



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

**Immunregulatorische Mechanismen
bei einer experimentellen akuten
Graft-versus-Host Disease**

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
im Promotionsfach Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Michael Weber

geboren in Bad Dürkheim

Mainz, September 2013

Dekan:

Erster Berichtstatter:

Zweiter Berichtstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 22.11.2013

Zusammenfassung

Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation ist bereits seit mehreren Jahrzehnten zur Therapie von Leukämien und anderen malignen Erkrankungen etabliert, aber ihre Effektivität wird durch Graft-versus-Host Reaktionen weiterhin deutlich eingeschränkt. Um die zu Grunde liegenden Mechanismen besser zu verstehen und Möglichkeiten zur Modulation zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit verschiedene Ansätze verfolgt.

Regulatorische T-Zellen sind in der Lage allogene T-Zell-Antworten, wie sie auch bei einer GvH-Erkrankung auftreten zu supprimieren. Es konnte gezeigt werden, dass dies unabhängig von Interleukin-10 geschieht, dafür jedoch ein kontaktabhängiger Mechanismus eine wichtige Rolle spielt. Dabei wird cAMP von Treg über Gap-Junctions in allogene Dendritische Zellen übertragen und deren Aktivierung dadurch verhindert. Versuche zur Modulation dieses Mechanismus mithilfe von Phosphodiesterase-Inhibitoren haben gezeigt, dass diese nicht nur die suppressiven Fähigkeiten von Treg verbessern, sondern ebenfalls direkt auf die T-Zellen einwirken, die schließlich die GvH-Erkrankung auslösen. Diese Ergebnisse konnten *in vivo* bestätigt werden und zeigen somit einen möglichen Ansatz hin zu einer kombinierten zellulären und pharmakologischen Therapie von GvH-Erkrankungen. Ein großer Vorteil dabei wäre, dass bereits eine Palette an PDE-Inhibitoren in der Klinik zur Verfügung steht.

Interleukin-10 ist ein immunsuppressives und anti-inflammatorisches Zytokin, dem bei der Regulation des Immunsystems eine wichtige Rolle zukommt. Wie in dieser und anderen Arbeiten gezeigt, ist diese Funktion von IL-10 auch bei GvH-Erkrankungen essentiell. Ein Ziel war es daher, die Zellpopulationen, die für die Produktion des Zytokins verantwortlich sind, zu identifizieren. Mittels einer IL-10 Reporter-Maus konnten B-Zellen vom Spender, wie auch vom Empfänger als IL-10 Produzenten ausgemacht werden. Darüberhinaus zeigen die so gefundenen Zellen auch einen typischen Phänotyp für sog. immunregulatorische B-Zellen. Transplantationsexperimente mit Mäusen, die einen B-Zell-spezifischen Knock-out für IL-10 tragen, konnten die Relevanz der B-Zellen als IL-10 Produzenten *in vivo* belegen.

Dendritische Zellen sind sehr potente Antigenpräsentierende Zellen und somit in der Lage GvH-Reaktionen zu induzieren. Überraschenderweise ist das Überleben von Versuchsmäusen, denen alle DC oder auch nur die *BATF3*-abhängige Subpopulation der CD8 α^+ DC fehlt, nicht besser als das des WT, sondern sogar deutlich schlechter. Dies geht einher mit entsprechenden Veränderungen im Zytokinmilieu der peripheren lymphatischen Organe. Bei Abwesenheit der CD8 α^+ DC sind die Zellen der mesenterialen Lymphknoten nach dem Konditionierungsprotokoll stärkere Stimulatoren für allogene T-Zell-Proliferation, was eine Erklärung für die stärkere GvH-Erkrankung ist. Eine Erklärung für diese Befunde liefert die verringerte Anzahl an Treg, die nach einer Transplantation in Abwesenheit der CD8 α^+ DC zu beobachten ist.

Die aufgezeigten immunsuppressiven Mechanismen stellen gute Ansatzpunkte dar, um GvH-Erkrankungen besser zu verstehen und damit die Effektivität der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation zu verbessern.

Summery

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation has been in the clinic for decades, but the efficacy is still limited due to some major complications, namely Graft-versus-Host Disease. This thesis deals with different approaches to understand and modulate the underlying mechanisms.

Regulatory T cells are potent suppressors of T cell activation during GvHD. The mechanism appears to be independent of IL-10 but dependent on cell-to-cell contact. Regulatory T cells transfer cAMP via Gap Junctions into allogeneic dendritic cells and thus prevent their activation. This can be modulated by Phosphodiesterase inhibitors that enhance the suppressive capacities of the Treg and, in addition, also reduce T cell proliferation directly. These findings could be confirmed in an *in vivo* experiment and therewith highlight the potential of a combined cellular and pharmacological therapy for GvHD. An important advantage would be that there are already PDE inhibitors in the clinic.

Interleukine-10 is an immunosuppressive and anti-inflammatory cytokine, that plays a key role in immunoregulation. As shown here and in previous publications, IL-10 is also essential in GvHD. One aim was to identify the cell populations contributing to IL-10 production. By using an IL-10 reporter mouse in an unbiased approach, B cells from donor as well as recipient origin could be identified as relevant sources. In addition, the IL-10 producers show the typical phenotype of immuoregulatory B cells. Further transplantation experiments with mice bearing a B cell specific IL-10 knock out confirmed the relevance of B cell derived IL-10.

Dendritic cells are well known as potent antigen presenting cells and subsequently are able to induce GvH reactions. Surprisingly, mice that lack all dendritic cells or even just the *BATF3* dependent subpopulation of CD8 α^+ DC show a reduced survival after an allogeneic transplantation. Cells from mesenteric lymph nodes of preconditioned mice without CD8 α^+ DC are better stimulators for allogeneic T cell proliferation, what would be an explanation for the more severe GvHD. All this findings including the higher mortality of DC knock-out mice might be due to reduced numbers of Treg detected in the periphery.

The described immunosuppressive mechanisms provide new insights into GvHD and might help to overcome current limitations of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	ALLOGENE HÄMATOPOETISCHE STAMMZELLTRANSPLANTATION	1
1.2	GRAFT-VERSUS-HOST-ERKRANKUNGEN	2
1.3	DAS MHC-SYSTEM	3
1.4	MINOR HISTOKOMPATIBILITÄTSANTIGENE	6
1.5	DENDRITISCHE ZELLEN	6
1.5.1	CD8 α ⁺ Dendritische Zellen	7
1.5.2	Myeloische Dendritische Zellen	9
1.5.3	Plasmazytoide Dendritische Zellen	9
1.6	T-ZELL-ENTWICKLUNG UND PRIMING	10
1.6.1	T-Zell-Priming nach allogener HSCT	12
1.7	REGULATORISCHE T-ZELLEN	13
1.8	B-ZELLEN	15
1.8.1	Immunregulatorische B-Zellen	16
1.9	INTERLEUKIN-10 UND DER IL-10 REZEPTOR	17
1.10	MURINE GvH-MODELLE	20
1.11	ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	22
2.	Material und Methoden	23
2.1	MATERIAL	23
2.1.1	Medien und Puffer	23
2.1.2	Reagenzien, Chemikalien und Enzyme	25
2.1.3	Antikörper	27
2.1.4	Versuchstiere	28
2.1.5	Verbrauchsmaterialien	29
2.1.6	Laborgeräte	29
2.2	METHODEN	31
2.2.1	Tierexperimentelle Methoden	31
2.2.2	<i>Ex vivo</i> und <i>in vitro</i> Arbeiten	33
2.2.3	Durchflusszytometrie	38
2.2.4	ELISA	40
2.2.5	Molekularbiologische Arbeiten	40
2.2.6	Histologische Methoden	43
2.2.7	Software und Statistik	43
3.	Ergebnisse	45
3.1	MECHANISMEN DER TREG VERMITTELTEN SUPPRESSION EINER GvH-ERKRANKUNG	45
3.1.1	Regulatorische T-Zellen des Donors supprimieren eine akute GvH-Erkrankung	45
3.1.2	Regulatorische T-Zellen supprimieren eine GvH-Erkrankung unabhängig von IL-10	46
3.1.3	Regulatorische T-Zellen kommunizieren mit allogenen DC über Gap Junctions und cAMP	47
3.1.4	Regulatorische T-Zellen induzieren einen suppressiven Phänotyp in allogenen DC	48
3.1.5	Inhibierung von Phosphodiesterasen verbessert die Suppression durch Treg	49
3.1.6	PDE-Inhibitoren supprimieren die T-Zell-Proliferation auch unabhängig von Treg	51

3.1.7	PDE-Inhibitoren verändern die Zytokinproduktion und die Expression von kostimulatorischen Molekülen auf DC <i>in vitro</i> nicht	51
3.1.8	Rolipram inhibiert die T-Zell-Proliferation direkt und indirekt durch Modulation der DC/Treg Interaktion	54
3.1.9	Rolipram verbessert die suppressiven Fähigkeiten von Treg <i>in vivo</i>	55
3.2	DIE ROLLE VON IL-10 BEI DER SUPPRESSION VON GVH-ERKRANKUNGEN	57
3.2.1	IL-10 spielt eine essentielle Rolle während einer GvH-Erkrankung	57
3.2.2	IL-10 von Donor und Empfänger beeinflusst den Verlauf einer GvH-Erkrankung	59
3.2.3	B-Zellen von Donor und Empfänger produzieren IL-10	60
3.2.4	IL-10 produzierende B-Zellen zeigen einen typischen Phänotyp	62
3.2.5	Blockade des IL-10 Rezeptors führt zu einem veränderten DC-Phänotyp	64
3.2.6	Blockade des IL-10 Rezeptors bei allogener HSCT führt zu verbessertem T-Zell-Priming	65
3.2.7	IL-10 aus Donor und Empfänger B-Zellen verbessert eine akute GvH-Erkrankung	66
3.3	UNTERSUCHUNG DER ROLLE VON DC BEI EINER AKUTEN GVH-ERKRANKUNG	69
3.3.1	Verlust der Empfänger DC führt zu verringertem Überleben einer akuten GvH-Erkrankung	69
3.3.2	Verlust der Empfänger DC beeinflusst das Anwachsen des allogenen Knochenmarks nicht	70
3.3.3	Depletion der DC führt zu einer veränderten zellulären Zusammensetzung der Milz nach allogener HSCT	71
3.3.4	Depletion von Empfänger DC führt zu einem höheren Anteil an Donor-Zellen nach allogener HSCT	72
3.3.5	Die Abwesenheit von CD8 α^+ DC im Empfänger führt zu einem schlechteren Verlauf einer akuten GvH-Erkrankung	73
3.3.6	In BATF3 ^{-/-} Mäusen herrscht nach allogener HSCT ein modifiziertes Zytokin-Millieu	74
3.3.7	DC aus konditionierten BATF3 ^{-/-} Mäusen zeigen einen stärker aktivierten Phänotyp	75
3.3.8	Lymphknotenzellen aus konditionierten BATF3 ^{-/-} Mäusen sind potentere Stimulatoren für allogene T-Zellen als Zellen aus WT Mäusen	76
3.3.9	Die Anzahl an Treg ist in allogenen transplantierten BATF3 ^{-/-} Mäusen reduziert	78
4	Diskussion	79
4.1	MECHANISMEN DER TREG VERMITTELTEN SUPPRESSION EINER GVH-ERKRANKUNG	79
4.2	DIE ROLLE VON IL-10 BEI DER SUPPRESSION EINER GVH-ERKRANKUNG	81
4.3	UNTERSUCHUNG DER ROLLE VON DC BEI EINER AKUTEN GVH-ERKRANKUNG	83
5	Graphische Zusammenfassung	87
6	Abkürzungen	89
7	Literaturverzeichnis	91
8	Eigene Publikationen	103
8	Lebenslauf	105

1 Einleitung

1.1 Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation

Bei der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation (hematopoietic stem cell transplantation, HSCT) werden Blutstammzellen eines Spenders (Donor) in einen zuvor konditionierten Empfänger (Rezipient) übertragen. Spender und Empfänger sind dabei immer unterschiedliche Personen, sind beide identisch spricht man von einer autologen Transplantation.

Die allogene HSCT ist eine Option bei der Behandlung von Erkrankungen des blutbildenden Systems. Dabei entfallen ca. 75% der Indikationen auf verschiedene Formen der Leukämie, wobei darunter die akute myeloische Leukämie (AML) und das myelodysplastische Symptom (MDS) mit Abstand den größten Anteil haben. Ferner werden lymphoproliferative Erkrankungen (knapp 20%) wie Myelome und Lymphome und in geringerem Umfang auch Erkrankungen wie solide Tumore, Knochenmarkplasien oder primären Immundefekten mit allogener HSCT therapiert (siehe Tabelle 1)¹.

Die Transplantation umfasst mehrere Phasen. Zunächst muss der Empfänger konditioniert werden. Dabei wird durch Chemotherapie und Strahlentherapie das Knochenmark weitgehend zerstört und z.B. im Falle einer Leukämie damit auch ein großer Teil der krankheitsverursachenden Zellen. Das Spenderknochenmark wird meist mittels Stammzellapharese aus dem peripheren Blut gewonnen, nachdem der Donor einige Tage mit G-CSF (Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor) behandelt wurde. Seltener wird das Knochenmark direkt aus dem Beckenkamm entnommen oder die Stammzellen werden aus Nabelschnurblut extrahiert. Die Stammzellen werden dem Empfänger intravenös verabreicht und wachsen selbstständig in den durch die Konditionierung leeren Nischen in den großen Knochen an. Nach wenigen Tagen sind die ersten Blutzellen von Donorursprung nachweisbar².

Einleitung

Tabelle 1: Überblick über allogene Ersttransplantationen in Deutschland zwischen 1998 und 2011 nach Diagnose, Spendertyp und Stammzellquelle.

Gezeigt sind Transplantationen, die in der ProMISe-Datenbank der EBMT (European Group for Blood and Marrow Transplantation) registriert wurden. Abkürzungen: KM – Knochenmark, PB – periphere Blutstammzellen, CB – Nabelschnurblut, OT – Kombinationen aus KM, PB, CB. HLA-id: HLA-identische Geschwister, HLA-MM: partiell HLA-identischer verwandter Spender, Zwilling: Eineiger Zwilling, unverwandt: HLA-identischer oder partiell-identischer unverwandter Spender. AML – Akute myeloische Leukämie, ALL – Akute lymphatische Leukämie, CML – Chronische myeloische Leukämie, MDS – Myelodysplastisches Syndrom, MPS – Myeloproliferatives Syndrom, CLL – Chronische lymphatische Leukämie, NHL – Non-Hodgkin-Lymphom. Entnommen aus Beelen et al¹.

Diagnose	HLA-id verwandt				HLA-MM verwandt				Zwilling		unverwandt				Gesamt
	KM	PB	CB	OT	KM	PB	CB	OT	KM	PB	KM	PB	CB	OT	
AML	253	1974		5	62	396		35	6	25	424	3684		8	6872
ALL	210	665	5	3	75	202	3	22	2	7	549	1500	11	1	3255
Akute Leukämie	10	66		2	10	16					27	114			245
CML	211	544		3	49	118		5	6	6	446	827		1	2216
MDS/MPS	148	1190		7	46	203		17		15	411	3014		2	5062
CLL	11	226		2	2	38		1		4	38	491		1	814
Chronische Leukämie	5	19			1	6				1	3	61			96
Myelom	18	587		2	7	70			1	15	83	899	1	1	1684
Morbus Hodgkin	2	100			1	19				3	18	159			302
NHL	48	619		1	28	104		12	1	20	118	1153		2	2106
Lymphom	3	14			2	2					5	32			58
Solider Tumor	8	72			1	96			1	4	2	24			208
Aplastische Anämie	149	110		3	29	35		1	3	4	137	162		3	638
Hämoglobinopathie	40	9	3	1	34	12					11	20		1	131
Immundefekt	36	9	1	2	35	60					69	32		9	253
Angeborener Defekt	20	2			12	26					48	32			140
Autoimmunerkrankung	1	2			1	1				2		2			9
Andere Diagnose						1						1			2
Gesamt	1173	6208	9	31	395	1405	3	93	20	106	2389	12207	44	8	24091

Ein weiterer erwünschter Effekt der Transplantation ist die sog. Graft-versus-Leukemia-Reaktion (GvL-Reaktion) oder allgemeiner formuliert Graft-versus-Malignancy-Reaktion (GvM-Reaktion). Diese wird vor allem durch T-Zellen aus dem Transplantat vermittelt³. Allerdings spielen auch NK-Zellen (Natürliche Killer-Zellen) eine große Rolle⁴. Die Zellen erkennen nach der Konditionierung verbleibende Leukämie-Zellen als solche und zerstören sie. Die Wichtigkeit der GvL-Reaktion lässt sich daran erkennen, dass die Heilungschancen deutlich verringert sind, wenn das Knochenmark vor der Übertragung von Leukozyten befreit wird^{5,6}.

1.2 Graft-versus-Host-Erkrankungen

Graft-versus-Host-Reaktionen (GvH-Reaktionen) sind eine unerwünschte, aber nicht selten auftretende Komplikationen nach einer allogenen HSCT. Dabei handelt es sich um Reaktionen von T-Zellen aus dem Transplantat, allerdings sind diese im Gegensatz zur GvM-Reaktion gegen gesundes Gewebe des Empfängers gerichtet.

Die folgende Graft-versus-Host-Erkrankung kann sowohl akut, wie auch chronisch auftreten. Die Grenze zwischen den beiden Formen wird um Tag 100 nach der Transplantation gezogen. Diese Unterteilung wird jedoch zunehmend kritischer betrachtet, da z.B. auch deutlich nach Tag 100 noch GvH-Erkrankungen mit akutem Charakter beginnen können⁷.

Die Symptome beider Formen sind sich ähnlich, aber nicht gleich. Bei einer akuten GvH-Erkrankung sind typischerweise vor allem Haut, Darm und Leber betroffen. Die Haut kann leicht gerötet sein (Erythrodermie), aber auch schwer entzündet (Makulopapulöses Exanthem). Durch den in Mitleidenschaft gezogenen Darm kommt es zu starkem Durchfall und Bauchschmerzen (Enteritis mit Diarrhoe) und folglich auch zu Gewichtsverlust. Bei Beteiligung der Leber sind erhöhte Werte entsprechender Marker im Blut (Alanin-Aminotransferase, Alkalische Phosphatase, Bilirubin u.a.) zu messen und auch eine Gelbsucht (Ikterus) und Leberversagen sind möglich. Bei einer chronischen GvH-Erkrankung sind des Weiteren ausgeprägte Mundtrockenheit und Veränderungen der Mundschleimhäute zu beobachten, ebenso wie trockene Horn- und Bindehaut im Auge. Auch das Lungengewebe kann entzündlich verändert sein und so zu Reizhusten und Luftnot führen⁸.

Die Wahrscheinlichkeit nach einer allogenen Knochenmarkstransplantation eine GvH-Erkrankung zu entwickeln hängt von einer Vielzahl von Faktoren ab. Neben Alter und Geschlecht von Spender und Empfänger, spielt auch die Art der Konditionierung und die Möglichkeit einer medikamentösen GvH-Prophylaxe eine Rolle¹⁰. Entscheidend ist jedoch die Ähnlichkeit von Gewebsmerkmalen von Spender und Empfänger, insbesondere (aber nicht ausschließlich) das Humane Leukozytenantigen-System (HLA-System) kommt hier zum Tragen.

1.3 Das MHC-System

Beim Humane Leukozytenantigen-System (HLA-System) handelt es sich um Proteinkomplexe auf der Oberfläche von nahezu jeder Zelle, die T-Zellen Peptide präsentieren und diese damit aktivieren können. Ähnliche Systeme kommen bei allen Wirbeltieren vor und werden allgemein als Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC, Major Histocompatibility Complex) bezeichnet. Die große Rolle die dieses System bei

Einleitung

Transplantationen spielen lässt sich an historischen Bezeichnungen wie Gewebsverträglichkeits-Antigen oder Transplantations-Antigen ablesen¹¹⁻¹³.

Grundsätzlich muss man zwischen den MHC Komplexen der Klassen I und II unterscheiden. MHC I ist auf allen kernhaltigen Zellen zu finden und wird konstitutiv exprimiert. Die membranständige MHC I α -Kette wird im Endoplasmatischen Retikulum (ER) an das β_2 -Mikroglobulin gebunden und danach mit dem zu präsentierenden Peptid beladen. Die Peptide stammen aus dem proteasomalen Abbau von Proteinen in der Zelle und werden durch Transportmechanismen ins ER gebracht. Das bedeutet, dass z.B. auch virale Proteine im Fall einer Infektion in dieser Art verarbeitet werden. Das Peptid-beladene MHC I Molekül wird an die Zelloberfläche transportiert und ist dort in der Lage CD8 positive T-Zellen, die den entsprechenden MHC/Peptid-Komplex mit ihrem T-Zell-Rezeptor erkennen zu aktivieren^{14,15}.

MHC II hingegen wird nur von wenigen Zelltypen exprimiert, diese werden als antigenpräsentierende Zellen (Antigen presenting cells, APC) zusammengefasst. Im Einzelnen handelt es sich dabei klassisch um Makrophagen, Monozyten, B-Zellen und Dendritische Zellen, die auch als professionelle APC bezeichnet werden¹⁷. Darüberhinaus werden z.T. auch Fibroblasten, Thymusepithel Zellen, Mikroglia und andere zu den nicht-professionellen APC gezählt¹⁸⁻²⁰. Das MHC II Molekül wird im ER aus einer α - und einer β -Kette, die beide membranständig sind, gebildet. Vesikel, die MHC II enthalten schnüren sich vom ER ab und verschmelzen mit Endosomen. In diesen werden endozytierte Proteine zu Peptiden degradiert und auf das MHC II Molekül geladen. Durch weiteren vesikulären Transport wird der MHC/Peptid-Komplex an die Zelloberfläche gebracht, wo er CD4 positive T-Zellen mit einem entsprechenden T-Zell-Rezeptor aktivieren kann¹⁵.

Darüberhinaus gibt es MHC III, wobei es deutliche Unterschiede zu den bereits beschriebenen Klassen gibt. MHC III ist eine Gruppe von Genen, die zwar ebenfalls in der HLA bzw. H-2 Region liegen, aber nicht für antigenpräsentierende Moleküle kodieren. Die Genprodukte sind jedoch ebenfalls Bestandteile des Immunsystems, wie z.B. die Komplementfaktoren C2 und C4, die zum humoralen Arm der angeborenen Immunität gehören. Die Zytokine TNF- α (Tumornekrosefaktor) und LTA (Lymphotoxin- α), die u.a. die Funktion von Makrophagen und Neutrophilen modulieren sind ebenfalls in MHC III gelegen^{21,22}.

