

**„*In vitro*-Analyse der Subpopulationen
humaner tolerogener IL-10-modulierter
dendritischer Zellen:
Induktion anergischer regulatorischer
T-Zell-Subpopulationen“**

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Fanny Sylvia Kryczanowsky

geb. am 27.3.1984

in Dresden

Mainz, 25.4.2013

Tag der mündlichen Prüfung: Mainz, 13.06.2014

Inhaltsverzeichnis

1	<u>Zusammenfassung</u>	5
2	<u>Einleitung</u>	7
2.1	Das angeborene Immunsystem	7
2.1.1	Dendritische Zellen– Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität	7
2.1.2	Populationen humaner dendritischer Zellen	8
2.1.3	Humane tolerogene dendritische Zellen	8
2.1.3.1	Überblick	8
2.1.3.2	IL-10 und IL-10-modulierte dendritische Zellen	9
2.2	Das adaptive Immunsystem	12
2.2.1	Der T-Zell-Rezeptor und der MHC-Komplex	12
2.2.2	T-Zellaktivierung	13
2.2.3	T-Zell-Toleranzinduktion	14
2.2.3.1	Zentrale Toleranzmechanismen	14
2.2.3.2	Periphere Toleranzmechanismen	14
2.3	Zielsetzung	18
3	<u>Material und Methoden</u>	19
3.1	Materialien	19
3.1.1	Chemikalien, Medien, Puffer und Lösungen	19
3.1.2	Zytokine	20
3.1.3	Antikörper	20
3.1.4	MicroBeads und Separationssäulen	23
3.1.5	Verwendete Kits	23
3.1.6	Primer (RT-PCR)	24
3.1.7	Geräte	24
3.2	Methoden	25
3.2.1	Durchflusszytometrie	25
3.2.1.1	Durchflusszytometrische Standardanalysen	25
3.2.1.2	DC-Marker-Durchflusszytometrie	26
3.2.1.3	T-Zell-Marker-Durchflusszytometrie	26
3.2.1.4	Durchflusszytometrische Analyse intrazellulärer Moleküle	26
3.2.1.5	Proliferationsfarbstoffe	27
3.2.1.5.1	CFSE	27
3.2.1.5.2	Celltrace Violet	27

3.2.1.5.3	eFluor670	27
3.2.2	Zellkultur	28
3.2.3	Zellzahl- und Viabilitätsbestimmung	28
3.2.3.1	Trypanblau-Färbung	28
3.2.3.2	7-AAD/Annexin V-Färbung	28
3.2.4	Generierung humaner dendritischer Zellen aus Leukapheresen	29
3.2.5	Anreicherungen	30
3.2.5.1	Anreicherung der IL-10DC Subpopulationen über Cellsort	30
3.2.5.2	Anreicherung der naiven T-Zellen über MACS	30
3.2.5.3	Anreicherung der CD4 ⁺ CD25 ^{low} T-Zellen über MACS	31
3.2.6	Primärkultur	31
3.2.6.1	³ H-Thymidin-Inkorporation	32
3.2.7	Restimulationen	32
3.2.7.1	Proliferationsassays – Anergieinduktion	32
3.2.7.1.1	³ H-Thymidin-Inkorporation	32
3.2.7.1.2	Einfluss von IL-2 auf die T-Zell-Proliferation	32
3.2.7.2	Suppressorassays	33
3.2.7.2.1	Durchflusszytometrische Analyse mittels Proliferationsfarbstoffe	33
3.2.8	RT-PCR-Analysen	33
3.2.9	Zytokinmessung	35
3.2.9.1	ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	35
3.2.9.2	Intrazelluläre durchflusszytometrische Analyse	35
3.2.10	Statistische Auswertungen	36
4	<u>Ergebnisse</u>	37
4.1	Charakterisierung der tolerogenen IL-10-modulierten dendritischen Zellpopulationen (IL-10DC)	37
4.1.1	Separation der IL-10DC-Subpopulationen	37
4.1.2	Expression von Oberflächenmolekülen auf dendritischen Zellen	39
4.1.3	Zytokinprofil	50
4.2	Charakterisierung der durch IL-10DC induzierten Treg-Subpopulationen	53
4.2.1	Expression von T-Zell-Oberflächenmolekülen	53
4.2.2	Induzierte T-Zell-Populationen nach Primärkultur	56
4.2.3	Anergiezustand der induzierten Treg-Populationen	57
4.2.3.1	T-Zell-Proliferationstest durch ³ H-Thymidin-Inkorporation	57
4.2.3.2	Einfluss von IL-2 auf die T-Zell-Proliferation nach Restimulation	58
4.2.4	Überprüfung der Viabilität der iTreg-Subpopulationen	59

4.2.4.1	Apoptosemessung nach primärer T-Zell-Stimulation und Ruhephase	59
4.2.4.2	Apoptosemessung im Restimulationstest	61
4.2.4.3	Einfluss der IL-2-Stimulation auf die Apoptose-Induktion	62
4.2.5	Expression von T-Zell-Differenzierungs- und -Aktivierungsmarkern durch RT-PCR-Analyse	63
4.2.6	Zytokinprofil der T-Zellpopulationen	66
4.2.6.1	ELISA-Messungen (IFN- γ , IL-5, IL-13, IL-10, sCD25)	66
4.2.6.2	Analyse der IL-2 Produktion mittels intrazellulärem FACS	69
4.2.7	Regulatorische Funktion der induzierten anergen Treg-Populationen – Suppressorassays	70
4.2.7.1	Durchflusszytometrische Analyse mittels Proliferationsfarbstoffe	70
5	<u>Diskussion</u>	74
6	<u>Literaturverzeichnis</u>	85
7	<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	98
8	<u>Publikationen</u>	100
9	<u>Referenzen</u>	100
10	<u>Lebenslauf</u>	102
11	<u>Danksagungen</u>	103
12	<u>Eidesstaatliche Erklärung</u>	104

1 Zusammenfassung

Humane IL-10-modulierte, tolerogene dendritische Zellen (IL-10DC), welche anerge regulatorische CD4⁺ T-Zellen (iTreg) induzieren, setzen sich aus zwei phänotypisch unterschiedlichen Subpopulationen zusammen: mature CD83^{high}CCR7^{high}HLA-DR^{high} und immature CD83^{low}CCR7^{negative}HLA-DR^{low}. In dieser Arbeit wurden die beiden durchflusszytometrisch separierten IL-10DC-Subpopulationen hinsichtlich ihres Phänotyps und ihrer tolerogenen Kapazität genauer untersucht.

Verglichen mit maturen DC (mDC) und der CD83^{high} IL-10DC-Subpopulation wies die CD83^{low} IL-10DC-Subpopulation eine signifikant verminderte Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86, ICOS-L und CD40 auf. Im Gegensatz hierzu konnte für beide IL-10DC-Subpopulationen eine gering (CD83^{low} IL-10DC) bzw. signifikant (CD83^{high} IL-10DC) erhöhte Expression der inhibitorischen Moleküle ILT3 und insbesondere ILT4 beobachtet werden. Die Expression von PD-L1 und PD-L2 lag jedoch lediglich auf der CD83^{high} IL-10DC-Subpopulation erhöht vor. Interessanterweise konnte neben einer erhöhten CD25-Expression auf der CD83^{high} IL-10DC-Subpopulation eine signifikant gesteigerte sCD25-Sezernierung beobachtet werden, während im Vergleich hierzu mDC und die CD83^{low} IL-10DC-Subpopulationen eine miteinander vergleichbare, aber deutlich verminderte Expression bzw. Sezernierung aufwiesen. Auch zwischen den beiden IL-10DC-Subpopulationen selbst konnten signifikante Unterschiede bezüglich des Expressionsmusters kostimulatorischer und koinhibitorischer Moleküle durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Restimulations-Experimente demonstrierten, dass beide IL-10DC-Subpopulationen, unabhängig von ihrem Maturierungsstatus, anerge CD4⁺ T-Zellen induzieren können. Dies wurde durch eine signifikant reduzierte T-Zell-Proliferation und IL-2-Expression sowie eine verminderte Produktion von T_H1- und T_H2-Zytokinen nachgewiesen. Zusätzlich zeigte sowohl die CD83^{high} IL-10DC-induzierte (iTreg⁺) als auch die CD83^{low} IL-10DC-induzierte (iTreg⁻) T-Zell-Population regulatorische Eigenschaften, indem beide die Aktivität von Responder-T-Zellen signifikant supprimierten. Beim Vergleich der suppressiven Kapazität der beiden iTreg-Subpopulationen anhand verschiedener Stimuli konnte eine verminderte Aktivität bei der CD83^{low} IL-10DC-induzierten iTreg-Subpopulation beobachtet werden. Interessanterweise verloren beide iTreg-Subpopulationen ihren anergen Status während der Suppressionsversuche.

Die *in vitro*-Induktion homogener potenter iTreg durch Stimulation mit maturaen CD83^{high}CCR7^{high}HLA-DR^{high} und immaturren CD83^{low}CCR7^{negative}HLA-DR^{low} IL-10DC stellt somit ein potenzielles Vorgehen zur Kontrolle und Limitierung harmloser, autoreaktiver und allergischer Immunantworten dar und erlaubt möglicherweise die Entwicklung einer neuen Strategie zur DC-vermittelten Vakzinierung.

2 Einleitung

2.1 Das angeborene Immunsystem

2.1.1 Dendritische Zellen – Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität

Dendritische Zellen (DC) stellen die potentesten Antigen-präsentierenden Zellen (APC) des angeborenen Immunsystems dar, da sie die Fähigkeit besitzen auch naive T-Zellen zu aktivieren. Als Antigen-präsentierende Zellen sind DC in allen Geweben präsent und sowohl in lymphatischen als auch in nichtlymphatischen Geweben vorzufinden.^{1, 2} Durch ihre weite Verbreitung gehören sie häufig zu den ersten Zellen, die mit Antigenen interagieren. Die DC-Aktivierung und -Reifung wird durch Kontakt mit so genannten Gefahrensignalen (PAMP, engl. Pathogen-Associated-Molecular Pattern; proinflammatorische Zytokine, Chemokine etc.) induziert, die z.B. von nekrotischen Zellen oder auch Pathogenen ausgehen bzw. gebildet werden. Aktivierte DC sind dann in der Lage, T-Zellen zu stimulieren und tragen zur T-Zell-Differenzierung und der Induktion effektiver Immunantworten u.a. bei Infektionen bei.³⁻⁶ Durch diese Funktion stellen APC, insbesondere dendritische Zellen, ein Bindeglied zwischen der adaptiven und der angeborenen Immunabwehr dar.

Über Mustererkennungs-Rezeptoren (PRR, engl. Pattern Recognition Receptors) erkennen DC die molekularen Muster der Pathogene (PAMP).^{7, 8} Neben den Phagozytose-induzierenden C-Typ-Lektin- und Scavenger-Rezeptoren sowie den intrazellulären RIG-I-like- und NOD-Rezeptoren gehören auch die bisher 11 identifizierten Toll-Like-Rezeptoren (TLR) zu den PRR. Der bekannteste TLR-Ligand ist Lipopolysaccharid (LPS), ein Bestandteil der äußeren Membran gramnegativer Bakterien, welcher vom TLR-4 erkannt wird. TLR-3 detektiert virale RNA-Doppelstränge, CpG-Motive bakterieller DNA werden von dem intrazellulären TLR-9 identifiziert.^{6, 9-11}

Im Rahmen einer Entzündungsreaktion reifen DC in einem Milieu aus proinflammatorischen Zytokinen (z.B. IL-6, TNF- α , IL-1 β) und PRR-Liganden zu T-Zell-aktivierenden muren DC (mDC) aus. Sie regulieren kostimulatorische Moleküle der B7-Familie, vor allem CD80 und CD86, sowie MHC-II-Moleküle herauf.¹²⁻¹⁵ Somit sind sie exzellent ausgestattet um T-Zellen zu aktivieren. Des Weiteren werden proinflammatorische Chemokin-Rezeptoren wie CCR1, CCR2 und CCR5 herunterreguliert und gleichzeitig die Expression von Lymphknoten-Homing-

Rezeptoren wie CCR7 und CXCR4 erhöht.¹⁶⁻¹⁸ MIP-3 β ist der Ligand des Chemokin-Rezeptors CCR7, CXCR4 detektiert SDF-1. Beide Chemokine werden von lymphatischen Geweben sezerniert und ermöglichen so die zielgerichtete Wanderung von APC, die so genannte Chemotaxis.^{17, 19-21} DC regulieren während der Ausreifung und der Migration in die benachbarten Lymphknoten ihre phagozytische Aktivität herab, um dort als optimale Antigen-präsentierenden Zellen den T-Zellen das prozessierte Antigen präsentieren zu können.²²

2.1.2 Populationen humaner DC

Aus den myeloiden Vorläuferzellen des Knochenmarks (pluripotente hämatopoetische Stammzelle) entwickeln sich die konventionellen dendritischen Zellen sowie auch Makrophagen, Granulozyten und Mastzellen. Neben den myeloiden bzw. konventionellen DC, zu denen auch die Langerhans-Zellen der Haut und die lymphatischen DC aus Lymphknoten und Blut gehören, existieren noch plasmazytoide DC, die sich aus lymphoiden Vorläuferzellen entwickeln. Plasmazytoide DC können die T-Zell-Proliferation im Gegensatz zu konventionellen DC nur schwach induzieren. Zudem zeichnen sie sich durch die Expression der TLR-7 und TLR-9 und der damit verbundenen Sezernierung von Typ I Interferonen (IFN) aus.^{23, 24} Beide DC-Populationen, plasmazytoide und konventionelle DC, liegen im peripheren Blut nur in geringer Anzahl vor (ca. 1-2%).²⁵

Auch Monozyten, welche mit größerer Frequenz im peripheren Blut vorhanden sind, können *in vivo* als Vorläuferzellen für dendritische Zellen fungieren.²⁶ Für die Generierung einer homogenen dendritischen Zell-Population *in vitro* bietet sich daher die Isolation von Monozyten aus PMBC (engl. Peripheral Mononuclear Blood Cells) an.^{27, 28} Neben der positiven Selektion über CD14²⁹ ist die Monozyten-Isolation aus PBMC über deren Adhärenz die einfachste Methode.³⁰⁻³³

2.1.3 Humane tolerogene dendritische Zellen

2.1.3.1 Überblick

Für die Regulation inflammatorischer Immunantworten, ausgelöst durch Pathogene (Infektionen), apoptotische Zellen, Allergene (Allergien) oder Auto-Antigene (Autoimmunerkrankungen), sind tolerogene dendritische Zellen unabdingbar. Sie üben einen regulatorischen Einfluss auf die Immunantwort aus, indem sie u.a. die Differenzierung von regulatorischen T-Zellen (Treg) induzieren und somit die periphere Toleranz aufrechterhalten.³⁴⁻³⁷ Tolerogene DC zeigen häufig einen semimaturen Phänotyp und sind terminal ausdifferenziert. Werden sie einem

inflammatorischen Milieu ausgesetzt, ändert sich deren Funktion im Vergleich zu immaturren DC (iDC) sowohl im murinen als auch im humanen System nur schwach.^{37, 38}

IL-10/TGF- β -modulierte DC zeigen neben der verminderten Expression kostimulatorischer Moleküle eine erhöhte IL-10-Serzernierung nach Stimulation. Ihre regulatorische Funktion konnte bereits anhand verschiedener *in-vivo*-Modelle wie der xenogenen GvHD und der Peritonitis sowie der Typ I Diabetes belegt werden.^{35, 39-41}

Mit Hilfe des Immunsuppressivums Dexamethason können ebenfalls tolerogene DC (DEX-DC) generiert werden. Diese sind durch eine erhöhte IL-4-Expression und IL-10-Serzernierung bei gleichzeitiger Reduktion der IL-12p40/p70-Produktion gekennzeichnet. Primärstimulation von T-Zellen mit DEX-DC führt zu einer reduzierten T-Zell-Proliferation und verminderten IFN γ -Produktion. Zudem zeigen die anergischen iTreg eine begrenzte suppressive Kapazität.⁴²⁻⁴⁴

Durch Inhibition der Aktivierung und Expression von NF- κ B in dendritischen Zellen wird die IL-12- und TNF α -Produktion sowie die Expression von kostimulatorischen Molekülen und MHC-II auf DC unterbunden.⁴⁵ So induziert die Bindung von Vitamin D₃ an den Vitamin D-Rezeptor einen Transkriptionsfaktor, der die NF- κ B-Aktivierung inhibiert und dadurch den tolerogenen Phänotyp der DC induziert.⁴⁶ Zudem resultiert die Stimulation mit Vitamin D₃-modulierten, IL-10-produzierenden DC in einer reduzierten Proliferation sowie einer verminderten IFN γ -Produktion der T-Zellen.^{43, 47-}

⁵¹ Durch Modulation der DC mit Vitamin D₃ in Kombination mit Mycophenolat-Mofetil konnte außerdem von der Arbeitsgruppe um Gregori et al. eine Toleranz nach Transplantationen induziert werden.⁵²

Auch die Vitamin D₃/Dexamethason-Modulation reduziert die Expression kostimulatorischer Moleküle der DC sowie die IL-12-Serzernierung durch DC, während eine erhöhte IL-10-Produktion induziert wird. Neben einer reduzierten stimulatorischen Kapazität weisen die durch diese tolerogenen DC induzierten Treg (iTreg) eine konzentrations-abhängige suppressive Aktivität auf.^{51, 53, 54}

2.1.3.2 IL-10 und IL-10-modulierte dendritische Zellen

Das immunsuppressive Zytokin IL-10 spielt in der Induktion der peripheren Toleranz eine wichtige Rolle. Die in dieser Arbeit untersuchten humanen *in vitro*-generierten IL-10-modulierten DC (IL-10DC) induzieren verglichen mit anderen tolerogenen DC anergische iTreg mit einer hohen suppressiven Kapazität und stellen somit ein sehr viel versprechendes Therapeutikum für Erkrankungen dar, die überschießende

Reaktionen des Immunsystems, wie sie für Autoimmunerkrankungen und Allergien charakteristisch sind, inhibieren können.^{31, 44, 55} Gregori et al. demonstrierten zudem die *in vivo*-Existenz humaner IL-10-modulierter tolerogener DC, bezeichnet als DC-10, im peripheren Blut.⁵⁶ Zusätzlich konnte in HIES (Hyper-IgE Syndrome)-Patienten beobachtet werden, dass die durch STAT3-Mutationen verursachte defekte IL-10-Antwort in DC zu einer Beeinträchtigung in der iTreg-Induktion führt.⁵⁷

Die durch IL-10 induzierte Signaltransduktion erfolgt über den IL-10-Rezeptor (IL-10R). Der IL-10R setzt sich aus je 2 transmembranen Ketten zusammen: IL-10R1 und IL-10R2. Die IL-10R1-Kette weist die höhere Affinität zu IL-10 auf und ist daher entscheidend für die Bindung des Liganden. Im Komplex mit IL-10R2 wird die Signaltransduktion nach Bindung des Liganden ermöglicht, wobei auch andere IL-10-verwandte Zytokine wie IL-22, IL-26 und IL-28, die IL-10R2-Kette zur Signaltransduktion nutzen. Die meisten (hämatopoetischen) Zellen exprimieren IL-10R1 und IL-10R2 konstitutiv, wobei die IL-10R1-Expression durch verschiedene Stimuli erhöht werden kann.^{58, 59}

Der IL-10/IL-10R-Signalweg ist gekennzeichnet durch die Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges. Die Phosphorylierung der Tyrosinkinase Tyk2/Jak1 initiiert die STAT3-Homodimerisierung, welches dann als Transkriptionsfaktor für antiinflammatorische Gene fungiert.^{60, 61} Entscheidend für die Einflussnahme von IL-10 auf die Maturierung bzw. Differenzierung dendritischer Zellen ist neben dem Reifungsstimulus vor allem auch der Zeitpunkt der IL-10-Zugabe.³³ Die durch IL-10-Behandlung beeinflussten Signalwege sind der PI3K/Akt/NF- κ B-, MyD88/MAPK(inase)- und der Ras/Raf/-MAPK-regulierte Signaltransduktionsweg (Abb. 1). Sowohl eine frühe Inhibition der src-Kinasen p56lyn und p58hck als auch die Suppression späterer Ereignisse der PTK-vermittelten Aktivierung (Ras, ERK, p38) wurde in humanen Monozyten und DC beobachtet.⁶²⁻⁶⁴ Die Degradation der beiden TLR-vermittelten MyD88-abhängigen Adaptormoleküle IRAK4 und TRAF6 werden durch IL-10-induzierte Signale post-transkriptionell reguliert.⁶⁵ Die IL-10-vermittelte Inhibition der NF- κ B-Aktivierung über den PI3K-Signalweg ist vielfältig: Die Aufhebung der Akt-Phosphorylierung, die Inhibition der κ B-Degradation, die Blockade der Aktivität des Inhibitors κ B-Kinase (IKK) sowie die Prevention der NF- κ B-Translokation und DNA-Bindungsaktivität wurden von mehreren Arbeitsgruppen demonstriert.⁶⁶⁻⁶⁷ Die Translokation der NF- κ B-Untereinheit p65 wird durch IL-10-Modulation blockiert, indem die Formation von p50-Homodimeren initiiert wird, und dieses als negativer Regulator fungiert.⁶⁶⁻⁶⁹

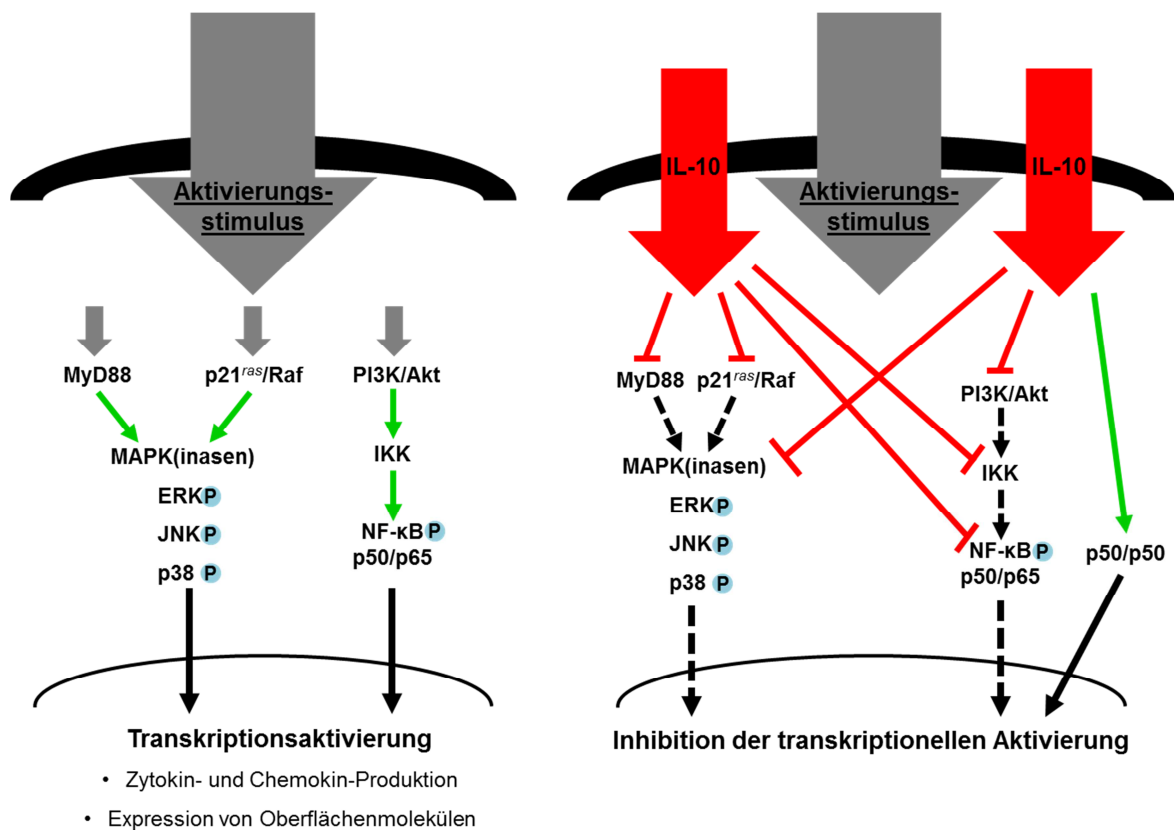


Abbildung 1: Inhibition der Maturierung und Differenzierung von APC durch IL-10. Proinflammatorische Stimuli aktivieren MyD88-abhängige (MAPK) sowie PI3K-vermittelte (NF-κB) Signalwege, die transkriptionelle Prozesse und schließlich die Aktivierung und Maturierung der stimulierten APC induzieren (links). Gleichzeitige Behandlung dieser aktivierten APC mit IL-10 inhibiert Schlüssel-moleküle der genannten Signalwege. Der MAPK-/MyD88-abhängige sowie der NF-κB-vermittelte Signalweg werden direkt oder indirekt durch IL-10 beeinflusst. Dies hebt die transkriptionelle und post-translationelle Prozesse oder induziert inhibitorische transkriptionelle Mechanismen (rechts). Abbildung nach Hubo et al. *Frontiers in Immunology*, 2013.

IL-10DC sind terminal ausdifferenzierte Zellen und weisen im Vergleich mit anderen tolerogenen DC ebenfalls einen semimaturen Phänotyp auf. Gekennzeichnet ist dies bei IL-10DC durch eine im Vergleich zu mDC reduzierte Expression der kostimulatorischen Moleküle aus der B7-Familie (CD80, CD86, ICOS-L) und eine stark eingeschränkte Produktion von inflammatorischen Zytokinen.^{31, 44, 55, 70, 71} Aber auch die Expression des DC-spezifischen Reifungsmarkers CD83, des Chemokin-Rezeptors CCR7 sowie des MHC-Klasse-II-Moleküls HLA-DR ist auf den IL-10DC reduziert. Gleichzeitig wird eine erhöhte Expression von CD14 sowie den inhibitorischen Rezeptoren ILT2, ILT3 und ILT4 auf IL-10-modulierten DC im Vergleich zu mDC postuliert.^{44, 55, 56, 71-73} Die Expressionsabnahme von CCR7 auf den IL-10DC korreliert dabei mit der des Reifungsmarkers CD83.⁴⁴

2.2 Das adaptive Immunsystem

2.2.1 Der T-Zell-Rezeptor und der MHC-Komplex

Das adaptive Immunsystem vermag hoch spezifisch auf Pathogene zu antworten und diese zu bekämpfen, jedoch wird das adaptive Immunsystem erst in der späteren Phase der Entzündungsreaktion aktiviert. Darüber hinaus ist es in der Lage, das immunologische Gedächtnis zu bilden, um bei einer erneuten Begegnung effizienter und schneller auf das Pathogen zu reagieren.⁷⁴⁻⁷⁷

Die zellulären Bestandteile des adaptiven Immunsystems werden von T- und B-Zellen gebildet. B-Zellen sezernieren Antikörper, die u.a. Pathogene opsonisieren und deren Phagozytose und Bekämpfung somit erleichtern.⁷⁸⁻⁸⁰ T-Zellen agieren vorwiegend über Zell-Zell-Kontakte und lösliche Mediatoren wie Zytokine und Granzyme. Sie erkennen durch ihren T-Zell-Rezeptor (TCR) spezifische Antigene, die über den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) von APC und anderen Zellen des Körpers präsentiert werden.

Der T-Zell-Rezeptor (TCR) ist die Grundlage zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems, da jede T-Zelle einen spezifischen Rezeptor exprimiert, der durch somatische Rekombination erzeugt wird. Das heißt, jede T-Zelle erkennt in der Regel nur ein einzelnes Epitop eines Pathogens bzw. Antigens. Der T-Zell-Rezeptor besteht entweder aus einer α - und einer β -Kette ($\alpha\beta$ TCR) oder seltener aus einer γ - und einer δ -Kette ($\gamma\delta$ TCR), die gemeinsam eine Mulde bilden und den MHC-Epitop-Komplex erkennt.⁸¹ Bei der V-(D)-J-Rekombination werden bestimmte DNA-Segmente (V-, D-, und J-Segmente) während der T-Zell-Reifung im Thymus miteinander kombiniert und ermöglichen somit das große TCR-Repertoire.⁸²⁻⁸⁴ Hieraus ergibt sich auch eine potentielle Gefahr für den Organismus, da nicht nur T-Zell-Rezeptoren gebildet werden, die potenziell pathogene Antigene erkennen, sondern auch T-Zell-Rezeptoren, die spezifisch für Auto-Antigene sind. Jedoch haben sich im Laufe der Evolution Mechanismen entwickelt, die diesem Risiko entgegenwirken: die zentrale und periphere Toleranz (siehe Abschnitt 2.2.3).

Es existieren zwei MHC-Molekül-Klassen: MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II. MHC-Klasse-I-Moleküle, die beinahe von allen Zellen des Körpers exprimiert werden, präsentieren hauptsächlich intrazelluläre, z.B. virale Antigene.⁸⁵ MHC-Klasse-II-Moleküle, z.B. HLA-DR, werden von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) exprimiert und präsentieren exogene, z.B. bakterielle Antigene. MHC-II-Moleküle erkennen den spezifischen TCR der CD4⁺ T-Zellen nur im Komplex mit dem

spezifischen Epitop des Antigens (Restriktion). CD4⁺ T-Zellpopulationen (z.B. T_H2-Zellen) können B-Zellen aktivieren oder Makrophagen (z.B. durch T_H1-Zellen) dazu veranlassen, die phagozytierten Pathogene abzutöten. Durch die Kreuzpräsentation ist es APC jedoch möglich Epitope, die sonst auf das MHC-Klasse-II-Molekül beschränkt wären, über das MHC-Klasse-I-Molekül zu präsentieren. Dieser Prozess ermöglicht es Viren zu bekämpfen, die keine APC infizieren. Zudem kann so gezielt über eine sogenannte „Kreuz-Toleranz“ eine Toleranz in CD8⁺ T-Zellen induziert werden, um eine Reaktion dieses T-Zelltyps zu inhibieren.^{86, 87}

2.2.2 T-Zellaktivierung

Zur Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sind APC, insbesondere mature DC (mDC), notwendig. Zwischen mDC und den T-Zellen entsteht bei Interaktion im Lymphknoten ein fester MHC-TCR-Kontakt (1. Signal). Wenn zu dieser Bindung kostimulatorische Signale über CD80/CD86-CD28 (2. Signal) sowie lösliche Mediatoren (3. Signal) hinzukommen, so erfolgt die Aktivierung, Differenzierung und Proliferation der T-Zelle.^{5, 88-90} Findet eine Signaltransduktion nur über den TCR statt, d.h. ohne Kostimulation über CD80/CD86-CD28, wird die T-Zelle in Anergie versetzt und reagiert nicht mehr auf aktivierende Signale.⁹¹⁻⁹³

CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) aus der B7-Familie waren die ersten kostimulatorischen Moleküle, die vor über 20 Jahren entdeckt wurden. Ihre Liganden auf T-Zellseite sind das von naiven T-Zellen konstitutiv exprimierte CD28 bzw. der inhibitorische Rezeptor CTLA-4 (engl. Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen 4), welcher erst nach T-Zell-Aktivierung exprimiert wird. CD80 und CD86 haben weitgehend ähnliche Funktionen, wie aus Knockoutstudien bekannt ist, jedoch bindet CD86 präferentiell CD28 und CD80 verstärkt CTLA-4.⁹⁴⁻⁹⁷ Der Kostimulus über CD80/CD86-CD28 induziert und stabilisiert u.a. den *IL-2*-Promotor und damit die IL-2-Produktion der T-Zelle. Die Bindung dieses autokrinen Zytokins dient als wichtiges Überlebenssignal für T-Zellen.^{91, 98} Kontakte über CD80/CD86-CTLA-4 inhibiert bzw. reguliert die T-Zellaktivierung (negatives Feedback). Dieser Kontakt über CTLA-4 spielt zudem auch eine wichtige Rolle bei der Induktion der peripheren T-Zelltoleranz.^{31, 99-102}

2.2.3 T-Zell-Toleranzinduktion

2.2.3.1 Zentrale Toleranzmechanismen

Im Thymus, dem Ort der zentralen Toleranz, werden alle CD4⁻CD8⁻ T-Lymphozyten aus dem Knochenmark auf die Erkennung von Eigen-Peptiden, die von Epithelzellen präsentiert werden, selektioniert. Während des Prozesses der T-Zell-Reifung werden TCR, CD4 und CD8 auf der Oberfläche der T-Lymphozyten exprimiert. Bei der Positiv-Selektion werden CD4⁺CD8⁺ T-Zellen zunächst anhand der Erkennung des MHC-Molekül-Klasse selektiert. Wenn die T-Zelle MHC-Klasse-I-Moleküle erkennt, so wird sie zur CD4⁻CD8⁺ T-Zelle, erkennt sie hingegen MHC-Klasse-II-Moleküle, entwickelt sie sich zur CD4⁺CD8⁻ T-Zelle. In diesem ersten Selektionsschritt werden ebenfalls Zellen deletiert, die allein durch die Bindung eines MHC-Moleküls aktiviert werden.^{103, 104} Danach erfolgt die Negativ-Selektion der einfach positiven Zellen. Dabei werden den T-Zellen Eigen-Peptide im Komplex mit dem MHC-Molekül von APC präsentiert. Bindet die T-Zelle diesen Komplex mit sehr hoher oder niedriger Affinität, wird die Apoptose der T-Zelle induziert.^{104, 105} Nur bei mittlerer Affinität überlebt die T-Zelle diesen Prozess und verlässt den Thymus in die Peripherie.¹⁰⁶ Diese autoreaktiven T-Zellen können jedoch mit Hilfe der peripheren Toleranzmechanismen weiterhin kontrolliert und reguliert werden, um die Entstehung von Autoimmunität zu verhindern.

2.2.3.2 Periphere Toleranzmechanismen

In der Peripherie sind Auto-Antigene vorhanden, die im Thymus nicht über MHC-Moleküle präsentiert werden. Die Zellen des Immunsystems u.a. T-Zellen) werden jedoch mit diesen harmlosen Antigenen konfrontiert. Peripheren Toleranzprozesse verhindern, dass Immunreaktionen gegen diese Antigene initialisiert werden. Sie sorgt auch dafür, dass autoreaktive T-Zellen, die der Selektion der zentralen Toleranz entgangen sind, nicht den Körper bzw. körpereigenes Gewebe angreifen und zerstören (Autoimmunität). Darüber hinaus ist die periphere Toleranz an der Limitierung und Kontrolle sämtlicher Immunreaktionen beteiligt, indem sie T-Zell-Aktivität supprimiert, T-Zellen in Apoptose oder Anergie versetzt.

Immunologische Ignoranz

Der Zugang zu immunologisch nicht überwachten Gebieten wird z.B. durch biologische Barrieren wie die Blut-Hirn-Schranke des zentralen Nervensystems erschwert bzw. blockiert und eine Immunantwort, verursacht durch autoreaktive Lymphozyten, somit verhindert.¹⁰⁷⁻¹¹⁰ Aber auch Tumore, welche schwach

immunogen sind oder immunologisch unzugänglich sind, können vom Immunsystem ignoriert werden.¹¹¹⁻¹¹³

Apoptose

Zur Vermeidung einer andauernden, T-Zell-vermittelten Immunantwort wird u.a. durch Interaktion des Rezeptors Fas (CD95) mit dem Fas-Liganden (CD178) die Apoptose, der programmierte Zelltod, induziert und somit die Immunantwort reguliert. Durch Kontakt zwischen diesen beiden Molekülen, bildet sich ein Trimer mit einer intrazellulären Todesdomäne, die z.B. den Adaptor FADD (engl. Fas-Associated via Death Domain) rekrutiert. Dies führt zur Aktivierung der Caspase 8, die dann den Prozess der Apoptose in der Zelle induziert.¹¹⁴

Anergie-Induktion

Prinzipiell wird eine anerge T-Zelle nur unvollständig aktiviert. Es kommt zu einem Proliferationsstopp, zugleich wird die IL-2-Produktion eingestellt. Zudem zeichnen sich anerge T-Zellen durch die Reaktionslosigkeit bei einem erneuten MHC-TCR-Kontakt aus.^{92, 93, 115}

Verschiedene Prozesse können zur Induktion anergischer T-Zellen führen. Erhalten z.B. T-Zellen ein starkes TCR-Signal ohne weitere (Ko-)Stimulation über CD28, so führt dies zur Anergie-Induktion.^{91, 115} So nehmen immature DC Antigene auch unter nichtinflammatorischen Bedingungen auf (Phagozytose apoptotischer Zellen oder peripherer Auto-Antigene), die daraufhin nur teilweise ausreifen, in die Lymphknoten migrieren (steady-state DC) und so aktiv z.B. durch ihre TGF- β - und IL-10-vermittelte tolerogene Wirkung zur peripheren Toleranz sowohl gegen Auto- als auch harmlose Fremd-Antigene, z.B. bei Transplantationen, beitragen.¹¹⁶⁻¹¹⁹ Aber auch tolerogene DC können anerge T-Zellen generieren.^{55, 70, 120} Bakterielle Superantigene können ebenfalls T-Zellen auf diese Art in Anergie versetzen, da diese Superantigene für einen unspezifischen Kontakt zwischen T-Zell-Rezeptor und MHC-Komplex sorgen.¹²¹

Regulatorische T-Zellen

Erste Hinweise auf die Existenz von natürlich vorhandenen regulatorischen Zellen zeigten sich 1969. Mäuse, denen der Thymus entfernt wurde, entwickelten Autoimmunerkrankungen.¹²² 1970 konnten Gershon et al. zeigen, dass eine T-Zell-Subpopulation existiert, die die Aktivierung von T- und B-Zellen sowie APC hemmt.¹²³ Die Beschreibung von T-Suppressor-Zellen erfolgte 1972 und 1973,¹²⁴⁻¹²⁶ jedoch erst 1995 identifizierten Sakaguchi et al. diese als CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺

regulatorische T-Zellen.¹²⁷ In der Peripherie sind nur ca. 5% aller T-Zellen natürlich vorkommende „CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatorische“ T-Zellen (nTreg) vorhanden.¹²⁷ nTreg sind *in vivo* durch eine eingeschränkte Proliferationsfähigkeit und Zytokin-Produktion charakterisiert¹²⁸ und zeigen *in vitro* nach einem TCR-Stimulus weder eine IL-2-Produktion noch eine Proliferation. Jedoch sind aktivierte nTreg in der Lage antigen-unspezifisch und Zell-Zell-Kontakt-vermittelt konventionelle CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zu supprimieren.¹²⁹⁻¹³¹ Verschiedene Mechanismen tragen zur suppressiven Kapazität bei. Durch direkten Zell-Zell-Kontakt ist der Transfer von zyklischem Adenosin-Mono-Phosphat (cAMP) via Gap Junctions in die Zielzelle ermöglicht, welches eine inhibierende Wirkung auf die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen ausübt.¹³² Jedoch gibt es auch Hinweise darauf, dass die Sekretion von löslichen Mediatoren wie IL-10 und TGF- β durch die nTreg *in vivo* zu einer Modulation der Immunantwort beiträgt.¹³³

Der Nachweis von Foxp3 allein ist im Gegensatz zum murinen System in humanen T-Zellen jedoch nicht ausreichend um nTreg zu identifizieren, da auch aktivierte T-Zellen eine erhöhte Foxp3-Expression aufweisen.¹³⁴⁻¹³⁷ Neben der hohen Foxp3-Expression wurde daher auch Helios als zusätzlicher Marker für (aktivierte) nTreg postuliert. Dieser reguliert die IL-2-Produktion durch Suppression der *IL-2*-Transkription via epigenetischer Modifikationen und begünstigt zudem die Bindung von Foxp3 an den *IL-2*-Promotor und damit den anergen Phänotyp der nTreg.^{138, 139} Die Bedeutung von regulatorischen T-Zellen für den Organismus wird deutlich bei Autoimmunerkrankungen, die auf das Fehlen oder die Dysfunktion von nTreg zurückzuführen sind.^{140, 141} Mäuse, die aufgrund einer Mutation im *Foxp3*-Gen (Scurfy) keine nTreg haben, sterben innerhalb von 16-25 Tagen nach der Geburt,¹⁴² da keine Toleranz-Induktion stattfindet und dadurch (auto-)reaktive Zellen nicht supprimiert werden können.

