## **INAUGURAL – DISSERTATION**

zur Erlangung der Doktorwürde der Naturwissenschaftlich - Mathematischen Gesamtfakultät der Ruprecht – Karls – Universität Heidelberg

> vorgelegt von Diplom-Biologe Christian Koble aus Trier

Heidelberg, im Frühjahr 2008

# Selbstantigen-Präsentation in der Thymus-Medulla: zur spezifischen Rolle von Epithelzellen *versus* Dendritische Zellen in zentraler T Zell-Toleranz

Gutachter:

Prof. Dr. Volker Schirrmacher Prof. Dr. Günter Hämmerling Angefertigt in der Abteilung Entwicklungsimmunologie (Leitung Prof. Dr. Bruno Kyewski) im Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg

#### Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

#### Kongressbeiträge:

- 1. Christian Koble, Jens Derbinski, Jana Gäbler und Bruno Kyewski (2005). Expression and presentation of endogenous self-antigens by distinct thymic APC-populations. Vortrag und Posterbeitrag zur Konferenz: *Genetic control of T cell activation*, Henningsvaer, Norwegen.
- Christian Koble, Jens Derbinski, Jana G\u00e4bler und Bruno Kyewski (2006). Expression and presentation of endogenous self-antigens by distinct thymic APC-populations. Posterbeitrag zur ENII-EFIS Conference, Capo Caccia, Italien.
- Christian Koble und Bruno Kyewski (2007). Constitutive cross-presentation of endogenous self-antigens by thymic dendritic cells. Vortrag und Posterbeitrag zum 37<sup>th</sup> Annual Meeting of the German Society for Immunology, Heidelberg, Deutschland.

meinen Eltern...

Sapere aude! Habe Mut, Dich Deines eigenen Verstandes zu bedienen! (*Immanuel Kant*, 1784)

## Zusammenfassung

Die ektopische Expression gewebespezifischer Autoantigene im Thymus durch medulläre Thymusepithelzellen (mTEZ), auch bekannt als promiske Genexpression, ist unabdingbar für die Induktion von zentraler T Zell(TZ)-Toleranz gegenüber peripheren Geweben. Die Toleranzmechanismen reichen dabei von funktioneller Inaktivierung über klonale Deletion bis hin zur Induktion Autoantigen-spezifischer regulatorischer TZ (Tregs). Diese Mechanismen basieren auf der Affinität des TZ-Rezeptors unreifer TZ zu spezifischen Peptid-/MHC-Liganden und sind somit abhängig von der Präsentation des jeweiligen Antigens durch Antigen-präsentierende Zellen (APZ) des Thymus. Da mTEZ selbst Charakteristika einer professionellen APZ besitzen, sind sie in der Lage, endogene Antigene autark zu präsentieren. Ob und in welchem Umfang native, gewebespezifische Antigene auch auf hämatopoetische APZ (insbesondere Dendritische Zellen (DZ)) der lokalen Mikroumgebung übertragen und von diesen präsentiert werden, konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden.

Die vergleichende funktionelle *ex vivo*-Analyse der Präsentation transgener und nativer Antigene im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermöglichte erstmals eine exakte Zuordnung zu definierten APZ-Populationen des Thymus. Es wurde gezeigt, dass sowohl ubiquitäre (Ovalbumin) als auch gewebespezifische Autoantigene (P1A, PLP), deren Transkription auf wenige mTEZ (1-3%) beschränkt ist, grundsätzlich von mTEZ <u>und</u> DZ des Thymus präsentiert werden, nicht aber von peripheren DZ. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass autologe Antigene *in situ* konstitutiv und unidirektional von mTEZ auf Thymus-DZ übertragen werden. Überraschenderweise war jedoch nicht nur die P1A- und PLP-Präsentation, sondern auch die des ubiquitär-exprimierten, nukleären *neo*-Autoantigens Ovalbumin durch Thymus-DZ strikt von der Transkription des Antigens in mTEZ abhängig. Dies zeigt, dass Thymus-DZ (im Gegensatz zu mTEZ) nicht oder nur eingeschränkt befähigt sind, nukleäres Antigen effizient für den MHC Klasse II-Beladungsweg zu prozessieren und unterstreicht die Bedeutung von mTEZ als APZ und spezifische Quelle zellassoziierter Antigene im Thymus.

Mithilfe eines fluoreszierenden, TEZ-restringierten Modellantigens gelang es, den Ag-Transfer von mTEZ auf DZ optisch nachzuweisen. Die fluoreszente DZ-(Sub-) Population wies eine erhöhte Expression von CD80, CD86 und MHC Klasse II-Heterodimeren sowie eine charakteristische Oberflächenexpression des Epithelzell-spezifischen Markermoleküls EpCAM auf. Funktionell war dieser Phänotyp mit einer deutlich gesteigerten Effizienz der MHC Klasse II-vermittelten Präsentation des endogenen *neo*-Autoantigens Ovalbumin verbunden. Die EpCAM-Oberflächenexpression von Thymus-DZ korrelierte jedoch nicht mit der EpCAM-Transkription, was Grund zu der Annahme gab, dass EpCAM-Moleküle im Zuge einer engen DZ-mTEZ-Interaktion *in situ* interzellulär übertragen werden. Diese Interpretation wurde durch weiterführende Experimente gestützt, in denen der Transfer von MHC-Klasse II-Komplexen von radioresistenten Thymusstromazellen (einschließlich mTEZ) auf DZ *in situ* gezeigt werden konnte. Gemeinsam belegen diese Befunde die konstitutive Übertragung mTEZ-assoziierter Antigene auf DZ durch Membrantransfer.

Der hier nachgewiesene interzelluläre Ag-Transfer von mTEZ auf Thy-DZ vergrößert die Selektionsbasis einer affinitätsabhängigen TZ-Toleranz gegenüber mTEZ-spezifischen Antigenen und ermöglicht so die parallele Induktion verschiedener Toleranzmechanismen (Deletion, Treg-Induktion). MTEZ selbst erscheinen durch die effiziente Präsentation endogener, promisk exprimierter Antigene für die Selektion hochaffiner, gewebespezifischer Tregs prädestiniert.

## Summary

Ectopic expression of tissue-restricted self-antigens (TRAs) by medullary thymic epithelial cells (mTECs), termed promiscuous gene expression, is indispensable for central induction of T cell (TC)-tolerance towards peripheral tissues. Central tolerance is provided by different mechanisms, such as functional inactivation, clonal deletion or the induction of autoantigen-specific regulatory T cells (Tregs). The induction of each of these mechanisms depends on the T cell receptor (TCR)-affinity of immature TCs for their cognate peptide-/MHC-ligand. Hence, central tolerance induction critically depends on the presentation of self-antigens by thymic antigen-presenting cells (APC). Because mTECs themselves have most characteristics of professional APCs, they are capable of presenting endogenous antigens autonomously. To what extent native TRA are transferred to and cross-presented by hemopoietic APCs (i.e., dendritic cells (DC)) of the local microenvironment, however, remains elusive.

In the present study, the comparative functional *ex vivo*-analysis of the presentation of transgenic and native antigens allowed for the first time an exact delineation of defined thymic APC-populations. It is shown here, that ubiquitous (Ovalbumin) as well as tissue-restricted autoantigens (P1A,PLP), the expression of which is restricted to only a few mTECs (1-5%), can be presented by mTECs and thymic DCs, but not by peripheral DC. This observation led to the conclusion, that autologous antigens are constitutively and unidirectionally transferred from mTECs to thymic DCs *in situ*. Somewhat surprisingly, not only thymic DC presentation of TRAs (P1A, PLP) but also of the ubiquitously expressed nuclear *neo*-self-antigen Ovalbumin strictly depended on its transcription by mTECs. This demonstrated that thymic DCs (in contrast to mTECs) are not equipped to process endogenous nuclear antigens efficiently into the MHC class II-loading pathway and thereby underlines the dual role of mTECs as a specialized source of cell-associated antigens and as APCs within the thymus.

By using a fluorescent, mTEC-restricted model antigen it was possible to directly trace the antigen transfer from mTECs to DCs. The fluorescent DC-subpopulation showed an increased expression of CD80, CD86 and MHC class II-heterodimers, as well as a characteristic surface expression of the epithelial lineage marker EpCAM. In functional terms, this phenotype was associated with a remarkably increased efficiency in MHC class II-mediated presentation of the *neo*-self-antigen Ovalbumin. Noteworthy, the EpCAM surface expression of thymic DC did not correlate with EpCAM transcription in these cells, implicating the intercellular transfer of preformed EpCAM molecules from mTECs to DCs *in situ*. This interpretation is also supported by the observation that MHC class II-complexes are transferred from radioresistant thymic stromal cells (including mTECs) to DCs *in situ*. Together these results provide strong evidence for the constitutive delivery of mTEC-associated antigens to thymic DCs by membrane-transfer.

The intercellular antigen-transfer from mTECs to DCs enlarges the number of APCs presenting a defined TRA, thereby increasing the basis for the affinity-dependent induction of TC-tolerance towards mTEC-specific antigens. The autochthonous presentation of endogenous, promiscuously expressed TRAs makes mTECs particularly suitable for the selection of high-affinity, tissue-specific Tregs, thus enabling the parallel induction of different modes of tolerance (i.e. deletion vs. Treg-induction) by mTECs and DCs.

## Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen	DTT	Dithiothreitol	
AIRE	autoimmune regulator	autoimmune regulator DZ Dendritische Ze		
Ak	Antikörper	EDTA	Ethylendiamintetraacetat	
APS-1	Autoimmune polyglandular	eGFP	enhanced Green	
	syndrome type 1		Fluorescence Protein	
APECED	Autoimmune polyglandular	EP	einfach positiv	
	enteropathy, candidiasis	EpCAM	epithelial cell adhesion	
	and ectodermal distrophy		molecule	
APZ	Antigen-präsentierende	ERK	extracellular signal	
	Zelle		regulated kinase	
AS	Aminosäure	et al.	<i>et alii /</i> und andere	
ATP	Adenosintriphosphat	FACS	fluorescence activated cell	
β-gal	β-Galaktosidase		sorting	
BSA	bovines Serumalbumin	FITC	Fluoresceinisothiocyanat	
BZ	B Zelle/-n	FKS	fötales Kälberserum	
cAMP	cyclic adenin-	G	Gramm	
	monophosphate	GSA	gewebespezifische	
CCL	chemokine ligand		Antigene	
CCR	chemokine receptor	GvH	graft versus host	
CD	cluster of differentiation	h	Stunde	
cDNA	complementary DNA	HEL	hen egg lysozyme	
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid	HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-	
Су	Cyanin		piperazinethansulfonsäure	
DEPC	Diethylpyrocarbonat	HPSF	high pure / salt free	
DKFZ	Deutsches Krebs-	HSA	heat stable antigen	
	forschungszentrum	lg	Immunglobulin	
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle	i.v.	intra venös	
	Medium	kTEZ	kortikale Thymus-	
DN	doppelt negativ		epithelzelle/-n	
DNA	deoxyribonucleic acid	kDa	kilo Dalton	
DNase	deocyribonuclease	KM	Knochenmark	
dNTP	Desoxyribonukleosidtri-	KO	knock out	
	phosphat	I	Liter	
DP	doppelt positiv	Lk-DZ	DZ aus den Lymphknoten	

m	Milli-	SR	scavenger receptor
ΜΦ	Makrophagen	EP	einfach positiv
MACS	magnetic cell sorter/-ing	TAE	Trisacetat-EDTA
Mb	Megabase TEZ Thy		Thymusepithelzellen
MHC	major histocompatibility-	tg	transgen
	complex	Thy-DZ	DZ des Thymus
min	Minute	Treg	regulatorische T Zelle/-n
mRNA	messenger RNA	Tris	Tris(hydroxymethyl)-
MS	Multiple Sklerose		Aminomethan
mTEZ	medulläre Thymusepithel-	TSLP	thymic stromal
	zellen		lymphopoetin
Mz-DZ	DZ aus der Milz	TZ	T Zelle
μ	Mikro-	Τ <sub>Η</sub> Ζ	Helfer-T Zelle
NTP	Ribonukleotidtriphosphat	TZR	T Zell-Rezeptor
OD	optische Dichte	U	unit
OVA	Ovalbumin	U/min	Umdrehungen pro Minute
PBS	phosphate buffered saline	UTP	Uridintriphosphat
PCR	Polymerasekettenreaktion	UV	Ultraviolett
PE	Phycoerythrin	V	Volumen
PerCP	Peridinin chlorophyll	VS	versus
	protein	W	weight
pGE	promiske Genexpression	Wt	Wildtyp
PLP	Proteolipid-Protein		
FITC	Fluoresceinisothiocyanat		
рН	potentia hydrogenii		
PI	Propidiumiodid		
pTZR	präTZR		
RAG	recombination activating		
	genes		
RIP	Ratten-Insulinpromotor		
RNA	ribonucleic acid		
RNase	ribonuclease		
RPMI 1640	Roswell Park Memorial		
	Institute 1640		
RT	Reverse Transkriptase		
sav	Streptavidin		
SDS	Natriumdodecylsulfat		

# Inhaltsverzeichnis

1.		Einleitung	1
	1.1	Der Thymus	1
	1.2	T Zell-Entwicklung	3
	1.3	Positive und negative Selektion	4
	1.4	Zentrale T Zell-Toleranz	6
	1.5	Die promiske Genexpression	9
	1.6	Die tolerogene Antigen-Präsentation im Thymus	.13
	1.7	Zielsetzung der Arbeit	.18
2.		Material und Methoden	19
	2.1	Materialien	.19
	2.1.1	Chemikalien	. 19
	2.1.2	Puffer und Lösungen	20
	2.1.3	Zellkulturmedien	.22
	2.1.4	Antikörper und Zweitreagenzien	.23
	2.1.5	Enzyme, sonstige Proteine und Peptide	.24
	2.1.6	Oligonukleotide, Nukleotide und Nukleinsäuren	.25
	2.1.7	Kits und Standards	27
	2.1.9	Geräte	28
	2.1.10	Software	29
	2.1.11	Verbrauchsmaterialien	29
	2.1.12	Zelllinien	31
	2.1.13	Mäuse	31
	2.2	Molekularbiologische Methoden	.32
	2.2.1	Isolierung von RNA aus Einzelzellsuspensionen	32
	2.2.2	Reverse Transkription	.32
	2.2.3	Isolierung von genomischer DNA aus Schwanzgewebe	33
	2.2.4	Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäurekonzentrationen	.33
	2.2.5	Polymerase Kettenreaktion (PCR) und RT-PCR	33
	2.2.6	Auftrennung der DNA-Amplifikate in Agarosegelen	34
	2.2.7	Echtzeit-PCR mit dem <i>GeneAmp</i> <sup>®</sup> 7300 Sequence Detector	35

2.3	Zellbiologische und immunologische Methoden	36
2.3.1	Bestimmung der Lebendzellzahl	36
2.3.2	Erythrozytenlyse	36
2.3.3	Präparation der Antigen-präsentierenden Zellen des Thymus	36
2.3.3.1	Dendritische Zellen	37
2.3.3.2	Epithelzellen	40
2.3.4	Präparation von lymphoiden Zellen der Milz	43
2.3.4.1	T-Lymphozyten	43
2.3.4.2	Dendritische Zellen	44
2.3.5	Präparation der Dendritischen Zellen des Lymphknotens	44
2.3.6	Knochenmarkpräparation	45
2.3.6.1	T Zell-Depletion von Knochenmark	.45
2.3.10	Ex vivo T Zell-Lymphoproliferationstest	46
2.3.11	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	47
2.4	Tierexperimentelle Methoden	48
2.4.1	Herstellung von Knochenmark-Chimären	48
	Ergebnisse	49
3.1	Der Phänotyp angereicherter DZ-Populationen des Thymus und	
3.1	Der Phänotyp angereicherter DZ-Populationen des Thymus und der Peripherie	49
3.1 3.2	Der Phänotyp angereicherter DZ-Populationen des Thymus und der Peripherie Die Präsentation des <i>neo</i> -Autoantigens Ovalbumin durch	49
3.1 3.2	Der Phänotyp angereicherter DZ-Populationen des Thymus und der Peripherie Die Präsentation des <i>neo</i> -Autoantigens Ovalbumin durch verschiedene APZ-Populationen des Thymus und der Peripherie	49
3.1 3.2	Der Phänotyp angereicherter DZ-Populationen des Thymus und der Peripherie Die Präsentation des <i>neo</i> -Autoantigens Ovalbumin durch verschiedene APZ-Populationen des Thymus und der Peripherie <i>ex vivo</i>	49 53
<b>3.1</b> <b>3.2</b> 3.2.1	Der Phänotyp angereicherter DZ-Populationen des Thymus und der Peripherie Die Präsentation des <i>neo</i> -Autoantigens Ovalbumin durch verschiedene APZ-Populationen des Thymus und der Peripherie <i>ex vivo</i> Die Expression des <i>neo</i> -Autoantigens Ovalbumin in L <sup>d</sup> -nOVA Mäusen	<b>49</b> <b>53</b> .53
<b>3.1</b> <b>3.2</b> 3.2.1 3.2.2	Der Phänotyp angereicherter DZ-Populationen des Thymus und der Peripherie Die Präsentation des <i>neo</i> -Autoantigens Ovalbumin durch verschiedene APZ-Populationen des Thymus und der Peripherie <i>ex vivo</i> Die Expression des <i>neo</i> -Autoantigens Ovalbumin in L <sup>d</sup> -nOVA Mäusen Die Ovalbumin-Präsentation durch APZ aus L <sup>d</sup> -nOVA Mäusen <i>ex vivo</i>	<b>49</b> <b>53</b> 53 54
<b>3.1</b> <b>3.2</b> 3.2.1 3.2.2 3.2.3	Der Phänotyp angereicherter DZ-Populationen des Thymus und der Peripherie Die Präsentation des <i>neo</i> -Autoantigens Ovalbumin durch verschiedene APZ-Populationen des Thymus und der Peripherie <i>ex vivo</i> Die Expression des <i>neo</i> -Autoantigens Ovalbumin in L <sup>d</sup> -nOVA Mäusen Die Ovalbumin-Präsentation durch APZ aus L <sup>d</sup> -nOVA Mäusen <i>ex vivo</i> Die Ovalbumin-Präsentation durch CD11c <sup>+</sup> CD8α <sup>+</sup> -DZ aus L <sup>d</sup> -nOVA	<b>49</b> <b>53</b> 53 54
<b>3.1</b> <b>3.2</b> 3.2.1 3.2.2 3.2.3	Der Phänotyp angereicherter DZ-Populationen des Thymus und der Peripherie Die Präsentation des <i>neo</i> -Autoantigens Ovalbumin durch verschiedene APZ-Populationen des Thymus und der Peripherie <i>ex vivo</i> Die Expression des <i>neo</i> -Autoantigens Ovalbumin in L <sup>d</sup> -nOVA Mäusen Die Ovalbumin-Präsentation durch APZ aus L <sup>d</sup> -nOVA Mäusen <i>ex vivo</i> Die Ovalbumin-Präsentation durch CD11c <sup>+</sup> CD8α <sup>+</sup> -DZ aus L <sup>d</sup> -nOVA Mäusen.	<b>49</b> <b>53</b> 54 58
<b>3.1</b> <b>3.2</b> 3.2.1 3.2.2 3.2.3 3.2.3	Der Phänotyp angereicherter DZ-Populationen des Thymus und der Peripherie Die Präsentation des <i>neo</i> -Autoantigens Ovalbumin durch verschiedene APZ-Populationen des Thymus und der Peripherie <i>ex vivo</i> Die Expression des <i>neo</i> -Autoantigens Ovalbumin in L <sup>d</sup> -nOVA Mäusen Die Ovalbumin-Präsentation durch APZ aus L <sup>d</sup> -nOVA Mäusen <i>ex vivo</i> Die Ovalbumin-Präsentation durch CD11c <sup>+</sup> CD8α <sup>+</sup> -DZ aus L <sup>d</sup> -nOVA Mäusen Die Ovalbumin-Präsentation durch APZ aus Knochenmark-Chimären	<b>49</b> <b>53</b> 53 54 58 60
<b>3.1</b> <b>3.2</b> 3.2.1 3.2.2 3.2.3 3.2.4 <b>3.3</b>	Der Phänotyp angereicherter DZ-Populationen des Thymus und der Peripherie Die Präsentation des <i>neo</i> -Autoantigens Ovalbumin durch verschiedene APZ-Populationen des Thymus und der Peripherie <i>ex vivo</i> Die Expression des <i>neo</i> -Autoantigens Ovalbumin in L <sup>d</sup> -nOVA Mäusen Die Ovalbumin-Präsentation durch APZ aus L <sup>d</sup> -nOVA Mäusen <i>ex vivo</i> Die Ovalbumin-Präsentation durch CD11c <sup>+</sup> CD8α <sup>+</sup> -DZ aus L <sup>d</sup> -nOVA Mäusen Die Ovalbumin-Präsentation durch APZ aus Knochenmark-Chimären Kreuz-Präsentation des Autoantigens P1A durch DZ des	<b>49</b> 53 53 54 58 60
<b>3.1</b> <b>3.2</b> 3.2.1 3.2.2 3.2.3 3.2.4 <b>3.3</b>	Der Phänotyp angereicherter DZ-Populationen des Thymus und der Peripherie Die Präsentation des <i>neo</i> -Autoantigens Ovalbumin durch verschiedene APZ-Populationen des Thymus und der Peripherie <i>ex vivo</i> Die Expression des <i>neo</i> -Autoantigens Ovalbumin in L <sup>d</sup> -nOVA Mäusen Die Ovalbumin-Präsentation durch APZ aus L <sup>d</sup> -nOVA Mäusen <i>ex vivo</i> Die Ovalbumin-Präsentation durch CD11c <sup>+</sup> CD8α <sup>+</sup> -DZ aus L <sup>d</sup> -nOVA Mäusen Die Ovalbumin-Präsentation durch APZ aus Knochenmark-Chimären Kreuz-Präsentation des Autoantigens P1A durch DZ des Thymus <i>ex vivo</i>	<ul> <li>49</li> <li>53</li> <li>53</li> <li>54</li> <li>58</li> <li>60</li> <li>66</li> </ul>
<b>3.1</b> <b>3.2</b> 3.2.1 3.2.2 3.2.3 3.2.4 <b>3.3</b> 3.3.1	Der Phänotyp angereicherter DZ-Populationen des Thymus und der Peripherie Die Präsentation des <i>neo</i> -Autoantigens Ovalbumin durch verschiedene APZ-Populationen des Thymus und der Peripherie <i>ex vivo</i> Die Expression des <i>neo</i> -Autoantigens Ovalbumin in L <sup>d</sup> -nOVA Mäusen Die Ovalbumin-Präsentation durch APZ aus L <sup>d</sup> -nOVA Mäusen <i>ex vivo</i> Die Ovalbumin-Präsentation durch CD11c <sup>+</sup> CD8α <sup>+</sup> -DZ aus L <sup>d</sup> -nOVA Mäusen Die Ovalbumin-Präsentation durch APZ aus Knochenmark-Chimären Kreuz-Präsentation des Autoantigens P1A durch DZ des Thymus <i>ex vivo</i> Die Expression des gewebespezifischen Autoantigens P1A in Balb/c	<ul> <li>49</li> <li>53</li> <li>53</li> <li>54</li> <li>58</li> <li>60</li> <li>66</li> </ul>
<b>3.1</b> <b>3.2</b> 3.2.1 3.2.2 3.2.3 3.2.4 <b>3.3</b> 3.3.1	Der Phänotyp angereicherter DZ-Populationen des Thymus und der Peripherie Die Präsentation des <i>neo</i> -Autoantigens Ovalbumin durch verschiedene APZ-Populationen des Thymus und der Peripherie <i>ex vivo</i> Die Expression des <i>neo</i> -Autoantigens Ovalbumin in L <sup>d</sup> -nOVA Mäusen Die Ovalbumin-Präsentation durch APZ aus L <sup>d</sup> -nOVA Mäusen <i>ex vivo</i> Die Ovalbumin-Präsentation durch CD11c <sup>+</sup> CD8α <sup>+</sup> -DZ aus L <sup>d</sup> -nOVA Mäusen Die Ovalbumin-Präsentation durch APZ aus Knochenmark-Chimären Kreuz-Präsentation des Autoantigens P1A durch DZ des Thymus <i>ex vivo</i> Die Expression des gewebespezifischen Autoantigens P1A in Balb/c Mäusen ist auf mTEZ beschränkt	<ul> <li>49</li> <li>53</li> <li>53</li> <li>54</li> <li>58</li> <li>60</li> <li>66</li> <li>66</li> </ul>
<ul> <li><b>3.1</b></li> <li><b>3.2</b></li> <li><b>3.2.1</b></li> <li><b>3.2.2</b></li> <li><b>3.2.3</b></li> <li><b>3.2.4</b></li> <li><b>3.3.1</b></li> <li><b>3.3.1</b></li> <li><b>3.3.2</b></li> </ul>	Der Phänotyp angereicherter DZ-Populationen des Thymus und der Peripherie Die Präsentation des <i>neo</i> -Autoantigens Ovalbumin durch verschiedene APZ-Populationen des Thymus und der Peripherie <i>ex vivo</i> Die Expression des <i>neo</i> -Autoantigens Ovalbumin in L <sup>d</sup> -nOVA Mäusen Die Ovalbumin-Präsentation durch APZ aus L <sup>d</sup> -nOVA Mäusen <i>ex vivo</i> Die Ovalbumin-Präsentation durch CD11c <sup>+</sup> CD8α <sup>+</sup> -DZ aus L <sup>d</sup> -nOVA Mäusen Die Ovalbumin-Präsentation durch APZ aus Knochenmark-Chimären Kreuz-Präsentation des Autoantigens P1A durch DZ des Thymus <i>ex vivo</i> Die Expression des gewebespezifischen Autoantigens P1A in Balb/c Mäusen ist auf mTEZ beschränkt Die Präsentation von endogenem P1A durch APZ-Populationen aus	<ul> <li>49</li> <li>53</li> <li>53</li> <li>54</li> <li>58</li> <li>60</li> <li>66</li> <li>66</li> </ul>
<ul> <li><b>3.1</b></li> <li><b>3.2</b></li> <li><b>3.2.1</b></li> <li><b>3.2.2</b></li> <li><b>3.2.3</b></li> <li><b>3.2.4</b></li> <li><b>3.3</b></li> <li><b>3.3.1</b></li> <li><b>3.3.2</b></li> </ul>	Der Phänotyp angereicherter DZ-Populationen des Thymus und der Peripherie Die Präsentation des <i>neo</i> -Autoantigens Ovalbumin durch verschiedene APZ-Populationen des Thymus und der Peripherie <i>ex vivo</i> Die Expression des <i>neo</i> -Autoantigens Ovalbumin in L <sup>d</sup> -nOVA Mäusen Die Ovalbumin-Präsentation durch APZ aus L <sup>d</sup> -nOVA Mäusen <i>ex vivo</i> Die Ovalbumin-Präsentation durch CD11c <sup>+</sup> CD8α <sup>+</sup> -DZ aus L <sup>d</sup> -nOVA Mäusen Die Ovalbumin-Präsentation durch APZ aus Knochenmark-Chimären Kreuz-Präsentation des Autoantigens P1A durch DZ des Thymus <i>ex vivo</i> Die Expression des gewebespezifischen Autoantigens P1A in Balb/c Mäusen ist auf mTEZ beschränkt Die Präsentation von endogenem P1A durch APZ-Populationen aus Balb/c (WT)-Mäusen	<ul> <li>49</li> <li>53</li> <li>53</li> <li>54</li> <li>58</li> <li>60</li> <li>66</li> <li>66</li> <li>.68</li> </ul>
<ul> <li><b>3.1</b></li> <li><b>3.2</b></li> <li><b>3.2.1</b></li> <li><b>3.2.2</b></li> <li><b>3.2.3</b></li> <li><b>3.2.4</b></li> <li><b>3.3.1</b></li> <li><b>3.3.1</b></li> <li><b>3.3.2</b></li> <li><b>3.3.2</b></li> <li><b>3.3.3.1</b></li> </ul>	Der Phänotyp angereicherter DZ-Populationen des Thymus und der Peripherie.         Die Präsentation des neo-Autoantigens Ovalbumin durch verschiedene APZ-Populationen des Thymus und der Peripherie ex vivo.         Die Expression des neo-Autoantigens Ovalbumin in L <sup>d</sup> -nOVA Mäusen.         Die Ovalbumin-Präsentation durch APZ aus L <sup>d</sup> -nOVA Mäusen ex vivo.         Die Ovalbumin-Präsentation durch CD11c <sup>+</sup> CD8α <sup>+</sup> -DZ aus L <sup>d</sup> -nOVA         Mäusen.         Die Ovalbumin-Präsentation durch APZ aus Knochenmark-Chimären.         Kreuz-Präsentation des Autoantigens P1A durch DZ des         Thymus ex vivo.         Die Expression des gewebespezifischen Autoantigens P1A in Balb/c         Mäusen ist auf mTEZ beschränkt.         Die Präsentation von endogenem P1A durch APZ-Populationen aus         Balb/c (WT)-Mäusen.         Bei der MHC-Klasse I-vermittelten Präsentation von P1A handelt es	<ul> <li>49</li> <li>53</li> <li>53</li> <li>54</li> <li>58</li> <li>60</li> <li>66</li> <li>66</li> <li>68</li> </ul>

3.

3.4	Präsentation des Autoantigens Proteolipid Protein durch
	Thy-DZ ex vivo
3.4.1	MTEZ exprimieren PLP und DM20 deutlich stärker als Thy-DZ78
3.4.2	PLP wird von Thy-DZ effizient präsentiert80
3.5	Funktionelle und phänotypische Charakterisierung des
	Ag-Transfers von TEZ auf Thy-DZ83
3.5.1	Visualisierung des Ag-Transfers anhand des FoxN1-eGFP-Modells83
3.5.2	Die EpCAM-Oberflächenexpression von FoxN1-eGFP-Thy-DZ
	korreliert mit der eGFP-Fluoreszenz
3.5.3	Weder die eGFP- noch die EpCAM-Transkription korreliert mit dem
	durchflusszytometrischem Proteinnachweis in Thy-DZ88
3.5.4	Die differentielle EpCAM-Proteinexpression repräsentiert
	unterschiedliche Reifestadien der Thy-DZ
3.5.5	EpCAM⁺-Thy-DZ präsentieren endogene MHC Klasse II-
	restringierte Antigene mit hoher Effizienz
3.5.6	Die MHC Klasse I-vermittelte Kreuzpräsentation von endogenem
	P1A korreliert nicht mit der EpCAM-Oberflächenexpression95
3.5.7	Der intrathymische Transfer von MHC Klasse II-Komplexen als
	Möglichkeit des Ag-Transfers von mTEZ auf Thy-DZ
	Diskussion100
4.1	Medulläre Thymusepithelzellen und Dendritische Zellen können
	mTEZ-abgeleitete gewebespezifischer Antigene in tolerogener
	Weise präsentieren101
4.2	Mechanismen des unidirektionalen Ag-Transfers von mTEZ
	auf Thy-DZ107
4.2.1	Die Präsentation von apoptotischen Zellfragmenten durch Thy-DZ 107
4.2.2	Exosomen als Vehikel des interzellulären Proteintransports
4.2.3	Die Akquisition zellulärer Antigene von vitalen Zellen durch "Nibbling"111
4.2.4	Die immunologische Kopplung benachbarter Zellen durch gap junctions.112
4.2.5	Der Import peripherer Antigene in den Thymus durch migratorische DZ113
4.3	Komplementierung oder Redundanz ?
	Der Einfluß des Ag-Transfers auf die differentielle Komposition
	des präsentierten Ag-Repertoires in mTEZ und DZ116
4.3.1	MTEZ und Thy-DZ präsentieren partiell redundante Ag-Repertoires116

4.

4.3.2	Welchen Einfluss hat die Epitopdichte auf die Effizienz der negativen	
	Selektion?	117
4.3.3	Negative Selektion wird durch die Affinität des T Zell-Rezeptors	
	bestimmt	120
4.4	Implikationen des unidirektionalen Ag-Transfers von mTEZ auf	
	DZ für die Induktion verschiedener Toleranzmechanismen	122
4.4.1	Die Induktion regulatorischer TZ durch TEZ	123
4.4.2	Die Bedeutung Dendritischer Zellen für die Treg-Entwicklung	125
4.4.3	Die Differenzierung von Tregs wird durch kostimulatorische	
	Moleküle entscheidend beeinflusst	128
4.5	Ausblick	130
	Literaturverzeichnis	131
	Danksagung	145

5.

6.

## 1. <u>Einleitung</u>

Grundlegendes Charakteristikum des adaptiven Immunsystems höherer Vertebraten ist die individuelle Neogenese eines hochdiversen Rezeptorrepertoires mit der Befähigung zur Identifizierung definierter "Fremd"-Strukturen. B- und T-Lymphozyten sind als Effektorzellen des adaptiven Immunsystems imstande, bis zu 10<sup>15</sup> mögliche Rezeptorspezifitäten zu generieren (Davis, 1990). Die enorme Diversität des Rezeptorrepertoires basiert auf der somatischen Rekombination von Antigenrezeptor-Genen (<u>Variable-, Diversity-, Joining-</u>Regionen) durch RAG-Enzyme (<u>recombination activating genes</u>) während der frühen Lymphozytenentwicklung. Aufgrund des randomisierten Rearrangements der VDJ-Regionen birgt die somatische Rekombination jedoch ein inhärentes Risiko zur Generierung autoreaktiver Rezeptoren. Dies führte zu der Vermutung, dass die Vielfalt der möglichen Rezeptorspezifitäten die Entwicklung eines Organs begünstigte, dessen Struktur eine qualitative Selektion des Lymphozytenrepertoires ermöglichte (Boehm und Bleul, 2007).

### 1.1 Der Thymus

Der Thymus ist ein lymphoepitheliales Organ, welches eine evolutionäre Neuentwicklung der kiefertragenden Vertebraten darstellt. Phylogenetisch geht die Entstehung des Thymus mit der Entwicklung der somatischen Rekombination einher, wie sie erstmals bei *Gnathostomata* in Erscheinung tritt (Boehm und Bleul, 2007). In allen rezenten Organismen, die sich des somatischen Rearrangements von Antigenrezeptor-Genen durch RAG-Enzyme zur Erhöhung der Rezeptordiversität bedienen, kann ein Thymus nachgewiesen werden.

Ontogenetisch geht der Thymus aus dem Endoderm der 3. und 4. Schlundtasche hervor, welches von multipotenten hämatopoetischen Vorläuferzellen mesodermalen Ursprungs besiedelt wird (Boehm *et al.*, 2003). Der parenchymale Anteil des Thymus lässt sich in einen äußeren Kortex und eine innere Medulla unterteilen. Der Kortex wird gegenüber umliegenden Geweben durch eine superfizielle Kapsel begrenzt und gleichzeitig von kapsulären Trabekeln untergliedert.

Kortikale und medulläre Thymusepithelzellen (kTEZ / mTEZ) bilden das Grundgerüst der jeweiligen Kompartimente. Darüber hinaus umfasst das heterogene Gewebe von Kortex und Medulla, welches als Thymusstroma bezeichnet wird, neben unreifen T-Zellen der verschiedenen Entwicklungsstadien auch Fibroblasten, Dendritische Zellen (DZ), Makrophagen (MΦ) und B-Zellen (BZ). Organisiert in einem lockeren Zellverbund, stellt das Thymusstroma die für die T Zell-Entwicklung notwendigen Mikromilieus zur Verfügung.

Während die meisten hämatopoetischen Zellen als lymphoide oder myeloide Vorläufer in den Thymus einwandern, entwickeln sich mTEZ und kTEZ nach aktuellem Kenntnisstand aus einer gemeinsamen, residenten, bipotenten Stammzelle (Rossi *et al.*, 2006; Boehm und Bleul, 2006). So konnten Boehm und Kollegen kürzlich zeigen, dass die Reversion der Expression des *forkhead-box* Transkriptionsfaktors FoxN1 in einer einzelnen FoxN1-defizienten Thymusepithelzelle zu einer vollständigen Restauration des Vorläuferpotentials führte, was sich in der Generierung von kortikalen und medullären Epithelstrukturen äußerte (Bleul *et al.*, 2006).



<u>Abb. 1:</u> Schematischer Querschnitt durch den Thymus. Lymphoide multipotente T-Vorläuferzellen wandern über Venolen im Bereich der kortiko-medullären Verbindung (KMV) in den Thymus ein. Geleitet von Zytokingradienten und der Interaktion mit verschiedenen Matrixkomponenten durchwandern unreife Thymozyten zunächst den Kortex, wo sie durch den erfolgreichen Kontakt mit kortikalen TEZ positiv selektioniert werden. Die nun als reife Thymozyten bezeichneten Zellen passieren auf einer anschließenden inversen Wanderung die KMV und treten in die Medulla über, wo negative Selektion durch den Kontakt mit verschiedenen professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (maßgeblich mTEZ und DZ) vermittelt wird. Verbliebene Zellen wandern als reife TZ in die Peripherie aus.

Darüber hinaus wird die essentielle Rolle des Thymusepithels bei der T-Zell (TZ)-Entwicklung durch den Phänotyp der *nude*-Maus (FoxN1<sup>-/-</sup>) verdeutlicht. In diesen Tieren kommt es, bedingt durch die Dysfunktion des Transkriptionsfaktors FoxN1, zu einer Blockade der Thymusentwicklung am Tag 11 der Embryonalentwicklung (Cordier *et al.*, 1980). Dementsprechend findet man in *nude*-Mäusen zwar rudimentäre Thymus-Organanlagen, die jedoch keine Unterteilung in kortikale und medulläre Areale erkennen lassen. Die gestörte Organarchitektur verhindert die TZ-Entwicklung, so dass diese Tiere schwere Immundefizienzen aufweisen (Nehls *et al.*, 1994).

#### 1.2 T-Zell-Entwicklung

Multipotente lymphoide Vorläuferzellen wandern bereits embryonal aus dem Dottersack oder der fötalen Leber in den Thymus ein; später rekrutieren sich diese Zellen ausschließlich aus dem Knochenmark. Nach Extravasation im Bereich der kortiko-medullären Verbindung, welche unter anderem durch die adhäsive Interaktion zwischen lymphoidem PSGL1 (platelet (P)-selectin glycoprotein ligand 1) und endothelialem P-Selektin vermittelt wird, begeben sich die im folgenden als Thymozyten bezeichneten TZ-Vorläufer zunächst auf eine everse Wanderung durch den Kortex (Lind et al., 2001, Rossi et al., 2005). Dabei spielen nach aktuellem Erkenntnisstand Chemokingradienten eine entscheidende Rolle, was an der verminderten embryonalen Besiedlung des Thymus in CCL25 (chemokine-ligand 25)defizienten Mäusen deutlich wird. Ein ähnliches Phänomen ist auch bei natürlich vorkommenden *plt/plt* <sup>-/-</sup>-Mäusen, die eine Mutation des CCL21-Gens tragen, zu beobachten (Liu et al., 2005). Da die Rezeptoren dieser Liganden, CCR7 und CCR9, von Thymozyten in verschiedenen Reifestadien exprimiert werden, nimmt man an, dass diese Rezeptor-Ligand-Interaktionen eine gerichtete Migration durch die jeweiligen spezialisierten Mikromilieus des Thymus ermöglicht (Ueno et al., 2002; Petrie, 2003; Misslitz et al., 2004; Kurobe et al., 2006).

Während der Wanderung durch den Thymus durchlaufen Thymozyten einen Reifungsprozess, in dessen Verlauf TZ-Rezeptor (TZR)-codierende Gensegmente mithilfe von RAG-Enzymen so rearrangiert werden, dass ein funktioneller TZR entsteht. Thymozyten, bei denen dies nicht gelingt, werden an einem von mehreren Kontrollpunkten der Thymozytenentwicklung durch programmierten Zelltod ausselektiert (Hayday und Pennington, 2007).

Anhand der differentiellen Expression von Oberflächenmolekülen werden grob folgende Reifestadien unterschieden: CD4-/CD8-doppelt-negative (DN)-, doppelt positive (DP)- und CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> einfach-positive (EP) Thymozyten. DN-Thymozyten lassen sich mithilfe der Oberflächenexpression von CD25 und CD44 in vier weitere Entwicklungsstufen unterteilen: DN1: CD25<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>, DN2: CD25<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>, DN3: CD25<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup> und DN4: CD25<sup>-</sup>CD44<sup>-</sup>. Die erste Kontrolle des erfolgreichen Rearrangements der TZR-β-Kette erfolgt während des CD25<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup> DN3-Stadiums (Dudley *et al.*, 1994). Nur solche Thymozyten, welche zu diesem Zeitpunkt einen funktionellen prä-T Zell-Rezeptor (pTZR), bestehend aus einer erfolgreich rearrangierten  $\beta$ -Kette und einer pTZR- $\alpha$ -Kette, membranständig exprimieren, entwickeln sich weiter zu DP-Thymozyten. Resultiert das Rearrangement nicht in einem funktionellen pTZR, besteht eine weitere Chance zur Editierung der  $\beta$ -Kette. Sollte auch dies fehlschlagen, führt das Ausbleiben des präTZR-Signals zu Apoptose.

#### 1.3 Positive und negative Selektion

Im DP- Stadium, in welchem Thymozyten zum ersten Mal ein vollständiges  $\alpha\beta$ - (oder  $\gamma\delta$ -) TZR-Heterodimer auf der Zelloberfläche exprimieren, erfolgt die positive Selektion.

Als positive Selektion wird die "Prägung" des TZ-Repertoires auf das "immunologische Selbst" (Selbst-Restriktion) bezeichnet, welches durch die Expression von körpereigenen Peptiden in Kombination mit <u>Major Histocompatibility Complex</u> (MHC) Klasse I- und II-Heterodimeren definiert ist. Erfolgreiche TZR-/MHC-Interaktionen legen fest, welche MHC-Haplotypen vom späteren TZ-Repertoire als körpereigen oder fremd erkannt werden. Es gilt als gesichert, dass die positive Selektion des TZR-Repertoires im Kortex maßgeblich durch die Interaktion von DP-Thymozyten mit kTEZ vermittelt wird (Merkenschlager *et al.*, 1994; Laufer *et al.*, 1996).

Auf Einzelzellebene äußert sich die positive Selektion in der Inhibition der RAG-Enzymaktivität, wodurch die Editierung der TZRα-Kette beendet wird, sowie der verstärkten Expression des TZR-Komplexes (Nemazee und Hogquist, 2003; Werlen *et al.*, 2003). Parallel hierzu wird die Expression eines Korezeptors (CD4 oder CD8) eingestellt. Die Mechanismen, die zum Abschalten jeweils eines Korezeptors führen, sind immer noch wenig verstanden. Zur Zeit werden drei verschiedene Modelle diskutiert:

Das stochastisch-selektive Modell geht davon aus, dass die Auswahl eines Korezeptors unabhängig von der Spezifität des TZR für einen MHC Klasse I- oder MHC Klasse II-Liganden erfolgt. In diesem Fall würden nur solche Thymozyten überleben, die zufällig die richtige TZR-Korezeptor Kombination exprimieren (Davis *et al.*, 1993; Chan *et al.*, 1993).

Das instruktive Modell hingegen postuliert, dass die erfolgreiche Interaktion des TZR mit seinem MHC-Peptid-Liganden zur Abschaltung der Expression des "falschen" Korezeptors führt, je nachdem ob der Ligand MHC Klasse I- oder II-vermittelt präsentiert wird (Seong *et al.*, 1992; Itano und Robey, 2000).

Das kinetische Modell schließlich besagt, dass die Dauer der Interaktion des TZR mit seinem Liganden über das Thymozytenschicksal entscheidet. Demnach unterstützen lange Wechselwirkungen die Differenzierung zu einer CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>-Zelle, während kurze Interaktionen

die Induktion eines CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T Zell-Schicksals induzieren (Brugnera *et al.*, 2000). Obwohl für alle Modelle experimentelle Belege existieren, konnte sich bislang keines durchsetzen.

Unter negativer Selektion versteht man die Eliminierung potentiell autoreaktiver Thymozyten durch spezifische TZR-/MHC-Interaktion. Somit umfasst diese Definition Wechselwirkungen variabler Avidität in Kortex und Medulla, da Thymozyten je nach Entwicklungsstadium mit unterschiedlicher Sensitivität auf TZR- und Kostimulator-vermittelte Signale reagieren (Davey *et al.*, 1998; Lucas *et al.*, 1999).

Bislang konnte nicht vollständig geklärt werden, wie konträre Zellschicksale (positive oder negative Selektion) über den gleichen Rezeptor vermittelt werden. Folgt man dem differentiellen *Aviditäts-Modell* von Ashton-Rickardt und Jameson, wird das Ergebnis der Interaktion entscheidend durch die Avidität der TZR/MHC-Peptidkomplex-Verbindung beeinflusst. In diesem Fall darf die aus der Anzahl und Affinität des TZR und der Summe der Liganden auf der Oberfläche der selektierenden APZ resultierende Signalstärke einen bestimmten Schwellenwert weder unter- noch überschreiten (Ashton-Rickardt *et al.*, 1994; Jameson *et al.*, 1995). Innerhalb dieses schmalen Aviditäts-Fensters kommt es zur positiven Selektion. Zellen, deren TZR bereits in diesem Stadium autologe Peptide mit hoher Avidität bindet, werden negativ selektioniert; solche, deren TZR keine Bindung mit körpereigenen Peptid-/MHC-Komplexen eingehen kann, fallen dem "Tod durch Vernachlässigung" (*death by neglect*) zum Opfer.

Ein anderes Modell geht davon aus, dass sich die TZR-vermittelten Signale, welche zu positiver oder negativer Selektion führen, auf Ebene der einzelnen TZR-/MHC-Interaktion qualitativ unterscheiden. So implementiert die von Hogquist postulierte *differentielle Signalhypothese*, dass die Stärke des einzelnen TZR-Signals in Abhängigkeit des jeweiligen Liganden, und nicht die Anzahl der an einer TZ-APZ-Interaktion beteiligten TZ-Rezeptoren die Determination des Zellschicksals bestimmt (Hogquist *et al.*, 1994; Hogquist, 2001). Ein positiv selektionierender Ligand würde demnach ein qualitativ anderes Signal auslösen, als ein negativ selektionierender Ligand, was sich darin äußert, dass ersterer nicht imstande ist, periphere TZ zu aktivieren.

Die qualitative Unterscheidung zweier Signale auf der Ebene einer individuellen TZR-/ Ligand-Interaktion setzt voraus, dass ein definierter TZR grundsätzlich in der Lage ist, eine Auswahl verschiedener Peptidliganden in Kombination mit MHC-Komplexen zu erkennen. Tatsächlich konnte am Beispiel von TZR-transgenen (TZRtg) Mäusen gezeigt werden, dass die Interaktion mit (niederaffinen) antagonistischen Peptiden in Verbindung mit MHC Klasse II-Komplexen im DP-Stadium zur positiven Selektion führt, während agonistische Peptide bevorzugt Apoptose auslösten (Smyth *et al.*, 1998). Dementsprechend geht man heute davon aus, dass ein TZR bis zu 10<sup>6</sup> verschiedene Peptidliganden "erkennt".

Die differentielle Signalhypothese wird durch weitere Studien gestützt. So konnte gezeigt werden, dass Mutationen in einem Motiv der TZRα-Kette, welches initial mit der *extracellular signal regulated kinase* (ERK)-Signaltransduktionskaskade in Verbindung steht, selektiv die positive Selektion beeinträchtigen, nicht aber die negative Selektion (Werlen, 2000). Diese Befunde sind mit den Ergebnissen einer aktuellen Studie konform, aus denen hervorgeht, dass eine *Calcineurin*-abhängige "Sensibilisierung" der ERK die positive Selektion durch schwache TZR-vermittelte Signale innerhalb eines definierten Entwicklungsstadiums ermöglicht (Gallo *et al.*, 2007). Die negative Selektion durch starke agonistische Signale ist hingegen in jedem Stadium unabhängig von der ERK-vermittelten Signaltransduktion möglich.

Gemeinsam ist beiden Modellen, dass die Affinität des TZR zu seinem Liganden entscheidend zur Determination des Thymozyten-Schicksals beiträgt. Es herrscht ein breiter Konsens, dass eine hochaffine TZR-Ligation sowohl im DP- als auch im EP-Stadium zu negativer Selektion führt. Ergänzend wurde von Modigliani und Kollegen vorgeschlagen, dass TZR-Signale in einer Intensität unterhalb der zur negativen Selektion führenden Signalstärke im DP- oder EP-Stadium zur Induktion von regulatorischen T-Zellen führen können (Abb. 2; Modigliani *et al.*, 1996).

Eine schwache, aber signifikante Affinität des TZR zu seinem Peptid-/MHC-Liganden vermittelt hingegen in beiden Stadien ein positives Überlebenssignal, was letztendlich zur Emigration der reifen CD4- oder CD8-EP-T Zellen in die Peripherie führt.

#### 1.4 Zentrale T Zell-Toleranz

Immunologische Toleranz ist definiert als ein Zustand, in dem Immunreaktionen gegen körpereigene Strukturen ausbleiben. Dieser Zustand kann sowohl durch die physische Eliminierung als auch durch die funktionelle Inaktivierung oder Suppression potentiell autoreaktiver Lymphozyten gewährleistet werden.

Die besondere Bedeutung des Thymus für die Toleranzinduktion von TZ wurde erkannt, als gezeigt werden konnte, dass TZ Gewebe tolerieren, die den gleichen MHC-Haplotyp des Thymus exprimieren, in dem ihre Entwicklung stattgefunden hat (Good *et al.*, 1983).

