

<b>1. Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1. Das Immunsystem .....	8
1.2. Die Antigenpräsentation .....	9
1.2.1. Antigenpräsentierende Zellen .....	10
1.2.1.1. Makrophagen .....	10
1.2.1.2. B-Zellen .....	11
1.2.1.3. Dendritische Zellen .....	11
1.2.1.3.1. Konventionelle dendritische Zellen .....	12
1.2.1.3.2. Plasmazytoide dendritische Zellen .....	13
1.3. Toll-like Rezeptoren .....	13
1.4. Die T-Zell-Differenzierung .....	14
1.4.1. $T_H1$ -, $T_H2$ - und $T_H17$ -Zellen .....	15
1.4.2. Regulatorische T-Zellen .....	16
1.5. Die Regulation von Immunantworten durch T-Zellen .....	17
1.5.1. Die Suppression von Immunantworten durch regulatorische T-Zellen .....	18
1.5.2. Das immunsuppressive Zytokin IL-10 .....	19
1.6. Notch – ein transmembranärer Rezeptor und seine Liganden .....	20
1.6.1. Der Notch-Signalweg .....	21
1.6.2. Die Expression von Notch-Komponenten im Immunsystem .....	22
1.6.3. Der Einfluss von Notch auf die T-Zell-Aktivierung .....	23
1.6.4. Der Einfluss von Notch auf die T-Zell-Differenzierung .....	24
1.6.4.1. Regulation der $T_H1$ -Differenzierung .....	24
1.6.4.2. Regulation der $T_H2$ -Differenzierung .....	25
1.6.4.3. Induktion regulatorischer T-Zellen .....	26
1.6.4.4. Notch als Modulator der $T_H$ -Zell-Differenzierung .....	27
<b>2. Zielsetzung</b>	<b>29</b>
<b>3. Material &amp; Methoden</b>	<b>31</b>
3.1. Medien und Puffer .....	32
3.2. Chemikalien und Reagenzien .....	33
3.3. Antikörper .....	34
3.3.1. für die Fluoreszenzmarkierung zum durchfluszytometrischen Nachweis ...	34
3.3.2. für die Blockade von Zytokinen .....	35

3.3.3. für die <i>in vivo</i> Anwendung .....	35
3.4. Rekombinante Zytokine .....	35
3.5. TLR-Stimuli .....	35
3.6. Mäuse .....	36
3.7. Zellpräparationen .....	36
3.7.1. Isolierung von Lymphozyten aus Milz und Lymphknoten .....	36
3.7.2. Isolierung von dendritischen Zellen aus Milz und Lymphknoten .....	36
3.8. Magnetische Zellsortierung (MACS) .....	37
3.8.1. Prinzip der magnetischen Zellsortierung .....	37
3.8.2. Anreicherung naiver Lymphozyten für den adoptiven Transfer .....	37
3.8.3. Anreicherung naiver CD4 <sup>+</sup> Lymphozyten für die <i>in vitro</i> Kultivierung .....	38
3.8.4. Anreicherung von Antigenpräsentierenden Zellen .....	39
3.9. Durchflusszytometrie .....	40
3.9.1. Prinzip der Durchflusszytometrie .....	40
3.9.2. Fluoreszenzmarkierung von Oberflächenmolekülen .....	41
3.9.3. Verstärkung des Fluoreszenzsignals mittels FASER-Kit .....	41
3.9.4. Intrazelluläre Fluoreszenzmarkierung .....	42
3.9.5. CFDA-SE Markierung .....	42
3.9.6. Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung .....	43
3.9.6.1. Isolierung von DZ Subpopulationen .....	43
3.10. T-Zell-Kulturen .....	43
3.11. Restimulation und Fixierung .....	44
3.12. Tierexperimentelle Methoden .....	44
3.12.1. Adoptiver Transfer .....	44
3.12.2. Immunisierungen .....	44
3.12.2.1. Die Immunisierung mit TLR-Liganden .....	44
3.12.2.2. Die Immunisierung mit antigenbeladenen DZ .....	45
3.12.3. Die Blockade des Notch-Signalweges <i>in vivo</i> .....	46
3.12.3.1. Die Blockade von Notch-Liganden .....	46
3.12.3.2. Die Inhibition des Enzyms $\gamma$ -Sekretase .....	46
3.12.4. Die Depletion von plasmazytoiden dendritischen Zellen .....	46
3.13. Statistik .....	46