Neben den im Thymus natürlich gereiften nTreg können unter immunsuppressiven Bedingungen regulatorische T-Zellen sowohl *in vivo* in der Peripherie als auch *in vitro* induziert werden (iTreg). Diese zeigen im Gegensatz zu nTreg nur eine teilweise Demethylierung der TSDR (engl. Treg-Specific Demethylated Region) des *Foxp3*-Gens.^{143, 144}

Die induzierten regulatorischen T-Zellen Typ I (T_H1) werden in Gegenwart von IL-10 und IFN α aus CD4⁺ T-Zellen generiert. Ihre supprimierende Wirkung gegenüber T_H1- und T_H2-T-Zellen basiert auf der schnellen Freisetzung hoher Mengen der Zytokine

IL-10 und TGF- β .^{36, 145-147} Auch im murinen System konnte eine natürliche DC-Population identifiziert werden, die eine Tr1-Differenzierung induziert.¹⁴⁸

Regulatorische T_H3-Zellen werden in der sogenannten „Low dose“-Toleranz durch orale Applikation von Antigenen induziert. Im Gegensatz zu nTreg supprimieren T_H3-Zellen Zellkontakt-unabhängig mittels der immunsuppressiven Mediatoren TGF- β und IL-10. T_H3-Zellen tragen zudem zur IgA-Produktion bei und wirken ebenfalls inhibitorisch auf T_H1- sowie T_H2-Zellen.^{149, 150}

Jonuleit et al. konnte 2000 zeigen, dass ein wiederholter Kontakt zwischen immaturren DC (iDC) und CD4⁺ T-Zellen zur Induktion von iTreg und einer verstärkten Expression von CTLA-4, einem regulatorischen Molekül, auf der T-Zell-Seite führt, aber ohne gleichzeitig die Expression von Apoptose fördernden Liganden wie Fas und Fas-Ligand zu erhöhen.¹⁵¹ Um die Produktion von IL-10 in dieser iTreg-Population auszulösen, ist ein Kontakt zwischen ICOS und ICOS-L nötig.¹⁵² Zudem verlieren diese iTreg die Fähigkeit IL-2, IFN γ und IL-4 zu produzieren und zu proliferieren.¹⁵¹

IL-10DC induzieren Antigen-spezifisch anerge CD4⁺ und CD8⁺ iTreg, deren regulatorische Funktionen nicht über lösliche Mediatoren wie IL-10, sondern über Zell-Zell-Kontakt vermittelt werden.^{31, 100} IL-10DC-induzierte iTreg sind durch eine stark verminderte T-Zellproliferation sowie IL-2- und IFN γ -Produktion, aber gleichzeitig erhöhte Aktivität der MAP-Kinase p38, die sowohl für die Induktion der Anergie als auch die Suppressor-Funktion wichtig ist, charakterisiert.^{31, 70, 120, 153} Die suppressiven Eigenschaften und der Proliferationsstopp der IL-10DC-induzierten iTreg sind abhängig von einem Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus. Die hohe Expression des „cyclin-dependent-kinase“-Inhibitors p27kip1 ist für diesen Arrest verantwortlich, da dieser Inhibitor den durch CDK (Cyclin-abhängige Kinase) induzierten Abbau des Retinoblastom-Proteins (Rb) und somit das Fortlaufen des Zellzyklus verhindert.¹⁰⁰ Mehrere Arbeitsgruppen postulierten bereits die suppressive Kapazität der IL-10DC-induzierten iTreg gegenüber aktivierten T_H1-, T_H2- und T_C1-Antworten.^{31, 120, 153, 154} Aber auch die mDC-stimulierte CD4⁺ T-Zell-Proliferation konnte von den IL-10DC-induzierten iTreg inhibiert werden.^{44, 55, 56, 72, 73}

2.3 Zielsetzung

Humane IL-10-modulierte dendritischer Zellen (IL-10DC), die *in vitro* aus Monozyten generiert wurden, zeigen einen semimaturen und heterogenen Phänotyp, der sich aus maturaen $CD83^{high}CCR7^{high}HLA-DR^{high}$ und immaturaen $CD83^{low}CCR7^{negative}HLA-DR^{low}$ IL-10DC zusammensetzt. Aufgrund ihrer Heterogenität werden bei Stimulation mit IL-10DC unterschiedliche iTreg-Subpopulationen induziert. Diese besitzen womöglich unterschiedliche Charakteristika, insbesondere in Bezug zur regulatorischen Kapazität. Die *in vitro*-Induktion homogener potenter iTreg trägt zur effizienteren Kontrolle und Limitierung autoreaktiver und allergischer Immunantworten bei und erlaubt die Entwicklung einer neuen Strategie zur DC-vermittelten Vakzinierung. In dieser Arbeit wurde daher die Wirkung der beiden unterschiedlichen, durchflusszytometrisch separierten, homogenen $CCR7^{high}$ und $CCR7^{negative}$ IL-10DC-Subpopulationen auf naive $CD4^{+}$ T-Zellen untersucht. Die These, dass die beiden IL-10DC-Subpopulationen unterschiedliche tolerogene Eigenschaften besitzen und dementsprechend unterschiedlich regulatorisch wirken, sollte anhand des Einflusses auf die Funktion der induzierten regulatorischen T-Zellen (iTreg) untersucht werden.

Im ersten Teil (A) werden die beiden humanen IL-10DC-Subpopulationen hinsichtlich ihres Expressionsmusters und Zytokinprofils genauer charakterisiert und mit immaturaen und maturaen DC verglichen. Im zweiten Teil dieser Arbeit (B) werden die iTreg-Subpopulationen, welche mit den beiden IL-10DC-Subpopulationen induziert wurden, im Vergleich zu aktivierten Effektor-T-Zellen hinsichtlich des Phänotyps und der regulatorischen Funktion genauer untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Serva (Heidelberg) bezogen. Alle nötigen Plastikverbrauchsmaterialien wie zum Beispiel Zellkulturplatten, Pipettenspitzen, Einmalspritzen und Kanülen, FACS- und Zentrifugenröhrchen wurden von Costar (Bodenheim), Greiner (Frickenhausen), Becton + Dickinson (Heidelberg), Millipore (Eschborn) und Nalgene (Rochester, NY, USA) bezogen. Die Glaspipetten sind von Greiner (Frickenhausen) und die Neubauerzählkammer von Merk (Wiesbaden).

3.1.1 Chemikalien, Medien, Puffer und Lösungen

Aqua dest. von Braun AG (Melsungen)

EDTA von Serva (Heidelberg)

Ethanol 70% von Brüggemann Alcohol (Heilbronn) bzw. Roth GmbH (Karlsruhe)

Terralin Desinfektion von Schülke & Mayr GmbH (Norderstedt)

FCS „Gold“ (Fötales Kälber Serum) von PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)

HSA (Humanes Serum Albumin) von Behring (Marburg)

DPBS *ohne CaCl und MgCl₂* (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) von life technologies (Darmstadt), Lagerung bei Raumtemperatur

„Biocoll Separating Solution“ von Biochrom AG (Berlin) bzw. „Lymphocyte Separation Medium“ von GE Healthcare/PAA (Pasching, Österreich), Lagerung bei Raumtemperatur

Trypanblau von Sigma (Taufkirchen)

³H-Thymidin von ICN Biomedicals GmbH (Eschwege)

IMDM *mit L-Glutamin* von Lonza (Wuppertal)

Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) von Lonza (Wuppertal)

X-VIVO20 von Lonza (Wuppertal)

1x PBS-Puffer:

137mM NaCl-Lösung (0,9%)

2,7mM KCl

8,1mM Na₂HPO₄

1,5mM KH₂PO₄ in Aqua dest., pH 7,0 – 7,2

MACS/FACS-Puffer:

1x PBS-Puffer

0,5% HSA

3mM EDTA

Antikörper-Verdünnungslösung: 1x PBS-Puffer + 0,5% HSA

Trypanblau-Lösung: 1x PBS-Puffer + 0,4% Trypanblau

3.1.2 Zytokine

Tabelle 1: Humane Zytokine.

Humane Zytokine	Quelle	Bezugsquelle
IL-1 β	E. coli	Miltenyi Biotec #130-093-898
IL-2	E. coli	Chiron
IL-4	E. coli	ImmunoTools #11340047
IL-6	E. coli	Strathmann Biotec #hIL6-25pg
IL-10		Cell Genix #1414-050
TNF α	Hefe	Miltenyi Biotec #130-094-024
GM-CSF		BERLEX
Prostaglandin E2		Cayman Chemical #363-24-6

3.1.3 Antikörper

Tabelle 2: Primäre Antikörper.

Spezifität	Klon	IgG-Klasse	Gebrauchslösung	Stamm-lösung	Bezugsquelle
Human CCR7	150503	Maus IgG2a	20 μ g/ml	500 μ g/ml	R&D Systems #MAB197
Human CD3	OKT-3	Maus IgG2a	0,5-1 μ g/ml	3,32 bzw. 1,6 mg/ml	selbstaufgereinigtes Hybridomplasma
Human CD14	RMO52	Maus IgG2a, κ	5 μ g/ml	250 μ g/ml	Immunotech #IM0643
Human CD19	J4.119	Maus IgG1	5 μ g/ml	250 μ g/ml	Immunotech #IM1313
Human CD28	CD28.2	Maus IgG1, κ	1 μ g/ml	1mg/ml	BD Biosciences #554725
Human CD80	MAB104	Maus IgG1	5 μ g/ml	250 μ g/ml	Immunotech #IM1449
Human CD83	HB15a	Maus IgG2b, κ	5 μ g/ml	250 μ g/ml	Immunotech #IM2069
Human CD86	BU63	Maus IgG1	5 μ g/ml	250 μ g/ml	AbD Serotec #MCA1118
Human HLA-DR	YD1/63.4.10	Ratte IgG2a	34ng/ml	340ng/ml	AbD Serotec #MCA72S

Tabelle 3: Sekundäre Antikörper.

Spezifität	Konjugat	Verdünnung	Stamm- lösung	Bezugsquelle
Esel anti-Maus IgG	PE	1:100	0,5mg/ml	Dianova #715-116-151
Ziege Anti-Ratte IgG	FITC	1:80	500µg/ml	BioLegend #405404

Tabelle 4: Direktkonjugierte Antikörper.

Spezifität Human	Konjugat	Klon	Ak- Klasse	Gebrauchsverdünnung / Konzentration	Bezugsquelle
CCR7	APC	150503	Maus IgG2a	1:2 / 5µg/ml	R&D Systems #FAB197A
CCR7	PE	150503	Maus IgG2a	1:2 / 25µg/ml	R&D Systems #FAB197P
CD3	PE	UCHT1	Maus IgG1,k	1:50	BD Biosciences #555333
CD4	APC	RPA-T4	Maus IgG1,k	1:20	BD Biosciences #555349
CD4	FITC	13B8.2	Maus IgG1	1:30	Beckman Coulter #A07750
CD4	PE-Cy7	SK3	Maus IgG1	1:5	BD Biosciences #557852
CD8	FITC	B9.11	Maus IgG1	1:30	Beckman Coulter #A07756
CD14	PE	M5E2	Maus IgG2a	1:2	BD Biosciences #555398
CD16	PE	3G8	Maus IgG1	1:130	BD Biosciences #555406
CD25	PE	4E3	Maus IgG2b	1:5	Miltenyi Biotec #130-091-024
CD25	V450	M-A251	Maus IgG1	1:20	BD Biosciences #560355
CD40	PE	5C3	Maus IgG1	1:2	eBioscience #12-0409-42
CD45RA	FITC	HI100	Maus IgG2b,k	1:20	BD Biosciences #555488
CD45RA	PE	HI100	Maus IgG2b,k	1:20	BD Biosciences #555489
CD45RO	PE	UCHL1	Maus IgG2a,k	1:20	BD Biosciences #555493
CD49b	FITC	AK-7	Maus IgG1	1:5	BioLegend #314306
CD62L	FITC	LT-TD180	Maus IgG1	1:4	ImmunoTools #21279623
CD80	PE	MAB104	Maus IgG1	1:2	Beckman Coulter #PN IM1976U
CD83	PE	HB15e	Maus IgG1	1:2	eBioscience #12-0839-73

CD86	PE	IT2.2	Maus IgG2b	1:10	eBioscience #12-0869-73
CD122	APC	TU27	Maus IgG1, κ	1:4	BioLegend #339008
CTLA-4	PE	BNI3	Maus IgG2a	1:4	BD Biosciences #560939
CXCR4	PE	12G5	Maus IgG2a	1:2	eBioscience #12-9999-42
Foxp3	PE	PCH101	Ratte IgG2a	1:2	eBioscience #12-4776 -42
HLA-DR	FITC	L243	Maus IgG2a	1:10	BD Biosciences #347400
HLA-DR	PE	MEM-12	Maus IgG1, κ	1:5	ImmunoTools #21278994
ICOS	PE	ISA-3	Maus IgG1	1:2	eBioscience #12-9948-71
ICOS-L	PE	MIH12	Maus IgG1	1:4	eBioscience #12-5889-71
IL-2	PE-Cy7	MQ1-17H12	Ratte IgG2a	1:2	BD Pharmingen #560707
ILT2	PE	GHI/75	Maus IgG2b	1:2	BioLegend #333708
ILT3	PE	ZM4.1	Maus IgG1	1:4	eBioscience #12-5139-73
ILT4	PE	42D1	Ratte IgG2a	1:2	eBioscience #12-5149-73
LAG-3	PE		Ziege IgG	1:10	R&D Systems #FAB2319P
OX40L	PE	Ik-1	Maus IgG1	1:8 / 25 μ g/ml	BD Biosciences #558164
PD-1	PE	eBioJ105	Maus IgG1	1:2	eBioscience #12-2799-71
PD-L1	PE	MIH18	Maus IgG1	1:4	eBioscience #12-5983-71
PD-L2	PE	MIH18	Maus IgG1	1:2	eBioscience #12-5888-41

Tabelle 5: Direkt-konjugierte Isotyp-Kontrollen.

Antikörper	Konjugat	Klon	Stammlösung/ Konzentration	Bezugsquelle
Maus IgG1	APC	MOPC-21	100 Tests	BD Biosciences #555751
Maus IgG1	FITC	679.1Mc7	100 Tests	Beckman Coulter #A07795
Maus IgG1	PE	679.1Mc7	100 Tests	Beckman Coulter #A07796
Maus IgG1	PE	MOPC-21	200µg/ml	BD Biosciences #554680
Maus IgG ₁	V450	MOPC-21	200µg/ml	BD Biosciences #560373
Maus IgG2a	PE	G155-178	200µg/ml	BD Pharmingen #554648
Maus IgG2b	PE	IS6-11E5.11	100 Test	Miltenyi Biotec #130-092-215
Ratte IgG2a	APC	R35-95	200µg/ml	BD Biosciences #553932
Ratte IgG2a	PE	R35-95	100 Tests	BD Biosciences #555844
Ratte IgG2a	PE-Cy7	R35-95	100 Tests	BD Pharmingen #557855

3.1.4 MicroBeads + Separationssäulen

humane MicroBeads von Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach) CD4 (#130-045-101)
 CD14 (#130-050-201)
 CD25 (#130-090-445)
 CD25II (#130-092-983)
 CD45RO (#130-046-001)

Depletionssäule/LD-Säule (#130-042-901), Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)

Anreicherungssäule/LS-Säule (#130-042-401), Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)

3.1.5 Verwendete Kits

BD Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit (#554714, + GolgiStop #554715) von BD Bioscience (Heidelberg)

Celltrace Violet Cell Proliferation Kit (#C34557) von life technologies (Darmstadt)

Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit (#V12883) von Invitrogen (Darmstadt)

Cell Proliferation Dye eFluor670 (#65-0840-85) von eBioscience (Frankfurt)

DuoSetR ELISA human IL-17 (#DY317) von R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt)

ELISA Set human IFN-γ (#31333539), human IL-13 (#31330139), human IL-10 (#21339108), human IL-6 (#31670069), human TNFα (#31333019) von ImmunoTools (Friesothye)

BD OptEIA™ Set human IL-5 (#2633KI), human IL-2 (#2627KI), human sIL-2Rα (#559104), human IL12p40 (#555171) von BD Biosciences (Heidelberg)

Human IL-9 ELISA Ready-Set-Go (#88-7958-88) von eBioscience (Frankfurt)
PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (#559763) von BD Biosciences (Heidelberg)
Fixable Viability Dye eFluor780 (#65-0865) von eBioscience (Frankfurt)
RNeasy Mini Kit (250) (#74106) von Qiagen (Hilden)
QuantiTect Reverse Transcription Kit (#205313) von Qiagen (Hilden)
QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit (#204154) von Qiagen (Hilden)

3.1.6 Primer (RT-PCR)

QuantiTect Primer Assays von Qiagen (Hilden)

EF-1 α	(#QT01669934)
T-bet	(#QT00042217)
GATA-3	(#QT00095501)
IFN γ	(#QT00000525)
IL-5	(#QT00001435)
NFATc1	(#QT00094157)
NFATc2	(#QT00053599)
Foxp3	(#QT00048286)
IL-2	(#QT00015435)

3.1.7 Geräte

Brutschrank: Hera-Cell 240i von Thermo Scientific (Bonn)
Cellsorter: FACSAria I von BD (Heidelberg)
FACS-Geräte: FACS-Calibur *mit Cellquest Pro Software Version 3.3* und LSRII *mit Diva 6.0* von BD (Heidelberg)
Mikroskope: Eclipse TS100 Nikon SM Lux von Leitz (Wetzlar)
NanoDrop 2000 Spectrophotometer von PEQLAB Biotechnologie (Erlangen)
RT-PCR: Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System von life technologies (Darmstadt)
Rührer: MR2002 von Heidolph GmbH (Schwabach)
Sterilbank: Herasafe von Thermo Scientific (Bonn)
Vortexer: VV3 von VWR (Darmstadt)
Waage: Scout pro von Ohaus (Nänikon, Schweiz)
Wasserbad: TW 12 von Julabo (Seelbach); Thermomix BU 5 von Braun AG (Melsungen)
Zentrifugen: Heraeus Fresco 17 und Multifuge 3 L-R von Thermo Scientific (Bonn), Rotina 46 R von Hettich (Tuttlingen)
 β -Counter: 1205 Betaplate Liquid Scintillation Beta Counter von LKB Wallac (Turku, Finnland)
Schwenker/Schüttler: Heidolph Polymax 2040 von Labotec (Wiesbaden)

3.2 Methoden

3.2.1 Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie (FACS, engl. Fluorescence Activated Cell Sorting) können verschiedene Zellpopulationen anhand diverser exprimierter Oberflächenmoleküleunterschieden und identifiziert werden. Diese werden mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern, wie z.B. Fluoresceinisothiocyanate (FITC) oder R-Phycoerythrin (PE), spezifisch markiert und mit Hilfe der Immunfluoreszenz untersucht. Die markierten Zellen werden durch eine Kapillare in einem Flüssigkeitsstrom nacheinander an einem Argonionen-Laser vorbeigeleitet. Das Gerät erfasst dabei die Lichtstreuung und Fluoreszenzintensität der Zellen. Nach vorne abgelenkte Strahlen oder auch Vorwärtsstreulicht (FSC, engl. Forward Scattered Light) sind ein Maß für die Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht (SSC, engl. Side Scattered Light) wird von den Zellen in einem Winkel von 90° abgestrahlt. Diese Messung liefert Kenntnisse über die Granularität der Zellen. Die Fluorochrome FITC und PE absorbieren das vom Argonionen-Laser emittierte Licht von 488nm, emittieren es dann aber bei unterschiedlichen Wellenlängen. Die Emissionsmaxima von FITC liegen bei 530nm (Grünfluoreszenz), die Emissionsmaxima von PE liegen bei 570nm (Rotfluoreszenz). Die Anzahl der detektierten Fluoreszenzsignale ist proportional zur Anzahl der Fluorochrom-Moleküle auf der Zelloberfläche. Ein elektronisches System erhält die Lichtimpulse von der optischen Einheit und übermittelt sie zur Datenauswertung an den Computer. Die Signale können z.B. durch die Software CELLQuest 3.3 oder Diva 6.0 (beide Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) ausgewertet werden. Die Durchflusszytometrie gibt somit letztendlich Informationen über die Expression der Oberflächenmoleküle sowie Größe und Granularität der Zellen.

3.2.1.1 Durchflusszytometrische Analysen – Standards

Die Zellen wurden zu $1 \cdot 10^5$ Zellen/Well in einer 96-Well-Rundboden-Platte verteilt. Anschließend wurde die Platte zentrifugiert (350xg, 3min, 4°C), der Überstand verworfen. Danach erfolgte die Färbung der Zellen, indem die Zellpellets jeweils mit 20µl der Gebrauchslösung des Primäantikörpers resuspendiert wurden. Bei einer Doppelfärbung (z.B. mit HLA-DR) wurde der zweite Antikörper gleichzeitig appliziert und zusammen für 20min bei 4°C inkubiert. Die Platte wurde abgedunkelt, um schädliche Lichteinflüsse auf den Fluoreszenzfarbstoff zu vermeiden. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen 2x mit 150µl FACS-Puffer pro Well gewaschen (350xg, 3min, 4°C). Bei nicht direkt-markierten Antikörpern wurde der FITC- und/oder PE-konjugierte Sekundäantikörper (20µl/Well) hinzugegeben und bei 4°C für weitere 15min unter Lichtausschluss inkubiert. Abschließend wurden die Zellen erneut 1-2x mit 150µl FACS-Puffer/Well gewaschen, um die überschüssigen Antikörper zu entfernen. Im letzten Schritt wurden die Zellpellets in 150µl FACS-Puffer aufgenommen und in FACS-Röhrchen für die Messung überführt.

Als Nachweis für die Reinheit bzw. den Reifegrad wurde die Expression standardisierter Oberflächenmoleküle auf den DC-Populationen und den T-Zellen vor und nach Aufreinigung untersucht.

Im Falle der DC-Kulturen wurde zu Kontrollzwecken jede DC-Population mit Antikörpern gegen CD2, CD14, CD19, CD80, CD83, CD86, CCR7 versus HLA-DR markiert. CD2, CD19 und CD14 wurden verwendet, um Verunreinigungen mit T-Zellen (CD2), Monozyten/Makrophagen (CD14) und B-Zellen (CD19) zu bestimmen. Hinweise auf die Reife der Zellen ergaben sich aus der Expression von CD80, CD83, CD86, CCR7 sowie HLA-DR (MHC-Klasse-II).

Zur Kontrolle der Reinheit der isolierten IL-10DC-Subpopulationen wurden diese mit den direkt-konjugierten Antikörpern gegen CD80, CD83, CD86, CCR7 und HLA-DR markiert.

Zur Überprüfung der Reinheit der naiven T-Zellen wurde von den PBMC und den naiven T-Zellen nach der MACS-Aufreinigung ebenfalls eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. Hierzu erfolgte die Inkubation der jeweiligen Zellpopulation mit den direkt-konjugierten Antikörpern gegen CD4, CD8, CD45RO, CD45RA, CD25, CCR7 sowie CD62L.

3.2.1.2 DC-Marker-Durchflusszytometrie

Neben den oben beschriebenen standardisierten Oberflächenmolekülen wurden die DC-Populationen an Tag 7 zur detaillierten Untersuchung des Expressionsmusters zudem mit direkt-konjugierten Antikörpern gegen ICOS-L, PD-L1 und PD-L2, B7-H3, ILT2/3/4, sowie CD40, OX40L und CXCR4 versus HLA-DR markiert und durchflusszytometrisch analysiert (siehe Abschnitt 3.2.1.1).

3.2.1.3 T-Zell-Marker-Durchflusszytometrie

Für die durchflusszytometrischen Untersuchungen des Expressionsmusters auf den induzierten T-Zell-Populationen wurde die jeweilige T-Zell-Population an Tag 5 der Primärstimulation sowie 48h nach polyklonaler Restimulation nach der oben beschriebenen Methode gegen CD28, ICOS, PD-1, CTLA-4, CD62L, CCR7 sowie CD49b und LAG-3 versus CD4/CD25 markiert und analysiert (siehe Abschnitt 3.2.1.1). Der intrazelluläre Marker Foxp3 wurde analog gefärbt (siehe Abschnitt 3.2.1.4).

3.2.1.4 Durchflusszytometrische Analyse intrazellulärer Moleküle

Zur Bestimmung des Transkriptionsfaktors Foxp3 wurden $2 \cdot 10^5$ Zellen pro Well zunächst wie oben beschrieben gegen die Oberflächenmoleküle CD4 und CD25 markiert und anschließend in 150µl FACS-Puffer pro Well gewaschen. Danach wurden die Zellpellets in 200µl der frisch angesetzten Fixations-/Permeabilisierungsgebrauchslösung resuspendiert und 30min bei 4°C abgedunkelt inkubiert. Dies ermöglicht den Zugang der Antikörper zum Zellinneren. Nach der Zentrifugation (400xg, 5min, 4°C) wurden die Zellen mit 200µl Permeabilisierungspuffer (PP) pro Well gewaschen (350xg, 3min, 4°C). Nun erfolgte die 30-minütige Färbung mit anti-human Foxp3-mAb bzw. der Isotyp-Kontrolle bei 4°C im Dunkeln.

Die Antikörper wurden hierfür in PP adäquat verdünnt. Nach 1-2 Waschschritten in 200µl PP pro Well wurden die Zellen in 150µl FACS-Puffer resuspendiert, um die Zellmembran wieder zu verschließen, und in FACS-Röhrchen für die Messung überführt.

3.2.1.5 Proliferationsfarbstoffe

Mit den verwendeten Proliferationsfarbstoffen sowie den markierten Zellsuspensionen wurde unter Lichtausschluss gearbeitet, da die Fluorochrome lichtempfindlich sind. Zudem wurden die Zellsuspensionen stets in vorgewärmten PBS (37°C) resuspendiert und markiert, da dies die Aufnahme der Farbstoffe verbessert. Die verwendeten Proliferationsfarbstoffe diffundieren durch die Zellmembran. Durch intrazelluläre Esterasen werden die Farbstoffe aktiviert und binden an freie Amine zytoplasmatischer Proteine, so dass diese nicht mehr membrangängig sind. Bei Zellteilung halbiert sich die Fluoreszenzintensität, dass durch eine durchflusszytometrische Messung detektiert werden kann.

3.2.1.5.1 CFDA-SE

Von einer 10mM CFDA-SE(Carboxyfluoreszein Diacetat Succinimidyl Ester)-Stammlösung wurde zunächst eine 1:100 Verdünnung mit 37°C warmem PBS hergestellt. $1-2 \cdot 10^7$ Zellen wurden in 1ml PBS resuspendiert. Pro 1ml PBS wurden 10µl der CFDA-SE-Verdünnung hinzugegeben, womit man eine CFDA-SE-Endkonzentration von 1µM erhält. Die mit 1µM CFDA-SE versehene Zellsuspension wurde für 20min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zum Abstoppen der Färbung wurde die Zellsuspension mit X-VIVO 20 + 2% HSA aufgefüllt (1:10) und zentrifugiert (350xg, 10min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, nach wiederholtem Vorgang mit X-VIVO 20 wurden die Zellen anschließend gezählt.

3.2.1.5.2 Celltrace Violet

Von dem Farbstoff Celltrace Violet wurde eine 5mM Stocklösung hergestellt, indem der Inhalt eines Röhrchens lyophilisierten Celltrace Violet in 20µl DMSO aufgenommen wurde. Bei einer optimalen Zellkonzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen pro ml PBS wurde die Zellsuspension mit einer Celltrace Violet-Endkonzentration von 0,5µM gefärbt, d.h. pro 10ml Zellsuspension wurde 1µl der Celltrace Violet Stöcklösung hinzupipettiert und für 20min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Färbung wurde abgestoppt, indem die Zellsuspension mit X-VIVO 20 mit 10% FCS aufgefüllt (1:5) und zentrifugiert wurde (350xg, 10min, 4°C,). Nach wiederholtem Vorgang mit X-VIVO 20 wurde die Zellsuspension gezählt.

3.2.1.5.3 CPD eFluor670

Zunächst wurde eine 5mM Stammlösung hergestellt, indem der Inhalt eines Röhrchens lyophilisierten CPD eFluor670 in 126µl DMSO resuspendiert wurde. Für die 2µM Gebrauchslösung wurde die Stammlösung 1:2500 in warmen PBS verdünnt. Bei einer optimalen Zellkonzentration von $2 \cdot 10^7$ Zellen pro ml PBS wurde die Zellsuspension dann mit einer Endkonzentration von 1µM gefärbt, d.h. pro ml Zellsuspension wurde 1ml der CPD

eFluor670 Gebrauchslösung hinzupipettiert und für 10-15min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Auffüllen der Zellsuspension mit kaltem X-VIVO 20 + 10% Serum (1:5) und einer Inkubation von 5min auf Eis abgestoppt. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (350xg, 10min, 4°C), wonach der Überstand verworfen wurde. Nach wiederholtem Vorgang mit X-VIVO 20 wurde die Zellsuspension gezählt.

3.2.2 Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden grundsätzlich unter sterilen und möglichst konstanten Bedingungen durchgeführt. Die Tätigkeiten mit potentiell infektiösen Materialien wie Buffy-Coats, Seren oder Zellkulturen erfolgten unter einer Sterilbank. Für das sterile Arbeiten wurden alle Glaswaren vor Gebrauch sterilisiert (4h; 180 °C), alle Lösungen autoklaviert (121 °C; 1,2 bar; 21min) oder steril filtriert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in sterilen Platten, im Brutschrank bei 37 °C, 5%iger CO₂-Begasung und mit Wasserdampf gesättigter Atmosphäre.

3.2.3 Zellzahl- und Viabilitätsbestimmung

3.2.3.1 Trypanblau-Färbung

Die Zahl und Viabilität der Zellen wurde mit Hilfe einer Trypanblau-Färbung ermittelt. Der saure Trypanblau-Farbstoff kann durch die Membran von toten Zellen ins Zellinnere aufgenommen werden. So erscheinen tote Zellen im Mikroskop blau bis violett, lebende Zellen bleiben farblos. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Gesamtzellzahl} = X * Y * Z * 10^4$$

X = Lebendzellzahl in einem Quadranten

Y = Verdünnung

Z = Volumen der Zellsuspension

3.2.3.2 7-AAD/Annexin-V-Färbung

Neben der Standardmethode der Trypanblau-Färbung zur Bestimmung der Viabilität wurde an Tag 5 der Primärkultur, an Tag 3 der Ruhe sowie analog zur Restimulation (Proliferationsassay) eine Apoptose-Messung (7-AAD/Annexin V) mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. 7-AAD färbt tote Zellen, während Annexin V ein Marker für sterbende, d.h. apoptotische Zellen darstellt. Hierfür wurden 1*10⁵ Zellen/Well mit FACS-Puffer gewaschen (350xg, 3min, 4°C). Anschließend wurden die Zellpellets mit 25µl/Well der in Binding-Puffer 1:20 verdünnten Antikörper markiert. Nach einer 15-minütigen abgedunkelten Inkubationszeit bei RT wurden die Proben in 150µl Binding-Puffer aufgenommen und die durchflusszytometrische Analyse erfolgte innerhalb 1h. Als Kontrollen dienten ungefärbte Zellen der jeweiligen Population.

3.2.4 Generierung humaner dendritischer Zellen aus Leukapheresen

Die dendritischen Zellen (DC) wurden durch "Adhäsions-Selektion" aus CD14⁺ Vorläuferzellen generiert. Hierfür wurden jeweils 8-10 Cryoröhrchen des jeweiligen gesunden Leukapherese-Spenders aus den Stickstofftanks entnommen und bei 37°C im Wasserbad vorsichtig angetaut. Anschließend wurde jedes Cryoröhrchen zügig in jeweils ein Zentrifugenröhrchen entleert, in denen zuvor kaltes FCS vorgelegt wurde, mit kaltem RPMI aufgefüllt und bei 350xg für 10min bei 4°C zentrifugiert. Die Materialien (Medien, Plastik) wurden dabei stets auf Eis gehalten. Die Zentrifugationsschritte wurden mit RPMI insgesamt 3x wiederholt, wobei der Überstand jeweils verworfen wurde. Die Zellen wurden gezählt und in der entsprechenden Menge RPMI aufgenommen, wobei 1,2-1,5*10⁷ Zellen/Well in 6-Well-Platten verteilt wurden und bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank für 30-45min inkubierten. Nach dieser Adhärenzphase wurden die Platten zur Entfernung von T- und B-Zellen sowie andere nicht adhärenter Zellen mit warmem PBS gewaschen. Über Nacht wurden die Zellen in IMDM + 5% autologem Serum kultiviert.

Am nächsten Morgen (Tag 1) wurde das Medium abgenommen und durch neues Kulturmedium (IMDM + 5% autologes Serum, 150IE/ml IL-4 und 400U/ml GM-CSF) ersetzt.

Am Tag 2 der DC-Kultur wurde 1ml Medium aus jedem Well entnommen und durch neues Kulturmedium ersetzt (IMDM+ 5% autologes Serum + 150IE/ml IL-4 + 800U/ml GM-CSF).

Die unreifen DC wurden an Tag 5 der DC-Kultur durch Kühlung (10-15min auf Eis) von den Platten gelöst, in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt und zentrifugiert (350xg, 4°C, 10min). Die Zellen wurden gezählt und in Medium (IMDM + 5% autologes Serum + 150IE/ml IL-4 + 800U/ml GM-CSF) auf 1*10⁶ Lebendzellen/Well eingestellt. Der Zytokincocktail (5ng/ml TNF α , 5ng/ml IL-1 β , 50IU/ml IL-6, 1 μ g/ml PGE₂) wurde für die DC-Maturierung hinzugegeben. Für die Generierung tolerogener DC wurde zusätzlich zum Reifungscocktail 20ng/ml IL-10 in die Wells gegeben.

Nach zwei Tagen der DC-Maturierung wurden die DC erneut durch Kühlung (10-15min auf Eis) von den Platten gelöst, anschließend in ihrem Medium von der Platte gespült, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert. Ein Teil des Überstands wurde bei -80°C wegefroren, der Rest verworfen. Die Zellen wurden anschließend in PBS gewaschen, gezählt und auf die gewünschte Lebendzellzahl in dem benötigten Medium eingestellt. Für alle Waschschrte wurde stets kaltes PBS verwendet und erfolgten bei 350xg, 4°C für die Dauer von 10min. Die Reinheit und der Reifegrad der DC-Populationen wurden mittels Durchflusszytometrie überprüft (siehe Abschnitt 3.2.1.1).

3.2.5 Anreicherungen

3.2.5.1 Anreicherung der IL-10DC Subpopulationen über Cellsort

Die IL-10DC wurden an Tag 7 der DC-Kultur geerntet, 2x mit PBS gewaschen (350xg, 10min, 4°C) und gezählt. Anschließend wurden die Zellen mit 100-150µl anti-human CCR7-mAb 15min auf Eis inkubiert. Zwischenzeitlich wurde die Suspension gut resuspendiert. Die gefärbten IL-10DC wurden gegebenenfalls über ein 70µm Zellsieb gegeben und nach nochmaligem Waschen und Zählen auf $5 \cdot 10^6$ pro ml MACS-Puffer + 5% DC-Serum eingestellt. Diese Zellsuspension wurde dann in der Flow Cytometry Core Facility der Universitätsmedizin Mainz anhand der CCR7-Expression nach CCR7^{high} und CCR7^{negativen} IL-10DC durchflusszytometrisch getrennt (Cellsort). Die Reinheit der aufgereinigten Zellpopulationen wurde anschließend mittels Durchflusszytometrie kontrolliert (siehe Abschnitt 3.2.1.1).

3.2.5.2 Anreicherung der naiven T-Zellen über MACS

Für die Aufreinigung der naiven T-Zellen aus dem peripheren Blut gesunder Spender wurden zunächst die PBMC (engl. Peripheral Blood Mononuclear Cells) aus einem Buffy-Coat aufgearbeitet. Der 80ml Buffy-Coat wurde zunächst in ein steriles Becherglas überführt und mit endotoxinfreiem PBS (DPBS, Fa. GIBCO) auf ca. 120ml aufgefüllt. Diese wurden vorsichtig auf ein Ficoll-Gradientenkissen pipettiert und zentrifugiert (350xg, 30min, RT, ohne Bremse). Diese Gradientenschicht ermöglicht die Auftrennung der Zellen, wobei durch die Zentrifugation mehrere Phasen entstehen. Die oberste Phase wird von dem Plasma gebildet. Darunter liegt die weiße, ringförmige Interphase, die aus den Lymphozyten und weiteren mononukleären Zellen besteht. Darunter befindet sich eine Ficoll-Schicht. Die letzte und unterste Phase wird von Granulozyten und Erythrozyten gebildet.

Die Interphase wurde gewonnen und 3x mit kaltem PBS durch Zentrifugieren gewaschen (350xg, 10min, 4°C). Anschließend wurden die PBMC gezählt. Das Plasma wurde ebenfalls abgenommen, hitzeinaktiviert (56°C, 30min) und nach zwei Zentrifugationsschritten (4000rpm, 5min, 4°C) im Kühlschrank aufbewahrt.

Zunächst erfolgte die Depletion von CD14⁺, CD45RO⁺ und CD25⁺ Zellen. Aktivierte T-Zellen und natürlich vorkommende Treg (nTreg) wurden durch die Depletion mit CD45RO- bzw. CD25-MicroBeads entfernt. Durch die CD14-Depletion wurden Monozyten aus den PBMC isoliert. Das Zellpellet wurde mit 16µl MACS-Puffer, 5µl anti-human CD14-MicroBeads, 6µl anti-human CD45RO-MicroBeads und 4µl anti-human CD25-MicroBeads pro $1 \cdot 10^7$ PBMC inkubiert (15min, 4°C, Schwenker). Anschließend erfolgte ein Waschschritt mit MACS-Puffer (300xg, 10min, 4°C). Das resuspendierte Zellpellet wurde auf zwei Depletions-/LD-Säulen aufgeteilt. Jede Säule wurde dreimal mit MACS-Puffer gespült, wobei der Durchlauf gesammelt wurde. Die so gewonnen CD14/CD45RO/CD25-depletierten PBMC wurden gezählt und einer CD4-Anreicherung unterzogen. Pro $1 \cdot 10^7$ Zellen wurden 16µl MACS-Puffer

und 4µl anti-human CD4-MicroBeads hinzugegeben und 15min bei 4°C auf dem Schwenker inkubiert. Anschließend wurde mit MACS-Puffer aufgefüllt und zentrifugiert (300xg, 10min, 4°C). Das resuspendierte Zellpellet wurde dann auf die LS-Säule zur CD4-Anreicherung gegeben. Die Säule wurde dreimal mit MACS-Puffer gespült, wobei der Durchlauf hier verworfen wurde. Das Eluat, welches zügig durch 3-maliges Eluieren mit je 5ml MACS-Puffer gewonnen wurde, enthält die naiven CD4⁺CD45RA⁺CD25^{low} T-Zellen. Diese wurden gezählt und für den Versuchsansatz (Primärkultur, siehe Abschnitt 3.2.6) eingesetzt. Die Aufreinigung wurde mithilfe der durchflusszytometrischen Analyse überprüft (siehe Abschnitt 3.2.1.1).