MHC I und II sind sowohl polygen, als auch polymorph^{23,24}. Polygen bedeutet, dass jedes Individuum mehrere Gene für MHC trägt. In der Maus befinden sich diese Gene im sog. H-2 Bereich auf Chromosom 17. Es gibt drei Gene für die α -Kette von MHC I (H-2K, D und L) und zwei für MHC II (H-2A und E). Beim Menschen ist die HLA-Region auf Chromosom 6 lokalisiert. Es existieren ebenfalls drei Gene für die MHC I- α -Kette (HLA-A, -B, -C) und drei Gene für die α - und β -Kette von MHC II (HLA-DR, -DP, -DQ). Sie werden kodominant exprimiert. Polymorph bedeutet, dass es gesehen auf die gesamte Population mehrere verschiedene Allele für dasselbe Gen gibt. Hierbei nehmen die MHC-Gene eine extreme Stellung ein. Sie sind nach aktuellem Kenntnisstand die am stärksten polymorphen Gene überhaupt. So sind z.B. allein für das HLA-B-Gen knapp 3000 Allele bekannt²⁵. Dieser Polymorphismus spielt für allogene Transplantationen eine wichtige Rolle.

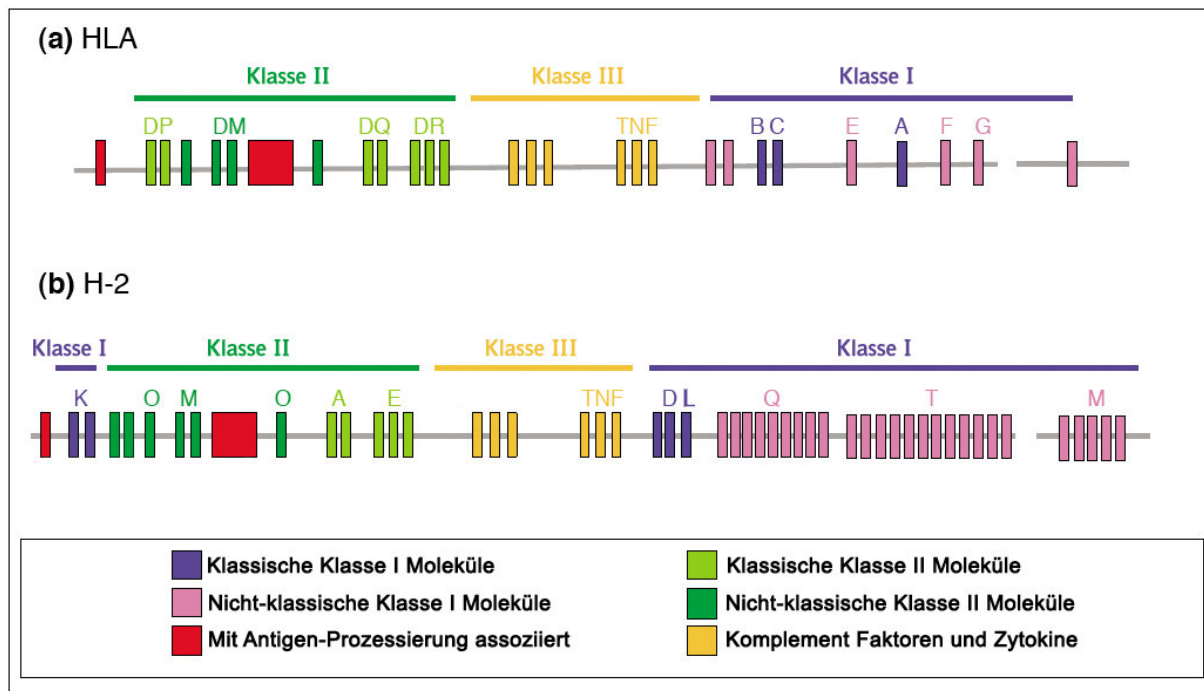


Abbildung 1: Die MHC-Region von Mensch und Maus

Gezeigt sind nur die wichtigsten Gene des MHC-Komplex, die beim Menschen (a) und bei der Maus (b) historisch in die Klassen I, II und III eingeteilt werden. Insgesamt handelt es sich jeweils um über 200 Gen-Loci. Neben den klassischen MHC-Molekülen sind in diesen Regionen auch Moleküle, die an der Peptidbeladung beteiligt sind (z.B. HLA-DM) kodiert. Die Klasse III-Gene kodieren z.B. für den Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) und verschiedene Bestandteile des Komplement-Systems. Abbildung verändert nach Trowsdale²⁶

1.4 Minor Histokompatibilitätsantigene

Selbst im Fall einer kompletten Übereinstimmung aller MHC-Allele zwischen Spender und Empfänger kann es zu Abstoßungsreaktionen oder GvH-Erkrankungen nach einer Transplantation kommen^{27,28}. Dafür sind sog. Minor Histokompatibilitätsantigene (mHag) verantwortlich. Diese entstehen dadurch, dass eine Vielzahl von Genen innerhalb einer Population Polymorphismen und insbesondere Einzelnukleotid-Polymorphismen (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) aufweisen. Ein Teil der SNPs führt zu Veränderungen in der Aminosäuresequenz von Proteinen, wobei dies nicht mit einer Beeinträchtigung der Funktion des Proteins einhergehen muss. Problematisch im Zusammenhang mit einer Transplantation werden diese Unterschiede erst durch die Prozessierung dieser Proteine zu Peptiden und deren Präsentation auf einem MHC. Eine T-Zelle, die in einem anderen Körper selektiert wurde, kann diesen Komplex mit ihrem T-Zell-Rezeptor erkennen und aktiviert werden (vergleiche Abschnitt 1.6)²⁹. Dadurch kann eine GvH-Reaktion entstehen, allerdings beruht ebenso der GvL-Effekt auf dieser Grundlage³⁰⁻³².

Die Anzahl der bekannten mHag nimmt in den letzten Jahren immer schneller zu³³. Dadurch konnten Antigene identifiziert werden, die potenzielle Ziele einer zellulären Therapie bei Leukämien und ähnlichen Erkrankungen sind. Die Idee dabei ist, dass T-Zellen, die nur dieses spezifische Antigen erkennen, infundiert werden und damit ein guter GvL-Effekt unabhängig von einer GvH-Reaktion erzielt werden kann. Erste klinische Studien, die diesem Ansatz folgten, waren zwar weitgehend erfolgreich, allerdings steht diese Art der Therapie noch am Anfang und bedarf noch weiterer Evaluation³⁴⁻³⁶.

1.5 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DC) gehören zu den professionellen APC und stellen innerhalb dieser Gruppe die potentesten Vertreter dar. Beschrieben wurden DC bereits 1868 durch Paul Langerhans. Dieser hielt sie jedoch für Nervenzellen der Haut³⁷. Heute ist bekannt, dass es sich bei diesen Zellen um eine Subpopulation von DC handelt, den sog. Langerhans Zellen. Die DC als solche wurden erst über 100 Jahre später durch

Ralph Steinman beschrieben^{38,39}. Mittlerweile hat sich das Bild weiter gewandelt: DC sind eine sehr heterogene Gruppe von Zellen, die viele Charakteristika miteinander teilen, sich jedoch auch distinkt von einander unterscheiden. DC entwickeln sich im Knochenmark sowohl aus der myeloischen, wie auch der lymphoiden Linie der Hämatopoese⁴⁰. Gemein ist ihnen, dass sie das Knochenmark als rundliche, naive Zellen verlassen und dann über das Blut in verschiedene Gewebe einwandern. Dort verbleiben die Zellen bis zu ihrer Aktivierung und untersuchen ihre Umgebung durch Phagozytose und Pinozytose. Die Aktivierung erfolgt über sog. Mustererkennungs-Rezeptoren (pattern recognition receptors, PRR), die Strukturen erkennen, die auf der Oberfläche von Bakterien oder Parasiten vorkommen oder virale Nucleinsäuren, sog. Pathogen-assoziierte molekulare Muster (Pathogene associated molecular Patterns, PAMPs). Auch Moleküle, die mit Gewebsschäden oder sonstiger Gefahr assoziiert sind können eine Aktivierung auslösen (Damage bzw. Danger associated molecular Patterns, DAMPs). Dazu zählen z.B. Harnsäure oder bestimmte Formen von RNA^{41,42}. Die bekanntesten und am besten Erforschten Rezeptoren für PAMPs und DAMPs sind die Toll-like Rezeptoren (TLR)^{43,44}. Die Aktivierung einer DC führt zu einer starken Veränderung der Zelle: Sie verlässt das Gewebe und migriert zum nächsten Lymphknoten (Homing), die phagozytotische Aktivität nimmt stark ab, wohingegen die Expression von MHC und kostimulatorischen Molekülen (CD80, CD86 usw.) stark zunimmt. Im Lymphknoten leitet die DC eine T-Zell Antwort ein⁴⁵.

1.5.1 CD8 α ⁺ Dendritische Zellen

Ein Subtyp von DC sind die CD8 α ⁺ DC. Wie der Name schon sagt, zeichnen sie sich durch die Expression des eigentlich für zytotoxische T-Zellen typischen Moleküls CD8 aus. Es ist jedoch wichtig zu beachten, dass dies nur in der Maus der Fall ist, beim Menschen hingegen nicht. Trotzdem existiert ein humanes Äquivalent, das funktionell sehr ähnlich ist und über den Marker DNGR-1, der auch auf den murinen Zellen vorkommt identifiziert werden kann⁴⁶. Die Entwicklung dieser Zellen ist vom Transkriptionsfaktor BATF3 abhängig und ein entsprechender Knock-out in der Maus hat zur Folge, dass keine CD8 α ⁺ DC entstehen⁴⁷. Darüberhinaus sind jedoch auch CD103⁺ DC, die einige Ähnlichkeiten zu den CD8 α ⁺ DC zeigen von BATF3 anhängig⁴⁸.

Einleitung

CD8 α^+ DC gehören zu den nicht-migrierenden DC. Das heißt, dass sie nicht nach Aktivierung in die lymphatischen Gewebe einwandern, sondern auch als naive Zellen dort resident sind. Im Vergleich zu anderen DC Populationen zeigen sie ohne Aktivierung eine relativ schwache Expression von MHCII. Nach Aktivierung werden aber sowohl MHCII, als auch kostimulatorische Moleküle wie CD80, CD86 und CD40 sehr schnell auf einem sehr hohen Niveau exprimiert⁴⁹. CD8 α^+ DC phagozytieren tote Zellen mit sehr hoher Effizienz und präsentieren die dadurch aufgenommenen Antigene. Dadurch bleibt eine Zelle auch nach ihrem Tod noch für das Immunsystem detektierbar⁵⁰. Darüberhinaus sind CD8 α^+ DC funktionell auf das sog. Kreuzpräsentieren von Antigenen spezialisiert. Das bedeutet, dass sie phagozytierte, exogene Antigene nicht nur auf MHCII, sondern über einen alternative Weg der Prozessierung, ebenfalls auf MHCI präsentieren können⁵¹. Dadurch kann eine Antwort durch zytotoxische T-Zellen induziert werden, die CD8 α^+ DC als gute Produzenten des Zytokins IL-12p70 weiter unterstützen⁵².

Andererseits wurden CD8 α^+ DC auch als regulatorische DC beschrieben. Durch die Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins TGF- β (Transformierender Wachstumsfaktor β) können sie T-Zellen in induzierte regulatorische T-Zellen (iTreg) umwandeln und tragen damit zur peripheren Toleranz bei^{53,54}. Darüberhinaus wurde gezeigt, dass nicht-aktivierte (steady-state) CD8 α^+ DC die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen verhindern können und zu vermehrter Apoptose führen. Obwohl der Mechanismus nicht endgültig geklärt ist, konnte beschrieben werden, dass die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine durch die T-Zellen stark reduziert ist und dadurch die Immunantwort nicht weiter unterhalten werden kann^{55,56}.

Im Kontext der GvH-Erkrankung konnte bisher in einem Mausmodell gezeigt werden, dass CD8 α^+ DC den Verlauf nicht beeinflussen, jedoch wichtig sind für die Induktion einer GvT-Reaktion⁵⁷. Des Weiteren konnte mit *in vitro* generierten CD8 α^+ DC ein Immunisierungsprotokoll entwickelt werden, dass den Verlauf einer GvH-Erkrankung im Mausmodell über einen IL-10 abhängigen Weg verbessert und zu einer erhöhten Überlebensrate führt^{16,58}.

1.5.2 Myeloische Dendritische Zellen

Myeloische dendritische Zellen (mDC) werden bei Betrachtungen oft zusammengefasst, da sie sich sehr ähnlich verhalten. Es soll jedoch trotzdem erwähnt sein, dass es sich dabei nicht um eine homogene Population handelt und diese Zellen z.B. durch die An- oder Abwesenheit des Oberflächenmarkers CD4 weiter unterteilt werden können. Wie die $CD8\alpha^+$ DC gehören sie zu den sog. konventionellen oder klassischen DC (cDC) und unterscheiden sich damit deutlich von plasmazytoiden DC⁵⁹.

Unter den mDC gibt es sowohl migratorische Vertreter, die bei Aktivierung in die lymphatischen Organe einwandern, wie auch in den lymphatischen Organen residente Populationen. Gemein ist ihnen, dass sie Peptide klassisch auf MHCII präsentieren und damit vor allem Immunantworten von $CD4^+$ T-Zellen primen. Ihre Fähigkeiten zur Kreuzpräsentation sind sehr begrenzt⁶⁰⁻⁶².

Betrachtet man die Rolle von mDC im Zusammenhang mit allogener HSCT und GvH-Reaktion, wurde beschrieben, dass im Fall einer akuten GvH-Erkrankung verschiedene Subpopulationen reduziert sind im Vergleich zu transplantierten Patienten, die nicht an einer GvH-Reaktion leiden⁶³. In einer zweiten Untersuchung wurden ähnliche Ergebnisse gefunden und es wurde darüberhinaus gezeigt, dass der Aktivierungsstatus der mDC dabei keine Rolle spielt⁶⁴. Eine größere Untersuchung zeigt, dass in der Haut schon allein durch die Konditionierung annähernd alle mDC untergehen und dann durch Zellen des Donors ersetzt werden⁶⁵. In Mausmodellen, in denen mit spezifischen Knockouts oder Depletionen gearbeitet wurde, konnte gezeigt werden, dass Langerhanszellen nicht zur Induktion einer GvH-Reaktion nötig sind⁶⁶. Eine weitere Untersuchung zeigte, dass cDC des Empfängers insgesamt nicht für die Induktion einer GvH-Erkrankung benötigt werden⁶⁷. Dieses Ergebnis steht zwar im Widerspruch zu älteren Veröffentlichungen, es konnten jedoch andere, nicht-hämatopoetische Zellen als Verursacher der GvH-Reaktion identifiziert werden⁶⁸⁻⁷¹.

1.5.3 Plasmazytoide Dendritische Zellen

Plasmazytoide Dendritische Zellen (pDC) sind eine überwiegend im Blut zirkulierende Subpopulation von DC. Sie weisen eine charakteristische Kombination

Einleitung

von Oberflächenmolekülen auf. Während murine pDC den DC-typischen Marker CD11c nur mäßig stark exprimieren, sind sie positiv für B220 und Ly6C, die auf anderen DC-Populationen nicht vorkommen⁷².

Funktionell sind pDC primär an der Induktion von Immunantworten gegen Viren beteiligt. Über TLR 7 und 9 detektieren sie virale Einzelstrang-RNA bzw. CpG reiche virale Doppelstrang-DNA⁷³. Die Aktivierung führt zu einer verstärkten Expression von MHCII und kostimulatorischen Molekülen (CD80, CD86, CD40) und damit zu einer effektiven Antigenpräsentation⁷⁴. Eine Besonderheit von pDC ist die Produktion großer Mengen an Typ I Interferonen (IFN α und β). Die Interferone sind in der Lage die Replikation von Viren direkt zu blockieren. Außerdem werden zytotoxische T-Zellen stimuliert, die virusbefallenen Zellen zerstören. Durch die autokrine Wirkung der Interferone wird das Kreuzpräsentieren von Antigenen auf pDC unterstützt⁷⁵⁻⁷⁷.

Im Kontext der allogenen HSCT konnte in einer Studie gezeigt werden, dass die Anzahl der pDC im Transplantat eine akute GvH-Erkrankung nicht beeinflusst, wohl aber eine chronische, deren Schwere reduziert wird⁷⁸. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine Depletion von pDC im Empfänger eine akute GvH-Erkrankung nicht beeinflusst⁶⁷. Konsistent dazu präsentieren pDC Alloantigene genauso effizient wie andere DC und können allogene T-Zellen ebenso gut primen⁷⁹.

1.6 T-Zell-Entwicklung und Priming

T-Zellen sind ein wichtiger Träger der adaptiven Immunantwort. Sie entwickeln sich über mehrere Zwischenstufen aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark, die über das Blut in den Thymus gelangen. Dort findet die eigentliche T-Zell-Entwicklung statt. Diese beinhaltet ein mehrstufiges Rearrangement der Gene für den T-Zell-Rezeptor, durch das dessen Spezifität bestimmt wird. Nach dem Rearrangement sind die Zellen positiv für die beiden Oberflächenmarker CD4 und CD8 und durchlaufen zunächst die sog. Positivselektion. Dafür ist es notwendig, dass die Zellen MHC-Moleküle erkennen können, ist dies nicht der Fall werden sie apoptotisch. Abhängig davon, ob das erkannte MHC-Molekül zur Klasse I oder II gehört, wird einer der beiden Oberflächenmarker und Korezeptoren CD4 oder CD8 nicht weiter exprimiert. Wurde MHC I erkannt, wird nur noch CD8 exprimiert und die Zelle wird sich zu einer zytotoxischen T-Zelle

entwickeln, wurde hingegen MHC II erkannt, wird nur noch CD4 exprimiert und die Zellentwicklung wird in Richtung T-Helferzelle fortgesetzt. In beiden Fällen geht jedoch zunächst noch die sog. Negativselektion voraus. Dabei werden vom Thymusepithel Peptide aus Proteinen aller Zelltypen auf MHC präsentiert. Erkennt eine T-Zelle einen dieser Komplex mit zu hoher Affinität, wird sie deletiert, da es sich um eine potentiell autoreaktive T-Zelle handelt. Nicht autoreaktive T-Zellen wandern aus dem Thymus aus und zirkulieren durch die sekundären lymphatischen Organe (Milz, Lymphknoten, Tonsillen etc.)⁸⁰⁻⁸².

Die Aktivierung von T-Zellen (Priming) ist ein stark regulierter Prozess. Er findet in den sekundären lymphatischen Organen statt und bedarf einer antigenpräsentierenden Zelle⁸³. Die APC muss in der Peripherie Antigen aufgenommen haben und aktiviert worden sein (z.B. über ihre TLR). Daraufhin migriert sie zum drainierenden Lymphknoten und trifft dort auf T-Zellen. Zunächst ist es entscheidend, dass eine T-Zelle mit ihrem T-Zell-Rezeptor ihr Antigen, also den entsprechenden MHC/Peptid-Komplex auf der APC erkennt (Signal 1). Zusätzlich muss die APC kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86 exprimieren, die mit dem Korezeptor CD28 auf der T-Zelle interagieren (Signal 2)^{84,85}. Ohne Kostimulation wird die T-Zelle anergisch und nicht aktiviert, sie kann außerdem nicht proliferieren. Es handelt sich also um einen Mechanismus der peripheren Toleranz⁸⁶. Aktivierte T-Zellen produzieren das Zytokin Interleukin-2 (IL-2), das autokrin wirkt und die T-Zelle zu Differenzierung und Proliferation anregt. Abhängig vom weiteren Zytokin-Milieu kann sich die T-Zell-Antwort in verschiedene Richtungen entwickeln. In der Gegenwart von IL-12 werden T-Helferzellen vom Typ 1 (T_H1) generiert, die selbst Interferon- γ (IFN- γ) produzieren und damit die T_H1-Polarisation weitertragen. Zytotoxische T-Zellen werden unter diesen Bedingungen ebenfalls begünstigt, sodass insgesamt eine Immunantwort auf primär zellulärer Basis ausgeführt wird. Diese richtet sich z.B. gegen Bakterien und Viren. Ein IL-4 reiches Milieu, wie es z.B. bei einem parasitären Befall vorliegt, lenkt die T-Zell-Polarisation in Richtung einer T_H2-Antwort, die einen eher humoralen Charakter hat^{87,88}. Das schließt z.B. Antikörperproduktion durch B-Zellen ein (siehe dort).

1.6.1 T-Zell-Priming nach allogener HSCT

Im Falle einer allogenen Stammzelltransplantation gelangen T-Zellen vom Spender in den Körper des Empfängers. Diese T-Zellen sind also in einer anderen Umgebung selektiert worden und somit ist eine stark erhöhte Gefahr der Reaktivität gegen den unbekanntem Organismus gegeben. Prinzipiell ist für die T-Zell-Aktivierung weiterhin eine APC von Nöten, aber die Erkennung des MHC/Peptid-Komplex unterscheidet sich. Bei der sog. direkten Erkennung trifft die Spender-T-Zelle auf eine Empfänger-APC, deren MHC-Moleküle sich von denen des Spenders unterscheiden (durch Polymorphismen oder Polygenie). Da die T-Zelle gegen diese Moleküle nicht selektioniert wurde, kann sie über ihren T-Zell-Rezeptor ein aktivierendes Signal erhalten. Dabei ist die Natur des präsentierten Peptids zweitrangig. Es kann sich sowohl um Empfänger-Peptide, als auch um Donor-Peptide handeln, die von Empfänger-APCs aufgenommen und prozessiert wurden⁸⁹. Bei der indirekten Erkennung nehmen Spender-APCs, die im Transplantat enthalten waren oder sich daraus entwickelt haben, Empfänger-Proteine auf, prozessieren sie und präsentieren sie den Donor-T-Zellen⁷⁰. In diesem Fall reagiert die T-Zelle auf das präsentierte Peptid, das einem Empfänger MHC- oder nicht-MHC-Molekül (Minor Histocompatibility Antigen) entstammen kann. Das kostimulatorische Signal wird von der jeweiligen APC geliefert, die durch die vorhergehende Konditionierung des Rezipienten bereits aktiviert wurde^{16,90}.

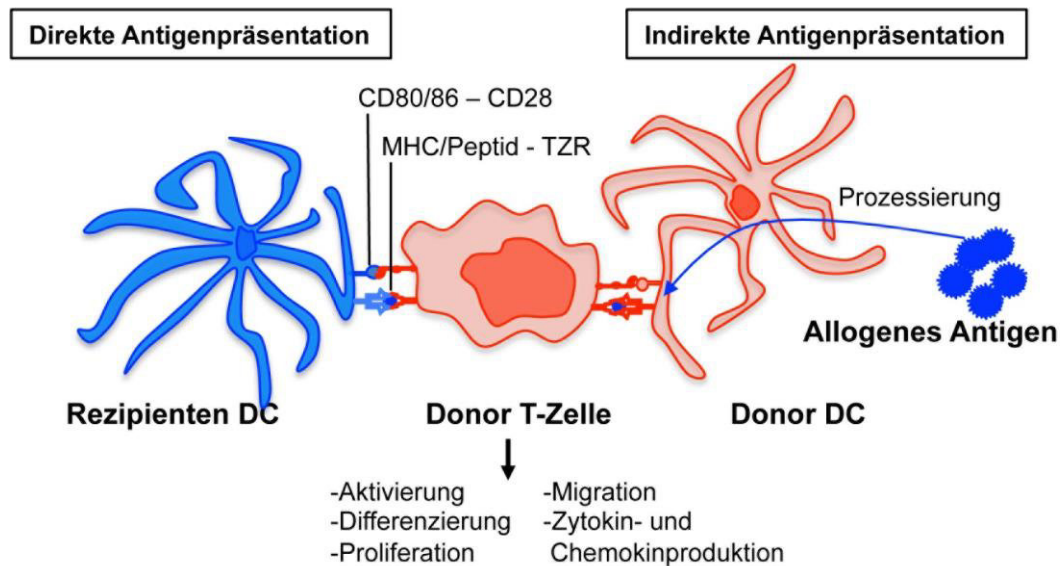


Abbildung 2: T-Zell-Aktivierung nach allogener HSCT.