Kappler und Kollegen konnten erstmals einen direkten Zusammenhang zwischen der Expression eines endogenen Antigens in Form eines viralen Superantigens und der klonalen Deletion Ag-spezifischer Thymozyten herstellen. Virale Superantigene werden von allen Thymozyten, deren TZR eine definierte β-Kette aufweist, erkannt. Durch Markierung der

β-Kette mit einem monoklonalen Antikörper konnte das Schicksal der Thymozyten nachvollzogen werden. Superantigen-spezifische Thymozyten waren zwar innerhalb des Pools unreifer Thymozyten im Thymus, nicht aber unter den reifen Thymozyten oder naiven TZ in der Peripherie nachzuweisen (Kappler *et al.*, 1987). Dieses Resultat wurde wenig später in einem MHC Klasse I-restringierten, TZRtg Modellsystem bestätigt. TZ mit der Spezifität für das geschlechtsspezifische H-Y-Ag, dessen Expression auf männliche Individuen beschränkt ist, wurden in weiblichen Tieren positiv selektioniert und entwickelten sich zu CD8<sup>+</sup> EP-Thymozyten. In männlichen Tieren fand hingegen eine massive klonale Deletion im CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> DP-Stadium statt (Kisielow *et al.*, 1988).

Neben der klonalen Deletion wurde klonale Anergie von Ramsdell und Kollegen als ein nichtdeletierender Toleranzmechanismus beschrieben. Die Expression von *minor lymphocyte stimulatory* (MIs-1a)- und MHC-Antigenen durch bestrahlungsresistente Thymusstromazellen führte in diesem Fall lediglich zur funktionellen Inaktivierung der responsiven TZ, nicht aber zu deren Deletion (Ramsdell *et al.*, 1989).

Zusammengefasst werden klonale Deletion und klonale Anergie unter dem Begriff der rezessiven Toleranz, da diese Form der Toleranz nicht interindividuell übertragbar ist. Dem steht die bereits erwähnte dominante Toleranz gegenüber, vermittelt durch regulatorische T-Zellen.

Mittlerweile wurden zahlreiche Zellpopulationen mit regulatorischen Eigenschaften beschrieben. Bislang am besten charakterisiert und verstanden ist jedoch die Biologie der natürlich vorkommenden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-regulatorischen Zellen (Tregs). Tregs umfassen in einer naiven Maus ungefähr 5-10% der peripheren CD4<sup>+</sup> TZ. Neben der konstitutiven Expression der Interleukin 2-Rezeptor α-Kette (CD25) lassen sich Tregs in der Maus zweifelsfrei durch die Expression des forkhead/winged-helix Transkriptionsfaktors Foxp3 identifizieren. Die besondere Bedeutung dieses Faktors für die Entwicklung und Funktion von Tregs wird anhand der spontanen Mutation des Foxp3-Gens in scurfy-Mäusen deutlich (Brunkow et al., 2001; Hori et al., 2003). Diese Tiere weisen vielfältige autoimmune Läsionen in Form von Diabetes, Thyroiditis und Enteropathie auf, kombiniert mit massiver Lymphoproliferation. Ein ähnliches klinisches Bild zeigt auch das humane IPEX-Syndrom (*immune dysregulation*, *polyendocrinopathy*, *enteropathy*, *X-linked*), eine seltene, Xchromosomal gekoppelte Autoimmunkrankheit, die ebenfalls auf einem Foxp3-Gendefekt basiert (Wildin et al., 2002). Da Tregs in Mäusen die einzige bislang bekannte Foxp3exprimierende lymphoide Zellpopulation darstellen, konnten die pathologischen Befunde in *scurfy*-Mutanten eindeutig mit dieser Zellpopulation korreliert werden.

Eine Reihe von Studien legt nahe, dass CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs, analog zu der Entwicklung von konventionellen CD4<sup>+</sup> TZ, durch Autoantigenkontakt im Thymus selektioniert werden. So beschrieben Modigliani und Kollegen eine Form der dominanten Toleranz, die durch den

Transfer von embryonalem Thymusepithel in athymische Empfängermäuse induziert werden konnte. Hier waren TZ, die durch das Thymusepithel des Spenders selektioniert wurden, nicht nur tolerant gegenüber weiteren Transplantaten des Spenders; diese Toleranz konnte darüber hinaus auch auf dritte Individuen mithilfe peripherer Lymphozyten übertragen werden (Modigliani *et al.*, 1995). Für eine zentrale Induktion im Thymus spricht weiterhin, dass sich TZR-transgene Thymozyten, deren TZR ein im Thymus exprimiertes Autoantigen mit intermediärer Affinität bindet, bevorzugt zu CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen TZ entwickeln, sofern sie nicht negativ selektioniert werden (Jordan *et al.*, 2001; Kawahata *et al.*, 2002).



<u>Abb. 2:</u> 3-stufiges Selektionsmodell (modifiziert, nach Schwartz, 2005.) Basierend auf der Affinität des TZR zu seinem spezifischen Liganden werden Thymozyten in verschiedenen Reifestadien unterschiedlich selektioniert. Liegt die Affinität unreifer Thymozyten unterhalb eines kritischen Schwellenwertes, erfolgt kein positives Überlebenssignal (Tod durch Vernachlässigung). In einem intermediären Affinitätsbereich werden unreife Thymozyten positiv selektioniert, während ein starkes Signal in unreifen und reifen Thymozyten zur negativen Selektion führt. In reifen Thymozyten induziert ein TZR-Signal im mittleren Affinitätsbereich oberhalb eines bestimmten Schwellenwertes ein regulatorisches TZ-Schicksal.

Aufgrund dieser Befunde wurde das bereits angedeutete dreistufige Selektionsmodell vorgeschlagen, das neben positiver und negativer Selektion auch die Induktion von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs vorsieht (Schwartz, 2005; Abb. 2). Daher werden Tregs hier den zentralen Toleranzmechanismen zugeordnet, obwohl sie ihre Effektorfunktion in der Peripherie ausüben.

Andere Untersuchungen ziehen allerdings die Abhängigkeit der Treg-Induktion von der Expressionsstärke des spezifischen Agonisten durch das Thymusepithel in Zweifel. So führte die verstärkte Expression eines *neo*-Autoantigens unter der Kontrolle eines dosisabhängigen Tetrazyklin-induzierbaren Promotors zu keiner Steigerung der absoluten Anzahl von Agspezifischen Tregs, wohl aber zu einer Erhöhung ihres relativen Anteils an der Gesamtpopulation von Thymusemigranten (van Santen *et al.*, 2004).

Obwohl der zugrunde liegende Mechanismus also bislang nicht augeklärt werden konnte, herrscht ein breiter Konsens darüber, dass die Induktion von Autoantigen-spezifischen Tregs im Thymus einen essentiellen Beitrag zur Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz leistet.

#### 1.5 Die promiske Genexpression

Die Mechanismen der Induktion von TZ-Toleranz gegenüber peripheren gewebespezifischen Antigenen waren lange Zeit unklar. Ursprünglich wurde spekuliert, dass diese Antigene über den Blutstrom in den Thymus gelangen, wo sie von APZ aufgenommen und präsentiert werden (Kyewski *et al.*, 1984). Das Ausbleiben von Autoimmunreaktionen gegenüber zellständigen oder schwach exprimierten Antigenen erklärte man hingegen meist durch periphere Toleranzmechanismen, wie immunologischer Ignoranz (Kurts *et al.*, 1998 + 1999) oder der peripheren Induktion von Anergie (Jenkins und Schwartz, 1987; Lane *et al.*, 1996; Perez *et al.*, 1997). Auch wurde beschrieben, dass TZR-transgene TZ die Expression ihres TZ- und Korezeptors nach Antigenkontakt in der Peripherie reduzieren. Diese Reduktion war reversibel und konnte durch die Reaktivierung des polyklonalen TZ-Repertoires *in vitro* aufgehoben werden, was nahe legt, dass die klonotypischen TZ nicht aus dem peripheren TZ-Pool eliminiert werden, sondern *in vivo* weiterhin anergisch persistieren (Schönrich *et al.*, 1991; Ferber *et al.*, 1994).

Interessanterweise führte jedoch die transgene Expression von *neo*-Autoantigenen unter der Kontrolle von gewebespezifischen Promotoren neben der erwarteten peripheren Expression oft auch zu einer ektopischen Expression im Thymus, was zunächst als Artefakt der Transgenese ohne physiologische Bedeutung angesehen wurde (Salmon *et al.*, 1988).

Hanahan und Kollegen interpretierten erstmals die Expression gewebespezifischer Antigene des exokrinen und endokrinen Pankreas als physiologische Eigenschaft von Thymus-Stromazellen, ohne jedoch den verantwortlichen Zelltyp genauer spezifizieren zu können (Jolicoeur *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1997). Zwar konnte anhand immunhistochemischer Insulin-Färbungen auf Thymusschnitten gezeigt werden, dass diese ursprünglich verallgemeinernd als PAE (*peripheral antigen expressing-*) bezeichneten Zellen vornehmlich in der Medulla lokalisiert sind; dieser Befund alleine ermöglichte aber aufgrund der heterogenen zellulären Komposition dieses Kompartiments keine eindeutige Zuordnung. Klein und Derbinski präsentierten schließlich Verfahren zur hochgradigen Anreicherung definierter medullärer Zellpopulationen, die eine zweifelsfreie Zuordnung der Ag-Expression zu bestimmten Zelltypen zuließ (Klein *et al.*, 1998; Derbinski *et al.*, 2001).

Demnach ist die ektopische Transkription von peripheren gewebespezifischen Antigenen (GSA), in der Folge bezeichnet als promiske Genexpression (pGE), vornehmlich eine Eigenschaft von mTEZ, wenngleich andere Autoren zunächst DZ als den verantwortlichen Zelltyp vorschlugen (Throsby *et al.*, 1998; Pugliese *et al.*, 2001) Tatsächlich konnten auch Derbinski und Kollegen die Transkription verschiedener GSA wie *P1A* (Testis) *Proteolipid-Protein* (ZNS) oder *Somatostatin* (Pankreas, Gastro-Intestinaltrakt) in DZ detektieren. Im direkten Vergleich mit mTEZ fiel jedoch die Expression der meisten Antigene in DZ deutlich schwächer aus.

Der Terminus pGE beschreibt ein evolutionär konserviertes transkriptionelles und translationelles Expressionsmuster, in welchem Gene weitestgehend unabhängig von ihrer peripheren lokalen, temporären oder geschlechtsspezifischen Regulation exprimiert werden. So wird beispielsweise die Expression fötaler Antigene in mTEZ bis ins adulte Stadium fortgesetzt, präpubertäre Mäuse exprimieren schwangerschaftsassoziierte Antigene und man findet geschlechtsrestringierte Antigene in mTEZ aus Tieren des jeweils anderen Geschlechts (Derbinski *et al.*, 2001). Dabei repräsentieren die im Zuge der pGE transkribierten Gene nahezu jedes periphere Gewebe. Schätzungen aufgrund der Auswertung von *gene array*-Analysen, gehen davon aus, dass 5-10% des Transkriptoms eines Individuums im Thymus repräsentiert sind, was einer Anzahl von ungefähr 3000 Genen entspricht (Kyewski und Derbinski, 2004).

Nachdem mTEZ als der für die pGE spezialisierte Zelltyp identifiziert worden waren, begannen Spekulationen über die zellulären Regulationsmechanismen, die diesem Phänomen zugrunde liegen. Aktuell versuchen zwei konträre Modelle, die Komplexität der pGE entwicklungsbiologisch zu erklären: das "terminale Differenzierungsmodell" und das "progressive Restriktionsmodell".

Das von Derbinski und Kyewski vorgeschlagene "terminale Differenzierungsmodell" geht davon aus, dass die Anzahl der promisk exprimierten Gene auf Einzelzellebene im Zuge einer mTEZ-Reifung zunimmt. Als Reifungsmarker wurden in diesem Zusammenhang die CD80- und MHC-Klasse II-Expression vorgeschlagen, basierend auf der Beobachtung, dass mTEZ im Hinblick auf beide Marker eine heterogene Population darstellen (Farr *et al.*, 2002; Gray *et al.*, 2002 + 2006). In der Tat konnten Derbinski und Kollegen eine enge Korrelation der CD80-Expression mit der Diversität und Quantität der pGE nachweisen (Derbinski *et al.*, 2005; Gäbler *et al.*, 2007). Entsprechend ihrem "reifen" Entwicklungsstadium zeigten CD80<sup>hoch</sup>-exprimierende mTEZ die größte Heterogenität bezüglich der Expression peripherer,

gewebespezifischer Gene, während in CD80<sup>niedrig</sup>-exprimierenden mTEZ nur ein eingeschränktes Repertoire exprimiert wurde. In ähnlicher Weise konnten Gray und Kollegen die Abhängigkeit der pGE von der MHC II-Expression demonstrieren (Gray *et al.*, 2006).



Abb. 3: Gegensätzliche Modellvorstellungen zur Regulation der promisken Genexpression in mTEZ. A) Das terminale Differenzierungsmodell: Die Promiskuität der Expression gewebespezifischer Antigene nimmt ebenso wie die AIRE-Expression im Zuge der mTEZ-Reifung und -Differenzierung auf Einzelzell- und Populationsebene zu, ausgehend von einer unreifen, FoxN1-exprimierenden epithelialen Vorläuferzelle. Als Reifungsmarker werden CD80 und MHC II-Komplexe gewertet. Farbige Kreise repräsentieren das Spektrum der pGE. B) Das progressive Restriktionsmodell: Vor der Differenzierung exprimieren (multipotente) Voräuferzellen ein breites Spektrum gewebespezifischer Antigene, repräsentativ für multiple periphere Zellschicksale. Während der Differenzierung werden selektiv einzelne transkriptionelle Programme abgeschaltet, was dazu führt, dass das Expressionsmuster individueller entdifferenzierter mTEZ dem Expressionsmuster determinierter peripherer Zellen ähnelt. AIRE würde in diesem Fall eine frühe Rolle bei der Festlegung des transkriptionellen Programms zukommen. Das "progressive Restriktionsmodell", welches von Farr und Kollegen postuliert wurde, impliziert hingegen, dass reife mTEZ ein restringiertes, Zelltyp-spezifisches Genexpressionsmuster aufweisen, welches die Genexpression differenzierter peripherer Zellen imitiert. Demnach wären lediglich die multipotenten Vorläuferzellen in vollem Umfang zur pGE befähigt (Farr *et al.*, 2002).

Eine kürzlich veröffentlichte Analyse der Transkription repräsentativer Gene auf Einzelzellebene mittels Echtzeit-PCR unterstützt das "terminale Differenzierungsmodell", da gezeigt wurde, dass individuelle mTEZ verschiedene Gene koexprimieren, die in der Peripherie von unterschiedlichen Zelltypen exprimiert werden (Derbinski *et al.*, 2008).

Über die Regulation der pGE auf molekularer Ebene ist nur wenig bekannt. Der einzige beschriebene Faktor, der in direkter Weise die promiske Expression unterschiedlicher Gene beeinflusst, ist der <u>autoimmune regulator</u> (AIRE) (Anderson *et al.*, 2002).

Obwohl AIRE ursprünglich als der für die Entstehung der seltenenen humanen Autoimmunstörung APECED (<u>autoimmune polyendocrinopathy, candidiasis and ectodermal dystrophy</u>) verantwortliche Genlokus identifiziert wurde, basieren heutige Erkenntnisse bezüglich seiner Wirkungsweise maßgeblich auf der Analyse des Tiermodells (Aaltonen *et al.*, 1997). Interessanterweise war die intrathymische Expression vieler -wenngleich nicht aller- gewebespezifischer Autoantigene durch mTEZ in AIRE-defizienten Mäusen stark reduziert oder nicht nachweisbar, was direkt mit dem Auftreten von autoimmunen Läsionen der entsprechenden peripheren Organe korrelierte (Ramsey *et al.*, 2002). Ein prominentes Beispiel für ein strikt AIRE-abhängiges Ag ist Insulin, was unter anderem die lymphozytäre Infiltration des Pankreas in AIRE<sup>-/-</sup>-Mäusen erklärt.

Weiterführende immunhistochemische Untersuchungen erbrachten den Nachweis, dass posttranslationelles AIRE-Protein ausschließlich im Nukleus lokalisiert ist, was zu der Vermutung führte, es handele sich bei AIRE um einen Transkriptionsfaktor, der als *cis*-regulatorisches Element in direkter Weise die pGE beeinflusst. So beschreiben aktuelle Studien tatsächlich eine Funktion von AIRE bei der RNA-Polymerase II-vermittelten Elongation von promisk exprimierten Genprodukten, basierend auf der Rekrutierung des *polymerase transkription- and elongation factor b* (P-TEFb) (Oven *et al.*, 2007).

Neben AIRE-abhängigen Genen wurde auch eine Reihe von AIRE-unabhängig exprimierten Autoantigenen beschrieben, über deren transkriptionelle Regulation wenig bekannt ist. Es wird vermutet, dass diese Autoantigene einer polygenetischen Regulation unterliegen, da kein Krankheitsbild bekannt ist, welches sich speziell auf die Expression AIRE-unabhängiger Gene zurückführen lässt. Eine funktionelle Redundanz mehrerer Faktoren könnte in diesem Fall das Ausbleiben eines prominenten autoimmunen Phänotyps erklären (Kyewski und Klein, 2006).

Die physiologische Relevanz der promisken Genexpression wurde erstmals deutlich, als Egwuagu und Kollegen über Speziesgrenzen hinweg nachweisen konnten, dass die Anfälligkeit für die Induktion der experimentellen autoimmunen Uveitis (EAU) durch die Expressionsstärke von relevanten Modellantigenen (retinales S-Antigen, inter-photoreceptor binding protein (IRBP)) im Thymus bestimmt wird. EAU-suszeptible Stämme von Maus und Ratte wiesen stets eine geringere intrathymische Expression auf als resistente Stämme. Auch in Rhesusaffen korrelierte die relative Expression der fraglichen Antigene im Thymus eng mit der Manifestation der autoimmunen Entzündungsreaktion (Egwuagu et al., 1997). Klein und Kollegen konnten schließlich zeigen, dass die ektopische Expression des humanen C-reaktiven Proteins (hCRP) in vereinzelten, bestrahlungsresistenten Zellen der Medulla zur vollständigen Deletion von hCRP-spezifischen TZR-transgenen TZ in vivo führt (Klein et al., 2001). Damit konnte die hCRP-Expression eindeutig mTEZ zugordnet werden. Ebenso demonstrierten Derbinski und Kollegen anhand der Transplantation von Wildtyp-Thymi in thymektomierte knock out-Mäuse, dass die Expression des Akutphase Proteins SAP in mTEZ ausreicht, um CD4<sup>+</sup> TZ gegenüber diesem Leber-spezifischen Ag zu tolerisieren (Derbinski et al., 2001).

Die Bedeutung der pGE durch mTEZ als lokale "Ag-Quelle" für die zentrale Toleranzinduktion ist mittlerweile unbestritten. Unklar ist jedoch weiterhin, welche Zellen für die Prozessierung und Präsentation mTEZ-abgeleiteter Antigene und somit für die unmittelbare Selektion des TZ-Repertoires verantwortlich sind.

#### 1.6 Die tolerogene Antigen-Präsentation im Thymus

Der Umfang der zentralen Toleranz wird bestimmt durch die Diversität des Peptidrepertoires, das unreifen Thymozyten durch APZ des Thymus MHC-vermittelt präsentiert wird. Dieses Repertoire besteht einerseits aus dem Transkriptom der unterschiedlichen APZ, zu denen kortikale und medulläre TEZ ebenso zählen wie BZ, MΦ und DZ hämatopoetischen Ursprungs. Andererseits können Selbstantigene über die Zirkulation in den Thymus gelangen (entweder in löslicher Form oder in Assoziation mit immigrierenden Zellen), wo sie insbesondere durch DZ der Medulla aufgenommen, prozessiert und präsentiert werden (Klein *et al.*, 2001).

Bereits in frühen Studien der Gruppe um van Meerwijk und MacDonald konnte gezeigt werden, dass die negative Selektion durch hämatopoetische Zellen für die Deletion von bis zu fünfzig Prozent der positiv selektionierten TZ verantwortlich ist (Van Meerwijk *et al.*, 1997).

Der relative Beitrag des Thymusepithels zur negativen Selektion wurde hingegen lange Zeit kontrovers diskutiert. Erste Hinweise auf eine direkte Beteiligung von TEZ an der tolerogenen Präsentation endogener Antigene stammen aus Transferexperimenten, in denen CD4<sup>+</sup> TZ aus MHC Klasse II-defizienten Mäusen in syngene BL/6 Wildtyp-Mäuse übertragen wurden. Stammten die TZ aus Spendertieren, die MHC Klasse II-Komplexe weder auf hämatopoetischen noch auf bestrahlungsresistenten Thymusstromazellen exprimierten, induzierten sie in den Empfängern eine akute *graft versus host* (GvH)-Reaktion. TZ aus Chimären, die MHC-Komplexe exklusiv auf Epithelzellen exprimierten, waren hingegen tolerant gegenüber dem Gewebe der Empfängertiere (Laufer *et al.*, 1999; Van Meerwijk und MacDonald, 1999).

Weitere Untersuchungen ergaben, dass auch ektopisch exprimierte GSA von Epithelzellen autonom präsentiert werden. So konnten Klein und Kollegen im Rahmen der bereits erwähnten Studie (siehe Abschnitt 1.5) anhand des transgenen *neo*-Selbstantigens hCRP zeigen, dass die Deletion von Ag-spezifischen CD4<sup>+</sup> TZ nicht zwangsläufig von der (indirekten) Präsentation des Antigens durch hämatopoetische Zellen abhängt. Vielmehr schien in diesem Fall die Expression und (direkte) Präsentation des löslichen Akutphaseproteins hCRP durch vereinzelte Epithelzellen für die negative Selektion des spezifischen TZR ausreichend zu sein (Klein *et al.*, 2001).

Beschränkte sich die transgene hCRP-Expression allerdings auf die Leber, so war die intrathymische Deletion stringent an die Ag-Präsentation durch hämatopoetische APZ gekoppelt. Diese Beobachtung deutete darauf hin, dass mTEZ, verglichen mit DZ, extrazelluläres Ag *in situ* lediglich ineffizient aufnehmen und präsentieren, wenngleich *in vitro* gezeigt werden konnte, dass sie in Gegenwart hoher Ag-Konzentrationen grundsätzlich hierzu in der Lage sind (Volkmann *et al.*, 1998; Merkenschlager *et al.*, 1999).

Vor dem Hintergrund dieser Befunde postulierten Klein und Kyewski das Modell der "Arbeitsteilung", welches davon ausgeht, dass mTEZ und hämatopoetische APZ weitestgehend komplementäre Ag-Repertoires präsentieren (Abb. 4; Klein und Kyewski, 2000). Demnach umfasst das Ag-Repertoire der myelogenen APZ des Thymus hauptsächlich Antigene des "hämatopoetischen Selbst", bestehend aus löslichen Komponenten der Zirkulation und ihrem endogenen Proteom.

MTEZ hingegen repräsentieren aufgrund der promisken Expression gewebespezifischer Antigene das "nicht-hämatopoetische" oder "parenchymale Selbst".

Mittlerweile konnte in zahlreichen Studien demonstriert werden, dass die promiske Expression eines GSA in mTEZ hinreichend für eine effiziente Deletion autoreaktiver TZ ist (Smith *et al.*, 1997; Klein *et. al.*, 1998; Avichezer *et al.*, 2003). Untersuchungen des Expressionsmusters ergaben jedoch, dass sich die Expression der meisten GSA auf wenige Stromazellen der Medulla (und seltener auch des Kortex) beschränkt. Wie aus Einzelzell-

PCR Analysen und immunhistochemischen Proteinfärbungen hervorgeht, wird ein definiertes Ag sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene von lediglich einem bis fünf Prozent aller mTEZ exprimiert (Derbinski *et al.*, 2001 und 2008; Avichezer *et al.*, 2003; Cloosen *et al.*, 2007).



<u>Abb. 4:</u> "Arbeitsteilung": DZ und mTEZ präsentieren komplementäre Ag-Repertoires. DZ zeigen eine hohe Effizienz in der Aufnahme und Präsentation extrazellulärer Antigene (symbolisiert durch farbige Kreise), die über die Zirkulation in den Thymus gelangen. Demgegenüber repräsentiert das Ag-Repertoire, welches von mTEZ und kTEZ präsentiert wird, weitestgehend das eigene Transkriptom, was insbesondere im Falle von mTEZ eine Vielzahl peripherer GSA einschließt. DZ induzieren demnach vornehmlich Toleranz gegenüber Bestandteilen des hämatopoetischen Systems (BZ, TZ, MΦ, lösliche Serumkomponenten), während mTEZ durch pGE für die Toleranzinduktion gegenüber Proteinen des peripheren "parenchymalen Selbst" prädestiniert erscheinen. Die Präsentation diverser, komplementärer Antigen-Repertoires durch DZ (repräsentativ für hämatopoetische APZ) und mTEZ sollte ein Maximum an Selbst-Repräsentation im Thymus sicherstellen. (BG: Blutgefäß)

Diese Befunde werfen die Frage auf, wie eine effiziente Toleranzinduktion mit der restriktiven Expression eines spezifischen Antigens durch vereinzelte Stromazellen vereinbar ist. Als mögliche Erklärung wurden zwei Modelle vorgeschlagen, die sich jedoch nicht gegenseitig ausschließen (Klein und Kyewski, 2000): das "*scanning*"-Modell und das Modell des "*antigen spreading*".

Geht man davon aus, dass die Präsentation der GSA auf die seltenen, exprimierenden mTEZ limitiert ist, wäre das intensive Absuchen der Stromazellen (*scannen*) durch Thymozyten Voraussetzung einer effizienten Toleranzinduktion (Witt *et al.*, 2005a und 2005b). Interessanterweise ergaben Studien zur Mobilität und dem Migrationsverhalten reifer TZ im Lymphknoten, dass eine einzige DZ von bis zu 5000 TZ pro Stunde auf die

Präsentation ihrer spezifischen Liganden hin "gescannt" werden kann (Miller *et al.*, 2004). Extrapoliert man diese Ergebnisse auf die Interaktion medullärer Thymozyten mit mTEZ, die ein definiertes GSA exprimieren, so kommt man zu dem Ergebnis, dass 1000 mTEZ (was ungefähr einem Prozent aller mTEZ eines murinen Thymus entspricht, s. o.) in der Lage wären, fünf Millionen Thymozyten in der Stunde zu selektionieren. Dies entspräche etwa einem Drittel aller medullären Thymozyten.



Abb. 5: Toleranzinduktion durch seltene, promisk exprimierte Antigene (symbolisiert durch farbige Kreise). A) Das antigen spreading Modell: GSA werden von mTEZ auf umliegende APZ (hauptsächlich DZ) übertragen. Denkbar ist ein Ag-Transfer durch Aufnahme von apoptotischem Material, Transfer von Exosomen, Zell-/Zell-Verbindungen in Form von gap junctions oder die Trogozytose von membranständigen Proteinen. Die Effizienz der Präsentation solcher Antigene durch DZ wäre somit abhängig von deren Prozessierungskapazität sowie ihrer Entfernung von der Ag-Quelle. B) Das scanning Modell: Eine effiziente Selektion erfordet das serielle "Abtasten" einer möglichst großen Auswahl unterschiedlicher Peptidfragmente. Hochaffine Interaktionen mit verschiedenen medullären APZ können sowohl zur negativen Selektion als auch zur Induktion von Tregs führen.

MHC Klasse II<sup>hoch</sup>-/CD80<sup>hoch</sup>-exprimierende, reife mTEZ, deren Anzahl im Thymus auf etwa 30000 geschätzt wird, zeigen die höchste Diversität in der Expression gewebespezifischer Antigene (Gäbler *et al.*, 2007). Die Selektion von 1,5 x 10<sup>7</sup> Thymozyten durch diese mTEZ-Subpopulation würde demnach 90 Stunden oder etwa 4 Tage in Anspruch nehmen, was mit der durchschnittlichen Verweildauer von Thymozyten in der Medulla von 5-10 Tagen vereinbar ist (Scollay und Godfrey, 1995; McCaughtry *et al.*, 2007).

Das *"antigen spreading"*-Modell postuliert den konstitutiven Ag-Transfer von mTEZ auf hämatopoetische APZ innerhalb der medullären Mikroumgebung, wie er bereits 1994 von Kyewski und Kollegen am Beispiel der Verbreitung der α-Kette des MHC Klasse II (I-E)-

Komplexes demonstriert wurde (Humblet *et al.*, 1994). Die Kreuzpräsentation der Antigene durch hämatopoetische APZ würde demnach die Anzahl der Zellen, die ein definiertes GSA präsentieren und somit die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion mit Ag-spezifischen Thymozyten deutlich erhöhen. Unterstützt wird das *"antigen spreading"*-Modell durch zwei unabhängige Studien. So konnte zunächst am Beispiel des *neo*-Autoantigens <u>hen egg</u> *lysozyme* (HEL) demonstriert werden, dass die Sekretion eines Protein zu einer robusteren Toleranzinduktion führt als die Expression der membrangebundenen Form (Zhang *et al.,* 2003). Unter der Annahme, dass die sekretierte Variante eines Proteins effizienter auf hämatopoetische APZ übertragen und von diesen kreuzpräsentiert wird, entsprechen diese Befunde den Vorhersagen des *"antigen spreading"*-Modells.

In einer weiteren Studie wurde die negative Selektion Ovalbumin-spezifischer TZRtg-Thymozyten durch eine membrangebundene Form von Ovalbumin (OVA) untersucht, deren Expression durch den Ratten-Insulin-Promotor kontrolliert wurde. Gallegos und Bevan konnten zeigen, dass DZ sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> Thymozyten deletieren können, obwohl die intrathymische OVA-Expression durch den Ratten-Insulin-Promotor auf mTEZ beschränkt war. Dies setzt voraus, dass OVA von mTEZ auf DZ übertragen und von letzteren kreuzpräsentiert wurde (Gallegos und Bevan, 2004). Bemerkenswerterweise waren mTEZ jedoch auch autonom imstande, OVA zu präsentieren und auf diese Weise OVAspezifische CD8<sup>+</sup> Thymozyten zu deletieren.

Die hier vorgestellten Studien lassen somit folgende Schlussfolgerungen zu: zum einen präsentieren mTEZ endogene Antigene autonom und können auf diese Weise negative Selektion vermitteln. Zum anderen werden mTEZ-abgeleitete Antigene von hämatopoetischen APZ kreuzpräsentiert, wodurch ebenfalls eine effiziente Deletion Agspezifischer Thymozyten gewährleistet wird.

Die Aussagekraft dieser Ergebnisse hinsichtlich der Expression und Präsentation nativer GSA in Wildtyp-Mäusen ist jedoch umstritten, da die pGE in allen verfügbaren funktionellen Studien durch die transgene Expression von *neo*-Selbstantigenen simuliert wurde. Dies erschwert die Interpretation der Resultate, da bislang nicht bekannt ist, ob die Expression eines Transgens unter der Kontrolle eines speziesfremden Promotors mit dem Expressionsmuster eines nativen GSA vergleichbar ist. Denkbar wäre einerseits eine unterschiedliche Frequenz Transgen-exprimierender mTEZ auf Populationsebene, bedingt durch eine veränderte transkriptionelle oder epigenetische Regulation der Expression des Transgens im Genom dazu führen, dass sich die Expressionsstärke auf Einzelzellebene deutlich von der Expression eines nativen GSA unterschiedet.

Da sowohl die Frequenz der APZ, die ein definiertes Ag präsentieren, als auch die Epitopdichte auf Einzelzellebene entscheidende Parameter der TZ-Selektion sind, können Variationen in Qualität und Quantität der Expression zu einer Fehlinterpretation der Resultate führen.

Diese limitierenden Faktoren lassen sich durch eine direkte Analyse der Präsentation nativer GSA *ex vivo* umgehen.

### 1.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Zu Beginn dieser Arbeit war unklar, ob und in welchem Ausmaß die autonome Präsentation endogener, nativer GSA durch mTEZ einerseits und die Kreuzpräsentation durch DZ andererseits zur negativen Selektion Ag-spezifischer Thymozyten beitragen.

Aus diesem Grund sollte die Präsentation von endogenen MHC Klasse I- und Klasse IIrestringierten Antigenen durch mTEZ und Thymus-DZ *ex vivo* mittels Kokultur mit naiven, Ag-spezifischen TZ näher untersucht werden. Anhand der Intensität der Lymphoproliferation sollte die Frequenz der mTEZ, die ein definiertes endogenes Ag *in situ* präsentieren, abgeschätzt werden. Darüber hinaus sollte analysiert werden, ob es sich bei der Kreuzpräsentation von mTEZ-abgeleiteten Antigenen durch Thymus-DZ um ein konstitutives Phänomen handelt. Da Thymus-DZ eine heterogene Zellpopulation darstellen, sollten weitere Experimente klären, welche DZ-Subpopulation für die Kreuzpräsentation von mTEZabgeleiteten GSA verantwortlich ist.

Ziel dieser Untersuchungen war eine Definition der qualitativen (werden Antigene unterschiedlicher zellulärer Kompartimente differentiell präsentiert?) und quantitativen (wie hoch ist der Anteil der Ag-präsentierenden Zellen an der Gesamtpopulation?) Beteiligung von mTEZ und Thy-DZ an der negativen Selektion GSA-spezifischer Thymozyten.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

#### Tab.1: Übersicht der verwendeten Chemikalien

Bezugsquelle
Riedel-de Haën
Sigma
Sigma
Sigma
Riedel-de Haën
Roth
PAA
J.T. Baker
Invitrogen / Gibco
Sigma
Amersham
Riedel-de Haën
Merck
Sigma
Fluka
Merck
J.T. Baker
Roth
Sigma
Merck
Axis-Shield
PAA
Amersham
Ambion

Chemikalie	Bezugsquelle
Szintillationslösung Opti Fluor <sup>®</sup> O	Packard
Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris, Trizma <sup>®</sup> Base)	Sigma
Trypanblau	Merck
Tween 20 (10%)	Gerbu

#### 2.1.2 Puffer und Lösungen

Alle Lösungen wurden mit deionisiertem und autoklaviertem Wasser hergestellt. Prozentangaben beziehen sich, sofern nicht anders vermerkt, auf das Gewicht pro Volumeneinheit (w/v).

#### Allgemein:

DEPC-Wasser (RNase-frei)
0,1% DEPC in H<sub>2</sub>O
(Lösung durch kräftiges Schütteln, anschließend ü.N. unter einem Abzug inkubieren und autoklavieren)

#### PBS

136 mM NaCl 2,56 mM KCl 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,76 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,2–7,4

## *Tail-*Puffer 50 mM Tris/HCL, pH 8,0 100 mM EDTA 10 mM NaCL 1% SDS 0,5 mg/ml Proteinase K (frisch zugeben)

NaCI-Lösung konzentriert ≥ 5M NaCI

Agarose-Gelelektrophorese:

**TAE-Puffer** 40 mM Tris/Acetat 1 mM EDTA pH 7,5–8,0

#### Agarose-Gel

1,5% Agarose in 100 ml TAE 3 μl Ethidiumbromid (10 mg/ml)

#### Isolierung primärer muriner Zellen:

#### Kollagenase-Lösung (Thymus)

0.2 mg/ml Kollagenase Typ IV10 mM HEPES2% Fötales Kälberserum (FKS; v/v)in RPMI 1640-Medium, pH 7.2-7.4

#### Kollagenase-Lösung (Milz)

0.2 mg/ml Kollagenase Typ IV 10 mM HEPES 5% FKS (v/v) 25 μg/ml DNase in RPMI 1640-Medium, pH 7.2-7.4

#### Percoll-Stammlösung

9 Teile Percoll (ρ=1.13 g/cm3) 1 Teil 10 x RPMI/HEPES (ρ=1.00 g/cm3) ergibt ρ=1.117 g/cm3

#### Trypanblau

0.2% Trypanblau (w/v) 150 mM NaCl pH 7.0

#### FACS-Puffer

3% FKS (v/v) 0.1% NaN<sub>3</sub> in PBS, pH 7.2-7.4

#### Waschpuffer

5% FKS (v/v) 5 μg/ml DNase in PBS, pH 7.2-7.4

#### Kollagenase-Dispase-Lösung

0.2 mg/ml Kollagenase Typ IV 0.2 mg/ml Dispase Grade I 25 μg/ml DNase I 10 mM HEPES 2% FKS (v/v) in RPMI 1640-Medium, pH 7.2-7.4

#### **Trypsin-Lösung**

0.05% Trypsin (v/v) 0.5 mM EDTA 0.3% BSA (w/v) 50 µg/ml DNase in PBS, pH 7.2-7.4

#### Nycoprep<sup>™</sup>-Stammlösung

1 Teil Nycoprep (ρ=1.31 g/ml) 1 Teil 20 mM Trizin-NaOH (pH 7,4) ergibt ρ=1.155 g/ml

#### MACS-Puffer

0.5% BSA (v/v) 5 mM EDTA in PBS, pH 7.2-7.4

#### EDTA / PBS 25 mM EDTA

in PBS, pH 7,4

### Lysepuffer 155 mM NH<sub>4</sub>Cl 10 mM KHCO<sub>3</sub> 100 mM EDTA, in PBS, pH 7,4

#### Lymphoproliferationstest:

#### <sup>3</sup>H-[Tdr]-Stammlösung

10% <sup>3</sup>H-[Tdr]-Stocklösung (v/v) in HL-1 Medium, pH 7,2-7,4

#### 2.1.3 Zellkulturmedien

Zellpräparation: RPMI 1640 Medium (PAA)

RPMI 1640 Medium (pH 7.2-7.4) 2% FKS (v/v) 10 mM HEPES 2 mM Glutamin 50 µM 2-Mercaptoethanol 50 µg/ml Streptomycin 50 U/ml Penicillin Serumfreies RPMI 1640 Medium

(gleiche Zusätze wie RPMI-1640 Medium, aber ohne FKS)

#### Lymphoproliferationstest, Kultivierung von T-Zelllinien:

HL-1 Medium (Cambrex)

#### HL-1 Medium

5% FKS (v/v) 10 mM HEPES 2 mM Glutamin 50 μM 2-Mercaptoethanol 50 μg/ml Streptomycin 50 U/ml Penicillin in HL-1, pH 7.2-7.4

#### Serumfreies HL-1 Medium

(gleiche Zusätze wie HL-1 Medium, aber ohne FKS)

### 2.1.4 Antikörper und Zweitreagenzien

Antigen / Epitop	Klon	Spezies / Isotyp	Konjugat	Referenz / Firma
CD4	H129.19	Ratte IgG2a	FITC	BD
CD4	H129.19	Ratte IgG2a	biotinyliert	BD
CD8a	53-6.7	Ratte IgG2a	PE	BD
CD11c	HL3	Hamster IgG1	PE	BD
CD11c	HL3	Hamster IgG1	biotinyliert	BD
CD24 (HSA)	M1/69	Ratte IgG2b	PE	BD
CD45	30-F11	Ratte IgG2b	PE	BD
CD45	30-F11	Ratte IgG2b	PerCP	BD
CD80	16-10A1	Hamster IgG2	PE	BD
CD86	GL1	Ratte IgG2a	PE	BD
F4/80	CI:H3-1	Ratte IgG2b	Alexa 488	Serotec
Ly 51 (BP-1 Antigen)	6C3	Ratte IgG2a	FITC	BD
gp40 (EpCAM)	G8.8	Ratte IgG2b	Alexa 647	Farr et al., 1991
MHC Klasse II (I-A / I-E)	2G9	Ratte IgG2a	PE	BD
MHC Klasse II (I-A <sup>d</sup> )	AMS-32.1	Maus IgG2b	PE	BD
MHC Klasse II (I-A <sup>b</sup> )	AF6-120.1	Maus IgG2a	Alexa 488	BD / Dr. Janna Arnold, DKFZ Heidelberg
mPDCA1	JF05-1C2.4.1	Ratte IgG2b	PE	Miltenyi Biotec
FcR (FcγIII/IIR)	2.4G2	Ratte IgG2b	Kulturüberstand	AG Altevogt, DKFZ Heidelberg
Biotin (Streptavidin)			Alexa 488	BD
			PerCP	BD
			APC-Cy7	BD
CD11c-Microbeads	N418	Hamster IgG		Miltenyi Biotec
CD45-Microbeads	Ly5	Ratte IgG2b		Miltenyi Biotec
sav-Microbeads				Miltenyi Biotec

Tab. 2: Primär- und Sekundärantikörper für durchflußzytometrische Analysen und Zellsortierung
## 2.1.5 Enzyme, sonstige Proteine und Peptide

Bezeichnung	Bezugsquelle
BSA	Sigma
BSA, azetyliert (50 mg/ml)	Invitrogen
Dispase Grade I	Roche
DNase (für Kollagenase / Dispase-, Kollagenase (Milz)- und	
Trypsinlösung	ICN
DNase I (1 U/µI) mit 10x Puffer und 25 mM EDTA	Invitrogen
FKS	Biochrom
Kollagenase Typ IV	CellSystems
Proreolipid-Protein	Vincent Tuohy,
Proteinase K	Merck
RedTaq <sup>™</sup> DNA-Polymerase (1 U/µI) mit 10x Puffer	Sigma
RNase Η (2 U/μl)	Promega
Rattenserum	DKFZ Heidelberg
RNasin (40 U/µl)	Promega
Superaseln (20 U/µl)	Ambion
Superscript II (Reverse Transkriptase (200 U/µI) mit 5x Puffer und	
100 mM DTT	Invitrogen
Ovalbumin	Sigma
T4gp32	USB
T7 RNA-Polymerase (HC, 80 U/µl)	Promega
Trypsin (2,5%)	ICN
Uracil-DNA Glycosylase (1 U/µl)	Eurogentec

Synthetische Peptide : (Hergestellt von der Peptidsyntheseeinheit, DKFZ Heidelberg)

 $\textbf{OVA}_{\textbf{323-339}} \textbf{:} \quad \textbf{ISQAVHAAHEINEAGR} - \textbf{NH}_2$ 

**P1A**<sub>35-43</sub>: L P Y L G W L V F – NH<sub>2</sub>

**PLP**<sub>239-250</sub>: LFIAAFVGAAAT-NH<sub>2</sub>

## 2.1.6 Oligonukleotide, Nukleotide und Nukleinsäuren

Die Primer-Paare für konventionelle PCR und RT-PCR wurden von der zentralen Oligonukleotid-Syntheseeinheit des DKFZ Heidelberg hergestellt. Alle für die Echtzeit-PCR verwendeten Primer-Paare wurden von der Firma MWG Biotech AG in *high purity salt free* (HPSF)-Qualität bezogen.

#### DNA-Primer zur Genotypisierung von Mausstämmen:

#### FoxN1-eGFP

(whn-eGFP fwd) forward:	5` - GTC CCT AAT CCG ATG GCT AGC TC – 3`
(whn-eGFP rev) <i>reverse</i> :	5` - GTG CAG ATG AAC TTC AGG GTC– 3`

## L<sup>d</sup>-nOVA

(OVA PLGE2) forward:	5' - TCA ATA CTG TCT CCG AAT CCT G – 3'
(BGS 21`) reverse:	5` - CTC TGC TAA CCA TGT TCA TGC– 3`

#### P1A-knock out

(IVO 49) forward:	5` - GAA ACT ATG CAA AAC ACG CCG – 3`
(IVO 50) reverse (KO):	5` - TTA GCA GCC TTA CCT CTC CC – 3`
(IVO 51) reverse (WT):	5` - CCT TTC CTG CTG ATT TTG GG – 3`

#### TCR P1A transgenic

(Vα 8) forward:	5` - GAA TTC ATG CGT CCT GGC ACC TGC – 3`
(Jα10) reverse:	5` - ACC AGC AAT CGA GTC CCA CTT CCA– 3`
(Vβ 1) <i>forward</i> :	5` - GAA TTC ATG AGC TGC AGG CTT CTC – 3`
(Jβ1.2) <i>reverse</i> :	5` - AAA AGC CTG GTC CCC GAC CGA AG– 3`

#### cDNA-Primer für die konventionelle RT-PCR:

## β-Actin

(Aktβ fwd) <i>forward</i> :	5` - TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA – 3`
(Aktβ rev) <i>reverse</i> :	5` - TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G – 3`

P1A

(P1A fwd) forward:	5` - ATG GGT GCT GGC GCT AAC TGT – 3`
(P1A rev) <i>reverse</i> :	5` - TCT TCT GGG CTT TGC AAC TGC – 3`

## cDNA-Primer für die quantitative Echtzeit-PCR:

Epithelial cell adhesion molec	cule (EpCAM)
(EpCAM fwd) forward:	5` - TTG CTC CAA ACT GGC GTC TA – 3`
(EpCAM rev) reverse:	5` - TCC CAG ACT TGC TGT GAG TCA – 3`
Forkhead-box N1 (FoxN1) / w	vinged helix nude 1 (whn1)
(FoxN1-207F) forward:	5` - CCC ACA GAA CAA GCA TGC TAA CT– 3`
(FoxN1-248R) reverse:	5` - GGC AGT GAG GGT GTC CTC TCT – 3`
Hypoxanthine guanine phosp	<i>horibosyl transferase 1</i> (Hprt 1)
(HPRT fwd) forward:	5` - GCT CGA GAT GTC ATG AAG GAG A – 3`
(HPRT rev) reverse:	5` - AGC AGG TCA GCA AAG AAC TTA TAG C – 3`
Ovalbumin (Ova)	
(Ova fwd) forward:	5` - TGG TGC TGT TGC CTG ATG A – 3`
(Ova rev) <i>reverse</i> :	5` - AAC ATT AGA ACT GGT CCA TTC AGT CA – 3`
Sonde: FA	M – AGT CCG GAA CTC GTC GAA CTC TCA TAT TAG T - TAMRA
Proteolipid protein 1 (DM20)	
(DM20 fwd) forward:	5` - CTT CTA CAC CAC CGG CGC T – 3`
(DM20 rev) reverse:	5` - GTC AGG GCA TAG GTG ATG CC – 3`
Sonde FA	M – CAA ACG TTG CGC TCA GGC CCT T - TAMRA
Proteolipid protein 1 (PLP)	
(PLP fwd) forward:	5` - CCA GAG GCC AAC ATC AAG CT – 3`
(PLP rev) reverse:	5` - GCA TAG GTG ATG CCC ACA AA – 3`
Sonde FA	M – ATG TCC TAG CCA TTT TCC CAA ACA ATG ACA - TAMRA
<i>Ubiquitin C</i> (Ubc)	
(Ubc fwd) forward:	5` - AGC CCA GTG TTA CCA CCA AG – 3`
(Ubc rev) <i>reverse</i> :	5` - ACC CAA GAA CAA GCA CAA GG – 3`
(	

(dT)-T7-Primer für die mRNA-Amplifikation:

Der Primer (Baugh *et al.*, 2001) wurde von der Firma MWG-Biotech AG synthetisiert und sind *HPSF* aufgereinigt.