3.2.5.3 Anreicherung der CD4⁺CD25^{low} T-Zellen über MACS

Am Tag der Restimulation (Tag 0) wurde neben dem standardisierten Proliferationsassay (siehe Abschnitt 3.2.7.1) auch ein Suppressorassay (siehe Abschnitt 3.2.7.2) angesetzt. Als Responder-T-Zellen dienten frisch isolierte CD4⁺CD25^{low} T-Zellen. Hierzu wurden zunächst PBMC aus einem Buffy Coat aufgearbeitet und gezählt (siehe Abschnitt 3.2.5.2). Anschließend erfolgte die Anreicherung der CD25⁺ T-Zellen. Das Zellpellet wurde in 10µl MACS-Puffer und 1µl anti-human CD25-MicroBeads resuspendiert. Daraufhin wurde die Suspension 20min bei 4°C auf einem Schwenker inkubiert. Die Zellsuspension wurde in MACS-Puffer gewaschen (300xg, 10min, 4°C) und dann auf die vorbereiteten LS-Säulen gegeben. Der Durchlauf nach dem 1. Waschen der Säule mit MACS-Puffer (CD25-depletierte Population) wurde aufgefangen, pelletiert und nochmals über eine LD-Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule mit MACS-Puffer 2x gewaschen, wobei der Durchfluss aufgefangen und gezählt wurde. Das Zellpellet wurde dann in 10µl MACS-Puffer und 3µl anti-human CD4-MicroBeads pro 1*10⁷ Zellen resuspendiert und 20min bei 4°C auf dem Schwenker inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde mit MACS-Puffer aufgefüllt und gewaschen (300xg, 10min, 4°C). Die Zellsuspension wurde anschließend auf die vorbereitete LS-Säule gegeben. Nach dreimaligem Spülen mit MACS-Puffer wurde das Eluat gewonnen und anschließend die Zellzahl bestimmt.

3.2.6 Primärkultur

Für den Ansatz der Primärkultur (Tag 0, Primärstimulation) wurde die jeweilige DC-Population mit den naiven T-Zellen im Verhältnis 1:10 bzw. 1:20 kultiviert. Hierfür wurden in einem 6-Well 2*10⁶ T-Zellen mit 2*10⁵ bzw. 1*10⁵ DC in dem Kulturmedium (X-VIVO 20 + 1% autologes DC-Serum + 2U/ml IL-2) kultiviert. Nach 2 Tagen wurde jede Population der Kokultur mit 1U/ml IL-2 gefüttert. Am Tag 5 der Primärkultur wurden die T-Zell-Populationen in Ruhe gebracht. Die Kulturen wurden gewonnen, zentrifugiert (350xg, 10min, 4°C), wobei ein Teil der Überstände bei -80°C weggefroren wurde, und anschließend mit PBS gewaschen sowie gezählt. Die Zellsuspensionen wurden dann mit einer Konzentration von 1*10⁶/ml in frischem Kulturmedium ausplattiert. Nach dieser 3-4tägigen Ruhephase wurden

die T-Zell-Populationen für die Restimulationsversuche (Tag 0, siehe Abschnitt 3.2.7) gewonnen.

3.2.6.1 ^3H -Thymidin-Inkorporation

Für den Proliferationsassay der Primärkultur wurden naive T-Zellen zusammen mit der jeweiligen DC-Population als Triplets in einer 96-Well-Platte in den DC:TC-Verhältnissen 1:10, 1:20, 1:40 und 1:80 kultiviert. Pro Well wurden stets $2,5 \cdot 10^4$ T-Zellen ausplattiert, die Zellzahl der jeweiligen DC-Population dementsprechend angepasst, wobei das Kulturmedium bestehend aus X-VIVO 20 + 1% autologes DC-Serum + 2U/ml IL-2 verwendet wurde. Nach 72h wurde der Proliferationsansatz mit $1\mu\text{Ci } ^3\text{H}$ -Thymidin ($^3\text{[H]TdR}$) gepulst. Nach weiteren 16-18h im Brutschrank wurde die Platte im β -Counter (Messung der T-Zell-Proliferation anhand der $^3\text{[H]TdR}$ -Inkorporation) gemessen.

3.2.7 Restimulationen

Im Allgemeinen wurde für die Restimulationsversuche stets das Kulturmedium X-VIVO 20 ohne Zusätze verwendet.

Für die Zytokinmessungen wurde am Vortag der Restimulation die entsprechende Well-Anzahl einer 96-well-Platte mit $1\mu\text{g/ml}$ anti-CD3-mAb und $2\mu\text{g/ml}$ anti-CD28-mAb bei 4°C beschichtet. Am nächsten Tag wurden diese 1x mit PBS gespült. Mit einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml wurden die T-Zellen der jeweiligen Population im Kulturmedium ausgebracht. Nach 24h Inkubation im Brutschrank wurden die Überstände nach Zentrifugation gewonnen und bei -80°C für die ELISA-Tests weggefroren.

3.2.7.1 Proliferationsassays – Anergieinduktion

3.2.7.1.1 ^3H -Thymidin-Inkorporation

Für den Proliferationsassay der Restimulation wurden 96-Well-Platten am Vortag mit $1\mu\text{g/ml}$ anti-CD3-mAb + $2\mu\text{g/ml}$ anti-CD28-mAb bei 4°C beschichtet. Die Platten wurden am nächsten Tag (Restimulation Tag 0) 1x mit PBS gewaschen und die T-Zell-Populationen zu $2,5 \cdot 10^4$ Zellen/Well ausplattiert. Nach 72h wurde der Proliferationsansatz mit $1\mu\text{Ci } ^3\text{H}$ -Thymidin ($^3\text{[H]TdR}$) gepulst. Nach weiteren 16-18h im Brutschrank wurden die Platten bis zur Messung im β -Counter (Messung der T-Zell-Proliferation anhand der $^3\text{[H]TdR}$ -Inkorporation) gegebenenfalls eingefroren.

3.2.7.1.2 IL-2-abhängige Proliferation

Die 96-Wells wurden am Vortag mit $1\mu\text{g/ml}$ anti-CD3-mAb bei 4°C beschichtet, am nächsten Tag (Restimulation Tag 0) dann 1x mit PBS gewaschen. Die T-Zell-Populationen wurden zu $0,5 \cdot 10^5$ Zellen/Well ausplattiert, wobei zusätzlich eine IL-2-Titration (2U/ml, 12,5U/ml, 25U/ml, 50U/ml, 100U/ml, 200U/ml) angesetzt wurde. Nach 72h wurde der Proliferationsansatz mit $1\mu\text{Ci } ^3\text{[H]TdR}$ gepulst. Nach weiteren 16-18h im Brutschrank wurden

die Platten bis zur Messung im β -Counter (Messung der T-Zell-Proliferation anhand der $^3\text{[H]TdR}$ -Inkorporation) gegebenenfalls eingefroren.

3.2.7.2 Suppressorassays

3.2.7.2.1 Durchflusszytometrische Analyse mittels Proliferationsfarbstoffe

Die $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{low}}$ Responder-T-Zellen wurden mit dem Proliferationsfarbstoff CPD eFluor670 markiert (siehe Abschnitt 3.2.1.5.3). Die induzierten Treg-Subpopulationen wurden nach der 3-tägigen Ruhephase gewonnen, gezählt und anteilig mit dem Proliferationsfarbstoff Celltrace Violet gefärbt (siehe Abschnitt 3.2.1.5.2). Zur Stimulation der T-Zell-Kulturen wurden mDC (syngen zur Primärstimulation), PBMC + $1\mu\text{g/ml}$ anti-CD3-mAb_{löslich} sowie $0,5\mu\text{g/ml}$ anti-CD3-mAb_{löslich} + $0,25\mu\text{g/ml}$ anti-CD28-mAb_{löslich} bzw. $1\mu\text{g/ml}$ anti-CD3-mAb_{löslich} + $0,5\mu\text{g/ml}$ anti-CD28-mAb_{löslich} eingesetzt. Die mDC wurden hierbei im DC:Responder-T-Zellen-Verhältnis 1:50 und die mit 9000rad bestrahlten PBMC im Verhältnis 3:1 eingesetzt. Sowohl mDC als auch PBMC wurden zudem mit dem Proliferationsfarbstoff CFSE markiert (siehe Abschnitt 3.2.1.5.1). Neben den Kokulturansätzen aus Responder-T-Zellen und der jeweiligen iTreg-Subpopulation im Verhältnis 1:1 wurden auch Einzelzellkulturen mit der jeweiligen Stimulation angesetzt. Pro 96-Well wurden jeweils $1 \cdot 10^5$ T-Zellen ausplattiert. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte an Tag 1 nach Versuchsansatz, die Endmessung an Tag 5.

3.2.8 RT-PCR – Bestimmung des mRNA-Levels

Für die Gewinnung der mRNA wurden die T-Zell-Populationen ($1 \cdot 10^6/\text{ml}$) mit immobilisiertem anti-CD3-mAb ($1\mu\text{g/ml}$) und anti-CD28-mAb ($2\mu\text{g/ml}$) 24h restimuliert. Zu den Zeitpunkten $t=0\text{h}$, 1h, 5h und 24h wurden die Zellpellets gewonnen und gegebenenfalls bei -80°C gelagert. Die Flächen wurden vor der Arbeit gereinigt um eine Kontamination mit fremder RNA zu vermeiden. Daher wurde auch stets mit Handschuhen und RNase-freien Materialien gearbeitet.

mRNA-Aufreinigung

Die mRNA-Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers mittels „RNeasy Kit“ (Fa. Qiagen). Je $1 \cdot 10^7$ Zellen wurden in $600\mu\text{l}$ RLT-Puffer gut resuspendiert und die Zellmembranen zerstört. Zur Suspension wurden weitere $600\mu\text{l}$ 70% Ethanol dazugegeben und resuspendiert. Der feine Niederschlag stellt Proteinausfällungen dar. Nach dem Auftrag der Suspensionen auf die Zentrifugationssäulen wurden diese 1min bei 14000rpm zentrifugiert. Die Eppis wurden entleert, die Säulen 1x mit $700\mu\text{l}$ RW1-Puffer und 2x mit $500\mu\text{l}$ RPE-Puffer gewaschen (14000rpm, 1min). Nach einem letzten Zentrifugationsschritt ohne Puffer (14000rpm, 4min) wurde die RNA mit $30\text{-}50\mu\text{l}$ RNase-freiem Wasser aus der Säule in frische Eppis gespült (14000rpm, 1min) und entweder direkt weiter verarbeitet (siehe unten) oder bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung weggefroren. Die Konzentration der mRNA in der Suspension wurde durch eine Messung mit NanoDrop 2000 bestimmt.

Reverse Transkription der gewonnenen mRNA

Die mRNA wurde mittels dem "QuantiTect Reverse Transcription Kit" (Fa. Qiagen) transkribiert. Die Reverse Transkription erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

Jeweils 0,5-1µg mRNA pro Probe wurden mit gDNA-Wipeout-Puffer (7-fach) und gegebenenfalls RNase-freiem Wasser versetzt, wobei das Gesamtvolumen 14µl betrug. Nach einer 2-minütigen Inkubation bei 42°C wurden die Proben umgehend auf Eis gesetzt. Anschließend wurde zu jeder Probe 6µl des bereits angefertigten Reverse Transkriptase-Mastermix (Quantiscript Reverse Transkriptase/RT-Puffer (5-fach)/RT-Primer-Mix) zugegeben, so dass das Gesamtvolumen pro Ansatz bei 20µl lag. Nach einer weiteren Inkubation bei 42°C für 15min und einer direkt angeschlossenen Inkubation bei 95°C für 3min konnte die gewonnene cDNA entweder direkt zur RT-PCR-Analyse genutzt oder bei -20°C gelagert werden.

RT-PCR-Analyse

Die Durchführung der RT-PCR-Analyse der gewonnenen cDNA-Proben erfolgte nach Protokoll des Herstellers mit „QuantiFAST SYBR Green RT-PCR Kit“ (Fa. Quiagen) in 96-Well-Platten, wobei pro Probe eine Doppelbestimmung durchgeführt wurde. Zudem wurde für jede Probe das Referenz-Haushaltsgen EF-1α mitgeführt. Zuvor wurden alle cDNA-Proben 1:2 mit TE-Puffer verdünnt. 1µl der verdünnten cDNA-Probe wurde dann mit RNase-freiem Wasser im Verhältnis 1:10 versetzt (cDNA-Mastermix). 15µl SYBR Green-Mastermix (2x SYBR Green + gewünschter Primer im Verhältnis 1:5) wurde zusammen mit 10µl cDNA-Mastermix möglichst luftblasenfrei pipettiert (25µl Gesamtvolumen pro 96-Well). Nach einer Zentrifugation bei 800rpm für 1min wurden die Ansätze mit dem 7300 Real Time PCR Applied Biosystem gemessen. Für die verwendeten Primer wurde jeweils folgendes

Programm durchgeführt:

Stufe	Zyklus	Temperatur	Zeit
1	1	95°C	5min
2	40	95°C	10sec
		60°C	30sec
3	1	95°C	30sec
4	1	60°C	30sec
5	1	95°C	15sec
		60°C	1min
		95°C	15sec

Mit den von dem Messgerät gemessenen Crossingpoints (Cp) wurde die relative Expression der mRNA nach folgender Formel berechnet: **ETCpT(C)-CpT(S) * ERCpR(S)-CpR(C)**

ET = Effizienz Zielgen
ER = Effizienz Referenz (Haushaltsgen)
S = Sample/Probe
R = Referenz
C = Calibrator
CpT = Zyklenanzahl der Cp für das Zielgen

3.2.9 Zytokinmessung

3.2.9.1 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Die ELISA-Sets können in ihrer Vorgehensweise, in den Konzentrationen der verwendeten Substanzen sowie in den zu verwendenden Volumina abweichen. Daher war es erforderlich, dass die entsprechende ELISA-Anleitung des Herstellers beachtet und befolgt wurde.

Am Vortag wurde die benötigte Anzahl an ELISA-Platten mit dem Antigen-spezifischen Coating-/Capture-Antikörper beschichtet (100µl/Well). Am nächsten Tag wurden die beschichteten Platten gewaschen und anschließend gut ausgeklopft. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurden die Wells mit Blocking-Puffer überschichtet und somit die freien Proteinbindungsstellen abgesättigt (1h, RT). Danach wurden die Wells mit Waschpuffer wieder gewaschen und gut ausgeklopft. Die zuvor angesetzte Standard-Kalibrierungs-Reihe und die (verdünnten) Proben wurden in die Wells pipettiert (50µl/Well), wobei immer Doppelbestimmungen durchgeführt wurden. Nach der Inkubation bei RT wird wiederholt mit dem Waschpuffer gewaschen. Pro Well wurden nun 100µl des Biotin-konjugierten Detektions-Antikörpers, gelöst in Diluent/Dilution-Puffer, hinzugegeben und wiederum für 1h inkubiert. Nachdem die Platten mit Waschpuffer gewaschen wurden, wurde das enzymatische Streptavidin-HRP-Konjugat auf die Wells verteilt (100µl/Well) und 20-30min inkubiert. Abweichend hiervon wurden 100µl Biotin-/Streptavidin-HRP-Reagent (Working Detector) pro Well verteilt. Der so entstandene Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex erinnert an ein „Sandwich“, weshalb dieses Verfahren auch Sandwich-ELISA genannt wird. Es wurde ein letztes Mal mit Waschpuffer gewaschen. Pro Well wurden 100µl des Substrates (TMB, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) pipettiert. Anschließend inkubierte die Platte bei RT im Dunkeln. Die Umsetzung des farblosen Substrates und der damit verbundene Farbumschlag (blau), katalysiert durch das HRP (engl. horseradish peroxidase)-Enzym, wurde mit 2N Schwefelsäure (H₂SO₄) abgestoppt (50-100µl pro Well). Die Absorptions-Messung bei 450nm und damit die fotometrische Bestimmung der Zytokinkonzentration erfolgten innerhalb von 30min.

3.2.9.2 Intrazelluläre durchflusszytometrische Analyse

An Tag 3 der Ruhe wurden die induzierten T-Zell-Populationen gewonnen, 2x gewaschen (350xg, 10min, 4°C) und anschließend mit 2*10⁵ Zellen pro 96-Well ausplattiert. Die Zellen wurden dann über Nacht mit immobilisiertem anti-CD3-mAb (1µg/ml) und löslichem anti-CD28-mAb (2µg/ml) restimuliert. Hierfür wurden die am Vortag mit 1µg/ml anti-CD3-mAb beschichtete 96-Well-Flachboden-Platte (100µl/Well) mit PBS 1x gewaschen. Am nächsten Tag erfolgte zunächst eine weitere Stimulation der T-Zell-Populationen mit 10ng/ml PMA + 1µg/ml Ionomycin + Goldgi-Stop für 5h. Anschließend wurde die Viabilitätsfärbung mit dem Fixable Viability Dye eFluor780 (eBioscience) durchgeführt, um bei der durchflusszytometrischen Analyse die toten Zellen ausgrenzen zu können. Hierfür wurden die

Zellpellets mit 50µl/Well einer in PBS 1:1000 verdünnten Gebrauchslösung 30min bei 4°C abgedunkelt inkubiert. Nach 1-2 Waschschritten erfolgte die Färbung der Oberflächenmoleküle wie oben beschrieben. Nachdem die Zellen wiederholt gewaschen worden waren, wurden die Zellpellets in 100µl Cytofix/Cytoperm-Lösung resuspendiert und 20min bei 4°C inkubiert, um die Zellyse zu induzieren. Nach einem Zentrifugationsschritt (400xg, 3min, 4°C) und einem weiteren Waschschritt mit 150µl 1x PermWash-Puffer pro Well (350xg, 3min, 4°C) wurden die Zellpellets mit anti-IL-2-mAb bzw. der Isotyp-Kontrolle (20µl/Well) gefärbt. Die Antikörper wurden hierfür in PermWash-Puffer verdünnt. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit wurden die Zellen erneut in PermWash-puffer gewaschen und zuletzt in 150µl FACS-Puffer (wichtig für das Verschließen der Zellmembran) für die Messung aufgenommen.

3.2.10 Statistische Auswertungen

Die statistischen Auswertungen werden mit Hilfe der Programme Graph Pad Prism für Windows Version 5.02 durchgeführt. Die statistischen Signifikanzen des Expressionsmusters der DC-Populationen sowie der induzierten T-Zell-Populationen, die Proliferationsdaten (Anergie-Induktion + Suppression) und die Apoptose-Messungen wurden mit dem student's t-test für paarige Stichproben analysiert. Die Signifikanzen der ELISA-Daten sowie der RT-PCR-Analysen wurden aufgrund geringer n-Zahl und stärkerer Abweichungen mit dem Wilcoxon matched pairs test bestimmt.

Die Werte werden dann als signifikant angesehen, wenn $p < 0,05$ ist (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der humanen tolerogenen IL-10-modulierten dendritischen Zellpopulationen (IL-10DC)

4.1.1 Separation der IL-10DC-Subpopulationen

In durchflusszytometrischen Analysen vorangegangener Studien^{44, 70, 71} wurde gezeigt, dass es sich bei den humanen IL-10-modulierten dendritischen Zellen (IL-10DC) um eine heterogene Population handelt, die sich aus einer murenen ($CD83^{\text{high}}HLA-DR^{\text{low}}$) und einer immaturren ($CD83^{\text{low}}HLA-DR^{\text{low}}$) Subpopulation zusammensetzt. Die Expression von CCR7, einem Chemokin-Rezeptor und damit am Prozess der Migration beteiligt, wird während der DC-Reifung simultan zur CD83-Expression induziert. CD83 ist jedoch in verschiedenen Prozessen der T-Zell-Aktivierung involviert, sodass sich eine Aufreinigung der IL-10DC über CD83 auch negativ auf die T-Zell-Stimulation auswirken könnte. Die Expression beider Oberflächenmoleküle ist vergleichbar, so dass CCR7 zur durchflusszytometrischen Separation der beiden phänotypisch unterschiedlichen IL-10DC Subpopulationen geeignet ist. Nach dem Separationsvorgang wurden die DC-Populationen hinsichtlich ihrer Reinheit überprüft (Abb. 2).

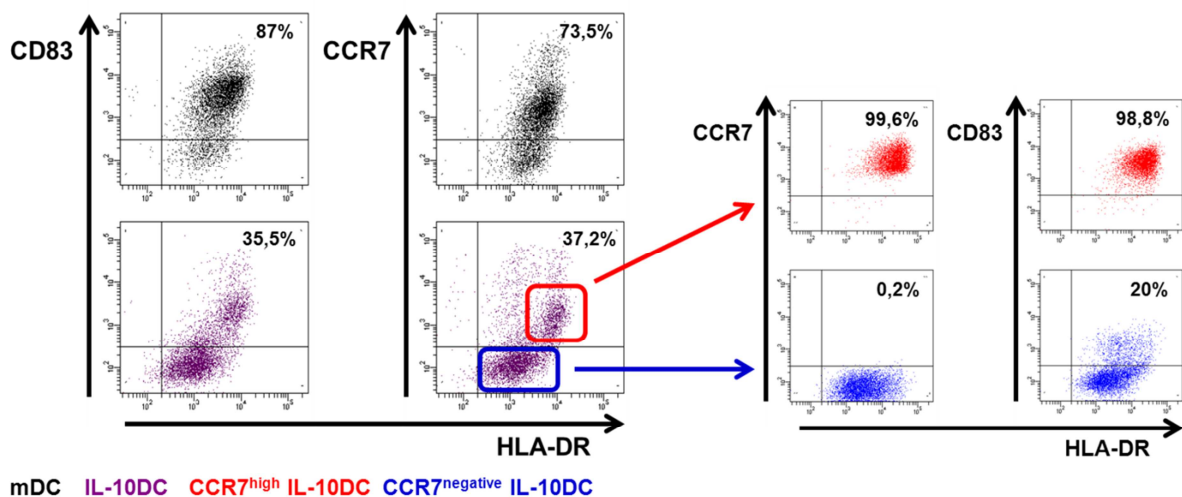


Abb. 2: Separation der $CCR7^{\text{high}}$ - und $CCR7^{\text{negative}}$ -IL-10DC-Subpopulation. Es ist ein exemplarisches Beispiel der durchflusszytometrischen Analyse der Expression von CD83 und CCR7 in Kombination mit HLA-DR auf mDC (schwarz) im Vergleich zu IL-10DC (violett) an Tag 7 sowie der beiden IL-10DC-Subpopulationen nach Separation durch Cellsort, $CCR7^{\text{high}}$ (rot) und $CCR7^{\text{negative}}$ (blau), dargestellt.

Die exemplarische Darstellung in Abb. 2 zeigt die vergleichbare Expression der beiden Oberflächenmoleküle CD83 und CCR7 auf der jeweiligen DC-Population, wobei die Expression der beiden Marker bei den IL-10DC im Vergleich zu den mDC stark vermindert vorlag. Die Separation der beiden IL-10DC-Subpopulationen zeigte eine Reinheit >99%, wobei die CCR7^{negative}-IL-10DC-Subpopulation dennoch einen geringen Anteil, in diesem Beispiel 20%, an CD83^{low}-exprimierenden Zellen aufwies. Die Ausbeute der IL-10DC-Subpopulationen betrug jeweils 40-60%.

In Abb. 3 wird der mikroskopische Phänotyp der einzelnen DC-Populationen im Vergleich gezeigt. Diese mikroskopischen Aufnahmen wurden bei 20facher Vergrößerung erstellt, wobei die Aufnahmen der mDC und IL-10DC an d7 der Kultur und die der beiden IL-10DC-Subpopulationen 24h nach Separation durchgeführt wurden. Im Vergleich zu den mDC wiesen die IL-10DC eine Heterogenität auf. Es waren sowohl reife Zellen mit deutlich ausgebildeten Dendriten als auch unreife Zellen zu erkennen, die nur sehr wenige bis keine Dendriten ausgebildet haben. Zudem konnten in der IL-10DC-Kultur Fibroblasten-ähnliche Zellen beobachtet werden, die sich auf dem Plattenboden als fadenähnliche Strukturen abzeichneten. Die CCR7^{high}- und die CCR7^{negative}-IL-10DC-Subpopulation zeigten nach 24h Kultivierung ähnliche Unterschiede wie der Vergleich zwischen mDC und IL-10DC. In der CCR7^{high}-Subpopulation waren kleinere Zellen zu erkennen, die jedoch die DC-typischen Dendriten ausgebildet haben. Die CCR7^{negative}-Subpopulation wies wiederum eine deutlich erhöhte Frequenz an Zellen auf, die keine bzw. nur sehr wenige Dendriten ausgebildet haben. Zudem fanden sich auch hier Fibroblasten-ähnliche Strukturen wieder.

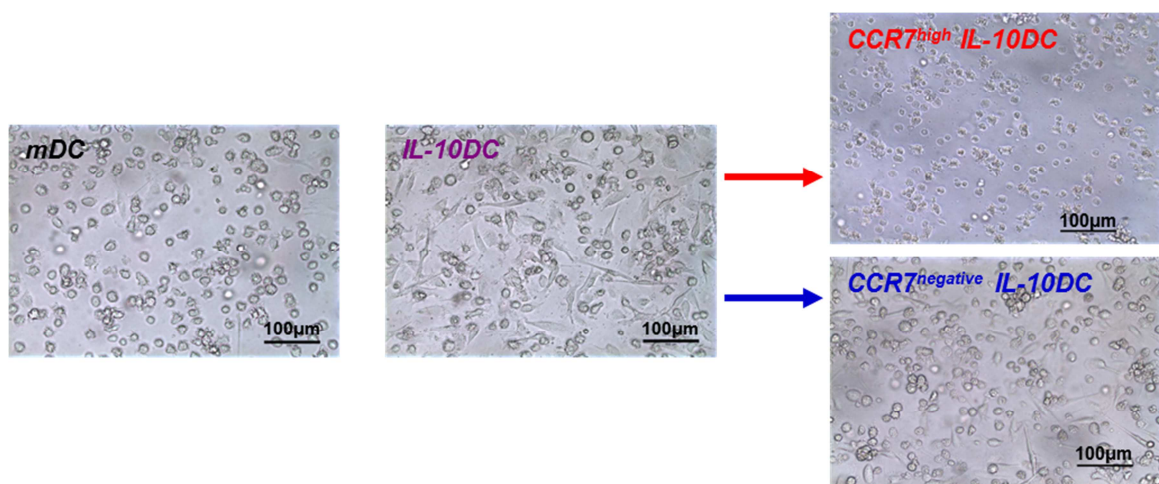


Abb. 3: Mikroskopische Aufnahmen der DC-Kulturen. Die mikroskopischen Aufnahmen an Tag 7 (mDC, IL-10DC) bzw. 24h nach Cellsort (CCR7^{high}- und CCR7^{negative}-IL-10DC) wurden bei 20facher Vergrößerung aufgenommen.

4.1.2 Expression von Oberflächenmolekülen auf dendritischen Zellen

In den folgenden Abbildungen werden jeweils unter A ein exemplarisches Beispiel für das Oberflächenmolekül und unter B die zusammengefassten und statistisch ausgewerteten Daten der durchflusszytometrischen Analysen jener Oberflächenmoleküle für die untersuchten DC-Populationen dargestellt, wobei sowohl der prozentuale Anteil doppelt positiver Zellen als auch die Expressionsdichte des jeweiligen Oberflächenmoleküls (MFI, mittlere Fluoreszenzintensität) auf den DC angegeben sind. Neben der Reinheit der DC-Populationen wurde die Expression verschiedener anderer Oberflächenmoleküle zur Analyse der Reifung und Differenzierung, wie z.B. CD83, Moleküle der B7-Familie, Chemokin-Rezeptoren, ILT-Moleküle sowie Vertreter aus der TNF/R-Familie in Kombination mit HLA-DR bestimmt. Hierfür wurden die IL-10DC-Subpopulationen jeweils mit maturen DC (mDC) und den IL-10-modulierten DC (IL-10DC) verglichen. Immature DC (iDC) dienten zusätzlich als Kontrollpopulation.

Reifestatus der DC-Populationen

Zunächst wurde die Expression typischer Oberflächenmoleküle von Monozyten und Makrophagen, CD14 und CD16 sowie CD83, dem Reifungsmarker humaner DC, untersucht (Abb. 4). Die IL-10DC zeigten einen unreifen Phänotyp, wobei sie sich zwischen den iDC und den mDC einordnen ließen. Dies wurde in der signifikant verminderten Expression von CD83 im Vergleich zu den mDC deutlich. Die CCR7^{high}-IL-10DC-Subpopulation zeigte eine zu den mDC vergleichbar hohe prozentuale CD83-Expression, wobei die Daten zur Expressionsdichte eine signifikant verminderte Expression von CD83 auf der CCR7^{high}-IL-10DC-Subpopulation im Vergleich zu den mDC aufwies. Die CCR7^{negative}-IL-10DC-Subpopulation eine ähnlich geringe Expression von CD83 wie die iDC aufwies.

Im Falle der Monozyten/Makrophagen-Marker CD14 und CD16 lässt sich sagen, dass die Zugabe von IL-10 die CD14-Expression deutlich verstärkte, wobei dies bei der CCR7^{negative}-Subpopulation signifikant ausgeprägter war als bei der CCR7^{high}-Subpopulation. CD16, einem Fc-Rezeptor für Antikörper der IgG-Klasse, wurde von den hier aus Monozyten generierten DC-Populationen prozentual in nur sehr geringen Mengen, jedoch hauptsächlich von der CCR7^{negative}-Subpopulation, exprimiert. Beim Vergleich der MFI-Werte konnten keine signifikanten Unterschiede für CD14 bzw. CD16 bestimmt werden.

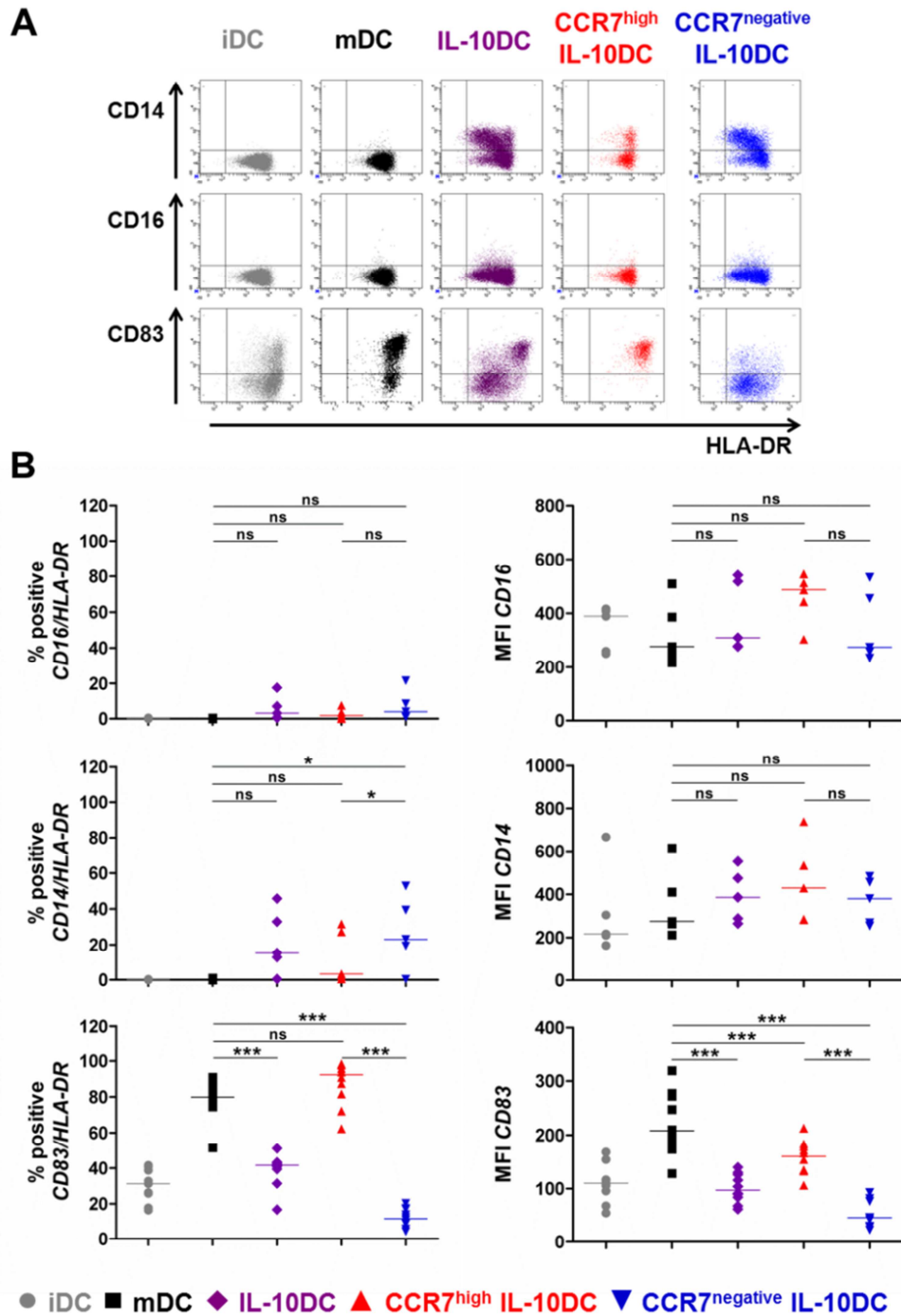


Abb. 4: Durchflusszytometrische Überprüfung des Reifestatus und der Differenzierung der DC-Populationen. **A** Gezeigt ist ein exemplarisches Beispiel der Expression von CD14, CD16 und CD83 in Kombination mit HLA-DR auf den jeweiligen DC-Populationen. **B** Gezeigt ist der Median der gepoolten Daten. Sowohl % als auch der MFI der doppelt positiven Zellen sind angegeben. Die Statistik der zusammengefassten Daten der durchflusszytometrischen Analyse (n=5-10) wurde mit dem paired student's t-test berechnet. * = p<0,05, *** = p<0,001, ns = nicht signifikant.

Kostimulatorische und koinhibitorische Moleküle der B7-Familie

Abb. 5 zeigt die Ergebnisse zur Analyse der Oberflächenmoleküle aus der B7-Familie. Wie im Falle von CD83 wurde auch eine gesteigerte Expression von CD80 erst nach Stimulation der Zellen induziert. Dieses Phänomen wurde deutlich beim Vergleich von iDC und mDC sowohl bezüglich der Frequenz positiver Zeller als auch der Expressionsdichte auf den DC (MFI). Die Expression der kostimulatorischen Oberflächenmoleküle CD80/CD86 sowie ICOS-L auf den mDC war im Vergleich zu den IL-10DC signifikant erhöht. Die CCR7^{high}-Subpopulation zeigte eine ähnlich starke Expression von CD80 und CD86 im Vergleich zu den mDC. Lediglich die Expression von ICOS-L war signifikant reduziert. Die CCR7^{negative}-Subpopulation zeigte einen anderen Phänotyp. Hier lag auch die Expression von CD80/CD86 im Vergleich zu den mDC und der CCR7^{high}-Subpopulation signifikant vermindert vor und war mit der der iDC vergleichbar.

Im Falle der koinhibitorischen B7-Moleküle PD-L2 (B7-DC) und PD-L1 (B7-H1) konnte beobachtet werden, dass die CCR7^{high}-Subpopulation trotz ihres reifen Phänotyps diese Oberflächenmoleküle im Vergleich zu den mDC signifikant höher exprimiert, insbesondere hinsichtlich der jeweiligen Expressionsdichte (MFI). Dieser Unterschied war bei dem Vergleich von mDC und IL-10DC nicht zu erkennen. Die CCR7^{negative}-Subpopulation hingegen zeigte eine leicht verminderte Expression dieser koinhibitorischen Oberflächenmoleküle der B7-Familie verglichen mit den mDC und der CCR7^{high}-Subpopulation.

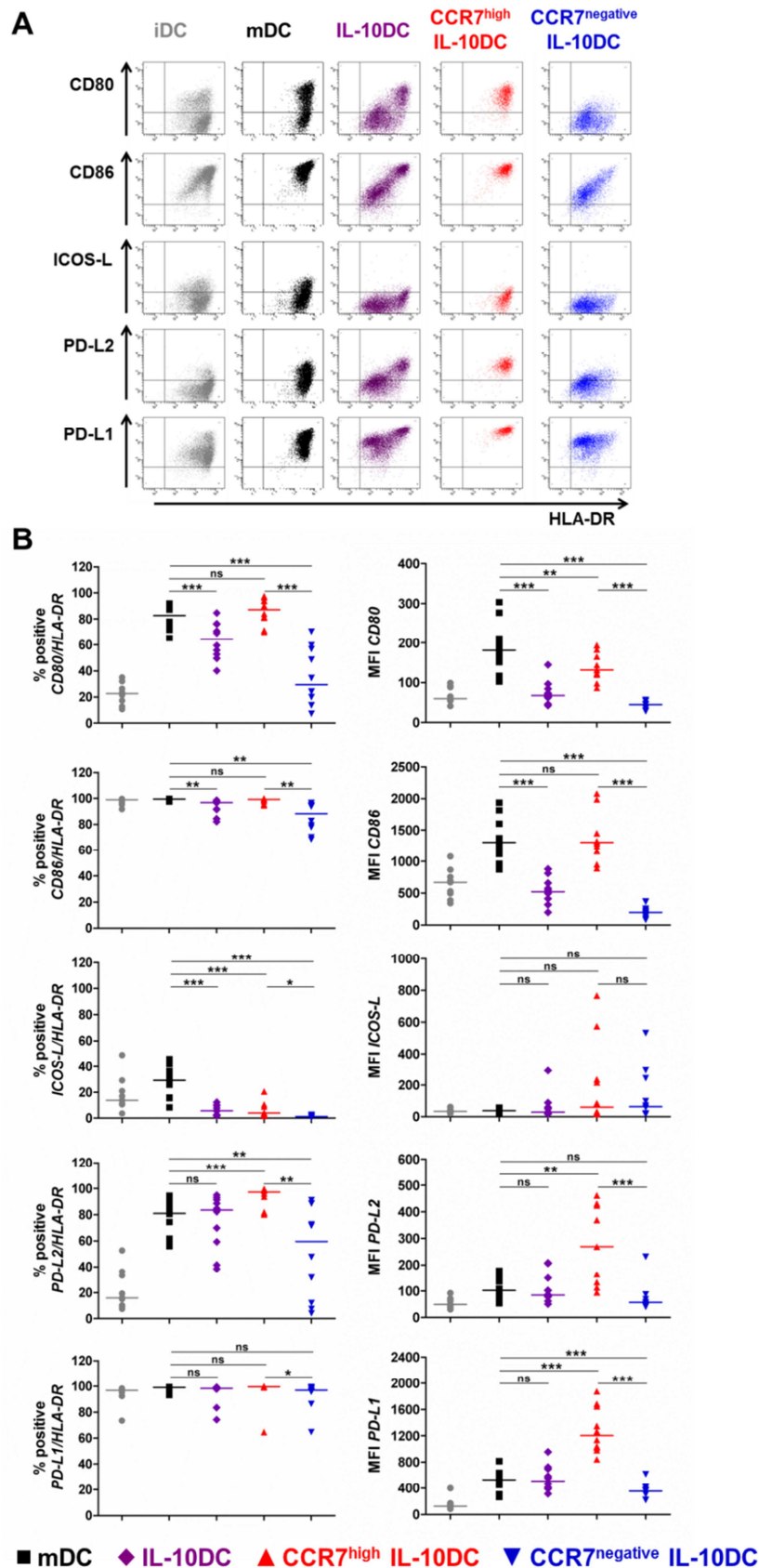


Abb. 5: Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmoleküle aus der B7-Familie auf den DC-Populationen. **A** Gezeigt ist ein exemplarisches Beispiel der Expression der B7-Moleküle CD80, CD86, ICOS-L, PD-L2 und PD-L1 in Kombination HLA-DR auf den jeweiligen DC-Populationen. **B** Gezeigt ist der Median der gepoolten Daten. Sowohl % als auch der MFI der doppelt positiven Zellen sind angegeben. Die Statistik der zusammengefassten Daten der durchflusszytometrischen Analyse (n=6-10) wurde mit dem paired student's t-test berechnet. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, ns = nicht signifikant.

DC-Migration

Bei Betrachtung der Chemotaxis-vermittelnden Rezeptoren CCR7 und CXCR4 (Abb. 6), die beide am Migrationsprozess des Lymphknoten-Homings beteiligt sind, zeigte sich, dass IL-10DC diese im Vergleich zu den mDC signifikant vermindert (CCR7) bzw. ähnlich stark (CXCR4) exprimierten. Die CCR7^{high}-IL-10DC-Subpopulation hingegen exprimierten CCR7 und CXCR4 signifikant höher, während auch hier die CCR7^{negative}-Subpopulation eine signifikant verminderte Expression der beiden Chemokin-Rezeptoren bezüglich der Frequenz und der Expressionsdichte im Vergleich zu den mDC und der CCR7^{high}-Subpopulation aufwies.

