschrieben gefärbt. Als Kontrolle für die YFP-Färbung wurden mLN identisch gehandhabter IFN $\beta^{\text{wt/wt}}$ Mäuse mitgefärbt (nicht gezeigt). Die Bilder wurden mit 20-facher Objektivvergrößerung aufgenommen.

Somit bestätigten die histologischen Daten den durchflusszytometrischen Befund, dass IFN β /YFP⁺ Zellen in den mLN nur nach i.p. Infektion mit *L. monocytogenes* zu detektieren waren.

3.4.5 Simultane *in vitro* und *in vivo* Visualisierung von YFP⁺ und *L. monocytogenes* infizierten Zellen

Als nächstes sollte der Fragestellung nachgegangen werden, ob im Fall von *L. monocytogenes* nur infizierte Zellen in der Lage sind IFN β zu exprimieren, oder ob auch nicht infizierte Zellen, sog. „Bystander“ Zellen, das Zytokin produzieren können. Aus den bisher durchgeführten *in vitro* Versuchen mit Knochenmark generierten Zellen (vgl. Abschnitt 3.4.3), konnte lediglich gefolgert werden, dass ein Vordringen der Bakterien in das Zytoplasma der Wirtszellen für die Induktion von IFN β nötig ist. Durch *in*

in vitro Infektionsversuche mit angefärbten bzw. GFP exprimierenden Listerien einerseits und *in vivo* Kolo-kalisierungsstudien mit wt und *actA* defizienten Bakterien andererseits sollte diese Fragestellung detail-lierter bearbeitet werden. *In vivo* Experimente mit dem GFP exprimierenden *L. monocytogenes* Stamm konnten nicht erfolgreich durchgeführt werden, da nach einer Infektion von $\text{IFN}\beta^{\text{mob/mob}}$ Mäusen durch-flusszytometrisch keine GFP⁺ Zellen nachzuweisen waren (Daten nicht gezeigt).

3.4.5.1 *In vitro* Analyse des Infektionszustands YFP⁺ und YFP⁻ Zellen nach *L. monocytogenes* Infektion

In vitro wurden zunächst die Bakterien mit „Baclight“, einem rot fluoreszierenden Farbstoff gefärbt und dann zur Infektion von BMDMs eingesetzt (Abb. 3.30).

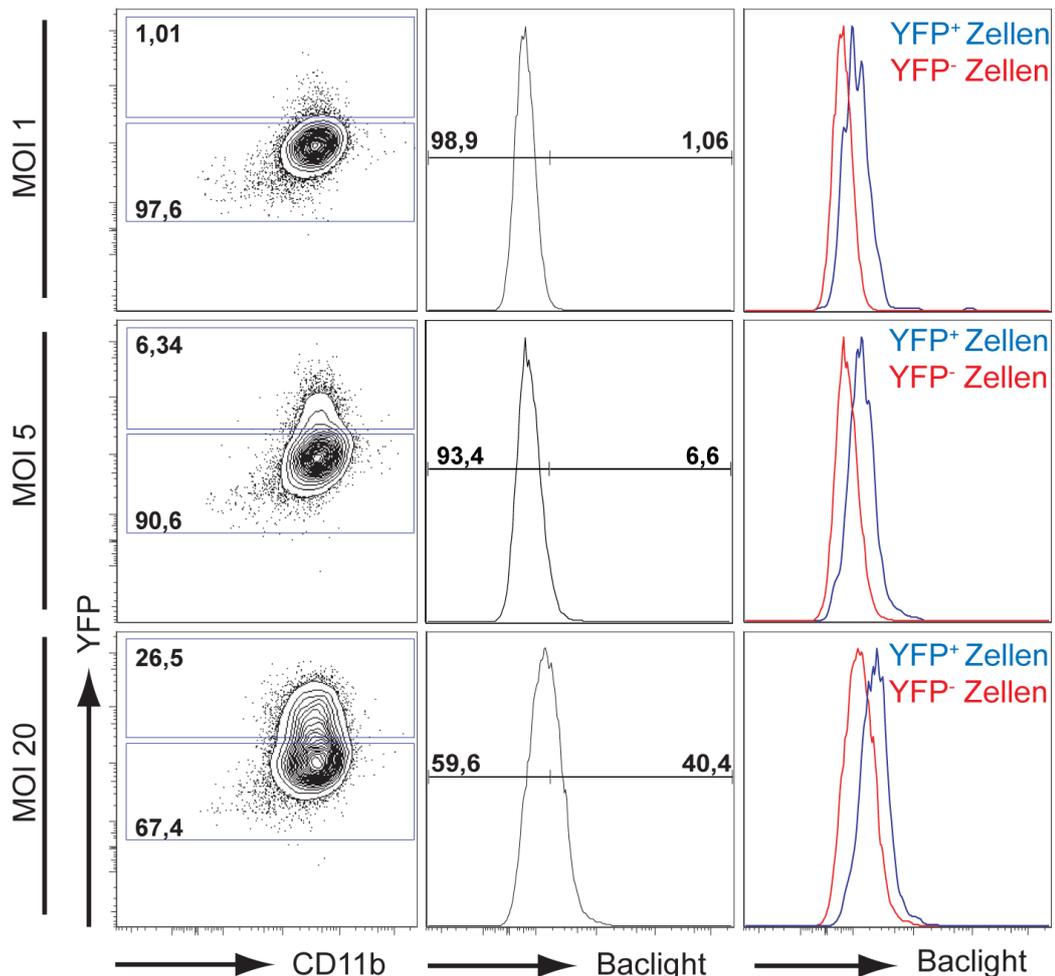


Abb. 3.30: FACS Analyse der bakteriellen Last von $\text{IFN}\beta/\text{YFP}^+$ und $\text{IFN}\beta/\text{YFP}^-$ Zellen
BMDMs von $\text{IFN}\beta^{\text{mob/mob}}$ Mäusen wurden für 12 h mit *L. monocytogenes* der angegebenen MOIs infiziert. Die Bakte-rien wurden vor der Infektion mit Baclight gefärbt und mit Medium gewaschen. Die Baclight-Fluoreszenz über alle Zellen bzw. deren Analyse separat für YFP⁺ und YFP⁻ Zellen ist in Histogrammen gezeigt.

Mit steigender Infektionsdosis konnte ein deutliches Ansteigen der Frequenz YFP⁺ Zellen von ~1 % auf über 25 % beobachtet werden (Abb. 3.30). Obwohl nach Infektion auch eine Infektionsdosis abhängige Zunahme der bakteriellen Last detektiert werden konnte, war die erzielte Verschiebung der Histogrammkurven nicht sehr deutlich. Eine Gegenüberstellung der Baclight-Fluoreszenz YFP⁺ und YFP⁻ Zellen zeigte, dass die IFN β produzierenden Zellen eine höhere bakterielle Last trugen als die IFN β ⁻ Zellen. Eine Auswertung des Infektionszustandes auf Einzelzellebene war mit diesem System aber nicht möglich.

Für die weitere *in vitro* Analyse des Infektionszustandes IFN β produzierender Zellen wurde aus diesem Grund ein GFP exprimierender *L. monocytogenes* Stamm zur Infektion von Knochenmark generierten BMDMs und GMCSF-DCs eingesetzt (Abb. 3.31).

Nach Infektion von BMDMs mit steigender MOI an Bakterien wuchs der Anteil der GFP⁺ Zellen von ~20 % bei MOI 0,2 bis auf etwa 95 % aller Zellen bei MOI 20 an. Gleichzeitig konnte ein Anstieg der Frequenz YFP⁺ Zellen beobachtet werden. Dieser beschränkte sich im Wesentlichen auf den Quadranten der infizierten Makrophagen und steigerte sich von 0,11 % (MOI 0,2) auf 3 % (MOI 20) der Zellen (Abb. 3.31 A). Eine getrennte Analyse des GFP Signals von YFP⁺ und YFP⁻ BMDMs ergab, dass bei geringer MOI die meisten YFP⁺ Zellen mit *L. monocytogenes* infiziert und somit GFP⁺ waren (Abb. 3.31 C). Mit wachsender MOI wuchs auch der Anteil GFP⁺ Zellen unter den YFP⁻ Zellen an, bis schließlich bei MOI 20 das GFP Signal von YFP⁺ und YFP⁻ Zellen eine identische Verteilung zeigte.

Ein vergleichbares Resultat zeigte sich nach Infektion von GMCSF-DCs mit GFP exprimierenden Listerien. Eine deutliche YFP-Expression war durchflusszytometrisch ausschließlich in den infizierten GFP⁺ Zellen festzustellen. Allerdings lag im Gegensatz zu den BMDMs die Infektionsrate bei identischer MOI deutlich niedriger und erreichte selbst bei MOI 20 keine 50 % der GMCSF-DCs (Abb. 3.31 A, C).

Neben dem bereits in der Literatur beschriebenen Unterschied der Suszeptibilität von BMDMs und GMCSF-DCs für eine *L. monocytogenes* Infektion (Westcott *et al.*, 2007) konnte somit gezeigt werden, dass *in vitro* die produktive Infektion der Zelle eine Prämisse für die Produktion von IFN β darstellt.

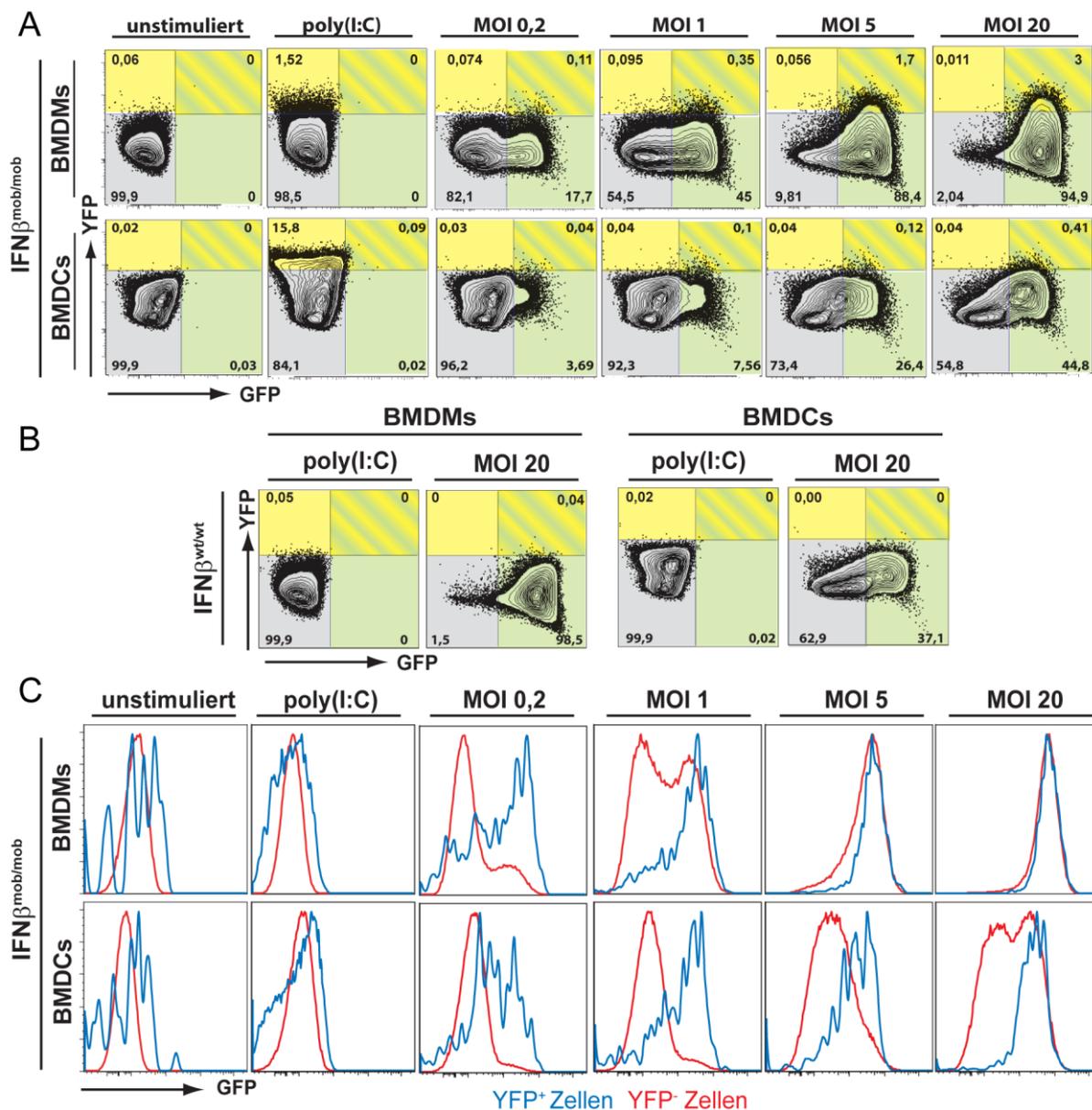


Abb. 3.31: FACS Ko-Visualisierung von Infektionsstatus und IFN β /YFP Expression in BMDMs und BMDCs
 BMDMs und BMDCs von IFN $\beta^{mob/mob}$ und IFN $\beta^{wt/wt}$ Mäusen wurden für 14 h mit den angegebenen MOIs an GFP exprimierenden *L. monocytogenes* infiziert, mit poly(I:C) stimuliert bzw. unstimuliert belassen. Die zelluläre IFN β /YFP Produktion (YFP) und die bakterielle Last (GFP) wurde durchflusszytometrisch analysiert. Die Zellpopulationen in den dargestellten FACS Plots wurden elektronisch auf CD11b⁺ BMDMs bzw. CD11c⁺ BMDCs vorselektiert [A]. Die Analysequadranten wurden den entsprechenden IFN $\beta^{wt/wt}$ Proben angepasst [B, und nicht gezeigt]. YFP⁺ und YFP⁻ Zellen wurden gegatet und in Histogrammen nach ihrem Infektionsstatus (GFP) überlagert dargestellt [C].

Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob nach *in vivo* Infektion auch ausschließlich infizierte Zellen IFN β produzierten.

3.4.5.2 Ko-Visualisierung IFN β ⁺ und *Listeria*⁺ Zellen nach *L. monocytogenes* Infektion *in vivo*

Nach *in vivo* Infektion mit wt Listerien konnten in der Milz zahlreiche einfach bis mehrfach infizierte YFP⁺ Zellen beobachtet werden (Abb. 3.32).

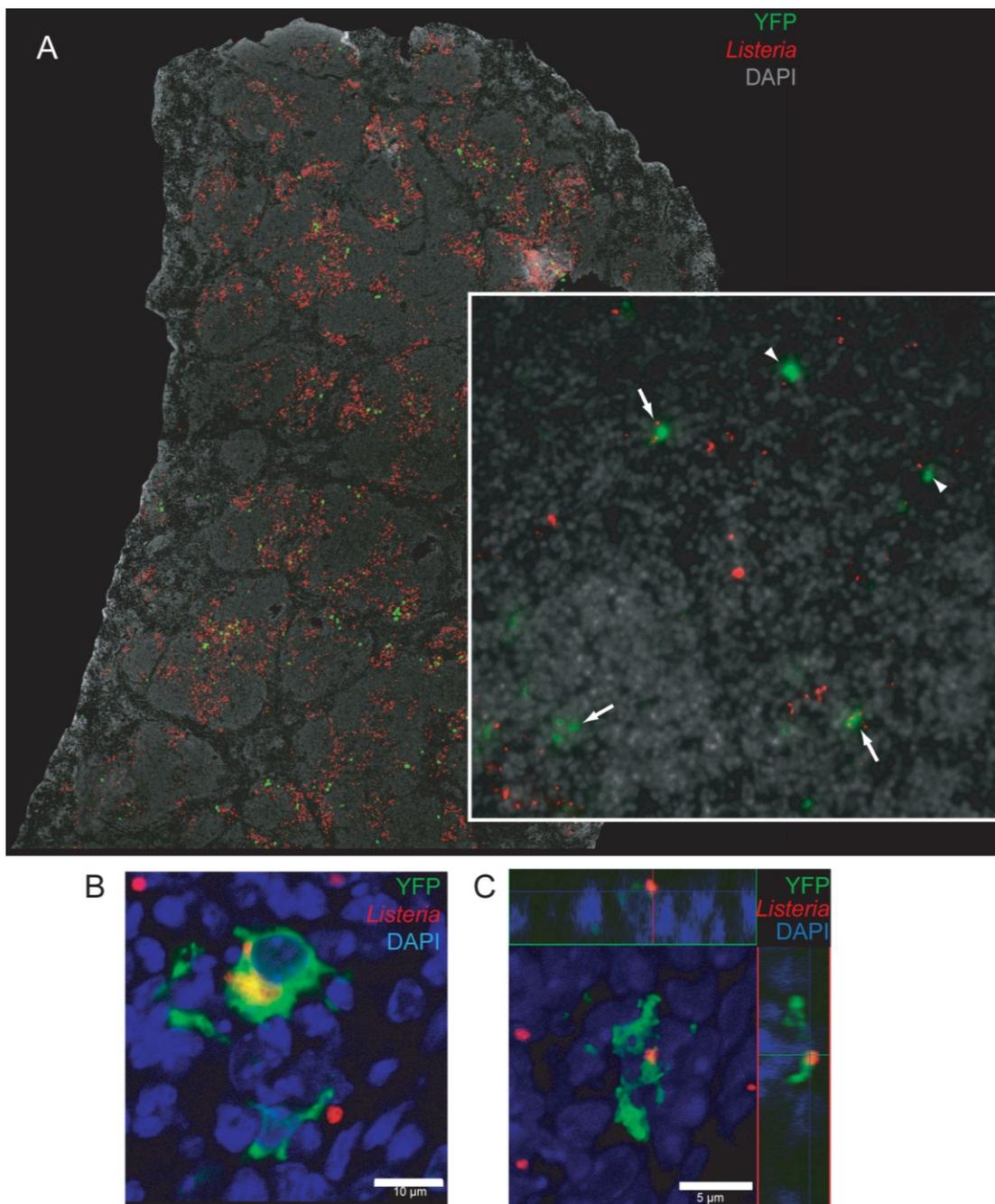


Abb. 3.32: Simultane Analyse der Kolo-kalisation von YFP⁺ Zellen und Listerien in der Milz

[A] Gezeigt ist ein Milzschnitt einer IFN $\beta^{mob/mob}$ Maus 24 h nach i.v. Infektion mit *L. monocytogenes*. Der Schnitt wurde wie beschrieben gefärbt. In der Ausschnittsvergrößerung deuten Pfeile infizierte bzw. Pfeilköpfe uninfizierte YFP⁺ Zellen an. Die YFP und *Listeria* Signale der Übersichtsaufnahme sind elektronisch vergrößert abgebildet. [B-C] Die dargestellten konfokalen Aufnahmen von Milzschnitten einer IFN $\beta^{mob/mob}$ Maus 24 h nach *L. monocytogenes* Infektion wurden wie beschrieben angefertigt. [C] Gezeigt ist ein orthogonaler Schnitt einer konfokalen Z-Stapel Serie der Milz. Im oberen bzw. rechten Bildbereich sind die X-Z- bzw. Y-Z-Ebenen dargestellt. Die Haupt X-Y-Ebene der Bildmitte zeigt eine Maximum-Projektion der übereinandergelagerten Stapel.

Daneben wurden allerdings auch in geringerer Anzahl YFP⁺ Zellen detektiert, die zum Zeitpunkt der Organfixierung kein Bakterium beherbergten. Ein vergleichbares Bild zeigten auch die konfokalmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 3.32 B, C). Die für diese Infektion genutzten wt Listerien waren durch Ausnutzen des Aktinzytoskeletts in der Wirtszelle motil. Somit konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die Bakterien intrazellulär zu einer benachbarten Zelle transmigrierten und somit eventuell YFP⁺ Zellen ohne Bakterien vorlagen. Daher wurden in einem weiteren Experiment *actA* defiziente Listerien zur *in vivo* Infektion eingesetzt (Abb. 3.33).

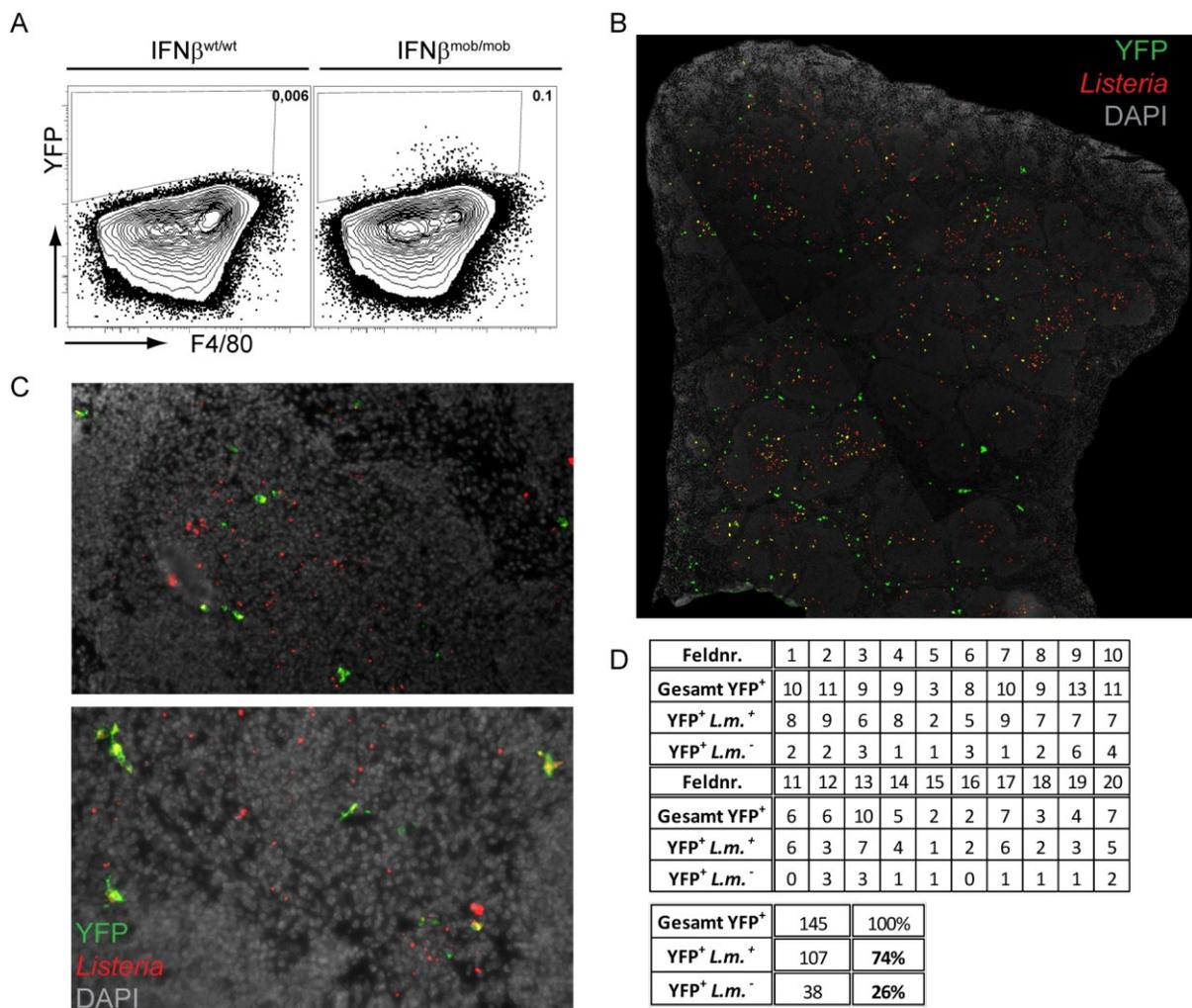


Abb. 3.33: Analyse des Infektionsstatus von YFP⁺ Zellen in der Milz nach Infektion mit $\Delta actA$ Listerien
 IFN $\beta^{mob/mob}$ und IFN $\beta^{wt/wt}$ Mäuse wurden für 24 h i.v. mit 10^7 CFU des *actA* defizienten *L. monocytogenes* Stammes infiziert. [A] Die Zellen in den dargestellten FACS Plots wurden elektronisch auf lebende CD19⁺ CD3 ϵ ⁺ Zellen vorselektiert. [B-C] Milzorganschnitte von IFN $\beta^{mob/mob}$ Mäusen wurden wie beschrieben gefärbt. YFP und *Listeria* Signale in [B] wurden vergrößert dargestellt. Die Bilder wurden mit 4- [B] bzw. 20-facher Objektivvergrößerung [C] aufgenommen. [D] Auszählung von Listerien in YFP⁺ Zellen in mikroskopischen Gesichtsfeldern.

