

Der Einfluss von Toso in der Interaktion zwischen dendritischen Zellen und T-Lymphozyten

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Pauline Funkner

aus Alma-Ata

Düsseldorf, Mai 2012

aus dem Institut der Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Karl Sebastian Lang

Korreferent: Prof. Dr. Lutz Schmitt

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Juni 2012

Meiner Familie gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG.....	1
1. SUMMARY	3
2. EINLEITUNG.....	5
2.1. Virale Hepatitis im LCMV-Modell	5
2.2. Dendritische Zellen.....	10
2.3. T-Lymphozyten.....	15
2.4. Fas apoptotic inhibitory molecule 3 (Faim3/Toso).....	21
2.5. Zielsetzung	23
3. MATERIAL UND METHODEN.....	25
3.1. Material	25
3.1.1. Chemikalien	25
3.1.2. Kits.....	25
3.1.3. Software.....	25
3.1.4. Verbrauchsmaterial.....	26
3.1.5. Geräte	26
3.1.6. Lösungen und Puffer	27
3.1.7. Antikörper	29
3.1.8. Virus.....	29
3.1.9. Zellen	29
3.1.10. Versuchstiere.....	30
3.1.11. Statistik.....	30
3.2. Methoden.....	30
3.2.1. Untersuchung von RNA.....	30
3.2.2. ELISA.....	31
3.2.3. FACS	32
3.2.3.1. Zelloberflächenfärbung.....	32

3.2.3.2.	Anfärben von Blutleukozyten.....	32
3.2.3.3.	Apoptose.....	33
3.2.4.	Zellkultur.....	33
3.2.4.1.	Ermittlung der Zellzahl	33
3.2.4.2.	Fertigung von Kryostocks	33
3.2.4.3.	Auftauen von Zellen.....	33
3.2.4.4.	Ernten von Zellen.....	34
3.2.4.5.	DC Generierung	34
3.2.4.6.	Aufreinigung von T-Zellen mittels MACS®Sort.....	34
3.2.4.7.	Anfärben der T-Lymphozyten mit CFSE.....	35
3.2.4.8.	Proliferationsassay mit T-Lymphozyten.....	35
3.2.4.9.	Generierung von GM-CSF im Überstand	36
3.2.5.	<i>In vivo</i> Untersuchungen im Mausmodell.....	36
3.2.5.1.	Intravenöse Verabreichung.....	36
3.2.5.2.	Intraperitoneale Verabreichung.....	36
3.2.5.3.	Blut- und Organentnahme.....	36
3.2.5.4.	Bestimmung viraler Titer	37
3.2.5.5.	ALT.....	38
3.2.5.6.	Bestimmung spezifischer T-Lymphozyten.....	38
3.2.5.7.	Anfärben intrazellulärer Zytokine.....	38
3.2.5.8.	Chimären.....	39
3.2.5.9.	<i>In vivo</i> Depletion von CD8 ⁺ T-Lymphozyten.....	39
3.2.5.10.	Adoptivtransfers von Zellen.....	39
4.	ERGEBNISSE	41
4.1.	Deletion von Toso	41
4.2.	T-Zell Aktivierung durch dendritische Zellen	47
4.3.	Toso Expression auf DCs ist notwendig für ein optimales Priming	50
4.3.1.	Funktionelles Priming	57

4.3.2. Toso kontrolliert T-Zell Expansion	68
5. DISKUSSION	79
6. ANHANG.....	91
6.1. Virale Titer der Knochenmarkschimären	91
6.2. Funktionalität von B-Lymphozyten.....	91
6.3. Entwicklung der iDCs in der <i>Toso</i> ^{-/-} Maus	92
6.4. Phagozytose-Kapazität der BMΦ.....	92
6.5. GM-CSF Expression.....	93
6.6. Untersuchung von <i>Toso</i> ^{-/-} BMDCs.....	93
6.7. Zytokinproduktion in BMDCs-T-Zell-Mischkulturen	94
6.8. Virale Titer d4 <i>p.i.</i> in der <i>Toso</i> ^{-/-} Maus.....	94
6.9. Überleben von T-Lymphozyten.....	94
6.10. Aktivierungspotential der <i>TNFR1</i> ^{-/-} BMDCs	95
6.11. Aktivierungsmarker von T-Zellen nach TCR Stimulation.....	96
6.12. Akut virales Infektionsmodell in der <i>sIgM</i> ^{-/-} Maus.....	96
6.13. Sequenzdaten.....	97
7. REFERENZEN.....	99
8. DANKSAGUNG	121
9. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	123
10. LEBENSLAUF	125
11. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	127

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 2.1	Entwicklung dendritischer Zellen der Maus als schematische Übersicht.....	11
Abb. 2.2	Expansion virusspezifischer CD8 ⁺ T-Zellen im akuten Infektionsverlauf.....	19
Abb. 2.3	Putatives Modell des murinen Faim3/Toso-Moleküls.....	22
Abb. 4.1	Naiver Phänotyp der <i>Toso</i> ^{-/-} Maus	42
Abb. 4.2	Das virale Infektionsmodell einer akuten Hepatitis in der <i>Toso</i> ^{-/-} Maus.....	43
Abb. 4.3	Akute Infektion der Knochenmarkschimären	45
Abb. 4.4	Transkriptioneller Nachweis von Toso mRNA.....	46
Abb. 4.5	Untersuchung der <i>CCR2</i> ^{-/-} Maus.....	49
Abb. 4.6	Akute virale Infektion mit LCMV WE in der <i>CCR2</i> ^{-/-} Maus	50
Abb. 4.7	Virusaufnahme und die antivirale IFN α -Produktion in den <i>Toso</i> ^{-/-} Mäusen	51
Abb. 4.8	Entwicklung konventioneller dendritischer Zellen aus dem Knochenmark	52
Abb. 4.9	Die Transkription von GM-CSF und TNF α	53
Abb. 4.10	Entwicklung und Reifung dendritischer Zellen aus dem Knochenmark	54
Abb. 4.11	TNF α Behandlung der ausdifferenzierten BMDCs.....	55
Abb. 4.12	Entwicklung reifer dendritischer Zellen	56
Abb. 4.13	Oberflächenmarker naiver CD8 ⁺ T-Lymphozyten der Milz.....	58
Abb. 4.14	Synaptische Interaktion der T-Lymphozyten mit primenden BMDCs	59
Abb. 4.15	Spezifische Aktivierung der CD8 ⁺ T-Lymphozyten innerhalb der immunologischen Synapse	60
Abb. 4.16	Funktionelles Priming in T-Zell-BMDC-Mischkulturen	62
Abb. 4.17	Zytokinproduktion induziert durch funktionelles Priming in Mischkulturen .	63
Abb. 4.18	Stimulation konventioneller dendritischer Zellen durch aktivierte T-Lymphozyten	64
Abb. 4.19	Aktivierungszustand GP33 gelabelter BMDCs.....	65
Abb. 4.20	Adoptiver Zelltransfer konventioneller BMDCs.....	66
Abb. 4.21	Zytotoxische T-Lymphozyten Antwort.....	67
Abb. 4.22	Zytotoxische T-Lymphozyten Antwort in gemischten Chimären.....	69

Abb. 4.23	Frühe CTL in der <i>Toso</i> ^{-/-} Maus.....	70
Abb. 4.24	Oberflächenexpression von CD69 auf T-Lymphozyten	71
Abb. 4.25	Migrationsverhalten von T-Lymphozyten in lymphatische Organe.....	72
Abb. 4.26	Homöostatische Proliferation in <i>RAG1</i> ^{-/-} Mäusen.....	73
Abb. 4.27	Homöostatisches Verhalten der <i>Toso</i> ^{-/-} T-Lymphozyten.....	74
Abb. 4.28	TCR spezifische Aktivierung der CD8 ⁺ T-Lymphozyten	75
Abb. 4.29	Adoptiver Zelltransfer virusspezifischer <i>Toso</i> ^{-/-} Splenozyten.....	76
Abb. 5.1	<i>In silico</i> Analyse des murinen Toso (mToso)	86
Abb. 5.2	Konservierungsstatus des YXXΦ-Motivs im murinen Toso.....	89
Abb. 6.1.1	Virale Infektion der Knochenmarkschimären	91
Abb. 6.2.1	Bestimmung der Immunglobulinlevels im Serum	91
Abb. 6.3.1	Die Frequenzen inflammatorischer dendritischer Zellen (iDCs).....	92
Abb. 6.4.1	Phagozytose CSFE-gelabelter Listerien.....	92
Abb. 6.5.1	Transkriptioneller Nachweis der GM-CSF Expression.....	93
Abb. 6.6.1	A) Transkriptioneller Nachweis von TNFα-mRNA in BMDCs.....	93
	B) TNFα-Behandlung der BMDCs aus <i>TNFR1</i> ^{-/-} Mäusen	93
	C) TNFα-Konzentration im Serum.....	93
Abb. 6.7.1	Zytokinproduktion in Mischkulturen.....	94
Abb. 6.8.1	Virale Replikation in peripheren Organen	94
Abb. 6.9.1	Überleben von T-Lymphozyten in T-Zell-BMDC Mischkulturen	94
Abb.6.10.1	Aktivierungspotential der <i>TNFR1</i> ^{-/-} BMDCs.....	95
Abb.6.10.2	Untersuchung der in der Mischkultur produzierten Zytokine	95
Abb.6.11.1	Oberflächenexpression von Aktivierungsmarkern der CD8 ⁺ T-Lymphozyten nach einer TCR-Stimulation	96
Abb.6.12.1	Akut virales Infektionsmodell in der <i>sIgM</i> ^{-/-} Maus.....	96
Abb.6.13.1	<i>In silico</i> Analyse von Toso	97

1. ZUSAMMENFASSUNG

Die virale Hepatitis stellt mit 500 Millionen infizierter Individuen eines der größten globalen Gesundheitsprobleme dar. Ein besseres Verständnis der Vorgänge, die zur Generierung einer potenten antiviralen Immunantwort führen, steht im Zentrum der heutigen Forschung.

Die Eliminierung des Virus ist essentiell von der Aktivierung der zytotoxischen T-Zell-Antwort abhängig und ist ein vielseitiger Prozess immunologischer Mechanismen. Die Erforschung der Interaktion zwischen den Antigen-präsentierenden Zellen und den T-Lymphozyten könnte somit Vakzinierungsstrategien weiterentwickeln und die medikamentöse Behandlung von Hepatitis verbessern.

Das Fas apoptotic inhibitory molecule 3 (Faim3/Toso) ist ein seit 1998 bekanntes Typ I Transmembranprotein, dessen funktionelle Wirkung seither kontrovers diskutiert wird. Zunächst als anti-apoptotisch im TNFR- und FasR-Signalweg wirkend beschrieben, konnte in einigen Untersuchungen die Funktion von Toso als ein exklusiver Rezeptor für IgM gezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung des Proteins während einer akuten viralen Infektion mit dem nicht zytopathischen lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) anhand einer totalen Deletionsmutante im Hinblick auf die interaktiven Vorgänge zwischen Antigen-präsentierenden dendritischen Zellen und T-Lymphozyten untersucht.

Das Fehlen von Toso resultiert in einer verminderten zytotoxischen T-Zell-Antwort und folglich in einer verzögerten Viruskontrolle. Im Rahmen dieser Studie konnte die Relevanz von Toso sowohl auf T-Lymphozyten als auch auf dendritischen Zellen gezeigt werden. Die Defizienz des Proteins auf einer oder beiden Zelltypen resultiert stets in verminderter Effektivität der zytotoxischen T-Zell-Antwort. Verursacht durch differentielle Reifung Toso defizienter konventioneller dendritischer Zellen durch frühinflammatorische Zytokine wie TNF α , vermitteln diese T-Lymphozyten kein effizientes, funktionelles Aktivierungssignal sowie vermindertes Überleben. T-Zellen werden auf diesem Wege für eine vorzeitige Kontraktion programmiert. Der fehlende Schutz virusspezifischer T-Lymphozyten vor apoptotischen Vorgängen in der Effektorphase der Infektion resultiert in *Toso*^{-/-} T-Zellen in vorzeitiger Eliminierung und folglich in ineffizienter antiviraler Zellantwort.

Zusammenfassend deuten die präsentierten Daten auf eine essentielle Rolle von Toso in der Regulation der T-Zell-Aktivierung und Generierung einer potenten zytotoxischen Immunantwort während einer viralen Infektion hin.

1. SUMMARY

Viral hepatitis is a major health problem with 500 mio infected individuals worldwide. It is the cause of death of approximately one million people each year. The investigation of mechanisms generating a potent immune response during viral infection is the aim of current research.

The virus clearance is essentially correlated with induction of a potent cytotoxic T cell response and depends on a variety of immunological mechanisms. Better understanding of the interaction between antigen presenting cells (APC) and T lymphocytes could improve vaccination strategies and therapeutic interventions.

Fas apoptotic inhibitory molecule 3 (Faim3/Toso) was first described as a type I transmembrane protein in 1998. The function of Toso is a controversial topic among scientists. Once described as an anti-apoptotic molecule in the TNFR- and FasR-pathways, Toso was also shown to be an exclusive receptor for IgM. In this study the role of Toso was examined during acute viral infection with lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) regarding to the interactive communication between APCs and T cells using *Toso*^{-/-} mice.

The lack of *Toso* results in diminished frequencies of cytotoxic T cells and reduced viral clearance during infection. In this study the high relevance of Toso expression on dendritic cells and T lymphocytes was shown. The deficiency in one or both cell types resulted in each case in diminished efficiency of CD8⁺T cells. *Toso*^{-/-} conventional DCs exhibited a differential maturation capacity after stimulation with early inflammatory cytokines like TNF α and are consequently not able to promote efficient T lymphocyte activation and survival. As a result T cells are determined for too early contraction phase. The lack of anti-apoptotic protection in *Toso*^{-/-} T cells in the effector phase led to early elimination of virus specific T cells and consequently in inefficient T cell response.

In conclusion, this study showed the preferential role of Toso in regulation of T cell priming and induction of an efficient T cell response during viral infection.

2. EINLEITUNG

Hepatitis ist im Allgemeinen ein Begriff, welcher für die Beschreibung einer Leberentzündung verwendet wird. Weltweit sind über 500 Millionen Menschen mit dem Hepatitis Virus infiziert. Eine virale Hepatitis wird vor allem durch die Hepatitis-Viren (HAV, HBV, HCV, HDV und HEV) als auch durch zahlreiche andere Viren wie Epstein Barr Virus (EBV), Varizella-Zoster-Virus (VZV) oder Herpes-Virus hervorgerufen (Al-Hamoudi, 2009; Crum, 2006; Kaufman et al., 1997; Plisek et al., 2011). Neben viralen Infektionen kann Hepatitis bei verschiedenen Stoffwechselerkrankungen, wie der Hämochromatose (Eisenspeicherkrankheit) (Witte et al., 1996) sowie nach einer intensiven Medikamenteneinnahme (Medikamentenhepatitis) (Moling et al., 2006), Alkoholmissbrauch und verschiedenen Autoimmunerkrankungen auftreten (Bruha et al., 2012; Della Corte et al., 2012).

Jährlich sterben weltweit 600.000 Menschen an einer HBV- (WHO, 2008) und 350.000 an einer HCV-Infektion (WHO, 2011) und die Rate für die chronische Hepatitis liegt in der Gesamtbevölkerung bei ca. 10% (WHO, 2011). Allein in Deutschland erkranken trotz der verfügbaren Impfstoffe jährlich geschätzte 15.000-30.000 Menschen an Hepatitis B (WHO, 2008), sodass die virale Hepatitis einer der bedeutendsten Erkrankungen darstellt. Die meisten Erkenntnisse über den Verlauf und die Auswirkungen der Krankheit stammen aus klinischen Studien, *in vitro* Untersuchungen sowie murinen Infektionsmodellen mit vergleichbaren Viren, wie dem Maus Hepatitis Virus (MHV) und dem lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV).

2.1. Virale Hepatitis im LCMV-Modell

Als Modell der viralen Hepatitis kann eine murine Infektion mit LCMV verwendet werden (Oldstone et al., 1985). Das seit vielen Jahren genutzte Modell bietet viele Vorteile. Virusinfektionen mit unterschiedlichen Stämmen des LCMV sind in Laboren gut etabliert. In Europa werden im Gegensatz zu den in den USA und Kanada genutzten neurotrophen Stämmen Armstrong und Clone 13 vorwiegend viszerotrophe Stämme WE und DOCILE verwendet. Die Infektion mit WE ruft eine akute Hepatitis hervor, während die DOCILE-Infektion durch eine min. 100-tägige Persistenz ausgezeichnet ist und chronisch verläuft (Ahmed and Oldstone, 1988; Ahmed et al., 1984; Moskophidis et al., 1993).

Lymphozytäre Choriomeningitis-Virus (LCMV)

Das LCMV gehört zu der Familie der *Arenaviridae* und wurde 1934 von Charles Armstrong erstmals beschrieben. Das ambisense Einzelstranggenom beinhaltet zwei negative RNA-Stränge (NS-RNA Viren), von denen das L-Segment von 7,2 kb die Polymerase (200 kDa) und das Z-Protein (11 kDa), während das 3,4 kb große S-Segment das Glykoprotein GPC (75 kDa) sowie das Nukleoprotein NP (63 kDa) codiert (Riviere et al., 1985; Salvato et al., 1989; Salvato and Shimomaye, 1989; Singh et al., 1987). Cotranslational wird im endoplasmatischen Retikulum (ER) des Wirts das ungewöhnlich lange Signalpeptid (SSP₁₋₅₈) abgespalten, jedoch im Gegensatz zu normalen Signalsequenzen nicht verdaut sondern stellt eine wichtige Domäne des Glykoproteins von LCMV dar (Agnihothram et al., 2006; Eichler et al., 2003a; Eichler et al., 2003b; Froeschke et al., 2003; Saunders et al., 2007; York and Nunberg, 2007; York et al., 2004). Untersuchungen am nah verwandten Lassa- (LASV) und Junin-Virus (JUNV) konnten Verständnis für die Funktionalität und die genaue Struktur des GP bei Arenaviren verbessern und ließen aufgrund der hohen Konservierung des SSP einen vergleichbaren Mechanismus bei LCMV vermuten (Froeschke et al., 2003; Schrempp et al., 2007; York and Nunberg, 2007). Das SSP leitet das Restpeptid durch das ER und ist maßgeblich an seiner weiteren Modifikation beteiligt (Agnihothram et al., 2006; Saunders et al., 2007). Außerdem verhilft es dem reifen GP an die Zelloberfläche des Wirts und ist essentiell für die Knospung des Virus und desweiteren an viralen Invasionsmechanismen beteiligt (Agnihothram et al., 2006; Agnihothram et al., 2007; York and Nunberg, 2006, 2007).

Das GPC wird post-translational im ER des Wirts einer massiven N-Glykosylierung an bis zu neun Stellen unterzogen (Wright et al., 1989), welcher eine große Rolle bei der Funktionalität des GP, jedoch auch bei antiviralen Wirtsmechanismen zugesprochen wird (Bonhomme et al., 2011; Oxsenbein et al., 1999). Im Post-Golgi-Komplex wird das GPC₅₉₋₄₉₈ von der Subtilase SKI-1/S1P an der -RRLL-Schnittstelle (AS₂₆₂₋₂₆₅) gespalten (Beyer et al., 2003; Kunz et al., 2003; Lenz et al., 2001; Wright et al., 1990). Gezielte Mutagenese der Schnittstelle konnte zeigen, dass das Arginin R₂₆₃ ebenso durch ein Lysin (K) oder ein Histidin (H) ausgetauscht werden kann, sowie das Leucin L₂₆₅ durch ein Alanin (A), Serin (S), Threonin (T) oder ein Phenylalanin (F) funktional ersetzt werden kann (Beyer et al., 2003). Das N-terminale peripher befindliche GP1 (AS₅₉₋₂₆₅) von 40-44 kDa und das C-terminale transmembrane GP2 (AS₂₆₆₋₄₉₈) von 35 kDa bilden durch die Assemblierung von Homotetrameren die dornartigen Fortsätze des Viruscapsids (Beyer et al., 2003; Southern et al., 1987; Wright et al., 1990). Dabei bindet der GP1-Komplex nicht kovalent an den GP2-Komplex und wird so als Heterooktamer in die

Plasmamembran der Wirtszelle transportiert (Burns and Buchmeier, 1991; Neuman et al., 2005). Die SSP-Domäne eines jeden GP Heterodimers interagiert nicht kovalent mit dem zytoplasmatischen Bereich des GP2 in der Wirtsmembran, sodass im reifen Viruspartikel sowohl der N- als auch der C-Terminus des SSP in das Capsidinnere reicht (Agnihothram et al., 2006; Agnihothram et al., 2007).

GP1 ist in die Rezeptorbindung involviert und wird zudem vom natürlich vorhandenen IgM erkannt, was ebenfalls eine Internalisierung des Viruspartikels zufolge hat (Burns and Buchmeier, 1991; Ochsenbein et al., 1999; Pinschewer et al., 2004; Wright et al., 1989). Quirin *et al.* konnten zudem zeigen, dass das LCMV nicht nur den Rezeptor-vermittelten Infektionsweg nimmt, sondern auch durch das Eindringen in die Spätendosome die Replikation initiieren kann und dies Cholesterol- und nicht wie in den meisten Fällen Clathrin-abhängig geschieht (Quirin et al., 2008; Rojek et al., 2007; Shah et al., 2006; Vela et al., 2007).

Das NP bildet zusammen mit der genomischen RNA das Nukleocapsid (NC) und ist gemeinsam mit der Polymerase die kleinste infektiöse Einheit, das virale Ribonukleoprotein (RNP), des LCMV (Fuller-Pace and Southern, 1988, 1989; Southern, 1996). Die Bedeutung des 11 kDa großen Z-Proteins ist nicht vollständig verstanden, wird jedoch aufgrund von Untersuchungen im Minigenomsystem regulatorisch im Transkriptionsvorgang vermutet (Cornu and de la Torre, 2001). Zudem wird das Z-Protein als der Gegenpart zum Matrixprotein (M) anderer NS-RNA-Viren, wie Influenza, Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV), Maus-Hepatitis-Virus (MHV), und Masern-Virus (Salvato et al., 1992) gesehen und ist zusammen mit SSP-GP1-GP2-Komplex notwendig für die korrekte Assemblierung und nicht-zytopatische Knospung (*budding*) des LCMV-Viruspartikel (Lee et al., 2002b; Perez et al., 2003; Salvato et al., 1992).

Virale Replikation

Während der Infektion bindet das virale Partikel mittels GP1 an α -Dystroglykan (α -DG), welches auf der Oberfläche der Wirtszelle exprimiert ist (Durbeej et al., 1998). α -DG ist zwar nicht der Alleinige, jedoch als der Hauptinternalisationsrezeptor für LCMV beschrieben (Borrow and Oldstone, 1994; Cao et al., 1998; Kunz et al., 2004a; Reignier et al., 2006; Sevilla et al., 2000; Smelt et al., 2001) und vermittelt ebenso Infektionen mit anderen Arenaviren (Cao et al., 1998; Spiropoulou et al., 2002). Die Expression des α -DG ist ubiquitär nachgewiesen worden (Durbeej et al., 1998). Die Bindung an α -DG ist zudem mit der Viruspersistenz und dem Exhaustionverhalten der zytotoxischen T-Lymphozyten

(*cytotoxic t lymphocytes*, CTL) in Verbindung gebracht worden und gilt als einer der Quellen des viralen Trophismus des LCMV (Cao et al., 1998; Sevilla et al., 2000; Smelt et al., 2001). Untersuchungen zeigten, dass eine starke Bindung des Virus an α -DG mit einer präferentiellen Viruspersistenz in der weißen Pulpa der Milz, im Speziellen in den dort befindlichen DCs (90%), mit einer suppressiven CTL-Antwort korreliert, wohingegen Infektionen mit Virusstämmen mit nur schwacher Bindungsaffinität an α -DG nur bedingt DCs infizieren (<10%), in der roten Pulpa replizieren und geklärt werden können (Evans et al., 1994; Kunz et al., 2004b; Sevilla et al., 2000; Smelt et al., 2001). Die Bindungsaffinität wird über die Positionen AS₂₅₉₋₂₆₀ im GP1 vermutet vermittelt zu werden und unterscheidet sich zwischen den verschiedenen Virusstämmen (Matloubian et al., 1990; Salvato et al., 1991; Salvato et al., 1988). Anschließend an die Rezeptorbindung wird das Virion von einem Vesikel umhüllt und in die Wirtszelle aufgenommen. Dieser Vorgang ist nicht Clathrin-abhängig, jedoch im Einzelnen nicht aufgeklärt (Borrow and Oldstone, 1994; Quirin et al., 2008). Die Verschmelzung mit dem Lysosom erniedrigt den pH-Wert und aktiviert somit das LCMV-Virion (Di Simone and Buchmeier, 1995; Di Simone et al., 1994; York et al., 2008). Die darauf folgende Konformationsänderung des GP-Komplexes ermöglicht die Egression des RNP ins Zytoplasma und ist entscheidend von SSP abhängig, welches zur Initialporenbildung führt und die Plasmamembran des Lysosoms aufbricht (Di Simone and Buchmeier, 1995; Di Simone et al., 1994; Saunders et al., 2007; York and Nunberg, 2006).

Die Replikation des LCMV-Genoms erfolgt über eine antigenomische RNA, wobei die Polymerase und das NP direkt vom Genom translatiert werden können, während das GPC und Z-Protein erst über die antigenomische Matrize gelesen werden (Fuller-Pace and Southern, 1988; Perez and de la Torre, 2003; Pinschewer et al., 2003). Als Terminationssignal fungiert die IGR-Sequenz, welche sich zwischen beiden Gensequenzen befindet (Meyer and Southern, 1994; Pinschewer et al., 2005). Die Entlassung virulenter Partikel erfolgt nicht-zytopatisch durch Knospung. Dabei interagiert das durch eine Myristoylation modifizierte Z-Protein mit dem zytoplasmatischen Teil des in der äußeren Plasmamembran des Wirts befindlichen GP-Komplexes, dem SSP und dem RNP und vermittelt somit die Bildung infektiöser, viraler Partikel vergleichbar mit einer Brückenverbindung (Capul et al., 2007; Perez et al., 2003; Perez et al., 2004; Strecker et al., 2003). Untersuchungen zufolge sind sowohl das Z-Protein als auch die SSP-Untereinheit essentiell für die Knospung und die erfolgreiche Reproduktion des LCMV (Agnihotram et al., 2006; Perez et al., 2003; Strecker et al., 2003).

Antivirale Wirtsmechanismen

Infektionen mit LCMV verlaufen abhängig vom Stamm und viraler Applikationsdosis unterschiedlich. So ist die Immunodominanz bestimmter Peptide während der Infektion von der Viruslast abhängig (Probst et al., 2003). Im akuten Infektionsmodell ist das auf MHC I präsentierte GP₃₃₋₄₁ immunodominant, bei niedrigeren Dosen jedoch das NP₃₉₆₋₄₀₄. Replikation stark persistierender Stämme wie Clone 13 und DOCILE wurden mit verschiedener Effizienz ablaufend beobachtet und hängen enorm mit den antiviralen Mechanismen der Wirtszelle zusammen. Ein besseres Verständnis dieser Vorgänge ist das Ziel heutiger Forschung und soll bei der Entwicklung neuer Medikamente helfen.

Die erste immunologische Barriere für das Virus stellen die gewebeständigen Makrophagen, die in fast jedem Organ vertreten sind (Hume and Gordon, 1983; Hume et al., 1983). Diese sind effektive phagozytierende Zellen und besitzen eine ganze Reihe von Antigen erkennenden Rezeptoren, wie PRR, TLR, FcR und können zudem Gewebe und Blutstrom erfolgreich über das Komplementsystem filtern (Mevorach et al., 1998). Untersuchungen konnten zeigen, dass die Aufnahme viraler Partikel essentiell von Makrophagen der Marginalzone (MZM), den metallophilen Makrophagen (MM), und den Kupffer-Zellen, den Makrophagen der Leber, abhängt (Aichele et al., 2003; Honke et al., 2012; Lang et al., 2010). Durch die Ausschüttung inflammatorischer Zytokine wie TNF α , IL-1 und IL-6 verlinken die Makrophagen Bestandteile des angeborenen Immunsystems wie NK-Zellen, Monozyten und Antigen präsentierende Zellen (APC) wie die dendritische Zellen. Zudem konnte einigen dieser Zytokine eine antivirale Wirkung nachgewiesen werden (Mestan et al., 1986; Wong and Goeddel, 1986). Die entstehende antivirale Immunantwort ist anfangs nicht-zytolytisch und erfolgt sowohl autokrin als auch parakrin über Typ I Interferone (IFN α/β) (Marie et al., 1998). Die Hauptproduzenten von IFN α/β während einer viralen Infektion sind plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs) (Asselin-Paturel et al., 2001; Cella et al., 1999a; Gary-Gouy et al., 2002). Die antivirale Wirkung der Interferone wird direkt über die Induktion der Genexpression von Abwehrproteinen in infizierten Zellen und indirekt über die Rekrutierung von Monozyten, welche sich unter dem Einfluss des Zytokins vermehrt zu inflammatorischen dendritischen Zellen (iDCs) entwickeln, vermittelt (Cella et al., 1999a; Siegal et al., 1999). Ferner induziert IFN α das Einwandern von Lymphozyten in die T-Zell-Areale lymphatischer Organe und initiiert somit den Prozess des Homings (Shiow et al., 2006). Untersuchungen zeigten, dass vor allem pDCs große Mengen an Typ I Interferon auf die Stimulation mit viralen Antigenen oder analogen Stimuli wie PolyI:C und CpG produzieren, sodass der IFN α Spiegel in den ersten 24 h nach einer akuten Infektion seinen Peak erreicht (Grundy et al., 1982; Krug et

al., 2004; Scheu et al., 2008). Die Notwendigkeit der nicht-zytolytischen Antiviralmechanismen zeigt sich nach Depletion der Makrophagen mit Clodronat oder in Infektionsmodellen mit $\text{IFN}\alpha\text{R1}^{-/-}$ Mäusen (Lang et al., 2010). Wird das Virus nicht über die Makrophagen kontrolliert, setzen massive Persistenzmechanismen bis hin zur Immunsuppression durch die Infektion der DCs in der weißen Pulpa ein und resultieren in einer fehlenden CTL-Antwort.

2.2. Dendritische Zellen

Entwicklung dendritischer Zellen

Die dendritischen Zellen (DCs) stellen zwar nicht die einzigen, jedoch die wichtigsten Antigen präsentierenden Zellen dar und werden als die wirkungsvollste Verbindung zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem gesehen. Durch die Aufnahme von Pathogenen, Prozessierung und Präsentation von Fremdproteinen sowie Produktion zahlreicher Zytokine kanalisieren die dendritischen Zellen das Immunsystem und sind für die Aktivierung von T-Lymphozyten ebenso essentiell wie für die Induktion zentraler und peripherer Toleranz.

Seit der Entdeckung der Zellen 1973 zeigten zahlreiche Untersuchungen, dass es verschiedene Populationen von DCs gibt, deren Funktion ebenso wie die zelluläre Herkunft unterschiedlich ist (Steinman and Cohn, 1973). Die sogenannten konventionellen DCs (cDCs) trennt man in der Literatur in lymphoide und myeloide DCs entsprechend ihrer Herkunft. Lymphoide dendritische Zellen entwickeln sich aus einer früh abspaltenden Population der hämatopoetischen Stammzellen (HSC), den lymphoiden Progenitorzellen (CLP, *common lymphoid progenitor*) (*Abbildung 2.1*). Adoptive Transfers der lymphoiden Progenitoren in bestrahlte Tiere zeigten eine Rekonstitution der T- und B-Lymphozyten, NK-Zellen sowie die Entwicklung von $\text{CD8}\alpha^+$ cDCs, jedoch keine Rekonstitution myeloider Zelllinien wie den Makrophagen oder Granulozyten (Wu et al., 1996). Dieser autarke Entwicklungspfad gilt als die Herkunft von $\text{CD8}\alpha^+$ cDCs, welche die dominierende Zellpopulation im Thymus und Lymphknoten stellen (Liu et al., 2007; Shortman et al., 1998; Vremec and Shortman, 1997; Vremec et al., 1992).

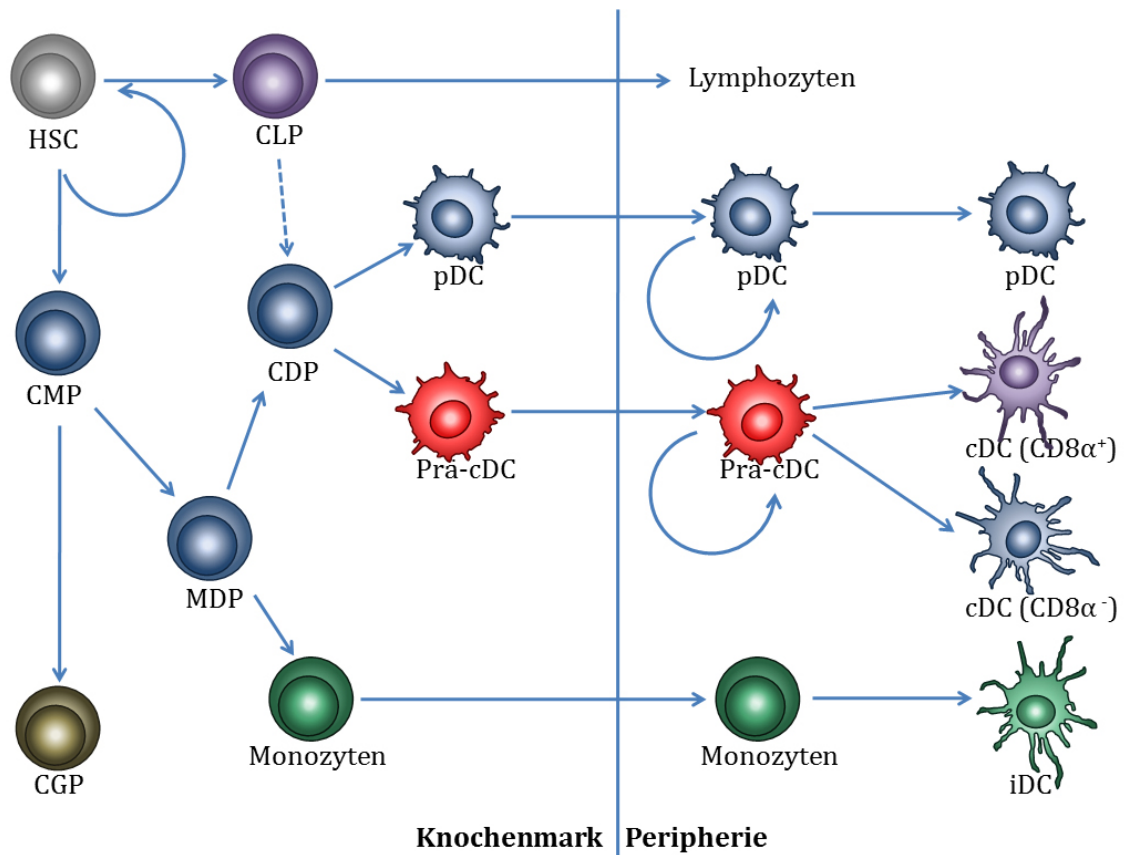


Abbildung 2.1.: Entwicklung dendritischer Zellen der Maus als schematische Übersicht. Im Knochenmark der Tiere werden aus der hämatopoetischen Stammzelle (HSC) die lymphoiden (*common lymphoid progenitor*, CLP) sowie die myeloiden (*common myeloid progenitor*, CMP) Vorläuferzellen generiert. Die CLPs differenzieren Lymphozyten-Progenitoren sowie die lymphoiden Vorläufer dendritischer Zellen aus (*common dendritic cell progenitor*, CDPs), die durch die Expression von CD8 α gekennzeichnet sind. Die CMPs spalten frühzeitig die Entstehungspopulation der Granulozyten, die CGPs (*common granulocyte progenitor*) ab. Zudem entwickeln sich aus den CMPs die Vorläuferzellen der Makrophagen und myeloiden dendritischen Zellen, die MDPs (*common macrophage/dendritic cell progenitor*). Diese differenzieren sich noch im Knochenmark zu Monozyten (Ly6C⁺ und Ly6C⁻), welche in die Peripherie auswandern und Progenitoren myeloider DCs, CDPs ausbilden. Die myeloiden CDPs exprimieren kein CD8 α , sind jedoch CD11b⁺. Sowohl lymphoide CDPs als auch myeloide CDPs differenzieren sich im Knochenmark zu plasmazytoiden (pDCs) sowie zu Vorläufern konventioneller, dendritischer Zellen (Prä-cDCs). Als Prä-DCs und pDCs emigrieren diese in die Peripherie und werden über einen homöostatischen Druck kontrolliert. Aus den Monozyten entwickeln sich während einer Infektion inflammatorischen DCs (iDCs) wie die TNF α und iNOS produzierende DCs (TipDCs).

In der Milz findet man neben den lymphoiden CD8 α^+ cDCs auch eine CD8 α^- DC-Population, welche gegenwärtigen Modellen zufolge aus den myeloiden Vorläufern (CMP, *common myeloid progenitor*) stammt. Aus dieser Zellpopulation entwickeln sich im Knochenmark die Quelle der Granulozyten über die CGPs (*common granulocyte progenitor*) sowie die Vorläufer von DCs und Makrophagen, die MDPs (*macrophage/DC progenitors*). Noch im Knochenmark differenzieren sich aus den MDPs unter dem vermuteten Einfluss wage beschriebener Faktoren über CDPs (*common dendritic progenitor*) die plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs) und PräDCs, die in die Peripherie auswandern. Adoptive Zelltransfers konnten zeigen, dass die MDPs sowohl dendritische Zellen als auch

Monozyten hervorbringen, während der Transfer von CDPs ausschließlich in der Differenzierung von cDCs und pDCs resultiert (Liu et al., 2009). Die Entwicklung beider DC-Populationen findet nachweislich im Knochenmark statt und gilt ebenso für die Entwicklung der lymphoiden CDPs, welche CD8 α ⁺pDCs und CD8 α ⁺cDCs hervorbringen. Erst im weiteren Differenzierungsstadium emigrieren die pDCs sowie die PräDCs in die lymphatischen Organe und entwickeln sich dort rasch unter dem Einfluss von Flt3L und T_{reg}S zu DCs (Liu et al., 2009; Pulendran et al., 1997; Waskow et al., 2008). Flt3/Flt3L defiziente Mäuse zeigen eine eindeutige Reduktion an cDCs und pDCs, während die Frequenzen der MDPs sowie PräDCs nicht verändert scheinen (McKenna et al., 2000; Waskow et al., 2008). So wird vermutet, dass die Homöostase dendritischer Zellen in den peripheren lymphatischen Organen durch die Zytokinlevel von Flt3L, LT α und GM-CSF kontrolliert wird (Kabashima et al., 2005; Liu et al., 2009). Untersuchungen konnten zudem zeigen, dass die Behandlung mit Flt3L *in vivo* große Mengen an myeloiden und lymphoiden DCs in den lymphatischen Organen induzieren konnte, wohingegen die Substitution mit GM-CSF präferentiell DCs myeloiden Ursprungs hervorbrachte (Brasel et al., 1997; Brasel et al., 1996; Karsunky et al., 2003; Maraskovsky et al., 1996; Pulendran et al., 1997; Pulendran et al., 1999; Shurin et al., 1997; Waskow et al., 2008).

Die pDCs stellen eine besondere Population der DCs, sind langlebig und ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunität (O'Keeffe et al., 2002). Neben der beschriebenen Fähigkeit T-Lymphozyten Antigene zu präsentieren (Asselin-Paturel et al., 2001; Hoeffel et al., 2007) sind sie die Hauptproduzenten der Typ I Interferone (IFN α / β) und liefern die erste nicht-zytolytische antivirale Antwort (Cella et al., 1999a; Cervantes-Barragan et al., 2007). Damit nehmen die pDCs stimulierenden Einfluss auf die Entwicklung und Reifung inflammatorischer DCs (iDCs) und sind in die Aktivierung von T-Lymphozyten involviert (Le Bon et al., 2006a; Le Bon et al., 2003; Le Bon et al., 2006b; Shioh et al., 2006). Zudem besitzen diese im Vergleich zu reifen cDCs eine höhere durch IFN γ und CpG induzierbare Kapazität zur Produktion der Chemokine CCL3/4, welche die Chemotaxis nicht maturierter DCs positiv beeinflusst (Proietto et al., 2004).

Die inflammatorischen dendritischen Zellen entwickeln sich aus CD115⁺Ly6C^{hi}CCR2⁺ Monozyten, die unter dem Einfluss von CCL2 während einer Infektion vermehrt in die Peripherie auswandern und sich dort Interferon-abhängig differenzieren (Cella et al., 1999a; Randolph et al., 1999; Siegal et al., 1999). Die Funktion dieser Zellpopulation ist sehr umstritten und stellt einen wichtigen Bereich der aktuellen Forschung. Untersuchungen zeigten, dass iDCs in der Lage sind als APC zu agieren und erfolgreich T-Lymphozyten zu aktivieren (Aldridge et al., 2009; Geissmann et al., 2003). Eine

gesonderte Population der iDCs stellt die wichtigen Produzenten von TNF α und iNOS die sogenannten Tip-DCs dar (Aldridge et al., 2009; Bosschaerts et al., 2010; Serbina et al., 2003).

Bedeutung der DCs für die Infektion

Die Hauptaufgabe dendritischer Zellen ist die Aufnahme und Prozessierung von Pathogenen sowie die anschließende Präsentation von Antigenen (Ag) mit der resultierenden klonalen Expansion spezifischer Lymphozyten. Untersuchungen konnten zeigen, dass die zirkulierenden DCs in einem nicht maturierten Zustand in der Peripherie verbleiben (Henri et al., 2001; Inaba et al., 1994; Leenen et al., 1998; O'Keeffe et al., 2003), jedoch eine enorme Aufnahmekapazität für Antigene aufweisen (Hawiger et al., 2001; Sallusto et al., 1995). Neben der niedrigen Oberflächendichte an kostimulatorischen Markern wie CD80/86 (B7.1/B7.2), CD40, OX-40L (Henri et al., 2001; Inaba et al., 1994; Lee et al., 1993; Leenen et al., 1998) und einer hohen intrazellulären Konzentration an in Kompartimenten akkumulierten MHC II-Molekülen (MIIC) (Kleijmeer et al., 1995; Mommaas et al., 1995; Nijman et al., 1995), zeigen nicht maturierte DCs keine Fähigkeit zur T-Lymphozyten Aktivierung. Diese wurden im Gegenteil sogar beobachtet T-Zellen anergisch zu stimulieren und periphere Toleranz zu induzieren (Hawiger et al., 2001; Inaba et al., 1998). Viele Oberflächenmoleküle wie TLRs, CD40, TNFR, IL1R und IL10R wurden bereits mit der Reifung der DCs bzw. Hemmung dieser in Verbindung gebracht (Bennett et al., 1998b; Buelens et al., 1997; Caux et al., 1994; Koppelman et al., 1997; Sallusto et al., 1995). Der Prozess ist kontinuierlich und beginnt mit der Stimulation durch z.B. LPS, bakterielle DNA, dsRNA (Cella et al., 1999b; Hartmann et al., 1999; Verdijk et al., 1999) sowie inflammatorische Zytokine (Jonuleit et al., 1997) über die entsprechenden Rezeptoren und endet durch den direkten Kontakt zu T-Zellen in lymphatischen Organen (Schoorhuis et al., 2000). Ist ein Antigen aufgenommen, so wandelt sich die Ag aufnehmende zur Ag präsentierenden Zelle und wandert unter der CCL19/21 vermittelten Chemotaxis in die T-Zell Areale der Lymphknoten und der Milz (Dieu et al., 1998; MartIn-Fonoteca et al., 2003). Die reifen DCs verlieren die Fähigkeit zur Ag-Aufnahme und verändern ihre Morphologie (Garrett et al., 2000; West et al., 2000). Die kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86, CD40, CD58 werden auf der Zelloberfläche ebenso heraufreguliert wie MHC I und II, deren durchschnittliche Erneuerungsrate gestoppt wird (turn over) (Cella et al., 1997; Cella et al., 1999b). Der Prozess dauert Beobachtungen zufolge nur 36 h (O'Keeffe et al., 2003). In den lymphatischen Organen angekommen, empfangen die DCs seitens der Lymphozyten ein zusätzliches,

aktivierendes Signal über CD40L, RANK, 4-1BB oder OX40L (Bennett et al., 1998b; Schoenberger et al., 1998). Nach aktuellen Modellen gilt dieses Signal als eine Art Lizenzierung der DCs weitere Lymphozyten zu aktivieren (Bennett et al., 1998b; Ridge et al., 1998). Dabei sind die DCs nicht permanent auf die Präsenz der Stimulation angewiesen, sondern behalten den Zustand durch die temporäre Expression weiterer Oberflächenmoleküle bei. Die nun voll ausgereiften und aktivierten DCs können naive T-Lymphozyten aktivieren und eine inflammatorische Zytokinantwort liefern.

Die Bedeutung der CD11c⁺ Zellen für die klonale Expansion spezifischer T-Zellen und letztlich Viruskontrolle wurde unter anderem in CD11c-DTR Ablationsmodellen gezeigt (Jung et al., 2002; Probst et al., 2005; Probst and van den Broek, 2005). So ist die Virusaufnahme und initiale Viruskontrolle, welche nachweislich mit der intakten Milzarchitektur und zellulären Funktionalität der Marginalzone zusammenhängt (Oehen et al., 2002), in diesen Tieren nicht beeinträchtigt. Die Expansion und Generierung der CTL-Antwort bleibt jedoch aus. Besteht während einer viralen Infektion kein ausreichender Link zum adaptiven Immunsystem, so endet die Infektion in einer stetigen Viruspersistenz und vor allem bei zytopathischen Viren folglich im letalen Ausgang (Honke et al., 2012). Als Agonisten nehmen die DCs einen regulatorischen Einfluss auf die Entwicklung der T-Zell-Antwort und sind somit essentiell für die virale Kontrolle. Untersuchungen persistierender Virusstämme konnten zeigen, dass eine effizientere Bindung an α -DG vermehrte Virusreplikation zufolge hat und in einer supprimierten zytotoxischen T-Zell-Antwort resultiert (Sevilla et al., 2003; Smelt et al., 2001). So ist die Masse (90%) der DCs bei einer Infektion mit dem persistierenden Stamm des LCMV Clone 13 infiziert und endet in der Eliminierung dendritischer Zellen und der fehlenden CTL-Antwort. Eine Infektion mit Armstrong dagegen führt zur Invasion von annähernd einem Zehntel der DCs und kann durch die Ag-Präsentation und die Induktion der CTL geklärt werden (Smelt, 2003). Welche Subpopulation dendritischer Zellen die T-Zell-Aktivierung *in vivo* vornimmt, ist jedoch nicht geklärt. Untersuchungen sprachen diese Fähigkeit sowohl lymphoiden als auch myeloiden DCs zu, wenn auch Untersuchungssystem-abhängig im unterschiedlichen Maße (Kronin et al., 1996; Suss and Shortman, 1996). Dies gilt auch für die pDCs und die sich aus Monozyten während einer Inflammation entwickelnden iDCs (Asselin-Paturel et al., 2001; Geissmann et al., 2003; Hoeffel et al., 2007).

2.3. T-Lymphozyten

Die Korrelation zwischen einer intakten zytotoxischen T-Zellantwort (CTL-Antwort, *cytotoxic T lymphocytes*) und viraler Kontrolle wurde von zahlreichen Arbeitsgruppen untersucht. Die Entwicklung der spezifischen CD8⁺ adaptiven Antwort ist essentiell für die Viruskontrolle und wurde bereits für humane (HBV, HCV) und murine Hepatitis Viren (z.B. LCMV) gezeigt (Byrne and Oldstone, 1984; Doherty and Zinkernagel, 1975; Thimme et al., 2001; Thimme et al., 2003; Zinkernagel and Welsh, 1976). Depletionen der CD8⁺T-Lymphozyten resultieren in viraler Persistenz und massivem Leberschaden durch virale Invasion (Cooper et al., 1999; Ferrari et al., 1990; Matloubian et al., 1994; Rehmann et al., 1995; Sobao et al., 2002; Zajac et al., 2003). Eine potente zytotoxische Immunabwehr resultiert jedoch temporal im partiellen Leberschaden und bestimmt die Immunpathologie der Erkrankung (Thimme et al., 2003; Zinkernagel and Doherty, 1973; Zinkernagel et al., 1986), welche durch die Aktivitätsbestimmung hepatischer Transaminasen (z.B. ALT, Alanin-Aminotransferase) im Blut der Patienten bestimmt werden kann (Cooper et al., 1999; Thimme et al., 2002; Thimme et al., 2001). Die Depletion von CD4⁺T-Zellen hat keinen Effekt auf die CTL im akuten Infektionsmodell, jedoch vermindert diese bei Infektionen mit persistierenden Stämmen des LCMV wie Clone 13 und DOCILE (Fung-Leung et al., 1991; Matloubian et al., 1994; Rahemtulla et al., 1991; Thimme et al., 2003). Interessanterweise kann eine niedrige virale Last eines nicht persistierenden Virusstammes auch ohne massive Leberpathologie weitestgehend sowohl CD8⁺T-Zell abhängig als auch unabhängig kontrolliert werden und wird durch die nicht-zytotoxische Immunabwehr über Typ I (IFN α/β) und Typ II Interferone (IFN γ) vermittelt (Frese et al., 2002; Guidotti et al., 1994; Guidotti and Chisari, 2000; Lanford et al., 2003; Thimme et al., 2002). Als Interferonproduzenten werden diesem Fall sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺T-Lymphozyten sowie die DCs, NK und NKT-Zellen gesehen (Franco et al., 1997; Guidotti et al., 1994; Guidotti et al., 1996; Guidotti and Chisari, 2000; Kakimi et al., 2000).