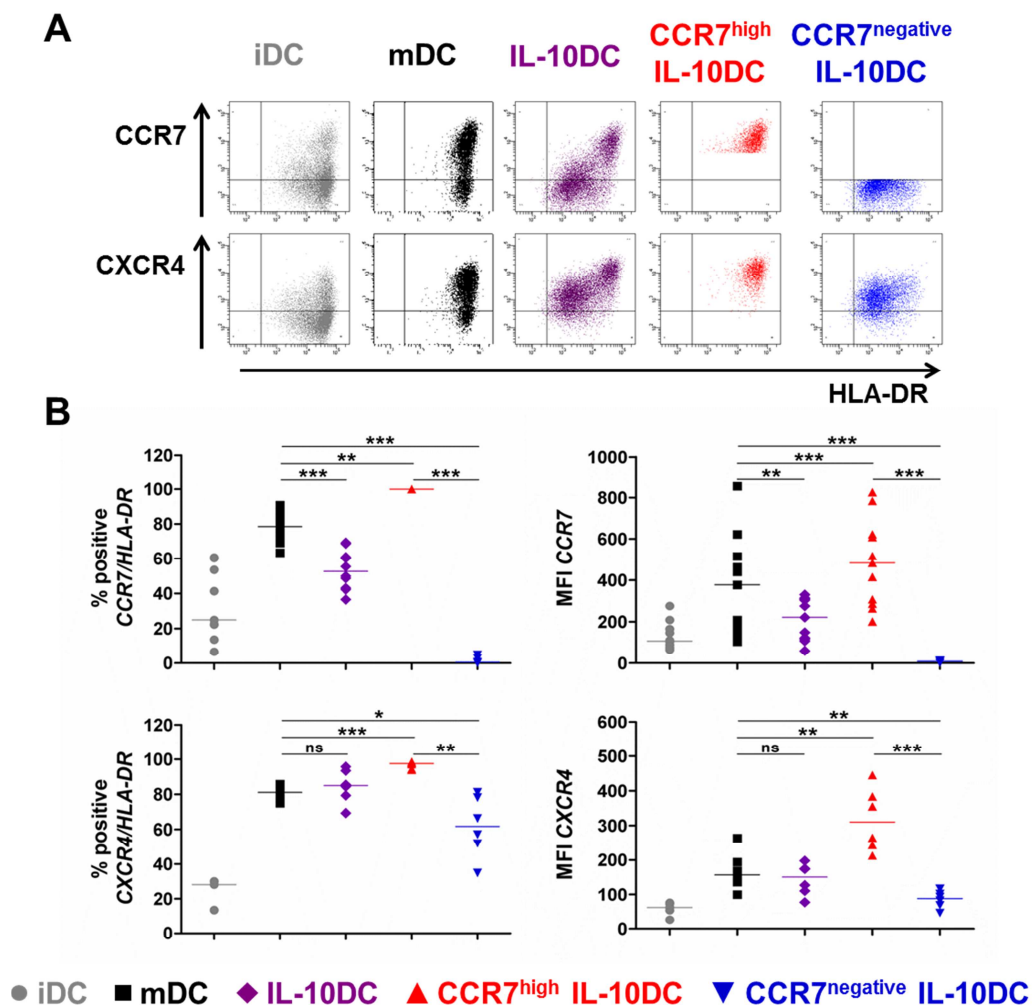


Abb. 6: Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Chemokin-Rezeptoren auf den DC-Populationen. **A** Gezeigt ist ein exemplarisches Beispiel der Expression der Chemokin-Rezeptoren CCR7 und CXCR4 in Kombination mit HLA-DR auf den jeweiligen DC-Populationen. **B** Gezeigt ist der Median der gepoolten Daten. Sowohl % als auch der MFI der doppelt positiven Zellen sind angegeben. Die Statistik der zusammengefassten Daten der durchflusszytometrischen Analyse (n=6-10) wurde mit dem paired student's t-test berechnet. * = p<0,05, ** = p<0,01, *** = p<0,001, ns = nicht signifikant.

Oberflächenmolekül-Expression aus der TNF/TNFR-Familie

CD40 spielt eine entscheidende Rolle bei der T-Zell-abhängigen B-Zell-Aktivierung, während OX40L an der T_H2-Differenzierung und Zytokin-Produktion beteiligt ist. Ähnlich wie bei der Expression von CD80/CD86 zeigten die IL-10DC im Vergleich zu mDC eine signifikant reduzierte Expression der Oberflächenmoleküle CD40 und OX40L aus der TNF/TNFR-Familie (Abb. 7). Verglichen mit den mDC konnte bei der CCR7^{high}-IL-10DC-Subpopulation eine ähnlich starke Expression beider Oberflächenmoleküle sowohl hinsichtlich der Frequenz positiver Zellen als auch der Expressionsdichte beobachtet werden, während die CCR7^{negative}-Subpopulation diese signifikant vermindert und vergleichbar mit iDC exprimierte.

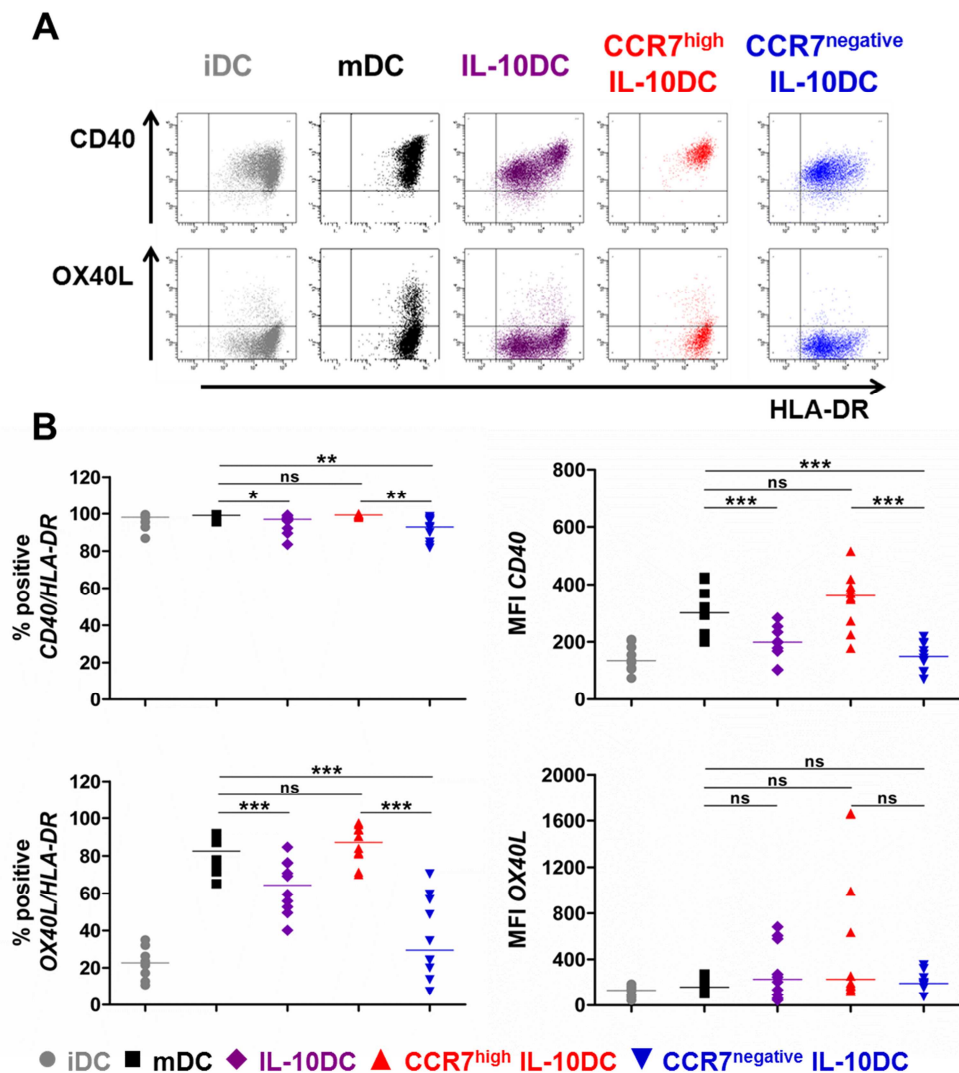


Abb. 7: Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Vertretern aus der TNF/TNFR-Familie auf den DC-Populationen. **A** Gezeigt ist ein exemplarisches Beispiel der Expression von CD40 und OX40L versus HLA-DR auf den jeweiligen DC-Populationen. **B** Gezeigt ist der Median der gepoolten Daten. Sowohl % als auch der MFI der doppelt positiven Zellen sind angegeben. Die Statistik der zusammengefassten Daten der durchflusszytometrischen Analyse (n=10) wurde mit dem paired student's t-test berechnet. * = p<0,05, ** = p<0,01, *** = p<0,001, ns = nicht signifikant.

Koinhibitorische Immunglobulin-Like-Transcripts

Die (ko-)inhibitorischen Oberflächenmoleküle aus der Immunglobulin-Like-Transcript (ILT)-Familie sind an Toleranz-induzierenden Mechanismen beteiligt. ILT2 und ILT3 wurden von mDC und IL-10DC ähnlich stark exprimiert (Abb. 8). Allerdings wurde ILT4 von den IL-10DC sowie der CCR7^{high}- als auch der CCR7^{negative}-IL-10DC-Subpopulation deutlich höher exprimiert. Die Expressionsdichte von ILT4 auf den IL-10DC und den beiden IL-10DC-Subpopulationen ergab jedoch lediglich einen tendenziellen Anstieg. Die CCR7^{high}-Subpopulation exprimierte zudem verglichen mit den mDC auch ILT3, bezogen auf die Frequenz und den MFI, signifikant verstärkt. Zwischen den beiden IL-10DC-Subpopulationen zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied, der sich in einer allgemein verminderten Expression der ILT-Moleküle bei der CCR7^{negative}-Subpopulation gegenüber der CCR7^{high}-Subpopulation äußerte.

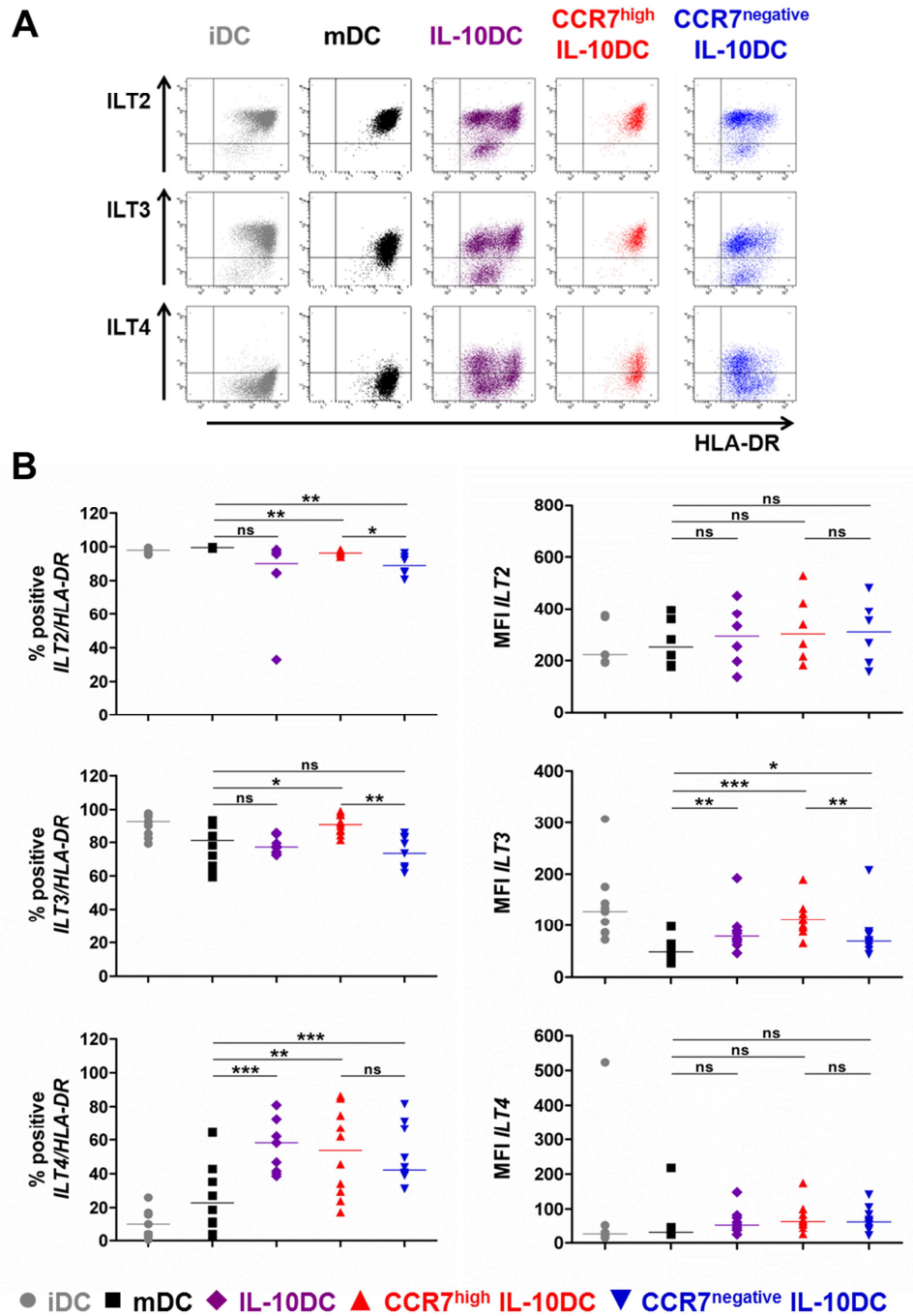


Abb. 8: Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Oberflächenmolekülen aus der ILT-Familie auf den DC-Populationen. A Gezeigt ist ein exemplarisches Beispiel der Expression der ILT-Moleküle ILT2, ILT3 und ILT4 in Kombination mit HLA-DR auf den jeweiligen DC-Populationen. **B** Gezeigt ist der Median der gepoolten Daten. Sowohl % als auch der MFI der doppelt positiven Zellen sind angegeben. Die Statistik der zusammengefassten Daten der durchflusszytometrischen Analyse (n=6-10) wurde mit dem paired student's t-test berechnet. * = p<0,05, ** = p<0,01, *** = p<0,001, ns = nicht signifikant, ILT = Immunglobulin-Like-Transcript.

Expression des IL-2-Rezeptors

Die Expression von CD25, der α -Kette des IL-2-Rezeptors (IL-2R α), wurde bisher als Aktivierungsmarker für DC beschrieben. Auf den tolerogenen IL-10DC konnte gegenüber den stimulatorischen mDC jedoch eine signifikant erhöhte Expression (Frequenz und Expressionsdichte) beobachtet werden (Abb. 9). Die stärkste Expression zeigte die CCR7^{high}-IL-10DC-Subpopulation. Bei der CCR7^{negative}-Subpopulation konnte kein signifikanter, aber ein tendenzieller Anstieg der CD25-Expression im Vergleich zu den mDC beobachtet werden. CD122, die signaltransduzierende β -Kette des IL-2-Rezeptors (IL-2R β), wurde von den untersuchten DC-Populationen nicht bzw. nur in einer sehr geringen Frequenz exprimiert. Auch bezüglich der Expressionsdichte wurden keine Unterschiede beobachtet.

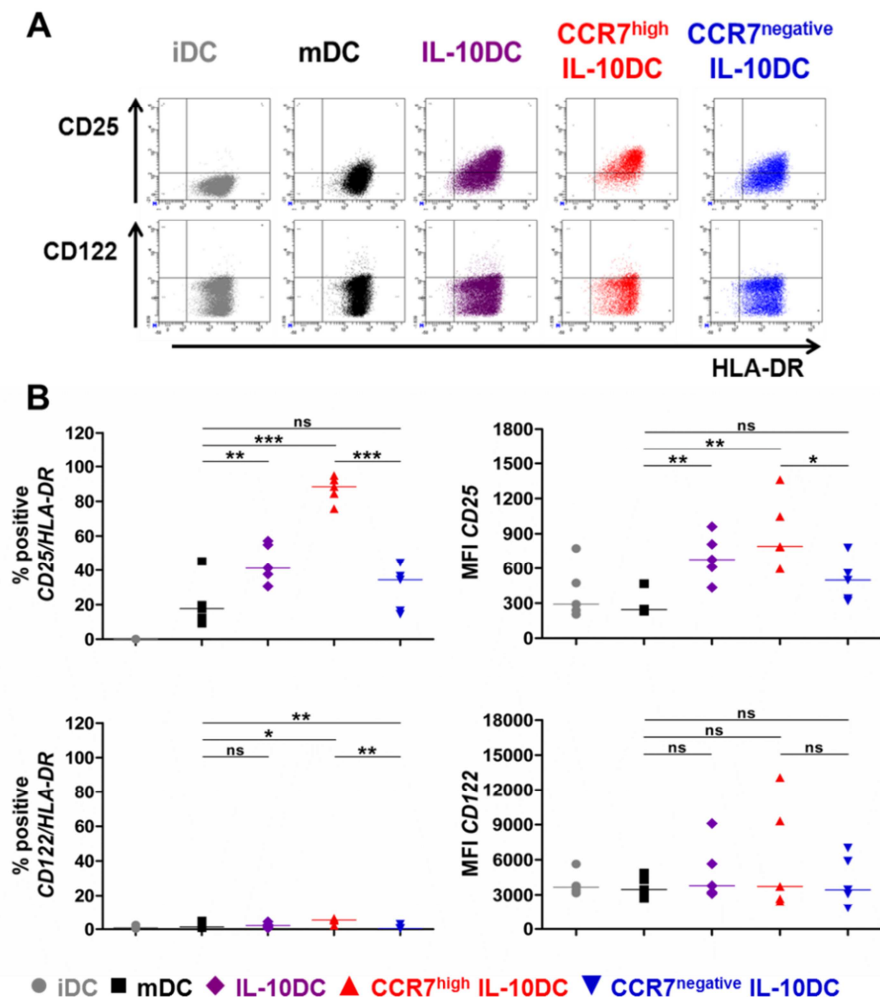


Abb. 9: Durchflusszytometrische Analyse des IL-2-Rezeptors auf den DC-Populationen. **A** Gezeigt ist ein exemplarisches Beispiel der Expression der α -Kette (CD25) und der β -Kette (CD122) des IL-2R in Kombination mit HLA-DR auf den jeweiligen DC-Populationen. **B** Gezeigt ist der Median der gepoolten Daten. Sowohl % als auch der MFI der doppelt positiven Zellen sind angegeben. Die Statistik der zusammengefassten Daten der durchflusszytometrischen Analyse (n=5) wurde mit dem paired student's t-test berechnet. * = p<0,05, ** = p<0,01, *** = p<0,001, ns = nicht signifikant.

Kurze Zusammenfassung

Insgesamt zeigte die CCR7^{high}-IL-10DC-Subpopulation einen maturen Phänotyp, der sich insbesondere in der hohen Expression von CD83 und CD80 widerspiegelte. Aber auch andere kostimulatorische Moleküle wie CD86 und CD40 sowie das koinhibitorische Molekül ILT2, wurden verglichen mit mDC ähnlich stark exprimiert. CD25 und die inhibitorischen Moleküle ILT3, ILT4 sowie PD-L1 und PD-L2 wurden nach Stimulation von der CCR7^{high}-IL-10DC-Subpopulation jedoch signifikant höher exprimiert, während die Expression von ICOS-L aufgehoben war.

Die CCR7^{negative}-IL-10DC-Subpopulation zeigte einen Phänotyp, der dem immaturer DC ähnelt. Reifungsmarker (CD83, CD80) und andere kostimulatorische (CD86, CD40) bzw. koinhibitorische Moleküle (ILT2, ILT3, PD-L1, PD-L2) wurden verglichen mit den mDC und der CCR7^{high}-IL-10DC-Subpopulation deutlich vermindert exprimiert. ILT4 wurde jedoch ebenfalls signifikant stärker exprimiert, während CD25 im Vergleich zu mDC nur tendenziell stärker exprimiert wurde.

Stabilität der Expression ausgewählter Oberflächenmoleküle

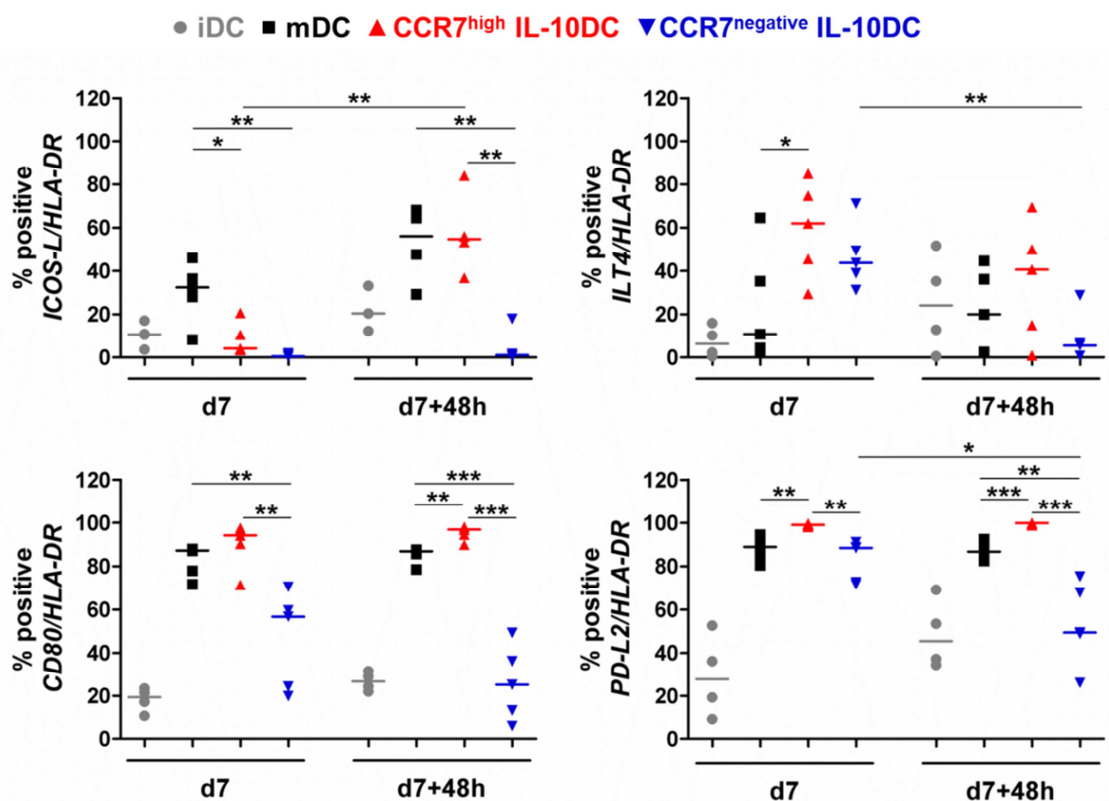


Abb. 10: Überprüfung der Stabilität ausgewählter Oberflächenmoleküle auf den DC-Populationen. Von exemplarischen Oberflächenmolekülen aus der B7- und ILT-Familie (ICOS-L, CD80, PD-L2, ILT4) wurde die Frequenz der doppelt positiven Zellen für HLA-DR und dem jeweiligen Oberflächenmolekül (%) mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Verglichen wird die Expression der Oberflächenmoleküle auf den DC-Populationen an Tag 7 (d7) und 48h später (d7+48h). Gezeigt ist der Median der gepoolten Daten. Die Statistik (n=5) wurde mit dem paired student's t-test berechnet. * = p<0,05, ** = p<0,01, *** = p<0,001.

Zur Überprüfung der Stabilität der Expression ausgesuchter Oberflächenmoleküle (ICOS-L, CD80, ILT4, PD-L2) wurden die DC-Kulturen für zusätzliche 48h (d7+48h) in frischem Kulturmedium inkubiert. Hierbei zeigte sich, dass die CCR7^{negative}-IL-10DC-Subpopulation eine insgesamt signifikant geringere Expression jener Oberflächenmoleküle nach 48h zusätzlicher Inkubation im Vergleich zu mDC und der CCR7^{high}-IL-10DC-Subpopulation aufwies (Abb.10).

Den deutlichsten Unterschied zwischen den DC-Populationen im Vergleich zu den Kulturen an Tag 7 (d7) war in der Expression von ILT4 und ICOS-L zu beobachten. Während ILT4 nach 48h Kultivierung auf beiden IL-10DC-Subpopulationen, jedoch nur für die CCR7^{negative}-IL-10DC-Subpopulation signifikant, herunterreguliert wurde, wurde ICOS-L von mDC und der CCR7^{high}-IL-10DC-Subpopulation hochreguliert und nun gleichermaßen stark exprimiert. Auch die Expression von CD80 und PD-L2 war nach 48h Kultivierung auf der CCR7^{negative}-IL-10DC-Subpopulation deutlich, wenn auch nicht signifikant für CD80, reduziert.

4.1.3 Zytokinprofil

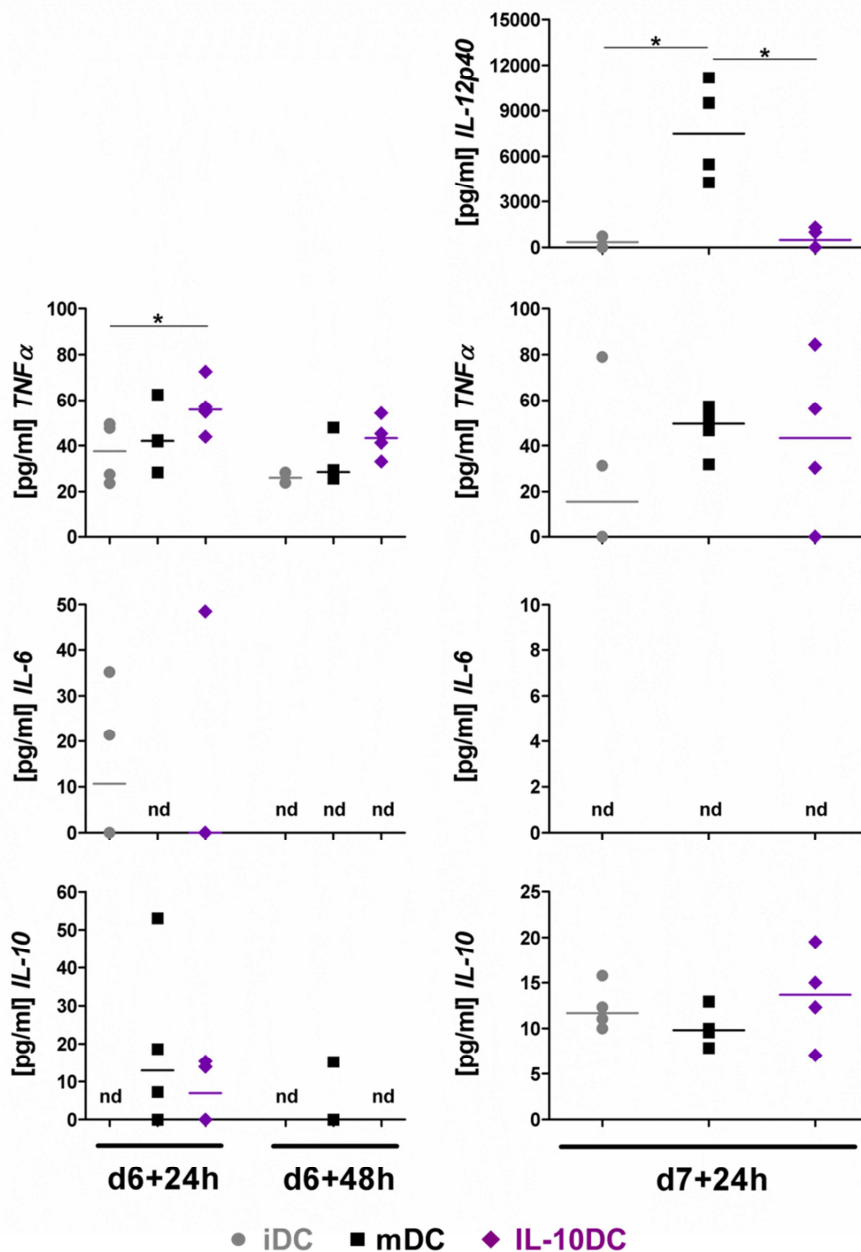


Abb. 11: Zytokinprofil der untersuchten DC-Populationen. Die Konzentration der Zytokine TNF α , IL-6 und IL-10 wurde sowohl 24h und 48h nach Tag 6 (d6+24h, d6+48h) als auch 24h nach Tag 7 (d7+24h) in den Überständen der DC-Kulturen mittels ELISA bestimmt. Die IL12p40-Konzentration wurde lediglich 24h nach 7-tägiger DC-Ausreifung gemessen (d7+24h). Verglichen werden die immaturren DC (iDC), maturen DC (mDC) und IL-10-modulierten DC (IL-10DC). Gezeigt ist der Median der gepoolten Daten. Die Statistik der zusammengefassten Daten (n=4) wurde mit dem paired student's t-test berechnet. * = p<0,05, nd = nicht detektierbar.

Für die Messung sowohl proinflammatorischer (IL-6, TNF α , IL-12p40) als auch immunsuppressiver (IL-10) Zytokine wurden an unterschiedlichen Zeitpunkten Kultur-Überstände entnommen (d6+24h, d6+48h und d7+24h) und die Zytokin-Sezernierung mittels ELISA bestimmt, um den optimalen Zeitpunkt der jeweiligen Zytokin-Produktion nicht zu verpassen. Die untersuchten DC-Populationen zeigten

jedoch zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede hinsichtlich ihres Zytokinprofils (Abb. 11). Lediglich zum Zeitpunkt d6+24h wiesen die IL-10DC eine signifikant erhöhte TNF α -Sezernierung im Vergleich zu den iDC auf, jedoch war nach 48h (d6+48h) nur noch ein tendenzieller Anstieg nachweisbar. Im Vergleich zu den mDC konnte auch eine tendenziell erhöhte TNF α -Freisetzung bei den IL-10DC zu den Zeitpunkten d6+24h und d6+48h beobachtet werden. Dieser Unterschied zwischen IL-10DC und mDC konnte aber an d7+24h nicht mehr gemessen werden. IL-6 konnte bei allen Populationen nicht bzw. nur vereinzelt nachgewiesen werden. Auch das immunsuppressive Zytokin IL-10 war weder in der immaturen und maturen DC-Population noch in der IL-10-modulierten Gruppe in höheren bzw. deutlich unterschiedlichen Konzentrationen nachweisbar. mDC sezernierten jedoch eine signifikante hohe Konzentration IL-12p40, eine Untereinheit des Zytokins IL-12, im Vergleich zu iDC und IL-10DC.

Sezernierung von löslichen CD25 durch dendritische Zellen

Die Sezernierung der löslichen Form von CD25 (sCD25) durch PBMC sowie verschiedene T-Zell-Populationen bzw. -Linien ist bereits beschrieben worden.¹⁵⁵⁻¹⁵⁷ Für DC wurde dies bisher jedoch nicht untersucht. Aufgrund der signifikant erhöhten CD25-Expression auf den tolerogenen IL-10DC, insbesondere auf der CCR7^{high}-Subpopulation im Vergleich zu iDC und mDC (siehe Abb. 9), wurde deshalb auch die sCD25-Sezernierung durch iDC, mDC und IL-10DC sowie der beiden IL-10DC-Subpopulationen untersucht und miteinander verglichen. Während die Messung von proinflammatorischen und immunsuppressiven Zytokinen keinen bzw. nur einen tendenziellen Unterschied zwischen den DC-Populationen ergeben hat, ließen die IL-10-modulierten DC eine signifikant höhere sCD25-Freisetzung von im Vergleich zu den mDC und den iDC erkennen. Immature DC zeigten zu keinem der gemessenen Zeitpunkte eine deutliche sCD25-Sezernierung (Abb. 12). Auch nach der Separation der beiden IL-10DC-Subpopulationen, CCR7^{high} und CCR7^{negative}, konnte eine signifikant erhöhte sCD25-Freisetzung im Vergleich zu den mDC beobachtet werden (Abb. 13). Hier zeigte sich jedoch bei der CCR7^{high}-IL-10DC-Subpopulation eine 10-fach erhöhte sCD25-Sezernierung nach 24h Kultivierung, während die sCD25-Konzentration bei der CCR7^{negative}-IL-10DC-Subpopulation mit der der mDC vergleichbar war.

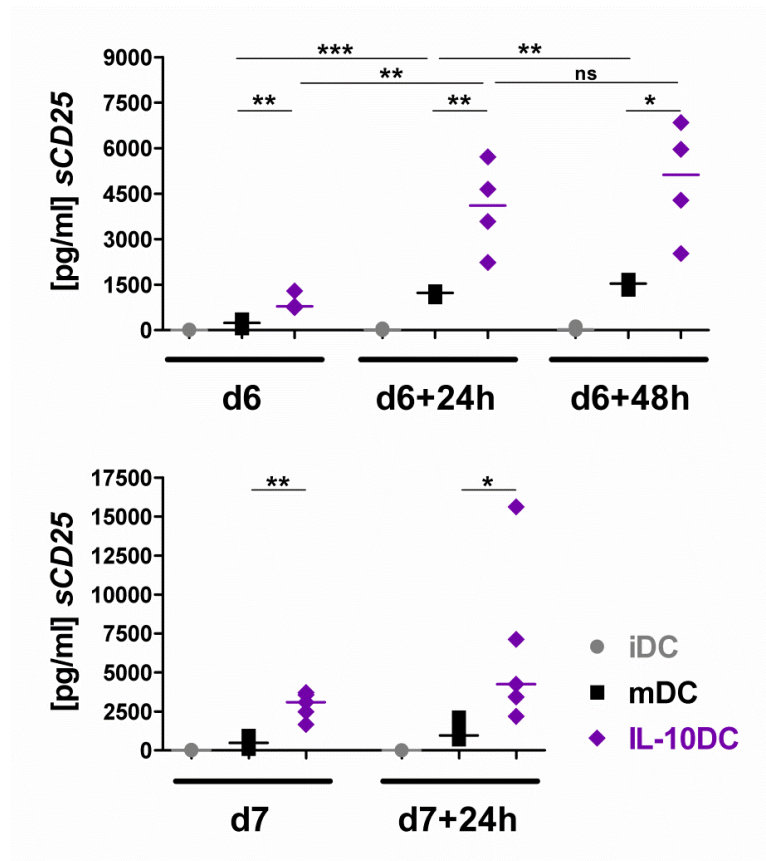


Abb. 12: Sezernierung der löslichen Form von CD25 (sCD25) in den DC-Kulturen. sCD25 wurde mittels ELISA in den Überständen 24h und 48h nach Tag 6 (d6+24h, d6+48h) als auch 24h nach Tag 7 (d7+24h) der DC-Kulturen bestimmt. Verglichen werden die immature DC (iDC), mature DC (mDC) und IL-10-modulierten DC (IL-10DC). Gezeigt ist der Median der gepoolten Daten. Die Statistik der zusammengefassten Daten (n=4-5) wurde mit dem paired student's t-test berechnet. * = p<0,05, ** = p<0,01, *** = p<0,001, ns = nicht signifikant.

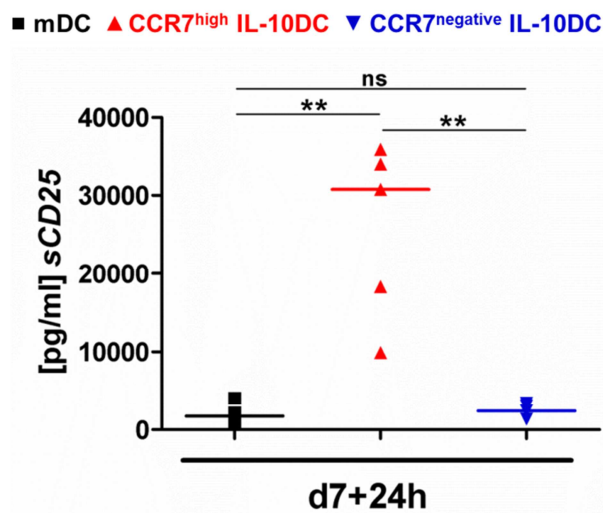


Abb. 13: Sezernierung der löslichen Form von CD25 (sCD25) in den tolerogenen IL-10DC-Subpopulationen. Mittels ELISA wurde 24h nach Tag 7 (d7+24h) der DC-Kulturen die sCD25-Sezernierung in den Überständen bestimmt. Verglichen wird die sCD25-Konzentration der mDC und der IL-10DC-Subpopulationen, CCR7^{high} und CCR7^{negative}. Gezeigt ist der Median der gepoolten Daten. Die Statistik der zusammengefassten Daten (n=5) wurde mit dem paired student's t-test berechnet. ** = p<0,01, ns = nicht signifikant.

4.2 Charakterisierung der durch IL-10DC induzierten Treg-Subpopulationen

Für die Stimulation mit mDC, CCR7^{high}-IL-10DC und CCR7^{negative}-IL-10DC wurden CD4⁺CD25^{low}CD45RA⁺ naive T-Zellen aus peripherem Blut gesunder Spender verwendet. Nach 5 Tagen primärer Stimulation (Primärkultur) und anschließender 3-4-tägiger Ruhephase wurden die mDC-induzierten Effektor-T-Zellen (Teff) sowie die CCR7^{high}-IL-10DC-induzierte (iTreg⁺) und die CCR7^{negative}-IL-10DC-induzierte (iTreg⁻) iTreg-Subpopulation je nach Versuchsansatz polyklonal restimuliert.

4.2.1 Expression von T-Zell-Oberflächenmolekülen

Nach der genaueren Charakterisierung der beiden IL-10DC-Subpopulationen wurden die induzierten regulatorischen T-Zellen (iTreg) im Vergleich zu den Effektor-T-Zellen (Teff) ebenfalls anhand ihres Oberflächenmolekülprofils genauer untersucht. Hierfür wurden verschiedene Marker für die T-Zell-Differenzierung und T-Zell-Aktivierung gewählt.

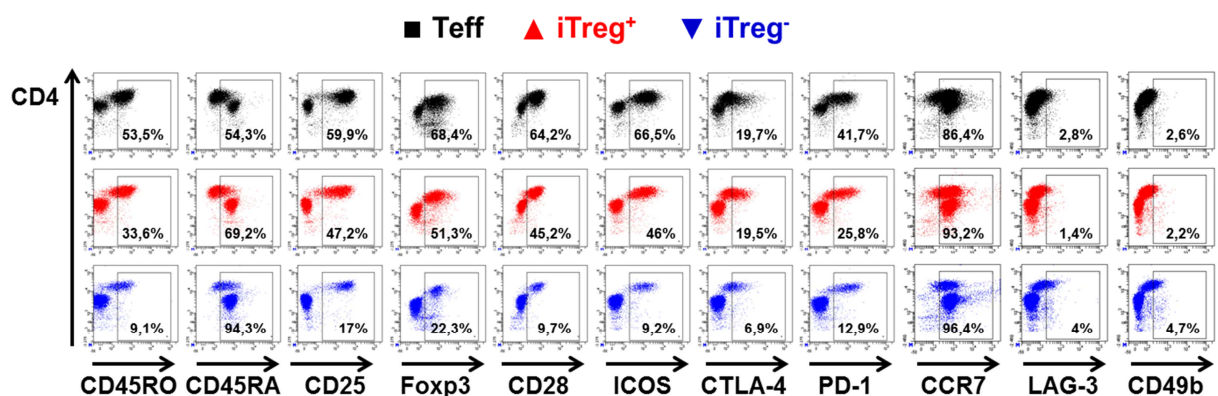


Abb. 14: Durchflusszytometrische Analyse verschiedener T-Zell-Marker auf den induzierten T-Zell-Populationen. Gezeigt ist ein exemplarisches Beispiel des Expressionsmusters der jeweiligen TC-Population nach 5 Tagen Primärkultur für die verschiedenen T-Zell-Marker CD45RO, CD45RA, CD25, Foxp3, CD28, ICOS, CTLA-4, PD-1, CCR7, CD49b und LAG-3 in Kombination mit CD4. mDC-induzierte Effektor-T-Zellen (Teff) dienten als Kontrollpopulation.