Nach Infektion von IFN β ^{mob/mob} Mäusen mit $\Delta actA$ Listerien konnten sowohl durchflusszytometrisch als auch mikroskopisch YFP⁺ Zellen detektiert werden (Abb. 3.33 A-C). Durch eine quantitative Analyse der mikroskopischen Daten konnte festgestellt werden, dass ~75 % der YFP⁺ Zellen mit *L. monocytogenes* infiziert waren.

Unter Berücksichtigung der Resultate der *in vitro* Infektionsexperimente mit GFP exprimierenden Listerien ist davon auszugehen, dass in der überwiegenden Mehrheit der Zellen einer IFN β Expression eine produktive, sich über das Phagosom hinaus erstreckende Infektion vorangehen muss.

3.4.6 Identifizierung der IFN β /YFP⁺ Zellen als Tip-DCs

Die in Abschnitt 3.4.2 als inflammatorische Monozyten charakterisierten Hauptproduzenten von IFN β /YFP exprimierten bemerkenswerter Weise die myeloiden Zellmarker Ly6C, CD11b sowie CD11c in vergleichbarer Stärke wie eine spezielle Population von DCs, die als TNF und iNOS produzierende DCs (Tip-DCs) bezeichnet werden (Abb. 3.34 A) (Serbina *et al.*, 2003b; Jia *et al.*, 2009). Tip-DCs sind in der murinen Listeriose als wichtige Produzenten von TNF und iNOS bekannt und exprimieren intrazellulär das Glykoprotein Mac-3 in großen Mengen. Um die Hypothese zu testen, ob die bisher beobachteten YFP⁺ Zellen in der Tat eine Subpopulation von Tip-DCs sind, wurden IFN β /YFP⁺ Zellen via FACS Technologie aufgereinigt und mit YFP⁻ *bona fide* Tip-DCs, cDCs und Makrophagen verglichen (Abb. 3.34 B).

3.4.6.1 YFP⁺ Zellen weisen eine mit Tip-DCs vergleichbare Morphologie, Bakterienlast und intrazelluläre Mac-3 Expression auf

Zunächst wurde die bakterielle Last der FACS sortierten Zellen durch Ausplattieren einer definierten Anzahl der Zellen auf Blutagarplatten (Abb. 3.34 C) bestimmt und miteinander verglichen.

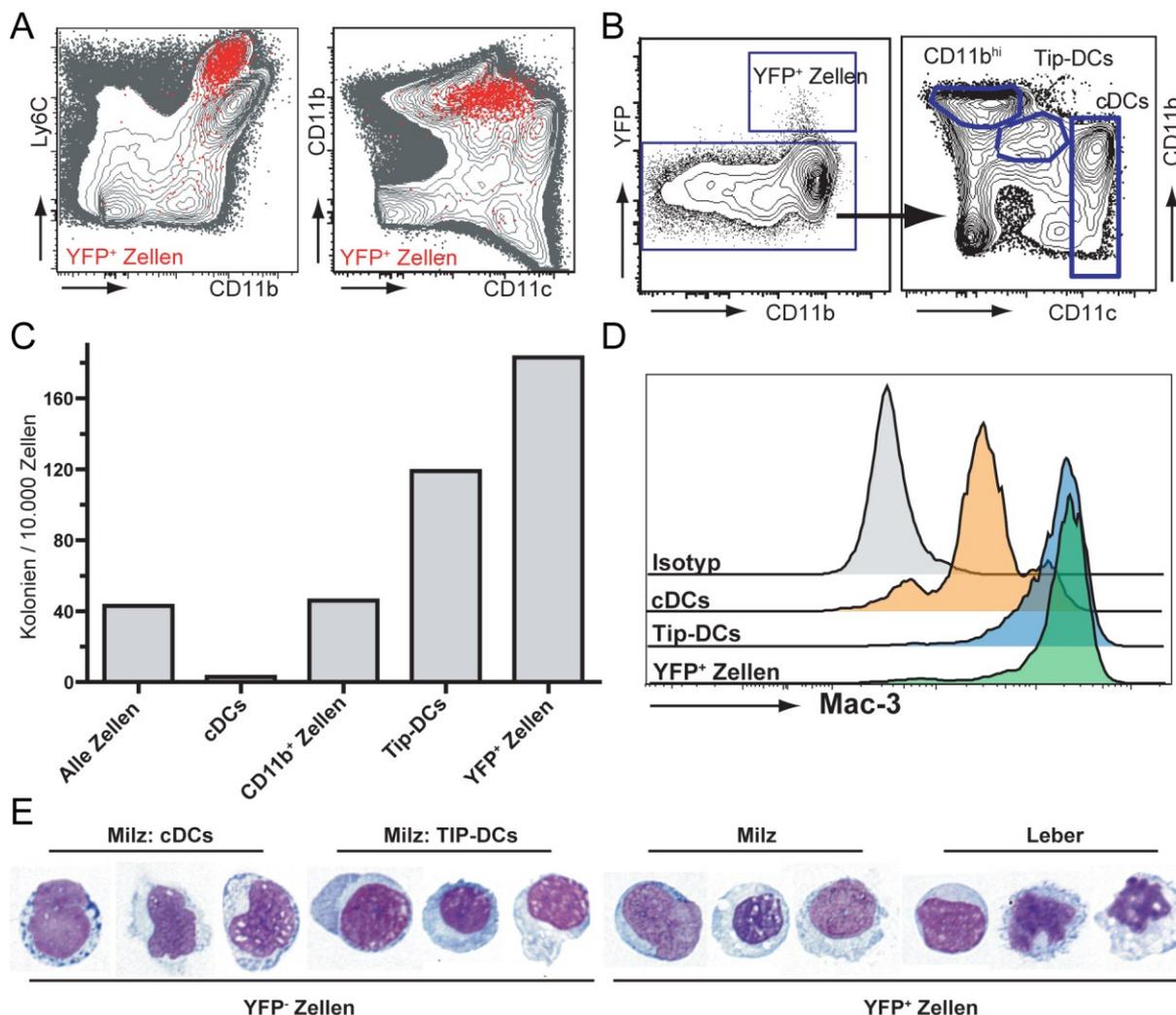


Abb. 3.34: Charakterisierung von *ex vivo* FACS sortierten Zellen nach *L. monocytogenes* Infektion
 IFN β _{mob/mob} Mäuse wurden für 24 h i.v. mit *L. monocytogenes* infiziert. [A] YFP⁺ Splenozyten (gezeigt als rote Punkte) wurden den YFP⁻ Zellen (gezeigt in grau) durch Rückgaten der FACS Daten überlagert. [B] Dargestellt ist die Sortier-Strategie, um YFP⁺ Zellen bzw. *bona fide* Tip-DCs, cDCs und CD11b^{hi} Makrophagen aus der YFP⁻ Splenozytenfraktion via FACS-Sort Technologie aufzureinigen. [C] Je 10⁴ Zellen der genannten Zellpopulationen wurden in PBS FACS sortiert und auf Blutagarplatten (COS/Biomerieux) ausplattiert. Nach 14 h Inkubation bei 37°C wurden die Bakterienkolonien ausgezählt. [D] Die intrazelluläre Expression von Mac-3 der FACS sortierten Zellen wurde nach intrazellulärer Färbung durchflusszytometrisch analysiert. Als Färbekontrolle wurden FACS sortierte Gesamt-Splenozyten mit einem Ig-Isotyp angepassten unspezifischem Antikörper gefärbt. [E] Die genannten FACS sortierten Zellpopulationen aus Milz und Leber wurden mittels Zytospin auf Objektträger zentrifugiert und mit einem Eosin-G/Azur-B Färbekit gefärbt. Die gezeigten durchlichtmikroskopischen Aufnahmen wurden mit 100 -facher Objektivvergrößerung aufgenommen.

Es zeigte sich bei diesem Ansatz, dass nicht die in der Literatur als am stärksten *L. monocytogenes* infizierte Zellpopulation diskutierten CD11b^{hi} Makrophagen (Muraille *et al.*, 2005; Jablonska *et al.*, 2007), sondern die sortierten Tip-DCs und vor allem die YFP⁺ Zellen die höchste Bakterienlast trugen (Abb. 3.34 C). Als nächstes wurde die Zellmorphologie und das Mac-3 Expressionsniveau von YFP⁻ cDCs und YFP⁻ Tip-DCs mit dem von YFP⁺ Zellen verglichen. Während sich morphologisch keine Unterschiede zwischen den sortierten Zellpopulationen feststellen ließen (Abb. 3.34 E), zeigten Tip-DCs

und YFP⁺ Zellen eine vergleichbar starke Mac-3 Expression, die deutlich über der größtenteils intermediären Mac-3 Expression der sortierten cDCs lag (Abb. 3.34 D).

3.4.6.2 IFN β /YFP⁺ Zellen zeigen die höchste iNOS und TNF Expression

Das namensgebende Charakteristikum von Tip-DCs ist deren Fähigkeit nach *L. monocytogenes* Infektion große Mengen TNF zu sekretieren und iNOS zu exprimieren. Aus diesem Grund wurden diese konzeptionellen Fähigkeiten durch intrazelluläre Färbungen in den sortierten Zellpopulationen bestimmt (Abb. 3.35).

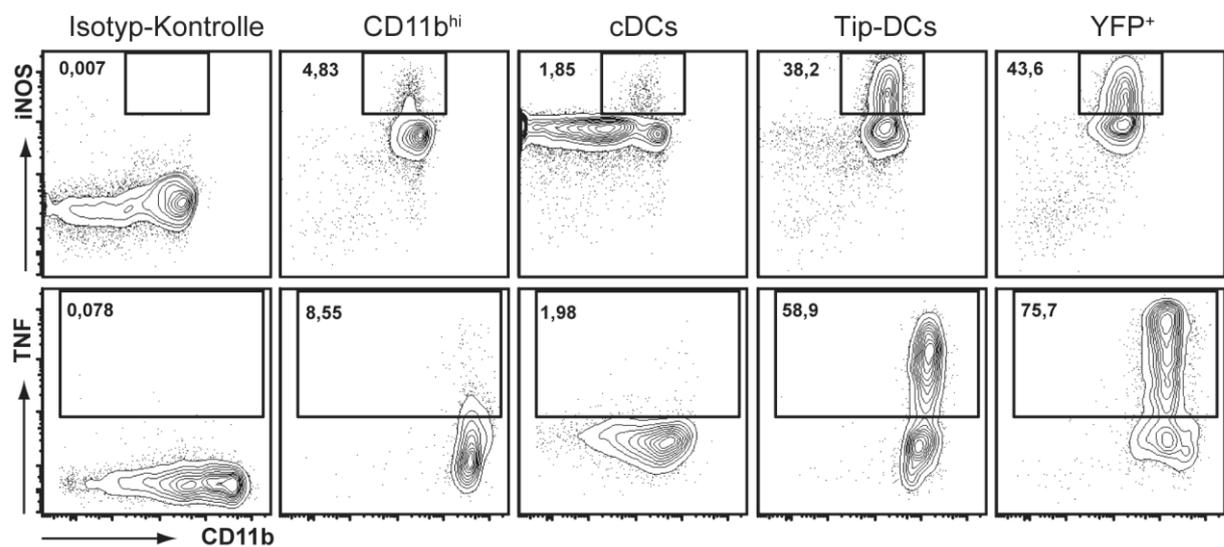


Abb. 3.35: Analyse von TNF und iNOS Expression in sortierten Zellpopulationen aus infizierten Milzen
 IFN β ^{mob/mob} Mäuse wurden für 24 h i.v. mit 10⁶ CFU *L. monocytogenes* infiziert. YFP⁺ Zellen und YFP⁻ Zellpopulationen wurden analog zu Abb. 3.34 aufgereinigt und durch intrazelluläre Färbungen auf die Expression von iNOS bzw. TNF untersucht. Die Analyse-Gates wurden an der jeweiligen cDC Färbung ausgerichtet. Zu den verwendeten Antikörpern wurden als Kontrollen Ig-Isotyp identische unspezifische Antikörper in FACS sortierten Gesamtsplenozyten verwendet.

Überraschender Weise konnten hohe Frequenzen an iNOS⁺ und TNF⁺ Zellen ausschließlich in den Tip-DC und IFN β /YFP⁺ Zellproben detektiert werden, wobei die YFP⁺ Zellen sowohl den höchsten Anteil an iNOS⁺ als auch an TNF⁺ Zellen zeigten (Abb. 3.35). Im Gegensatz hierzu konnten in cDCs und CD11b^{hi} Makrophagen nur jeweils geringe Frequenzen an iNOS⁺ und TNF⁺ Zellen nachgewiesen werden. Hierdurch konnte eindeutig die zelluläre Identität der IFN β Produzenten von cDCs und Makrophagen getrennt werden.

3.4.6.3 IFN β ⁺ Zellen lokalisieren in iNOS⁺ Arealen der *L. monocytogenes* infizierten Milz

Eine Färbung von YFP⁺ und iNOS⁺ Zellen in seriellen Milzschnitten von mit *L. monocytogenes* infizierten IFN β ^{mob/mob} zeigte, dass beide Zelltypen in identischen Arealen in der weißen-Pulpa der Milz kolokalisierten (Abb. 3.36).

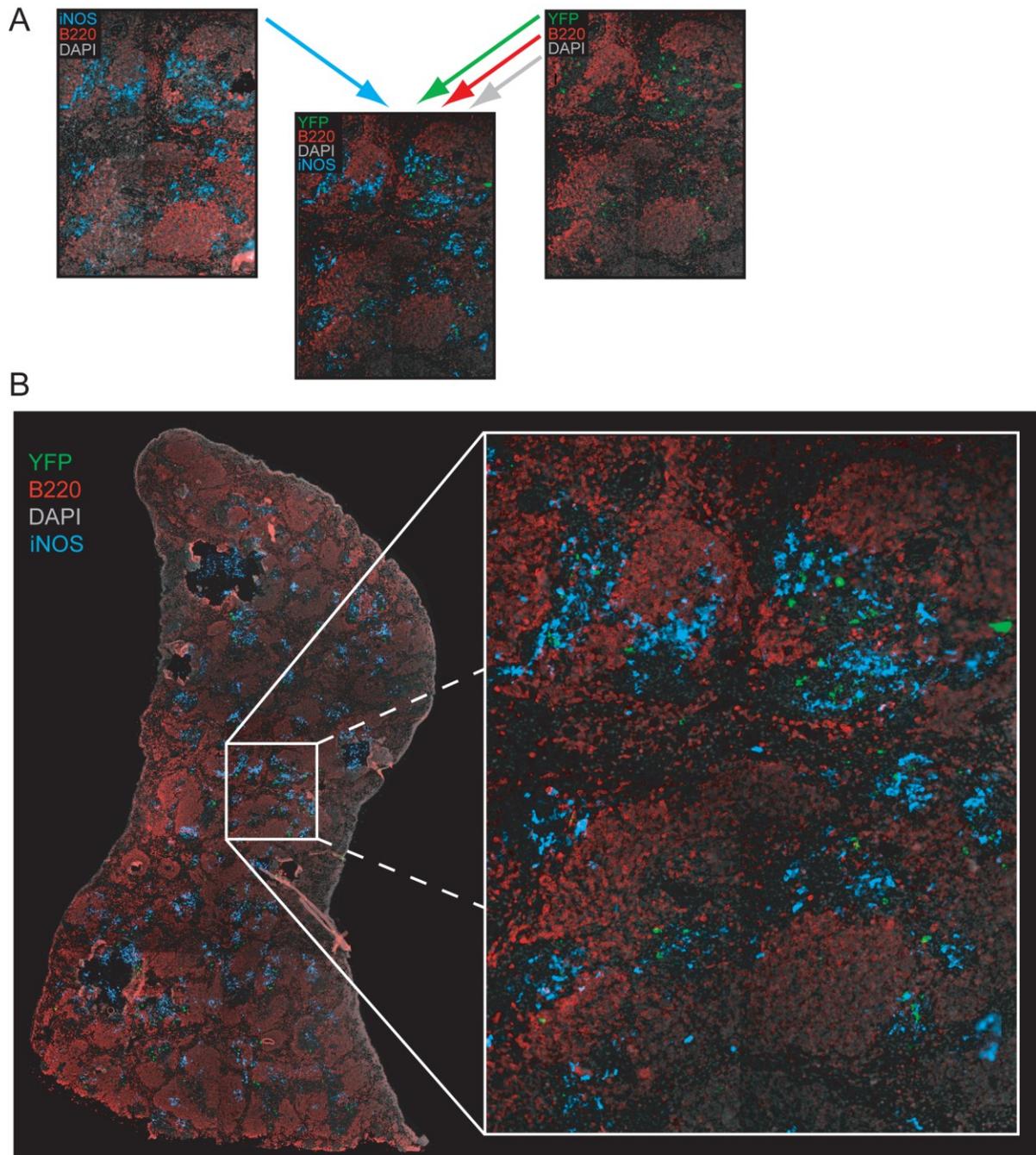


Abb. 3.36: Lokalisation von IFN β /YFP⁺ und iNOS⁺ Zellen in der *L. monocytogenes* infizierten Milz
 [A] Gezeigt ist die Konstruktion des überlagerten Bildes aus seriellen Aufnahmen. Die Pfeile zeigen die jeweiligen Farbkanäle der Ursprungsbilder, die in dem fertigen Bild vereinigt wurden. In den seriellen Schnitten wurde YFP, B220, DAPI bzw. iNOS, B220 und DAPI gefärbt. Die Überlagerung der Färbungen serieller Schnitte wurde an der B220 und DAPI Färbung beider Aufnahmen ausgerichtet. Unschärfe wurde durch Eliminierung des DAPI und B220 Farbkanals der iNOS, B220 und DAPI Färbung vermieden. Die Signale wurden mit Tyramid-FITC (YFP und iNOS)

bzw. Tyramid-Bio und Streptavidin-Cy3 (B220) verstärkt. Nuklei wurden mit DAPI gegengefärbt. [B] Gezeigt ist ein aus zwei seriellen Schnitten überlagertes Bild der Milz 24 h nach i.v. Infektion mit 10^6 CFU *L. monocytogenes*. Die Objektivvergrößerung betrug 4 –fach für die Übersichtsaufnahmen bzw. 20 –fach für den gezeigten Bildausschnitt.

Da die IFN β produzierenden Zellen in der murinen Listeriose sowohl den phänotypischen als auch den funktionellen Tip-DC Charakteristika entsprachen, zeigten diese Resultate, dass es sich bei den IFN β ⁺ Zellen um eine hochspezialisierte Tip-DC Subpopulation handelt, die neben der Produktion von TNF und iNOS als zusätzliche Effektorfunktion die Sekretion von IFN β besitzen.

3.4.7 IFN β ⁺ Tip-DCs sind T-Zell „primende“ APCs

Der Oberflächenmarker-Phänotyp der IFN β produzierenden Zellen nach *L. monocytogenes* Infektion (Ly6C^{hi}, CD11b⁺, F4/80⁺) ordnet diese Zellen in die Gruppe inflammatorischer Monozyten ein (Geissmann *et al.*, 2010; Serbina *et al.*, 2008). Nach den durchgeführten intrazellulären Färbungen von Effektormolekülen (vgl. Abb. 3.35) sind die IFN β /YFP⁺ Zellen jedoch einer Subpopulation von TNF und iNOS produzierenden DCs zuzurechnen. Weil diese YFP⁺ Tip-DCs sowohl positiv für MHC Klasse II als auch für kostimulatorische Marker waren, wurde die Frage untersucht, in welchem Maße diese Zellen *bona fide* DCs sind.

Das Kern-Merkmal von DCs ist ihre Fähigkeit naive T-Zellen zu aktivieren (sog. „primen“). Daher wurden IFN β /YFP⁺ Tip-DCs, Makrophagen, cDCs sowie *bona fide* Tip-DCs *ex vivo* aus *L. monocytogenes* infizierten Milzen FACS sortiert und als Stimulatoren in einer Gemischten-Lymphozyten-Reaktion (mixed lymphocyte reaction, MLR) eingesetzt. Auf diese Weise wurde die Fähigkeit der sortierten Zellpopulationen analysiert eine Proliferation von naiven CD4⁺ T-Zellen zu induzieren (Abb. 3.37).

Im Gegensatz zu den sortierten Makrophagen, die keine signifikante T-Zell-Proliferation bewirkten, riefen cDCs die stärkste T-Zell Teilung hervor. Bemerkenswerter Weise induzierten die sortierten IFN β ⁺ Tip-DCs ebenfalls eine hoch signifikante Proliferation der T-Zellen ($p < 0,001$ im Vergleich mit der Makrophagenprobe) und waren in dieser Eigenschaft den IFN β ⁻ *bona fide* Tip-DCs überlegen (Abb. 3.37).

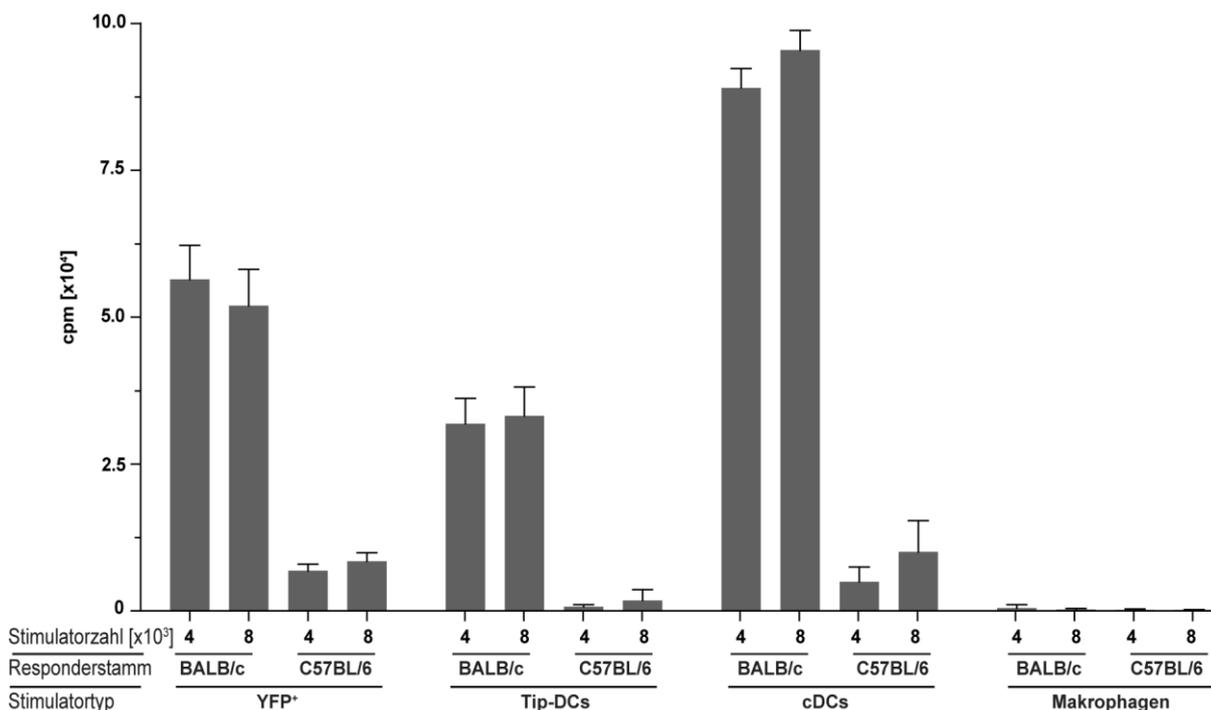


Abb. 3.37: Allogene MLR mit aus *L. monocytogenes* infizierten Milzen FACS sortierten Zellpopulationen YFP⁺ Zellen, Tip-DCs, cDCs und Makrophagen wurden aus Milzen von IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ Mäusen (C57BL/6) 24 h nach Infektion mit 10⁶ CFU *L. monocytogenes* FACS sortiert. Nach Bestrahlung mit 3000 rad wurden diese Zellen als Stimulatorzellen in einer allogenen MLR eingesetzt. Die Proliferation von CD4⁺ CD62L⁺ naiver T Zellen aus allogenen BALB/c bzw. isogenen C57BL/6 Responder-Mäusen, als Reaktion auf die sortierten Zell-Populationen, wurde durch Inkorporation von [³H]-Thymidin gemessen.