Entwicklung der CTL

In einem akuten Infektionsmodell mit LCMV werden unter dem Einfluss frühinflammatorischer Zytokine wie TNF α und Typ I IFN die sonst in der Peripherie zirkulierenden und stets die lymphatischen Organe passierenden T-Lymphozyten einem so bezeichneten Prozess des „*homing*“ unterzogen (Shiow et al., 2006). Dieser erfolgt durch die Minimierung ihrer Wanderungsgeschwindigkeit (*shutdown*), Heraufregulation

von Adhensionsmolekülen wie ICAM, CD62L, CD69, welche die Kontaktaufnahme mit dem Endothelium ermöglichen (*rolling*), gefolgt von einer stabilen Bindung zum Endothel sowie dem Eintritt in die lymphatischen Gewebe (*transmigration*) (Shiow et al., 2006). Studien mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie konnten zeigen, dass während der folgenden 48 h nach Eintritt in die lymphatischen Organe die naiven T-Zellen in drei Schritten aktiviert werden (Hugues et al., 2004; Mempel et al., 2004; Miller et al., 2004). Die durch die Maturierung dendritischer Zellen hohe Oberflächendichte an Ag präsentierenden Molekülen MHC I und II erlaubt es den eingewanderten T-Zellen die Antigene abzutasten und nach der Spezifität zu prüfen. In der ersten Phase des Primings, während der ersten 8 h nach dem Eintritt, tasten die T-Zellen durch vielfache Kurzkontakte mit DCs nach spezifischen Ag, was ihre Wanderungsgeschwindigkeit enorm reduziert und ihre Oberflächenmarker CD44 und CD69 hochreguliert. Isolierte T-Zellen aus diesem Abschnitt der Aktivierung zeigten jedoch keine intrazelluläre Produktion von IL-2 oder IFN γ .

Spätestens nach dem Ablauf der 8 h setzt die zweite Phase des Primings ein. Wird ein entsprechendes Antigen präsentiert, bilden die T-Lymphozyten unter der Einwirkung unterschiedlicher Adhensionsmoleküle (CD2, CD50, CD54, CD58, ICAM-1) sowie Integrine $\beta 1/2$ einen stabilen Kontakt zu der APC aus (*supramolecular activation clusters, SMACs*) (Potter et al., 2001; Stoll et al., 2002; Van Seventer et al., 1990). Innerhalb der Kontaktzone, der immunologischen Synapse (*supramolecular activation cluster, SMAC*), werden die T-Lymphozyten über den TCR-MHC I/II sowie dem kostimulatorischen Komplex CD28-CD80/86 aktiviert (Townsend and Allison, 1993; Wetzel et al., 2002). Die Kontaktzone stellt somit ein Dialogfeld zwischen beiden Zellen dar. Während die T-Lymphozyten über den TCR und CD28 aktiviert werden, leisten diese über auf ihrer Oberfläche exprimierten CD40L eine sogenannte T-Zell-Hilfe. Einige Untersuchungen konnten zeigen, dass die Stimulation der DCs über CD40 eine Maturierung und Zytokinproduktion der DCs sowie zusätzliche Raufregulation der kostimulatorischen Moleküle induziert (Bennett et al., 1998b; Caux et al., 1994; Sallusto and Lanzavecchia, 1994; Schoenberger et al., 1998). Heutigen Modellen zufolge stellt die Stimulation der DCs über CD40-CD40L ein Lizenzierungssignal zur vollständigen T-Zell Aktivierung dar (Toes et al., 1998) und involviert auch andere TNF-Familienmitglieder (OX40L-OX40, 4-1BBL-4-1BB) in die DC-T-Zell-Kommunikation, indem diese einen regulatorischen Stellenwert im Aktivierungsprozess einnehmen (DeBenedette et al., 1997). Die zweite bis zu 20 h andauernde Phase des Primings ist durch die Heraufregulation der Aktivierungsmarker der T-Zellen (CD25, CD44, CD28, CD69) und durch die einsetzende Produktion von IL-2 und IFN γ , jedoch keinerlei Zellteilung gekennzeichnet (Hugues et al., 2004; Mempel et al.,

2004; Miller et al., 2004). Untersuchungen konnten zeigen, dass das Antigen, wenn auch am effektivsten von der DC, auch von anderen Zellen wie den B-Lymphozyten oder Makrophagen präsentiert werden kann (Barker et al., 2002; Chesnut et al., 1982; Macatonia et al., 1992; Toubert and Charron, 1997) und dass das kostimulatorische Signal, welches für das Priming naiver T-Zellen grundlegend ist, nicht zwingend auf derselben Zelle vorhanden sein muss (Bennett et al., 1998b; Ridge et al., 1998; Schoenberger et al., 1998). So wurde bereits eine Ag-Präsentation von Fibroblasten und Endothelzellen beobachtet, wenn eine kostimulierende DC in der Nähe ist. Der alleinige Kontakt zum passenden Ag über den TCR ohne die Stimulation über CD28 kann jedoch zum anergischen Verhalten der T-Zellen führen (Gimmi et al., 1993; Harding et al., 1992). Memory T-Lymphozyten dagegen benötigen keine zusätzliche Stimulation über CD28 und können auf das ausschließliche Signal über den TCR-MHC I/II-Komplex erfolgreich und rapide expandieren (Croft et al., 1994).

Während der dritten Phase, 24-48 h nach Eintritt der Lymphozyten in die lymphatischen Organe, findet eine Dissoziation der T-Zellen von den APCs statt. Die Lymphozyten erlangen ihre Wanderungsgeschwindigkeit wieder, beginnen enorm zu proliferieren und emigrieren in den Blutfluss. War das Abtasten der DCs nicht erfolgreich, verweilen die T-Lymphozyten bis zu 20 h in den lymphatischen Organen ohne signifikante Veränderungen der Oberflächemarker oder Zytokinproduktion und verlassen daraufhin diese ohne zu proliferieren (Mempel et al., 2004). Untersuchungen konnten zeigen, dass der Primingprozess für die Aktivierung der CD8⁺T-Zellen mit dem der CD4⁺T-Zellen vergleichbar verläuft (Hugues et al., 2004; Mempel et al., 2004; Miller et al., 2004). Zudem ist ein Mehrfachkontakt zu einer DC beobachtet worden, dessen Bedeutung nicht geklärt ist, jedoch regulatorisch vermutet wird (Mempel et al., 2004).

Die Verfügbarkeit der reifen und aktivierten DCs, das präsentierte Ag sowie die Anzahl der zirkulierenden dafür spezifischen Lymphozytenklone stellen die limitierenden Faktoren der Immunantwort. Eine verbesserte Expansion spezifischer T-Zellen konnte bereits durch die induzierte Zunahme dendritischer Zellen in der Peripherie durch Flt3L (Pulendran et al., 1998) sowie durch Adoptivtransfers unterschiedlicher Zellmengen an DCs gelabelt mit differentiellen Ag-Konzentrationen gezeigt werden (Ludewig et al., 1998). Wird die T-Zell-Aktivierung mit nicht aktivierten DCs vorgenommen, führt dies zur peripheren Toleranz und folglich zu nicht intakter CTL-Antwort (Hawiger et al., 2001). Eine exzessive Ag Präsentation maturierter oder überaktivierter DCs führt zudem zur Eliminierung der DCs und ist in der Lage T-Zell-Exhaustion auszulösen.

Lymphozytenpool

Der naive Lymphozytenpool wird durch die Lymphozytenhomeostase streng kontrolliert. Untersuchungen konnten zeigen, dass der periphere Pool an B- und T-Lymphozyten unterschiedlich und voneinander unabhängig reguliert wird (Kitamura et al., 1991). Reife naive T-Lymphozyten verlassen den Thymus nach negativen und anschließend positiven Selektionsvorgängen und werden in der Peripherie durch die Kontakte zu MHC-Molekülen und Zytokinlevel über ihre Lebenszeitspanne und über die Produktionsrate im Thymus reguliert (Berzins et al., 1998; Chu et al., 2004; Sportes et al., 2008). Studien konnten zeigen, dass IL-7 eines der wichtigsten Zytokine für die Regulation der peripheren naiven Lymphozytenmenge ist (Bender et al., 1999; Ernst et al., 1999; Tan et al., 2001; Tan et al., 2002), welche über das Homing in die Lymphknoten vermittelt wird (Schuster et al., 2009). Die Regulation des Memory-T-Zell-Pools ist dagegen neben IL-7 auch von IL-15 abhängig (Kennedy et al., 2000; Ku et al., 2000; Lodolce et al., 1998; Zhang et al., 1998) und konnte bereits durch Substitutionen der Zytokine modifiziert werden (Nanjappa et al., 2008).

Während einer akuten Infektion expandieren spezifisch aktivierte T-Zellen beim Kontakt zum Fremdantigen aus dem naiven Lymphozytenpool in der Effektorphase der Infektion (*Abbildung 2.2*). Das erst in der Milz und anschließend auch in der Leber persistierende Virus erreicht den Peak der viralen Last im akuten Infektionsmodell um d6 *p.i.* und korreliert mit der Expansion spezifischer CD8⁺T-Zellen (d6-d12 *p.i.*) (Moskophidis et al., 1987) und der zunehmenden Immunpathologie (d8-d12 *p.i.*) (Thimme et al., 2003; Zinkernagel et al., 1986). Die effCD8⁺T-Zellen kontrollieren das Virus und werden anschließend in der Kontraktionsphase der CTL-Antwort apoptotisch eliminiert (Ahmed and Gray, 1996; Pellegrini et al., 2003). Ein geringer Prozentsatz der CTL entwickelt sich zu Memory-T-Lymphozyten und verbleibt in der Peripherie (Jacob and Baltimore, 1999; Kaech and Ahmed, 2001; Murali-Krishna et al., 1998; Opferman et al., 1999).

In Gegensatz zu naiven CD8⁺T-Zellen, welche IL7R^{hi}IL15R^{lo}IL2R⁻ sind (Goldrath et al., 2002; Maraskovsky et al., 1996; Schluns et al., 2002; Vella et al., 1997), regulieren die Effektor T-Zellen (effCD8⁺) während des Primings den IL2R hoch und IL7R herunter (IL7R^{lo}IL15R^{hi}IL2R^{hi}) (Lang et al., 2005). Ist die Effektorphase der akuten Infektion vorbei, reguliert eine kleine Population der effCD8⁺ T-Zellen den IL7R wieder hoch und einwickelt sich zu IL7R^{hi}IL15R^{hi}IL2R^{lo} Memory-T-Zellen (memCD8⁺), deren Homöostase jedoch abhängig vom allgemeinen T-Lymphozytenpool ist (Kaech et al., 2002; Kaech et al., 2003; Ku et al., 2000; Schluns et al., 2002). Faktoren, die die Entscheidung der Entwicklung von

effCD8⁺T-Zellen zu memCD8⁺T-Zellen (IL7R^{hi}IL15R^{hi}IL2R^{lo/-}) vornehmen sind im Einzelnen nicht aufgeklärt. Untersuchungen konnten jedoch zeigen, dass eine Substitution mit IL-7 während der Effektorphase keinen Zuwachs an memCD8⁺T-Zellen bewirken konnte, eine spätere Zugabe aber die Frequenz an funktionellen Memory-T-Zellen erhöhen konnte (Nanjappa et al., 2008). Eine Substitution mit IL-15 konnte ebenfalls die Frequenz kontrahierender CD8⁺T-Zellen mindern (Yajima et al., 2006). Die restliche Population der effCD8⁺T-Zellen (IL7R^{lo}IL15R^{hi}IL2R^{lo}) wird apoptotisch eliminiert.

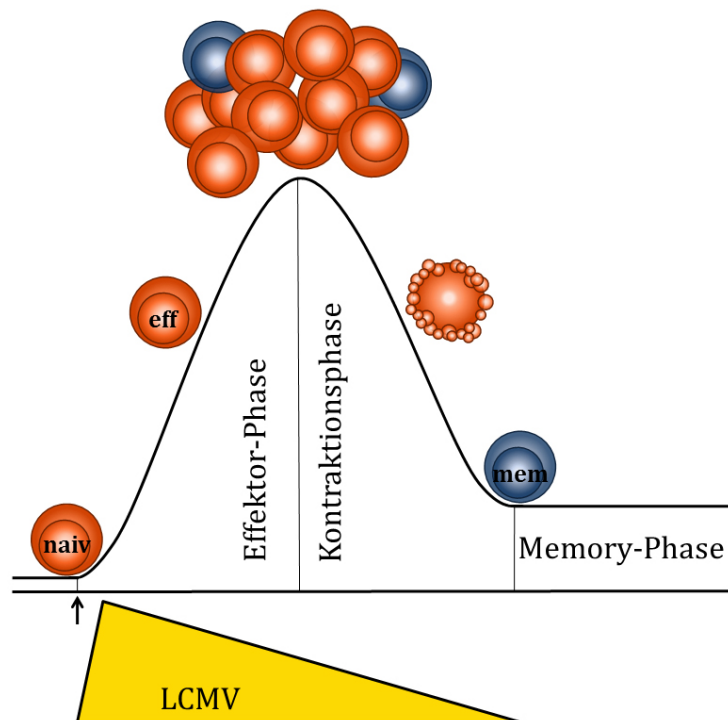


Abbildung 2.2.: Expansion virusspezifischer CD8⁺T-Zellen im akuten Infektionsverlauf mit LCMV. Die naive virusspezifische T-Zelle (CD8⁺IL7R^{hi}IL15R^{lo}IL2R) aus dem Lymphozytenpool wird während der viralen Infektion (schwarzer Pfeil) in lymphatischen Organen geprimt und expandiert als Effektor-T-Zelle (eff, CD8⁺IL7R^{lo}IL15R^{hi}IL2R^{hi}). Diese bilden die zytotoxische T-Zell-Antwort und eliminieren das Virus in der Peripherie (unteres Dreieck, korrelierend mit der Viruslast). Einige der expandierten CD8⁺T-Zellen wurden zu Memory-T-Zellen (mem) determiniert und weisen eine differenzielle Zytokinrezeptorexpression auf (dunkle Zellen, CD8⁺IL7R^{hi}IL15R^{hi}IL2R^{lo}). Anschließend an die Effektor-Phase werden die meisten effCD8⁺T-Zellen, die zu diesem Zeitpunkt CD8⁺IL7R^{lo}IL15R^{hi}IL2R^{lo} sind, apoptotisch in der Kontraktionsphase eliminiert. Die Population der Memory-T-Zellen bleibt weiterhin bestehen und bietet einen langfristigen Schutz gegen das LCMV.

Der Mechanismus der Eliminierung spezifischer T-Zellen in der Kontraktionsphase ist schlecht verstanden und sehr umstritten. So konnten einige Studien zeigen, dass der aktivierungsinduzierte Zelltod (*activation induced cell death*, AICD) einen möglichen Mechanismus der Kontraktion darstellt (Ju et al., 1995). Die hier vermuteten Molekülinteraktionen zwischen FasL-FasR, TNF-TNFR sowie IL-2-CD25 wurden mit der Kontraktionsphase in Verbindung gebracht und sehr kontrovers diskutiert (Alderson et

al., 1995; Algeciras-Schimmich et al., 1999; Ju et al., 1995). Studien an *lpr*^{-/-} (*FasR*^{-/-}) und *gld*^{-/-} (*FasL*^{-/-}) sowie an *TNFR1/2*^{-/-} Mäusen konnten eine Kontraktion spezifischer CTL zeigen und werfen die Frage nach möglichen Alternativen auf (Lohman et al., 1996; Miethke et al., 1996). Als Ersatzmechanismus wird der aktivierte autonome Zelltod (*activated T cell autonomous death*, ACAD) vorgeschlagen (Hildeman et al., 2002). Untersuchungen zufolge erfolgt somit die Vorprogrammierung auf den apoptotischen Tod bereits während der Zellaktivierung und wird durch die frühinflammatorischen Zytokine bestimmt (Badovinac et al., 2002, 2004; Hildeman et al., 2002; Kohlmeier et al., 2011). Der antiapoptotische Schutz wird über die IL-7 und IL-15 induzierte Expression von Bcl-2 vermittelt (Grayson et al., 2000; Hildeman et al., 2002; Pellegrini et al., 2003).

T-Zell vermittelte Zytotoxizität erfolgt durch unterschiedliche Mechanismen und wird zum Einen über die Produktion und Sezernierung von Zytokinen wie TNF α und IFN γ , welche die Zielzellen direkt apoptotisch stimulieren (TNF-TNFR) oder sensitiv für FasR-vermittelte Apoptose determinieren (IFN γ), erfüllt (Klavinskis et al., 1989; Leist et al., 1989). Ein direkter Zell-Zell-Kontakt ist für diese Form der Zytotoxizität nicht notwendig, was einen weniger spezifischen Ablauf ermöglicht. Die Eliminierung der Zielzellen über die FasR-vermittelte oder Perforin-abhängige Apoptose verlangt dagegen direkten Zellkontakt und stellt die Hauptmechanismen der CTL dar (Kagi et al., 1994b). Untersuchungen aktivierter T-Lymphozyten konnten eine verstärkte Expression von FasL- und Perforin-mRNA zeigen und deuten auf eine wichtige Rolle beider Proteine während der Infektion hin (Muller et al., 1989; Young et al., 1989). Eine akute virale Infektion der *gld*^{-/-} Maus mit LCMV zeigte keine Unterschiede in der Generierung der CTL-Antwort (Zhou et al., 2002). Auch Perforin defiziente Mäuse entwickeln normale CD8⁺T-Zellen und eine intakte spezifische T-Zell-Antwort während einer viralen Infektion, sind jedoch im Gegensatz zu FasL defizienten Tieren nicht in der Lage das Virus zu klären (Kagi et al., 1994a; Walsh et al., 1994; Zhou et al., 2002), sodass der Perforin-vermittelter Mechanismus als entscheidend für virale Infektionen gilt.

Infektionen mit persistierenden Viren des LCMV wie DOCILE und Clone 13 rufen eine schwächere CTL-Antwort hervor, welche uneffektive Zytotoxizität und fehlende Viruskontrolle verursachen (Gallimore et al., 1998; Moskophidis et al., 1993). Die mit diesem Vorgang der T-Zell-Exhaustion zusammenhängenden Mechanismen sind im Einzelnen nicht verstanden und stellen aufgrund der enormen klinischen Relevanz einen der wichtigsten Zweige heutiger Forschung. Untersuchungen konnten bereits Zytokinen wie IL-10 und IL-7 eine wichtige Rolle zusprechen. Die Blockade von IL-10- und PD-1-Signalwegen konnte exhaustete T-Lymphozyten zur erneuten Proliferation und

Zytotoxizität anregen (Barber et al., 2006; Brooks et al., 2006; Ejrnaes et al., 2006; Ha et al., 2008; Pellegrini et al., 2011), die Substitution mit IL-7 dagegen resultierte in einer Erhöhung des Memory T-Lymphozytenpools, welcher virale Kontrolle vermitteln konnte (Nanjappa et al., 2008; Pellegrini et al., 2011).

2.4. Fas apoptotic inhibitory molecule 3 (Faim3/Toso)

Zahlreiche Entwicklungsvorgänge sowie immunologische Abläufe sind von apoptotisch geprägten Vorgängen abhängig und bereits gut charakterisiert. Viele in diesen Prozess involvierte Moleküle sind Mitglieder der TNF-Superfamilie. Das wahrscheinlich am besten beschriebene System ist die FasR-vermittelte Apoptose (Nagata and Golstein, 1995), die eine wichtige Rolle in der Lymphozytenentwicklung und der Generierung peripherer Toleranz einnimmt (Adachi et al., 1996; Griffith et al., 1996; Watanabe-Fukunaga et al., 1992). Auch andere Mitglieder der TNF-Superfamilie wie TNFR, LT-R, DR und 4-1BB regulieren apoptotische Vorgänge (Chinnaiyan et al., 1996; Kienzle and von Kempis, 2000; Micheau and Tschopp, 2003; Rooney et al., 2000). Interessanterweise sind viele dieser Rezeptoren und ihre Liganden beschrieben worden auch proliferative Regulation zu übernehmen (Kennedy et al., 1999; Lee et al., 2002a; Starck et al., 2005). Untersuchungen konnten zeigen, dass sogar der Prototyp der Todesrezeptoren CD95 in der beginnenden T-Zell-Aktivierung über die Bindung des löslichen FasL (CD178) Proliferation induziert (Suzuki et al., 2000; Zhang et al., 2000). Die Bedeutung der einzelnen Interaktionen wird in natürlich vorkommenden Mutationen sichtbar und ist mit zahlreichen schwerwiegenden Erkrankungen in Verbindung gebracht worden. So resultiert das Fehlen des FasR im entarteten Lymphozytenverhalten (Lymphadenopathy) und progressiver, systemischer Autoimmunität (autoimmunes, lymphoproliferatives Syndrom, ALPS) (Bettinardi et al., 1997). Eine 2010 veröffentlichte Studie konnte jedoch zeigen, dass CD95 essentiell für Tumorwachstum ist (Chen et al., 2010) und machte nicht zum ersten Mal deutlich, dass eine stringente Regulation der Expression von Todesrezeptoren noch weiterer Erforschung bedarf (Bennett et al., 1998a; Niehans et al., 1997; Okada et al., 2000; Saas et al., 1997).

Toso/Faim3 wurde 1998 erstmals von Hitoshi *et al.* als ein spezifischer Regulator der Fas-induzierten Apoptose (*fas apoptotic inhibitory molecule 3*, Faim3) beschrieben (Hitoshi et al., 1998). Das Typ I Transmembranprotein weist in der Maus eine errechnete Größe von 47 kDa (422 AS) mit einem N-terminalen Signalpeptid von 17 Aminosäuren auf (*Abbildung 2.3*). Die N-terminale extrazelluläre Domäne des Proteins beträgt ca. 28 kDa

und weist eine Homologie zur variablen Immunoglobulinregion (IgV) mit einer Schwefelbrücke bei C₃₇-C₁₀₃ auf. Die Positionen AS₁₇₁₋₁₇₉ weisen eine Prolin-reiche (P) und die Positionen AS₂₃₃₋₂₄₈ eine Histidin-reiche Region (H) auf. Die Aminosäuren AS₂₆₃₋₂₈₃ stellen die ca. 2,5 kDa große Transmembrandomäne gefolgt vom 16 kDa schweren intrazellulären C-Terminus des Proteins. Hier befindet sich eine basische, Arginin-reiche (AS₂₈₅₋₃₃₉) Region.

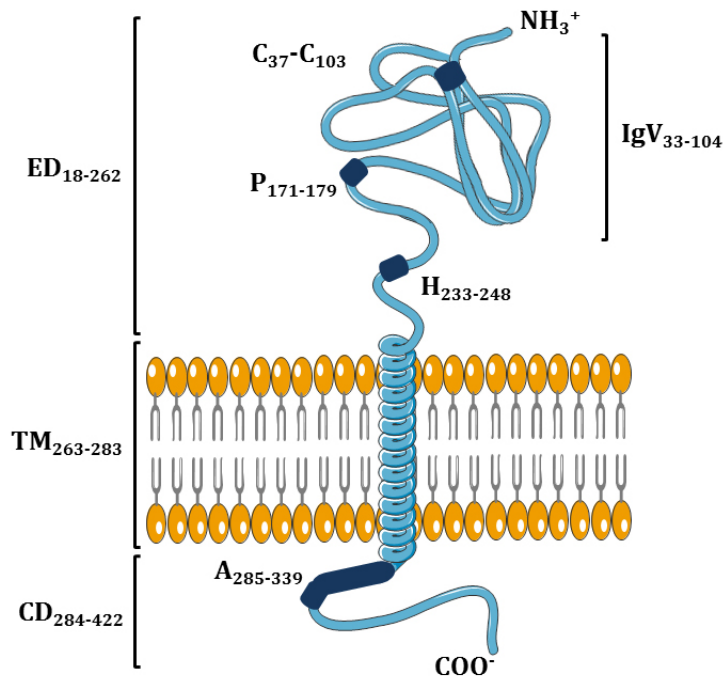


Abbildung 2.3.: Putatives Modell des murinen Faim3/Toso-Moleküls (47 kDa) mit einer extrazellulären Domäne (ED) von 28 kDa, einer transmembranen Domäne (TM) von 2,5 kDa und einer zytoplasmatischen Domäne (CD) von 16 kDa nach dem Einbau in die Lipiddoppelschicht ohne das N-terminale Signalpeptid von 17 Aminosäuren. Extrazellulär befindet sich eine konservierte IgV-Domäne, die über die Aminosäuren 33-104 reicht. Die Cysteine C₃₇ und C₁₀₃ werden durch eine Schwefelbrücke verbunden. Proximal der IgV-Domäne befindet sich eine prolinreiche (P) und eine histidinreiche (H) Sequenz. Die zytoplasmatische Domäne von Toso weist eine basische argininreiche Region (A) proximal der Transmembran.

Das humane Toso unterscheidet sich vom Mausprotein in einigen wenigen Aspekten. Die Nukleotidsequenz stimmt zu 78%, während die AS-Abfolge lediglich zu 58% übereinstimmt. Die Grundstruktur weist jedoch die gleichen funktionellen Domänen auf, was vergleichbare Funktionalität suggeriert. Zudem konnten Studien mehrere Transkripte vom humanen Toso darunter eine lösliche Form des Proteins nachweisen (hToso1-4) (Anhang 6.13).

Untersuchungen auf RNA und Proteinebene konnten zeigen, dass die Expression von Toso auf die hämatopoetische Linie beschränkt ist und aktivierungsabhängig reguliert wird

(Abbas et al., 2005; Nguyen et al., 2011). Toso wird außerdem in den Vesikeln akkumuliert, sodass die funktionelle Expression auf der Oberfläche ebenso in kurzer Zeit verändert werden kann (Vire et al., 2011). So zeigen naive T-Zellen geringe Mengen an Toso auf der Oberfläche und regulieren die Expression nach TCR-Stimulation bereits nach 12 h enorm hoch (Nguyen et al., 2011).

Die postulierte Apoptose-inhibierende Wirkung von Toso basiert im Wesentlichen auf heterologen Expressionsstudien in Jurkat-Zellen (Hitoshi et al., 1998; Song and Jacob, 2005). In einer Folgepublikation zur Erstbeschreibung konnte zudem eine Interaktion der intrazellulären Domäne von Toso mit FADD, die in negativer Regulation der Caspase 8 resultiert, nachgewiesen werden (Song and Jacob, 2005). Eine kürzlich publizierte Arbeit schlug einen Mechanismus vor, welcher die Regulation von Apoptose und Überleben in T-Zellen über RIP1 und seine Ubiquitinierung reguliert (Nguyen et al., 2011). Durch die konstitutive intrazelluläre Bindung an RIP1 erhöht Toso den Autoren zufolge die Bindung an FADD und FasR. Dieser trimere Komplex reguliert bei Bindung an FasR die Entscheidung zum Überleben oder Apoptose. Fehlt Toso richtet sich die Entscheidung gegen das Überleben.

2.5. Zielsetzung

Trotz der in vergangenen Jahren publizierten Ergebnisse ist die funktionelle Bedeutung von Faim3/Toso nicht geklärt. Die wenigen gewonnenen Daten stammen primär aus *in vitro* Untersuchungen in heterolog modifizierten Systemen. Studien an primären Zellen oder *in vivo* Daten aus defizienten Tiermodellen existieren kaum. So scheint jedoch die Expression von Toso auf das hämatopoetische System beschränkt und unter anderem in der lymphoiden Entwicklungslinie vertreten zu sein. Dies suggeriert eine mögliche funktionelle Involvierung des Proteins in die immunologischen Prozesse des angeborenen und adaptiven Immunsystems.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung von Toso während einer viralen Infektion im murinen Tiermodell untersucht. Der Fokus lag auf der Entwicklung und Kontrolle der zytotoxischen T-Lymphozyten-Antwort bei akutem Infektionsmodell und der resultierenden Viruskontrolle.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien

Alle Labor-üblichen Chemikalien wurden von gängigen Chemielieferanten geordert. Hierzu gehörten AppliChem (Darmstadt), Merk (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) sowie Sigma-Aldrich (München).

3.1.2. Kits

<i>Mouse</i> GM-CSF ELISA Set BD OptEIA™	BD Bioscience, Heidelberg
<i>Mouse</i> IFN γ ELISA Ready-SET-Go!®	eBioscience, Frankfurt
<i>Mouse</i> IL-2 ELISA Ready-SET-Go!®	eBioscience, Frankfurt
<i>Mouse</i> IL-6 ELISA Ready-SET-Go!®	eBioscience, Frankfurt
<i>Mouse</i> TNF α ELISA Ready-SET-Go!®	eBioscience, Frankfurt
Quantikine <i>Mouse</i> M-CSF ELISA Kit	R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA
QuantiTect Reverse Transcription Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Pan T Cell Isolation Kit II	Miltenyi BioTech, Bergisch-Gladbach
RNeasy Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
SYBR®Green	AppliedBiosystems, Darmstadt
Annexin V Apoptosis Detection Kit II	BD Pharmingen™, Heidelberg

3.1.3. Software

7500 Software v2.0.1	AppliedBiosystems, Darmstadt
AxioVision Rel.4.7	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena
EMBL-EBI ClustalW2.1	EBI, Cambridge (UK)
FlowJo 7.6.1	TreeStar Inc., Ashland (OR, USA)

GraphPad Prism5	GraphPad Software, La Jolla (CA, USA)
MicrosoftOffice 2007	Microsoft Corporation, Redmont (WA, USA)
NetOGlyc 3.1 Server	Center for Biological Sequence Analysis, Lyngby (Denmark)
Photoshop CS3	Adobe Systems, München

3.1.4. Verbrauchsmaterial

Das Labor-übliche Verbrauchsmaterial für Zellkultur wurde von TPP (FaustLaborbedarf, Schaffhausen) und Cellstar (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) bezogen. Die Einweg-Plastikware wurde von BD Bioscience (Heidelberg), VWR International (Darmstadt) und TPP (FaustLaborbedarf, Schaffhausen) und die Reagenzgefäße von Eppendorf (Hamburg) verwendet.

3.1.5. Geräte

Alle übrigen Labor-üblichen, nicht aufgeführten Geräte wurden von VWR International (Darmstadt) bezogen.

Autoklav	Systemc GmbH, Wetzlar
ELISA Reader	AnthosLabtecInstruments GmbH, Wals-Siezenheim
FACSCanto™ II	BD Bioscience, Heidelberg
Fluoreszenz-Mikroskop HS BZ-9000	Keyence GmbH, Neu-Isenburg
Gefrierschrank -20°C	Welabo Laborbedarf GmbH, Düsseldorf
Gefrierschrank -80°C	Thermo Scientific, Schwerte
NanoDrop ND-1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Neubauer-Zählkammer <i>improved</i>	Karl Hecht GmbH&Co KG, Sondheim
pH Messgerät	WTW GmbH, Weilheim
Thermoblock	Oehmen GmbH, Essen
TissueLyserII	QIAGEN, Hilden
Untertisch-Zentrifuge	Heraeus Instruments GmbH&Co. KG, Düsseldorf
Micro 220R-Zentrifuge	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen

3.1.6. Lösungen und Puffer

Zellkultur

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturmedien sowie das für sterile Arbeiten verwendete PBS wurden von PAN Biotech GmbH (Aidenbach) bezogen. Für die Zellkultur primärer Zellen wurden VLE Medien von Biochrom (Berlin) genutzt. Zusatz von Antibiotika erfolgte unter der Verwendung einer Kombinationslösung aus Penicillin, Streptomycin und L-Glutamin (PSG; Sigma-Aldrich, München). Das zum Ansetzen von Lösungen verwendete Wasser wurde doppelt destilliert von der Universitätsapotheke der HHU bezogen und folgend als ddH₂O bezeichnet.

Zellkulturmedien

BMDCs	VLE-DMEM 10% (v/v) FCS 50 mM β -Mercaptoethanol
T-Lymphozyten	VLE-RPMI 1640 10% (v/v) FCS 50 mM β -Mercaptoethanol
MC57	DMEM 5% (v/v) FCS 1% (v/v) PSG
X63	VLE-DMEM 5% (v/v) FCS 50 mM β -Mercaptoethanol

Plaque-Assay

Zellmedium	DMEM 5% FCS 1% (v/v) PSG
2xIMDM	160 g/l IMDM (9x) 10% (v/v) FCS 2% (v/v) PSG ddH ₂ O pH 7-8

Overlay	50% (v/v) Methylcellulose 50% (v/v) 2xIMDM
Fixier-Lösung	4% (v/v) Formalin PBS-
Permeabilisations-Lösung	1% (v/v) Triton-X100 PBS-
Block-Lösung	10% (v/v) FCS PBS-
Antikörper-Lösung	α VL4/ α Rat 2% (v/v) FCS PBS-
Färbelösung	50 % (v/v) ddH ₂ O 25 % (v/v) 0,1 M Zitronensäure (C ₆ H ₈ O ₇) 25 % (v/v) 0,2 M Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 0,2 % (v/v) H ₂ O ₂ 0,6 mg/ml o-Phenylenediamine dihydrochloride (Sigma-Aldrich, München)

Intrazelluläre Zytokinfärbung

Inkubationsmedium	IMDM 5% (v/v) FCS 1% (v/v) PSG
Fixierlösung	2% (v/v) Formalin PBS-
Permiabilisationslösung	0,25 M Saponin FACS-Puffer

Lösungen

FACS-Puffer	PBS- 2% (v/v) FCS 0,1% (v/v) NaN ₃ 2 mM EDTA
MACS-Puffer	0,5% (v/v) FCS 2 mM EDTA PBS-

EDTA-Lösung	0,5 M EDTA ddH ₂ O pH 8,0
100xNaN ₃	10% (v/v) NaN ₃ ddH ₂ O
Freezing-Medium	20% (v/v) DMSO 80% (v/v) FCS

3.1.7. Antikörper

Die im Rahmen dieser Arbeit in der Durchflusszytometrie verwendeten direkt gelabelten Antikörper wurden von BD Pharmingen (Heidelberg) sowie eBioscience (Frankfurt) bezogen und nach Anleitung des Herstellers verwendet. Die genutzten Fluorochrome waren je nach Kombinationsnotwendigkeit PE, PerCP, FITC, APC, PacificBlue und PeCy7.

Für die spezifische Aktivierung der T-Lymphozyten wurden ungelabelte α CD3 ϵ (eBioscience, Frankfurt) und α CD28 (BD Bioscience, Heidelberg) Antikörper genutzt und nach Anleitung des Herstellers verwendet.

3.1.8. Virus

Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete lymphozytäre Choriomeningitis Virus Stamm WE (LCMV WE) wurde mit freundlicher Unterstützung von F. Lehmann-Grube (Heinrich Pette Institute, Hamburg) erhalten.

3.1.9. Zellen

In der hier vorgestellten Arbeit fanden eine murine Fibrosarcomalinie (MC-57G, ATCC®CRL-2295™) sowie die Myeloma-Zelllinie X63 (Dr. Karasuyama, 1988; Basel) Verwendung.

Zudem wurden Zellkulturen primärer T-Lymphozyten und konventioneller dendritischer Zellen untersucht (*Kapitel 3.2.4.8; Kapitel 3.2.4.5*).

3.1.10. Versuchstiere

Die verwendeten Versuchstiere (*Mus musculus*) wurden von der zentralen Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (TVA-HHU) bezogen und entsprechend der dort geltenden Anforderungen gehalten. Mit freundlicher Unterstützung des dort arbeitenden Teams wurden die beschriebenen Tierexperimente in den Räumen der TVA entsprechend den dort geltenden Bestimmungen und im Einklang mit dem Tierschutzgesetz durchgeführt. Die Tierhaltung erfolgte zum Teil unter spezifiziert pathogenfreien Bedingungen (SPF). Alle in dieser Arbeit verwendeten Deletionsmutaten sowie *Knock In*-Stämme hatten einen C57BL/6J (B6)-Hintergrund und werden folgend inklusive der in dieser Arbeit verwendeten Bezeichnung aufgelistet.

B6xCD45.1	C57BL/6.SJL-Ptprca Pepcb/BoyJ
<i>Toso</i> ^{-/-}	C57BL/6J-toso tm
P14	C57BL/6J.B6D2F2-TgN(H2K ^b -TCRVβ8.1)
<i>Toso</i> ^{-/-} P14	C57BL/6J.B6D2F2-TgN(H2K ^b -TCRVβ8.1)-toso tm
<i>CCR2</i> ^{-/-}	C57BL/6.129S4-Ccr2 ^{tm1Ifc} /J
<i>TNFR1</i> ^{-/-}	C57BL/6-TNFαRp55 ^{tmKP}
<i>RAG1</i> ^{-/-}	C57BL/6.129S7-Rag1 ^{tm1Mom} /J
<i>sIgM</i> ^{-/-}	C57BL/6.129Sv-sIgM tm

3.1.11. Statistik

Zur statistischen Analyse wurde, wenn nichts Weiteres angegeben, der ungepaarte Students *T test* verwendet und die Signifikanzen mit „*“ für *p* Werte < 0,05, „**“ für *p* Werte < 0,01 und mit „***“ für *p* Werte < 0,001 angegeben.

3.2. Methoden

3.2.1. Untersuchung von RNA

Zur Aufreinigung von RNA aus Geweben wurde TriFast®Trizol (peqGOLD TriFast®Trizol; PeqLab, Erlangen) nach Angaben des Herstellers verwendet. Für die Isolation wurden in

der Regel 2-3 mm³ große frisch entnommene Stücke Leber bzw. Milz sowie in einigen Fällen ein Lymphknoten in 1 ml Trizol verwendet und mit einer Metallkugel (QIAGEN, Hilden) im TissueLyser 5 min bei 25 rps homogenisiert. Anschließend an die Isolation erfolgte stets eine Qualitätskontrolle im Agarosegel. Hierfür wurden 500 ng gesamt RNA im geeigneten Volumen in einem 2%igen Agarose/TAE Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Isolation der RNA aus Zellen erfolgte unter der Verwendung eines kommerziell erhältlichen RNA-Aufreinigungskits (QIAGEN, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Auch hier wurde nach Möglichkeit eine anschließende Qualitätskontrolle im Agarosegel mit 100 ng RNA durchgeführt.

Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte mittels eines Synthesekits (QuantiTect Reverse Transcription Kit; QIAGEN, Hilden) nach Herstellerangaben. Es wurde 1 µg gesamt RNA für die Synthese verwendet und im Anschluss an das Protokoll die cDNA 1:5 mit DEPC behandeltem Wasser verdünnt und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung verwahrt.

Expressionen bestimmter Gentranskripte wurden in der quantitativen *real time* PCR unter der Verwendung von SYBR®Green (AppliedBiosystems, Darmstadt) und 50 ng der wie oben beschrieben hergestellten cDNA nach Angaben des Herstellers gemessen. Die relative Transkriptmenge wurde nach 40 Zyklen auf die 18S rRNA oder GAPDH angeglichen und als 2^{-Δct} angegeben. War ein Transkript auch nach 40 Zyklen nicht amplifizierbar, galt die Expression des entsprechenden Genprodukts als unter dem Detektionslimit (ND).

3.2.2. ELISA

Bestimmungen der Zytokinkonzentrationen in Seren oder Zellüberständen wurden mittels eines ELISA nach Angaben des entsprechenden Herstellers durchgeführt (*Kapitel 3.1.2*). Die Proben wurden nach in der Literatur beschriebenen Kenntnissen erwartungsgemäß verdünnt und in der Regel über Nacht zu höheren Sensitivität bei 4°C inkubiert.

3.2.3. FACS

Die durchflusszytometrische Untersuchung von Zellen erfolgte am BD CantoII™ Analysegerät (BD Biosciences, Heidelberg). Es wurden max. 2×10^6 Zellen in einem FACS-Röhrchen (BD Biosciences, Heidelberg) mit 50 µl Antikörperlösung, welche neben den direkt gelabelten Antikörpern Kallibrierungsbeads (BC Calibrite™ Beads; BD Bioscience, Heidelberg) enthielt, versetzt, 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert und anschließend mit FACS-Puffer gewaschen. Die Antikörper wurden nach Herstellerangaben verwendet und unmittelbar vor der Anwendung im FACS-Puffer angesetzt. Wenn nichts Weiteres angegeben, wurden alle Waschschrirte der Proben durch die Zugabe von 3 ml FACS-Puffer gefolgt von 10 minütiger Zentrifugation bei 300 g und 4°C durchgeführt.

3.2.3.1. Zelloberflächenfärbung

Die Untersuchung der Zelloberflächen von Leukozyten des Blutes, der Organe sowie *in vitro* kultivierter Zellen erfolgte wie oben beschrieben in der Durchflusszytometrie. Die Färbung adhärenter Zellen wurde anschließend an ein FcBlock mit α CD16/ α CD32 durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen 10 min mit dem Blockantikörper bei 4°C inkubiert und anschließend ohne Waschschrirte mit den Oberflächenmarkern versetzt. Zum Ausgrenzen toter Zellen wurde kombinationsabhängig DAPI (Invitrogen, Darmstadt) oder 7AAD (BD Biosciences, Heidelberg) verwendet.

3.2.3.2. Anfärben von Blutleukozyten

Untersuchungen von Blutleukozyten erfolgten über eine durchflusszytometrische Messung von 10 µl Heparin behandelten Vollblutes. Hierfür wurde das entsprechende Volumen des Blutes in ein FACS-Reaktionsröhrchen mit bereits vorgelegten 50 µl Antikörperlösung transferiert und gevortext. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 4°C und anschließendem 3 minütigen Vorwärmen bei 37°C wurden die Erythrozyten des Blutes durch die Zugabe von 1 ml Lysis-Lösung (BD FACSTM Lysing Solution; BD Bioscience, Heidelberg) lysiert, gewaschen und im Durchflusszytometer analysiert.

3.2.3.3. Apoptose

Die Detektion apoptotischer Vorgänge wurde unter der Verwendung des BD Pharmigen™ AnnexinV Apoptosis Detection KitII nach Anleitung des Herstellers (BD Biosciences, Heidelberg) durchgeführt. Statt 7-AAD wurde DAPI verwendet und im PacificBlue-Kanal detektiert.

3.2.4. Zellkultur

3.2.4.1. Ermittlung der Zellzahl

Die Zellzählung erfolgte unter der Nutzung einer Neubauer-Kammer (*improved*). Die Zellsuspension wurde 1:10 mit Trypanblau (Sigma-Aldrich, München) verdünnt und in allen vier Leukozyten-Feldern ausgezählt.

3.2.4.2. Fertigung von Kryostocks

Zur langfristigen Konservierung von Zellstämmen wurden Kryostocks gefertigt. Hierzu wurde eine dichte Kultur des entsprechenden Zellstammes geerntet (*Kapitel 3.2.4.4*) und in einem geringen Volumen des für die Zellen optimalen Wachstumsmediums resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension 1:1 mit Freezing-Medium (*Kapitel 3.1.6*) versetzt, durch Vortexen vermischt und zügig in vorbereitete Kryoröhrchen (NUNC, Langenselbold) aliquotiert. Das Wegfrieren der Zellen erfolgte stufenweise durch die 30 minütige Inkubation bei -20°C mit anschließender dauerhafter Verwahrung bzw. bei Sicherheitsverwahrung der Stämme im Stickstofftank nach einstündiger Inkubation bei -80°C gefolgt von der Lagerung bei -140°C.

3.2.4.3. Auftauen von Zellen

Zum Auftauen der Kryostocks und weiteren Kultivierung der Zellen wurde das Zellaliquot erst in 50 ml des für die Zelllinie optimalen Mediums gelöst und 10 min bei 300 g abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen im frischen Medium resuspendiert und in

geeignete Zellkulturflaschen ausplattiert. Zelllinien wurden bis zur 10. Passage gehalten und anschließend gegen frische ausgetauscht.

3.2.4.4. Ernten von Zellen

Kultivierte adhärente Zellen wurden zum Passagieren sowie zum Ernten und zur weiteren Verwendung einer Trypsin/EDTA-Behandlung unterzogen. Hierzu wurde das Medium verworfen und der monolayeren Zellrasen zweifach mit vorgewärmten PBS⁻ gewaschen. Anschließend wurden 0,1 V des Kultivierungsmediums Trypsin/EDTA-Lösung (Biochrom, Berlin) in die Flasche gegeben und nach einer Inkubationszeit von 3 min bei 37°C die Zellen mit einem FCS haltigen Medium abgestoppt. Durch Abklopfen der Kulturflasche konnten die Zellen abgelöst, bei 300 g und 4°C 10 min abzentrifugiert und im frischen Medium zur weiteren Verwendung resuspendiert werden.

3.2.4.5. DC Generierung

Die Generierung dendritischer Zellen aus dem Knochenmark (BMDC) erfolgte modifiziert nach bereits publizierten Protokollen (Inaba et al., 1992; Lutz et al., 1999). Als Wachstumsmedium wurde VLE-DMEM mit dem Zusatz von 50 µM β-Mercaptoethanol und 10% FCS jedoch ohne Antibiotikazusätze verwendet. Die Differenzierungsinduktion erfolgte durch den Zusatz von 40 ng/ml eigens generierten GM-CSF (*Kapitel 3.2.4.9*). Voll ausdifferenzierte konventionelle dendritische Zellen (cDCs) wurden bis d10 nach Differenzierungsbeginn mit konstanter Konzentration an GM-CSF stimuliert, anschließend geerntet und weiterverwendet.

3.2.4.6. Aufreinigung von T-Zellen mittels MACS®Sort

Die Aufreinigung von T-Lymphozyten erfolgte als Negativsort (MACS®Cell Separation Pan T Cell Isolation Kit II; Miltenyi, Bergisch-Gladbach) unter der Nutzung der *magnetic associated cell sort* (MACS®) Methode. Hierfür wurden Milzen sowie zervikale, mediastinale, axillare und inguinale Lymphknoten der untersuchten Tiere herauspräpariert und durch ein 70 µm Zellsieb gedrückt. Die Einzelzellsuspension wurde anschließend nach Angaben des Herstellers behandelt. Die Trennung unmarkierter T-Lymphozyten von den übrigen markierten Zellen wurde mittels LS-Magnetsäulen

(Miltenyi, Bergisch-Gladbach) durchgeführt und anschließend durchflusszytometrisch auf die Reinheit der Probe untersucht. Für weitere Versuche wurden Zellfraktionen mit einer Reinheit von min. 98% verwendet.

Die nach beschriebenen Verfahren aufgereinigten T-Zellen wurden sowohl für *in vivo* als auch *in vitro* Versuche verwendet. Zur zusätzlichen Untersuchung des Proliferationspotentials der T-Lymphozyten wurden die Zellen mit CFSE gelabelt (Kapitel 3.2.4.7).

3.2.4.7. Anfärben der T-Lymphozyten mit CFSE

Das Anfärben der Zellen mit Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) erlaubte eine Verfolgung der Proliferationszyklen der T-Zellen unter den gegebenen Bedingungen. Die Färbung erfolgte zügig und unmittelbar nach dem Sortieren der T-Lymphozyten bei 4°C (Kapitel 3.2.4.6) nach Nguyen (Nguyen et al., 2002). Hierfür wurden die T-Zellen 10 min bei 300 g und 4°C pelletiert und im kalten PBS⁻ mit 2 µM CFSE resuspendiert. Anschließend folgte eine Inkubationszeit von 10 min bei 37°C und eine erneute 5 minütige Zentrifugation bei 300 g und 4°C. Das Zellpellet wurde zweifach im kalten VLE-RPMI 1640 Medium mit 50 µM β-Mercaptoethanol und 10% FCS gewaschen und gefolgt an den letzten Zentrifugationsschritt im Medium für *in vitro* Kultivierung bzw. im kalten PBS⁻ für adoptive Zelltransfers *in vivo* resuspendiert. Die Zellzahl wurde in der Neubauer-Kammer bestimmt (Kapitel 3.2.4.1).

3.2.4.8. Proliferationsassay mit T-Lymphozyten

Die Untersuchung der Proliferationskapazität von T-Lymphozyten erfolgte durch eine Stimulation des TCRs *in vitro*. Hierfür wurde eine Kultur aufgereinigter T-Zellen im VLE-RPMI 1640 Medium mit 50 µM β-Mercaptoethanol und 10% FCS mit jeweils 5 µg/ml αCD3ε/αCD28 stimuliert. Die Proliferation wurde über das CFSE-Signal, welches im FITC-Kanal detektiert wurde, zeitabhängig verfolgt.

3.2.4.9. Generierung von GM-CSF im Überstand

Zur Generierung von GM-CSF wurde eine transgene Zelllinie (X63-GM-CSF, Dr. Karasuyama, 1988; Basel) nach beschriebenen Protokollen verwendet (Karasuyama and Melchers, 1988; Stockinger and Hausmann, 1994; Stockinger et al., 1996; Zal et al., 1994). Die Kultivierung erfolgte im VLE-DMEM mit 50 μM β -Mercaptoethanol und 5% FCS über einen Zeitraum von 7 Tagen mit anschließender Konzentrationsbestimmung über ELISA sowie einer Aktivitätsmessung *in vitro*. Hierfür wurde die Entwicklung von BMDCs aus dem Knochenmark von B6-Mäusen unter der Verwendung des neu generierten Überstandes als Differenzierungsstimulus zeitabhängig verfolgt.

3.2.5. *In vivo* Untersuchungen im Mausmodell

3.2.5.1. Intravenöse Verabreichung

Die Verabreichung infektiöser Viruspartikel sowie Zellen für Adoptivtransfers wurde intravenös in die Schwanzvene der Tiere durchgeführt. Die Injektion erfolgte unter einer Sterilbank in einer Infektionsröhre mit einer 29G Edelstahlkanüle (Terumo Neolus®, Neuwied). Das Virus wurde entsprechend vorverdünnt in 200 μl DMEM verabreicht. Die Zellen wurden als Einzelzellsuspension im PBS transferiert.

3.2.5.2. Intraperitoneale Verabreichung

Die Substitution mit Oligopeptiden (GP33) erfolgte intraperitoneal im Freundschens Adjuvant (incomplete Freund's Adjuvant; Sigma-Aldrich, München). Hierfür wurde das GP33 in PBS gelöst, 1:1 mit dem Adjuvant vermischt und mit einer 24 G Nadel in die Bauchhöhle der Tiere injiziert.