5'- GCA TTA GCG GCC GCG AAA TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA (T)\_{21} (AGC) -3'

## Nukleotide und Nukleinsäuren:

dNTP-Mix (10 mM) dNTP-Mix (2 mM) Heringsperma-DNA (10 mg/ml) Oligo(dT)20-*Primer* (500 μg/ml) *Random-Hexamer-Primer* (100 μg/ml) MBI Fermentas MBI Fermentas Promega DKFZ Heidelberg Amersham

## 2.1.7 Kits und Standards

Tab. 4: Übersicht über die verwendeten Kits und Standards:

Bezeichnung	Bezugsquelle
Alexa Fluor <sup>®</sup> 647 Protein Labeling Kit	Molecular Probes
AmpliScribe <sup>™</sup> T7 High Yield Transcription Kit	Epicentre
CD8 <sup>+</sup> T cell isolation kit	Miltenyi Biotec
RNase-Free DNase Set	Qiagen
Gene Ruler <sup>™</sup> 100 bp DNA Ladder plus (0,5 µg/µl)	MBI Fermentas
High Pure RNA Isolation Kit	Roche
qPCR <sup>1M</sup> Core Kit for Sybr <sup>1M</sup> -Green I	Eurogentec
qPCR <sup>IM</sup> Core Kit	Eurogentec
SuperScript <sup>™</sup> Double-Stranded cDNA Synthesis Kit	Invitrogen
NucleoSpin <sup>®</sup> Blood Quick Pure	Macherey-Nagel

## 2.1.8 Geräte

Tab. 5: Übersicht über die verwendeten Geräte und Gebrauchsmaterialien:

Bezeichnung	Hersteller
BD FACSCalibur <sup>™</sup> Flow Cytometer	Becton Dickinson (BD)
BD FACSCanto II <sup>™</sup> Flow Cytometer	BD
BD FACSDIVA <sup>™</sup> Cell Sorter	BD
BD FACSVantage <sup>™</sup> SE Cell Sorter	BD
Betaplate <sup>®</sup> 1205	LKB Wallac
Harvester 96®	Tomtec
Feinwaage CD224S	Sartorius
Gelelektrophoresekammer	AGS
GeneAmp <sup>®</sup> 5700 Sequence Detector	Applied Biosystems
GeneAmp <sup>®</sup> 7300 Sequence Detector	Applied Biosystems
Heat Sealer 1295-012	LKB Wallac
Inkubator HeraCell 240	Kendro
Lumi-Imager <sup>™</sup> F1 Workstation	Roche
Magnetrührer MR 2000	Heidolph
Mausschrank Uni Protect	Ehret
Mikroskop Axio Imager <sup>™</sup> .Z1	Zeiss
Mikrowelle	Siemens
Milzsieb	Werkstatt, Feinmechanik DKFZ Heidelberg
PCR-Maschine PTC-0220 DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cycler	MJ Research
pH-Meter pH 720	InoLab
Photometer Gene Quant Pro	Amersham Biosciences
Spannungsgeber (EPS 500/ 400)	Pharmacia
Stereomikroskop nach Greenough	Zeiss
Sterilbank HeraSafe Typ KS12	Kendro
Tischmikroskop AxiostarPlus <sup>1M</sup>	Zeiss
Tischzentrifuge (Biofuge fresco)	Heraeus
Videodrucker (UP890 CE)	Sony
Vortexer Genie 2	Bender und Hobein
Waage TE1502S	Sartorius

Bezeichnung	Hersteller
Wasserbad (Thermomix <sup>®</sup> M)	Braun
Zentrifuge Rotanta 460 R	Hettich

#### 2.1.9 Software

## Tab. 6: Übersicht über die verwendete Software:

Bezeichnung	Hersteller
Adobe Photoshop <sup>™</sup> CS (Bildbearbeitung)	Adobe
AxioVision <sup>®</sup> LE	Zeiss
CellQuest <sup>™</sup> Pro	BD
CellQuest <sup>™</sup> 3.3	BD
FACSDiva <sup>™</sup>	BD
EditSeq 5.06	DNASTAR
FlowJo <sup>™</sup> 6.4.1; 6.4.2	Tree Star
GeneAmp <sup>®</sup> 5700 SDS Software	Applied Biosystems
GeneAmp <sup>®</sup> 7300 SDS Software	Applied Biosystems
GeneJockey <sup>®</sup> Sequence Processor	Biosoft
LumiAnalyst <sup>®</sup> 3.0	Roche
Microsoft Office 2003	Microsoft
MegAlign <sup>®</sup> 5.06	DNASTAR
Primer Express <sup>™</sup> 1.0; 2.0	Applied Biosystems

## 2.1.10 Verbrauchsmaterialien

	Tab. 7: Übersicht	über die verwende	eten Verbrauchsmaterialien
--	-------------------	-------------------	----------------------------

Bezeichnung	Hersteller
ABI PRISM 96-well Optical Reaction Plate und Optical Caps	Applied Biosystems
Bio-Gel-P-6-Säulen	Bio-Rad
Cell-Strainer-Cap-Tubes (5 ml)	BD
Dialyseschläuche	Fisher Scientific

Bezeichnung	Hersteller
Einwegpipetten, steril (alle Größen)	Starlab
Filterspitzen (10 μl und 1000 μl)	ART
Filterspitzen (20 µl und 200 µl)	Nerbeplus
Gaze (PA-60 Nybolt)	Eckert
Glasobjektträger (Histobond)	Marienfeld Laborglas
Kanülen (verschiedene Größen)	BD
MACS <sup>®</sup> LS-Säulen	Miltenyi Biotec
MACS <sup>®</sup> MS-Säulen	Miltenyi Biotec
MicroSpin™ G-50 Säulen	Amersham
Mikroskopische Deckgläschen (22 x 50 mm)	Lankenbrinck
Pasteurpipetten	WU-Mainz
PCR-Reaktionsgefäße (200 µl)	Biozym
Petrischalen (verschiedene Größen)	TPP
Phase Lock Gel <sup>™</sup> Heavy (0.5 ml, PLG)	Eppendorf
Rundbodenröhrchen (25 ml)	Nunc
Safe-Lock Reaktionsgefäße (0.5 ml, 1.5 ml und 2 ml)	Eppendorf
Spritzen (5 ml, 10 ml und 50 ml)	Terumo
Spritzen (1 ml und 2 ml)	BD
Sterilfilter (0.22 µm)	Millipore
Sterilfilter (Steritop <sup>™</sup> )	Millipore
Thermo-Fast <sup>®</sup> 96 Detection Plate	Abgene
Thermo-Fast <sup>®</sup> 96 Loch-Detektion-Platte	Abgene
Zentrifugenröhrchen (15 ml und 50 ml)	TPP
Zellkulturplatten, Flachboden (6-well, 24-well und 96-well)	TPP
Zellkulturplatten, Rundboden (96-well)	TPP
Zellsieb 70 µm	BD

## 2.1.11 Zelllinien

Die PLP-reaktive T Zelllinie TPLP15-5-2 wurde in HL-1 Medium bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> für einen maximalen kontinuierlichen Zeitraum von 6 Monaten propagiert. Alle 3 Wochen erfolgte die Restimulation durch Kokultur mit bestrahlten, syngenen C57BL/6 Milzzellen oder aufgereinigten Dendritischen Zellen (DZ) aus der Milz unter Zugabe von PLP-Gesamtprotein oder des spezifischen Peptids PLP<sub>239-250</sub>. Im Anschluss an die Restimulation wurden die Zellen alle 2-3 Tage für die Dauer von 2 Wochen im Verhältnis 2:1 expandiert.

Die Verwendung in Lymphoproliferationstests erfolgte ausschließlich 3 Wochen nach der letzten Restimulation. Zu diesem Zeitpunkt war keine Eigenproliferation mehr nachweisbar.

## 2.1.12 Mäuse

Wildtyp-Mäuse der Stämme C57BL/6, CB6/F1 und Balb/c wurden von Charles River WIGA bezogen und, soweit nötig, in der Barrierenstation des zentralen Tierlabors (DKFZ Heidelberg) gehalten. L<sup>d</sup>-nOVA-transgene Mäuse (Kawahata et al., 2002) wurden freundlicherweise von Prof. Kazuhiko Yamamoto (University of Tokyo, Japan) zur Verfügung gestellt und in Isolatoren des DKFZ als Inzuchtstamm gezüchtet. Diese Tiere tragen als Transgen ein Fragment, welches die Promotorregion des MHC Klasse I (L<sup>d</sup>)-Allels und die kodierende Region des Ovalbumin-Gens kombiniert. FoxN1-eGFP Mäuse (Bleul et al., 2006) wurden freundlicherweise von Prof. Thomas Boehm (MPI für Immunbiologie, Freiburg) zur Verfügung gestellt und in der Barrierenstation des DKFZ über 6 Generationen auf Balb/c-Hintergrund zurückgekreuzt. Diese Tiere exprimieren das *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) als Transgen unter der Kontrolle des gewebespezifischen FoxN1-Promotors. P1A-*knock out* Mäuse wurden freundlicherweise von Prof. Benoit van den Eynde (Ludwig Institute for Cancer Research, Brüssel) zur Verfügung gestellt und in der IVC-Station des DKFZ gehalten.

DO11.10-TZR transgene Mäuse (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Edgar Schmitt, Mainz) und P1A-TZR-transgene Mäuse (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Anne-Marie Schmitt-Verhulst, Marseille) wurden in Isolatoren und der Barrierenstation des DKFZ als Inzuchtstämme gezüchtet. Die Haltung aller Tiere in den jeweiligen Bereichen erfolgte unter <u>spezifisch pathogenfreien</u> (SPF-) Bedingungen. Soweit nicht anders angegeben, wurden für die Experimente Tiere beiderlei Geschlechts im Alter zwischen 6-12 bzw. 16 (TZRtg-Mäuse) Wochen verwendet.

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

## 2.2.1 Isolierung von RNA aus Einzelzellsuspensionen

Aus sortierten Zellpopulationen oder unsortierten Einzelzellsuspensionen wurde mithilfe des *High Pure RNA Isolation Kits* der Firma Roche die Gesamt-RNA isoliert. Zunächst wurden die Zellen (max. 5 x  $10^6$  / Reaktionsansatz) bei 4000 U/min für 5 Minuten in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet in 200 µl sterilfiltriertem (0,22 µm) PBS aufgenommen. Anschließend wurde nach den Protokollangaben des Herstellers verfahren. Nach einem abschließenden 15-minütigen DNase I-Verdau wurde die RNA mit 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

## 2.2.2 Reverse Transkription

Die cDNA-Synthese erfolgte in 0,5 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf) unter Verwendung einer PCR-Maschine (Thermalcycler). Der eigentlichen cDNA-Synthese ging zunächst ein weiterer DNase-Verdau voraus. Zu diesem Zweck wurden 48 µl der wässrigen RNA-Lösung mit jeweils 6 µl DNase I (1 U/µl) und 10x DNase I-Reaktionspuffer versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der DNase-Verdau durch die Inkubation mit 6 µl EDTA (25 mM) bei 65°C für 10 min gestoppt.

Von den 66 µl Gesamtvolumen des DNase-Verdaus wurden 6 µl für die spätere Kontrolle der vollständigen Degradation genomischer DNA zurückbehalten. Das Restvolumen wurde zur cDNA-Synthese verwendet und zunächst mit 6 µl 10 mM dNTP–Mix (MBI) sowie 6 µl Oligo(dT)<sub>20</sub> (500 µg/ml) versetzt und für 5 min bei 65 °C inkubiert.

Anschließend wurden dem Ansatz 24 µl First-Strand-Puffer (5x), 12 µl DDT (100 mM) und 6 µl SUPERase-In (20 U/µl) hinzugefügt und dieser für 2 min auf die Reaktionstemperatur von 42°C erwärmt. Nach Zugabe von 6 µl Super-Script II Reverse Transkriptase (Invitrogen) erfolgte die cDNA–Synthese bei 42 °C für weitere 60 min, woraufhin die Reaktion durch 15-minütiges Erhitzen auf 70°C abgestoppt wurde.

Nach Abschluss der cDNA-Synthese wurde die Reaktionslösung mit 2 µl RNase H (Promega) versehen und 20 min bei 37°C inkubiert, um die zur cDNA komplementäre RNA zu entfernen. Anschließend wurde der Ansatz mit deionisiertem Wasser auf 200 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Der Erfolg der reversen Transkription sowie des vollständigen Verdaus genomischer DNA wurde durch

eine PCR überprüft. Zu diesem Zweck wurde jeweils 1  $\mu$ l der cDNA-Lösung oder 5  $\mu$ l der DNase I-verdauten RNA mit  $\beta$ -*Aktin* Primern über 40 Zyklen amplifiziert.

## 2.2.3 Isolierung von genomischer DNA aus Schwanzgewebe

Zur Genotypisierung transgener Mäuse wurde zunächst ein 0,5 cm langes Schwanzstück in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) mit 750 µl *Tail*-Puffer versehen und über Nacht bei 56°C inkubiert. Anschließend wurde das Lysat mit 250 µl gesättigter NaCl-Lösung versetzt und mithilfe eines Vortexers gründlich gemischt. Ausgefallene Bestandteile wurden durch 5-minütige Zentrifugation in einer Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 500 µl Isopropanol gefällt. Nach erneuter 5-minütiger Zentrifugation wurde nun das Pellet zweimalig mit 70% Ethanol gewaschen, abzentrifugiert und nach Entfernung des Überstandes bei 50°C für maximal 10 min getrocknet. Abschließend wurde das Pellet mit 200 µl deionisiertem Wasser versetzt und 15 min bei 68°C gelöst.

#### 2.2.4 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die optische Dichte einer jeweiligen zu bestimmenden Lösung wurde photometrisch bei 260 und 280 nm in Quarzküvetten (Pharmacia) bestimmt. Dabei wurden folgende Berechnungen zugrunde gelegt:

Doppelsträngige DNA:	Konz. (µg / µl) = OD <sub>260</sub>	×	0,05	×	Verdünnungsfaktor
Einzelsträngige DNA:	Konz. (µg / µl) = OD <sub>260</sub>	×	0,033	×	Verdünnungsfaktor
Einzelsträngige RNA:	Konz. (μg / μl) = OD <sub>260</sub>	×	0,04	×	Verdünnungsfaktor

## 2.2.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR) und RT-PCR

Der Nachweis von DNA- und cDNA-Sequenzen erfolgte mittels PCR/RT-PCR. Zu diesem Zweck wurden in 200 µl-Reaktionsgefäßen folgende Reaktionsansätze mit einem Endvolumen von 25 µl hergestellt:

- ✤ 5 µl DNA-/cDNA-Lösung
- ✤ 2,5 µl Primer sense (2,5 µM)
- ◆ 2,5 µl Primer antisense (2,5 µM)
- ✤ 2,5 µl dNTP (2 mM)
- ✤ 2,5 µl Reaktionspuffer (10x)
- ✤ 9 µl H<sub>2</sub>O
- ✤ 1 µl RedTaq<sup>®</sup> DNA-Polymerase (1 U/µl)

Für die Analyse von spezifischen cDNA-Sequenzen wurde anhand dieser Reaktionsansätze mithilfe der *Lumi-Imager*<sup>TM</sup> F1-Workstation zunächst der Verdünnungsfaktor bestimmt, unter dessen Berücksichtigung die Amplifikation der cDNA des allgemeinen Haushaltsgens  $\beta$ -*Aktin* für alle Proben ein Signal vergleichbarer Intensität lieferte. Nach entsprechender Vorverdünnung der Proben erfolgte nun die PCR der spezifischen cDNA-Sequenzen nach oben beschriebenem Muster. Dabei wurden, soweit nicht anders beschrieben, folgende Zyklusparameter gewählt (die *annealing*-Temperaturen können Abschnitt 2.1.6 entnommen werden):

- Denaturierung: 3 min bei 94°C
- Denaturierung:
- 1 min bei 94°C 1 min bei 54-62°C
- 35-40 Zyklen

- Annealing:
- Strangverlängerung: 2 min bei 72°C
- Strangverlängerung: 10 min bei 72°C

Von dem entstandenen PCR-Produkt wurden jeweils 10-15 µl auf ein Agarosegel geladen (siehe 2.2.6). Die Genotypisierung anhand der DNA aus Mäuseschwänzen erfolgte nach demselben Schema, jedoch ohne vorherige Angleichung der DNA-Konzentration der unterschiedlichen Proben.

#### 2.2.6 Auftrennung der DNA-Amplifikate in Agarosegelen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 1-1,5-prozentige horizontale Agarosegele mit einem Volumen von 100 ml eingesetzt. Zur Herstellung der Gele wurde eine entsprechende Menge Agarose in 1x TAE-Puffer aufgekocht und mit 3,5 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) pro 100 ml Gelvolumen versetzt. Nach der Polymerisation des Agarosegels erfolgte die Elektrophorese unter konstanter Spannung von 80 bis 100 Volt. Die Auftrennung der DNA wurde an der Lumi-Imager™ F1-Workstation durch eine UV-Expositionszeit von 100-200 ms sichtbar gemacht und das entstandene Bild digital gespeichert.

## 2.2.7 Echtzeit-PCR mit dem GeneAmp® 7300 Sequence Detector

Die vergleichenden, quantitativen Expressionsanalysen verschiedener Gene in Thymusstromazellen und peripheren Dendritischen Zellen wurden mit dem *GeneAmp*<sup>®</sup> 7300 *Sequence Detector* durchgeführt. Die optimalen Primerkonzentrationen wurden in separaten Experimenten ermittelt.

Im Reaktionsvolumen von 25 µl waren enthalten:

- Primerkonzentration: 50–900 nM
- dNTPs: jeweils 200 μM (dATP, dCTP, dGTP) und 400 μM dUTP
- MgCl2: 3 mM
- Sybr Green I (Verdünnung der Stocklösung): 1:66.666
- ✤ Hot GoldStar Polymerase: 0,025 U/µI
- Uracil-DNA Glycosylase (UNG): 0,01 U/µl

Alle PCR–Reaktionen wurden in Triplikatansätzen unter Verwendung folgender Zyklusparameter durchgeführt:

*	UNG-Abbau von Kontaminationen:	2 min bei 50°C	
*	Hot GoldStar Aktivierung:	10 min bei 95°C	•
*	Denaturierung:	15 s bei 95°C	40 Zyklen
*	Annealing und Strangverlängerung:	1 min bei 60°C	

Durch den Abgleich des Schmelzkurvenverlaufs mit den Kurven geeigneter Positivkontrollen wurden unspezifische Amplifikationen von der Auswertung ausgeschlossen. Die relative Quantifizierung der Genexpression erfolgte mittels der  $\Delta\Delta$ Ct–Methode unter Verwendung von  $\beta$ –*Aktin* oder *Ubiquitin* zur Normalisierung (ABI User Bulletin #2; erhältlich unter www.appliedbiosystems.com).

## 2.3 Zellbiologische Methoden

## 2.3.1 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen wurde ein Aliquot einer Einzelzellsuspension mit Trypanblau-Lösung verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer mikroskopisch ausgezählt. Tote Zellen können aufgrund ihrer blauen Färbung ausgeschlossen werden. Die durchschnittliche Anzahl der lebenden Zellen eines Großquadrates (N) wurde anschließend mit dem Verdünnungsfaktor (V) und der Kammerkonstante ( $10^4$ ) multipliziert und ergab so die Anzahl der lebenden Zellen pro ml Ausgangslösung (N x V x  $10^4$  = Zellzahl / ml).

## 2.3.2 Erythrozytenlyse

Einzelzellsuspensionen der Milz wurden pelletiert und nach Abnahme des Überstandes in 1 ml Lysepuffer (RT) pro Milz suspendiert. Nach 60-90 Sekunden wurde die Lyse durch Zugabe von Medium oder PBS im Verhältnis 10:1 abgestoppt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und erneut mit 5 ml Medium oder PBS gewaschen.

#### 2.3.3 Präparation der Antigen-präsentierenden Zellen des Thymus

Für eine Präparation wurden jeweils 10-30 Mäuse durch CO<sub>2</sub> getötet. Die Thymi wurden mithilfe gebogener Pinzetten möglichst unblutig aus dem Thorax entnommen und in Petrischalen mit eisgekühltem RPMI 1640 Medium überführt. Anschließend wurden die Thymi von anhaftendem Fett und Bindegewebe befreit und mit einer Schere zerkleinert. Der Gewebebrei wurde in ein Rundbodenröhrchen überführt, mit Medium auf 10-15 ml aufgefüllt und auf einem Magnetrührer bei Raumtemperatur für 15 min langsam gerührt, um freie Thymozyten auszuwaschen. Der Überstand wurde dekantiert. Die im Überstand enthaltenen Thymozyten wurden für Kontrollexperimente verwendet oder verworfen. Da die präparierten Zellen in den meisten Fällen in Kultur genommen werden sollten, wurden alle nachfolgenden Schritte, die das Öffnen der Reaktionsgefäße erforderten, unter keimarmen Bedingungen an Sicherheitswerkbänken durchgeführt

#### 2.3.3.1 Dendritische Zellen

Um Dendritische Zellen (DZ) aus dem Thymusstroma herauszulösen, wurde ein 15-minütiger Kollagenase-Verdau durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden dem Gewebe etwa 10 ml Kollagenase-Mix zugeführt und im Wasserbad unter Rühren auf 37°C erwärmt. Während dem Verdau wurden die Gewebefragmente mithilfe einer abgebrochenen Pasteurpipette vorsichtig auf- und abpippettiert, um die Dissoziation des Gewebes durch die dabei auftretenden Scherkräfte zu unterstützen. Im Anschluss an den Verdau wurde der Überstand in ein 50 ml-Röhrchen dekantiert und durch Zugabe von 30 ml Medium gewaschen. Der Kollagenase-Verdau wurde insgesamt dreimal nach gleichem Protokoll durchgeführt und die Überstände der einzelnen Verdauschritte vereinigt.

Anschließend wurde das Gewebe mit 10 ml Kollagenase-/Dispase-Mix versetzt und für weitere 25 Minuten auf einem Magnetrührer bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Der Überstand dieses Verdauschrittes wurde mit den Überständen des Kollagenase-Verdaus zur "Rosettenfraktion" vereinigt. Aus dem bislang nicht verdauten Gewebe wurden anschließend die Epithelzellen isoliert (siehe 2.3.3.2).

Die Rosettenfraktion wurde zunächst durch ein Zellsieb (Porenweite 70 µm) in ein frisches 50 ml Zentrifugenröhrchen filtriert, mit RPMI Medium gewaschen und abzentrifugiert (1350 U/min, 5 min, 4°C). Anschließend wurde das Pellet in 10 ml EDTA/PBS (25 mM) resuspendiert und für 5 min bei 37°C inkubiert, um interzelluläre Verbindungen zwischen DZ und Thymozyten zu dissoziieren. Die Dissoziation wurde schließlich durch Zugabe von 40 ml eisgekühltem MACS-Puffer abgestoppt und das Ergebnis mikroskopisch kontrolliert.

#### Anreicherung Dendritischer Zellen durch MACS-Separation:

Zunächst wurden die Zellen abzentrifugiert (1350 U/min, 5 min, 4°C) und in 5 ml MACS-Puffer aufgenommen. Dann erfolgte die Bestimmung der Lebendzellzahl (siehe 2.3.1). Dendritische Zellen lassen sich anhand der Oberflächenexpression des charakteristischen Markers CD11c von anderen Zellen diskriminieren. Zur Anreicherung von CD11c<sup>+</sup> DZ wurde die Konzentration der Zellen mit MACS-Puffer auf 2 x 10<sup>8</sup> / ml eingestellt und CD11c-Microbeads<sup>®</sup> (Miltenyi Biotech) im Verhältnis 1:25 zugegeben, woran sich eine 15-minütige Inkubation bei 4°C anschloss. In der Zwischenzeit wurde die Magnetseparation vorbereitet. Hierzu wurden je nach Zellzahl (die maximale Beladungskapazität ist den Herstellerangaben zu entnehmen) 1-4 *LS*-Säulen in einen *Quadro-MACS*<sup>®</sup>-Magneten eingespannt und mit jeweils 5 ml PBS + 0,5% BSA zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen überschichtet. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension zunächst durch ein Zellsieb (70 µm) filtriert und dann in Portionen zu je 1 ml über die Säulen gegeben, wobei Zellen, die CD11c-Microbeads auf ihrer Oberfläche gebunden hatten, zurückgehalten wurden. Abschließend wurden die Säulen erneut mit 2 x 3 ml MACS-Puffer gespült, bevor die gebundenen Zellen mit 5 ml MACS-Puffer in ein frisches Reaktionsgefäß eluiert wurden. Nach einmaliger Separation wurde auf diesem Wege eine 60-70-prozentige Anreicherung von CD11c<sup>+</sup>-Zellen erzielt. Zur Steigerung der Anreicherungseffizienz wurden die bereits angereicherten Zellen ein weiteres Mal über die MACS-Säulen gegeben, wodurch eine Reinheit von 90-95% erzielt werden konnte.

#### Voranreicherung Dendritischer Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation:

Die Anreicherung Dendritischer Zellen aus den Thymi von Knochenmarkchimären zwecks Analyse der MHC Klasse II-Expression (siehe auch 3.5.7) erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation in Anlehnung an Vremec und Shortman (1997).

Nach Vereinigung der Fraktionen der bisherigen Verdauschritte wurde das Pellet in 5 ml EDTA / PBS aufgenommen und für weitere 5 min unter Rühren bei 37°C im Wasserbad inkubiert, um die interzellulären Verbindungen zwischen TZ und DZ zu lösen. Anschließend wurden die Zellen mit FKS-freiem RPMI-Medium gewaschen, abzentrifugiert und in 10 ml FKS-freiem Medium aufgenommen. Nach der Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen abermals in FKS-freiem Medium gewaschen. Währenddessen wurden aus der isoosmotischen Nycoprep<sup>TM</sup>-Stammlösung und serumfreiem RPMI-Medium (pH 6,5) eine Lösung mit der Dichte  $\rho = 1,077$  g/cm<sup>3</sup> hergestellt.

Das Zellpellett (max. 2 x  $10^8$  Zellen pro Gradient) wurde nun vorsichtig in 10 ml der Nycoprep<sup>TM</sup> -Lösung mit der Dichte  $\rho = 1,077$  g/cm<sup>3</sup> resuspendiert und in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurde der Gradient hergestellt, indem die Zellsuspension mithilfe einer Pasteurpipette vorsichtig mit 10 ml FKS-freiem Medium (pH 7,3) überschichtet wurde. Die Zentrifugation des Gradienten erfolgte bei 1700 x g für 10 Minuten bei 4°C (ohne Bremse). Die Zellen niedriger Dichte (~ 5-10%) wurden mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgesaugt und in ein frisches 50 ml-Röhrchen überführt, in das zuvor FKS-haltiges Medium vorgelegt worden war. Nach erneuter Zentrifugation (1350 U/min, 5 min) wurde das Zellpellett in 5 ml FKS-haltigem Medium aufgenommen, ausgezählt und bis zur Färbung in einem 15 ml-Röhrchen auf Eis gelagert.

#### Färbung der Thymus-DZ:

Im Anschluss an die MACS-Separation wurden die Thymus-DZ (Thy-DZ) als Antigenpräsentierende Zellen (APZ) in Lymphoproliferationstests (siehe 2.3.10) eingesetzt oder mithilfe fluoreszenzgekoppelter Antikörper gefärbt.

Zur Aufreinigung von mRNA wurden die Zellen durchflusszytometrisch sortiert, um eine größtmögliche Reinheit zu erzielen (≥ 98%). Alternativ wurde ebenfalls mittels Durchflusszytometrie die Expression verschiedener Oberflächenmarker analysiert. Die

jeweils verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind zusammen mit den Verdünnungsfaktoren den nachstehenden Tabellen zu entnehmen (Tab. 8 und 9).

Zur Färbung wurden die Zellen zunächst abzentrifugiert, in 0,5 ml anti-Fc-Rezeptor (2.4G2) Kulturüberstand (KÜS) resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Waschschritt in 10 ml FACS-Puffer, woraufhin die Zellen je nach weiterem Verwendungszweck mit verschiedenen Antikörpercocktails gefärbt wurden. Hierzu wurden jeweils 1 x 10<sup>8</sup> Zellen mit 1 ml Antikörpercocktail versehen und für 15 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut in FACS-Puffer gewaschen und in 0,5 ml PBS bis zur Sortierung aufbewahrt Sah das Färbeprotokoll die Verwendung eines Sekundärreagenzes vor, wurde im Anschluss an den Waschschritt wie bei der Inkubation mit dem primären Antikörpercocktail verfahren.

Sortierte Zellpopulation	Antikč	Verdünnungs- faktor	
	Primärreagenz	Sekundärreagenz	
	anti-Ly51-FITC <sup>*</sup>		1:100
	anti-CD11c-PE		1:50
	anti-EpCAM-Alexa647		1:100
	anti-CD45-PerCP		1:100
	anti-CD8α-PE		1:100
CD8α <sup>+</sup> und CD8α <sup>-</sup> Thy-DZ	anti-EpCAM-Alexa647		1:100
	anti-CD11c-biotin		1:50
		streptavidin-APC-Cy7	1:100
	anti-CD45-PE		1:100
EpCAM <sup>+</sup> und EpCAM <sup>-</sup>	anti-EpCAM-Alexa647		1:100
Thy-DZ	anti-CD11c-biotin		1:50
		streptavidin-APC-Cy7	1:100

Tab. 8: Übersicht über die zur Sortierung von Thy-DZ und Thy-DZ-Subpopulationen verwendeten Antikörper

\* Bei der Sortierung von Thymuszellen aus FoxN1-eGFP Mäusen wurde auf die Markierung mit anti-Ly51-FITC verzichtet

Antikörper		Verdünnungsfakor	
Primärreagenz	Sekundärreagenz	_	
anti-CD11c-PE		1:50	
anti-CD11c-biotin		1:50	
anti-CD45-PE		1:100	
anti-CD45-PerCP		1:100	
	streptavidin-APC-Cy7	1:100	
anti-CD4-FITC		1:100	
anti-F4/80-Alexa488		1:100	
anti-I-A <sup>b</sup> -Alexa488		1:500	
anti-CD8α-PE		1:100	
anti-CD24-PE		1:100	
anti-CD80-PE		1:100	
anti-CD86-PE		1:100	
anti-I-A <sup>d</sup> -PE		1:100	
anti-mPDCA1-PE		1:100	
anti-EpCAM-Alexa647		1:100	

Tab. 9: Übersicht über die zur Analyse von Thy-DZ (und Mz-DZ) verwendeten Antikörper

#### 2.3.3.2 Epithelzellen

Nach Dekantierung des Überstandes des ersten Kollagenase-Dispase-Verdaus (siehe 2.3.3.1) wurde das Restgewebe weitere drei- bis viermal mit jeweils 10 ml Kollagenase-Dispase Mix versetzt und erneut unter langsamem Rühren für jeweils 25 min bei 37°C inkubiert. Während jedem Verdauschritt wurde auch hier der enzymatische Verdau durch das vorsichtige Auf- und Abpipettieren mit einer Pasteurpipette unterstützt. In einzelnen Experimenten wurde bislang unverdautes Gewebe im Anschluss an den letzten Kollagenase-Dispase-Verdau ein- bis zweimalig mit Trypsin behandelt, um die Gesamtausbeute an mTEZ zu erhöhen. Diese Verdauschritte wurden ebenfalls für 25 min bei 37°C durchgeführt. War jedoch beabsichtigt, die mTEZ für funktionelle *ex vivo*-Analysen zu verwenden, wurde wegen der Trypsinsensitivität des Kofaktors CD80 auf einen Trypsinverdau verzichtet (Gray *et al.*, 2002).

Nach jedem Verdau wurden die Überstände zunächst einzeln in 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, mit 30 ml RPMI-Medium (inkl. FKS) gewaschen und abzentrifugiert (1350 U/min, 5 min, 4°C). Anschließend wurden die Pellets der einzelnen Fraktionen in jeweils 5 ml Medium aufgenommen, durch ein Zellsieb (70 µm) filtriert und vereinigt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in Abhängigkeit des folgenden Präparationsschrittes (siehe unten) in 10 ml unterschiedlicher Medien aufgenommen und ausgezählt.

Zur Voranreicherung der Epithelzellen kamen im Verlauf der vorliegenden Arbeit zwei verschiedene Verfahren zum Einsatz:

#### Voranreicherung von Epithelzellen mittels Dichtegradientenzentrifugation:

Nach Vereinigung der Fraktionen des Kollagenase-Dispase- (und Trypsin-) Verdaus wurde das Pellet in 10 ml FKS-freiem RPMI-Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden die Zellen erneut in FKS-freiem Medium gewaschen. Währenddessen wurden aus der Percoll-Stammlösung und serumfreiem Medium (pH 6,5) Lösungen mit unterschiedlichen Dichten hergestellt ( $\rho = 1,045 \text{ g/cm}^3$  und  $\rho = 1,07 \text{ g/cm}^3$ ).

Das Zellpellet (max. 5 x 10<sup>8</sup> Zellen pro Gradient) wurde nun vorsichtig in 6 ml der Percoll-Lösung mit der Dichte  $\rho = 1,07$  g/cm<sup>3</sup> resuspendiert und in ein neues 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurde der Gradient hergestellt, indem die Zellsuspension zunächst mithilfe einer Pasteurpipette vorsichtig mit 6 ml der Percoll-Lösung ( $\rho = 1,045$  g/cm<sup>3</sup>) und anschließend mit 6 ml FKS-freiem Medium (pH 7,3) überschichtet wurde.

Die Zentrifugation des Gradienten erfolgte bei 3500 g für 30 Minuten bei 4°C (ohne Bremse). Die einzelnen Sedimentationsschichten (Interphasen) wurden mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgesaugt und in ein frisches 50 ml-Röhrchen überführt, in das zuvor FKShaltiges Medium vorgelegt worden war. Nach erneuter Zentrifugation (1350 U/min, 5 min) wurde das Zellpellett in 5 ml FKS-haltigem Medium aufgenommen, ausgezählt und bis zur Färbung in einem 15 ml-Röhrchen auf Eis gelagert.

#### Voranreicherung von Epithelzellen durch Magnetseparation:

Neben der Anreicherung über einen Dichtegradienten wurden mTEZ im Zuge der vorliegenden Arbeit auch durch Magnetseparation angereichert. Setzt man den Zeit- und Kostenaufwand beider Methoden in Relation, so ist die Magnetseparation für viele Anwendungen die Methode der Wahl, da sie trotz etwas höherer Kosten eine deutlich effizientere Voranreicherung der Epithelzellen gestattet (Faktor: ~30-50; Dichtegradientenzentrifugation: Faktor: ~2-3), was eine enorme Zeitersparnis bei der späteren Zellsortierung bedeutet.

Zur Voranreicherung von Epithelzellen durch Magnetseparation wurden die vereinigten Fraktionen des Kollagenase-Dispase- (und Trypsin-) Verdaus zunächst in 10 ml MACS-Puffer aufgenommen und ausgezählt. Nach der Zentrifugation wurde die Zellzahl mit MACS-Puffer auf 2 x 10<sup>8</sup> /ml eingestellt und *anti-CD45-Microbeads*<sup>®</sup> im Verhältnis 1:40 zugegeben. Es folgte eine 15-minütige Inkubation bei 4°C. Die weiteren Präparationsschritte sind dem unter 2.3.3.1 geschilderten Protokoll zu entnehmen. Die Anreicherung der Epithelzellen basierte jedoch in diesem Fall (im Unterschied zur positiven Selektion von CD11c<sup>+</sup>-DZ) auf

der Depletion von CD45<sup>+</sup>-hämatopoetischen Zellen, weshalb der Durchlauf und nicht das Eluat der Säulenpräparation weiterverwendet wurde. Der Durchlauf wurde abzentrifugiert (1350 U/min, 5 min), in 5 ml FKS-haltigem Medium aufgenommen, ausgezählt und bis zur Färbung in einem 15 ml-Röhrchen auf Eis gelagert.



<u>Abb. 6:</u> Darstellung der Regionen zur Sortierung der mTEZ-Gesamtpopulation sowie der CD80<sup>hoch</sup> und CD80<sup>niedrig</sup>-exprimierenden Subpopulationen. Zunächst wurden kleine Thymozyten anhand ihrer Größe und Granulierung im *forward- / side-scatter* Punktdiagramm ausgeschlossen. Die Anreicherung von TEZ erfolgte durch Ausschluss von toten, PI<sup>+</sup> Zellen und CD45<sup>+</sup> Zellen hämatopoetischen Ursprungs. Anschließend wurden EpCAM<sup>+</sup> TEZ aufgrund der differentiellen Expression des Oberflächenmarkers Ly51 in EpCAM<sup>+</sup> Ly51<sup>-</sup> mTEZ und EpCAM<sup>+</sup> Ly51<sup>+</sup> kTEZ unterteilt. Die Anreicherung von reifen (CD80<sup>hoch</sup>-) und unreifen (CD80<sup>niedrig</sup>-exprimierenden) mTEZ-Subpopulationen erfolgte anhand der heterogenen CD80-Expression von CD45<sup>-</sup> Ly51<sup>-</sup> EpCAM<sup>+</sup> mTEZ.

#### Färbung der Epithelzellen:

Nach der Voranreicherung wurden die Zellen zunächst abzentrifugiert, in 1 ml anti-Fc-Rezeptor-KÜS pro 1 x 10<sup>8</sup> Zellen aufgenommen und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in eiskaltem FACS-Puffer gewaschen und je nach Fragestellung unterschiedlich gefärbt. Der Antikörpercocktail zur Isolierung der mTEZ-Gesamtpopulation setzte sich aus anti-CD45-PE (1:100), anti-EpCAM-Alexa647 (1:100) und anti-Ly51-FITC (1:100) in FACS-Puffer zusammen. Die Sortierung von CD80<sup>hoch</sup>- und CD80<sup>niedrig</sup>-exprimierenden mTEZ erfolgte aufgrund der Färbung mit anti-Ly51-FITC (1:100), anti-CD80-PE (1:100), anti-EpCAM-Alexa647 (1:100) und anti-CD45-PerCP (1:100). Zur Färbung wurden jeweils 1 x  $10^8$  Zellen mit 1 ml Antikörpercocktail versehen und für 15 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut in FACS-Puffer gewaschen und in 0,5 ml FACS-Puffer mit Propidiumiodid (Endkonzentration: 1 µg/ml) aufgenommen, um eine Diskriminierung toter Zellen bei der Sortierung zu ermöglichen.

#### 2.3.4 Präparation von lymphoiden Zellen der Milz

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden sowohl reife, naive T Zellen (TZ) als auch DZ aus Milzpräparationen aufgereinigt. Bis auf das Töten der Mäuse erfolgten alle Arbeitsschritte unter keimarmen Bedingungen an Sicherheitswerkbänken.

## 2.3.4.1 T-Lymphozyten

Hierzu wurden je nach Bedarf die Milzen von 1-2 Mäusen, welche zuvor durch zervikale Dislokation getötet worden waren, möglichst unblutig entnommen und in eisgekühltes RPMI-Medium verbracht. Anschließend wurde die Milzkapsel mithilfe einer Schere einseitig eröffnet und der Inhalt vorsichtig ausgestrichen. Die Milzfragmente wurden nun zur Homogenisierung mithilfe des Stempels einer 2 ml-Spritze durch ein feinmaschiges Gewebesieb gedrückt. Die auf diese Weise gewonnene Zellsuspension wurde mehrfach kräftig resuspendiert, in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und abzentrifugiert (1350 U/min, 5 min, 4°C). In der Zwischenzeit wurde Lysepuffer auf 25°C erwärmt. Es folgte die Lyse der Erythrozyten, wie unter 2.3.2 beschrieben. Anschließend wurden die Zellen gezählt und mit MACS-Puffer auf eine Konzentration von 1 x 10<sup>8</sup> Zellen / ml eingestellt.

#### Anreicherung von CD4<sup>+</sup> TZ durch MACS-Separation:

Die Anreicherung von CD4<sup>+</sup> TZ erfolgte durch die "positive Isolierung" der CD4exprimierenden Zellen aus der Milz-Gesamtzellpopulation. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit biotinyliertem anti-CD4-Antikörper in einer Endkonzentration von 0,5  $\mu$ g/ml für 12 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit MACS-Puffer gewaschen und abzentrifugiert (1350 U/min, 5 min, 4°C). Nun erfolgte eine 15-minütige Inkubation bei 4°C mit *streptavidin-Microbeads*® in einer 1:40-Verdünnung. Die auf diese Weise markierten Zellen wurden durch ein Zellsieb (Porenweite 70  $\mu$ m) filtriert und -wie unter 2.3.3.1 beschrieben- zweimalig über äquilibrierte *LS*-Trennsäulen aufgereinigt. Nach der Elution wurden die Zellen gezählt und bis zur Verwendung im Proliferationstest bei 4°C in Testmedium aufbewahrt.

#### Anreicherung von CD8<sup>+</sup> TZ durch MACS-Separation:

Die Anreicherung von CD8<sup>+</sup> TZ erfolgte durch "negative Isolierung" aus der Milz-Gesamtzellpopulation mithilfe des *CD8<sup>+</sup> T Cell isolation kit*<sup>®</sup> (Miltenyi Biotech). Funktionell basiert dieses Verfahren auf der Markierung und anschließenden Depletion ungewünschter Zellpopulationen, während die Zellpopulation von Interesse nicht markiert wird. Dies ist im Falle von CD8<sup>+</sup> TZ von besonderer Bedeutung, da sich zytotoxische TZ sehr leicht über die Stimulation des Korezeptors aktivieren lassen, was zu einer unerwünschten, unspezifischen Proliferation der Zellen im Lymphoproliferationstest führen kann.

Die Anreicherung der CD8<sup>+</sup> TZ mit dem *CD8<sup>+</sup> T Cell isolation kit*<sup>®</sup> (Miltenyi Biotech) erfolgte strikt nach Angaben des Herstellers. Die Aufreinigung der Zellen über die *LS*-Trennsäulen wurde einmalig wiederholt und die Durchlauf-Fraktionen beider Trennungsgänge vereinigt. Anschließend wurden die Zellen gezählt und bis zur Verwendung im Proliferationstest bei 4°C in Testmedium aufbewahrt.

#### 2.3.4.2 Dendritische Zellen

Zur Präparation von DZ wurden die Milzen aus jeweils 4-5 Mäusen unblutig entnommen und in eisgekühltes RPMI-Medium überführt, welches zuvor mit 0,2 mg/ml Kollagenase Typ IV und 25 µg/ml DNase I versehen worden war, um einerseits die Dissoziation des Gewebes zu verstärken und andererseits die Beeinträchtigung der Präparation durch freiwerdende DNA zu vermindern. Zunächst wurden die Milzen mithilfe einer gebogenen Schere grob zerkleinert. Die Gewebefragmente wurden mit einer 10 ml-Glaspipette in ein 15 ml-Röhrchen überführt und im vorgeheizten Wasserbad bei 37°C für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die verdauten Gewebefragmente mit dem Stempel einer 2 ml-Spritze durch ein Metallsieb passiert und wie bereits unter 2.3.4.1 beschrieben bis zur Bestimmung der Zellzahl weiterbehandelt. Die Zellzahl wurde mit gekühltem MACS-Puffer auf 2 x 10<sup>8</sup>/ml Die anschließende Aufreinigung der Dendritischen Zellen eingestellt. durch Magnetseparation erfolgte analog der bereits unter 2.3.3.1 beschriebenen Vorgehensweise. Zur Analyse und Sortierung von Mz-DZ wurden ebenfalls die unter 2.3.3.1 aufgelisteten Antikörper und Färbeprotokolle verwendet.

#### 2.3.5 Präparation der Dendritischen Zellen des Lymphknotens

Zur Präparation von DZ aus Lymphknoten (Lk-DZ) wurden zunächst jeweils 10-20 Mäusen, die durch CO<sub>2</sub> getötet worden waren, die inguinalen, poplitealen und mesenterialen Lymphknoten mithilfe gebogener Pinzetten entnommen und in eisgekühltes RPMI-Medium überführt. Nach Entfernung von Fett- und Bindegewebsrückständen wurden die Lymphknoten zwischen den angerauhten Oberflächen zweier hitzesterilisierter Mattrand-Objektträger zerrieben. Die auf diese Weise freigesetzten Zellen wurden in ein 15 ml-Röhrchen mit frischem RPMI-Medium überführt. Das übrige Lymphknotengewebe wurde abschließend durch ein Zellsieb (Porenweite 70 µm) filtriert, mit frischem Medium gewaschen und verworfen. Der Durchlauf wurde mit den zuvor gewonnenen Zellen vereinigt, abzentrifugiert (1350 U/min, 5 min, 4°C) und in 5 ml eisgekühltem MACS-Puffer aufgenommen. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt. Die Zellzahl wurde mit gekühltem MACS-Puffer auf 2 x  $10^8$  /ml eingestellt. Die anschließende Aufreinigung der Dendritischen Zellen durch Magnetseparation erfolgte analog der bereits unter 2.3.3.1 beschriebenen Vorgehensweise. Zur Analyse der Lk-DZ wurden ebenfalls die unter 2.3.3.1 aufgelisteten Antikörper und Färbeprotokolle verwendet.

#### 2.3.6 Knochenmarkpräparation

Die Herstellung von Knochenmarkchimären (siehe 2.4.1) erfolgte durch Rekonstitution letal bestrahlter Mäuse mit Knochenmark aus syn- oder allogenen Donoren.

Zur Gewinnung des Knochenmarks wurden zunächst 7-10 Mäuse durch  $CO_2$  –Begasung getötet (alle weiteren Präparationsschritte erfolgten unter keimarmen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank). Anschließend wurden die Hinterbeine von Fell befreit, am Hüftgelenk vom Torso getrennt und Tibia sowie Femur aus dem Kniegelenk herausgedreht. Die Knochen wurden von Muskeln freipräpariert und durch Abschneiden beider Enden eröffnet, so dass sie mit RPMI-Medium ohne FKS unter Verwendung einer 2 ml-Spritze mit Kanüle (0,55 x 25 mm) ausgespült werden konnten. Durch Resuspendieren wurde nun aus dem so gewonnenen Knochenmark eine Zellsuspension hergestellt, welche zur Entfernung von Knochen- und Bindegewebsfragmenten über ein Zellsieb (70 µm) gegeben wurde. Anschließend wurde die Zellsuspension abzentrifugiert (1350 U/min, 7 min, 4°C) der Überstand abgesaugt und die im Pellet enthaltene Erythrozyten durch Zugabe von 2 ml Lysepuffer lysiert (siehe 2.3.2). Abgestoppt wurde die Reaktion mit 8-10 ml RPMI-Medium (inklusive FKS). Ausgehend von einem 10 Tiere umfassenden Präparationsansatz konnte auf diese Weise eine Zellsuspension mit 2-3 x  $10^8$  Zellen gewonnen werden.

#### 2.3.6.1 T Zell-Depletion von Knochenmark

Das Knochenmark enthält neben myeloiden und lymphoiden Vorläuferzellen auch reife hämatopoetische Zellen, unter anderem CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> TZ. Werden diese TZ bei der Herstellung von Knochenmarkschimären in lethal bestrahlte, allogene Empfängertiere eingebracht, besteht die Gefahr, dass sie gegenüber dem Gewebe des Empfängers eine

akute *graft-versus-host* (GvH)-Reaktion auslösen. Aus diesem Grund wurden reife CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> TZ vor der Injektion durch Komplementlyse aus der Zellsuspension entfernt (siehe auch Abb. 7). Hierzu wurden die Zellen pelletiert und mit jeweils 1 ml anti-CD4 (Klon 172.4)und anti-CD8-(Klon 3.168.8.1)-IgM-Kulturüberstand pro 1 x 10<sup>8</sup> Zellen für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Medium gewaschen, abzentrifugiert (1350 U/min, 5 min) und in 2 ml Medium mit 5% frisch angesetztem Kaninchen-Komplement / 1 x 10<sup>8</sup> Zellen und 50 µg/ml DNase I resuspendiert. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C (Wasserbad) wurden die Zellen erneut gewaschen, filtriert (70 µm) und in eiskaltem PBS bis zur Injektion aufbewahrt. Die erfolgreiche Depletion wurde mittels FACS-Analyse kontrolliert. Hierzu wurde ein Aliquot der Zellen mit anti-CD4-FITC- und anti-CD8α-PE-Antikörpern (beide 1:100 verdünnt) in 100 µl FACS-Puffer gefärbt und nach einmaligem Waschen durchflusszytometrisch analysiert. Die Zellen wurden nur dann injiziert, wenn die Depletion mehr als 90% betrug. Andernfalls wurde die Komplementlyse wiederholt.

#### 2.3.7 Ex vivo T Zell-Lymphoproliferationstest

In der vorliegenden Arbeit wurde die Präsentation definierter, endogener Antigen (Ag)-Epitope durch verschiedene Ag-präsentierende Zellen (APZ) aus dem Thymus und aus peripheren lymphatischen Organen anhand der Proliferation Ag-spezifischer TZ untersucht. Hierzu wurden die APZ zunächst wie beschrieben (siehe 2.3.3 - 2.3.5) präpariert und aufgereinigt. Anschließend wurden die APZ in HL-1-Medium mit 5% FKS aufgenommen, in Triplikaten in 96-Loch-Flachboden-Platten titriert (beginnend bei einer Zellzahl von 1-3 x 10<sup>5</sup> pro Loch) und mit jeweils 4 x 10<sup>5</sup> naiven, Ag-spezifischen TZ (TZR-transgene TZ oder TZ-Linie) in 200 µl Medium kokultiviert. Da sich herausstellte, dass Mz-DZ keines der untersuchten endogenen Epitope effizient präsentierten, wurden Stimulationsansätze mit Mz-DZ in der Folge als Negativ-Kontrolle verwendet. Als Positiv-Kontrolle wurde den Stimulationsansätzen entweder das spezifische Peptid (1 µg/ml) oder das jeweilige Modellantigen als Gesamtprotein (10-50 µg/ml) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 70-72 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einer gesättigten Wasserdampf-Atmosphäre wurden die Zellen für weitere 16-24 Stunden mit 1 µCi <sup>3</sup>H-Thymidin / Loch in 10 µl HL-1-Medium "gepulst". Anschließend wurden die Zellen mit einer Erntemaschine (MicroCell<sup>®</sup> Harvester) abgesaugt und auf Glasfiber-Filtermatten übertragen. Die Filtermatten wurden bei 60°C für 30 min getrocknet und zusammen mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit in eine Folienhülle eingeschweißt. Abschließend erfolgte die Messung der integrierten Radioaktivität in einem β-Szintillationszähler (Betaplate<sup>®</sup> 1205) in Form von gezählten Impulsen pro Minute (cpm: <u>c</u>ounts <u>p</u>er <u>m</u>inute). Als Maß für die Stimulation ist das arithmetische Mittel der cpm-Werte von jeweils 2-3 parallel angesetzten Testansätzen angegeben.

#### 2.3.11 Durchflusszytometrie

Die FACS (*fluorescence activated cell sorter*)-Analyse beruht auf dem Prinzip der Durchflusszytometrie. Hierbei werden mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markierte Zellen in einem Flüssigkeitsstrom an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Die in den nachgeschalteten Detektoren ermittelten Messwerte erlauben Aussagen über die Morphologie der Zellen sowie über ihre Fluoreszenzpositivität. Das von den Zellen gestreute Licht der Laser kann als direktes Maß für die Granulierung der Zellen verwendet werden (SSC: *side scatter*). Dagegen erlaubt das an den Zellen gebeugte Licht eine Aussage über die Größe der Zellen (FSC: *forward scatter*). Mit Hilfe von Größe und Granulierung kann man sowohl zwischen lebenden und toten Zellen, als auch zwischen verschiedenen Zellpopulationen (z.B. Lymphocyten und Macrophagen) differenzieren.

Mit Hilfe von Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern kann die Verteilung von Antigenen auf den Oberflächen von Zellen und deren Expressionsstärke nachgewiesen werden. Dabei werden diese Fluoreszenzfarbstoffe je nach verwendetem Laser bei verschiedenen Wellenlängen angeregt und emittieren Licht einer größeren Wellenlänge. Durch die Verwendung von entsprechenden Filtersystemen kann zwischen den emittierten Wellenlängen unterschieden werden, sodass unterschiedliche Oberflächenmoleküle gleichzeitig mit verschiedenen Fluorochromen gefärbt werden können.

Daneben besteht die Möglichkeit der Analyse von intrazellulären Proteinen. In diesem Fall werden zur Markierung der Zellen in der Regel unpolare Farbstoffe verwendet, welche die Zellmembran passieren können und nach Hydrolyse intrazellulär an zytoplasmatische Proteine binden. Alternativ werden fluoreszierende Proteine als transgene Markermoleküle von den Zellen exprimiert. Zu diesen Molekülen zählt das <u>enhanced green fluorescent</u> grotein (eGFP), welches in der vorliegenden Arbeit in FoxN1-eGFP Mäusen zur Indikation der FoxN1-Expression verwendet wurde.