Dieses Experiment zeigte zum einen, dass die IFN β produzierenden Tip-DCs gemäß ihrer Fähigkeit zum "primen" naiver T-Zellen professionelle Antigen präsentierende Zellen (APCs) darstellen und grenzte zum anderen diese Tip-DCs deutlich von den nicht T-Zell aktivierenden Makrophagen ab.

3.4.8 Adoptiver Transfer von Tip-DCs in IFN $\beta^{-/-}$ Rezipienten

Allgemein wird angenommen, dass die Induktion von Typ I Interferonen in der murinen Listeriose von Nachteil für den Wirt ist (Auerbuch *et al.*, 2004; Carrero *et al.*, 2004; O'Connell *et al.*, 2004). So zeigten IFNAR-, IRF3- und IFN β defiziente Mäuse eine höhere Resistenz gegenüber einer *L. monocytogenes* Infektion als Wildtypiere und trugen in infizierten Organen eine reduzierte Bakterienlast (Stockinger *et al.*, 2009; Fehr *et al.*, 1997). Um zu testen, ob die als Haupt-IFN β -Produzenten identifizierten YFP⁺ Tip-DCs für diesen nachteiligen Effekt verantwortlich sind, sollten Gesamt-Tip-DCs aus Milzen von IFN $\beta^{-/-}$ Mäusen sowie YFP⁺ bzw. YFP⁻ Tip-DCs aus IFN $\beta^{\text{mob/mob}}$ Milzen nach *L. monocytogenes* Infektion aufgereinigt und i.v. in IFN $\beta^{-/-}$ Mäuse adoptiv transferiert werden. Durch Transfer von CD45.1⁺ cDCs und

Tip-DCs aus der Milz in CD45.1⁻ Rezipienten-Mäuse wurde im Vorfeld festgestellt, dass etwa 10 % der injizierten Zellen die Rezipienten-Milz erreichten (Abb. 3.38 A).

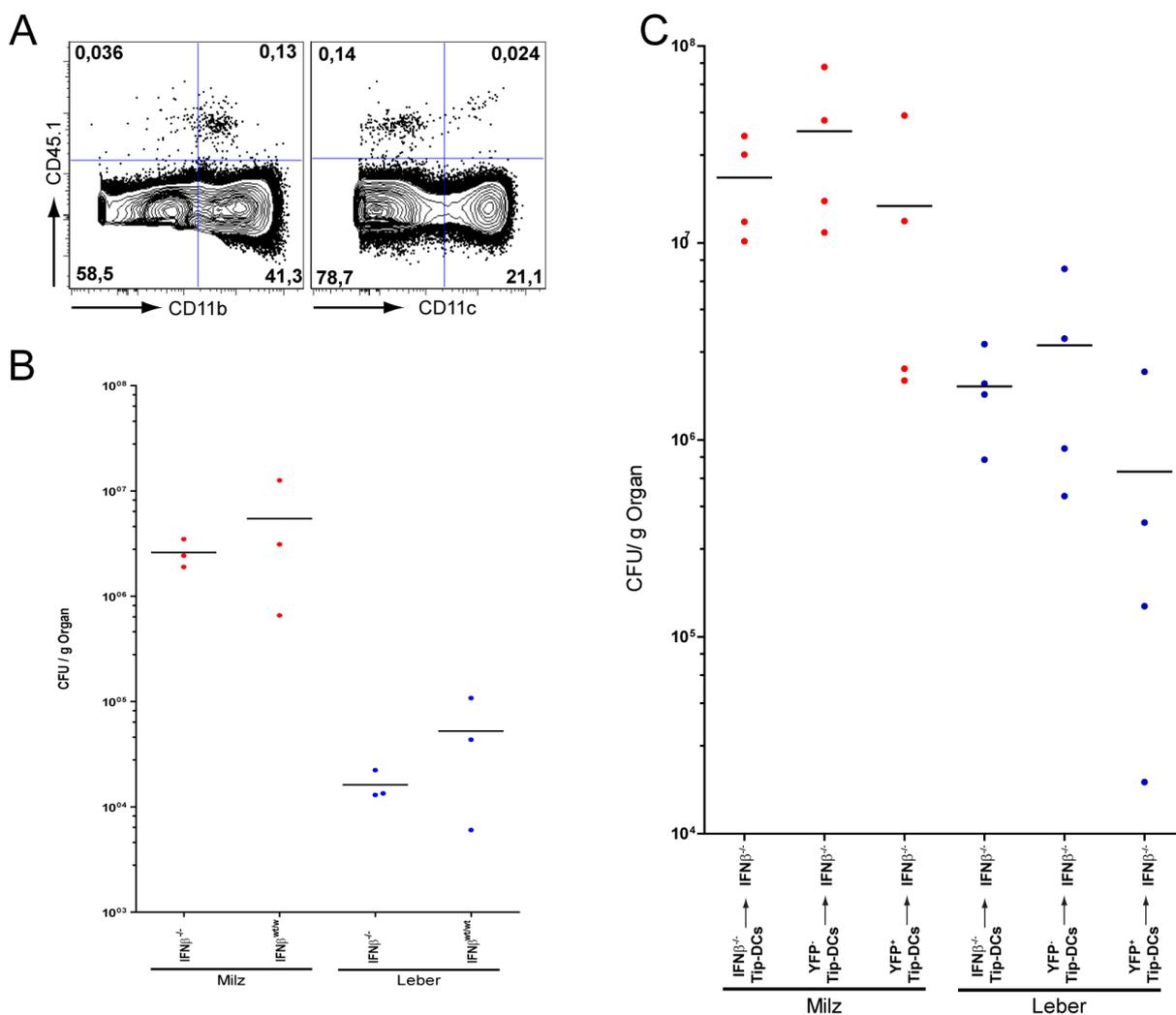


Abb. 3.38: Analyse des Einfluss von adoptiv transferierten IFNβ⁺ und IFNβ⁻ Tip-DCs auf die Bakterienlast
 [A] cDCs und Tip-DCs aus Milzen kongener CD45.1⁺ Mäuse wurden via FACS Sort Technologie aufgereinigt und je 10⁶ Zellen i.v. in eine CD45.1⁻ Maus injiziert. Nach 24 h wurden die adoptiv transferierten Zellen über ihren CD45.1 Marker in der Milz der Rezipienten-Maus identifiziert. [B] IFNβ^{-/-} und IFNβ^{wt/wt} Mäuse wurden i.v. mit 5 × 10⁴ CFU *L. monocytogenes* infiziert. Milz und Leber wurden nach 3 d entnommen und die Bakterienlast in CFU/g Organ bestimmt. [C] IFNβ^{-/-} und IFNβ^{mob/mob} Mäuse wurden für 24 h i.v. mit 10⁶ CFU *L. monocytogenes* infiziert. Es wurden entweder 10⁵ FACS sortierte Tip-DCs aus IFNβ^{-/-} Milzen adoptiv in IFNβ^{-/-} Mäuse transferiert oder 10⁵ YFP⁺ bzw. YFP-FACS sortierte Tip-DCs aus IFNβ^{mob/mob} Milzen in IFNβ^{-/-} Mäuse transferiert. Die Rezipienten-Mäuse wurden für 3 d mit 5 × 10⁴ CFU *L. monocytogenes* infiziert. Die Bakterienlast von Milzen und Lebern der Rezipienten-Tiere wurden anschließend bestimmt.

Ein Vergleich der Bakterienlast in Milz und Leber zwischen IFNβ^{-/-} und IFNβ^{wt/wt} Tieren nach *L. monocytogenes* Infektion zeigte, wie erwartet, eine höhere Bakterienlast in den Organen der wt-Mäuse. Der Unterschied umfasste in etwa 0,5 Log Stufen und war aufgrund der Wertestreuung bei der hier erreichbaren Gruppengröße nicht signifikant ($p > 0,05$). Das Resultat des adoptiven Transfers von IFNβ/YFP⁺,

IFN β /YFP⁻ bzw. IFN β ^{-/-} Tip-DCs in IFN β ^{-/-} Rezipienten stand im Gegensatz zu dem bisher publizierten negativen Effekt der Typ I IFN Induktion in der murinen Listeriose. Während der Transfer von YFP⁻ Tip-DCs zu einer höheren Bakterienlast in den Rezipienten-Mäusen führte als die Injektion von IFN β ^{-/-} Tip-DCs, konnten die im Durchschnitt niedrigsten Bakterienzahlen in Milz und Leber nach Transfer von IFN β /YFP⁺ Tip-DCs beobachtet werden. Der Unterschied der Mittelwerte war auch hier nicht signifikant ($p > 0,05$).

Die IFN β produzierenden Tip-DCs, als höchst potente TNF und iNOS exprimierende Effektor-Zellen besitzen demnach zu mindestens in dem gewählten Experimentalansatz zum untersuchten Zeitpunkt einen protektiven Effekt in der murinen *L. monocytogenes* Infektion.

Es konnte gezeigt werden, dass in der murinen Listeriose eine Subpopulation stark infizierter Tip-DCs für die Produktion von IFN β verantwortlich war. Diese Zellen waren höchstgradig aktivierte Effektorzellen und besaßen einen protektiven Einfluss auf den Verlauf der Infektion.

4 Diskussion

Typ I Interferone nehmen neben der Induktion eines antiviralen Zellzustandes mannigfaltige Aufgaben im Immunsystem wahr. Diese reichen von der Regulierung von T Zell Antworten über die B Zell Differenzierung bis hin zur Steigerung der Zytotoxizität von NK Zellen. Die Signaltransduktionswege, welche ausgehend von der Erkennung eines Pathogens oder molekularen mikrobiellen Produkten durch TLRs bzw. zytoplasmatische PRRs in der Expression von Typ I Interferonen münden sind weitgehend definiert. Ebenso sind die positiven oder negativen Konsequenzen ihrer Sekretion auf den Organismus in zahlreichen Infektions- und Autoimmunitätsmodellen hinreichend bekannt (Bogdan *et al.*, 2004; Baccala *et al.*, 2007; Prinz *et al.*, 2008; Kawai und Akira, 2010). Obwohl vermutlich unter geeigneten Stimulationsbedingungen fast jede Zelle zur Expression von Typ I Interferonen in der Lage ist, war es bisher nicht möglich die Induktion der Typ I IFN Antwort auf zellulärer Ebene *in vitro* oder unter physiologischen Bedingungen *in vivo* zu beobachten und die hierfür verantwortlichen Zelltypen zu identifizieren. In der vorliegenden Arbeit wurde zur *in vitro* und *in vivo* Charakterisierung der Initiation der Typ I IFN Antwort ein biscistronisches IFN β /YFP Reportermausmodell genutzt. Dieses ermöglichte eine Identifikation von IFN β produzierenden Zellen über eine Koexpression von YFP. Während nach *in vitro* Stimulation mit definierten mikrobiellen Bestandteilen distinkte Zellsubpopulationen IFN β produzierten, konnten nach *in vivo* Injektion von CpG bzw. poly(I:C) Teilpopulationen von pDCs bzw. cDCs als Hauptproduzenten von IFN β identifiziert und im immunhistologischen Kontext visualisiert werden. Die Analyse der IFN β Antwort im etablierten bakteriellen Infektionsmodell der murinen Listeriose zeigte, dass eine Subpopulation TNF und iNOS produzierender DCs (Tip-DCs) die Hauptproduzenten von IFN β waren. Eine Mikroarray basierte Transkriptom Analyse von IFN β ⁺ und IFN β ⁻ pDCs nach Stimulation mit CpG ODNs zeigte gravierende Unterschiede im Transkriptom der beiden Zellpopulationen. Dieses deutete auf distinkte immunologische Funktionen der pDC Populationen hin, die deutlich über die Expression oder Nicht-Expression von Typ I Interferonen hinausging.

4.1 Charakterisierung der IFN β Antwort nach Stimulation mit definierten mikrobiellen Bestandteilen

Der in der vorliegenden Arbeit genutzte IFN β ^{mob/mob} Reportermausstamm war bei Aufnahme der experimentellen Arbeiten bereits generiert und wurde durch den Vergleich der YFP Expression mit dem intrazellulär gefärbten IFN β Protein abschließend validiert (Scheu *et al.*, 2008); (Abb. 3.1). Die vergleichbar hohen Anteile von YFP⁺ und IFN β ⁺ Zellen belegten zusammen mit den zuvor durchgeführten Analy-

sen, dass das Mausmodell eine akkurate Detektion von IFN β produzierenden Zellen mit höherer Sensitivität ermöglicht als der intrazelluläre Nachweis des fortlaufend sekretierten Zytokins. Eine schwache konstitutive IFN β Expression, wie diese für embryonale Mausfibroblasten, Thymus-Epithelzellen und verschiedene myeloide Zellen in Milz und LN beschrieben ist (Hata *et al.*, 2001; Lienenklaus *et al.*, 2009), konnte jedoch nicht beobachtet werden. Dieses zeigt, dass erst ab einem bestimmten IFN β Schwellenwert Zellen durchflusszytometrisch bzw. immunhistochemisch als YFP⁺ zu identifizieren sind. Das hier genutzte Reportermaus-Modell erreicht daher nicht die hohe Sensitivität eines IFN β Luciferase Mausmodelles (Lienenklaus *et al.*, 2009) oder der Detektion der IFN β mRNA mittels RT-PCR (Hata *et al.*, 2001), ermöglicht aber exklusiv und zuverlässig eine Identifizierung der Haupt-IFN β Produzenten *in vivo* auf zellulärer Basis ohne störenden Hintergrund.

Stimulationskinetiken mit dem potenten Typ I IFN induzierendem TLR3/MDA-5 Agonisten poly(I:C) (Field *et al.*, 1967) durchgeführt an BMDMs bzw. GM-CSF-DCs zeigten, dass etwa nach 4 h eine IFN β /YFP Expression nachzuweisen, aber erst 24–48 h nach Stimulation die maximale Frequenz YFP⁺ Zellen vorhanden war (Abb. 3.2). *In vivo* konnte hingegen durch ELISA Messungen im Serum poly(I:C) stimulierter Mäuse die höchste IFN β Proteinkonzentration bereits nach 3 h beobachtet werden, die anschließend deutlich abfiel (Gitlin *et al.*, 2006). Vergleichbares wurde auch für globale Typ I IFN Serumkonzentrationen nach CpG, LPS und R848 Stimulation beschrieben (Asselin-Paturel *et al.*, 2005). Diese widersprüchlichen Daten können zum Teil mit einer Betrachtung des YFP Reifeprozesses erklärt werden. Bevor neu synthetisiertes YFP in der Lage ist Fluoreszenz zu emittieren, muss das Protein zunächst in seine native Konformation falten und dann in einem Prozess mit einer Zeitkonstanten von etwa 2-4 h das aktive Chromophor ausbilden (Heim *et al.*, 1994; Nagai *et al.*, 2002). Somit ist die Detektion der YFP Fluoreszenz zeitlich gegenüber der Sekretion des Zytokins um mehrere Stunden verzögert und in Einklang mit der publizierten Datenlage. Im Gegensatz zum sekretierten IFN β akkumuliert das koexprimierte YFP in der Zelle und besitzt somit in Bezug auf die Nachweisbarkeit in biologischen Systemen eine andere Halbwertszeit. Aus diesem Grund war ein rasches Abklingen der Frequenz YFP⁺ Zellen selbst nach Beendigung der Zytokinsekretion nicht zu erwarten. Da bisher keine Möglichkeit bestand akkurat die Initiation der Typ I IFN Antwort auf zellulärer Ebene *in vivo* zu verfolgen, ist der gewählte Ansatz, das zu Beginn in der Typ I IFN Antwort produzierte IFN β durch Koexpression eines Fluorophors zu visualisieren, bisher alternativlos und zugleich erfolgreich, wie die im Rahmen der vorliegenden Arbeit präsentierten Resultate belegen.

Pathogen assoziierte molekulare Muster werden von den Zellen des Immunsystems durch zahlreiche Rezeptorsysteme detektiert und führen nach Induktion von Signaltransduktionskaskaden zur Zellaktivierung und der Expression von Zytokinen. Die Mitglieder der TLR Familie sind auf der Zelloberfläche und Membranen von Lysosomen und Endosomen lokalisiert wobei jeder TLR eine spezifische Funktion in Bezug auf PAMP Erkennung und Immunantwort besitzt (Kawai und Akira, 2010). Daneben wird auch das Zytosol der Zelle auf Anwesenheit von PAMPs überwacht. Neben den zytosolischen NOD-LRR Proteinen, die bis auf Ausnahme von NOD2 nach Aktivierung keine Typ I IFN Antwort induzieren, sind dort unter anderem die CARD Helikasen MDA-5 bzw. RIG-I exprimiert, die nach Binden von dsRNA bzw. 5'Triphosphat dsRNA eine Typ I IFN Antwort auslösen (Akira *et al.*, 2006; Hornung und Latz, 2010; Hornung *et al.*, 2006). Obwohl TLRs zum Teil gemeinsame Signalwege nutzen, existiert häufig ein Unterschied in den rekrutierten Adaptermolekülen. Während sämtliche TLRs außer TLR3 das Adaptermolekül MyD88 nutzen, rekrutieren TLR3 und TLR4 das Adaptermolekül TRIF. Da die neben MyD88 und TRIF existierenden Proteine TRAM und TIRAP lediglich als Sortieradapter fungieren, lassen sich im Groben die TLR Signalwege als MyD88 abhängig und als TRIF abhängig bzw. MyD88 unabhängig klassifizieren. Im Kontext einer mikrobiellen Infektion treten PAMPs immer in Kombinationen auf. Das Pathogen aktiviert daher durch die ihm immanenten PAMPs während einer Infektion multiple PRR Signalwege, die miteinander interferieren und am Ende eine spezifische Immunantwort für die jeweilige Mikrobe aktivieren (Kawai und Akira, 2010; Takeda und Akira, 2004). Aus diesem Grund kann im Unterschied zur Zellstimulation mit einem isolierten TLR Agonisten eine simultane Stimulation mit distinkten PAMPs eine Inhibition oder synergistische Steigerung der induzierten Zytokinantwort zur Folge haben.

In BMDMs konnte eine synergistische Expression von IFN β /YFP nach simultaner Induktion des MyD88 abhängigen TLR9 Signalwegs durch CpG 1668 und des TRIF abhängigen TLR3 Weges durch poly(I:C) beobachtet werden (Abb. 3.3). Auch in GM-CSF-DCs führte die Kombination eines MyD88 abhängigen mit einem TRIF abhängigen TLR Agonisten zu einer kooperativen IFN β Expression und wurde für CpG 2216 und poly(I:C) sowie für CpG 1668 oder CpG 2216 und LPS gezeigt (Abb. 3.4). Ähnliche Resultate wurden bereits für die Expression von IL-6, IL-12, iNOS und TNF nach *in vitro* Stimulation von murinen Makrophagen mit poly(I:C) und dem B-Typ CpG ODN 1824 (Whitmore *et al.*, 2004) sowie für die Expression der Zytokine IL-6, TNF und MIP-1 α nach *in vivo* Injektion des MyD88 unabhängigen TLR3/MDA-5 Agonisten poly(I:C) zusammen mit dem MyD88 abhängigen TLR2 Agonisten Pam3Cys beobachtet (Bagchi *et al.*, 2007). Hieraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass die Kombination eines MyD88 abhängigen TLR Agonisten mit einem TRIF abhängigen TLR Agonisten zu einer synergistischen Zytokin-Expression führt (Napolitani *et al.*, 2005; Bagchi *et al.*, 2007). Diese Hypothese konnte nun erstmals direkt auf zellulärer Ebene auf die Induktion von IFN β erweitert werden.

Neben diesem gewissermaßen kombinatorischen Code beeinflusst auch die Lokalisation der verschiedenen TLRs und der Zelltyp die Typ I IFN Antwort. Während in Makrophagen die Kombination von poly(I:C) und des B-Typ CpG 1668 zu einer synergistischen Steigerung der Zellfrequenz YFP⁺ Zellen führt, ist hierzu in den generierten DCs neben poly(I:C) das A-Typ CpG nötig. Der Einsatz der jeweils anderen CpG Klasse führte nicht zum Synergismus, sondern zu einer etwa gleichbleibenden Frequenz YFP⁺ Zellen im Vergleich zu alleiniger poly(I:C) Stimulation. Aber auch die alleinige Stimulation mit CpG ODNs zeigte zelltypspezifische Unterschiede zwischen BMDMs und GMCSF-DCs hinsichtlich der Fähigkeit IFN β zu induzieren. Das A-Typ CpG ODN ist durch ein zentrales palindromisches Phosphodiester CpG Motiv und beiderseits flankierenden Poly Guanin Sequenzen mit Phosphothioat-Rückgrat charakterisiert und induzierte in einer Subpopulation der GMCSF-DCs IFN β . CpG 1668 zählt zur Klasse der B-Typ ODNs, weist keine palindromische Sequenz auf, besitzt ausschließlich Phosphothioatbindungen und induzierte in den generierten Zelltypen nur eine geringe Anzahl IFN β /YFP⁺ Zellen. Dieses spiegelt in wesentlichen Punkten Befunde früherer Studien wieder, in denen beobachtet wurde, dass myeloiden GMCSF-DCs im Gegensatz zu Makrophagen nach CpG Stimulation potente IFN β Produzenten sind (Schroder *et al.*, 2007; Schmitz *et al.*, 2007). Allerdings induzierte dort das B-Typ ODN und nicht das A-Typ ODN die stärkste IFN β Expression.

Mechanistisch wurden Unterschiede in der Signaltransduktion zwischen myeloiden DCs und Makrophagen für die zelltypspezifische IFN β Expression verantwortlich gemacht. Hiernach ist die TLR9 vermittelte Induktion von IFN β in myeloiden DCs abhängig von dem Interferon Regulatory Factor (IRF)-1 und unabhängig von sowohl IRF-3, der essentiell in der TRIF- (TLR3, TLR4) und IPS-1 (RIG-I, MDA-5) basierten IFN β Induktion ist, als auch unabhängig von IRF-7, der eine Schlüsselposition in der Expression von Typ I IFN in pDCs nach Aktivierung von TLR7 oder TLR9 spielt (Schroder *et al.*, 2007; Schmitz *et al.*, 2007).

In Übereinstimmung mit der beobachteten Inhibition der IFN α Expression in pDCs nach simultaner Stimulation mit dem TLR7 Agonisten R848 und dem TLR9 Liganden CpG 2216 (Berghofer *et al.*, 2007), konnte unter vergleichbaren Bedingungen in GMCSF-DCs eine drastische Reduktion der Frequenz YFP⁺ Zellen festgestellt werden. Weil beide TLRs in myeloiden DCs exprimiert werden und in endosomalen Kompartimenten lokalisieren (Barton und Kagan, 2009; Edwards *et al.*, 2003), ist eine naheliegende Hypothese, dass eine simultane Aktivierung beider MyD88 abhängiger TLRs zu einer Interferenz in der Signalkaskade führt. Andererseits ist denkbar, dass eine Priorisierung des TLR7 Signals gegenüber dem des CpG Stimulus erfolgt, da selbst substimulatorische R848 Konzentrationen eine nachfolgende TLR9 induzierte IFN α Expression unterdrücken (Berghofer *et al.*, 2007).

In der Summe zeigen die Ergebnisse, dass nach Stimulation mit distinkten PAMPs zelltypspezifische Aktivierungsmuster für die Induktion der Typ I IFN Antwort verantwortlich sind. Welche biologische Bedeutung hat dieses nun im Kontext des Organismus?

Pathogene aktivieren durch eine Reihe verschiedener PAMPs in der Regel nicht nur einen sondern multiple PRRs. Die Zelle integriert dies über die Interferenz der einzelnen aktivierten Signalwege und induziert ein zelltypspezifisches Repertoire an Zytokinen, um eine maßgeschneiderte Immunantwort gegen den jeweiligen Krankheitserreger einzuleiten. Aufgrund der pleiotropen immunregulatorischen Funktionen von Typ I Interferonen ist es von zentraler Relevanz auch die Expression von IFN α /IFN β der jeweiligen Gefahrenlage anzupassen. Eine synergistische Induktion von IFN β , wie sie nach simultaner Stimulation mit poly(I:C) und CpG ODNs gezeigt wurde, ist auch *in vivo* von Relevanz. CpG Dinukleotide treten in bakteriellen und viralen Genomen statistisch vier Mal häufiger auf als in Vertebraten. In diesen sind zudem die Cytosine hochgradig methyliert und das CpG Motiv immunologisch inaktiv, so dass CpG Motive potente Immunaktivatoren darstellen (Krieg *et al.*, 1995). Einige DNA Viren produzieren im Laufe ihres Replikationszyklus beachtliche Mengen dsRNA (Weber *et al.*, 2006) und besitzen neben CpG Motiven auch dsRNA um die PRR der Wirtszelle zu aktivieren. Da zahlreiche Viren Immunevasionsmechanismen zur Unterdrückung der dsRNA Detektion entwickelt haben, ist es hier umso wichtiger, eine starke Typ I IFN Antwort zu generieren (Bowie und Unterholzner, 2008). Darüber hinaus kann im Falle einer viralen Infektion eine erhöhte Gefährdung für eine bakterielle Koinfektion vorliegen (Small *et al.*, 2010), weswegen hier eine synergistische Steigerung der Zytokinsekretion zur stärkeren Immunabwehr sinnvoll ist.