DC präsentieren Donor T-Zellen allogenenes Antigen. Rezipienten DC präsentieren Antigen über den direkten Weg, wogegen Donor DC aufgenommenes und prozessiertes allogenenes Antigen auf syngemem MHC präsentieren. Für die Aktivierung der T-Zelle ist sowohl ein Signal über den T-Zell-Rezeptor (TZR), wie auch Kostimulation über CD28 durch CD80 und CD86 nötig. Diese Interaktion führt zur vollständigen Aktivierung der T-Zelle, Proliferation und Differenzierung (primär T_H1), Migration zu den typischen GvH-Zielorganen und Produktion von Zytokinen wie IL-2 und INF- γ . Abbildung nach Stenger et al¹⁶.

1.7 Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen (T_{reg}) sind ein Subtyp der CD4 positiven T-Zellen und machen in der Peripherie ca. 5-10% von ihnen aus. Ihre Aufgabe ist die Regulation des Immunsystems um überschießende Reaktionen, die eine Gefahr für den Organismus darstellen, zu verhindern. Neben CD4 werden Treg als CD25 positiv charakterisiert. Dabei handelt es sich um die hochaffine alpha-Kette des IL-2 Rezeptors, die von anderen T-Zellen nur nach Aktivierung exprimiert wird⁹¹. Dies illustriert einen weiteren wichtigen Unterschied zu sog. konventionellen T-Zellen, denn Treg sind in ihrer Funktion absolut abhängig von IL-2, sie sind jedoch nicht selbst in der Lage es zu produzieren. D.h. die Aktivierung von Treg erfordert zuvor die IL-2 Produktion anderer Zellen⁹². Das ist ein wichtiger Mechanismus, denn die Treg soll eine Immunreaktion nur eindämmen, sie aber nicht von vorn herein verhindern⁹³.

Die sog. natürlichen Treg, von denen im Rahmen dieser Arbeit gesprochen wird, entstammen wie auch die konventionellen T-Zellen dem Thymus. Der Grund, warum sich eine T-Zelle zur Treg entwickelt, ist bisher nicht komplett geklärt. Es konnte

Einleitung

jedoch gezeigt werden, dass der T-Zell-Rezeptor von Treg eine vergleichsweise hohe Avidität besitzt und diese Zellen daher nur knapp der Negativselektion entgehen⁹⁴. Die Funktion von Treg ist anhängig vom Transkriptionsfaktor Forkhead box P3 (FoxP3), der aktuell der wichtigste Marker für die Identifizierung von Treg ist^{95,96}. Wie wichtig FoxP3 bzw. Treg sind lässt sich am IPEX Syndrom (immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome) erkennen. Dabei ist FoxP3 durch einen Gendefekt nicht funktionsfähig und als Folge treten schwerste, multiple autoimmune Reaktionen zu Tage, die meist zum Tod innerhalb der ersten zwei Lebensjahre führen (die einzige Therapiemöglichkeit besteht in einer Knochenmarkstransplantation)⁹⁷.

Die Mechanismen, derer sich Treg bedienen, um Immunreaktionen zu supprimieren sind sehr verschieden und noch nicht komplett verstanden. Ein sehr grundlegender Mechanismus ist bereits der Verbrauch von IL-2, das dadurch anderen Zellen nicht mehr zur Verfügung steht (IL-2 consumption)⁹⁸. Andererseits sind Treg in der Lage große Mengen an immunsuppressiven Zytokinen zu produzieren um Effektor T-Zellen, aber auch APCs und andere Zellen zu beeinflussen. Zu diesen Zytokinen gehört neben IL-10 und TGF- β , deren Wirkung bereits länger bekannt ist, auch neuere Vertreter wie IL-35⁹⁹⁻¹⁰¹. Eine Suppression ist aber auch schon durch die Produktion deutlich einfacherer Moleküle möglich. Über die Enzyme CD39 und CD73 auf der Zelloberfläche von Treg werden ATP und ADP (Adenosintri- und Diphosphat) in Adenosin umgewandelt, das über A_{2A} -Rezeptoren supprimierend auf das Immunsystem wirken kann^{102,103}. Weiter Mechanismen basieren auf direktem Zell-Zell-Kontakt. Treg tragen z.B. das Molekül CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4), das mit den kostimulatorischen Molekülen CD80 und CD86 auf APCs interagiert und damit die Kostimulation verringert¹⁰⁴. LAG-3 (Lymphocyte-activation gene 3) auf Treg verhindert durch Wechselwirkung mit MHC II auf DCs deren Aktivierung¹⁰⁵. Eine weitere Art der Suppression ist ebenfalls kontaktabhängig, dabei werden jedoch suppressive Metabolite wie cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) über Zell-Zell-Kanäle (Gap Junctions) direkt in die Ziel-Zelle übertrage und verhindern deren Aktivierung von innen heraus¹⁰⁶⁻¹⁰⁸.

Als gute Suppressoren von T-Zell-Antworten werden Treg bereits seit einigen Jahren als zelluläre Therapie für GvH-Erkrankungen diskutiert. Dabei konnte im Maus-Modell gezeigt werden, dass Donor-Treg eine GvH-Reaktion durchaus eindämmen

können und sich die Überlebenschancen der Tiere deutlich verbessern^{109,110}. *In vitro*-Experimente mit humanen Zellen ließen ähnliche Ergebnisse erkennen¹¹¹. Für die Behandlung von Menschen sind jedoch hohe Zellzahlen nötig, die meist nicht direkt gewonnen werden können. Es ist also zusätzlich erforderlich isolierte Zellen *ex vivo* zu expandieren und diese anschließend zu infundieren¹¹². Die Daten einer ersten Studie wurden 2011 veröffentlicht¹¹³. Dazu wurden 23 Patienten *ex vivo* expandierte Treg aus Nabelschnurblut infundiert. Es wurden keine toxischen Effekte oder vermehrte Infektionen beobachtet und die Inzidenz für schwere Verlaufsformen der akuten GvH-Erkrankung wurde leicht verringert, sodass diese erste Studie als Erfolg gilt. Eine weitere Studie, die 27 Patienten einschloss zeigte, dass niedrige Dosen an IL-2 eine chronische GvH-Erkrankung abschwächen können. Dieser Effekt wurde der deutlich erhöhten Zellzahlen an Treg im Blut der Patienten zugeschrieben¹¹⁴. Laut dem nationalen amerikanischen Gesundheitsinstitut NIH (www.clinicaltrials.gov) sind mehrere klinische Studien im Gange oder bei der Rekrutierung, die sich mit dem Nutzen von Treg bei GvH-Erkrankungen beschäftigen, sodass auf diesem Feld in den nächsten Jahren mit weiteren Erkenntnissen zu rechnen ist.

1.8 B-Zellen

B-Zellen stellen neben den T-Zellen die zweite Säule der adaptiven Immunantwort dar. Sie entwickeln sich über mehrere Zwischenstufen im Knochenmark und wandern über das Blut in die Peripherie aus. Während der Entwicklung werden die Gene für den B-Zell-Rezeptor neu angeordnet (rearrangiert) ähnlich wie es auch beim T-Zell-Rezeptor der Fall ist. Als Folge entstehen B-Zell-Rezeptoren mit deutlich mehr Spezifitäten, als es durch einfache Kodierung in der Keimbahn möglich wäre¹¹⁵. Der B-Zell-Rezeptor entspricht einem membranständigen Monomer des Antikörperisotyps IgM (Immunglobulin der Klasse M) oder des Isotyps IgD, wobei die Spezifität davon unabhängig dieselbe ist. Bevor die B-Zelle das Knochenmark verlässt durchläuft sie einen Selektionsprozess, der zu ihrer Deletion oder zu Anergie führt, falls der B-Zell-Rezeptor Eigenantigene, insbesondere multivalente Eigenantigene erkennt^{116,117}.

Die Aktivierung von B-Zellen ist ein stark regulierter Prozess, den man grundsätzlich in einen thymusunabhängigen (T-Zell-unabhängigen) und einen thymusabhängigen

Einleitung

(T-Zell-anhängigen) Weg unterteilen kann. Thymusunabhängige Antigene treten in polymerer, repetitiver Form auf und kreuzvernetzen mehrere B-Zell-Rezeptoren auf einer Zelle über einen längeren Zeitraum. Ein typisches Beispiel wäre ein Befall des Organismus durch parasitäre Helminthen oder andere Vielzeller¹¹⁸. Beim thymusabhängigen Weg erkennt die B-Zelle ein Antigen (z.B. auf einem Bakterium) mit ihrem B-Zell-Rezeptor und internalisiert ihn daraufhin mitsamt des gebundenen Antigens über Endozytose. In einem Prozess vergleichbar zu dem in Dendritischen Zellen (siehe dort) wird das Antigen prozessiert und die Peptide auf MHCII geladen und präsentiert. Um ihre Effektorfunktion zu erlangen benötigt die B-Zelle Kostimulation durch eine T-Helferzelle¹¹⁹. Diese muss einen MHC/Peptidkomplex mit ihrem T-Zell-Rezeptor erkennen und zusätzlich von der B-Zelle (oder zuvor von einer DC) über CD80 und CD86 aktiviert werden. Daraufhin reguliert die T-Helferzelle die Expression von CD40L (CD154) nach oben. CD40L ist der Ligand von CD40, das auf der B-Zelle vorhanden ist und dessen Ligation in Kombination mit Zytokinen wie IL-4 zur vollen Aktivierung der B-Zelle führt^{120,121}. Die B-Zelle durchläuft nun eine Phase starker Proliferation. Daraus entwickeln sich einerseits B-Gedächtnis-Zellen und andererseits Plasmazellen, die Antikörper produzieren¹²². Abhängig vom Zytokinmilieu findet ein sog. Klassenwechsel zu einem bestimmten Isotyp bei der Antikörperproduktion statt. Je nach Isotyp besitzt ein Antikörper unterschiedliche Funktionen. Antikörper vom Typ IgG1 sind z.B. wichtig für die Opsonisierung von Bakterien für Phagozyten und verbessern deren Erkennung und Phagozytose, sämtliche IgG Isotypen können Toxine neutralisieren. IgG1 und 3 markieren Zielzellen außerdem für NK-Zellen. IgE ist wichtig für die Aktivierung von Mastzellen und pentameres IgM ist der wichtigste Aktivator für das Komplementsystem^{123,124}. Antikörper und damit B-Zellen spielen also eine wichtige und vielfältige Rolle innerhalb des Immunsystems.

1.8.1 Immunregulatorische B-Zellen

In den letzten Jahren sind B-Zellen darüberhinaus als potente Quellen verschiedener Zytokine identifiziert worden. Es konnte gezeigt werden, dass B-Zellen durch IL-10 Produktion eine experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), das murine Modell für die Multiple Sklerose (MS) stark abschwächen¹²⁵. Ähnliches wurde in einem Modell der Colitis ulcerosa beobachtet¹²⁶. In beiden Fällen wird die Produktion

von proinflammatorischen Zytokinen durch T_H1 bzw. T_H17 -Zellen inhibiert. *In vitro* wurde gezeigt, dass IL-10 aus B-Zellen die Produktion von IL-6, IL-12 sowie IL-23 durch Dendritische Zellen hemmt und damit die T-Zell-Antwort inhibiert¹²⁷. Im Kontext der EAE wurden TLR2 und TLR4 auf B-Zellen als wichtige Rezeptoren für eine optimale IL-10 Produktion identifiziert, ebenso ist das Adapterprotein MyD88 kritisch¹²⁷.

Es wurde andererseits aber auch gezeigt, dass B-Zellen in bestimmten Situationen nicht zu einer relevanten Produktion von IL-10 beitragen. In einem Mausmodell für systemischen Lupus erythematoses (SLE), einer Autoimmunerkrankung, wurde weder die Symptomatik, noch das Überleben der Tiere durch IL-10 aus B-Zellen beeinflusst¹²⁸. Für ein Modell für eine Infektion mit Nematoden konnte gezeigt werden, dass B-Zellen als IL-10 Produzenten ebenfalls keine Rolle spielen, sondern T-Zellen in diesem Fall die wichtigen IL-10-Produzenten sind¹²⁹.

In vergleichenden Studien wurde gezeigt, dass B-Zellen von Patienten mit einer Form von MS weniger IL-10 produzieren als die Kontrollgruppe¹³⁰. Bei Patienten mit Colitis ulcerosa wurde festgestellt, dass eine Depletion von B-Zellen mit Rituximab zu einer Verschlimmerung der Erkrankung führt. Dies konnte mit einer stark reduzierten IL-10 Produktion in der intestinalen Mucosa in Verbindung gebracht werden¹³¹. Diese beiden Beispiele belegen, dass B-Zellen als IL-10 Produzenten nicht nur eine Erscheinung in verschiedenen Tiermodellen sind, sondern durchaus eine hohe klinische Relevanz besitzen.

1.9 Interleukin-10 und der IL-10 Rezeptor

Interleukin-10 (IL-10) ist ein anti-inflammatorisches Zytokin und maßgeblich an der Regulation des Immunsystems beteiligt. Es ist ein homodimeres Molekül, wobei jede Kette aus 160 bzw. 157 Aminosäuren beim Menschen respektive der Maus besteht. Die Sequenz von humanem und murinem IL-10 stimmt zu 72% überein¹³². Die sekundäre Struktur ist überwiegend durch 6 alpha-helikale Bereiche bestimmt. Systematisch wird IL-10 somit zu den Klasse 2 Zytokinen gezählt, zu der neben IL-19, IL-20 und IL-22 auch die Interferone gehören¹³³.

Einleitung

Ursprünglich wurde IL-10 als Zytokinsynthese Inhibitionsfaktor (Cytokine synthesis inhibitory factor, CSIF) charakterisiert, weil es die Produktion von IL-2, TNF- α , IFN- γ und GM-CSF durch T_H1-Zellen hemmt. Als Produzenten wurden damals stimulierte T_H2-Zellen identifiziert¹³⁴. Heute ist bekannt, dass eine Vielzahl von weiteren Zellen in der Lage sind IL-10 in z.T. beträchtlichen Mengen zu produzieren. Dazu gehören Zellen des Immunsystems wie Monozyten, DC, Treg, T_H17-Zellen, CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen und Mastzellen¹³⁵ ebenso wie nicht-hämatopoietische Zellen wie z.B. Keratinozyten¹³⁶. Die Bedingungen, die eine IL-10 Produktion in den einzelnen Zellen induzieren sind dabei jedoch sehr verschieden. Ähnliches gilt für die Zellen, auf die das Zytokin einwirkt. Es gibt eine große Bandbreite an Zellen, die den IL-10 Rezeptor exprimieren und somit auf IL-10 reagieren können. Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Entfernung zwischen IL-10 Produzenten und den darauf reagierenden Zellen, denn die Wirkung wird wie bei den meisten Zytokinen eher auf einer lokalen, nicht systemischen Ebene erzielt.

Der IL-10 Rezeptor ist ein heterodimeres Molekül und gehört zur Familie der Interferonrezeptoren. Die α -Untereinheit bindet den Liganden und wird auf fast allen hämatopoietischen Zellen und einigen nicht-hämatopoietischen Zellen wie Fibroblasten oder Keratinozyten exprimiert^{137,138}. Es ist jedoch wichtig zu beachten, dass die Anzahl der Rezeptoren auf der Zelloberfläche sehr unterschiedlich ist und z.T. durch Stimulation stark verändert werden kann. Die β -Untereinheit hingegen ist auf fast allen Zellen zu finden und ihre Expression wird kaum reguliert¹³⁹. Die Aufgabe der β -Untereinheit ist die Signalweiterleitung ins Zellinnere. Dies geschieht über den Jak/STAT Signalweg (siehe Abbildung 3). An diesem sind die Januskinasen Jak1 und Tyk2 beteiligt, die STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transkription) phosphorylieren, sodass es im Zellkern als Transkriptionsfaktor aktiv werden kann^{140,141}.

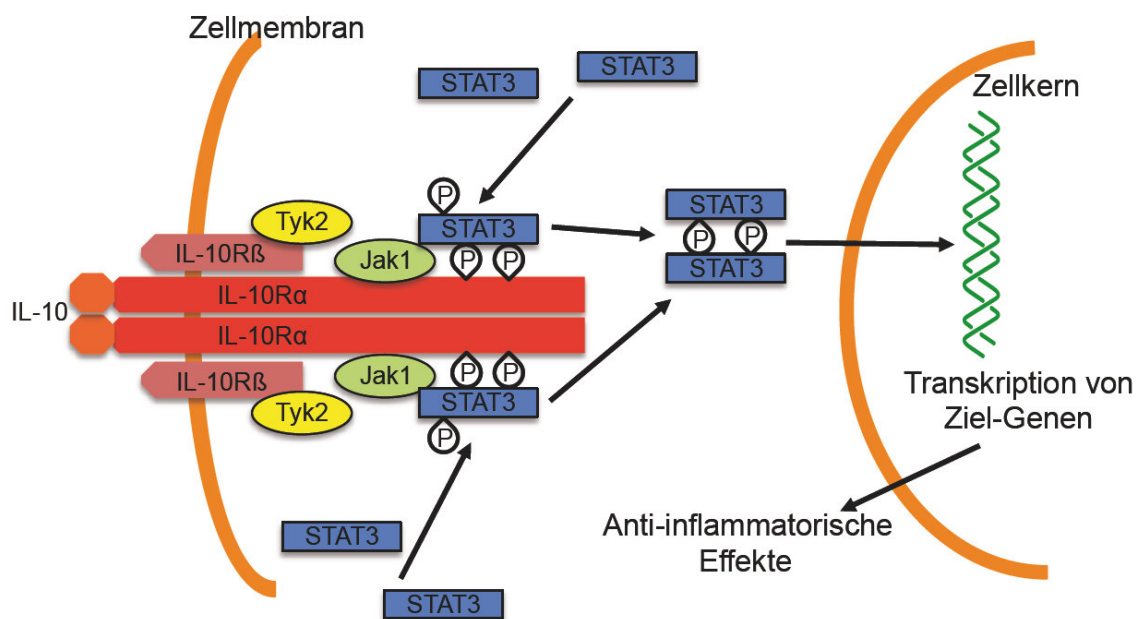


Abbildung 3: Der IL-10 Signalweg.

IL-10 bindet an die IL-10 Rezeptor α -Untereinheit, für eine erfolgreiche Signalweiterleitung ist jedoch die Gegenwart der β -Untereinheit ebenfalls erforderlich. Durch Phosphorylierung durch die Januskinasen Tyk2 und Jak1 wird STAT3 rekrutiert und seinerseits auch phosphoryliert. Dimeres STAT3 kann in den Zellkern translozieren und dort auf seine Ziel-Gene einwirken. Die Folge sind die für IL-10 beschriebenen anti-inflammatorischen Effekte. Abbildung frei nach Glocker *et al* erstellt¹⁴¹.

Die Wirkungen von IL-10 auf unterschiedliche Zellen sind durchaus verschieden. Monozyten und Makrophagen werden stark beeinflusst. Die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6 oder IL-12 wird ebenso unterbunden wie die Produktion verschiedener Chemokine¹⁴²⁻¹⁴⁴. Die Funktion als APC wird des Weiteren durch eine verminderte Expression von CD80, CD86 und MHCII gehemmt¹⁴⁵. Auf verschiedene DC Subpopulationen gibt es ähnliche Wirkungen, wobei diese allgemein schwächer ausfallen¹⁴⁶. Zusätzlich wird die Expression inhibitorischer Oberflächenmoleküle wie B7-H4 induziert und die DC beginnt ihrerseits selbst IL-10 zu produzieren^{147,148}. So nehmen DC insgesamt einen Phänotyp an, der auf T-Zellen anergisierend wirkt. Darüberhinaus wirkt IL-10 auch direkt auf T-Zellen ein. Die Produktion inflammatorischer Zytokine wie IL-2 wird verhindert und die Expression von Chemokin-Rezeptoren wie CXCR4 in CD4⁺ T-Helferzellen verringert^{149,150}. Auf B-Zellen hingegen hat IL-10 eine aktivierende Wirkung. Das Überleben wird verlängert und die Proliferation begünstigt. Außerdem wird die MHCII Expression gesteigert und ein Antikörperklassen-Wechsel

Einleitung

eingeleitet^{151,152}. Zusammengenommen wird die Immunantwort also einerseits gedämpft und andererseits ändert sich der Charakter zu einer humoralen und weniger zellulären Antwort.

Die Wichtigkeit von IL-10 für den gesamten Organismus lässt sich an einer Vielzahl von Beispielen erläutern, bei denen Unregelmäßigkeiten und Defekte, die mit IL-10 und dem Rezeptor assoziiert sind zu z.T. schwersten Erkrankungen führen. Dazu gehören z.B. die Multiple Sklerose, chronisch-entzündliche Darmerkrankungen oder Dermatitis¹⁵³⁻¹⁵⁵. Auch GvH-Erkrankungen und deren Schweregrad konnten beim Menschen mit IL-10 in Verbindung gebracht werden. So sind bestimmte Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) im IL-10 und IL-10 Rezeptor β Gen mit schwereren Verläufen einer akuten GvH-Erkrankung assoziiert^{156,157}. Des Weiteren konnte ein direkter statistischer Zusammenhang zwischen der IL-10 Produktion von Patienten nach einer HSCT und der Schwere einer GvH-Erkrankung hergestellt werden: Höhere Werte an IL-10 im Serum sind assoziiert mit einem milderem Verlauf oder einem Ausbleiben der Erkrankung¹⁵⁸. Andere Arbeiten konnten jedoch auch gegenteilige Ergebnisse präsentieren. In diesen Fällen wurde die hohe IL-10 Produktion als Gegenregulation einer starken T-Zell-Antwort interpretiert. Hohe Serumspiegel an IL-10 verursachen die starke GvH-Erkrankung also nicht, sie sind lediglich eine Folge davon^{159,160}.