In Abb. 14 ist das repräsentative Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse der Oberflächenmoleküle nach primärer T-Zell-Stimulation (Primärkultur) mit mDC (Teff), CCR7^{high}-IL-10DC (iTreg⁺) und CCR7^{negative}-IL-10DC (iTreg⁻) gezeigt. Beide iTreg-Subpopulationen zeigten im Vergleich zu den Teff eine deutlich geringere Frequenz positiver Zellen hinsichtlich der Expression des T-Zell-Aktivierungsmarkers CD45RO sowie von CD28 und ICOS, beide an der T-Zell-Kostimulation beteiligt. Zeitgleich exprimierten beide T-Zell-Populationen auch regulatorische Oberflächenmoleküle wie CTLA-4 und PD-1 verglichen mit den Teff vermindert. Zudem zeigten beide iTreg-Subpopulationen eine deutlich reduzierte Expression von CD25 sowie des

Transkriptionsfaktors Foxp3 im Vergleich zu Effektor-T-Zellen, wobei die iTreg⁺-Subpopulation eine erhöhte Frequenz positiver Zellen verglichen mit den iTreg⁻ aufwies. Eine hohe Expression beider Marker ist charakteristisch für nTreg, jedoch regulieren auch aktivierte Effektor-T-Zellen diese Moleküle herauf. Der Chemokin-Rezeptor CCR7, am Prozess des Lymphknoten-Homings beteiligt, wurde hingegen nach primärer Stimulation auf beiden iTreg-Subpopulationen im Vergleich zu den Effektor-T-Zellen geringfügig höher exprimiert.

Bei Betrachtung der zusammengefassten Daten mehrerer Versuchsansätze sind die obigen Unterschiede zwischen den einzelnen T-Zell-Populationen nach primärer Stimulation (Abb. 15 oben) auch statistisch belegbar. Während der T-Zell-Aktivierungsmarker CD45RO auf der iTreg⁻-Subpopulation signifikant geringer exprimiert wurde, zeigte diese T-Zell-Population im Vergleich zu den Teff und iTreg⁺ simultan eine signifikant höhere CD45RA-Expression, einem Marker für naive und ruhende T-Zellen. Die an der Kostimulation beteiligten Rezeptoren CD28 und ICOS, aber auch CD25 und Foxp3 wurden ebenfalls von der iTreg⁻-Subpopulation verglichen mit den Teff und iTreg⁺ signifikant vermindert exprimiert. Verglichen mit der Effektor-T-Zell-Population zeigten die iTreg⁺ eine signifikant reduzierte Expression der oben beschriebenen Oberflächenmoleküle und gleichzeitig eine signifikant erhöhte CD45RA-Expression. Hingegen konnte für Foxp3 nur eine tendenziell verminderte Expression nachgewiesen werden. Dies konnte auch für die regulatorischen Oberflächenmoleküle CTLA-4 und PD-1 beobachtet werden, während die Unterschiede zwischen den Teff und iTreg⁻ signifikant vorlagen.

Nach 48h polyklonaler Restimulation der induzierten T-Zell-Populationen (Abb. 15 unten) wurde das kostimulatorische Molekül naiver T-Zellen CD28 von allen T-Zell-Populationen gleichermaßen stark herunterreguliert. Im Falle der anderen T-Zell-Marker (CD45RO, CD25, Foxp3, ICOS) zeigte sich beim Vergleich der untersuchten T-Zell-Populationen ein ähnliches Bild wie nach primärer Stimulation, allerdings waren die Unterschiede zu der iTreg⁻-Subpopulation insgesamt deutlich erhöht, während sich das Expressionsmuster der iTreg⁺ dem der Teff angeglichen hat und die Unterschiede hinsichtlich der CD45RO-, CD25- sowie Foxp3-Expression nur noch tendenziell vorhanden waren. Die iTreg⁻ zeigten eine signifikant stärkere CD45RA-Expression im Vergleich zu Effektor-T-Zellen und iTreg⁺. Der auffälligste Unterschied zwischen der iTreg⁻-Subpopulation und den beiden anderen T-Zell-Populationen war jedoch bei Betrachtung der regulatorischen Oberflächenmoleküle CTLA-4 und PD-1 zu erkennen. In beiden Fällen wiesen die iTreg⁻ eine deutlich

verminderte Expression verglichen mit den Teff und iTreg⁺ auf, wobei die CTLA-4-Expression im Vergleich zur Primärkultur insgesamt gesunken ist. Sowohl CD45RA als auch CCR7 wurden zudem von den Teff und der iTreg⁺-Subpopulation im Vergleich zu iTreg⁻ herunterreguliert.

Neben den oben beschriebenen T-Zell-Oberflächenmolekülen wurde zusätzlich die Expression der Marker LAG-3 und CD49b auf den iTreg⁺ und iTreg⁻ untersucht, die kürzlich für regulatorische T-Zellen Typ 1 (Tr1) beschrieben wurden.¹⁵⁸ Beide iTreg-Subpopulationen zeigten jedoch sowohl nach primärer Stimulation als auch nach polyklonaler Restimulation eine sehr geringe Expression von CD49b und LAG-3, die zudem vergleichbar mit der von Effektor-T-Zellen war.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass beide iTreg-Subpopulationen im Vergleich zu Effektor-T-Zellen die untersuchten T-Zell-Marker CD45RO, CD25, Foxp3, CD28 sowie ICOS signifikant vermindert exprimierten. Die iTreg⁺-Subpopulation lies sich dabei bezüglich des Expressionsmusters der analysierten Moleküle zwischen den Teff und der iTreg⁻-Subpopulation eingliedern. Gleichzeitig zeigten die iTreg-Subpopulationen verglichen mit den Effektor-T-Zellen keine erhöhte Expression der regulatorischen Moleküle PD-1 und CTLA-4.

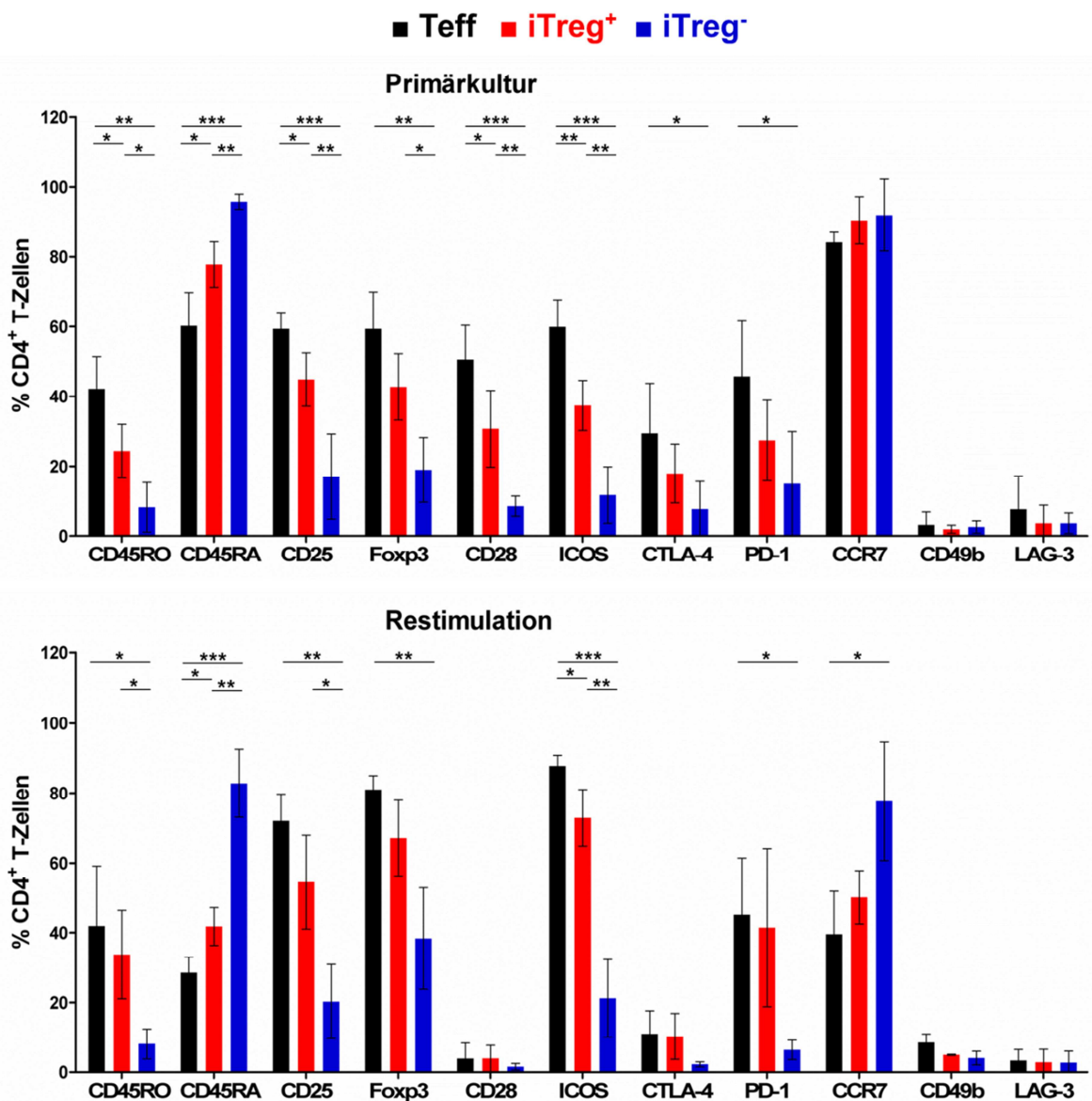


Abb. 15: Zusammenfassung der durchflusszytometrischen Analyse verschiedener T-Zell-Marker auf den induzierten T-Zell-Populationen. Gezeigt ist das Expressionsmuster der jeweiligen TC-Population für die verschiedenen T-Zell-Marker CD45RO, CD45RA, CD25, Foxp3, CD28, ICOS, CTLA-4, PD-1, CCR7, CD49b und LAG-3 in Kombination mit CD4 nach primärer Stimulation (oben, n=4) und nach 48h polyklonaler Restimulation (unten, n=3). Angegeben ist der Mittelwert ± SD der gepoolten Daten. Die Statistik der zusammengefassten Daten der durchflusszytometrischen Analyse wurde mit dem paired student's t-test berechnet. * = p<0,05, ** = p<0,01, *** = p<0,001.

4.2.2 Induzierte T-Zell-Populationen nach Primärkultur

Neben dem Phänotyp der iTreg und Teff wurden auch funktionelle Untersuchungen durchgeführt. Für den Nachweis der stimulatorischen Kapazität der CCR7^{high}- und CCR7^{negative}-IL-10DC-Subpopulation im Vergleich zu mDC wurde die primäre T-Zell-Stimulation mit der jeweiligen DC-Population in unterschiedlichen DC-T-Zell-Verhältnissen induziert und die ³H-Thymidin-Inkorporation als Maß der T-Zell-Proliferation gemessen. Abb. 16 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchung. Es ist auffällig, dass sowohl die CCR7^{high}- als auch die CCR7^{negative}-IL-10DC-Subpopulation

im Vergleich zu mDC eine sehr geringe stimulatorische Wirkung auf T-Zellen ausübten und nur eine sehr geringe bzw. keine T-Zell-Proliferation induzieren konnten. Besonders im Falle der mDC-Stimulation, aber auch bei der iTreg⁺-Subpopulation zeigte sich zudem eine Abnahme der T-Zell-Proliferationsrate mit steigendem DC-T-Zell-Verhältnis.

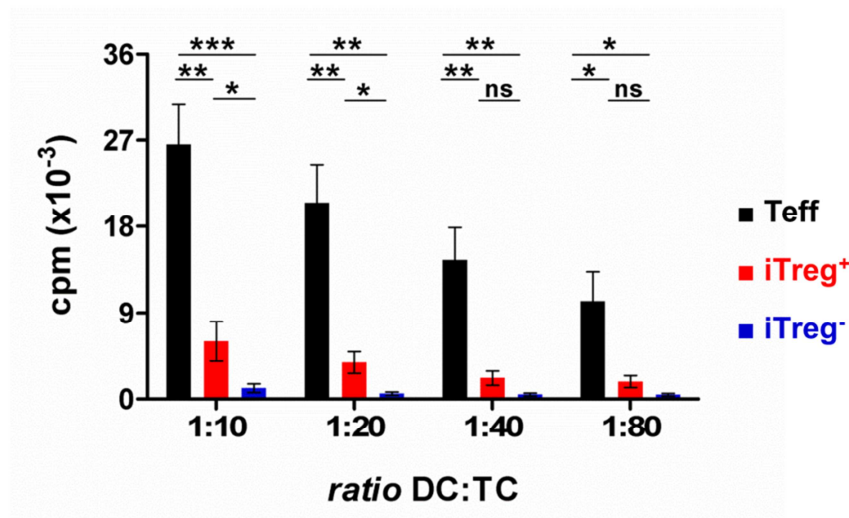


Abb 16: Stimulatorische Kapazität der DC-Populationen. mDC, CCR7^{high}- und CCR7^{negative}-IL-10DC wurden jeweils in einem Verhältnis von 1:10, 1:20, 1:40 und 1:80 zusammen mit naiven T-Zellen 3 Tage in Kokultur gehalten. Nach zusätzlichen 18h Kultur in Anwesenheit von ³H-Thymidin wurde die Proliferation der T-Zell-Populationen gemessen. Die gepoolten Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben. Die Statistik der zusammengefassten Daten (n=5) wurde mit dem paired student's t-test berechnet. * = p<0,05, ** = p<0,01, *** = p<0,001, ns = nicht signifikant.

4.2.3 Anergiezustand der induzierten Treg-Populationen

4.2.3.1 T-Zell-Proliferationstest durch ³H-Thymidin-Inkorporation

Nach einer 3-tägigen Ruhephase wurden die T-Zell-Populationen polyklonal restimuliert und deren Proliferation ebenfalls mittels ³H-Thymidin-Inkorporation bestimmt. Als Kontrolle dienten hierfür unstimulierte Zellpopulationen. In Abb. 17 ist zu sehen, dass die Kontrollen keine Proliferation zeigten und lagen somit vollständig in Ruhe vor. Es ist zudem zu erkennen, dass die Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28-mAb eine starke Proliferation der mDC-induzierten Effektor-T-Zellen (Teff) induzierte. Im Vergleich hierzu proliferierten beide iTreg-Subpopulationen signifikant geringer, wobei zwischen den Ansätzen mit den iTreg⁺ bzw. iTreg⁻ kein signifikanter Unterschied in der Proliferation zu beobachten war. Beide iTreg-Subpopulationen zeigten in diesem Testsystem somit einen anergen Zustand, der bei CCR7^{negative}-IL-10DC-induzierten Treg tendenziell stärker ausgeprägt war.

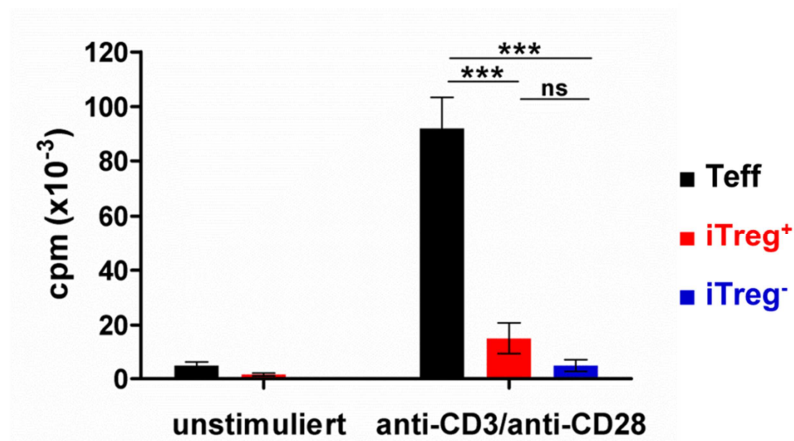


Abb. 17: Polyklonale Restimulation der induzierten T-Zell-Populationen. Die mDC-induzierten (Teff), CCR7^{high}-IL-10DC-induzierten (iTreg⁺) und die CCR7^{negative}-IL-10DC-induzierten (iTreg⁻) T-Zellen wurden für 72h mit anti-CD3/anti-CD28-mAb restimuliert. Als Kontrolle dienen unstimulierte Zellen. Nach zusätzlichen 18h Kultur in Anwesenheit von ³H-Thymidin wurde die Proliferation der T-Zell-Populationen gemessen. Die gepoolten Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben. Die Statistik der zusammengefassten Daten (n=25) wurde mit dem paired student's t-test berechnet. *** = p<0,001, ns = nicht signifikant.

4.2.3.2 Einfluss von IL-2 auf die T-Zell-Proliferation nach Restimulation

Um den Einfluss von IL-2 auf die Anergie der beiden iTreg-Subpopulationen zu untersuchen, wurde im folgendem Versuch rekombinantes IL-2 in unterschiedlichen Konzentrationen zusammen mit anti-CD3 mAb in die T-Zell-Kulturen gegeben und die Proliferation anschließend mittels Nachweis der ³H-Thymidin-Inkorporation gemessen.

In Abb. 18 ist zu erkennen, dass die Proliferation der Teff mit zunehmender IL-2-Konzentration deutlich anstieg und bei 100U/ml IL-2 ein Plateau erreichte. Auch die iTreg⁺ zeigten eine IL-2-abhängige Proliferation, wenn auch im Vergleich zu den Teff eine signifikant verminderte Proliferation bei allen IL-2-Konzentrationen. Ihr anergischer Zustand konnte durch höhere Konzentrationen von IL-2 nur teilweise aufgehoben werden, wobei dieser Effekt ebenfalls ein Plateau bei 100U/ml IL-2 erreichte. Höhere Konzentrationen führten zu keiner weiteren Steigerung der Proliferation. Im Gegensatz hierzu konnte bei der iTreg⁻-Subpopulation keine IL-2-konzentrationsabhängige Proliferation beobachtet werden. Sie verblieben auch in Anwesenheit von IL-2 im anergen Zustand. Bereits ab 12,5U/ml IL-2 war der Unterschied zwischen den beiden iTreg-Subpopulationen signifikant und blieb konstant erhalten.

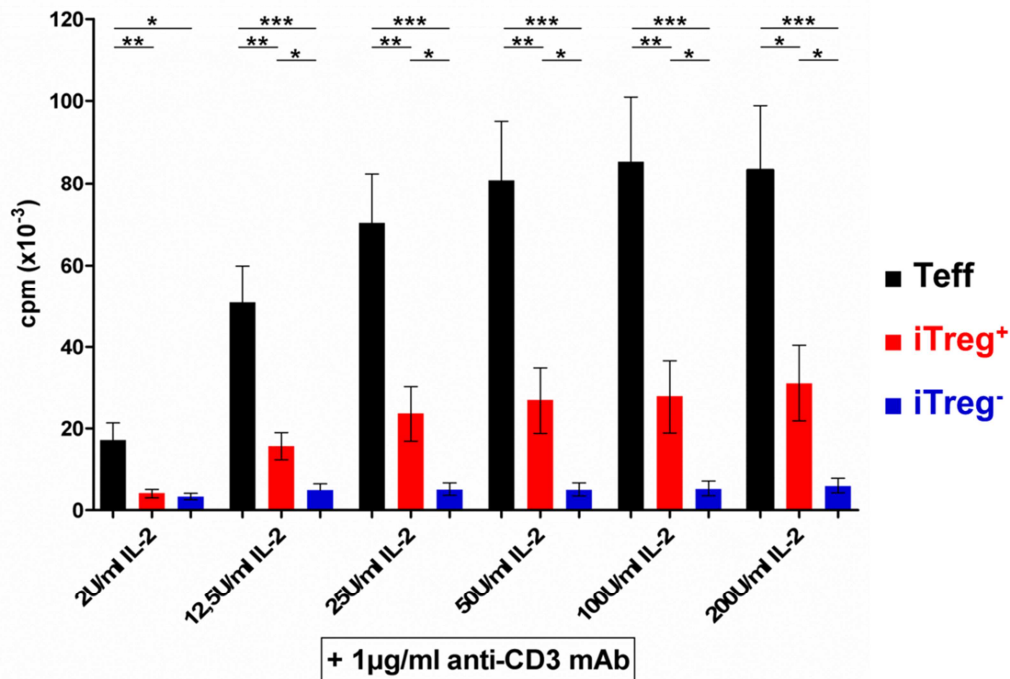


Abb. 18: Überprüfung des Einflusses von IL-2 auf die Proliferation der induzierten T-Zell-Populationen. Die T-Zell-Populationen wurden mit unterschiedlichen IL-2-Konzentrationen (2-200U/ml) und jeweils 1µg/ml anti-CD3-mAb für 72h restimuliert. Nach zusätzlichen 18h Kultur in Anwesenheit von ³H-Thymidin wurde die Proliferation der T-Zell-Populationen gemessen. Die gepoolten Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben. Die Statistik der zusammengefassten Daten (n=8) wurde mit dem paired student t-test berechnet. * = p<0,05, ** = p<0,01, *** = p<0,001.

4.2.4 Überprüfung der Viabilität der iTreg-Subpopulationen

In den nachfolgenden Abbildungen sind jeweils unter A ein exemplarisches Beispiel und unter B die zusammengefassten Daten der durchflusszytometrischen Analyse der Apoptose-Induktion gezeigt.

4.2.4.1 Apoptosemessung nach primärer T-Zell-Stimulation und Ruhephase

Parallel zur funktionellen Untersuchung der mDC-induzierten, CCR7^{high}-IL-10DC-induzierten und CCR7^{negative}-IL-10DC-induzierten T-Zellen wurde die Induktion der Apoptose bzw. die Viabilität der Zell-Populationen mittels 7-AAD/Annexin V-Färbung analysiert. In Abb. 19 A ist zunächst die durchflusszytometrische Analyse an Tag 5 der Primärkultur und Tag 3 der Ruhephase (Tag 0 der Restimulation) dargestellt. Insgesamt stieg die Frequenz nekrotischer (7-AAD⁺ bzw. 7-AAD⁺/Annexin V⁺) bzw. apoptotischer (Annexin V⁺) Zellen nach der Ruhephase im Vergleich zur Primärkultur bei allen T-Zell-Populationen gleichermaßen. Die T-Zell-Populationen zeigten erst nach der Ruhephase Unterschiede in der Frequenz nekrotischer Zellen. Die iTreg⁻-Subpopulation wies die höchste Frequenz nekrotischer Zellen auf, aber gleichzeitig den geringsten Anteil apoptotischer Zellen. Dies gilt sowohl an Tag 5 der

Primärkultur als auch nach der Ruhephase. Dies unterstützt die Ergebnisse zur verminderten Stimulation der induzierten iTreg⁻ (siehe Abschnitt 4.2.2).

Auch anhand der zusammengefassten Daten in Abb. 19 B lässt sich beobachten, dass sowohl nach primärer Stimulation als auch nach der Ruhephase die iTreg⁻-Kultur den größten Anteil nekrotischer Zellen aufwies. Aber auch die iTreg⁺-Subpopulation zeigte im Vergleich zu den Teff eine signifikant erhöhte Frequenz nekrotischer Zellen nach der Primärkultur bzw. der Ruhephase. Zwischen den beiden iTreg-Subpopulationen selbst waren jedoch erst nach der Ruhephase signifikante Unterschiede zu beobachten. Der Anteil nekrotischer Zellen in den Kulturen liegt nach primärer Stimulation im Mittel bei 10-15%, und nach der Ruhephase bei 20-30%. Zudem waren größere Schwankungen zwischen den einzelnen Versuchsansätzen bei den untersuchten T-Zell-Populationen zu beobachten.

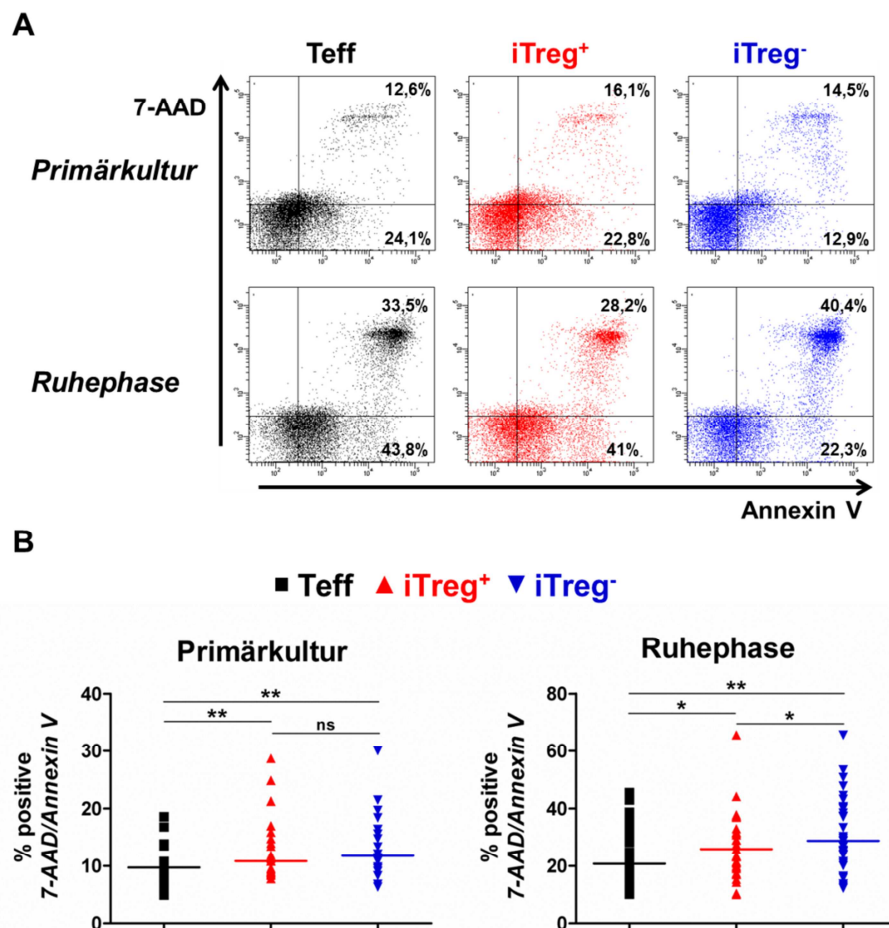


Abb. 19: Durchflusszytometrische Analyse der Apoptose-Induktion nach primärer T-Zell-Stimulation und nach der T-Zell-Ruhephase. Parallel zur Primärkultur und der Ruhephase wurde die Apoptose-Induktion in den T-Zell-Populationen mittels 7-AAD/Annexin V-Färbung und anschließender Durchflusszytometrie ermittelt. **A** Gezeigt ist ein exemplarisches Beispiel für die durchflusszytometrische Analyse der Apoptose-Induktion nach Primärkultur (oben) und nach der Ruhephase (unten). Mit Ende der Primärkultur (d5) bzw. der Ruhephase (d3/4) erfolgte die Messung der doppelt positiven Zellen. **B** Es ist der Median der gepoolten Daten (PK n=22, Ruhe n=35) angegeben. Die Statistik wurde mit dem paired student's t-test berechnet. * = p<0,05, ** = p<0,01, ns = nicht signifikant.

4.2.4.2 Apoptosemessung im Restimulationstest

Während nach der Primärkultur und der Ruhephase noch ein hoher Anteil an viablen Zellen in der jeweiligen T-Zell-Kultur zu finden war, zeigten die Daten zur Restimulation eine deutlich erhöhte Frequenz nekrotischer Zellen in allen T-Zell-Populationen (Abb. 20). Wie bereits zuvor beschrieben, ließen sich deutliche Schwankungen innerhalb der Versuchsansätze beobachten. Bei fehlender Stimulation zeigten alle untersuchten T-Zell-Populationen gleichermaßen einen erhöhten Anteil nekrotischer Zellen. Bei Betrachtung der anti-CD3/anti-CD28-mAb-Stimulation jedoch zeigten beide iTreg-Subpopulationen (Ø 75%) einen signifikant erhöhten Anteil nekrotischer Zellen in der Kultur im Vergleich zu den Teff (Ø 60%). Gleichzeitig war in diesem Beispiel die Frequenz apoptotischer Zellen in beiden iTreg-Subpopulation-Kulturen verglichen mit der Teff-Kultur vermindert (Abb. 20 A). Zwischen den beiden iTreg-Subpopulationen selbst lag jedoch hinsichtlich der Viabilität kein Unterschied vor.

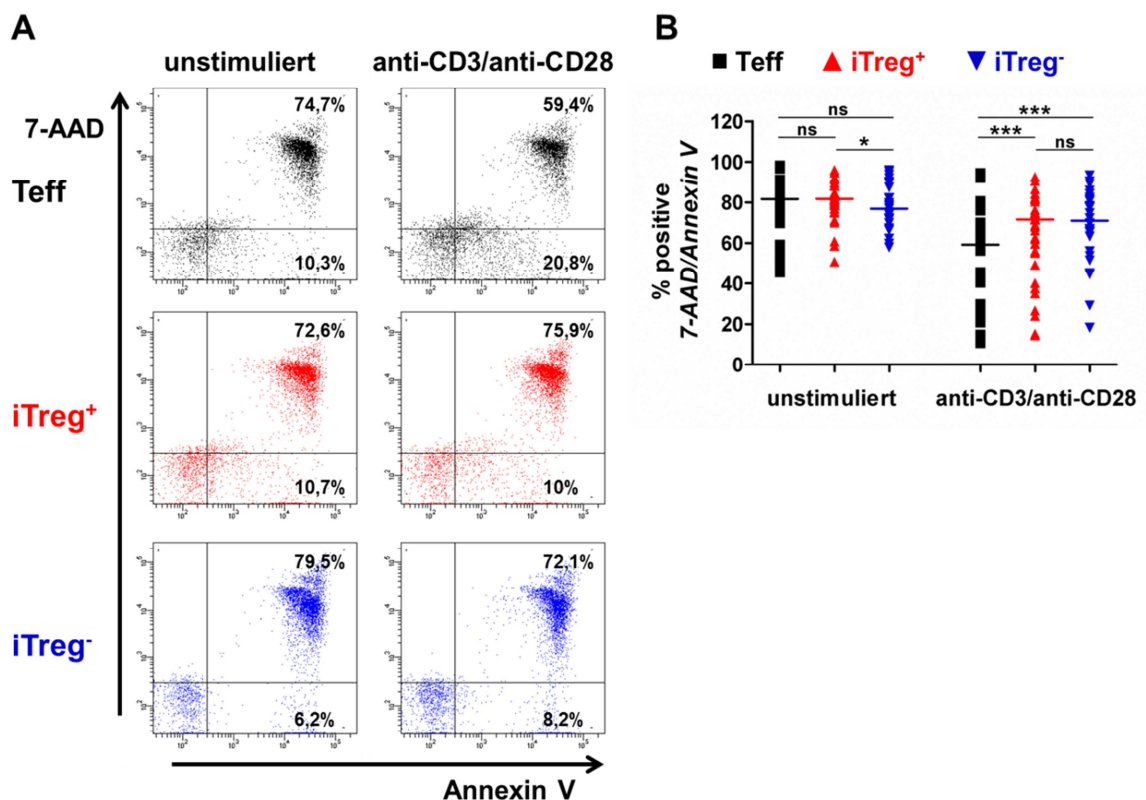


Abb. 20: Durchflusszytometrische Analyse der Apoptose-Induktion nach polyklonaler T-Zell-Restimulation. Parallel zur polyklonalen Restimulation wurde die Apoptose-Induktion in den T-Zell-Populationen mittels 7-AAD/Annexin V-Färbung und anschließender Durchflusszytometrie ermittelt. **A** Gezeigt ist ein exemplarisches Beispiel für die durchflusszytometrische Analyse der Apoptose-Induktion nach polyklonaler Restimulation. Mit Ende des Restimulations-Assays erfolgte die Messung. **B** Es ist der Median der gepoolten Daten (n=33) angegeben. Die Statistik wurde mit dem paired student's t-test berechnet. *** = p<0,001, ns = nicht signifikant.

4.2.4.3 Einfluss der IL-2-Stimulation auf die Apoptose-Induktion

Parallel zur Untersuchung des IL-2-Einflusses auf die iTreg-Subpopulationen wurde auch die Apoptose-Induktion bei den einzelnen T-Zell-Populationen bestimmt (Abb. 21). Die CCR7^{negative}-IL-10DC-induzierten T-Zellen zeigten insgesamt eine erhöhte Frequenz nekrotischer Zellen im Vergleich zu den beiden anderen T-Zellpopulationen. Es ist deutlich zu erkennen, dass die iTreg⁻-Subpopulation keine deutliche Verbesserung mit steigender IL-2-Konzentration in ihrer Viabilität aufwies, während jedoch ein geringerer Anteil apoptotischer Zellen innerhalb der Teff (Ø 25-30%) und der iTreg⁺ (Ø 45-50%) gemessen werden konnte. Während eine steigende IL-2-Konzentration somit eine positive Auswirkung auf das Überleben der Teff und zu einem geringeren Teil auch der iTreg⁺-Subpopulation ausübte, sprach die iTreg⁻-Subpopulation in diesem System nicht auf das exogene IL-2 an.

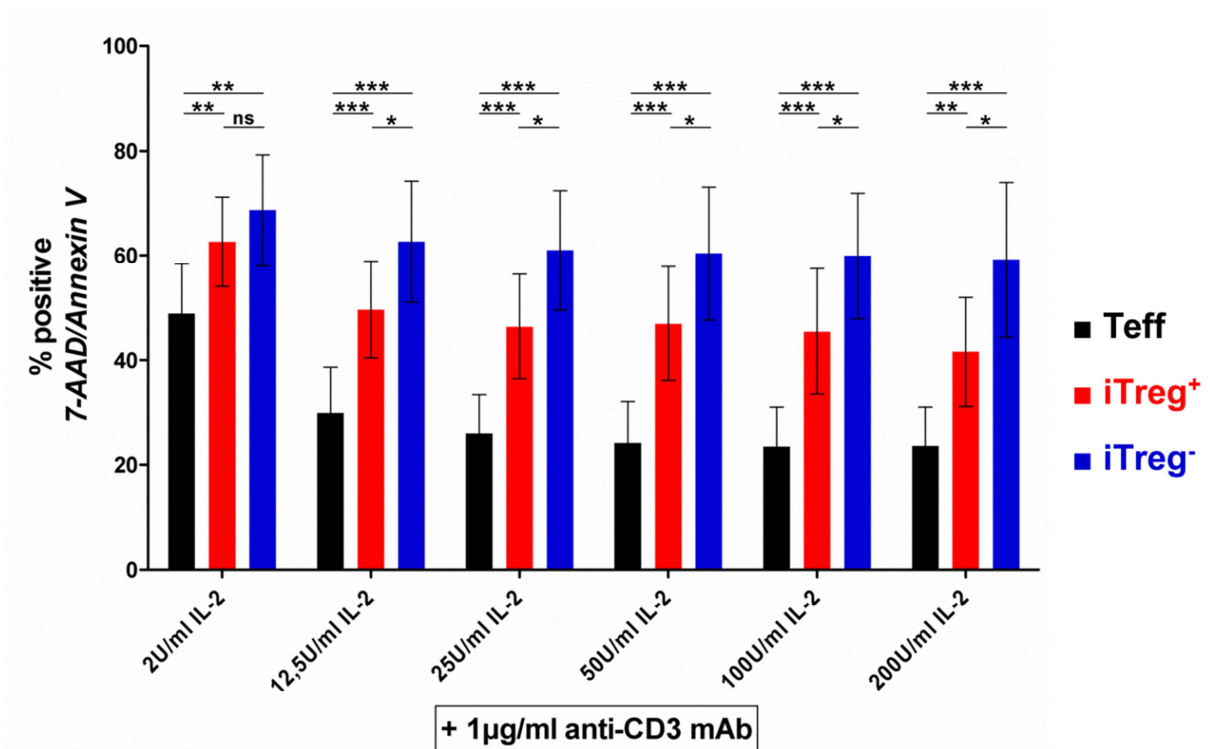


Abb. 21: Durchflusszytometrische Analyse der Apoptose-Induktion in den induzierten T-Zell-Populationen unter IL-2-Einfluss. Parallel zur Untersuchung des IL-2-Einflusses auf die T-Zell-Proliferation wurde die Apoptose-Induktion in den T-Zell-Populationen mittels 7-AAD/Annexin V-Färbung und anschließender Durchflusszytometrie ermittelt. Nach insgesamt 72h + 16-18h Restimulation erfolgte die Messung. Es ist der Mittelwert ± SD der gepoolten Daten der doppelt positiven Zellen (n=8) angegeben. Die Statistik wurde mit dem paired student's t-test berechnet. * = p<0,05, ** = p<0,01, *** = p<0,001, ns = nicht signifikant.

4.2.5 Expression von T-Zell-Differenzierungs- und -Aktivierungsmarkern

Die Expression der Transkriptionsfaktoren *T-bet* und *GATA-3*, die charakteristisch von T_H1 bzw. T_H2 -Zellen exprimiert werden, sowie deren charakteristischen Zytokine *IFN γ* und *IL-5* wurde hier auf mRNA-Ebene in einer Restimulations-Kinetik (t=0h, 1h, 5h, 24h) mittels RT-PCR bestimmt. Angegeben ist hierbei die relative Expression der jeweiligen mRNA, d.h. es wurde auf den Wert der Effektor-T-Zellen zum Zeitpunkt t=0h normalisiert (=1) (Abb. 22).

Sowohl für *T-bet* als auch für *GATA-3* zeigten beide iTreg-Subpopulationen eine signifikant geringere Expression dieser Transkriptionsfaktoren bereits zu Beginn der Restimulationskinetik (t=0h) im Vergleich zu den Teff, wobei keine Unterschiede zwischen den beiden iTreg-Subpopulationen bestimmt werden konnten. Bei beiden iTreg-Subpopulationen war für *T-bet* und für *GATA-3* eine signifikant geringere Expression dieser T-Zell-Differenzierungsmarker bereits 5h nach Restimulation im Vergleich zu den Teff zu beobachten. Dieser Unterschied war für *T-bet* bereits 1h nach T-Zell-Aktivierung zu erkennen. Die Effektor-T-Zellen erreichten einen Durchschnittswert von 3 für *T-bet* bzw. 1,5 für *GATA-3* (t=5h), während beide iTreg-Subpopulationen signifikant verminderte Durchschnittswerte (<1) sowohl für *T-bet* als auch *GATA-3* (t=5h) erzielten. Gleichzeitig zeigten sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen der iTreg⁺- und der iTreg⁻-Subpopulation hinsichtlich der *T-bet*-Expression, während bereits 1h nach Restimulation eine signifikant reduzierte *GATA-3*-Expression bei den iTreg⁻ verglichen mit der iTreg⁺-Subpopulation zu erkennen war.

Bei Betrachtung der mRNA-Level der Zytokine *IFN γ* und *IL-5* zeigten die Daten vergleichbare Ergebnisse. Die Effektor-T-Zellen erzielten Durchschnittswerte von 9 für *IFN γ* bzw. 15 für *GATA-3* (t=5h) im Vergleich zur Kontrolle (Teff, t=0h), während beide iTreg-Subpopulationen einen ähnlichen, signifikant verminderten Durchschnittswert (<2) für *IFN γ* (t=5h) erreichten. Der Durchschnittswert der *IL-5*-Expression (t=5h) lag bei den iTreg⁺ bei 2 und bei der iTreg⁻-Subpopulation bei 1.