Plasmazytoide DCs sekretieren nach Detektion viraler Nukleinsäuren oder synthetischer TLR7- und TLR9 Agonisten große Mengen an Typ I IFN, weswegen pDCs als natürliche Typ I IFN produzierende Zellen bezeichnet werden (Liu, 2005). In Makrophagen und cDCs wird nach Detektion eines viralen PAMPs das konstitutiv exprimierte IRF-3 phosphoryliert. Dieses transloziert daraufhin in den Nukleus und induziert die Expression der frühen Typ I Interferone, IFN β sowie IFN α 4. Diese werden sekretiert und initiieren mittels des Typ I IFN Rezeptors auf auto- und parakrine Weise eine positive Rückkopplung, die in der Expression des Transkriptionsfaktors IRF-7 und hiermit in einer Expression von sowohl sämtlichen Typ I Interferonen als auch den Typ I IFN stimulierten Effektorgenen mündet. Im Gegensatz zu diesem klassischen Signalweg der Typ I IFN Induktion ist in pDCs IRF-7 auf einem hohen Niveau konstitutiv exprimiert. Aus diesem Grund sekretieren pDCs, ohne von dem Rückkopplungsschritt Gebrauch machen zu müssen, direkt alle Typ I Interferone (Honda *et al.*, 2005b; Honda *et al.*, 2006; Fitzgerald-Bocarsly *et al.*, 2008). Daneben sind pDCs in der Lage A-Typ CpG ODNs lange Zeit in Endosomen zurückzuhalten und schaffen hiermit ideale Voraussetzungen für eine nachhaltige TLR9 Aktivie-

rung und Typ I IFN Expression. A-Typ CpG ODNs bilden spontan Aggregate über ihre poly G Motive und lokalisieren in pDCs in Transferrin-Rezeptor positiven Endosomen. B-Typ CpG ODNs sind dem hingegen nicht zur Aggregatbildung in der Lage, lokalisieren in Lysosome-associated membrane protein (LAMP)-1⁺ Lysosomen und induzieren kaum IFN α . Werden B-Typ CpG ODNs jedoch mit kationischen Lipiden wie DOTAP komplexiert, so verhalten sie sich wie A-Typ CpG ODNs in Hinblick auf endosomale Lokalisation und IFN α Induktion (Guiducci *et al.*, 2006; Honda *et al.*, 2005a; Kerkmann *et al.*, 2005). Diese spatiotemporäre Aktivierung von TLR7 und TLR9 in pDCs ist in cDCs und Makrophagen nicht vorhanden und ein Schlüsselfaktor zur hohen Typ I IFN Produktionskapazität von pDCs (Fitzgerald-Bocarsly *et al.*, 2008). Obwohl pDCs zytoplasmatische RNA Rezeptoren wie MDA-5 exprimieren, erfolgt die Induktion von Typ I Interferonen in ihnen vermutlich unabhängig von den CARD-Helikasen. Reziprok hierzu ist in cDCs die Expression von Typ I Interferonen nach viraler Infektion TRIF abhängig und basiert auf TLR3 und den CARD Helikasen (Longhi *et al.*, 2009; Kato *et al.*, 2006; Miyake *et al.*, 2009). Hierdurch können die Resultate nach PAMP Stimulation *in vitro* generierter myeloider Zellen treffend erklärt werden.

Sowohl pDCs als auch zu *in vivo* CD8 α ⁺ bzw. CD11b⁺ cDCs äquivalente DCs lassen sich *in vitro* durch Kultivierung von Knochenmarkszellen in Flt3L-haltigem Medium in einer einzigen Kultur generieren (Naik *et al.*, 2005). Durchflusszytometrisch trennbar sind pDCs bzw. cDCs der Flt3L-Mischkultur durch eine exklusive Expression von B220 bzw. CD11b (Gilliet *et al.*, 2002). Die beschriebene dichotome IFN β /YFP Expression von pDCs und cDCs der Flt3L-Mischkultur nach PAMP Stimulation reflektiert in idealer Weise die differentiellen PAMP Detektionsmechanismen beider Zelltypen (Abb. 3.5). Während poly(I:C) und LPS überwiegend IFN β in CD11b⁺ cDCs induzierte und nicht in den B220⁺ pDCs, verursachten beide CpG Arten sowie der TLR7 Agonist Imiquimod vorwiegend eine Antwort in pDCs. Wie beschrieben werden in pDCs B-Typ ODNs rasch in lysosomale Kompartimente transferiert und induzierten aus diesem Grund nur in wenigen Zellen IFN β . Im Gegensatz hierzu wird das A-Typ CpG in den TLR9 beinhaltenden Endosomen sequestriert und löst eine robuste IFN β Expression in zahlreichen pDCs aus. Die Resultate erweitern somit die für IFN α diskutierte A-Typ CpG Abhängigkeit auf die Induktion von IFN β . Durch Transfektion von mit DOTAP komplexiertem B-Typ CpG wurde eine Lokalisierung des ODNs in endosomalen Zellkompartimenten erzwungen. Hierdurch war die Interaktion zwischen endosomalem TLR9 und dem CpG ODN gewährleistet und resultierte in einer 10-fachen Steigerung der Zellfrequenz IFN β ⁺ pDCs.

Die *in vitro* in Flt3L-DCs identifizierte und sowohl Zelltyp- (cDC bzw. pDC) als auch Agonist-spezifische (poly(I:C) bzw. CpG ODN) dichotome IFN β Expression war in identischer Weise auch nach *in vivo* Injektion von poly(I:C) und DOTAP komplexiertem CpG 1668 zu beobachten. Nach poly(I:C) Injektion

konnten hauptsächlich $CD8\alpha^+$ cDCs als $IFN\beta^+$ Zellen identifiziert werden. Ausgehend von der roten Pulpa der Milz akkumulierten diese Zellen schließlich in der Marginalzone und den T-Zell Arealen der weißen Pulpa bzw. lokalisierten in den LN im Bereich des subkapsulären Sinus und des Paracortex (Abb. 3.7 - Abb. 3.12). Im Gegensatz hierzu stellten pDCs nach CpG Injektion den überwiegenden Anteil der Typ I IFN Antwort-Initiatoren dar, die relativ statisch im Bereich der T-/B-Zellgrenze der weißen Pulpa der Milz und der LN lokalisierten (Abb. 3.15).

Vergleichbare *in vivo* Experimente mit einer $IFN\alpha 6^{wt/GFP}$ Reportermaus zur zellulären Visualisierung der $IFN\alpha$ -Expression zeigten hinsichtlich der Phänotypen und niedrigen Anzahl an GFP^+ Zellen identische Ergebnisse (Kumagai *et al.*, 2007). Diese gespaltene stimuluspezifische $IFN\beta$ Induzierbarkeit in pDCs und cDCs reflektiert grundsätzliche Unterschiede zwischen den beiden DC Typen. pDCs exprimieren kein TLR3, TLR4 und TLR5 (Colonna *et al.*, 2004; Iwasaki und Medzhitov, 2004; Liu, 2005) und sind darauf spezialisiert virale Nukleinsäuren mit den endosomal exprimierten TLR7 und TLR9 zu detektieren. Während über TLR7 ssRNA Viren detektiert werden (Wang *et al.*, 2006; Beignon *et al.*, 2005), spielt TLR9 eine dominante Rolle bei der Typ I IFN Induktion nach Detektion von DNA Viren durch pDCs (Fitzgerald-Bocarsly *et al.*, 2008; Hochrein *et al.*, 2004; Lund *et al.*, 2003).

Wie beschrieben ist die Detektion viraler Nukleinsäuren in cDCs abhängig von TLR3 sowie zytoplasmatischen Rezeptorsystemen. Nach TLR Stimulation regulieren cDCs den Chemokinrezeptor CCR7 hoch und migrieren einem CCL19 und CCL21 Chemokingradienten folgend in die T-Zell Areale sekundärer lymphatischer Organe (Reis e Sousa *et al.*, 1997; Vassileva *et al.*, 1999). Die Marginalzone der Milz ist insbesondere zum Erkennen von sich über das Blutgefäßsystem ausbreitenden Krankheitserregern wichtig. Mäuse mit einer fehlenden oder suboptimal ausgebildeten Marginalzone können nach viraler Infektion keine angemessene $IFN\alpha$ Antwort auslösen (Louten *et al.*, 2006). Daher ist es durchaus sinnvoll, dass viele $IFN\beta^+$ cDCs an Antigen-Eintrittspositionen wie der Marginalzone der Milz oder dem subkapsulären Sinus der LN lokalisierten (Lopez-Bravo und Ardavin, 2008). Die immunologische Funktion der $IFN\beta^+$ $CD8\alpha^+$ cDCs in der T-Zell Zone könnte in der Aktivierung einer antiviralen T-Zell Antwort bestehen. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnte gezeigt werden, dass $CD8\alpha^+$ cDCs viel potenter in der Lage sind über Kreuzpräsentation von Antigenen eine Virus-spezifische $CD8^+$ T-Zell Antwort zu initiieren als ihr $CD8\alpha^-$ Pendant (Dudziak *et al.*, 2007).

TLR Agonist aktivierte pDCs migrieren chemotaktisch ausgehend von der T-Zell Zone und der roten Pulpa der Milz, in denen sie verstreut vorhanden sind, hauptsächlich in die Marginalzone, in der sie sich zu Zell-Haufen zusammenfinden. Anders als hier in dieser Arbeit für die $IFN\beta$ produzierenden Zellen gezeigt, migrieren nur sehr wenige TLR- aktivierte pDCs in die T-Zell Zone (Asselin-Paturel *et al.*,

2005). Dieses könnte darauf hindeuten, dass sich IFN β ⁺ pDCs gegenüber IFN β ⁻ DC in ihrem Migrationsverhalten unterscheiden. In der Tat konnte gezeigt werden, dass pDCs in Abhängigkeit von Typ I IFN den Chemokinrezeptor CCR7 induzieren, der diese Zellen empfänglich macht für den von T-Zell Zonen sekundärer lymphatischer Organe ausgehenden CCL19, CCL21 Chemokingradienten (Asselin-Paturel *et al.*, 2005; Reis e Sousa *et al.*, 1997; Vassileva *et al.*, 1999). Die Mikroarray-Analyse belegte, dass IFN β /YFP⁺ pDCs CCR7 deutlich stärker exprimierten als IFN β ⁻ pDCs (vgl. Tabelle 3.1). Dieses erklärt somit das tiefere Eindringen der YFP⁺ pDCs in die T-Zell Zone der Milz und bringt die hier beobachtete Verteilung YFP⁺ pDCs in Einklang mit der von Asselin-Paturel *et al.* festgestellten Lokalisierung der Gesamt-pDC Population nach systemischer CpG Stimulation (Asselin-Paturel *et al.*, 2005). Die wenigen in der T-Zell Zone der weißen Pulpa lokalisierten pDCs könnten demnach identisch mit den in dieser Arbeit charakterisierten IFN β /YFP⁺ pDCs sein. Eine detaillierte Analyse der Mikroarraydaten zeigte, nach Ausschluss einer qualitativ suboptimalen YFP⁻ Probe (s. Abschnitt 7.2) neben CCR7 und dem in IFN β ⁺ pDCs ebenfalls stärker exprimierten Chemokin CCL5 (RANTES), eine ganze Reihe weiterer in IFN β ⁺ pDCs überproportional im Vergleich zu IFN β ⁻ pDCs exprimierte Zytokine und Zytokinrezeptoren (Tabelle 4.1).

Gen	Δ	Funktion
<i>Ccl3</i>	22,53	
<i>Ccl4</i>	5,98	Rekrutierung von naiven CTLs, Aktivierung von NKT Zellen
<i>Ccl5</i>	18,25	
<i>Ccl22</i>	4,49	
<i>Cxcl16</i>	3,37	Rekrutierung von naiven CD8 T Zellen sowie NKT Zellen
<i>Ccr7</i>	9,72	Chemokinrezeptor, Chemotaxis nach CCL19, CCL21
<i>Il12a</i>	4,35	Zytokin, Aktivierung von Th1 Immunantwort
<i>Il12b</i>	36,01	
<i>Il15</i>	3,19	Induzierung von NK Zellproliferation nach Virusinfektion
<i>Il27</i>	3,43	Verstärker der T Zell Antwort
<i>Il28b</i>	10,55	Typ III IFN, Aktivierung eines antiviralen Zustands
<i>Cd200r1</i>	-5,34	negative Regulierung myeloider Zellaktivität nach Binden von CD200

Tabelle 4.1: Differenziell in IFN β ⁺ pDCs exprimierte Gene mit Relevanz für Chemotaxis und Zellaktivierung Mikroarraydaten gemäß Abschnitt 7.2. Der Δ Wert gibt den Faktor an um wie viel stärker ein Gen in YFP⁺ pDCs im Vergleich zu YFP⁻ pDCs transkribiert wird.

CCL5 ist bekannter Weise an der Rekrutierung von NK-Zellen durch Chemokinrezeptor vermittelte Chemotaxis und der Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen (CTLs) beteiligt und wird zu diesem Zweck unter anderem auch von pDCs exprimiert (Maghazachi *et al.*, 1996; Persson und Chambers, 2010; Zitvogel, 2002; Yoneyama *et al.*, 2005; Hadida *et al.*, 1999). Die im Vergleich zu den IFN β ⁻ pDCs von den IFN β ⁺ pDCs deutlich stärker exprimierten Chemokine CCL3, CCL4, CCL5 und CCL22 werden im allgemeinen von DCs unter inflammatorischen Bedingungen nach Interaktion mit T-Helfer-Zellen sekretiert und sind für die Rekrutierung von CD8⁺ CTLs verantwortlich (Castellino *et al.*, 2006; Semmling *et al.*, 2010; Kurts *et al.*, 2010). Durch Sekretion von CXCL16 erfolgt eine chemotaktische Rekrutierung von CXCR6 exprimierenden T- und NK T-Zellen (Matloubian *et al.*, 2000).

Diese Befunde implizieren, dass IFN β ⁺ pDCs durch ihre Lokalisierung in den T-Zell Arealen sekundärer lymphatischer Organe und durch ihr Chemokin-Expressionsprofil eine funktional tragende Rolle in der Rekrutierung und Aktivierung antiviraler Effektorzellen besitzen.

Kongruent mit dieser Hypothese sind die Auswirkungen der in den IFN β ⁺ pDCs stärker exprimierten Interleukine. Die von den IFN β ⁺ pDCs im Vergleich zu IFN β ⁻ pDCs stärker exprimierten Zytokine IL-12 und IL-27 sind Mitglieder der IL-12 Zytokinfamilie. Während IL-12 von zentraler Bedeutung für die Induktion einer T_H1 vermittelten zellulären Immunantwort ist, führt IL-27 zu einer Verstärkung dieses Antwort-Typs durch stärkere Expression des T_H1 spezifischen Transkriptionsfaktors T-bet und gleichzeitiger Inhibition des Transkriptionsfaktors GATA-3, der kritisch für die Einleitung einer T_H2-Antwort ist (Lucas *et al.*, 2003; Colgan und Rothman, 2006). Das in IFN β ⁺ pDCs überrepräsentierte IL-15 regt die Proliferation von NK Zellen nach viraler Infektion an und IL-28 trägt schließlich als Typ III IFN zur Induktion antiviraler Effektorproteine bei (Grabstein *et al.*, 1994; Murillo *et al.*, 2010; Kempuraj *et al.*, 2004).

IFN β produzierende pDCs scheinen somit eine exklusive und zentrale Aufgabe bei der Rekrutierung von CTLs und NK-Zellen zu erfüllen und damit essentiell zur Aktivierung der zellulären Virusabwehr beizutragen.

Nach *in vivo* poly(I:C) bzw. CpG Stimulation konnte jeweils neben CD8 α ⁺ cDCs bzw. pDCs eine weitere IFN β ⁺ Population beobachtet werden, die ihrem Oberflächenphänotyp nach keinem bekannten Zelltypen zuzuordnen war (Abb. 3.9 bzw. Abb. 3.14). Dieses waren CD11c^{int}, CD11b⁻, CD8 α ⁺, F4/80⁺ Zellen nach poly(I:C) Stimulation sowie eine CD11c^{int}, F4/80⁺, CD11b⁺, mPDCA-1⁺ Zellpopulation nach CpG 1668 Injektion. Generell zeigen gerade nach Zellstimulation einige Zellmarker eine plastische Expression. Der Antikörper mPDCA-1 erkennt das Antigen bone marrow stromal cell (BST)2 auf der Zelloberfläche von pDCs. BST2 wird allerdings auch auf Lungenzellen exprimiert und kann nach IFN β Stimulation

auf fast allen cDCs hochreguliert werden, wenn auch das hohe mPDCA-1 Expressionsniveau von *bona fide* pDCs in diesen nicht erreicht wird (Bochtler *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2010; Yong *et al.*, 2009). Daneben ist beschrieben, dass F4/80 auch auf DCs der Milz exprimiert wird (Leenen *et al.*, 1998). Auch ist bekannt, dass inflammatorische Ly6C⁺ Monozyten zu Entzündungsorten rekrutiert werden und dort zu anderen Zelltypen, wie DCs oder Makrophagen differenzieren. Oft ist hierbei eine Hochregulation von CD11c sowie MHC Klasse II zu beobachten, was als Zeichen einer DC Differenzierung gesehen wird. Unter inflammatorischen Bedingungen zeigt das monozytäre System bedingt dadurch, dass das jeweilige Entzündungsumfeld mit seinen multiplen Stimuli komplexe phänotypische Differenzierungswege zu verschiedensten Zelltypen induzieren kann, eine sehr hohe Plastizität (Serbina *et al.*, 2008; Gordon und Taylor, 2005). Es ist daher nicht auszuschließen, dass es sich bei den IFN β produzierenden Zellen sowohl nach poly(I:C) als auch nach CpG Injektion, tatsächlich zum Teil auch um differenzierte inflammatorische Monozyten handeln kann.

4.2 Analyse der Differenz zwischen IFN β ⁺ und IFN β ⁻ pDCs mittels eines Mikroarrays.

Ein wesentliches Charakteristikum der IFN β Expression ist, dass selbst unter optimalen Stimulations- und Infektionsbedingungen nur eine Subpopulation der Zellen, die einen IFN β induzierenden Stimulus erhalten, das Zytokin tatsächlich exprimiert (Senger *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2007; Scheu *et al.*, 2008). Dieses auf Einzelzellebene stochastische Phänomen wurde auch für weitere Zytokine wie IL-2 (Hollander *et al.*, 1998), IL-4 (Riviere *et al.*, 1998), IL-5, IL-13 (Kelly und Locksley, 2000) und IL-10 (Calado *et al.*, 2006) beschrieben. Das Erklärungsmodell für die IFN β Expression basiert auf einer interchromosomalen, zufälligen Interaktion verschiedener Loci, die den für die *Irfb* Transkription limitierenden Transkriptionsfaktor NF- κ B binden. Hierdurch kommt es in nur wenigen Zellen zu einer Induktion des Zytokins (Apostolou und Thanos, 2008). Dieses erlaubt die Aufstellung der Hypothese, dass sich die Unterschiede zwischen IFN β ⁺ und IFN β ⁻ pDCs alleinig auf die distinkte Expression der am IFN β Signalweg beteiligten Gene sowie die durch die Typ I IFN Antwort induzierten Effektorgene beschränken. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation RNA-Microarray-Hybridisierungen durchgeführt.

Diese Transkriptom-Analyse von IFN β ⁺ und IFN β ⁻ pDCs zeigte, dass neben differentiell regulierten Typ I Interferonen noch weitere Unterschiede auf transkriptioneller Ebene zwischen den beiden pDC Typen bestehen: Auf Seite der in YFP⁺ pDCs überrepräsentierten Transkripte waren im Vergleich zum Gesamt-Transkriptom signifikant mehr Gene mit annotierter Funktion in der Immun-, Defensiv- und Vi-

rusantwort vertreten, welche in der NK Zell vermittelten Zytotoxizität, der Zytokin-Zytokinrezeptor-Interaktion sowie in immunrelevanten Signalwegen beteiligt sind. In den unterrepräsentierten Transkripten wurde dem hingegen eine signifikante Anreicherung in Bereichen der Steroid- und Cholesterolsynthese, des Rho-Signalweges und intrazellulären Signalkaskaden entdeckt.

Die positive Regulation der IFN β Expression wurde erwartet und bestätigt das Funktionieren des Maus-Reportermodells. Da in pDCs die Detektion von CpG durch TLR9 im endosomalen Kompartiment der Zelle zu einer unmittelbaren IRF7 induzierten Expression von Typ I Interferonen führt (Honda *et al.*, 2005b; Honda *et al.*, 2006), lässt sich hiermit die zu IFN β parallele Expression der zahlreichen IFN α s bereits in der Initiationsphase der Typ I IFN Antwort 6 h nach Injektion des Stimulus erklären. Die verstärkte Transkription zahlreicher proinflammatorischer Gene könnte zum Teil auf das autokrine Wirken der sekretierten Typ I Interferone zurückzuführen sein. So kann über aktivierte MAPK und Jak/STAT Signalwege die differentielle Expression von Zytokinen (IL-6, IL-12), Chemokinen und die Aktivierung von im Zellzyklus beteiligter Proteine wie GTPasen (Cdc42, Rhob) und Kinasen (Cdk6) erklärt werden (Abb. 3.20). Jedoch ist es durchaus fraglich, ob bereits in der Initiationsphase der Typ I IFN Antwort innerhalb von 6 h nach Stimulation eine solch umfangreiche Transkriptionsregulation auf Grund autokriner Signaltransduktion stattzufinden vermag.

Schwächer exprimierte Gene konnten funktionell zu einem großen Teil Biosyntheswegen von Steroiden und Isoprenoiden zugeordnet werden bzw. waren übermäßig an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt (Abb. 3.20).

Auf die zentrale Frage, durch welche Gen-Transkripte es zu erklären ist, dass nach systemischer Stimulation von einer homogenen Zellpopulation nur ein geringer Anteil IFN β produziert, lässt sich auf Grund der multiple vernetzten Funktionen der regulierten Genprodukte keine direkte Antwort finden. Deutlich ist aber, dass die Unterschiede nicht nur auf der Sekretion bzw. nicht Sekretion von Typ I Interferonen der YFP⁺ bzw. YFP⁻ pDCs beruhen.

Der stochastische Erklärungsansatz, nachdem nur ein kleiner Teil einer Zellpopulation auf Grund limitierender intrazellulärer Konzentrationen an Transkriptionsfaktoren IFN β produziert (Apostolou und Thanos, 2008), erklärt den Umfang der differentiellen Regulation also nicht, da in diesem Fall sehr ähnliche Transkriptionsprofile zu erwarten wären. Zur genaueren Überprüfung dieser Hypothese, müsste das System jedoch noch weiter vereinfacht werden, indem das Transkriptom von YFP⁺ und YFP⁻ Zellen in synchronisierten BMDM oder DC Kulturen nach TLR-Agonisten Stimulation analysiert wird.

Zur weiteren funktionellen Auswertung der Arraydaten ist es am sinnvollsten sich zunächst auf die am stärksten regulierten Transkripte zu konzentrieren und Hypothesen zu erstellen, welchen Beitrag diese Gene zum Gesamtbild der Transkriptionsregulation leisten können. Differentiell regulierte Transkripti-

onsfaktoren oder Genprodukte mit proteinmodifizierender Funktion wie Kinasen und GTPasen stellen hier eine naheliegende Möglichkeit dar.