3.2.5.3. Blut- und Organentnahme

Zur Untersuchung von Blutleukozyten, Serumzytokine sowie Virustiter während einer viralen Infektion wurden den Tieren unter Narkose mit Isofluran (Delta Select, Pfullingen) an den relevanten Tagen bis zu 200 μl Vollblut aus dem retrobulbären Venenplexus

entnommen und je nach Verwendungszweck in Serum- bzw. in Heparin-Tubes aufgefangen. Das heparinisierte Blut wurde durchflusszytometrisch untersucht (*Kapitel 3.2.3.2*), während das Serum für die Bestimmung der Virustiter (*Kapitel 3.2.5.4*), Zytokine (*Kapitel 3.2.2*) und des Leberschadens über die Aktivität der ALT (*Kapitel 3.2.5.5*) verwendet wurde. Die Abtrennung des Serums von den geronnenen Blutzellen erfolgte nach einer 30 minütiger Inkubation des entnommenen Blutes auf Eis, gefolgt von einem 10 minütigen Zentrifugationsschritt bei 6000 g in einer Eppendorf-Kühlzentrifuge. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Serum bei -20°C verwahrt.

Die Entnahme von Organen zwecks Zelluntersuchung, Titerbestimmung, Immunhistochemie sowie RNA-Isolation wurde nach einer zervikalen Dislokation durchgeführt. Für die Bestimmungen viraler Titer in den peripheren Organen an den relevanten Tagen der Infektion wurden in der Regel 1/3 der Milz, 1/4 der Leber, eine Niere sowie eine halbe Lunge verwendet. Thymus und Gehirn wurden im Ganzen untersucht. Die entnommenen Organe wurden in 2 ml Eppendorfgefäßen (Eppendorf GmbH, Hamburg) mit 1 ml Plaque-Medium (*Kapitel 3.1.6*) und einer Metallkugel (QIAGEN, Hilden) 5 min bei 30 rps im TissueLyser (QIAGEN, Hilden) homogenisiert und anschließend bis zur Titerbestimmung bei -80°C verwahrt.

Für immunhistologische Untersuchungen wurden kleinere Organteile nach der Entnahme in geeigneten Gefäßen mit Einbettmedium überschichtet und im flüssigen Stickstoff Schock gefroren.

3.2.5.4. Bestimmung viraler Titer

Virustiterbestimmung im Serum, sowie in peripheren Organen wie der Milz, Leber, Niere, Lunge sowie in einigen Fällen dem Thymus und Gehirn, wurde an den für die Infektion relevanten Tagen durchgeführt und erfolgte nach in früheren Arbeiten beschriebenen Protokollen (Battegay et al., 1991). Die entsprechend verwendeten Lösungen sind im Kapitel 3.1.6 aufgelistet. Die Detektion von infizierten Zellen erfolgte mittels eigens hergestellten, primären, ungelabelten Antikörpers gegen das Nukleopeptid des LCMV (Battegay et al., 1991), sowie des sekundären HRP-konjugierten Antikörpers (Goat α Rat IgG (H+L)-HRP; Jackson Immuno Research, USA).

3.2.5.5. ALT

Die qualitative Bewertung des Leberschadens wurde indirekt über die Enzymaktivität der ALT im Serum der Tiere während der Infektion bestimmt. Hierfür wurden Serumproben im Zentrallabor der Universitätsklinik Düsseldorf im *Serum Multiple Biochemical Analyzer* (Ektachem DTSCII, Johnson & Johnson Inc.) untersucht und die Aktivität des Enzyms in U/ml Serum bestimmt.

3.2.5.6. Bestimmung spezifischer T-Lymphozyten

Die Bestimmung von LCMV spezifischer T-Lymphozyten im Blut und Organen erfolgte durch eine Tetramerfärbung. Die Klassifizierung spezifischer TC-Rezeptoren erfolgte unter der Verwendung der Oligopeptide GP₃₃₋₄₁ (GP33) bzw. NP₃₉₆₋₄₀₄ (NP396) gebunden auf einem mit Fluoreszenzmarker gekoppelten, tetramerisierten MHC I-Molekül, welches vom TCR erkannt und gebunden wurde. In der Regel wurden 10 µl Heparinblutes bzw. 50 µl Zellsuspension der Leber und Milz mit dem im FACS-Puffer (*Kapitel 3.1.6*) verdünnten Tetramer versetzt und 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend konnte die Zelloberfläche wie beschrieben gefärbt werden (*Kapitel 3.2.3.2*).

3.2.5.7. Anfärben intrazellulärer Zytokine

Die Untersuchung der Zytotoxizität von T-Lymphozyten während einer viralen Infektion wurde indirekt über die korrelierende Koproduktion aktivierter T-Zellen von IFN γ in der Milz und Leber bestimmt (Zhou et al., 2002). Die zuvor entnommenen Organe (*Kapitel 3.2.5.3*) infizierter Tiere wurden zunächst zur Isolation Antigen präsentierender Zellen aus ihrem Gewebeverband mit Liberase (0,4 mg/ml) und DNase (0,2 mg/ml) (Roche, Mannheim) verdaut. Hierzu wurden definierte Organteile mit 800 µl enzymhaltigen IMD-Mediums versetzt, bei 37°C 30 min inkubiert und anschließend die Reaktion mit 10 ml IMD-Medium mit 10% FCS abgestoppt. Die resultierende Zellsuspension wurde 10 min bei 300 g und 4°C pelletiert und in 5 ml des FCS haltigen Mediums wieder aufgenommen.

Ein jeweils 100 µl Aliquot der entsprechenden Zelllösung wurde zum Nachweis der Aktivierungsspezifität mit unterschiedlichen Oligopeptiden des LCMV in einer 96 Well Platte 1 h bei 37°C vorstimuliert, anschließend mit 2.5 µg/ml BrefeldinA (Sigma-Aldrich,

München) versetzt und weitere 5 h bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Restimulation wurde die Platte 10 min bei 300 g und 4°C abzenrifugiert, das Zellpelett in 50 µl FACS-Puffer versetzt mit den gewünschten Oberflächenantikörpern resuspendiert und 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Antikörper durch die Zugabe von 100 µl PBS-herausgewaschen und die erneut pelletierten Zellen erst durch die Zugabe von 100 µl Fixierlösung (2% Formalin/PBS-) 10 min bei RT fixiert. Die Permiabilisation der Zellen erfolgte durch die Zugabe von weiteren 100 µl Permiabilisationslösung (Saponin/FACS-Puffer), welche die Zellmembran durchlässig für die intrazellulär gerichteten Antikörper machte. Die Zellen wurden nach obigen Angaben zentrifugiert und durch eine erneute, zweifach durchgeführte Resuspension in 200 µl Permiabilisationslösung gewaschen. Das Färben der intrazellulären Zytokine erfolgte durch die Zugabe von 50 µl Antikörperhaltiger Permiabilisationslösung und anschließender Inkubation bei 4°C. Nach zwei weiteren Waschschritten konnte das intrazelluläre Zytokin im Durchflusszytometer detektiert werden.

3.2.5.8. Chimären

Zur Herstellung von Knochenmarkchimären wurden die entsprechenden Empfänger in der Radiologie der Universitätsklinik Düsseldorf in speziellen Käfigapparaturen in einer Cobalt-Anlage mit 1050 rad bestrahlt und am Folgetag mit jeweils 1×10^7 Knochenmarkszellen aus entsprechenden Spendern intravenös rekonstituiert. Die Adaptionszeit betrug mind. 30 Tage nach Rekonstitution.

3.2.5.9. *In vivo* Depletion von CD8⁺T-Lymphozyten

Die Depletion von Lymphozyten erfolgte durch eine intravenöse Verabreichung von 100 µg Antikörper gelöst in PBS- an d-3 und d-1 mit anschließender Depletionskontrolle im Blut an d0 im Durchflusszytometer (*Kapitel 3.2.3.2*).

3.2.5.10. Adoptivtransfers von Zellen

Für adoptive Zelltransfers wurde eine Einzelzellsuspension entsprechender Zellen intravenös in PBS- verabreicht. Hierfür wurden Milzen der entsprechenden Tiere steril entnommen, durch ein Zellsieb gedrückt und 5 min bei 300 g und 4°C pelletiert. Das

Zellpellet wurde anschließend in PBS⁻ resuspendiert und nach Bestimmung der Zellzahl (*Kapitel 3.2.4.1*) 1×10^4 lebende Splenozyten in die Empfängertiere transferiert (d-1). Die Infektion mit unterschiedlichen Dosen des LCMV WE erfolgte am Folgetag (d0).

Zur Untersuchung homeostatischer Proliferation wurden die Splenozyten bzw. aufgereinigte T-Lymphozyten nach dem ersten Zentrifugationsschritt einer CFSE-Färbung (*Kapitel 3.2.4.7*) unterzogen und anschließend 1×10^7 lebender Splenozyten bzw. 5×10^6 lebender T-Lymphozyten in die *RAG1*^{-/-} Empfängertiere transferiert. Die Analyse des Proliferationspotentials von T-Zellen infolge einer spezifischen TCR Aktivierung erfolgte nach einem ebenso durchgeführten Zelltransfer. 1×10^7 CFSE gelabelten Splenozyten bzw. 3×10^6 gelabelten T-Lymphozyten aus P14 bzw. *Toso*^{-/-}P14-Mäusen wurden in die CD45.1xB6 Mäuse transferiert und mit GP33 am Folgetag substituiert (*Kapitel 3.2.5.2*).

Die adoptiven Transfers konventioneller dendritischer Zellen erfolgten an d-8 der Infektion mit 2×10^6 PFU LCMV WE. Die *in vitro* generierten BMDCs wurden an d10 des Differenzierungsprozesses geerntet und 12 h mit GP33 gelabelt. Nach dem anschließenden dreifachen Waschen mit kaltem PBS⁻ (10 min, 300 g, 4°C) wurden 3×10^6 lebender, löslicher DCs intravenös verabreicht und die Tiere an d0 infiziert.

4. **ERGEBNISSE**

Der Zusammenhang zwischen der viralen Last und der Entwicklung der zytotoxischen T-Zell-Antwort wurde schon zahlreich für akute und chronische Infektionsmodelle untersucht (Zinkernagel et al., 1985). Eine hohe initiale Viruslast führt zur Persistenz und einer uneffektiven Immunantwort (T-Zell-Exhaustion) (Ahmed et al., 1984; Moskophidis et al., 1995; Moskophidis et al., 1993), während eine niedrige geklärt werden kann und in der Generierung von Memory-T-Zellen resultiert. Ziel heutiger Forschung ist es neue Möglichkeiten zu entwickeln die Generierung funktioneller Memory-T-Zellen während der Infektion positiv zu beeinflussen sowie T-Zell-Exhaustion zu vermeiden. Ein besseres Verständnis für die interaktiven Vorgänge während der T-Zell-Aktivierung führt somit zu potentiellen Wirkmechanismen von Therapien.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung von Fas apoptotic inhibitory molecule 3 (Faim3/Toso) während dieser zellulären Interaktionen untersucht. Als ein antiapoptotisch wirkend beschriebenes Molekül (Hitoshi et al., 1998; Nguyen et al., 2011; Song and Jacob, 2005) stellt Toso einen interessanten Kandidaten für die Regulation der T-Zell-Homöostase während einer viralen Infektion und somit ein therapeutisches Zielmolekül bei der Manipulation derselben.

4.1. **Deletion von Toso**

Die Bedeutung einer Deletion von Toso für das hämatopoetische System wurde an einer totalen *Toso*^{-/-} Maus zunächst im naiven Zustand untersucht. Hierzu wurden die Frequenzen der Blutleukozyten aus *Toso* defizienten Tieren mit denen der Kontroll-C57BL/6J-Mäuse in der Durchflusszytometrie verglichen (*Kapitel 3.2.3.2*). Während die Anzahl der CD4⁺ (CD3ε⁺CD4⁺) und CD8⁺ T-Lymphozyten (CD3ε⁺CD8⁺) keine signifikanten Unterschiede zeigte, waren die Frequenzen der B-Zellen (B220⁺CD19⁺) um die Hälfte reduziert. Die Anzahl der Monozyten (GR1^{im}Ly6C^{hi}) war ebenfalls um ca. 50% reduziert (*Abbildung 4.1.A*). Die Frequenzen gewebeständiger dendritischer Zellen wurden nach einer Liberase/DNase-Behandlung in der Milz der Tiere bestimmt (*Kapitel 3.2.5.7*). Im naiven Zustand waren in den *Toso*^{-/-} Mäusen verglichen mit C57BL/6J-Kontrolltieren keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der konventionellen DCs (cDCs) zu ermitteln (*Abbildung 4.1.B*). Sowohl CD8⁺ (CD8α⁺CD11c^{hi}Ly6C^{lo}CD11b⁻) als auch CD8⁻ (CD8α⁻CD11c^{hi}Ly6C^{lo}CD11b⁺) cDCs der Milz waren in der mit C57BL/6J-Mäusen

vergleichbaren Anzahl gemessen worden. Die Entwicklung der *Toso*^{-/-} Mäuse hat sich auch sonst nicht von der der Kontrolltiere unterschieden, sodass diese einen gesunden Phänotypen aufwiesen.

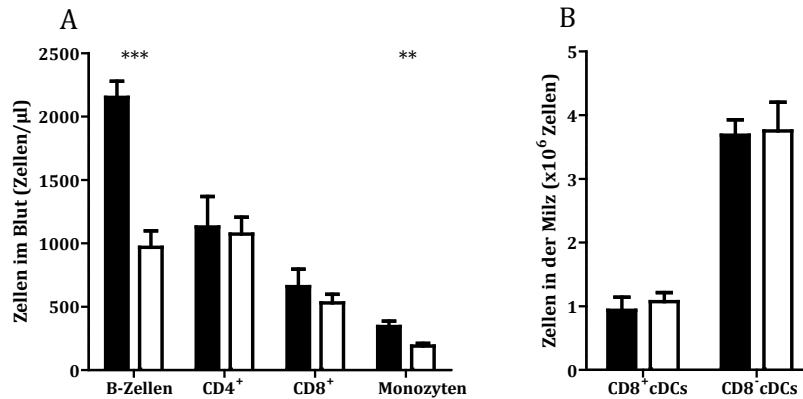


Abbildung 4.1.: Naiver Phänotyp der *Toso*^{-/-} Maus. Untersuchung der Leukozytenfrequenzen in den *Toso*^{-/-} (helle Balken) sowie Kontroll-C57BL/6J-Mäusen (schwarze Balken) im naiven Zustand in der Durchflusszytometrie. A) Die Frequenzen der Blutleukozyten wiesen signifikante Unterschiede in der Anzahl der B-Zellen, gefärbt mit α CD19 und α B220, sowie der Monozyten ($GR1^{im}Ly6C^{hi}$) auf. In den Frequenzen der T-Lymphozyten sowohl CD4⁺ ($CD3\epsilon^{+}CD4^{+}$) als auch CD8⁺ ($CD3\epsilon^{+}CD8^{+}$) konnten keine signifikanten Differenzen zu den Kontrolltieren detektiert werden. Die Analyse erfolgte mit jeweils insgesamt acht Tieren pro Gruppe in vier unabhängigen Versuchsansätzen. B) Die konventionellen dendritischen Zellen (cDCs) in der Milz wurden nach einem Liberase/DNase Verdau des Organs wie im Kapitel 3.2.5.7 beschrieben untersucht. Die CD8⁺cDCs wurden als $CD8\alpha^{+}CD11c^{hi}Ly6C^{lo}CD11b^{-}$ und die CD8⁻cDCs als $CD8\alpha^{-}CD11c^{hi}Ly6C^{lo}CD11b^{+}$ definiert. Die Färbung erfolgte nach einem Fc-Block mit α CD16 α CD32 wie im Kapitel 3.2.3.1 beschrieben mit jeweils vier Tieren pro Gruppe in zwei unabhängigen Versuchsansätzen.

Akutes Infektionsmodell in der *Toso*^{-/-} Maus

Zur Untersuchung der adaptiven Immunantwort bei der *Toso*^{-/-} Maus wurde das akute Infektionsmodell gewählt. Hierzu wurden die Tiere mit 2×10^6 PFU des Stammes LCMV WE intravenös (*i.v.*) infiziert und die zytotoxische T-Zellantwort (*cytotoxic T lymphocyte*, CTL-Antwort) sowie die Viruslast an den für die Infektion relevanten Tagen untersucht. Während die C57BL/6J Mäuse eine für die akute Infektion typische Zell-Expansion GP33 spezifischer CD8⁺ T-Zellen zeigten (Zhou et al., 2002), war diese in den *Toso*^{-/-} Mäusen ab d8 *p.i.* signifikant verringert (Abbildung 4.2.A).

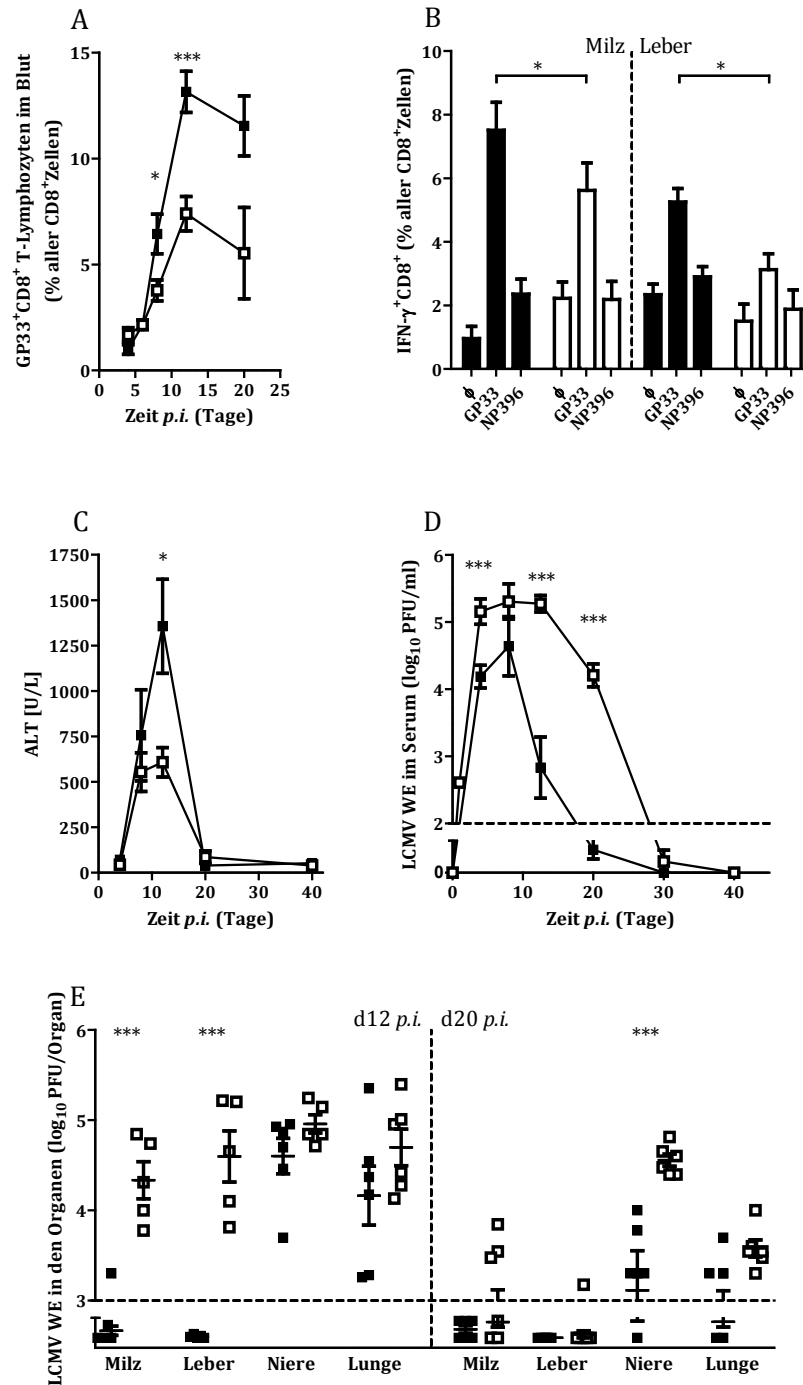


Abbildung 4.2.: Das virale Infektionsmodell einer akuten Hepatitis in der *Toso*^{-/-}Maus. Die Infektion erfolgte mit 2×10^6 PFU des LCMV WE in den *Toso*^{-/-} (helle Balken bzw. □) und Kontroll-C57BL/6J Mäusen (schwarze Balken bzw. ■). A) Zeitliche Expansion GP33 spezifischer CD8⁺T-Zellen gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen wie in Kapitel 3.2.5.6. beschrieben mit jeweils 4-12 Tieren (d4=12; d6=4; d8=12; d12=9-12; d20=8) B) Intrazelluläre IFN γ -Produktion in CD8⁺T-Lymphozyten der Milz und Leber d12 p.i. nach einem Liberase/DNase Verdau der Organe gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen wie in Kapitel 3.2.6.7 beschrieben mit jeweils sechs Tieren in zwei unabhängigen Versuchsansätzen. Die Restimulation erfolgte mit synthetischen Oligopeptiden des Glykoproteins GP33 (AS₃₃₋₄₁) und des Nukleoproteins NP396 (AS₃₉₆₋₄₀₄), sowie unstimulierten Kontrolle (φ). C) Zeitliche Kinetik der ALT-Aktivitätsmessung im Serum während der akuten Infektion mit jeweils 6-8 Tieren (d12=8). D-E) Virustiterbestimmung in zeitlicher Abhängigkeit im Serum (n=4-8) (D) und d12 sowie d20 p.i. in den Organen (E) infizierter Tiere. Die Organtiter wurden mit insgesamt jeweils sechs Tieren in zwei unabhängigen Versuchsansätzen bestimmt.

Die Zytotoxizität der CD8⁺ T-Lymphozyten korreliert mit der intrazellulären Produktion von IFN γ und TNF α (Ou et al., 2001; Zhou et al., 2002) und ist für die Immunpathologie der Hepatitis verantwortlich (Cooper et al., 1999). Diese kann nach einer *ex vivo* Restimulation mit unterschiedlichen Oligopeptiden des LCMV auf die Spezifität hin untersucht werden und lässt indirekt auf den zytotoxischen Zustand der Lymphozyten schließen. Die Restimulation der zuvor mit Liberase/DNase behandelten Organe (Kapitel 3.2.6.7) erfolgte mit einem synthetischen Oligopeptid des Glykoproteins GP₃₃₋₄₁ (GP33) und dem des Nukleoproteins NP₃₉₆₋₄₀₄ (NP396) des LCMV über eine Zeitspanne von 5 h (Kapitel 3.2.6.7). Beide Peptide werden den CD8⁺ T-Lymphozyten auf MHC I-Molekülen präsentiert und stellen die beiden immunogen dominantesten Antigene des LCMV dar (Probst et al., 2003). Im Anschluss an die Restimulation wurde die intrazelluläre IFN γ -Produktion im Durchflusszytometer erfasst (Abbildung 4.2.B). Toso defizienten Tiere zeigten in der Milz und Leber d12 *p.i.* weniger IFN γ produzierender CD8⁺ T-Zellen als die C57BL/6J-Kontrollen. Der korrelierende Leberschaden wurde am Aktivitätslevel der ALT im Serum der Tiere gemessen (Kapitel 3.2.6.3; Kapitel 3.2.6.5) und konnte in den *Toso*^{-/-} Mäusen an d8-12 *p.i.* ebenfalls niedriger detektiert werden (Abbildung 4.2.C). Als Folge der verminderten Zytotoxizität der CD8⁺ T-Lymphozyten konnte zudem eine höhere Viruslast im Blut und Organen der Toso defizienten Tiere gemessen werden, welche im Serum erst nach d30 *p.i.* das Detektionslimit unterschritten hatte (Abbildung 4.2.D-E).

Zur Klärung, ob das hämatopoetische System dem Phänotyp der *Toso*^{-/-} Tiere zu Grunde liegt, wurden Knochenmarkschimären sowohl im C57BL/6J- als auch im Toso defizienten Hintergrund hergestellt (Kapitel 3.2.6.8). Die Rekonstitution erfolgte sowohl mit C57BL/6J als auch mit *Toso*^{-/-} Knochenmark. 30 Tage nach der Rekonstitution wurden den Tieren für eine akute Infektion 2×10^5 PFU des LCMV WE *i.v.* verabreicht und d12 *p.i.* die spezifische T-Zell-Antwort analysiert. Unabhängig vom Hintergrund der verwendeten Tiere für die Bestrahlung, wiesen die mit dem *Toso* defizienten Knochenmark rekonstituierten Mäuse eine signifikant niedrigere CTL-Antwort auf (Abbildung 4.3.A). Die Anzahl GP33 spezifischer CD8⁺ T-Zellen war bei den *Toso*^{-/-} rekonstituierten Tieren um die Hälfte reduziert. Ein signifikanter Unterschied war auch in der Zytotoxizität der CD8⁺ T-Lymphozyten der Milz und der Leber zu sehen. Die intrazelluläre IFN γ -Produktion d12 *p.i.* wurde sowohl in der Milz auch in der Leber nach Rekonstitution mit *Toso*^{-/-} Zellen erniedrigt gemessen (Abbildung 4.3.B). Korrelierend damit wurden in den Toso defizient rekonstituierten Chimären höhere virale Titer gemessen (Anhang 6.1).

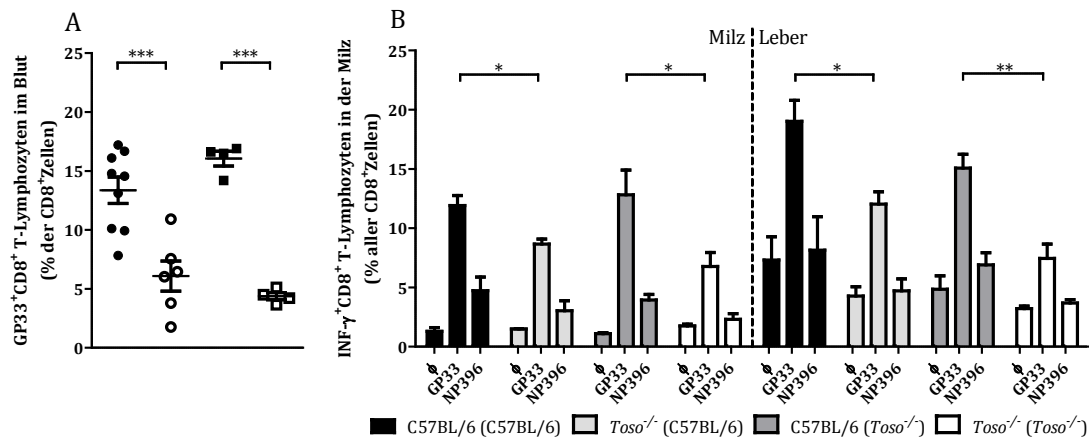


Abbildung 4.3.: Akute Infektion der Knochenmarkschimären. Bestrahlte C57BL/6J und *Toso*^{-/-} Mäuse wurden mit dem Knochenmark aus C57BL/6J oder *Toso*^{-/-} Mäusen rekonstituiert (Kapitel 3.2.5.8) und nach der Adaptionszeit die Tiere mit 2×10^5 PFU LCMV WE *i.v.* infiziert. Die Untersuchungen erfolgten mit insgesamt mind. 4-9 Empfängern pro Gruppe in 2-4 unabhängig durchgeführten Experimenten. A) Frequenzen GP33 spezifischer CD8⁺ T-Zellen im Blut der Chimären d12 *p.i.* wurden im Durchflusszytometer wie im Kapitel 3.2.5.6 beschrieben analysiert. Bestrahlte Tiere mit C57BL/6J Hintergrund (♂ und ♀) oder *Toso*^{-/-} Hintergrund (♂ und ♀) wurden mit C57BL/6J (♂ und ♀) oder *Toso*^{-/-} Knochenmark (♂ und ♀) rekonstituiert. B) Die Messung der intrazellulären Produktion von IFN γ in CD8⁺ T-Zellen der mit Liberase und DNase behandelten Milz und Leber wurde d12 *p.i.* nach einer *ex vivo* Restimulation mit GP₃₃₋₄₁ (GP33) und NP₃₉₆₋₄₀₄ (NP396), sowie unstimulierter Kontrolle (ϕ) durchflusszytometrisch analysiert (Kapitel 3.2.6.7.) (n=4-9). Der Empfängerhintergrund wurde in der Abbildung in Klammern angegeben.

Expression von Toso

Die Expression von Toso wird in der Literatur kontrovers beschrieben. In geringen Mengen konnte das Protein jedoch auf der Oberfläche naiver T-Zellen, stärker auf B-Zellen sowie NK-Zellen nachgewiesen werden (Nguyen et al., 2011; Song and Jacob, 2005). Zudem scheint Toso stringent sowohl auf der RNA- als auch Protein-Ebene reguliert und Untersuchungen zufolge durch vesikuläre Akkumulation gespeichert zu werden (Vire et al., 2011). Auf aktivierten T-Zellen ist eine starke Zunahme der Moleküldichte gezeigt worden (Abbas et al., 2005; Nguyen et al., 2011), während die Transkriptmengen bei Aktivierung verringert werden (Abbas et al., 2005).

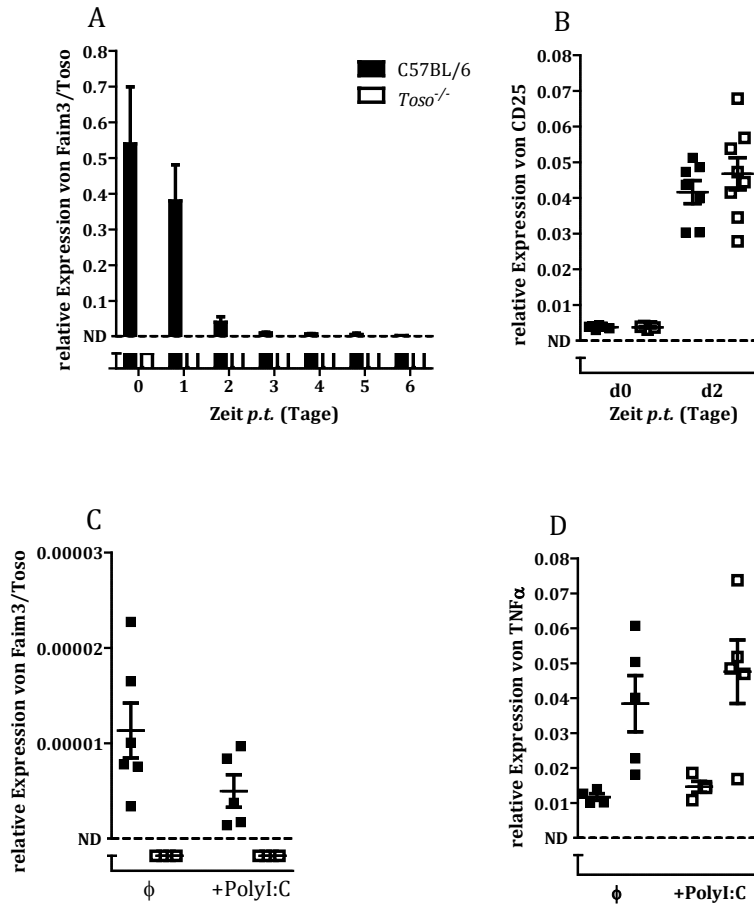


Abbildung 4.4.: Transkriptioneller Nachweis von Toso mRNA in aktivierten T-Zellen (A) und dendritischen Zellen (C). Die Genexpression wurde in der quantitativen *real time* PCR unter der Verwendung von SYBR®Green als Farbreagens gemessen und als relative Expression ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) abgeglichen auf GAPDH als Referenzgen angegeben (Kapitel 3.2.1). Konnte ein Transkript nach 40 Zyklen nicht amplifiziert werden, galt dieses als nicht detektierbar (ND). A-B) $0,5 \times 10^6$ T-Lymphozyten der Milz und Lymphknoten aus C57BL/6J (■) und *Toso*^{-/-} Mäusen (□) wurden mittels Pan T-Cell MACS-Sorts isoliert und mit α CD3/ α CD28 stimuliert (Kapitel 3.2.4.6; Kapitel 3.2.4.8). An den angegebenen Zeitpunkten wurde die RNA isoliert (Kapitel 3.2.1) und die Genexpression von Toso (A) und CD25 als Referenzmarker für die Aktivierung der T-Zellen (B) gemessen (n=5-8). C-D) 3×10^6 BMDCs aus *Toso*^{-/-} (□) und C57BL/6J (■) Knochenmark wurden unter der Verwendung von GM-CSF generiert und d10 des Differenzierungsprozesses mit 1 μ g/ml PolyI:C 24 h stimuliert. Anschließend wurde die Expression von Toso und TNF α , welches als Indikationsgen für die Aktivierung der Zellen diente, gemessen (n=4-6).

Die transkriptionelle Regulation von Toso mRNA wurde in der quantitativen *real time* PCR untersucht (Kapitel 3.2.1). Zur Untersuchung der Expression in T-Lymphozyten wurden naive aufgereinigte T-Zellen zervikaler, mediastinaler, axillarer, sowie inguinaler Lymphknoten und der Milz im Proliferationsassay unter der Verwendung der α CD3/ α CD28-Aktivierung über mehrere Tage stimuliert (Kapitel 3.2.5.8) und an den entsprechenden Zeitpunkten die Transkriptmengen von Toso bestimmt. Als ein Kontrollgen für die Aktivierung der T-Zellen wurde die Expression des IL-2R α (CD25) gewählt, dessen Expression abhängig von der TCR-Stimulation steigt (Abbas et al., 2005).

Korrelierend mit der Literatur konnten große Mengen an Toso mRNA in naiven T-Zellen von C57BL/6J nachgewiesen werden, welche in zeitlicher Abhängigkeit der Stimulation herunterreguliert wurde (*Abbildung 4.4.A*). In *Toso*^{-/-} T-Zellen konnte keine Transkription von *toso* detektiert werden. Der Aktivierungszustand der T-Zellen wurde durch die Genregulation von Toso nicht vermindert und zeigt zumindest auf der Ebene der RNA keine Aktivierungsunterschiede zwischen *Toso*^{-/-} und C57BL/6J T-Lymphozyten (*Abbildung 4.4.B*).

Die Expression von Toso auf dendritischen Zellen wurde ebenfalls auf der RNA-Ebene untersucht (*Abbildung 4.4.C*). Hierzu wurden 3×10^6 BMDCs aus dem Knochenmark von C57BL/6J und *Toso*^{-/-} Tieren unter der Verwendung von GM-CSF als Differenzierungsstimulus generiert und d10 nach Differenzierungsbeginn mit PolyI:C (1 µg/ml) 24 h stimuliert. Als aktivierungsinduziertes Kontroll-Genprodukt wurde die Transkriptmenge von TNF α verwendet, welche in Zellen beider Genotypen vergleichbar anstieg (*Abbildung 4.4.D*). Die Expression von Toso zeigte keine signifikante Regulation, was zu den bereits publizierten Daten passt (Abbas et al., 2005). In *Toso*^{-/-} cDCs konnten auch nach 40 Zyklen keine detektierbaren Transkriptmengen von Toso amplifiziert werden.

In den vorrangegangenen Experimenten konnte ein deutlicher Phänotyp der *Toso*^{-/-} Mäuse während einer viralen Infektion gezeigt werden. Die beschriebenen Effekte sind an das Immunsystem geknüpft. Der Austausch des Knochenmarks in den Chimären konnte den Phänotyp weitestgehend umkehren und wies auf eine funktionelle Wirkung der Toso Expression auf den für eine virale Infektion relevanten Zellen hin. In *Toso*^{-/-} Mäusen konnte eine deutliche Minderung in den Frequenzen von B-Lymphozyten im naiven Blut gemessen werden, die für eine akute virale Infektion mit LCMV jedoch eine untergeordnete Rolle spielte (*Anhang 6.2*). Die B-Zell Expansion zeigte während der Infektion keine Auffälligkeiten und die Generierung von Antikörpern konnte vergleichbar mit C57BL/6J detektiert werden.

4.2. T-Zell Aktivierung durch dendritische Zellen

Dendritische Zellen sind spezialisierte Antigen präsentierende Zellen, die entsprechend ihrer Herkunft in Subgruppen unterteilt werden. Die konventionellen DCs (cDCs), welche wiederum in lymphoide CD8⁺ und myeloide CD8⁻ unterteilt werden, sind relativ kurzlebig und werden durch den Blutfluss von den gemeinsamen Vorläufern aus dem Knochenmark

ersetzt. Sie unterscheiden sich maßgeblich von den langlebigen in der Infektion aus Monozyten entstehenden inflammatorischen (iDCs) sowie den TipDCs (TNF α /iNOS producing dendritic cells).

Welche der Zellepopulationen das Priming naiver T-Lymphozyten vornimmt ist sehr umstritten. Die iDCs sind in der Lage T-Zellen zu aktivieren und Proliferation zu induzieren (Geissmann et al., 2003). Sie sind, wie auch bereits *in vivo* gezeigt, in der Lage spezifische CTL bei *Influeza* induzieren zu können (Aldridge et al., 2009). Untersuchungen konnten zeigen, dass die T-Zell Aktivierung *in vivo* ca. 48 h nach Eintritt der T-Zellen in die lymphatischen Organe vollzogen ist (Hugues et al., 2004; Mempel et al., 2004; Miller et al., 2004). Dies gilt für CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen im gleichen Maße. Ob nun die cDCs oder die iDCs beim Priming der T-Zellen während einer Infektion mit LCMV von Bedeutung sind, wurde in der *CCR2*^{-/-} Maus untersucht.

Deletion von CCR2

Während einer Infektion wandern Monozyten unter dem Einfluss von CCL2 vermehrt in die Peripherie ein und entwickeln sich durch die Einwirkung der Typ I und II Interferone zu iDCs (Cella et al., 1999; Randolph et al., 1999; Siegal et al., 1999). CCR2 ist ein Chemokinrezeptor, welcher auf Monozyten exprimiert wird und für die Egression der Zellen aus dem Knochenmark verantwortlich ist (Serbina and Pamer, 2006). Verglichen mit C57BL/6J zeigt die *CCR2*^{-/-}Maus signifikante Unterschiede in der Frequenz der peripheren Monozyten und stellt somit ein geeignetes Modell zur Untersuchung des Einflusses der iDCs auf die CD8⁺T-Lymphozyten dar. Die Anzahl der Lymphozyten sowie der konventionellen dendritischen Zellen unterschied sich naiv nicht signifikant von den C57BL/6J-Tieren (*Abbildung 4.5.A-B*).

Die Entwicklung der iDCs wurde in der *CCR2*^{-/-} Maus während einer viralen Infektion mit 2×10^6 PFU LCMV WE untersucht. Eine deutliche Population der iDCs konnte ab d6 *p.i.* in der Milz und Leber der C57BL/6J-Tiere nachgewiesen werden (Meryk, Funkner et al., *unpublizierte Daten*). Die verringerte periphere Anzahl der Monozyten in der *CCR2*^{-/-} Maus konnte auch während der Infektion nicht kompensiert werden und resultierte in der signifikant reduzierten Entwicklung der iDCs d6 *p.i.* (*Abbildung 4.5.A, C*).

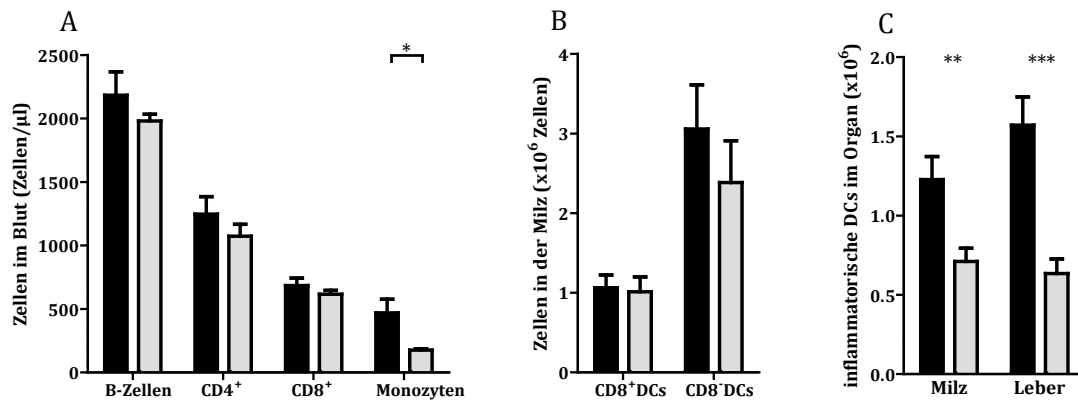


Abbildung 4.5.: Untersuchung der *CCR2*^{-/-} Maus A) Erfassung der Blutleukozyten im naiven Zustand von *CCR2*^{-/-} (graue Balken) und Kontroll-C57BL/6J Mäusen (schwarze Balken) in der Durchflusszytometrie wie im Kapitel 3.2.3.2 beschrieben mit jeweils 4 Tieren pro Gruppe. Die B-Zellen wurden mit α CD19 und α B220 gefärbt. T-Lymphozyten wurden mit α CD3 ϵ gefärbt und nach CD4⁺ (α CD4) sowie CD8⁺ (α CD8 β) T-Zellen aufgetrennt. Als Monozyten galt die GR1^{im}Ly6C^{hi}Population. B) Die Frequenzen der lymphoiden CD8⁺ (CD8 α +CD11c^{hi}Ly6C^{lo}CD11b⁻) und myeloiden CD8⁻ (CD8 α -CD11c^{hi}Ly6C^{lo}CD11b⁺) cDCs in der naiven *CCR2*^{-/-} (graue Balken) und C57BL/6J-Maus (schwarze Balken) wurden in der Milz nach einem Liberase/DNase Verdau in insgesamt vier Tieren pro Gruppe in zwei unabhängigen Versuchsansätzen bestimmt (Kapitel 3.2.5.7). C) Die Entwicklung der inflammatorischen dendritischen Zellen (CD11b⁺CD11c^{im-hi}Ly6C^{im}) während einer akuten Virusinfektion mit 2×10^6 PFU des LCMV WE wurde in den *CCR2*^{-/-} sowie Kontrolltieren in der Durchflusszytometrie an d6 *p.i.* in der Milz und Leber mit insgesamt jeweils neun Tieren in drei unabhängigen Experimenten untersucht.

Trotz der verminderten Entwicklung inflammatorischer dendritischer Zellen (iDCs) in den *CCR2*^{-/-} Mäusen während der Infektion, zeigte die zytotoxische T-Zell Antwort vergleichbare Expansion und Zytotoxizität (Abbildung 4.6.A-B). In der Milz der *CCR2*^{-/-} Tiere konnte sogar eine signifikant verbesserte IFN γ -Produktion nachgewiesen werden (Abbildung 4.6.B). Sowohl die Titer im Serum (Abbildung 4.6.C) als auch in den Organen (Meryk, Funkner et al., *unpublizierte Daten*) zeigten weder in einem akuten noch in einem chronischen Infektionsmodell mit LCMV (Meryk, Funkner et al., *unpublizierte Daten*) nachteilige Effekte für die Aktivierung der CD8⁺ T-Lymphozyten (Abbildung 4.6.C).

Zusammenfassend kann man sagen, dass in der akuten Infektion mit LCMV die Rolle der iDCs für die Aktivierung der CD8⁺ T-Lymphozyten untergeordnet ist und die verminderte Frequenz dieser DC-Population keinen Nachteil in der Generierung einer intakten CTL-Antwort darstellt. Somit ist die verminderte Anzahl der Monozyten, sowie die resultierende Menge der iDCs in der *Toso*^{-/-} Maus (Anhang 6.3) nicht mit dem viralen Phänotyp zu verknüpfen.

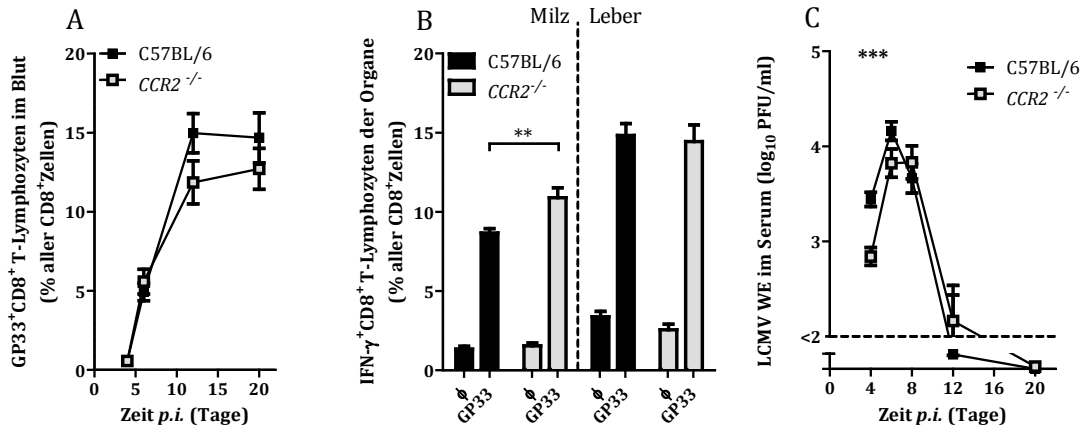


Abbildung 4.6.: Akute virale Infektion mit LCMV WE in der *CCR2*^{-/-} Maus. *CCR2*^{-/-} und Kontroll-C57BL/6j Mäuse wurden mit 2×10^6 PFU des LCMV WE *i.v.* infiziert und die spezifische CTL (A), die Zytotoxizität (B) und die viralen Titer (C) der Tiere an den ausgewiesenen Tagen *p.i.* gemessen. A) Zeitabhängige Expansion GP33 spezifischer CD8⁺ T-Zellen im Blut der Tiere gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen wie im Kapitel 3.2.5.6 beschrieben. B) Intrazelluläre Produktion von IFN γ in den CD8⁺ T-Zellen der mit Liberase/DNase verdauten Milz und Leber d6 *p.i.* nach einer *ex vivo* Restimulation mit synthetischem Oligopeptid des LCMV (GP33) sowie unstimulierten Kontrolle (ϕ) (Kapitel 3.2.5.7). C) Zeitabhängige Virustiterbestimmung im Blut der infizierten Tiere.

4.3. Toso Expression auf DCs ist notwendig für ein optimales Priming

Virale Aufnahme

Die Virusaufnahme aus dem Blutfluss zählt zu den wichtigsten Schritten in der Pathogenabwehr und ist maßgeblich für den weiteren Verlauf der Infektion (Lang, 2010). Das LCMV ist bereits innerhalb weniger Minuten nach der Infektion kaum im Blut nachweisbar. Die Aufnahme virulenter Partikel aus dem Blut der *Toso*^{-/-} Mäuse wurde nach der intrazellulären Verabreichung von 2×10^6 PFU LCMV WE zeitabhängig untersucht. Die Virustiter waren innerhalb der ersten 90 min auch in *Toso* defizienten Mäusen verglichen mit C57BL/6J-Kontrolltieren nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 4.7.A). Nach dem anfänglichen Peak 2 min nach der intravenösen Verabreichung des Virus wurden diese innerhalb der folgenden 90 min fast vollständig herausgefiltert. Folglich konnte man nach der Virusaufnahme den IFN α Anstieg im Serum der Tiere verzeichnen, welcher sich jedoch in der *Toso*^{-/-} Mäusen d1-2 *p.i.* signifikant von den C57BL/6J-Tieren unterschied (Abbildung 4.7.B).

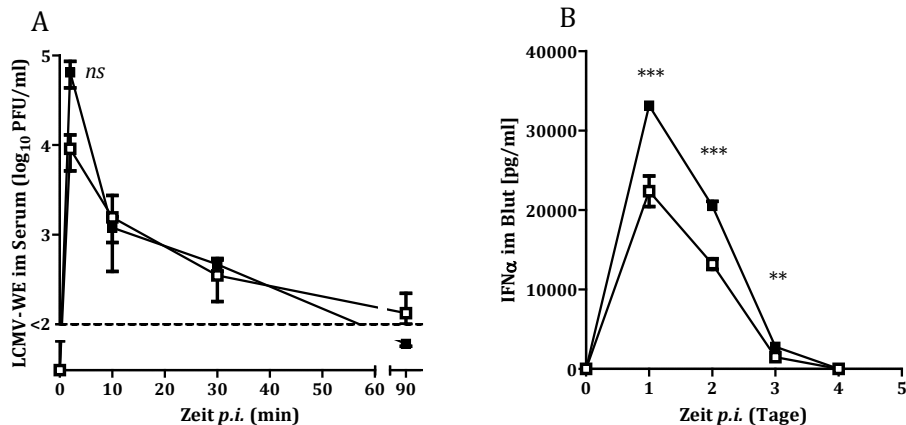


Abbildung 4.7.: Virusaufnahme und die antivirale IFN α -Produktion in *Toso*^{-/-} Mäusen. *Toso*^{-/-} (□) und C57BL/6J-Kontrollmäuse (■) wurden mit jeweils 2×10^6 PFU LCMV WE *i.v.* infiziert und A) die viralen Titer im Blut der Tiere zeitabhängig wie im Kapitel 3.2.5.4 beschrieben mit sechs (C57BL/6J) bzw. vier (*Toso*^{-/-}) Tieren in zwei unabhängigen Versuchen bestimmt. „ns“ steht für nicht signifikant unterschiedlich. B) Bestimmung des Blutlevels an IFN α während der Infektion mittels eines ELISAs mit jeweils vier Tieren an d1, sieben Tieren an d2 und drei Tieren an d3 *p.i.* (Kapitel 3.2.2).

Eine vergleichbare virale Aufnahme ist ein essentieller Schritt in der Initiierung der zytotoxischen T-Zell-Antwort und somit entscheidend für die Virusklärung. Die Aufnahme der Pathogene wird von den gewebeständigen Makrophagen vorgenommen und zeigt in den *Toso*^{-/-} Mäusen keine Fehlfunktion (Anhang 6.4). Die verringerte Produktion der Typ I Interferone deutet auf eine verminderte Aktivierung der plasmazytoiden DCs (pDCs) hin, zeigt jedoch eine ca. 30%ige Reduktion des Zytokinlevels. Die Untersuchung einer möglichen Auswirkung des Aktivierungszustandes von DCs wurde im Folgenden untersucht.