Die Analyse unterschiedlicher Zellpopulationen im Zuge der vorliegenden Arbeit erfolgte an FACSCalibur<sup>™</sup>- und FACSCanto<sup>™</sup> (I und II)-Analysegeräten (BD Bioscience). Zellsortierungen wurden mithilfe von FACSVantage<sup>™</sup>-, FACSDiVa<sup>™</sup>-, und FACSAria<sup>™</sup>- Zellsortern (BD Bioscience) vorgenommen. Die Auswertung der Daten erfolgte mithilfe der FlowJo<sup>™</sup>-Software (Tree Star).

## 2.4 Tierexperimentelle Methoden

## 2.4.1 Herstellung von Knochenmarkchimären

Aufgrund der konstitutiv hohen Teilungsrate der meisten myelogenen Zellen reagiert das hämatopoetische System besonders sensitiv auf Schädigungen der DNA und des Replikationsapparates. So kann durch radioaktive Bestrahlung nahezu das gesamte hämatopoetische System zerstört werden. Die Zerstörung des autologen Immunsystems ermöglicht die Rekonstituierung mit syngenem oder allogenem Knochenmark, wodurch ein letal bestrahltes Individuum überleben kann. Bei diesen Individuen handelt es sich nun um Knochenmarkchimären, da das bestrahlungssensitive Knochenmark des Spenders einen anderen Genotyp aufweist als die bestrahlungsresistenten Zellen des Empfängers. Auf diese Weise lassen sich am Tiermodell Wechselwirkungen zwischen Zellen unterschiedlicher Genotypen *in situ* untersuchen.

#### <u>Abb. 7:</u> Schematische Darstellung des Verfahrens zur Herstellung von Knochenmarkchimären.



Injektion von 5 x 106 KMZ in 100 µl PBS intra venös

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand von Knochenmarkchimären der Transfer von Antigenen und Oberfächenmarkern zwischen bestrahlungssensitiven hämatopoetischen Zellen (insbesondere DZ) und bestrahlungsresistenten Epithelzellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden 4-6 Wochen alte Empfängertiere unterschiedlicher Mausstämme mit 850-950 rad (8,5-9,5 Gray) bestrahlt. Die bestrahlten Mäuse wurden innerhalb von 24 h durch eine intravenöse Injektion von 5 x  $10^6$  TZ-depletierten Knochenmarkzellen des gewünschten Spender-Genotyps in 100 µl PBS rekonstituiert. Vor und nach der Rekonstitution wurden die Tiere in keimarmer Umgebung (*isolated ventilated cages* oder Überdruck-Isolator) gehalten. Im Anschluß an die Bestrahlung wurde das Trinkwasser der Tiere für die Dauer von 4 Wochen mit Amoxicillin versehen. Die Präparation der Chimären erfolgte 5-7 Wochen nach der Rekonstitution.

# 3. Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die Autoantigen-Präsentation durch Dendritische Zellen (DZ) des Thymus (Thy-DZ) in Relation zu medullären Thymusepithelzellen (mTEZ) und Milz-DZ (Mz-DZ) als peripherer Kontrollpopulation im Kontext der zentralen Toleranzinduktion funktionell zu untersuchen.

## 3.1 Der Phänotyp angereicherter DZ-Populationen des Thymus und der Peripherie

Wie bereits zahlreiche Studien gezeigt haben, unterscheiden sich die Dendritischen Zellpopulationen der verschiedenen lymphatischen Organe teilweise grundlegend im Hinblick auf ihre Zusammensetzung aus unterschiedlichen Subpopulationen sowie auch auf deren Aktivierungsstatus (Vremec *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 2003). Beides beeinflusst über die differentielle Interaktion von T Zell-Rezeptoren (TZR) mit Peptid-/MHC-Komplexen und die begleitende Kostimulation in direkter Weise die Initiation, den Verlauf und die Termination einer T Zell (TZ)-Antwort. Gleiches gilt vermutlich für die intrathymische Depletion von potentiell autoaggressiven TZ-Klonen im Zuge der negativen Selektion.

Um die Ergebnisse des funktionellen Vergleichs von DZ-Gesamt-(und Sub-)Populationen des Thymus und der Peripherie vor dem Hintergrund ihrer unterschiedlichen Komposition besser verstehen zu können, wurden zunächst, in Anlehnung an Vremec *et al.* (1997-2000), umfassende Analysen der Oberflächenexpression von Molekülen, die in direktem oder indirektem Zusammenhang mit der Ag-Präsentation und TZ-Aktivierung stehen, durchgeführt. Hierzu zählen neben MHC-Komplexen auch kostimulatorische Moleküle sowie Mediatoren der Zell-Adhäsion.

Zunächst wurden Thy-DZ und Mz-DZ von weiblichen Balb/c-Mäusen anhand ihrer CD11c-Expression aus Einzelzellsuspensionen des jeweiligen Organs durch Magnetseparation angereichert (Reinheit: ~ 50-70%). Je nach Fragestellung erfolgte anschließend die Markierung von Oberflächenmolekülen mit verschiedenen Kombinationen fluoreszenzgekoppelter Antikörper. Abschließend erfolgte die Messung an einem FACSCanto II<sup>®</sup>-Durchflusszytometer.



<u>Abb.8:</u> Differentielle Expression von charakteristischen Oberflächenmolekülen durch murine CD11c<sup>+</sup> Dendritische Zellen aus Thymus und Milz. A) Der obere Teil der Abb. zeigt die der Analyse zugrunde liegenden Auswahlkriterien. Analysiert wurden CD11c<sup>+</sup>-, nicht-autofluoreszente Zellen des jeweiligen Organs aus weiblichen Balb/c-Mäusen nach Ausschluss von sehr kleinen und schwach granulierten Zellen sowie von sehr großen und stark granulierten Zellen (inkl. Multipletten) im FSC-/SSC-Punktdiagramm. Die Oberflächenexpression von Mz-DZ ist grau-, die von Thy-DZ rot-schattiert dargestellt. B) Gezeigt wird das Verhältnis der medianen Fluoreszenz von Thy-DZ zu Mz-DZ für alle untersuchten Oberfächenmoleküle aus A. Wie aus Abbildung 8A hervorgeht, zeigt ein Großteil der Thy-DZ im Vergleich zu Mz-DZ einen reiferen, aktivierteren Phänotyp, charakterisiert durch die stärkere Expression von MHC Klasse II-Komplexen sowie der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86. Dennoch sind diese Thy-DZ im Vergleich zu artifiziell -beispielsweise durch die Zugabe von bakteriellen Lipopolysacchariden- aktivierten DZ als unreif zu bezeichnen.

Mz-DZ weisen hingegen eine etwas stärkere Expression von CD11c und F4/80 auf Populationsebene auf. Letzteres könnte auf eine höhere Kontamination der CD11cangereicherten Milzzellfraktion mit Makrophagen (M $\Phi$ ) hindeuten.

Weiterhin deutlich zu erkennen und konform mit der Literatur (Vremec *et al.*, 2000) ist der höhere Anteil der CD4<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>-Subpopulation an der Gesamt-DZ-Population in der Milz, während im Thymus die CD8α<sup>+</sup>-Subpopulation den Großteil der DZ ausmacht. Auch die Expression der Adhäsionsmoleküle CD24 (<u>Heat Stable Antigen</u>, HSA) und EpCAM ist im Thymus deutlich erhöht, ein Befund, der möglicherweise eine höhere Avidität der DZ-/TZ-Interaktion unterstützt und später noch ausführlicher untersucht wird (siehe Kapitel 3.5).

In den folgenden Kapiteln wird der (indirekten) Ag-Präsentation durch DZ die (direkte) Ag-Präsentation durch mTEZ gegenübergestellt. Dies erscheint sinnvoll, da insbesondere reife mTEZ ebenfalls viele phänotypische Merkmale einer professionellen Ag-Präsentierenden Zelle (APZ) besitzen, wie beispielsweise die Expression von MHC Klasse II-Komplexen sowie des Kostimulators CD80 (Derbinski *et al.*, 2005).

Darüber hinaus wurde bereits in einer Reihe von *in vivo*-Modellen gezeigt, dass mTEZ autonom in der Lage sind, je nach Avidität der TZR-/MHC-Interaktion Thymozyten Agspezifisch zu deletieren oder ein T-regulatorisches Zellschicksal zu induzieren (Gallegos und Bevan., 2004; Klein *et al.*, 2001, 2007). Beides setzt nach aktuellem Wissensstand eine effiziente Ag-Präsentation voraus.

# 3.2 Die Präsentation des *neo*-Autoantigens Ovalbumin durch verschiedene APZ-Populationen des Thymus und der Peripherie *ex vivo*

Die Frage, ob und in wiefern sich die verschiedenen APZ-Populationen des Thymus und der Peripherie hinsichtlich der Präsentation eines ubiquitär-exprimierten endogenen Antigens unterscheiden, wurde bislang nicht untersucht. Darüber hinaus existiert kein direkter Vergleich der Ag-Präsentationseffizienz von unterschiedlichen APZ-Populationen des Thymus.

Aus diesem Grund sollte zunächst mithilfe des L<sup>d</sup>-nOVA-/DO11.10-Modellsystems (Kawahata *et al.*, 2002) ein Verfahren etabliert werden, welches die Detektion der Präsentation eines endogenen Antigens durch APZ des Thymus und der Peripherie *ex vivo* mittels T Zell-Rezeptor-transgener (TZRtg) TZ in einem standardisierten Proliferationsassay zuverlässig gestattet.

#### 3.2.1 Die Expression des *neo*-Autoantigens Ovalbumin in L<sup>d</sup>-nOVA Mäusen

Das transgene L<sup>d</sup>-nOVA Mausmodell zeichnet sich durch die ubiquitäre Expression des *neo*-Autoantigens Ovalbumin (OVA) unter der Kontrolle des MHC Klasse I (L<sup>d</sup>)-Promotors aus. Um Rückschlüsse auf den potentiellen Einfluss der Expressionsstärke auf die endogene OVA-Präsentation ziehen zu können, wurden zunächst Mz-DZ, Thy-DZ und mTEZ aus L<sup>d</sup>-nOVA-Mäusen anhand der differentiellen Expression der Oberflächenmarker CD11c, CD45, EpCAM und Ly51 mittels durchflusszytometrischer Zellsortierung hochgradig angereichert (Reinheit:  $\geq$  95%). Aus den so gewonnenen Zellpopulationen wurde die RNA isoliert und durch reverse Transkription in stabile cDNA umgeschrieben. Die Quantifizierung der OVA-Expression erfolgte durch quantitative PCR unter Verwendung geeigneter Primer-Paare im Abgleich auf die Expression der Haushaltsgene HPRT und Ubiquitin (Ubc).

Die relative OVA-Expression in den untersuchten APZ-Populationen fällt vergleichbar aus, was zu erwarten gewesen war, da sie durch den MHC Klasse I (L<sup>d</sup>)-Promotor reguliert wird, welcher in allen kernhaltigen somatischen Zellen aktiv ist (Abb. 9). In mTEZ, welche die stärkste relative Expression aufweisen, ist diese im Vergleich zu Mz-DZ (schwächste Expression) lediglich um den Faktor 2 erhöht.



<u>Abb. 9:</u> Quantitative Analyse der OVA-Expression in APZ-Populationen des Thymus und der Peripherie. Die OVA-Expression wurde mittels Echtzeit-PCR anhand von cDNA aus hochreinen ( $\geq$  95% Reinheit) Zellpopulationen analysiert. Dargestellt ist die mittels  $\Delta\Delta$ ct-Methode quantifizierte relative Expression unter Verwendung der Ubiquitin (Ubc)- und HPRT-Expression zur Normalisierung. Die Expressionsstärke in mTEZ wurde gleich 1 gesetzt.

Neben der ubiquitären Expression liegt ein weiteres Charakteristikum des OVA-Transkripts in der Kopplung an ein nukleäres Lokalisationssignal, womit eine membranständige Lokalisation sowie eine Sezernierung des Proteins verhindert werden. Dies ist im Hinblick auf die später behandelte Fragestellung der Ag-Präsentation im Thymus von entscheidender Bedeutung, da durch die nukleäre Restriktion ein "unspezifischer" Transfer von OVA peripheren Ursprungs über längere Distanz, beispielsweise über den Blutstrom, vermindert wird. In der Tat konnten Kawahata und Kollegen OVA zwar im Kern und (in schwächerem Ausmaß) auch im Zytoplasma von L<sup>d</sup>-nOVA-Milzzellen nachweisen, der OVA-Gehalt im Serum von L<sup>d</sup>-nOVA-Mäusen war jedoch sehr gering (Kawahata *et al.*, 2002).

Für MHC Klasse II-vermittelte Präsentation kommt folglich vorrangig intrazelluläres OVA in Betracht, welches beispielsweise durch endo-lysosomalen Abbau im Zuge von Autophagie für den MHC Klasse II-Beladungsweg prozessiert wird.

#### 3.2.2 Die Ovalbumin-Präsentation durch APZ aus L<sup>d</sup>-nOVA-Mäusen ex vivo

Bislang wurden nur wenige vergleichende funktionelle Studien zur Präsentation eines endogenen Antigens *ex vivo* durchgeführt. Der Grund hierfür liegt unter anderem in der vergleichsweise schwachen und ineffizienten Präsentation der meisten autologen Antigene auf APZ-Populationsebene in gesunden Tieren. Dies hat zur Folge, dass man eine relativ hohe Anzahl an APZ benötigt, um naive T-Zellen Ag-spezifisch zu stimulieren. Die Mehrheit

früherer Studien beschränkte sich darüber hinaus auf die Analyse von APZ-Populationen (Makrophagen (MΦ), B-Zellen (BZ), DZ) aus Milz und Lymphknoten.

Kawahata und Kollegen berichteten in diesem Zusammenhang über eine, wenngleich relativ schwache, Präsentation von OVA durch L<sup>d</sup>-nOVA Mz-DZ und Lymphknoten-DZ (Lk-DZ), nachgewiesen *ex vivo* mithilfe TZR-transgener CD4<sup>+</sup> TZ aus DO11.10-Mäusen (Kawahata *et al.*, 2002). Letztere tragen einen TZR mit der Spezifität für ein dominantes OVA-Epitop, bestehend aus den Aminosäuren (AS) 323-339.

Diese funktionellen *ex vivo*-Studien von Kawahata und Kollegen wurden in der vorliegenden Arbeit auf mTEZ und Thy-DZ als APZ-Populationen erweitert. Zu diesem Zweck wurden Thy-DZ, Mz-DZ und Lk-DZ aus L<sup>d</sup>-nOVA-Mäusen -wie bereits unter 3.1 beschriebenaufgereinigt, mit dem Unterschied, dass der Anreicherungsgrad aller Zellpopulationen, bedingt durch eine wiederholte Magnetseparation der CD11c<sup>+</sup> DZ-Fraktionen, nun  $\ge$  90% betrug. Die Anreicherung der mTEZ erfolgte, wie auch in allen folgenden Experimenten, stets durch sequentiellen Thymus-Verdau, gefolgt von einer Magnetseparation von CD45<sup>+</sup>- und CD45<sup>-</sup>- Thymuszellen. Aus der auf diese Weise vorangereicherten CD45<sup>-</sup> TEZ-Fraktion wurden nach Markierung mit entsprechenden fluoreszenzgekoppelten Antikörpern mittels durchflusszytometrischer Zell-Sortierung CD45<sup>-</sup> EpCAM<sup>+</sup> Ly5<sup>-</sup> mTEZ mit einer Reinheit von  $\ge$  95% gewonnen.

Für funktionelle Analysen wurden die APZ titriert und für 60-65 h mit jeweils 5 x 10<sup>4</sup> frisch isolierten DO11.10 TZRtg CD4<sup>+</sup> TZ in 96-Loch-Platten kokultiviert, worauf die Markierung der Zellen mit <sup>3</sup>H-Thymidin erfolgte. Die vorausgegangene Isolierung der Ag-spezifischen TZ erfolgte ebenfalls mittels MACS-Separation.

Anhand der Proliferation der TZ wird deutlich, dass sich die Effizienz der Ag-Präsentation in den untersuchten APZ-Populationen deutlich unterscheidet (Abb.10). Obgleich die Stimulation mit Lk-DZ gegenüber Mz-DZ in einer Verdoppelung der Proliferationsrate resultiert, liegen beide Messwerte, verglichen mit den APZ-Populationen des Thymus, lediglich im basalen Bereich. Es ist an dieser Stelle anzumerken, dass sich die dargestellten Absolutwerte der <sup>3</sup>H-Inkorporation für Lk-DZ und Mz-DZ näherungsweise in der Größenordnung bewegen, wie sie von Kawahata et al. bereits für ein Drittel der hier eingesetzten APZ-Zahlen beschrieben wurden. Auch waren in der früheren Studie Mz-DZ effektiver als Lk-DZ, wenngleich die beschriebenen Unterschiede vor dem Hintergrund der hier gezeigten Differenz zwischen APZ des Thymus und der Peripherie als marginal anzusehen sind und aus diesem Grund nicht genauer untersucht wurden.

Schließt man nun die APZ-Populationen des Thymus in die Betrachtung ein, so fällt auf, dass sowohl mTEZ als auch Thy-DZ eine 10-40-fach stärkere Proliferation induzieren als die DZ-Populationen der peripheren Organe. Darüber hinaus ist die Effizienz der Ag-

Präsentation durch Thy-DZ gegenüber mTEZ je nach Titrationsstufe um den Faktor 2-5 erhöht.

Um funktionell zu prüfen, ob die hier gezeigte differentielle Präsentation eines endogenen Antigens auf die in Abschnitt 3.1 beschriebenen phänotypischen Unterschiede der DZ-Gesamtpopulationen zurückzuführen ist, wurde das in Abbildung 4 dargestellte Experiment unter Zugabe von 1 µg/ml OVA-Peptid (AS<sub>323-339</sub>) durchgeführt.



<u>Abb. 10:</u> OVA-spezifische Proliferation von CD4<sup>+</sup> TZRtg TZ aus DO11.10-Mäusen als Antwort auf die Präsentation von endogenem OVA. Dargestellt ist jeweils die Proliferation von initial 5 x 10<sup>4</sup> DO11.10 CD4<sup>+</sup> TZ nach 85 h Kokultur mit L<sup>d</sup>-nOVA APZ-Populationen. Die letzten 20 h der Kokultur erfolgten in Anwesenheit von 1  $\mu$ Ci <sup>3</sup>H-Thymidin/Ansatz. Die Proliferation wurde anhand der integrierten Radioaktivität bestimmt.

Wie in Abbildung 11 zu erkennen ist, zeigen speziell Thy-DZ und Mz-DZ ein ähnliches Stimulationsprofil. Auch die Präsentation von exogenem OVA durch mTEZ resultiert in einer vergleichbaren Proliferation. Lediglich die Stimulation durch Lk-DZ fällt gegenüber den anderen APZ um den Faktor 2-3 schwächer aus, die Gründe hierfür wurden im Zuge der vorliegenden Arbeit jedoch nicht näher untersucht.

Die fehlende Korrelation der TZ-Proliferation mit der Titration der APZ (besonders im Bereich hoher APZ-Zahlen) ist wahrscheinlich durch eine Überstimulation der TZ, bedingt durch die

hier eingesetzte ungewöhnlich hohe Anzahl an APZ in Kombination mit der Maximalbeladung der MHC Komplexe durch das spezifische OVA-Peptid zu erklären.



<u>Abb. 11:</u> OVA-spezifische Proliferation von CD4<sup>+</sup> TZRtg TZ aus DO11.10-Mäusen als Antwort auf die Präsentation von exogenem OVA. Die Durchführung dieses Experiments erfolgte analog zu der Beschreibung unter Abb. 10. Zusätzlich wurde jedem Versuchsansatz 1 µg/ml OVA-Peptid (AS<sub>323-339</sub>) zugefügt.

Hervorzuheben ist an dieser Stelle, dass sich Thy-DZ von peripheren DZ zwar durch die effiziente Präsentation eines ubiquitären endogenen Antigens unterscheiden, dass sich dieser Unterschied aber nicht in der Präsentation des spezifischen exogenen Peptids widerspiegelt.

Zusammenfassend lässt sich deshalb festhalten, dass nicht alleine Unterschiede in der Expression von Oberflächenmolekülen, die in direktem funktionellen Bezug zur Ag-Präsentation stehen, für die hohe Effizienz der Thy-DZ im Hinblick auf die Präsentation eines endogenen Antigens verantwortlich sein können. Vielmehr liegt die Vermutung nahe, dass organotypische Eigenschaften des Thymus-Mikromilieus zu diesem Phänomen beitragen.

#### 3.2.3 Die Ovalbumin-Präsentation durch CD11c<sup>+</sup>CD8α<sup>+</sup>-DZ aus L<sup>d</sup>-nOVA Mäusen

Die DZ der verschiedenen lymphatischen Organe setzen sich aus verschiedenen Subpopulationen zusammen, welche anhand von Oberflächenmarkern unterschieden werden. Die dominante DZ-Population im Mausthymus ist durch die Koexpression von CD11c und CD8αα-Homodimeren gekennzeichnet. Je nach Mausstamm können ihr 60-90% aller DZ des Thymus zugeordnet werden (Vremec et al., 1992; 1997; 2000, Abb. 8). Es liegt daher nahe, anzunehmen, dass diese Subpopulation auch für einen Großteil der in Abb. 10 dargestellten, effizienten Präsentation von endogenem OVA durch Thy-DZ verantwortlich ist. Im Gegensatz zum Thymus zählen lediglich 10-20% aller Mz-DZ zu dieser CD8α<sup>+</sup>-Subpopulation. Es galt daher zu prüfen, ob eine hochgradige Anreicherung der CD8α<sup>+</sup> DZ-Subpopulationen aus Thymus und Milz zu einer Nivellierung der oben beschriebenen Unterschiede in der Präsentation von endogenem OVA führt. Zu diesem Zweck wurden CD11c<sup>+</sup> Zellen aus Thymus- und Milz-Einzelzellsuspensionen von L<sup>d</sup>-nOVA-Mäusen mittels Magnetseparation vorangereichert und mit fluoreszenzgekoppelten und gegen die Oberflächenmoleküle CD11c, CD45 und CD8a gerichteten Antikörpern markiert. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Aufreinigung der CD11c<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>und CD11c<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CD8α<sup>-</sup>-Zellpopulationen beider Organe. Die so gewonnenen hochreinen APZ-Populationen wurden nun mit CD4<sup>+</sup> TZ aus DO11.10-Mäusen -wie unter 3.2.2 beschrieben- kokultiviert, wobei die Proliferation der TZ erneut Indikator für die Ag-Präsentation war.

Wie aus Abbildung 12A hervorgeht, ist durch die Anreicherung der CD8α<sup>+</sup>-DZ Population aus der Milz keine Steigerung der Effizienz der Ag-Präsentation zu erzielen. Auch die Kokultur der TZ mit CD8α<sup>-</sup> und Gesamt-Mz-DZ resultiert in keiner messbaren Proliferation.

Im Gegensatz hierzu zeigen Thy-DZ, analog zu den unter 3.2.2 geschilderten Daten, eine deutlich effizientere Präsentation. Auffallend ist hierbei, dass sowohl CD8 $\alpha^+$ -Thy-DZ, als auch CD8 $\alpha^-$ -Thy-DZ eine stärkere Ag-spezifische TZ-Proliferation induzieren als Gesamt-Thy-DZ, wobei CD8 $\alpha^+$ -Thy-DZ endogenes OVA am effizientesten präsentieren. Dieser Befund und sein scheinbarer Widerspruch zu der anerkannten Lehrmeinung, dass sich die CD8 $\alpha^+$  DZ-Subpopulation von CD8 $\alpha^-$  DZ deutlich durch eine besonders effiziente (Kreuz-) Präsentation endogener Antigene unterscheidet, werden im Abschnitt 3.5.5 genauer betrachtet.

Demgegenüber resultiert die Präsentation von exogenem OVA-Peptid durch alle APZ-Populationen in ähnlichen Proliferationsraten, erneut ein Indiz für eine vergleichbare Ag-Präsentationskompetenz (Abb. 12B).



<u>Abb. 12:</u> OVA-spezifische Proliferation von CD4<sup>+</sup> TZRtg TZ aus DO11.10-Mäusen, induziert durch CD8αpositive und negative DZ-Populationen. A) Die Durchführung des Experiments erfolgte wie unter Abb. 10 beschrieben. Thy-DZ, nicht aber Mz-DZ, sind in der Lage, eine messbare TZ-Proliferation zu induzieren. Dabei ist keine stringente Korrelation der Präsentationseffizienz mit der CD8α-Expression festzustellen. B) Gleicher Versuchsaufbau wie in A), zusätzlich wurde jedem Versuchsansatz 1 µg/ml OVA-Peptid (AS<sub>323-339</sub>) zugegeben.
#### 3.2.4 Die Ovalbumin-Präsentation durch APZ aus Knochenmark-Chimären

Der deutliche Unterschied in der Präsentation des endogenen Antigens OVA zwischen APZ des Thymus und der Peripherie wirft die Frage nach der jeweiligen Quelle des Antigens auf. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass mTEZ, im Vergleich zu MΦ und DZ, sehr ineffizient Ag aus ihrer Umgebung aufnehmen und präsentieren (Klein *et al.*, 2001). Dies impliziert, dass die effektive Präsentation von endogenem OVA durch mTEZ *ex vivo* auf die Prozessierung von intrazellulärem OVA zurückzuführen ist.

*Per definitionem* unreife DZ, welche einen Großteil der Thymus-residenten DZ ausmachen (Wilson *et al.*, 2003), sind hingegen zu einer sehr effizienten Endozytose und Prozessierung extrazellulärer Antigene befähigt. Als Ag-Quelle kommen in diesem Fall sowohl Thymozyten, welche im Zuge der negativen Selektion in Apoptose gehen, als auch Stromazellen der näheren Umgebung, wie beispielsweise mTEZ, in Betracht. Letztere Möglichkeit wird gestützt durch den Befund, dass der Ag-Transfer von mTEZ auf Thy-DZ unter bestimmten Umständen nicht nur möglich, sondern essentiell für die Deletion von potentiell autoaggressiven CD4<sup>+</sup> Thymozyten zu sein scheint (Gallegos und Bevan, 2004).



<u>Abb. 13:</u> Abschätzung des Chimärismus nach Transfer von L<sup>d</sup>-nOVA Knochenmark in letal bestrahlte Balb/c Mäuse. 4-6 Wochen nach dem Transfer von 5 x 10<sup>6</sup> Knochenmarkzellen aus L<sup>d</sup>-nOVA- oder Balb/c-Spendertieren in letal (85 Gy) bestrahlte L<sup>d</sup>-nOVA- oder Balb/c-Empfängertiere wurde der Chimärismus anhand genomischer Milzzell-DNA bestimmt. Zu diesem Zweck wurde DNA aus Einzelzellsuspensionen mittels PCR auf die Präsenz des L<sup>d</sup>-nOVA-Transgens hin untersucht.



<u>Abb. 14:</u> **Ovalbumin-Präsentation durch APZ-Populationen aus KM-Chimären und Wt-Mäusen.** Die Herstllung der KM-Chimären wurde bereits unter 3.2.4 beschrieben. In dieser Darstellung sind KM-Chimären durch ein (\*) gekennzeichnet. Dabei bezeichnet der erstgenannte Stamm den Knochenmarkdonor, der zweitgenannte den Rezipienten. Jeder dargestellte Versuchsansatz repräsentiert vereinigte APZ aus 15-25 Individuen. Die Isolierung der APZ-Populationen und die anschließende Kokultur mit DO11.10 CD4<sup>+</sup> TZRtg-TZ erfolgte wie unter 3.1 beschrieben. Die TZ-Proliferation wurde wiederum anhand der <sup>3</sup>H-Thymidin-Inkorporation bestimmt. Die Balken der Diagramme repräsentieren jeweils einen APZ-Titrationsschritt im Verhältnis 1:3, ausgehend von  $3 \times 10^5$  Zellen (schwarz) bis hin zu  $1 \times 10^3$  Zellen (weiß).

Um zu klären, ob das von Thy-DZ präsentierte OVA hämatopoetischen Ursprungs (was sowohl die Prozessierung von intra-, als auch von extrazellulärem OVA *in vivo* einschließt) oder auf den Ag-Transfer von bestrahlungsresistenten Thymus-Stromazellen zurückzuführen ist, wurden Knochenmark(KM)-Chimären aus Balb/c- und L<sup>d</sup>-nOVA-Mäusen hergestellt. Hierzu wurden, je nach Fragestellung, jeweils 20-25 Individuen aus beiden Stämmen im Alter von 4-6 Wochen letal bestrahlt und innerhalb von 24 h mit 5 x 10<sup>6</sup> Knochenmarkzellen aus Balb/c- oder L<sup>d</sup>-nOVA-Spendertieren rekonstituiert. Nach einer Rekonstitutionsphase von 4-6 Wochen erfolgte die Analyse der Ag-Präsentation, wie bereits unter 2.3.7 und 3.2.2 beschrieben. Parallel wurde der Chimärismus anhand genomischer Milzzell-DNA aus den rekonstituierten Empfängertieren abgeschätzt. Wie den PCR-Ergebnissen in Abbildung 13 entnommen werden kann, betrug der Grad des Chimärismus in jedem Versuchsansatz mehr als 95%.

Die Ergebnisse der Analyse der Präsentation von endogenem OVA durch die jeweiligen APZ-Populationen aus unterschiedlichen KM-Chimären sind in Abbildung 14 zusammengefasst.

Betrachtet man zunächst die Ag-spezifische Proliferation der TZ als Antwort auf die OVA-Präsentation durch Thy-DZ (Abb. 14, oben), so zeigen sowohl Thy-DZ aus L<sup>d</sup>-nOVA(Wt)-Tieren (analog zu den in Abb. 10 dargestellten Ergebnissen), als auch solche aus L<sup>d</sup>nOVA $\rightarrow$ L<sup>d</sup>-nOVA KM-Chimären eine vergleichbar effiziente Präsentation von endogenem OVA. Die Eliminierung des hämatopoetische System als potentielle Ag-Quelle in Balb/c $\rightarrow$ L<sup>d</sup>nOVA Chimären übt lediglich einen geringen Einfluss auf die OVA-Präsentation durch Thy-DZ aus. Im Vergleich mit der Stimulation durch L<sup>d</sup>-nOVA(Wt)-DZ ist die Proliferation der TZ im titrierenden Bereich hier nur um den Faktor 2-3 reduziert.

Anders verhält es sich, wenn bestrahlungsresistente Thymus-Stromazellen als Ag-Quelle ausgeschlossen wurden. In Kokultur mit Thy-DZ aus L<sup>d</sup>-nOVA $\rightarrow$ Balb/c Chimären ist die Proliferation der TZ nicht nur um den Faktor 6-8 gegenüber L<sup>d</sup>-nOVA $\rightarrow$ L<sup>d</sup>-nOVA Chimären reduziert, sie befindet sich darüber hinaus auf gleichem Niveau mit der Ag-unspezifischen Proliferation, wie sie nach Stimulation durch Thy-DZ aus der Balb/c $\rightarrow$ Balb/c Kontrollpopulation zu messen ist.

Dies lässt den Schluss zu, dass die OVA-Expression in bestrahlungsresistenten Thymus-Stromazellen, zu denen auch mTEZ gehören, für die effiziente Präsentation von OVA durch Thy-DZ von essentieller Bedeutung ist. Umgekehrt kann OVA-Präsentation durch mTEZ nur nachgewiesen werden, wenn diese mTEZ autochthon OVA exprimieren (Abb. 14, Mitte). Dies ist sowohl in L<sup>d</sup>-nOVA(Wt)-Mäusen, als auch in L<sup>d</sup>-nOVA $\rightarrow$ L<sup>d</sup>-nOVA- und Balb/c $\rightarrow$ L<sup>d</sup>nOVA-KM-Chimären der Fall. Generell fällt jedoch die effektive OVA-Präsentation durch mTEZ aus KM-Chimären deutlich schwächer aus, als durch solche, die aus L<sup>d</sup>-nOVA(Wt)-Tieren isoliert wurden. A)



Quotient cpm Thy-DZ / cpm Mz-DZ (endogenes OVA)

B)

## Quotient cpm Thy-DZ / cpm Mz-DZ (exogenes OVA)



<u>Abb. 15:</u> Die effektive Präsentation von endogenem OVA (Epitop<sub>323-339</sub>) ist im Gegensatz zur Präsentation von exogenem OVA-Peptid in Thy-DZ im Vergleich zu Mz-DZ stark erhöht. Dargestellt ist der Quotient aus der <sup>3</sup>H-Inkorporation, die aus der Thy-DZ-induzierten Proliferation resultiert, und der Proliferation, die durch Mz-DZ induziert wurde, in Abwesenheit (A) oder Gegenwart (B) von exogenem OVA-Peptid (AS<sub>323-339</sub>) für die Gesamtdauer des Versuchs. Jeder Buchstabe bezeichnet ein unabhängiges Experiment der jeweiligen Versuchsreihe. MW: Mittelwert.

A)



<u>Abb. 16:</u> Die effektive Präsentation von endogenem OVA (Epitop<sub>323-339</sub>) und exogenem OVA-Peptid in Thy-DZ im Vergleich zu mTEZ. Dargestellt ist der Quotient aus der <sup>3</sup>H-Inkorporation, die aus der Thy-DZ-induzierten Proliferation resultiert, und der Proliferation, die durch mTEZ induziert wurde, in Abwesenheit (A) oder Gegenwart (B) von exogenem OVA-Peptid (AS<sub>323-339</sub>) für die Gesamtdauer des Versuchs. Jeder Buchstabe bezeichnet ein unabhängiges Experiment der jeweiligen Versuchsreihe. MW: Mittelwert. Der Grund hierfür liegt unter Umständen in einer Schädigung des Thymusepithels durch die vorgenommene Bestrahlung. Hierüber kann aber nur spekuliert werden, da die Interpretation der interexperimentellen Vergleiche der Thymusepithelzellen durch die während der Rekonstitutionsphase fortschreitende postpubertäre Involution des Thymus erschwert wird. Weiterführende phänotypische Untersuchungen der mTEZ aus KM-Chimären waren aufgrund der geringen Zellzahl leider nicht möglich.

Im Gegensatz zu Thy-DZ und mTEZ kann weder durch Mz-DZ aus Wt-Tieren noch durch solche aus KM-Chimären eine OVA-spezifische Proliferation der TZ induziert werden (Abb. 14, unten).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Thy-DZ und mTEZ, im Gegensatz zu DZ aus peripheren Organen, in der Lage sind, das nukleäre *neo*-Autoantigen OVA sehr effizient *ex vivo* zu präsentieren. Dabei sind Thy-DZ, nicht aber mTEZ, auf die Aufnahme von extrazellulärem OVA angewiesen. Die strikte Abhängigkeit der OVA-Präsentation durch Thy-DZ von der OVA-Expression durch radioresistente Stromazellen in KM-Chimären lässt vermuten, dass ein gerichteter Ag-Transfer von letzteren Zellen, zu denen auch mTEZ zählen, auf Thy-DZ zur effizienten OVA-Präsentation durch Thy-DZ beiträgt. Weder die Aufnahme von apoptotischem Material negativ-selektionierter Thymozyten noch die Prozessierung von autochthon synthetisiertem OVA für den MHC Klasse II-Beladungsweg, beispielsweise durch Autophagie, scheinen für die OVA-Präsentation durch Thy-DZ von entscheidender Bedeutung zu sein.

Die von Kawahata und Kollegen beschriebene Präsentation durch DZ-Populationen aus Milz und Lymphknoten kann im Vergleich zu der effizienten Präsentation im Thymus als basal, wenngleich signifikant präsent, gewertet werden.

### 3.3 Kreuz-Präsentation des Autoantigens P1A durch DZ des Thymus ex vivo

Obwohl das *neo*-Autoantigen OVA in L<sup>d</sup>-nOVA-Mäusen (mutmaßlich) in allen kernhaltigen Zellen in vergleichbarer Stärke exprimiert wird, bestanden deutliche Unterschiede zwischen DZ-Gesamtpopulationen aus Thymus und Milz hinsichtlich der MHC Klasse II-vermittelten OVA-Präsentation *ex vivo*. Diese Ergebnisse deuteten bereits darauf hin, dass der Beladung Dendritischer Zellen im Thymus ein sehr effizienter Ag-Transfer-Mechanismus zugrunde liegt. Die nachfolgenden Studien an KM-Chimären stützten diese These, indem sie eine strikte Abhängigkeit der DZ-Beladung von der Expression des Antigens durch radioresistente Thymus-Stromazellen belegten.

Um den für die Ag-Synthese verantwortlichen Stroma-Zelltyp näher spezifizieren zu können, wurde die funktionelle *ex vivo*-Analyse der Ag-Präsentation auf das gewebespezifische Tumor-Abstoßungs-Ag P1A (*Tumor Rejection Antigen* P1A) ausgedehnt, dessen promiske Expression in früheren Arbeiten als mTEZ-spezifisch charakterisiert worden ist. Des Weiteren sollte die funktionelle Analyse mithilfe eines MHC-Klasse-I restringierten TZR-transgenen P1A-Detektionssystems Einblicke in mögliche Gemeinsamkeiten und Unterschiede der MHC Klasse I- und Klasse II- vermittelten Ag-Präsentation im Zuge der TZ-Selektion im Thymus erlauben.

## 3.3.1 Die Expression des gewebespezifischen Autoantigens P1A in Balb/c-Mäusen ist auf mTEZ beschränkt

Bei P1A handelt es sich um ein 26 kDa großes Protein, welches zunächst als dominantes Ag einer gegen das Maus-Mastozytom P815 gerichteten TZ-Antwort identifiziert wurde. In peripheren gesunden Geweben konnte lediglich in Testes eine starke Expression nachgewiesen werden, darüber hinaus ist die genaue physiologische Funktion unbekannt. Die P1A-Expression verschiedener APZ-Populationen des Thymus wurde von Derbinski und Kollegen für C57BL/6-Mäuse (MHC-Haplotyp H-2<sup>b</sup>) detailliert beschrieben (Derbinski et al., 2001). Demnach wird P1A intrathymisch stark von mTEZ exprimiert. Eine schwache Expression wurde jedoch auch in kortikalen TEZ (kTEZ) und Thy-DZ detektiert.

Für die nachfolgenden funktionellen *ex vivo*-Analysen der P1A-Präsentation wurden Balb/c-Mäuse als APZ-Donoren verwendet, bedingt durch die H-2<sup>d</sup>-Restriktion der verwendeten TZRtg P1A-spezifischen TZ.

Da bekannt ist, dass sich verschiedene Mausstämme hinsichtlich der Expressionsstärke diverser Antigene unterscheiden können (Egwuagu et al., 1997; Liu et al., 2001), wurden die Befunde von Derbinski et al. zunächst für die relevanten Zellpopulationen aus Balb/c-Mäusen geprüft. Zu diesem Zweck wurde mRNA aus hochreinen (≥ 98%) Mz-DZ, Thy-DZ und mTEZ isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die anhand

eines β-Aktin-Abgleichs normalisierte cDNA der unterschiedlichen Zellpopulationen wurde anschließend mittels semiquantitativer RT-PCR-Analyse auf Ihren P1A-Transkript-Gehalt hin untersucht.



<u>Abb. 17:</u> Semiquantitative Analyse der TRAP1A-Expression in unterschiedlichen APZ-Populationen des Thymus und der Peripherie aus Balb/c-Mäusen. Die Analyse der P1A-Expression erfolgte mittels RT-PCR anhand von cDNA aus hochreinen ( $\geq$  98% Reinheit) Zellpopulationen. Zur Normalisierung der eingesetzten cDNA-Menge wurde ein  $\beta$ -Aktin Abgleich durchgeführt. In Mz-DZ und Thy-DZ war kein Amplikon nachweisbar.

Die P1A-Expression der verschiedenen Zellpopulationen ist in Abbildung 17 dargestellt. Im Gegensatz zu dem von Derbinski und Kollegen beschriebenen Expressionsmuster in C57BL/6-Mäusen, wo eine schwache P1A-Expression auch in kortikalen TEZ (kTEZ) und Thy-DZ nachgewiesen wurde, beschränkt sich die P1A-Expression in den untersuchten Zellpopulationen aus Balb/c-Mäusen ausschließlich auf mTEZ. Weder in Thy-DZ noch in Mz-DZ ist das P1A-Transkript nachweisbar. KTEZ waren nicht in die Untersuchungen eingeschlossen.

Es soll an dieser Stelle erwähnt werden, dass die P1A-Expression im direkten Vergleich in Balb/c-mTEZ deutlich stärker ausfällt als in C57BL/6-mTEZ (Daten nicht gezeigt). Ob dieser Befund physiologische Relevanz besitzt, wurde jedoch im Zuge der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

## 3.3.2 Die Präsentation von endogenem P1A durch APZ-Populationen aus Balb/c (Wt)-Mäusen

In zahlreichen Studien wurde die Beteiligung unterschiedlicher APZ-Populationen an der negativen Selektion von Ag-spezifischen Thymozyten *in vivo* untersucht. Meist bediente man sich hierfür einer Simulation der promisken Genexpression durch Verwendung gebräuchlicher Modell-Antigene unter der Kontrolle von gewebespezifischen, aber auch in mTEZ aktiven Promotoren, wie beispielsweise im RIP-mOVA Modellsystem (Kurts *et al.*, 1996). Diese Studien legen die Vermutung nahe, dass sowohl Thy-DZ, als auch mTEZ im Zuge der zentralen Toleranzinduktion in der Lage sind, CD8<sup>+</sup> Thymozyten Ag-spezifisch zu deletieren, wenn die Expression des Antigens auf mTEZ beschränkt ist (Gallegos und Bevan, 2004). Dies wiederum setzt die effiziente Präsentation des Antigens durch beide Zelltypen voraus.

Wie eingangs gezeigt, besteht eine zuverlässige Möglichkeit der Abschätzung der separaten Präsentation durch mTEZ oder Thy-DZ in der Kokultur dieser hochangereicherten APZ-Populationen mit naiven, Ag-spezifischen TZ *ex vivo*. Auf diese Weise wurde nun auch die MHC-Klasse I-restringierte Präsentation von P1A als Beispiel eines nativen gewebespezifischen Autoantigens untersucht.

Zu diesem Zweck wurden DZ aus Thymus und Milz sowie mTEZ aus Balb/c (Wt)-Tieren -wie unter 3.1 beschrieben- angereichert und in definierter Zellzahl mit 5 x 10<sup>4</sup> naiven, CD8<sup>+</sup> TZ aus P1A-TZRtg x Rag<sup>o/+</sup>-Mäusen (Shanker *et al.*, 2004) für 65-72 h kokultiviert. Daran schloss sich eine 16-20-stündige Inkubationsphase in Anwesenheit von 1 µCi <sup>3</sup>H-Thymidin an. Da CD8<sup>+</sup> TZ leichter als CD4<sup>+</sup> TZ durch eine unspezifische Stimulation ihres Korezeptors aktiviert werden können, erfolgte die Isolierung der TZ in diesem Fall durch eine "negative" MACS-Separation, die in der Depletion unerwünschter Zelltypen besteht. CD8<sup>+</sup>-T-Zellen blieben weitestgehend unberührt.

Die Kokultur von P1A-TZRtg TZ mit CD11c<sup>+</sup> Thy-DZ resultiert in einer deutlichen Proliferation der TZ in Abhängigkeit von der eingesetzten APZ-Zahl (Abb. 18). Die verhältnismäßig schwache <sup>3</sup>H-Inkorporation nach Stimulation mit der höchsten Anzahl an Thy-DZ (3 x 10<sup>5</sup>) wurde sowohl im P1A-, als auch im Ld-nOVA-Modellsystem häufiger beobachtet und deutet vermutlich auf eine Überstimulation der TZ hin. Ein sehr starker Stimulus kann durch eine beschleunigte Aktivierung und Proliferation der Mehrheit der Ag-spezifischen TZ zu einer frühzeitigen Erschöpfung der Edukte sowie einer Anreicherung von toxischen Produkten des Zellstoffwechsels innerhalb des Mikromilieus des Versuchsansatzes führen. Ähnliche Beobachtungen wurden auch für die als Positiv-Kontrollen durchgeführten Versuchsansätze zur Präsentation von exogenem Ag gemacht (Abb. 11, Abb. 19). Auch hier zeigen die Stimulationsansätze mit den höchsten APZ-Zahlen oftmals reduzierte Proliferationsraten.



<u>Abb. 18:</u> P1A-spezifische Proliferation von CD8<sup>+</sup>-TZ aus P1A-TZRtg-Mäusen als Antwort auf die Präsentation von endogenem P1A, Epitop AS<sub>35-43</sub>. Dargestellt ist jeweils die Proliferation von initial 5 x 10<sup>4</sup> TZRtg CD8<sup>+</sup> TZ nach 92 h Kokultur mit Balb/c (Wt)-APZ-Populationen. Die letzten 20 h der Kokultur erfolgten in Anwesenheit von 1  $\mu$ Ci <sup>3</sup>H-Thymidin/Ansatz. Die Proliferation wurde anhand der eingebauten Radioaktivität bestimmt.

Da diese Diskrepanz aber keinen Einfluss auf die Gesamtaussage des jeweiligen Experiments ausübt, wurden vor dem Hintergrund der Komplexität der Versuche keine Anstrengungen zur Optimierung der Messbarkeit unternommen.

Eine Präsentation von endogenem P1A durch mTEZ und Mz-DZ war zunächst nicht nachweisbar.

Anders als im OVA-System zeigen die untersuchten APZ-Populationen hier auch Unterschiede in der Präsentationseffizienz von exogenem Ag. In Anwesenheit von P1A-Peptid fällt die Proliferation der transgenen TZ unter Verwendung von mTEZ und Mz-DZ als APZ im Vergleich mit Thy-DZ schwächer aus.

Wie aus Abbildung 23 hervorgeht, unterscheiden sich Thy-DZ und Mz-DZ in der Präsentation von endogenem P1A in allen Versuchen durchschnittlich um den Faktor 25-42, jedoch nur um den Faktor 2-3 bei der Präsentation von exogenem P1A-Peptid. Ähnliches kann für den Vergleich zwischen Thy-DZ und mTEZ festgestellt werden (Abb. 24), wenngleich die Unterschiede hier insgesamt geringer ausfallen (Präsentation von endogenem P1A:  $\approx$  7-23-fach; Präsentation von exogenem P1A:  $\approx$  1-4,5-fach). Es ist daher unwahrscheinlich, dass der geringe Unterschied bei der Präsentation von exogenem Ag (Abb. 19) eine Erklärung für die unterschiedliche Effizienz in der Präsentation von endogenem P1A liefert (Abb. 18).



<u>Abb. 19:</u> P1A-spezifische Proliferation von CD8<sup>+</sup>-TZ aus P1A-TZRtg-Mäusen als Antwort auf die Präsentation von exogenem P1A-Peptid (AS<sub>35-43</sub>). Die Durchführung dieses Experiments erfolgte analog zu der Beschreibung unter Abb. 12. Zusätzlich wurde zu jedem Versuchsansatz 1  $\mu$ g/ml P1A-Peptid (AS<sub>35-43</sub>) hinzugefügt.

Die promiske Expression der meisten GSA ist nach aktuellem Kenntnisstand auf mRNA- und auf Proteinebene auf 1-5% aller mTEZ beschränkt (Derbinski *et al.*, 2001; Klein *et al.*, 2001; Avichezer *et al.*, 2003). Auf obige Versuchsansätze bezogen, bedeutet dies, dass maximal 3000-15000 von 3 x  $10^5$  eingesetzten mTEZ P1A präsentieren können, vorausgesetzt, dass P1A nicht zwischen mTEZ transferiert wurde (vergleiche auch 3.2.4).

Um die Anzahl der effektiv P1A-präsentierenden mTEZ in den Stimulationsansätzen zu erhöhen, wurde im folgenden Versuchsansatz eine Unterteilung der Gesamt-mTEZ Fraktion anhand der Expression des kostimulatorischen Oberflächenmoleküls CD80 vorgenommen. Aktuelle Studien schlagen CD80 als Marker des Reifungs- oder Aktivierungszustandes von mTEZ vor (Derbinski *et al.*, 2005; Rossi *et al.*, 2007; Dissertation J. Gäbler). Tatsächlich korreliert die Oberflächenexpression von CD80 mit der Expressionsstärke zahlreicher GSA in mTEZ. Auf mRNA-Ebene konnte auch für P1A eine Steigerung der Expression in Zellen nachgewiesen werden, die zuvor anhand einer starken CD80-Oberflächenexpression sortiert worden waren.



<u>Abb. 20:</u> *Ex vivo*-Aktivierung von CD8<sup>+</sup>-TZ aus P1A-TZRtg-Mäusen durch verschiedene mTEZ (Sub-)-Populationen. Dargestellt ist jeweils die Proliferation von initial 5 x 10<sup>4</sup> TZRtg CD8<sup>+</sup> TZ nach 92 h Kokultur mit Balb/c (Wt)-APZ-Populationen. Man beachte den Unterschied der TZ-Proliferation nach Inkubation mit CD80<sup>hoch</sup>und CD80<sup>niedrig</sup>-exprimierenden mTEZ.



<u>Abb. 21:</u> P1A-spezifische Proliferation von CD8<sup>+</sup>-TZ aus P1A-TZRtg-Mäusen als Antwort auf die Präsentation von exogenem P1A-Peptid (AS<sub>35-43</sub>). Die Durchführung dieses Experiments erfolgte analog zu der Beschreibung unter Abb. 20. Zusätzlich wurde jedem Versuchsansatz 1 µg/ml P1A-Peptid (AS<sub>35-43</sub>) zugefügt.