Für die GTPasen der Rho-Familie ist bekannt, dass diese auch an der Regulation der angeborenen Immunantwort beteiligt sind. Sie wirken durch das Binden und Hydrolysieren von GTP als molekularer Schalter und steuern hierdurch viele zelluläre Funktionen. Innerhalb der in IFN β ⁺ pDCs am stärksten überrepräsentierten Transkripte zählt *Cdc42* und *RhoB* zur Klasse der kleinen Rho GTPasen. Zu den Rho GTPasen zählen die Mitglieder der Rho-, Rac- und Cdc42 Unterfamilien (Bokoch, 2005). Rho GTPasen besitzen eine Bedeutung im TLR Signalweg und führen so etwa zur Rekrutierung von Rac1 und der Phosphatidylinositol 3 Kinase (PI3K) zu TLR2 (Arbibe *et al.*, 2000). Auch bei Aktivierung des TLR9 Signalweges spielt Rac eine Rolle (Stovall *et al.*, 2004). Es wird vermutet, dass die Rho GTPasen dort einen alternativen Weg zur Regulation der NF- κ B Transkriptionsaktivität darstellen (Bokoch, 2005). Neben der Regulation der Motilität und Chemotaxis von Leukozyten besitzen sie durch Modulation des zellulären Aktins integrale Funktionen im Phagozytoseprozess (Jones *et al.*, 1998; Castellano *et al.*, 2001). Über eine Regulation der Typ I Interferonexpression im Zusammenhang mit Rho-GTPasen ist bis dato nichts bekannt, und stellt ein Thema für weiterführende Untersuchungen dar. Es ist in diesem Zusammenhang bemerkenswert, dass das in der IFN β ⁺ Zellpopulation am schwächsten exprimierte Gen *Arhgap11a* war (vgl. Tabelle 3.1). *Arhgap11a* codiert für ein Rho-GTPase aktivierendes Protein (GAP) und überführt Rho-GTPasen wieder in ihren inaktiven GDP Zustand.

Die in IFN β ⁺ pDCs stärker exprimierte Kinase Cdk6 zählt zur Gruppe der Cyclin abhängigen Kinasen und ist wichtig in der Regulation des Zellzyklus. Daneben ist Cdk6 an der Notch/Akt abhängigen T Zell Entwicklung und Tumorgenese beteiligt (Hu *et al.*, 2009). Insbesondere hier sind Untersuchungen an synchronisierten Kulturen wichtig, um die Expressionsunterschiede zu bestätigen.

Dlg2 (PSD-93) war in den Zytokin sekretierenden pDCs am deutlichsten überrepräsentiert. Es zählt zur Klasse der Membran-assoziierten Guanylat Kinasen (MAGUKs), die vorwiegend in neuronalen Synapsen exprimiert werden. PSD-93 ist eine postsynaptische MAGUK und kann über seine drei PDZ (post-synaptic density [PSD]-95/discs large/zona occludens-1) Regionen an spezifische Ionenkanäle binden. Eine *Dlg2* defiziente Maus zeigte in der Entwicklung oder Funktion von Synapsen im Cerebellum allerdings keinen Phänotyp (McGee *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu konnte dem MAGUK Mitglied DLG1 eine immunassoziierte Funktion zugewiesen werden. DLG1 koordiniert die TCR/CD28 induzierte und Aktin getriebene Bildung der T-Zell Synapse (Round *et al.*, 2005). Eine direkte Beteiligung an Prozessen der angeborenen Immunität wurde dagegen bisher für DLG2 nicht beschrieben. Allerdings ist bekannt, dass DLG2 von der Kinase FYN phosphoryliert wird (Nada *et al.*, 2003). FYN ist ein Schlüsselregulator der Tubulin-Zytoskelett-Remodellierung in T-Zellen (Martin-Cofreces *et al.*, 2006) und in JAK2/STAT3 bzw. p38 MAPK Signalwegen involviert (Li *et al.*, 2008). Der Umstand, dass das FYN bin-

dende Proteins FYB (ADAP) in IFN β ⁺ pDCs zehnmal schwächer exprimiert vorliegt als in IFN β ⁻ pDCs, könnte als Indiz dafür gewertet werden, dass in pDCs über ein Interaktionsnetzwerk bestehend aus FYB/FYN/DLG2 eine spezifische, bisher unbekannte immunregulierende Funktion induziert wird.

Die auffallend konträre Expression von Rho-GTPasen und ihrem deaktivierenden GAP bzw. DLG2 und FYB könnte darauf hindeuten, dass hier ein immunrelevanter Prozess unter gleichzeitiger Inhibierung eines entgegenwirkenden Weges induziert wurde. Demnach bietet die weitergehende Analyse der Expression dieser Gene einen ersten vielversprechenden Ansatz die Ursache des Zellschicksalunterschiedes zwischen IFN β ⁺ und IFN β ⁻ Zellen aufzuklären.

4.3 Charakterisierung der IFN β Antwort im Infektionsmodell der murinen Listeriose

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal in einem biologisch und medizinisch relevanten bakteriellen Infektionsmodell *in vivo* gezeigt, dass Tip-DCs die Hauptquelle der IFN β Produktion darstellen. Diese Zellen besitzen neben der Eigenschaft TNF und iNOS zu exprimieren, die Fähigkeit naive T Zellen zu primen und sind vorwiegend selbst mit *L. monocytogenes* infiziert. Die IFN β ⁺ Zellen lokalisierten exklusiv in den bakteriellen Entzündungsherden in der weißen Pulpa der Milz und zeigten im Gegensatz zur globalen, nachteiligen Typ I IFN Produktion in der murinen Listeriose einen protektiven, die Bakterienlast reduzierenden Effekt.

Das beobachtete Maximum der IFN β Produktion in der Milz 24 h nach *L. monocytogenes* Infektion (Abb. 3.23) stimmt gut mit dem von Stockinger *et al.* beschriebenen Expressionsgipfel der IFN β Genexpression überein (Stockinger *et al.*, 2009). Neben der Milz replizieren die Bakterien jedoch auch stark in der Leber, die ein weiteres Zielorgan in der *L. monocytogenes* Infektion darstellt (Cousens und Wing, 2000; Gregory *et al.*, 1996). Allerdings konnten dort nur sehr wenige IFN β ⁺ Zellen identifiziert werden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Hepatozyten, die massiv während der Zellaufbereitung starben und deswegen von den analysierten Leukozyten getrennt wurden, eine zusätzliche IFN β Quelle darstellen. Mit der geringen IFN β ⁺ Zellzahl in der Leber steht jedoch im Einklang, dass dort verglichen mit der Milz zehnmal so wenig *Ifnb* mRNA detektiert werden konnte (Garifulin *et al.*, 2007). Ein vergleichbares Resultat konnte nach Infektion mit dem murinen Cytomegalovirus (MCMV) beobachtet werden. Obwohl das Virus auch in der Leber repliziert, konnten Typ I IFN exprimierende Zellen ausschließlich in der Milz detektiert werden (Zucchini *et al.*, 2008). Eine Erklärung für die im Widerspruch

zur Bakterienreplikation stehende geringe Anzahl IFN β produzierender Zellen in der Leber könnte der immunprivilegierte Status des Organs bieten. Da das portalvenöse Blut des Dünndarms mit LPS und weiteren TLR Agonisten angereichert ist, sichern distinkte immunsuppressive Mechanismen in der Leber ein Aufrechterhalten der Selbsttoleranz (Crispe, 2009).

Während im Falle eines Eindringens von *L. monocytogenes* in den intraperitonealen Bauchraum nach i.p. oder auch oraler Infektion eine signifikante Bakterienlast in mLN beobachtet werden kann, sind nach i.v. Infektion dort nur sporadisch Bakterien zu finden (Kursar *et al.*, 2002). Dieses stimmt gut mit den hier gezeigten Ergebnissen nach i.p. Inokulation überein und ist ein Hinweis darauf, dass nur infizierte Zellen zur Produktion von IFN β in der Lage sind (Abb. 3.29).

Im Laufe der murinen Listeriose bilden sich innerhalb der ersten 24 h an den Infektionsfoci in der T-Zell Zone der weißen Pulpa der Milz Cluster aus Monozyten und neutrophilen Granulozyten. Die in die Milz rekrutierten inflammatorischen Monozyten differenzieren abhängig von IFN γ zu Tip-DCs und produzieren TNF und Stickstoffmonoxid (NO) in großen Mengen (Serbina *et al.*, 2003b; Kang *et al.*, 2008). Die durchgeführten immunhistologischen Untersuchungen belegen, dass die IFN β ⁺ Zellen a) eingebettet sind in diese myeloiden Zellcluster (Abb. 3.27), b) mit dem histologischen Kompartiment der höchsten iNOS Expression kolokalisieren (Abb. 3.36) und c) zu etwa 80 % *L. monocytogenes* infiziert sind (Abb. 3.33).

Detaillierte durchflusszytometrische und funktionelle Analysen der IFN β /YFP⁺ Zellen erbrachten zwingende Indizien, die in ihrer Gesamtheit hinreichend belegen, dass es sich bei den IFN β produzierenden Zellen um eine Subpopulation von Tip-DCs handelt. Die IFN β /YFP⁺ Zellen zeigten sowohl die für Tip-DCs beschriebene Expression der Zelloberflächenmarker Ly6C, CD11c, CD11b, F4/80 und exprimierten sowohl iNOS als auch TNF (Abb. 3.24, Abb. 3.35). Darüber hinaus konnte ebenfalls die für Tip-DCs postulierte hohe Expression von intrazellulärem Mac-3 nachgewiesen werden (Abb. 3.34). Tip-DCs wurden erstmals als eine Effektor APC Subpopulation im Verlauf der *L. monocytogenes* Infektion in der Milz identifiziert. Es wurde gezeigt, dass Ly6C⁺ inflammatorische Monozyten in das infizierte Organ CCR2 abhängig rekrutiert werden, dort zu Tip-DCs differenzieren und kritisch für die frühe Eindämmung des bakteriellen Wachstums sind (Auffray *et al.*, 2009a; Pamer, 2004; Serbina *et al.*, 2003b; Serbina und Pamer, 2006). Obwohl darüber hinaus auch eine Beteiligung von Tip-DCs in der parasitären, bakteriellen und viralen Immunabwehr gegen *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei*, *Brucella melitensis* und Influenza-Viren gezeigt werden konnte, wurden die Tip-DCs bisher in keinem Infektionsmodell auf die Fähigkeit hin charakterisiert Typ I Interferone zu produzieren (Aldridge, Jr. *et al.*, 2009; Copin *et al.*, 2007; De Trez *et al.*, 2009; Guilliams *et al.*, 2009).

Die vorgenommene Zuordnung der IFN β Produzenten zur Gruppe von Tip-DCs steht oberflächlich betrachtet in Widerspruch mit einem publizierten Experiment, das Makrophagen als Hauptquelle von IFN β in der murinen Listeriose identifiziert (Stockinger *et al.*, 2009). In diesem Ansatz zeigten FACS sortierte CD11b⁺, CD11c⁻, mPDCA-1⁻, B220⁻ Zellen die höchste *Irfb* mRNA Expression, die entsprechend ihrer Oberflächenmarker als Makrophagen bezeichnet wurden. Der Vorteil des in der vorliegenden Arbeit genutzten IFN β Reportermaus-Modells ist, dass die IFN β Produktion direkt auf dem Niveau der einzelnen Zelle mittels YFP Expression betrachtet werden kann. Das System macht es somit überflüssig bestimmte Zellpopulationen nach vorheriger Isolierung auf die Expression von IFN β untersuchen zu müssen, da hier reziprok dazu direkt *ex vivo* eine detaillierte phänotypische und funktionelle Analyse der IFN β /YFP⁺ Zellen erfolgen kann.

Die Kultivierung von FACS sortierten YFP⁺ Tip-DCs zeigte, dass diese im Vergleich zu Makrophagen, YFP⁻ Tip-DCs und cDCs am stärksten *L. monocytogenes* infiziert waren (Abb. 3.34). Obwohl eine Publikation eine ähnliche Bakterienlast zwischen sortierten Tip-DCs und Makrophagen nahelegt, ist der allgemeine Standpunkt, dass Tip-DCs in der Listeriose als Bystander Zellen fungieren und nur ein kleiner Teil von ihnen infiziert ist (Jablonska *et al.*, 2007; Pamer, 2004; Serbina *et al.*, 2003b). Diese Diskrepanzen lassen sich zum einen durch eine unzureichende Stringenz beim Separieren von Makrophagen und Tip-DCs und zum anderen durch die unterschiedlichen experimentellen Ansätze zum Bestimmen der Bakterienlast in den verschiedenen Zellpopulationen begründen. Neben einem Ausplattieren von entweder intakten oder lysierten Zellen wurden infizierte Zellen auch durch mikroskopische Auswertungen von Zytospin-Präparaten identifiziert. Allerdings kann vermutet werden, dass die von Serbina *et al.* beschriebene kleine Fraktion *Listeria*⁺ Tip-DCs die hier in dieser Arbeit identifizierten IFN β ⁺ Zellen repräsentiert (Serbina *et al.*, 2003b).

Der überwiegende Teil der IFN β /YFP⁺ Zellen in der Leber und den mLN zeigte ebenfalls das für Tip-DCs charakteristische Oberflächenmarker-Profil (Abb. 3.24). Aufgrund einer zu geringen Anzahl YFP⁺ Zellen konnte dort nicht überprüft werden, ob diese Zellen iNOS und TNF exprimieren und so den formalen an Tip-DCs gestellten Anforderungen genügen.

Zum Zeitpunkt der Abfassung dieser Dissertation herrschte in der Fachwelt Uneinigkeit darüber, ob Tip-DCs eher zu einer spezialisierten Gruppe aus Monozyten abgeleiteten DCs angehören, oder ob sie IFN γ induzierten und damit klassisch aktivierten Makrophagen zuzurechnen sind. Da Tip-DCs CD11c und MHC Klasse II exprimieren und als Stimulatoren in T-Zell Proliferationstests dienen, spricht dieses für die DC Hypothese. Konträr dazu können in Entzündungsreaktionen aktivierte Makrophagen CD11c und MHC Klasse II auf ihrer Zelloberfläche exprimieren und sind in einer primären Immunantwort in der Lage Antigene zu präsentieren (Dominguez und Ardavin, 2010; Hume, 2008).

Durch eine umfassende Analyse funktioneller Eigenschaften von IFN β produzierenden Zellen im Vergleich zu *bona fide* CD11c⁻ CD11b⁺ Makrophagen sowie CD11c^{hi} cDCs wurde gezeigt, dass die IFN β ⁺ Zellen sich eindeutig in Bezug auf die Bakterienlast, der Fähigkeit TNF und iNOS zu exprimieren und der Kompetenz naive T-Zellen zu primen von den anderen untersuchten Zelltypen unterscheiden (Abb. 3.34, Abb. 3.35, Abb. 3.37). Obwohl die stärkste T-Zell Proliferation von FACS sortierten cDCs induziert wurde, konnten, im Gegensatz zu sortierten Makrophagen, IFN β produzierende Tip-DCs naive T-Zellen in hoch signifikanter Weise primen (Abb. 3.37). Auf Grund der experimentell analysierten funktionellen Kriterien, wird es als gerechtfertigt erachtet die IFN β ⁺ Tip-DCs als professionelle APCs zu betrachten und nicht der Gruppe inflammatorischer Makrophagen zuzurechnen.

Tip-DCs stellen Effektorzellen des angeborenen Immunsystems dar, deren wesentliche Funktion die Sekretion von Zytokinen ist. Die unterschiedliche Fähigkeit zwischen Tip-DCs und cDCs eine adaptive Immunantwort zu induzieren impliziert hierdurch ebenfalls eine distinkte Arbeitsweise beider APC Zelltypen. Da Mäuse, ohne den zur Rekrutierung von Tip-DCs essentiellen Chemokinrezeptor CCR2 oder mit einer Defizienz für iNOS, TNF bzw. der jeweiligen Rezeptoren eine stark erhöhte Suszeptibilität gegenüber der *L. monocytogenes* Infektion zeigen, impliziert dies eine fundamentale Bedeutung von Tip-DCs für die frühe Eindämmung der murinen Listeriose (Rothe *et al.*, 1993; Pfeffer *et al.*, 1993; MacMicking *et al.*, 1995; Jin *et al.*, 2001; Havell, 1989). Diese Zellen scheinen daher Teil des initialen Verteidigungsbollwerkes der nativen Immunantwort zu sein. Sie bekämpfen die Bakterien durch die Sekretion von Effektorzytokinen und reaktiven Stoffwechselintermediaten und implementieren ein geeignetes Zytokinumfeld zur Induktion der adaptiven und sterilisierenden Immunantwort. Weil in den durchgeführten Experimenten Tip-DCs die am stärksten infizierte Zellpopulation darstellten und die IFN β ⁺ Tip-DCs die höchsten Anteile an TNF- und iNOS positiven Zellen besaßen, ist eine plausible Hypothese, dass die IFN β sekretierenden Tip-DCs in der murinen Listeriose die terminal differenzierten und potentesten Zytokin-produzierenden Effektorzellen des angeborenen Immunsystems darstellen.

Allerdings ist beschrieben, dass die Induktion von Typ I Interferonen in der murinen Listeriose von Nachteil für den Wirt ist. So zeigen IRF3^{-/-}, IFN β ^{-/-} oder IFNAR^{-/-} Mäuse gegenüber wt Tieren eine signifikant erhöhte Resistenz in der *L. monocytogenes*-Infektion sowie eine reduzierte Bakterienlast in Leber und Milz (Auerbuch *et al.*, 2004; Carrero *et al.*, 2004; Fehr *et al.*, 1997; O'Connell *et al.*, 2004; Stockinger *et al.*, 2009). Während multiple Typ I IFN bedingte Auswirkungen hierfür verantwortlich gemacht werden (Stockinger und Decker, 2008), konnte Rayamajhi *et al.* zu mindestens einen Teil des dahinterstehenden Mechanismus aufklären. Die Freisetzung von Typ I Interferonen von *L. monocytogenes* infi-

zierten Zellen induziert hiernach eine Herunterregulation des IFN γ Rezeptors und damit eine Unempfindlichkeit des Wirtes für IFN γ , eines für die zelluläre Immunität essentiellen Zytokins (Rayamajhi *et al.*, 2010). Falls Tip-DCs nun adoptiv transferiert werden, so könnten transferierte IFN β ⁺ Tip-DCs in einer anschließenden *L. monocytogenes* Infektion zu einer höheren Bakterienlast in Milz und Leber führen. Entgegen dieser Annahme resultierte ein Transfer von IFN β /YFP⁺ Tip-DCs jedoch in einer verringerten Bakterienlast in den untersuchten Organen (Abb. 3.38). Erstaunlicherweise führte der Transfer von IFN β /YFP⁻ Tip-DCs zu einer höheren Bakterienlast in den Organen als der Kontrolltransfer von IFN β defizienten Tip-DCs in die IFN β ^{-/-} Rezipienten. Da diese Mäuse nicht in der Lage sind IFN β zu produzieren, ist anzunehmen, dass die beobachteten Unterschiede auf die transferierten Zellen zurückzuführen sind. Wie Vorexperimente zeigten gelangten nur etwa 10 % der transferierten Zellen in die Milz, so dass $\sim 10^4$ Tip-DCs pro Milz für die Unterschiede verantwortlich zu machen sind.

Allerdings können diese zum allgemein akzeptierten Standpunkt widersprüchlichen Daten gut mit den bisher gezeigten Resultaten erklärt werden. Die IFN β produzierenden Tip-DCs besaßen mit Abstand den höchsten Anteil an TNF und iNOS exprimierenden Zellen und waren ihren IFN β ⁻ Pendanten hierin überlegen. TNF und Stickstoffmonoxid-Derivate sind essentielle Faktoren der frühen Immunabwehr gegen *L. monocytogenes*. Daher ist es nachvollziehbar, dass die Injektion von höchst aktivierten Effektorzellen zu einer Reduktion der Bakterienlast beiträgt. In dem hier verfolgten experimentellen Ansatz ist die Aktivierung der antibakteriellen Effektor-Mechanismen durch die IFN β Expression nicht negativ beeinflusst, da die Injektion von IFN β ⁻ Tip-DC eine erhöhte Bakterienlast in Milz und Leber zur Folge hatte.

Die Daten deuten darauf hin, dass in der murinen Listeriose die Induktion von Typ I Interferonen nicht zwangsläufig zu einem verschärften Infektionsverlauf führen muss, sondern die Zellen in einen maximalen Abwehrstatus versetzen. In Infektionsmodellen mit den extrazellulär replizierenden Bakterien der Familie der Enterobacteriaceae sowie Streptococcaceae sind Typ I Interferone ebenfalls für eine Resistenz gegen die Mikroben unabdingbar (Mancuso *et al.*, 2007). Die intravenöse Applikation von rekombinantem IFN β bewirkt gleichfalls eine Protektion vor einer letalen *L. monocytogenes* Infektion (Fujiki und Tanaka, 1988). Die Induktion von Typ I Interferonen nach Erkennen von extra- und intrazellulären Pathogenen scheint ein stereotypischer Immunabwehrmechanismus zu sein, der in den meisten Fällen zum Schutz des Wirtes beiträgt. Der *in vivo* nachgewiesene nachteilige Effekt von Typ I Interferonen in einer *L. monocytogenes* Infektion könnte, spekulativ gedeutet, auch mit der Menge der IFN β exprimierenden Zellen zusammenhängen. In dem hier gezeigten Transferexperiment waren in der Milz nur etwa 10% der normalerweise anwesenden IFN β produzierenden Tip-DCs vorhanden. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass Zellen an nicht analysierten physiologischen Positionen Typ I Interferone

sekretierten, oder dass eine schwache durch das Reportersystem nicht erfassbare konstitutive Typ I IFN Produktion zu diesem Phänotyp beitrug. Es ist daher vorstellbar, dass Typ I IFN produzierende Zellen solange protektiv wirken bis ein bestimmter Schwellenwert IFN β produzierender infizierter Zellen überstiegen wird und dann die negativen Effekte dominieren. In diesem Zusammenhang ist es interessant anzumerken, dass nach systemischer hochdosierter- bzw. sehr niedrig dosierter *L. monocytogenes* Infektion Unterschiede im antimikrobiellen Verhalten von Monozyten auftreten. Eine hohe Inokulationsdosis führt zu einer verstärkten Expression der negativen Regulatoren der Zytokin Signaltransduktion SOCS1 und SOCS3 und zu einer geringeren Expression von IL-6. Darüber hinaus sind nach hochdosierter Infektion Monozyten nur noch eingeschränkt in der Lage zur Eindämmung der Infektion beizutragen (Drevets *et al.*, 2010).

Letzten Endes kann die systemische Infektion mit hohen Inokulationsdosen an Listerien die unter natürlichen Bedingungen über eine Aufnahme von kontaminierter Nahrung induzierte *L. monocytogenes* Infektion nicht in allen Details abbilden. Es ist daher durchaus denkbar, dass in der freien Wildbahn die Induktion von Typ I Interferonen in der Listeriose einen protektiven Effekt besitzt.

4.4 Ausblick

Eine weitere Charakterisierung der initialen Typ I IFN Expression wird bereits in viralen Infektionsmodellen als auch im murinen Modell der Multiplen Sklerose durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit ist besonders die Synthese von *in vivo* Befunden nach CpG ODN Injektion und der durchgeführten Mikroarray-Analyse für die weiterführenden Untersuchungen relevant. Insbesondere die in IFN β produzierenden pDCs überrepräsentierten Chemokine und Chemokinrezeptoren erklären deren spezifische Lokalisation und geben einen ersten Hinweis auf die biologische Relevanz dieser Zellen. So ist die Rekrutierung und das Priming von NK-Zellen sowie zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen durch dieses spezifische Expressionsprofil zu erklären.

Zunächst einmal ist es essentiell die Arraydaten durch unabhängige RNA Proben von IFN β ⁺ bzw. IFN β -pDCs mittels quantitativer RT-PCR zu validieren. Im Anschluss kann die biologische Relevanz durch *in vivo* Nachweis der verschiedenen Zytokine durch intrazelluläre Zytokinfärbung sortierter YFP⁺ sowie YFP⁻ pDCs sowie ELISA Messungen im Überstand YFP⁺ bzw. YFP⁻ Flt3L-DCs erbracht werden. Parallel hierzu soll durch konfokale Analysen festgestellt werden, ob speziell IFN β ⁺ pDCs in der Lage sind, mit T-Zellen und NK-Zellen in der weißen Pulpa zu interagieren. Zusätzlich soll untersucht werden, ob die IFN β produzierenden pDCs dazu geeignet sind, CD8⁺ T-Zellen zu aktivieren. Dieser Punkt ist besonders relevant, da die Frage, ob pDCs zur Kreuzpräsentation von Antigenen in der Lage sind, kontro-

vers diskutiert wird (Villadangos und Young, 2008). Es wäre vorstellbar, dass selektiv IFN β ⁺ pDCs in der weißen Pulpa im Gegensatz zu IFN β nicht sekretierenden pDCs dazu in der Lage sind.