Weitergehende Untersuchungen in Mausmodellen haben ergeben, dass eine Blockade von IL-12 während einer GvH-Erkrankung das Überleben verbessert, weil die T-Zell-Antwort eher einen T_H2 -typischen Charakter annimmt und mehr IL-10 produziert wird¹⁶¹. Auch eine Vorbehandlung der Spendertiere mit G-CSF führt zu einer erhöhten Anzahl IL-10 produzierender Zellen im Transplantat und dadurch zu einem verbesserten Überleben¹⁶². Ähnlich Ergebnisse lieferten Versuche mit Spenderzellen, die mit einem Vektor für IL-10 transfiziert wurden¹⁶³.

1.10 Murine GvH-Modelle

Mäuse sind die am häufigsten genutzten Modelorganismen für HSCT und GvH-Erkrankungen. Dabei ist es sehr vorteilhaft, dass Mäuse durch die vielen Arbeiten aus dem Bereich der Immunologie in hämatologischer Hinsicht sehr gut charakterisiert sind. Dadurch sind einige Modelle etabliert worden, die je nach den

Anforderungen der Fragestellung benutzt werden und verschiedene Stärken und Schwächen besitzen.

Für die Experimente in dieser Arbeit wurden zwei Modelle verwendet, die sich relativ ähnlich sind und zu den am häufigsten benutzten Modellen gehören. Es wurden C57BL/6 Mäuse als Empfänger und BALB/c Mäuse als Spender eingesetzt oder die Rollen der beiden Mausstämme wurden getauscht. Der Einsatz dieser Mausstämme hat den Vorteil, dass es viele verschiedene genetische veränderte Varianten auf demselben genetischen Hintergrund gibt. Bei beiden Modellen reagieren die Donor-T-Zellen gegen MHC I und MHC II sowie mHag. Es handelt sich dementsprechend um ein relativ aggressives Model, dass neben der Ausprägung der Krankheitssymptome auch die Beobachtung des Überlebens der Tiere erlaubt^{164,165}. Andere Modelle sind weniger aggressiv. Ein oft benutztes Beispiel dafür ist die Transplantation von Zellen aus C3H.SW Mäusen in C57BL/6 Empfänger. Hier reagieren die T-Zellen nur gegen einige mHag und der Krankheitsverlauf ist milder. Oftmals versterben die Tiere nicht und es werden nur Symptome und Gewichtsveränderungen beobachtet. Ebenso existieren Modelle, bei denen sich die T-Zell-Antwort nur gegen MHC I oder MHC II richtet^{166,167}.

Die Charakteristika eines Modells werden jedoch nicht nur durch die verwendeten Tierstämme bestimmt. Einen Einfluss haben z.B. auch die Konditionierung und die Anzahl und Art der verabreichten Zellen. Die krankheitsauslösenden T-Zellen können zusammen mit anderen Milzzellen ohne weitere Anreicherung transplantiert werden oder isolierte T-Zellen oder Subpopulationen von T-Zellen (CD4⁺, CD8⁺) können als klar definiertes Transplantat eingesetzt werden¹⁶⁸.

Bei all den Möglichkeiten, die murine Modelle bieten, darf jedoch nicht vergessen werden, dass es sich lediglich um ein Modell handelt und die Übertragbarkeit auf die humane Situation nicht immer gegeben ist. Die Konditionierung besteht bei den meisten Modellen nur aus einer Bestrahlung, Patienten erhalten jedoch in der Regel auch eine Chemotherapie¹⁶⁹. Im Tiermodell stammen die allogenen T-Zellen aus der Milz, beim Menschen jedoch aus dem Knochenmark, sodass auch hier mit Unterschieden (z.B. beim Homing) zu rechnen ist¹⁷⁰. Außerdem kommen die Versuchstiere im Idealfall aus einer nahezu sterilen Umgebung, sodass sich das Immunsystem wegen fehlender Krankheitserreger nicht wie bei einem Menschen ausgebildet hat¹⁷¹.

1.11 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war ein verbessertes Verständnis der Mechanismen, die zur Induktion einer GvH-Erkrankung führen, sowie Ansätze zu deren Abschwächung zu untersuchen. Dazu wurde einerseits die Rolle der Dendritischen Zellen als klassischem GvH-Induktor näher beleuchtet. Darüberhinaus wurden die Mechanismen und der therapeutische Nutzen regulatorischer T-Zellen und des Zytokins IL-10 untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Medien und Puffer

Iscove's Medium:	Pulver wurde von PAN Biotech bezogen, in Reinstwasser gelöst, mit Penicillin/Streptomycin versetzt und sterilfiltriert (0,2 µm)
MEM:	Minimum Essential Medium wurde als Pulver von PAN Biotech bezogen, in Reinstwasser gelöst und sterilfiltriert (0,2 µm)
FCS:	Fötale Kälberserum wurde von Invitrogen bezogen und vor Benutzung 45 Minuten bei 56 °C hitzeinaktiviert
Testmedium (TM5):	5 % FCS 1 % Glutamin 1 % Natriumpyruvat in Iscoves's Medium
DC-Medium:	2 % GM-CSF in TM5
Treg-Medium:	100 ng/ml rmlL-2 in TM5
Gey's Lysepuffer:	150 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 0,1 mM EDTA in 1 l Reinstwasser (pH 7,3)

Material und Methoden

ACK-Puffer: 150 mM NH₄Cl
1 mM KHCO₃
0,1 mM EDTA
in Reinstwasser (pH 7,3)

PBS (10x): 1,4 M NaCl
0,1 M NaH₂PO₄
in Reinstwasser (pH 7,2)

Saponin-Puffer: 1 % BSA
0,1 % Saponin
0,02 % Natriumazid
in PBS

FACS-Puffer: 1 % BSA
1 mM EDTA
0,02 % Natriumazid
in PBS

MACS-Puffer: 0,5 % BSA
5 mM EDTA
0,1 % Natriumazid
in PBS

Trypanblaulösung: 0,5 % Trypanblau
0,02 % Natriumazid
in PBS

ELISA Coating-Puffer: 0,1 M Na₂HPO₄
in Wasser (pH 9,2)

ELISA Block-Puffer: 1 % BSA
0,2 % Tween20
in PBS

Lösung C: 0,88 g NaCl
0,5 g BSA
10 ml 100 mM Hepes
200 µl 0,5 M EDTA
mit Wasser auf 100 ml auffüllen (pH 7,4)

2.1.2 Reagenzien, Chemikalien und Enzyme

7AAD	BioLegend
Ammoniumchlorid	Roth
BAY-60-7550	Santa Cruz Biotechnology
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth
CFSE	Sigma
Chloroform	Roth
Cilostazol	Tocris
Diphtherietoxin	Sigma
DMSO	Sigma
DNase	Sigma
dNTPs	Thermo
Dynabeads	Invitrogen
EDTA	Sigma
Ethanol 70%	Roth
Ethanol absolut, reinst	AppliChem

Material und Methoden

FCS	Gibco
GAP27	Tocris
Glutaraldehyd	Sigma
Glykogen	Sigma
GM-CSF	Eigenprodukt, X63 Überstand
L-Glutamin	Roth
HBSS (10x)	Gibco
Hepes	Roth
Histofix	Roth
Isopropanol	Roth
Kaliumhydrogencarbonat	Roth
Koffein	Merck
Kollagenase, Typ 2	Worthington
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma
Lysin	Merck
Microbeads (anti-CD90.2, anti-PE)	Miltenyi Biotech
Mitomycin C	Sigma
Natriumazid	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Roth
Natriumpyruvat	Sigma
Oligo-dT-Primer	Fermentas
OptiPrep	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Serva
Primer (sonstige)	Thermo
Propidiumiodid (PI)	Sigma
Random Hexamer Primer	Thermo
RevertAid Reverse Transkriptase	Fermentas
Rolipram	Sigma
SA-Brilliant Violet 421	BioLegend

SA-PE	Dianova
Saponin	Sigma
SYBR-Green	Sigma
Szintillationsflüssigkeit	Roth
³ H-Thymidin	Perkin-Elmer
TMB	eBioscience
Trizol	Invitrogen oder Bio&Sell
Trypanblau	Merck
Tween20	Sigma
Wasser (ultra pure)	Gibco

2.1.3 Antikörper

Anwendung	Spezifität	Klon	Konjugation	Quelle
FACS	CD1d	1B1	Alexa Fluor 647	BioLegend
	CD5	53-7.3	PE	eBioscience
	CD4	GK1.5	PE-Cy7	BioLegend
	CD8	53-6-7	Pacific Blue, FITC	eBioscience
	CD11b	M1/70	PE	eBioscience
	CD11c	N418	APC-Cy7	eBioscience
	CD19	6D5	Biotin, PE-Cy7	BioLegend
	CD25	PC61	FITC	Eigenprodukt
	CD40	3/23	FITC	BD
	CD45.2	104	FITC	eBioscience
	CD80	16-10.A1	APC, PE, FITC	BioLegend
	CD86	GL1	APC, PE, FITC	BioLegend
	CD90.2	53-2.1	Pacific Blue, APC	BioLegend
	CD273 (B7-DC)	TY25	PE, FITC	eBioscience
	B7-H1	10F.9G2	PE	BioLegend
	B7-H4	clone9	PE	eBioscience
	cAMP	SMP486	FITC*	abcam
	FoxP3	FJK-16S	APC	eBioscience
	GR-1	RB6-8C5	APC	eBioscience
	H2-k ^b	AF6-88.5	PE, Biotin	BioLegend
	H2-k ^d	SF1-1.1	Biotin	BD
	TIM-1	RMT1-4	Biotin	BioLegend
"Fc-Block"	CD16 / CD32	2.4G2	Keine	Eigenprodukt
Zellisolation	CD25	7D4	Biotin	BD
<i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	CD3	145-2C11	Keine	Eigenprodukt

Material und Methoden

	CD28	37.51	Keine	Eigenprodukt
	B7-H4	MIH29	Keine	BD
	rat IgM-Isotyp	unbek.	Keine	eBioscience
	IL-10 Rezeptor	1B1.2	Keine	Eigenprodukt
	NK1.1	PK136	Keine	Eigenprodukt

* Der Antikörper wurde ohne Farbstoff gekauft und mit dem Lightning-Link Fluorescein Conjugation Kit von Innova Biosciences markiert¹⁷².

2.1.4 Versuchstiere

- C75BL/6 Genetisch unveränderte Mäuse, bezogen von der ZVTE Mainz
- BALB/c Genetisch unveränderte Mäuse, bezogen von der ZVTE Mainz
- C57BL/6.IL-10^{-/-} Das IL-10 Gen wurde durch das Einbringen eine Neomycin-Resistenzkassette inaktiviert¹⁷³. Der genetische Hintergrund ist C57BL/6.
- BALB.IL-10^{-/-} C57BL/6.IL-10^{-/-} Mäuse wurden über mehrere Generationen auf den genetischen BALB/c Hintergrund zurückgekreuzt¹⁷⁴.
- IL-10.eGFP Ein Konstrukt aus IRES und eGFP wurde in die untranslatierte 3' Region des murinen IL-10 Gens eingebracht. In Zellen, in denen das IL-10 Gen aktiviert wird, wird neben IL-10 auch eGFP gebildet. Der genetische Hintergrund ist C57BL/6¹⁷⁵.
- CD19CRE x IL-10^{fl/fl} Mäuse, die eine CRE Rekombinase unter Kontrolle des CD19 Promotors exprimieren, wurden mit Mäusen verpaart bei denen das Exon 1 des IL-10 Gens von loxP Sites flankiert wird. In den Nachkommen liegt eine B-Zell-spezifische Inaktivierung des IL-10 Gens vor^{176,177}. Der genetische Hintergrund ist C57BL/6.
- CD11c-DTA Die Mäuse tragen eine CRE Rekombinase unter Kontrolle des CD11c Promotors und die Diphtheritoxin α Kette nach einer loxP flankierten Stop Kassette im ubiquitinär exprimierten ROSA26 Locus. Folglich wird DTA in DC exprimiert, woraufhin diese untergehen. Der genetische Hintergrund ist C57BL/6¹⁷⁸.
- CD11c-iDTR Die Mäuse tragen eine CRE Rekombinase unter der Kontrolle des CD11c Promotors und den Diphtheritoxin-Rezeptor nach einer loxP flankierten Stop Kassette im ubiquitinär exprimierten ROSA26 Locus. Somit können alle CD11c positiven Zellen durch Injektion von Diphtherietoxin depletiert werden¹⁷⁹. Der genetische Hintergrund ist C57BL/6.
- BATF3^{-/-} Durch die Deletion der Exons 1 und 2 wurde das *BATF3* Gen inaktiviert. Als Folge davon entwickeln sich keine vom Transkriptionsfaktor BATF3 abhängigen Zellen, vor allem CD8 α ⁺ und 103⁺ DC. Der genetische Hintergrund ist C57BL/6⁴⁷.

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

6-Kavitätenplatte	Greiner
96-Kavitätenplatte (U-Form)	Greiner
Abdeckplatte	Greiner
Cell Strainer	BD
CryoS-Röhrchen	Greiner
Einweghandschule (Nitril)	Roth
Entsorgungsbeutel	Roth
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Greiner
FACS-Röhrchen (5ml, 300µl)	Greiner und Sarstedt
Filterpapier für Beta-Counter	Wallac
Glaspipetten	Hirschmann und Brand
Kanülen	Braun
Kapseln für histologische Schnitte	Neolab
MACS-Säule (LS)	Miltenyi Biotech
PCR-Tubes und Deckel	Thermo
Petrischalen	Nunc
Pipettenspitzen (weis, gelb, blau)	StarLab
Schiffchen	Corning
Skalpelle	Feather
Spritzen	Braun
Spritzenfilter (0,2 µm)	Roth
Weisdeckel-Röhrchen (2 ml)	Nunc
Zählkammer	Neubauer
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner

2.1.6 Laborgeräte

Absaugvorrichtung	Cell Harvester 1295-001	LKB Wallac
Beta-Counter	Betaplate 1205	LKB Wallac

Material und Methoden

Durchflusszytometer	LSRII	BD
Feinwaage	CP64	Sartorius
Heizblock		HLC
Infrarotlampe		Philips
Inkubator		Heraeus
Kleintierbestrahlungsanlage	OB58-BA	Buchler
Lichtmikroskop	AE20	Motic
MACS-Magnet	QuatroMACS	Miltenyi Biotech
Maushalterung		Kent Scientific
Mehrkanalpipetten		Thermo
Photometer	BioPhotometer Plus	Eppendorf
Pipetten		Gilson
Pipetierhilfe		Integra Bioscience
Plattenleser	GENios	Tecan
Real-Time PCR Maschine	iCycler	Biorad
Sterilbank		Heraeus
Tischzentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus
Ultraturrax	PT2100	Kinematica
Vortexer	Vortex-Genie 2	Sci Industries
Wasserbad	AL12	Lauda
Zentrifuge	Multifuge 3 L-R	Heraeus

2.2 Methoden

2.2.1 Tierexperimentelle Methoden

Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden unter Einhaltung der gesetzlichen Regelungen und Bestimmungen durchgeführt und sind durch die Tierversuchsanträge AZ 23 177-07/G07-1-009 und G11-1-034 genehmigt.

2.2.1.1 *Murines Modell für eine akute GvH-Erkrankung*

Empfänger auf genetischem C57BL/6 Hintergrund:

Den Tieren wird zunächst ein anti-NK1.1 Antikörper *i.p.* verabreicht um NK-Zellen zu depletieren (Klon PK136, 500 µg/Maus), anschließend werden sie in einer Kleintierbestrahlungsanlage mit einer Dosis von 5,5 Gy aus einer ¹³⁷Cs Quelle bestrahlt. Dem Trinkwasser wird das Antibiotikum Borgal (Sulfadoxin und Trimethoprim) zugesetzt. Am folgenden Tag werden die Tiere erneut mit 5,5 Gy bestrahlt. Der nächste Tag ist der eigentliche Transplantationstag (Tag 0). Den Tieren werden 5x10⁶ CD90.2⁺ T-Zellen und 10x10⁶ Zellen T-Zell-depletiertes Knochenmark (TCD-BM) aus BALB/c Mäusen *i.v.* verabreicht.

Empfänger auf genetischem BALB/c Hintergrund:

Die Tiere werden mit einer Dosis von 8,5 Gy letal bestrahlt und dem Trinkwasser wird Borgal zugesetzt. Am folgenden Tag (Tag 0) werden den Versuchstieren 0,5x10⁶ CD90.2⁺ T-Zellen und 5x10⁶ Zellen TCD-BM aus C57BL/6 Mäusen *i.v.* gespritzt.

Verfolgen des Krankheitsverlauf:

Unabhängig vom verwendeten Model werden die Tiere alle zwei bis drei Tage in Augenschein genommen und der Krankheitsverlauf wird dokumentiert. Die Mäuse werden gewogen, außerdem werden die Kriterien Felltextur, Haltung, Haut und Vitalität bewertet und entsprechend Punkte vergeben. Die Spanne reicht dabei von 0 Punkten, was keine Veränderung bedeutet bis zu zwei Punkten. Eine Ausnahme ist die Gewichtsveränderung, die bis zu drei Punkte erreichen kann. Erreicht eine Maus

Material und Methoden

sechs oder mehr Punkte, so wird sie mit CO₂ abgetötet und der folgende Tag als Todestag definiert. Im Fall eines extrem schlechten Gesamtzustands kann eine Maus aus tierschutzrechtlichen Gründen auch ohne das Erreichen von sechs Punkten abgetötet werden.

Punkte	Gewicht	Felltextur	Haut	Haltung	Vitalität
0	max. 5 % Verlust seit Versuchsbeginn	normal	normal	normal	normal
1	5-10 % Verlust	leicht struppig	schuppig	leicht gebückt	eingeschränkt
2	10-20 % Verlust	stark struppig	expliziter Fellverlust	stark gebückt	annähernd inaktiv
3	>20 % Verlust				

An Versuchstag 100 wird das Experiment beendet, alle noch lebenden Versuchstiere werden abgetötet und als Überlebende gerechnet.

2.2.1.2 Injektionen

Intraperitoneale Injektionen: *i.p.*

Die Tiere wurden mit der Hand an der Nackenfalte so gegriffen, dass sie den Experimentator nicht beißen können. So fixiert wurden sie hochgehoben um freien Zugang zum Bauch der Tiere zu haben und die Injektion gut setzen zu können.

anti-NK1.1 (PK136) 500 µg pro Maus in 200 µl PBS

anti-IL-10R (1B1.2) 250 µg pro Maus in 200 µl PBS

Diphtherietoxin 1 µg pro Maus in 200 µl PBS

Rolipram 0,3 mg pro kg Körpergewicht in 200 µl PBS

Intravenöse Injektionen: *i.v.*

Die Tiere wurden zunächst wenige Minuten unter einer Rotlichtlampe erwärmt damit sich die Blutgefäße weiten. Danach wurden sie in eine spezielle Plexiglasröhre gezogen, sodass nur der Schwanz herausschaute. Die Injektion wurde in die linke

oder rechte Schwanzvene gesetzt. Auf diesem Weg wurden T-Zellen, Knochenmark oder Treg in PBS verabreicht.

2.2.2 Ex vivo und in vitro Arbeiten

2.2.2.1 Gewinnung von Milzzellen

Die Tiere werden mit CO₂ abgetötet und äußerlich mit Ethanol desinfiziert. Durch einen einfachen Schnitt durch Haut und Bauchfell an der linken Flanke, wird die Milz freigelegt und sodann entfernt. Um eine Einzelzellsuspension zu erhalten wird die Milz auf ein Zellsieb gelegt und mit einem Spritzenstempel durch selbiges zerrieben. Das Sieb wird mit PBS nachgespült. Erythrozyten werden durch einminütiges Resuspendieren der Zellen in Gey's Lysepuffer entfernt.

2.2.2.2 Präparation der mesenterialen Lymphknoten

Die Tiere werden mit CO₂ abgetötet und äußerlich mit Ethanol desinfiziert. Der Bauchraum wird durch einen V-förmigen Schnitt eröffnet. Das Mesenterium wird durch ein Verschieben des Darms nach rechts aus dem Bauchraum heraus sichtbar. Die mesenterialen Lymphknoten sind nun in der Nähe des Zentrums des Mesenteriums zu finden und können mit zwei Pinzetten abgenommen werden¹⁸⁰.

2.2.2.3 Präparation von Knochenmark

Die Tiere werden mit CO₂ abgetötet und äußerlich mit Ethanol desinfiziert. Die Hinterbeine werden vom Fell und der Haut befreit und danach durch einen Schnitt zwischen Hüft- und Oberschenkelknochen vom Rumpf getrennt. Das Muskelgewebe wird vom Ober- und Unterschenkelknochen entfernt und die Enden der Knochen werden aufgeschnitten. Das Knochenmark kann nun mit PBS + 1% FCS mit einer Spritze mit Kanüle (5,5 x 25 mm) aus dem Knochen herausgespült werden. Um Knochensplinter zu entfernen wird das gut suspendierte Mark über ein Zellsieb gegeben. Erythrozyten werden mit Gey's Lysepuffer entfernt.

2.2.2.4 *Präparation von Dünndarmstücken*

Die Tiere werden mit CO₂ abgetötet und äußerlich mit Ethanol desinfiziert. Der Bauchraum wird durch einen V-förmigen Schnitt eröffnet und der Darm außerhalb des Körpers ausgebreitet. Kurze Darmstücke (ca. 5 mm Länge) werden möglichst mittig zwischen Magenausgang und Blinddarm aus dem Dünndarm herausgeschnitten. Der Darminhalt wird durch ausdrücken mit einer gebogenen Pinzette entfernt. Für Gewebsschnitte wird das Darmstück in einer Kapsel in Histofix eingelegt.

2.2.2.5 *Präparation von Hautstücken*

Die Tiere werden mit CO₂ abgetötet. Das Fell auf dem Rücken wird mit den Fingern ausgerupft. Mit einer Schere wird ein ca. 1 cm² großes Stück aus der Rückenhaut ausgeschnitten. Für Gewebsschnitte wird das Hautstück flach ausgebreitet in eine Kapsel überführt und in Histofix gelegt.

2.2.2.6 *Enzymatischer Verdau von Milzen und Lymphknoten*

Die Organe werden in eine 6-Kavitätenplatte mit 4 ml HBSS pro Kavität gelegt. Es werden DNase (100 µg/ml) und Kollagenase (1 mg/ml) zugesetzt und das enzymhaltige HBSS wird mittels Spritze und Kanüle in die Organe gespritzt. Die Platte wird 20 min im Inkubator belassen, dann werden die Organe mit zwei Kanülen in möglichst kleine Stücke zerrupft und erneut 20 min bei 37 °C inkubiert. Es werden pro Kavität 80 µl EDTA-Lösung (0,5 M) zugegeben und 5 min inkubiert. Der Inhalt der Platte wird gut resuspendiert und über ein Zellsieb in ein 50 ml Röhrchen gegeben. Die Platte und das Sieb werden mit HBSS gut nachgespült.