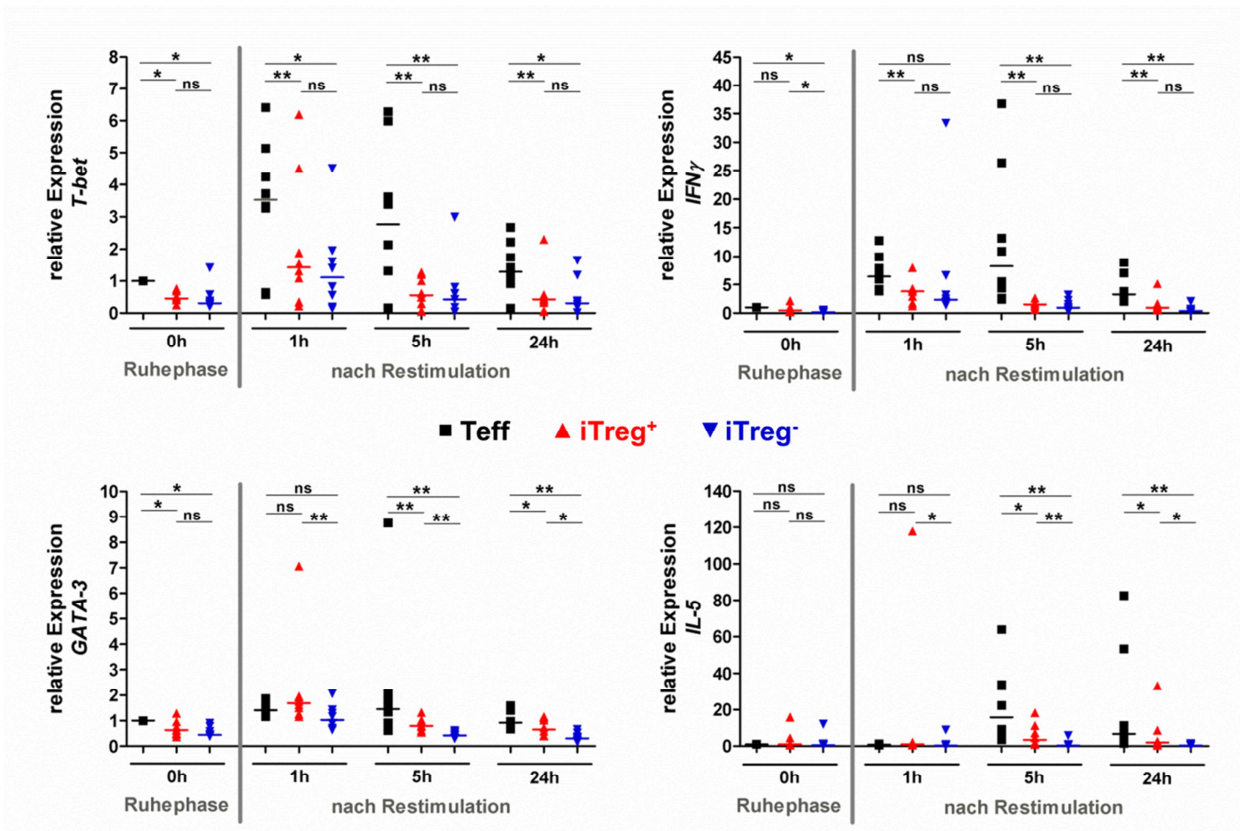


Abb. 22: Expression von T_H1- und T_H2-Differenzierungsmarkern mittels RT-PCR-Analyse. Zu den Zeitpunkten t=0h (Ruhephase) und nach 1h, 5h und 24h polyklonaler Restimulation wurden die T-Zellen gewonnen und die mRNA-Level von *T-bet*, *GATA-3*, *IFN γ* und *IL-5* bestimmt. Angegeben ist hierbei die relative Expression der jeweiligen mRNA, d.h. es wurde auf den Wert der Effektor-T-Zellen zum Zeitpunkt t=0h normalisiert (=1). Oben ist das Ergebnis der RT-PCR-Analyse zur T_H1-Differenzierung (*T-bet* und *IFN γ*), unten das Ergebnis zur T_H2-Differenzierung (*GATA-3* und *IL-5*) dargestellt. Es ist der Median der zusammengefassten Daten (n=8) angegeben. Die Statistik wurde mit dem Wilcoxon matched pairs test bestimmt. * = p<0,05, ** = p<0,01, ns = nicht signifikant.

Neben charakteristischen Transkriptionsfaktoren der T-Zell-Differenzierung wurde auch die Expression von *Foxp3*, *IL-2* sowie *NFATc1* und *NFATc2* nach der bereits oben beschriebenen Methode untersucht (Abb. 23).

Eine hohe *Foxp3*-Expression ist charakteristisch für nTreg, aber auch in aktivierten humanen Effektor-T-Zellen zu beobachten. Die Teff und die iTreg⁺-Subpopulation zeigten bereits zum Zeitpunkt t=0h eine vergleichbare *Foxp3*-Expression, welche bei beiden T-Zell-Populationen nach 5h ($\bar{\Delta}$ 2) und 24h ($\bar{\Delta}$ 1,5 bzw. 2,5) deutlich anstieg, während die iTreg⁻-Subpopulation im Durchschnittswert keinen Anstieg der *Foxp3*-Expression aufwies. Die Unterschiede zwischen den Populationen waren zudem teilweise nur tendenziell, wobei die iTreg⁻ eine signifikant reduzierte *Foxp3*-Expression zeigte.

Es ist bekannt und zudem charakteristisch, dass in anergen T-Zellen die IL-2-Produktion stark reduziert vorliegt. Eine 20-fach erhöhte *IL-2*-Expression (t=5h) verglichen zum Zeitpunkt t=0h konnte bei den Effektor-T-Zellen gemessen werden.

Signifikante Unterschiede zwischen den Teff und den beiden iTreg-Subpopulationen zeigten sich bereits 1h nach Restimulation, wobei diese Unterschiede am deutlichsten nach 5h zu sehen waren. Die beiden iTreg-Subpopulationen erreichten im Vergleich zur Kontrolle (Teff, t=0h) lediglich Durchschnittswerte von 9 (iTreg⁺) bzw. 2 (iTreg⁻) für den 5h-Zeitpunkt.

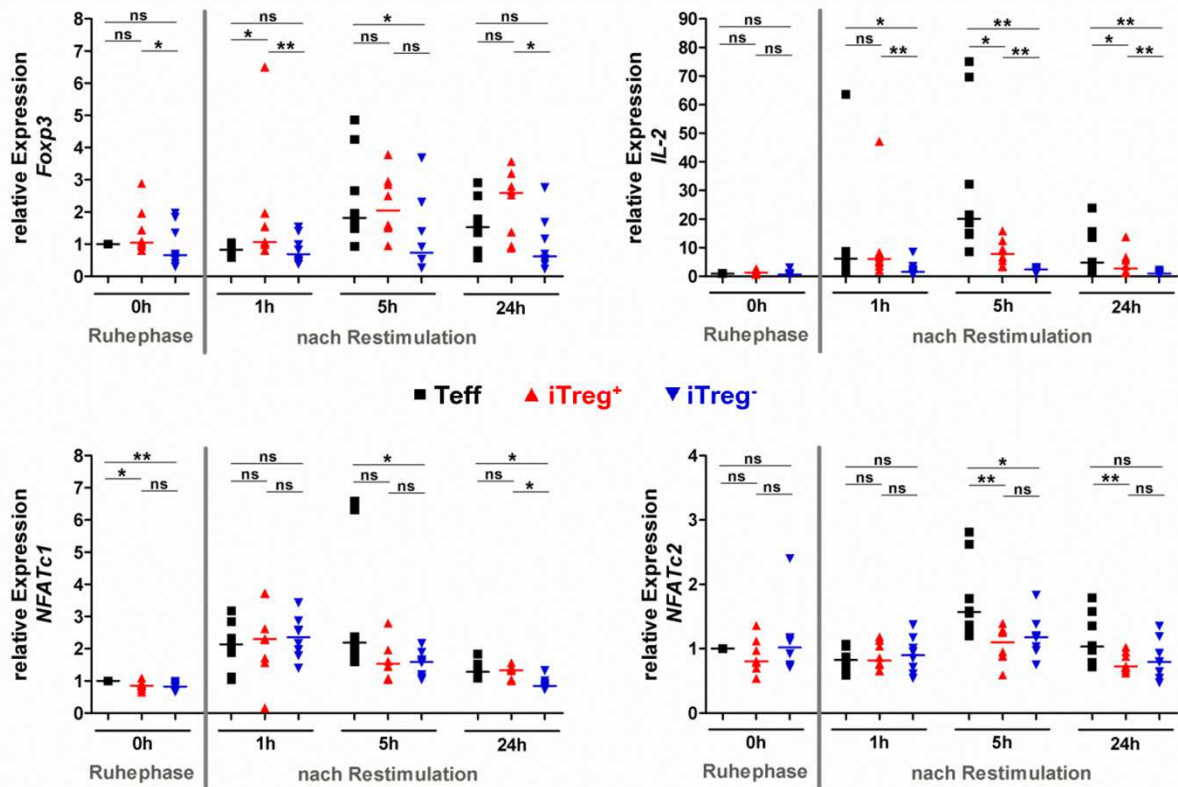


Abb. 23: Expression von *Foxp3*, *IL-2*, *NFATc1* und *NFATc2* mittels RT-PCR-Analyse. Zu den Zeitpunkten t=0h (Ruhephase) und nach 1h, 5h und 24h polyklonaler Restimulation wurden die T-Zellen gewonnen und die mRNA-Level der verschiedenen Parameter bestimmt. Angegeben ist hierbei die relative Expression der jeweiligen mRNA, d.h. es wurde auf den Wert der Effektor-T-Zellen zum Zeitpunkt t=0h normalisiert (=1). Oben sind die Ergebnisse der RT-PCR-Analyse für *Foxp3* und *IL-2*, unten von *NFATc1* und *NFATc2* dargestellt. Es ist der Median der zusammengefassten Daten (n=8) angegeben. Die Statistik wurde mit dem Wilcoxon matched pairs test bestimmt. * = p<0,05, ** = p<0,01, ns = nicht signifikant.

Die Transkriptionsfaktoren NFATc1 und NFATc2 sind beide involviert in der T-Zell-Aktivierung und der Zytokin-Produktion. Bei Betrachtung der *NFATc1*- und *NFATc2*-Expression zeigt sich, dass beide iTreg-Subpopulationen diese verglichen mit den Effektor-T-Zellen signifikant vermindert exprimierten. Dies wurde 5h nach Restimulation besonders deutlich, wobei die Unterschiede nach 24h teilweise nur noch als Tendenzen bestimmt werden konnten. Zwischen den beiden iTreg-Subpopulationen selbst zeigten sich jedoch keine deutlichen Unterschiede in der mRNA-Expression beider Transkriptionsfaktoren. Während der Durchschnittswert der

relativen *NFAT-c1*-Expression (t=5h) bei den Teff bei 2,5 lag, wurde für die *NFATc2*-Expression ein Durchschnittswert von 1,5 erzielt (t=5h). Beide iTreg-Subpopulationen erreichten hingegen Durchschnittswerte von 1,5 für *NFATc1* bzw. 1 für *NFATc2* (t=5h).

Zusammengefasst zeigten die beiden iTreg-Subpopulationen eine deutlich verminderte mRNA-Expression der charakteristischen T_H1- und T_H2-spezifischen Transkriptionsfaktoren. Insbesondere *IL-2* wurde von beiden anergen iTreg-Subpopulationen im Vergleich zu den Effektor-T-Zellen signifikant vermindert exprimiert. Aber auch zwischen den beiden iTreg-Subpopulationen selbst ließen sich signifikante Unterschiede in der *Foxp3*- und *IL-2*-Expression beobachten, wobei die iTreg⁻-Subpopulation stets eine geringere Expression aufwies als die iTreg⁺-Subpopulation. Für die Transkriptionsfaktoren *NFATc1* und *NFATc2* konnte teilweise nur eine tendenziell verminderte Expression im Vergleich zu den Teff bestimmt werden.

4.2.6 Zytokinprofil der T-Zellpopulationen

4.2.6.1 Konzentrationsbestimmung mittels ELISA

Die Bestimmung des mRNA-Levels gibt lediglich Hinweise auf die T-Zell-Differenzierung und Zytokin-Produktion, da aufgrund potenziell posttranskriptioneller Modulationen die Protein-Produktion nicht zwangsläufig mit dem mRNA-Level korreliert. Daher wurde die Zytokin-Sezernierung in Kulturüberständen gemessen.

Die in Abb. 24 dargestellten Ergebnisse zeigen das Zytokinprofil (IFN γ , IL-5, IL-13, IL-10, sIL-2R α) der untersuchten T-Zell-Populationen nach der primären Stimulation an Tag 5 (Primärkultur) und der polyklonalen Restimulation nach 24h. Insbesondere in der Primärkultur zeigte sich, dass beide iTreg-Subpopulationen signifikant geringe Konzentrationen der typischen T_H1- und T_H2-Zytokine IFN γ , IL-5 und IL-13 sezernierten. Gleichzeitig wies die CCR7^{high}-IL-10DC-induzierte T-Zell-Kultur eine deutlich höhere Freisetzung dieser Zytokine gegenüber der CCR7^{negative}-IL-10DC-induzierten iTreg-Subpopulation auf. Nach Restimulation der T-Zell-Populationen verringerte sich die absolut gemessene Zytokin-Konzentration. Dennoch konnten weiterhin signifikante Unterschiede beim Vergleich der Teff mit den beiden iTreg-Subpopulationen und beim Vergleich der iTreg⁺- mit der iTreg⁻-Subpopulation beobachtet werden.

Während bereits in der Primärkultur die beiden iTreg-Subpopulationen einen tendenziellen Anstieg des immunsuppressiven Zytokins IL-10 aufwiesen, konnte dieser Unterschied zu den Teff nach Restimulation nicht mehr gemessen werden. Zwischen den beiden iTreg-Subpopulationen selbst waren weder nach der primären Stimulation noch Restimulation signifikante Unterschiede in der IL-10-Freisetzung nachweisbar.

Bei der CCR7^{high}-IL-10DC-Subpopulation konnte im Vergleich zu mDC und den CCR7^{negative}-IL-10DC eine signifikant erhöhte sCD25-Sezernierung nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 4.1.3). Daher wurde überprüft, ob dieser Unterschied auch in den Kulturen der DC-induzierten T-Zell-Populationen zu beobachten ist. Sowohl in der Primärkultur als auch nach Restimulation wiesen die Effektor-T-Zellen die höchste sCD25-Sezernierung auf, während hingegen beide iTreg-Subpopulationen eine signifikant verminderte Sezernierung der löslichen Form von CD25 verglichen mit den Teff zeigten. Zudem konnte eine signifikant reduzierte Freisetzung von sCD25 bei der iTreg-Subpopulation verglichen mit den iTreg⁺ beobachtet werden. Wie im Falle der T_H1- und T_H2-Zytokine sowie IL-10 nahm die Sezernierung von sCD25 nach Restimulation im Vergleich zur Primärkultur bei allen T-Zell-Populationen deutlich ab.

Zusammengefasst produzierten beide iTreg-Subpopulationen deutlich geringere Mengen der charakteristischen T_H1- und T_H2-Zytokine sowie des löslichen CD25 im Vergleich zu den Effektor-T-Zellen. Gleichzeitig wurde das immunsuppressive Zytokin IL-10 nur in sehr geringen und nicht signifikant unterschiedlichen Mengen sezerniert.

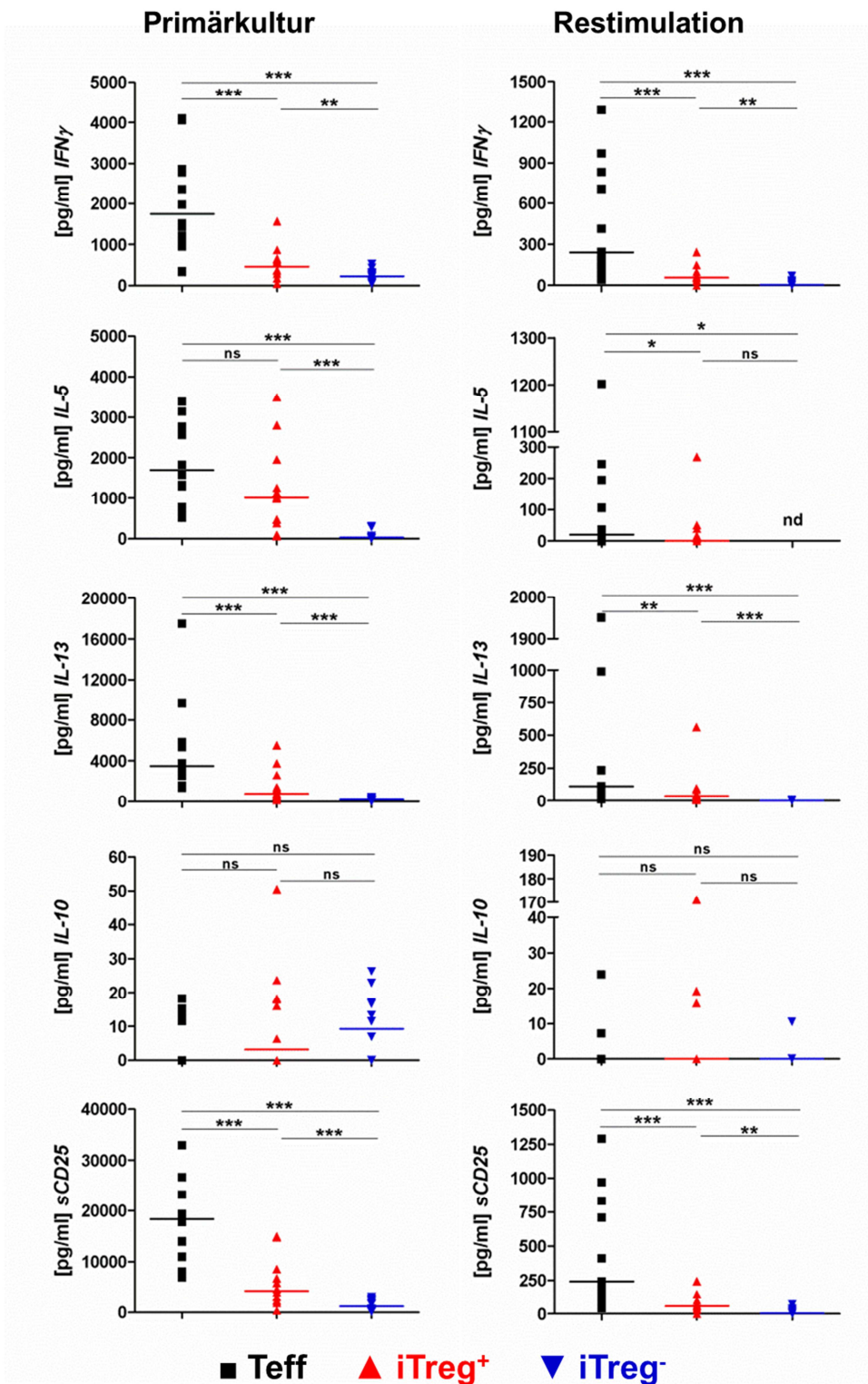


Abb. 24: Zytokinprofil und sCD25-Shedding der DC-induzierten T-Zell-Populationen. Es wurden in den Kulturüberständen die Zytokin-Konzentrationen IFN γ , IL-5, IL-13, IL-10 sowie sCD25 mittels ELISA bestimmt. Links sind die Daten nach 5-tägiger primärer Stimulation, rechts die Daten nach 24h Restimulation dargestellt. Es ist jeweils der Median der zusammengefassten Daten (n=12) angegeben. Die Statistik wurde mit dem Wilcoxon matched pairs test berechnet. * = p<0,05, ** = p<0,01, *** = p<0,001, ns = nicht signifikant.

4.2.6.2 Analyse der IL-2 Produktion mittels intrazellulärem FACS

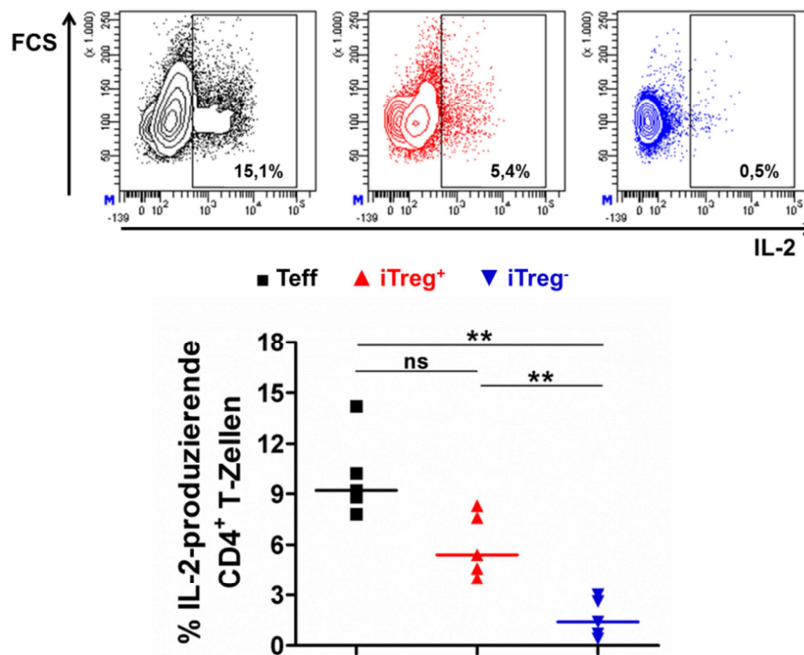


Abb. 25: Bestimmung der IL-2-Produktion in den induzierten T-Zell-Populationen. Die T-Zell-Populationen wurden mit anti-CD3/anti-CD28-mAb über Nacht restimuliert und anschließend für weitere 5h mit PMA/Ionomycin/Golgi-Stop stimuliert. Oben ist ein exemplarisches Beispiel für die durchflusszytometrische Analyse der IL-2-produzierenden Zellen in der jeweiligen T-Zell-Population gezeigt. Unten ist jeweils der Median der zusammengefassten Daten (n=5) angegeben. Die Statistik wurde mit dem paired student's t-test berechnet. ** = $p < 0,01$, ns = nicht signifikant.

Aufgrund der schnellen Verwertung des autokrinen IL-2 im Kulturmedium durch die T-Zellen kann die Konzentration des Zytokins mittels ELISA nicht verlässlich gemessen werden. Aus diesem Grund wurde eine intrazelluläre FACS-Messung durchgeführt. Hierfür wurden die T-Zell-Populationen zunächst polyklonal restimuliert und anschließend mit PMA/Ionomycin/Golgi-Stop stimuliert, wodurch eine IL-2-Akkumulation erwirkt wurde. Die Frequenz der IL-2-produzierenden, lebenden T-Zellen konnte nach der Färbung anschließend mithilfe der durchflusszytometrischen Analyse bestimmt werden.

In Abb. 25 ist anhand der exemplarischen (oben) und der zusammengefassten (unten) Ergebnisse zu beobachten, dass die mDC-induzierte Effektor-T-Zell-Population die größte Frequenz an IL-2-Produzenten (ca. 10%) umfasste, gefolgt von der CCR7^{high}-IL-10DC-induzierten (ca. 6%) und zuletzt der CCR7^{negative}-IL-10DC-induzierten Treg-Subpopulation (ca. 2%). Während zwischen den Teff und der iTreg⁺-Subpopulation lediglich ein tendenzieller Unterschied in der Anzahl IL-2-produzierender Zellen vorlag, zeigte die iTreg⁻-Subpopulation jeweils eine signifikant

verminderte Frequenz IL-2⁺-T-Zellen im Vergleich zu den Teff und der iTreg⁺-Subpopulation.

4.2.7 Regulatorische Funktion der induzierten anergen Treg-Subpopulationen - Suppressorassays

4.2.7.1 Durchflusszytometrische Analyse mittels Proliferationsfarbstoffen

Im Gegensatz zur Standardmethode der ³H-Thymidin-Inkorporation kann mithilfe der durchflusszytometrischen Analyse die Proliferationsrate einzelner Zellpopulationen, die mit unterschiedlichen Proliferationsfarbstoffen gefärbt werden, bestimmt werden. Diese Methode wurde daher für die Untersuchung der regulatorischen Funktion der beiden iTreg-Subpopulationen im Folgenden angewandt.

In Abb. 26 ist zunächst ein exemplarisches Beispiel für die durchflusszytometrische Analyse der regulatorischen Funktion der beiden iTreg-Subpopulationen unter verschiedenen Stimulationsbedingungen (syngene mDC, PBMC + 1µg/ml anti-CD3 mAb, 0,5µg/ml anti-CD3 + 0,25µg/ml anti-CD28 mAb, 1µg/ml anti-CD3 + 0,5µg/ml anti-CD28) dargestellt. Interessanterweise wurde die Proliferation der Responder-T-Zellen in den Kokulturen mit beiden iTreg-Populationen von der jeweiligen iTreg-Subpopulation inhibiert. Im Falle der mDC-Stimulation (diese mDC sind syngen zur Primärstimulation) wiesen die Responder-T-Zell-Proliferationen der beiden iTreg-Kokulturen in diesem Beispiel keinen Unterschied auf, während bei der Stimulation mit PBMC + 1µg/ml anti-CD3 mAb und den beiden anti-CD3 mAb/anti-CD28 mAb-Konzentrationen die Frequenz der proliferierenden Responder-T-Zellen in der iTreg⁺-Kokultur stärker inhibiert wurde als in der Kokultur mit der iTreg⁻-Subpopulation. Gleichzeitig wurde für die beiden iTreg-Subpopulationen beobachtet, dass der anerge Zustand der beiden iTreg-Populationen (siehe Abschnitt 4.2.3.1) in diesem Testsystem aufgehoben und damit anscheinend keine Voraussetzung für die regulatorische Kapazität war. Im Vergleich mit der iTreg⁺-Subpopulation konnte jedoch bei den iTreg⁻ eine geringere Frequenz der Teilungsschritte, insbesondere bei der Stimulation mit PBMC bzw. anti-CD3/anti-CD28-mAb, beobachtet werden.

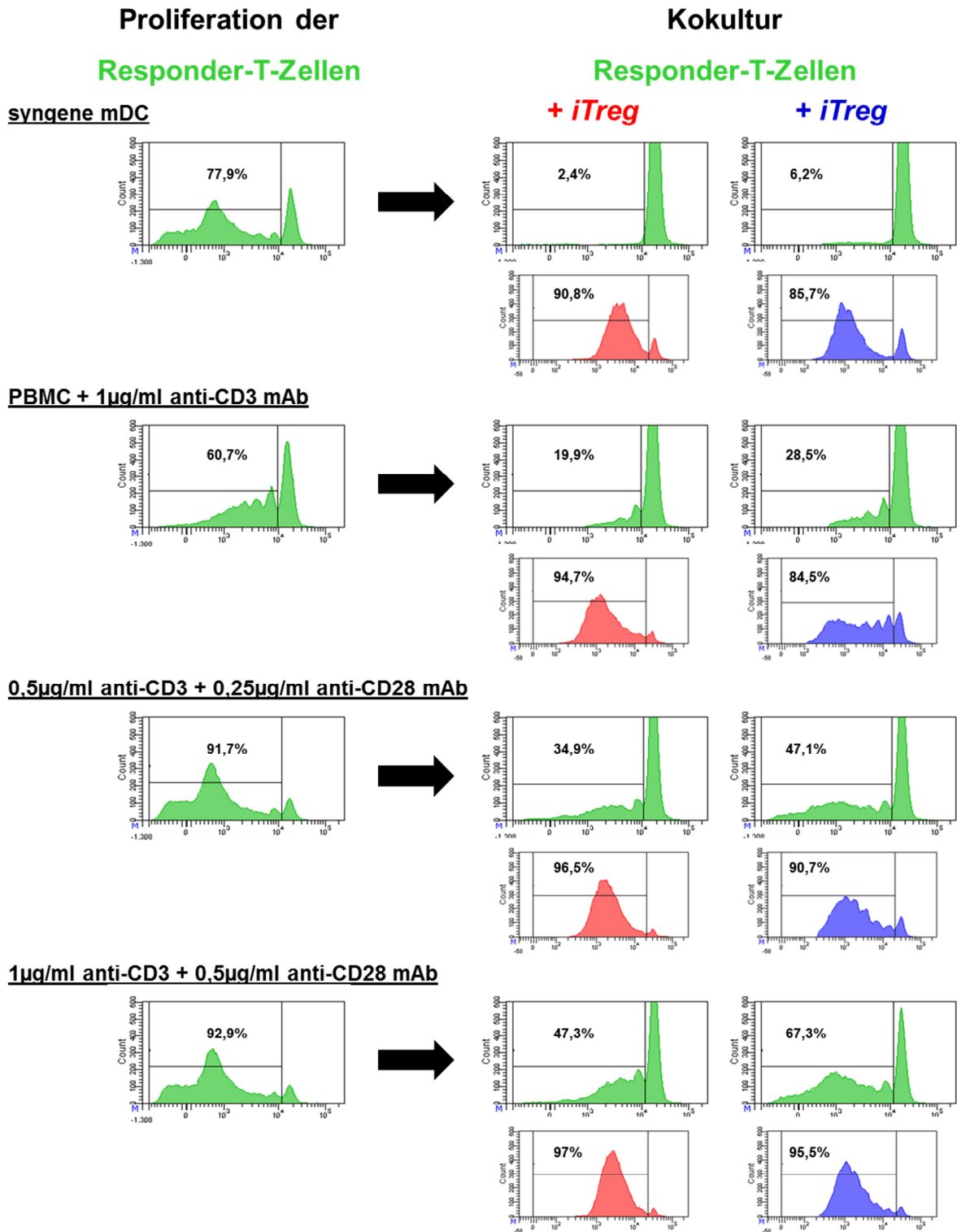


Abb. 26: Exemplarisches Beispiel der durchflusszytometrischen Analyse der suppressiven Kapazität der iTreg-Subpopulationen. Die Responder-T-Zellen wurden zusammen mit der jeweiligen iTreg-Subpopulation 5 Tage kultiviert und entweder mit syngenen mDC, PBMC + anti-CD3 mAb oder anti-CD3/anti-CD28-mAb restimuliert. An Tag 5 erfolgte die Messung der T-Zell-Proliferation mittels Durchflusszytometrie. Hierfür wurden am Tag 0 der Restimulation die Responder-T-Zellen mit dem Proliferationsfarbstoff efluor670 und die beiden iTreg-Subpopulationen mit Celltrace Violet markiert.

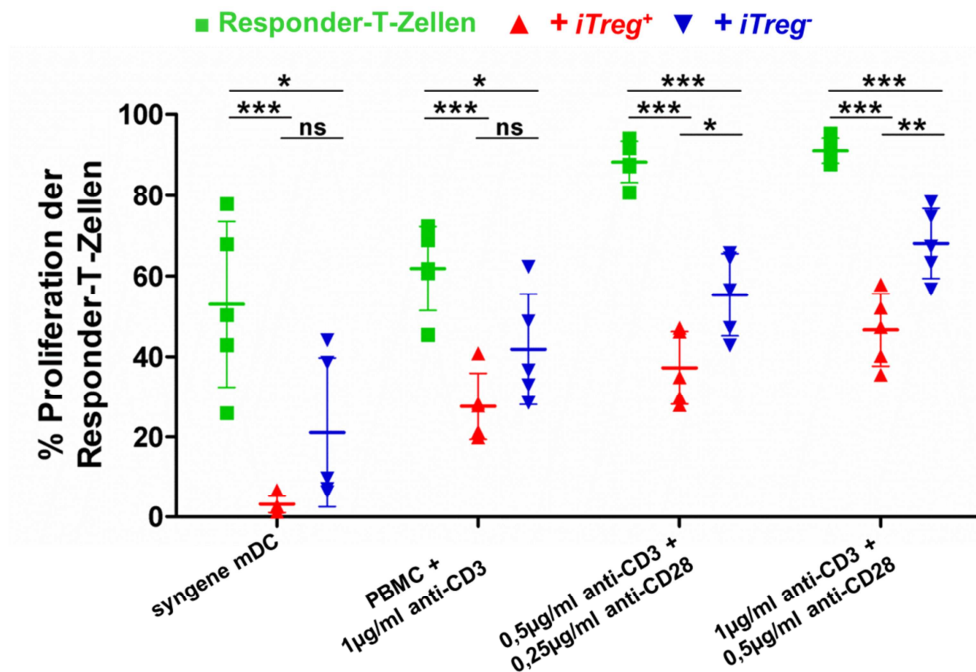


Abb. 27: Durchflusszytometrische Analyse der suppressiven Kapazität der iTreg-Subpopulationen. Die Responder-T-Zellen wurden zusammen mit der jeweiligen iTreg-Subpopulation unter der angegebenen Stimulation (mDC, PBMC, anti-CD3/anti-CD28-mAb) 5 Tage kultiviert. Für die durchflusszytometrische Messung der T-Zell-Proliferation wurden am Tag 0 der Restimulation die Responder-T-Zellen mit dem Proliferationsfarbstoff efluor670 und die beiden iTreg-Subpopulationen mit Celltrace Violet markiert. Angegeben ist der Mittelwert \pm SD der Responder-T-Zell-Proliferation in Einzelkultur (grün) und in Kokultur mit der jeweiligen iTreg-Subpopulation (rot bzw. blau). Die Statistik der gepoolten Daten (n=5) wurde mit dem paired student's t-test berechnet. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, ns = nicht signifikant.

Wie bereits am obigen exemplarischen Beispiel beschrieben, zeigten die Responder-T-Zellen auch bei den zusammengefassten Daten (Abb. 27) unter der jeweiligen Stimulationsbedingung eine starke Proliferation, wobei die Responder-T-Zell-Proliferation durch mDC-Stimulation höhere Abweichungen in den einzelnen Versuchen aufwies. In Kokultur mit der jeweiligen iTreg-Subpopulation war die Proliferation der Responder-T-Zellen insgesamt signifikant inhibiert, so dass abhängig von der Stimulation für beide iTreg-Subpopulationen eine hohe suppressive Aktivität bestimmt werden konnte. Zudem zeigt sich, dass die Inhibition der Responder-T-Zell-Proliferation in der iTreg⁻-Kokultur im Vergleich zu der iTreg⁺-Kokultur deutlich vermindert vorlag, d.h. die iTreg⁻ eine signifikant verminderte Suppressoraktivität aufwies. Die Unterschiede zwischen den beiden iTreg-Subpopulationen traten bei der Stimulation mit mDC bzw. PBMC jedoch nur tendenziell auf. Die Proliferation der Responder-T-Zellen in der iTreg⁻-Kokultur wiesen insgesamt deutlich größere Schwankungen auf als in Kokultur mit der iTreg⁺-Subpopulation.

Zur Bestimmung der regulatorischen Kapazität der beiden iTreg-Subpopulationen wurde anhand der durchflusszytometrischen Daten die prozentuale Suppression berechnet (Abb. 28). Es ist zu beobachten, dass unter der mDC-Stimulation beide iTreg-Subpopulationen ihre höchste suppressive Kapazität besaßen, wobei die iTreg⁺-Subpopulation tendenziell die stärkere regulatorische Funktion aufwies. Bei den Stimulationen mit PBMC bzw. beiden anti-CD3/anti-CD28-mAb zeichnete sich eine insgesamt verminderte suppressive Kapazität der beiden iTreg-Subpopulationen ab, wobei auch hier stets die iTreg⁺-Subpopulation die signifikant höhere suppressive Kapazität zeigte.

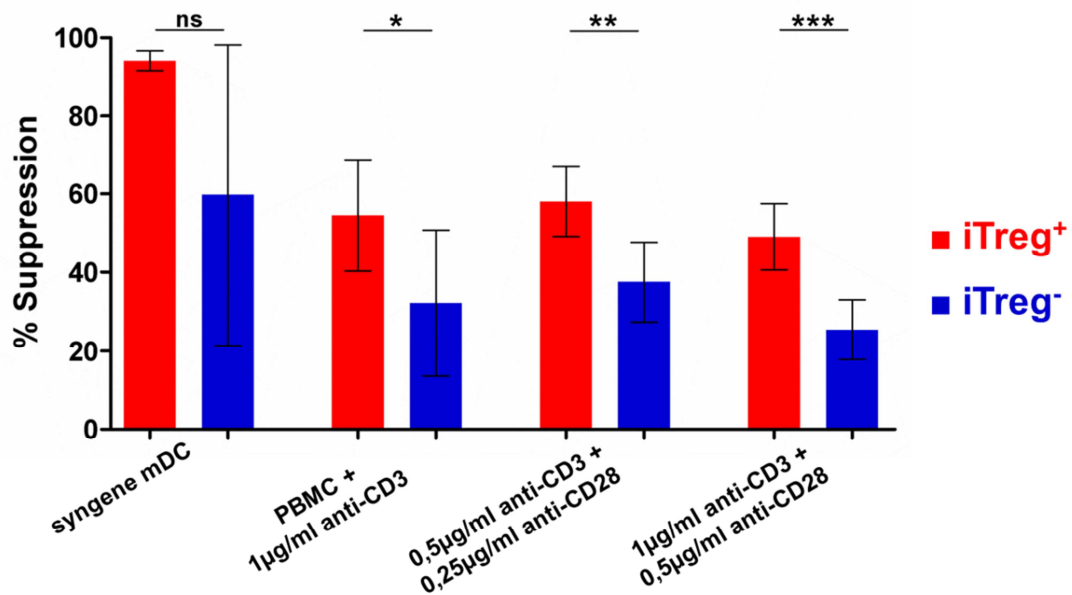


Abb. 28: Berechnung der prozentualen suppressiven Kapazität der beiden iTreg-Subpopulationen. Anhand der durchflusszytometrischen Daten wurde die Suppression der jeweiligen iTreg-Subpopulation prozentual berechnet werden. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD der zusammengefassten Daten (n=5). Die Statistik wurde mit dem paired student's t-test berechnet. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, ns = nicht signifikant.

5 Diskussion

Humane IL-10-modulierte tolerogene dendritische Zellen (IL-10DC) stellen eine heterogene DC-Population dar, die sich aus zwei phänotypisch unterschiedlichen Subpopulationen zusammensetzt. Diese Heterogenität der IL-10DC ließ vermuten, dass diese Subpopulationen möglicherweise T-Zell-Populationen mit unterschiedlichen Charakteristika, insbesondere in Bezug zur suppressiven Kapazität, induzieren können. Aus diesem Grund und zur Generierung einer homogenen iTreg-Population mit hoher suppressiver Potenz wurden in der folgenden Studie die beiden IL-10DC-Subpopulationen, die sich aufgrund ihres Reifezustandes deutlich unterscheiden (CD83, CCR7), durchflusszytometrisch isoliert und bezüglich ihrer Fähigkeit anerge regulatorische T-Zellen (iTreg) zu induzieren *in vitro* detailliert untersucht.