Um die Faktoren besser identifizieren zu können, die für die stochastische Expression von IFN β verantwortlich sind, sollen identische Mikroarray-Versuche mit FACS sortierten YFP⁺ bzw. YFP⁻ CD8 α ⁺ cDCs nach *in vivo* poly(I:C) Stimulation durchgeführt werden. Beide Sätze an Mikroarraydaten können noch durch weitere Analysen an YFP⁺ bzw. YFP⁻ Zellen aus synchronisierten Knochenmarkskulturen oder nach *in vivo* Infektionsversuchen ergänzt werden. Neben dem Vergleich der Transkriptome der jeweiligen Probenpaare soll durch eine alle Proben umfassende bioinformatische Analyse festgestellt werden, ob in IFN β produzierenden Zellen gemeinsame Regulationswege vorliegen, die den Unterschied zwischen sich nur singular durch die Zytokin-Expression unterscheidenden Zellen zufriedenstellend erklären. Sobald sich dabei interessante Kandidaten herauskristallisieren, kann zunächst *in vitro* durch siRNA induzierte Transkriptions-Supprimierung bzw. Überexpression des Genproduktes die Auswirkung auf die IFN β Induzierbarkeit charakterisiert werden. Final kann dann eine gendefiziente bzw. eine transgene Maus generiert werden, um den beobachteten *in vitro* Phänotypen *in vivo* global analysieren zu können.

Die als Hauptproduzenten von IFN β in der murinen Listeriose identifizierten Tip-DCs können in weiteren Versuchen abschließend auf ihre Auswirkung auf den Krankheitsverlauf untersucht werden. Dazu sollten die Transferexperimente ausgedehnt werden und sofern realisierbar eine größere Anzahl IFN β /YFP⁺ Zellen pro Maus adoptiv transferiert werden. Zusätzlich kann durch eine Erhöhung der jeweiligen Gruppengröße die Aussicht auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen erhöht werden. Daneben kann untersucht werden, in wie fern IFN β ⁺ Zellen an der Ausbreitung der Bakterien über die Blutbahn in das zentrale Nervensystem und der Etablierung einer fatalen bakteriellen Meningitis in diesem immunprivilegierten Kompartiment beteiligt sind (Drevets *et al.*, 2004).

Mit Hilfe einer bicistronischen IFN β /YFP Reportermaus ist es erfolgreich gelungen die Initiatoren der Typ I IFN Immunantwort unter verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Konditionen zu identifizieren, weitergehend funktional zu charakterisieren und darüber hinaus aussichtsreiche Fragestellungen für zukünftige Projekte zu entwickeln.

5 Zusammenfassung

Typ I Interferone bilden eine Klasse von Sequenz-homologen Zytokinen, zu der multiple IFN α s und ein einziges, im Allgemeinen initial exprimiertes IFN β gerechnet werden. Typ I Interferone sind essentiell für die Etablierung einer effektiven antiviralen Immunantwort und besitzen pleiotrope immunregulatorische Funktionen. Im Gegensatz zur Wirtsprotektion bei Virusinfektionen ist ihr Einfluss bei bakteriellen Erkrankungen sehr ambivalent. So ist die Expression von Typ I Interferonen nach Infektion mit dem intrazellulären Modellbakterium *Listeria monocytogenes* für den Wirt von Nachteil und induziert eine erhöhte Bakterienlast in infizierten Organen sowie eine gesteigerte Sterblichkeitsrate. Sehr viele Zelltypen besitzen die molekulare Grundausstattung zur Expression von IFN β . Welche Zellen aber diese Zytokinantwort *in vivo* initiieren ist weitestgehend unbekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde daher ein biscistronisches IFN β /YFP Reportermausmodell genutzt, das die Identifizierung und eingehende *in vitro* und *in vivo* Charakterisierung IFN β produzierender Zellen auf zellulärer Ebene durch eine Koexpression von YFP ermöglicht.

Durch Stimulation von *in vitro* aus Knochenmarkszellen differenzierten Makrophagen und Dendritischen Zellen (DCs) mit definierten mikrobiellen Bestandteilen (PAMPs) konnte belegt werden, dass unterschiedliche PAMP Kombinationen zelltypspezifisch zur entsprechend optimalen IFN β Produktion führen. Nach *in vivo* Stimulation mit poly(I:C) und CpG 1668 wurde ein unterschiedliches Lokalisierungs- und Migrationsverhalten der jeweiligen IFN β produzierenden Zellen beobachtet. Während poly(I:C) IFN β in konventionellen (c)DCs induzierte, die von der roten Pulpa über die Marginalzone in die weiße Pulpa der Milz relokalisieren, war eine Subpopulation plasmazytoider (p)DCs nach CpG Injektion für die Expression des Zytokins verantwortlich. Durch eine Mikroarray basierte Transkriptom Analyse von *ex vivo* FACS sortierten IFN β ⁺ und IFN β ⁻ pDCs wurde gezeigt, dass eine umfangreiche differentielle Gentranskription zwischen den beiden Populationen vorlag. Insbesondere ließen die in IFN β ⁺ pDCs stärker exprimierten Chemokine und Interleukine auf eine spezifische Funktion der IFN β -Produzenten bei der Rekrutierung von Effektorzellen sowie der Induktion der zellulären adaptiven Immunantwort schließen.

Die funktionelle Analyse der IFN β exprimierenden Zellen im etablierten Infektionsmodell der murinen Listeriose zeigte, dass anders als bisher vermutet, nicht Makrophagen, sondern eine hochaktivierte Effektorpopulation von Antigenpräsentierenden Zellen für die IFN β Expression in der Milz verantwortlich ist. Diese Zellen exprimierten über IFN β hinaus im höchsten Maße iNOS und TNF und waren in der Lage, naive T-Zellen zu primen. Daher konnten diese Zellen eindeutig als neue Subpopulation von TNF und iNOS produzierenden DCs (Tip-DCs) identifiziert werden. Überraschenderweise zeigte ein adoptiver Transfer von IFN β ⁺ Tip-DCs in IFN β defiziente Mäuse, dass diese Zellpopulation keinen ungünstigen Effekt auf den Wirt ausübte, sondern im Gegenteil durch eine Reduktion der Bakterienlast in infizierten Organen protektiv wirkte. Trotz der Expression des für den Wirt in dieser Situation ungünstigen IFN β überwiegt die durch iNOS und TNF aktivierte bakterizide Effektorfunktion. Somit konnten in dieser Arbeit erstmals die Initiatorzelltypen der Typ I IFN Antwort *in vivo* auf zellulärer Ebene identifiziert und durch die eingehende Charakterisierung dieser Zellen ein tieferes Verständnis für ihre immunologische Funktion erreicht werden.

Summary

Type I interferons constitute a class of sequence-homologous cytokines that consist of multiple IFN α s and a single IFN β which in general is expressed first. Type I interferons are essential for the establishment of a protective antiviral immune response and possess pleiotropic immunoregulatory features. In contrast to their beneficial impact in viral infections the outcome of their actions in bacterial challenges is ambivalent. For instance, the induction of type I interferons during infection with the intracellular model bacterium *Listeria monocytogenes* was shown to be detrimental to the host and to induce an increased bacterial burden in infected organs as well as an elevated death rate. Although many cell types have the molecular equipment for the expression of IFN β in place, the cells that initiate that cytokine response *in vivo* remain obscure. In the present thesis a bicistronic IFN β /YFP reporter mouse model was used to identify and characterize in detail the IFN β producing cells *in vitro* and *in vivo* by means of YFP coexpression.

Stimulation of *in vitro* bone marrow derived macrophages, and dendritic cells (DCs) with defined microbial compounds (PAMPs) showed that distinct PAMP combinations lead to an optimal IFN β production in a cell type specific manner. After *in vivo* injection of poly(I:C) and CpG 1668 a differential localization and migratory behaviour of the particular IFN β producing cell could be observed. While poly(I:C) triggered IFN β from conventional DCs that relocated from the red pulp via the marginal zone to the white pulp of the spleen a subpopulation of plasmacytoid DCs was accountable for the expression of the cytokine after CpG 1668 injection. A microarray based transcriptome evaluation of *ex vivo* FACS sorted IFN β ⁺ vs. IFN β ⁻ pDCs revealed that a substantial amount of differential geneexpression existed between the two pDC populations. The over-represented expression of many chemokines and cytokines, in particular, in the IFN β ⁺ pDC fraction hinted at an outstanding function of these cells in both the recruitment of effector cells and the induction of an adaptive cellular immune response.

The functional analysis of the IFN β expressing cells in the well-established infection model of murine listeriosis showed that not macrophages as assumed so far were responsible for the production of the cytokine. In contrast, a highly activated population of effector APCs in the spleen was accountable for the expression of IFN β . Besides IFN β these cells express high amounts of TNF and iNOS and were able to prime naïve T cells. Therefore these cells could clearly be identified as a subpopulation of TNF and iNOS producing DCs (Tip-DCs). Strikingly, adoptively transferred IFN β ⁺ Tip-DCs into IFN β deficient mice did not reveal an adverse effect on the host but in contrast had rather a protective impact by causing a reduced bacterial burden in infected organs. In this situation the iNOS and TNF mediated bactericidal effector functions might outweigh the overall adverse effect of IFN β to the host. Here for the first time an in depth analysis of the type I IFN initiator cell types was performed on the cellular level *in vivo* and led through the functional characterization of these cells to a deeper understanding of their immunological functions.

6 Literaturverzeichnis

- Abbas,A. and Lichtman,A. (2004). Basic Immunology: Functions and disorders of the immune system. (Philadelphia, USA: Saunders).
- Akira,S., Uematsu,S., und Takeuchi,O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. **Cell** 124, 783-801.
- Al Shahrour,F., Minguez,P., Tarraga,J., Medina,I. et al. (2007). FatiGO +: a functional profiling tool for genomic data. Integration of functional annotation, regulatory motifs and interaction data with microarray experiments. **Nucleic Acids Res.** 35, W91-W96.
- Al Shahrour,F., Minguez,P., Tarraga,J., Montaner,D. et al. (2006). BABELOMICS: a systems biology perspective in the functional annotation of genome-scale experiments. **Nucleic Acids Res.** 34, W472-W476.
- Aldridge,J.R., Jr., Moseley,C.E., Boltz,D.A., Negovetich,N.J. et al. (2009). TNF/iNOS-producing dendritic cells are the necessary evil of lethal influenza virus infection. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A** 106, 5306-5311.
- Alexopoulou,L., Holt,A.C., Medzhitov,R., und Flavell,R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. **Nature** 413, 732-738.
- Aoshi,T., Zinselmeyer,B.H., Konjufca,V., Lynch,J.N. et al. (2008). Bacterial entry to the splenic white pulp initiates antigen presentation to CD8+ T cells. **Immunity**. 29, 476-486.
- Apostolou,E.undThanos,D. (2008). Virus Infection Induces NF-kappaB-dependent interchromosomal associations mediating monoallelic IFN-beta gene expression. **Cell** 134, 85-96.
- Arbibe,L., Mira,J.P., Teusch,N., Kline,L. et al. (2000). Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway. **Nat. Immunol.** 1, 533-540.
- Ashburner,M., Ball,C.A., Blake,J.A., Botstein,D. et al. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. **Nat. Genet.** 25, 25-29.
- Asselin-Paturel,C., Brizard,G., Chemin,K., Boonstra,A. et al. (2005). Type I interferon dependence of plasmacytoid dendritic cell activation and migration. **J. Exp. Med.** 201, 1157-1167.
- Auerbuch,V., Brockstedt,D.G., Meyer-Morse,N., O'Riordan,M. et al. (2004). Mice lacking the type I interferon receptor are resistant to *Listeria monocytogenes*. **J. Exp. Med.** 200, 527-533.
- Auffray,C., Fogg,D.K., Narni-Mancinelli,E., Senechal,B. et al. (2009a). CX3CR1+ CD115+ CD135+ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. **J. Exp. Med.** 206, 595-606.
- Auffray,C., Sieweke,M.H., und Geissmann,F. (2009b). Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol.** 27, 669-692.
- Baccala,R., Hoebe,K., Kono,D.H., Beutler,B. et al. (2007). TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity. **Nat. Med.** 13, 543-551.
- Bagchi,A., Herrup,E.A., Warren,H.S., Trigilio,J. et al. (2007). MyD88-dependent and MyD88-independent pathways in synergy, priming, and tolerance between TLR agonists. **J. Immunol.** 178, 1164-1171.
- Barton,G.M.undKagan,J.C. (2009). A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. **Nat. Rev. Immunol.** 9, 535-542.
- Beignon,A.S., McKenna,K., Skoberne,M., Manches,O. et al. (2005). Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. **J. Clin. Invest** 115, 3265-3275.

- Berghofer,B., Haley,G., Frommer,T., Bein,G. et al. (2007). Natural and synthetic TLR7 ligands inhibit CpG-A- and CpG-C-oligodeoxynucleotide-induced IFN-alpha production. **J. Immunol.** 178, 4072-4079.
- Bochtler,P., Kroger,A., Schirmbeck,R., und Reimann,J. (2008). Type I IFN-induced, NKT cell-mediated negative control of CD8 T cell priming by dendritic cells. **J. Immunol.** 181, 1633-1643.
- Bogdan,C., Mattner,J., und Schleicher,U. (2004). The role of type I interferons in non-viral infections. **Immunol. Rev.** 202, 33-48.
- Bokoch,G.M. (2005). Regulation of innate immunity by Rho GTPases. **Trends Cell Biol.** 15, 163-171.
- Boltz-Nitulescu,G., Wiltshcke,C., Holzinger,C., Fellinger,A. et al. (1987). Differentiation of rat bone marrow cells into macrophages under the influence of mouse L929 cell supernatant. **J. Leukoc. Biol.** 41, 83-91.
- Bowie,A.undO'Neill,L.A. (2000). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. **J. Leukoc. Biol.** 67, 508-514.
- Bowie,A.G.undUnterholzner,L. (2008). Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. **Nat. Rev. Immunol.** 8, 911-922.
- Calado,D.P., Paixao,T., Holmberg,D., und Haury,M. (2006). Stochastic monoallelic expression of IL-10 in T cells. **J. Immunol.** 177, 5358-5364.
- Carrero,J.A., Calderon,B., und Unanue,E.R. (2004). Type I interferon sensitizes lymphocytes to apoptosis and reduces resistance to Listeria infection. **J. Exp. Med.** 200, 535-540.
- Castellano,F., Chavrier,P., und Caron,E. (2001). Actin dynamics during phagocytosis. **Semin. Immunol.** 13, 347-355.
- Castellino,F., Huang,A.Y., Altan-Bonnet,G., Stoll,S. et al. (2006). Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8+ T cells to sites of CD4+ T cell-dendritic cell interaction. **Nature** 440, 890-895.
- Cesta,M.F. (2006). Normal structure, function, and histology of the spleen. **Toxicol. Pathol.** 34, 455-465.
- Chomarat,P., Banchereau,J., Davoust,J., und Palucka,A.K. (2000). IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. **Nat. Immunol.** 1, 510-514.
- Colgan,J.undRothman,P. (2006). All in the family: IL-27 suppression of T(H)-17 cells. **Nat. Immunol.** 7, 899-901.
- Colonna,M., Trinchieri,G., und Liu,Y.J. (2004). Plasmacytoid dendritic cells in immunity. **Nat. Immunol.** 5, 1219-1226.
- Cooksley,W.G. (2004). The role of interferon therapy in hepatitis B. **MedGenMed.** 6, 16.
- Copin,R., De Baetselier,P., Carlier,Y., Letesson,J.J. et al. (2007). MyD88-dependent activation of B220-CD11b+LY-6C+ dendritic cells during Brucella melitensis infection. **J. Immunol.** 178, 5182-5191.
- Cousens,L.P.undWing,E.J. (2000). Innate defenses in the liver during Listeria infection. **Immunol. Rev.** 174, 150-159.
- Crispe,I.N. (2009). The liver as a lymphoid organ. **Annu. Rev. Immunol.** 27, 147-163.
- De Trez,C., Magez,S., Akira,S., Ryffel,B. et al. (2009). iNOS-producing inflammatory dendritic cells constitute the major infected cell type during the chronic Leishmania major infection phase of C57BL/6 resistant mice. **PLoS. Pathog.** 5, e1000494.
- Decker,T., Muller,M., und Stockinger,S. (2005). The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection. **Nat. Rev. Immunol.** 5, 675-687.
- Denis,M. (1991). Recombinant murine beta interferon enhances resistance of mice to systemic Mycobacterium avium infection. **Infect. Immun.** 59, 1857-1859.

- Dominguez,P.M.undArdavin,C. (2010). Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation. **Immunol. Rev.** 234, 90-104.
- Drevets,D.A., Dillon,M.J., Schawang,J.S., Van Rooijen,N. et al. (2004). The Ly-6Chigh monocyte subpopulation transports Listeria monocytogenes into the brain during systemic infection of mice. **J. Immunol.** 172, 4418-4424.
- Drevets,D.A., Schawang,J.E., Mandava,V.K., Dillon,M.J. et al. (2010). Severe Listeria monocytogenes infection induces development of monocytes with distinct phenotypic and functional features. **J. Immunol.** 185, 2432-2441.
- Dudziak,D., Kamphorst,A.O., Heidkamp,G.F., Buchholz,V.R. et al. (2007). Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. **Science** 315, 107-111.
- Edwards,A.D., Diebold,S.S., Slack,E.M., Tomizawa,H. et al. (2003). Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 alpha+ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. **Eur. J. Immunol.** 33, 827-833.
- Endres,R., Luz,A., Schulze,H., Neubauer,H. et al. (1997). Listeriosis in p47(phox^{-/-}) and TRp55^{-/-} mice: protection despite absence of ROI and susceptibility despite presence of RNI. **Immunity.** 7, 419-432.
- Erlandsson,L., Blumenthal,R., Eloranta,M.L., Engel,H. et al. (1998). Interferon-beta is required for interferon-alpha production in mouse fibroblasts. **Curr. Biol.** 8, 223-226.
- Fehr,T., Schoedon,G., Odermatt,B., Holtschke,T. et al. (1997). Crucial role of interferon consensus sequence binding protein, but neither of interferon regulatory factor 1 nor of nitric oxide synthesis for protection against murine listeriosis. **J. Exp. Med.** 185, 921-931.
- Field,A.K., Tytell,A.A., Lampson,G.P., und Hilleman,M.R. (1967). Inducers of interferon and host resistance. II. Multistranded synthetic polynucleotide complexes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A** 58, 1004-1010.
- Fitzgerald-Bocarsly,P., Dai,J., und Singh,S. (2008). Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history. **Cytokine Growth Factor Rev.** 19, 3-19.
- Fritz,J.H., Ferrero,R.L., Philpott,D.J., und Girardin,S.E. (2006). Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. **Nat. Immunol.** 7, 1250-1257.
- Fujiki,T.undTanaka,A. (1988). Antibacterial activity of recombinant murine beta interferon. **Infect. Immun.** 56, 548-551.
- Garifulin,O., Qi,Z., Shen,H., Patnala,S. et al. (2007). Irf3 polymorphism alters induction of interferon beta in response to Listeria monocytogenes infection. **PLoS. Genet.** 3, 1587-1597.
- Geissmann,F., Jung,S., und Littman,D.R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. **Immunity.** 19, 71-82.
- Geissmann,F., Manz,M.G., Jung,S., Sieweke,M.H. et al. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science** 327, 656-661.
- Gellin,B.G.undBroome,C.V. (1989). Listeriosis. **JAMA** 261, 1313-1320.
- Gilliet,M., Boonstra,A., Paturel,C., Antonenko,S. et al. (2002). The development of murine plasmacytoid dendritic cell precursors is differentially regulated by FLT3-ligand and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. **J. Exp. Med.** 195, 953-958.
- Gitlin,L., Barchet,W., Gilfillan,S., Cella,M. et al. (2006). Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A** 103, 8459-8464.
- Goldstein,D.undLaszlo,J. (1988). The role of interferon in cancer therapy: a current perspective. **CA Cancer J. Clin.** 38, 258-277.
- Goossens,P.L.undMilon,G. (1992). Induction of protective CD8+ T lymphocytes by an attenuated Listeria monocytogenes actA mutant. **Int. Immunol.** 4, 1413-1418.

- Gordon,S. (2002). Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. **Cell** 111, 927-930.
- Gordon,S.undTaylor,P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat. Rev. Immunol.** 5, 953-964.
- Grabstein,K.H., Eisenman,J., Shanebeck,K., Rauch,C. et al. (1994). Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. **Science** 264, 965-968.
- Gregory,S.H., Sagnimeni,A.J., und Wing,E.J. (1996). Bacteria in the bloodstream are trapped in the liver and killed by immigrating neutrophils. **J. Immunol.** 157, 2514-2520.
- Guiducci,C., Ott,G., Chan,J.H., Damon,E. et al. (2006). Properties regulating the nature of the plasmacytoid dendritic cell response to Toll-like receptor 9 activation. **J. Exp. Med.** 203, 1999-2008.
- Guilliams,M., Movahedi,K., Bosschaerts,T., VandenDriessche,T. et al. (2009). IL-10 dampens TNF/inducible nitric oxide synthase-producing dendritic cell-mediated pathogenicity during parasitic infection. **J. Immunol.** 182, 1107-1118.
- Gyory,I., Wu,J., Fejer,G., Seto,E. et al. (2004). PRDI-BF1 recruits the histone H3 methyltransferase G9a in transcriptional silencing. **Nat. Immunol.** 5, 299-308.
- Hadida,F., Vieillard,V., Mollet,L., Clark-Lewis,I. et al. (1999). Cutting edge: RANTES regulates Fas ligand expression and killing by HIV-specific CD8 cytotoxic T cells. **J. Immunol.** 163, 1105-1109.
- Hamon,M., Bierne,H., und Cossart,P. (2006). *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. **Nat. Rev. Microbiol.** 4, 423-434.
- Hata,N., Sato,M., Takaoka,A., Asagiri,M. et al. (2001). Constitutive IFN-alpha/beta signal for efficient IFN-alpha/beta gene induction by virus. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 285, 518-525.
- Havell,E.A. (1987). Production of tumor necrosis factor during murine listeriosis. **J. Immunol.** 139, 4225-4231.
- Havell,E.A. (1989). Evidence that tumor necrosis factor has an important role in antibacterial resistance. **J. Immunol.** 143, 2894-2899.
- Heim,R., Prasher,D.C., und Tsien,R.Y. (1994). Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A** 91, 12501-12504.
- Hochrein,H., Schlatter,B., O'Keeffe,M., Wagner,C. et al. (2004). Herpes simplex virus type-1 induces IFN-alpha production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A** 101, 11416-11421.
- Hollander,G.A., Zuklys,S., Morel,C., Mizoguchi,E. et al. (1998). Monoallelic expression of the interleukin-2 locus. **Science** 279, 2118-2121.
- Honda,K., Ohba,Y., Yanai,H., Negishi,H. et al. (2005a). Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. **Nature** 434, 1035-1040.
- Honda,K., Takaoka,A., und Taniguchi,T. (2006). Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. **Immunity.** 25, 349-360.
- Honda,K.undTaniguchi,T. (2006). IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. **Nat. Rev. Immunol.** 6, 644-658.
- Honda,K., Yanai,H., Negishi,H., Asagiri,M. et al. (2005b). IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. **Nature** 434, 772-777.
- Hornung,V., Ellegast,J., Kim,S., Brzozka,K. et al. (2006). 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. **Science** 314, 994-997.
- Hornung,V.undLatz,E. (2010). Intracellular DNA recognition. **Nat. Rev. Immunol.** 10, 123-130.
- Hsieh,C.S., Macatonia,S.E., Tripp,C.S., Wolf,S.F. et al. (1993). Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. **Science** 260, 547-549.