Entwicklung konventioneller dendritischer Zellen

Die Entwicklung dendritischer Zellen aus dem Knochenmark wurde *in vitro* untersucht (Inaba et al., 1992; Lutz et al., 1999). Die Frequenz der sich in Kultur entwickelnden DCs (BMDC), welche als CD11c^{hi}Ly6C^{lo} klassifiziert wurden, unterschied sich nicht von denen des C57BL/6J-Ursprungs (Abbildung 4.8.A). Interessant war jedoch, dass der Aktivierungsstatus der Zellen ein völlig anderer war. Hierzu dienten die mit der Antigenpräsentation zusammenhängende Oberflächenmoleküle MHC I und MHC II, sowie das kostimulatorische Molekül CD80, welches über die Bindung an CD28 ein für das Priming naiver T-Lymphozyten essentielles Signal vermittelt (DeBenedette et al., 1997; Harding et al., 1992). Die Expression der Oberflächenmarker CD80, MHC I und MHC II war auf *Toso* defizienten Zellen signifikant niedriger als die der C57BL/6J-DCs. Lediglich das

Integrin CD11b konnte auf einem erhöhten Expressionslevel detektiert werden (Abbildung 4.8.B-E).

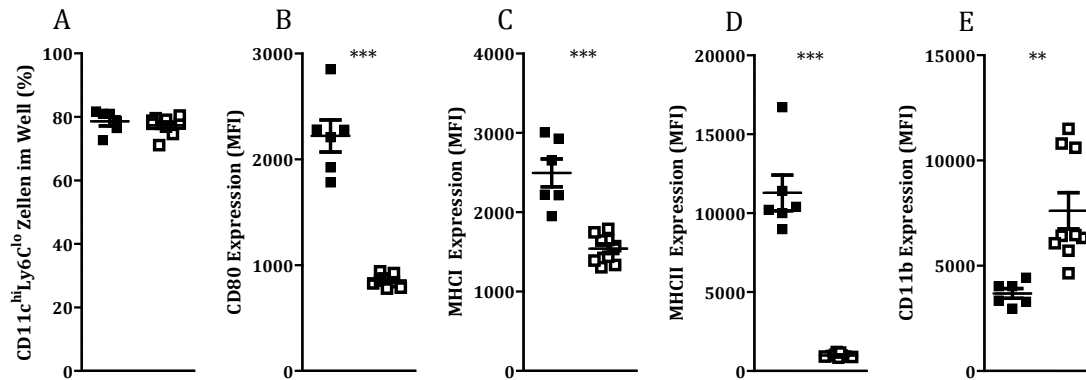


Abbildung 4.8: Entwicklung konventioneller dendritischer Zellen aus dem Knochenmark (BMDCs) von *Toso*^{-/-} (□) und C57BL/6J (■) Tieren *in vitro* nach dem Protokoll wie im Kapitel 3.2.4.5 beschrieben. A) Prozentueller Anteil BMDCs im Well unter der Verwendung von GM-CSF d10 des Differenzierungsprozesses klassifiziert als die DAPI-CD11c^{hi}Ly6C^{lo} Population im Durchflusszytometer B-E) Die durchflusszytometrische Messung der Oberflächenexpression der cDCs (DAPI-CD11c^{hi}Ly6C^{lo}) von CD80 (B), MHC I-II (C und D) sowie CD11b (E) auf BMDCs d10 des Differenzierungsprozesses erfolgte nach einem Fc-Block mit αCD16/αCD32 wie im Kapitel 3.2.3.1 beschrieben.

Unter dem Einfluss inflammatorischer Zytokine entwickeln sich in den ersten Tagen der Infektion die im Gewebe befindlichen PrädDCs zu vollständig reifen und aktivierten dendritischen Zellen (Jonuleit et al., 1997). Zudem nehmen die so genannten ruhenden DCs das Zytokinsignal wahr und wechseln in einen Aktivierungszustand (Ritter et al., 2003). Hierbei werden viele Oberflächenmarker hochreguliert, welche dendritischen Zellen eine Kommunikation mit anderen Zellen erlauben und ihr Wanderungsverhalten sowie ihr Antigenaufnahmeverhalten ändern (Garrett et al., 2000; West et al., 2000). TNF α ist neben dem antiviral wirkenden IFN α und dem für die Entwicklung der DCs wichtigen GM-CSF eines dieser frühen Zytokine (Abbildung 4.9.B) (Ritter et al., 2003) und steht zudem noch im Zusammenhang das Signaling über Toso und RIP1 zu kanalisieren (Nguyen et al., 2011).

Die Untersuchung der Produktion von GM-CSF und TNF α während einer Infektion mit 2×10^6 PFU LCMV WE in den *Toso*^{-/-} Mäusen erfolgte mittels *real time* PCR in der Milz und der Leber (Abbildung 4.9). Die Analyse zeigte keine signifikanten Unterschiede zu den C57BL/6J Kontrollen in der Expression beider Zytokine im naiven Zustand der Tiere. Während die Milz bereits eine Expression von GM-CSF zeigte (Abbildung 4.9.A), konnte die mRNA in der Leber kaum über dem Detektionslimit gemessen werden (ND). Zudem konnte keinerlei Regulation der Genexpression während der frühen Infektion (d2 *p.i.*) sowie auch bis d8 *p.i.* in der Milz detektiert werden (Anhang 6.5). TNF α dagegen wurde

naiv in der Milz und Leber kaum exprimiert und d2 *p.i.* als deutliches Anzeichen der Frühinflammation in der Milz um ca. das Zehnfache hochreguliert (Abbildung 4.9.B). Hier zeigten die *Toso*^{-/-} Mäuse eine verglichen mit den C57BL/6J-Kontrollen signifikant niedrigere Expression des Zytokins, was zu dem verminderten IFN α -Level passte (Abbildung 4.7.B).

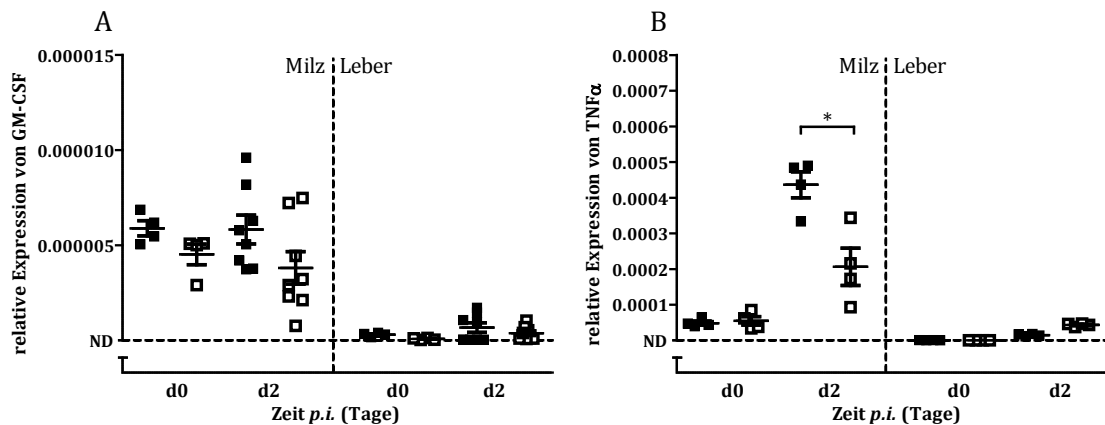


Abbildung 4.9.: Die Transkription von GM-CSF und TNF α naiv (d0) und während einer viralen Infektion mit 2×10^6 PFU des LCMV WE (d2 *p.i.*) in der Milz und Leber von *Toso*^{-/-} (□) und Kontroll-C57BL/6J Mäusen (■) mit jeweils insgesamt 4-8 Tieren in 2-3 unabhängigen Versuchsansätzen. Die relativen Transkriptmengen von GM-CSF (A) und TNF α (B) wurden in der quantitativen *real time* PCR unter der Verwendung von SYBR®Green als Farbreagens gemessen und als relative Expression (2^{-dCt}) abgeglichen auf 18S rRNA als Referenzgen angegeben. Wurde auch nach 40 PCR-Zyklen kein Transkript nachgewiesen, galt dieses als nicht detektierbar (ND).

Die Reifung und gleichzeitige Aktivierung dendritischer Zellen wurde unter dem Einfluss von TNF α untersucht und die Aktivierungsmarker in der Durchflusszytometrie analysiert. Die DC-Population wurde als CD11c^{hi}Ly6C^{lo} klassifiziert. Die Expression von MHC II und CD80 diente zur näheren Charakterisierung des Entwicklungsstatus der DCs und wurde im Zuge der TNF α -Behandlung verglichen. Das Zytokin wurde entweder direkt mit dem GM-CSF an d0 oder zeitlich verzögert an d3 hinzugegeben. Die Entwicklung der dendritischen Zellen wurde d6 des Differenzierungsprozesses analysiert.

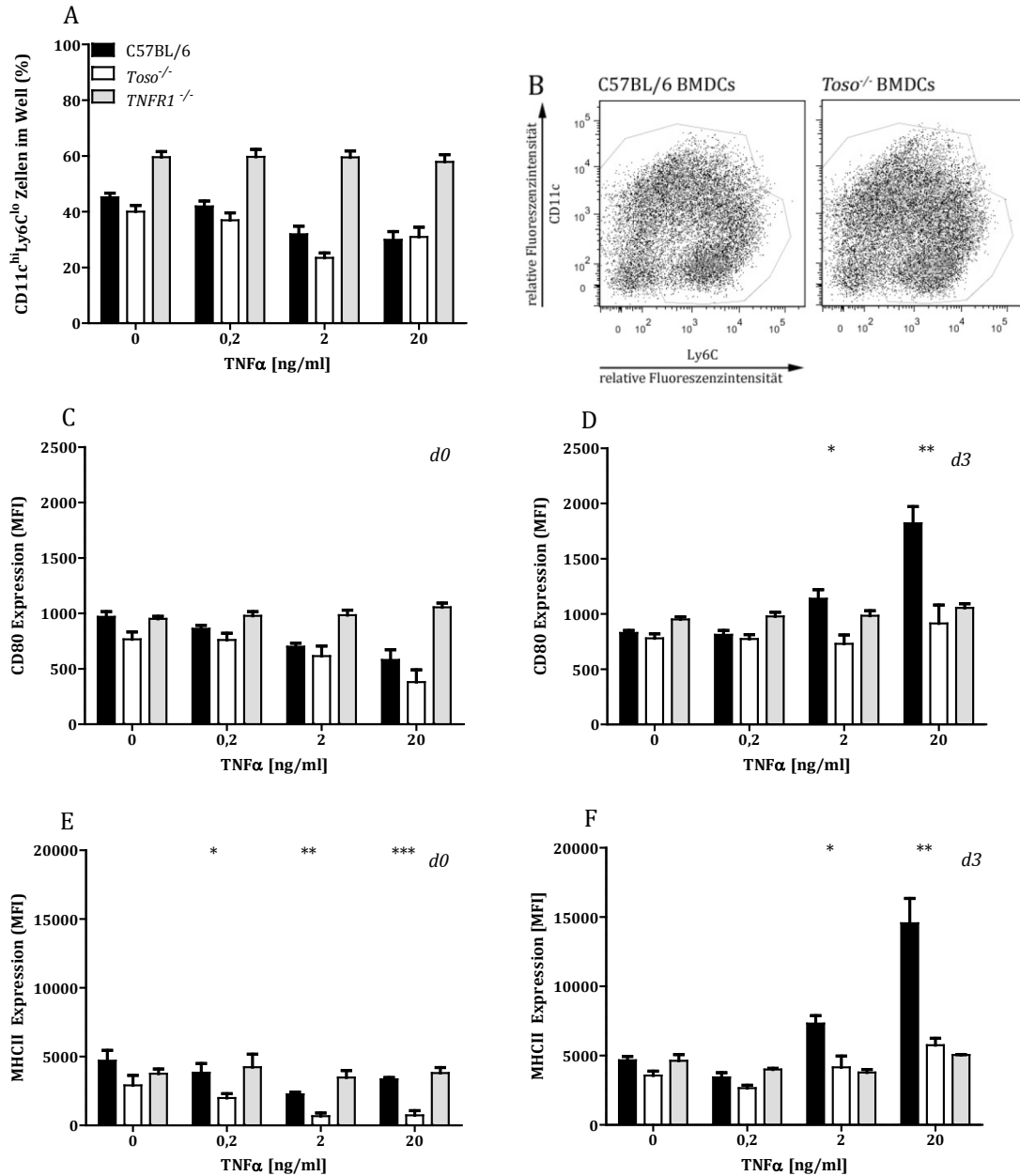


Abbildung 4.10.: Entwicklung und Reifung dendritischer Zellen aus dem Knochenmark von *Toso*^{-/-} (weiße Balken) und C57BL/6] (schwarze Balken), sowie *TNFR1*^{-/-}Mäusen (graue Balken) als Behandlungskontrolle *in vitro* unter der Verwendung von GM-CSF (Kapitel 3.2.4.5). BMDCs (CD11c^{hi}Ly6C^{lo}) mit und ohne Zusatz von TNFα wurden an d6 des Differenzierungsprozesses geerntet und im Durchflusszytometer auf die Quantität sowie die Qualität bezüglich der Oberflächenmarker CD80 und MHC II untersucht. A) Frequenz der CD11c^{hi}Ly6C^{lo} Zellen im Well abhängig von der TNFα Konzentration B) DotPlot Analyse der Zellen im Well ohne Zugabe von TNFα mit dem oberen DC-Gate (CD11c^{hi}Ly6C^{lo}) und dem unteren PrädC-Gate (CD11c^{lo-im}Ly6C^{hi}) C-D) Expression von CD80 abhängig von der TNFα-Konzentration bei direkter (C) und zeitlich verzögerter (D) Zugabe des Zytokins E-F) Expression von MHCII abhängig von der TNFα-Konzentration bei direkter (E) und zeitlich verzögerter (F) Zugabe des Zytokins.

Während der prozentuelle Anteil der sich d6 *p.t.* aus dem Knochenmark entwickelten dendritischen Zellen (BMDCs) der *Toso*^{-/-} Maus nicht signifikant von dem C57BL/6]-

Ursprung unterschied und keine Abhängigkeit von TNF α suggerierte (Abbildung 4.10.A-B), zeigte die Oberfläche differenzielle Expression von CD80 und MHC II (Abbildung 4.10.C-F). Dieser Effekt wurde zudem noch zeitabhängig beobachtet. Die Zugabe des Zytokins bereits am Anfang des Differenzierungsprozesses verhinderte die Heraufregulation von MHC II und CD80. Die Suppression von MHC II durch TNF α erfolgte in der *Toso*^{-/-} BMDCs signifikant stärker als in den C57BL/6J-Zellen (Abbildung 4.10.C, E). Die spätere Zugabe von TNF α an d3 der Differenzierung zeigte einen stimulierenden Effekt auf die Expression dieser Oberflächenmoleküle auf den bereits determinierten Vorläufern konzentrationsabhängig. Während die BMDCs des C57BL/6J-Ursprungs beide Marker mit ansteigender Zytokinkonzentration heraufregulierten, zeigten *Toso* defiziente BMDCs ein ähnliches Verhalten wie die *TNFR1*^{-/-} BMDCs, welche als negative Kontrolle im Experiment dienten (Abbildung 4.10.D, F). *Toso*^{-/-} BMDCs konnten weder bei hohen noch bei niedrigen Zytokinkonzentrationen die Expression von CD80 und MHC II regulieren. Eine Behandlung mit dem Zytokin anschließend an die Differenzierung d10 der Kultur hatte in beiden Genotypen keinen Effekt auf die Anzahl und Qualität der sich entwickelnden dendritischen Zellen (Abbildung 4.11).

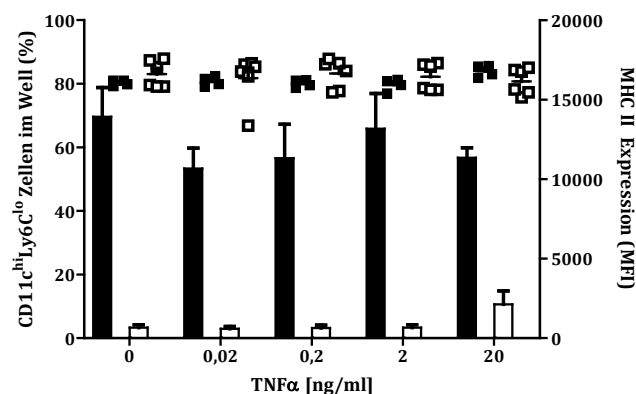


Abbildung 4.11.: TNF α Behandlung der ausdifferenzierten BMDCs d10 nach Differenzierungsbeginn. Unter dem Differenzierungstimulus von GM-CSF generierte BMDCs aus dem Knochenmark von C57BL/6J (schwarze Balken bzw. ■) und *Toso*^{-/-} Mäusen (helle Balken bzw. □) wurden d10 nach Differenzierungsbeginn mit ansteigender Konzentration von TNF α über einen Zeitraum von 36 h behandelt und anschließend der prozentuelle Anteil von ausdifferenzierten BMDCs (DAPI-CD11c^{hi}Ly6C^{lo}) (■ und □, linke Y-Achse) sowie die Expression von MHC II auf den DCs (Balken, rechte Y-Achse) im Durchflusszytometer bestimmt. Die Untersuchung erfolgte mit insgesamt sechs Knochenmarkspendern pro Genotyp in zwei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Das in beschriebenen Experimenten verwendete Protokoll unter der Verwendung von GM-CSF generiert in einer C57BL/6J Kultur ein Gemisch aus nicht aktivierten, unreifen (immature) und leicht aktivierten, reifen (mature) dendritischen Zellen (Inaba et al., 1992; Lutz et al., 1999; Ritter et al., 2003). Die Expression von CD80 und MHC II diente zur

Klassifizierung dieser beiden Populationen. Als nicht aktivierte, unreife DCs wurden die $CD11c^{hi}Ly6C^{lo}$ Zellen bezeichnet, die $MHCII^{im}CD80^{im}$ exprimierten. Die DCs, die $MHCII^{hi}CD80^{hi}$ waren, wurden als reife DCs klassifiziert (Abbildung 4.12.A).

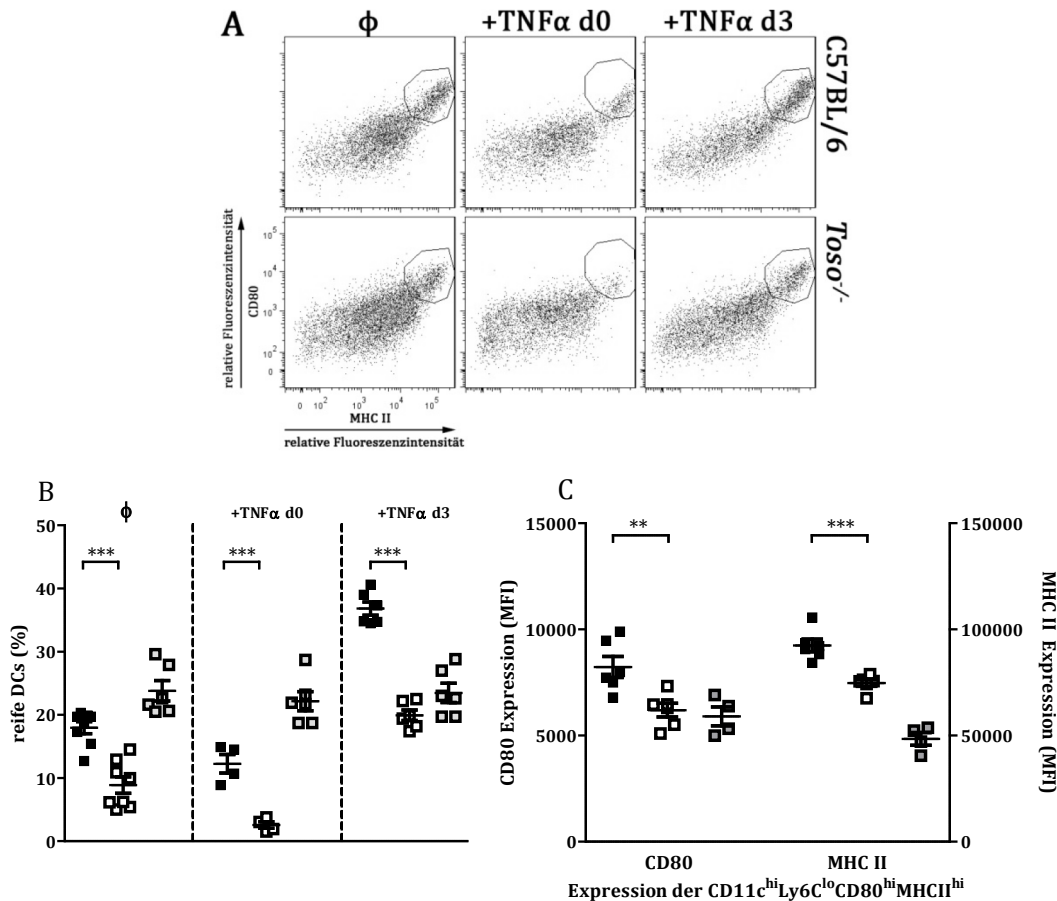


Abbildung 4.12.: Entwicklung reifer dendritischer Zellen unter der Verwendung von GM-CSF und zeitabhängiger Zugabe von TNF α . Die BMDCs aus dem Knochenmark von *Toso*^{-/-} (□), C57BL/6J (■) und *TNFR1*^{-/-} Mäusen (graue ■) wurden d6 des Differenzierungsprozesses im Durchflusszytometer untersucht und in reife, $CD11c^{hi}Ly6C^{lo}CD80^{hi}MHCII^{hi}$ und unreife, $CD11c^{hi}Ly6C^{lo}CD80^{im}MHCII^{im}$ DCs klassifiziert. A) DotPlot-Analyse der $CD11c^{hi}Ly6C^{lo}$ -Zellen (DCs) in *Toso*^{-/-} und C57BL/6J-Kultur mit der vertikalen Auftragung der Fluoreszenzintensität von CD80 und der horizontalen von MHC II, sowie der eingetragenen reifen DC-Population mit direkter (+TNF α d0) und zeitlich verzögerter Zugabe von 2 ng/ml TNF α an d3 (+TNF α d3), sowie ohne Zusatz des Zytokins (ϕ). B) Der prozentuelle Anteil der reifen DCs bezogen auf alle $CD11c^{hi}Ly6C^{lo}$ -Zellen in der Kultur d6 nach Differenzierungsbeginn bei direkter (+TNF α d0), während der Differenzierung (+TNF α d3), sowie ohne Zugabe des Zytokins (ϕ). C) Die Oberflächenexpression der reifen DC-Population ($CD11c^{hi}Ly6C^{lo}CD80^{hi}MHCII^{hi}$) von *Toso* defizienten (□), *TNFR1* defizienten (graue ■), sowie C57BL/6J (■) BMDCs d6 des Differenzierungsprozesses nach einer TNF α -Zugabe an d3 im Durchflusszytometer.

Unter der alleinigen Verwendung von GM-CSF entwickelten *Toso* defiziente Zellen prozentuell signifikant weniger ausgereifte DCs (ca. 10%) verglichen mit C57BL/6J-Kulturen (ca. 20%) (Abbildung 4.12.A-B). Durch die Zugabe von TNF α d0 der Differenzierung wurde die Ausbildung dieser Zellpopulation sowohl in der C57BL/6J als auch in der *Toso*^{-/-} Kultur um die Hälfte vermindert (beide $p \leq 0,05$). Die Zugabe des

Zytokins am dritten Tag der Differenzierung erhöhte die Ausbildung der reifen DCs beider Genotypen verglichen mit unbehandelten Kulturen stark (beide $p \leq 0,001$), konnte jedoch keine mit C57BL/6J-Kultur (ca. 40%) vergleichbaren Mengen an reifen DCs in der *Toso*^{-/-}-Kultur (ca. 20%) induzieren. Die TNFR1 defiziente Kultur zeigte keine Reaktion auf das Zytokin, weder in hohen noch in niedrigen Konzentrationen (*Abbildung 4.12.B*). Zudem konnte auch die Expression der Marker reifer DCs (CD11c^{hi}Ly6C^{lo}CD80^{hi}MHCII^{hi}) in *Toso*^{-/-}-Mäusen trotz der Zytokinbehandlung weiterhin auf einem signifikant niedrigeren Niveau detektiert werden (*Abbildung 4.12.C*).

In den vorrangegangenen Experimenten konnte die Entwicklung *Toso* defizienter DCs näher betrachtet werden. Während die Frequenzen der sich aus dem Knochenmark entwickelnden DCs keinen Unterschied zu den C57BL/6J-Kulturen zeigten, konnte eine differenzielle qualitative Entwicklung unter dem Einfluss inflammatorischer Zytokine GM-CSF und TNF α beobachtet werden. *Toso* defiziente BMDCs zeigen in Kultur ein vermindertes Reifungsverhalten auf die Behandlung mit TNF α hin und regulieren im Gegensatz zu C57BL/6J-BMDCs bei einer frühen Behandlung mit dem Zytokin sogar ihre Aktivierungsmarker herunter. Die Behandlung der DCs mit TNF α im mittleren Differenzierungsstadium konnte zwar auch in *Toso*^{-/-} BMDCs die Reifung stimulieren, zeigte jedoch eine nur halb so große Wirkung. Die Oberflächendichte von CD80 und MHC II blieb dabei unstimuliert und auf niedrigen Niveau.

4.3.1. Funktionelles Priming

in vitro Priming

Die Fähigkeit dendritischer Zellen naive T-Lymphozyten zu aktivieren wurde ebenfalls in Kultur getestet. Hierzu wurden spezifische TCR-*knock in* Mäuse (P14) des C57BL/6J Ursprungs sowie *Toso* defiziente TCR-*knock in* Tiere (*Toso*^{-/-}-P14) verwendet. Der TCR dieser Mäuse ist spezifisch für ein Oligopeptid des Glykoproteins des LCMV und stellt die Aminosäuren AS₃₃₋₄₁ dar (GP33). Das GP33 wird auf dem MHC I Molekül den CD8⁺ T-Lymphozyten präsentiert und ist in der akuten Infektion das immunogen stärkste Peptid des LCMV (Probst et al., 2003). Die P14 T-Zellen lassen sich durch die Zugabe des GP33 Oligopeptids spezifisch über den TCR aktivieren und stellen ein gutes System zu Untersuchung des Primingsverhaltens dar.

Die Aktivierung der T-Zellen während des Primings stellt eine Art Dialog zwischen dendritischen Zellen und T-Lymphozyten dar. Ist diese Kommunikation fehlerhaft, werden T-Zellen nicht ausreichend stimuliert, was fatale Folgen für die virale Kontrolle haben kann. Aus dieser Überlegung heraus wurde zunächst die Möglichkeit einer vollständigen und effizienten Aktivierung *Toso* defizienter T-Zellen geprüft. Die Expression wichtiger Oberflächenproteine, die mit der T-Zell Aktivierung in Verbindung gebracht sind, wurde im Vorfeld bei naiven T-Lymphozyten der C57BL/6J und *Toso*^{-/-} Mäuse sowie bei den nachfolgend untersuchten P14 und *Toso*^{-/-} P14-Tieren untersucht und zeigte in beiden Fällen keine differentielle Expression an CD25, CD28, ICAM, CD44, CD62L, CD69, IL7R, PD1 sowie einzelner Ketten des CD8/TCR-Komplexes (Abbildung 4.13).

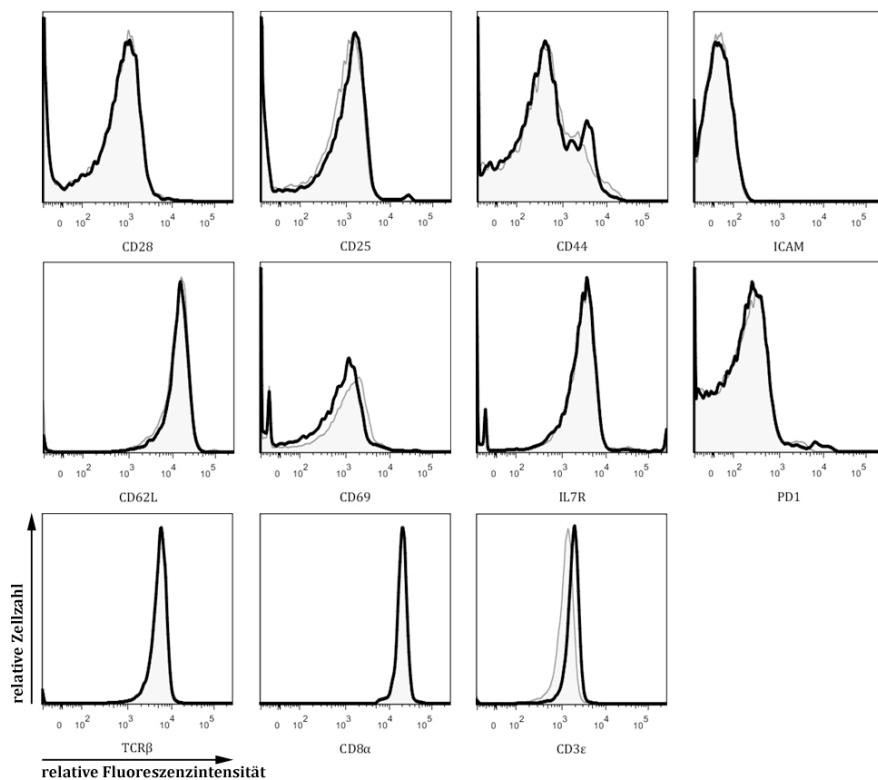


Abbildung 4.13.: Oberflächenmarker naiver CD8⁺ T-Lymphozyten der Milz von *Toso*^{-/-} (grau schattiert) und C57BL/6J-Kontrolltieren wurden gefärbt wie im Kapitel 3.2.3.1 beschrieben und in der Durchflusszytometrie untersucht. Dargestellt sind repräsentative Histogramme der CD8⁺ T-Zellen von vier unabhängig durchgeführten Versuchen mit jeweils zwei Tieren pro Gruppe. Keines der gezeigten Marker konnte auf der Oberfläche der T-Lymphozyten differentielldetektiert werden.

Eine Kokultur der aufgereinigten T-Zellen aus den Lymphknoten und der Milz der P14-Tiere beider Genotypen sowie der ohne Zusatz von TNF α generierten Peptidgelabelten BMDCs des C57BL/6J Ursprungs wurde 24 h nach der Zugabe der T-Lymphozyten durchflusszytometrisch untersucht (Abbildung 4.14-15). Die DCs wurden

12 h vor Versuchsbeginn mit dem synthetischen Zielpeptid GP33 und einem vergleichbaren Kontrollpeptid NP396 gelabelt, welche anschließend herausgewaschen wurden. Der Aktivierungszeitrahmen von 24 h ermöglichte die Bildung einer stabilen immunologischen Synapse zwischen der dendritischen Zelle und den T-Lymphozyten, reichte jedoch zur Proliferation nicht aus und veränderte somit nicht das Zellverhältnis zu einander (Hugues et al., 2004; Mempel et al., 2004; Miller et al., 2004).

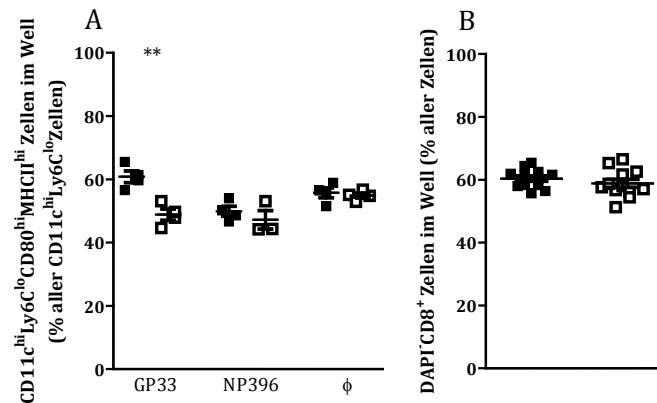


Abbildung 4.14.: Synaptische Interaktion der T-Lymphozyten mit primenden BMDCs. Mischkulturen aus Peptid-gelabelten (GP33 und NP396), sowie ungelabelten (ϕ) BMDCs generiert aus C57BL/6J Knochenmark unter der Verwendung von GM-CSF als Differenzierungsstimulus mit aufgereinigten T-Lymphozyten isoliert aus P14 (■) und *Toso*^{-/-} P14 (□) Mäusen wurden in einem Verhältnis von 1:2 (BMDCs:T-Zellen) gemischt und 24 h lang inkubiert. Anschließend wurden A) die Frequenzen reifer dendritischer Zellen (CD11c^{hi}Ly6C^{lo}CD80^{hi}MHCII^{hi}) sowie B) der Anteil DAPI-T-Lymphozyten durchflusszytometrisch bestimmt. Die Frequenzen der DCs wurden auf alle DCs in der Mischkultur bezogen, die der T-Lymphozyten auf die Gesamtheit der Zellen im Well.

Die Frequenz der DAPI-CD8⁺T-Lymphozyten zeigte zwischen P14 und *Toso*^{-/-} P14 Kokulturen keine Unterschiede (Abbildung 4.15.B). Als Anzeichen einer spezifischen T-Zellaktivierung konnte die Regulation der Oberflächendichte einiger Ketten des TCR untersucht werden (Valitutti et al., 1997), welche innerhalb kurzer Zeit nach der Stimulation mit dem Antigen internalisiert werden. Sowohl die CD3 ϵ - als auch die TCR β -Kette auf CD8⁺ T-Zellen wurden nur nach der Zugabe des spezifischen Peptids GP33 unabhängig vom Genotyp der T-Zellen herunterreguliert (Abbildung 4.15). Die Expression des CD8 α veränderte sich kaum. Interessanterweise war die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD28, sowie der Aktivierungsmarker CD62L, CD69, CD44, ICAM und des IL-2 Rezeptors CD25 auf der Oberfläche *Toso* defizienter P14 CD8⁺ T-Zellen nach Aktivierung signifikant höher als in den P14-Kokulturen (Abbildung 4.15). Zudem wurde auf der Oberfläche der *Toso*^{-/-} T-Zellen das PD1, welches im Zusammenhang steht Exhaustion zu fördern, verstärkt detektiert, wohingegen der IL7R im Gegensatz zu P14-CD8⁺ T-Zellen kaum reguliert wurde (Abbildung 4.15).

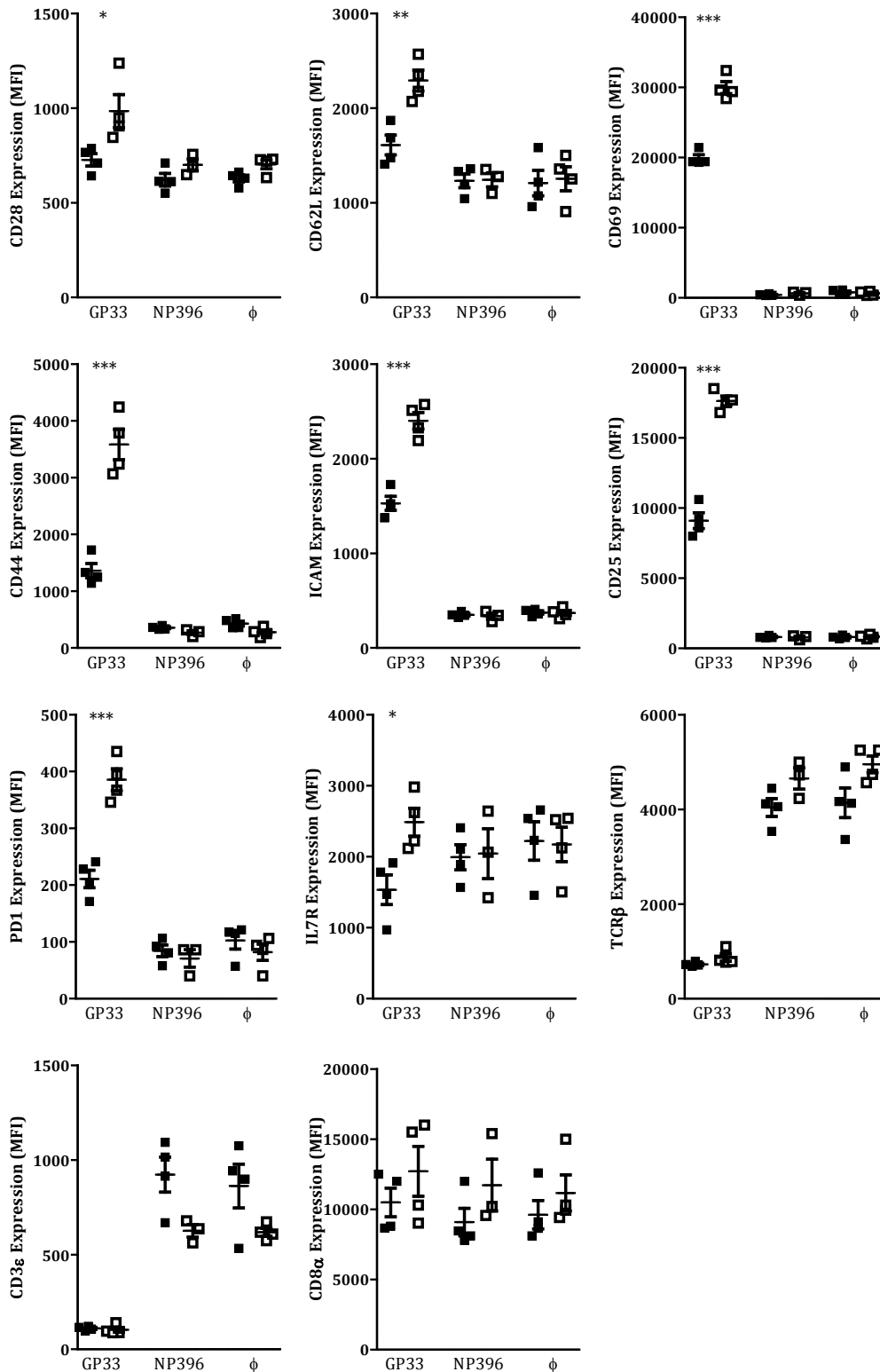


Abbildung 4.15.: Spezifische Aktivierung der CD8⁺ T-Lymphozyten innerhalb der immunologischen Synapse. Die Untersuchung erfolgte unter der Verwendung von Mischkulturen aus Peptid-gelabelten (GP33 und NP396), sowie ungelabelten (ϕ) dendritischen Zellen (BMDCs) generiert aus dem Knochenmark von C57BL/6J-Mäusen (vier verschiedene Spender) und aufgereinigten T-Lymphozyten (Kapitel 3.2.4.6) der P14 (\blacksquare) sowie *Toso*^{-/-} P14 Mäuse (\square) in einem Mischverhältnis von 1:2 (BMDCs:T-Zellen) nach einer Inkubationszeit von 24 h im Durchflusszytometer. Die T-Lymphozyten wurden auf DAPI-CD3 ϵ ⁺CD8 β ⁺ vorgegattet und die entsprechende Oberflächenexpression der Marker untersucht.

Aktivierte T-Zellen sind zudem für die Heraufregulation der Aktivierungsmarker auf den primenden APCs als fördernd beschrieben worden (Schoorhuis et al., 2000). So wurde auch die Reifung der aktivierten Population dendritischer Zellen (CD11c^{hi}Ly6C^{lo}MHCII^{hi}CD80^{hi}) in der oben beschriebenen Mischkultur analysiert (*Abbildung 4.14.A*). Interessanterweise waren die Toso defizienten P14 T-Lymphozyten trotz ihres höheren Aktivierungsstatus nicht in der Lage das ihrerseits notwendige Signal für die Reifung der DCs zu liefern. Während die Bildung der CD11c^{hi}Ly6C^{lo}MHCII^{hi}CD80^{hi} Zellen durch die P14 T-Zellen bereits in dieser Zeitperiode begünstigt wurde, war auch in diesem Experiment kein Reifungsstimulus in Kulturen mit Toso defizienten T-Zellen zu vermerken (*Abbildung 4.14.A*).

Eine mögliche Auswirkung dieser fehlenden Signale für ein funktionelles Priming wurden in der Untersuchung der durch die T-Zell Aktivierung entstehenden Proliferationscluster bestimmt. 36 h nach TCR-Stimulus wurden die Kokulturen im Hinblick auf die Clusterbildung lichtmikroskopisch untersucht. Hierfür wurden sowohl Peptid-gelabelte C57BL/6J-BMDCs als auch *Toso*^{-/-}-BMDCs verwendet und in einer Kokultur mit P14 oder *Toso*^{-/-} P14 T-Zellen in einem Mischverhältnis von 1:2 (BMDCs:T-Zellen) inkubiert. In den Kulturen mit C57BL/6J-BMDCs konnte ein deutliches aktivierungsspezifisches Proliferationspotential beobachtet werden (*Abbildung 4.16-Bildgruppe A*). Anschließend an die Kontaktaufnahme zu den gelabelten DCs konnten Proliferationscluster CD8⁺ T-Lymphozyten beobachtet werden, welche interessanteweise in den Kulturen mit *Toso*^{-/-} P14 T-Zellen deutlich stärker expandierten (*Abbildung 4.16.- Bildgruppe A, Spalte 1-2; Bildgruppe C*). Die BMDCs vom *Toso*^{-/-} Ursprung konnten trotz sichtbarer Kontaktaufnahme zu den T-Zellen (*Abbildung 4.16-Bildgruppe D*) keine vergleichbare Expansion oder ähnliche Proliferationskonglomerate induzieren (*Abbildung 4.16-Bildgruppe B, Spalte 1-2*).

Anschließend wurde die Zytokinantwort in den Kokulturen untersucht (*Abbildung 4.17*). Die IL-2 Produktion der T-Zellen war beim Priming durch die *Toso*^{-/-} BMDCs leicht vermindert. Der Genotyp der T-Zellen war hierfür nicht ausschlaggebend (*Abbildung 4.17.A*). Die IFN γ -Produktion und somit die Zytotoxizität der T-Zellen zeigte dagegen keine signifikanten Unterschiede zwischen dem C57BL/6J- und dem Toso defizienten Priming (*Abbildung 4.17.B*). Interessanterweise betrug jedoch die IFN γ -Produktion der *Toso*^{-/-} P14 T-Zellen ca. das Doppelte verglichen mit P14 T-Zellen unabhängig welche DCs geprimt haben, was zum stärkeren Aktivierungszustand der T-Zellen bezüglich der Oberflächenmarker 24 h nach Aktivierung passte (*Abbildung 4.15*). Die Produktion des TNF α war ähnlich wie das IL-2 in den Kokulturen mit Toso defizienten

DCs verglichen mit dem Priming der C57BL/6J-BMDCs niedriger, in den Kulturen mit *Toso*^{-/-} P14 T-Zellen verglichen mit P14 T-Zellen jedoch stets signifikant höher (Abbildung 4.17.C). Da nun sowohl die T-Zellen, als auch die DCs nach Aktivierung und gegenseitiger Kontaktaufnahme TNF α produzieren, wurden die regulatorischen Einwirkungen der T-Zellen auf die dendritischen Zellen bezüglich anderer Zytokine untersucht (Abbildung 4.18).

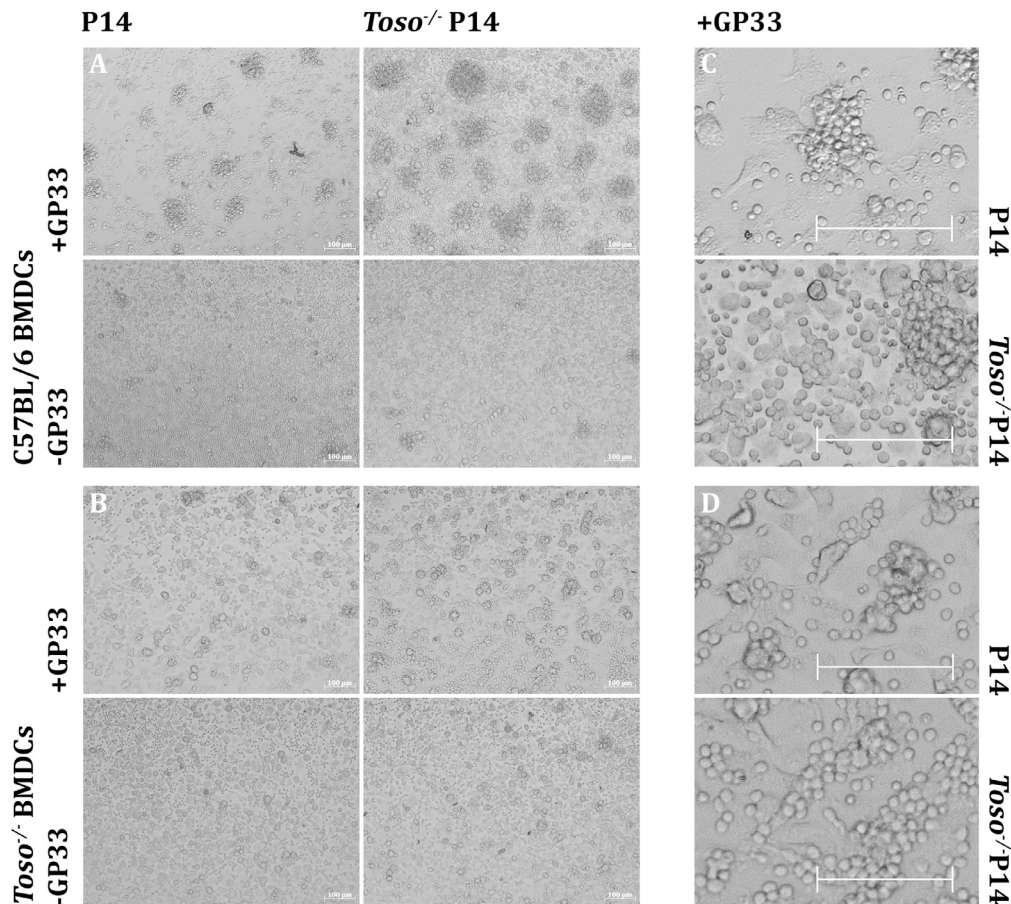


Abbildung 4.16.: Funktionelles Priming in T-Zell DCs Mischkulturen. Das Clusteringpotential von BMDCs und T-Zellen wurde in Mischkulturen aus GP33 Peptid-gelabelter BMDCs aus dem Knochenmark von *Toso*^{-/-} (Bildgruppe B, D) und C57BL/6J-Mäusen (Bildgruppe A, C) mit aufgereinigten T-Lymphozyten der P14 (Spalte 1) sowie *Toso*^{-/-}P14 Tiere (Spalte 2) im Mischverhältnis 1:2 (BMDCs:T-Zellen) nach einer Inkubationszeit von 36 h untersucht. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen der Kulturen sind repräsentativ aus 2 unabhängig durchgeführten Experimenten mit insgesamt jeweils vier Knochenmarkspendern, sowie zehn T-Zellspendern. Der eingezeichnete Maßstab beträgt 100 μ m. A-B) Die Bildgruppen zeigen aktivierungsspezifische Bildung von Zellkonglomeraten in Abhängigkeit des DC-Genotyps. C-D) Vergrößerte Bildausschnitte zur Veranschaulichung der Kontaktaufnahme zu den Peptid-gelabelten BMDCs.

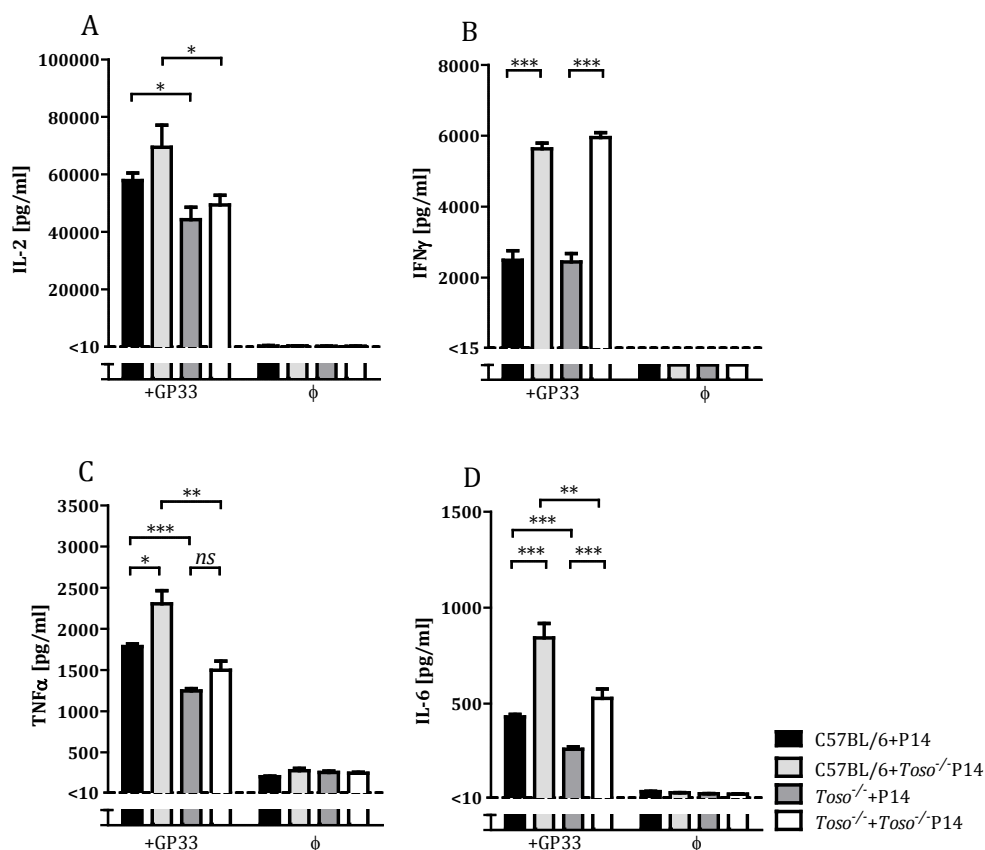


Abbildung 4.17.: Zytokinproduktion induziert durch funktionelles Priming in Mischkulturen aus Peptid (GP33)-gelabelter BMDCs und T-Lymphozyten. Überstände der Kokulturen von BMDCs aus dem Knochenmark von *Toso*^{-/-} und C57BL/6J-Mäusen sowie aufgereinigten T-Lymphozyten der P14 oder *Toso*^{-/-} P14 Tiere im Mischverhältnis 1:2 (BMDCs:T-Zellen) wurden nach einer Inkubationszeit von 36 h untersucht. Die Zytokinproduktion T-Zell spezifischer (A-B), IL-2 und IFN γ , sowie DC-spezifischer, IL-6 (D), Zytokine untersucht. TNF α wird von beiden Zelltypen produziert und galt als gemeinsames Zytokin (C). Alle Proteinkonzentrationen wurden im ELISA (Kapitel 3.2.2) bestimmt.