<b>4. Ergebnisse</b>	<b>49</b>
4.1. Die IL-10- Induktion in T <sub>H1</sub> -Zellen durch Aktivierung des Notch-Signalweges ...	50
4.1.1. Etablierung einer Immunisierungsstrategie .....	50
4.1.2. Die Blockade des Notch-Signalweges durch Inhibition der $\gamma$ -Sekretase ....	51
4.1.2.1. Die Depletion von MZ B-Zellen .....	52
4.1.2.2. Die Blockade der IL-10 Induktion durch Inhibition der $\gamma$ -Sekretase	53
4.1.3. Die Charakterisierung der Immunisierung mit Ovalbumin und CpG .....	55
4.1.3.1. Das Zytokinprofil OVA-TZR transgener T-Zellen .....	55
4.1.3.2. Das Zytokinprofil der endogenen CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	57
4.1.3.3. Die Verteilung von CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> , CD19 <sup>+</sup> , CD11c <sup>+</sup> Zellen und pDZ nach CpG/OVA Immunisierung .....	58
4.2. Die Beteiligung der Notch-Liganden an der IL-10 Induktion in T <sub>H1</sub> -Zellen .....	60
4.2.1. Die Blockade von Notch-Liganden <i>in vivo</i> .....	60
4.3. Die Analyse der Beteiligung verschiedener APZ an der IL-10 Induktion .....	63
4.3.1. Die Notch-Liganden Expression auf verschiedenen DZ Populationen .....	63
4.3.1.1. Die murinen DZ Populationen in Milz und Lymphknoten .....	63
4.3.1.2. Die Expression von Notch-Liganden <i>ex vivo</i> .....	64
4.3.1.3. Die Expression von Notch-Liganden nach Immunisierung .....	66
4.3.2. Die Rolle von pDZ für die IL-10 Induktion in T <sub>H1</sub> -Zellen .....	68
4.3.2.1. pDZ induzieren IL-10 in T <sub>H1</sub> -Zellen <i>in vitro</i> .....	69
4.3.2.2. Die Rolle von ICOS für die IL-10 Induktion durch pDZ .....	70
4.3.2.3. pDZ induzieren IL-10 in T <sub>H1</sub> -Zellen <i>in vivo</i> .....	72
4.3.2.4. Die Depletion von pDZ .....	73
4.3.2.4.a. Die Effizienz der pDZ Depletion .....	73
4.3.2.4.b. Die Blockade der IL-10 Induktion nach pDZ Depletion ..	74
4.3.3. Die Rolle von B-Zellen für die IL-10 Induktion in T <sub>H1</sub> -Zellen .....	76
4.3.3.1. Analyse der Beteiligung von B-Zellen an der IL-10 Induktion .....	76
4.3.3.2. Die Notch-Liganden Expression auf B-Zellen .....	78
4.3.3.2.a. Die Notch-Liganden Expression <i>ex vivo</i> .....	78
4.3.3.2.b. Die Notch-Liganden Expression nach OVA/CpG .....	79
<b>5. Diskussion</b>	<b>81</b>
5.1. Die Aktivierung der Notch-Signalweges <i>in vivo</i> .....	82
5.1.1. Notch und die T-Zell-Differenzierung .....	82

5.1.2. Notch induziert das immunsuppressive Zytokin IL-10 in T <sub>H</sub> 1-Zellen .....	83
5.2. Die IL-10 Induktion in T <sub>H</sub> 1-Zellen durch Liganden der Delta-Like Familie .....	84
5.3. Die IL-10 Induktion in T <sub>H</sub> 1-Zellen durch verschiedene APZ Populationen .....	86
5.3.1. Die IL-10 Induktion in T <sub>H</sub> 1-Zellen durch pDZ .....	87
5.3.1.1. pDZ können Immunantworten regulieren .....	87
5.3.1.2. Wie wird die Ligandenexpression reguliert? .....	89
5.3.1.3. pDZ als Induktoren einer Immunantwort .....	90
5.3.2. Die IL-10 Induktion in T <sub>H</sub> 1-Zellen durch konventionelle DZ .....	92
5.3.3. Die IL-10 Induktion in T <sub>H</sub> 1-Zellen durch B-Zellen .....	93
5.4. Die Notchvermittelte Immunregulation als Mechanismus der Selbstlimitation? ...	94
5.5. Hat der Notch-Signalweg therapeutisches Potential? .....	96
5.6. Ausblick und offene Fragen.....	98
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>101</b>
<b>7. Summary</b>	<b>105</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>107</b>
<b>9. Anhänge</b>	<b>131</b>
I       Abbildungsverzeichnis .....	132
II      Tabellenverzeichnis .....	133
III     Abkürzungsverzeichnis .....	134
IV      Erklärung .....	137
V       Danksagung .....	138
VI      Kongressbeiträge .....	141
VII     Publikationen .....	142