2.2.2.7 Gewinnung von DC aus der Milz

Die Mäuse werden abgetötet, die Milz wird entnommen und wie zuvor beschrieben verdaut. Die Zellen von ein bis zwei Milzen werden in 3 ml HBSS aufgenommen und mit 1 ml Optiprep gemischt. Die Zellen werden in ein 15 ml Röhrchen gegeben und vorsichtig mit einer Mischung aus 4,2 ml Lösung C und 1 ml Optiprep überschichtet. Diese wird wiederum mit 3 ml HBSS überschichtet¹⁸¹. Das Röhrchen wird 15 min bei 1800 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Die Fraktion mit überwiegend DC und B-Zellen ist als milchige Bande zwischen oberer und mittlerer Phase zu sehen. Sie wird mit einer Pasteurpipette abgenommen und mit viel MACS-Puffer gewaschen. Die Zellzahl wird auf 1×10^8 pro ml in MACS-Puffer eingestellt und anti-CD11c-Microbeads werden 1:10 zugesetzt. Es wird 20 min bei 4 °C inkubiert. Eine MACS-Säule wird in den Magneten eingehängt und mit 8 ml MACS-Puffer gespült. Die Zellen werden einmal in MACS-Puffer gewaschen, in 5 ml aufgenommen und anschließend milliliterweiße über die Säule gegeben. Es wird zweimal mit je 3 ml MACS-Puffer nachgespült und mit 5 ml MACS-Puffer in ein 50 ml Röhrchen eluiert. Die Reinheit der DC beträgt 90-95 %.

2.2.2.8 Generierung von DC aus Knochenmark (BMDC)

Knochenmark wird wie zuvor beschrieben gewonnen und von Erythrozyten befreit. Die Zellen werden auf $0,75 \times 10^6$ pro ml in DC-Medium eingestellt. Es werden 4 ml der Zellsuspension pro Kavität einer 6-Kavitäten-Platte ausplattiert und zwei Tage im Inkubator belassen. An Tag 2 wird die Platte gut geschwenkt und es werden pro Kavität 3 ml Medium abgenommen und durch frisches DC-Medium ersetzt. Die Platte wird erneut zwei Tage im Inkubator belassen, an Tag 4 werden vorsichtig und ohne Schwenken 3 ml Medium abgenommen und durch frisches DC-Medium ersetzt. Nach weiteren zwei Tagen im Inkubator können die BMDC durch kräftiges Spülen der Platte mit Testmedium gewonnen werden. Die Differenzierung der Zellen ist am Lichtmikroskop zu kontrollieren, der Phänotyp und die Reinheit sollten nach der Kultur durchflusszytometrisch bestimmt und überprüft werden.

2.2.2.9 Gewinnung von CD90.2⁺ T-Zellen

Die Milz wird entnommen und durch ein Zellsieb verrieben, Erythrozyten werden mit Gey's Lysepuffer entfernt. Die Zellen werden auf 1×10^8 pro ml in MACS-Puffer eingestellt und pro ml werden 55 μ l anti-CD90.2-Microbeads zugegeben. Es wird 20 min bei 4 °C inkubiert. Währenddessen wird eine MACS-Säule (für max. 5×10^8 Zellen) in den Magneten eingehängt und mit 8 ml MACS-Puffer gespült. Die Zellsuspension wird einmal gewaschen, in 5 ml pro Säule aufgenommen und milliliterweiße über die Säule gegeben. Es wird zweimal mit je 3 ml MACS-Puffer nachgespült und mit 5 ml MACS-Puffer in ein 50 ml Röhrchen eluiert.

2.2.2.10 Gewinnung von Treg

Die Milz wird entnommen und durch ein Zellsieb verrieben, Erythrozyten werden mit Gey's Lysepuffer entfernt. Die Zellen werden auf 1×10^8 pro ml in MACS-Puffer eingestellt, es wird anti-CD25 zugesetzt (7D4-Biotin, 1,25 μ g/ml) und 20 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen werden zweimal gewaschen, erneut eingestellt und mit SA-PE (1:400) 20 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellen werden gewaschen, auf 5×10^8 pro ml in MACS-Puffer eingestellt und mit 50 μ l anti-PE-Microbeads je ml versetzt. Die Inkubation erfolgt zunächst 10 min bei 4 °C und dann 10 min bei Raumtemperatur im Plattformrüttler. Das Volumen wird auf 5 ml mit MACS-Puffer aufgefüllt und die Zellen werden milliliterweiße über eine vorbereitete MACS-Säule gegeben. Die Säule wird zweimal mit je 3 ml MACS-Puffer gespült, dann wird mit 5 ml eluiert. Das Eluat wird nochmal über die Säule gegeben. Die Zellen werden gezählt und zellzahlunabhängig in 0,5 ml PBS + 0,5 % BSA aufgenommen. Verunreinigungen (ca. 30 %) werden mit Dynabeads entfernt: 50% entfällt auf B-Zellen, es wird die achtfache Menge anti-B220-Beads zugegeben, halb so viele anti-MAC1-Beads und 75 % anti-CD8-Beads. Es wird 20 min bei Raumtemperatur auf dem Rüttler inkubiert und anschließend mit PBS + 10 % FCS auf 10 ml aufgefüllt. Das Röhrchen wird zwei min in den Magnet gestellt und die Zellsuspension wird langsam mit einer Pasteurpipette abgenommen. Das Röhrchen wird mit 5 ml gespült, 2 min in den Magnet gestellt und die Flüssigkeit entnommen und mit der davor vereinigt. Die Reinheit der Treg (CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺) sollte mindestens 90-95 % betragen und durchflusszytometrisch überprüft werden.

2.2.2.11 Voraktivieren von Treg

Die Voraktivierung wird in einer 24-Kavitäten-Platte durchgeführt. Pro Kavität werden zunächst 500 µl PBS mit 3 µg/ml anti-CD3 pipettiert und 30 min bei 37 °C inkubiert. Es wird einmal mit PBS gespült und mit 500 µl PBS mit 3 µg/ml anti-CD28 erneut 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Kavität wird erneut gespült und mit 1 ml Treg ($1,5 \times 10^6$ pro ml) in Treg-Medium gefüllt. Am folgenden Tag wird pro Kavität ein weiterer ml Treg-Medium zugegeben. Zwei Tage später werden die Zellen durch Resuspendieren von der Platte gelöst, in einem Röhrchen gesammelt, das Volumen durch weiteres Treg-Medium verdoppelt und davon je zwei ml in eine neue Kavität (ohne Antikörperbeschichtung) gegeben. Weitere zwei Tage später können die Zellen als voraktivierte Treg (preTreg) verwendet werden.

2.2.2.12 T-Zell-depletiertes Knochenmark (TCD-BM)

Knochenmark wird wie zuvor beschrieben gewonnen, Erythrozyten werden lysiert. Die Zellen werden auf 1×10^7 pro ml in MACS-Puffer eingestellt und pro ml werden 55 µl anti-CD90.2-Microbeads zugesetzt. Es wird 20 min bei 4 °C inkubiert. Währenddessen wird eine MACS-Säule vorbereitet und im Magneten positioniert. Die Zellen werden gewaschen, in 5 ml MACS-Puffer aufgenommen und milliliterweiße über die Säule gegeben. Der Durchlauf enthält das TCD-BM und wird aufgefangen. Es wird zweimal mit 3 ml MACS-Puffer gespült und der Durchlauf ebenfalls aufgefangen.

2.2.2.13 Bestimmung der Lebendzellzahl

Eine Probe der Zellsuspension wird in Trypanblau-Lösung verdünnt und auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Unter dem Lichtmikroskop wird die Zellzahl in einem Gruppenquadrat bestimmt, wobei tote (blaue) Zellen nicht mitgezählt werden. Die Anzahl der Zellen pro Milliliter entspricht dem Produkt aus dem Kammerfaktor (10^4), dem Verdünnungsfaktor und der Zellzahl.

2.2.2.14 *Fixieren von Zellen mit Glutaraldehyd*

Bis zu 10×10^6 Zellen werden in 1 ml PBS mit 0,1 % Glutaraldehyd aufgenommen. Nach 30 sec wird der Vorgang durch Zugabe von 4,5 ml einer 0,2 M Lösung von Lysin in PBS und 4,5 ml FCS abgestoppt. Die fixierten Zellen werden in Medium gewaschen.

2.2.2.15 *Behandlung von Zellen mit Mitomycin C*

Um weitere Zellteilung zu unterbinden, werden Milz- oder Lymphknotenzellen mit dem Zytostatikum Mitomycin C behandelt. Die Zellen werden auf 2×10^7 Zellen pro ml in MEM mit 2 % FCS eingestellt und dem gleichen Volumen einer Mitomycin Lösung mit 60 $\mu\text{g/ml}$ in MEM mit 2 % FCS gemischt. Die Inkubation erfolgt für 30 min bei 37 °C im Wasserbad. Anschließend werden die Zellen fünfmal gewaschen um Reste von Mitomycin sicher zu entfernen.

2.2.2.16 *Behandlung von Zellen mit CFSE*

Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE) wird an der Zelloberfläche gebunden und ist als Fluoreszenzfarbstoff durchflusszytometrisch zu detektieren. Bei jeder Zellteilung halbiert sich die Fluoreszenzintensität, sodass dadurch die Proliferation gemessen werden kann.

Die zu behandelnden T-Zellen werden auf 2×10^7 Zellen pro ml in PBS eingestellt und mit dem gleichen Volumen einer 10 μM CFSE-Lösung in PBS gemischt. Die Inkubation erfolgt 4 min bei 37 °C, dann wird die Reaktion mit dem gleichen Volumen FCS abgestoppt und die Zellen gewaschen.

2.2.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Analyse einer großen Anzahl einzelner Zellen. Die Zellen werden in einer Kapillare einzeln an Lasern und entsprechenden

Detektoren vorbeigeführt. So kann generell durch die Unterbrechung des Lasersignals eine Aussage über die Größe gemacht werden und über das messbare Streulicht ist eine Beurteilung der Granularität der Zellen möglich. Darüberhinaus können jedoch auch Fluoreszenzfarbstoffe zum Leuchten angeregt werden. Diese Farbstoffe werden an Antikörper gekoppelt, die spezifische Moleküle auf oder in der Zelle erkennen, sodass die Stärke des Signals mit der Expression des entsprechenden Moleküls korreliert.

2.2.3.1 Identifizierung toter Zellen

Um tote Zellen von der Messung auszuschließen wurde wenige Minuten zuvor 7AAD oder Propidiumiodid (PI) 1:100 zu der Probe gegeben. Beide Farbstoffe können durch die löchrige Membran in tote Zellen eindringen und dort in die DNA interkalieren. Tote Zellen erscheinen dadurch als positiv im PerCP-Kanal und können von lebenden, PerCP-negativen Zellen unterschieden werden.

2.2.3.2 Oberflächenfärbungen

Die Zellen werden in einer 96-Kavitäten-Platte in FACS-Puffer aufgenommen und gewaschen. Abhängig von der Anzahl werden die Zellen in 50 bis 100 µl Antikörperlösung für 20 min bei 4 °C inkubiert. Die Antikörper werden anhand früherer Erfahrungen und Titrationen in FACS-Puffer verdünnt (meist zwischen 1:200 und 1:2000). Nach der Inkubation werden die Proben zweimal gewaschen und in einem adäquaten Volumen in große oder kleine FACS-Röhrchen überführt und gemessen.

2.2.3.3 Intrazelluläre cAMP-Färbung

Zunächst wird eine Oberflächenfärbung durchgeführt, wobei der Farbstoff APC-Cy7 nicht benutzt werden kann, weil er durch die folgende Fixierung zerstört wird. Die Fixierung erfolgt durch zehnmütige Inkubation der Zellen in 100 µl PBS mit 4 % PFA bei 4 °C. Es werden 100 µl Saponinpuffer hinzugegeben und erneut 10 min bei

Material und Methoden

4 °C inkubiert. Es wird zweimal in Saponinpuffer gewaschen, in 50 µl Fc-Block (1:50) in Saponinpuffer aufgenommen und 10 min bei 4 °C inkubiert. Es werden 50 µl anti-cAMP-FITC (1:100) bzw. eine Isotypkontrolle hinzugegeben und 45 min bei 4 °C inkubiert. Die Probe wird in Saponinpuffer gewaschen, in FACS-Puffer aufgenommen und gemessen.

2.2.4 ELISA

2.2.4.1 cAMP ELISA

Es wurde mit dem Direct cAMP EIA kit von Enzo Life Sciences gearbeitet.

Die zu analysierenden Zellen wurden in 100 µl 0,1 M Salzsäure pro 1×10^6 Zellen aufgenommen, für 10 min bei Raumtemperatur lysiert und zunächst bei -20 °C aufbewahrt. Das weitere Vorgehen entsprach den Herstellerangaben des Kits. Es wurde nach dem Protokoll für acetylierte Proben verfahren. Die optische Dichte wurde an einem Tecan GENios (410 nm) bestimmt und nach Herstellerangaben ausgewertet¹⁸².

2.2.4.2 IL-12 ELISA

Es wurde mit dem Mouse IL-12 p70 ELISA Ready-SET-Go! Kit von eBioscience nach den Angaben des Herstellers gearbeitet. Der ELISA wurde in MaxiSorp 96-Kavitäten Flachbodenplatten von Nunc durchgeführt¹⁸³.

2.2.5 Molekularbiologische Arbeiten

2.2.5.1 Gewinnung von RNA aus Zellen und Geweben

Gewebeproben werden in 1 ml Trizol in einem Weisdeckelröhrchen aufgenommen und mit einem Ultraturax ca. eine Minute aufgeschlossen. Anschließend wird das Röhrchen 10 min bei 1200 g zentrifugiert und der Überstand mit einer RNase-freien

Spitze in ein RNase-freies Reaktionsgefäß überführt. Alle weiteren Arbeiten erfolgen mit RNase-freien Materialien und Reagenzien.

Isolierte Zellen werden direkt in 1 ml Trizol resuspendiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Alle weiteren Arbeiten erfolgen mit RNase-freien Materialien und Reagenzien.

Der Probe werden 200 µl Chloroform zugesetzt, es wird gevortext bis die Probe milchig erscheint und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgt eine Zentrifugation für 15 min und 11.500 rpm bei 4 °C. Die obere, wässrige Phase (ca. 500 µl) wird abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt, der Rest wird verworfen. Der wässrigen Phase werden 1,5 µl Glykogen zugesetzt, es wird invertiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es werden 500 µl Isopropanol hinzugegeben, gevortext, 10 min inkubiert und 10 min bei 11.500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die RNA ist nun als weißes Palett zu erkennen, der Überstand wird verworfen. Die RNA wird zweimal mit eiskaltem Ethanol/Wasser (3:1) gewaschen, anschließend an der Luft getrocknet und in 20 µl Wasser aufgenommen. Der RNA-Gehalt wird photometrisch bestimmt und die Probe bei -80 °C gelagert.

2.2.5.2 Reverse Transkription

Mittels einer viralen Reversen Transkriptase (RT) wird die isolierte RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die benutzte RT stammt aus dem Moloney murinen Leukämie Virus (Mo-MLV).

Zunächst werden in einem RNase-freien Reaktionsgefäß 500 ng RNA in 11 µl

Wasser vorgelegt. Dazu kommen:

- 4 µl 5x Puffer
- 2 µl dNTPs (je 10 mM)
- 1 µl Random Hexamer Primer
- 1 µl Oligo-d(T)-Primer (100 ng/µl)
- 1 µl Mo-MLV-RT (200 u)

Die Reaktion findet 1 h bei 42 °C statt, dann werden 80 µl Wasser zugesetzt und die Probe kann bei -20 °C gelagert werden.

2.2.5.3 Quantitative Real-Time PCR (q-PCR)

Pipettieransatz für Triplikate:

- 29 µl Wasser
- 3,2 µl Primer
- 8 µl cDNA
- 40 µl SYBR-Green

Pro Unikat werden 25 µl pipettiert.

Bei SYBER-Green handelt es um den SYBR GreenER qPCR SuperMix von Invitrogen, der speziell an den verwendeten iCycler angepasst ist. Er enthält die Polymerase, die dNTPs sowie den Fluoreszenzfarbstoff und weitere Hilfsstoffe.

Die Primer werden in einer Arbeitslösung eingesetzt, in der der forward und der revers Primer jeweils eine Konzentration von 5 pmol/µl haben. Die Sequenzen der benutzten Primer sind:

Bezeichnung	Sequenz
B2M for	5'-TTTCTGGTGCTTGTCTCACTGACCG-3'
B2M rev	5'-GCAGTTCAGTATGTTCTGGCTTCCCA-3'
IL-10 for	5'-GAGAGCGCTCATCTCGATTT-3'
IL-10 rev	5'-GGGTCTCCCAAGGAAAGGTA-3'
IL-12p35 for	5'-GTCAATCACGCTACCTCCTC-3'
IL-12p35 rev	5'-CTGCACAGCTCATCGATGGC-3'
TGF-β1 for	5'-TGACGCTCACTGGAGTTGTACGG-3'
TGF-β1 rev	5'-GGTTCATGTCATGGATGGTGC-3'

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

Schritt	Temperatur	Dauer (min:sec)	Wiederholung
1. Aktivierung	50 °C	2:00	
2. Denaturierung	95 °C	15:00	
3. Denaturierung	95 °C	0:30	} 50x
4. Annealing	57 °C	0:30	
5. Elongation	72 °C	1:00	
6. Denaturierung	95 °C	1:00	
7. Schmelzkurve	95 °C – 65 °C	0:10	70x

2.2.6 Histologische Methoden

Die zu untersuchenden Organe, wurden wie zuvor beschrieben entnommen und in Kapseln in Histofix (4 % PFA) eingelegt. Für die weitere Verarbeitung wurden die Proben der Core Facility für Histologie der Universitätsmedizin Mainz übergeben. Dort wurde das Gewebe in Paraffin eingebettet, am Mikrotom in 3 µm dicke Scheiben geschnitten und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt.

Für die Begutachtung der Schnitte und die Erstellung der Fotografien wurde Dr. Andreas Kreft, Institut für Pathologie, Universitätsmedizin Mainz zu Rate gezogen.

2.2.7 Software und Statistik

Die gewonnen Daten wurden den Anforderungen entsprechend mit Microsoft Excel oder GraphPad Prism ausgewertet. Beide Programme wurden ebenfalls für die graphische Darstellung benutzt. Wenn nicht anders vermerkt, wird immer ein Mittelwert mit Standardabweichung (SD) oder Standard Fehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Statistische Signifikanz wurde, anhängig vom Versuchsaufbau, nach t-Test (zweiseitig, ungepaart) oder Mann-Whitney-*U*-Test bestimmt. Es wurde $P < 0,05$ als signifikanter Unterschied definiert.

Material und Methoden

Alle Daten zu Überlebens-Versuchen wurden mit GraphPad Prism dargestellt und mit selbigem Programm anhand eines Mantel-Cox-Test (Logrank-Test) bewertet. Es wurde $P < 0,05$ als signifikanter Unterschied definiert.

Die Verarbeitung und Darstellung von Primärdaten der Durchflusszytometrie erfolgte mit der FACS Diva Software von BD oder der FlowJo Software von Tree Star.

Die histologischen Abbildungen wurden mittels Adobe Photoshop arrangiert.

3. Ergebnisse

3.1 Mechanismen der Treg vermittelten Suppression einer GvH-Erkrankung

Regulatorische T-Zellen sind bekannte und gut beschriebene Suppressoren für die Aktivierung von anderen T-Zell-Populationen. Dies geschieht einerseits direkt, wie auch indirekt durch Suppression der beteiligten APCs. Beide Möglichkeiten machen Treg zu einem interessanten Mittel in der zellulären Therapie. Das gilt auch für die Suppression von T-Zell-Reaktionen während einer GvH-Erkrankung.

3.1.1 Regulatorische T-Zellen des Donors supprimieren eine akute GvH-Erkrankung

Es wurde bereits in verschiedenen Maus-Modellen für GvH-Erkrankungen gezeigt, dass Treg des Donors in der Lage sind das Krankheitsbild, wie auch die Überlebenschancen zu verbessern. Um zu evaluieren, ob das von uns benutzte Modell ebenso reagiert, wurden BALB/c Empfängermäuse letal bestrahlt und mit T-Zell-depletiertem Knochenmark und CD90.2⁺ T-Zellen aus C57BL/6 Tieren transplantiert. Bei einer Gruppe wurden zusätzlich CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg aus C57BL/6 Mäusen *i.v.* gespritzt. Wie Abbildung 4 zu entnehmen ist, verbessert das Verabreichen der Treg das Überleben deutlich. Ohne Treg überleben 29% der Tiere einen Zeitraum von 100 Tagen, das mediane Überleben liegt bei 40 Tagen. Durch die Treg steigt das Überleben auf 73% der Tiere.

Ergebnisse

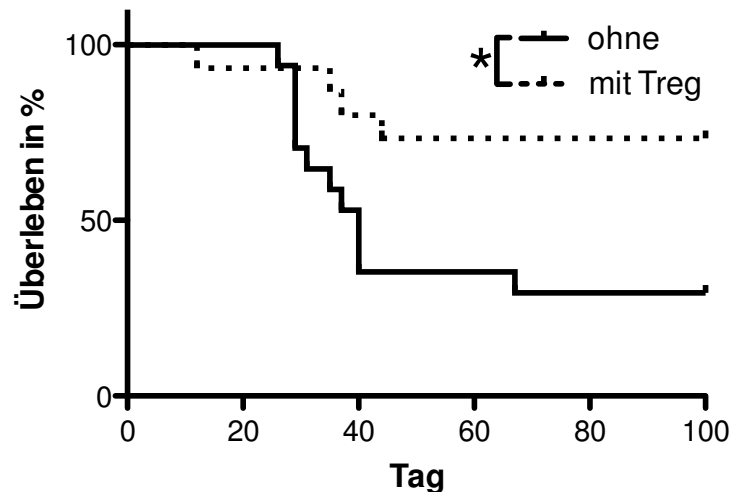


Abbildung 4: Regulatorische T-Zellen verbessern das Überleben nach allogener HSCT.

BALB/c Mäuse wurden letal bestrahlt (8,5 Gy) und am folgenden Tag wurden 5×10^6 Zellen an T-Zell-depletiertem Knochenmark und $0,5 \times 10^6$ CD90.2⁺ T-Zellen aus C57BL/6 Mäusen transplantiert (n=17). Bei einer zweiten Gruppe wurden pro Tier zusätzlich $0,5 \times 10^6$ Treg aus C57BL/6 Mäusen kotransplantiert (n=15). Gezeigt sind die kombinierten Daten aus drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz der Unterschiede im Überleben wurde nach dem Mantel-Cox-Test bestimmt, (*) zeigt signifikante Unterschiede an.