Die Aktivierungswirkung von T-Zellen auf dendritische Zellen innerhalb der Bildung immunologischer Synapsen wurde in vielen Arbeiten beschrieben (Buelens et al., 1997; Caux et al., 1994; Schoenberger et al., 1998; Schuurhuis et al., 2000). Unter anderem ist der Zusammenhang zwischen der Zytokinproduktion von z.B. IL-10 und TGF β mit der CD4⁺ T-Zell Polarisierung und von IL-6 mit der B-Zell-Aktivierung und anschließendem Ig-Klassenwechsel beschrieben (Recher; *unpublished*). Die Produktion von IL-6 wurde als Beispiel T-Zell abhängiger DC-Aktivierung gewählt und wurde ebenfalls in Kokulturen von P14 T-Zellen mit C57BL/6J- und *Toso*^{-/-} dendritischen Zellen gemessen (Abbildung 4.18.A-B). Hierfür wurden die entsprechend dem Protokoll unter dem Einfluss von GM-CSF generierte GP33-gelabelte BMDCs beider Genotypen mit ansteigenden Konzentrationen an aufgereinigten P14 T-Zellen versetzt und 24 h lang aktiviert. Die aktivierten P14 T-Zellen stimulierten in diesem Experiment dendritische Zellen, was an

der Produktion von IL-6 gemessen werden konnte. Der Aktivierungszustand der P14 T-Zellen war in beiden Mischkulturen vergleichbar und konnte an der Produktion von IL-2 detektiert werden (Abbildung 4.18.B). Während die IL-6 Produktion dendritischer Zellen des C57BL/6J-Ursprungs T-Zell konzentrationsabhängig anstieg, ließen sich *Toso*^{-/-} BMDCs nicht zur IL-6-Produktion anregen (Abbildung 4.18.A). Interessanterweise stieg die Zytokin-Produktion *Toso*^{-/-} BMDCs auf C57BL/6J-Niveau sobald *Toso*^{-/-} P14T-Zellen verwendet wurden, welche sogar die Produktion des Zytokins in C57BL/6J-BMDCs verdoppeln konnten (Abbildung 4.17.D).

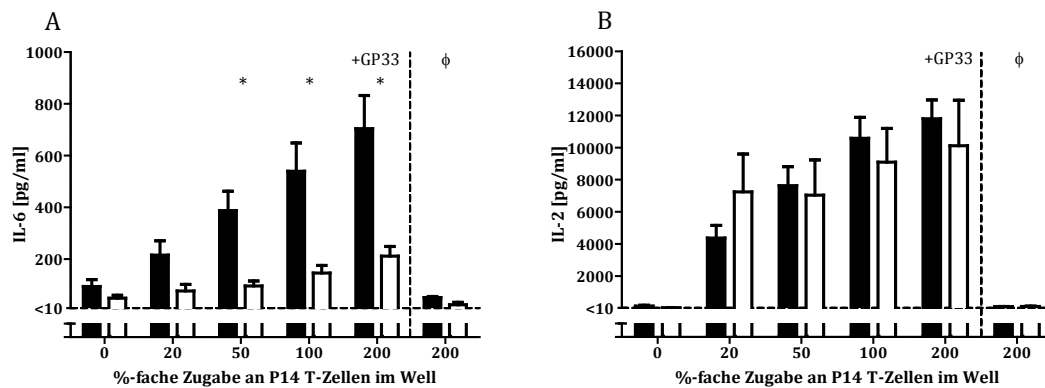


Abbildung 4.18.: Stimulation konventioneller dendritischer Zellen durch aktivierte T-Lymphozyten.

Untersuchung der Zytokinproduktion in Mischkulturen aus GP33 Peptid-gelabelter *Toso*^{-/-} (helle Balken) oder C57BL/6J (schwarze Balken) BMDCs mit aufgereinigten T-Lymphozyten aus der Milz und Lymphknoten der P14 Mäuse (Kapitel 3.2.4.6). Die T-Zellen wurden in ansteigender prozentueller Konzentration bezogen auf die verwendeten DCs zugegeben ($0,5 \times 10^6$ Zellen/ml) und die Überstände der Kulturen nach einer Inkubationszeit von 24 h auf die Zytokinkonzentrationen von IL-6 (A) und IL-2 (B) hin untersucht (Kapitel 3.2.2). Die *IL-6*^{-/-} BMDC-Kontrolle zeigte keinerlei IL-6 Produktion im Überstand der Kulturen (Anhang 6.7).

Die oben beschriebenen Effekte einer fehlerhaften Kommunikation zwischen den DCs und T-Lymphozyten sind eindeutig *Toso* abhängig und zudem beidseitig bestimmt. Die ohnehin schon schlechter reifenden DCs der *Toso*^{-/-} Mäuse können durch die induzierenden Signale überaktivierter *Toso* defizienter T-Zellen nicht kompensiert werden und können in diesem Zuge keine vergleichbare T-Zell-Proliferation induzieren oder inflammatorische Zytokine produzieren. Interessanterweise ist die IL-2 Produktion aktivierter T-Zellen nicht direkt mit der IFN γ Produktion gelinkt. Zudem sind *Toso* defiziente T-Lymphozyten deutlich stärkere IFN γ -Produzenten und somit möglicherweise zur stärkeren Zytotoxizität in kürzerer Zeit befähigt.

in vivo Priming

Die Kompetenz dendritischer Zellen naive T-Lymphozyten *in vivo* zu primen und eine CTL-Antwort zu induzieren wurde mittels eines adoptiven Zelltransfers untersucht. Hierzu wurden *in vitro* generierte BMDCs aus dem Knochenmark der C57BL/6J und *Toso*^{-/-} defizienten Mäusen mit dem Oligopeptid GP33 gelabelt und an d-8 in C57BL/6J und *Toso*^{-/-} Empfänger transferiert. Nach einer Infektion mit 2×10^6 PFU LCMV WE an d0 wurde die zytotoxische T-Zell Antwort an d6 *p.i.* untersucht. Es wurden die Frequenzen der GP33⁺CD8⁺ T-Zellen als induzierte Immunantwort sowie der NP396⁺CD8⁺ T-Zellen als nicht induzierte Kontrollimmunantwort bestimmt. Das NP396 ist ein weiteres Oligopeptid vom Nukleoprotein des LCMV, welches den zytotoxischen T-Zellen auf MHC I präsentiert wird und die Aminosäuren AS₃₉₆₋₄₀₄ des Nukleoproteins erfasst. Es ist das in akuter Infektion immunogen zweitstärkste Peptid des Virus und löst verglichen mit dem GP33 in einer akuten Infektion eine ca. halb so starke CTL-Antwort aus. Da die DCs nur mit GP33 gelabelt wurden, diente die Expansion der NP396⁺CD8⁺ T-Zellen als systemische Kontrolle des Experiments und zeigte die durch den Transfer womöglich verbesserte Antigenprozessierung und Präsentation.

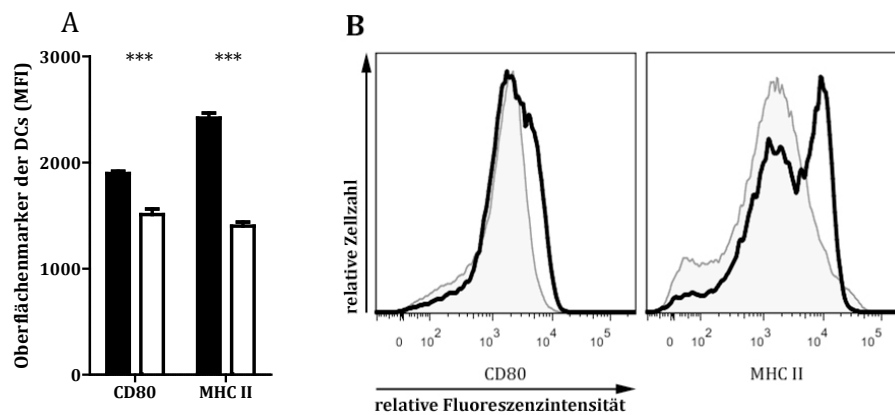


Abbildung 4.19.: Aktivierungszustand GP33 gelabelter BMDCs vor dem adoptiven Transfer generiert aus dem Knochenmark von C57BL/6J (schwarze Balken/Kurve) und *Toso*^{-/-}Mäusen (weiße Balken/schattierte Kurve) nach dem Labeln mit GP33. Die Fluoreszenzintensität (*median fluorescens intensity*, MFI) von CD80 und MHC II auf der Oberfläche von in Kultur generierter DAPI⁻CD11c^{hi}Ly6C^{lo} Zellen wurde nach einer 12 h Inkubationszeit mit GP33 vor dem Transfer in die Empfänger bestimmt und als MFI-Wert (A) von insgesamt jeweils 4 Spendern in zwei unabhängigen Versuchsansätzen aufgetragen. B) Repräsentative Histogramme der Oberflächenexpression von CD80 und MHC II.

Die transferierten, gelabelten dendritischen Zellen wurden vor dem Transfer auf CD80 und MHC II hin untersucht. Die Expression der Oberflächenmarker wies weiterhin einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Genotypen auf, der im Falle des

kostimulatorischen Moleküls CD80 zwar signifikant, jedoch nicht mehr wesentlich war (Abbildung 4.19).

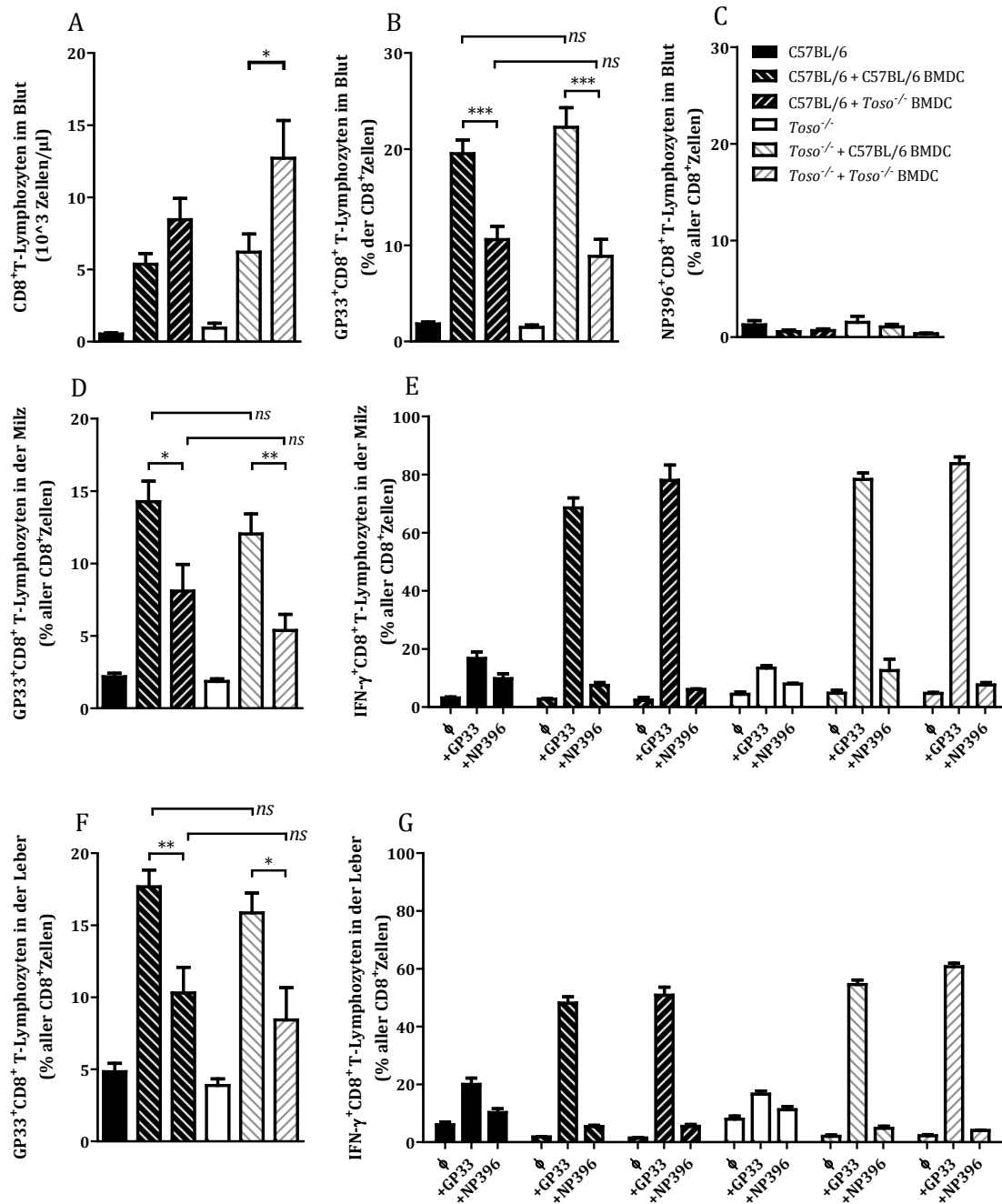


Abbildung 4.20.: Adoptiver Zelltransfer konventioneller DCs generiert aus C57BL/6j und *Tosso*^{-/-} Knochenmark. Die BMDCs wurden unter der Verwendung von GM-CSF als Differenzierungsstimulus bis d10 *in vitro* generiert, 12 h mit GP33 gelabelt und 3x10⁶ lebender DCs d-8 der Infektion in C57BL/6j- und *Tosso*^{-/-} Empfänger transferiert. Virus spezifische CTL-Antwort wurde d6 *p.i.* mit 2x10⁶ PFU des LCMV WE nach dem Adoptivtransfer dendritischer Zellen in C57BL/6j und *Tosso*^{-/-} Empfänger (straffierte Balken) sowie unbehandelter Kontrollen (nicht straffierte Balken) untersucht (Kapitel 3.2.6.10). A-C) Frequenzen der CD8⁺ T-Zellen im Blut absolut (A) und prozentuell spezifisch für das Zielperitid GP33 (B) bzw. das Kontrollpeptid NP396 (C). Die spezifische T-Zell-Expansion (D, F) der GP33⁺CD8⁺ T-Zellen in der Milz (D) und der Leber (F) wurde d6 *p.i.* untersucht. Die intrazelluläre IFN γ Produktion der GP33⁺CD8⁺ T-Zellen in der Milz (E) und der Leber (G) wurde anschließend an die *ex vivo* Restimulation mit dem Zielperitid GP33 und dem Kontrollpeptid NP396, sowie unstimulierten Kontrolle (ϕ) durchflusszytometrisch wie im Kapitel 3.2.5.7 beschrieben ermittelt. Die Legende in C) gilt für alle Graphen in der Abbildung.

Unabhängig vom Empfängerhintergrund war die prozentuelle Frequenz GP33 spezifischer T-Lymphozyten im Blut, Milz und Leber beim Transfer Toso-defizienter BMDCs verglichen mit den C57BL/6J-BMDCs signifikant niedriger (Abbildung 4.20.B, D, F). Da die NP396⁺CD8⁺ T-Zellexpansion in allen Fällen verschwindet gering war, resultierten die Effekte aus der induzierten Immunantwort und sind auf die transferierten cDCs zurückzuführen (Abbildung 4.20.C). Interessanterweise war die Frequenz aller CD8⁺ T-Zellen im Blut erhöht sobald die Spender Toso defizient waren und in Toso^{-/-} Empfängern sogar signifikant höher verglichen mit C57BL/6J-BMDC-Transfer (Abbildung 4.20.A).

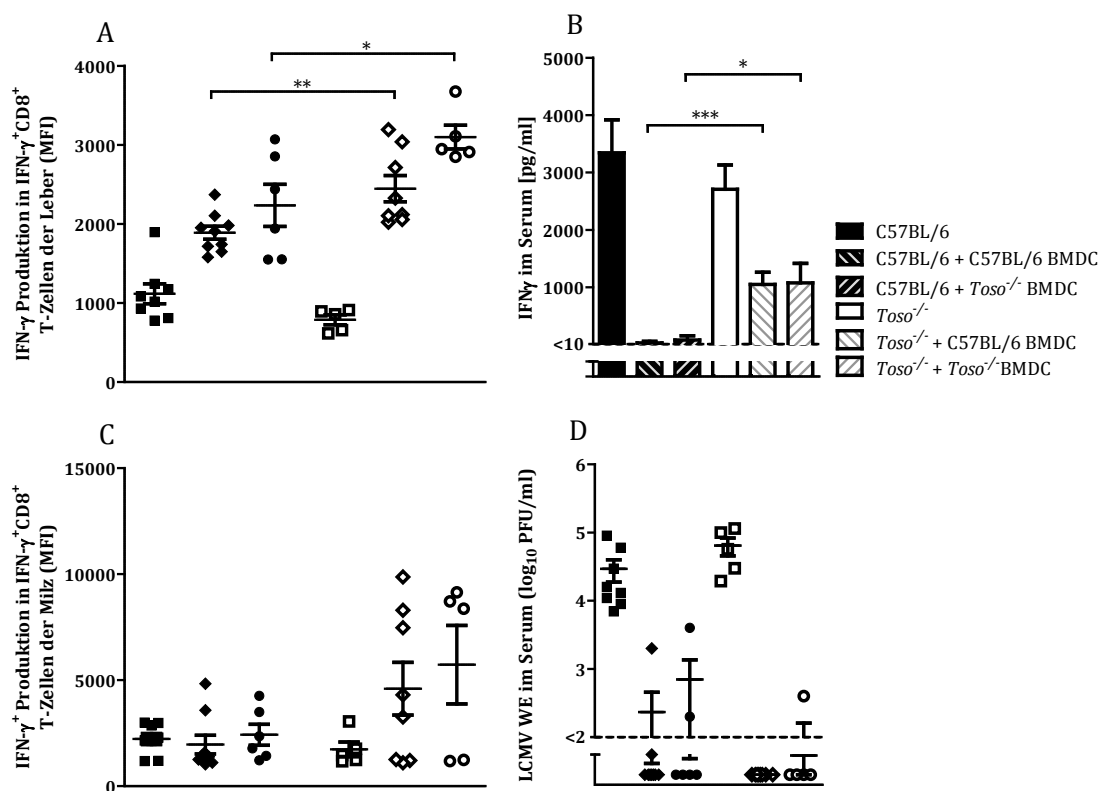


Abbildung 4.21.: Zytotoxische T-Lymphozyten Antwort in Empfängertieren nach einem Adoptivtransfer d-8 der Infektion konventioneller dendritischer Zellen (BMDCs). Die CTL-Antwort der mit BMDCs immunisierter Empfänger (straffierte Balken; ◩; ◪; ◫; ◬) wurde d6 p.i. mit 2x10⁶ PFU LCMV WE untersucht und mit unimmunisierten Tieren (unstraffierte Balken; ◩ und ◪) verglichen. C57BL/6J (schwarze Symbole/Balken) und Toso^{-/-} Empfänger (helle Symbole/Balken) wurden mit 3x10⁶ GP33 gelabelter BMDCs generiert aus C57BL/6J (◩ und ◪) und Toso^{-/-} (◫ und ◬) Knochenmark behandelt und inklusiver un behandelter Kontrolltiere (◩ und ◪) mit LCMV WE infiziert. Die experimentelle Durchführung erfolgte mit n=5-9 Empfängern in der jeweiligen Gruppe in drei unabhängigen Versuchsansätzen mit jeweils drei unterschiedlichen Knochenmarkspendern pro Versuchsdurchführung und Genotyp der Spender. A, C) Die Bestimmung der durchschnittlichen intrazellulären Produktion von IFN γ (MFI) in den IFN γ ⁺CD8⁺ T-Lymphozyten der Leber (A) und der Milz (C) wurde nach einer Restimulation mit GP33 wie im Kapitel 3.2.5.7 beschrieben durchflusszytometrisch bestimmt. B) Bestimmung des Zytokinlevels an IFN γ im Blut der behandelten Tiere sowie nicht immunisierter Kontrolltiere erfolgte mittels ELISAs (Kapitel 3.2.2). D) Virale Titer im Blut der behandelten Tiere d6 p.i. (Kapitel 3.2.5.4).

Die Frequenzen der IFN γ -produzierender CD8⁺ T-Zellen in der Milz und Leber waren jedoch nicht signifikant unterschiedlich (*Abbildung 4.20.E,G*). Die Restimulation mit dem Kontrollpeptid NP396 zeigte auch hier keine veränderten Frequenzen zu unbehandelten Tieren, sodass auch die intrazelluläre IFN γ -Produktion einen experimentspezifischen Effekt darstellte. Die produzierte Menge an IFN γ in Toso defizienten T-Lymphozyten der Leber war zudem signifikant höher (*Abbildung 4.21.A*), was im erhöhten Level an IFN γ im Blut resultierte (*Abbildung 4.21.B*). Vergleichbar mit *in vitro* Kulturen (*Abbildung 4.17.B*) waren die Toso defizienten CD8⁺ T-Zellen beim verbesserten Priming, unabhängig welchen Genotyp die primenden DCs haben, zur verbesserten Zytokinproduktion verglichen mit den C57BL/6J T-Lymphozyten in der Lage, was womöglich auch auf eine bessere Zytotoxizität hindeutet. In der Milz ist ein solcher Effekt nicht beobachtet worden (*Abbildung 4.21.C*). Die viralen Titer im Blut der behandelten Tiere waren unabhängig von der Konstellation der Behandlung eliminiert (*Abbildung 4.21.D*).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Toso defiziente cDCs ein scheinbar geringeres Primingpotential verglichen mit C57BL/6J cDCs entwickeln konnten. Die Frequenzen GP33 spezifischer CD8⁺ T-Zellen waren *d6 p.i.* sowohl im Blut als auch in den Organen geringer. Interessanterweise war in den immunisierten Tieren insbesondere dann ein vermehrtes CD8⁺ T-Zell- Proliferationspotential zu beobachten, wenn sowohl der Spender als auch der Empfänger Toso defizient waren. Beim Transfer von C57BL/6J-BMDCs konnte dieses nicht detektiert werden. Zudem ist die Zytokinproduktion der *Toso*^{-/-} T-Zellen signifikant höher beobachtet worden und unterstützt somit die Befunde in den *in vitro* Kokulturen.

4.3.2. Toso kontrolliert T-Zell Expansion

Die durchgeführten Experimente insbesondere in den Mischkulturen ließen auf eine funktionelle Bedeutung von Toso auf T-Lymphozyten schließen. Die Expression des Proteins auf T-Lymphozyten und die intrinsischen Auswirkungen einer Deletion von Toso in T-Zellen während einer viralen Infektion wurden zunächst in gemischten Chimären analysiert. Hierzu wurden C57BL/6J-Tiere bestrahlt und mit einem 50:50 Knochenmarkgemisch aus C57BL/6J x CD45.1 und *Toso*^{-/-} x CD45.2 rekonstituiert. CD45 (Ly5) ist ein auf allen Leukozyten exprimiertes Antigen, welches auf C57BL/6J-Leukozyten in seiner wildtypischen CD45.2-Form (Ly5.2) exprimiert wird. Eine *missense* Punktmutation (konservativer AS-Austausch) in der Primärstruktur des Proteins erlaubt durch die entsprechende Positionserkennung eines geeigneten Antikörpers das CD45.1-

Antigen in den Mäusen zu detektieren, die sich sonst nicht von C57BL/6J unterscheiden. Für das CD45.1-Allel homozygote Tiere werden für Adoptivtransfers bei Zellgemischen zur Ursprungsauftrennung verwendet.

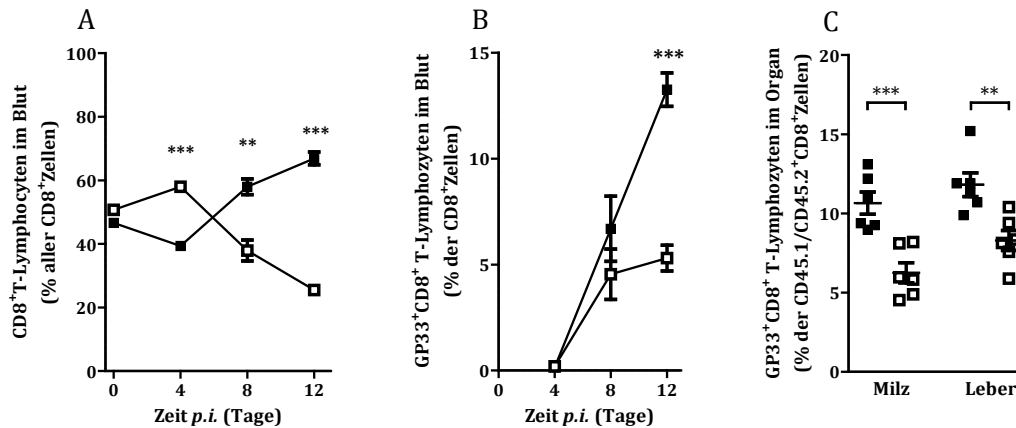


Abbildung 4.22.: Zytotoxische T-Lymphozyten Antwort in gemischten Chimären mit C57BL/6J Hintergrund. Bestrahlte C57BL/6J-Mäuse wurden mit einem Zellgemisch aus C57BL/6J x CD45.1 (■) und *Toso*^{-/-} x CD45.2 (□) Knochenmark im 50:50 Verhältnis rekonstituiert und anschließend an eine 30 tägige Adaptionszeit intravenös mit 2×10^5 PFU LCMV WE infiziert. A) Die prozentuelle Verteilung der CD8⁺ T-Zellen im Blut an den ausgewiesenen Tagen der Infektion nach ihrem Ursprung analysiert und auf die Gesamtmenge der CD8⁺ T-Lymphozyten in den Tieren bezogen. B-C) Die gezeigten Frequenzen GP33 spezifischer CD8⁺ T-Zellen wurden auf die Menge der jeweiligen CD8⁺ T-Lymphozyten Population (CD45.1/CD45.2) im Blut (B) und in den Organen (n=6) (C) bezogen.

Nach einer 30 tägigen Adaptionszeit wurden die Tiere mit 2×10^5 PFU LCMV WE *i.v.* infiziert und die zytotoxische Immunantwort auf ihren Ursprung hin untersucht. Die prozentuelle Verteilung der CD8⁺ T-Zellen im Blut sowie der Anteil GP33 spezifischer T-Lymphozyten ist in der *Abbildung 4.22.A-B* zu sehen. Während das Verhältnis der CD8⁺ T-Zellen vor der Infektion annähernd 50:50 betrug, veränderte sich dieses im Verlauf der Infektion drastisch. In den ersten Tagen der Infektion zeigten die Chimären einen starken Anstieg *Toso* defizienter CD8⁺ T-Zellen im Blut, sodass diese einen deutlich höheren Anteil als 50 % aller CD8⁺ T-Zellen betragen. Anschließend änderten sich die Verhältnisse dramatisch. Bereits d8 *p.i.* sank der Anteil *Toso*^{-/-} zytotoxischer T-Lymphozyten auf unter 40% und d12 *p.i.* auf ca. 20 %. Ähnlich verhielten sich die GP33 spezifischen CD8⁺ T-Zellen. D12 *p.i.* betrug die Frequenz GP33⁺ CD8⁺ T-Lymphozyten des *Toso*^{-/-} Ursprungs im Blut nur noch ca. 5 % aller *Toso*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen während die Frequenz der GP33⁺ CD8⁺ T-Lymphozyten vom C57BL/6J Ursprung (CD45.1) auf ca. 12 % anstieg. Die Frequenzen an GP33⁺ CD8⁺ T-Lymphozyten in der Milz und Leber waren d12 *p.i.* ebenfalls um die Hälfte reduziert (*Abbildung 4.22.C*).

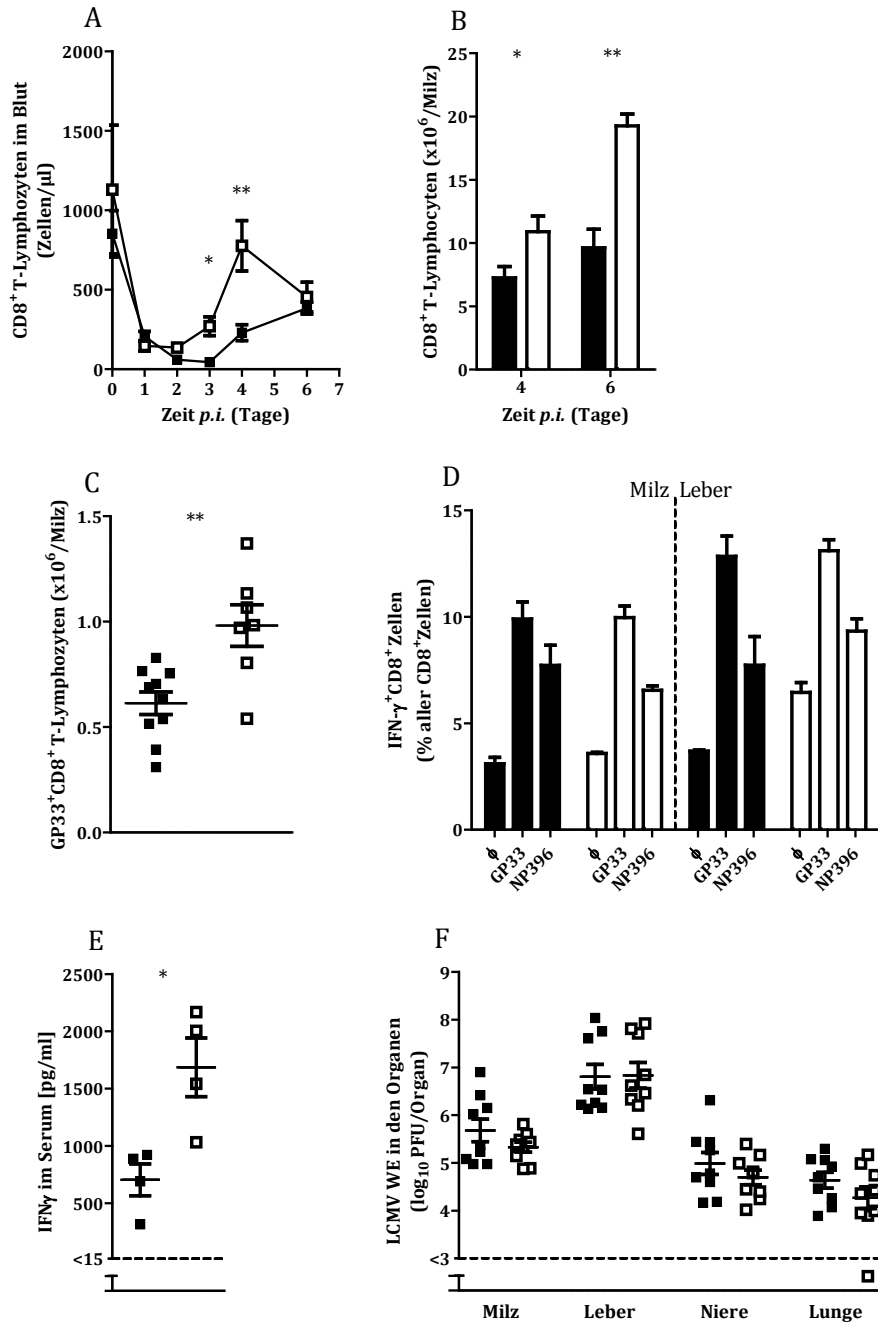


Abbildung 4.23.: Frühe CTL in der *Toso*^{-/-} Maus während einer akuten Infektion mit 2×10^6 PFU LCMV WE. *Toso*^{-/-} (weiße Balken bzw. □) und Kontroll-C57BL/6J (schwarze Balken bzw. ■) Mäuse wurden an d0 intravenös mit LCMV infiziert und die absoluten Frequenzen der CD8⁺ T-Lymphozyten im Blut (A) an den ausgezeichneten Tagen sowie d4 und d6 p.i. in der Milz (B) bestimmt. Die Blutleukozyten wurden mit einer jeweiligen Anzahl zwischen 4-16 Tieren (d4=16) in mehreren unabhängigen Versuchsansätzen analysiert. C) Absolute Frequenzen GP33 spezifischer CD8⁺ T-Lymphozyten in der Milz d6 p.i. (n=7-10) D) Die Untersuchung der intrazellulären IFN γ -Produktion Virus-spezifischer CD8⁺T-Zellen in der Milz und Leber d6 p.i. erfolgte nach einer *ex vivo* Restimulation mit GP33 und NP396, sowie einer unstimulierten Kontrolle (ϕ) wie im Kapitel 3.2.5.7 beschrieben. Angegeben sind die prozentuellen Frequenzen IFN γ produzierender CD8⁺ T-Lymphozyten in der Milz und Leber (n=3). E) Zytokinlevel an IFN γ im Serum der Tiere d4 p.i. gemessen im ELISA mit insgesamt vier Tieren pro Gruppe durchgeführt in zwei unabhängigen Experimenten. F) Quantifizierung viraler Titer in den Organen d6 p.i. mit insgesamt neun Tieren pro Gruppe durchgeführt in drei Versuchsansätzen.

Interessanterweise war bei näherer Betrachtung das Expansionsverhalten der T-Lymphozyten in unbestrahlten Toso defizienten Mäusen ähnlich (Abbildung 4.23). In den frühen Tagen der Infektion mit 2×10^6 PFU des LCMV WE stieg die CD8⁺ T-Zell Frequenz bereits ab d3 *p.i.* im Blut signifikant an (Abbildung 4.23.A). D4 *p.i.* betrug die Menge an Blut CD8⁺ T-Zellen das Dreifache und die Frequenzen in der Milz stiegen d6 *p.i.* auf das Doppelte verglichen mit C57BL/6J-Kontrolltieren an (Abbildung 4.23.B). Die Anzahl der GP33 spezifischen T-Zellen war sowohl im Blut als auch in der Milz in der ersten Tagen der Infektion nicht signifikant unterschiedlich, was wiederum absolut eine signifikant höhere Anzahl der expandierten T-Zellen bedeutete (Abbildung 4.23.C). Die IFN γ Produktion der CD8⁺ T-Zellen zeigte d6 *p.i.* keine Unterschiede sowohl in der Milz auch in der Leber (Abbildung 4.23.D) und konnte im Serum d4 *p.i.* auf einem deutlich höheren Level detektiert werden (Abbildung 4.23.E). Die viralen Titer in den Organen waren d6 *p.i.* vergleichbar (Abbildung 4.23.F).

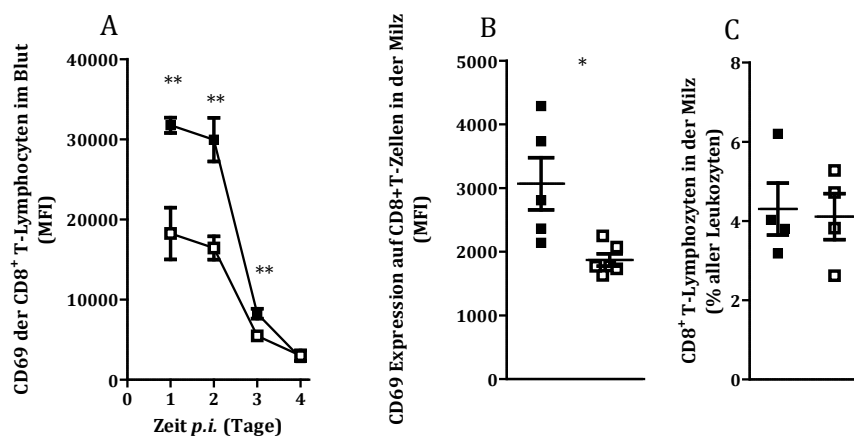


Abbildung 4.24.: Oberflächenexpression von CD69 auf T-Lymphozyten während der frühen Infektion mit 2×10^6 PFU des LCMV WE in Toso^{-/-} (□) und Kontroll-C57BL/6J (■) Mäusen im Blut (A) bis d4 *p.i.* und in der Milz d4 *p.i.* (B). Die Analyse der Blut- sowie Milzlymphozyten erfolgte wie im Kapitel 3.2.3.2 beschrieben mit insgesamt jeweils vier bis fünf Tieren pro Gruppe in zwei unabhängigen Versuchsansätzen. C) Frequenzen der in die Milz eingewanderter (gehomter) CD8⁺ T-Lymphozyten wurden d2 *p.i.* mit insgesamt vier Tieren pro Gruppe in zwei Experimenten ermittelt.

Vergleichbar mit den *in vitro* Untersuchungen wurde der Aktivierungsstatus von Toso defizienten und C57BL/6J-Kontroll-T-Zellen in 24 h Abständen nach der Infektion im Blut und d4 *p.i.* in der Milz gemessen (Abbildung 4.24.A-B). Im Gegensatz zu den *in vitro* Kokulturen, in denen das Priming von C57BL/6J-DCs vorgenommen wurde, konnte auf der Oberfläche Toso defizienter CD8⁺ T-Zellen signifikant verringerte Expression von CD69 verglichen mit C57BL/6J Kontrolltieren während der gesamten Beobachtungszeit detektiert werden und suggeriert eine verminderte Aktivierungsregulation abhängig von frühinflammatorischen Zytokinen wie IFN α , die in den ersten Tagen der Infektion

vermindert produziert wurden (Abbildung 4.24.B; Abbildung 4.7.B) (Shiow et al., 2006). Interessanterweise konnten vergleichbare Frequenzen von T-Lymphozyten in der Milz d2 p.i. gemessen werden (Abbildung 4.24.C).

CD69 ist ein für Lymphozyten-Homing relevantes Oberflächenlektin, welches IFN α abhängig innerhalb kürzester Zeit auf T-Lymphozyten hochreguliert wird und entscheidend für die Einwanderung der Lymphozyten in die lymphatischen Organe ist (Shiow et al., 2006). Zur genauen Untersuchung des Homingverhaltens der *Toso*^{-/-} T-Zellen wurde den Mäusen 500 μ g PolyI:C, welches über den TLR3 erkannt wird und über die Induktion von IFN α -Produktion auf das Homing der Lymphozyten einwirkt, intravenös verabreicht. Anschließend wurde die Frequenz von CD8⁺ sowie CD4⁺ T-Zellen im Blut zeitabhängig im Durchflusszytometer erfasst (Kapitel 3.2.3.2). Trotz der verminderten Expression von CD69 während der beginnenden Infektion (Abbildung 4.24.A-B) erfolgte die Einwanderung der T-Zellen auch in der *Toso*^{-/-} Mäusen mit den Kontrolltieren vergleichbar (Abbildung 4.25.C). Sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen migrierten nach intravenöser Verabreichung von PolyI:C in vergleichbaren Kinetiken in die lymphatischen Organe (Abbildung 4.25.A-B).

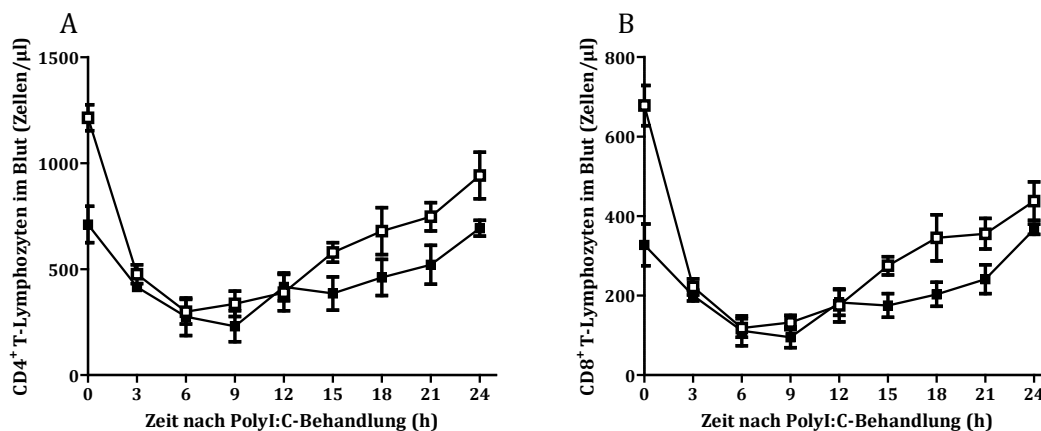


Abbildung 4.25.: Migrationsverhalten von T-Lymphozyten in die lymphatischen Organe in *Toso*^{-/-} (□) und C57BL/6j (■) Mäusen nach einer intravenösen Verabreichung von 500 μ g PolyI:C (Kapitel 3.2.6.1). Die Frequenzen der CD4⁺ (A) (CD3 ϵ ⁺CD4⁺) und CD8⁺ T-Lymphozyten (B) (CD3 ϵ ⁺CD8⁺) im Blut wurden alle 3 Stunden mit jeweils 3 Tieren durchflusszytometrisch ermittelt (Kapitel 3.2.4.2; Kapitel 3.2.3.2).

In den beschriebenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine *Toso* Deletion auf T-Lymphozyten in einem T-Zell intrinsischen Phänotypen resultiert. In den frühen Tagen einer viralen Infektion ist *Toso* für die Expansionskontrolle der durch die inflammatorischen Zytokine aktivierten T-Lymphozyten und die korrekte Modifikation

der Oberflächenmarker der T-Zellen verantwortlich. Ob dieser Effekt TCR spezifisch oder unspezifisch erfolgt, wird folgend untersucht.

Homöostase der T-Lymphozyten in der *Toso*^{-/-} Maus

Zur Untersuchung des homeostatischen Proliferationsverhaltens *in vivo* wurde das *RAG1*^{-/-} Modell verwendet. Das Fehlen der RAG-Enzyme (*recombination activating gene*) resultiert im Abbruch der Lymphozytengenerierung und folglich im Fehlen reifer peripherer B- und T-Lymphozyten. Bei einer adoptiven Rekonstitution von B- oder T-Zellen werden diese durch die homöostatischen Mechanismen zur Proliferation und Wiederherstellung des Lymphozytenpools angeregt. Die homöostatische Proliferation ist IL-7 und MHC I/II abhängig und stellt einen zu der spezifischen Aktivierung der T-Zellen differenziellen Mechanismus, welcher sowohl naiv als auch während der Infektion Einfluss auf das Verhalten der Lymphozyten nimmt (Tan et al., 2001; Tan et al., 2002).

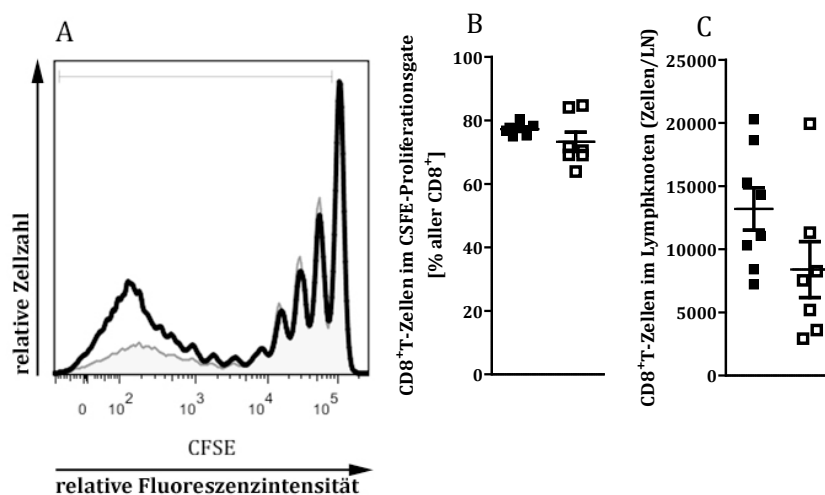


Abbildung 4.26.: Homöostatische Proliferation in *RAG1*^{-/-} Mäusen nach einem adoptiven Zelltransfer 1×10^7 CFSE gelabelter Splenozyten aus C57BL/6J (■) und *Toso*^{-/-} (□) Mäusen an d0. D4 *p.t.* wurde die Zellproliferation in den Lymphknoten der Tiere analysiert. Hierfür wurden die inguinalen Lymphknoten herauspräpariert und eine Einzelzellsuspension im Durchflusszytometer untersucht. CD8⁺ T-Zellen wurden mit α CD3 ϵ und α CD8 β gefärbt und die DAPI-CD8 β^+ CD3 ϵ^+ Zellpopulation als CD8⁺ T-Zellen definiert. A) Repräsentatives histogrammatisches Overlay der C57BL/6J (schwarz) oder *Toso*^{-/-} (grau schattiert) CD8⁺ T-Zellen mit dem eingezeichneten Gate für die Proliferation gemessen am schwächer werdenden CFSE-Signal. Alle CD8⁺ T-Lymphozyten, die sich mind. im ersten Proliferationszyklus befanden wurden vom Proliferationsgate erfasst. B) Prozentueller Anteil der CD8⁺ T-Lymphozyten im Proliferationsgate sowie eine absolute Quantifizierung (C) der CD8⁺ T-Zellen im Lymphknoten der *RAG1*^{-/-} Mäuse d4 *p.t.*

Zur Untersuchung des homöostatischen Einflusses in der *Toso*^{-/-} Maus wurden jeweils 1×10^7 CFSE gelabelte Splenozyten aus C57BL/6J und *Toso*^{-/-} Tieren in die *RAG1*^{-/-} Mäuse

transferiert und d4 nach Transfer die Proliferationsrate über das CFSE-Signal sowie die CD8⁺ T-Zell-Frequenzen im inguinalen Lymphknoten analysiert (Abbildung 4.26). Zudem wurden periphere CD8⁺ T-Lymphozyten in *Toso*^{-/-} und Kontroll-C57BL/6J Mäusen mittels eines α CD8-Antikörpers depletiert und über einen längeren Zeitraum das homöostatische Verhalten der T-Zellen verfolgt (Abbildung 4.27). Die Wiederherstellung des peripheren Lymphozytenpools ist von IL-7 abhängig, welches über den IL7R auf den T-Zellen wahrgenommen werden kann. Homöostatisch proliferierende Zellen regulieren den Rezeptor entsprechend ihrer Aktivierung hoch und sind für das aktivierende Signal kompetent.

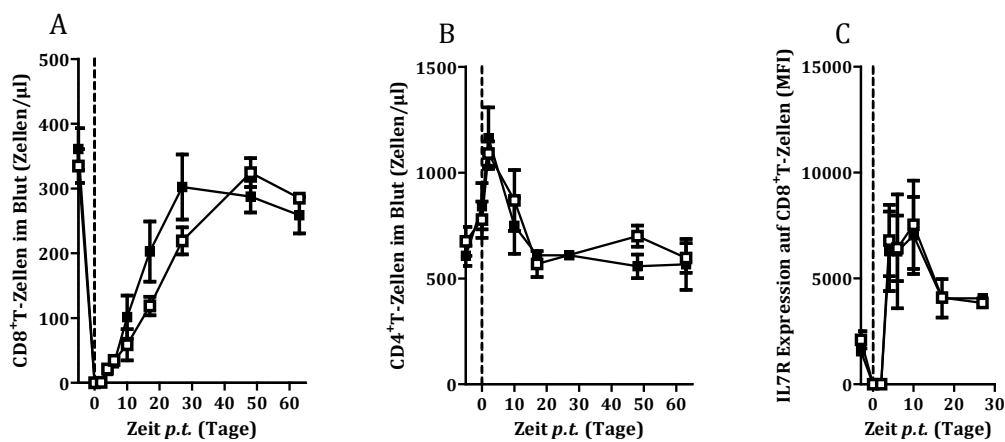


Abbildung 4.27.: Homöostatisches Verhalten der *Toso*^{-/-} T-Lymphozyten nach einer CD8-Depletion mit monoklonalem antiCD8 α -Antikörper (100 μ g je Applikation an d-3 und -1) (Kapitel 3.2.5.9). Anschließend wurden die Frequenzen der CD8⁺ (A) sowie der CD4⁺ T-Lymphozyten (B) im Blut der *Toso*^{-/-} (□) und C57BL/6J (■) Kontrolltiere zeitabhängig verfolgt und die Expression des IL7R (C) auf CD8⁺ T-Lymphozyten als relatives Fluoreszenzsignal subtrahiert mit der unspezifischen Fluoreszenz der Isotypkontrolle angegeben. Die Untersuchung erfolgte mit insgesamt vier Tieren pro Gruppe in zwei unabhängigen Versuchsansätzen.

Sowohl im RAG1 Modell als auch in den Depletionsexperimenten konnte kein Unterschied in der Proliferation zwischen *Toso*^{-/-} und C57BL/6J Mäusen detektiert werden. Die Proliferationsrate, welche am CFSE-Signal bemessen wurde (Proliferationsgate) sowie die Zellzahl im Lymphknoten der *RAG1*^{-/-} Tiere unterschied sich nicht signifikant zwischen dem Transfer der C57BL/6J- und *Toso*^{-/-}-Splenozyten (Abbildung 4.26).

Anschließend an die erfolgreiche Depletion der CD8⁺-T-Zellen wurde der Lymphozytenpool mit ansteigender CD4⁺ Frequenz kompensiert (Abbildung 4.27.A-B). Dies erfolgte in C57BL/6J und *Toso* defizienten Tieren gleichermaßen. Die anschließende Wiederherstellung der CD8⁺ Population in der Peripherie bis ca. d40 p.t. zeigte keine Unterschiede zwischen beiden Genotypen. Sowohl in C57BL/6J als auch in den *Toso*^{-/-}

Mäusen normalisierte sich auch die CD4⁺T-Zell-Population bis d20 *p.t.* Die Expression des IL-7R auf CD8⁺ (Abbildung 4.27.C) und CD4⁺T-Zellen (Daten nicht gezeigt) konnte ebenfalls auf dem gleichen Level detektiert werden und zeigte insgesamt eine vergleichbare Homöostase in Toso defizienten und C57BL/6J Tieren.

Spezifische Aktivierung über den TCR

Ein vergleichbares homöostatisches Verhalten der T-Lymphozyten in den *Toso*^{-/-} Mäusen stellte die Frage nach der TCR spezifischen Aktivierung der T-Zellen *in vivo*. Zur Untersuchung des spezifischen Proliferationspotentials der T-Lymphozyten wurde ein Proliferationsassay durchgeführt. Hierzu wurden T-Zellen aus den Milzen und Lymphknoten aufgereinigt, mit CFSE galabelt und über einen Zeitraum von 72 h *in vitro* mit antiCD3ε/antiCD28 stimuliert (Kapitel 3.2.4.8). Anschließend wurde das CFSE-Signal im FITC-Kanal eines Durchflusszytometers detektiert und die Anzahl der CD8⁺ T-Zellen im Proliferationsgate, welches sich wie bereits im RAG1-System auf alle Zellen erstreckt hat, die sich mindestens im ersten Teilungszyklus befanden, bestimmt (Abbildung 4.26.A).