- Hu, J., Sealfon, S.C., Hayot, F., Jayaprakash, C. et al. (2007). Chromosome-specific and noisy IFNB1 transcription in individual virus-infected human primary dendritic cells. **Nucleic Acids Res.** 35, 5232-5241.
- Hu, M.G., Deshpande, A., Enos, M., Mao, D. et al. (2009). A requirement for cyclin-dependent kinase 6 in thymocyte development and tumorigenesis. **Cancer Res.** 69, 810-818.
- Hume, D.A. (2008). Macrophages as APC and the dendritic cell myth. **J. Immunol.** 181, 5829-5835.
- Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H. et al. (1992). Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. **J. Exp. Med.** 176, 1693-1702.
- Iwasaki, A. und Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nat. Immunol.** 5, 987-995.
- Jablonska, J., Dittmar, K.E., Kleinke, T., Buer, J. et al. (2007). Essential role of CCL2 in clustering of splenic ERTR-9+ macrophages during infection of BALB/c mice by *Listeria monocytogenes*. **Infect. Immun.** 75, 462-470.
- Jakowski, R.M. und Wyand, D.S. (1971). Listeriosis associated with canine distemper in a gray fox. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 159, 626-628.
- Janeway, C., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M. (2005). Immunobiology. (New York, USA: Garland Science Publishing).
- Jia, T., Leiner, I., Dorothee, G., Brandl, K. et al. (2009). MyD88 and Type I interferon receptor-mediated chemokine induction and monocyte recruitment during *Listeria monocytogenes* infection. **J. Immunol.** 183, 1271-1278.
- Jin, Y., Dons, L., Kristensson, K., und Rottenberg, M.E. (2001). Neural route of cerebral *Listeria monocytogenes* murine infection: role of immune response mechanisms in controlling bacterial neuroinvasion. **Infect. Immun.** 69, 1093-1100.
- Jones, G.E., Allen, W.E., und Ridley, A.J. (1998). The Rho GTPases in macrophage motility and chemotaxis. **Cell Adhes. Commun.** 6, 237-245.
- Kanehisa, M., Goto, S., Furumichi, M., Tanabe, M. et al. (2010). KEGG for representation and analysis of molecular networks involving diseases and drugs. **Nucleic Acids Res.** 38, D355-D360.
- Kang, S.J., Liang, H.E., Reizis, B., und Locksley, R.M. (2008). Regulation of hierarchical clustering and activation of innate immune cells by dendritic cells. **Immunity.** 29, 819-833.
- Kang, Y.S., Yamazaki, S., Iyoda, T., Pack, M. et al. (2003). SIGN-R1, a novel C-type lectin expressed by marginal zone macrophages in spleen, mediates uptake of the polysaccharide dextran. **Int. Immunol.** 15, 177-186.
- Karasuyama, H. und Melchers, F. (1988). Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukin 2, 3, 4 or 5, using modified cDNA expression vectors. **Eur. J. Immunol.** 18, 97-104.
- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M. et al. (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. **Nature** 441, 101-105.
- Kawai, T. und Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nat. Immunol.** 11, 373-384.
- Kelly, B.L. und Locksley, R.M. (2000). Coordinate regulation of the IL-4, IL-13, and IL-5 cytokine cluster in Th2 clones revealed by allelic expression patterns. **J. Immunol.** 165, 2982-2986.
- Kempuraj, D., Donelan, J., Frydas, S., Iezzi, T. et al. (2004). Interleukin-28 and 29 (IL-28 and IL-29): new cytokines with antiviral activities. **Int. J. Immunopathol. Pharmacol.** 17, 103-106.
- Kerkmann, M., Costa, L.T., Richter, C., Rothenfusser, S. et al. (2005). Spontaneous formation of nucleic acid-based nanoparticles is responsible for high interferon-alpha induction by CpG-A in plasmacytoid dendritic cells. **J. Biol. Chem.** 280, 8086-8093.

- Kerkmann,M., Rothenfusser,S., Hornung,V., Towarowski,A. et al. (2003). Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells. **J. Immunol.** 170, 4465-4474.
- Kim,T.K.undManiatis,T. (1997). The mechanism of transcriptional synergy of an in vitro assembled interferon-beta enhancerosome. **Mol. Cell** 1, 119-129.
- Kraal,G.undJanse,M. (1986). Marginal metallophilic cells of the mouse spleen identified by a monoclonal antibody. **Immunology** 58, 665-669.
- Krieg,A.M., Yi,A.K., Matson,S., Waldschmidt,T.J. et al. (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. **Nature** 374, 546-549.
- Kumagai,Y., Takeuchi,O., Kato,H., Kumar,H. et al. (2007). Alveolar macrophages are the primary interferon-alpha producer in pulmonary infection with RNA viruses. **Immunity.** 27, 240-252.
- Kursar,M., Bonhagen,K., Kohler,A., Kamradt,T. et al. (2002). Organ-specific CD4+ T cell response during Listeria monocytogenes infection. **J. Immunol.** 168, 6382-6387.
- Kurts,C., Robinson,B.W., und Knolle,P.A. (2010). Cross-priming in health and disease. **Nat. Rev. Immunol.** 10, 403-414.
- Lecuit,M., Vandormael-Pournin,S., Lefort,J., Huerre,M. et al. (2001). A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. **Science** 292, 1722-1725.
- Leenen,P.J., Radosevich,K., Voerman,J.S., Salomon,B. et al. (1998). Heterogeneity of mouse spleen dendritic cells: in vivo phagocytic activity, expression of macrophage markers, and subpopulation turnover. **J. Immunol.** 160, 2166-2173.
- Li,J., Niu,X.L., und Madamanchi,N.R. (2008). Leukocyte antigen-related protein tyrosine phosphatase negatively regulates hydrogen peroxide-induced vascular smooth muscle cell apoptosis. **J. Biol. Chem.** 283, 34260-34272.
- Lienenklaus,S., Cornitescu,M., Zietara,N., Lyszkiewicz,M. et al. (2009). Novel reporter mouse reveals constitutive and inflammatory expression of IFN-beta in vivo. **J. Immunol.** 183, 3229-3236.
- Liu,Y.J. (2005). IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. **Annu. Rev. Immunol.** 23, 275-306.
- Lomvardas,S.undThanos,D. (2002). Modifying gene expression programs by altering core promoter chromatin architecture. **Cell** 110, 261-271.
- Longhi,M.P., Trumpfheller,C., Idoyaga,J., Caskey,M. et al. (2009). Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4+ Th1 immunity with poly IC as adjuvant. **J. Exp. Med.** 206, 1589-1602.
- Lopez-Bravo,M.undArdavin,C. (2008). In vivo induction of immune responses to pathogens by conventional dendritic cells. **Immunity.** 29, 343-351.
- Louten,J., Van Rooijen,N., und Biron,C.A. (2006). Type 1 IFN deficiency in the absence of normal splenic architecture during lymphocytic choriomeningitis virus infection. **J. Immunol.** 177, 3266-3272.
- Lucas,S., Ghilardi,N., Li,J., und de Sauvage,F.J. (2003). IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4+ T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A** 100, 15047-15052.
- Lund,J., Sato,A., Akira,S., Medzhitov,R. et al. (2003). Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. **J. Exp. Med.** 198, 513-520.
- MacMicking,J.D., Nathan,C., Hom,G., Chartrain,N. et al. (1995). Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Cell** 81, 641-650.
- Maghazachi,A.A., Al Aoukaty,A., und Schall,T.J. (1996). CC chemokines induce the generation of killer cells from CD56+ cells. **Eur. J. Immunol.** 26, 315-319.

- Manca,C., Tsenova,L., Bergtold,A., Freeman,S. et al. (2001). Virulence of a Mycobacterium tuberculosis clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN-alpha /beta. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A** 98, 5752-5757.
- Mancuso,G., Midiri,A., Biondo,C., Beninati,C. et al. (2007). Type I IFN signaling is crucial for host resistance against different species of pathogenic bacteria. **J. Immunol.** 178, 3126-3133.
- Maniatis,T., Falvo,J.V., Kim,T.H., Kim,T.K. et al. (1998). Structure and function of the interferon-beta enhanceosome. **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.** 63, 609-620.
- Martin-Cofreces,N.B., Sancho,D., Fernandez,E., Vicente-Manzanares,M. et al. (2006). Role of Fyn in the rearrangement of tubulin cytoskeleton induced through TCR. **J. Immunol.** 176, 4201-4207.
- Matloubian,M., David,A., Engel,S., Ryan,J.E. et al. (2000). A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo. **Nat. Immunol.** 1, 298-304.
- McGee,A.W., Topinka,J.R., Hashimoto,K., Petralia,R.S. et al. (2001). PSD-93 knock-out mice reveal that neuronal MAGUKs are not required for development or function of parallel fiber synapses in cerebellum. **J. Neurosci.** 21, 3085-3091.
- Mebius,R.E.undKraal,G. (2005). Structure and function of the spleen. **Nat. Rev. Immunol.** 5, 606-616.
- Miyake,T., Kumagai,Y., Kato,H., Guo,Z. et al. (2009). Poly I:C-induced activation of NK cells by CD8 alpha+ dendritic cells via the IPS-1 and TRIF-dependent pathways. **J. Immunol.** 183, 2522-2528.
- Mullis,K.B.undFaloona,F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymol.** 155, 335-350.
- Munshi,N., Agaloti,T., Lomvardas,S., Merika,M. et al. (2001). Coordination of a transcriptional switch by HMGI(Y) acetylation. **Science** 293, 1133-1136.
- Muraille,E., Giannino,R., Guimalda,P., Leiner,I. et al. (2005). Distinct in vivo dendritic cell activation by live versus killed Listeria monocytogenes. **Eur. J. Immunol.** 35, 1463-1471.
- Murillo,O., Ochoa,M.C., Arina,A., Gabari,I. et al. (2010). Proliferating NK cells in response to IL-15 do not upregulate surface B220 in vivo. **Gene Ther.** 17, 687-689.
- Nada,S., Shima,T., Yanai,H., Husi,H. et al. (2003). Identification of PSD-93 as a substrate for the Src family tyrosine kinase Fyn. **J. Biol. Chem.** 278, 47610-47621.
- Nagai,T., Ibata,K., Park,E.S., Kubota,M. et al. (2002). A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. **Nat. Biotechnol.** 20, 87-90.
- Naik,S.H., Proietto,A.I., Wilson,N.S., Dakic,A. et al. (2005). Cutting edge: generation of splenic CD8+ and CD8- dendritic cell equivalents in Fms-like tyrosine kinase 3 ligand bone marrow cultures. **J. Immunol.** 174, 6592-6597.
- Napolitani,G., Rinaldi,A., Bertoni,F., Sallusto,F. et al. (2005). Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. **Nat. Immunol.** 6, 769-776.
- O'Connell,R.M., Saha,S.K., Vaidya,S.A., Bruhn,K.W. et al. (2004). Type I interferon production enhances susceptibility to Listeria monocytogenes infection. **J. Exp. Med.** 200, 437-445.
- O'Riordan,M., Yi,C.H., Gonzales,R., Lee,K.D. et al. (2002). Innate recognition of bacteria by a macrophage cytosolic surveillance pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A** 99, 13861-13866.
- Pamer,E.G. (2004). Immune responses to Listeria monocytogenes. **Nat. Rev. Immunol.** 4, 812-823.
- Paolicelli,D., Drenzo,V., und Trojano,M. (2009). Review of interferon beta-1b in the treatment of early and relapsing multiple sclerosis. **Biologics.** 3, 369-376.

- Persson,C.M.undChambers,B.J. (2010). Plasmacytoid dendritic cell-induced migration and activation of NK cells in vivo. **Eur. J. Immunol.**
- Pfeffer,K., Matsuyama,T., Kundig,T.M., Wakeham,A. et al. (1993). Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. **Cell** 73, 457-467.
- Platanias,L.C. (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. **Nat. Rev. Immunol.** 5, 375-386.
- Prinz,M., Schmidt,H., Mildner,A., Knobeloch,K.P. et al. (2008). Distinct and nonredundant in vivo functions of IFNAR on myeloid cells limit autoimmunity in the central nervous system. **Immunity.** 28, 675-686.
- Ptashne,M. and Gann,A. (2002). Genes and Signals. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Qiu,H., Fan,Y., Joyee,A.G., Wang,S. et al. (2008). Type I IFNs enhance susceptibility to *Chlamydia muridarum* lung infection by enhancing apoptosis of local macrophages. **J. Immunol.** 181, 2092-2102.
- Rayamajhi,M., Humann,J., Penheiter,K., Andreasen,K. et al. (2010). Induction of IFN- α enables *Listeria monocytogenes* to suppress macrophage activation by IFN- γ . **J. Exp. Med.** 207, 327-337.
- Re,F.undStrominger,J.L. (2004). IL-10 released by concomitant TLR2 stimulation blocks the induction of a subset of Th1 cytokines that are specifically induced by TLR4 or TLR3 in human dendritic cells. **J. Immunol.** 173, 7548-7555.
- Reis e Sousa, Hieny,S., Scharon-Kersten,T., Jankovic,D. et al. (1997). In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T cell areas. **J. Exp. Med.** 186, 1819-1829.
- Riviere,I., Sunshine,M.J., und Littman,D.R. (1998). Regulation of IL-4 expression by activation of individual alleles. **Immunity.** 9, 217-228.
- Rothe,J., Lesslauer,W., Lotscher,H., Lang,Y. et al. (1993). Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. **Nature** 364, 798-802.
- Round,J.L., Tomassian,T., Zhang,M., Patel,V. et al. (2005). Dlg1 coordinates actin polymerization, synaptic T cell receptor and lipid raft aggregation, and effector function in T cells. **J. Exp. Med.** 201, 419-430.
- Sabbah,A., Chang,T.H., Harnack,R., Frohlich,V. et al. (2009). Activation of innate immune antiviral responses by Nod2. **Nat. Immunol.** 10, 1073-1080.
- Sadler,A.J.undWilliams,B.R. (2008). Interferon-inducible antiviral effectors. **Nat. Rev. Immunol.** 8, 559-568.
- Scheu,S., Dresing,P., und Locksley,R.M. (2008). Visualization of IFN β production by plasmacytoid versus conventional dendritic cells under specific stimulation conditions in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A** 105, 20416-20421.
- Schmitz,F., Heit,A., Guggemoos,S., Krug,A. et al. (2007). Interferon-regulatory-factor 1 controls Toll-like receptor 9-mediated IFN- β production in myeloid dendritic cells. **Eur. J. Immunol.** 37, 315-327.
- Schroder,K., Spille,M., Pilz,A., Lattin,J. et al. (2007). Differential effects of CpG DNA on IFN- β induction and STAT1 activation in murine macrophages versus dendritic cells: alternatively activated STAT1 negatively regulates TLR signaling in macrophages. **J. Immunol.** 179, 3495-3503.
- Semmling,V., Lukacs-Kornek,V., Thaiss,C.A., Quast,T. et al. (2010). Alternative cross-priming through CCL17-CCR4-mediated attraction of CTLs toward NKT cell-licensed DCs. **Nat. Immunol.** 11, 313-320.
- Senger,K., Merika,M., Agaloti,T., Yie,J. et al. (2000). Gene repression by coactivator repulsion. **Mol. Cell** 6, 931-937.
- Serbina,N.V., Jia,T., Hohl,T.M., und Pamer,E.G. (2008). Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. **Annu. Rev. Immunol.** 26, 421-452.
- Serbina,N.V., Kuziel,W., Flavell,R., Akira,S. et al. (2003a). Sequential MyD88-independent and -dependent activation of innate immune responses to intracellular bacterial infection. **Immunity.** 19, 891-901.

-
- Serbina, N.V. und Pamer, E.G. (2006). Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. **Nat. Immunol.** 7, 311-317.
- Serbina, N.V., Salazar-Mather, T.P., Biron, C.A., Kuziel, W.A. et al. (2003b). TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. **Immunity.** 19, 59-70.
- Shiloh, M.U., MacMicking, J.D., Nicholson, S., Brause, J.E. et al. (1999). Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. **Immunity.** 10, 29-38.
- Shortman, K. und Naik, S.H. (2007). Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. **Nat. Rev. Immunol.** 7, 19-30.
- Sixl, W., Stunzner, D., und Withalm, H. (1978). [Epidemiologic and serologic study of listeriosis in man and domestic and wild animals in Austria]. **J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.** 22, 460-469.
- Small, C.L., Shaler, C.R., McCormick, S., Jeyanathan, M. et al. (2010). Influenza infection leads to increased susceptibility to subsequent bacterial superinfection by impairing NK cell responses in the lung. **J. Immunol.** 184, 2048-2056.
- Stockinger, S. und Decker, T. (2008). Novel functions of type I interferons revealed by infection studies with *Listeria monocytogenes*. **Immunobiology** 213, 889-897.
- Stockinger, S., Kastner, R., Kernbauer, E., Pilz, A. et al. (2009). Characterization of the interferon-producing cell in mice infected with *Listeria monocytogenes*. **PLoS. Pathog.** 5, e1000355.
- Stockinger, S., Materna, T., Stoiber, D., Bayr, L. et al. (2002). Production of type I IFN sensitizes macrophages to cell death induced by *Listeria monocytogenes*. **J. Immunol.** 169, 6522-6529.
- Stovall, S.H., Yi, A.K., Meals, E.A., Talati, A.J. et al. (2004). Role of vav1- and src-related tyrosine kinases in macrophage activation by CpG DNA. **J. Biol. Chem.** 279, 13809-13816.
- Takaoka, A., Wang, Z., Choi, M.K., Yanai, H. et al. (2007). DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. **Nature** 448, 501-505.
- Takaoka, A. und Yanai, H. (2006). Interferon signalling network in innate defence. **Cell Microbiol.** 8, 907-922.
- Takeda, K. und Akira, S. (2004). TLR signaling pathways. **Semin. Immunol.** 16, 3-9.
- Takeuchi, O. und Akira, S. (2009). Innate immunity to virus infection. **Immunol. Rev.** 227, 75-86.
- Teixeira, L., Botelho, A.S., Mesquita, S.D., Correia, A. et al. (2010). Plasmacytoid and conventional dendritic cells are early producers of IL-12 in *Neospora caninum*-infected mice. **Immunol. Cell Biol.** 88, 79-86.
- Thanos, D. und Maniatis, T. (1995). Virus induction of human IFN beta gene expression requires the assembly of an enhanosome. **Cell** 83, 1091-1100.
- Tripp, C.S., Wolf, S.F., und Unanue, E.R. (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. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A** 90, 3725-3729.
- Tsou, C.L., Peters, W., Si, Y., Slaymaker, S. et al. (2007). Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. **J. Clin. Invest** 117, 902-909.
- Turner, J. und Orme, I.M. (2004). The expression of early resistance to an infection with *Mycobacterium tuberculosis* by old mice is dependent on IFN type II (IFN-gamma) but not IFN type I. **Mech. Ageing Dev.** 125, 1-9.
- Unanue, E.R. (1997). Studies in listeriosis show the strong symbiosis between the innate cellular system and the T-cell response. **Immunol. Rev.** 158, 11-25.
- Unterholzner, L., Keating, S.E., Baran, M., Horan, K.A. et al. (2010). IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. **Nat. Immunol.**
-

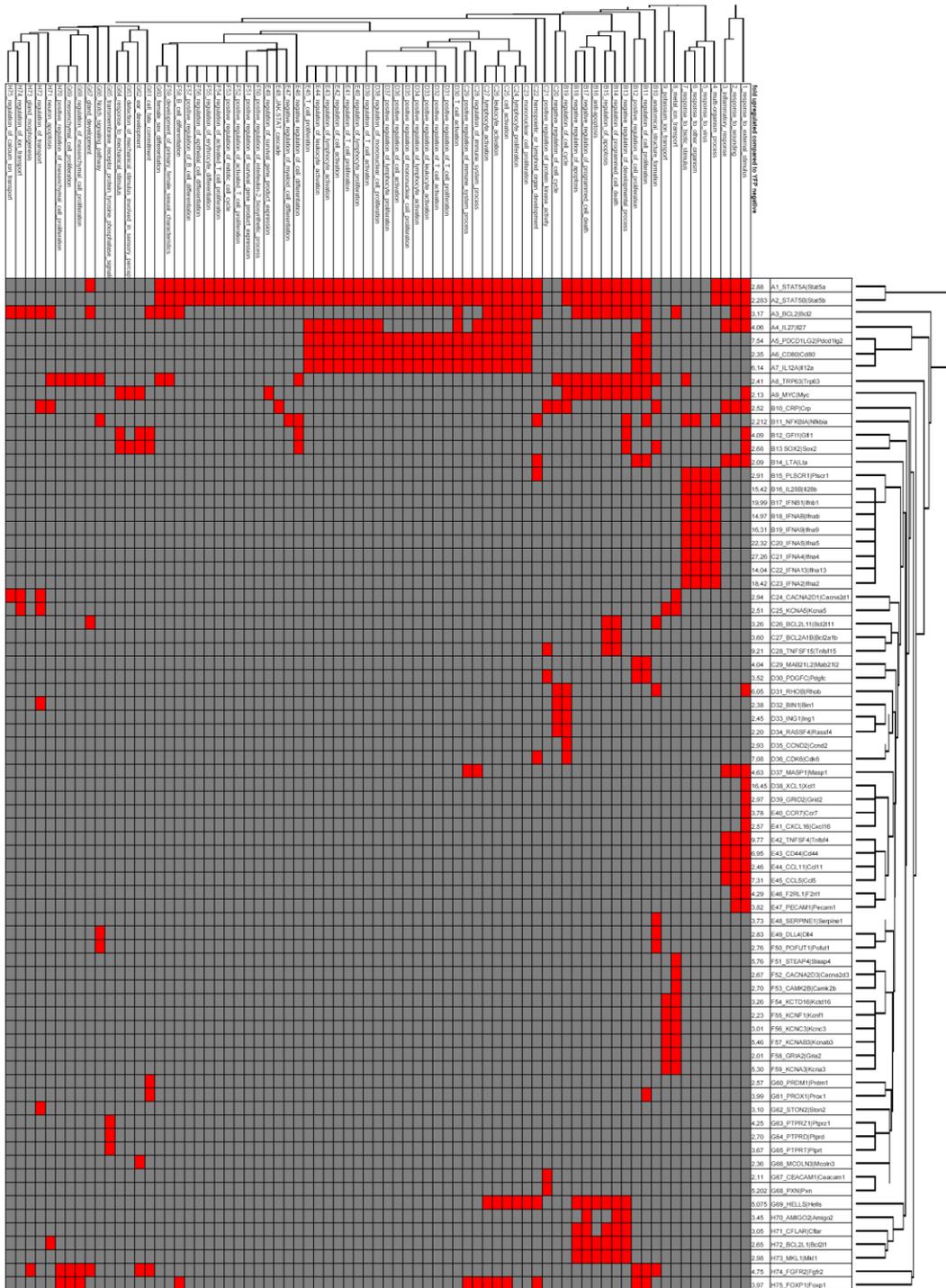
- Vassileva,G., Soto,H., Zlotnik,A., Nakano,H. et al. (1999). The reduced expression of 6Ckine in the plt mouse results from the deletion of one of two 6Ckine genes. **J. Exp. Med.** 190, 1183-1188.
- Villadangos,J.A.undYoung,L. (2008). Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. **Immunity.** 29, 352-361.
- von Andrian,U.H.undMempel,T.R. (2003). Homing and cellular traffic in lymph nodes. **Nat. Rev. Immunol.** 3, 867-878.
- Wang,J.P., Liu,P., Latz,E., Golenbock,D.T. et al. (2006). Flavivirus activation of plasmacytoid dendritic cells delineates key elements of TLR7 signaling beyond endosomal recognition. **J. Immunol.** 177, 7114-7121.
- Weber,F., Wagner,V., Rasmussen,S.B., Hartmann,R. et al. (2006). Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses. **J. Virol.** 80, 5059-5064.
- Weng,L., Dai,H., Zhan,Y., He,Y. et al. (2006). Rosetta error model for gene expression analysis. **Bioinformatics.** 22, 1111-1121.
- Westcott,M.M., Henry,C.J., Cook,A.S., Grant,K.W. et al. (2007). Differential susceptibility of bone marrow-derived dendritic cells and macrophages to productive infection with *Listeria monocytogenes*. **Cell Microbiol.** 9, 1397-1411.
- Whitmore,M.M., DeVeer,M.J., Edling,A., Oates,R.K. et al. (2004). Synergistic activation of innate immunity by double-stranded RNA and CpG DNA promotes enhanced antitumor activity. **Cancer Res.** 64, 5850-5860.
- Woodward,J.J., Iavarone,A.T., und Portnoy,D.A. (2010). c-di-AMP secreted by intracellular *Listeria monocytogenes* activates a host type I interferon response. **Science** 328, 1703-1705.
- Yang,P., An,H., Liu,X., Wen,M. et al. (2010). The cytosolic nucleic acid sensor LRRFIP1 mediates the production of type I interferon via a beta-catenin-dependent pathway. **Nat. Immunol.** 11, 487-494.
- Yin,J.undFerguson,T.A. (2009). Identification of an IFN-gamma-producing neutrophil early in the response to *Listeria monocytogenes*. **J. Immunol.** 182, 7069-7073.
- Yoneyama,H., Matsuno,K., Toda,E., Nishiwaki,T. et al. (2005). Plasmacytoid DCs help lymph node DCs to induce anti-HSV CTLs. **J. Exp. Med.** 202, 425-435.
- Yong,M., Mitchell,D., Caudron,A., Toth,I. et al. (2009). Expression of maturation markers on murine dendritic cells in response to group A streptococcal lipopeptide vaccines. **Vaccine** 27, 3313-3318.
- Zitvogel,L. (2002). Dendritic and natural killer cells cooperate in the control/switch of innate immunity. **J. Exp. Med.** 195, F9-14.
- Zucchini,N., Bessou,G., Robbins,S.H., Chasson,L. et al. (2008). Individual plasmacytoid dendritic cells are major contributors to the production of multiple innate cytokines in an organ-specific manner during viral infection. **Int. Immunol.** 20, 45-56.