Mature DC (mDC) spielen eine entscheidende Rolle bei der Induktion einer protektiven Immunantwort, indem diese u.a. T-Zellen effektiv stimulieren und somit die adaptive Immunität initiieren. Andererseits ist es jedoch wichtig, dass z.B. autoreaktive Immunzellen inaktiviert werden, bevor diese eigene Körperzellen und Organe schädigen können. Diese Toleranzinduktion wird u.a. von immaturren (iDC) bzw. steady-state DC initiiert, welche somit auch einen wichtigen Bestandteil der Homöostase darstellen.^{37, 159, 160}

Neben vielen proinflammatorischen Zytokinen, die die verschiedensten Immunzellen u.a. rekrutieren und aktivieren können, existieren auch Zytokine wie das immunsuppressive IL-10, welches Immunreaktionen z.B. über Modulation der Immunzellen herunterreguliert und damit einen negativen Feedback vermittelt. Durch Zugabe von exogenem IL-10 wird der IL-10/IL-10R-Signaltransduktionsweg stimuliert und u.a. die damit einhergehenden Veränderungen der Differenzierung zu tolerogenen DC induziert. Für die *in vitro*-Generierung solcher tolerogenen DC ist neben der angewandten Konzentration der Zeitpunkt der IL-10-Zugabe entscheidend. Je früher die IL-10-Zugabe während der DC-Generierung erfolgt, desto immaturer ist deren Phänotyp. Zudem unterscheiden sich auch Expressionsmuster sowie Zytokinprofil der jeweiligen IL-10-modulierten DC. In unserer Studie wurde die IL-10-Zugabe während der 2-tägigen DC-Maturierung, d.h. zeitgleich zum Stimulus der DC-Reifung gewählt. Auch andere Arbeitsgruppen wählten die zeitnahe IL-10-Zugabe während der DC-Maturierung für ihre Studien.^{31, 44, 70-72, 120} Gregori et al., Gagliani et al. sowie Torres-Aguilar et al. hingegen

differenzierten tolerogene DC aus CD14⁺ Vorläuferzellen über einen deutlich längeren Zeitraum der IL-10-Modulation.^{55, 56, 158} Gregori et al. belegten zudem durch einen Vergleich der beiden unterschiedlich IL-10-modulierten DC-Populationen deutliche Unterschiede im Expressionsmuster.⁵⁶

Die Differenzierung und Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen werden durch Stimulation mit IL-10DC moduliert, wobei anerge regulatorische T-Zellen induziert werden.^{31, 70, 120} Diese weisen eine erhöhte suppressive Kapazität im Vergleich zu TGFβ-, Rapamycin-, Dexamethason- und Vitamin D₃-modulierten DC-induzierten Treg auf.^{44, 55} IL-10DC stellen somit ein sehr viel versprechendes Therapeutikum für Erkrankungen dar, da sie Hyperaktivierungen des Immunsystems, wie sie für Autoimmunerkrankungen und Allergien charakteristisch sind, inhibieren können. Diverse Arbeitsgruppen konnten bereits mithilfe IL-10-modulierter DC aus allergischen Spendern die antigen-spezifische T_H2-Antwort *in vitro* inhibieren und zeigen, dass die T-Zell-Proliferation und die Zytokin-Sekretion der induzierten allergen-spezifischen T-Zell-Antwort deutlich vermindert ist.^{72, 154, 161} Die wichtige physiologische Bedeutung von IL-10DC konnte außerdem bei HIES(Hyper-IgE Syndrome)-Patienten beobachtet werden. Diese weisen eine durch STAT3-Mutationen verursachte defekte IL-10-Antwort in dendritischen Zellen auf, welche zu einer beeinträchtigten Fähigkeit der iTreg-Induktion führt.⁵⁷

Auch bei tumor-assoziierten Toleranzmechanismen spielt IL-10 eine entscheidende Rolle. Einige Tumorarten nutzen den immunsuppressiven Effekt von IL-10 auf die Differenzierung von Immunzellen z.B. durch Induktion tolerogener DC und anerer regulatorischer T-Zellen um dem Immunsystem zu entgehen.¹⁶²⁻¹⁶⁴ IL-10 hat jedoch nicht stets einen suppressiven Effekt, sondern kann auch je nach umgebendem Milieu stimulatorisch auf Immunzellen wirken.^{165, 166} Die Expansion und zytotoxische Aktivität von CD8⁺ T-Zellen sowie NK-Zellen kann durch IL-10-Modulation induziert bzw. gesteigert werden.¹⁶⁷⁻¹⁷⁰

Um die regulatorische Funktion der induzierten Treg zu verbessern und damit die Wirkung als mögliches Therapeutikum zu erhöhen, wurden in unserer Studie die heterogene Population der humanen IL-10-modulierten dendritischen Zellen (IL-10DC) anhand ihres Maturierungsstatus separiert und hinsichtlich ihrer tolerogenen Eigenschaften untersucht. Für die durchflusszytometrische Trennung der beiden IL-10DC-Subpopulationen, mature CD83^{high}CCR7^{high}HLA-DR^{high} und immature CD83^{low}CCR7^{negative}HLA-DR^{low}, wurde der Chemokin-Rezeptor CCR7, welcher an

Migrationsprozessen, aber nicht an der T-Zell-Stimulation beteiligt ist, gewählt.^{18, 171} Die Expression von CCR7 korreliert mit dem DC-spezifischen Reifungsmarker CD83 (siehe Abschnitt 4.1.1).⁴⁴ CD83 ist jedoch an multiplen Prozessen der T-Zell-Stimulation beteiligt. Daher wurde dieser Marker für die durchflusszytometrische Trennung ausgeschlossen. So konnte gezeigt werden, dass CD83-defiziente Mäuse eine gestörte Entwicklung von CD4⁺ T-Zellen im Thymus aufweisen. In der Peripherie konnte eine deutlich reduzierte Anzahl CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen werden, während kein Einfluss auf CD8⁺ T-Zellen beobachtet werden konnte.^{172, 173} Garcia-Martinez et al. postulierten zudem eine modifizierte Aktivierung der CD4⁺ Zellen in CD83^{-/-} Mäusen, die sich in einem veränderten Zytokinprofil widerspiegelte.¹⁷³ Außerdem weisen HSV-1-infizierte dendritische Zellen eine verminderte CD83-Expression auf und zeigen dadurch eine verminderte T-Zell-stimulatorische Kapazität.¹⁷⁴ Des Weiteren konnten Prectel et al. mithilfe von RNA-Interferenz-Experimenten ein CD83-Knockdown in DC erzeugen und ebenfalls eine reduzierte stimulatorische Funktion nachweisen.¹⁷⁵ Eine weitere mögliche Funktion von CD83 liegt in der Stabilisierung der Expression von MHC-II und CD86 auf murinen DC durch die transmembrane Domäne von CD83. Deren Degradation wird durch eine Blockade der MHC-Klasse-II-Assoziation mit der Ubiquitin-Ligase MARCH1 inhibiert.¹⁷⁶

Innerhalb der Monozyten existieren 2 große Subpopulationen, CD14⁺CD16⁻ und CD14⁺CD16⁺. Diese unterscheiden sich nicht nur phänotypisch, sondern auch in ihrem Migrationsverhalten und ihrer Funktion.¹⁷⁷⁻¹⁸¹ Die Vermutung, dass es sich bei der immaturen CD83^{low}CCR7^{negative}HLA-DR^{low} IL-10DC-Subpopulation nicht um dendritische Zellen, sondern um Monozyten/Makrophagen handelt, konnte durch die durchflusszytometrische Analyse von CD16, welcher als Marker für Monozyten und Makrophagen beschrieben wurde, ausgeschlossen werden (siehe Abschnitt 4.1.2). Die Expression von CD16, einem phagozytose-induzierenden Fc-Rezeptor für Pathogen-opsonisierende IgG-Antikörper, konnte in unserer Studie auf beiden IL-10DC-Subpopulationen nicht nachgewiesen werden. CD14, ein Ko-Rezeptor für Lipopolysaccharide (LPS), einem Bestandteil der äußeren Membran gramnegativer Bakterien, konnte sowohl auf der maturen als auch auf der immaturen IL-10DC-Subpopulation nachgewiesen werden, wobei eine verstärkte Expression auf der immaturen Subpopulation zu beobachten war (siehe Abschnitt 4.1.2). Es ist jedoch bereits bekannt, dass durch die exogene Zugabe von IL-10 während der DC-Generierung ein Monozyten-ähnlicher, semimaturer Phänotyp induziert wird, wobei

die CD14 auf den induzierten tolerogenen DC hochreguliert und kostimulatorische Moleküle z.B. aus der B7-Familie vermindert exprimiert werden.^{71, 182, 183}

Auch Velten et al. konnten 2004 bereits zeigen, dass die IL-10DC eine heterogene Population darstellt. Jedoch legte diese Arbeitsgruppe den Schwerpunkt bei der Separation auf die kombinierten Oberflächenmoleküle CD83/ILT2.⁷¹ Durch Stimulation mit der CD83^{low}CD14^{high}ILT2^{high}HLA-DR^{low} und der CD83^{high}CD14^{low}ILT2^{low}HLA-DR^{high} IL-10DC-Subpopulation von Velten et al. wurde eine verminderte Proliferation der CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zur Stimulation mit mDC nachgewiesen. Gleichzeitig zeigte die CD83^{high}CD14^{low}ILT2^{low}HLA-DR^{high} IL-10DC keinen deutlichen Unterschied in der stimulatorischen Kapazität verglichen mit den ungesorteten IL-10DC. Diese Ergebnisse unterstützen unsere Untersuchungen, da auch wir eine deutlich reduzierte stimulatorische Kapazität der beiden IL-10DC-Subpopulationen nachweisen konnten (siehe Abschnitt 4.2.2). Das Expressionsmuster der untersuchten DC-Populationen in unserer Studie stimmt jedoch nicht mit dem der von Velten et al. untersuchten DC-Populationen überein. Unterschiede im Protokoll zur Generierung dendritischer Zellen sowie eine abweichende IL-10DC-Separierung erklären die unterschiedlichen Expressionsmuster. Anhand durchflusszytometrischer und RNA-Analysen konnten Velten et al. zeigen, dass die CD83^{low}CD14^{high}ILT2^{high}HLA-DR^{low} IL-10DC im Vergleich zu den CD83^{high}CD14^{low}ILT2^{low}HLA-DR^{high} IL-10DC die inhibitorischen Rezeptoren ILT2 und ILT3 verstärkt exprimieren. In unserer Studie konnten jedoch beide inhibitorischen Oberflächenmoleküle sowohl auf beiden IL-10DC-Subpopulationen als auch auf mDC nachgewiesen werden. Während hinsichtlich der ILT2-Expression keine deutlichen Unterschiede zwischen den DC-Populationen beobachtet werden konnten, zeigte die CCR7^{high} IL-10DC-Subpopulation verglichen mit mDC eine signifikant erhöhte ILT3-Expression. Die CCR7^{negative} IL-10DC-Subpopulation wies verglichen mit der CCR7^{high} IL-10DC-Subpopulation hingegen eine signifikant reduzierte ILT3-Expression auf (siehe Abschnitt 4.1.2). ILT2 und ILT3 besitzen sogenannte ITIM (engl. Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif), die durch Bindung von inhibitorischen Phosphatasen die Signaltransduktion durch Antigen-spezifische Rezeptoren wie z.B. dem T-Zell-Rezeptor hemmen können.^{184, 185}

In der Studie von Gregori et al. 2010 konnte die Existenz tolerogener IL-10-modulierter DC (DC-10) *in vivo* nachgewiesen werden.⁵⁶ Zudem postulierte diese Arbeitsgruppe die DC-10-Generierung *in vitro* und zeigte, dass die Differenzierung

der regulatorischen T-Zellen Typ 1 (Tr1) über den IL-10-abhängigen ILT4/HLA-G-Signalweg vermittelt wird. Dabei ist eine hohe IL-10-Sezernierung der DC-10 erforderlich, welche auch für die HLA-G Expression auf den tolerogenen DC-10 entscheidend ist. Liang et al. konnten zudem 2008 zeigen, dass die ILT4/HLA-G-vermittelte Modulation der DC-Differenzierung über den IL-6/STAT3-Signalweg induziert wird.¹⁸⁶ Die inhibitorischen Rezeptoren ILT2 und ILT3 werden ebenfalls, wie auch bei der Studie von Velten et al., erhöht exprimiert. Während eine deutliche höhere Expression von ILT4 auf den IL-10DC und den IL-10DC-Subpopulationen in unserer Studie ebenfalls nachgewiesen werden konnte (siehe Abschnitt 4.1.2), wurde keine Expression von HLA-G beobachtet. Das Zytokinprofil der untersuchten DC-Populationen unserer Studie (siehe Abschnitt 4.1.3) zeigte ebenfalls eine deutlich verminderte IL-12p40 Produktion der IL-10DC-Population, jedoch keine erhöhte IL-10-Freisetzung. Es muss jedoch beachtet werden, dass in unserer Studie die Messung der Zytokin-Sezernierung ohne vorherige DC-Stimulation erfolgte. Neben Gregori et al. konnten auch andere Arbeitsgruppen eine hohe IL-10-Serzernierung nach Stimulation der IL-10-modulierten DC messen, während die Produktion proinflammatorischer Zytokine deutlich reduziert war.^{44, 55, 56}

In unserer Studie konnten wir eine erhöhte Expression von PD-L1 lediglich auf der muren CCR7^{high} IL-10DC-Subpopulation im Vergleich zu muren DC beobachten. Die gesamten IL-10DC sowie die CCR7^{negative} IL-10DC-Subpopulation zeigten keine gesteigerte PD-L1-Expression verglichen mit mDC (siehe Abschnitt 4.1.2). Bereits 1999 wurden erste Hinweise für die Beteiligung des konstitutiv DC-exprimierten PD-L1, auch B7-H1 genannt, an der negativen Regulation zellvermittelter Immunantworten gefunden. In Studien von Dong et al. induzierte die PD-L1-Ligation polyklonal stimulierter T-Zellen eine IL-2-abhängige IL-10-Produktion.¹⁸⁷ Freeman et al. wiesen die Expression von PD-L1 auf humanen und murinen DC sowie nicht-lymphatischen Zellen nach. Die Bindung des Rezeptors PD-1 auf der T-Zelle führte dabei zu einer inhibierten TCR-vermittelten Proliferation und Zytokin-Produktion.¹⁸⁸ Die Balance zwischen dem PD-1/PD-L1-Ligation-induzierten Signal und der CD28-Aktivierung über die kostimulatorischen B7-Moleküle CD80 und CD86 bestimmt die Intensität der T-Zell-Aktivierung, so dass die PDL-1/PD-1-Ligation zur negativen Regulation inflammatorischer T-Zell-Antworten beiträgt.¹⁸⁸ Durch die Blockade von PD-L1 konnte die stimulatorische Kapazität der IL-10-modulierten DC deutlich erhöht werden, so dass PD-L1 eine entscheidende Funktion bei der Induktion und Aufrechterhaltung der T-Zell-Anergie zugeschrieben werden kann.¹⁸⁹ Aufgrund der

Expression von PD-L1 auf Tumorzellen und der immunregulatorischen Eigenschaften der PD-L1/PD-1-Ligation wurden bereits eine Vielzahl an Modulationen dieses Signalwegs für neuste Immuntherapien zur Tumor-Behandlung untersucht und eingesetzt.^{190, 191} In unserer Studie zeigte die gesamte IL-10DC-Population sowie die CCR7^{negative} IL-10DC-Subpopulation keine gesteigerte PD-L1-Expression verglichen mit mDC (siehe Abschnitt 4.1.2). Die Expression der kostimulatorischen B7-Moleküle CD80 und CD86 lag verglichen mit den mDC jedoch auf den gesamten IL-10DC und der CCR7^{negative} IL-10DC-Subpopulation deutlich vermindert vor. Aufgrund der Verschiebung in der Balance kann die regulatorisch wirkende Signalgebung über PD-L1 somit den schwächeren stimulatorischen/aktivierenden Signalen über CD80/CD86 entgegenwirken.^{188, 189}

Neben PD-L1 wurde auch PD-L2 als Ligand für den T-Zell-exprimierten Rezeptor PD-1 beschrieben. Die Expression von PD-L2, auch B7-DC genannt, wird anders als bei PD-L1 erst nach Stimulation der dendritischen Zellen induziert.¹⁹² Während Untersuchungen im murinen System das Potenzial von PD-L2 als T-Zell-kostimulatorisches Molekül zeigen, indem es die Proliferation und IFN γ -Produktion von naiven T-Zellen induziert und damit eine T_H1-Immunantwort initiiert,¹⁹³ wurde von Pfistershammer et al. im humanen System jedoch gezeigt, dass durch PD-L2-Ligation die Aktivierung sowohl von CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen deutlich inhibiert ist. Diese Inhibition konnte nicht durch CD28-Stimulation, jedoch durch PD-1-Blockade aufgehoben werden.¹⁹⁴ Wir konnten, wie auch im Fall von PD-L1, eine deutlich erhöhte Expression von PD-L2 nur auf der mDC CCR7^{high} IL-10DC-Subpopulation bestimmen, während die immature CCR7^{negative} IL-10DC-Subpopulation eine deutlich verminderte Expression aufzeigte (siehe Abschnitt 4.1.2).

Unsere These, dass beide IL-10DC-Subpopulationen verschiedene Mechanismen zur Induktion von Treg anwenden, führte zur Untersuchung der CD25-Expression auf den DC-Populationen. Zudem ist die Funktion der membranständigen sowie der löslichen Form von CD25 (sCD25) für IL-10DC sowie anderen tolerogenen DC bisher nicht beschrieben worden. Aufgrund verschiedener Studien ist bereits bekannt, dass humane mDC eine hohe Expression der α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) aufweisen, welche durch den Einfluss von PGE₂ induziert wird,¹⁹⁵ gleichzeitig aber die signalgebende β -Kette (CD122) nicht exprimieren. Die Expression der γ -Kette (CD132) wird, abhängig von der DC-Generierung, kontrovers diskutiert.^{196, 197} Die Funktion der CD25-Expression auf mDC sowie tolerogenen IL-10DC ist bisher

nicht genau bekannt. Wuest et al. konnten jedoch in ihren Studien zeigen, dass die Stimulation mit mDC, welche mit dem CD25-Inhibitor Daclizumab vorbehandelt wurden, eine verminderte T-Zell-Proliferation zur Folge hat. Die Stimulation von CD25⁻ T-Zellen mit mDC hat jedoch eine Aktivierung der T-Zellen und deren Expansion zur Folge. Anhand dieser Ergebnisse entstand die These, dass das mDC-abgeleitete CD25 IL-2 über eine *trans*-Präsentation den T-Zellen zur Verfügung stellt und somit eine (gesteigerte) T-Zell-Proliferation ermöglicht.¹⁹⁶ Velten et al. konnten diesen gesteigerten Stimulationseffekt auf T-Zellen durch CD25^{high} mDC ebenfalls beobachten.¹⁹⁷ Die Frage, an welchem Epitop die T-Zellen binden können, ist jedoch nicht geklärt. In unserer Studie konnte die Expression von CD25 auf mDC ebenfalls nachgewiesen werden, während CD122 nicht exprimiert wird (siehe Abschnitt 4.1.2). CD83^{high}CCR7^{high}HLA-DR^{high} IL-10DC zeigten jedoch eine deutlich erhöhte CD25-Expression im Vergleich zu mDC und den IL-10DC. Die immaturen CD83^{low}CCR7^{negative}HLA-DR^{low} IL-10DC hingegen zeigten eine zu den IL-10DC vergleichbare, aber zu den mDC dennoch erhöhte Expression (siehe Abschnitt 4.1.2).

Diverse Studien belegten, dass es sich bei der löslichen Form von CD25 (sCD25) nicht um eine alternative RNA-Splicing-Variante handelt, sondern sCD25 über enzymatische Spaltung von der Membran gelöst wird, wobei die Affinität zum Wachstumsfaktor IL-2 vorhanden bleibt.^{155, 198-201} Die Familie der Metalloproteinasen (MMP), insbesondere der Einfluss von MMP-9, scheint bei der gesteigerten Freisetzung von sCD25 eine entscheidende Rolle zu spielen, wie bei Untersuchungen mit verschiedenen Tumor-Zell-Linien gezeigt wurde.^{156, 202} Die Expression von MMP-9 wird während der DC-Reifung durch den Einfluss von PGE₂ über die Aktivierung von AP-1 (engl. Activator Protein 1) induziert.²⁰³

Trotz einer erhöhten CD25-Expression auf der immaturen IL-10DC-Subpopulation gegenüber den mDC, konnte lediglich eine vergleichbare sCD25-Serzernierung gemessen werden. Bemerkenswerterweise wies die mature IL-10DC-Subpopulation eine 10-fach erhöhte Sezernierung von sCD25 verglichen sowohl mit den mDC als auch der immaturen IL-10DC-Subpopulation auf (siehe Abschnitt 4.1.3). Die Unterschiede in der CD25-Expression und sCD25-Sezernierung zwischen den beiden IL-10DC-Subpopulationen unterstützen unseren Verdacht, dass diese über abweichende Mechanismen ihre tolerogene Funktion ausüben. Die Funktion der löslichen Form könnte im Abfangen von freiem IL-2 und der damit verbundenen

Inhibition der T-Zell-Aktivierung und des Überlebens der T-Zellen liegen. Bisher liegen jedoch keine eindeutigen wissenschaftlichen Belege hierfür vor.

Während die mature CCR7^{high} IL-10DC-Subpopulation eine hohe Expression der kostimulatorischen (CD80/CD86, CD40), aber auch von koinhibitorischen Molekülen (ILT3, ILT4, PD-L1, PD-L2) aufwies, zeigte die immature CCR7^{negative} IL-10DC-Subpopulation, mit Ausnahme von ILT4, eine deutlich reduzierte Expression der kostimulatorischen und koinhibitorischen Oberflächenmarker (siehe Abschnitt 4.1.2). Trotz des unterschiedlichen Expressionsmusters zeigten beide IL-10DC-Subpopulationen eine deutlich reduzierte stimulatorische Kapazität (siehe Abschnitt 4.2.2) und induzierten anerge Treg, welche in der Lage waren die Aktivierung und Proliferation von CD4⁺ T-Zellen zu inhibieren (siehe Abschnitt 4.2.7). Mature und immature IL-10DC-Subpopulation scheinen daher unterschiedliche Mechanismen zu nutzen, um ihre tolerogenen Funktionen auszuüben. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass beide iTreg-Subpopulationen abhängig von der Stimulation unterschiedlich starke suppressive Aktivitäten aufweisen (siehe Abschnitt 4.2.7).

DC können mittels löslicher Mediatoren, wie z.B. Zytokine, aber auch Zellkontakt-abhängig ihre stimulatorischen Signale übermitteln. Die Sekretion des immunsuppressiven Zytokins IL-10 durch tolerogene DC spielt bei der Induktion von Treg eine wichtige Rolle.^{36, 56, 146} Neben den tolerogenen IL-10DC sind auch Rapamycin-, Vitamin D₃-, TGFβ- und Dexamethason-modulierte tolerogene DC bekannt, die ebenfalls anerge Treg induzieren, aber im Vergleich zu IL-10DC-induzierten Treg eine verminderte suppressive Kapazität aufweisen.^{43, 44, 55} Ihnen ist jedoch gemeinsam, dass sie kostimulatorische Moleküle (z.B. CD80/CD86) vermindert exprimieren und gleichzeitig eine reduzierte Produktion proinflammatorischer Zytokine (z.B. IL-12) aufweisen, während die Expression koinhibitorischer Moleküle wie ILT3 und ILT4 heraufreguliert wird und diese Zellkontakt-abhängig an der Treg-Induktion beteiligt sind.^{56, 204, 205}

Aber auch auf der T-Zell-Seite existiert das duale System aus löslichen Mediatoren und Zellkontakt-abhängigen Rezeptor-Liganden-Interaktionen, um immunologische Prozesse zu kontrollieren und regulieren. Sowohl eine hohe Sekretion der immunmodulierenden Zytokine IL-10 bzw. TGFβ, welche eine wichtige Funktion bei der suppressiven Aktivität der regulatorischen Tr1- und T_H3-Zellen einnimmt^{206, 207}, als auch der direkte Zell-Zell-Kontakt über Rezeptor-Liganden-Interaktion stellen wichtige Mechanismen für die regulatorische Aktivität von iTreg und nTreg dar.

So ist PD-1 (engl. Programmed Death-1) ein auf T-Zell-Seite beschriebener Rezeptor, der durch Ligation abhängig von der Intensität eingehender kostimulatorischer Signale seine inhibitorische Funktion ausübt und zur Toleranzinduktion beiträgt.^{33, 192, 208} PD-1 inhibiert die PI3K-Aktivität mittels erhöhter Akt-Phosphorylierung, wodurch die Induktion wichtiger Überlebenssignale, wie z.B. Bcl-xl, behindert und die Apoptose eingeleitet wird.^{192, 209, 210} PD-1 wirkt dabei nicht über Anergie-abhängige Mechanismen, vielmehr ist die Differenzierung von TGFβ-induzierten Treg gestört.²¹⁰

Die extrazelluläre und intrazelluläre Expression von CTLA-4 spielt eine entscheidende Rolle bei der suppressiven Aktivität der IL-10DC-induzierten Treg, während lösliche Mediatoren wie die immunsuppressiven Zytokine IL-10 und TGFβ keinen Einfluss auf die suppressive Funktion aneurer iTreg haben.^{31, 100-102} Die durchflusszytometrischen Analysen in unserer Studie zeigten jedoch keine deutlichen Unterschiede in der Expression von CTLA-4 zwischen mDC-induzierten Effektor-T-Zellen und den iTreg-Subpopulationen (siehe Abschnitt 4.2.1). Untersuchungen zur intrazellulären Expression, bei der deutlich größere Unterschiede beobachtet wurden,³¹ wurden in unserer Studie nicht durchgeführt. Zudem wurden unsere durchflusszytometrischen Analysen mit primär stimulierten naiven T-Zellen bzw. polyklonal restimulierten T-Zellen durchgeführt, und nicht mit primär stimulierten CD4⁺ T-Zellen, die mit mDC, syngen zur Primärstimulation, restimuliert wurden.³¹

Obwohl die Aktivierung anhand der CD28-Expression bei beiden iTreg-Subpopulationen in unserer Studie deutlich inhibiert ist und bei den iTreg⁺ am stärksten ausgeprägt ist, weisen beide keine erhöhte Expression der regulatorischen Rezeptoren CTLA-4 und PD-1 gegenüber Effektor-T-Zellen nach primärer Stimulation auf. Erst nach polyklonaler Restimulation verschiebt sich das Verhältnis zwischen aktivierenden und inhibitorischen Signalen, da CD28 auf allen T-Zell-Populationen herunterreguliert wurde und die Expression von CTLA-4 und insbesondere PD-1 auf Teff und iTreg⁺ erhöht vorliegt (siehe Abschnitt 4.2.1). Die Expression beider Rezeptoren wird zeitversetzt zur CD28-Stimulation auf aktivierten T-Zellen induziert. Es wird ein Mechanismus zur Selbst-Regulierung initiiert. Starke kostimulatorische Signale über CD28-Ligation überkommen die inhibitorischen Effekte von PD-1 und CTLA-4. Eine verschobene Balance zwischen aktivierenden und inhibitorischen Signalen kann somit die Immunantwort bereits negativ beeinflussen.^{192, 209}

Die Koexpression von CD49b und LAG-3 wurde erst kürzlich als neue Marker-Kombination für regulatorische T-Zellen Typ 1 (Tr1) identifiziert.¹⁵⁸ Die Expression dieser beiden Marker auf unseren iTreg konnte jedoch in nur sehr geringen Mengen nachgewiesen und somit als spezifische Marker in unserem System ausgeschlossen werden (siehe Abschnitt 4.2.1). Dies wurde bereits durch die fehlende HLA-G-Expression auf unseren IL-10-modulierten DC, welche zur Tr1-Differenzierung erforderlich ist, angedeutet.^{56, 186}

Für natürlich vorkommende Treg (nTreg) wurde neben einer konstitutiv hohen CD25-Expression auch eine stabile und hohe Foxp3-Expression belegt, die jedoch nicht ausschließlich für die suppressive Funktion, sondern auch für die Differenzierung der nTreg und die Aufrechterhaltung deren Phänotyps verantwortlich ist.^{137, 211} Wir konnten sowohl durch RT-PCR-Analyse als auch durch durchflusszytometrische Analysen beobachten, dass keine Foxp3^{high+} Treg durch Stimulation mit der jeweiligen IL-10DC-Subpopulation induziert werden und die Foxp3-Expression somit lediglich den Aktivierungsstatus der iTreg widerspiegelt. Beide iTreg-Subpopulationen zeigten sowohl eine deutlich verminderte Foxp3- als auch CD25-Expression im Vergleich zu aktivierten Effektor-T-Zellen (siehe Abschnitte 4.2.1). Somit unterscheiden sich die CCR7^{high} und CCR7^{negative} IL-10DC-induzierten Treg phänotypisch deutlich von nTreg. CD25 und Foxp3 sind zugleich nicht ausreichend zur Charakterisierung von nTreg im humanen System. Neben einer hohen CD25- und Foxp3-Expression sind zusätzlich auch Helios und GARP als Marker für (aktivierte) nTreg postuliert worden. Helios reguliert die IL-2-Produktion durch Suppression der IL-2-Transkription via epigenetischer Modifikationen und begünstigt zudem die Bindung von Foxp3 an den IL-2-Promotor und damit den anergen Phänotyp der nTreg.^{138, 139} Das membrangebundene Molekül GARP (engl. Glycoprotein A Repetitions Predominant) aktivierter humaner Treg bindet das latente TGFβ auf der Zelloberfläche, reguliert somit die Bioverfügbarkeit und Aktivierung von TGFβ und ist zudem an der suppressiven Funktion der nTreg beteiligt.²¹²⁻²¹⁵ Durch Zugabe der löslichen Form von GARP (sGARP) wurde die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen zu Foxp3⁺ Treg induziert, welche im humanisierten Mausmodell der xenogenen GvHD eine protektive Wirkung zeigen.²¹⁶ Jedoch gibt es auch Hinweise darauf, dass die Sekretion anderer löslicher Mediatoren wie IL-10 und TGF-β durch die nTreg *in vivo* zu einer Modulation der Immunantwort beiträgt.¹³³

Die klassische Definition der T-Zell-Anergie^{92, 93, 115} wird von beiden iTreg-Subpopulationen dieser Studie widergespiegelt. Beide iTreg-Subpopulationen

zeigten einen Proliferationsstopp trotz optimaler, polyklonaler Restimulation (siehe Abschnitt 4.2.3). Zudem war die IL-2-Produktion in beiden Subpopulationen im Vergleich zu aktivierten Effektor-T-Zellen deutlich inhibiert (siehe Abschnitte 4.2.5 und 4.2.6.2).

Die niedrige Proliferationsrate und die geringe Reaktionsfähigkeit auf exogenes IL-2 ließ vermuten (siehe Abschnitt 4.2.3), dass beide iTreg-Subpopulationen aufgrund ihrer geringen Viabilität (siehe Abschnitt 4.2.4) nicht mehr zur Proliferation fähig sind. In dem Suppressions-System zeigten beide iTreg-Subpopulationen jedoch eine deutliche stimulationsabhängige Proliferation in Kokultur mit den CD4⁺ Responder-T-Zellen (siehe Abschnitt 4.2.7), so dass eine durch Aktivierung einhergehende Proliferation der IL-10DC-induzierten Treg-Populationen für die suppressive Wirkung erforderlich zu sein scheint. Diese Beobachtung wurde bisher für andere DC-induzierte Treg-Populationen nicht beschrieben. Jedoch konnte die *in vitro*-Expansion von humanen Tr1-Klonen durch Zugabe von IL-2 und IL-15 induziert werden.²¹⁷ Im murinen System konnte eine starke Kostimulation der nTreg durch CD28 oder hohe IL-2-Mengen sowohl deren Anergie als auch suppressive Kapazität aufheben.²¹⁸ Die *in vivo*-Expansion der murinen sowie humaner nTreg) wurde von mehreren Arbeitsgruppen ebenfalls postuliert.²¹⁹⁻²²³ Abhängig von der Stimulation bleibt die suppressive Aktivität der nTreg dennoch erhalten.^{224, 225} Die proliferative Aktivität ist somit nicht zwangsläufig mit der suppressiven Kapazität der nTreg verbunden.²²⁵

Beide iTreg-Subpopulationen unserer Studie zeigten eine deutliche suppressive Aktivität gegenüber CD4⁺CD25^{low} Responder-T-Zellen (siehe Abschnitt 4.2.7). Die CCR7^{high} IL-10DC-induzierten Treg zeigten eine gesteigerte Kapazität verglichen mit den CCR7^{negative} IL-10DC-induzierten Treg, wobei auch eine Abhängigkeit von der Stimulation beobachtet werden konnte (siehe Abschnitt 4.2.7). Die Sezernierung von sCD25 konnte als suppressiver Mechanismus jedoch ausgeschlossen werden, da beide iTreg-Subpopulationen im Vergleich zu den Teff eine deutlich verminderte sCD25-Produktion aufwiesen. Somit ist der Nachweis von sCD25 wie auch die Expression von CD25 lediglich ein charakteristisches Merkmal für den Aktivierungsstatus der T-Zellen (siehe Abschnitte 4.2.6). Über welche vielfältigen Mechanismen die beiden induzierten Treg-Subpopulationen ihre regulatorische Funktion ausüben, sollte jedoch in weiteren Untersuchungen bestimmt werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol* 2013; 31: 563-604.
2. Collin M, McGovern N, Haniffa M. Human dendritic cell subsets. *Immunology* 2013; 140(1): 22-30.
3. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Liu Y-J *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2000; 18: 767-811.
4. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004; 5(10): 987-95.
5. Kadowaki N. Dendritic Cells—A Conductor of T Cell Differentiation. *Allergology International* 2007; 56: 193-199.
6. Joffre O, Nolte MA, Spörri R, Reis e Sousa C. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunological Reviews* 2009; 227: 234-247.
7. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 1999; 17: 593-623.
8. Mahla RS, Reddy MC, Prasad DV, Kumar H. Sweeten PAMPs: Role of Sugar Complexed PAMPs in Innate Immunity and Vaccine Biology. *Front Immunol* 2013; 4: 248.
9. Thompson MR, Kaminski JJ, Kurt-Jones EA, Fitzgerald KA. Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses* 2011; 3(6): 920-40.
10. Szabo A, Rajnavolgyi E. Collaboration of Toll-like and RIG-I-like receptors in human dendritic cells: tRIGgering antiviral innate immune responses. *Am J Clin Exp Immunol* 2013; 2(3): 195-207.
11. Manoury B. Proteases: Essential Actors in Processing Antigens and Intracellular Toll-Like Receptors. *Front Immunol* 2013; 4: 299.
12. Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 1997; 388: 782-787.
13. Inaba K, Pack M, Inaba M, Sakuta H, Isdell F *et al.* High Levels of a Major Histocompatibility Complex II-Self Peptide Complex on Dendritic Cells from the T Cell Areas of Lymph Nodes. *J. Exp. Med.* 1997; 186(5): 665-672.
14. Dilioglou S, Cruse JM, Lewis RE. Function of CD80 and CD86 on monocyte- and stem cell-derived dendritic cells. *Experimental and Molecular Pathology* 2003; 75(3): 217-227.
15. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 515-48.
16. Sozzani S, Allavena P, D'Amico G, Luini W, Bianchi G *et al.* Cutting Edge: Differential Regulation of Chemokine Receptors During Dendritic Cell Maturation: A Model for Their Trafficking Properties. *The Journal of Immunology* 1998; 161: 1083-1086.
17. McColl SR. Chemokines and dendritic cells: A crucial alliance. *Immunology and Cell Biology* 2002; 80: 489-496.
18. Sánchez-Sánchez N, Riol-Blanco L, Rodríguez-Fernández JL. The Multiple Personalities of the Chemokine Receptor CCR7 in Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* 2006; 176: 5153-5159.
19. Randolph GJ, Ochando J, Partida-Sanchez S. Migration of dendritic cell subsets and their precursors. *Annu Rev Immunol* 2008; 26: 293-316.

20. Ricart BG, John B, Lee D, Hunter CA, Hammer DA. Dendritic cells distinguish individual chemokine signals through CCR7 and CXCR4. *J Immunol* 2011; 186(1): 53-61.
21. Johnson LA, Jackson DG. Control of dendritic cell trafficking in lymphatics by chemokines. *Angiogenesis* 2013.
22. Kiama SG, Cochand L, Karlsson L, Nicod LP, Gehr P. Evaluation of Phagocytic Activity in Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *JOURNAL OF AEROSOL MEDICINE* 2001; 14(3): 289–299.
23. Gilliet M, Cao W, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 2008; 8(8): 594-606.
24. Rogers NM, Isenberg JS, Thomson AW. Plasmacytoid Dendritic Cells: No Longer an Enigma and Now Key to Transplant Tolerance? *American Journal of Transplantation* 2013; 13: 1125–1133.
25. MacDonald KP, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J *et al.* Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* 2002; 100(13): 4512-20.
26. Cheong C, Matos I, Choi JH, Dandamudi DB, Shrestha E *et al.* Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209⁺ dendritic cells for immune T cell areas. *Cell* 2010; 143(3): 416-29.
27. Romani N, Gruner S, Brang D, Kämpgen E, Lenz A *et al.* Proliferating Dendritic Cell Progenitors in Human Blood. *J. Exp. Med.* 1994; 180: 83-93.
28. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient Presentation of Soluble Antigen by Cultured Human Dendritic Cells Is Maintained by Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor Plus Interleukin 4 and Downregulated by Tumor Necrosis Factor alpha. *J. Exp. Med.* 1994; 179: 1109-1118.
29. Thurner B, Kruse M, Roder C, Glaser A, Bender A *et al.* Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *Journal of Immunological Methods* 1999; 223: 1-15.
30. Schuler-Thurner B, Dieckmann D, Keikavoussi P, Bender A, Maczek C *et al.* Mage-3 and Influenza-Matrix Peptide-Specific Cytotoxic T Cells Are Inducible in Terminal Stage HLA-A2.1⁺ Melanoma Patients by Mature Monocyte-Derived Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* 2000; 165: 3492–3496.
31. Steinbrink K, Graulich E, Kubsch S, Knop J, Enk AH. CD4⁺ and CD8⁺ anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood* 2002; 99(7): 2468-2476.
32. Royer P-J, Tanguy-Royer s, Ebstein F, Sapede C, Simon T *et al.* Culture Medium and Protein Supplementation in the Generation and Maturation of Dendritic Cells. *Scand J Immunol* 2006; 63(401-409).
33. Hubo M, Trinschek B, Kryczanowsky F, Tuettenberg A, Steinbrink K *et al.* Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. *Front Immunol* 2013; 4(82): 1-14.
34. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 685-711.
35. Adler HS, Steinbrink K. Tolerogenic dendritic cells in health and disease: friend and foe! *Eur J Dermatol* 2007; 17(6): 476-91.
36. Gregori S. Dendritic cells in networks of immunological tolerance. *Tissue Antigens* 2010; 77(2): 89-99.
37. Saei A, Hadjati J. Tolerogenic dendritic cells: key regulators of peripheral tolerance in health and disease. *Int Arch Allergy Immunol* 2013; 161(4): 293-303.

38. Lutz MB. Therapeutic potential of semi-mature dendritic cells for tolerance induction. *Front Immunol* 2012; 3: 1-9.
39. Sato K, Yamashita N, Baba M, Matsuyama T. Modified myeloid dendritic cells act as regulatory dendritic cells to induce anergic and regulatory T cells. *Blood* 2003; 101(9): 3581-9.
40. Fujita S, Seino K, Sato K, Sato Y, Eizumi K *et al.* Regulatory dendritic cells act as regulators of acute lethal systemic inflammatory response. *Blood* 2006; 107: 3656-3664.
41. Torres-Aguilar H, Sanchez-Torres C, Jara LJ, Blank M, Shoenfeld Y. IL-10/TGF-beta-treated dendritic cells, pulsed with insulin, specifically reduce the response to insulin of CD4+ effector/memory T cells from type 1 diabetic individuals. *J Clin Immunol* 2010; 30(5): 659-68.
42. Rea D, van Kooten C, van Meijgaarden KE, Ottenhoff THM, Melief CJM *et al.* Glucocorticoids transform CD40-triggering of dendritic cells into an alternative activation pathway resulting in antigen-presenting cells that secrete IL-10. *Blood* 2000; 95: 3162-3167.
43. Naranjo-Gomez M, Raich-Regue D, Onate C, Grau-Lopez L, Ramo-Tello C *et al.* Comparative study of clinical grade human tolerogenic dendritic cells. *J Transl Med* 2011; 9: 89.
44. Boks MA, Kager-Groenland JR, Haasjes MS, Zwaginga JJ, van Ham SM *et al.* IL-10-generated tolerogenic dendritic cells are optimal for functional regulatory T cell induction--a comparative study of human clinical-applicable DC. *Clin Immunol* 2012; 142(3): 332-42.
45. Iruetagoiena MI, Sepulveda SE, Lezana JP, Hermoso M, Bronfman M *et al.* Inhibition of nuclear factor-kappa B enhances the capacity of immature dendritic cells to induce antigen-specific tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 318(1): 59-67.
46. D'Ambrosio D, Cippitelli M, Cocciolo MG, Mazzeo D, Di Lucia P *et al.* Inhibition of IL-12 Production by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Involvement of NF-kB Downregulation in Transcriptional Repression of the p40 Gene. *J. Clin. Invest.* 1998; 101(1): 252-262.
47. Piemonti L, Monti P, Sironi M, Fraticelli P, Leone BE *et al.* Vitamin D₃ Affects Differentiation, Maturation, and Function of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* 2000; 164: 4443-4451.
48. Griffin MD, Lutz WH, Phan VA, Bachman LA, McKean DJ *et al.* Potent inhibition of dendritic cell differentiation and maturation by vitamin D analogs. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 270(3): 701-8.
49. Penna G, Adorini L. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D₃ Inhibits Differentiation, Maturation, Activation, and Survival of Dendritic Cells Leading to Impaired Alloreactive T Cell Activation. *The Journal of Immunology* 2000; 164: 2405-2411.
50. Mathieu C, Adorini L. The coming of age of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ analogs as immunomodulatory agents. *TRENDS in Molecular Medicine* 2002; 8(4): 174-179.
51. Pedersen AE, Schmidt EG, Gad M, Poulsen SS, Claesson MH. Dexamethasone/1alpha-25-dihydroxyvitamin D₃-treated dendritic cells suppress colitis in the SCID T-cell transfer model. *Immunology* 2008; 127(3): 354-64.
52. Gregori S, Casorati M, Amuchastegui S, Smioldo S, Davalli AM *et al.* Regulatory T Cells Induced by 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D₃ and Mycophenolate Mofetil Treatment Mediate Transplantation Tolerance. *The Journal of Immunology* 2001; 167: 1945-1953.
53. Dong X, Bachman LA, Kumar R, Griffin MD. Generation of antigen-specific, interleukin-10-producing T-cells using dendritic cell stimulation and steroid hormone conditioning. *Transplant Immunology* 2003; 11(3-4): 323-333.
54. Volchenkov R, Brun JG, Jonsson R, Appel S. In vitro suppression of immune responses using monocyte-derived tolerogenic dendritic cells from patients with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Res Ther* 2013; 15(5): R114.