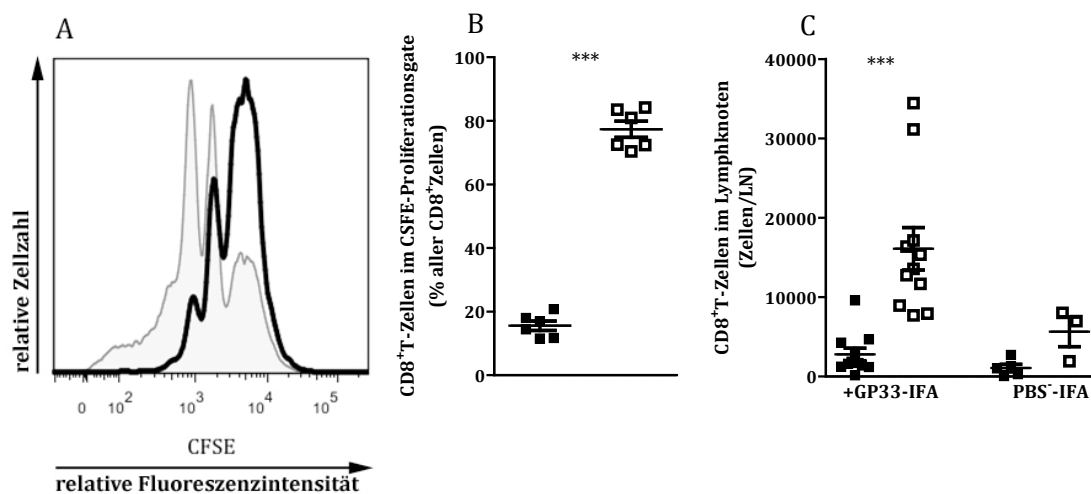


Abbildung 4.28.: TCR spezifische Aktivierung der CD8⁺ T-Lymphozyten. Das Proliferationspotential von CD8⁺ T-Lymphozyten nach einer TCR-spezifischen Aktivierung der Zellen wurde *in vitro* (A-B) und *in vivo* (C) untersucht. A-B) Aufgereinigte T-lymphozyten der Milz und Lymphknoten von C57BL/6J (schwarze Kurve bzw. ■) und *Toso*^{-/-} (grau schattiert bzw. □) Mäusen wurden mit CFSE gelabelt und *in vitro* mit αCD3ε/αCD28 aktiviert. 72 h nach der Aktivierung wurde die Proliferation am verminderten CFSE-Signal im FITC-Kanal des Durchflusszytometers bestimmt. A) Histogrammischer Overlay des CFSE-Signals nach 72 h *in vitro* Aktivierung und daraus resultierende B) prozentuelle Anteil der CD8⁺ T-Zellen innerhalb des Proliferationsgates, welches sich auf alle Zellen, die sich mind. im ersten Proliferationszyklus befanden, erstreckte. C) Adoptiver Transfer CFSE gelabelter Splenozyten aus P14 und *Toso*^{-/-}P14 Mäusen mit anschließender Aktivierung über den TCR durch die intraperitoneale Verabreichung von GP33 im IFA und der Frequenzbestimmung exogener CD8⁺ T-Zellen im inguinalen Lymphknoten (Kapitel 3.2.5.2).

Während die C57BL/6J T-Zellen bei der gewählten Antikörperkonzentration nur geringfügig proliferiert haben, zeigten die *Toso*^{-/-}CD8⁺ T-Zellen hohe Proliferationsraten in Kultur (Abbildung 4.28.A-B). Nur 20% der C57BL/6J CD8⁺ T-Zellen befanden sich im Proliferationsgate, wohingegen ca. 80% der *Toso*^{-/-} CD8⁺ T-Lymphozyten bereits proliferiert haben. Ein ähnlicher Effekt konnte mittels adoptiven Zelltransfers Virus spezifischer T-Zellen von P14 und *Toso*^{-/-} P14 Mäusen gezeigt werden (Abbildung 4.28.C). Hierfür wurden 1×10^7 Splenozyten mit CFSE gelabelt und an d-1 in C57BL/6J x CD45.1 Mäuse transferiert. Anschließend wurde den Tieren das GP33 im Friends Adjuvans (*incomplete friends adjuvans*, IFA) *i.p.* d0 verabreicht und die Zellexpansion d3 *p.t.* in inguinalen Lymphknoten untersucht. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zeigten die *Toso* defizienten T-Zellen eine signifikant höhere Proliferation nach spezifischer TCR-Aktivierung.

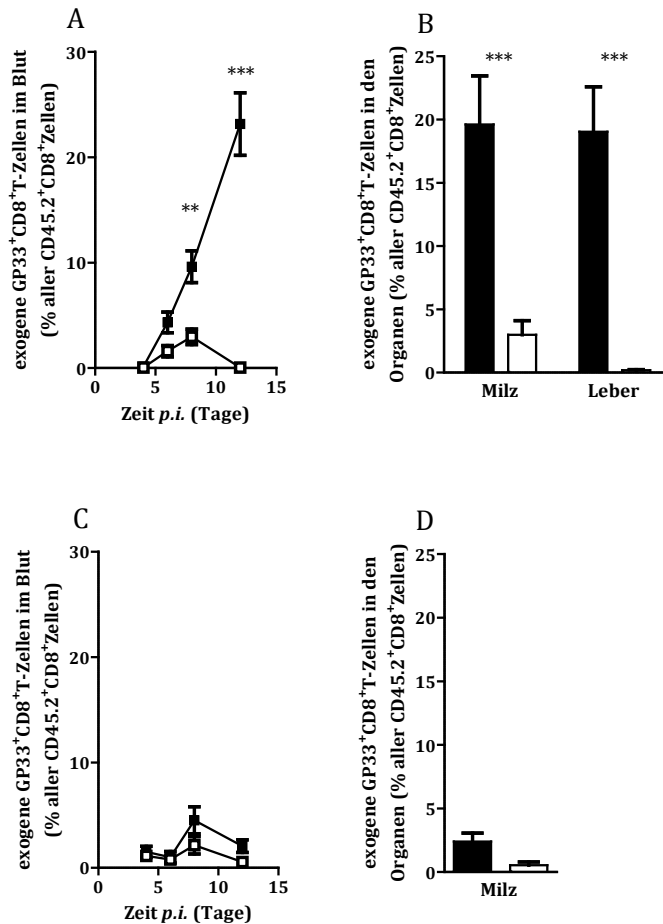


Abbildung 4.29.: Adoptiver Zelltransfer virusspezifischer *Toso*^{-/-} Splenozyten. Isolierte Splenozyten (1×10^4) aus P14 (■ bzw. schwarze Balken) sowie *Toso*^{-/-} P14 (□ bzw. helle Balken) Mäusen wurden d-1 in die CD45.1 x C57BL/6J Empfänger transferiert und die Tiere anschließend d0 intravenös mit 2×10^6 (A-B) oder 2×10^2 (C-D) PFU des LCMV WE infiziert. An den angegebenen Zeitpunkten wurden die Frequenzen viruspezifischer (exogener) CD8⁺T-Zellen (CD45.2) im Blut (A, C) und d12 *p.i.* in der Milz bzw. Leber (B, D) durchflusszytometrisch untersucht und bezogen auf alle exogenen CD8⁺ T-Zellen angegeben.

Zur Untersuchung der Expansion spezifischer T-Lymphozyten während einer viralen Infektion wurden 1×10^4 Splenozyten aus P14 und *Toso*^{-/-} P14 Spendertieren d-1 in C57BL/6J x CD45.1 intravenös transferiert und d0 die Tiere mit 2×10^6 PFU (*Abbildung 4.29.A-B*) bzw. 2×10^2 PFU (*Abbildung 4.29.C-D*) LCMV WE infiziert. Die Expansion exogener CD8⁺T-Lymphozyten wurde zeitabhängig untersucht.

Während die P14 CD8⁺T-Zellen bei hoher Virusdosis eine spezifische Population zytotoxischer T-Zellen bildeten, verschwanden die ohnehin schon niedriger expandierten *Toso*^{-/-} P14 CD8⁺T-Zellen nach dem achten Tag der Infektion aus dem Blut (*Abbildung 4.29.A*) und konnten auch in den Organen d12 *p.i.* kaum nachgewiesen werden (*Abbildung 4.29.B*). Die Infektion mit geringerer Viruslast zeigte keinen signifikanten Phänotyp (*Abbildung 4.29.C-D*). Der umgekehrte Transfer von CD45.1 x P14 T-Lymphozyten in C57BL/6J und *Toso*^{-/-} Mäuse zeigte in *Toso* defizienten Empfängern ebenfalls eine geringere Expansion exogener P14 T-Zellen (*Daten nicht gezeigt*). Während die Expansion anfangs vergleichbar war, verschwand die Population exogener CD8⁺T-Zellen ab d8 *p.i.* Die Expansion in C57BL/6J konnte zeitabhängig zunehmend detektiert werden.

5. DISKUSSION

Die virale Hepatitis stellt eine der bedeutendsten Erkrankungen der heutigen Zeit. Mit einer jährlich verzeichneten Todesrate von fast einer Million Menschen ist das Hepatitisvirus eines der gefährlichsten Viren. Neben klinischen Studien an Patienten werden Infektionen in Mausmodellen zur Erforschung der viralen Hepatitis verwendet. Erkenntnisse über die Persistenzmechanismen, Virusescape und Replikation sind ebenso relevant wie die Forschung an der Generierung der antiviralen Immunantwort des Wirts und sind notwendig für die Entwicklung neuer Medikamente.

Die virale Kontrolle ist essentiell von der Entwicklung der zytotoxischen T-Zell-Antwort abhängig (Byrne and Oldstone, 1984; Thimme et al., 2001; Thimme et al., 2003; Zinkernagel and Welsh, 1976). Die Kommunikation der T-Lymphozyten mit Antigen-präsentierenden Zellen stellt einen wesentlichen Schritt in der Aktivierung der T-Zellen. Ein besseres Verständnis dieser Interaktion und der darin beteiligten Moleküle könnte einer Verbesserung der funktionellen T-Zell-Qualität dienen und stellt eine Möglichkeit die immunopathologischen Symptome und virale Eliminierung therapeutisch zu regulieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion zwischen den Antigen präsentierenden dendritischen Zellen und den T-Lymphozyten im Hinblick auf die Rolle von Toso mittels einer totalen Deletionsmutante untersucht. Die bisher veröffentlichte Funktion von Toso als ein anti-apoptotisch wirkendes Molekül lässt eine Bedeutung in der komplexen Interaktion zwischen den beiden Zellen vermuten und kann somit ein Medium zur Regulation dieser darstellen.

Infektionsmodell

Im Rahmen dieser Arbeit konnte der Einfluss von Toso auf die Entwicklung einer antiviralen Immunantwort gegen das nicht zytopatische LCM-Virus gezeigt werden. Das Fehlen von Toso resultiert trotz vergleichbarer initialer Voraussetzungen (*Abbildung 4.1*) in einer gestörten Entwicklung der zytotoxischen T-Lymphozyten (*Abbildung 4.2*). Die verminderten Frequenzen Virus-spezifischer CD8⁺ T-Zellen in der Effektorphase der Infektion resultieren in einer verlangsamten Viruskontrolle, verursachen jedoch auch eine geringere Immunpathologie in Toso defizienten Tieren. Der Zusammenhang zwischen

dem Phänotypen und Zellen des Immunsystems konnte durch die Revision in Knochenmarkschimären gezeigt werden und schließt eine essentielle Beteiligung anderer gewebespezifischer Zellarten aus (*Abbildung 4.3*).

Die Generierung einer viruspezifischen CD8⁺ T-Lymphozytenpopulation stellt einen vielseitigen Prozess in der Immunologie, welcher von zahlreichen Faktoren abhängig ist. Die erste immunologische Barriere bildet das angeborene Immunsystem (Honke et al., 2012; Lang et al., 2010). Die gewebeständigen Makrophagen spielen dabei eine entscheidende Rolle, indem diese die infektiösen Viruspartikel aus dem peripheren Blutfluss herausfiltern und mit der Frühinflammation beginnen. Während dieses Prozesses ist eine kontrollierte virale Replikation in spezialisierten Zellen für eine stabile Induktion der adaptiven Immunantwort notwendig (Honke et al., 2012). *Toso*^{-/-} Mäuse zeigten keine Defekte in der phagozytotischen Kapazität der Makrophagen. Dies konnte durch eine vergleichbare Virusaufnahme gezeigt werden (*Abbildung 4.7.A*) und wurde zudem in Kulturen primärer Makrophagen (BMΦ) getrennt untersucht (*Anhang 6.4*). Die erste antivirale Antwort zeigte jedoch verminderte Level an IFNα (*Abbildung 4.7.B*), was auf eine geringere Aktivierung der pDCs, den Hauptproduzenten der Typ I Interferone, hindeutet (Asselin-Paturel et al., 2001; Cella et al., 1999a; Gary-Gouy et al., 2002). Dies zeigte jedoch keine gravierenden Auswirkungen auf die antiviralen Mechanismen der Makrophagen und konnte an den mit Kontrolltieren vergleichbaren Virustiter d4 *p.i.* in den Organen festgemacht werden (*Anhang 6.8*). Interessanterweise zeigte die Untersuchung der gesamt RNA d2 *p.i.* in den *Toso*^{-/-} Mäusen auch geringere Mengen an TNFα (*Abbildung 4.9.B*), was insgesamt das Bild einer verminderten Frühinflammation bestätigen konnte.

Bedeutung von Toso auf DCs

Die detaillierte Untersuchung der Entwicklung von DCs konnte zeigen, dass die Maturierung dendritischer Zellen entscheidend mit der Expression von Toso zusammenhängt. Eine Deletion des Proteins verhinderte die Ausreifung und Regulation der Expression von Oberflächenmolekülen in den cDCs auf einen aktivierenden Stimulus hin (*Abbildung 4.8; Abbildung 4.10-12*). Die Reifung der DCs ist jedoch für ein funktionelles antivirales Priming essentiell und ermöglicht erst eine Initialisierung zytotoxischer T-Zell-Aktivierung (Cella et al., 1999b). Nicht vollständig aktivierte, semi-maturierte DCs können statt einer intakten CTL-Antwort anergisches Verhalten der T-Lymphozyten bis hin zu peripherer Toleranz induzieren (Hawiger et al., 2001; Inaba et al., 1998).

Als einer der reifungsinduzierenden Stimuli während einer viralen Infektion gilt das TNF α (Ritter et al., 2003), welches die Aktivierung der Expression von Oberflächenmolekülen durch seinen Rezeptor-vermittelten Signalweg induziert. Die Untersuchung der Entwicklung von cDCs unter der Verwendung von GM-CSF als Stimulus ist ein verbreitetes Modellsystem (Inaba et al., 1992; Lutz et al., 1999), ist jedoch nicht in allen Punkten mit der *in vivo* Entwicklung zu vergleichen. Die Generierung von cDCs in Kultur resultiert in teilweise maturierten cDCs (Lutz et al., 1999; Ritter et al., 2003). Diese Reifung wird nachweislich durch eigens produzierte TNF α -Level ab d6 nach Differenzierungsbeginn erzeugt und fehlt bei der naiven Entwicklung der DCs *in vivo* (Ritter et al., 2003). Während die TNF α Produktion der BMDCs d10 nach Differenzierungsbeginn in Kultur vergleichbar detektiert werden konnte (*Anhang 6.6.1.A*), entwickelten die Toso defizienten BMDCs ein differentielles Verhalten auf das TNF α -Signal (*Abbildung 4.10-12*). Die Differenzierung der BMDCs in Kultur zeigte deutliche Unterschiede in der Qualität der DCs bezüglich des Aktivierungsstatus der Zellen (*Abbildung 4.8*). Die Ursache dieser Fehlentwicklung könnte mit dem TNF α -Signalweg zusammenhängen und würde zu der bereits publizierten Signalfunktion von Toso über RIP1 durchaus passen (Nguyen et al., 2011). Durch Supplementation der Kulturen mit zusätzlichem Zytokin wurde die Entwicklung der Zellen beider Genotypen genauer untersucht (*Abbildung 4.10-11*). Während die C57BL/6J BMDCs auf den Aktivierungsstimulus entsprechend reagiert haben und ihre Aktivierungsmarker hochregulierten, wurde die Expression dieser in *Toso*^{-/-} BMDCs verhindert. Interessanterweise erwies sich der Zeitpunkt der Stimulation als enorm wichtig. Die ausgereiften DCs beider Genotypen d10 nach Differenzierungsbeginn zeigten keine Reaktion auf TNF α weder in niedrigen noch in hohen Konzentrationen (*Abbildung 4.11*). Das zusätzliche Zytokin konnte keine Expressionsveränderungen von CD80, MHC I und II sowie CD11b induzieren. Toso defiziente BMDCs konnten die meisten Moleküle nicht hochregulieren und wiesen somit weiterhin einen unreifen nicht maturierten Zustand auf. Eine Behandlung der DCs mit TNF α d0 gleichzeitig mit dem Differenzierungsbeginn erwies sich ebenfalls als erfolglos. Die Marker und der Reifungszustand der DC-Population wurden damit sowohl in den C57BL/6J als auch in *Toso*^{-/-} Kulturen vermindert (*Abbildung 4.10.C,E*). Bei steigender TNF α Konzentration zeigten Toso defiziente BMDCs sogar einen signifikant stärkeren Effekt auf das Zytokin und regulierten die untersuchten Oberflächenproteine fast vollständig herunter (*Abbildung 4.10.C,E*).

Eine stimulierende Wirkung auf die Reifung der cDCs konnte lediglich bei der Zugabe an d3 des Differenzierungsprozesses erzielt werden. Der Zusatz von TNF α resultierte im

Wildtypen in einer Verdoppelung der Maturierungsleistung. Sowohl der prozentuelle Anteil (*Abbildung 4.12.A-B*) als auch die Oberflächenexpression der Aktivierungsmarker (*Abbildung 4.12.C*) der maturierten Population konnten in C57BL/6J Kulturen verbessert werden. *Toso*^{-/-} BMDCs zeigten dagegen einen schwachen Effekt, konnten jedoch im Gegensatz zu *TNFR1*^{-/-} BMDCs, die erwartungsgemäß keinerlei Veränderungen zeigten (*Abbildung 4.12; Anhang 6.6.1.B*), eine zu unbehandelter Kultur signifikant höhere Frequenz der reifen Population entwickeln. Dies zeigt eindeutig, dass ein TNF α -Signal nicht ausgeschlossen ist, jedoch in *Toso* defizienten Zellen differenziell oder vermindert verarbeitet wird.

Diese Befunde lassen sich gut in die heute geltenden Reifungsprozesse der DCs einbinden. Die Entwicklung konventioneller dendritischer Zellen findet bereits im Knochenmark ohne Mitwirkung von TNF α statt und ist in den *Toso*^{-/-} mit C57BL/6J Mäusen vergleichbar (*Anhang 6.6.1.A, C; Abbildung 4.1.B*). Als PräDCs gelangen sowohl myeloide als auch lymphoide Vorläufer in die Peripherie und werden durch die Stimulation mit GM-CSF, LT α und Ftl3L über die homöostatische Regulation kontrolliert (Liu et al., 2009; Liu et al., 2007), sowie zur Ausreifung in ruhende Antigen-aufnehmende Zellen stimuliert (Henri et al., 2001; Inaba et al., 1994; Leenen et al., 1998). Die peripheren Populationen einzelner DCs konnten in der gleichen Frequenz gemessen werden (*Abbildung 4.1.B*) und deuten auf eine intakte Egression aus dem Knochenmark sowie eine korrekte Homöostase der Zellen in lymphatischen Organen hin. Die Expressionslevel an GM-CSF unterschieden sich zudem in *Toso*^{-/-} Tieren nicht von den C57BL/6J-Mäusen weder naiv noch während der Infektion (*Abbildung 4.9.A*) und schließen somit einen Entwicklungs-stimulatorischen Defekt in *Toso* defizienten Tieren aus.

Bei einem sogenannten Danger-Signal, welches meist über die frühinflammatorischen Zytokine produziert von Makrophagen vermittelt wird, werden den Experimenten zufolge vor allem die PräDCs zur maturierenden Entwicklung stimuliert (Jonuleit et al., 1997). Der Effekt auf reife DCs ist bei weitem nicht so groß (*Abbildung 4.11*). Diese werden durch die Aufnahme infektiöser Partikel und apoptotischer Zellen maturiert und switchen von Antigen-aufnehmenden zu Antigen- präsentierenden Zellen (Garrett et al., 2000; West et al., 2000). Betrachtet unter dem Aspekt, dass die präsentierenden, maturierten DCs keine Antigen-aufnehmende Kapazität besitzen, ist die Ausreifung der PräDCs zum bereits maturierten Zustand während der Infektion für die Antigenpräsentation nicht förderlich. Diese würden dann keine bis kaum Antigene aufnehmen können und somit weniger präsentieren. Die Rolle dieser DCs könnte regulatorisch sein und zum Beispiel über die Zytokinproduktion oder einen direkten Kontakt zu den Lymphozyten während des

Primings z.B. beim beobachtetem Mehrfachkontakt zu DCs erfolgen (Mempel et al., 2004). Somit könnte die Reifungsregulation über $\text{TNF}\alpha$ eine Art Gleichgewicht zwischen T-Zell-aktivierenden und T-Zell-regulierenden DCs während der Infektion darstellen und maßgeblich von der Toso-Expression auf dendritischen Zellen abhängen.

Toso^{-/-} Mäuse zeigen keinerlei Minderung der zirkulierenden DCs (*Abbildung 4.1.B*) und sind *in vivo* nachweislich in der Lage T-Lymphozyten zu aktivieren (*Abbildung 4.23*). In vielerlei Hinsicht zeigt sich der beobachtete Phänotyp während der frühen Inflammation und stellt die Frage auf in wie fern sich die unter dem stimulatorischen Einfluss inflamatorischer Zytokine ($\text{IFN}\alpha$ und $\text{TNF}\alpha$) entwickelnde DCs bei der initialen T-Zell-Aktivierung beteiligt sind. Toso defiziente T-Lymphozyten zeigen in den ersten Tagen einer viralen Infektion vergleichbare bis bessere Expansion (*Abbildung 4.23.A-B*), welche womöglich durch die anfangs verminderte Frühinflammation unterstützt wird und mit der geringeren Aktivierbarkeit maturierenden DCs zusammenhängen könnte.

Toso defiziente cDCs, die einen geringeren Aktivierungsstatus während der $\text{TNF}\alpha$ -induzierten Maturierung zeigten (*Abbildung 4.10.D,F; Abbildung 4.11-12*), könnten dann *in vivo* zur vermehrten Antigenaufnahme und -präsentation befähigt sein und in den ersten Tagen der Aktivierung, dem Zeitpunkt des Primings, vermehrt CD8^+ T-Zellen primen. Das Fehlen der $\text{TNF}\alpha$ -induzierten reifen DCs-Population könnte in der anschließenden Effektorphase durch die verminderte Regulation entweder in T-Zell-Exhaustion oder vorzeitiger Kontraktion münden. Einige bereits *in vitro* durchgeführten Mischkulturexperimente könnten diese Theorie bestätigen (*Anhang 6.9*). Während die Antigen gelabelten C57BL/6J-BMDCs über einen Zeitraum von 72 h ein aktivierungsspezifisches Überleben der T-Lymphozyten vermitteln konnten, befanden sich in den *Toso*^{-/-}BMDCs Kulturen trotz der vergleichbaren Synapsenbildung (*Abbildung 4.16.C-D*) nahezu alle T-Lymphozyten in der späten Apoptose ($\text{DAPI}^+\text{AnnexinV}^+$). Der Genotyp der T-Zellen spielte dabei keine Rolle. Dieser Effekt kann auch in das beobachtete Clustering 36 h nach der T-Zell-Zugabe in den Mischkulturen interpretiert werden (*Abbildung 4.16.A-B*). Auch da nehmen die T-Lymphozyten Kontakt zu den DCs auf und bilden Zellkonglomerate, welche in den C57BL/6J-Kulturen in der T-Zell Aktivierung münden, in den Toso defizienten Kulturen jedoch im verminderten Überleben der T-Zellen enden. Der Kontakt reicht jedoch aus um die initiale Stimulation der T-Lymphozyten zu erreichen, was eindeutig an der IL-2 und $\text{IFN}\gamma$ Produktion im Überstand zu sehen ist (*Abbildung 4.17.A-B; Abbildung 4.18.B*). Betrachtet man diese Befunde aus der Sicht der T-Zellen, könnte es bedeuten, dass die sogenannte zweite Phase des Primings in Toso defizienten Kulturen nicht mit Proliferationsinitiation beendet wird,

sondern im apoptotischen Verhalten resultiert. Grund dafür könnte die fehlende Aktivierungskapazität *Toso*^{-/-} BMDCs durch T-Zell-Interaktionen sein, die womöglich durch Toso selbst innerhalb der supramolekularen Aktivierungscluster (SMACs) vermittelt werden muss (*Abbildung 4.18*).

Eine solche Theorie würde auch viele der *in vivo* Experimente erklären. Untersuchungen der *TNFR1*^{-/-} Maus konnten bereits in der Vergangenheit zeigen, dass das Fehlen des Signals einer intakten zytotoxischen T-Zell-Entwicklung während einer akuten viralen Infektion nur minder im Wege steht (Zhou et al., 2002). Die defizienten Tiere konnten das Virus in vergleichbaren Kinetiken kontrollieren und entwickelten eine ausreichende Zytotoxizität. Auch in Mischkulturen konnte ein mit C57BL/6J-BMDCs vergleichbares Clustering mit *TNFR1*^{-/-} Zellen beobachtet werden (*Anhang 6.10.1*). Die *TNFR1*^{-/-} BMDCs sind auf das Toso Gen wildtypisch zeigen jedoch vergleichbar mit den *Toso*^{-/-}BMDCs einen geringeren Aktivierungsstatus und fehlende TNF α -induzierte Maturierung (*Anhang 6.6.1.B; Abbildung 4.10, Abbildung 4.12*). Die Proliferations- (*Anhang 6.10.1*) sowie die Zytokininduktion (*Anhang 6.10.2*) in T-Lymphozyten sind jedoch mit C57BL/6-BMDCs vergleichbar und könnten somit auf die entscheidende Rolle von Toso als Survival-Signal hindeuten.

Die Rolle inflammatorischer dendritischen Zellen

Die regulatorische Wirkung bestimmter Populationen dendritischer Zellen ist unzureichend beschrieben und wird zudem durch die Komplexität der viralen Infektionen erschwert. So wird zum Beispiel der Einfluss inflammatorischer DCs (iDCs) bei unterschiedlichen Infektionen als positiv beschrieben (Sato et al., 2000). Während einer bakteriellen Infektion mit Listerien wirken diese direkt gegen die Pathogene (Serbina et al., 2003). Ein positiver Effekt konnte zudem bei der Infektion mit *Influenza* gezeigt werden (Aldridge et al., 2009).

Bei der hepatischen Infektion mit LCMV konnte im Rahmen dieser Arbeit dagegen gezeigt werden, dass die Generierung der CTL iDC-unabhängig verläuft. Die Abwesenheit dieser Zellpopulation bietet sogar einen Vorteil bei der Entwicklung einer potenten Zytotoxizität. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine chronische Infektion in der *CCR2*^{-/-} Maus, die verminderte Frequenzen von iDCs entwickelt (Meryk, Funkner et al., *unveröffentlicht*), effektiver unter Kontrolle gebracht werden kann und zeigt einen negativen Einfluss der Population auf die CD8⁺ T-Lymphozyten während der LCMV-Infektion. Im Verlauf einer

akuten viralen Infektion konnte ebenfalls ein signifikanter Unterschied in der Zytotoxizität der *CCR2*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen beobachtet werden (*Abbildung 4.5-6*) (Meryk, Funkner et al., *unveröffentlicht*) und suggeriert damit eine T-Zell regulierende Rolle der iDCs in der viralen Infektion mit LCMV. Aus diesem Aspekt heraus scheinen die verminderten Frequenzen der Monozyten (*Abbildung 4.1.A*) sowie eine signifikant geringere Entwicklung dieser zu iDCs in der *Toso*^{-/-} (*Anhang 6.3*) zwar ins Gesamtbild zu passen, jedoch nicht die Ursache für die verzögerte Viruskontrolle der defizienten Tiere zu sein.

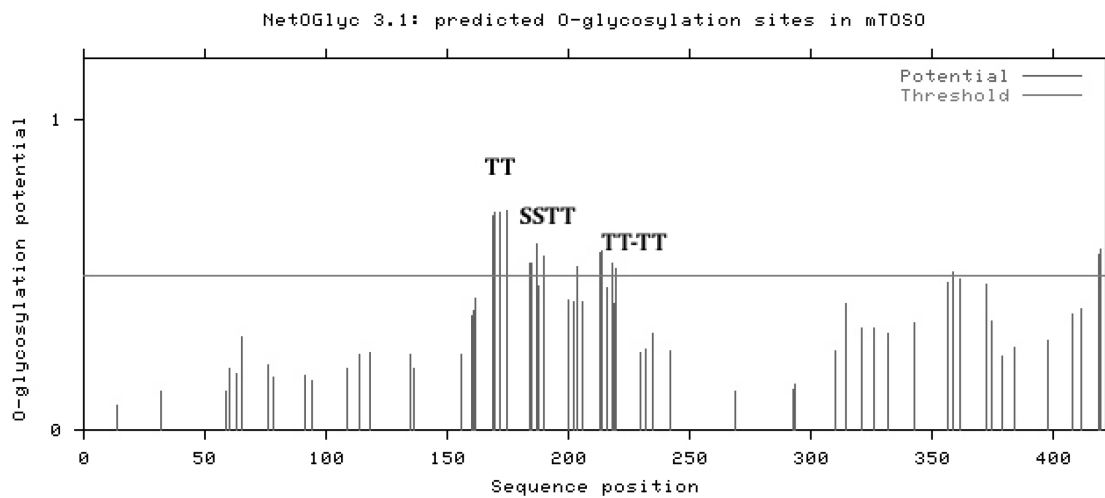
Bedeutung von *Toso* für die T-Lymphozyten

Betrachtet man die frühen Kinetiken in der *Toso*^{-/-} Mäuse so wird deutlich, dass die Expansion der CD8⁺ T-Lymphozyten anfangs nicht vermindert, sondern sogar im Gegenteil signifikant höher ist (*Abbildung 4.23*). Der geringere Aktivierungsstatus der cDCs in Kultur resultierte nicht im schlechteren Priming der CD8⁺ T-Zellen. *In vivo* waren die DCs durchaus in der Lage T-Zell Proliferation zu induzieren. *Toso*^{-/-} Tiere zeigten sowohl im Blut als auch in der Milz eine deutliche Expansion spezifischer CD8⁺ T-Zellen bis d6 *p.i.* (*Abbildung 4.23.B-C*), was auf ausreichendes mit C57BL/6J vergleichbares Priming in der frühen Infektion hindeutet. Lediglich die Expression von CD69 konnte auf einem geringeren Level detektiert werden (*Abbildung 4.24*), was zu der verminderten Produktion von IFN α in den ersten Tagen der Infektion passte (Shiow et al., 2006), jedoch für ein ausreichendes Homing in die lymphatischen Organe ausreichte (*Abbildung 4.24.C; Abbildung 4.25*). Interessanterweise konnten auch die adoptiv transferierten *Toso* defizienten cDCs (BMDCs), welche in Kultur einen verminderten Aktivierungsstatus zeigten (*Abbildung 4.19*), ein gemessen an der absoluten Zellzahl vergleichbares Priming sowie effiziente Zytotoxizität induzieren (*Abbildung 4.20-21*). Dies suggeriert ein TNF α unabhängigen Reifungsmechanismus der DCs zu Beginn der Infektion und geht mit übrigen Befunden sowie den beschriebenen Infektionen in den *TNFR1*^{-/-} Mäusen einher.

Untersuchungen konnten bereits zeigen, dass das Kontraktionsverhalten der CD8⁺ T-Lymphozyten bereits in der frühen Phase der Infektion programmiert wird (Badovinac et al., 2002, 2004). Die bereits in einigen Publikationen gezeigte antiapoptotische Wirkung des *Toso* Proteins könnte einen Schutzmechanismus gegen die induzierten Kontraktionssignale darstellen. Während naive T-Lymphozyten hohe Level an *Toso* mRNA zeigten (Abbas et al., 2005) (*Abbildung 4.4.A*), wird das Protein nur geringfügig auf der Zelloberfläche exprimiert (Nguyen et al., 2011). Dies suggeriert eine zu

Makrophagen vergleichbare Akkumulation des Proteins im *trans*-Golgi (Vire et al., 2011). Aktivierte T-Zellen regulieren das Protein auf der Oberfläche innerhalb weniger Stunden nach der TCR-Stimulation hoch (Nguyen et al., 2011), was über die Transportleistung der Zelle gut möglich, über die Proteinbiosynthese jedoch relativ unwahrscheinlich scheint. Zudem konnte eine enorme Reduktion der mRNA in aktivierten T-Zellen unmittelbar nach der TCR-Stimulation verzeichnet werden (Abbildung 4.4.A) (Abbas et al., 2005) und deutet somit auf die erste Variante der Regulation.

A



B

```

hToso1      FVTRVTTPAQRGKVPVHHSSEPTQITHRPRVSRASSVAGDKPRTFLPSTTASKISALEG 218
hToso3      FVTRVTTPAQRGKVPVHHSSEPTQITHRPRVSRASSVAGDKPRTFLPSTTASKISALEG 106
hToso4      FVTRVTTPAQRGKVPVHHSSEPTQITHRPRVSRASSVAGDKPRTFLPSTTASKISALEG 218
mToso       VIAKVTTPTPKTEAPPVHQESSITTSVTQHPRVYRAFSVATKSPALLPATTASKTSTQQ- 222
           .....***: : :.***: *. *.:*::*** ** **: . * .:***:***** *: :

```

Abbildung 5.1: *In silico* Analyse des murinen Toso (*mToso*) konnte mehrere O-Glycosylierungspositionen proximal der IgV-Domäne des extrazellulären Teils des Proteins identifizieren (A) (Kapitel 3.1.3). Die prominentesten Positionen stimmen mit denen des humanen Proteins (*hToso*) überein und sind zudem in den veröffentlichten Sequenzen aller *hToso*-Varianten hochkonserviert. B) Die Positionen TT (Box1) und SSTT (Box2) werden im membrangebundenen *hToso1* nachweislich glykosyliert und sind mit der Funktionalität des Proteins in Verbindung gebracht. Die Position TT-TT (Box3) ist neu und noch unzureichend untersucht. Die Sequenzen sind im *One-Letter Code* angegeben mit dem darunter stehenden Konservierungsstatus von „.“ ähnlich über „:“ gutem Konservierungsstatus bis hin zu „*“ identischen Aminosäuren.

Untersuchungen zufolge ist für einen effizienten Transport von Toso zur Plasmamembran eine O-Glykosylierung im apikalen Teil der extrazellulären Domäne des Proteins essentiell (Vire et al., 2011). Gezielte Mutagenese konnte in einer der vier beschriebenen humanen Toso-Varianten mehrere funktionelle Glykosylierungsstellen identifizieren, wovon eine mit dem Transport an die Oberfläche in Verbindung gebracht werden konnte. Diese Position ist auch im murinen Toso konserviert und deutet auf eine vergleichbare Funktion

hin (*Abbildung 5.1.B*). Durch die mit der Aktivierung der T-Zellen verbundene Transkriptionsminderung der mRNA stellt Toso einen nur zeitlich begrenzten Schutz vor apoptotischen Signalen in der Effektorphase der Infektion und somit einen eleganten Mechanismus der Kontraktionsprogrammierung. Die Begrenzung eines solchen Depots könnte durch die Halbwertszeit des Proteins erfolgen und müsste in Memory-T-Lymphozyten verlängert werden. Die Hochregulation der Toso mRNA in memT-Lymphozyten konnte bereits nachgewiesen werden (Abbas et al., 2005) und deutet somit auf eine hohe Wahrscheinlichkeit dieser Theorie.

Betrachtet man die Kontraktion Toso defizienter T-Lymphozyten, scheinen die beschriebenen Befunde die Theorie des Schutzdepots über die Expression von Toso zu bestätigen. Eine Deletion des Proteins resultiert im abrupten sterben der T-Zellen *in vivo* und *in vitro* nach einer gewissen Expansionszeit (*Abbildung 4.22.A; Abbildung 4.23.A*). Ab d6 *p.i.* ist die Frequenz der CD8⁺ T-Lymphozyten im Blut der Tiere nach anfänglich verstärkter Expansion signifikant vermindert und resultiert schließlich in verspäteter viralen Kontrolle und geringerer Pathologie, dem infektiösen Phänotypen der *Toso*^{-/-} Maus (*Abbildung 4.2*).

Interessanterweise ist die Expression von Toso für das Überleben der T-Zellen sowohl auf T-Lymphozyten als auch auf DCs von Bedeutung. In gemischten Knochenmarkschimären konnte ein funktionelles Priming mit nötigen Survival-Signalen durch das C57BL/6J Knochenmark kompensiert werden, das intrinsische Fehlen eines apoptotischen Schutzdepots jedoch nicht (*Abbildung 4.22.A*). Die vergleichbare anfängliche Expansion spezifischer T-Zellen bis d8 *p.i.* zeigt die Kompensation der Überlebenssignale seitens der DCs und resultiert trotzdem in einer vorzeitigen Kontraktion der CD8⁺ T-Zellen nach d8 *p.i.* (*Abbildung 4.22.B-C*). Vergleichbare Effekte konnten in Transferexperimenten mit spezifischen TCR-*knock in* T-Lymphozyten beobachtet werden (*Abbildung 4.29*). Adoptive Transfers spezifischer T-Zellen beider Genotypen in C57BL/6J x CD45.1 Mäuse konnten keine stabile Expansion Toso defizienter T-Zellen induzieren. Nach anfänglicher Proliferation konnte die exogene *Toso*^{-/-} Population spezifischer T-Zellen kaum mehr im Blut nachgewiesen werden und zeigte d12 *p.i.* verschwindend geringe Frequenzen in den Organen.

In vitro Kulturen konnten jedoch ein enormes Potential der Aktivierung und Proliferation *Toso*^{-/-} T-Lymphozyten zeigen und deuten somit ein Fehlen der intrinsischen TCR-Verarbeitung als unwahrscheinlich. Im Gegenteil resultierte die gezielte Stimulation des TCRs der naiv vergleichbaren T-Zellen (*Abbildung 4.13*) beim Priming durch

C57BL/6J-BMDCs (*Abbildung 4.15*) oder durch direkte Stimulation mit dem Antigen (*Anhang 6.11*) in einer stärkeren Oberflächenexpression aller Aktivierungsmarker auf *Toso*^{-/-} CD8⁺ T-Zellen. Gleiches galt für das Proliferationspotential spezifischer T-Zellen bei Primern mit C57BL/6J-BMDCs. Sowohl das Clustering in Kultur (*Abbildung 4.16.A*) als auch die Expansion im *in vivo* und *in vitro* Proliferationsassay (*Abbildung 4.28*) zeigten ein stärkeres Expansionsverhalten und konnten somit nicht die Ursache für das Verschwinden der exogenen Population in den adoptiven Transfers darstellen (*Abbildung 4.29.A-B*).

Die Theorie der beidseitigen Expression von Toso sowohl auf T-Zellen als auch auf DCs konnte zudem in umgekehrten Transfers der CD45.1 x P14 T-Lymphozyten in *Toso*^{-/-} und C57BL/6J Empfänger gezeigt werden (*Daten nicht gezeigt*). Auch hier konnten die exogenen spezifischen T-Zellen in *Toso*^{-/-} Empfängern nach anfangs vergleichbarer Proliferation d12 *p.i.* nicht mehr detektiert werden und deuten auf verminderte Survival-Signale von Toso defizienten DCs hin (*Anhang 6.9*). Einen möglichen verminderten homöostatischen Druck auf die spezifischen T-Zellen über Toso konnte ausgeschlossen werden. Sowohl im *RAG1*^{-/-} Maus Modell (*Abbildung 4.26*) als auch in CD8⁺ T-Zell-Depletionsexperimenten (*Abbildung 4.27*) konnte die homöostatische Kontrolle des T-Lymphozytenpools vergleichbar und über IL7R reguliert gezeigt werden.

Welche Mechanismen die Kontraktion regulieren ist sehr umstritten. Die gezeigten Daten könnten auf eine strenge Regulation der Expansion über TNF α -maturierte dendritische Zellen hindeuten und lassen auf eine direkte Interaktion von auf der Zelloberfläche expremiertem Toso mit einem unbekanntem Liganden schließen. Die Möglichkeit einer Selbstinteraktion sowie die Bindung der von DCs produzierten Moleküle über Toso könnten eine Regulationsmöglichkeit der T-Zellkontraktion darstellen und über eine stringente Kontrolle der Proteinexpression auf beiden Zellarten reguliert werden.

Im humanen System konnten bereits mehrere Splice-Varianten von Toso nachgewiesen werden (Li et al., 2011) (*Anhang 6.13*). Eine davon wurde als eine lösliche Form des Proteins identifiziert (hToso4) und in hohen Mengen im Serum von CLL Patienten nachgewiesen (Li et al., 2011). Die Übereinstimmung mit dem bisher bekannten murinem Transkript von Toso beträgt 56% (Ähnlichkeit 69%) (*Anhang 6.13*). Die Möglichkeit der parakrinen Wirkung von Toso erschwert somit die funktionelle Aufklärung des Proteins *in vivo*.

Expression von Faim3/Toso/FcμR

Die Expression und Funktion von Toso wird in der heutigen Literatur kontrovers diskutiert. Einige kürzlich veröffentlichte Arbeiten zeigen eine exklusive Toso abhängige Interaktion mit IgM, welche die Internalisierung des Pathogens über eine intrazelluläre YXXΦ-Domäne bewirkt (Kubagawa et al., 2009; Shima et al., 2010; Vire et al., 2011). Eine hohe Oberflächendichte des Proteins auf B-Lymphozyten sowie die propagierte Funktion von Toso bei der Entwicklung von B-Zellen schließt IgM als möglichen Liganden für murines Toso ein. Die entsprechenden funktionellen Domänen sind auch im murinen Protein konserviert (*Abbildung 5.1-2*) und suggerieren eine ähnliche Wirkung. IgM stellt auch für die virale Kontrolle ein entscheidendes Molekül dar und verhilft als natürlich vorkommendes Immunoglobulin zur Virusaufnahme aus der Peripherie (Ochsenbein et al., 1999).

```

hToso1      PPAPLQVSESPWLHAPSLKTSCEYVSLYHQPAAMMEDSDSDDYINVPA----- 390
hToso3      PPAPLQVSESPWLHAPSLKTSCEYVSLYHQPAAMMEDSDSDDYINVPA----- 278
mToso       SPASPQVLEAPWPHTPSLKMSCFYVSLGYQPAVNLEDPDSDDYINIPDPSHLPSYAPGPR 418
           .** . ** *:* ** *:* ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** *

```

Abbildung 5.2.: Konservierungsstatus des YXXΦ-Motivs im murinen Toso. *In silico* Analyse des murinen Toso (mToso) verglichen mit humanen Varianten mit einer intrazellulären Domäne (hToso) wies einen hohen Konservierungsstatus des YXXΦ-Motivs an zwei von drei möglichen Positionen auf (markierte Stellen) (*Kapitel 3.1.3*). Die Sequenzen sind im *One-Letter Code* angegeben mit dem darunter stehenden Konservierungsstatus von „.“ ähnlich über „:“ gutem Konservierungsstatus bis hin zu „*“ identischen Aminosäuren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde unter diesem Aspekt die frühe CTL-Antwort in der *slgM*^{-/-} Maus genauer untersucht (*Anhang 6.12*). Im Gegensatz zu *Toso*^{-/-} Tieren konnte in *slgM*^{-/-} Maus keine differentielle T-Zell-Expansion in den ersten Tagen der Infektion detektiert werden. *slgM* defiziente Mäuse zeigten erst ab d12 *p.i.* gravierende Unterschiede in der zytotoxischen T-Zellantwort und zeigten interessanterweise vergleichbare Level an ALT im Serum während der Infektion (*Anhang 6.12.A*). Eine mögliche Ligandenbindung des IgM ist damit nicht ausgeschlossen, scheint jedoch im Hintergrund der beschriebenen Effekte nicht die Ursache des viralen Phänotyps von *Toso*^{-/-} Mäusen zu sein.

6. ANHANG

6.1. Virale Titer der Knochenmarkschimären

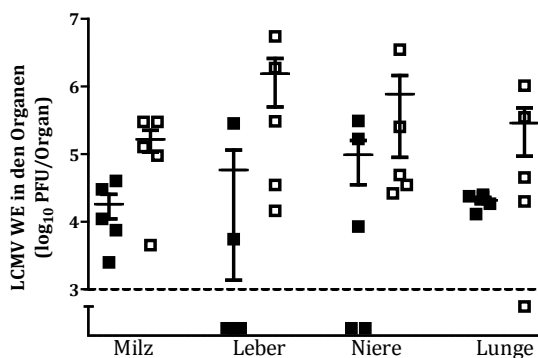


Abbildung 6.1.1.: Virale Infektion der Knochenmarkschimären. Bestrahlte C57BL/6J Mäuse wurden mit dem Knochenmark aus C57BL/6J (■) und *Toso*^{-/-} (□) Tieren rekonstituiert und nach einer 30 tägigen Rekonstitutionsphase mit 2×10^5 PFU des LCMV WE intravenös infiziert. An d12 *p.i.* wurden die viralen Titer in peripheren Organen der Tiere bestimmt (Kapitel 3.2.5.4). Es wurden insgesamt je fünf Tiere pro Gruppe in zwei unabhängigen Versuchsansätzen verwendet.

6.2. Funktionalität von B-Lymphozyten

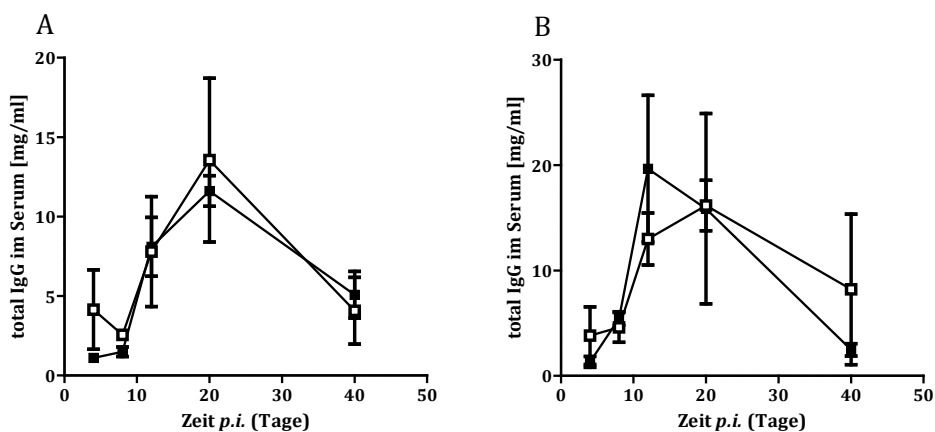


Abbildung 6.2.1.: Bestimmung der Immunglobulinlevels im Serum von *Toso*^{-/-} (□) und C57BL/6J-Kontrolltieren (■) als zeitabhängige Kinetik nach einer intravenösen Virusinfektion mit 2×10^2 PFU (A) bzw. 2×10^6 PFU (B) des LCMV WE (A n=2-4; B n=3-6).

6.3. Entwicklung der iDCs in der *Toso*^{-/-}Maus

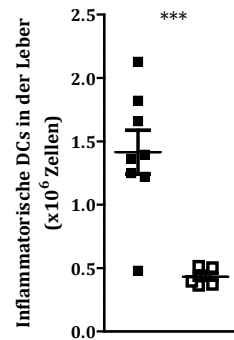


Abbildung 6.3.1: Die Frequenzen inflammatorischer dendritischer Zellen (iDCs) in der Leber von *Toso*^{-/-} (□) und C57BL/6J (■) Mäusen während einer viralen Infektion mit 2×10^6 PFU des LCMV WE d6 *p.i.* Die Frequenzen der iDCs wurden nach einem enzymatischen Verdau der Leber mit Liberase und DNase (Kapitel 3.2.5.7) im Durchflusszytometer als CD11b⁺CD11c^{int}Ly6C^{int} definierte Population mit jeweils 6-8 Tieren in zwei unabhängigen Versuchsansätzen bestimmt.