7 Anhang

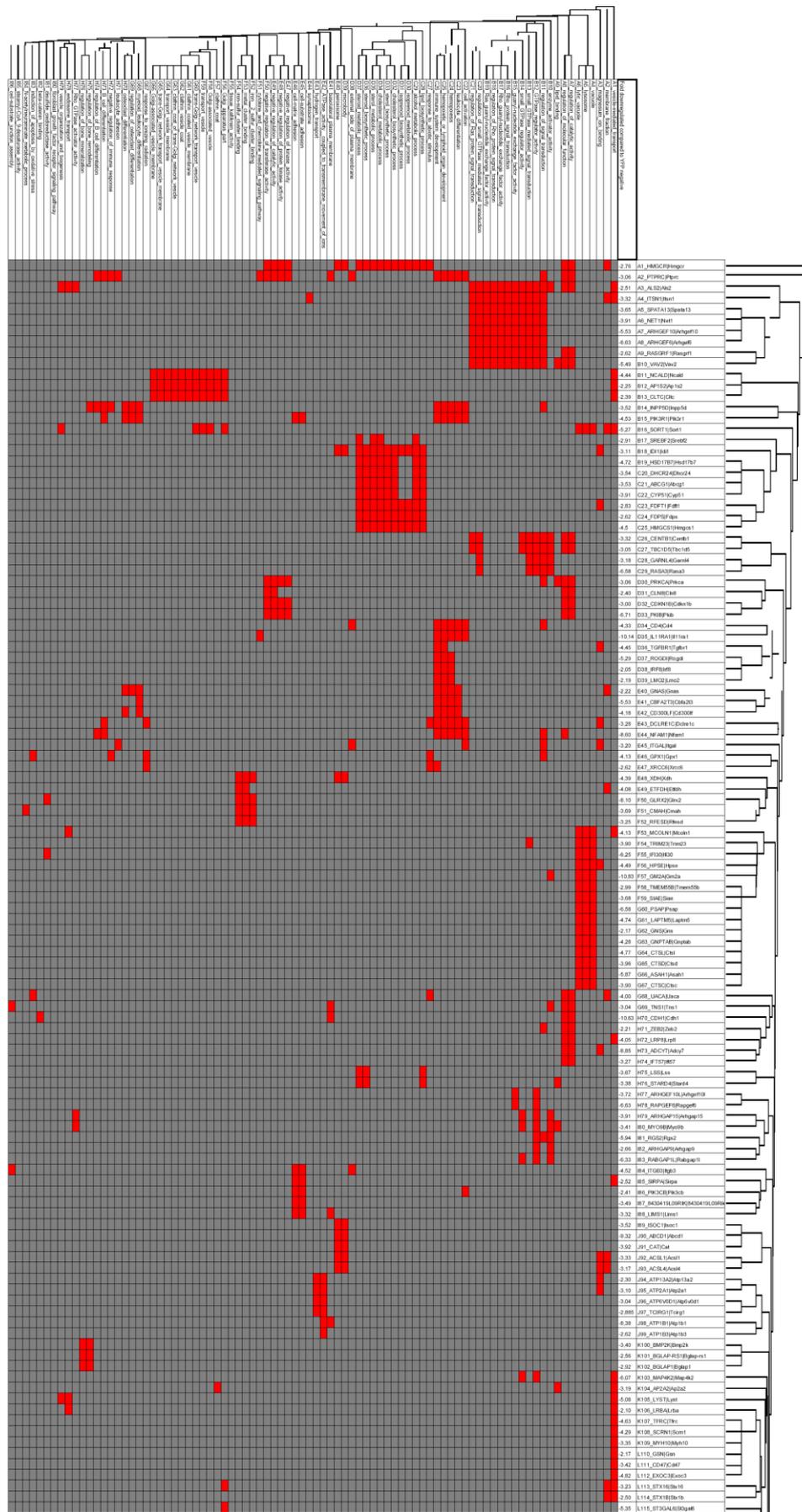
7.1 GoMiner Analysen

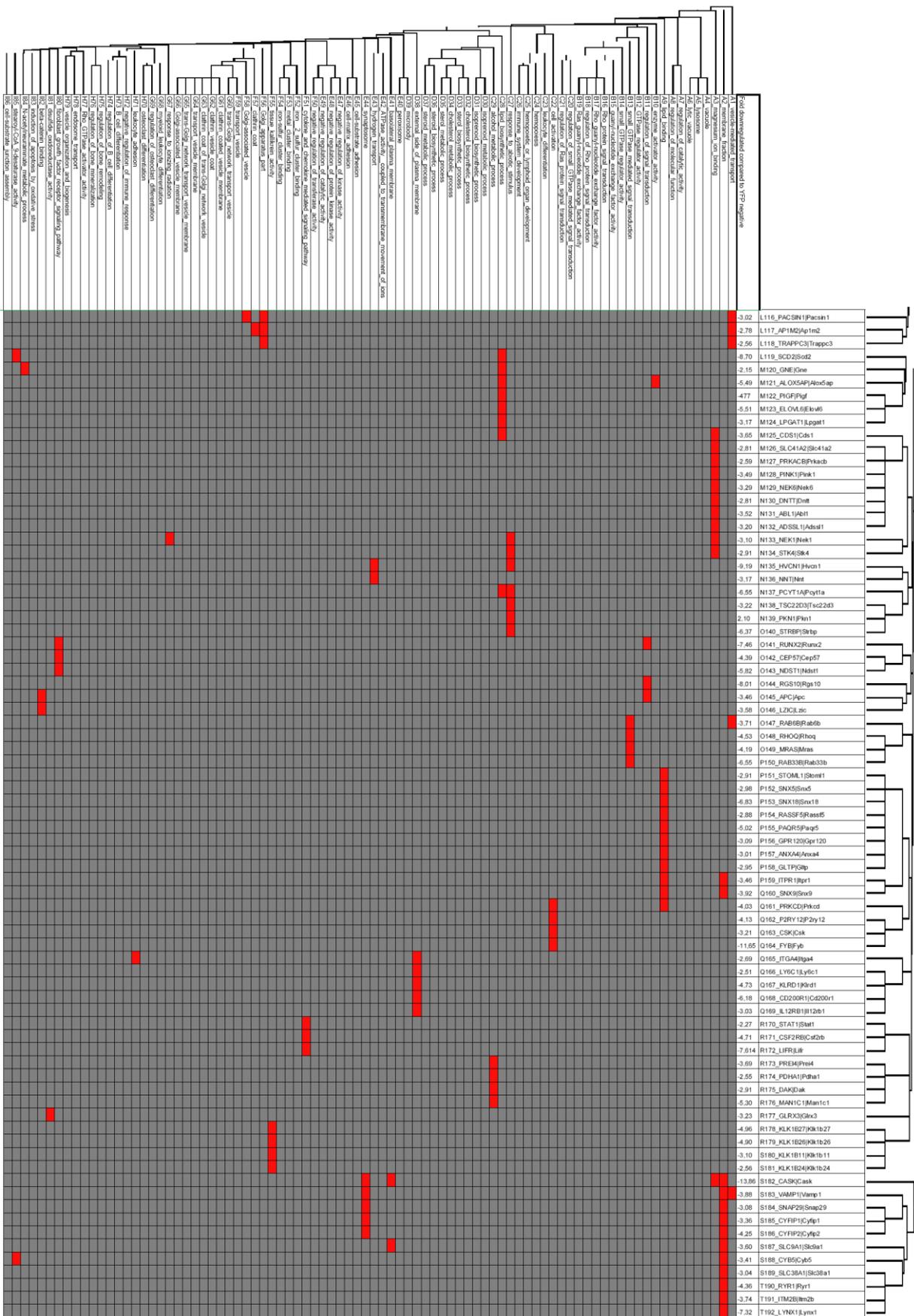
Das GoMiner Programm (<http://discover.nci.nih.gov/gominer/index.jsp>) stellte eine graphische Clusterung der jeweils signifikant unter- bzw. überrepräsentierten Gene der analysierten Proben (vertikal) einer entsprechenden Clusterung von GO-Kategorien (horizontal) gegenüber. Eine positive Korrelation des analysierten Gens mit der jeweiligen GO-Kategorie wurde als „roter“ Block gekennzeichnet.

Differentiell überrepräsentierte Gene



Differentiell unterrepräsentierte Gene





7.2 Signifikant differentiell regulierte Gene nach Ausschluss einer Probe

Gen	Δ	Gen	Δ	Gen	Δ	Gen	Δ	Gen	Δ	Gen	Δ
<i>Ifna4</i>	49,72	<i>Ehf</i>	6,78	<i>Jun</i>	4,81	<i>AK085049</i>	4,06	<i>AK048858</i>	3,55	<i>Cd200r1</i>	-5,34
<i>Dlg2</i>	43,12	<i>Il1rn</i>	6,77	<i>Cd44</i>	4,79	<i>Ehf</i>	4,05	<i>Pfjfb3</i>	3,54	<i>AK042175</i>	-5,35
<i>Ifna2</i>	37,46	<i>Atf3</i>	6,74	<i>Map3k5</i>	4,78	<i>Has3</i>	4,03	<i>AK050110</i>	3,53	<i>Adcy7</i>	-5,36
<i>A_52_P13337</i>	36,08	<i>Grhl1</i>	6,68	<i>Ball</i>	4,73	<i>Gaint6</i>	4,03	<i>Bcl2l11</i>	3,52	<i>Gm2a</i>	-5,70
<i>Il12b</i>	36,01	<i>Tgfbap1</i>	6,65	<i>Plcx3</i>	4,72	<i>Gltpd1</i>	4,01	<i>AK033143</i>	3,49	<i>Atp1b1</i>	-5,74
<i>Ccl5</i>	27,81	<i>AK045221</i>	6,58	<i>AK149231</i>	4,72	<i>NP377814</i>	4,01	<i>Lactb</i>	3,49	<i>Ifi30</i>	-5,77
<i>Ifna5</i>	27,49	<i>Lactb</i>	6,58	<i>Rbmxl2</i>	4,72	<i>MUST000001136</i>	4,00	<i>A130015J22Rik</i>	3,49	<i>Hvcn1</i>	-5,84
<i>Ifna12</i>	27,08	<i>Tnfsf15</i>	6,49	<i>AK087232</i>	4,70	<i>Otud1</i>	4,00	<i>Ier3</i>	3,48	<i>Abcd1</i>	-5,94
<i>Xcl1</i>	23,58	<i>Marcck5</i>	6,42	<i>Gmpr</i>	4,69	<i>Pcdhb19</i>	3,99	<i>Car13</i>	3,47	<i>Lifr</i>	-5,95
<i>Ifna2</i>	22,56	<i>AI851602</i>	6,41	<i>Nfia</i>	4,63	<i>BB229778</i>	3,93	<i>Pxn</i>	3,46	<i>Ankrd44</i>	-6,08
<i>Ccl3</i>	22,53	<i>Ranbp6</i>	6,34	<i>AK052923</i>	4,60	<i>Lipg</i>	3,92	<i>Api5</i>	3,44	<i>Rgs10</i>	-6,18
<i>Ccl5</i>	18,25	<i>Hk2</i>	6,27	<i>Cd80</i>	4,58	<i>H2-M11</i>	3,91	<i>4933403O08Rik</i>	3,43	<i>Man2a2</i>	-6,19
<i>Ifnb1</i>	15,35	<i>Gpr31c</i>	6,24	<i>AK080445</i>	4,57	<i>Srgn</i>	3,91	<i>Il27</i>	3,43	<i>Slc29a3</i>	-6,25
<i>Ifnb9</i>	13,85	<i>Slc16a10</i>	6,18	<i>Ankrd33b</i>	4,53	<i>Slc43a3</i>	3,90	<i>Ankrd33b</i>	3,43	<i>Runx2</i>	-6,29
<i>Ifna9</i>	13,57	<i>Gprin3</i>	6,05	<i>Ccl22</i>	4,49	<i>Slc39a8</i>	3,89	<i>Gsr</i>	3,40	<i>Il11ra1</i>	-6,31
<i>Zfp36</i>	13,35	<i>Tnfsf4</i>	6,03	<i>D830044D21Rik</i>	4,48	<i>MUST000000575</i>	3,89	<i>A230067G21Rik</i>	3,40	<i>Cdh1</i>	-6,35
<i>Ebi3</i>	12,87	<i>AI504432</i>	6,00	<i>Ggta1</i>	4,47	<i>Kcna3</i>	3,88	<i>Tmem67</i>	3,40	<i>Myo18a</i>	-6,36
<i>Lmo4</i>	12,58	<i>Olfml2a</i>	5,99	<i>4933408A14Rik</i>	4,46	<i>Tbr1</i>	3,87	<i>MUST00000115C</i>	3,40	<i>Tsc22d1</i>	-6,47
<i>Qk</i>	12,06	<i>Ccl4</i>	5,98	<i>Rnd3</i>	4,39	<i>Hspa1a</i>	3,86	<i>BE371292</i>	3,40	<i>Man2a2</i>	-6,48
<i>Batf</i>	11,20	<i>Cdk6</i>	5,97	<i>Slc10a2</i>	4,39	<i>Kcnab3</i>	3,85	<i>Fam38b</i>	3,39	<i>Runx2</i>	-6,54
<i>Ifna13</i>	11,10	<i>1100001G20Rik</i>	5,94	<i>Pim1</i>	4,39	<i>Ptprt</i>	3,84	<i>Ing1</i>	3,39	<i>Cyp27a1</i>	-6,54
<i>Bcl2a1c</i>	11,00	<i>Pdcd1lg2</i>	5,91	<i>Cntn4</i>	4,39	<i>Stat5a</i>	3,84	<i>Rbpms</i>	3,39	<i>Psap</i>	-6,65
<i>Slc9a2</i>	10,93	<i>AK032741</i>	5,87	<i>Cdk6</i>	4,38	<i>Fam89a</i>	3,84	<i>Olfml2a</i>	3,39	<i>Psap</i>	-6,68
<i>Il28b</i>	10,55	<i>Ppp4r2</i>	5,87	<i>Gpx4</i>	4,36	<i>1190002H23Rik</i>	3,83	<i>Gfr1</i>	3,38	<i>Upb1</i>	-6,82
<i>Retn</i>	10,30	<i>MUST000001034</i>	5,85	<i>Apol7c</i>	4,35	<i>Arhgef3</i>	3,82	<i>Atf6</i>	3,38	<i>Sor11</i>	-6,84
<i>Cdk5r1</i>	10,08	<i>Milt6</i>	5,82	<i>AK041447</i>	4,35	<i>Gramd4</i>	3,81	<i>Cxcl16</i>	3,37	<i>Prepl</i>	-6,92
<i>Ccr7</i>	9,72	<i>Arhgef3</i>	5,64	<i>Il12a</i>	4,35	<i>Pim1</i>	3,77	<i>Furin</i>	3,36	<i>AK029749</i>	-7,30
<i>Olfml2a</i>	9,70	<i>AK037636</i>	5,64	<i>9430040K09Rik</i>	4,35	<i>Cer1</i>	3,75	<i>Dtd1</i>	3,36	<i>Gm2a</i>	-7,82
<i>Kctd14</i>	9,27	<i>AK030651</i>	5,44	<i>Gabra6</i>	4,32	<i>F2rl1</i>	3,75	<i>Rassf4</i>	3,35	<i>Siglech</i>	-7,83
<i>AI504432</i>	9,00	<i>Fam46c</i>	5,43	<i>Pdha2</i>	4,29	<i>Rbpms</i>	3,73	<i>Il1rn</i>	3,34	<i>Cxcs5</i>	-7,88
<i>Retn</i>	8,91	<i>Cdgap</i>	5,43	<i>Apol7c</i>	4,29	<i>AK089343</i>	3,73	<i>AK032739</i>	3,34	<i>Fyb</i>	-7,94
<i>Rhbdl3</i>	8,75	<i>1810063B05Rik</i>	5,38	<i>Gsr</i>	4,29	<i>Spry2</i>	3,73	<i>Cdk6</i>	3,34	<i>Adam11</i>	-8,09
<i>Bcl2l11</i>	8,66	<i>AK048971</i>	5,34	<i>Tcf7</i>	4,28	<i>Fgfr2</i>	3,72	<i>MUSG000000526</i>	3,34	<i>Cask</i>	-8,39
<i>Ighg</i>	8,54	<i>Adra2a</i>	5,32	<i>C230075M21Rik</i>	4,27	<i>Tctn3</i>	3,71	<i>AK084228</i>	3,32	<i>Nfam1</i>	-8,40
<i>Arl14</i>	8,22	<i>Phlda1</i>	5,25	<i>AK037854</i>	4,26	<i>Sipa1l3</i>	3,68	<i>Fam135b</i>	3,32	<i>P2ry12</i>	-8,62
<i>TC1590993</i>	8,20	<i>Rhob</i>	5,25	<i>Mab21l2</i>	4,25	<i>AK083407</i>	3,67	<i>Glipr1</i>	3,27	<i>Mgl1</i>	-9,12
<i>Actn1</i>	8,11	<i>D430001L07Rik</i>	5,22	<i>Cd274</i>	4,23	<i>Itgb3bp</i>	3,67	<i>Basp1</i>	3,26	<i>Ppcdc</i>	-9,28
<i>Rhbdl3</i>	8,00	<i>Exoc4</i>	5,17	<i>Acsf5</i>	4,20	<i>AK081090</i>	3,67	<i>Mkl1</i>	3,26		
<i>Fggy</i>	7,95	<i>Sema6d</i>	5,13	<i>4930570N19Rik</i>	4,20	<i>4933400F03Rik</i>	3,67	<i>Slc31a2</i>	3,25		
<i>Serpinc1c</i>	7,87	<i>AK138803</i>	5,12	<i>Lmo4</i>	4,20	<i>Steap4</i>	3,67	<i>Casp8</i>	3,25		
<i>Bcl2a1b</i>	7,85	<i>AK031920</i>	5,09	<i>Bhlhe22</i>	4,19	<i>A630006J10Rik</i>	3,67	<i>Fam129a</i>	3,24		
<i>Phip</i>	7,78	<i>BB113440</i>	5,09	<i>Bcl2l1</i>	4,18	<i>AK081189</i>	3,65	<i>AK085781</i>	3,21		
<i>AK047032</i>	7,72	<i>Serpinc1b</i>	5,06	<i>Map3k5</i>	4,17	<i>Fggy</i>	3,64	<i>F730043M19Rik</i>	3,21		
<i>Igfbp3</i>	7,66	<i>Hells</i>	4,96	<i>Cas21</i>	4,15	<i>Rnd3</i>	3,63	<i>Npr1</i>	3,21		
<i>Grhl1</i>	7,62	<i>Cd63</i>	4,94	<i>Creb5</i>	4,14	<i>Fut8</i>	3,61	<i>Vipr2</i>	3,21		
<i>Igsf8</i>	7,23	<i>AK035046</i>	4,93	<i>Bcl2l1</i>	4,13	<i>Pstpip2</i>	3,61	<i>Ttn</i>	3,20		
<i>Pstpip2</i>	7,12	<i>Zh2c2</i>	4,92	<i>Slc39a8</i>	4,12	<i>AK087943</i>	3,60	<i>Senp6</i>	3,20		
<i>Sbf2</i>	7,12	<i>Lmo4</i>	4,90	<i>Cd80</i>	4,12	<i>Ccnd2</i>	3,59	<i>Ovol1</i>	3,20		
<i>Zbtb10</i>	6,99	<i>Gpr18</i>	4,88	<i>4930548G14Rik</i>	4,10	<i>D930044I17Rik</i>	3,58	<i>Il15</i>	3,19		
<i>Atp11a</i>	6,94	<i>Csn3</i>	4,88	<i>3021401C12Rik</i>	4,09	<i>Spon1</i>	3,57				
<i>Ddx11</i>	6,81	<i>AK033876</i>	4,86	<i>NAP052236-1</i>	4,09	<i>Nat8l</i>	3,55				

Tabelle 7.1: Gekürzte Übersicht differentiell regulierter Gene

Die Tabelle zeigt in gekürzter Form die signifikant um mehr als Faktor 2 differentiell regulierten Gene zwischen IFN β ⁺ und IFN β ⁻ pDCs 6 h nach CpG 1668 Stimulation *in vivo*. Die Arraydaten wurden von Miltenyi Biotec unter Ausschluss der YFP⁻ Probe des ersten Versuchsansatzes berechnet. Die ausgeschlossene Probe besaß den geringsten RIN-Wert (7,6), den kleinsten OD260/280 Wert (1,5) und erzeugte laut Miltenyi Biotec ein erhöhtes Signalrauschen. Der Δ Wert gibt den Faktor an um wie viel stärker bzw. schwächer ein Gen in YFP⁺ pDCs im Vergleich zu YFP⁻ pDCs transkribiert wird.

7.3 Danksagung und Widmung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht entstanden wäre.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Stefanie Scheu für die Überlassung des Themas, die exzellente und kontinuierliche Betreuung der Arbeit sowie die Anleitung zum selbständigen wissenschaftlichen Denken und Handeln in einem hervorragenden und inspirierenden Arbeitsumfeld.

Weiterhin bedanke ich mich bei Prof. Dr. Klaus Pfeffer für seine Unterstützung, die Möglichkeit diese Arbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene anfertigen zu können und die idealen wissenschaftlichen Rahmenbedingungen.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Peter Westhoff für die freundliche Betreuung meiner Doktorarbeit von Seiten der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät.

Bei meinen Mentoren PD Dr. Sandra Beer-Hammer, PD Dr. Karl Lang, Prof. Dr. Ingo Schmitz und PD Dr. Albert Zimmermann möchte ich mich herzlich für die anregenden und konstruktiven Diskussionen bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Jens, Magda, Sonja und Steffi für die schöne Zeit im Labor, die Versorgung mit Leckereien, experimentelle Unterstützung, das Korrekturlesen des Manuskripts, lustige Anekdoten und Freundschaft. Ohne Euch hätte mir die Arbeit nur halb so viel Freude bereitet und ich war stets froh Euch um mich zu haben, gerade auch in schweren Zeiten.

Neben allen Mitgliedern der AG „mob“ möchte ich mich herzlich bedanken bei Albert, Anika, Anne, Conny, Daniel, David, Eric, Felix, Julia, Kristina, Margret, Nicole, Regina, Silke, Simone und Uschi für wissenschaftlichen Teamspirit, den ein oder anderen Schabernack und unvergessliche außeruniversitäre Aktivitäten.

Mein größter Dank gebührt meiner Familie für Geborgenheit und seelischer Unterstützung sowie meiner Freundin Nadine für unermüdliches Verständnis, Rückhalt und Liebe.

Meinem Vater, der mich stets in jeder Lebenslage unterstützte und dem ein Miterleben der Vollendung dieser Arbeit nicht vergönnt war, möchte ich diese Dissertation voller Dankbarkeit widmen.

7.4 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Arbeit wurde weder in der vorgelegten noch in einer ähnlichen Form bei einer anderen Institution eingereicht.

Düsseldorf, den 13.10.2010

Philipp Dresing