Funktionell entsprechen die differentiellen, durch CD80<sup>hoch</sup>- und <sup>-niedrig</sup>-exprimierende mTEZ induzierten Proliferationsraten den Unterschieden in der RNA-Expression zwischen beiden Subpopulationen (Abb. 20; persönliche Mitteilung von Jana Gäbler). Durch die Ko-Anreicherung P1A-präsentierender mTEZ im Zuge der Sortierung der CD80<sup>hoch</sup>- exprimierenden Subpopulation war es erstmals möglich, die Präsentation eines nativen GSA durch mTEZ *ex vivo* nachzuweisen. Die Ag-Präsentation durch CD80<sup>hoch</sup>-exprimierende mTEZ entspricht in ihrer Effizienz ungefähr einem Drittel der Präsentation durch die vergleichbare Anzahl an Thy-DZ.

Limitierender Faktor bei der Durchführung der in den Abbildungen 20 und 21 gezeigten Experimente war die Zellzahl der mTEZ-Subpopulationen. Bedingt durch die (verlustreiche) durchflusszytometrische Sortierung sowie die hohen Zellzahlen, die für eine Detektion der endogenen P1A-Präsentation benötigt werden, repräsentieren die hier dargestellten Werte lediglich Einzelereignisse und keine Mittelwerte aus Triplikat-Ansätzen. Weitere Experimente sind nötig, um die Aussagekraft der hier gezeigten vorläufigen Ergebnisse zu stützen.



<u>Abb. 22:</u> Die effektive Präsentation von endogenem P1A (Epitop<sub>35-43</sub>) ist im Gegensatz zur Präsentation von exogenem P1A-Peptid in Thy-DZ im Vergleich zu Mz-DZ stark erhöht. Dargestellt ist der Quotient aus der <sup>3</sup>H-Inkorporation transgener TZ, bedingt durch Thy-DZ-induzierte Proliferation und der Proliferation, die durch Mz-DZ induziert wurde, in Abwesenheit (A) oder Gegenwart (B) von exogenem P1A-Peptid (AS<sub>35-43</sub>) für die Gesamtdauer des Versuchs. Jeder Buchstabe bezeichnet ein unabhängiges Experiment der jeweiligen Versuchsreihe. MW: Mittelwert.

73



<u>Abb. 23:</u> Die effektive Präsentation von endogenem P1A (Epitop<sub>35-43</sub>) und exogenem P1A-Peptid in Thy-DZ im Vergleich zu mTEZ. Dargestellt ist der Quotient aus der <sup>3</sup>H-Inkorporation transgener TZ, bedingt durch Thy-DZ-induzierte Proliferation und der Proliferation, die durch mTEZ induziert wurde, in Abwesenheit (A) oder Gegenwart (B) von exogenem P1A-Peptid (AS<sub>35-43</sub>) für die Gesamtdauer des Versuchs. Jeder Buchstabe bezeichnet ein unabhängiges Experiment der jeweiligen Versuchsreihe. MW: Mittelwert.

## 3.3.3 Bei der MHC Klasse I-vermittelten Präsentation von P1A handelt es sich um Kreuz-Präsentation von extrazellulärem Antigen

Die Befunde aus 3.3.1 und 3.3.2 deuten darauf hin, dass der in Kokultur mit Thy-DZ gemessenen Proliferation der P1A-responsiven TZ ein Ag-Transfer von mTEZ auf Thy-DZ zugrunde liegt. In einem solchen Fall wäre die MHC-Klasse I-vermittelte Präsentation als Kreuz-Präsentation zu bezeichnen, da das präsentierte Ag nicht intrazellulären Ursprungs ist, sondern von DZ mit Hilfe diverser Mechanismen aufgenommen wird (Bevan, 2006).

Um die Quelle des von Thy-DZ präsentierten P1A exakt zu definieren, wurde die P1A-Expression durch Thy-DZ experimentell ausgeschlossen, indem letal bestrahlte Balb/c-Mäuse mit Knochenmark aus P1A-*knock out* (KO)-Mäusen (B. van den Eynde, Brüssel) rekonstituiert wurden. Als Kontrollpopulation wurden Balb/c-Mäuse verwendet, die mit Knochenmark aus Wt-Geschwistern der P1A-KO Mäuse rekonstituiert worden waren.

Im Anschluss an eine Rekonstitutionsphase von 5 Wochen wurden die bereits zuvor untersuchten APZ-Populationen aus Thymus und Milz isoliert und mit den unter 3.3.2 beschriebenen TZRtg-TZ kokultiviert. Parallel wurde auch hier der Chimerismus anhand genomischer Milzzell-DNA aus den rekonstituierten Empfängertieren abgeschätzt. Wie den PCR-Ergebnissen in Abbildung 24 entnommen werden kann, konnte in beiden Chimären-Ansätzen keine DNA des jeweils konträren P1A-Lokus in der Milz nachgewiesen werden.



Abb. 24: Abschätzung des Chimärismus Transfer P1A-KOnach von Knochenmark in letal bestrahlte Balb/c-Mäuse. 5-6 Wochen nach dem Transfer von 5 x 10<sup>6</sup> Knochenmarkzellen aus P1A-KO Mäusen in lethal (85 Gy) bestrahlte Balb/c-Empfängertiere wurde der Chimärismus anhand genomischer Milzzell-DNA bestimmt. Zu diesem Zweck wurde DNA aus vereinigten Finzelzellsuspensionen von 5 Milzen mittels PCR auf die Präsenz des P1A-KO-Konstrukts hin untersucht.





<u>Abb. 25:</u> Vergleich der P1A-Präsentation durch APZ-Populationen aus P1A-KO $\rightarrow$ Balb/c-KM-Chimären mit äquivalenten Zellpopulationen aus (P1A-KO)Wt-Geschwister $\rightarrow$ Balb/c-KM-Chimären. Dargestellt ist die Proliferation von initial 5 x 10<sup>4</sup> CD8<sup>+</sup> P1A-TZRtg TZ als Antwort auf die Präsentation von endogenem P1A durch die jeweiligen APZ-Population aus P1A-KO $\rightarrow$ Balb/c- und (P1A-KO)Wt-Geschwister $\rightarrow$ Balb/c-KM-Chimären.

76

Die Kokultur der Thy-DZ aus P1A-KO→Balb/c-KM-Chimären mit P1A-responsiven TZ führt zu einer deutlichen, wenn auch im Vergleich mit Balb/c(Wt)-Thy-DZ schwächeren Proliferation der TZ. Da aber bereits die Maximalwerte der durch Balb/c (Wt)-Thy-DZ induzierten Proliferation großen interexperimentellen Schwankungen unterliegen (siehe Abb. 22, 23), ist lediglich der intraexperimentelle Vergleich der Proliferationsraten von Kokulturen mit APZ aus P1A-KO→Balb/c- oder (P1A-KO)Wt-Geschwister→Balb/c-Chimären aussagekräftig. Hier zeigt sich, dass Thy-DZ aus beiden Chimären-Populationen in ähnlichem Ausmaß in der Lage sind, eine P1A-spezifische Proliferation zu induzieren. Dies lässt den Schluss zu, dass eine mögliche P1A-Expression unterhalb der Detektionsgrenze durch Thy-DZ in Balb/c-Mäusen keinen messbaren Einfluss auf die P1A-Präsentation dieser Zellpopulation ausübt.

Die von (Gesamt-) mTEZ und Mz-DZ induzierten Proliferationsraten lassen wiederum auf eine schwache P1A-Präsentation schließen.

Die hier geschilderten Ergebnisse zeigen erstmalig *ex vivo* am Beispiel eines promisk exprimierten Autoantigens, dass Thy-DZ unter nativen Bedingungen konstitutiv Ag aus ihrer unmittelbaren Umgebung aufnehmen und in Kombination mit MHC Klasse I-Komplexen auf der Oberfläche präsentieren. Die von einer autochthonen P1A-Expression unabhängige P1A-Präsentation durch Thy-DZ lässt den Schluss zu, dass es sich hierbei um Kreuz-Präsentation handelt. MTEZ (-Subpopulationen) hingegen waren imstande, autochthon synthetisiertes P1A effizient zu präsentieren. Die starke P1A-Expression durch mTEZ legt nahe, dass sie sich dabei des konventionellen MHC-Klasse I-Beladungswegs bedienen.

## 3.4 Präsentation des Autoantigens *Proteolipid Protein* durch Thy-DZ ex vivo

In den vorangegangenen Abschnitten konnten sowohl die MHC-Klasse II-vermittelte Präsentation des ubiquitär exprimierten *neo*-Autoantigens OVA, als auch die MHC-Klasse I-vermittelte Präsentation des nativen Tumor-Abstoßungs-Antigens P1A durch Thy-DZ und mTEZ experimentell nachgewiesen werden.

In früheren *in vivo* Studien zeigten sich allerdings deutliche Unterschiede zwischen Thy-DZ und mTEZ im Hinblick auf ihre Fähigkeit, CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Thymozyten negativ zu selektionieren. Während sowohl Thy-DZ als auch mTEZ analog zu den hier gezeigten Daten in der Lage waren, CD8<sup>+</sup>-Thymozyten zu deletieren, war für die negative Selektion des CD4<sup>+</sup>-Repertoires die Ag-Präsentation durch hämatopoetische Zellen erforderlich (Gallegos und Bevan, 2004). Der Frage, ob und in welcher Weise sich die MHC Klasse II-restringierte Präsentation eines GSA durch mTEZ und Thy-DZ unterscheidet, sollte nachfolgend am Beispiel des Autoantigens *Proteolipid Protein* (PLP) nachgegangen werden.

## 3.4.1 MTEZ exprimieren PLP und DM20 deutlich stärker als Thy-DZ

PLP, ein 30 kDa großes integrales Membranprotein mit vier Transmembrandomänen, ist der Hauptbestandteil der axonalen Myelinscheiden des ZNS. PLP ist phylogenetisch hoch konserviert zwischen Maus und Mensch und wird als Autoantigen zur Induktion der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) im Multiple-Sklerose-Mausmodell verwendet.

Vor diesem Hintergrund ist die zentrale Toleranzinduktion gegen PLP im Thymus von besonderem Interesse. Frühere Studien haben gezeigt, dass mTEZ, welche die größte PLP-Quelle im Thymus darstellen, vorrangig DM20 exprimieren, eine Spleißvariante von PLP (Klein *et al.*, 2000, Abb. 26). Die differentielle Expression von PLP und DM20 sollte also zunächst für mTEZ und Thy-DZ verifiziert und mit der Expression in peripheren Mz-DZ verglichen werden.

	1	11	21	31	41	51	
1	MGLLECCARC	LVGAPFASLV	ATGLCFFGVA	LFCGCGHEAL	TGTEKLIETY	FSKNYQDYEY	60
61	LINVIHAFQY	VIYGTASFFF	LYGALLLAEG	FYTTGAVRQI	FGDYKTTICG	KGLSATVTGG	120
121	QKGRGSRGQH	QAHSLERVCH	CLGKWLGHPD	KFVGITYALT	VVWLLVFACS	AVPVYIYFNT	180
181	WTTCQSIAFP	SKTSASIGSL	CADARMYGVL	PWNAFPGKVC	GSNLLSICKT	AEFQMTFHLF	240
241	IAAFVGAAAT	LVSLLTFMIA	ATYNFAVLKL	MGRGTKF			
X: Fehlt in Spleißvariante DM20							
X: PLP Epitop 15-5-2							

Abb. 26: PLP-/DM20-Aminosäuren-Sequenz (Mus musculus)



<u>Abb. 27:</u> Quantitative Analyse der PLP- und DM20-Expression in APZ-Populationen des Thymus und der Peripherie. Die Expression beider Spleißvarianten wurde mittels Echtzeit-PCR anhand von cDNA aus hochreinen ( $\geq$  95% Reinheit) Zellpopulationen analysiert. A) zeigt die relativen Unterschiede der Expressionsstärke zwischen den angegebenen Zellpopulationen. Die Kalkulation der zugrunde liegenden Expressionsstärken erfolgte wie für mTEZ unter B) beschrieben. Dargestellt in **B**) ist die mittels  $\Delta\Delta$ ct-Methode quantifizierte relative Expression in mTEZ unter Verwendung von Aktin zur Normalisierung. Die PLP-Expression wurde gleich 1 gesetzt.

Wie zu erwarten war, werden sowohl PLP als auch die Spleißvariante DM20 in mTEZ deutlich stärker exprimiert als in Thy-DZ oder Mz-DZ (Abb. 27A). Dabei fällt auf, dass die relativen Expressionsunterschiede zwischen mTEZ und den untersuchten DZ-Populationen im Hinblick auf PLP deutlich größer sind, als für DM20. Insgesamt überwiegt jedoch die Expression der DM20-Spleißvariante sowohl in mTEZ (Abb. 27B), als auch, wenngleich deutlich schwächer, in Thy-DZ und Mz-DZ, wodurch die geringeren relativen DM20-Expressionsunterschiede zwischen den analysierten Zellpopulationen zu erklären sind. Mz-DZ und Thy-DZ weisen für beide Varianten nur geringe Expressionsunterschiede auf.

Es ist also davon auszugehen, dass eine intrathymische Präsentation des im folgenden Abschnitt beschriebenen PLP-Epitops zu einem Großteil auf die PLP- und DM20 Expression durch mTEZ zurückzuführen ist.

#### 3.4.2 PLP wird von Thy-DZ effizient präsentiert

Klein und Kollegen konnten bereits 2000 zeigen, dass verschiedene PLP-Epitope mit unterschiedlicher Effizienz Toleranz induzieren (Klein *et al.*, 2000). Ausschlaggebendes Kriterium war dabei die fehlende Reaktivierbarkeit von Epitop-spezifischen T-Zellen *ex vivo* nach vorangegangener Immunisierung mit PLP-Gesamtprotein. Dieser Effekt wurde auf die differentielle Expression verschiedener PLP-Epitope durch APZ des Thymus zurückgeführt, die ihrerseits in der selektiven Deletion bestimmter TZR-Spezifitäten resultierte. TZ mit der Spezifität für PLP-Epitope, welche im Thymus nicht oder unter-repräsentiert waren, konnten hingegen in die Peripherie gelangen und durch PLP-Immunisierung aktiviert werden. Aufgrund des von Klein et al. gewählten *in vivo*-Versuchsmodells war es aber nicht möglich, die PLP-Präsentation im Thymus einem bestimmten Zelltyp zuzuordnen.

Um dies zu erreichen, sollte im folgenden Abschnitt die Aktivierbarkeit einer T-Zelllinie, deren Rezeptor gegen das im Thymus stark repräsentierte PLP-Epitop 15-5-2 (AS<sub>239-250</sub>) gerichtet ist, durch die bereits bekannten APZ-Populationen des Thymus und der Peripherie *ex vivo* geprüft werden. Es sollte an dieser Stelle erwähnt werden, dass das ausgewählte PLP-Epitop sowohl Bestandteil des Gesamtproteins als auch der im Thymus dominant exprimierten Spleißvariante DM20 ist (siehe Abb. 26).

Zur Gewinnung der T-Zelllinie TPLP15-5-2 wurden von Dr. Ludger Klein frischisolierte CD4<sup>+</sup> TZ aus PLP-immunisierten PLP-KO-Mäusen durch wiederholte Stimulation mit autologen APZ und dem oben genannten PLP-Peptid (AS<sub>239-250</sub>) klonal expandiert. Diese Zellen wurden für den hier geschilderten Versuchsansatz mindestens 2, höchstens jedoch 3 ½ Wochen nach der letzten Re-Stimulation der TZ-Linie *in vitro* mit hochreinen APZ-Populationen aus 6-8 Wochen alten C57BL/6-Mäusen (♀) kokultiviert. Die Detektion der Ag-Präsentation erfolgte, wie bereits unter 3.2.2 und 3.3.2 geschildert, nach 85-90 h durch Messung der <sup>3</sup>H-[Tdr]-Inkorporation im Zuge der Ag-spezifischen TZ-Proliferation.

Bei der Betrachtung der Präsentation von exogenem PLP-Peptid fällt erneut auf, dass Thy-DZ und Mz-DZ nur geringe funktionelle Unterschiede in der Präsentationseffizienz aufweisen, sofern das Ag im Überschuss vorliegt (Abb. 28A). Für die Ag-Präsentation durch mTEZ wurden im Rahmen der dargestellten Experimente keine Positivkontrollen durchgeführt, da stets alle isolierten Zellen für die Analyse der endogenen Ag-Präsentation benötigt wurden. In Bezugnahme auf die unter 3.2.2 dargestellte, MHC Klasse II-vermittelte Präsentation von exogenem OVA-Peptid darf jedoch für das hier in gleicher Konzentration zugesetzte PLP-Peptid eine ähnlich effiziente Präsentation durch mTEZ angenommen werden, wie sie für Thy- und Mz-DZ gezeigt werden konnte (Abb. 28A).



B)



<u>Abb. 28:</u> PLP-spezifische Proliferation von der T-Zelllinie TPLP15-5-2 als Antwort auf die Präsentation von exogenem PLP-Peptid ( $AS_{239-250}$ ) sowie endogenem PLP, Epitop 15-5-2. A) Dargestellt ist jeweils die Proliferation von initial 5 x 10<sup>4</sup> CD4<sup>+</sup> TZ nach 89 h Kokultur mit C57BL/6(Wt)-APZ-Populationen in Anwesenheit von 1 µg/ml PLP-Peptid. B) Die Durchführung erfolgte wie unter A beschrieben, jedoch ohne Zugabe von PLP-Peptid.

Anders verhält es sich wiederum bei der Präsentation von endogenem PLP. Analog zu den bereits im OVA- und im P1A-System gemachten Beobachtungen ist auch hier die stärkste TZ-Proliferation in Kokultur mit Thy-DZ zu verzeichnen (Abb. 28B). Mz-DZ und mTEZ induzieren hingegen lediglich eine schwache Proliferation. Im Gegensatz zum MHC Klasse I-restringierten P1A-System (s. 3.3.2) ist durch die Anreicherung CD80<sup>hoch</sup>-exprimierender mTEZ aber keine verbesserte Präsentation des PLP-Epitops zu erzielen (Daten nicht gezeigt).

Zusammengefasst liefern die vorliegenden Ergebnisse einen Beleg dafür, dass die Expression durch mTEZ und der anschließende Transfer auf Thy-DZ auch eine Grundvoraussetzung für die Präsentation eines promisk exprimierten, MHC Klasse II-restringierten Autoantigens sind. Der Ausschluss von Thy-DZ als Ag-Quelle durch die Generierung von KM-Chimären aus PLP-KO-Knochenmark und Wt-Empfängertieren und somit der endgültige Beweis für TEZ als entscheidende Ag-Quelle war im Zuge der vorliegenden Arbeit nicht möglich.

Dennoch lässt die in diesem Kapitel gezeigte effiziente Präsentation des endogenen MHC Klasse II-restringierten PLP-Epitops 15-5-2 durch Thy-DZ vor dem Hintergrund der PLP- und DM20-Expressionsanalysen ebenfalls darauf schließen, dass mTEZ, und nicht Thy-DZ, als primäre Ag-Quelle anzusehen sind.

# 3.5 Funktionelle und phänotypische Charakterisierung des Ag-Transfers von TEZ auf Thy-DZ

In allen hier untersuchten Modellsystemen war eine sehr effiziente und von autochthoner Expression weitgehend unabhängige Ag-Präsentation durch Thy-DZ *ex vivo* nachzuweisen. Eine notwendige Voraussetzung hierfür scheint die Expression des jeweiligen Antigens durch mTEZ zu sein, was wiederum einen der Präsentation vorausgehenden Ag-Transfer von mTEZ auf Thy-DZ erforderlich macht.

Bei diesem intrathymischen Ag-Transfer handelt es sich somit offenbar um einen konstitutiven und hoch effizienten Mechanismus, der sowohl die MHC Klasse I- als auch die MHC Klasse II-vermittelte Präsentation endogener ubiquitärer und gewebespezifischer Antigene durch Thy-DZ sicherstellt. Die dem Ag-Transfer zugrunde liegenden Mechanismen waren aus diesem Grund Gegenstand der weiteren Untersuchungen.

Des Weiteren wirft die offensichtliche Sonderstellung der Thy-DZ hinsichtlich der Präsentation endogener Antigene im Kontext der zentralen Toleranzinduktion die Frage auf, ob es sich hierbei um eine generelle Funktion Thymus-residenter DZ handelt, oder ob sich funktionelle Thy-DZ Subpopulationen anhand der differentiellen Präsentation endogener Antigene unterscheiden lassen. Auch diese Fragestellung sollte im folgenden Kapitel untersucht werden.

#### 3.5.1 Visualisierung des Ag-Transfers anhand des FoxN1-eGFP-Modells

Obwohl insbesondere der Transfer promisk exprimierter Antigene von mTEZ auf Thy-DZ mittlerweile als essentiell für die negative Selektion potentiell autoreaktiver Thymozyten (Gallegos und Bevan, 2004) sowie die positive Selektion von regulatorischen T-Zellen (Aschenbrenner *et al.*, 2007) angesehen wird, basiert diese Annahme lediglich auf indirekten Befunden. Der tatsächliche Proteintransfer zwischen beiden Zelltypen konnte bislang nicht nachgewiesen werden.

Das FoxN1-eGFP-Mausmodell, welches von Prof. Thomas Boehm (MPI für Immunbiologie, Freiburg) freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde, bietet erstmals die Möglichkeit, den interzellulären Austausch eines fluoreszierenden Proteins zwischen mTEZ und Thy-DZ qualitativ und quantitativ zu analysieren. Diese Mäuse exprimieren eine Variante des *green fluorescent protein* (GFP) der Qualle *Aequorea victoria*, das sogenannte *enhanced*-GFP (eGFP), unter der Kontrolle des thymusepithelzell-spezifischen FoxN1-Promotors. Bei eGFP handelt es sich um ein 29 kDa großes Monomer, welches durch die Insertion humaner Codon-Sequenzen für die Expression in Säugersystemen optimiert wurde (Yang *et al.*, 1996). Obwohl ein zyklisches Tripeptid, bestehend aus den AS<sub>65-67</sub>, als minimales

Fluorochrom beschrieben wurde, scheint die intakte Tertiärstruktur für die Fluoreszenz notwendig zu sein.

Der zu der Familie der *forkhead-box* Proteine gehörende FoxN1-Transkriptionsfaktor hingegen spielt offensichtlich eine essentielle Rolle bei der Determination des epithelialen Zellschicksals im Thymus und wird konstitutiv von kortikalen und medullären TEZ exprimiert (Bleul *et al.*, 2006).



<u>Abb. 29:</u> Schematische Darstellung des zur Herstellung der transgenen FoxN1-eGFP-Mäuse verwendeten Konstrukts. A) Das FoxN1-Promotorfragment wurde an der BamH1-Restriktionsschnittstelle stromaufwärts der eGFP-cDNA in den pEGFP-N3-Vektor (Clontech) kloniert. Anschließend wurde das linearisierte Konstrukt in Pronuklei von FVB-Mäusen injeziert. B) Der eGFP-Transfer von mTEZ auf Thy-DZ sollte in einer fluoreszierenden Thy-DZ-Subpopulation resultieren.

Die Regulierung der eGFP-Expression durch den FoxN1-Promotor sollte somit die eGFP-Expression auf TEZ limitieren. Die Detektion grüner Fluoreszenz in Thy-DZ würde demnach bedeuten, dass intaktes eGFP-Protein oder, weit weniger wahrscheinlich, funktionelle mRNA von TEZ auf Thy-DZ transferiert worden ist (Abb. 29). Um dies zu untersuchen, wurden Thy-DZ aus 8-12 Wochen alten FoxN1-eGFP-Mäusen durch Magnetseparation der CD11c<sup>+</sup> Zellpopulation vorangereichert und mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen CD11c, CD45 und EpCAM markiert. Parallel wurden Thy-DZ aus Balb/c-Mäusen als Negativkontrolle in gleicher Weise vorbehandelt. Die Messungen erfolgten an einem FACSCanto II<sup>®</sup>- Durchflusszytometer.



<u>Abb. 30:</u> EGFP<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> Thy-DZ lassen sich selektiv in Thymus-Präparationen aus FoxN1-eGFP Mäusen nachweisen. A+B) Aus Thymuseinzelzellpräparationen von FoxN1-eGFP- und Balb/c-Mäusen wurden nach sequentiellem Enzymverdau CD11c<sup>+</sup>-Zellen durch Magnetseparation (Miltenyi MACS<sup>®</sup>) vorangereichert und nach Ausschluss autofluoreszenter Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Man beachte, dass CD11c-/eGFP-doppelt-positive Zellen nur in FoxN1-eGFP-Präparationen (A), nicht aber in Balb/c-Mäusen nachzuweisen sind (B).

Nach Ausschluss der autofluoreszenten Zellen anhand des unspezifischen Emissionssignals in nicht belegten Fluoreszenzkanälen wird eine deutlich abzugrenzende CD11c-/eGFP-doppelt-positive Population innerhalb der transgenen Zellpopulation sichtbar (Abb. 30). Diese eGFP<sup>+</sup> DZ-Subpopulation kann in Thymus-Zellpräparationen aus Balb/c-Mäusen nicht nachgewiesen werden. Um sicherzustellen, dass es sich bei diesen Zellen nicht um eGFP-exprimierende TEZ handelt, wurden CD45<sup>-</sup>EpCAM<sup>+</sup>-Zellen von der Analyse ausgeschlossen.

## 3.5.2 Die EpCAM-Oberflächenexpression von FoxN1-eGFP-Thy-DZ korreliert mit der eGFP-Fluoreszenz

Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt erwähnt, erfolgte die exakte Diskreminierung von mTEZ und Thy-DZ anhand der Oberflächenmarker CD45, dessen Expression auf Zellen hämatopoetischen Ursprungs beschränkt ist, und EpCAM, welches hauptsächlich von epithelialen Zellen exprimiert wird. Die Markierung mit dem EpCAM (gp40)-spezifischen Antikörper G8.8 erfasst allerdings nicht nur TEZ, sondern auch eine Teilpopulation von CD11c<sup>+</sup> Thymuszellen. Diese Population wurde von Farr und Kollegen erstmalig phänotypisch beschrieben, fand aber in der Folgezeit keine weitere Beachtung (Borkowski *et al.*,1996).



<u>Abb. 31:</u> Der prozentuale Anteil an eGFP-positiven Zellen ist in EpCAM-exprimierenden Thy-DZ stark erhöht. Durchflusszytometrische Analyse der CD11c- und EpCAM-Expression von FoxN1-eGFP-Thymuszellpräparationen nach Voranreicherung der CD11c<sup>+</sup>-Fraktion mittels Magnetseparation. Dargestellt ist die Gesamtpopulation nach Ausschluss von CD45<sup>-</sup> und autofluoreszenten Zellen.

Anhand der EpCAM-Verteilung lassen sich 3 distinkte Subpopulationen innerhalb der MACSangereicherten CD11c<sup>+</sup> Thy-DZ abgrenzen, welche sich sowohl in der Stärke der EpCAM-, als auch der CD11c-abhängigen Fluoreszenzemission unterscheiden. Die CD11c<sup>medium</sup>exprimierende Population, auf die ca. 40% der CD11c<sup>+</sup> Thy-DZ entfallen, zeigte keine EpCAM-spezifische Fluoreszenz. CD11c<sup>hoch</sup>-EpCAM<sup>medium</sup>-exprimierende Thy-DZ machten ca. 45% aller Thy-DZ aus, während etwa 15% der CD11c<sup>hoch</sup>-exprimierenden Thy-DZ auch ein starkes EpCAM-Fluoreszenzsignal zeigten (Abb. 31).

Interessanterweise korreliert die EpCAM-abhängige Emission der einzelnen Thy-DZ-Subpopulationen direkt mit der Intensität der eGFP-Fluoreszenz. Während innerhalb der CD11c<sup>medium</sup>-EpCAM<sup>negativ</sup>-Population keine eGFP-Emission detektierbar ist (< 3% eGFP<sup>+</sup>-Zellen), liegt der prozentuale Anteil eGFP-positiver Zellen innerhalb der CD11c<sup>hoch</sup>-EpCAM<sup>hoch</sup>-exprimierenden Subpopulation mit nahezu 47% am Höchsten (Abb. 31).



<u>Abb. 32:</u> EGFP-exprimierende TEZ lassen sich anhand ihrer CD11c-Expression deutlich von eGFP<sup>+</sup>-Thy-DZ abgrenzen. Durchflusszytometrische Analyse der CD11c- und EpCAM-Expression von FoxN1-eGFP-Thymuszellpräparationen. Dargestellt ist die Analyse der vereinigten Kollagenase-/Dispase-Fraktionen II-IV des sequentiellen Enzymverdaus nach Ausschluss von autofluoreszenten Zellen. Man beachte die deutliche Abgrenzung von Thy-DZ und TEZ anhand der differentiellen CD11c-Expression.

Dennoch liegt die eGFP-Emission der CD11c<sup>+</sup>-Fraktion deutlich niedriger, als die der eGFPexprimierenden Epithelzellfraktion, welche durch eine hohe EpCAM-Expression bei gleichzeitig niedriger CD11c-Expression charakterisiert ist (Abb. 32). Innerhalb der Epithelzellpopulation aus den hier untersuchten hemitransgenen FoxN1<sup>wt / eGFP</sup>-Mäusen beläuft sich der Anteil eGFP-positiver Zellen auf 87%.

Die verschiedenen prozentualen Mengenverhältnisse in Abbildung 31 und Abbildung 32 sind vermutlich auf unterschiedliche Präparationsverfahren zurückzuführen. In Abbildung 31 ist eine Kombination der Verdaufraktionen Kollagenase I-III und Kollagenase/Dispase I (siehe 2.3.3.1) nach CD11c-basierter Magnetseparation dargestellt, was unter anderem das Fehlen einer EpCAM<sup>hoch</sup>-CD11c<sup>niedrig</sup>-exprimierenden Population erklärt. Abbildung 32 zeigt die vereinigten Fraktionen Kollagenase/Dispase II-V ohne weitere Voranreicherung.

# 3.5.3 Weder die eGFP- noch die EpCAM-Transkription korreliert mit dem durchflusszytometrischem Proteinnachweis in Thy-DZ

Die positive Korrelation der EpCAM-Oberflächenexpression mit der eGFP-Emission in Thy-DZ aus FoxN1-eGFP-Mäusen legt die Vermutung nahe, dass beide Proteine epithelialen Ursprungs sind und im Verlauf eines uni- oder bilateralen Austauschs zellulären Materials kotransferiert werden.

Um zu prüfen, ob die zur Unterteilung der Thy-DZ herangezogenen Markerproteine eGFP und EpCAM epithelialen Ursprungs sind oder von Thy-DZ selbst synthetisiert werden, wurde sowohl die FoxN1-, als auch die EpCAM-Expression in Thy-DZ und mTEZ auf RNA-Ebene untersucht. Zu diesem Zweck wurde mRNA aus durchflusszytometrisch hochgradig angereicherten Thymus-Zellpopulationen isoliert, in cDNA transkribiert und unter Verwendung FoxN1- und EpCAM-spezifischer Primer-Paare mittels Echtzeit-PCR analysiert. Wie aus Abbildung 33 hervorgeht, beschränkt sich die FoxN1-Expression ebenso wie die EpCAM-Expression auf mRNA-Ebene weitestgehend auf mTEZ. Lediglich in Thy-DZ, die anhand der membranständigen EpCAM-Proteinexpression vorsortiert worden waren, ließ sich eine schwache EpCAM-mRNA-Transkription detektieren.

Vergleicht man die Resultate der Echtzeit-PCR mit den in Abbildung 31 und 32 dargestellten durchflusszytometrischen Protein-Expressionsanalysen, so fällt auf, dass mRNA- und Protein-Expression im Falle beider Proteine lediglich in mTEZ, nicht aber in Thy-DZ korrelieren. So entspricht zwar die EpCAM-Proteinexpression auf CD11c<sup>hoch</sup>-EpCAM<sup>hoch</sup>-exprimierenden Thy-DZ näherungsweise der EpCAM-Expression auf mTEZ (Abb. 32), die mRNA-Expression ist aber in mTEZ um den Faktor 40 erhöht. Noch deutlicher fällt der Unterschied im Falle der FoxN1-abhängigen eGFP-Expression aus. Obwohl sich innerhalb der EpCAM<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>-Thy-DZ-Population eine deutliche eGFP-Emission detektieren lässt, ist die FoxN1-Expression in Thy-DZ im Vergleich mit mTEZ um den Faktor 250 reduziert.



<u>Abb. 33:</u> Quantitative Analyse der FoxN1- und EpCAM-Expression in mTEZ und Thy-DZ aus FoxN1-eGFP-Mäusen. Die Gen-Expression wurde mittels Echtzeit-PCR anhand von cDNA aus hochreinen ( $\geq$  99 % Reinheit) Zellpopulationen analysiert. Dargestellt ist die mittels  $\Delta\Delta$ ct-Methode quantifizierte relative Expression unter Verwendung von Ubiquitin (Ubc) zur Normalisierung. Die Expression in Thy-DZ (gesamt) wurde gleich 1 gesetzt. Man beachte die unterschiedliche Skalierung der Ordinaten in der linken und rechten Grafik.

Beide Resultate deuten darauf hin, dass EpCAM und eGFP maßgeblich von mTEZ synthetisiert und auf Thy-DZ übertragen werden. Während eGFP mutmaßlich makropinozytiert wird, also über klassische Endozytosewege in die Thy-DZ gelangt, spricht vieles dafür, dass dem EpCAM-Transfer ein Phänomen zugrunde liegt, welches als "Nibbling" bezeichnet wird. Dieser Begriff beschreibt den Austausch von Membranfragmenten zwischen vitalen Zellen, wie er erstmals für den Transfer von MHC Klasse II-Komplexen von Thy-DZ auf Thymozyten beschrieben wurde (Hudrisier et al., 2001). Als weiterer Transportweg kommt aufgrund der zellulären Lokalisation und der Größe der einzelnen Komponenten auch exosomaler Transfer (EpCAM- und eGFP-mRNA und Protein) in Frage (siehe auch 4.2.2).

# 3.5.4 Die differentielle EpCAM-Proteinexpression repräsentiert unterschiedliche Reifestadien der Thy-DZ

Die in Abschnitt 3.5.2 geschilderte Korrelation des Transfers intrazellulärer Antigene mit dem mutmaßlichen "Nibbling" von EpCAM legt nahe, dass sich EpCAM<sup>hoch</sup>-exprimierende Thy-DZ durch eine besonders effiziente Akquisition und Präsentation mTEZ-abgeleiteter Antigene auszeichnen. Eine solche funktionelle Prädisposition der EpCAM<sup>hoch</sup>-exprimierenden DZ-Subpopulation würde sich vermutlich auch in einer verstärkten Expression von MHC Klasse II-Komplexen und kostimulatorischen Molekülen ausdrücken, da diese Voraussetzung für eine effiziente Ag-Präsentation sind.

Um diese Annahme zu prüfen, wurden erneut Thy-DZ aus Balb/c-Mäusen nach sequentiellem Verdau mittels Magnetseparation vorangereichert und mithilfe fluoreszenzgekoppelter Antikörper auf die Expression relevanter Oberflächenmarker hin untersucht (siehe auch 3.1).

Die durchflusszytometrischen Analysen der Thy-DZ-Subpopulationen ergaben, dass die EpCAM-Expression, welche zur Unterteilung der Thy-DZ herangezogen wurde, in direkter Weise mit der Expression aller untersuchten Reifungs-/Aktivierungsmarker korreliert. So weist die EpCAM<sup>hoch</sup>-CD11c<sup>hoch</sup>-exprimierende Subpopulation auch die stärkste Expression von MHC-Klasse II-Komplexen (I-A<sup>d</sup>), CD80 und CD86 auf, während die EpCAM<sup>niedrig</sup>-CD11c<sup>medium</sup>-exprimierende Population diese Marker nur in geringem Ausmaß exprimiert (Abb. 34). Des Weiteren fällt auf, dass letztere Population deutlich weniger CD8α exprimiert als die beiden anderen Populationen bei gleichzeitig verstärkter Expression des Makrophagen-Markers F4/80. Dies lässt daran zweifeln, dass es sich bei dem Großteil dieser Population um DZ handelt. Da diese Subpopulation aber Bestandteil aller vorangegangenen funktionellen Analysen war, wurde sie auch in nachfolgenden Experimenten eingeschlossen. Weitere Experimente müssen zeigen, ob CD11c<sup>medium</sup>-CD8a<sup>-</sup>F4/80<sup>+</sup> Thymuszellen eine gesonderte, bislang nicht beachtete Rolle bei der Autoantigen-Präsentation im Thymus spielen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass EpCAM<sup>hoch</sup>-exprimierende Thy-DZ den höchsten Reifegrad aller CD11c<sup>+</sup> Zellen im Thymus aufweisen. Zusammen mit der verstärkten Aufnahme von TEZ-abgeleitetem Ag erscheint diese Thy-DZ-Subpopulation also in besonderer Weise geeignet, (promisk exprimierte) mTEZ-abgeleitete Antigene effizient zu präsentieren. Dieser Vermutung sollte im nächsten Kapitel nachgegangen werden.



<u>Abb. 34:</u> Phänotyp verschiedener Thy-DZ-Subpopulationen in Abhängigkeit der EpCAM-Oberflächenexpression. A) Der obere Teil der Abbildung zeigt die der Analyse zugrunde liegenden Auswahlkriterien. CD11c<sup>+</sup>, nicht-autofluoreszente Zellen aus weiblichen Balb/c-Mäusen wurden wie unter 3.5.2 beschrieben anhand der differentiellen Expression von EpCAM in drei Subpopulationen unterteilt. Die jeweilige Oberflächenexpression von EpCAM<sup>niedrig</sup>-exprimierenden DZ ist orange, die von DZ mit mittlerer EpCAM-Expression in Rot und von EpCAM<sup>noch</sup>-exprimierenden DZ in Dunkelrot dargestellt. B) Gezeigt wird ein Vergleich der medianen Fluoreszenz für alle untersuchten Oberflächenmoleküle aus A, wiederum unterteilt nach den jeweiligen Thy-DZ-Subpopulationen.

# 3.5.5 EpCAM<sup>+</sup>-Thy-DZ präsentieren endogene MHC Klasse II-restringierte Antigene mit hoher Effizienz

Die Präsentation eines endogenen Antigens durch Thy-DZ-Subpopulationen, welche anhand der differentiellen Oberflächenexpression des Markers EpCAM definiert wurden, sollte zunächst am L<sup>d</sup>-nOVA-Mausmodell untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden erneut CD11c<sup>+</sup> Thymuszellen aus Thymus-Einzelzellsuspensionen durch Magnetseparation vorangereichert und mittels fuoreszenzgekoppelter, gegen CD11c, EpCAM und CD45 gerichteter Antikörper markiert. Anschließend erfolgte die hochgradige Anreicherung der CD11c<sup>+</sup>-EpCAM<sup>niedrig</sup>- und CD11c<sup>+</sup>EpCAM<sup>hoch</sup>-exprimierenden Thy-DZ mithilfe eines FACSDiVa<sup>®</sup>-Durchflusszytometers. Die so gewonnenen Subpopulationen wurden, wie bereits unter 3.2.2 beschrieben, mit frisch isolierten CD4<sup>+</sup> DO11.10 TZ kokultiviert, wovon wiederum die letzten 20 h in Anwesenheit von 1  $\mu$ Ci <sup>3</sup>H-Thymidin erfolgten. Als Vergleichspopulationen wurden MACS-angereicherte CD11c<sup>+</sup> Gesamt-Thy-DZ und -Mz-DZ herangezogen.



<u>Abb. 35:</u> OVA-spezifische Proliferation von CD4<sup>+</sup> TZRtg-TZ aus DO11.10-Mäusen als Antwort auf die **Präsentation von exogenem OVA durch verschiedene L<sup>d</sup>-nOVA DZ-(Sub-)Populationen.** Die Durchführung dieses Experiments erfolgte analog zu der Beschreibung unter Abb. 10. Zusätzlich wurde jedem Versuchsansatz 1 µg/ml OVA-Peptid (AS 323-339) zugefügt.

Wie aus den vergleichbaren Proliferationsraten der DO11.10 TZ hervorgeht, unterscheiden sich Mz-DZ, Thymus-DZ und die EpCAM<sup>niedrig</sup>-exprimierende Thy-DZ-Subpopulation nur wenig in ihrer Kapazität, exogenes OVA-Peptid (AS 323-339) zu präsentieren (Abb. 35). Lediglich die Präsentation durch Gesamt-Thy-DZ scheint etwas effizienter zu sein, in

Übereinstimmung mit dem reiferen Phänotyp dieser Zellen (vgl. Abb. 8 und Abb. 34). Aufgrund der geringen Zellzahlen EpCAM<sup>hoch</sup>-exprimierender Thy-DZ und der Fokussierung auf die endogene Ag-Präsentation in diesem Experiment (siehe Abb. 36) liegen jedoch keine Daten bezüglich der Präsentation von exogenem Ag durch diese Subpopulation vor.

Demgegenüber zeigen die untersuchten (Sub-)Populationen deutliche Unterschiede in der Effizienz der Präsentation von endogenem OVA. Wie in Abschnitt 3.2.2 ist auch hier zunächst festzustellen, dass lediglich Thy-DZ, nicht aber Mz-DZ in der Lage sind, eine messbare TZ-Proliferation zu induzieren (Abb. 36).

Interessanterweise besteht darüber hinaus eine enge Korrelation zwischen der Präsentationseffizienz und dem Anteil an EpCAM<sup>hoch</sup>-exprimierenden Zellen innerhalb der untersuchten DZ-Population. So ist die Stimulation der transgenen TZ mit angereicherten EpCAM<sup>hoch</sup>-exprimierenden DZ deutlich effektiver als die Stimulation mit vergleichbaren Mengen an Gesamt-Thy-DZ. Letztere wiederum induzieren immer noch eine deutlich stärkere TZ-Proliferation als EpCAM<sup>niedrig</sup>-exprimierende Thy-DZ (siehe auch Abb. 10, Abb. 12A).



<u>Abb. 36:</u> Proliferation von CD4<sup>+</sup> DO11.10-TZ als Antwort auf die OVA-Präsentation durch verschiedene L<sup>d</sup>nOVA Thy-DZ-Subpopulationen. CD11c<sup>+</sup> L<sup>d</sup>-nOVA-Thy-DZ wurden anhand der differentiellen EpCAM-Oberflächenexpression durchflusszytometrisch in EpCAM<sup>hoch</sup>- und EpCAM<sup>niedrig</sup>-exprimierende Subpopulationen unterteilt und für 90 h mit CD4<sup>+</sup> DO11.10-TZ in 96-Loch-Platten kokultiviert. Unseparierte Thy-DZ und Mz-DZ Gesamtpopulationen dienten als positive bzw. negative Referenz.



<u>Abb 37:</u> Der prozentuale Anteil EpCAM-exprimierender Thy-DZ ist sowohl innerhalb der CD8 $\alpha^+$ , als auch CD8 $\alpha^-$ Subpopulation im Vergleich mit CD11c<sup>+</sup>-Gesamt-Thy-DZ (stark) erhöht. CD11c<sup>+</sup>-Zellen wurden wie unter 3.5.1 beschrieben aus Thymuseinzelzellpräparationen von Balb/c-Mäusen vorangereichert und mit fluoreszenzgekoppelten  $\alpha$ -CD11c<sup>+</sup>,  $\alpha$ -CD8 $\alpha^-$  und  $\alpha$ -EpCAM-Antikörpern markiert. Die Bestimmung des Anteils der EpCAM<sup>hoch</sup>-exprimierenden Zellen an der jeweiligen Thy-DZ (Sub)-Population erfolgte an einem FACSCanto<sup>®</sup>II – Durchflusszytometer. Die dargestellten Histogramme der CD8 $\alpha^+$ -/CD8 $\alpha^-$ Thy-DZ und CD11c<sup>+</sup> Gesamt-Thy-DZ repräsentieren unterschiedliche Experimente.

Vor dem Eindruck dieser Befunde erschien es sinnvoll, auch die unter Abschnitt 3.2.3 geschilderten Resultate bezüglich der OVA-Präsentation durch CD8α-positive und -negative Thy-DZ-Populationen auf eine mögliche Korrelation mit der EpCAM-Expression zu prüfen. Zu diesem Zweck wurden erneut vorangereicherte CD11c<sup>+</sup>-Thy-DZ Gesamtpopulationen aus Balb/c-Mäusen mit fluoreszenzgekoppelten und gegen die Oberflächenproteine CD11c, CD8α und EpCAM gerichteten Antikörpern markiert und anschließend mit einem FACSCanto<sup>®</sup>II-Durchflusszytometer analysiert.

Aus Abbildung 37 geht hervor, dass die EpCAM-Oberflächenexpression der Thy-DZ nicht stringent mit der CD8 $\alpha$ -Expression segregiert. Zwar weist die CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>-Subpopulation mit 44% auch den höchsten prozentualen Anteil an EpCAM<sup>hoch</sup>-exprimierenden Zellen auf; letztere Population ist aber auch innerhalb der CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>-Subpopulation (31%) im Vergleich mit unsortierten CD11c<sup>+</sup>-Thy-DZ (11,1%) deutlich stärker vertreten.

Setzt man diese Daten nun in Relation zu den Ergebnissen der funktionellen OVA-Präsentation durch die jeweiligen L<sup>d</sup>-nOVA Thy-DZ-Populationen (Abb. 12A), so fällt auf, dass die Effizienz der Ag-Präsentation mit dem prozentualen Anteil EpCAM-exprimierender Thy-DZ an der Gesamtpopulation korreliert. Im Gegensatz hierzu ist, wie bereits erwähnt, keine Abhängigkeit der TZ-Proliferation von der Stimulation mit CD8α<sup>+</sup>- oder CD8α<sup>-</sup>-Thy-DZ festzustellen.

## 3.5.6 Die MHC Klasse I-vermittelte Kreuzpräsentation von endogenem P1A korreliert nicht mit der EpCAM-Oberflächenexpression

Diese, aus einem MHC Klasse II-restringierten Modellsystem gewonnenen Erkenntnisse sollten als Nächstes im MHC Klasse I-restringierten P1A-System untersucht werden, um zu prüfen, ob EpCAM als genereller funktioneller Indikator für eine effektive Ag-Präsentation durch Thy-DZ angesehen werden kann, unabhängig vom zugrunde liegenden Ag-Transferund MHC-Beladungsweg.

Zu diesem Zweck wurden die unter 3.5.5 beschriebenen Thy-DZ-Subpopulationen aus Balb/c (Wt)-Mäusen isoliert und mit CD8<sup>+</sup> P1A-TZRtg-TZ kokultiviert. Der Nachweis der P1A-spezifischen TZ-Proliferation erfolgte wiederum durch Messung der integrierten Menge an <sup>3</sup>H-Thymidin.

Analog zu den unter Abschnitt 3.3.2 geschilderten Ergebnissen ist erneut ein deutlicher Unterschied zwischen Mz-DZ und Gesamt-Thy-DZ hinsichtlich der Präsentation von endogenem P1A feststellbar (Abb. 38A). Wie erwartet, sind Thy-DZ sehr effizient in der Induktion einer P1A-spezifischen TZ-Proliferation, während Mz-DZ lediglich eine schwache Proliferation induzieren.

Im Gegensatz zum L<sup>d</sup>-nOVA-System ist jedoch im MHC Klasse I-restringierten P1A-System keine deutliche Steigerung der TZ-Proliferation durch Stimulation mit EpCAM<sup>hoch</sup>-exprimierenden Thy-DZ zu erzielen. Hier resultiert die Präsentation durch EpCAM<sup>hoch</sup>-exprimierende Thy-DZ und Gesamt-Thy-DZ in einer vergleichbaren Proliferation der P1A-spezifischen TZ, während EpCAM<sup>niedrig</sup>-exprimierende Thy-DZ etwas ineffizienter sind.

Wie aus Abb. 38B hervorgeht, unterscheiden sich die Thy-DZ-Populationen jedoch kaum in der Präsentation von exogenem P1A-Peptid. Lediglich Mz-DZ zeigen hier ein etwas schwächeres Potential zur Ag-Präsentation.

Es lässt sich demnach festhalten, dass Thy-DZ mit hoher EpCAM-Oberflächenexpression in besonderer Weise befähigt sind, endogene Antigene naiven T-Zellen MHC Klasse II-vermittelt zu präsentieren. Dies kann einerseits mit der selektiv erhöhten Aufnahme von Antigenen innerhalb des Thymus-Mikromilieus in Verbindung stehen, wie am Beispiel des FoxN1-eGFP-Modells gezeigt wurde (siehe Abb. 31).




<u>Abb. 38:</u> Proliferation von CD8<sup>+</sup> P1A-TZRtg-TZ als Antwort auf die Präsentation von endogenem und exogenem P1A durch verschiedene Balb/c Thy-DZ-Subpopulationen. A) CD11c<sup>+</sup> Balb/c Thy-DZ wurden anhand der differentiellen EpCAM-Oberflächenexpression durchflusszytometrisch in EpCAM<sup>hoch</sup>- und EpCAM<sup>niedrig</sup>-exprimierende Subpopulationen unterteilt und für 90 h mit CD8<sup>+</sup> P1A-TZRtg-TZ in 96-Loch-Platten kokultiviert. Die letzten 20 h der Kokultur erfolgten in Anwesenheit von 1 µCi <sup>3</sup>H-Thymidin / Loch. Unseparierte Thy-DZ- und Mz-DZ-Gesamtpopulationen dienten als positive bzw. negative Referenz. B) Zur Analyse der Präsentation von exogenem P1A wurde jedem Ansatz 1 µg/ml synthetisches P1A-Peptid (AS<sub>35-43</sub>) zugesetzt

Auf der anderen Seite weist die EpCAM<sup>hoch</sup>-exprimierende Thy-DZ Subpopulation auch die höchste Expression von MHC Klasse II-Molekülen und der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf, was sie zu besonders effizienten APZ macht (siehe Abschnitt 3.5.4). Demgegenüber war für die MHC-Klasse I-vermittelte Präsentation des promisk exprimierten endogenen Antigens P1A durch Thy-DZ keine direkte Korrelation der EpCAM-Expression mit der Effizienz der Ag-Präsentation nachweisbar.