6.4. Phagozytose-Kapazität der BMΦ

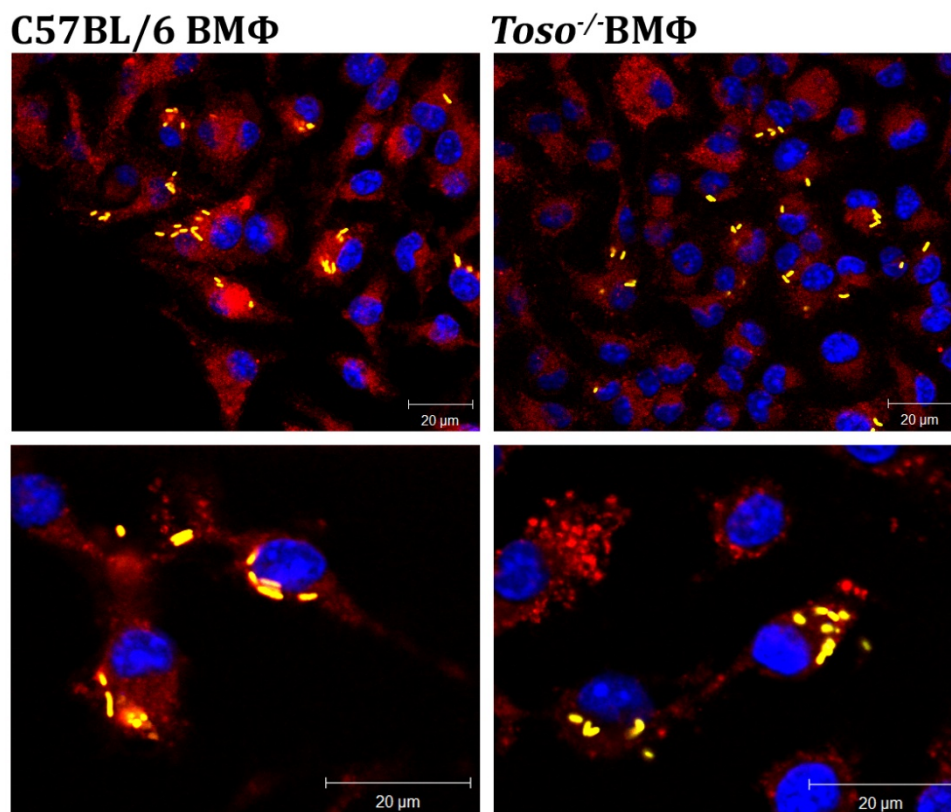


Abbildung 6.4.1: Phagozytose CFSE-gelabelter *Listeria* von *in vitro* generierten Makrophagen (BMΦ). Aus dem Knochenmark von C57BL/6J (linke Spalte) und *Toso*^{-/-} (rechte Spalte) Tieren wurden unter der Verwendung von M-CSF als Differenzierungsstimulus BMΦ generiert und d10 nach Differenzierungsbeginn 12 h auf CoverSlips inkubiert. Anschließend wurde das Kulturmedium gewechselt und die Zellen mit CFSE-gelabelten *Listeria* (MOI1) 2 h inkubiert. Die Färbung erfolgte mit F4/80-PE und DAPI (Kapitel 3.2.3.1). Maßstabsbalken beträgt sowohl in der Übersicht als auch im Ausschnitt 20 μm.

6.5. GM-CSF Expression

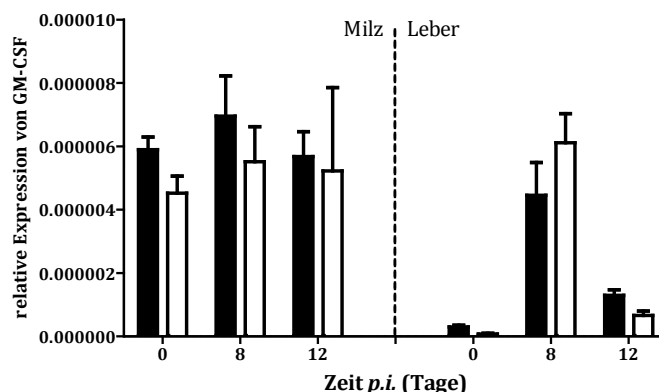


Abbildung 6.5.1: Transkriptioneller Nachweis der GM-CSF-Expression in der Milz und der Leber in C57BL/6J (schwarze Balken) und *Toso*^{-/-} (weiße Balken) Mäusen während einer viralen Infektion mit 2×10^6 PFU des LCMV WE. Die gesamte RNA aus den Organen wurde frisch nach deren Entnahme mittels TriFast®/Trizols isoliert (Kapitel 3.2.1) und die Transkriptmengen in der quantitativen *real time* PCR unter der Verwendung des SYBR®Green als Farbreagenz bestimmt. Die Transkriptmengen wurden auf 18S rRNA abgeglichen und als relative Expression ($2^{-\Delta Ct}$) angegeben. (n=4)

6.6. Untersuchung von *Toso*^{-/-} BMDCs

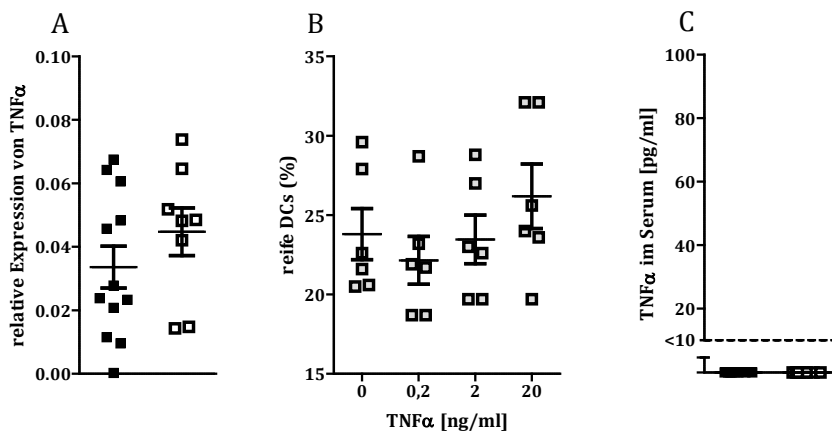


Abbildung 6.6.1: A) Transkriptioneller Nachweis von TNF α -mRNA in BMDCs d10 nach Differenzierungsbeginn generiert unter der Verwendung von GM-CSF als Differenzierungsstimulus. Die gesamte RNA der BMDCs generiert aus C57BL/6J (■) und *Toso*^{-/-} (□) Knochenmark wurde nach der Differenzierung der Zellen mittels Trizol®/TriFast isoliert und die Expression von TNF α mittels quantitativen *real time* PCR unter der Verwendung von SYBR®Green als Farbreagenz ermittelt (Kapitel 3.2.1). B) TNF α Behandlung der BMDCs aus *TNFRI*^{-/-} Mäusen d3 nach Differenzierungsbeginn in der *TNFRI*^{-/-} Kultur generiert unter der Einwirkung von GM-CSF und konzentrationsabhängiger Zugabe von TNF α d3 des Differenzierungsprozesses. C) TNF α Konzentration im Serum naiver C57BL/6J (■) und *Toso*^{-/-} (□) Tiere (n=8) gemessen im ELISA (Kapitel 3.2.2).

6.7. Zytokinproduktion in BMDCs-T-Zell-Mischkulturen

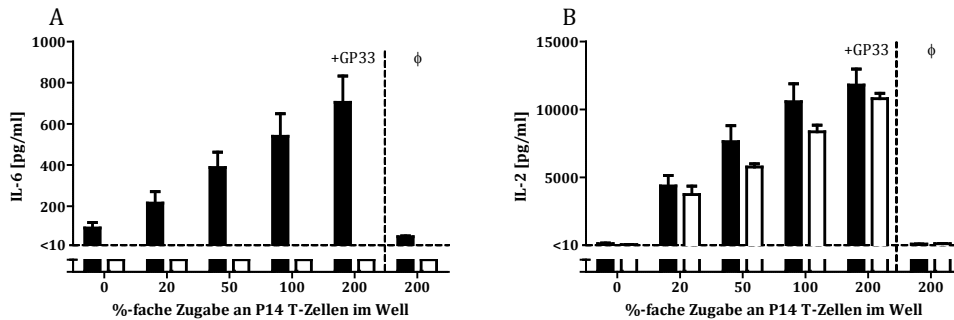


Abbildung 6.7.1: Zytokinproduktion in Mischkulturen der GP33-gelabelter *IL-6*^{-/-} BMDCs (helle Balken) sowie C57BL/6J BMDCs (schwarze Balken) mit aufgereinigten T-Lymphozyten aus P14 Mäusen nach einer Inkubationszeit von 36 h. Die Zellüberstandskonzentration an IL-6 (A) und an IL-2 (B) als Kontrollzytokin für die T-Zellaktivierung wurden mittels ELISA mit insgesamt 4-11 Knochenmarkspendern in min 4 unabhängigen Versuchsansätzen bestimmt worden (Kapitel 3.2.2).

6.8. Virale Titer d4 p.i. in der *Toso*^{-/-} Maus

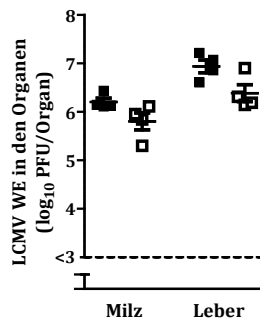


Abbildung 6.8.1: Virale Replikation in peripheren Organen von C57BL/6J (■) und *Toso*^{-/-} (□) Mäusen d4 p.i. mit 2×10^6 PFU des LCMV WE. Die Titerbestimmung in der Milz und Leber erfolgte wie im Kapitel 3.2.5.4 beschrieben mit insgesamt jeweils vier Tieren pro Gruppe in zwei unabhängigen Versuchsansätzen.

6.9. Überleben von T-Lymphozyten

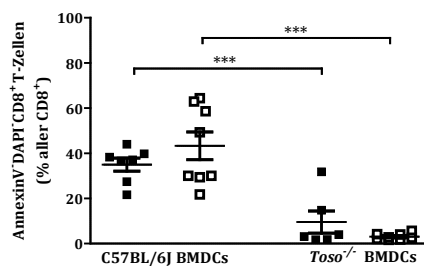


Abbildung 6.9.1: Überleben von T-Lymphozyten in den T-Zell-BMDC Mischkulturen nach der Inkubationszeit von 72h. Die aus dem Knochenmark von C57BL/6J (linker Datensatz) und *Toso*^{-/-} (rechter Datensatz) Mäusen *in vitro* mit GM-CSF als Differenzierungsstimulus generierte BMDCs wurden d10 nach Differenzierungsbeginn 12 h mit GP33 gelabelt und anschließend mit aufgereinigten P14 (■) oder *Toso*^{-/-}P14 (□) T-Lymphozyten über einen Zeitraum von 72 h inkubiert. Anschließend wurde das Überleben (DAPI-AnnexinV-) der CD8⁺T-Zellen in Kultur bestimmt (Kapitel 3.2.3.3).

6.10. Aktivierungspotential der *TNFR1*^{-/-} BMDCs

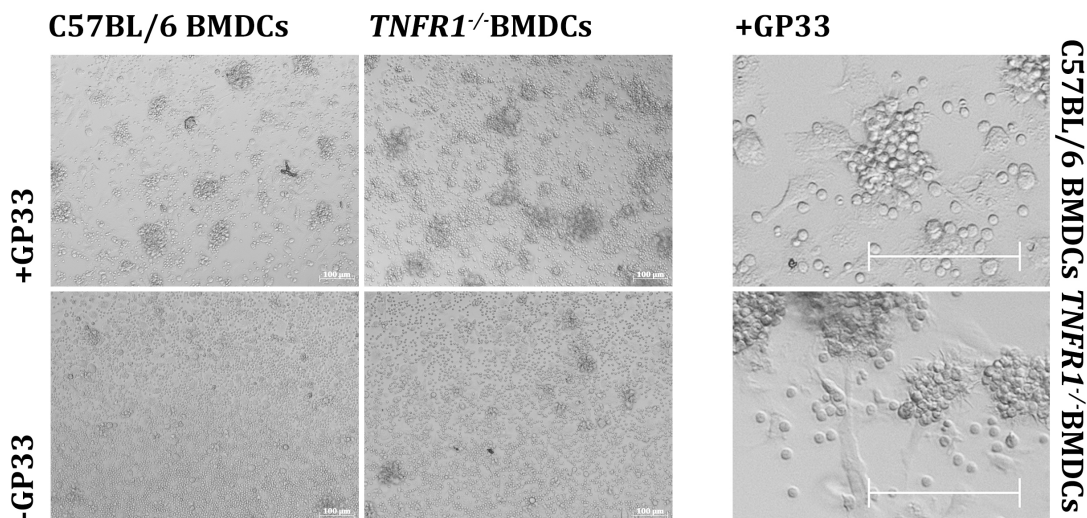


Abbildung 6.10.1: Aktivierungspotential der *TNFR1*^{-/-} BMDCs wurde in Mischkulturen GP33-gelabelter BMDCs generiert aus dem Knochenmark von C57BL/6J (linke Bildgruppe erste Spalte) und *TNFR1*^{-/-} (linke Bildgruppe zweite Spalte) Mäusen unter der Verwendung von GM-CSF als Differenzierungsstimulus und aufgereinigten T-Lymphozyten der P14 Mäuse nach einer Inkubationszeit von 36 h untersucht. Die linke Bildgruppe zeigt das Clusteringpotential der T-Lymphozyten beim spezifischen Aktivierungssignal (obere Zeile) bzw. unstimulierter Kontrolle (untere Zeile). Die Kontaktaufnahme zu DCs und das Proliferationsverhalten der P14 T-Lymphozyten beim Priming durch die *TNFR1*^{-/-} BMDCs konnte mit dem der Kontrolltiere vergleichbar beobachtet werden (linke Bildgruppe). Der Maßstabsbalken beträgt in beiden Bildgruppen 100 µm.

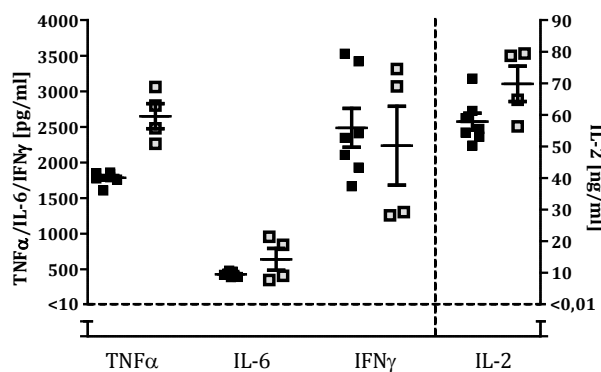


Abbildung 6.10.2: Untersuchung der in der Mischkultur produzierten Zytokine. Eine Kokultur der mit GM-CSF generierten GP33-gelabelten BMDCs aus dem Knochenmark von C57BL/6J (■) sowie *TNFR1*^{-/-} (■) Mäusen mit P14 T-Lymphozyten wurde 36 h inkubiert und die Zytokinproduktion im Überstand auf TNFα, IL-6 und IFNγ (linke Y-Achse), sowie IL-2 (rechte Y-Achse) anschließend im ELISA untersucht. Die Experimente wurden mit jeweils insgesamt vier Tieren pro Gruppe in zwei unabhängigen Versuchsansätzen durchgeführt.

6.11. Aktivierungsmarker von T-Zellen nach TCR-Stimulation

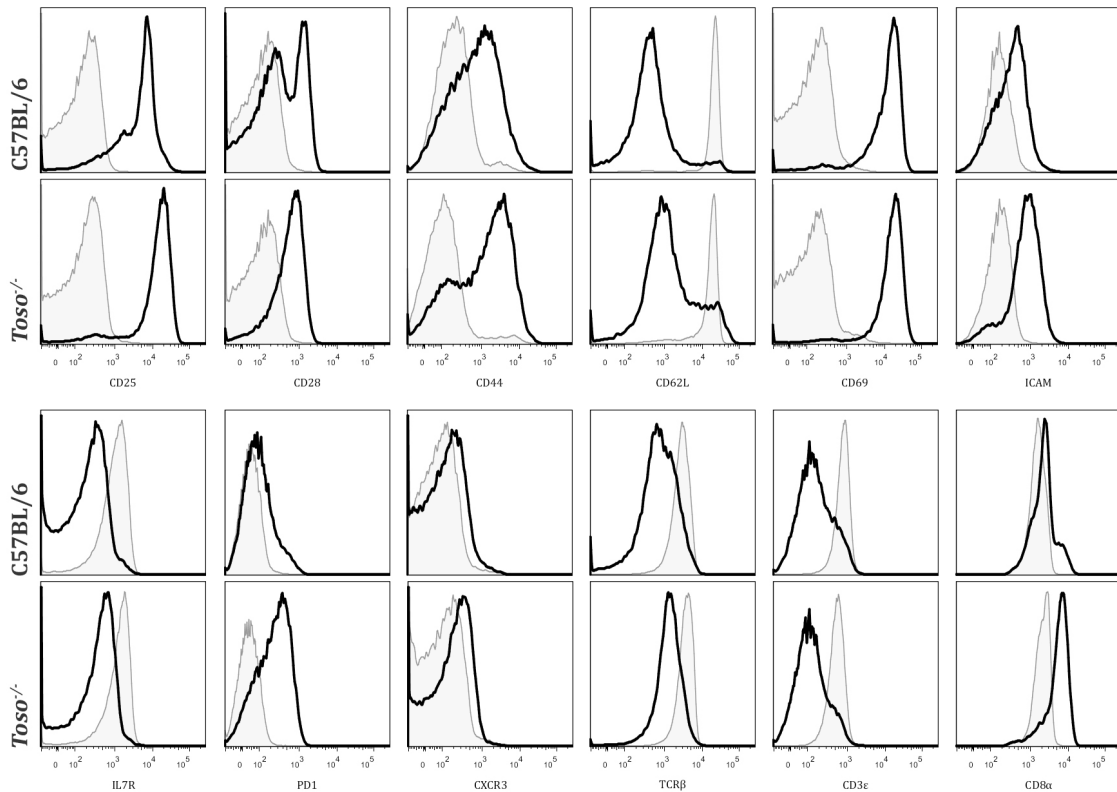


Abbildung 6.11.1.: Oberflächenexpression der Aktivierungsmarker von CD8⁺T-Lymphozyten nach einer TCR-Stimulation. Aufgereinigte T-Zellen der Lymphknoten und der Milz isoliert aus C57BL/6J (erste und dritte Zeile) und *Toso*^{-/-} (zweite und vierte Zeile) Mäusen wurden mit α CD3 ϵ und α CD28 über einen Zeitraum von 24 h aktiviert (Kapitel 3.2.4.6) und anschließend die Oberflächenexpression einiger Aktivierungsmarker auf CD8⁺T-Zellen untersucht (Kapitel 3.2.3.1). Gezeigt sind repräsentative Histogramme aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten mit insgesamt jeweils vier Spendern. Grau schattiert ist die Expression der Marker nach 24 h unstimuliert, schwarze Linie stellt die Expression der TCR-aktivierten T-Lymphozyten dar.

6.12. Akut virales Infektionsmodell in der *slgM*^{-/-} Maus

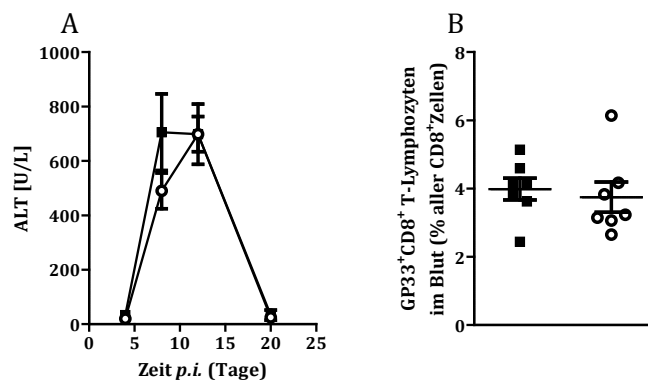


Abbildung 6.12.1.: Akut virales Infektionsmodell in der *slgM*^{-/-} Maus. An d0 wurden C57BL/6J (■) sowie *slgM*^{-/-} (○) Mäuse mit 2×10^6 PFU des LCMV WE intravenös infiziert und (A) an den ausgewiesenen Tagen die Aktivität der ALT im Serum gemessen ($n=3-7$) (Kapitel 3.2.5.5), sowie (B) die Frequenzen GP33⁺CD8⁺T-Lymphozyten d8 p.i. im Blut mit jeweils sieben Tieren pro Gruppe bestimmt.

6.13. Sequenzdaten

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

hTOSO1      MDFFWLWPLYFLPVSGALRILPEVKVEGELGGSVTIKCPLPEMHVRIYLCREMAGSGTCGT 60
hTOSO3      MDFFWLWPLYFLP----- 12
hTOSO4      MDFFWLWPLYFLPVSGALRILPEVKVEGELGGSVTIKCPLPEMHVRIYLCREMAGSGTCGT 60
mTOSO       MDFFWLWLLYFLPVSGALRVLPEVQLNVEWGGSIIECPLPQLHVRMYLCRQMAKPGICST 60
          ***** *****

hTOSO1      VVSTTNFIKAEYKGRVTLKQYPRKNLFLVEVTQLTESDSGVYACGAGMNTDRGKTQKVTL 120
hTOSO3      ----- 120
hTOSO4      VVSTTNFIKAEYKGRVTLKQYPRKNLFLVEVTQLTESDSGVYACGAGMNTDRGKTQKVTL 120
mTOSO       VVSN-TFVKKEYERRVTLTPCLDKKLFLVEMTQLTENDDGIYACGVMGKTDKGKTQKITL 119

hTOSO1      NVHSEY-EPWEEQMPETPKWFHLPYLFQMP----AYASSSKFVTRVTTPAQRGKVPP 174
hTOSO3      ----EY-EPWEEQMPETPKWFHLPYLFQMP----AYASSSKFVTRVTTPAQRGKVPP 62
hTOSO4      NVHSEY-EPWEEQMPETPKWFHLPYLFQMP----AYASSSKFVTRVTTPAQRGKVPP 174
mTOSO       NVHNEYPEPFWEDEWTSERPRWLHRFLQHQPWLHGSEHPSSSGVIAKVTTPPKTEAPP 179
          ** * * *: . * *: * . * * : . * * : . * * : . * * : . * *

hTOSO1      VHHSSPTQITHRPRVSRASSVAGDKPRTFLPSTTASKISALEGLLKPQTPSYNHHTRLH 234
hTOSO3      VHHSSPTQITHRPRVSRASSVAGDKPRTFLPSTTASKISALEGLLKPQTPSYNHHTRLH 122
hTOSO4      VHHSSPTQITHRPRVSRASSVAGDKPRTFLPSTTASKISALEGLLKPQTPSYNHHTRLH 234
mTOSO       VHQPSSITISVQHPRVYRAFVSATKSPALLPATTASKTSQQ-AIRPLEASYSHHTRLH 238
          ** : * . * : : * * * * * * * * : : * : * * . * * * * *

hTOSO1      RQRALDYGSQSGREGQGFHI-----LIPTILGLFLLALLGLVVKRAVERRKALSRRAR 287
hTOSO3      RQRALDYGSQSGREGQGFHI-----LIPTILGLFLLALLGLVVKRAVERRKALSRRAR 175
hTOSO4      RQSPLQAGPPTGRED-----ARPELPEAPRVAATALPKQHL 271
mTOSO       EQRTRHHGPHYGREDRGLHIPIPEFHILIPFGLFLLVLLGLVVKRAIQRRRASSRRAG 298
          . * . . * . * * . . * * : : . * * : .

hTOSO1      RLAVRMRALESS-----QRPRGSPRPRSQNNIYACPRRARGADAAGTGEAPVPGPGAPL 342
hTOSO3      RLAVRMRALESS-----QRPRGSPRPRSQNNIYACPRRARGADAAGTGEAPVPGPGAPL 230
hTOSO4      QRLPAARSWSGR-----CRHRGGPRSRPRS---AVAPRPAAGV----- 306
mTOSO       RLAMRRRGRGASRPFPTQRDASQRPRSQNNIYACPRRARGPDSLGPAAEAPLLNAPASA 358
          : * . . * .. * . * . : . * * * *

hTOSO1      PPAPLQVSESPWLHAPSLKTSCEYVSLYHQPAAMMEDSDSDDYINVPA----- 390
hTOSO3      PPAPLQVSESPWLHAPSLKTSCEYVSLYHQPAAMMEDSDSDDYINVPA----- 278
hTOSO4      ----- 418
mTOSO       SPASPQVLEAPWPHTPSLKMCSCEYVSLGYQPAVNLEDPDSDDYINIYINIPDPSHLPSYAPGPR 418