3.1.2 Regulatorische T-Zellen supprimieren eine GvH-Erkrankung unabhängig von IL-10

Die Produktion des immunsuppressiven Zytokins IL-10 ist ein bekannter Mechanismus mit dem Treg die T-Zell-Aktivierung supprimieren. Um die Relevanz der IL-10 Produktion durch Donor Treg zu untersuchen, wurden zunächst in einer gemischten Lymphozytenreaktion BALB/c DC mit C57BL/6 T-Zellen und C57BL/6 WT oder IL-10^{-/-} Treg kokultiviert. Wie in Abbildung 5 A zu sehen ist, wird die T-Zell-Proliferation durch WT und IL-10^{-/-} Treg im gleichen Umfang gehemmt. Zur weiteren Überprüfung dieses Befunds *in vivo*, wurden BALB/c Empfängermausen neben T-Zell-depletiertem Knochenmark und CD90.2⁺ T-Zellen aus C57BL/6 Spendern, Treg aus C57BL/6 WT oder IL-10^{-/-} Mäusen transplantiert. Wie in Abbildung 5 B gezeigt, spielt es keine Rolle, ob die Treg in der Lage sind IL-10 zu produzieren oder nicht. Sowohl der Verlauf der Kurven, wie auch die Überlebensrate nach 100 Tagen ist sehr ähnlich (73% bzw. 75%).

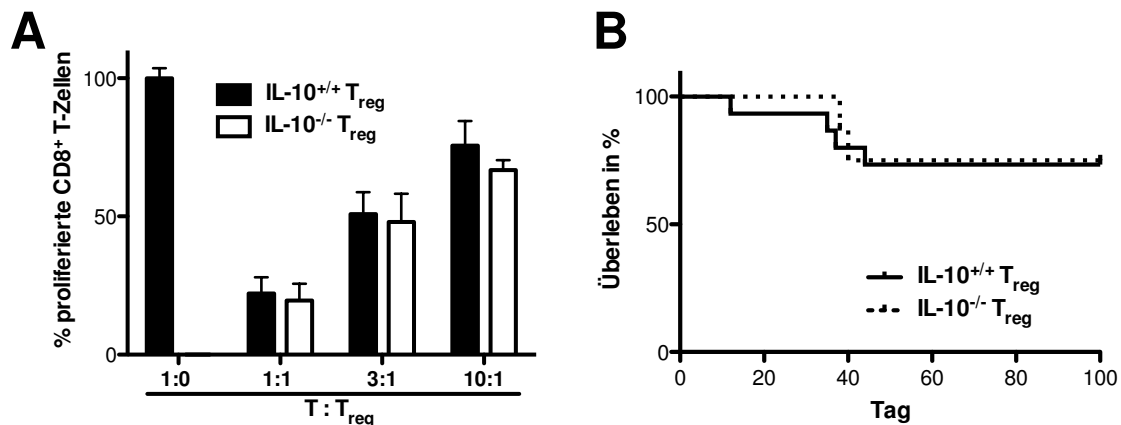


Abbildung 5: IL-10 Produktion durch Donor Treg ist nicht nötig um eine GvH-Erkrankung zu supprimieren.

(A) In einer gemischten Lymphozytenreaktion wurden BALB/c DC (1×10^4 pro Kavität) mit C57BL/6 T-Zellen (1×10^5 pro Kavität, CFSE markiert) und C57BL/6 WT oder IL-10^{-/-} Treg in gezeigten Verhältnissen für 4 Tage kokultiviert. Die Proliferation der T-Zellen wurde durchflusszytometrisch durch die Verringerung des CFSE-Signals gemessen und auf die Proben ohne Treg normiert. Es wurde mit Triplikaten gearbeitet. Gezeigt ist ein repräsentatives von drei unabhängigen Experimenten

(B) BALB/c Mäuse wurden letal bestrahlt (8,5 Gy). Am folgenden Tag wurden 5×10^6 Zellen an T-Zell-depletiertem Knochenmark und $0,5 \times 10^6$ CD90.2⁺ T-Zellen aus C57BL/6 Mäusen transplantiert. Zusätzlich wurden $0,5 \times 10^6$ Treg aus C57BL/6 WT (schwarze Linie, n=15) oder IL-10^{-/-} Tieren (unterbrochene Linie, n=8) *i.v.* injiziert. Gezeigt sind die kombinierten Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten.

3.1.3 Regulatorische T-Zellen kommunizieren mit allogenen DC über Gap Junctions und cAMP

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass Treg über interzellulären Kontakt via Gap Junctions sowohl andere T-Zellen, wie auch DC hemmen können^{106,107}. Dabei wird zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) die Rolle des suppressiven Agens zugeschrieben. Um zu überprüfen, ob dieser Mechanismus auch in der allogenen Situation, wie sie in einer transplantierten Maus herrscht eine Rolle spielt, wurden BMDC aus BALB/c Mäusen gewonnen und mit voraktivierten Treg aus C57BL/6 Mäusen kokultiviert. Nachdem die BMDC mittels magnetischer Separation reisoliert wurden, wurde der Gehalt von cAMP in den Zellen über einen spezifischen ELISA bestimmt. Wie in Abbildung 6 A zu sehen ist nimmt der cAMP Gehalt durch Kokultur mit Treg (DC_{sup}) auf ca. das Doppelte zu. Dieser Effekt kann durch den Gap Junction Inhibitor GAP27 nahezu aufgehoben werden. Im Gegenzug führt eine Inhibition des cAMP abbauenden Enzyms Phosphodiesterase 4 (PDE4) durch

Ergebnisse

Rolipram zu einem weiter erhöhten Spiegel an cAMP. Zusätzlich lässt sich mittels Durchflusszytometrie ein reduzierter Gehalt an cAMP in Treg feststellen, wenn diese zuvor mit allogenen BMDC kokultiviert wurden (Abbildung 6 B).

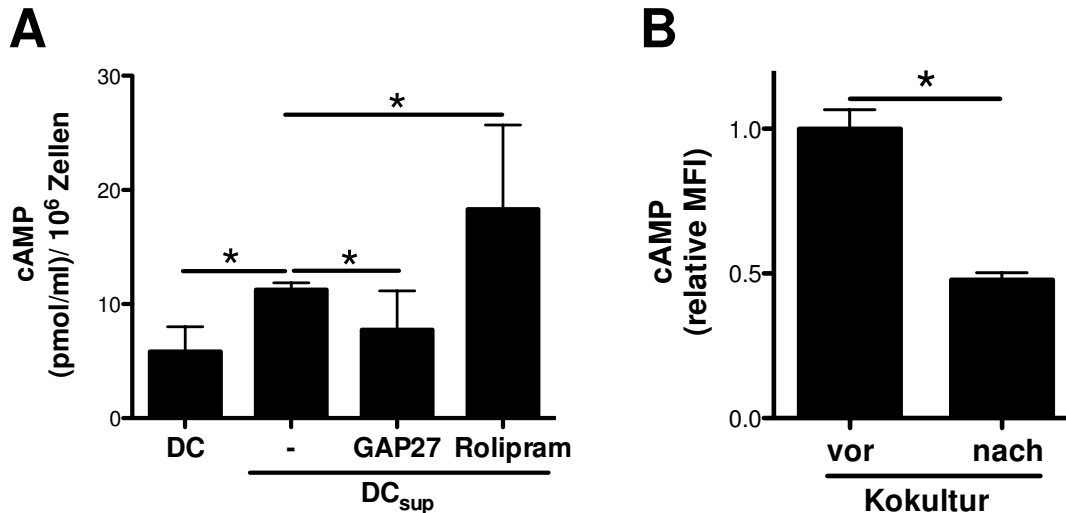


Abbildung 6: Regulatorische T-Zellen kommunizieren mit allogenen DC kontakt- und cAMP abhängig.

BALB/c BMDC wurden alleine oder mit voraktivierten C57BL/6 Treg (DC_{sub}) für 4 h in Gegenwart von anti-CD3 (3 µg/ml) kultiviert. Wo angezeigt wurde der Gap Junction Inhibitor GAP27 (300 ng/ml) oder der PDE 4 Inhibitor Rolipram (300 nM) zugesetzt. **(A)** Nach 4 h wurden die BMDC mittels CD11c spezifischem, magnetischem Zellsorting reisoliert, lysiert und der cAMP Gehalt mittels eines spezifischen ELISA bestimmt. **(B)** Der relative cAMP Gehalt in Treg wurde mittels eines cAMP spezifischen Antikörpers im Durchflusszytometer bestimmt. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente und wurden in Triplikaten gemessen. (*) Statistisch signifikante Unterschiede nach Mann-Whitney *U*-Test.

3.1.4 Regulatorische T-Zellen induzieren einen suppressiven Phänotyp in allogenen DC

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Treg und allogene DC miteinander kommunizieren, ist es von Interesse, welche Folgen diese Kommunikation hat. Als hochpotenter APC kommt der DC bei der Aktivierung allogener T-Zellen eine Schlüsselrolle zu. Dementsprechend wurden Oberflächenmoleküle untersucht, die auf Seiten der DC für die T-Zell-Aktivierung wichtig sind. Dazu wurden DC in Abwesenheit oder Anwesenheit von Treg mit dem TLR 4 Liganden LPS stimuliert. Wie in Abbildung 7 gezeigt, führt LPS zu einer verstärkten Expression des kostimulatorischen Moleküls CD80, ebenso wie zu einer erhöhten Expression der inhibitorischen Moleküle B7-DC und B7-H1. Durch Kokultivierung mit Treg wird die LPS bedingte Zunahme der CD80 Expression verhindert. Im Fall der inhibitorischen

Moleküle führt die Gegenwart der Treg bereits zu einer verstärkten Expression. B7-H1 wird durch LPS und Treg zusammen sogar noch stärker exprimiert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kokultur mit Treg auf der Oberfläche der DC einen suppressiven Phänotyp induziert.

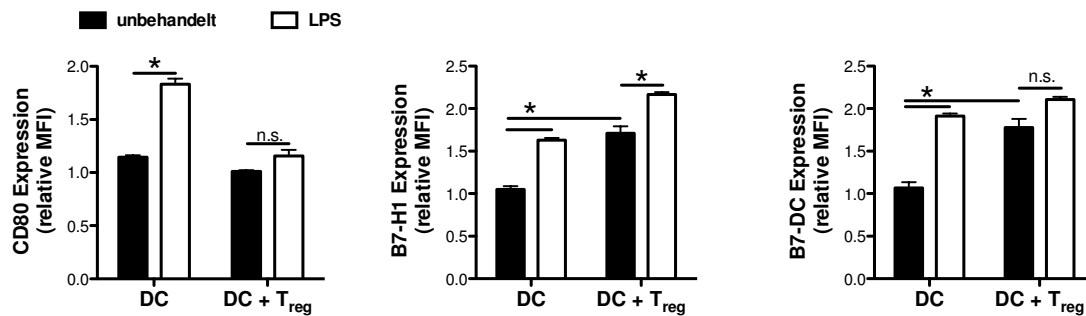


Abbildung 7: Treg induzieren einen suppressiven DC Phänotyp.

BALB/c BMDC wurden in Anwesenheit oder Abwesenheit von C57BL/6 Treg (1:1 Verhältnis) mit LPS (100 ng/ml) stimuliert oder unbehandelt belassen. In allen Fällen wurde ein anti-CD3-Antikörper (3 µg/ml) zugesetzt. Nach 4 h wurde die Expression von CD80, B7-H1 und B7-DC durchflusszytometrisch bestimmt. Dabei wurden CD11c⁺ MHCII⁺ Zellen als DC definiert. Alle Messungen wurden in Triplikaten vorgenommen. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. (*) Statistisch signifikante Unterschiede nach Mann-Whitney-U-Test; n.s. – nicht signifikante Unterschiede.

3.1.5 Inhibierung von Phosphodiesterasen verbessert die Suppression durch Treg

Wie gezeigt wird die Suppression von allogenen DC durch Treg durch einen Transfer von cAMP vermittelt. Dementsprechend sollte ein erhöhter cAMP Spiegel auch zu einer stärkeren Suppression führen. Um dies pharmakologisch zu erreichen wurden Inhibitoren für verschiedene Phosphodiesterasen (PDE) getestet. Phosphodiesterasen spalten zyklische Nukleotide in ihre nicht-zyklische Form, also cAMP zu AMP und/oder cGMP zu GMP, abhängig von der Spezifität des jeweiligen Enzyms. Untersucht wurde der Einfluss der Inhibitoren BAY-60-7550, der spezifisch ist für die cGMP und cAMP degradierende Isoform PDE-2, Cilostazol, der spezifisch ist für die cGMP und cAMP degradierende Isoform PDE-3 und Rolipram, das spezifisch die cAMP degradierende Isoform PDE-4 hemmt. Für alle drei Isoformen konnte gezeigt werden, dass sie in Leukozyten exprimiert werden^{184,185}. In Abbildung 8 A ist zu sehen, dass alle drei Inhibitoren in der Lage sind die T-Zell-Proliferation in einer Kultur von BALB/c DC mit allogenen C57BL/6 T-Zellen und Treg

Ergebnisse

konzentrationsabhängig zu hemmen. In Abbildung 8 B wurde die Konzentration der Inhibitoren konstant gehalten und das Verhältnis von T-Zellen zu Treg verändert. Es ist zu sehen, dass die Suppression der T-Zell-Proliferation durch Treg in fast allen getesteten Kombinationen durch die PDE-Inhibitoren verstärkt wird. Bei den Kulturen, denen PDE-2 und 3 Inhibitoren zugesetzt wurden fällt außerdem auf, dass auch in der Abwesenheit von Treg eine Reduktion der T-Zell-Proliferation zu messen ist. Dies wird im nächsten Abschnitt genauer untersucht.

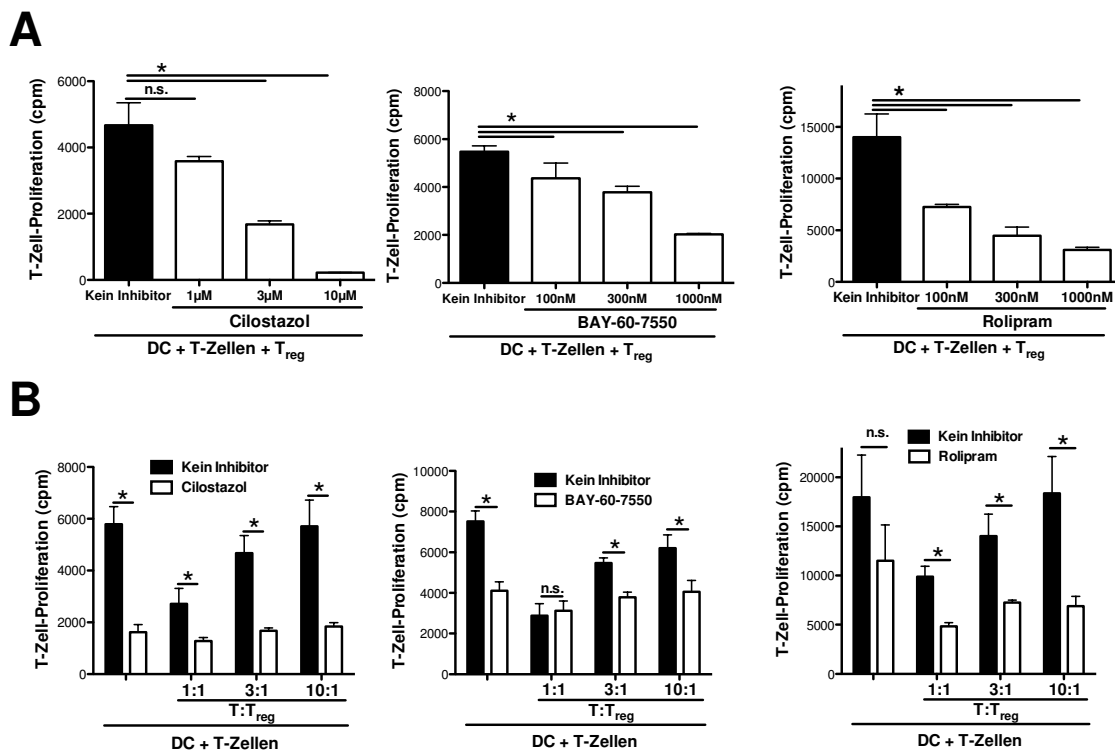


Abbildung 8: PDE-Inhibition verbessert die Treg-vermittelte Suppression.

BALB/c DC (3×10^4 pro Kavität) wurden mit allogenen C57BL/6 T-Zellen (1×10^5 pro Kavität) für 3 Tage kokultiviert. Die T-Zell-Proliferation wurde durch ^3H -Thymidin-Einbau bestimmt. **(A)** Es wurden pro Kavität 3×10^4 C57BL/6 Treg verwendet und die Inhibitoren in den angegebenen Konzentrationen eingesetzt. **(B)** Die PDE-Inhibitoren Cilostazol (3 μ M), BAY-60-7550 (300 nM) und Rolipram (100 nM) wurden in festen Konzentrationen zugesetzt. Die Anzahl der Treg ist den Verhältnissen zur T-Zell-Zahl zu entnehmen. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. (*) Statistisch signifikante Unterschiede nach Mann-Whitney-U-Test; n.s. – nicht signifikante Unterschiede.

3.1.6 PDE-Inhibitoren supprimieren die T-Zell-Proliferation auch unabhängig von Treg

Wie in Abbildung 8 B bereits zu sehen, haben die PDE-Inhibitoren auch ohne die Gegenwart von Treg einen hemmenden Effekt auf die T-Zell-Proliferation. Um diesen genauer zu evaluieren wurden T-Zellen und allogene DC in einem festen Verhältnis kokultiviert und die Inhibitoren Cilostazol, BAY-60-7550 und Rolipram in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt (Abbildung 9). Es ist klar zu sehen, dass alle drei Inhibitoren die T-Zell-Proliferation konzentrationsabhängig direkt hemmen. Eine verminderte cAMP (oder cGMP) Degradation verbessert also nicht nur die suppressiven Kapazitäten von Treg, sondern führt auch direkt zu einer verminderten T-Zell-Proliferation.

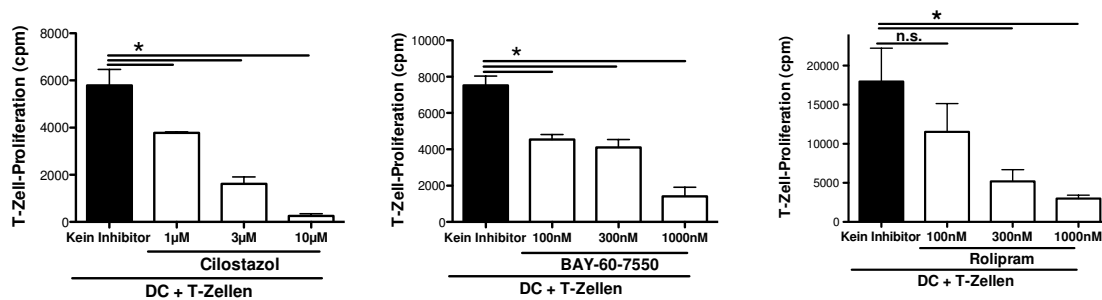


Abbildung 9: T-Zell-Proliferation wird durch Inhibition von PDE-2, -3 und -4 direkt gehemmt.

C57BL/6 T-Zellen (1×10^5 pro Kavität) wurden 3 Tage mit allogenen BALB/c DC (3×10^4 pro Kavität) kokultiviert. Cilostazol, BAY-60-7550 und Rolipram wurden in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt. Die T-Zell-Proliferation wurde durch ^3H -Thymidin-Einbau bestimmt. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. (*) Statistisch signifikante Unterschiede nach Mann-Whitney-U-Test; n.s. – nicht signifikante Unterschiede.

3.1.7 PDE-Inhibitoren verändern die Zytokinproduktion und die Expression von kostimulatorischen Molekülen auf DC *in vitro* nicht

Die T-Zell-Proliferation der zuvor gezeigten Versuche wird durch Priming über allogene DC ausgelöst. Somit stellt sich die Frage, ob die Inhibitoren die T-Zell-Proliferation direkt beeinflussen oder ob die DC als Induktoren der Proliferation verändert werden. Um die direkte Wirkung auf DC zu untersuchen wurden aus den Milzen von BALB/c Mäusen DC isoliert und mit den Inhibitoren inkubiert. Wie in Abbildung 10 zu sehen ist, sind die Inhibitoren in den verwendeten Konzentrationen

Ergebnisse

nicht toxisch. Die Expression der kostimulatorischen Oberflächenmoleküle CD40, CD80 und CD86 wird nur minimal beeinflusst und es ist nicht davon auszugehen, dass die Veränderungen große Auswirkungen auf die T-Zell-Proliferation hätten. Ebenso verhält es sich mit der Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-12. Während der PDE3-Inhibitor Cilostazol hier gar keinen Effekt zeigt, reduziert Inkubation mit BAY-60-7550 oder Rolipram die Produktion nur minimal und nicht statistisch signifikant.

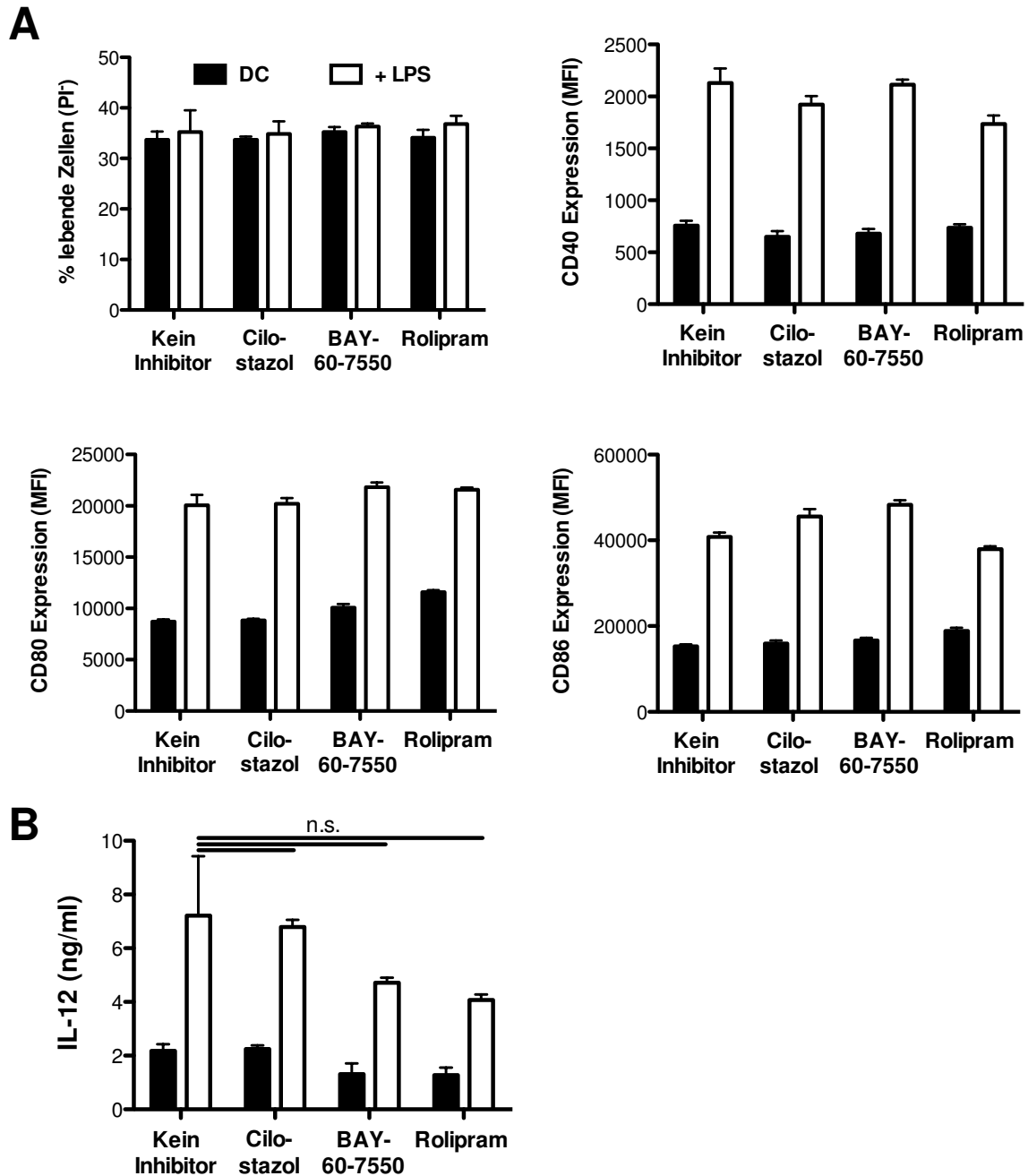


Abbildung 10: Inhibition von PDE2 und PDE4 beeinflusst DC nicht

Aus den Milzen von BALB/c Mäusen wurden DC isoliert und in eine 96-Kavitätenplatte übertragen (1×10^5 Zellen pro Kavität). Wo angegeben (weiße Säulen) wurden die Zellen mit 100 ng/ml LPS stimuliert. Die Konzentrationen der Inhibitoren betragen 3 μ M (Cilostazol) oder 300 nM (BAY-60-7550 und Rolipram). **(A)** nach ca. 16 h Inkubation wurde der Phänotyp der DC durchflusszytometrisch bestimmt. **(B)** nach ca. 48 h Inkubation wurden Kulturüberstände abgenommen und mittels ELISA die IL-12 Konzentration bestimmt. Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Versuche. n.s. - nicht signifikante Unterschiede.