#### 3.5.7 Der intrathymische Transfer von MHC Klasse II-Komplexen als Möglichkeit des Ag-Transfers von mTEZ auf Thy-DZ

Im Zuge dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl ubiquitäre als auch promisk exprimierte Antigene von mTEZ auf Thy-DZ transferiert werden.

Über die zugrunde liegenden Transfermechanismen wurde bislang lediglich spekuliert. Zwar darf mit einiger Sicherheit angenommen werden, dass die Aufnahme von apoptotischem Zelldebris durch DZ innerhalb des Mikromilieus ebenso eine Rolle spielt, wie der exosomale Transfer von Proteinen und möglicherweise von mRNA. Eine Beteiligung anderer Mechanismen wie dem Transfer von linearisierten Proteinen, Peptiden und mRNA durch *gap junctions* sowie dem *"Nibbling"* von Membranproteinen wird ebenfalls diskutiert. Letztere Möglichkeit erscheint insbesondere aufgrund des EpCAM-Transfers von mTEZ auf Thy-DZ wahrscheinlich (siehe auch 3.5.2). Speziell vor diesem Hintergrund erschien es sinnvoll, den potentiellen Transfer weiterer Oberflächenmoleküle, die in direktem Zusammenhang mit der Ag-Präsentation stehen, zu analysieren. Anhand von KM-Chimären wurde untersucht, ob und in welchem Ausmaß MHC Klasse II-Komplexe von bestrahlungsresistenten Stromazellen auf Thy-DZ übertragen.

4-6 Wochen alte CB6/F1-Mäuse wurden letal bestrahlt und innerhalb von 24 h mit 5 x 10<sup>6</sup> CD4- und CD8-depletierten KM-Zellen aus Balb/c- oder C57BL/6-Donoren rekonstituiert. Nach einer Rekonstitutionsphase von 4-6 Wochen erfolgte die Präparation der Thy-DZ. Zu diesem Zweck wurden zunächst Zellen geringer Dichte, welche die Thy-DZ-Populationen umfassen, von Zellen höherer Dichte aus Thymuszellsuspensionen durch Nycoprep<sup>®</sup>- Dichtegradientenzentrifugation getrennt. Die auf diese Weise vorangereicherte Thy-DZ-Population wurde anschließend mittels adäquater Antikörper identifiziert und auf die Präsenz von MHC Klasse II-Komplexen des I-A<sup>d</sup>- und I-A<sup>b</sup>-Haplotyps hin untersucht. Da Zellen, welche dem jeweiligen Donor-KM entstammen, nur einen der beiden Haplotypen exprimieren, kann durch den Nachweis des Allo-Haplotypen auf Thy-DZ auf einen Transfer des Empfänger-Haplotyps von radioresistenten Stromazellen geschlossen werden.

Parallel wurde eine Abschätzung des Chimärismus anhand der MHC II-Expression von Mz-BZ vorgenommen. Diese ergab, dass sowohl im Falle der Balb/c→CB6/F1- als auch der C57BL/6→CB6/F1-KM-Chimären von einer mehr als 95%-igen Rekonstitution des hämatopoetischen Systems der CB6/F1-Empfänger durch KM-Stammzellen der jeweiligen Spendertiere ausgegangen werden kann (Abb. 39).



<u>Abb. 39:</u> Abschätzung des Chimärismus von Balb/c $\rightarrow$ CB6/F1- und C57BL/6 $\rightarrow$ CB6/F1-KM-Chimären anhand des MHC II-Haplotyps von Mz-BZ. 4-6 Wochen nach dem Transfer von 5 x 10<sup>6</sup> Knochenmarkzellen aus Balb/c- oder C57BL/6-Mäusen in letal (850 rd) bestrahlte CB6/F1-Empfängertiere wurde der Chimärismus anhand des MHC Klasse II-Haplotyps von Mz-BZ bestimmt. Zu diesem Zweck wurde der MHC II-Haplotyp von BZ aus vereinigten Einzelzellsuspensionen von 5 Milzen mithilfe fluoreszenzgekoppelter Ratte anti-Maus-Antikörper durchflusszytometrisch bestimmt (blau: I-A<sup>b</sup>, grün: I-A<sup>d</sup>; die dunklen Farbschattierungen stellen die Isotypkontrollen dar).

Die Analyse der Oberflächenexpression der verschiedenen MHC Klasse II-Haplotypen im Thymus ergab, dass Thy-DZ beider Chimären-Variationen neben dem jeweiligen Spender-Haplotypen auch den Empfänger-Haplotypen exprimieren (Abb. 40). Der Befund, dass die Expression des jeweiligen Empfänger-Haplotypen auf einem Großteil der Thy-DZ-Population nachzuweisen ist, deutet neben der insgesamt geringen Expressionsstärke auf einen Transfer der MHC-Klasse **II-Komplexe** von radioresistenten Thymusstromazellen (einschließlich mTEZ) hin. Wäre die Präsenz dieser MHC-Komplexe auf die Expression Thy-DZ-Subpopulation durch eine kleine. radioresistente der Empfängertiere zurückzuführen, würde man ein deutlich stärkeres, mit Thy-DZ aus CB6/F1 (Wt)-Tieren vergleichbares Signal erwarten. Auch wäre das Haplotyp-Histogramm der Hauptpopulation in diesem Fall vermutlich weitestgehend kongruent mit der Kontrollfärbung der Thy-DZ aus den jeweiligen Donor (Wt)-Mäusen.



<u>Abb. 40:</u> Transfer von MHC Klasse II-Komplexen von mTEZ auf Thy-DZ *in vivo*. Thymuszellen geringer Dichte aus Balb/c $\rightarrow$ CB6/F1- und C57BL/6 $\rightarrow$ CB6/F1-KM-Chimären wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation vorangereichert und mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen CD11c, EpCAM und die MHC II-Haplotypen H-2<sup>b</sup> und H-2<sup>d</sup> markiert. CD11c<sup>hoch</sup>-EpCAM<sup>medium</sup>-exprimiernde Zellen wurden als Thy-DZ definiert. Die Auswertung erfolgte an einem FACSCalibur<sup>®</sup>-Durchflusszytometer.

Mit diesem Experiment konnte eine weitere Route des Ag-Transfers von mTEZ auf Thy-DZ direkt nachgewiesen werden. Geht man zusätzlich davon aus, dass die übertragenen MHC II-Heterodimere Peptid-beladen und innerhalb der Membran entsprechend orientiert sind, stellt dieser Transfer auch eine Möglichkeit der Verbreitung von Epitopen promisk exprimierter GSA innerhalb des Thymusmikromilieus dar.

### 4. Diskussion

Die Induktion der zentralen TZ-Toleranz des adaptiven Immunsystems setzt die Präsentation autologer Antigene innerhalb des Thymus voraus.

Anhand ihrer Herkunft lassen sich tolerogene Selbstantigene in zwei Gruppen einteilen: einerseits ubiquitäre Antigene, zu denen Proteine des allgemeinen Zellstoffwechsels ebenso gerechnet werden wie lösliche Komponenten, welche über den Blutstrom in den Thymus gelangen; andererseits Antigene mit limitierter Gewebeverteilung, sogenannte geweberestringierte oder <u>gewebespezifische Antigene</u> (GSA).

Die Bedeutung hämatopoetischer APZ und insbesondere von DZ für die Toleranzinduktion gegenüber löslichen Proteinen der Zirkulation sowie anderen Bestandteilen des extrazellulären Milieus ist heute unbestritten (Page *et al.*, 1993). Wie aus Studien von van Meerwijk und Kollegen hervorgeht, wird etwa die Hälfte bis zwei Drittel aller ursprünglich positiv selektionierten Thymozyten durch hämatopoetische APZ negativ selektioniert (van Meerwijk *et al.* 1997; van Meerwijk und MacDonald, 1999).

Die Mechanismen der Toleranzinduktion gegenüber peripheren GSA, deren Transkription sich auf einige wenige Gewebe oder gar vereinzelte, spezialisierte Zelltypen beschränkt, war hingegen lange Zeit unklar. Einen ersten Erklärungsansatz lieferte die Beobachtung, dass verschiedene GSA des Pankreas im Thymus, genauer gesagt in der Medulla, "ektopisch" oder "promisk" exprimiert werden (Smith *et al.*, 1997). Das Ausmaß und die funktionelle Relevanz der promisken Genexpression (pGE) für die negative Selektion Autoantigen-spezifischer Thymozyten wurden durch Kyewski und Kollegen eindrucksvoll demonstriert (Klein *et al.*, 2000; Derbinski *et al.*, 2001). Darüber hinaus gelang es, die pGE zweifelsfrei und speziesübergreifend medullären Thymusepithelzellen (mTEZ) zuzuordnen (Derbinski *et al.*, 2001; Gotter *et al.*, 2004; Derbinski *et al.*, 2005), wenngleich die ektopische Expression einzelner Antigene auch in kortikalen TEZ oder DZ nachgewiesen werden konnte.

So gilt es heute als gesichert, dass die Expression bestimmter Antigene eines peripheren Gewebes durch mTEZ nicht nur hinreichend, sondern auch notwendig für die Aufrechterhaltung der zentralen TZ-Toleranz ist (Halonen *et al.*, 2001; Heino *et al.*, 2001; Liston *et al.*, 2003; DeVoss *et al.*, 2006; Gavenescu *et al.*, 2007). Strittig ist hingegen nach wie vor, ob die zentrale Toleranzinduktion gegenüber Antigenen, deren intrathymische Expression auf mTEZ beschränkt ist, auf der autonomen Präsentation dieser Antigene durch mTEZ basiert, oder eine Kreuzpräsentation durch hämatopoetische APZ, insbesondere DZ, erfordert. Die Beantwortung dieser Frage ist von besonderer Relevanz für das Verständnis der Induktion alternativer Zellschicksale (negative Selektion *versus* Induktion regulatorischer TZ) durch unterschiedliche APZ-Populationen des Thymus.

Hier wurde erstmals die Präsentation endogener, gewebespezifischer Antigene *ex vivo* anhand der Kokultur hochreiner APZ-Populationen des Thymus mit naiven, Antigen (Ag)-spezifischen TZ funktionell untersucht. Diese Methode bringt gegenüber früheren *in vivo*-Studien den Vorteil, dass die Effizienz der Ag-Präsentation durch eine definierte APZ-Population anhand der Intensität der Proliferation des TZ-Repertoires abgeschätzt werden kann, während gleichzeitig Wechselwirkungen mit anderen APZ-Populationen ausgeschlossen werden.

Da lediglich negativ selektionierende Liganden in der Lage sind, naive periphere TZ *in vitro* vollständig zu aktivieren (Davey *et al.*, 1998; Lucas *et al.*, 1999; Daniels *et al.*, 2006), kann die Proliferation der TZ in den hier verwendeten Nachweissystemen als Surrogat für die tolerogene Präsentation *in vivo* gewertet werden.

die Darüber hinaus bietet hier angewandte Vorgehensweise die Möglichkeit, **APZ-Subpopulationen** anhand der differentiellen Expression charakteristischer Oberflächenmarker zu diskriminieren und deren separaten Einfluss auf die TZ-Entwicklung anhand der jeweiligen Ag-Präsentationseffizienz zu untersuchen. Auf diese Weise konnte hier die Präsentation von nativen GSA zweifelsfrei definierten APZ-Populationen des Thymus zugeordnet werden.

## 4.1 Medulläre Thymusepithelzellen und Dendritische Zellen können mTEZabgeleitete GSA in "tolerogener" Weise präsentieren

In der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass sowohl mTEZ als auch Thy-DZ *ex vivo* endogene, native GSA effizient präsentieren.

Es wurde gezeigt, dass sowohl die MHC Klasse I- als auch MHC Klasse II-vermittelte Präsentation von zellassoziierten GSA durch Thymus-DZ von der Expression in mTEZ abhängig ist. Diese Schlussfolgerung stützt sich auf semiquantitative und quantitative Analysen der Ag-Expression durch die jeweiligen APZ-Populationen.

So konnte die intrathymische Expression des Tumorantigens P1A in Balb/c-Mäusen eindeutig mTEZ zugeordnet werden (siehe Abb. 17, 18; Tabelle 10). Dennoch wurde hier eine effiziente MHC Klasse I-vermittelte Präsentation durch Thymus-DZ in Kokultur mit naiven, P1A-spezifischen CD8<sup>+</sup> TZR-transgenen (tg) TZ nachgewiesen.

Andererseits war eine autochthone P1A-Präsentation durch die mTEZ-Gesamtpopulation, definiert als CD45<sup>-</sup>Ly51<sup>-</sup>EpCAM<sup>+</sup> Fraktion, zunächst nicht detektierbar. Wurden hingegen die CD80<sup>hoch</sup>-exprimierenden, "reifen" mTEZ aus der Gesamtpopulation angereichert, so vermochten auch diese die Proliferation naiver TZ zu induzieren.

Im Gegensatz hierzu war im MHC Klasse II-restringierten PLP-Modell nur eine Präsentation durch Thymus-DZ, nicht aber durch mTEZ nachweisbar, obgleich mTEZ sowohl PLP als auch die im Thymus dominierende Spleißvariante DM20 deutlich stärker exprimierten als Thy-DZ (siehe Abb. 27; Tabelle 10). Die Frage, ob eine selektive Anreicherung reifer, CD80<sup>hoch</sup>-exprimierender mTEZ zu einer gesteigerten Effizienz der PLP-Präsentation führt, konnte wegen des Verlustes der Spezifität der zur Detektion verwendeten TZ-Linie im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht untersucht werden.

<u>Tab. 10:</u> Zusammenstellung der verwendeten Modellsysteme unter Angabe der mRNA-Expression und der Präsentation des jeweiligen Ag-Epitops durch die entsprechenden APZ-Populationen.

Antigen	MHC-Restriktion des TZR	mTEZ		Thymus-DZ		Mz-DZ	
		Expression I Präsentation					
P1A	Klasse I	+++	+ (CD80 <sup>hoch</sup> )	-	+++	-	-
PLP/DM20	Klasse II	+++	-	+	+++	+	-
OVA	Klasse II	+++	++	+++	+++	+++	-

Daher kann nicht abschließend beurteilt werden, ob CD80<sup>hoch</sup>-exprimierende mTEZ auch MHC Klasse II-restringierte, endogene GSA effizient präsentieren. Die zellulären Voraussetzungen hierfür sind gegeben, da reife mTEZ im Vergleich mit unreifen, CD80<sup>niedrig</sup>- exprimierenden mTEZ eine deutlich stärkere Oberflächenexpression von MHC Klasse II-Komplexen aufweisen. Obwohl beide Subpopulationen DM20 und PLP in vergleichbarer Stärke transkribieren (Dissertation J. Gäbler, 2008), sind reife mTEZ somit wohl die effizienteren APZ (Gray *et al.*, 2006; Gäbler *et al.*, 2007;).

Betrachtet man die Ergebnisse dieser beiden Modellsysteme zunächst separat, so könnte man sie im Kontext der zentralen Toleranzinduktion dahingehend interpretieren, dass der Ag-Transfer von mTEZ auf DZ für die negative Selektion von CD4<sup>+</sup> Thymozyten notwendig ist, während CD8<sup>+</sup> Thymozyten von mTEZ und DZ tolerisiert werden können.

Eine frühere Studie kam unter Verwendung des transgenen RIP-mOVA-Mausmodells bereits zu ähnlichen Schlussfolgerungen. In diesen Tieren wird die promiske Expression von GSA durch die Expression des *neo*-Selbstantigens *Ovalbumin* (OVA) unter der Kontrolle des Ratten-Insulin-Promotors "simuliert", was die intrathymische OVA-Expression auf mTEZ beschränkt.

Bevan und Kollegen konnten durch die Herstellung von Knochenmark (KM)-Chimären aus MHC Klasse I- oder II-defizienten Spendertieren und letal bestrahlten RIP-mOVA-Empfängern zeigen, dass die Präsentation von OVA durch mTEZ ausreicht, um CD8<sup>+</sup> OVAspezifische OT-I-Thymozyten zu deletieren; für die negative Selektion von CD4<sup>+</sup> OT-II-Zellen war jedoch die Kreuzpräsentation<sup>1</sup> durch hämatopoetische Zellen erforderlich (Gallegos und Bevan, 2004).

Es ist allerdings unklar, ob diese Notwendigkeit zur Kreuzpräsentation MHC Klasse IIrestringierter Antigene durch hämatopoetische DZ eine generelle Gesetzmäßigkeit darstellt. Frühere Studien zur zentralen Toleranzinduktion gegenüber ubiquitären Antigenen (in diesem Fall allogene MHC-Moleküle) lieferten bereits Hinweise darauf, dass auch die autonome Präsentation durch TEZ hinreichend ist, um CD4<sup>+</sup>-TZ mit einem polyklonalen TZR-Repertoire nachhaltig zu tolerisieren (Laufer et al., 1999; van Meerwijk und MacDonald, 1999). Klein und Kollegen konnten schließlich am Beispiel des induzierbaren transgenen Serumproteins hCRP zeigen, dass die Präsentation eines GSA, dessen Expression auf wenige mTEZ beschränkt ist, durch Thymusepithelzellen ausreicht, um CD4<sup>+</sup>-hCRPspezifische TZRtg Thymozyten zu deletieren (Klein et al., 1998 und 2001). Zu diesem Zweck wurde die hCRP-Präsentation analog zu der von Bevan und Kollegen angewandten Verfahrensweise durch die Herstellung von MHC Klasse II-knock out  $\rightarrow$  Wt-Chimären auf hingegen das bestrahlungsresistente Thymusstroma beschränkt. Wurde hCRP ausschließlich in der Leber exprimiert, so war die intrathymische Deletion abhängig von der MHC-Expression durch hämatopoetische APZ. Diese Befunde wiesen darauf hin, dass mTEZ autochthon synthetisierte Proteine endogen in den MHC Klasse II-Beladungsweg einschleusen und anschließend effektiv präsentieren, während Antigene, welche den Thymus über die Zirkulation erreichen, ausschließlich von hämatopoetischen Zellen endozytiert, prozessiert und präsentiert werden. Somit sind sowohl DZ als auch mTEZ in vergleichbarer Weise zur negativen Selektion autoreaktiver Thymozyten befähigt, wenngleich beide Zelltypen hierfür auf unterschiedliche Ag-Reservoires zurückgreifen. Hämatopoetische Zellen sind demnach für die Deletion von CD4<sup>+</sup> TZ nicht zwingend erforderlich, sofern das entsprechende Ag von mTEZ exprimiert wird.

Die Studien von Bevan *et al.* und Klein *et al.* sind bislang die einzigen Untersuchungen zur Ag-Präsentation von Thymusstromazellen, die das natürliche Expressionsmuster von GSA im Thymus berücksichtigen (obwohl nicht abschließend geklärt wurde, ob die Frequenz der

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Im Gegensatz zur üblichen Definition, welche ausschließlich die MHC Klasse I-vermittelte Präsentation exogener Antigene beschreibt, wird der Begriff "Kreuzpräsentation" hier auch für die MHC Klasse II-vermittelte Präsentation exogener, mTEZ-abgeleiteter Antigene durch DZ verwendet.

exprimierenden mTEZ sowie die Expressionsstärke auf Einzelzellebene äquivalent mit dem Expressionsmuster des jeweiligen nativen Antigens sind).

So ist die Expression der meisten GSA und *neo*-Selbstantigene unter der Kontrolle gewebespezifischer Promotoren im Thymus auf RNA- wie auch auf Proteinebene auf wenige Stromazellen beschränkt. Meist konzentrieren sich die exprimierenden Zellen auf die Medulla, seltener sind positive Zellen auch im Kortex nachzuweisen. Wie aus *in situ*-Hybridisierungen und Proteinfärbungen isolierter mTEZ hervorgeht, werden die meisten promisk exprimierten Antigene lediglich in 1-3% aller mTEZ transkribiert bzw. translatiert (Klein *et al.*, 2001). Gleiches gilt auch für das hier verwendete Modellantigen P1A (Derbinski *et al.*, 2001).

Dennoch unterscheiden sich die Studien von Bevan *et al.* und Klein *et al.* in einem wichtigen Aspekt, da es sich bei OVA im RIP-mOVA Modell um ein membranständiges Protein handelt, hCRP jedoch sekretiert wird.

Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass hCRP auf mTEZ oder kTEZ in der näheren Umgebung der exprimierenden Zelle übertragen wird. Dies könnte erklären, warum die Deletion hCRP-spezifischer TZRtg-Thymozyten im CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> doppeltpositiven Stadium (und somit wahrscheinlich im Kortex) stattfindet.

Ein Transfer von hCRP auf kTEZ ist jedoch unwahrscheinlich, da berichtet wurde, dass kortikale Epithelzelllinien *in vitro* und *in vivo* nicht imstande sind, lösliche Proteine aufzunehmen und effizient zu präsentieren (Kasai *et al.*, 1998). Auch die Aufnahme und Präsentation extrazellulärer Proteine durch mTEZ ist im Vergleich zu DZ bemerkenswert ineffizient und in der Regel an (unphysiologisch) hohe Ag-Dosen gekoppelt (Klein *et al.*, 2001).

Ein möglicher interzellulärer hCRP-Transfer zwischen mTEZ würde jedoch im Hinblick auf die hier vorgelegten Daten zur Ag-Präsentation nichts an der Grundaussage ändern, dass mTEZ CD4<sup>+</sup> Thymozyten durch die Präsentation endogener GSA tolerisieren können.

Im Einklang mit diesen Befunden stehen die hier vorgelegten Ergebnisse der Analyse der Präsentation des *neo*-Selbstantigens OVA im L<sup>d</sup>-nOVA Mausmodell. In L<sup>d</sup>-nOVA Mäusen wird OVA unter der Kontrolle des MHC Klasse I (L<sup>d</sup>)-Promotors und somit ubiquitär exprimiert, was durch transkriptionelle Analysen bestätigt werden konnte (siehe Abb. 9; Tabelle 10). Wie sich herausstellte, wird OVA *ex vivo* von Thy-DZ <u>und</u> mTEZ sehr effizient präsentiert (siehe Abb. 10; Tabelle 10).

Überraschenderweise zeigte sich anhand der Analyse von KM-Chimären aus L<sup>d</sup>-nOVA- und Wildtyp (Wt)-Mäusen, dass nicht nur die Präsentation von Antigenen, deren Expression auf mTEZ beschränkt ist, sondern auch die Präsentation ubiquitärer Antigene durch DZ strikt von

der Expression in mTEZ, also der Aufnahme extrazellulärer Proteine, abhängig ist. MTEZ hingegen waren imstande, endogenes OVA CD4<sup>+</sup> TZ MHC Klasse II-vermittelt zu präsentieren (siehe Abb. 14).

Daraus könnte man folgern, dass endogen exprimierte Proteine lediglich von mTEZ in den MHC Klasse II-Beladungsweg prozessiert werden können, nicht aber von DZ. Wie aus der Analyse der Ag-Präsentation in transgenen Mäusen, welche ein *neo*-Selbstantigen unter der Kontrolle des DZ-spezifischen CD11c-Promotors exprimieren, hervorgeht, ist eine solche Vorstellung jedoch zu sehr vereinfacht. Demnach sind DZ *in vivo* imstande, endogene Antigene effizient zu präsentieren und auf diese Weise ein monoklonales TZ-Repertoire zu deletieren (Aschenbrenner *et al.*, 2007).

Wie also lässt sich die strikte Abhängigkeit der OVA-Präsentation durch DZ von der Expression durch mTEZ im L<sup>d</sup>-nOVA Modell erklären? Eine mögliche Antwort liegt in der zellulären Lokalistion des Antigens.

Wie bereits beschrieben, ist das OVA-Transkript an ein nukleäres Lokalisationssignal gekoppelt. Dementsprechend ist die Proteinexpression auf den Kern beschränkt, was durch immunhistochemische Analysen bestätigt werden konnte (Kawahata *et al.*, 2002).

Bereits in einer früheren Studie wurde der Beitrag der Präsentation von endogener, nukleärer  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -gal) durch mTEZ respektive Thy-DZ zur zentralen TZ-Toleranz untersucht (Oukka *et al.*, 1996). Periphere CD4<sup>+</sup> TZ waren tolerant gegenüber  $\beta$ -gal, wenn diese von mTEZ exprimiert wurde, während eine Expression ausschließlich in hämatopoetischen APZ nicht zur Toleranz führte. Auch *in vitro* ließ sich eine MHC Klasse IIvermittelte Präsentation lediglich durch  $\beta$ -gal-transfizierte mTEZ-Linien, nicht aber durch  $\beta$ -gal-transgene DZ nachweisen. Aufgrund dieser Befunde folgerten die Autoren, dass endogene, nukleäre Proteine durch Thy-DZ weder autonom noch nach Aufnahme von apoptotischem zellulärem Material anderer hämatopoetischer Zellen präsentiert werden.

Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnte auch für Thy-DZ im L<sup>d</sup>-nOVA-Modellsystem keine effiziente endogene Beladung von MHC Klasse II-Komplexen mit nukleärem OVA nachgewiesen werden (siehe Abb. 14; Kawahata *et al.*, 2002).

Im Widerspruch zu der Interpretation von Oukka und Kollegen ergaben unsere Untersuchungen jedoch, dass nukleäres Ag durchaus von DZ kreuzpräsentiert wird. Bemerkenswerterweise war hierfür stets die Expression des Antigens durch TEZ notwendig, während die Expression durch hämatopoetische Zellen alleine (analog zu den Ergebnissen von Oukka und Kollegen) nicht ausreichte, um eine effiziente (Kreuz-)Präsentation durch DZ nachweisen zu können.

Dies impliziert, dass mehrere, nicht-redundante Mechanismen des Ag-Transfers von mTEZ auf DZ existieren, welche nicht notwendigerweise auf der Aufnahme von apoptotischen Zellfragmenten basieren. Auf die verschiedenen, möglichen Transferrouten wird im nächsten Kapitel detailliert eingegangen.

Warum aber können DZ nukleäres OVA weder autonom präsentieren noch von anderen hämatopoetischen Zellen aufnehmen, während mTEZ endogenes OVA sehr effizient präsentieren?

Da nur geringe Unterschiede in der OVA-Transkription zwischen mTEZ und DZ nachweisbar waren, deutet die strikte Abhängigkeit der Präsentation von der Expression durch TEZ darauf hin, dass sich hämatopoetische Zellen und TEZ in der posttranslationalen Prozessierung nukleärer Antigene deutlich voneinander unterscheiden.

Es ist bekannt, dass intrazelluläre Proteine durch Makroautophagie, einem Abbauprozess zytosolischen Materials, in den endo-lysosomalen MHC Klasse II-Beladungsweg gelangen und als Konsequenz von ihrer Ursprungszelle präsentiert werden können (Nimmerjahn *et al.*, 2003; Paludan *et al.*, 2005; Schmid *et al.*, 2007). Makroautophagie stellt in Zeiten des Mangels eine alternative Ressource an Edukten des katabolen, aber auch des anabolen Zellstoffwechsels dar und lässt sich unter gegebenen Umständen in nahezu allen peripheren Geweben nachweisen (Mizushima *et al.*, 2004; Dengjel *et al.*, 2005). Ungewöhnlicherweise konnte in TEZ (im Gegensatz zu DZ) ein hohes Maß an konstitutiver Autophagie festgestellt werden, die möglicherweise in direktem Zusammenhang mit der (Kreuz-)Präsentation mTEZ-abgeleiteter Antigene steht (persönliche Mitteilung von Dr. Ludger Klein).

Obwohl man davon ausgeht, dass nukleäre Komponenten (im Gegensatz zu zytoplasmatischen Proteinen) durch die Kernmembran vor Autophagie geschützt sind, besteht während der zytosolischen Translation die Möglichkeit, dass auch OVA im L<sup>d</sup>-nOVA-Modell von Autophagosomen eingeschlossen wird und auf diesem Wege in den MHC Klasse II-Beladungsweg von TEZ gelangt.

An dieser Stelle sollte hervorgehoben werden, dass die bemerkenswerten Unterschiede zwischen mTEZ und DZ hinsichtlich der Präsentation eines nukleären Antigens lediglich für die MHC Klasse II-vermittelte Präsentation zu beobachten waren. In den Untersuchungen von Oukka und Kollegen waren mTEZ und DZ in der Lage,  $\beta$ -gal in vivo und in vitro MHC Klasse I-vermittelt zu präsentieren, vorausgesetzt, das Ag wurde von der entsprechenden Zellpopulation endogen exprimiert (Oukka *et al.*, 1996).

Eine strikte Abhängigkeit der Präsentation durch DZ von der Expression in mTEZ besteht also möglicherweise nur für solche Antigene, deren intrathymische Expression sich, wie im Fall vieler promisk exprimierter GSA, auf mTEZ beschränkt, sowie für MHC-Klasse IIrestringierte Epitope nukleärer Antigene. In diesem Zusammenhang wäre es sicherlich interessant, zu untersuchen, ob auch die MHC-Klasse II-vermittelte Präsentation anderer kompartmentalisierter Proteine, wie beispielsweise mitochondrialer Antigene, durch DZ strikt von der Expression in mTEZ abhängig ist.

Zusammengefasst konnten die hier vorgestellten Modellsysteme zeigen, dass mTEZ die von ihnen exprimierten Antigene autonom präsentieren können. Daneben werden mTEZ-abgeleitete Antigene von Thy-DZ konstitutiv und hocheffizient kreuzpräsentiert. Ob eine solche Kreuzpräsentation durch hämatopoetische APZ für die Deletion autoreaktiver Thymozyten erforderlich ist, hängt wahrscheinlich von dem Expressionsniveau des Antigens sowie der Stabilität und Effizienz der MHC-Beladung in mTEZ ebenso ab, wie von der Affinität des jeweiligen TZR zu "seinem" Peptid-/MHC-Liganden und müsste demzufolge theoretisch für jede Ag- / TZR-Konstellation separat beurteilt werden.

#### 4.2 Mechanismen des unidirektionalen Ag-Transfers von mTEZ auf Thy-DZ

Da es sich bei allen hier untersuchten Antigenen um zellassoziierte, nicht-sekretierte Proteine handelt, erscheint es unwahrscheinlich, dass ein unspezifischer, auf Diffusion basierender Transfermechanismus, wie er beispielsweise für lösliche Serumkomponenten wie hCRP oder SAP (Klein *et al.*, 2001; Derbinski *et al.*, 2001) angenommen wird, auch für den hier beobachteten interzellulären Transfer verantwortlich ist.

Es stellt sich daher die Frage, auf welchem Weg diese Antigene von mTEZ auf DZ übertragen werden. Im Folgenden werden mögliche Transfermechanismen diskutiert.

#### 4.2.1 Die Präsentation von apoptotischen Zellfragmenten durch Thy-DZ

In der Peripherie sind CD8α<sup>+</sup> lymphoide DZ darauf spezialisiert, bei viralen Infektionen apoptotische Zellfragmente mithilfe von *scavenger*-Rezeptoren (SR) zu phagozytieren und die darin enthaltenen viralen Proteine zytotoxischen CD8<sup>+</sup> TZ zu präsentieren (den Haan *et al.*, 2000; Heath und Carbone, 2001). Diese Form der Präsentation extrazellulärer Antigene wird durch die übliche Definition der Kreuzpräsentation (vgl. Kapitel 4.1) beschrieben, da sie entgegen dem lange Zeit gültigen Paradigma extrazelluläre Antigene dem MHC Klasse I-Beladungsweg zuführt.

Darüber hinaus ist die CD8 $\alpha^+$  DZ-Subpopulation auch maßgeblich an der Induktion peripherer Toleranz in den drainierenden Lymphknoten des Pankreas beteiligt, die auf der nicht-inflammatorischen Präsentation Inselzell-assoziierter Antigene beruht (Belz *et al.*, 2002). CD8 $\alpha^+$  DZ, welche auch die Mehrheit der Thy-DZ bilden ( $\geq$  60%, siehe Abb. 8,), scheinen also in besonders effizienter Weise zur Präsentation zellassoziierter Antigene imstande zu sein. Demnach besteht die Möglichkeit, dass Thy-DZ GSA von apoptotischen mTEZ aufnehmen und sowohl MHC Klasse I-, wie auch Klasse II-vermittelt (kreuz-)präsentieren. Interessanterweise zeigen reife mTEZ, charakterisiert durch eine erhöhte CD80- und MHC Klasse II-Expression, eine besonders hohe Umsatzrate (Gray *et al.*, 2006; Gäbler *et al.*, 2007). So konnten aktuelle Studien belegen, dass innerhalb von 2 Wochen über 60% der MHCII<sup>hoch</sup>-CD80<sup>hoch</sup>-exprimierenden mTEZ in Apoptose gehen, wenngleich keine verstärkte Expression proapoptotischer Gene in CD80<sup>hoch</sup>-exprimierenden mTEZ nachgewiesen werden konnte (Dissertation J. Gäbler, 2008). Reife mTEZ zeigen zudem die höchste Diversität der pGE sowie die stärkste Expression vieler GSA auf Einzelzell- und Populationsebene (Gäbler *et al.*, 2007; Derbinski *et al.*, 2005 und 2008; persönliche Mitteilung von Sheena Pinto). Dies macht sie zu der wahrscheinlichsten Quelle zellassoziierter GSA für einen auf der Aufnahme apoptotischen Materials basierenden Transfermechanismus. Da jedoch keine Studien vorliegen, in denen die Appoptoserate von mTEZ experimentell positiv oder negativ beeinflusst wurde, konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Apoptose reifer mTEZ und der Effizienz der negativen Selektion bislang nicht nachgewiesen werden.

Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass es neben der Endozytose apoptotischer Zellen noch weitere Möglichkeiten des Ag-Transfers geben muss. So ist es, wie bereits angedeutet, unwahrscheinlich, dass der OVA-Transfer in Balb/c $\rightarrow$ L<sup>d</sup>nOVA KM-Chimären (siehe Abb. 14) auf die Phagozytose apoptotischen Materials zurückgeführt werden kann, da die negative Selektion von hämatopoetischen Thymozyten vermutlich auch in L<sup>d</sup>-nOVA $\rightarrow$ Balb/c Chimären für die Freisetzung von OVA durch apoptotische Zellen sorgt. In diesen Chimären war jedoch keine OVA-Präsentation durch Thy-DZ *ex vivo* nachweisbar. Thy-DZ scheinen also explizit auf den Transfer nukleärer Antigene von mTEZ angewiesen zu sein.

Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass Thy-DZ aus Balb/c $\rightarrow$ L<sup>d</sup>-nOVA Chimären prozessiertes OVA in Form von beladenen MHC Klasse II-Komplexen von apoptotischen mTEZ aufnehmen und diese in einem als *"cross-dressing"* bezeichneten Prozess präsentieren. Wie Dolan und Kollegen anhand einer gemischten Lymphozytenreaktion zeigen konnten, nehmen dabei CD11c<sup>+</sup> KM-DZ Peptid-/MHC-Komplexe von allogenen, apoptotischen (jedoch nicht von lebenden!) Zellen auf und präsentieren diese ohne weitere Prozessierung unverändert allogenen TZ (Dolan *et al.*, 2006).

Bislang konnte ein solcher Zellkontakt-abhängiger Transfermechanismus jedoch nur für die Übertragung von MHC Klasse I-Komplexen nachgewiesen werden, weshalb unklar ist, ob er sich auch auf einen Transfer von MHC Klasse II-/Peptid-Komplexen, wie er hier gezeigt werden konnte, übertragen lässt. Dies ließe sich jedoch leicht überprüfen, in dem man isolierte Thy-DZ aus C57BL/6 (Wt)-Mäusen (H-2<sup>b</sup>) zunächst mit apoptotischen mTEZ aus allogenen L<sup>d</sup>-nOVA-Mäusen (H-2<sup>d</sup>) inkubiert und anschließend mit OVA-spezifischen, H-2<sup>d</sup>-restringierten DO11.10 TZ kokultiviert. Eine Proliferation der TZ würde in diesem Fall auf einen effizienten Transfer von Peptid-beladenen MHC Klasse II-Komplexen schließen lassen.

#### 4.2.2 Exosomen als Vehikel des interzellulären Proteintransports

Eine Möglichkeit des Ag-Transfers zwischen lebenden Zellen bietet die Exozytose von Exosomen, membranumschlossenen Vesikeln mit einem Durchmesser von 30-100 Nanometern. Exosomen werden von einer Vielzahl von Zellen gebildet und können sowohl immunstimulatorische, wie auch tolerogene Eigenschaften besitzen. So wurde einerseits gezeigt, dass Exosomen aus dem Überstand von Tumorpeptid-beladenen DZ in der Lage sind, die Regression und Abstoßung manifester Tumore durch die Aktivierung Agspezifischer TZ zu induzieren (Zitvogel *et al.*, 1998 und 2000). Andererseits konnte die Induktion oraler Toleranz auf die Generierung von Exosomen mit tolerogenen Eigenschaften (Tolerosomen) durch intestinale Epithelzellen zurückgeführt werden (Karlsson *et al.*, 2001; Ostman *et al.*, 2005; van Niel *et al.*, 2003). Beiden Mechanismen ist jedoch gemein, dass eine effiziente Präsentation exosomaler Antigene nur nach Membranfusion mit professionellen APZ möglich ist (Thery *et al.*, 2002), wenngleich in Einzelfällen auch eine schwache TZ-Aktivierung in Abwesenheit von APZ nachgewiesen werden konnte (Raposo *et al.*, 1996; Wolfers *et al.*, 2001).

Neben ubiquitären zytosolischen und membranständigen Proteine, wie Filamenten des Zytoskeletts, Hitzeschockproteinen oder Peptid-/MHC-Komplexen, enthalten Exosomen auch zelltypspezifische Antigene, die das individuelle Proteom der Herkunftszelle widerspiegeln (Pisitkun *et al.*, 2004). Darüber hinaus wurde kürzlich durch den Nachweis der Übertragung von funktioneller mRNA und *micro*RNA eine weitere Möglichkeit des exosomalen Ag-Transports aufgezeigt (Valadi *et al.*, 2007).

MTEZ könnten durch die Generierung von Exosomen auch nicht sezernierte, zytoplasmatische Proteine wie die hier untersuchten GSA oder eGFP (siehe Abb. 30, 33) auf DZ übertragen. Ob und in welchem Ausmaß mTEZ *in vivo* tatsächlich Exosomen generieren, bedarf jedoch weiterer Klärung. So wäre es zunächst interessant zu prüfen, ob sich mithilfe von Exosomen aus dem Überstand von Thymus-Reaggregationskulturen oder Epithelzellkulturen TZ-Toleranz gegenüber einem definierten mTEZ-restringierten GSA *in vitro* und *in vivo* induzieren lässt. Zu diesem Zweck könnte man die Exosomen erneut in Reaggregationskulturen einbringen, die sich aus Ag-defizienten Epithelzellen und Agspezifischen TZRtg-Thymozyten konstituieren. In einem solchen Fall wäre eine Deletion der Thymozyten auf den Ag-Transfer durch Exosomen zurückzuführen.

Auch die Mechanismen der Präsentation exosomaler Proteine durch hämatopoetische APZ sind noch nicht vollständig verstanden. Es konnte aber gezeigt werden, dass die Adsorption von Exosomen an die Oberfläche von DZ von der Bindung des von Exosomen exprimierten Adhäsionsmoleküls ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) an das Integrin LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen 1*), welches insbesondere von CD8 $\alpha^+$  DZ exprimiert wird, abhängt (Segura *et al.*, 2007). Weitere funktionelle Analysen ergaben, dass in der Folge CD8 $\alpha^+$  DZ, nicht jedoch CD8 $\alpha^-$  DZ, exosomale Peptid-/MHC-Komplexe *in vivo* in Abhängigkeit der LFA-1-Expression präsentieren.

Da Thy-DZ zu 60-80% der CD8α<sup>+</sup> lymphoiden DZ-Subpopulation angehören, sollten sie demnach imstande sein, Exosomen zu binden und exosomale Proteine zu präsentieren.

Im Hinblick auf die Resultate der vorliegenden Arbeit wären sowohl der Transfer von P1A als auch von PLP durch Exosomen möglich. Da Exosomen aufgrund ihrer endosomalen Herkunft jedoch keine nukleären Proteine enthalten (Mears *et al.*, 2004), erscheint ihre Relevanz als Mediatoren des OVA-Transfers, wie er hier im L<sup>d</sup>-nOVA-Modell beobachtet wurde (siehe Abb. 14), eher fraglich.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Exosomen auf ihrer Oberfläche entsprechend dem Phänotyp der Herkunftszelle sowohl MHC Klasse I-, als auch MHC Klasse II-/Peptid-Komplexe tragen, welche ohne vorherige Internalisierung von Empfänger-DZ präsentiert werden können (Andre *et al.*, 2004). Somit wäre die Präsentation mTEZ-abgeleiteten Ovalbumins durch Thy-DZ, wie sie im Zuge der vorliegenden Arbeit demonstriert werden konnte (siehe Abb. 14), nach exosomalem Membrantransfer von MHC-OVA <sub>323-339</sub>-Komplexen möglich.

Darüber hinaus liefert ein solcher Transfer eine mögliche Erklärung für den hier erbrachten phänotypischen Nachweis von mTEZ-assoziierten membranständigen Molekülen (MHC Klasse II-Komplexen und EpCAM) auf der Oberfläche von Thy-DZ (siehe Abb. 31; 40). Auch die Korrelation der EpCAM-Oberflächenexpression mit dem Nachweis von eGFP, wie sie hier für Thy-DZ aus FoxN1-eGFP-Mäusen (siehe Abb. 31) gezeigt werden konnte, wäre durch den gleichzeitigen exosomalen Transfer von membrangebundenem EpCAM und intrazellulärem eGFP zu erklären.

Da bislang jedoch nicht bekannt ist, ob Exosomen *in vivo* von mTEZ gebildet werden, kann über die Bedeutung eines exosomalen Transfers von Oberflächenmarkern, wie EpCAM oder MHC-/Peptid-Komplexen, für die negative Selektion lediglich spekuliert werden. So wäre es interessant zu untersuchen, ob transferierte MHC-/Peptid-Komplexe unmittelbar an der tolerogenen Präsentation von GSA beteiligt sind oder lediglich dem Proteintransfer dienen und erst nach der Prozessierung durch Thy-DZ präsentiert werden. Hierüber könnte die Analyse von KM-Chimären aus letal bestrahlten RIP-mOVA-Mäusen (MHC-Haplotyp H-2<sup>b</sup>), welche mit Balb/c-KM (MHC-Haplotyp H-2<sup>d</sup>) rekonstituiert wurden, Aufschluss geben. Durch Kokultur der Thy-DZ (H-2<sup>d</sup>) dieser Tiere mit H-2<sup>b</sup>-restringierten OT-II TZRtg-TZ ließe sich die effiziente Präsentation von transferierten, allogenen MHC-/Peptid-Komplexen nachweisen, deren Herkunft sich in diesem Fall auf OVA-exprimierende mTEZ zurückführen ließe.

#### 4.2.3 Die Akquisition zellulärer Antigene von vitalen Zellen durch "Nibbling"

Neben dem exosomalen Transport wurde *"Nibbling"* als eine weitere Möglichkeit des interzellulären Transfers von Membranfragmenten und intrazellulären Materials zwischen vitalen Zellen beschrieben (wenngleich eine genaue Abgrenzung beider Mechanismen *in vivo* schwierig ist). Die Definition des Zellkontakt-abhängigen *"Nibblings"* basiert zur Zeit vornehmlich auf phänomenologischen Befunden. So konnten Harshyne und Kollegen am Primatenmodell zeigen, dass monozytäre DZ *in vitro* nicht nur apoptotische Zellfragmente, sondern auch fluoreszenzmarkierte Membranbestandteile sowie intrazelluläre Proteine von vitalen Zellen konstitutiv akquirieren und MHC-vermittelt kreuzpräsentieren (Harshyne *et al.*, 2001).

Die Aufnahme und Kreuzpräsentation zellulären Materials von vitalen Nachbarzellen ließ sich im Falle von humanen DZ und DZ aus Rhesusaffen partiell auf die Expression von *scavenger*-Rezeptoren der Klasse A (SR-A) zurückführen (Harshyne *et al.*, 2003). Durch die SR-A-vermittelte Endozytose unterscheidet sich *"Nibbling"* von der Aufnahme apoptotischer Fragmente durch CD36, einem *scavenger*-Rezeptor der Klasse B, und  $\alpha_v\beta_5$ -Integrin (Albert *et al.*, 1998).

Komplexer stellt sich die Situation im Mausmodell dar. Hier findet man SR-A hauptsächlich auf CD8α<sup>-</sup> DZ, während aus zahlreichen Studien hervorgeht, dass CD8α<sup>+</sup> DZ maßgeblich für die Kreuzpräsentation zellassoziierter Antigene verantwortlich sind (den Haan *et al.*, 2000; lyoda *et al.*, 2002). Dementsprechend konnte in SR-A-defizienten Mäusen keine Beeinträchtigung der Kreuzpräsentation nachgewiesen werden (Belz et al., 2002; Schulz *et al.*, 2002).

Dennoch sind die physiologischen Voraussetzungen für einen Zellkontakt-abhängigen, rezeptorvermittelten Transfer mTEZ-assoziierter Antigene auf CD8α<sup>+</sup> DZ im Thymus gegeben, betrachtet man die Akkumulation und direkte Nachbarschaft von DZ und MHCII<sup>hoch</sup>/CD80<sup>hoch</sup>-exprimierenden, reifen mTEZ insbesondere im Bereich der kortiko-medullären Verbindung. Das aktive *"Nibbling"* einer hochdiversen Auswahl gewebespezifischer Antigene könnte hier auf engstem Raum zu einer deutlichen Verbreiterung der Selektionsbasis für autoreaktive Thymozyten führen.

#### 4.2.4 Die immunologische Kopplung benachbarter Zellen durch gap junctions

Eine weitere Form der interzellulären Kommunikation, deren Bedeutung im Zusammenhang mit immunologischen Fragestellungen lange Zeit unterschätzt wurde, stellen *gap junctions* dar. *Gap junctions* konstitutieren sich aus 2 Connexonen, welche sich aus jeweils 6 ringförmig angeordneten Connexin-Untereinheiten zusammensetzen. Sie ermöglichen den interzellulären Transfer von Metaboliten mit einer maximalen Größe von bis zu 1,8 kDa, wie beispielsweise Ca<sup>2+</sup>-Ionen, cAMP, ATP oder linearisierten Peptiden mit einer Maximallänge von 16 Aminosäuren (Nicholson *et al.*, 2003; Neijssen *et al.*, 2005).

Ein solcher Peptid-Transport könnte auch im Hinblick auf den Ag-Transfer zwischen mTEZ und DZ relevant sein, da das *gap junction*-Protein Connexin 43 (Cx43) sowohl in DZ als auch in mTEZ nachgewiesen werden konnte (Alves *et al.*, 1995; Fonseca *et al.*, 2004; Neijssen *et al.*, 2005; Corvalan *et al.*, 2007). Dass Peptide von professionellen APZ über *gap junctions* von Nachbarzellen aufgenommen werden können, konnte vor kurzem am Beispiel von humanen Monozyten demonstriert werden, welche virale *Influenza*-Peptide über einen Cx43-abhängigen Mechanismus effizient kreuzpräsentierten (Neijssen *et al.*, 2005).

Bislang konnte jedoch kein kausaler Zusammenhang zwischen der Cx43-Expression in DZ und mTEZ und der tolerogenen Präsentation mTEZ-abgeleiteter Antigene durch Thy-DZ hergestellt werden.

Hinweise dafür könnte die Untersuchung Cx43-defizienter Mäuse liefern. Wäre die zentrale Toleranzinduktion entscheidend abhängig von einem *gap junction*-vermittelten Peptid-Transfer, so sollten sich in diesen Tieren Autoimmuninfiltrationen peripherer Organe nachweisen lassen. Cx43-*knock out* Mäuse sind jedoch aufgrund eines defizitären pulmonalen Gasaustausches, hervorgerufen durch eine Schwellung und Blockade der rechten ventrikulären Ausstromöffnung des Herzens, perinatal letal (Shibata und Yamamoto, 1977; Reaume *et al.*, 1995), weshalb eine Verifizierung dieser Hypothese auf diese Weise nicht möglich ist.

Eine Alternative stellt die Generierung von konditionellen Cx43-*knock out* Mäusen dar, welche die perinatale kardiale Dysfunktion durch die Induktion einer gewebespezifischen Defizienz umgeht. Dies wird momentan in der eigenen Gruppe durch Kreuzung von Cx43*flox*- und FoxN1-*Cre*-Mäusen durchgeführt. In doppelt-transgenen Tieren führt die durch den FoxN1-Promotor hervorgerufene TEZ-spezifische Expression der *Cre*-Rekombinase zu einer Entfernung der Cx43-Sequenzen zwischen den flankierenden loxP-Sequenzen, wodurch die Cx43-Defizienz auf TEZ beschränkt wird. Somit sollte auch der *gap junction*-vermittelte Peptidtransport zwischen mTEZ und DZ unterbrochen sein. Erste Analysen dieser Tiere stehen noch aus.

Dieses Modell setzt jedoch voraus, dass der unterbrochene Peptid-Transfer durch *gap junctions* nicht von anderen Transfer-Mechanismen kompensiert werden kann.