hTOSO1      ----
hTOSO3      ----
hTOSO4      ----
mTOSO       SSCQ 422

```

Abbildung 6.13.1: In silico Analyse von Toso. Dargestellt sind die AS-Sequenzen vom murinen (mTOSO) [NM_026976] sowie humanen Varianten von TOSO (hTOSO1, 3-4) [NM_005449; NM_001142473; NM_001193338] in einem *Multiple Sequence Alignment* unter der Verwendung von ClustalW2.1 im OneLetterCode. Der Konservierungsstatus zwischen den Sequenzen ist unterhalb angegeben („*“ hoher Konservierungsstatus, identisch; „:“ sehr ähnliche AS; „.” niedriger Konservierungsstatus. Die funktionellen Domänen im murinen Toso sind entsprechend markiert. Das N-terminale Signalpeptid (AS₁₋₁₈) sowie die Transmembrandomäne (AS₂₆₃₋₂₈₃) sind unterstrichen dargestellt. Der extrazelluläre Bereich des Proteins (AS₁₈₋₂₆₂) enthält eine IgV-Domäne (AS₃₃₋₁₀₄), die gelb markiert ist mit einer in Rot dargestellten Schwefelbrücke bei C₃₇-C₁₀₃. Proximal folgen mehrere hypothetische blau markierte O-Glykosylierungsstellen (TT₁₇₀; SS-TT₁₉₀; TT-TT₂₂₀) sowie eine prolinreiche Region bei AS₁₇₁₋₁₇₉ (grün markiert) und eine histidinreiche Sequenz bei AS₂₃₃₋₂₄₈ (grau markiert). Der zytoplasmatische Teil des Proteins (AS₂₈₄₋₄₂₂) weist neben einer basischen argininreichen Domäne (margenta) zwei YXXΦ-Motive (rot unterlegt), welche funktionell mit der Internalisation in Verbindung gebracht wurden.

7. REFERENZEN

- Abbas, A.R., D. Baldwin, Y. Ma, W. Ouyang, A. Gurney, F. Martin, S. Fong, M. van Lookeren Campagne, P. Godowski, P.M. Williams, A.C. Chan, and H.F. Clark. 2005. Immune response in silico (IRIS): immune-specific genes identified from a compendium of microarray expression data. *Genes and immunity* 6:319-331.
- Adachi, M., S. Suematsu, T. Suda, D. Watanabe, H. Fukuyama, J. Ogasawara, T. Tanaka, N. Yoshida, and S. Nagata. 1996. Enhanced and accelerated lymphoproliferation in Fas-null mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:2131-2136.
- Agnihothram, S.S., J. York, and J.H. Nunberg. 2006. Role of the stable signal peptide and cytoplasmic domain of G2 in regulating intracellular transport of the Junin virus envelope glycoprotein complex. *Journal of virology* 80:5189-5198.
- Agnihothram, S.S., J. York, M. Trahey, and J.H. Nunberg. 2007. Bitopic membrane topology of the stable signal peptide in the tripartite Junin virus GP-C envelope glycoprotein complex. *Journal of virology* 81:4331-4337.
- Ahmed, R., and D. Gray. 1996. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 272:54-60.
- Ahmed, R., and M.B. Oldstone. 1988. Organ-specific selection of viral variants during chronic infection. *The Journal of experimental medicine* 167:1719-1724.
- Ahmed, R., A. Salmi, L.D. Butler, J.M. Chiller, and M.B. Oldstone. 1984. Selection of genetic variants of lymphocytic choriomeningitis virus in spleens of persistently infected mice. Role in suppression of cytotoxic T lymphocyte response and viral persistence. *The Journal of experimental medicine* 160:521-540.
- Aichele, P., J. Zinke, L. Grode, R.A. Schwendener, S.H. Kaufmann, and P. Seiler. 2003. Macrophages of the splenic marginal zone are essential for trapping of blood-borne particulate antigen but dispensable for induction of specific T cell responses. *J Immunol* 171:1148-1155.
- Al-Hamoudi, W.K. 2009. Severe autoimmune hepatitis triggered by varicella zoster infection. *World journal of gastroenterology : WJG* 15:1004-1006.
- Alderson, M.R., T.W. Tough, T. Davis-Smith, S. Braddy, B. Falk, K.A. Schooley, R.G. Goodwin, C.A. Smith, F. Ramsdell, and D.H. Lynch. 1995. Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 181:71-77.
- Aldridge, J.R., Jr., C.E. Moseley, D.A. Boltz, N.J. Negovetich, C. Reynolds, J. Franks, S.A. Brown, P.C. Doherty, R.G. Webster, and P.G. Thomas. 2009. TNF/iNOS-producing dendritic cells are the necessary evil of lethal influenza virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:5306-5311.
- Algeciras-Schimnich, A., T.S. Griffith, D.H. Lynch, and C.V. Paya. 1999. Cell cycle-dependent regulation of FLIP levels and susceptibility to Fas-mediated apoptosis. *J Immunol* 162:5205-5211.
- Asselin-Paturel, C., A. Boonstra, M. Dalod, I. Durand, N. Yessaad, C. Dezutter-Dambuyant, A. Vicari, A. O'Garra, C. Biron, F. Briere, and G. Trinchieri. 2001. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nature immunology* 2:1144-1150.

- Badovinac, V.P., B.B. Porter, and J.T. Harty. 2002. Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nature immunology* 3:619-626.
- Badovinac, V.P., B.B. Porter, and J.T. Harty. 2004. CD8+ T cell contraction is controlled by early inflammation. *Nature immunology* 5:809-817.
- Barber, D.L., E.J. Wherry, D. Masopust, B. Zhu, J.P. Allison, A.H. Sharpe, G.J. Freeman, and R. Ahmed. 2006. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439:682-687.
- Barker, R.N., L.P. Erwig, K.S. Hill, A. Devine, W.P. Pearce, and A.J. Rees. 2002. Antigen presentation by macrophages is enhanced by the uptake of necrotic, but not apoptotic, cells. *Clinical and experimental immunology* 127:220-225.
- Battegay, M., S. Cooper, A. Althage, J. Banziger, H. Hengartner, and R.M. Zinkernagel. 1991. Quantification of lymphocytic choriomeningitis virus with an immunological focus assay in 24- or 96-well plates. *Journal of virological methods* 33:191-198.
- Bender, J., T. Mitchell, J. Kappler, and P. Marrack. 1999. CD4+ T cell division in irradiated mice requires peptides distinct from those responsible for thymic selection. *The Journal of experimental medicine* 190:367-374.
- Bennett, M.W., J. O'Connell, G.C. O'Sullivan, C. Brady, D. Roche, J.K. Collins, and F. Shanahan. 1998a. The Fas counterattack in vivo: apoptotic depletion of tumor-infiltrating lymphocytes associated with Fas ligand expression by human esophageal carcinoma. *J Immunol* 160:5669-5675.
- Bennett, S.R., F.R. Carbone, F. Karamalis, R.A. Flavell, J.F. Miller, and W.R. Heath. 1998b. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 393:478-480.
- Berzins, S.P., R.L. Boyd, and J.F. Miller. 1998. The role of the thymus and recent thymic migrants in the maintenance of the adult peripheral lymphocyte pool. *The Journal of experimental medicine* 187:1839-1848.
- Bettinardi, A., D. Brugnoli, E. Quiros-Roldan, A. Malagoli, S. La Grutta, A. Corrao, and L.D. Notarangelo. 1997. Missense mutations in the Fas gene resulting in autoimmune lymphoproliferative syndrome: a molecular and immunological analysis. *Blood* 89:902-909.
- Beyer, W.R., D. Popplau, W. Garten, D. von Laer, and O. Lenz. 2003. Endoproteolytic processing of the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein by the subtilase SKI-1/S1P. *Journal of virology* 77:2866-2872.
- Bonhomme, C.J., A.A. Capul, E.J. Lauron, L.H. Bederka, K.A. Knopp, and M.J. Buchmeier. 2011. Glycosylation modulates arenavirus glycoprotein expression and function. *Virology* 409:223-233.
- Borrow, P., and M.B. Oldstone. 1994. Mechanism of lymphocytic choriomeningitis virus entry into cells. *Virology* 198:1-9.
- Boschaerts, T., M. Guillemins, B. Stijlemans, Y. Morias, D. Engel, F. Tacke, M. Herin, P. De Baetselier, and A. Beschin. 2010. Tip-DC development during parasitic infection is regulated by IL-10 and requires CCL2/CCR2, IFN-gamma and MyD88 signaling. *PLoS pathogens* 6:e1001045.
- Brasel, K., H.J. McKenna, K. Charrier, P.J. Morrissey, D.E. Williams, and S.D. Lyman. 1997. Flt3 ligand synergizes with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or granulocyte colony-stimulating factor to mobilize hematopoietic progenitor cells into the peripheral blood of mice. *Blood* 90:3781-3788.

- Brasel, K., H.J. McKenna, P.J. Morrissey, K. Charrier, A.E. Morris, C.C. Lee, D.E. Williams, and S.D. Lyman. 1996. Hematologic effects of flt3 ligand in vivo in mice. *Blood* 88:2004-2012.
- Brooks, D.G., M.J. Trifilo, K.H. Edelman, L. Teyton, D.B. McGavern, and M.B. Oldstone. 2006. Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. *Nature medicine* 12:1301-1309.
- Bruha, R., K. Dvorak, and J. Petrtyl. 2012. Alcoholic liver disease. *World journal of hepatology* 4:81-90.
- Buelens, C., V. Verhasselt, D. De Groote, K. Thielemans, M. Goldman, and F. Willems. 1997. Human dendritic cell responses to lipopolysaccharide and CD40 ligation are differentially regulated by interleukin-10. *European journal of immunology* 27:1848-1852.
- Burns, J.W., and M.J. Buchmeier. 1991. Protein-protein interactions in lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* 183:620-629.
- Byrne, J.A., and M.B. Oldstone. 1984. Biology of cloned cytotoxic T lymphocytes specific for lymphocytic choriomeningitis virus: clearance of virus in vivo. *Journal of virology* 51:682-686.
- Cao, W., M.D. Henry, P. Borrow, H. Yamada, J.H. Elder, E.V. Ravkov, S.T. Nichol, R.W. Compans, K.P. Campbell, and M.B. Oldstone. 1998. Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science* 282:2079-2081.
- Capul, A.A., M. Perez, E. Burke, S. Kunz, M.J. Buchmeier, and J.C. de la Torre. 2007. Arenavirus Z-glycoprotein association requires Z myristoylation but not functional RING or late domains. *Journal of virology* 81:9451-9460.
- Caux, C., C. Massacrier, B. Vanbervliet, B. Dubois, C. Van Kooten, I. Durand, and J. Banchereau. 1994. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *The Journal of experimental medicine* 180:1263-1272.
- Cella, M., A. Engering, V. Pinet, J. Pieters, and A. Lanzavecchia. 1997. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 388:782-787.
- Cella, M., D. Jarrossay, F. Facchetti, O. Alebardi, H. Nakajima, A. Lanzavecchia, and M. Colonna. 1999a. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nature medicine* 5:919-923.
- Cella, M., M. Salio, Y. Sakakibara, H. Langen, I. Julkunen, and A. Lanzavecchia. 1999b. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *The Journal of experimental medicine* 189:821-829.
- Cervantes-Barragan, L., R. Zust, F. Weber, M. Spiegel, K.S. Lang, S. Akira, V. Thiel, and B. Ludewig. 2007. Control of coronavirus infection through plasmacytoid dendritic-cell-derived type I interferon. *Blood* 109:1131-1137.
- Chen, L., S.M. Park, A.V. Tumanov, A. Hau, K. Sawada, C. Feig, J.R. Turner, Y.X. Fu, I.L. Romero, E. Lengyel, and M.E. Peter. 2010. CD95 promotes tumour growth. *Nature* 465:492-496.
- Chesnut, R.W., S.M. Colon, and H.M. Grey. 1982. Antigen presentation by normal B cells, B cell tumors, and macrophages: functional and biochemical comparison. *J Immunol* 128:1764-1768.
- Chinnaiyan, A.M., K. O'Rourke, G.L. Yu, R.H. Lyons, M. Garg, D.R. Duan, L. Xing, R. Gentz, J. Ni, and V.M. Dixit. 1996. Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science* 274:990-992.

- Chu, Y.W., S.A. Memon, S.O. Sharrow, F.T. Hakim, M. Eckhaus, P.J. Lucas, and R.E. Gress. 2004. Exogenous IL-7 increases recent thymic emigrants in peripheral lymphoid tissue without enhanced thymic function. *Blood* 104:1110-1119.
- Cooper, S., A.L. Erickson, E.J. Adams, J. Kansopon, A.J. Weiner, D.Y. Chien, M. Houghton, P. Parham, and C.M. Walker. 1999. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* 10:439-449.
- Cornu, T.I., and J.C. de la Torre. 2001. RING finger Z protein of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) inhibits transcription and RNA replication of an LCMV S-segment minigenome. *Journal of virology* 75:9415-9426.
- Croft, M., L.M. Bradley, and S.L. Swain. 1994. Naive versus memory CD4 T cell response to antigen. Memory cells are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many antigen-presenting cell types including resting B cells. *J Immunol* 152:2675-2685.
- Crum, N.F. 2006. Epstein Barr virus hepatitis: case series and review. *Southern medical journal* 99:544-547.
- DeBenedette, M.A., A. Shahinian, T.W. Mak, and T.H. Watts. 1997. Costimulation of CD28- T lymphocytes by 4-1BB ligand. *J Immunol* 158:551-559.
- Della Corte, C., M.R. Sartorelli, C.D. Sindoni, E. Girolami, L. Giovannelli, D. Comparcola, and V. Nobili. 2012. Autoimmune hepatitis in children: an overview of the disease focusing on current therapies. *European journal of gastroenterology & hepatology*
- Di Simone, C., and M.J. Buchmeier. 1995. Kinetics and pH dependence of acid-induced structural changes in the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein complex. *Virology* 209:3-9.
- Di Simone, C., M.A. Zandonatti, and M.J. Buchmeier. 1994. Acidic pH triggers LCMV membrane fusion activity and conformational change in the glycoprotein spike. *Virology* 198:455-465.
- Dieu, M.C., B. Vanbervliet, A. Vicari, J.M. Bridon, E. Oldham, S. Ait-Yahia, F. Briere, A. Zlotnik, S. Lebecque, and C. Caux. 1998. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *The Journal of experimental medicine* 188:373-386.
- Doherty, P.C., and R.M. Zinernagel. 1975. Capacity of sensitized thymus-derived lymphocytes to induce fatal lymphocytic choriomeningitis is restricted by the H-2 gene complex. *J Immunol* 114:30-33.
- Durbeej, M., M.D. Henry, M. Ferletta, K.P. Campbell, and P. Ekblom. 1998. Distribution of dystroglycan in normal adult mouse tissues. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 46:449-457.
- Eichler, R., O. Lenz, T. Strecker, M. Eickmann, H.D. Klenk, and W. Garten. 2003a. Identification of Lassa virus glycoprotein signal peptide as a trans-acting maturation factor. *EMBO reports* 4:1084-1088.
- Eichler, R., O. Lenz, T. Strecker, and W. Garten. 2003b. Signal peptide of Lassa virus glycoprotein GP-C exhibits an unusual length. *FEBS letters* 538:203-206.
- Ejrnaes, M., C.M. Filippi, M.M. Martinic, E.M. Ling, L.M. Togher, S. Crotty, and M.G. von Herrath. 2006. Resolution of a chronic viral infection after interleukin-10 receptor blockade. *The Journal of experimental medicine* 203:2461-2472.

- Ernst, B., D.S. Lee, J.M. Chang, J. Sprent, and C.D. Surh. 1999. The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery. *Immunity* 11:173-181.
- Evans, C.F., P. Borrow, J.C. de la Torre, and M.B. Oldstone. 1994. Virus-induced immunosuppression: kinetic analysis of the selection of a mutation associated with viral persistence. *Journal of virology* 68:7367-7373.
- Ferrari, C., A. Penna, A. Bertoletti, A. Valli, A.D. Antoni, T. Giuberti, A. Cavalli, M.A. Petit, and F. Fiaccadori. 1990. Cellular immune response to hepatitis B virus-encoded antigens in acute and chronic hepatitis B virus infection. *J Immunol* 145:3442-3449.
- Franco, A., L.G. Guidotti, M.V. Hobbs, V. Pasquetto, and F.V. Chisari. 1997. Pathogenetic effector function of CD4-positive T helper 1 cells in hepatitis B virus transgenic mice. *J Immunol* 159:2001-2008.
- Frese, M., V. Schwarzle, K. Barth, N. Krieger, V. Lohmann, S. Mihm, O. Haller, and R. Bartenschlager. 2002. Interferon-gamma inhibits replication of subgenomic and genomic hepatitis C virus RNAs. *Hepatology* 35:694-703.
- Froeschke, M., M. Basler, M. Groettrup, and B. Dobberstein. 2003. Long-lived signal peptide of lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein pGP-C. *The Journal of biological chemistry* 278:41914-41920.
- Fuller-Pace, F.V., and P.J. Southern. 1988. Temporal analysis of transcription and replication during acute infection with lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* 162:260-263.
- Fuller-Pace, F.V., and P.J. Southern. 1989. Detection of virus-specific RNA-dependent RNA polymerase activity in extracts from cells infected with lymphocytic choriomeningitis virus: in vitro synthesis of full-length viral RNA species. *Journal of virology* 63:1938-1944.
- Fung-Leung, W.P., T.M. Kundig, R.M. Zinkernagel, and T.W. Mak. 1991. Immune response against lymphocytic choriomeningitis virus infection in mice without CD8 expression. *The Journal of experimental medicine* 174:1425-1429.
- Gallimore, A., A. Glithero, A. Godkin, A.C. Tissot, A. Pluckthun, T. Elliott, H. Hengartner, and R. Zinkernagel. 1998. Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *The Journal of experimental medicine* 187:1383-1393.
- Garrett, W.S., L.M. Chen, R. Kroschewski, M. Ebersold, S. Turley, S. Trombetta, J.E. Galan, and I. Mellman. 2000. Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42. *Cell* 102:325-334.
- Gary-Gouy, H., P. Lebon, and A.H. Dalloul. 2002. Type I interferon production by plasmacytoid dendritic cells and monocytes is triggered by viruses, but the level of production is controlled by distinct cytokines. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 22:653-659.
- Geissmann, F., S. Jung, and D.R. Littman. 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19:71-82.
- Gimmi, C.D., G.J. Freeman, J.G. Gribben, G. Gray, and L.M. Nadler. 1993. Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:6586-6590.

- Goldrath, A.W., P.V. Sivakumar, M. Glaccum, M.K. Kennedy, M.J. Bevan, C. Benoist, D. Mathis, and E.A. Butz. 2002. Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8+ T cells. *The Journal of experimental medicine* 195:1515-1522.
- Grayson, J.M., A.J. Zajac, J.D. Altman, and R. Ahmed. 2000. Cutting edge: increased expression of Bcl-2 in antigen-specific memory CD8+ T cells. *J Immunol* 164:3950-3954.
- Griffith, T.S., X. Yu, J.M. Herndon, D.R. Green, and T.A. Ferguson. 1996. CD95-induced apoptosis of lymphocytes in an immune privileged site induces immunological tolerance. *Immunity* 5:7-16.
- Grundy, J.E., J. Trapman, J.E. Allan, G.R. Shellam, and C.J. Melief. 1982. Evidence for a protective role of interferon in resistance to murine cytomegalovirus and its control by non-H-2-linked genes. *Infection and immunity* 37:143-150.
- Guidotti, L.G., K. Ando, M.V. Hobbs, T. Ishikawa, L. Runkel, R.D. Schreiber, and F.V. Chisari. 1994. Cytotoxic T lymphocytes inhibit hepatitis B virus gene expression by a noncytolytic mechanism in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:3764-3768.
- Guidotti, L.G., P. Borrow, M.V. Hobbs, B. Matzke, I. Gresser, M.B. Oldstone, and F.V. Chisari. 1996. Viral cross talk: intracellular inactivation of the hepatitis B virus during an unrelated viral infection of the liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:4589-4594.
- Guidotti, L.G., and F.V. Chisari. 2000. Cytokine-mediated control of viral infections. *Virology* 273:221-227.
- Ha, S.J., S.N. Mueller, E.J. Wherry, D.L. Barber, R.D. Aubert, A.H. Sharpe, G.J. Freeman, and R. Ahmed. 2008. Enhancing therapeutic vaccination by blocking PD-1-mediated inhibitory signals during chronic infection. *The Journal of experimental medicine* 205:543-555.
- Harding, F.A., J.G. McArthur, J.A. Gross, D.H. Raulet, and J.P. Allison. 1992. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 356:607-609.
- Hartmann, G., G.J. Weiner, and A.M. Krieg. 1999. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:9305-9310.
- Hawiger, D., K. Inaba, Y. Dorsett, M. Guo, K. Mahnke, M. Rivera, J.V. Ravetch, R.M. Steinman, and M.C. Nussenzweig. 2001. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *The Journal of experimental medicine* 194:769-779.
- Henri, S., D. Vremec, A. Kamath, J. Waithman, S. Williams, C. Benoist, K. Burnham, S. Saeland, E. Handman, and K. Shortman. 2001. The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. *J Immunol* 167:741-748.
- Hildeman, D.A., Y. Zhu, T.C. Mitchell, P. Bouillet, A. Strasser, J. Kappler, and P. Murrack. 2002. Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim. *Immunity* 16:759-767.
- Hitoshi, Y., J. Lorens, S.I. Kitada, J. Fisher, M. LaBarge, H.Z. Ring, U. Francke, J.C. Reed, S. Kinoshita, and G.P. Nolan. 1998. Toso, a cell surface, specific regulator of Fas-induced apoptosis in T cells. *Immunity* 8:461-471.
- Hoeffel, G., A.C. Ripoche, D. Matheoud, M. Nascimbeni, N. Escriou, P. Lebon, F. Heshmati, J.G. Guillet, M. Gannage, S. Caillat-Zucman, N. Casartelli, O. Schwartz, H. De la Salle, D. Hanau, A.

- Hosmalin, and C. Maranon. 2007. Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 27:481-492.
- Honke, N., N. Shaabani, G. Cadeddu, U.R. Sorg, D.E. Zhang, M. Trilling, K. Klingel, M. Sauter, R. Kandolf, N. Gailus, N. van Rooijen, C. Burkart, S.E. Baldus, M. Grusdat, M. Lohning, H. Hengel, K. Pfeffer, M. Tanaka, D. Haussinger, M. Recher, P.A. Lang, and K.S. Lang. 2012. Enforced viral replication activates adaptive immunity and is essential for the control of a cytopathic virus. *Nature immunology* 13:51-57.
- Hugues, S., L. Fetler, L. Bonifaz, J. Helft, F. Amblard, and S. Amigorena. 2004. Distinct T cell dynamics in lymph nodes during the induction of tolerance and immunity. *Nature immunology* 5:1235-1242.
- Hume, D.A., and S. Gordon. 1983. Mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80. Identification of resident macrophages in renal medullary and cortical interstitium and the juxtaglomerular complex. *The Journal of experimental medicine* 157:1704-1709.
- Hume, D.A., A.P. Robinson, G.G. MacPherson, and S. Gordon. 1983. The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80. Relationship between macrophages, Langerhans cells, reticular cells, and dendritic cells in lymphoid and hematopoietic organs. *The Journal of experimental medicine* 158:1522-1536.
- Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu, and R.M. Steinman. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *The Journal of experimental medicine* 176:1693-1702.
- Inaba, K., S. Turley, F. Yamaide, T. Iyoda, K. Mahnke, M. Inaba, M. Pack, M. Subklewe, B. Sauter, D. Sheff, M. Albert, N. Bhardwaj, I. Mellman, and R.M. Steinman. 1998. Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 188:2163-2173.
- Inaba, K., M. Witmer-Pack, M. Inaba, K.S. Hathcock, H. Sakuta, M. Azuma, H. Yagita, K. Okumura, P.S. Linsley, S. Ikehara, S. Muramatsu, R.J. Hodes, and R.M. Steinman. 1994. The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *The Journal of experimental medicine* 180:1849-1860.
- Jacob, J., and D. Baltimore. 1999. Modelling T-cell memory by genetic marking of memory T cells in vivo. *Nature* 399:593-597.
- Jonuleit, H., U. Kuhn, G. Muller, K. Steinbrink, L. Paragnik, E. Schmitt, J. Knop, and A.H. Enk. 1997. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *European journal of immunology* 27:3135-3142.
- Ju, S.T., D.J. Panka, H. Cui, R. Ettinger, M. el-Khatib, D.H. Sherr, B.Z. Stanger, and A. Marshak-Rothstein. 1995. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature* 373:444-448.
- Jung, S., D. Unutmaz, P. Wong, G. Sano, K. De los Santos, T. Sparwasser, S. Wu, S. Vuthoori, K. Ko, F. Zavala, E.G. Pamer, D.R. Littman, and R.A. Lang. 2002. In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 17:211-220.
- Kabashima, K., T.A. Banks, K.M. Ansel, T.T. Lu, C.F. Ware, and J.G. Cyster. 2005. Intrinsic lymphotoxin-beta receptor requirement for homeostasis of lymphoid tissue dendritic cells. *Immunity* 22:439-450.

- Kaech, S.M., and R. Ahmed. 2001. Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nature immunology* 2:415-422.
- Kaech, S.M., S. Hemby, E. Kersh, and R. Ahmed. 2002. Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell* 111:837-851.
- Kaech, S.M., J.T. Tan, E.J. Wherry, B.T. Konieczny, C.D. Surh, and R. Ahmed. 2003. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nature immunology* 4:1191-1198.
- Kagi, D., B. Ledermann, K. Burki, P. Seiler, B. Odermatt, K.J. Olsen, E.R. Podack, R.M. Zinkernagel, and H. Hengartner. 1994a. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 369:31-37.
- Kagi, D., F. Vignaux, B. Ledermann, K. Burki, V. Depraetere, S. Nagata, H. Hengartner, and P. Golstein. 1994b. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 265:528-530.
- Kakimi, K., L.G. Guidotti, Y. Koezuka, and F.V. Chisari. 2000. Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *The Journal of experimental medicine* 192:921-930.
- Karasuyama, H., and F. Melchers. 1988. Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukin 2, 3, 4 or 5, using modified cDNA expression vectors. *European journal of immunology* 18:97-104.
- Karsunky, H., M. Merad, A. Cozzio, I.L. Weissman, and M.G. Manz. 2003. Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo. *The Journal of experimental medicine* 198:305-313.
- Kaufman, B., S.A. Gandhi, E. Louie, R. Rizzi, and P. Illei. 1997. Herpes simplex virus hepatitis: case report and review. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 24:334-338.
- Kennedy, M.K., M. Glaccum, S.N. Brown, E.A. Butz, J.L. Viney, M. Embers, N. Matsuki, K. Charrier, L. Sedger, C.R. Willis, K. Brasel, P.J. Morrissey, K. Stocking, J.C. Schuh, S. Joyce, and J.J. Peschon. 2000. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* 191:771-780.
- Kennedy, N.J., T. Kataoka, J. Tschopp, and R.C. Budd. 1999. Caspase activation is required for T cell proliferation. *The Journal of experimental medicine* 190:1891-1896.
- Kienzle, G., and J. von Kempis. 2000. CD137 (ILA/4-1BB), expressed by primary human monocytes, induces monocyte activation and apoptosis of B lymphocytes. *International immunology* 12:73-82.
- Kitamura, D., J. Roes, R. Kuhn, and K. Rajewsky. 1991. A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. *Nature* 350:423-426.
- Klavinskis, L.S., R. Geckeler, and M.B. Oldstone. 1989. Cytotoxic T lymphocyte control of acute lymphocytic choriomeningitis virus infection: interferon gamma, but not tumour necrosis factor alpha, displays antiviral activity in vivo. *The Journal of general virology* 70 (Pt 12):3317-3325.
- Kleijmeer, M.J., M.A. Ossevoort, C.J. van Veen, J.J. van Hellemond, J.J. Neefjes, W.M. Kast, C.J. Melief, and H.J. Geuze. 1995. MHC class II compartments and the kinetics of antigen presentation in activated mouse spleen dendritic cells. *J Immunol* 154:5715-5724.

- Kohlmeier, J.E., W.W. Reiley, G. Perona-Wright, M.L. Freeman, E.J. Yager, L.M. Connor, E.L. Brincks, T. Cookenham, A.D. Roberts, C.E. Burkum, S. Sell, G.M. Winslow, M.A. Blackman, M. Mohrs, and D.L. Woodland. 2011. Inflammatory chemokine receptors regulate CD8(+) T cell contraction and memory generation following infection. *The Journal of experimental medicine* 208:1621-1634.
- Koppelman, B., J.J. Neefjes, J.E. de Vries, and R. de Waal Malefyt. 1997. Interleukin-10 down-regulates MHC class II alphabeta peptide complexes at the plasma membrane of monocytes by affecting arrival and recycling. *Immunity* 7:861-871.
- Kronin, V., K. Winkel, G. Suss, A. Kelso, W. Heath, J. Kirberg, H. von Boehmer, and K. Shortman. 1996. A subclass of dendritic cells regulates the response of naive CD8 T cells by limiting their IL-2 production. *J Immunol* 157:3819-3827.
- Krug, A., A.R. French, W. Barchet, J.A. Fischer, A. Dzionek, J.T. Pingel, M.M. Orihuela, S. Akira, W.M. Yokoyama, and M. Colonna. 2004. TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* 21:107-119.
- Ku, C.C., M. Murakami, A. Sakamoto, J. Kappler, and P. Murrack. 2000. Control of homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines. *Science* 288:675-678.
- Kubagawa, H., S. Oka, Y. Kubagawa, I. Torii, E. Takayama, D.W. Kang, G.L. Gartland, L.F. Bertoli, H. Mori, H. Takatsu, T. Kitamura, H. Ohno, and J.Y. Wang. 2009. Identity of the elusive IgM Fc receptor (FcmuR) in humans. *The Journal of experimental medicine* 206:2779-2793.
- Kunz, S., L. Calder, and M.B. Oldstone. 2004a. Electron microscopy of an alpha-dystroglycan fragment containing receptor sites for lymphocytic choriomeningitis virus and laminin, and use of the receptoid body as a reagent to neutralize virus. *Virology* 325:207-215.
- Kunz, S., K.H. Edelmann, J.C. de la Torre, R. Gorney, and M.B. Oldstone. 2003. Mechanisms for lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein cleavage, transport, and incorporation into virions. *Virology* 314:168-178.
- Kunz, S., N. Sevilla, J.M. Rojek, and M.B. Oldstone. 2004b. Use of alternative receptors different than alpha-dystroglycan by selected isolates of lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* 325:432-445.
- Lanford, R.E., B. Guerra, H. Lee, D.R. Averett, B. Pfeiffer, D. Chavez, L. Notvall, and C. Bigger. 2003. Antiviral effect and virus-host interactions in response to alpha interferon, gamma interferon, poly(i)-poly(c), tumor necrosis factor alpha, and ribavirin in hepatitis C virus subgenomic replicons. *Journal of virology* 77:1092-1104.
- Lang, K.S., M. Recher, A.A. Navarini, N.L. Harris, M. Lohning, T. Junt, H.C. Probst, H. Hengartner, and R.M. Zinkernagel. 2005. Inverse correlation between IL-7 receptor expression and CD8 T cell exhaustion during persistent antigen stimulation. *European journal of immunology* 35:738-745.
- Lang, P.A., M. Recher, N. Honke, S. Scheu, S. Borkens, N. Gailus, C. Krings, A. Meryk, A. Kulawik, L. Cervantes-Barragan, N. Van Rooijen, U. Kalinke, B. Ludewig, H. Hengartner, N. Harris, D. Haussinger, P.S. Ohashi, R.M. Zinkernagel, and K.S. Lang. 2010. Tissue macrophages suppress viral replication and prevent severe immunopathology in an interferon-I-dependent manner in mice. *Hepatology* 52:25-32.
- Le Bon, A., V. Durand, E. Kamphuis, C. Thompson, S. Bulfone-Paus, C. Rossmann, U. Kalinke, and D.F. Tough. 2006a. Direct stimulation of T cells by type I IFN enhances the CD8+ T cell response during cross-priming. *J Immunol* 176:4682-4689.

- Le Bon, A., N. Etchart, C. Rossmann, M. Ashton, S. Hou, D. Gewert, P. Borrow, and D.F. Tough. 2003. Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nature immunology* 4:1009-1015.
- Le Bon, A., C. Thompson, E. Kamphuis, V. Durand, C. Rossmann, U. Kalinke, and D.F. Tough. 2006b. Cutting edge: enhancement of antibody responses through direct stimulation of B and T cells by type I IFN. *J Immunol* 176:2074-2078.
- Lee, H.W., S.J. Park, B.K. Choi, H.H. Kim, K.O. Nam, and B.S. Kwon. 2002a. 4-1BB promotes the survival of CD8+ T lymphocytes by increasing expression of Bcl-xL and Bfl-1. *J Immunol* 169:4882-4888.
- Lee, K.J., M. Perez, D.D. Pinschewer, and J.C. de la Torre. 2002b. Identification of the lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) proteins required to rescue LCMV RNA analogs into LCMV-like particles. *Journal of virology* 76:6393-6397.
- Lee, M.G., T.A. Borkowski, and M.C. Udey. 1993. Regulation of expression of B7 by murine Langerhans cells: a direct relationship between B7 mRNA levels and the level of surface expression of B7 by Langerhans cells. *The Journal of investigative dermatology* 101:883-886.
- Leenen, P.J., K. Radosevic, J.S. Voerman, B. Salomon, N. van Rooijen, D. Klatzmann, and W. van Ewijk. 1998. Heterogeneity of mouse spleen dendritic cells: in vivo phagocytic activity, expression of macrophage markers, and subpopulation turnover. *J Immunol* 160:2166-2173.
- Leist, T.P., M. Eppler, and R.M. Zinkernagel. 1989. Enhanced virus replication and inhibition of lymphocytic choriomeningitis virus disease in anti-gamma interferon-treated mice. *Journal of virology* 63:2813-2819.
- Lenz, O., J. ter Meulen, H.D. Klenk, N.G. Seidah, and W. Garten. 2001. The Lassa virus glycoprotein precursor GP-C is proteolytically processed by subtilase SKI-1/S1P. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:12701-12705.
- Li, F.J., Y. Kubagawa, M.K. McCollum, L. Wilson, T. Motohashi, L.F. Bertoli, J.C. Barton, S. Barnes, R.S. Davis, and H. Kubagawa. 2011. Enhanced levels of both the membrane-bound and soluble forms of IgM Fc receptor (FcmuR) in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 118:4902-4909.
- Liu, K., G.D. Victora, T.A. Schwickert, P. Guermonprez, M.M. Meredith, K. Yao, F.F. Chu, G.J. Randolph, A.Y. Rudensky, and M. Nussenzweig. 2009. In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science* 324:392-397.
- Liu, K., C. Waskow, X. Liu, K. Yao, J. Hoh, and M. Nussenzweig. 2007. Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice. *Nature immunology* 8:578-583.
- Lodolce, J.P., D.L. Boone, S. Chai, R.E. Swain, T. Dassopoulos, S. Trettin, and A. Ma. 1998. IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* 9:669-676.
- Lohman, B.L., E.S. Razvi, and R.M. Welsh. 1996. T-lymphocyte downregulation after acute viral infection is not dependent on CD95 (Fas) receptor-ligand interactions. *Journal of virology* 70:8199-8203.
- Ludewig, B., S. Ehl, U. Karrer, B. Odermatt, H. Hengartner, and R.M. Zinkernagel. 1998. Dendritic cells efficiently induce protective antiviral immunity. *Journal of virology* 72:3812-3818.

- Lutz, M.B., N. Kukutsch, A.L. Ogilvie, S. Rossner, F. Koch, N. Romani, and G. Schuler. 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *Journal of immunological methods* 223:77-92.
- Macatonia, S.E., M. Gompels, A.J. Pinching, S. Patterson, and S.C. Knight. 1992. Antigen-presentation by macrophages but not by dendritic cells in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Immunology* 75:576-581.
- Maraskovsky, E., K. Brasel, M. Teepe, E.R. Roux, S.D. Lyman, K. Shortman, and H.J. McKenna. 1996. Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *The Journal of experimental medicine* 184:1953-1962.
- Marie, I., J.E. Durbin, and D.E. Levy. 1998. Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *The EMBO journal* 17:6660-6669.
- Martin-Fontecha, A., S. Sebastiani, U.E. Hopken, M. Uguccioni, M. Lipp, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2003. Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *The Journal of experimental medicine* 198:615-621.
- Matloubian, M., R.J. Concepcion, and R. Ahmed. 1994. CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *Journal of virology* 68:8056-8063.
- Matloubian, M., T. Somasundaram, S.R. Kolhekar, R. Selvakumar, and R. Ahmed. 1990. Genetic basis of viral persistence: single amino acid change in the viral glycoprotein affects ability of lymphocytic choriomeningitis virus to persist in adult mice. *The Journal of experimental medicine* 172:1043-1048.
- McKenna, H.J., K.L. Stocking, R.E. Miller, K. Brasel, T. De Smedt, E. Maraskovsky, C.R. Maliszewski, D.H. Lynch, J. Smith, B. Pulendran, E.R. Roux, M. Teepe, S.D. Lyman, and J.J. Peschon. 2000. Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* 95:3489-3497.
- Mempel, T.R., S.E. Henrickson, and U.H. Von Andrian. 2004. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* 427:154-159.
- Mestan, J., W. Digel, S. Mittnacht, H. Hillen, D. Blohm, A. Moller, H. Jacobsen, and H. Kirchner. 1986. Antiviral effects of recombinant tumour necrosis factor in vitro. *Nature* 323:816-819.
- Mevorach, D., J.O. Mascarenhas, D. Gershov, and K.B. Elkon. 1998. Complement-dependent clearance of apoptotic cells by human macrophages. *The Journal of experimental medicine* 188:2313-2320.
- Meyer, B.J., and P.J. Southern. 1994. Sequence heterogeneity in the termini of lymphocytic choriomeningitis virus genomic and antigenomic RNAs. *Journal of virology* 68:7659-7664.
- Micheau, O., and J. Tschopp. 2003. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 114:181-190.
- Miethke, T., R. Vabulas, R. Bittlingmaier, K. Heeg, and H. Wagner. 1996. Mechanisms of peripheral T cell deletion: anergized T cells are Fas resistant but undergo proliferation-associated apoptosis. *European journal of immunology* 26:1459-1467.
- Miller, M.J., O. Safrina, I. Parker, and M.D. Cahalan. 2004. Imaging the single cell dynamics of CD4+ T cell activation by dendritic cells in lymph nodes. *The Journal of experimental medicine* 200:847-856.

- Moling, O., E. Cairon, G. Rimenti, F. Rizza, R. Pristera, and P. Mian. 2006. Severe hepatotoxicity after therapeutic doses of acetaminophen. *Clinical therapeutics* 28:755-760.
- Mommaas, A.M., A.A. Mulder, C.J. Out, G. Girolomoni, H.K. Koerten, B.J. Vermeer, and F. Koning. 1995. Distribution of HLA class II molecules in epidermal Langerhans cells in situ. *European journal of immunology* 25:520-525.
- Moskophidis, D., M. Bategay, M. van den Broek, E. Laine, U. Hoffmann-Rohrer, and R.M. Zinkernagel. 1995. Role of virus and host variables in virus persistence or immunopathological disease caused by a non-cytolytic virus. *The Journal of general virology* 76 (Pt 2):381-391.
- Moskophidis, D., S.P. Cobbold, H. Waldmann, and F. Lehmann-Grube. 1987. Mechanism of recovery from acute virus infection: treatment of lymphocytic choriomeningitis virus-infected mice with monoclonal antibodies reveals that Lyt-2+ T lymphocytes mediate clearance of virus and regulate the antiviral antibody response. *Journal of virology* 61:1867-1874.
- Moskophidis, D., F. Lechner, H. Pircher, and R.M. Zinkernagel. 1993. Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature* 362:758-761.
- Muller, C., D. Kagi, T. Aebischer, B. Odermatt, W. Held, E.R. Podack, R.M. Zinkernagel, and H. Hengartner. 1989. Detection of perforin and granzyme A mRNA in infiltrating cells during infection of mice with lymphocytic choriomeningitis virus. *European journal of immunology* 19:1253-1259.
- Murali-Krishna, K., J.D. Altman, M. Suresh, D.J. Sourdive, A.J. Zajac, J.D. Miller, J. Slansky, and R. Ahmed. 1998. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* 8:177-187.
- Nagata, S., and P. Golstein. 1995. The Fas death factor. *Science* 267:1449-1456.
- Nanjappa, S.G., J.H. Walent, M. Morre, and M. Suresh. 2008. Effects of IL-7 on memory CD8 T cell homeostasis are influenced by the timing of therapy in mice. *The Journal of clinical investigation* 118:1027-1039.
- Neuman, B.W., B.D. Adair, J.W. Burns, R.A. Milligan, M.J. Buchmeier, and M. Yeager. 2005. Complementarity in the supramolecular design of arenaviruses and retroviruses revealed by electron cryomicroscopy and image analysis. *Journal of virology* 79:3822-3830.
- Nguyen, L.T., A.R. Elford, K. Murakami, K.M. Garza, S.P. Schoenberger, B. Odermatt, D.E. Speiser, and P.S. Ohashi. 2002. Tumor growth enhances cross-presentation leading to limited T cell activation without tolerance. *The Journal of experimental medicine* 195:423-435.
- Nguyen, X.H., P.A. Lang, K.S. Lang, D. Adam, G. Fattakhova, N. Foger, M.A. Kamal, P. Prilla, S. Mathieu, C. Wagner, T. Mak, A.C. Chan, and K.H. Lee. 2011. Toso regulates the balance between apoptotic and nonapoptotic death receptor signaling by facilitating RIP1 ubiquitination. *Blood* 118:598-608.
- Niehans, G.A., T. Brunner, S.P. Frizelle, J.C. Liston, C.T. Salerno, D.J. Knapp, D.R. Green, and R.A. Kratzke. 1997. Human lung carcinomas express Fas ligand. *Cancer research* 57:1007-1012.
- Nijman, H.W., M.J. Kleijmeer, M.A. Ossevoort, V.M. Oorschot, M.P. Vierboom, M. van de Keur, P. Kenemans, W.M. Kast, H.J. Geuze, and C.J. Melief. 1995. Antigen capture and major histocompatibility class II compartments of freshly isolated and cultured human blood dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 182:163-174.

- O'Keeffe, M., H. Hochrein, D. Vremec, I. Caminschi, J.L. Miller, E.M. Anders, L. Wu, M.H. Lahoud, S. Henri, B. Scott, P. Hertzog, L. Tatarczuch, and K. Shortman. 2002. Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8(+) dendritic cells only after microbial stimulus. *The Journal of experimental medicine* 196:1307-1319.
- O'Keeffe, M., H. Hochrein, D. Vremec, B. Scott, P. Hertzog, L. Tatarczuch, and K. Shortman. 2003. Dendritic cell precursor populations of mouse blood: identification of the murine homologues of human blood plasmacytoid pre-DC2 and CD11c+ DC1 precursors. *Blood* 101:1453-1459.
- Ochsenbein, A.F., T. Fehr, C. Lutz, M. Suter, F. Brombacher, H. Hengartner, and R.M. Zinkernagel. 1999. Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* 286:2156-2159.
- Oehen, S., B. Odermatt, U. Karrer, H. Hengartner, R. Zinkernagel, and C. Lopez-Macias. 2002. Marginal zone macrophages and immune responses against viruses. *J Immunol* 169:1453-1458.
- Okada, K., K. Komuta, S. Hashimoto, S. Matsuzaki, T. Kanematsu, and T. Koji. 2000. Frequency of apoptosis of tumor-infiltrating lymphocytes induced by fas counterattack in human colorectal carcinoma and its correlation with prognosis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 6:3560-3564.
- Oldstone, M.B., R. Ahmed, J. Byrne, M.J. Buchmeier, Y. Riviere, and P. Southern. 1985. Virus and immune responses: lymphocytic choriomeningitis virus as a prototype model of viral pathogenesis. *British medical bulletin* 41:70-74.
- Opferman, J.T., B.T. Ober, and P.G. Ashton-Rickardt. 1999. Linear differentiation of cytotoxic effectors into memory T lymphocytes. *Science* 283:1745-1748.
- Ou, R., S. Zhou, L. Huang, and D. Moskophidis. 2001. Critical role for alpha/beta and gamma interferons in persistence of lymphocytic choriomeningitis virus by clonal exhaustion of cytotoxic T cells. *Journal of virology* 75:8407-8423.
- Pellegrini, M., G. Belz, P. Bouillet, and A. Strasser. 2003. Shutdown of an acute T cell immune response to viral infection is mediated by the proapoptotic Bcl-2 homology 3-only protein Bim. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:14175-14180.
- Pellegrini, M., T. Calzascia, J.G. Toe, S.P. Preston, A.E. Lin, A.R. Elford, A. Shahinian, P.A. Lang, K.S. Lang, M. Morre, B. Assouline, K. Lahl, T. Sparwasser, T.F. Tedder, J.H. Paik, R.A. DePinho, S. Basta, P.S. Ohashi, and T.W. Mak. 2011. IL-7 engages multiple mechanisms to overcome chronic viral infection and limit organ pathology. *Cell* 144:601-613.
- Perez, M., R.C. Craven, and J.C. de la Torre. 2003. The small RING finger protein Z drives arenavirus budding: implications for antiviral strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:12978-12983.
- Perez, M., and J.C. de la Torre. 2003. Characterization of the genomic promoter of the prototypic arenavirus lymphocytic choriomeningitis virus. *Journal of virology* 77:1184-1194.
- Perez, M., D.L. Greenwald, and J.C. de la Torre. 2004. Myristoylation of the RING finger Z protein is essential for arenavirus budding. *Journal of virology* 78:11443-11448.
- Pinschewer, D.D., M. Perez, and J.C. de la Torre. 2003. Role of the virus nucleoprotein in the regulation of lymphocytic choriomeningitis virus transcription and RNA replication. *Journal of virology* 77:3882-3887.

- Pinschewer, D.D., M. Perez, and J.C. de la Torre. 2005. Dual role of the lymphocytic choriomeningitis virus intergenic region in transcription termination and virus propagation. *Journal of virology* 79:4519-4526.
- Pinschewer, D.D., M. Perez, E. Jeetendra, T. Bachi, E. Horvath, H. Hengartner, M.A. Whitt, J.C. de la Torre, and R.M. Zinkernagel. 2004. Kinetics of protective antibodies are determined by the viral surface antigen. *The Journal of clinical investigation* 114:988-993.
- Plisek, S., L. Pliskova, V. Bostik, P. Prasil, J. Laco, R. Chlibek, P. Vyroubal, P. Kosina, and P. Bostik. 2011. Fulminant hepatitis and death associated with disseminated varicella in an immunocompromised adult from the Czech Republic caused by a wild-type clade 4 varicella-zoster virus strain. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 50:72-75.
- Potter, T.A., K. Grebe, B. Freiberg, and A. Kupfer. 2001. Formation of supramolecular activation clusters on fresh ex vivo CD8+ T cells after engagement of the T cell antigen receptor and CD8 by antigen-presenting cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:12624-12629.
- Probst, H.C., K. Tschannen, A. Gallimore, M. Martinic, M. Basler, T. Dumrese, E. Jones, and M.F. van den Broek. 2003. Immunodominance of an antiviral cytotoxic T cell response is shaped by the kinetics of viral protein expression. *J Immunol* 171:5415-5422.
- Probst, H.C., K. Tschannen, B. Odermatt, R. Schwendener, R.M. Zinkernagel, and M. Van Den Broek. 2005. Histological analysis of CD11c-DTR/GFP mice after in vivo depletion of dendritic cells. *Clinical and experimental immunology* 141:398-404.
- Probst, H.C., and M. van den Broek. 2005. Priming of CTLs by lymphocytic choriomeningitis virus depends on dendritic cells. *J Immunol* 174:3920-3924.
- Proietto, A.I., M. O'Keeffe, K. Gartlan, M.D. Wright, K. Shortman, L. Wu, and M.H. Lahoud. 2004. Differential production of inflammatory chemokines by murine dendritic cell subsets. *Immunobiology* 209:163-172.
- Pulendran, B., J. Lingappa, M.K. Kennedy, J. Smith, M. Teepe, A. Rudensky, C.R. Maliszewski, and E. Maraskovsky. 1997. Developmental pathways of dendritic cells in vivo: distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in FLT3 ligand-treated mice. *J Immunol* 159:2222-2231.
- Pulendran, B., J.L. Smith, G. Caspary, K. Brasel, D. Pettit, E. Maraskovsky, and C.R. Maliszewski. 1999. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:1036-1041.
- Pulendran, B., J.L. Smith, M. Jenkins, M. Schoenborn, E. Maraskovsky, and C.R. Maliszewski. 1998. Prevention of peripheral tolerance by a dendritic cell growth factor: flt3 ligand as an adjuvant. *The Journal of experimental medicine* 188:2075-2082.
- Quirin, K., B. Eschli, I. Scheu, L. Poort, J. Kartenbeck, and A. Helenius. 2008. Lymphocytic choriomeningitis virus uses a novel endocytic pathway for infectious entry via late endosomes. *Virology* 378:21-33.
- Rahemtulla, A., W.P. Fung-Leung, M.W. Schilham, T.M. Kundig, S.R. Sambhara, A. Narendran, A. Arabian, A. Wakeham, C.J. Paige, R.M. Zinkernagel, and et al. 1991. Normal development and function of CD8+ cells but markedly decreased helper cell activity in mice lacking CD4. *Nature* 353:180-184.

- Randolph, G.J., K. Inaba, D.F. Robbiani, R.M. Steinman, and W.A. Muller. 1999. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* 11:753-761.
- Rehermann, B., P. Fowler, J. Sidney, J. Person, A. Redeker, M. Brown, B. Moss, A. Sette, and F.V. Chisari. 1995. The cytotoxic T lymphocyte response to multiple hepatitis B virus polymerase epitopes during and after acute viral hepatitis. *The Journal of experimental medicine* 181:1047-1058.
- Reignier, T., J. Oldenburg, B. Noble, E. Lamb, V. Romanowski, M.J. Buchmeier, and P.M. Cannon. 2006. Receptor use by pathogenic arenaviruses. *Virology* 353:111-120.
- Ridge, J.P., F. Di Rosa, and P. Matzinger. 1998. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 393:474-478.
- Ritter, U., A. Meissner, J. Ott, and H. Korner. 2003. Analysis of the maturation process of dendritic cells deficient for TNF and lymphotoxin-alpha reveals an essential role for TNF. *Journal of leukocyte biology* 74:216-222.
- Riviere, Y., R. Ahmed, P.J. Southern, M.J. Buchmeier, F.J. Dutko, and M.B. Oldstone. 1985. The S RNA segment of lymphocytic choriomeningitis virus codes for the nucleoprotein and glycoproteins 1 and 2. *Journal of virology* 53:966-968.
- Rojek, J.M., C.F. Spiropoulou, K.P. Campbell, and S. Kunz. 2007. Old World and clade C New World arenaviruses mimic the molecular mechanism of receptor recognition used by alpha-dystroglycan's host-derived ligands. *Journal of virology* 81:5685-5695.
- Rooney, I.A., K.D. Butrovich, A.A. Glass, S. Borboroglu, C.A. Benedict, J.C. Whitbeck, G.H. Cohen, R.J. Eisenberg, and C.F. Ware. 2000. The lymphotoxin-beta receptor is necessary and sufficient for LIGHT-mediated apoptosis of tumor cells. *The Journal of biological chemistry* 275:14307-14315.
- Saas, P., P.R. Walker, M. Hahne, A.L. Quiquerez, V. Schnuriger, G. Perrin, L. French, E.G. Van Meir, N. de Tribolet, J. Tschopp, and P.Y. Dietrich. 1997. Fas ligand expression by astrocytoma in vivo: maintaining immune privilege in the brain? *The Journal of clinical investigation* 99:1173-1178.
- Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli, and A. Lanzavecchia. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *The Journal of experimental medicine* 182:389-400.
- Sallusto, F., and A. Lanzavecchia. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *The Journal of experimental medicine* 179:1109-1118.
- Salvato, M., P. Borrow, E. Shimomaye, and M.B. Oldstone. 1991. Molecular basis of viral persistence: a single amino acid change in the glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus is associated with suppression of the antiviral cytotoxic T-lymphocyte response and establishment of persistence. *Journal of virology* 65:1863-1869.
- Salvato, M., E. Shimomaye, and M.B. Oldstone. 1989. The primary structure of the lymphocytic choriomeningitis virus L gene encodes a putative RNA polymerase. *Virology* 169:377-384.
- Salvato, M., E. Shimomaye, P. Southern, and M.B. Oldstone. 1988. Virus-lymphocyte interactions. IV. Molecular characterization of LCMV Armstrong (CTL+) small genomic segment and that of its variant, Clone 13 (CTL-). *Virology* 164:517-522.

- Salvato, M.S., K.J. Schweighofer, J. Burns, and E.M. Shimomaye. 1992. Biochemical and immunological evidence that the 11 kDa zinc-binding protein of lymphocytic choriomeningitis virus is a structural component of the virus. *Virus research* 22:185-198.
- Salvato, M.S., and E.M. Shimomaye. 1989. The completed sequence of lymphocytic choriomeningitis virus reveals a unique RNA structure and a gene for a zinc finger protein. *Virology* 173:1-10.
- Sato, N., S.K. Ahuja, M. Quinones, V. KostECKi, R.L. Reddick, P.C. Melby, W.A. Kuziel, and S.S. Ahuja. 2000. CC chemokine receptor (CCR)2 is required for langerhans cell migration and localization of T helper cell type 1 (Th1)-inducing dendritic cells. Absence of CCR2 shifts the *Leishmania* major-resistant phenotype to a susceptible state dominated by Th2 cytokines, b cell outgrowth, and sustained neutrophilic inflammation. *The Journal of experimental medicine* 192:205-218.
- Saunders, A.A., J.P. Ting, J. Meisner, B.W. Neuman, M. Perez, J.C. de la Torre, and M.J. Buchmeier. 2007. Mapping the landscape of the lymphocytic choriomeningitis virus stable signal peptide reveals novel functional domains. *Journal of virology* 81:5649-5657.
- Scheu, S., P. Dresing, and R.M. Locksley. 2008. Visualization of IFN β production by plasmacytoid versus conventional dendritic cells under specific stimulation conditions in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:20416-20421.
- Schluns, K.S., K. Williams, A. Ma, X.X. Zheng, and L. Lefrancois. 2002. Cutting edge: requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8 T cells. *J Immunol* 168:4827-4831.
- Schoenberger, S.P., R.E. Toes, E.I. van der Voort, R. Offringa, and C.J. Melief. 1998. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393:480-483.
- Schrempf, S., M. Froeschke, T. Giroglou, D. von Laer, and B. Dobberstein. 2007. Signal peptide requirements for lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein C maturation and virus infectivity. *Journal of virology* 81:12515-12524.
- Schuster, K., J. Gadiot, R. Andreesen, A. Mackensen, T.F. Gajewski, and C. Blank. 2009. Homeostatic proliferation of naive CD8⁺ T cells depends on CD62L/L-selectin-mediated homing to peripheral LN. *European journal of immunology* 39:2981-2990.
- Schuurhuis, D.H., S. Laban, R.E. Toes, P. Ricciardi-Castagnoli, M.J. Kleijmeer, E.I. van der Voort, D. Rea, R. Offringa, H.J. Geuze, C.J. Melief, and F. Ossendorp. 2000. Immature dendritic cells acquire CD8(+) cytotoxic T lymphocyte priming capacity upon activation by T helper cell-independent or -dependent stimuli. *The Journal of experimental medicine* 192:145-150.
- Serbina, N.V., and E.G. Pamer. 2006. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nature immunology* 7:311-317.
- Serbina, N.V., T.P. Salazar-Mather, C.A. Biron, W.A. Kuziel, and E.G. Pamer. 2003. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* 19:59-70.
- Sevilla, N., S. Kunz, A. Holz, H. Lewicki, D. Homann, H. Yamada, K.P. Campbell, J.C. de La Torre, and M.B. Oldstone. 2000. Immunosuppression and resultant viral persistence by specific viral targeting of dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 192:1249-1260.

- Sevilla, N., S. Kunz, D. McGavern, and M.B. Oldstone. 2003. Infection of dendritic cells by lymphocytic choriomeningitis virus. *Current topics in microbiology and immunology* 276:125-144.
- Shah, W.A., H. Peng, and S. Carbonetto. 2006. Role of non-raft cholesterol in lymphocytic choriomeningitis virus infection via alpha-dystroglycan. *The Journal of general virology* 87:673-678.
- Shima, H., H. Takatsu, S. Fukuda, M. Ohmae, K. Hase, H. Kubagawa, J.Y. Wang, and H. Ohno. 2010. Identification of TOSO/FAIM3 as an Fc receptor for IgM. *International immunology* 22:149-156.
- Shiow, L.R., D.B. Rosen, N. Brdickova, Y. Xu, J. An, L.L. Lanier, J.G. Cyster, and M. Matloubian. 2006. CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nature* 440:540-544.
- Shortman, K., D. Vremec, L.M. Corcoran, K. Georgopoulos, K. Lucas, and L. Wu. 1998. The linkage between T-cell and dendritic cell development in the mouse thymus. *Immunological reviews* 165:39-46.
- Shurin, M.R., P.P. Pandharipande, T.D. Zorina, C. Haluszczak, V.M. Subbotin, O. Hunter, A. Brumfield, W.J. Storkus, E. Maraskovsky, and M.T. Lotze. 1997. FLT3 ligand induces the generation of functionally active dendritic cells in mice. *Cellular immunology* 179:174-184.
- Siegal, F.P., N. Kadowaki, M. Shodell, P.A. Fitzgerald-Bocarsly, K. Shah, S. Ho, S. Antonenko, and Y.J. Liu. 1999. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284:1835-1837.
- Singh, M.K., F.V. Fuller-Pace, M.J. Buchmeier, and P.J. Southern. 1987. Analysis of the genomic L RNA segment from lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* 161:448-456.
- Smelt, S.C., P. Borrow, S. Kunz, W. Cao, A. Tishon, H. Lewicki, K.P. Campbell, and M.B. Oldstone. 2001. Differences in affinity of binding of lymphocytic choriomeningitis virus strains to the cellular receptor alpha-dystroglycan correlate with viral tropism and disease kinetics. *Journal of virology* 75:448-457.
- Sobao, Y., H. Tomiyama, K. Sugi, M. Tokunaga, T. Ueno, S. Saito, S. Fujiyama, M. Morimoto, K. Tanaka, and M. Takiguchi. 2002. The role of hepatitis B virus-specific memory CD8 T cells in the control of viral replication. *Journal of hepatology* 36:105-115.
- Song, Y., and C.O. Jacob. 2005. The mouse cell surface protein TOSO regulates Fas/Fas ligand-induced apoptosis through its binding to Fas-associated death domain. *The Journal of biological chemistry* 280:9618-9626.
- Southern, E.M. 1996. High-density gridding: techniques and applications. *Current opinion in biotechnology* 7:85-88.
- Southern, P.J., M.K. Singh, Y. Riviere, D.R. Jacoby, M.J. Buchmeier, and M.B. Oldstone. 1987. Molecular characterization of the genomic S RNA segment from lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* 157:145-155.
- Spiropoulou, C.F., S. Kunz, P.E. Rollin, K.P. Campbell, and M.B. Oldstone. 2002. New World arenavirus clade C, but not clade A and B viruses, utilizes alpha-dystroglycan as its major receptor. *Journal of virology* 76:5140-5146.
- Sportes, C., F.T. Hakim, S.A. Memon, H. Zhang, K.S. Chua, M.R. Brown, T.A. Fleisher, M.C. Krumlauf, R.R. Babb, C.K. Chow, T.J. Fry, J. Engels, R. Buffet, M. Morre, R.J. Amato, D.J. Venzon, R. Korngold, A. Pecora, R.E. Gress, and C.L. Mackall. 2008. Administration of rhIL-7 in humans

- increases in vivo TCR repertoire diversity by preferential expansion of naive T cell subsets. *The Journal of experimental medicine* 205:1701-1714.
- Starck, L., C. Scholz, B. Dorken, and P.T. Daniel. 2005. Costimulation by CD137/4-1BB inhibits T cell apoptosis and induces Bcl-xL and c-FLIP(short) via phosphatidylinositol 3-kinase and AKT/protein kinase B. *European journal of immunology* 35:1257-1266.
- Steinman, R.M., and Z.A. Cohn. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of experimental medicine* 137:1142-1162.
- Stockinger, B., and B. Hausmann. 1994. Functional recognition of in vivo processed self antigen. *International immunology* 6:247-254.
- Stockinger, B., T. Zal, A. Zal, and D. Gray. 1996. B cells solicit their own help from T cells. *The Journal of experimental medicine* 183:891-899.
- Stoll, S., J. Delon, T.M. Brotz, and R.N. Germain. 2002. Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science* 296:1873-1876.
- Strecker, T., R. Eichler, J. Meulen, W. Weissenhorn, H. Dieter Klenk, W. Garten, and O. Lenz. 2003. Lassa virus Z protein is a matrix protein and sufficient for the release of virus-like particles [corrected]. *Journal of virology* 77:10700-10705.
- Suss, G., and K. Shortman. 1996. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *The Journal of experimental medicine* 183:1789-1796.
- Suzuki, I., S. Martin, T.E. Boursalian, C. Beers, and P.J. Fink. 2000. Fas ligand costimulates the in vivo proliferation of CD8+ T cells. *J Immunol* 165:5537-5543.
- Tan, J.T., E. Dudl, E. LeRoy, R. Murray, J. Sprent, K.I. Weinberg, and C.D. Surh. 2001. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:8732-8737.
- Tan, J.T., B. Ernst, W.C. Kieper, E. LeRoy, J. Sprent, and C.D. Surh. 2002. Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8+ cells but are not required for memory phenotype CD4+ cells. *The Journal of experimental medicine* 195:1523-1532.
- Thimme, R., J. Bukh, H.C. Spangenberg, S. Wieland, J. Pemberton, C. Steiger, S. Govindarajan, R.H. Purcell, and F.V. Chisari. 2002. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:15661-15668.
- Thimme, R., D. Oldach, K.M. Chang, C. Steiger, S.C. Ray, and F.V. Chisari. 2001. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *The Journal of experimental medicine* 194:1395-1406.
- Thimme, R., S. Wieland, C. Steiger, J. Ghayeb, K.A. Reimann, R.H. Purcell, and F.V. Chisari. 2003. CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *Journal of virology* 77:68-76.
- Toes, R.E., S.P. Schoenberger, E.I. van der Voort, R. Offringa, and C.J. Melief. 1998. CD40-CD40Ligand interactions and their role in cytotoxic T lymphocyte priming and anti-tumor immunity. *Seminars in immunology* 10:443-448.
- Toubert, A., and D. Charron. 1997. [Antigen presentation and macrophages]. *Pathologie-biologie* 45:126-130.

- Townsend, S.E., and J.P. Allison. 1993. Tumor rejection after direct costimulation of CD8+ T cells by B7-transfected melanoma cells. *Science* 259:368-370.
- Valitutti, S., S. Muller, M. Salio, and A. Lanzavecchia. 1997. Degradation of T cell receptor (TCR)-CD3-zeta complexes after antigenic stimulation. *The Journal of experimental medicine* 185:1859-1864.
- Van Seventer, G.A., Y. Shimizu, K.J. Horgan, and S. Shaw. 1990. The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells. *J Immunol* 144:4579-4586.
- Vela, E.M., L. Zhang, T.M. Colpitts, R.A. Davey, and J.F. Aronson. 2007. Arenavirus entry occurs through a cholesterol-dependent, non-caveolar, clathrin-mediated endocytic mechanism. *Virology* 369:1-11.
- Vella, A., T.K. Teague, J. Ihle, J. Kappler, and P. Marrack. 1997. Interleukin 4 (IL-4) or IL-7 prevents the death of resting T cells: stat6 is probably not required for the effect of IL-4. *The Journal of experimental medicine* 186:325-330.
- Verdijk, R.M., T. Mutis, B. Esendam, J. Kamp, C.J. Melief, A. Brand, and E. Goulmy. 1999. Polyriboinosinic polyribocytidylic acid (poly(I:C)) induces stable maturation of functionally active human dendritic cells. *J Immunol* 163:57-61.
- Vire, B., A. David, and A. Wiestner. 2011. TOSO, the Fcμ receptor, is highly expressed on chronic lymphocytic leukemia B cells, internalizes upon IgM binding, shuttles to the lysosome, and is downregulated in response to TLR activation. *J Immunol* 187:4040-4050.
- Vremec, D., and K. Shortman. 1997. Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *J Immunol* 159:565-573.
- Vremec, D., M. Zorbas, R. Scollay, D.J. Saunders, C.F. Ardavin, L. Wu, and K. Shortman. 1992. The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 176:47-58.
- Walsh, C.M., M. Matloubian, C.C. Liu, R. Ueda, C.G. Kurahara, J.L. Christensen, M.T. Huang, J.D. Young, R. Ahmed, and W.R. Clark. 1994. Immune function in mice lacking the perforin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:10854-10858.
- Waskow, C., K. Liu, G. Darrasse-Jeze, P. Guermonprez, F. Ginhoux, M. Merad, T. Shengelia, K. Yao, and M. Nussenzweig. 2008. The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. *Nature immunology* 9:676-683.
- Watanabe-Fukunaga, R., C.I. Brannan, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, and S. Nagata. 1992. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356:314-317.
- West, M.A., A.R. Prescott, E.L. Eskelinen, A.J. Ridley, and C. Watts. 2000. Rac is required for constitutive macropinocytosis by dendritic cells but does not control its downregulation. *Current biology : CB* 10:839-848.
- Wetzel, S.A., T.W. McKeithan, and D.C. Parker. 2002. Live-cell dynamics and the role of costimulation in immunological synapse formation. *J Immunol* 169:6092-6101.
- Witte, D.L., W.H. Crosby, C.Q. Edwards, V.F. Fairbanks, and F.A. Mitros. 1996. Practice guideline development task force of the College of American Pathologists. Hereditary

- hemochromatosis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 245:139-200.
- Wong, G.H., and D.V. Goeddel. 1986. Tumour necrosis factors alpha and beta inhibit virus replication and synergize with interferons. *Nature* 323:819-822.
- Wright, K.E., M.S. Salvato, and M.J. Buchmeier. 1989. Neutralizing epitopes of lymphocytic choriomeningitis virus are conformational and require both glycosylation and disulfide bonds for expression. *Virology* 171:417-426.
- Wright, K.E., R.C. Spiro, J.W. Burns, and M.J. Buchmeier. 1990. Post-translational processing of the glycoproteins of lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology* 177:175-183.
- Wu, L., C.L. Li, and K. Shortman. 1996. Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. *The Journal of experimental medicine* 184:903-911.
- Yajima, T., K. Yoshihara, K. Nakazato, S. Kumabe, S. Koyasu, S. Sad, H. Shen, H. Kuwano, and Y. Yoshikai. 2006. IL-15 regulates CD8+ T cell contraction during primary infection. *J Immunol* 176:507-515.
- York, J., D. Dai, S.M. Amberg, and J.H. Nunberg. 2008. pH-induced activation of arenavirus membrane fusion is antagonized by small-molecule inhibitors. *Journal of virology* 82:10932-10939.
- York, J., and J.H. Nunberg. 2006. Role of the stable signal peptide of Junin arenavirus envelope glycoprotein in pH-dependent membrane fusion. *Journal of virology* 80:7775-7780.
- York, J., and J.H. Nunberg. 2007. Distinct requirements for signal peptidase processing and function in the stable signal peptide subunit of the Junin virus envelope glycoprotein. *Virology* 359:72-81.
- York, J., V. Romanowski, M. Lu, and J.H. Nunberg. 2004. The signal peptide of the Junin arenavirus envelope glycoprotein is myristoylated and forms an essential subunit of the mature G1-G2 complex. *Journal of virology* 78:10783-10792.
- Young, L.H., L.S. Klavinskis, M.B. Oldstone, and J.D. Young. 1989. In vivo expression of perforin by CD8+ lymphocytes during an acute viral infection. *The Journal of experimental medicine* 169:2159-2171.
- Zajac, A.J., J.M. Dye, and D.G. Quinn. 2003. Control of lymphocytic choriomeningitis virus infection in granzyme B deficient mice. *Virology* 305:1-9.
- Zal, T., A. Volkman, and B. Stockinger. 1994. Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. *The Journal of experimental medicine* 180:2089-2099.
- Zhang, J., J.X. Gao, K. Salojin, Q. Shao, M. Grattan, C. Meagher, D.W. Laird, and T.L. Delovitch. 2000. Regulation of fas ligand expression during activation-induced cell death in T cells by p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH2-terminal kinase. *The Journal of experimental medicine* 191:1017-1030.
- Zhang, X., S. Sun, I. Hwang, D.F. Tough, and J. Sprent. 1998. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* 8:591-599.
- Zhou, S., R. Ou, L. Huang, and D. Moskophidis. 2002. Critical role for perforin-, Fas/FasL-, and TNFR1-mediated cytotoxic pathways in down-regulation of antigen-specific T cells during persistent viral infection. *Journal of virology* 76:829-840.

- Zinkernagel, R.M., and P.C. Doherty. 1973. Cytotoxic thymus-derived lymphocytes in cerebrospinal fluid of mice with lymphocytic choriomeningitis. *The Journal of experimental medicine* 138:1266-1269.
- Zinkernagel, R.M., E. Haenseler, T. Leist, A. Cerny, H. Hengartner, and A. Althage. 1986. T cell-mediated hepatitis in mice infected with lymphocytic choriomeningitis virus. Liver cell destruction by H-2 class I-restricted virus-specific cytotoxic T cells as a physiological correlate of the 51Cr-release assay? *The Journal of experimental medicine* 164:1075-1092.
- Zinkernagel, R.M., C.J. Pfau, H. Hengartner, and A. Althage. 1985. Susceptibility to murine lymphocytic choriomeningitis maps to class I MHC genes--a model for MHC/disease associations. *Nature* 316:814-817.
- Zinkernagel, R.M., and R.M. Welsh. 1976. H-2 compatibility requirement for virus-specific T cell-mediated effector functions in vivo. I. Specificity of T cells conferring antiviral protection against lymphocytic choriomeningitis virus is associated with H-2K and H-2D. *J Immunol* 117:1495-1502.

8. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. Karl Sebastian Lang, Institut für Immunologie, Universitätsklinikum Essen, danke ich herzlich für die geduldige Betreuung und die Überlassung des interessanten Themas sowie das große Vertrauen und Freiheiten dieses gestalten zu können.

Herrn Prof. Dr. Lutz Schmitt, Institut für Biochemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Dieter Häussinger. Des Weiteren möchte ich ein großes Dankeschön an alle Mitarbeiter des Instituts für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Universitätsklinik Düsseldorf richten, die mit großer Geduld und viel Verständnis mir hilfsbereit zur Seite gestanden haben.

Keineswegs zuletzt möchte Herrn Prof. Dr. Carsten Münk, AIDS Research Group, für seine Freundlichkeit, Hilfsbereitschaft und erfrischende Gelassenheit danken. Die Zusammenarbeit mit euch habe ich sehr genossen.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Humboldt Research Group als auch den Doktoranden und Diplomanden des Instituts für die kollegiale Zusammenarbeit bedanken.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern der TVA Düsseldorf für die fortwährende Hilfe und das Entgegenkommen. Bei PD Dr. Peter Benten bedanke ich mich herzlichst für die Mühe und Kompromissbereitschaft. Konstanze Schätzel danke ich sehr für das Verhättscheln meiner *Toso*- Mäuse. Dem Herz der TVA Düsseldorf Elke Niketta schulde ich ein riesiges Dankeschön. Ohne ihr Management wäre wohl keine einzige Infektion möglich gewesen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem langjährigen Kollegen und guten Freund Andreas Meryk, der mich über die Jahre unterstützt hat und stets ermutigte auch noch so unmöglich scheinende Experimente zu wagen. Mit seiner Liebe zum tierischen Detail und scheinbar unendlichen Hilfsbereitschaft war er mir immer eine große Inspiration und ein guter Diskussionspartner. Unsere gemeinsame Arbeit werde ich sehr vermissen.

Meinem guten Freund Denis Delic möchte ich besonders für seine langjährige Geduld und Unterstützung danken. Mit seiner ehrlichen und direkten Art hat er viel öfter ins Schwarze getroffen, als er vielleicht glaubt und war immer jemand auf den man sich verlassen konnte.

Den ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung für Molekulare Parasitologie schulde ich ein riesiges Dankeschön. Hans-Peter, der einem stets mit gutem Rat zur Seite stand, hatte auch immer ein offenes Ohr. Mein Dank gilt auch Piet, der mir immer, wenn auch manchmal erzwungen, stets der Retter in Not war.

Meinen Eltern danke ich sehr für ihre Unterstützung, ihr Verständnis und die stete Geduld. Sie haben mit im Leben alles ermöglicht. Ein ganz besonderer Dank gebührt meinem Partner Nawid, der mich in sämtlichen Lebenslagen begleitend unterstützt hat. Er war und ist mir der beste Freund und ein Fels in der Brandung.

9. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Der Einfluss von Toso in der Interaktion zwischen dendritischen Zellen und T-Lymphozyten“ selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Düsseldorf, den

10. LEBENS LAUF

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

11. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
ALT	Alanin-Transaminase
APC	Antigen präsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>)
APC	Allophycocyanin
AS	Aminosäure
BMDC	Knochenmarkgenerierte dendritische Zellen (bone marrow DC)
CCL	CC-Chemokin-Liganden
CCR	CC-Chemokin-Rezeptor
CD	cluster of differentiation
cDC	konventionelle dendritische Zelle (<i>conventional DC</i>)
cDNA	<i>complementary</i> DNA
CDP	<i>common dendritic cell progenitor</i>
CFSE	Carboxy-fluorescein-diacetate-N-succinimidyl-ester
CGP	<i>common granulocyte cell progenitor</i>
CLP	<i>common lymphocyte cell progenitor</i>
CMP	<i>common myeloid cell progenitor</i>
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
CTL	zytotoxische T-Zelle (<i>cytotoxic T cell</i>)
d	Tag (<i>day</i>)
DAPI	Diamidino-2-Phenylindole
DC	dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
DG	Dystro-Glycan
DMEM	Dulbecco`s modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DR	Todesrezeptor (<i>death receptor</i>)
dsRNA	Doppelstrang-RNA (<i>double stranded RNA</i>)
DTR	Diphtheria-Toxin-Rezeptor

EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetylsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosobent assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	und andere (<i>et alii</i>)
FACS	<i>fluorescence activated cell sort</i>
FAIM	Fas apoptotic inhibitory molecule
FcR	Fc-Rezeptoren
FCS	fetales Kälberserum (<i>fetale calf serum</i>)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanate
FLT	Fms-ähnliche Tyrosinkinase (<i>Fms-like tyrosine kinase</i>)
GAPDH	Glycerinaldehyde-3-Phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierende Faktor (<i>granulocytes macrophages colony stimulating factor</i>)
GP	Glykoprotein (<i>glycoprotein</i>)
HSC	Hämatopoetische Stammzelle (<i>hematopoietic stem cell</i>)
<i>i.v.</i>	intravenös
iDC	inflammatorische dendritische Zellen
IFN	Interferon
IgM	Immunglobulin M
IgV	variable Kette der Immunglobine
IL	Interleukin
IMDM	<i>Iscoves Modified Dulbeccos Medium</i>
iNOS	induzierbare NO-Synthase
LCMV	lymphozytäres Choriomeningitis-Virus
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Lymphotoxin
MACS	<i>magnetic activated cell sort</i>
M-CSF	Makrophagen koloniestimulierender Faktor (<i>macrophages colony stimulating factor</i>)
MDP	<i>myeloid dendritic cell progenitor</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)

MOI	<i>multiplicity of infection</i>
ND	nicht detektierbar
NP	Nukleoprotein (<i>nucleoprotein</i>)
<i>p.i.</i>	nach Infektion (<i>post infection</i>)
<i>p.t.</i>	nach Behandlung (<i>post treatment</i>)
PBS	Phosphat buffered saline
pDC	plasmozytoide dendritische Zellen
PE	Phycoerythrin
PeCy7	Phycoerythrin-Cyanin-7
PerCP	Peridin-Chlorophyll
PFU	<i>plaque forming unit</i>
PolyI:C	Polyadenylic-cytidylic-inosinic acid
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PSG	Penicilin-Streptomycin-LGlutamine
RAG	<i>recombination activating gene</i>
RNP	Ribonukleoprotein-Komplex
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SMAC	<i>supramolecular activation cluster</i>
SPF	spezifiziert pathogenfrei
SSP	stabile signal peptide
ssRNA	Einzelstrang-RNA (<i>single stranded</i>)
TAE	Tris-acetate-EDTA
TCR	T-Zell Rezeptor (<i>T cell receptor</i>)
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TipDC	TNF α und iNOS produzierende dendritische Zellen
TLR	Toll ähnlicher Rezeptor (<i>toll-like receptor</i>)
TNFR	TNF-Rezeptor
T _{reg}	regulatorische T-Lymphozyten
VLE	<i>very low endotoxin</i>