3.1.8 Rolipram inhibiert die T-Zell-Proliferation direkt und indirekt durch Modulation der DC/Treg Interaktion

Ein Problem der bisher gezeigten *in vitro* Versuche ist, dass dabei immer mindestens zwei Zelltypen auf die PDE-Inhibition reagieren können. Es kann nicht eindeutig gesagt werden, auf welche Zelle die Inhibitoren einwirken. Um dieses Problem zu umgehen, wurde ein Versuchsaufbau wie in Abbildung 11 A skizziert gewählt. In einer ersten vierstündigen Kokultur wurde der Phänotyp der DC durch Treg, Rolipram und/oder LPS manipuliert. Anschließend wurden die Zellen und mit ihnen auch ihr Phänotyp mit Glutaraldehyd fixiert. In einer folgenden dreitägigen Kokultur mit allogenen, frisch isolierten T-Zellen wurden die DC als Stimulatoren benutzt und somit ihr Phänotyp in Form der messbaren T-Zell-Proliferation ausgelesen. Zunächst wurde die Umsetzbarkeit dieses Versuchsaufbaus untersucht. Wie in Abbildung 11 B gezeigt sind die fixierten DC prinzipiell in der Lage als Stimulatoren zu fungieren, wobei die T-Zell-Proliferation im Vergleich zu nicht fixierten Zellen verringert ist. Abbildung 11 C zeigt, dass die in Abbildung 7 gezeigten Unterschiede im Phänotyp der DC auch im T-Zell-Proliferationsassay abbildbar sind. Damit ist die Methode hinreichend sensitiv und geeignet. In Abbildung 11 D wird gezeigt, dass weder eine Behandlung der DC mit Rolipram, noch eine vierstündige Kokultur mit Treg alleine zu einer signifikanten Veränderung der T-Zell-Proliferation führt. Diese wird jedoch erreicht, wenn Rolipram bei der Kokultur mit Treg zugegen ist. Rolipram hat folglich keine Wirkung auf die DC direkt, sondern auf die DC/Treg Interaktion.

In Abbildung 9 wurde eine direkte Wirkung von Rolipram auf die T-Zell-Proliferation gezeigt. Es ist jedoch nicht klar, ob der Inhibitor dabei auf die DC oder die T-Zellen einwirkt. Um dies zu klären wurden DC vier Stunden mit LPS stimuliert, fixiert und dann in Gegenwart von Rolipram drei Tage mit T-Zellen kokultiviert. Die Resultate sind in Abbildung 11 E zu sehen und zeigen, dass Rolipram die T-Zell-Proliferation stark hemmt. Ein Einwirken von Rolipram auf DC ist in diesem Fall nicht nötig.

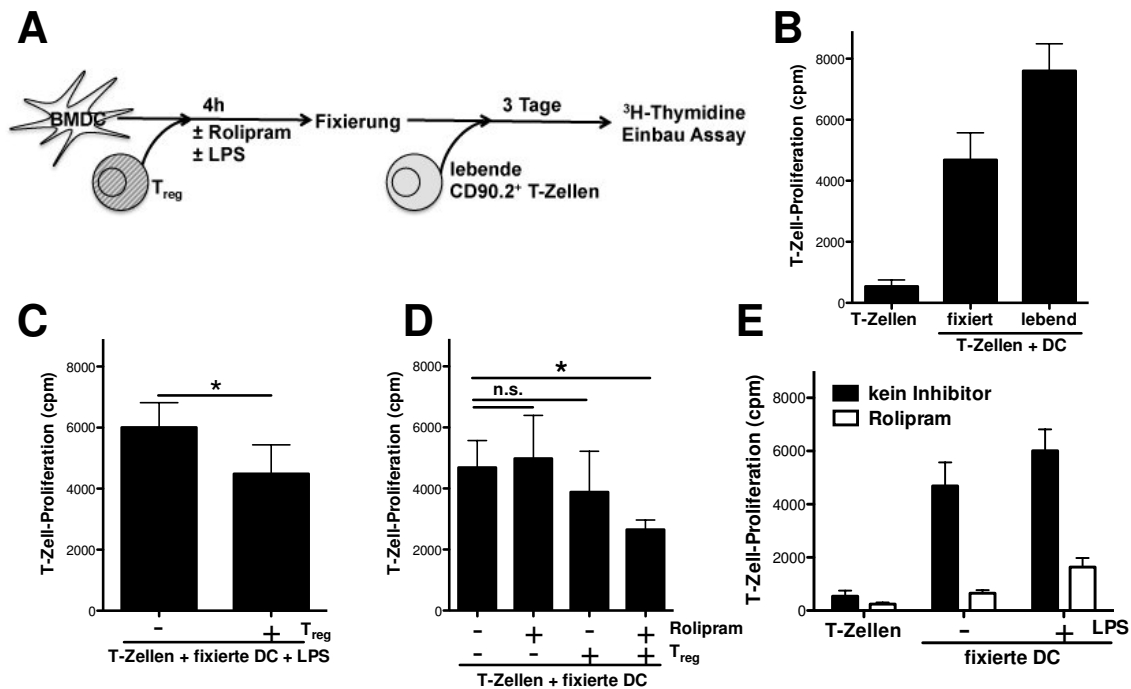


Abbildung 11: Rolipram moduliert die DC/Treg Interaktion und hemmt die T-Zell-Proliferation

(A) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. (B-D) BALB/c BMDC wurden mit C57BL/6 Treg für 4 h in einem 1:1 Verhältnis in Gegenwart von löslichem anti-CD3 (3 µg/ml) kokultiviert. Wo angezeigt wurde LPS (100 ng/ml) und/oder Rolipram (300 nM) zugesetzt. Nach der Kokultur wurden die Zellen mit Glutaraldehyd fixiert und drei Tage mit einem zehnfachen Überschuss an C57BL/6 T-Zellen kokultiviert. (E) LPS wurde erst nach dem Fixieren zur dreitägigen Kokultur mit T-Zellen zugesetzt. Die T-Zell-Proliferation wurde durch ³H-Thymidin-Einbau bestimmt. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente, bei denen jeweils eine Sechsfachbestimmung durchgeführt wurde. (*) Statistisch signifikante Unterschiede nach Mann-Whitney-*U*-Test; n.s. – nicht signifikante Unterschiede.

3.1.9 Rolipram verbessert die suppressiven Fähigkeiten von Treg *in vivo*

Um zu überprüfen, ob die gezeigten Ergebnisse auch *in vivo* im Kontext einer GvH-Erkrankung relevant sind, wurden entsprechende allogene Knochenmarkstransplantationen durchgeführt. Die Resultate sind in Abbildung 12 gezeigt. Eine Kontrollgruppe von BALB/c Mäusen erhielt nach letaler Bestrahlung nur allogenes Knochenmark und T-Zellen, die zuvor von Treg befreit wurden. In dieser Gruppe beträgt das mediane Überleben 16 Tage, im Laufe von 60 Tagen sterben 90% der Tiere. Wie bereits in Abbildung 4 gezeigt, führt die zusätzliche Transplantation von Treg zu einem verbesserten Überleben (hier 55%). Die tägliche Verabreichung von Rolipram während der ersten 20 Versuchstage führt zu einer leicht und nicht signifikant verbesserten Überlebensrate von 36% (Medianes Überleben 35 Tage).

Ergebnisse

Eine kombinierte Behandlung mit Treg und Rolipram führt zu einem deutlich verbesserten Überleben, es sterben lediglich 11% der Tiere, sodass von einem kooperativ-protektiven Effekt von Treg und Rolipram gesprochen werden kann. Diese Ergebnisse konnten mit histologischen Schnitten der Haut am zehnten Tag nach der Transplantation ebenfalls untermauert werden (Abbildung 12 B). Die Haut ist ein klassisches Zielorgan bei einer GvH-Erkrankung und es lässt sich bei den Tieren, die Treg und Rolipram erhalten haben eine Tendenz zu weniger apoptotischen Keratinozyten und fokalen Spongiosen in der Epidermis erkennen.

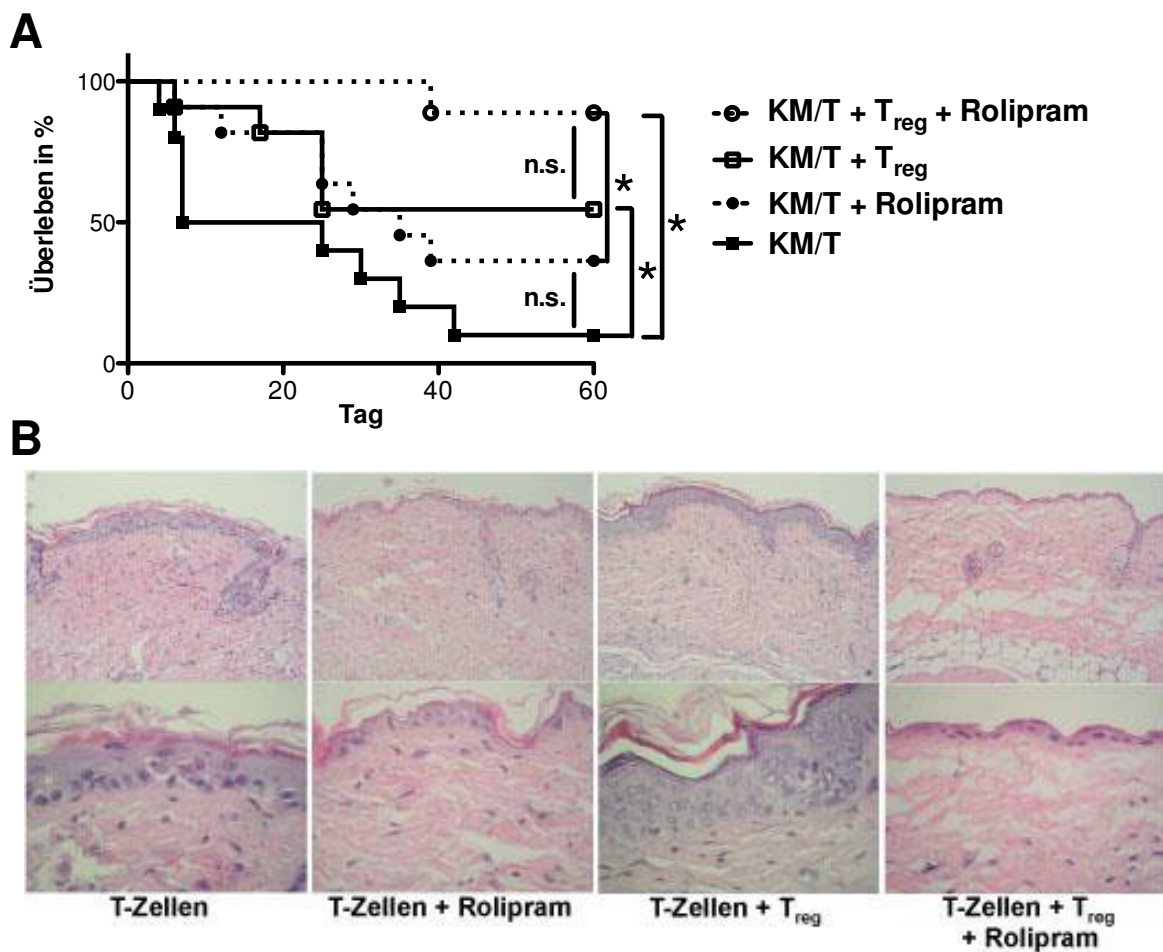


Abbildung 12: Rolipram und Treg verbessern kooperativ das Überleben einer GvR-Erkrankung

(A) BALB/c Mäuse wurden letal bestrahlt (8,5 Gy) und am folgenden Tag mit T-Zell-depletiertem Knochenmark (5×10^6 Zellen) und CD90.2⁺CD25⁻ T-Zellen ($0,5 \times 10^6$ Zellen) aus C57BL/6 Mäusen transplantiert (gefüllte Quadrate, n=10). Den weiteren Versuchsgruppen wurden zusätzlich 5×10^6 C57BL/6 Treg verabreicht (offene Quadrate, n=11) oder täglich von Tag 0 bis 20 Rolipram (0,3 mg/kg) *i.p.* gespritzt (gefüllte Kreise, n=11). Eine vierte Gruppe erhielt Treg und Rolipram (offene Kreise, n=9). Gezeigt sind die kombinierten Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten. (*) zeigt signifikante Unterschiede nach Mantel-Cox-Test; n.s. – nicht signifikante Unterschiede. (B) Die Mäuse der verschiedenen Gruppen wurden wie zuvor beschrieben behandelt. An Tag 10 nach der Transplantation wurden die Tiere abgetötet, Proben der Rückenhaut entnommen, Gewebsschnitte angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Die oberen Bilder zeigen einen Überblick (Originalvergrößerung 200x), die unteren Bilder eine Detailansicht (Originalvergrößerung 630x). Gezeigt sind repräsentative Beispiele.

3.2 Die Rolle von IL-10 bei der Suppression von GvH-Erkrankungen

IL-10 ist als immunsuppressorisches und anti-inflammatorisches Zytokin weithin bekannt und es konnte bereits für verschiedenen Krankheiten eine wichtige Rolle beschrieben werden. Für eine GvH-Erkrankung deren grundlegender Mechanismus auf einer T-Zell-Antwort gegen das Empfängergewebe beruht, ist IL-10 als kritischer Faktor von hohem Interesse.

3.2.1 IL-10 spielt eine essentielle Rolle während einer GvH-Erkrankung

In einer ersten Versuchsreihe sollte die generelle Rolle von IL-10 in unserem Mausmodell evaluiert werden. Dazu erhielten IL-10^{-/-} Mäuse auf BALB/c Hintergrund (BALB.IL-10^{-/-}) allogene IL-10^{-/-} T-Zellen und Knochenmark von Mäusen auf C57BL/6 Hintergrund (B6.IL-10^{-/-}). Als Kontrollgruppe dienten wildtypische BALB/c Mäuse, die C57BL/6 Wildtyp Zellen erhielten. In Abbildung 13 A ist zu sehen, dass die Abwesenheit von IL-10 zu einem erheblich drastischeren Verlauf der GvH-Erkrankung führt. Das mediane Überleben verringert sich von 30 auf 9 Tage und es sterben alle Versuchstiere, während in der Kontrollgruppe 28% überleben. Wie bereits bei der Erstpublikation gezeigt, entwickeln IL-10^{-/-} Mäuse eine chronische Enterocolitis¹⁷³. Um den Einfluss eines autoimmunen Phänotyps ausschließen zu können wurde deshalb ein ergänzendes Experiment mit einem Antikörper, der den IL-10 Rezeptor blockiert durchgeführt. Als Empfänger wurden C57BL/6 Mäuse benutzt, die T-Zellen und Knochenmark von BALB/c Spendern erhalten haben. Einem Teil der Tiere wurde zusätzlich der blockierende Antikörper an den Tagen -1 und 3 gespritzt. Wie in Abbildung 13 B gezeigt, sterben die mit dem Antikörper behandelten Tiere schneller als die Kontrollen. Das mediane Überleben ist von 21 auf 6 Tage reduziert. Um toxische Effekte durch den Antikörper auszuschließen wurde eine zusätzliche Gruppe syngene transplantiert und der Antikörper verabreicht. Alle diese Tiere haben überlebt. Die Aussage der Versuche mit den IL-10^{-/-} Tieren konnte folglich qualitativ bestätigt werden. Des Weiteren wurden histologische Schnitte des Dünndarms von Tieren, die den Antikörper erhalten haben und Kontrollen angefertigt (Abbildung 13 C). Die Übersicht zeigt insgesamt stärkere Gewebsschädigungen bei der mit Antikörper behandelten Gruppe. In der Detailansicht sind außerdem mehr apoptotische Zellen zu sehen.

Ergebnisse

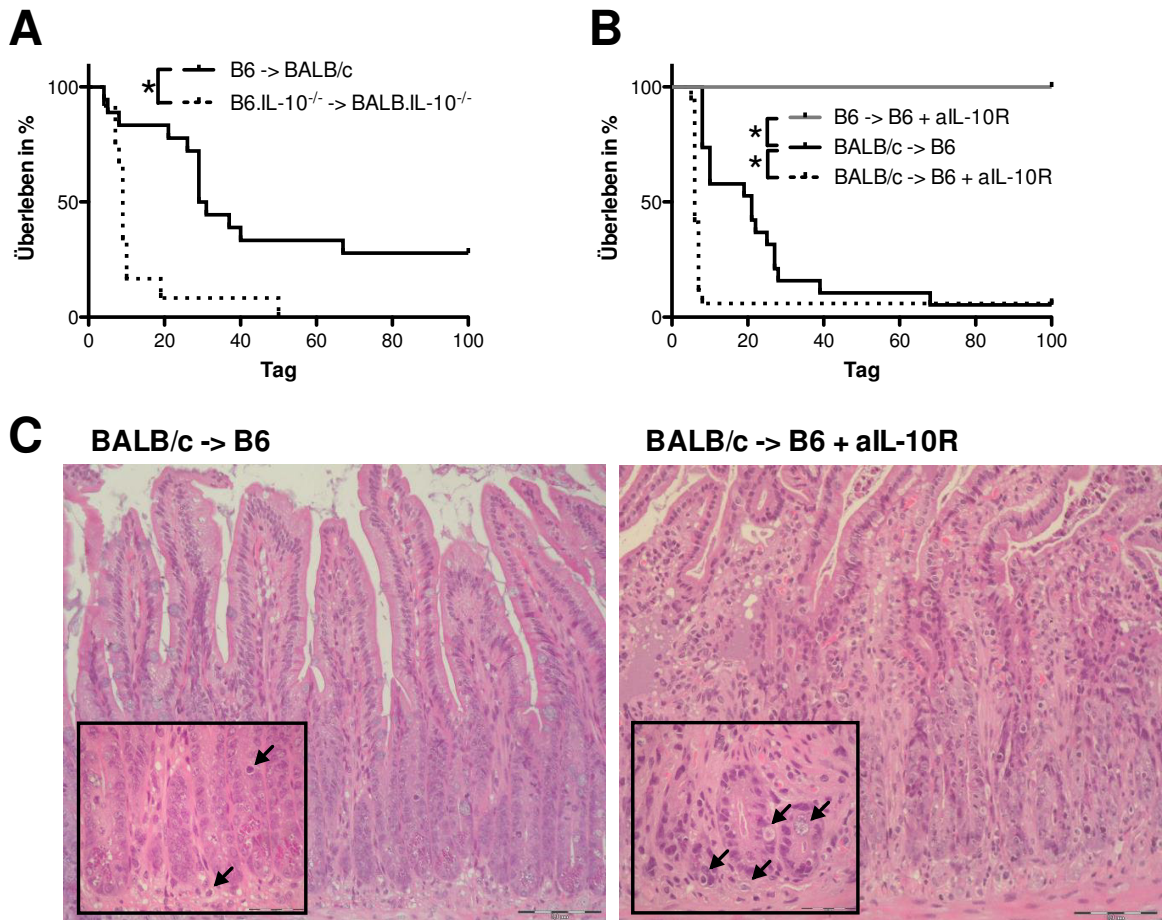


Abbildung 13: IL-10 beeinflusst den Verlauf einer GvH-Erkrankung entscheidend

(A) BALB/c WT (n=18) und IL-10^{-/-} Mäuse (n=12) wurden letal bestrahlt (8,5 Gy) und am folgenden Tag mit 5×10^6 T-Zell-depletierten Knochenmarkszellen und $0,5 \times 10^6$ T-Zellen aus C57BL/6 (B6) WT bzw. IL-10^{-/-} Mäusen transplantiert. Der Verlauf der Erkrankung wurde 100 Tage verfolgt. (B) C57BL/6 Mäuse wurden letal bestrahlt (11 Gy), NK-Zellen wurden durch einen Antikörper depletiert und es wurden 10×10^6 Zellen T-Zell-depletiertes Knochenmark und 5×10^6 T-Zellen aus BALB/c Mäusen (n=19) transplantiert. Ein Teil der Mäuse erhielt an den Tagen -1 und 3 je $250 \mu\text{g}$ eines Antikörpers *i.p.* verabreicht, der den IL-10 Rezeptor blockiert (n=17). Zur syngenon Kontrolle erhielten C57BL/6 Tiere Zellen von C57BL/6 Mäusen und den blockierenden Antikörper (n=4). Gezeigt sind die kombinierten Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten. (*) zeigt signifikante Unterschiede nach Mantel-Cox-Test. (C) Die Mäuse wurden wie zuvor beschrieben behandelt und an Tag 6 abgetötet. Es wurden Proben des Dünndarms entnommen, Gewebsschnitte angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Die gezeigten Schnitte sind repräsentative Beispiele.