Abb. 34: Die Präsentation von gewebespezifischen Antigenen (GSA) unter Berücksichtigung des unidirektionalen Ag-Transfers von mTEZ auf DZ. Periphere GSA, deren intrathymische Expression in vielen Fällen auf mTEZ beschränkt ist, werden sowohl von mTEZ als auch von Dendritischen Zellen (DZ) des Thymus MHC Klasse I- und Klasse II-vermittelt präsentiert. Dies setzt einerseits voraus, dass mTEZ endogene Antigene effizient in den MHC Klasse II-Beladungsweg prozessieren. Tatsächlich zeigen mTEZ konstitutiv ein ungewöhnlich hohes Maß an Autophagie (A). Andererseits werden Antigene unidirektional von mTEZ auf DZ übertragen. Vier unterschiedliche Mechanismen, welche sich nicht gegenseitig ausschließen, kommen für den interzellulären Transfer in Frage: die Sekretion von löslichen Proteinen oder membranumschlossenen Exosomen, welche sowohl membranständige, als auch zytoplasmatische Proteine und RNA enthalten können (B); der Transfer linearisierter Peptide durch *gap junctions* (C); die Akquisition von Membranfragmenten lebender ("*Nibbling*") oder toter ("*cross-dressing*") mTEZ (D) oder die Endozytose apoptotischer Zellen (E). Die Relevanz der jeweiligen Mechanismen für den Ag-Transfer *in vivo* ist bislang jedoch unklar.

#### 4.2.5 Der Import peripherer Antigene in den Thymus durch migratorische DZ

Alle bisher beschriebenen Mechanismen zeigen Routen des intrathymischen Ag-Transfers von mTEZ auf Thy-DZ auf. Daneben besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass zentrale Toleranz gegenüber GSA induziert wird, die nicht im Thymus exprimiert werden.

Hinweise auf einen solchen Mechanismus lieferten Huseby und Kollegen, die zeigen konnten, dass *myelin basic protein* (MBP)-spezifische Thymozyten, welche ein Epitop

(Aminosäuren 121-150) erkennen, das aufgrund alternativen Spleißens der mRNA nicht im Thymus exprimiert wird, durch hämatopoetische APZ deletiert werden (Huseby *et al.*, 2001).

In einer weiteren Studie wurde durch adoptiven Transfer demonstriert, dass die Immigration von unreifen, OVA-beladenen DZ aus der Zirkulation in den Thymus unmittelbar zur negativen Selektion von Ag-spezifischen OT-II Thymozyten führt. Schließlich konnte gezeigt werden, dass auf diesem Wege auch endogene GSA (hier simuliert durch die transgene Expression von OVA in Kardiomyozyten) in den Thymus gelangen und Ag-spezifische Thymozyten deletieren (Bonasio *et al.*, 2006). Die Autoren dieser Studie untersuchten jedoch nicht, ob das verwendete Transgen im Rahmen der pGE im Thymus exprimiert wird, weshalb nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch in diesem Modell eine intrathymische Expression von OVA an der Deletion beteiligt war.

Ungeachtet dieser Möglichkeit konnte in einer Vielzahl von Studien nachgewiesen werden, dass die Expression von GSA in peripheren Organen, wie Pankreas oder ZNS, nicht ausreicht, um zentrale Toleranz zu induzieren (Kurts *et al.*, 1997; Klein *et al.*, 2000; Thebault-Baumont *et al.*, 2003; DeVoss *et al.*, 2006).

Im Gegensatz hierzu konnten in einigen Fällen Autoimmuninfiltrationen peripherer Organe durch die Expression eines einzelnen GSA in mTEZ verhindert werden, unabhängig davon, ob dieses Ag in der Peripherie exprimiert wird oder nicht. So konnten De Voss und Kollegen am Beispiel der Expression des *interphotoreceptor retinoid binding protein* (IRBP) nachweisen, dass eine Expression in mTEZ nicht nur hinreichend, sondern notwendig für die Vermeidung von spontaner autoimmuner Uveitis ist (DeVoss *et al.*, 2006). Andere Autoren konnten eine inverse Dosisabhängigkeit der Reaktivität peripherer Insulin-spezifischer TZ von dem intrathymischen Insulin-Expressionsniveau bei gleichbleibender pankreatischer Expressionsstärke nachweisen. So zeigten die TZ in Mäusen mit einer niedrigen intrathymischen Insulinexpression eine erhöhte Insulinreaktivität, obwohl die periphere Insulinproduktion der  $\beta$ -Zellen durch metabolische Rückkopplung auf einem gleichbleibend hohen Niveau gehalten wurde (Chentoufi und Polychronakos, 2002)

Das stärkste Argument für die Abhängigkeit zentraler Toleranz von der intrathymischen Genexpression liefert allerdings der Phänotyp von AIRE-defizienten Mäusen (Heino *et al.*, 1999; Halonen *et al.*, 2001). In diesen Tieren führt der Verlust des <u>autoimmune regulators</u> (AIRE), welcher im Thymus hauptsächlich von medullären Epithelzellen exprimiert wird, zu einer drastischen Reduktion der Transkription vieler promisk exprimierter Gene, die für periphere Autoantigene unterschiedlicher Gewebespezifität kodieren (Anderson *et al.*, 2002). Untersuchungen zur Expression einzelner Gene in peripheren Geweben von AIRE<sup>-/+</sup>- und AIRE-*knock out* Mäusen ergaben jedoch, dass die Expressionsstärke in der Peripherie von der AIRE-Defizienz nicht betroffen ist (Liston *et al.*, 2003).

Die intrathymische Expressionsstärke kann dementsprechend direkt mit dem Auftreten von Autoimmunreaktionen gegen eine Vielzahl von Organen sowie dem Nachweis von Autoantikörpern korreliert werden (De Voss *et al.*, 2006; Giraud *et al.*, 2007).

Diese Befunde weisen darauf hin, dass der Import peripherer GSA durch migratorische DZ höchstens im Einzelfall als Ersatz für die promiske Expression von GSA durch mTEZ dienen kann. Es soll aber keineswegs ausgeschlossen werden, dass dieser Mechanismus eine wichtige Ergänzung der intrathymischen Expression gewebespezifischer Antigene darstellt, da hierdurch möglicherweise auch Isoformen oder differentielle Spleißvarianten zellassoziierter Antigene Zugang zur zentralen Toleranzinduktion erhalten, die durch die promiske Genexpression nicht oder unterrepräsentiert sind.

In ihrer Gesamtheit bieten die hier vorgestellten Transfermechanismen mögliche Erklärungen für die effiziente Präsentation mTEZ-assoziierter Antigene durch Thy-DZ, wie sie im Zuge der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden konnte. Ob die genannten Mechanismen für den Ag-Transfer im Thymus essentiell sind oder redundante Funktionen ausüben, ist bislang unklar. Einen Hinweis auf die Relevanz der einzelnen Transferrouten könnte die Polarisierung des Ag-Transfers liefern. In allen hier vorgestellten Modellsystemen wurden Antigene stets ausschließlich unidirektional von mTEZ auf Thy-DZ übertragen. Diese Beobachtung ist im Falle von GSA, deren Expression auf mTEZ beschränkt ist, trivial. Die strikte Polarisierung des Transfers des ubiquitären *neo*-Selbstantigens OVA im L<sup>d</sup>-nOVA Modell impliziert jedoch einen gerichteten Transfermechanismus, unabhängig von einer differentiellen Expression des Antigens.

Dies spricht gegen eine Beteiligung von Mechanismen, die einen bidirektionalen Austausch von Antigenen ermöglichen, wie etwa die *gap junction*-vermittelte interzelluläre Kommunikation. Auch ein Transfer durch die Endozytose apoptotischer Zellen ist in diesem konkreten Fall unwahrscheinlich, da in L<sup>d</sup>-nOVA→Balb/c KM-Chimären keine OVA-Präsentation nachgewiesen werden konnte (siehe oben).

Die Möglichkeit des Transfers von (funktionellen) OVA<sub>323-339</sub>-/MHC-Komplexen durch *"cross-dressing"*, *"Nibbling"* und/oder Exosomen hingegen wäre konsistent mit dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit erbrachten Nachweis von anderen TEZ-abgeleiteten Oberflächenmarkern auf Thy-DZ und wird hier aus diesem Grund favorisiert.

Letztendlich ist zu erwarten, dass die relative Bedeutung der unterschiedlichen Transfermechanismen entsprechend der Größe, Expressionsstärke und zellulären Lokalisation des jeweiligen Antigens auf Einzelzellebene sowie der Frequenz der exprimierenden Zellen auf Populationsebene variiert und somit nicht generalisiert werden kann.

## 4.3 Komplementierung oder Redundanz ? – Der Einfluss des Ag-Transfers auf die differentielle Komposition des präsentierten Liganden-Repertoires in mTEZ und Thy-DZ

Thy-DZ und mTEZ erscheinen aufgrund ihrer jeweiligen spezifischen zellulären Eigenschaften (DZ: hohe Endozytose, Kreuzpräsentation extrazellulärer Antigene; mTEZ: niedrige Endozytose, pGE peripherer GSA) prädestiniert, Ag-Repertoires unterschiedlicher Herkunft zu präsentieren. Untersuchungen anhand von chimären Mäusen, in denen die **MHC-Expression** und somit die Ag-Präsentation auf bestrahlungsresistente Thymusstromazellen beschränkt war, schienen diese Vermutung zu bestätigen. So konnten, wie bereits erwähnt, Klein und Kollegen am Beispiel des proinflammatorischen Serumproteins hCRP demonstrieren, dass TEZ endogen synthetisiertes Ag autark präsentieren und Ag-spezifische TZ deletieren. Wurde das Ag jedoch über die Zirkulation in den Thymus transportiert, war eine effiziente negative Selektion nur durch hämatopoetische APZ möglich (Klein et al., 2001).

Anhand dieser Befunde postulierten Klein und Kyewski die Hypothese, dass sich mTEZ und DZ in einer Form von Arbeitsteilung bei der negativen Selektion autoreaktiver Thymozyten unterstützen, indem sie komplementäre Ag-Repertoires präsentieren (Klein und Kyewski, 2000). Demnach würden die myelogenen DZ des Thymus hauptsächlich Antigene des "hämatopoetischen Selbst" präsentieren, bestehend aus löslichen Komponenten der Zirkulation und dem Proteom der DZ. Das Ag-Repertoire der mTEZ hingegen würde aufgrund der promisken Expression gewebespezifischer Antigene einen Querschnitt des "nicht-hämatopoetischen-" oder "parenchymalen Selbst" repräsentieren.

#### 4.3.1 MTEZ und Thy-DZ präsentieren partiell redundante Ag-Repertoires

Nicht zuletzt aufgrund der hier vorgelegten Daten kann diese vereinfachende Vorstellung jedoch nicht aufrechterhalten werden. Thy-DZ präsentieren konstitutiv GSA, deren intrathymische Transkription auf mTEZ beschränkt ist. Bereits frühere Studien legten einen solchen Zusammenhang nahe (Gallegos und Bevan, 2004), doch konnte nun erstmals der Transfer nativer, zellassoziierter GSA von mTEZ auf DZ gezeigt werden.

Der konstitutive Ag-Transfer impliziert, dass Epitope gewebespezifischer Antigene von einer weitaus größeren Anzahl an APZ im Thymus präsentiert werden, als bislang angenommen wurde. Da nicht zu erwarten ist, dass sich Thymozyten in einer gerichteten Migration selektiv auf diejenigen APZ zu bewegen, welche ein Ag tragen, dass von ihrem TZR mit hoher Affinität gebunden wird, ist für die zentrale Toleranzinduktion von entscheidender Bedeutung, dass die Interaktion zwischen einem Thymozyten und einer APZ, die ein zu dem TZR

"passendes" Ag präsentiert, ausreichend wahrscheinlich ist. Die Wahrscheinlichkeit einer solchen Interaktion wird durch den Ag-Transfer in bemerkenswerter Weise erhöht.

Dies entspricht dem von Klein und Kyewski postulierten *"antigen-spreading"*-Modell, welches bereits in der Einleitung vorgestellt wurde und nunmehr als bestätigt angesehen werden darf. (siehe auch Abschnitt 1.6; Abb. 5; Klein und Kyewski 2000). In der Folge ergibt sich, dass die auf vereinzelte mTEZ beschränkte Expression, wie sie für viele GSA gezeigt werden konnte, mit einer effizienten Toleranzinduktion vereinbar ist.

Eine offensichtliche Konsequenz des Ag-Transfers ist die partielle Überlappung der von mTEZ und DZ repräsentierten Ag-"Pools", welche auf eine funktionelle Redundanz beider Zellpopulationen *in situ* hinweisen könnte. Gestützt wird diese Interpretation durch zwei verschiedene Beobachtungen:

zum einen exprimieren mTEZ und Thy-DZ MHC Klasse I- und Klasse II-Komplexe sowie kostimulatorische Moleküle (CD80, CD40) (siehe auch Abb. 8; Gäbler *et al.*, 2007; Spence und Green, 2008) und induzieren in Anwesenheit einer saturierenden Konzentration von exogenem Peptid vergleichbare TZ-Proliferationsraten *in vitro* (Abb. 16B, 23B). Dies zeigt, dass die Qualität der Ag-Präsentation beider Zellpopulationen *in vitro* vergleichbar ist.

Zum anderen weisen Thy-DZ und mTEZ ähnliche, vergleichsweise lange Halbwertszeiten (~ 25 h) von endogenen Peptid-/MHC-Komplexe auf der Zelloberfläche auf (Dissertation B. Röttinger, 2000). Es wird vermutet, dass die niedrige Austauschrate der Peptid-/MHC-Komplexe die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass autoreaktive Thymozyten mit ihrem spezifischen Ag in Kontakt kommen, was insbesondere für die tolerogene Präsentation seltener GSA relevant sein dürfte.

## 4.3.2 Welchen Einfluss hat die Epitopdichte auf die Effizienz der negativen Selektion?

Im Gegensatz zu Qualität und Dauer der Präsentation ist die Dichte der Peptid-/MHC-Komplexe eines mTEZ-restringierten GSA auf der Oberfläche von mTEZ und DZ *in vivo* vermutlich selten vergleichbar, da davon auszugehen ist, dass mTEZ-assoziierte Proteine durch die bereits beschriebenen Transfer-Mechanismen asymmetrisch verteilt werden.

Durch den unidirektionalen Transfer kommt es zu einer Verdünnung des Antigens, die entsprechend der bislang vorherrschenden Aviditätshypothese der TZ-Selektion (Modigliani *et al.* 1996; Hogquist, 2001; Zehn und Bevan, 2006) dazu führen kann, dass die Epitopdichte eines GSA auf der Oberfläche von DZ mit zunehmender Entfernung von der exprimierenden mTEZ unter den Schwellenwert fällt, der für die negative Selektion autoreaktiver Thymozyten notwendig ist.

Die Anzahl der Thy-DZ, die ein mTEZ-abgeleitetes Ag in tolerogener Weise präsentieren, wäre demnach in jedem Fall begrenzt, was gegen eine funktionelle Redundanz beider Zellpopulationen spricht.

Ein allgemeingültiger Zusammenhang zwischen einer hohen Epitopdichte pro Zelle und der effizienten negativen Selektion spezifischer Thymozyten konnte jedoch bis heute nicht nachgewiesen werden und wird von einigen Studien generell in Frage gestellt (Peterson *et al.*, 1999).

So lieferten Untersuchungen von Zhang und Kollegen Hinweise darauf, dass die durch einen Transfer des Antigens bedingte Verdünnung in einem definierten Modellsystem keinen Einfluss auf die Effizienz der negativen Selektion hat. In dieser Studie wurde HEL (<u>hen egg</u> *lysozyme*) als *neo*-Selbstantigen unter der Kontrolle des gewebespezifischen  $\alpha$ A-*Crystallin* Promotors differentiell als sekretorisches oder als membrangebundenes Protein exprimiert (Zhang *et al.*, 2003). Die Analyse der Transkription ergab, dass in beiden Fällen eine Expression in bestrahlungsresistenten Thymusstromazellen (einschließlich mTEZ) nachzuweisen war, die zu einer Deletion HEL-spezifischer TZ führte. Interessanterweise war die Deletion in Mäusen, welche die lösliche Variante exprimierten, effizienter und führte zu einem robusteren Toleranzstatus, obwohl die membrangebundene Form auf Proteinebene stärker exprimiert wurde.

Setzt man voraus, dass die sekretierte Variante auf eine größere Anzahl an APZ übertragen wird als die membrangebundene Form, lässt sich anhand dieser Daten postulieren, dass die Anzahl der Zellen, die ein definiertes Ag präsentieren, im Vergleich zur Ligandendichte pro Zelle von übergeordneter Bedeutung für die negative Selektion ist.

Auch die hier vorgelegten Ergebnisse zur Präsentation endogener GSA im P1A- und PLP-Modell unterstützen diese Schlussfolgerung. Obwohl es sich bei beiden Antigenen nicht um sekretierte Proteine handelt, konnte der Ag-Transfer von mTEZ auf Thy-DZ zweifelsfrei nachgewiesen werden. Dies impliziert, dass sich die Anzahl der präsentierenden Zellen erhöht, während sich die Epitopdichte pro Zelle verringert (Abb. 35). In beiden Modellsystemen konnte eine effiziente Präsentation mTEZ-abgeleiteter Antigene durch Thy-DZ *ex vivo* nachgewiesen werden (siehe Abb. 18, 28B).



<u>Abb 35:</u> Schematische Darstellung des Transfers gewebespezifischer Antigene von mTEZ auf Thy-DZ (erweitertes *Spreading*-Modell). Basierend auf den Befunden der eigenen Arbeit und den Überlegungen zum interzellulären Transfer mTEZ-assoziierter Antigene zeigt diese Abbildung, wie zentrale Toleranz gegenüber seltenen GSA im Thymus gewährleistet werden kann. GSA werden von mTEZ exprimiert und konstitutiv auf Dendritische Zellen übertragen. Abhängig von dem zugrunde liegenden Transfermechanismus werden GSA durch Zellkontakt (*"Nibbling", gap junctions, "cross-dressing"*) auf DZ in der näheren Umgebung oder durch einen Zellkontakt-unabhängigen Mechanismus (Exosomen, Sekretion von löslichem Ag) in einem weiteren Radius verbreitet. Hieraus kann ein Verdünnungseffekt abgeleitet werden, der dazu führt, dass DZ in der unmittelbaren Umgebung der exprimierenden mTEZ zwar eine hohe Ligandendichte eines definierten GSAs aufweisen, insgesamt jedoch eine geringe GSA-Diversität repräsentieren, da sie nur beschränkten Zugang zum GSA-"Pool" anderer mTEZ haben. Thy-DZ, die Antigene von mehreren mTEZ erhalten, präsentieren hingegen ein hochdiverses, jedoch quantitativ limitiertes Ligandenrepertoire. Gemeinsam führen beide Effekte zu einer Verbreiterung der Selektionsbasis seltener GSA auf Affinitäts- und Aviditätsebene.

#### 4.3.3 Negative Selektion wird durch die Affinität des T Zell-Rezeptors bestimmt

Eine mögliche Erklärung für die effiziente Deletion Ag-spezifischer Thymozyten durch APZ mit geringer Epitopdichte liefert eine aktuelle Studie, wonach die Affinität des TZR zu "seinem" Peptid-/MHC-Liganden einen größeren Einfluss auf die negative Selektion ausübt als die Ligandendichte auf der Oberfläche der APZ (Naeher *et al.*, 2007).

Naeher und Kollegen verglichen anhand fötaler Thymusorgankulturen das Selektions-Potential unterschiedlich starker, agonistischer Peptid-/MHC-Liganden. Wie erwartet, induzierten schwach-agonistische Liganden in TZRtg-Thymozyten positive Selektion, während starke Agonisten negative Selektion vermittelten. Überraschenderweise stellte sich aber heraus, dass die Induktion von positiver und negativer Selektion über einen breiten Konzentrationsbereich der jeweiligen Peptid-Liganden stabil blieb (nach dem Aviditätsmodell hätte man eine Verstärkung der negativen Selektion mit steigender Ligandenkonzentration erwartet).

In weiteren Untersuchungen konnte ein konstanter Affinitätsschwellenwert (bei  $K_d \sim 6 \mu M$ ) definiert werden, oberhalb dessen es in drei verschiedenen CD8<sup>+</sup> TZRtg-Modellsystemen unweigerlich zur negativen Selektion kam, unabhängig von der Anzahl der beteiligten TZR-Ligand-Interaktionen. Für gegebene TZR gibt es demnach einen Affinitätsbereich, innerhalb dessen die Epitopdichte auf der Oberfläche der APZ keinen Einfluss auf das Resultat der Interaktion hat.

Entgegen den Vorhersagen der Aviditätshypothese ist negative Selektion demnach mit einer geringen Menge an Peptid-/MHC-Komplexen auf der APZ-Oberfläche vereinbar, vorausgesetzt, die Affinität des TZR zu "seinem" Liganden liegt oberhalb des definierten Schwellenwertes. Durch den Transfer eines hochaffinen Liganden von mTEZ auf Thy-DZ würde sich somit die Anzahl der Zellen, die negative Selektion gegenüber diesem Ag vermitteln, effektiv erhöhen.

Aus der Studie von Naeher und Kollegen geht jedoch ebenfalls hervor, dass es einen Grenzbereich unterhalb des Affinitätsschwellenwertes gibt (bei  $K_d \ge 6 \mu$ M), in dem die Ligandenkonzentration für das Resultat der Selektion entscheidend ist. Die Autoren konnten zeigen, dass Peptid-Liganden, die von definierten TZR mit mittlerer Affinität gebunden werden, positive Selektion vermitteln, wenn sie in niedriger Konzentration vorliegen, während eine hohe Ligandenkonzentration zur negativen Selektion führt.

Auch für natürliche mTEZ-restringierte Antigene scheint es einen solchen Grenzbereich zu geben. So konnte in mehreren Fällen eine enge Korrelation zwischen der Expressionsstärke in mTEZ und der Effizienz der negativen Selektion nachgewiesen werden. Man stellte fest, dass bereits eine geringe Reduktion der Transkription in einer erhöhten Suszeptibilität für Autoimmunerkrankungen resultieren kann (Vafiadis *et al.*, 1997). Besonders anschaulich

wird dies, betrachtet man die intrathymischen Expressionsunterschiede in anfälligen und resistenten Mausstämmen für <u>experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis</u>, <u>U</u>veitis oder <u>Neuritis</u> (EAE /EAU /EAN). Obwohl sich in diesen Fällen die Expressionsstärke zwischen den jeweiligen Stämmen teilweise nur um den Faktor 2-4 unterscheidet (Liu *et al.*, 2001; Miyamoto *et al.*, 2003; Liston *et al.*, 2003), bedingt bereits dieser Unterschied ein erhöhtes Erkrankungsrisiko.

Liegen Antigene wie in einem solchen Fall nur in äußerst geringer Konzentration vor, kann es für die Aufrechterhaltung der Toleranz von Bedeutung sein, dass endogene Peptid-/MHC-Komplexe, welche von einem TZR mit niedriger Affinität gebunden werden, als Ko-Agonisten für wenige hochaffine Liganden fungieren können (Krogsgaard *et al.*, 2005). Die kooperative Ligation solcher Ko-Agonisten resultiert in einer höheren Sensitivität für das spezifische Ag und erhöht somit die Wahrscheinlichkeit einer negativen Selektion, vorausgesetzt, die Affinität zu dem starken Agonisten liegt oberhalb des tolerogenen Schwellenwertes.

Die hier diskutierten Befunde und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erfordern eine Adaptation des von Kyewski und Klein postulierten Arbeitsteilungsmodells. So darf es nunmehr als erwiesen angesehen werden, dass Thy-DZ mTEZ-abgeleitete GSA in tolerogener Weise präsentieren können. Umgekehrt konnten andere Studien zeigen, dass die pGE in mTEZ auch Proteine der Zirkulation wie beispielsweise Hämoglobin, Somatostatin oder Komponenten des Komplementsystems (C5) umfasst (Derbinski *et al.*, 2001, Dissertation J. Derbinski, 2003). Geht man davon aus, dass mTEZ diese Antigene auch autonom präsentieren, so ist es nicht zutreffend, dass lösliche Serumkomponenten ausschließlich von DZ präsentiert werden.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass mTEZ und Thy-DZ partiell redundante und nicht strikt komplementäre Ag-Repertoires präsentieren. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die effiziente Präsentation mTEZ-abgeleiteter Antigene durch DZ in den untersuchten Modellsystemen trotz einer mit dem Transfer einhergehenden Verdünnung möglich ist. Liegt die Affinität eines TZR zu einem solchen Liganden über einem definierten Schwellenwert, ist davon auszugehen, dass es zur negativen Selektion kommt.

Die Avidität der Interaktion zwischen TZ und APZ (mTEZ oder Thy-DZ) könnte hingegen für die Entscheidung relevant sein, welcher Toleranzmechanismus (negative Selektion oder Treg-Induktion) in einer TZ mit definierter Spezifität induziert wird. Dies wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

# 4.4 Implikationen des unidirektionalen Ag-Transfers von mTEZ auf Thy-DZ für die Induktion alternativer Toleranzmechanismen

Obwohl es sich bei der negativen Selektion um einen hocheffizienten Mechanismus handelt, ist die Präsentation eines Antigens im Thymus kein Garant für die Deletion autoreaktiver Thymozyten.

Einerseits sind seltene GSA, deren intrathymische Expression sich oft auf wenige hundert mTEZ pro Thymus beschränkt, im Vergleich mit ubiquitären Antigenen *in situ* unterrepräsentiert. Da TZR mit einer Spezifität für diese seltenen Liganden im Zuge der somatischen Rekombination jedoch mit der gleichen Wahrscheinlichkeit generiert werden wie solche, die ein ubiquitäres Ag mit hoher Affinität binden, ergibt sich, dass für erstere ein erhöhtes Risiko besteht, als autoreaktive Rezeptoren unzensiert in die Peripherie entlassen zu werden. Auch wurde gezeigt, dass autoreaktive TZ, die einer negativen Selektion im Thymus entgehen, weil sie ihren spezifischen Liganden mit niedriger Avidität binden, in Gegenwart starker inflammatorischer Stimuli in der Peripherie aktiviert werden können (Zehn und Bevan, 2006).

Andererseits repräsentiert das promiske Genexpressionsmuster reifer mTEZ, obwohl hochdivers, keineswegs das vollständige periphere Transkriptom.

Demzufolge konnte gezeigt werden, dass autoreaktive TZ Bestandteil des peripheren TZ-Repertoires eines jeden gesunden Individuums sind (Fowell und Mason, 1993; Wucherpfennig *et al.*, 1994).

Daraus wird deutlich, dass neben der negativen Selektion autoreaktiver Thymozyten noch weitere Mechanismen an der Aufrechterhaltung der Toleranz beteiligt sein müssen. Hierzu zählen periphere Toleranzmechanismen, wie die Induktion von Anergie oder die immunologische Ignoranz ebenso, wie die Suppression autoreaktiver TZ durch regulatorische TZ (Walker und Abbas, 2002).

Die Mehrheit der natürlich vorkommenden regulatorischen TZ (Tregs), welche durch die konstitutive Koexpression des Transkriptionsfaktors Foxp3 mit CD4 und der Interleukin 2-Rezeptor α-Kette (CD25) phänotypisch charakterisiert werden, entstammt einem Thymusabhängigen Selektionsprozess (Asano *et al.*, 1996; Itoh *et al.*, 1999; Fontenot *et al.*, 2005a). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs repräsentieren somit aller Wahrscheinlichkeit nach einen alternativen Entwicklungsweg zu CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> konventionellen TZ (Bensinger *et al.*, 2001).

Die Induktion von Tregs ist ebenso wie die negative Selektion selbstreaktiver Thymozyten von der Autoantigen-Expression und -Präsentation im Thymus abhängig (Jordan *et al.*, 2001 Apostolou *et al.*, 2002). Derzeitige Modelle postulieren, dass Tregs analog zu der negativen Selektion autoreaktiver Thymozyten ebenfalls durch Interaktion ihres TZR mit einem Selbst-

Peptid-/MHC-Liganden in einem affinitätsabhängigen Prozess determiniert werden (Hogquist *et al.*, 2005, Schwartz *et al.*, 2005; Kretschmer *et al.*, 2006).

#### 4.4.1 Die Induktion regulatorischer TZ durch TEZ

Die Frage, in welchem Reifestadium die unterschiedliche Differenzierung der Thymozyten erfolgt und welche akzessorischen Zellpopulationen und induktiven Signale an dieser Entscheidung beteiligt sind, ist aktuell Gegenstand intensiver Forschung.

Bekannt ist, dass die Expression und autonome Präsentation von Autoantigenen durch Thymusepithelzellen hinreichend sind, um CD4<sup>+</sup> Thymozyten zu Tregs zu "konvertieren". So konnte die Induktion eines normalen polyklonalen Treg-Repertoires in MHC Klasse II<sup>-/-</sup> Mäusen durch die transgene MHC-Expression in TEZ wiederhergestellt werden (Laufer et al., 1996; Apostolou et al., 2002; Ribot et al., 2006). In diesen Tieren entsprach die periphere Fraktion CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> mit 10% aller CD4<sup>+</sup> TZ sowohl in Anzahl, als auch in Funktionalität in vitro und in vivo der Treg-Population in Wt-Mäusen. Eine kürzlich veröffentlichte detaillierte Studie untermauerte diese Befunde, indem sie nachwies, dass die kTEZ-restringierte Präsentation eines definierten Peptid-Liganden ausreicht, um Tregs Ag-spezifisch aus einem polyklonalen Thymozten-Repertoire zu selektieren (Ribot et al., 2007). Tatsächlich konnte in einem doppelt-transgenen TZR-/Ligand-Modell die Transkription des Treg-spezifischen bereits in CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Transkriptionsfaktors Foxp3 doppelt-positiven Thymozyten nachgewiesen werden, welche einen Großteil der kortikalen Thymozytenpopulation ausmachen (Cabarrocas et al., 2006). Diese Ergebnisse implizieren, dass die Präsentation autologer Antigene durch kTEZ hinreichend ist, um die Differenzierung doppelt-positiver Thymozyten in CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs zu induzieren.

Ein wesentlicher Aspekt dieser Studien blieb dabei jedoch bislang unberücksichtigt: in keinem der Fälle kann mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass die beobachteten Effekte exklusiv auf die Ag-Expression und -Präsentation durch kTEZ zurückzuführen sind, da die Wahl der jeweiligen Promotorfragmente (*keratin 14* und *glial fibrillary acidic protein*) auch eine Transkription in mTEZ erlaubt. Erstaunlicherweise stimmt die Frequenz der MHC-Transgen-exprimierenden mTEZ ( $\leq 2\%$ ) in der Studie von Ribot und Kollegen (2007) mit der Frequenz von mTEZ überein, die in Wt-Mäusen ein jeweiliges GSA promisk exprimieren (1-3%). Eine medulläre Treg-Induktion wäre also durchaus möglich.

So verwundert es nicht, dass andere Untersuchungen einen rein kortikalen Ursprung der Tregs in Frage stellen. Wie die Analyse von transgenen Foxp3-GFP (*green fluorescent protein*)-Mäusen ergab, findet die Translation des Foxp3-GFP-Fusionsproteins vornehmlich in medullären Thymozyten statt, während nur wenige grün fluoreszierende Zellen im Kortex nachgewiesen werden konnten (Fontenot *et al.*, 2005a und 2005b). Unter der Annahme,

dass Foxp3-Transkription und -Translation zeitlich versetzt auftreten, wäre dieser Befund jedoch auch mit der Foxp3-Induktion in kortikalen Thymozyten vereinbar.

Überzeugendere Hinweise auf eine Beteiligung des medullären Stromas erbrachten die Untersuchungen von TRAF6- und NFκB-defizienten Mäusen. In beiden Mutanten ist die medulläre Thymusarchitektur gestört, was zu einer reduzierten Anzahl CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs in der Peripherie führt, während das kortikale Stroma augenscheinlich einen normalen Phänotyp besitzt. Diese Beobachtungen sind konsistent mit der räumlichen und zeitlichen Kopplung der Induktion einer ersten "Welle" von Tregs mit der Entwicklung eines funktionellen medullären Stromas in neonatalen Mäusen (Bonomo *et al.*, 1995; Asano *et al.*, 1996; Fontenot *et al.*, 2005b).

Die Differenzierung eines Wt-Treg-Repertoires setzt demnach einen medullären Entwicklungsschritt voraus, was eine direkte Beteiligung von mTEZ und/oder Thy-DZ wahrscheinlich macht. Im Gegensatz zur negativen Selektion hochaffiner konventioneller TZ erhalten Treg-Vorläufer in der Medulla jedoch ein positives Signal, welches offenbar essentiell für die Entwicklung einer normalen Anzahl reifer CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs ist. Unklar ist bislang, ob der medulläre Entwicklungsschritt lediglich die Expansion bereits determinierter Treg-Vorläufer oder aber auch die *de novo*-Induktion von Tregs umfasst.

Erste Belege für eine nicht-redundante Funktion von mTEZ entstammen einer kürzlich veröffentlichten Studie, wonach die autonome Ag-Expression und -Präsentation durch mTEZ mit der erhöhten Frequenz Ag-spezifischer CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Thymozyten korreliert (Aschenbrenner *et al.*, 2007).

Aschenbrenner und Kollegen rekonstituierten zunächst bestrahlte athymische Nacktmäuse mit TZRtg-Knochenmark, woraufhin Thymi transplantiert wurden, in denen die Expression des spezifischen Antigens (*hemagglutinin*, HA) durch den AIRE-Promotor kontrolliert und hierdurch auf mTEZ beschränkt war. Um die Kreuzpräsentation des Antigens und somit eine "Kreuz-Induktion" von Tregs durch DZ formell auszuschließen, wurden die MHC-Haplotypen von Empfängertieren und Transplantat so gewählt, dass lediglich Thymusepithelzellen in der Lage waren, den TZRtg-Thymozyten das selektionierende Ag zu präsentieren. Die Frequenz CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Thymozyten blieb daraufhin jedoch unverändert hoch, was als Zeichen gewertet wurde, dass die HA-Präsentation durch DZ für die Differenzierung von Tregs nicht notwendig ist. MTEZ wären also unabhängig von DZ imstande, Ag-spezifische Tregs durch autonome Präsentation zu induzieren.

Möglicherweise spielt auch hier die konstitutive Makroautophagie in mTEZ (siehe Kapitel 4.1) für die effiziente Beladung von MHC Klasse II-Komplexen mit endogenen Peptiden eine entscheidende Rolle. Ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen Autophagie in mTEZ und der Induktion regulatorischer TZ konnte allerdings bislang nicht nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zur Induktion regulatorischer TZ als Folge der mTEZ-spezifischen Expression resultierte die HA-Expression unter der Kontrolle des DZ-spezifischen CD11c-Promotors in der totalen Deletion Ag-spezifischer Thymozyten. Dies würde bedeuten, dass Thy-DZ und mTEZ in Bezug auf die Selektion von Tregs unterschiedliche Funktionen ausüben.

Zu ähnlichen Schlussfolgerungen kamen Romagnoli und Kollegen, die zeigen konnten, dass zwar die Interaktion mit hämatopoetischen APZ, jedoch nicht mit epithelialen Stromazellen, zur negativen Selektion hochaffiner, autoreaktiver Treg-Vorläufer führt (Romagnoli *et al.*, 2005). Ob Thy-DZ und mTEZ tatsächlich komplementäre Funktionen ausüben, oder ob diese Aufgabenteilung lediglich eine Besonderheit der hier verwendeten Modellsysteme darstellt, bleibt zu klären.

#### 4.4.2 Die Bedeutung Dendritischer Zellen für die Treg-Entwicklung

Die zuletzt genannten Befunde implizieren, dass die Präsentation eines Autoantigens durch Thy-DZ primär zur negativen Selektion spezifischer Thymozyten führt. Andere Studien zeigen jedoch, dass DZ auf vielfältige Weise an der Induktion und/oder der Expansion regulatorischer TZ in Thymus und Peripherie beteiligt sind.

Funktionelle Anhaltspunkte für die Induktion regulatorischer Zellen durch Thy-DZ stammen aus *in vitro*-Exprimenten mit humanen DZ, die nach Inkubation mit *thymic stromal lymphopoetin* (TSLP) in der Lage waren, CD25<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> Thymozyten in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs zu konvertieren (Watanabe *et al.*, 2005). Die intrathymische TSLP-Expression *in situ* konnte den Hassall`schen Korpuskeln zugeordnet werden, globulären Strukturen des Humanthymus, welche hauptsächlich aus epithelialen Zellen aufgebaut und in der Medulla lokalisiert sind. Demnach würden mTEZ durch die Expression von TSLP Thy-DZ konditionieren, regulatorische TZ zu induzieren.

Dieser Effekt scheint jedoch nicht evolutionär konserviert zu sein, da murines TSLP zwar eine ähnliche Funktion *in vitro* ausübt, TSLP-defiziente Mäuse aber normale Frequenzen von Foxp3<sup>+</sup> Thymozyten aufweisen (Jiang *et al.*, 2006). Denkbar wäre auch, dass die Entwicklung von Tregs in TSLP<sup>-/-</sup>-Mäusen durch andere Zellpopulationen, wie mTEZ, unterstützt wird, was jedoch eine TSLP-abhängige Treg-Induktion durch Thy-DZ in Wt-Mäusen nicht ausschließt.

Im Unterschied zum Thymus, wo ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen TSLP-Expression und einer Treg-Induktion durch DZ *in vivo* bislang nicht hergestellt werden konnte, scheint die TSLP-Produktion durch intestinale Epithelzellen eine wichtige Rolle bei der Konditionierung peripherer, tolerogener DZ zu spielen (Rimoldi *et al.*, 2005).

Wie aus Studien der Gruppe um Powrie hervorgeht, sind diese tolerogenen DZ der Darmmukosa und der mesenterialen Lymphknoten charakterisiert durch die konstitutive Expression von  $\alpha_E$ -Integrin (CD103). Es konnte gezeigt werden, dass CD103<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DZ *in* 

*vitro* und *in vivo* die Fähigkeit besitzen, naive CD4<sup>+</sup> TZ in Abhängigkeit des inflammatorischen Milieus in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs zu konvertieren (Coombes *et al.*, 2007). Obwohl diese CD103<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DZ keine distinkte, homogene Zellpopulation darstellen, ist die Mehrheit dieser Zellen neben der Expression von CD103 gekennzeichnet durch die Koexpression von CD8α und MHC Klasse II-Komplexen, während Marker anderer DZ-Subpopulationen, wie B220 und CD11b, weitestgehend fehlen (Annacker *et al.*, 2005). Möglicherweise liefern diese peripheren DZ Hinweise auf den Phänotyp Treg-induzierender Thy-DZ.

Der Phänotyp von peripheren CD103<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> DZ entspricht im Wesentlichen dem der CD8 $\alpha^+$  Hauptpopulation der Thy-DZ. Darüber hinaus zeigen vorläufige Ergebnisse der eigenen Gruppe, dass auch CD103 von einer Subpopulation der CD8 $\alpha^+$ CD11c<sup>+</sup> Thy-DZ exprimiert wird (Daten nicht gezeigt). Erstaunlicherweise ist die Frequenz der CD103<sup>+</sup> Zellen innerhalb der EpCAM<sup>+</sup> DZ-Subpopulation, die sich durch eine besonders effiziente Akquisition und Präsentation mTEZ-abgeleiteter Proteine auszeichnet (siehe Abb. 31), am höchsten.

Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob CD103<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup> Thy-DZ tatsächlich das Potential zur Induktion regulatorischer TZ besitzen.

Eine aktuelle Studie zur Treg-Entwicklung in CD40-defizienten Mäusen liefert den derzeitig besten Hinweis auf eine direkte Beteiligung von Thy-DZ *in vivo* (Spence und Green, 2008). CD40 zählt zu den kostimulatorischen Molekülen und wird von TEZ und Thy-DZ exprimiert. Die Bindung durch den CD40-Liganden CD154, welcher von CD4<sup>+</sup> Thymozyten exprimiert wird, resultiert unter anderem in einer Verstärkung und Manifestation der Expression von MHC Klasse II-Komplexen und der Kofaktoren CD80 und CD86 und hat somit direkten Einfluss auf die Ag-Präsentation.

In CD40<sup>-/-</sup>-, aber auch in CD154<sup>-/-</sup>-Mäusen ist die Anzahl der Foxp3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Thymozyten um mehr als 60% reduziert, was auf eine wichtige Rolle dieses Kofaktors bei der Entwicklung von Tregs schließen lässt. Interessanterweise ergab die Analyse von KM-Chimären, dass die exklusive CD40-Expression sowohl durch bestrahlungsresistente Thymusstromazellen (TEZ), als auch durch hämatopoetische Zellen (DZ) hinreichend ist, um die normale Frequenz von Foxp3<sup>+</sup> Tregs in Thymus und Peripherie wieder herzustellen. Weiterführende Untersuchungen ergaben jedoch, dass dieser Effekt vermutlich auf der Expansion bereits determinierter Treg-Vorläufer und nicht auf der *de novo*-Induktion eines polyklonalen Treg-Repertoires beruht.



<u>Abb. 36:</u> Zentrale TZ-Toleranz basiert auf der kooperativen Induktion dominanter und rezessiver Toleranzmechanismen. Die zentrale Toleranzinduktion gegenüber GSA erfolgt durch die parallele Deletion potentiell selbstreaktiver Thymozyten und die Induktion regulatorischer TZ (Tregs). An beiden Ereignissen sind epitheliale (TEZ) und hämatopoetische (DZ) APZ-Populationen der Medulla maßgeblich beteiligt. MTEZ exprimieren und präsentieren GSA und können auf diese Weise selbst-reaktive Thymozyten deletieren. Darüber hinaus ist die ektopische Expression und autonome Präsentation von *neo*-Selbstantigenen durch mTEZ hinreichend für die Selektion Autoantigen-spezifischer Tregs. Parallel werden GSA konstitutiv und unidirektional von mTEZ auf DZ übertragen. Die Präsentation mTEZ-abgeleiteter Antigene durch DZ ist hinreichend und in einigen Fällen notwendig, um autoreaktive Thymozyten zu deletieren. Daneben beeinflussen hämatopoetische APZ durch die Expression von kostimulatorischen Molekülen auch die Entwicklung regulatorischer TZ. Die umfassende Deletion Autoantigen-spezifischer Thymozyten, deren TZR ein DZ-restringiertes Ag erkennt, spricht jedoch dafür, dass DZ primär negative Selektion vermitteln. Welche Kriterien im Einzelfall darüber entscheiden, ob autoreaktive Thymozyten deletiert werden oder zu Tregs differenzieren, ist zur Zeit unklar. Vieles deutet jedoch darauf hin, dass die Affinität/Avidität des TZR zu seinem Peptid-/MHC-Liganden und die Präsenz von Kofaktoren auf der Oberfläche von APZ entscheidend sind.

#### 4.4.3 Die Differenzierung von Tregs wird durch kostimulatorische Moleküle entscheidend beeinflusst

Am Einfluss des kostimulatorischen Moleküls CD40 wird deutlich, dass die Differenzierung von Treg-Vorläufern im Thymus nicht alleine von der Affinität des TZR zu seinem Peptid-/ MHC-Liganden abhängt. Vielmehr konnte neben der CD40-CD154-Interaktion die Beteiligung weiterer Kofaktoren an der Treg-Entwicklung belegt werden.

So ist bekannt, dass die CD28-vermittelte Kostimulation sowohl für die Homöostase peripherer Tregs, als auch für die Induktion Foxp3<sup>positiver</sup>-Thymozyten von entscheidender Bedeutung ist (Tang *et al.*, 2003; Tai *et al.*, 2005). Dementsprechend weisen CD28-defiziente Mäuse eine reduzierte Anzahl an Foxp3<sup>+</sup> Tregs in Thymus und Peripherie auf. Der CD28-Rezeptor ist das wichtigste kostimulatorische Molekül von TZ und interagiert mit CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) auf der Oberfläche reifer, Ag-präsentierender Zellen, wie B-Zellen, DZ und mTEZ.

Tai und Kollegen konnten zeigen, dass die Expression von Foxp3 in unreifen DP-Thymozyten *in vitro* durch die Kostimulation von TZR und CD28 induziert werden kann. In diesem Fall war die Kostimulation sogar von übergeordneter Bedeutung, da hohe Dosen eines agonistischen anti-CD28-Antikörpers erforderlich waren, um Foxp3 zu induzieren, während die Induktion der Foxp3-Expression über einen breiten Titrationsbereich eines anti-TZR-Antikörpers möglich war (Tai *et al.*, 2005).

Der Einfluss von CD28 auf die Entwicklung von Tregs kann vielfältiger Natur sein. Zum einen ist denkbar, dass die CD28-Ligation eine Steigerung der Avidität der TZ-APZ Interaktion zur Folge hat, was diese über den zur Selektion regulatorischer TZ notwendigen Schwellenwert erhebt. Zum anderen könnte CD28 in Tregs ein expansives oder protektives Signal vermitteln, da durch CD28-vermittelte Kostimulation sowohl die Sekretion von Interleukin-2 (IL-2), als auch die Expression anti-apoptotischer Proteine, wie *bcl-xL*, induziert wird (Jenkins *et al.*, 1991; Boise *et al.*, 1995; Alegre *et al.*, 2001).

Neueste Studien deuten darauf hin, dass CD28 die Differenzierung regulatorischer TZ vornehmlich mittelbar durch die Induktion der Sekretion von Zytokinen, insbesondere von IL-2, beeinflusst (Lio *et al.*, 2008). IL-2 bindet an einen trimeren Rezeptor, der neben der induzierbaren, hochaffinen  $\alpha$ -Kette (CD25) auch aus einer  $\beta$ -Kette und der gemeinsamen  $\gamma$ -Kette besteht, die sich viele Zytokinrezeptoren teilen. Interessanterweise scheint die charakteristische, hochaffine  $\alpha$ -Kette für die Foxp3<sup>+</sup>-Induktion in Thymozyten entbehrlich zu sein, während die Treg-Entwicklung in IL2R $\beta^{--}$ -Mäusen dramatisch gestört ist (Fontenot *et al.*, 2005c; D'Cruz und Klein, 2005).

Die Expression der CD28-Liganden (CD80/CD86) im Thymus ist auf die medullären Areale beschränkt und deckt sich somit sowohl mit der Verteilung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Thymozyten, als auch mit dem intrathymischen Expressionsmuster des Treg-spezifischen Transkriptionsfaktors Foxp3 (Nelson *et al.*, 1993; Itoh *et al.*, 1999; Zheng *et al.*, 2004; Fontenot *et al.*, 2005b).

Innerhalb der medullären Areale konzentriert sich die B7-Expression auf "reife" mTEZ und Thy-DZ. In mTEZ korreliert die CD80-Expression in bemerkenswerter Weise mit der Stärke und Diversität der pGE, aber auch mit der Effizienz der endogenen Ag-Präsentation, was die Induktion einer polyklonalen Treg-Population mit einem hochdiversen Rezeptorrepertoire begünstigen würde (Gray *et al.*, 2006; Gäbler *et al.*, 2007).

Auf Seiten der Thy-DZ zeichnen sich insbesondere EpCAM<sup>hoch</sup>-exprimierende CD11c<sup>+</sup> DZ durch eine starke Expression beider B7-Kofaktoren aus. Interessanterweise korreliert dieser Phänotyp auch hier mit der hocheffizienten MHC Klasse II-vermittelten Präsentation mTEZ-abgeleiteter Antigene *ex vivo* (siehe Abb. 34; 36).

Reife mTEZ und EpCAM<sup>hoch</sup>-exprimierende Thy-DZ können demnach die zur Treg-Entwicklung notwendige CD28-Kostimulation vermitteln.

Angesichts der effizienten Kreuzpräsentation mTEZ-abgeleiteter GSA und der Bedeutung von kostimulatorischen Signalen für die Treg-Entwicklung erscheinen sowohl eine synergistische Ko-Induktion regulatorischer TZ durch Thy-DZ- und TEZ-(Sub-)Populationen, als auch eine Aufgabenteilung (Treg-Induktion / negative Selektion) möglich, wobei sich beide Optionen nicht grundsätzlich ausschließen.

Ein aktuelles Modell postuliert, dass Tregs in einem 2-stufigen Selektionsprozess als Alternative zur negativen Selektion hochaffiner autoreaktiver Thymozyten induziert werden (Liston und Rudensky, 2007; Burchill *et al.*, 2008; Lio *et al.*, 2008). Ist eine geeignete Affinität des TZR gegeben, kann die Festlegung potentieller Treg-Vorläuferzellen sowohl durch die Interaktion mit kortikalen, als auch mit medullären TEZ und DZ erfolgen, je nach dem, welche Zellpopulation den spezifischen Liganden in ausreichender Dichte präsentiert. Die initiale Aktivierung der Thymozyten resultiert zunächst in der Expression des hochaffinen IL-2R und somit einer erhöhten Sensitivität gegenüber zytokinvermittelten Signalen.

Ein "zweites" Signal, welches durch die Ligation des CD28-Rezeptors und die daraus resultierende auto- und parakrine Zytokin-Sekretion vermittelt wird, setzt die Expression der Kofaktoren CD80 und CD86 durch APZ voraus. Da EpCAM<sup>+</sup> Thy-DZ und reife mTEZ eine starke Expression beider Kofaktoren aufweisen, erscheinen beide Zellpopulationen in besonderer Weise geeignet, selektiv die positive Selektion und Expansion regulatorischer TZ aus hochaffinen Vorläuferzellen zu unterstützen.

#### 4.5 Ausblick

Die Entdeckung der promisken Genexpression peripherer GSA leistete einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis der zentralen TZ-Toleranz. Die geringe Frequenz der mTEZ, die ein bestimmtes Ag exprimieren, ist jedoch nur unter gewissen Voraussetzungen mit einer effektiven Selektion autoreaktiver Thymozyten vereinbar.