55. Torres-Aguilar H, Aguilar-Ruiz SR, Gonzalez-Perez G, Munguia R, Bajana S *et al.* Tolerogenic dendritic cells generated with different immunosuppressive cytokines induce antigen-specific anergy and regulatory properties in memory CD4+ T cells. *J Immunol* 2010; 184(4): 1765-75.
56. Gregori S, Tomasoni D, Pacciani V, Scirpoli M, Battaglia M *et al.* Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood* 2010; 116(6): 935-44.
57. Saito M, Nagasawa M, Takada H, Hara T, Tsuchiya S *et al.* Defective IL-10 signaling in hyper-IgE syndrome results in impaired generation of tolerogenic dendritic cells and induced regulatory T cells. *J Exp Med* 2011; 208(2): 235-49.
58. Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y *et al.* Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 929-79.
59. Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunological Reviews* 2008; 226: 205–218.
60. Finbloom DS, Winestock KD. IL-10 Induces the Tyrosine Phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the Differential Assembly of STAT1 α and STAT3 Complexes in Human T Cells and Monocytes. *The Journal of Immunology* 1995; 155: 1079-1090.
61. Ding Y, Chen D, Tarcsfalvi A, Su R, Qin L *et al.* Suppressor of Cytokine Signaling 1 Inhibits IL-10-Mediated Immune Responses. 2003; 170: 1383–1391.
62. Geng Y, Gulbins E, Altman A, Lotz M. Monocyte deactivation by interleukin 10 via inhibition of tyrosine kinase activity and the Ras signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 8602-8606.
63. Niiro H, Otsuka T, Eiichi Ogami E, Yamaoka K, Nagano S *et al.* MAP Kinase Pathways as a Route for Regulatory Mechanisms of IL-10 and IL-4 Which Inhibit COX-2 Expression in Human Monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 250: 200–205.
64. Sato K, Nagayama H, Tadokoro K, Juji T, Takahashi TA. Extracellular Signal-Regulated Kinase, Stress-Activated Protein Kinase/c-Jun N-Terminal Kinase, and p38^{mapk} Are Involved in IL-10-Mediated Selective Repression of TNF- α -Induced Activation and Maturation of Human Peripheral Blood Monocyte-Derived Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* 1999; 162: 3865–3872.
65. Knodler A, Schmidt SM, Bringmann A, Weck MM, Brauer KM *et al.* Post-transcriptional regulation of adapter molecules by IL-10 inhibits TLR-mediated activation of antigen-presenting cells. *Leukemia* 2009; 23(3): 535-44.
66. Shames BD, Selzman CH, Meldrum DR, Pulido EJ, Barton HA *et al.* IL-10 stabilizes inhibitory kB- α in human monocytes. *Schock* 1998; 10(6): 389-394.
67. Bhattacharyya S, Sen P, Wallet M, Long B, Baldwin AS, Jr. *et al.* Immunoregulation of dendritic cells by IL-10 is mediated through suppression of the PI3K/Akt pathway and of IkappaB kinase activity. *Blood* 2004; 104(4): 1100-9.
68. Schottelius AJG, Mayo MW, Sartor RB, Baldwin ASJ. Interleukin-10 Signaling Blocks Inhibitor of kB Kinase Activity and Nuclear Factor kB Binding. *J Biol Chem* 1999; 274(45): 31868–31874.
69. Driessler F, Venstrom K, Sabat R, Asadullah K, Schottelius AJ. Molecular mechanisms of interleukin-10-mediated inhibition of NF-kB activity: a role for p50. *Clin Exp Immunol* 2004; 135: 64–73.
70. Steinbrink K, Wöfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of Tolerance by IL-10-Treated Dendritic Cells. *The Journal of Immunology* 1997; 159: 4772-4780.
71. Velten FW, Duperrier K, Bohlender J, Metharom P, Goerdts S. A gene signature of inhibitory MHC receptors identifies a BDCA3⁺ subset of IL-10-induced dendritic cells with reduced allostimulatory capacity in vitro. *Eur J Immunol* 2004; 34(10): 2800-11.

72. Li X, Yang A, Huang H, Zhang X, Town J *et al.* Induction of type 2 T helper cell allergen tolerance by IL-10-differentiated regulatory dendritic cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010; 42(2): 190-9.
73. Boks MA, Zwaginga JJ, van Ham SM, ten Brinke A. An optimized CFSE-based T-cell suppression assay to evaluate the suppressive capacity of regulatory T-cells induced by human tolerogenic dendritic cells. *Scand J Immunol* 2010; 72(2): 158-68.
74. Dutton RW, Bradley LM, Swain SL. T cell memory. *Annu. Rev. Immunol.* 1998; 16: 201–223.
75. Sprent J, Surh CD. T cell memory. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 551-79.
76. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 745-63.
77. Beverley PC. Primer: making sense of T-cell memory. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008; 4(1): 43-9.
78. Chehadeh W, Halim MA, Al-Nakib W. Antibody-mediated opsonization of red blood cells in parvovirus B19 infection. *Virology* 2009; 390(1): 56-63.
79. Jönsson G, Lood C, Gullstrand B, Holmström E, Selander B *et al.* Vaccination against encapsulated bacteria in hereditary C2 deficiency results in antibody response and opsonization due to antibody-dependent complement activation. *Clin Immunol* 2012; 144(3): 214-27.
80. Panda S, Zhang J, Tan NS, Ho B, Ding JL. Natural IgG antibodies provide innate protection against ficolin-opsonized bacteria. *EMBO J* 2013; 32(22): 2905-19.
81. MacDonald HR, Wilson A. The role of the T-cell receptor (TCR) in alpha-beta/gamma-delta lineage commitment: clues from intracellular TCR staining. *Immunological Review* 1998; 165: 87-94.
82. Shinkai Y, Rathbun G, Lam K-L, Oltz EM, Stewart V *et al.* RAG-2-Deficient Mice Lack Mature Lymphocytes Owing to Inability to Initiate V(D)J Rearrangement. *Cell* 1992; 68: 855-867.
83. Krangel MS, Hernandez-Munain C, Lauzurica P, McMurry M, Roberts JL *et al.* Developmental regulation of V(D)J recombination at the TCR alpha/delta locus. *Immunological Review* 1998; 165: 131-147.
84. Anderson G, Takahama Y. Thymic epithelial cells: working class heroes for T cell development and repertoire selection. *Trends Immunol* 2012; 33(6): 256-63.
85. Yewdell JW, Bennink JR. Mechanisms of viral interference with MHC class I antigen processing and presentation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1999; 15: 579–606.
86. Heath WR, Carbone FR. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 2001; 19: 47–64.
87. Heath WR, Belz GT, Behrens GMN, Smith CM, Forehan SP *et al.* Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunological Reviews* 2004; 199: 9–26.
88. Kalinski P, Hilkens CMU, Wierenga EA, Kapsenberg ML. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *VIEWPOINT Immunology Today* 1999; 20(12): 561-567.
89. Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 2003; 3(12): 984-93.
90. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol* 2010; 28: 445-89.
91. Powell JD, Ragheb JA, Kitagawa-Sakakida S, Schwartz RH. Molecular regulation of interleukin-2 expression by CD28 co-stimulation and anergy. *Immunological Reviews* 1998; 165: 207-200.

92. Zheng Y, Zha Y, Gajewski TF. Molecular regulation of T-cell anergy. *EMBO Rep* 2008; 9(1): 50-5.
93. Wells AD. New insights into the molecular basis of T cell anergy: anergy factors, avoidance sensors, and epigenetic imprinting. *J Immunol* 2009; 182(12): 7331-41.
94. McAdam AJ, Schweitzer AN, Sharpe AH. The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Immunological Reviews* 1998; 165: 251-247.
95. Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2002; 2(2): 116-26.
96. Wang S, Chen L. Co-signaling molecules of the B7-CD28 family in positive and negative regulation of T lymphocyte responses. *Microbes Infect* 2004; 6(8): 759-66.
97. Pentcheva-Hoang T, Egen JG, Wojnoonski K, Allison JP. B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity* 2004; 21(3): 401-13.
98. Malek TR. The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol* 2008; 26: 453-79.
99. Perez VL, Parijs LV, Biuckians A, Zheng XX, Strom TB *et al.* Induction of Peripheral T Cell Tolerance In Vivo Requires CTLA-4 Engagement. *Immunity* 1997; 6: 411-417.
100. Kubsch S, Graulich E, Knop J, Steinbrink K. Suppressor activity of anergic T cells induced by IL-10-treated human dendritic cells: association with IL-2- and CTLA-4-dependent G1 arrest of the cell cycle regulated by p27Kip1. *Eur J Immunol* 2003; 33(7): 1988-97.
101. Fife BT, Bluestone JA. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunological Reviews* 2008; 224: 166-182.
102. Romo-Tena J, Gomez-Martin D, Alcocer-Varela J. CTLA-4 and autoimmunity: new insights into the dual regulator of tolerance. *Autoimmun Rev* 2013; 12(12): 1171-6.
103. Fowlkes BJ, Schweighoffer E. Positive selection of T cells. *Curr Opin Immunol* 1995; 7: 188-195.
104. Anderson G, Moore NC, Owen JJT, Jenkinson EJ. Cellular interactions in thymocyte development. *Annu. Rev. Immunol.* 1996; 14: 73-99.
105. Zal T, Volkmann A, Stockinger B. Mechanisms of Tolerance Induction in Major Histocompatibility Complex Class II-restricted T Cells Specific for a Blood-borne Self-Antigen. *J. Exp. Med.* 1994; 180: 2089-2099.
106. Bouneaud C, Kourilsky P, Bousso P. Impact of Negative Selection on the T Cell Repertoire Reactive to a Self-Peptide: A Large Fraction of T Cell Clones Escapes Clonal Deletion. *Immunity* 2000; 13: 829-840.
107. Chen L. Immunological ignorance of silent antigens as an explanation of tumor evasion. *VIEWPOINT Immunology Today* 1998; 19(1): 27-30.
108. Salaman MR. A Two-step Hypothesis for the Appearance of Autoimmune Disease. *Autoimmunity* 2003; 36(2): 57-61.
109. Fassnacht U, Ackermann A, Staeheli P, Hausmann J. Immunization with dendritic cells can break immunological ignorance toward a persisting virus in the central nervous system and induce partial protection against intracerebral viral challenge. *J Gen Virol* 2004; 85(Pt 8): 2379-87.
110. Reinke E, Fabry Z. Breaking or making immunological privilege in the central nervous system: the regulation of immunity by neuropeptides. *Immunol Lett* 2006; 104(1-2): 102-9.
111. Ochsenbein AF, Klenerman P, Karrer U, Ludewig B, Pericin M *et al.* Immune surveillance against a solid tumor fails because of immunological ignorance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96: 2233-2238.

112. Ochsenein AF. Immunological ignorance of solid tumors. *Springer Semin Immunopathol* 2005; 27(1): 19-35.
113. Wilcox RA, Flies DB, Zhu G, Johnson AJ, Tamada K *et al.* Provision of antigen and CD137 signaling breaks immunological ignorance, promoting regression of poorly immunogenic tumors. *Journal of Clinical Investigation* 2002; 109(5): 651-659.
114. Strasser A, Jost PJ, Nagata S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* 2009; 30(2): 180-92.
115. Schwartz RH. T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 305-34.
116. Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K. The Induction of Tolerance by Dendritic Cells That Have Captured Apoptotic Cells. *J. Exp. Med.* 2000; 191(3): 411–416.
117. Scheinecker C, McHugh R, Shevach EM, Germain RN. Constitutive Presentation of a Natural Tissue Autoantigen Exclusively by Dendritic Cells in the Draining Lymph Node. *Journal of Experimental Medicine* 2002; 196(8): 1079-1090.
118. Verbovetski I, Bychkov H, Trahtemberg U, Shapira I, Hareuveni M *et al.* Opsonization of Apoptotic Cells by Autologous iC3b Facilitates Clearance by Immature Dendritic Cells, Down-regulates DR and CD86, and Up-regulates CC Chemokine Receptor 7. *Journal of Experimental Medicine* 2002; 196(12): 1553-1561.
119. Morelli AE. The immune regulatory effect of apoptotic cells and exosomes on dendritic cells: its impact on transplantation. *Am J Transplant* 2006; 6(2): 254-61.
120. Steinbrink K, Jonuleit H, Müller G, Schuler G, Knop J *et al.* Interleukin-10–Treated Human Dendritic Cells Induce a Melanoma-Antigen–Specific Anergy in CD8⁺ T Cells Resulting in a Failure to Lyse Tumor Cells. *Blood* 1999; 93(5): 1634-1642.
121. Cauley LS, Cauley KA, Shub F, Huston G, Swain SL. Transferable Anergy: Superantigen Treatment Induces CD4⁺ T Cell Tolerance That Is Reversible and Requires CD4⁺CD8⁻ Cells and Interferon gamma. *J. Exp. Med.* 1997; 186(1): 71–81.
122. Nishizuka Y, Sakakura T. Thymus and Reproduction: Sex-Linked Dysgenesis of the Gonad after Neonatal Thymectomy in Mice. *Science* 1969; 166: 753-755.
123. Gershon RK, Kondo K. Cell Interactions in the Induction of Tolerance: The Role of Thymic Lymphocytes. *Immunology* 1970; 18: 723-737.
124. Gershon RK, Cohen P, Hencin R, Liehaber SA. Suppressor T cells. *The Journal of Immunology* 1972; 108(3): 586-590.
125. Rich RR, Pierce CW. Biological expressions of lymphocyte activation II. Generation of a population of thymus-derived suppressor lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine* 1973; 137: 649-659.
126. Ha T-Y, Waksman BH. Role of the thymus in tolerance X. "Suppressor" Activity of Antigen-Stimulated Rat Thymocytes Transferred to Normal Recipients. *The Journal of Immunology* 1973; 110(5).
127. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic Self-Tolerance Maintained by Activated T Cells Expressing IL-2 Receptor alpha-Chains (CD25): Breakdown of a Single Mechanism of Self-Tolerance Causes Various Autoimmune Diseases. *The Journal of Immunology* 1995; 155: 1151-1164.
128. Shevach EM, McHugh RS, Piccirillo CA, Thornton AM. Control of T-cell activation by CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells. *Immunological Reviews* 2001; 182: 58–67.
129. Thornton AM, Shevach EM. CD4⁺CD25⁺ Immunoregulatory T Cells Suppress Polyclonal T Cell Activation In Vitro by Inhibiting Interleukin-2 Production. *J Exp Med* 1998; 88(2): 287–296.

130. Thornton AM, Shevach EM. Suppressor Effector Function of CD4⁺CD25⁺ Immunoregulatory T Cells Is Antigen Nonspecific. *The Journal of Immunology* 2000; 164: 183–190.
131. Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting Edge: Control of CD8⁺ T Cell Activation by CD4⁺CD25⁺ Immunoregulatory Cells. *The Journal of Immunology* 2001; 167: 1137–1140.
132. Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Hessling S, Palmethofer A *et al.* Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med* 2007; 204(6): 1303-10.
133. Hawrylowicz CM. Regulatory T cells and IL-10 in allergic inflammation. *J Exp Med* 2005; 202(11): 1459-63.
134. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299(5609): 1057-61.
135. Allan SE, Passerini L, Bacchetta R, Crellin N, Dai M *et al.* The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4⁺ Tregs. *J Clin Invest* 2005; 115(11): 3276-84.
136. Gavin MA, Torgerson TR, Houston E, DeRoos P, Ho WY *et al.* Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(17): 6659-64.
137. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 2010; 10(7): 490-500.
138. Thornton AM, Korty PE, Tran DQ, Wohlfert EA, Murray PE *et al.* Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3⁺ T regulatory cells. *J Immunol* 2010; 184(7): 3433-41.
139. Baine I, Basu S, Ames R, Sellers RS, Macian F. Helios induces epigenetic silencing of *Il2* gene expression in regulatory T cells. *J Immunol* 2013; 190(3): 1008-16.
140. Alvarado-Sanchez B, Hernandez-Castro B, Portales-Perez D, Baranda L, Layseca-Espinosa E *et al.* Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 2006; 27(2): 110-8.
141. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ *et al.* The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of *FOXP3*. *Nature Genetics* 2001; 27: 20-21.
142. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB *et al.* Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature Genetics* 2001; 27: 68-73.
143. Baron U, Floess S, Wiczorek G, Baumann K, Grutzkau A *et al.* DNA demethylation in the human *FOXP3* locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3⁺ conventional T cells. *Eur J Immunol* 2007; 37(9): 2378-89.
144. Floess S, Freyer J, Siewert C, Baron U, Olek S *et al.* Epigenetic Control of the *foxp3* Locus in Regulatory T Cells. *PLoS Biol* 2007; 5(2): 0169-0178.
145. Levings MK, Sangregorio R, Galbiati F, Squadrone S, de Waal Malefyt R *et al.* IFN- α and IL-10 Induce the Differentiation of Human Type 1 T Regulatory Cells. *The Journal of Immunology* 2001; 166: 5530–5539.
146. Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK. Type 1 T regulatory cells. *Immunological Reviews* 2001; 182: 68–79.
147. Gregori S, Goudy KS, Roncarolo MG. The cellular and molecular mechanisms of immunosuppression by human type 1 regulatory T cells. *Front Immunol* 2012; 3: 30.

148. Wakkach A, Fournier N, Brun V, Breittmayer J-P, Cottrez F *et al.* Characterization of Dendritic Cells that Induce Tolerance and T Regulatory 1 Cell Differentiation In Vivo. *Immunity* 2003; 18: 605–617.
149. Weiner HL. The mucosal milieu creates tolerogenic dendritic cells and T_R 1 and T_H3 regulatory cells. *Nat Immunol* 2001; 2(8): 671-672.
150. Jonuleit H, Schmitt E. The Regulatory T Cell Family: Distinct Subsets and their Interrelations. *J Immunol* 2003; 171: 6323-6327.
151. Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of Interleukin 10–producing, Nonproliferating CD4⁺ T Cells with Regulatory Properties by Repetitive Stimulation with Allogeneic Immature Human Dendritic Cells. *J. Exp. Med.* 2000; 192(9): 1213–1222.
152. Tuettenberg A, Fondel S, Steinbrink K, Enk AH, Jonuleit H. CD40 signalling induces IL-10-producing, tolerogenic dendritic cells. *Exp Dermatol* 2010; 19(1): 44-53.
153. Adler HS, Kubsch S, Graulich E, Ludwig S, Knop J *et al.* Activation of MAP kinase p38 is critical for the cell-cycle–controlled suppressor function of regulatory T cells. *Blood* 2007; 109: 4351-4359.
154. Pacciani V, Gregori S, Chini L, Corrente S, Chianca M *et al.* Induction of anergic allergen-specific suppressor T cells using tolerogenic dendritic cells derived from children with allergies to house dust mites. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125(3): 727-36.
155. Rubin LA, Kurman CC, Fritz ME, Biddison WE, Boutin B *et al.* Soluble Interleukin 2 Receptors are released from activated human lymphoid cells *in vitro*. *The Journal of Immunology* 1985; 135(5): 3172-3177.
156. El Houda Aguezny N, Badoual C, Hans S, Gey A, Vingert B *et al.* Soluble Interleukin-2 Receptor and metalloproteinase-9 expression in head and neck cancer: prognostic value and analysis of their relationships. *Clin Exp Immunol* 2007; 150(1): 114-23.
157. Pedersen AE, Lauritsen JP. CD25 shedding by human natural occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells does not inhibit the action of IL-2. *Scand J Immunol* 2009; 70(1): 40-3.
158. Gagliani N, Magnani CF, Huber S, Gianolini ME, Pala M *et al.* Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat Med* 2013; 19(6): 739-46.
159. Steinman RM, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(1): 351-358.
160. Doan T, McNally A, Thomas R, Steptoe RJ. Steady-state dendritic cells continuously inactivate T cells that escape thymic negative selection. *Immunol Cell Biol* 2009; 87(8): 615-622.
161. Bellinghausen I, Brand U, Steinbrink K, Enk AH, Knop J *et al.* Inhibition of human allergic T-cell responses by IL-10-treated dendritic cells: differences from hydrocortisone-treated dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108(2): 242-9.
162. Enk AH, Jonuleit H, Saloga J, Knop J. DC as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. *Int. J. Cancer* 1997; 73: 309–316.
163. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Barthelemy C, Liu Y-J *et al.* Interleukin-10 inhibits T cell alloreaction induced by human dendritic cells. *International Immunology* 1994; 6(8): 1177-1185.
164. Faulkner L, Buchan G, Baird M. Interleukin-10 does not affect phagocytosis of particulate antigen by bone marrow-derived dendritic cells but does impair antigen presentation. *Immunology* 2000; 99: 523-531.
165. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and Interleukin-10 Receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 2001; 19: 683–765.

166. Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 therapy--review of a new approach. *Pharmacol Rev* 2003; 55(2): 241-69.
167. Chen W-F, Zlotnik A. IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor. *The Journal of Immunology* 1991; 147(2): 528-534.
168. Schwarz MA, Hamilton LD, Tardelli L, Narula SK, Sullivan LM. Stimulation of Cytolytic Activity by Interleukin-10. *Journal of Immunotherapy* 1994; 16: 95-104.
169. Carson WE, Lindemann MJ, Baiocchi R, Linett M, Tan JC *et al.* The Functional Characterization of Interleukin-10 Receptor Expression on Human Natural Killer Cells. *Blood* 1995; 85(12): 3577-358.
170. Kundu N, Fulton AM. Interleukin-10 Inhibits Tumor Metastasis, Downregulates MHC Class I, and Enhances NK Lysis. *Cell Immunol* 1997; 180: 55-61.
171. Forster R, Davalos-Miszlitz AC, Rot A. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol* 2008; 8(5): 362-71.
172. Fujimoto Y, Tedder TF. CD83: A Regulatory Molecule of The Immune System with Great Potential for Therapeutic Application. *J Med Dent Sci* 2006; 53: 85-91.
173. Garcia-Martinez LF, Appleby MW, Staehling-Hampton K, Andrews DM, Chen Y *et al.* A Novel Mutation in CD83 Results in the Development of a Unique Population of CD4⁺ T Cells. *The Journal of Immunology* 2004; 173: 2995-3001.
174. Kruse M, Rosorius O, Krätzer F, Stelz G, Kunt C *et al.* Mature Dendritic Cells Infected with Herpes Simplex Virus Type 1 Exhibit Inhibited T-Cell Stimulatory Capacity. *JOURNAL OF VIROLOGY* 2000; 74(15): 7127-7136.
175. Prechtel AT, Turza NM, Theodoridis AA, Steinkasserer A. CD83 Knockdown in Monocyte-Derived Dendritic Cells by Small Interfering RNA Leads to a Diminished T Cell Stimulation. *The Journal of Immunology* 2007; 178: 5454-5464.
176. Tze LE, Horikawa K, Domaschew H, Howard DR, Roots CM *et al.* CD83 increases MHC II and CD86 on dendritic cells by opposing IL-10-driven MARCH1-mediated ubiquitination and degradation. *J Exp Med* 2011; 208(1): 149-65.
177. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 1989; 74: 2527-2534.
178. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties. *Immunity* 2003; 19(1): 71-82.
179. Zhao C, Zhang H, Wong W-C, Sem X, Han H *et al.* Identification of Novel Functional Differences in Monocyte Subsets Using Proteomic and Transcriptomic Methods. *J Proteome Res* 2009; 8: 4028-4038.
180. Ingersoll mA, Rainer Spanbroek R, Lottaz C, Gautier EL, Frankenberger M *et al.* Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. *Blood* 2010; 115(3).
181. Wong KL, Yeap WH, Tai JJ, Ong SM, Dang TM *et al.* The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res* 2012; 53(1-3): 41-57.
182. Oosterhoff D, Loughheed S, van de Ven R, Lindenberg J, van Crujisen H *et al.* Tumor-mediated inhibition of human dendritic cell differentiation and function is consistently counteracted by combined p38 MAPK and STAT3 inhibition. *Oncoimmunology* 2012; 1(5): 649-658.
183. Lindenberg JJ, van de Ven E, Loughheed SM, Zomer A, Santegoets SJAM *et al.* Functional characterization of a STAT3-dependent dendritic cell-derived CD14⁺ cell population arising upon IL-10-driven maturation. *Oncoimmunology* 2013; 2(4): 1-14.

184. Unkeless JC, Jin JJ. Inhibitory receptors, ITIM sequences and phosphatases. *Curr Opin Immunol* 1997; 9: 338-343.
185. Colonna M, Nakajima H, Navarro F, López-Botet M. A novel family of Ig-like receptors for HLA class I molecules that modulate function of lymphoid and myeloid cells. *J Leukoc Biol* 1999; 66: 375-381.
186. Liang S, Ristich V, Arase H, Dausset J, Carosella ED *et al.* Modulation of dendritic cell differentiation by HLA-G and ILT4 requires the IL-6/STAT3 signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(24): 8357-62.
187. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 1999; 5(12): 1365-1369.
188. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T *et al.* Engagement of the PD-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *J. Exp. Med.* 2000; 192(7): 1027-1034.
189. Selenko-Gebauer N, Majdic O, Szekeres A, Höfler G, Zlabinger G *et al.* B7-H1 (Programmed Death-1 Ligand) on Dendritic Cells Is Involved in the Induction and Maintenance of T Cell Anergy. *The Journal of Immunology* 2003; 170: 3637-3644.
190. Flies DB, Sandler BJ, Sznol M, Chen L. Blockade of the B7-H1/PD-1 Pathway for Cancer Immunotherapy. *YALE JOURNAL OF BIOLOGY AND MEDICINE* 2011; 84: 409-421.
191. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol* 2012; 24(2): 207-12.
192. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2008; 26: 677-704.
193. Tseng S-Y, Otsuji M, Gorski K, Huang X, Slansky JE *et al.* B7-DC, a New Dendritic Cell Molecule with Potent Costimulatory Properties for T Cells. *J. Exp. Med.* 2001; 193(7): 839-845.
194. Pfistershammer K, Klauser C, Pickl WF, Stockl J, Leitner J *et al.* No evidence for dualism in function and receptors: PD-L2/B7-DC is an inhibitory regulator of human T cell activation. *Eur J Immunol* 2006; 36(5): 1104-13.
195. von Bergwelt-Baildon MS, Popov A, Saric T, Chemnitz J, Classen S *et al.* CD25 and indoleamine 2,3-dioxygenase are up-regulated by prostaglandin E2 and expressed by tumor-associated dendritic cells in vivo: additional mechanisms of T-cell inhibition. *Blood* 2006; 108(1): 228-37.
196. Wuest SC, Edwan JH, Martin JF, Han S, Perry JS *et al.* A role for interleukin-2 trans-presentation in dendritic cell-mediated T cell activation in humans, as revealed by daclizumab therapy. *Nat Med* 2011; 17(5): 604-9.
197. Velten FW, Rambow F, Metharom P, Goerdts S. Enhanced T-cell activation and T-cell-dependent IL-2 production by CD83⁺, CD25^{high}, CD43^{high} human monocyte-derived dendritic cells. *Mol Immunol* 2007; 44(7): 1544-50.
198. Rubin LA, Jay G, Nelson DL. The released Interleukin 2 Receptor binds Interleukin 2 efficiently. *The Journal of Immunology* 1986; 137(12): 3841-3844.
199. Rubin LA, Galli F, Greene WC, Jay G. The molecular basis for the generation of the human soluble Interleukin 2 Receptor. *CYTOKINE* 1990; 2(5): 330-336.
200. Jaques Y, Le Mauff B, Boeffard F, Godard A, Souliou J-P. A soluble Interleukin 2 receptor produced by a normal alloreactive human T cell clone binds Interleukin 2 with low affinity. *The Journal of Immunology* 1987; 139(7): 2308-2316.
201. Robb RJ, Kutny RM. Structure-function relationships for the IL 2-receptor system IV. Analysis of the Sequence and Ligand-Binding Properties. *The Journal of Immunology* 1987; 139(3): 855-862.

202. Sheu B-C, Hsu S-M, Ho H-N, Lien H-C, Huang S-H *et al.* A Novel Role of Metalloproteinase in Cancer-mediated Immunosuppression. *CANCER RESEARCH* 2001; 61: 237–242.
203. Yen JH, Kocieda VP, Jing H, Ganea D. Prostaglandin E2 induces matrix metalloproteinase 9 expression in dendritic cells through two independent signaling pathways leading to activator protein 1 (AP-1) activation. *J Biol Chem* 2011; 286(45): 38913-23.
204. Suci-Foca N, Cortesini R. Central role of ILT3 in the T suppressor cell cascade. *Cell Immunol* 2007; 248(1): 59-67.
205. Stallone G, Pontrelli P, Infante B, Gigante M, Netti GS *et al.* Rapamycin induces ILT3^{high}ILT4^{high} dendritic cells promoting a new immunoregulatory pathway. *Kidney Int* 2014; 85(4): 888-897.
206. Buckner JH, Ziegler SF. Regulating the immune system: the induction of regulatory T cells in the periphery. *Arthritis Res Ther* 2004; 6(5): 215-222.
207. Peterson RA. Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. *Toxicol Pathol* 2012; 40(2): 186-204.
208. Krupnick AS, Gelman AE, Barchet W, Richardson S, Kreisel FH *et al.* Cutting Edge: Murine Vascular Endothelium Activates and Induces the Generation of Allogeneic CD4⁺25⁺Foxp3⁺ Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology* 2005; 175: 6265–6270.
209. Chemnitz JM, Parry RV, Nichols KE, June CH, Riley JL. SHP-1 and SHP-2 Associate with Immunoreceptor Tyrosine-Based Switch Motif of Programmed Death 1 upon Primary Human T Cell Stimulation, but Only Receptor Ligation Prevents T Cell Activation. *The Journal of Immunology* 2004; 173: 945–954.
210. Qiao G, Yang L, Li Z, Ying H, Hassen Y *et al.* Program death-1 regulates peripheral T cell tolerance via an anergy-independent mechanism. *Clin Immunol* 2012; 143(2): 128-33.
211. Rudensky AY. Regulatory T cells and Foxp3. *Immunological Reviews* 2011; 241: 260–268.
212. Wang R, Wan Q, Kozhaya L, Fujii H, Unutmaz D. Identification of a Regulatory T Cell Specific Cell Surface Molecule that Mediates Suppressive Signals and Induces Foxp3 Expression. *PLoS ONE* 2008; 3(7): 1-9.
213. Wang R, Kozhaya L, Mercer F, Khaitan A, Fujii H *et al.* Expression of GARP selectively identifies activated human FOXP3⁺ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(32): 13439-44.
214. Wang R, Zhu J, Dong X, Shi M, Lu C *et al.* GARP regulates the bioavailability and activation of TGFbeta. *Mol Biol Cell* 2012; 23(6): 1129-39.
215. Stockis J, Colau D, Coulie PG, Lucas S. Membrane protein GARP is a receptor for latent TGF-beta on the surface of activated human Treg. *Eur J Immunol* 2009; 39(12): 3315-22.
216. Hahn SA, Stahl HF, Becker C, Correll A, Schneider F-J *et al.* Soluble GARP has potent antiinflammatory and immunomodulatory impact on human CD4⁺ T cells. *Blood* 2013; 122(7): 1182-1191.
217. Bacchetta R, Narula S, Sartirana C, Levings MK, Roncarolo M-G. Growth and expansion of human T regulatory type 1 cells are independent from TCR activation but require exogenous cytokines. *Eur. J. Immunol.* 2002; 32: 2237–2245.
218. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *International Immunology* 1998; 10(12): 1969–1980.
219. Vukmanovic-Stejic M, Agius E, Booth N, Dunne PJ, Lacy KE *et al.* The kinetics of CD4⁺Foxp3⁺ T cell accumulation during a human cutaneous antigen-specific memory response *in vivo*. *J Clin Invest* 2008; 118(11): 3639-3650.

220. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K *et al.* Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 2009; 30(6): 899-911.
221. Peters JH, Koenen HJ, Fasse E, Tijssen HJ, Ijzermans JN *et al.* Human secondary lymphoid organs typically contain polyclonally-activated proliferating regulatory T cells. *Blood* 2013; 122(13): 2213-2223.
222. Attridge K, Walker LSK. Homeostasis and function of regulatory T cells (Tregs) *in vivo*: lessons from TCR-transgenic Tregs. *Immunological Reviews* 2014; 259: 23–39.
223. Klein L, Khazaie K, von Boehmer H. *In vivo* dynamics of antigen-specific regulatory T cells not predicted from behavior *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(15): 8886-8891.
224. Walker LSK, Chodos A, Eggena M, Dooms H, Abbas AK. Antigen-dependent proliferation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells *in vivo*. *J Exp Med* 2003; 198(2): 249-258.
225. Walker LSK. CD4⁺CD25⁺ Treg: divide and rule? *Immunology* 2004; 111: 129-137.

7 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
³ H-Thymidin	Tritium-markiertes Thymidin
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin (Fluorochrom)
APC	antigen-präsentierende Zelle/n
Aqua dest.	destilliertes Wasser
bzw.	beziehungsweise
cAMP	cyclic Adenosine Monophosphate
CD	Cluster of Differentiation
CTLA-4	Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen 4
d. h.	das heißt
DC	dendritische Zelle/n
DEX-DC	Dexamethason-modulierte dendritische Zelle/n
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
engl.	englisch
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanate (Fluorochrom)
Foxp3	Forkhead box P3
FSC	Forward Scattered Light
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GvHD	Graft versus Host Disease
h	Stunde
HLA	Human Leukocyte Antigen
HSA	Human Serum Albumin
ICOS	Inducible T-cell Co-Stimulator
iDC	immature dendritische Zellen
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-10DC	IL-10-modulierte dendritische Zelle/n
ILT	Immunoglobuline-Like Transcript
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif
iTreg	induzierte regulatorische T-Zelle
mAb	monoklonale/r Antikörper

MACS	Magnetic Cell Sorter
mDC	mature dendritische Zellen
MFI	Mittlerer Fluoreszenz-Index
mg	Milligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Versuche
n.d.	nicht detektierbar
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
ns	nicht signifikant
nTreg	natürlich vorkommende regulatorische T-Zelle
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Salt Solution
PE	R-Phycoerythrin (Fluorochrom)
PGE	Prostaglandin E
PRR	Pattern Recognition Receptor
rpm	Umdrehungen pro Minute
s.o.	siehe oben
SLC	sekundäres lymphatisches Chemokin
SSC	Side Scattered Light
stDC	„steady state“ dendritische Zelle/n
TC	T-Zelle / T-Lymphozyt
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF	Transforming Growth Factor
T _H	T-Helferzelle
TLR	Toll-Like Rezeptor
TMB	3,5,3',5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorischen T-Zelle/n (allgemein)
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
VDR	Vitamin D ₃ -Rezeptor
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ZTL	zytotoxische T-Lymphozyten

8 Publikationen

Hubo M, Trinschek B, Kryczanowsky F, Tüttenberg A, Steinbrink K und Jonuleit H. Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. *Frontiers in Immunology*, 2013; 4: 1-14.

9 Konferenzen

Vorträge:

Mainzer Allergie-Workshop, 2013

Fanny Kryczanowsky, Edith Graulich, Kathrin Rost, Kerstin Steinbrink

Humane IL-10-modulierte dendritische Zellen: Induktion anergischer regulatorischer T Zellen durch reife $CD83^{high}CCR7^{high}HLA-DR^{high}$ und unreife $CD83^{low}CCR7^{negative}HLA-DR^{low}$ DC Subpopulationen.

Poster-Präsentationen:

Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung Lübeck, 2010

Henric S. Adler, Fanny Kryczanowsky, Fabian Hermann, Helen Martin, Stephan Sudowe, Christian Taube, Kerstin Steinbrink

Analysis of the effect of IL-10-modulated DC in a humanized mouse model of lethal GvHD.

Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung Tübingen, 2011

Fanny Kryczanowsky, Edith Graulich, Kathrin Rost, Andrea Englert, Henric S. Adler, Kerstin Steinbrink

Analysis of the tolerogenic properties of two subpopulations of human IL-10-modulated dendritic cells.

Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung Marburg, 2012

Fanny Kryczanowsky, Edith Graulich, Kathrin Rost, Henric S. Adler, Kerstin Steinbrink

IL-10-modulated human dendritic cells: induction of anergic T cells by $CD83/CCR7/HLA-DR^{high}$ as well as $CD83^{low}CCR7^{negative}HLA-DR^{low}$ subpopulations of tolerogenic DC.

European Congress of Immunology Glasgow, 2012

Fanny Kryczanowsky, Edith Graulich, Kathrin Rost, Kerstin Steinbrink

Induction of anergic T cells by $CD83^{high}CCR7^{high}HLA-DR^{high}$ as well as $CD83^{low}CCR7^{negative}HLA-DR^{low}$ IL-10-modulated human dendritic cell subpopulations.

Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung Dessau, 2013

Fanny Kryczanowsky, Edith Graulich, Kathrin Rost, Kerstin Steinbrink

Tolerogenic IL-10-modulated human dendritic cells: induction of anergic regulatory T cells by mature CD83^{high}CCR7^{high}HLA-DR^{high} as well as immature CD83^{low}CCR7^{negative}HLA-DR^{low} DC subpopulations.

International Congress of Immunology Mailand, 2013

Fanny Kryczanowsky, Edith Graulich, Kathrin Rost, Kerstin Steinbrink

Tolerogenic human IL-10-modulated dendritic cells as inducers of regulatory T cells: analysis of mature CD83^{high}CCR7^{high}HLA-DR^{high} and immature CD83^{low}CCR7^{negative}HLA-DR^{low} DC subpopulations.

Deutsche Gesellschaft für Immunologie Mainz, 2013

Fanny Kryczanowsky, Edith Graulich, Kathrin Rost, Kerstin Steinbrink

Tolerogenic human IL-10-modulated mature CD83^{high}CCR7^{high}HLA-DR^{high} and immature CD83^{low}CCR7^{negative}HLA-DR^{low} DC subpopulations as inducers of regulatory T cells.

Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung Köln, 2014

Fanny Kryczanowsky, Edith Graulich, Kathrin Rost, Kerstin Steinbrink

Tolerogenic human IL-10-modulated dendritic cells: mature CD83^{high} and immature CD83^{low} DC subpopulations are inducers of potent regulatory T cells.

10 Lebenslauf

11 Danksagungen

12 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Mainz,

Fanny Kryczanowsky