Die hier gezeigte Kreuzpräsentation mTEZ-abgeleiteter GSA durch Thy-DZ, basierend auf einem konstitutiven, unidirektionalen Ag-Transfer, bietet in Kombination mit der Präsentation endogener Antigene durch mTEZ eine mögliche Erklärung für die bemerkenswerte Effizienz der zentralen Toleranzinduktion gegenüber transkriptionell restriktiv exprimierten Antigenen.

Durch den Ag-Transfer wird einerseits die Gesamtzahl der Zellen, die ein definiertes Ag präsentieren, deutlich erhöht, was die Wahrscheinlichkeit vergrößert, dass autoreaktive Thymozyten mit ihrem spezifischen Peptidliganden in Kontakt kommen. Andererseits wird durch die Variation der Ligandendichte auf Einzelzellebene die Induktion verschiedener, aviditätsabhängiger Toleranzmechanismen (Deletion / Treg-Induktion) unterstützt.

Obwohl es für beide Szenarien überzeugende Hinweise gibt, sind die Regularien der zentralen Toleranz nach wie vor unvollständig verstanden. So konnte bislang nicht geklärt werden, welche Frequenz Ag-präsentierender Zellen für die effiziente Selektion eines autoreaktiven TZR nötig ist. Auch ist weitestgehend unklar, warum die autonome Präsentation gewebespezifischer Antigene durch mTEZ bevorzugt zur Induktion regulatorischer TZ aus TZRtg-Vorläufern führt, während die endogene Präsentation des spezifischen Antigens durch DZ präferentiell in der Deletion dieser Thymozyten resultiert.

Welche Parameter definieren den kritischen Schwellenwert, der darüber entscheidet, ob ein Thymozyt zu einer konventionellen oder regulatorischen TZ differenziert oder negativ selektioniert wird?

Bislang konnte kein allgemeingültiger Zusammenhang zwischen der Expressionsstärke, der Ag-Präsentation, der Affinität des TZR und der präferentiellen Induktion eines bestimmten Differenzierungsschicksals hergestellt werden. Handelt es sich hierbei um einen instruktiven oder stochastisch-selektiven Prozess?

## 5. <u>Literaturverzeichnis</u>

Aaltonen, J., Horelli-Kuitunen, N., Fan, J. B., Bjorses, P., Perheentupa, J., Myers, R., Palotie, A. and Peltonen, L., High-resolution physical and transcriptional mapping of the autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy locus on chromosome 21q22.3 by FISH. *Genome Res* **1997**. 7: 820-829.

Albert, M. L., Pearce, S. F., Francisco, L. M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R. L. and Bhardwaj, N., Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* **1998**. 188: 1359-1368.

Alegre, M. L., Frauwirth, K. A. and Thompson, C. B., T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol* 2001. 1: 220-228.

Alves, L. A., Campos de Carvalho, A. C., Cirne Lima, E. O., Rocha e Souza, C. M., Dardenne, M., Spray, D. C. and Savino, W., Functional gap junctions in thymic epithelial cells are formed by connexin 43. *Eur J Immunol* **1995**. 25: 431-437.

Anderson, M. S., Venanzi, E. S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S. P., Turley, S. J., von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C. and Mathis, D., Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* **2002**. 298: 1395-1401.

Andre, F., Chaput, N., Schartz, N. E., Flament, C., Aubert, N., Bernard, J., Lemonnier, F., Raposo, G., Escudier, B., Hsu, D. H., Tursz, T., Amigorena, S., Angevin, E. and Zitvogel, L., Exosomes as potent cell-free peptide-based vaccine. I. Dendritic cell-derived exosomes transfer functional MHC class I/peptide complexes to dendritic cells. *J Immunol* **2004**. 172: 2126-2136.

Annacker, O., Coombes, J. L., Malmstrom, V., Uhlig, H. H., Bourne, T., Johansson-Lindbom, B., Agace, W. W., Parker, C. M. and Powrie, F., Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis. *J Exp Med* **2005**. 202: 1051-1061.

Apostolou, I., Sarukhan, A., Klein, L. and von Boehmer, H., Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol* **2002**. 3: 756-763.

Asano, M., Toda, M., Sakaguchi, N. and Sakaguchi, S., Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med* **1996**. **184**: 387-396.

Aschenbrenner, K., D'Cruz, L. M., Vollmann, E. H., Hinterberger, M., Emmerich, J., Swee, L. K., Rolink, A. and Klein, L., Selection of Foxp3+ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire+ medullary thymic epithelial cells. *Nat Immunol* **2007**. 8: 351-358.

Ashton-Rickardt, P. G. and Tonegawa, S., A differential-avidity model for T-cell selection. *Immunol Today* **1994**. 15: 362-366.

Avichezer, D., Grajewski, R. S., Chan, C. C., Mattapallil, M. J., Silver, P. B., Raber, J. A., Liou, G. I., Wiggert, B., Lewis, G. M., Donoso, L. A. and Caspi, R. R., An immunologically privileged retinal antigen elicits tolerance: major role for central selection mechanisms. *J Exp Med* **2003**. 198: 1665-1676.

Baugh, L. R., Hill, A. A., Brown, E. L. and Hunter, C. P., Quantitative analysis of mRNA amplification by in vitro transcription. *Nucleic Acids Res* **2001**. 29: E29.
Belz, G. T., Behrens, G. M., Smith, C. M., Miller, J. F., Jones, C., Lejon, K., Fathman, C. G., Mueller, S. N., Shortman, K., Carbone, F. R. and Heath, W. R., The CD8alpha(+) dendritic cell is responsible for inducing peripheral self-tolerance to tissue-associated antigens. *J Exp Med* **2002**. 196: 1099-1104.

Bensinger, S. J., Bandeira, A., Jordan, M. S., Caton, A. J. and Laufer, T. M., Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4(+)25(+) immunoregulatory T cells. *J Exp Med* **2001**. 194: 427-438.

Bevan, M. J., Cross-priming. Nat Immunol 2006. 7: 363-365.

Bleul, C. C., Corbeaux, T., Reuter, A., Fisch, P., Monting, J. S. and Boehm, T., Formation of a functional thymus initiated by a postnatal epithelial progenitor cell. *Nature* **2006**. 441: 992-996.

Boehm, T. and Bleul, C. C., Thymus-homing precursors and the thymic microenvironment. *Trends Immunol* 2006. 27: 477-484.

Boehm, T. and Bleul, C. C., The evolutionary history of lymphoid organs. *Nat Immunol* **2007**. 8: 131-135.

**Boehm, T., Scheu, S., Pfeffer, K. and Bleul, C. C.,** Thymic medullary epithelial cell differentiation, thymocyte emigration, and the control of autoimmunity require lympho-epithelial cross talk via LTbetaR. *J Exp Med* **2003**. 198: 757-769.

Boise, L. H., Minn, A. J., Noel, P. J., June, C. H., Accavitti, M. A., Lindsten, T. and Thompson, C. B., CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* **1995**. 3: 87-98.

Bonasio, R., Scimone, M. L., Schaerli, P., Grabie, N., Lichtman, A. H. and von Andrian, U. H., Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus. *Nat Immunol* **2006**. 7: 1092-1100.

Bonomo, A., Kehn, P. J. and Shevach, E. M., Post-thymectomy autoimmunity: abnormal T-cell homeostasis. *Immunol Today* **1995**. 16: 61-67.

Borkowski, T. A., Nelson, A. J., Farr, A. G. and Udey, M. C., Expression of gp40, the murine homologue of human epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM), by murine dendritic cells. *Eur J Immunol* **1996**. 26: 110-114.

Brugnera, E., Bhandoola, A., Cibotti, R., Yu, Q., Guinter, T. I., Yamashita, Y., Sharrow, S. O. and Singer, A., Coreceptor reversal in the thymus: signaled CD4+8+ thymocytes initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8+ T cells. *Immunity* **2000**. 13: 59-71.

Brunkow, M. E., Jeffery, E. W., Hjerrild, K. A., Paeper, B., Clark, L. B., Yasayko, S. A., Wilkinson, J. E., Galas, D., Ziegler, S. F. and Ramsdell, F., Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* **2001**. 27: 68-73.

Burchill, M. A., Yang, J., Vang, K. B., Moon, J. J., Chu, H. H., Lio, C. W., Vegoe, A. L., Hsieh, C. S., Jenkins, M. K. and Farrar, M. A., Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. *Immunity* **2008**. 28: 112-121.

Burkly, L. C., Degermann, S., Longley, J., Hagman, J., Brinster, R. L., Lo, D. and Flavell, R. A., Clonal deletion of V beta 5+ T cells by transgenic I-E restricted to thymic medullary epithelium. *J Immunol* **1993**. 151: 3954-3960.

Cabarrocas, J., Cassan, C., Magnusson, F., Piaggio, E., Mars, L., Derbinski, J., Kyewski, B., Gross, D. A., Salomon, B. L., Khazaie, K., Saoudi, A. and Liblau, R. S., Foxp3+ CD25+ regulatory T cells specific for a neo-self-antigen develop at the double-positive thymic stage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006. 103: 8453-8458.

Chan, S. H., Cosgrove, D., Waltzinger, C., Benoist, C. and Mathis, D., Another view of the selective model of thymocyte selection. *Cell* **1993.** 73: 225-236.

**Chentoufi, A. A. and Polychronakos, C.,** Insulin expression levels in the thymus modulate insulinspecific autoreactive T-cell tolerance: the mechanism by which the IDDM2 locus may predispose to diabetes. *Diabetes* **2002**. 51: 1383-1390.

Cloosen, S., Arnold, J., Thio, M., Bos, G. M., Kyewski, B. and Germeraad, W. T., Expression of tumor-associated differentiation antigens, MUC1 glycoforms and CEA, in human thymic epithelial cells: implications for self-tolerance and tumor therapy. *Cancer Res* **2007**. 67: 3919-3926.

**Coombes, J. L., Siddiqui, K. R., Arancibia-Carcamo, C. V., Hall, J., Sun, C. M., Belkaid, Y. and Powrie, F.,** A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* **2007**. 204: 1757-1764.

**Cordier, A. C. and Haumont, S. M.,** Development of thymus, parathyroids, and ultimo-branchial bodies in NMRI and nude mice. *Am J Anat* **1980**. 157: 227-263.

Corvalan, L. A., Araya, R., Branes, M. C., Saez, P. J., Kalergis, A. M., Tobar, J. A., Theis, M., Willecke, K. and Saez, J. C., Injury of skeletal muscle and specific cytokines induce the expression of gap junction channels in mouse dendritic cells. *J Cell Physiol* **2007**. 211: 649-660.

Daniels, M. A., Teixeiro, E., Gill, J., Hausmann, B., Roubaty, D., Holmberg, K., Werlen, G., Hollander, G. A., Gascoigne, N. R. and Palmer, E., Thymic selection threshold defined by compartmentalization of Ras/MAPK signalling. *Nature* **2006**. 444: 724-729.

Davey, G. M., Schober, S. L., Endrizzi, B. T., Dutcher, A. K., Jameson, S. C. and Hogquist, K. A., Preselection thymocytes are more sensitive to T cell receptor stimulation than mature T cells. *J Exp Med* **1998**. 188: 1867-1874.

Davis, C. B., Killeen, N., Crooks, M. E., Raulet, D. and Littman, D. R., Evidence for a stochastic mechanism in the differentiation of mature subsets of T lymphocytes. *Cell* **1993**. 73: 237-247.

Davis, M. M., T cell receptor gene diversity and selection. Annu Rev Biochem 1990. 59: 475-496.

**D'Cruz, L. M. and Klein, L.,** Development and function of agonist-induced CD25+Foxp3+ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. *Nat Immunol* **2005**. 6: 1152-1159.

den Haan, J. M., Lehar, S. M. and Bevan, M. J., CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med* **2000**. 192: 1685-1696.

Dengjel, J., Schoor, O., Fischer, R., Reich, M., Kraus, M., Muller, M., Kreymborg, K., Altenberend, F., Brandenburg, J., Kalbacher, H., Brock, R., Driessen, C., Rammensee, H. G. and Stevanovic, S., Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**. 102: 7922-7927.

**Derbinski, J.,** Promiskuöse Genexpression in medullären Epithelzellen des Mausthymus – Implikationen für zentrale T-Zell-Toleranz. Dissertation **2003**.

Derbinski, J., Gabler, J., Brors, B., Tierling, S., Jonnakuty, S., Hergenhahn, M., Peltonen, L., Walter, J. and Kyewski, B., Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *J Exp Med* **2005**. 202: 33-45.

Derbinski, J., Pinto, S., Rösch, S., Hexel, K. and Kyewski, B., Promiscuous gene expression in thymic epithelium does not emulate tissue-specific gene regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008. In Press.

**Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B. and Klein, L.,** Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol* **2001.** 2: 1032-1039.

DeVoss, J., Hou, Y., Johannes, K., Lu, W., Liou, G. I., Rinn, J., Chang, H., Caspi, R. R., Fong, L. and Anderson, M. S., Spontaneous autoimmunity prevented by thymic expression of a single self-antigen. *J Exp Med* **2006**. 203: 2727-2735.

**Dolan, B. P., Gibbs, K. D., Jr. and Ostrand-Rosenberg, S.,** Tumor-specific CD4+ T cells are activated by "cross-dressed" dendritic cells presenting peptide-MHC class II complexes acquired from cell-based cancer vaccines. *J Immunol* **2006**. 176: 1447-1455.

Dudley, E. C., Petrie, H. T., Shah, L. M., Owen, M. J. and Hayday, A. C., T cell receptor beta chain gene rearrangement and selection during thymocyte development in adult mice. *Immunity* **1994.** 1: 83-93.

Egwuagu, C. E., Charukamnoetkanok, P. and Gery, I., Thymic expression of autoantigens correlates with resistance to autoimmune disease. *J Immunol* **1997**. 159: 3109-3112.

Farr, A. G., Dooley, J. L. and Erickson, M., Organization of thymic medullary epithelial heterogeneity: implications for mechanisms of epithelial differentiation. *Immunol Rev* **2002**. 189: 20-27.

Farr, A. G. and Rudensky, A., Medullary thymic epithelium: a mosaic of epithelial "self"? *J Exp Med* **1998**. 188: 1-4.

Ferber, I., Schonrich, G., Schenkel, J., Mellor, A. L., Hammerling, G. J. and Arnold, B., Levels of peripheral T cell tolerance induced by different doses of tolerogen. *Science* **1994**. 263: 674-676.

Fonseca, P. C., Nihei, O. K., Urban-Maldonado, M., Abreu, S., de Carvalho, A. C., Spray, D. C., Savino, W. and Alves, L. A., Characterization of connexin 30.3 and 43 in thymocytes. *Immunol Lett* **2004**. 94: 65-75.

Fontenot, J. D., Dooley, J. L., Farr, A. G. and Rudensky, A. Y., Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *J Exp Med* **2005(b)**. 202: 901-906.

Fontenot, J. D., Rasmussen, J. P., Gavin, M. A. and Rudensky, A. Y., A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* **2005(c)**. 6: 1142-1151.

Fontenot, J. D., Rasmussen, J. P., Williams, L. M., Dooley, J. L., Farr, A. G. and Rudensky, A. Y., Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* **2005(a)**. 22: 329-341.

**Fowell, D. and Mason, D.,** Evidence that the T cell repertoire of normal rats contains cells with the potential to cause diabetes. Characterization of the CD4+ T cell subset that inhibits this autoimmune potential. *J Exp Med* **1993**. 177: 627-636.

**Gäbler, J.,** Regulation der promisken Genexpression auf molekularer und zellulärer Ebene im medullären Thymusepithel der Maus. Dissertation **2008**.

Gabler, J., Arnold, J. and Kyewski, B., Promiscuous gene expression and the developmental dynamics of medullary thymic epithelial cells. *Eur J Immunol* **2007**. 37: 3363-3372.

Gallegos, A. M. and Bevan, M. J., Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *J Exp Med* 2004. 200: 1039-1049.

Gallo, E. M., Winslow, M. M., Cante-Barrett, K., Radermacher, A. N., Ho, L., McGinnis, L., Iritani, B., Neilson, J. R. and Crabtree, G. R., Calcineurin sets the bandwidth for discrimination of signals during thymocyte development. *Nature* **2007**. 450: 731-735.

Gavanescu, I., Kessler, B., Ploegh, H., Benoist, C. and Mathis, D., Loss of Aire-dependent thymic expression of a peripheral tissue antigen renders it a target of autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**. 104: 4583-4587.

Giraud, M., Taubert, R., Vandiedonck, C., Ke, X., Levi-Strauss, M., Pagani, F., Baralle, F. E., Eymard, B., Tranchant, C., Gajdos, P., Vincent, A., Willcox, N., Beeson, D., Kyewski, B. and Garchon, H. J., An IRF8-binding promoter variant and AIRE control CHRNA1 promiscuous expression in thymus. *Nature* 2007. 448: 934-937.

Good, M. F., Pyke, K. W. and Nossal, G. J., Functional clonal deletion of cytotoxic T-lymphocyte precursors in chimeric thymus produced in vitro from embryonic Anlagen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1983**. 80: 3045-3049.

Gotter, J., Brors, B., Hergenhahn, M. and Kyewski, B., Medullary epithelial cells of the human thymus express a highly diverse selection of tissue-specific genes colocalized in chromosomal clusters. *J Exp Med* **2004**. 199: 155-166.

Gray, D. H., Chidgey, A. P. and Boyd, R. L., Analysis of thymic stromal cell populations using flow cytometry. *J Immunol Methods* 2002. 260: 15-28.

Gray, D. H., Seach, N., Ueno, T., Milton, M. K., Liston, A., Lew, A. M., Goodnow, C. C. and Boyd, R. L., Developmental kinetics, turnover, and stimulatory capacity of thymic epithelial cells. *Blood* **2006**. 108: 3777-3785.

Halonen, M., Pelto-Huikko, M., Eskelin, P., Peltonen, L., Ulmanen, I. and Kolmer, M., Subcellular location and expression pattern of autoimmune regulator (Aire), the mouse orthologue for human gene defective in autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy (APECED). *J Histochem Cytochem* **2001**. 49: 197-208.

Harshyne, L. A., Watkins, S. C., Gambotto, A. and Barratt-Boyes, S. M., Dendritic cells acquire antigens from live cells for cross-presentation to CTL. *J Immunol* **2001**. 166: 3717-3723.

Harshyne, L. A., Zimmer, M. I., Watkins, S. C. and Barratt-Boyes, S. M., A role for class A scavenger receptor in dendritic cell nibbling from live cells. *J Immunol* **2003**. 170: 2302-2309.

Hayday, A. C. and Pennington, D. J., Key factors in the organized chaos of early T cell development. *Nat Immunol* **2007**. 8: 137-144.

Heath, W. R. and Carbone, F. R., Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat Rev Immunol* 2001. 1: 126-134.

Heino, M., Peterson, P., Kudoh, J., Nagamine, K., Lagerstedt, A., Ovod, V., Ranki, A., Rantala, I., Nieminen, M., Tuukkanen, J., Scott, H. S., Antonarakis, S. E., Shimizu, N. and Krohn, K., Autoimmune regulator is expressed in the cells regulating immune tolerance in thymus medulla. *Biochem Biophys Res Commun* **1999**. 257: 821-825.

Heino, M., Peterson, P., Kudoh, J., Shimizu, N., Antonarakis, S. E., Scott, H. S. and Krohn, K., APECED mutations in the autoimmune regulator (AIRE) gene. *Hum Mutat* **2001**. 18: 205-211.

Hogquist, K. A., Signal strength in thymic selection and lineage commitment. *Curr Opin Immunol* **2001**. 13: 225-231.

Hogquist, K. A., Baldwin, T. A. and Jameson, S. C., Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol* **2005**. 5: 772-782.

Hogquist, K. A., Jameson, S. C., Heath, W. R., Howard, J. L., Bevan, M. J. and Carbone, F. R., T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* **1994**. 76: 17-27.

Hori, S., Nomura, T. and Sakaguchi, S., Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003. 299: 1057-1061.

Hudrisier, D., Riond, J., Mazarguil, H., Gairin, J. E. and Joly, E., Cutting edge: CTLs rapidly capture membrane fragments from target cells in a TCR signaling-dependent manner. *J Immunol* **2001**. 166: 3645-3649.

**Humblet, C., Rudensky, A. and Kyewski, B.,** Presentation and intercellular transfer of self antigen within the thymic microenvironment: expression of the E alpha peptide-I-Ab complex by isolated thymic stromal cells. *Int Immunol* **1994**. 6: 1949-1958.

Huseby, E. S., Sather, B., Huseby, P. G. and Goverman, J., Age-dependent T cell tolerance and autoimmunity to myelin basic protein. *Immunity* **2001**. 14: 471-481.

**Itano, A. and Robey, E.,** Highly efficient selection of CD4 and CD8 lineage thymocytes supports an instructive model of lineage commitment. *Immunity* **2000**. **1**2: 383-389.

**Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., Otsuka, F. and Sakaguchi, S.,** Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* **1999**. 162: 5317-5326.

Iyoda, T., Shimoyama, S., Liu, K., Omatsu, Y., Akiyama, Y., Maeda, Y., Takahara, K., Steinman, R. M. and Inaba, K., The CD8+ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J Exp Med* **2002**. 195: 1289-1302.

Jameson, S. C., Hogquist, K. A. and Bevan, M. J., Positive selection of thymocytes. Annu Rev Immunol 1995. 13: 93-126.

Jenkins, M. K. and Schwartz, R. H., Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J Exp Med* **1987**. 165: 302-319.

Jenkins, M. K., Taylor, P. S., Norton, S. D. and Urdahl, K. B., CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells. *J Immunol* **1991**. 147: 2461-2466.

Jiang, Q., Su, H., Knudsen, G., Helms, W. and Su, L., Delayed functional maturation of natural regulatory T cells in the medulla of postnatal thymus: role of TSLP. *BMC Immunol* **2006**. 7: 6.

Jolicoeur, C., Hanahan, D. and Smith, K. M., T-cell tolerance toward a transgenic beta-cell antigen and transcription of endogenous pancreatic genes in thymus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**. 91: 6707-6711.

Jordan, M. S., Boesteanu, A., Reed, A. J., Petrone, A. L., Holenbeck, A. E., Lerman, M. A., Naji, A. and Caton, A. J., Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* **2001**. 2: 301-306.

Kappler, J. W., Roehm, N. and Marrack, P., T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* **1987**. 49: 273-280.

Karlsson, M., Lundin, S., Dahlgren, U., Kahu, H., Pettersson, I. and Telemo, E., "Tolerosomes" are produced by intestinal epithelial cells. *Eur J Immunol* **2001**. 31: 2892-2900.

**Kasai, M., Kominami, E. and Mizuochi, T.,** The antigen presentation pathway in medullary thymic epithelial cells, but not that in cortical thymic epithelial cells, conforms to the endocytic pathway. *Eur J Immunol* **1998**. 28: 1867-1876.

Kawahata, K., Misaki, Y., Yamauchi, M., Tsunekawa, S., Setoguchi, K., Miyazaki, J. and Yamamoto, K., Peripheral tolerance to a nuclear autoantigen: dendritic cells expressing a nuclear autoantigen lead to persistent anergic state of CD4+ autoreactive T cells after proliferation. *J Immunol* **2002.** 168: 1103-1112.

**Kisielow, P., Bluthmann, H., Staerz, U. D., Steinmetz, M. and von Boehmer, H.,** Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4+8+ thymocytes. *Nature* **1988**. 333: 742-746.

Klein, L., Klein, T., Ruther, U. and Kyewski, B., CD4 T cell tolerance to human C-reactive protein, an inducible serum protein, is mediated by medullary thymic epithelium. *J Exp Med* **1998**. 188: 5-16.

Klein, L., Klugmann, M., Nave, K. A., Tuohy, V. K. and Kyewski, B., Shaping of the autoreactive Tcell repertoire by a splice variant of self protein expressed in thymic epithelial cells. *Nat Med* **2000**. 6: 56-61.

Klein, L. and Kyewski, B., Self-antigen presentation by thymic stromal cells: a subtle division of labor. *Curr Opin Immunol* **2000**. 12: 179-186.

Klein, L., Roettinger, B. and Kyewski, B., Sampling of complementing self-antigen pools by thymic stromal cells maximizes the scope of central T cell tolerance. *Eur J Immunol* **2001**. 31: 2476-2486.

Kretschmer, K., Heng, T. S. and von Boehmer, H., De novo production of antigen-specific suppressor cells in vivo. *Nat Protoc* 2006. 1: 653-661.

Krogsgaard, M., Li, Q. J., Sumen, C., Huppa, J. B., Huse, M. and Davis, M. M., Agonist/endogenous peptide-MHC heterodimers drive T cell activation and sensitivity. *Nature* 2005. 434: 238-243.

Kurobe, H., Liu, C., Ueno, T., Saito, F., Ohigashi, I., Seach, N., Arakaki, R., Hayashi, Y., Kitagawa, T., Lipp, M., Boyd, R. L. and Takahama, Y., CCR7-dependent cortex-to-medulla migration of positively selected thymocytes is essential for establishing central tolerance. *Immunity* **2006**. 24: 165-177.

Kurts, C., Heath, W. R., Carbone, F. R., Allison, J., Miller, J. F. and Kosaka, H., Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo. *J Exp Med* **1996**. 184: 923-930.

Kurts, C., Heath, W. R., Carbone, F. R., Kosaka, H. and Miller, J. F., Cross-presentation of self antigens to CD8+ T cells: the balance between tolerance and autoimmunity. *Novartis Found Symp* **1998**. 215: 172-181; discussion 181-190.

Kurts, C., Kosaka, H., Carbone, F. R., Miller, J. F. and Heath, W. R., Class I-restricted crosspresentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *J Exp Med* **1997**. 186: 239-245.

Kyewski, B. and Derbinski, J., Self-representation in the thymus: an extended view. *Nat Rev Immunol* 2004. 4: 688-698.

Kyewski, B. and Klein, L., A central role for central tolerance. Annu Rev Immunol 2006. 24: 571-606.

Kyewski, B. A., Fathman, C. G. and Kaplan, H. S., Intrathymic presentation of circulating non-major histocompatibility complex antigens. *Nature* **1984.** 308: 196-199.

Lane, P., Haller, C. and McConnell, F., Evidence that induction of tolerance in vivo involves active signaling via a B7 ligand-dependent mechanism: CTLA4-Ig protects V beta 8+ T cells from tolerance induction by the superantigen staphylococcal enterotoxin B. *Eur J Immunol* **1996**. 26: 858-862.

Laufer, T. M., DeKoning, J., Markowitz, J. S., Lo, D. and Glimcher, L. H., Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex. *Nature* **1996**. 383: 81-85.

Laufer, T. M., Fan, L. and Glimcher, L. H., Self-reactive T cells selected on thymic cortical epithelium are polyclonal and are pathogenic in vivo. *J Immunol* **1999**. 162: 5078-5084.

Lind, E. F., Prockop, S. E., Porritt, H. E. and Petrie, H. T., Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J Exp Med* **2001**. 194: 127-134.

Lio, C. W. and Hsieh, C. S., A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity* 2008. 28: 100-111.

Liston, A., Lesage, S., Wilson, J., Peltonen, L. and Goodnow, C. C., Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nat Immunol* **2003**. 4: 350-354.

Liston, A. and Rudensky, A. Y., Thymic development and peripheral homeostasis of regulatory T cells. *Curr Opin Immunol* **2007**. 19: 176-185.

Liu, C., Ueno, T., Kuse, S., Saito, F., Nitta, T., Piali, L., Nakano, H., Kakiuchi, T., Lipp, M., Hollander, G. A. and Takahama, Y., The role of CCL21 in recruitment of T-precursor cells to fetal thymi. *Blood* **2005**. 105: 31-39.

Liu, H., MacKenzie-Graham, A. J., Kim, S. and Voskuhl, R. R., Mice resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis have increased thymic expression of myelin basic protein and increased MBP specific T cell tolerance. *J Neuroimmunol* **2001**. 115: 118-126.

Lucas, B., Stefanova, I., Yasutomo, K., Dautigny, N. and Germain, R. N., Divergent changes in the sensitivity of maturing T cells to structurally related ligands underlies formation of a useful T cell repertoire. *Immunity* **1999**. 10: 367-376.

McCaughtry, T. M., Wilken, M. S. and Hogquist, K. A., Thymic emigration revisited. J Exp Med 2007. 204: 2513-2520.

Mears, R., Craven, R. A., Hanrahan, S., Totty, N., Upton, C., Young, S. L., Patel, P., Selby, P. J. and Banks, R. E., Proteomic analysis of melanoma-derived exosomes by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* **2004**. 4: 4019-4031.

Merkenschlager, M., Benoist, C. and Mathis, D., Evidence for a single-niche model of positive selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994. 91: 11694-11698.

**Merkenschlager, M., Power, M. O., Pircher, H. and Fisher, A. G.**, Intrathymic deletion of MHC class I-restricted cytotoxic T cell precursors by constitutive cross-presentation of exogenous antigen. *Eur J Immunol* **1999**. 29: 1477-1486.

**Miller, M. J., Hejazi, A. S., Wei, S. H., Cahalan, M. D. and Parker, I.,** T cell repertoire scanning is promoted by dynamic dendritic cell behavior and random T cell motility in the lymph node. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**. 101: 998-1003.

Misslitz, A., Pabst, O., Hintzen, G., Ohl, L., Kremmer, E., Petrie, H. T. and Forster, R., Thymic T cell development and progenitor localization depend on CCR7. *J Exp Med* **2004**. 200: 481-491.

**Miyamoto, K., Miyake, S., Schachner, M. and Yamamura, T.,** Heterozygous null mutation of myelin P0 protein enhances susceptibility to autoimmune neuritis targeting P0 peptide. *Eur J Immunol* **2003**. 33: 656-665.

Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T. and Ohsumi, Y., In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* **2004**. 15: 1101-1111.

Modigliani, Y., Coutinho, A., Pereira, P., Le Douarin, N., Thomas-Vaslin, V., Burlen-Defranoux, O., Salaun, J. and Bandeira, A., Establishment of tissue-specific tolerance is driven by regulatory T cells selected by thymic epithelium. *Eur J Immunol* **1996**. 26: 1807-1815.

Modigliani, Y., Thomas-Vaslin, V., Bandeira, A., Coltey, M., Le Douarin, N. M., Coutinho, A. and Salaun, J., Lymphocytes selected in allogeneic thymic epithelium mediate dominant tolerance toward tissue grafts of the thymic epithelium haplotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**. 92: 7555-7559.

Naeher, D., Daniels, M. A., Hausmann, B., Guillaume, P., Luescher, I. and Palmer, E., A constant affinity threshold for T cell tolerance. *J Exp Med* **2007**. 204: 2553-2559.

Nehls, M., Pfeifer, D., Schorpp, M., Hedrich, H. and Boehm, T., New member of the winged-helix protein family disrupted in mouse and rat nude mutations. *Nature* **1994**. 372: 103-107.

Neijssen, J., Herberts, C., Drijfhout, J. W., Reits, E., Janssen, L. and Neefjes, J., Crosspresentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature* **2005**. 434: 83-88. Nelson, A. J., Hosier, S., Brady, W., Linsley, P. S. and Farr, A. G., Medullary thymic epithelium expresses a ligand for CTLA4 in situ and in vitro. *J Immunol* **1993**. 151: 2453-2461.

**Nemazee, D. and Hogquist, K. A.**, Antigen receptor selection by editing or downregulation of V(D)J recombination. *Curr Opin Immunol* **2003**. 15: 182-189.

Nicholson, B. J., Gap junctions - from cell to molecule. J Cell Sci 2003. 116: 4479-4481.

Nimmerjahn, F., Milosevic, S., Behrends, U., Jaffee, E. M., Pardoll, D. M., Bornkamm, G. W. and Mautner, J., Major histocompatibility complex class II-restricted presentation of a cytosolic antigen by autophagy. *Eur J Immunol* **2003**. 33: 1250-1259.

**Ostman, S., Taube, M. and Telemo, E.,** Tolerosome-induced oral tolerance is MHC dependent. *Immunology* **2005**. 116: 464-476.

Oukka, M., Colucci-Guyon, E., Tran, P. L., Cohen-Tannoudji, M., Babinet, C., Lotteau, V. and Kosmatopoulos, K., CD4 T cell tolerance to nuclear proteins induced by medullary thymic epithelium. *Immunity* **1996**. 4: 545-553.

**Oven, I., Brdickova, N., Kohoutek, J., Vaupotic, T., Narat, M. and Peterlin, B. M.,** AIRE recruits P-TEFb for transcriptional elongation of target genes in medullary thymic epithelial cells. *Mol Cell Biol* **2007**. 27: 8815-8823.

Page, D. M., Kane, L. P., Allison, J. P. and Hedrick, S. M., Two signals are required for negative selection of CD4+CD8+ thymocytes. *J Immunol* **1993**. 151: 1868-1880.

Paludan, C., Schmid, D., Landthaler, M., Vockerodt, M., Kube, D., Tuschl, T. and Munz, C., Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science* **2005**. 307: 593-596.

Perez, V. L., Van Parijs, L., Biuckians, A., Zheng, X. X., Strom, T. B. and Abbas, A. K., Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity* **1997**. 6: 411-417.

Peterson, D. A., DiPaolo, R. J., Kanagawa, O. and Unanue, E. R., Cutting edge: negative selection of immature thymocytes by a few peptide-MHC complexes: differential sensitivity of immature and mature T cells. *J Immunol* **1999**. 162: 3117-3120.

Petrie, H. T., Cell migration and the control of post-natal T-cell lymphopoiesis in the thymus. *Nat Rev Immunol* 2003. 3: 859-866.

Pisitkun, T., Shen, R. F. and Knepper, M. A., Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004. 101: 13368-13373.

Pugliese, A., Brown, D., Garza, D., Murchison, D., Zeller, M., Redondo, M. J., Diez, J., Eisenbarth, G. S., Patel, D. D. and Ricordi, C., Self-antigen-presenting cells expressing diabetes-associated autoantigens exist in both thymus and peripheral lymphoid organs. *J Clin Invest* **2001**. 107: 555-564.

Ramsdell, F., Lantz, T. and Fowlkes, B. J., A nondeletional mechanism of thymic self tolerance. *Science* **1989**. 246: 1038-1041.

Ramsey, C., Winqvist, O., Puhakka, L., Halonen, M., Moro, A., Kampe, O., Eskelin, P., Pelto-Huikko, M. and Peltonen, L., Aire deficient mice develop multiple features of APECED phenotype and show altered immune response. *Hum Mol Genet* **2002**. 11: 397-409.

Raposo, G., Nijman, H. W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C. V., Melief, C. J. and Geuze, H. J., B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* **1996**. 183: 1161-1172.

Reaume, A. G., de Sousa, P. A., Kulkarni, S., Langille, B. L., Zhu, D., Davies, T. C., Juneja, S. C., Kidder, G. M. and Rossant, J., Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* **1995**. 267: 1831-1834.

**Ribot, J., Enault, G., Pilipenko, S., Huchenq, A., Calise, M., Hudrisier, D., Romagnoli, P. and van Meerwijk, J. P.,** Shaping of the autoreactive regulatory T cell repertoire by thymic cortical positive selection. *J Immunol* **2007**. 179: 6741-6748.

**Ribot, J., Romagnoli, P. and van Meerwijk, J. P.,** Agonist ligands expressed by thymic epithelium enhance positive selection of regulatory T lymphocytes from precursors with a normally diverse TCR repertoire. *J Immunol* **2006**. 177: 1101-1107.

Rimoldi, M., Chieppa, M., Salucci, V., Avogadri, F., Sonzogni, A., Sampietro, G. M., Nespoli, A., Viale, G., Allavena, P. and Rescigno, M., Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol* **2005**. 6: 507-514.

**Romagnoli, P., Hudrisier, D. and van Meerwijk, J. P.,** Molecular signature of recent thymic selection events on effector and regulatory CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* **2005**. 175: 5751-5758.

Rossi, F. M., Corbel, S. Y., Merzaban, J. S., Carlow, D. A., Gossens, K., Duenas, J., So, L., Yi, L. and Ziltener, H. J., Recruitment of adult thymic progenitors is regulated by P-selectin and its ligand PSGL-1. *Nat Immunol* **2005**. 6: 626-634.

Rossi, S. W., Jenkinson, W. E., Anderson, G. and Jenkinson, E. J., Clonal analysis reveals a common progenitor for thymic cortical and medullary epithelium. *Nature* **2006**. 441: 988-991.

Rossi, S. W., Kim, M. Y., Leibbrandt, A., Parnell, S. M., Jenkinson, W. E., Glanville, S. H., McConnell, F. M., Scott, H. S., Penninger, J. M., Jenkinson, E. J., Lane, P. J. and Anderson, G., RANK signals from CD4(+)3(-) inducer cells regulate development of Aire-expressing epithelial cells in the thymic medulla. *J Exp Med* **2007**. 204: 1267-1272.

**Röttinger, B.,** Stabilität der Antigenpräsentation *in vivo*: Regulation durch die Organ-Mikroumgebung. Dissertation **2000**.

Salmon, A. M., Bruand, C., Cardona, A., Changeux, J. P. and Berrih-Aknin, S., An acetylcholine receptor alpha subunit promoter confers intrathymic expression in transgenic mice. Implications for tolerance of a transgenic self-antigen and for autoreactivity in myasthenia gravis. *J Clin Invest* **1998**. 101: 2340-2350.

Schmid, D., Pypaert, M. and Munz, C., Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes. *Immunity* **2007**. 26: 79-92.

Schonrich, G., Kalinke, U., Momburg, F., Malissen, M., Schmitt-Verhulst, A. M., Malissen, B., Hammerling, G. J. and Arnold, B., Down-regulation of T cell receptors on self-reactive T cells as a novel mechanism for extrathymic tolerance induction. *Cell* **1991**. 65: 293-304.

Schulz, O., Pennington, D. J., Hodivala-Dilke, K., Febbraio, M. and Reis e Sousa, C., CD36 or alphavbeta3 and alphavbeta5 integrins are not essential for MHC class I cross-presentation of cell-associated antigen by CD8 alpha+ murine dendritic cells. *J Immunol* **2002**. 168: 6057-6065.

Schwartz, R. H., Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nat Immunol* 2005. 6: 327-330.

Scollay, R. and Godfrey, D. I., Thymic emigration: conveyor belts or lucky dips? *Immunol Today* 1995. 16: 268-273.

Segura, E., Guerin, C., Hogg, N., Amigorena, S. and Thery, C., CD8+ dendritic cells use LFA-1 to capture MHC-peptide complexes from exosomes in vivo. *J Immunol* 2007. 179: 1489-1496.

Seong, R. H., Chamberlain, J. W. and Parnes, J. R., Signal for T-cell differentiation to a CD4 cell lineage is delivered by CD4 transmembrane region and/or cytoplasmic tail. *Nature* **1992**. 356: 718-720.

Shanker, A., Auphan-Anezin, N., Chomez, P., Giraudo, L., Van den Eynde, B. and Schmitt-Verhulst, A. M., Thymocyte-intrinsic genetic factors influence CD8 T cell lineage commitment and affect selection of a tumor-reactive TCR. *J Immunol* **2004**. 172: 5069-5077.

Shibata, Y. and Yamamoto, T., Gap junctions in the cardiac muscle cells of the lamprey. *Cell Tissue Res* 1977. 178: 477-482.

Smith, K. M., Olson, D. C., Hirose, R. and Hanahan, D., Pancreatic gene expression in rare cells of thymic medulla: evidence for functional contribution to T cell tolerance. *Int Immunol* **1997**. 9: 1355-1365.

Smyth, L. A., Williams, O., Huby, R. D., Norton, T., Acuto, O., Ley, S. C. and Kioussis, D., Altered peptide ligands induce quantitatively but not qualitatively different intracellular signals in primary thymocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**. 95: 8193-8198.

**Spence**, **P. J. and Green**, **E. A.**, Foxp3+ regulatory T cells promiscuously accept thymic signals critical for their development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**. 105: 973-978.

Sprent, J., Kosaka, H., Gao, E. K., Surh, C. D. and Webb, S. R., Intrathymic and extrathymic tolerance in bone marrow chimeras. *Immunol Rev* **1993**. 133: 151-176.

Tai, X., Cowan, M., Feigenbaum, L. and Singer, A., CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat Immunol* **2005**. 6: 152-162.

Tang, Q., Henriksen, K. J., Boden, E. K., Tooley, A. J., Ye, J., Subudhi, S. K., Zheng, X. X., Strom, T. B. and Bluestone, J. A., Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* **2003.** 171: 3348-3352.

Thebault-Baumont, K., Dubois-Laforgue, D., Krief, P., Briand, J. P., Halbout, P., Vallon-Geoffroy, K., Morin, J., Laloux, V., Lehuen, A., Carel, J. C., Jami, J., Muller, S. and Boitard, C., Acceleration of type 1 diabetes mellitus in proinsulin 2-deficient NOD mice. *J Clin Invest* **2003**. 111: 851-857.

Thery, C., Zitvogel, L. and Amigorena, S., Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2002. 2: 569-579.

Throsby, M., Homo-Delarche, F., Chevenne, D., Goya, R., Dardenne, M. and Pleau, J. M., Pancreatic hormone expression in the murine thymus: localization in dendritic cells and macrophages. *Endocrinology* **1998**. 139: 2399-2406.

Ueno, T., Saito, F., Gray, D. H., Kuse, S., Hieshima, K., Nakano, H., Kakiuchi, T., Lipp, M., Boyd, R. L. and Takahama, Y., CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes. *J Exp Med* **2004**. 200: 493-505.

Vafiadis, P., Bennett, S. T., Todd, J. A., Nadeau, J., Grabs, R., Goodyer, C. G., Wickramasinghe, S., Colle, E. and Polychronakos, C., Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus. *Nat Genet* **1997**. 15: 289-292.

Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J. J. and Lotvall, J. O., Exosomemediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* **2007**. 9: 654-659.

van Meerwijk, J. P. and MacDonald, H. R., In vivo T-lymphocyte tolerance in the absence of thymic clonal deletion mediated by hematopoietic cells. *Blood* **1999**. 93: 3856-3862.

van Meerwijk, J. P., Marguerat, S., Lees, R. K., Germain, R. N., Fowlkes, B. J. and MacDonald, H. R., Quantitative impact of thymic clonal deletion on the T cell repertoire. *J Exp Med* **1997**. 185: 377-383.

Van Niel, G., Mallegol, J., Bevilacqua, C., Candalh, C., Brugiere, S., Tomaskovic-Crook, E., Heath, J. K., Cerf-Bensussan, N. and Heyman, M., Intestinal epithelial exosomes carry MHC class II/peptides able to inform the immune system in mice. *Gut* **2003**. 52: 1690-1697.

van Santen, H. M., Benoist, C. and Mathis, D., Number of T reg cells that differentiate does not increase upon encounter of agonist ligand on thymic epithelial cells. *J Exp Med* **2004**. 200: 1221-1230.

**Volkmann, A., Barthlott, T., Weiss, S., Frank, R. and Stockinger, B.,** Antagonist peptide selects thymocytes expressing a class II major histocompatibility complex-restricted T cell receptor into the CD8 lineage. *J Exp Med* **1998**. 188: 1083-1089.

Vremec, D., Pooley, J., Hochrein, H., Wu, L. and Shortman, K., CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol* **2000**. 164: 2978-2986.

**Vremec, D. and Shortman, K.,** 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* **1997**. 159: 565-573.

Vremec, D., Zorbas, M., Scollay, R., Saunders, D. J., Ardavin, C. F., Wu, L. and Shortman, K., The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *J Exp Med* **1992**. 176: 47-58.

Walker, L. S. and Abbas, A. K., The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol* 2002. 2: 11-19.

Watanabe, N., Wang, Y. H., Lee, H. K., Ito, T., Wang, Y. H., Cao, W. and Liu, Y. J., Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature* **2005**. 436: 1181-1185.

Werlen, G., Hausmann, B., Naeher, D. and Palmer, E., Signaling life and death in the thymus: timing is everything. *Science* **2003**. 299: 1859-1863.

Werlen, G., Hausmann, B. and Palmer, E., A motif in the alphabeta T-cell receptor controls positive selection by modulating ERK activity. *Nature* **2000**. 406: 422-426.

Wildin, R. S., Smyk-Pearson, S. and Filipovich, A. H., Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J Med Genet* 2002. 39: 537-545.

Wilson, H. L. and O'Neill, H. C., Murine dendritic cell development: difficulties associated with subset analysis. *Immunol Cell Biol* 2003. 81: 239-246.

Witt, C. M., Raychaudhuri, S., Schaefer, B., Chakraborty, A. K. and Robey, E. A., Directed migration of positively selected thymocytes visualized in real time. *PLoS Biol* **2005(a)**. 3: e160.

Witt, C. M. and Robbins, K., Tracking thymocyte migration in situ. *Semin Immunol* **2005(b)**. 17: 421-430.

Wolfers, J., Lozier, A., Raposo, G., Regnault, A., Thery, C., Masurier, C., Flament, C., Pouzieux, S., Faure, F., Tursz, T., Angevin, E., Amigorena, S. and Zitvogel, L., Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med* **2001**. 7: 297-303.

Wucherpfennig, K. W., Zhang, J., Witek, C., Matsui, M., Modabber, Y., Ota, K. and Hafler, D. A., Clonal expansion and persistence of human T cells specific for an immunodominant myelin basic protein peptide. *J Immunol* **1994**. 152: 5581-5592.

Yang, T. T., Cheng, L. and Kain, S. R., Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic Acids Res* **1996**. 24: 4592-4593.

Zehn, D. and Bevan, M. J., T cells with low avidity for a tissue-restricted antigen routinely evade central and peripheral tolerance and cause autoimmunity. *Immunity* 2006. 25: 261-270.

Zhang, M., Vacchio, M. S., Vistica, B. P., Lesage, S., Egwuagu, C. E., Yu, C. R., Gelderman, M. P., Kennedy, M. C., Wawrousek, E. F. and Gery, I., T cell tolerance to a neo-self antigen expressed by thymic epithelial cells: the soluble form is more effective than the membrane-bound form. *J Immunol* **2003**. 170: 3954-3962.

Zheng, S. G., Wang, J. H., Gray, J. D., Soucier, H. and Horwitz, D. A., Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGFbeta, and IL-10. *J Immunol* **2004**. 172: 5213-5221.

Zitvogel, L., Angevin, E. and Tursz, T., Dendritic cell-based immunotherapy of cancer. *Ann Oncol* 2000. 11 Suppl 3: 199-205.

Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G. and Amigorena, S., Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med* **1998**. 4: 594-600.

## 6. Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Bruno Kyewski möchte ich mich ganz herzlich für die Bereitstellung des interessanten Themas, die ausgezeichnete Betreuung, seine ständige Diskussionsbereitschaft, sowie die vielen wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Anregungen bedanken. Ganz besonders danke ich ihm für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Herrn Prof. Dr. Volker Schirrmacher und Herrn Prof. Dr. Günter Hämmerling danke ich ganz herzlich für ihre Bereitschaft, die vorliegende Arbeit zu begutachten.

Herrn Dr. Jens Derbinski möchte ich für die Einführung in die Thematik, die geduldige Einarbeitung in verschiedene Methodiken, seine stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und nicht zuletzt für seine freundschaftliche Kollegialität meinen besonderen Dank aussprechen.

Herrn Klaus Hexel und Herrn Dr. Schmitt möchte ich für ihren nicht zu überschätzenden Einsatz bei der professionellen Sortierung der hier verwendeten Zellpopulationen danken (insbesondere in den Fällen, in denen es mal wieder etwas länger gedauert hat).

Ein herzliches Dankeschön gilt auch Herrn Esmail Rezavandy und ganz besonders Frau Stefanie Rösch, ohne deren tolle Unterstützung und ständige Hilfsbereitschaft die Durchführung vieler der hier gezeigten Experimente nicht möglich gewesen wäre.

Bei Herrn Dr. Natalio Garbi aus der Abteilung Molekulare Immunologie des DKFZ Heidelberg und Herrn Prof. Dr. Thomas Schüler, jetzt Max-Delbrück-Center für Molekulare Medizin, Berlin, bedanke ich mich herzlich für die Hilfestellung beim Erlernen der *i.v.*-Injektion von Mäusen.

Bei Herrn Dr. Edgar Schmitt (Institut für Immunologie, Universität Mainz), Herrn Prof. Dr. Benoit van den Eynde (Ludwig Institute for Cancer Research, Brüssel), Frau Prof. Dr. Anne-Marie Schmitt-Verhulst (Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Université Marseille), Herrn Prof. Dr. Thomas Boehm (MPI für Immunbiologie, Freiburg) und Herrn Prof. Dr. Kazuhiko Yamamoto (University of Tokyo) möchte ich mich für die freundliche Bereitstellung der in dieser Arbeit verwendeten transgenen Mausmodelle bedanken.

Dem gesamten Personal des zentralen Tierlabors des DKFZ Heidelberg, insbesondere jedoch Frau Ute Riesterer, Herrn Martin Friedel und Herrn Dr. Werner Nicklas danke ich herzlich für die Zucht und die professionelle Betreuung der in dieser Arbeit verwendeten Tiere.

Allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung Entwicklungsimmunologie am DKFZ sowie allen Freunden gilt mein ganz spezieller Dank: Ihr habt durch eine tolle Arbeitsatmosphäre, Eure Hilfsbereitschaft und so manchen vergnüglichen Abend bei und abseits der Arbeit dafür gesorgt, dass schlechte Zeiten nicht ganz so unerfreulich und gute Zeiten umso schöner waren.

Das größte Dankeschön gebührt jedoch meiner Familie, die mich stets unterstützt und an mich geglaubt hat, und vor allem Hannah, ohne deren Rückhalt, liebevolles Verständnis und ständige Motivation diese Arbeit wohl nicht zustande gekommen wäre.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und mich dabei keiner anderen, als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

(Christian Koble)

Heidelberg, Mai 2008