3.2.2 IL-10 von Donor und Empfänger beeinflusst den Verlauf einer GvH-Erkrankung

Um weiter zu untersuchen, welche Zellen die Quelle des IL-10 sind, wurde zunächst nach der Relevanz von Donor- und Empfängerzellen unterschieden. Um die Wirkung von IL-10 aus dem Transplantat zu klären, wurden die T-Zellen und das Knochenmark aus IL-10^{-/-} Mäusen auf C57BL/6 Hintergrund gewonnen und in wildtypische BALB/c Mäuse transplantiert. Wie in Abbildung 14 gezeigt, ist das Überleben der Empfänger von IL-10^{-/-} Zellen (graue Linie) deutlich reduziert im Vergleich zur Kontrolle, bei der beide Fraktionen in der Lage sind IL-10 zu produzieren (schwarze Linie). Das mediane Überleben beträgt nur 8 Tage im Vergleich zu 32 Tagen. Außerdem starben alle Versuchstiere im Vergleich zu 18% Überlebenden bei der Kontrolle.

Die Rolle von IL-10, das vom Empfänger produziert wird, wurde adressiert, indem IL-10^{-/-} Rezipienten auf BALB/c Hintergrund mit Zellen von wildtypischen C57BL/6 Mäusen transplantiert wurden (Abbildung 14, gepunktete Linie). Auch in diesem Fall ist ein reduziertes medianes Überleben feststellbar (10 Tage) und es gibt wieder keine überlebenden Versuchstiere. Es kann folglich gesagt werden, dass sowohl Zellen des Transplantats, wie auch Zellen des Empfängers durch ihre IL-10 Produktion einen wichtigen Beitrag zur Abschwächung der GvH-Erkrankung leisten.

Ergebnisse

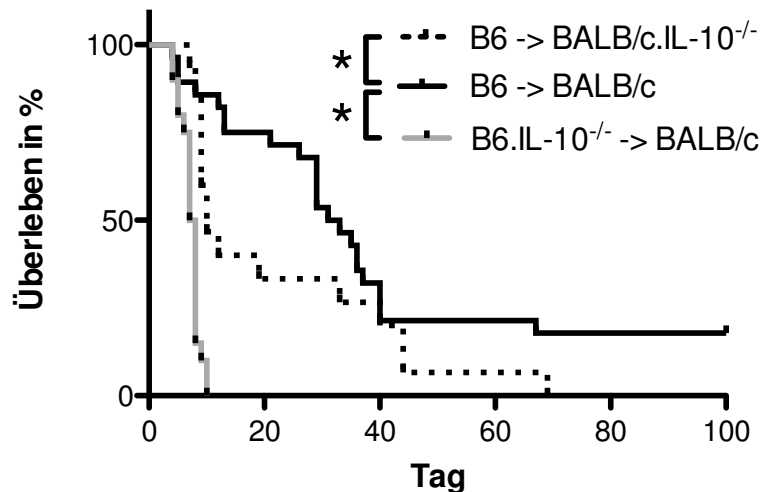


Abbildung 14: IL-10 von Donor- und Empfängerzellen verbessert das Überleben einer GvH-Erkrankung.

WT oder IL-10^{-/-} Empfänger auf BALB/c Hintergrund wurden letal bestrahlt (8,5 Gy) und am folgenden Tag mit $0,5 \times 10^6$ CD90.2⁺ T-Zellen und T-Zell-depletiertem Knochenmark von WT oder IL-10^{-/-} Spendern auf C57BL/6 Hintergrund transplantiert. Es erhielten BALB/c.IL-10^{-/-} Tiere C57BL/6 Zellen (unterbrochene Linie, n=15), BALB/c Tiere Zellen aus B6.IL-10^{-/-} Mäusen (graue Linie, n=20) oder BALB/c Tiere Zellen aus C57BL/6 WT Mäusen (schwarze Linie, n=28). Der Verlauf der Erkrankung wurde 100 Tage überwacht. Gezeigt sind die kombinierten Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten. (*) zeigt signifikante Unterschiede nach Mantel-Cox-Test.

3.2.3 B-Zellen von Donor und Empfänger produzieren IL-10

Für die genauere Identifizierung der relevanten IL-10 Produzenten nach allogener HSCT wurde eine sog. Reporter-Maus benutzt. Diese hat einen knock-in des grün fluoreszierenden Proteins eGFP in den *IL-10* Locus, sodass die IL-10 produzierenden Zellen durchflusszytometrisch detektiert werden können. Diese Tiere haben einen genetischen C57BL/6 Hintergrund und werden in allen weiteren Ausführungen als IL-10.eGFP Mäuse bezeichnet.

Um die IL-10 produzierenden Empfängerzellen zu identifizieren, wurden die Mäuse lediglich letal bestrahlt ohne eine Transplantation anzuschließen, da davon auszugehen ist, dass bereits die Konditionierung die IL-10 Produktion induziert¹⁸⁶. Als Vergleichsgruppe wurden Wildtypen in der gleichen Weise behandelt, um strahlungsinduzierte Zelluntergänge und Veränderungen, die zu einer erhöhten Autofluoreszenz führen können, als falsch-positive Signale zu erkennen. Es wurde nach B-Zellen (positiv für CD19 und MHCII), T-Zellen (positiv für CD90.2), DC (positiv für CD11c und MHCII) und CD45 negativen, nicht-hämatopoetischen Zellen

unterschieden. Wie in Abbildung 15 gezeigt wurde das eGFP Signal aus den Wildtypen (graue Fläche) gegen das der transgenen Tiere (schwarze Linie) aufgetragen. Der deutlichste Unterschied ist bei den B-Zellen der Milz zu erkennen. Bei den B-Zellen aus den mesenterialen Lymphknoten (mLK) ist der Unterschied geringer. Bei den anderen untersuchten Zellen und Organen sind keine klaren Veränderungen detektierbar.

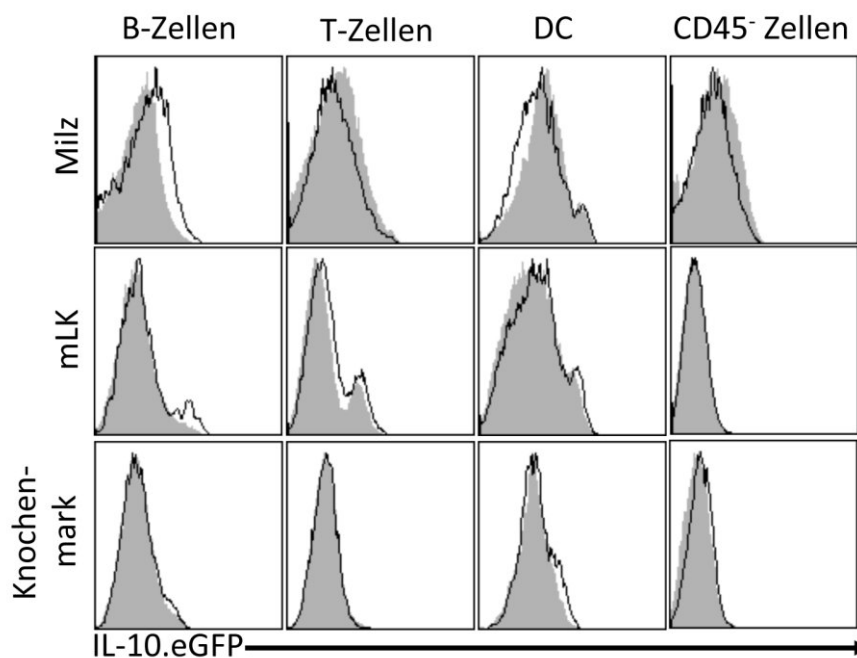


Abbildung 15: Rezipienten B-Zellen produzieren IL-10 nach letaler Bestrahlung

IL-10.eGFP (schwarze Linie) und C57BL/6 Mäuse (graue Fläche) wurden mit 9,5 Gy letal bestrahlt und 16 h später abgetötet. Milzen und mesenteriale Lymphknoten (mLK) wurden entnommen und durch Verdauung und Zellsieb in eine Einzelzellsuspension überführt. Knochenmark wurde aus dem Oberschenkelknochen (Femur) gewonnen. Die eGFP-Expression wurde durchflusszytometrisch bestimmt. B-Zellen wurden definiert als CD19⁺MHCII⁺, T-Zellen als CD90.2⁺, DC als CD11c⁺MHCII⁺ und die nicht-hämatopoietischen Zellen als CD45⁻. Gezeigt sind repräsentative Beispiele aus zwei unabhängigen Versuchen mit jeweils 3 Mäusen pro Gruppe.

Die Rolle der Donor-Zellen wurde untersucht indem BALB/c Mäuse mit Knochenmark und T-Zellen aus IL-10.eGFP oder C57BL/6 Mäusen transplantiert wurden. Die eGFP-Expression wurde zwei Tage nach der Transplantation durchflusszytometrisch bestimmt. Aus Abbildung 16 ist klar zu entnehmen, dass erneut nur bei den B-Zellen aus Milz und mesenterialen Lymphknoten eine Zunahme der eGFP-Expression messbar ist. In den untersuchten Organen und Zellpopulationen und zu den genannten Zeitpunkten sind B-Zellen vom Spender wie auch vom Empfänger die wichtigsten IL-10 Produzenten.

Ergebnisse

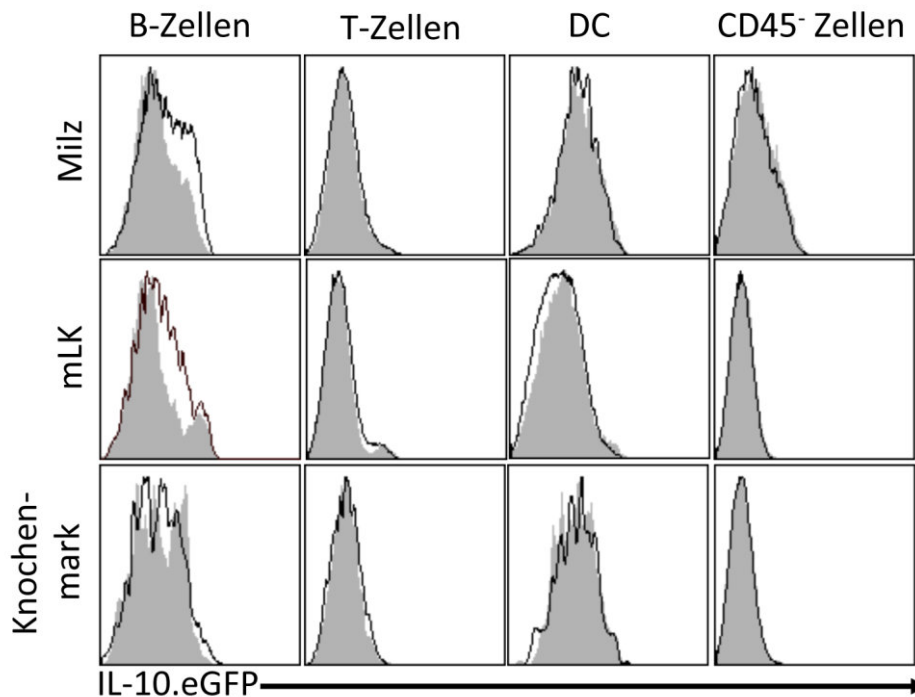


Abbildung 16: Donor B-Zellen produzieren IL-10 nach allogener HSCT

BALB/c Mäuse wurden letal bestrahlt (8,5 Gy) und am folgenden Tag mit 5×10^6 CD90.2⁺ T-Zellen und 10×10^6 T-Zell-depletierten Knochenmarkszellen aus C57BL/6 (graue Fläche) oder IL-10.eGFP Mäusen (schwarze Linie) transplantiert. An Tag zwei nach der Transplantation wurden die Tiere abgetötet und die Milz und die mesenterialen Lymphknoten entnommen. Durch Verdau und ein Zellsieb wurden diese in Einzelzellsuspensionen überführt. Knochenmark wurde aus dem Oberschenkelknochen (Femur) gewonnen. Die eGFP-Expression wurde durchflusszytometrisch bestimmt. B-Zellen wurden definiert als CD19⁺MHCII⁺, T-Zellen als CD90.2⁺, DC als CD11c⁺MHCII⁺ und die nicht-hämatopoietischen Zellen als CD45⁻. Gezeigt sind repräsentative Beispiele aus zwei unabhängigen Versuchen mit jeweils 4 Mäusen pro Gruppe.

3.2.4 IL-10 produzierende B-Zellen zeigen einen typischen Phänotyp

Die gewonnenen Erkenntnisse der letzten Jahre hinsichtlich IL-10 produzierender B-Zellen, warf die Frage auf, ob es sich dabei um eine definierbare Subpopulation handelt. Oberflächenmarker sind eine beliebte Möglichkeit verschiedene Zellpopulationen gegeneinander abzugrenzen, da sie relativ leicht analysierbar sind. Dies ist jedoch nicht in allen Fällen möglich. Für IL-10 produzierende B-Zellen ist bisher kein eindeutiger Phänotyp von Oberflächenmarkern beschrieben. Es gibt jedoch verschiedene Moleküle, deren Expression mit der Produktion von IL-10 in Verbindung gebracht wird. Die IL-10 Produzenten unter den B-Zellen wurden überwiegend als positiv für CD5 beschrieben. Außerdem exprimieren sie CD1d auf

relativ hohem Niveau¹⁸⁷. Eine andere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass TIM-1 ein weiterer potenzieller Oberflächenmarker ist¹⁸⁸.

Es wurde überprüft, ob diese Charakterisierung auch auf die IL-10 Produzenten im Kontext der allogenen HSCT zutrifft. Dazu wurde wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben verfahren um die IL-10 produzierenden B-Zellen zu identifizieren. Diese wurden dann durchflusszytometrisch auf die Expression der drei zuvor genannten Marker überprüft. In Abbildung 17 ist gezeigt, dass die (roten) IL-10 Produzenten unter den B-Zellen (grün) überwiegend positiv für CD1d und TIM-1 sind. Die Expression von CD5 liegt auf einem intermediären Niveau. Dies gilt für die Rezipienten ebenso wie für die Donor B-Zellen.

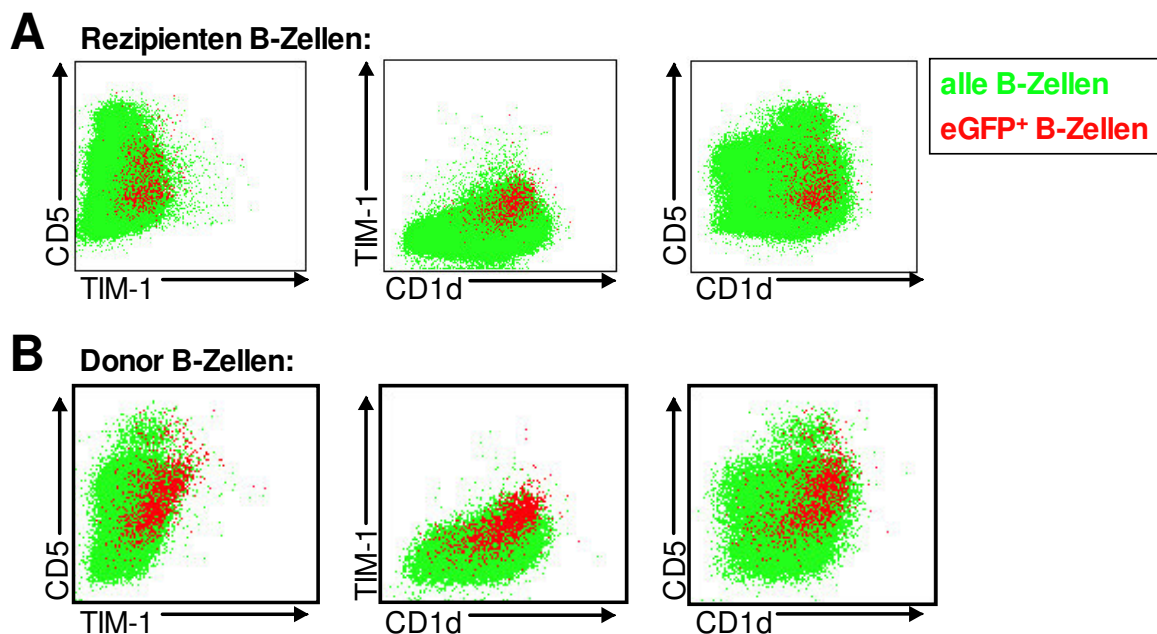


Abbildung 17: IL-10 produzierende B-Zellen zeigen einen typischen Phänotyp

(A) IL-10.eGFP Mäuse wurden letal bestrahlt (9,5 Gy) und 16 h später abgetötet. Die Milzen wurden entnommen, verdaut und durchflusszytometrisch untersucht. B-Zellen wurden definiert als CD19⁺MHCII⁺ Zellen. Die eGFP⁺ Zellen wurden anhand einer gleichbehandelten WT Kontrolle identifiziert. **(B)** BALB/c Mäuse wurden letal bestrahlt (8,5 Gy) und am folgenden Tag mit 5×10^6 CD90.2⁺ T-Zellen und 10×10^6 T-Zell-depletierten Knochenmarkszellen aus IL-10.eGFP Mäusen rekonstituiert. An Tag zwei nach der Transplantation wurden die Tiere abgetötet und die Milz entnommen. Das weitere Vorgehen entspricht dem zuvor beschriebenen. Gezeigt sind repräsentative Beispiele aus jeweils zwei unabhängigen Versuchen mit je 3 bis 4 Versuchstieren.

3.2.5 Blockade des IL-10 Rezeptors führt zu einem veränderten DC-Phänotyp

Der Aktivierungsstatus der DC ist entscheidend für das Priming der allo-genen T-Zellen, die letztlich die GvH-Erkrankung auslösen. Durch Blockade des IL-10 Rezeptors kann dieses suppressive Zytokin nicht mehr auf die Zelle einwirken. Die Auswirkungen davon wurden im Kontext der allo-genen HSCT untersucht, indem den Versuchstieren nach der Transplantation die Milz bzw. die mesenterialen Lymphknoten als periphäre lymphoide Organe entnommen wurden und der Phänotyp der DC bestimmt wurde. Wie in Abbildung 18 gezeigt, ist die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 zwar erhöht im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, es macht jedoch keinen Unterschied, ob der IL-10 Rezeptor blockiert wird oder nicht. Das auf T-Zellen inhibitorisch wirkende Oberflächenmolekül B7-H4 zeigt einen deutlichen Unterschied. Durch die Transplantation wird die Expression extrem verstärkt, die Blockade des IL-10 Rezeptors verhindert dies jedoch völlig. Um die Zytokinproduktion zu untersuchen wurden DC aus der Milz isoliert und cDNA daraus gewonnen. Für IL-12p35 ist eine leichte Induktion im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu erkennen, diese wird jedoch nicht durch Blockade des IL-10 Rezeptors beeinflusst. Im Fall von IL-10 ist ein minimaler Rückgang in der Induktion zu sehen, dieser wird aber auch nicht durch die Rezeptor-Blockade beeinflusst.

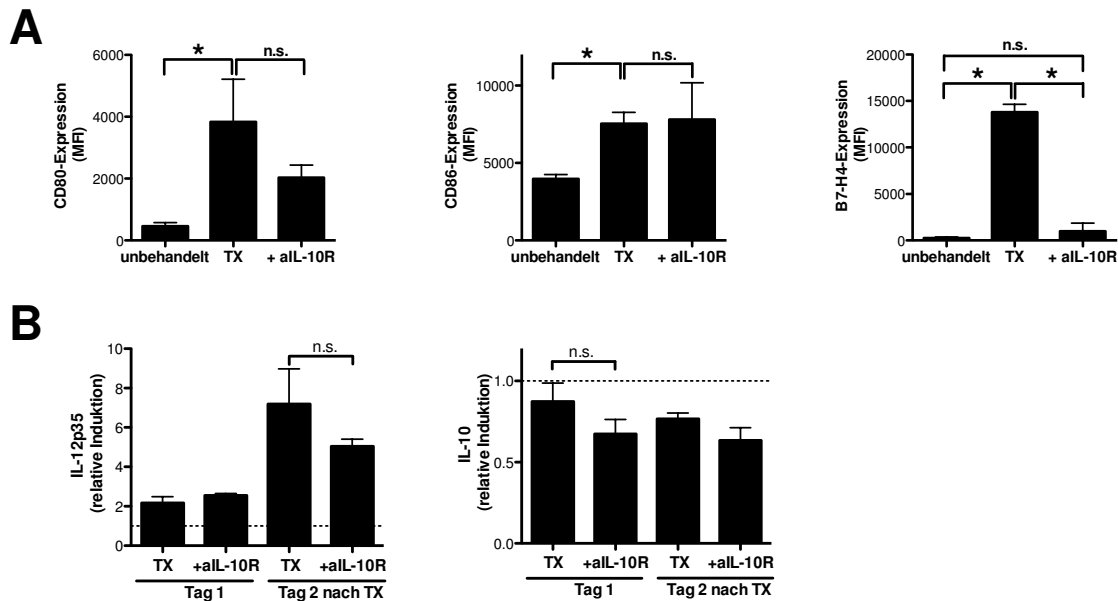


Abbildung 18: Der Phänotyp von DC wird durch Blockade des IL-10 Rezeptors beeinflusst

C57BL/6 Mäuse wurden letal bestrahlt (11 Gy), NK-Zellen wurden durch einen Antikörper depletiert und es wurden 10×10^6 Zellen T-Zell-depletiertes Knochenmark und 5×10^6 T-Zellen aus BALB/c Mäusen transplantiert (TX). Wo angegeben, wurde am Tag vor der Transplantation ein Antikörper, der den IL-10 Rezeptor blockiert verabreicht ($250 \mu\text{g}/\text{Maus}$ *i.p.*). **(A)** Zwei Tage nach der Transplantation wurden den Tieren die mesenterialen Lymphknoten entnommen. Diese wurden verdaut und in eine Einzelzellsuspension überführt. Die Expression der Oberflächenmarker CD80, CD86 und B7-H4 auf DC ($\text{MHCII}^+ \text{CD11c}^+$) wurde durchflusszytometrisch bestimmt. **(B)** An Tag eins und zwei nach der Transplantation wurden DC aus den Milzen isoliert. Aus den DC wurde RNA gewonnen und in cDNA umgeschrieben. Die Expression von IL-12p35 und IL-10 wurde anhand spezifischer Primersequenzen über Real-Time-PCR bestimmt und auf eine unbehandelte Kontrolle normiert. Als Haushaltsgen wurde *B2M* verwendet. (*) Statistisch signifikante Unterschiede nach Mann-Whitney-*U*-Test; n.s. – nicht signifikante Unterschiede. Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente mit je 3-5 Tieren pro Gruppe.

3.2.6 Blockade des IL-10 Rezeptors bei allogener HSCT führt zu verbessertem T-Zell-Priming

Nachdem Unterschiede im Phänotyp der DC nachweisbar sind, stellt sich die Frage, ob diese Unterschiede auch eine funktionelle Relevanz besitzen. Die primäre Aufgabe von DC ist das Priming von T-Zellen und so wurde untersucht, ob die Blockade des IL-10 Rezeptors *in vivo* zu DC führt, die Unterschiede im T-Zell-Priming *in vitro* zeigen. Dazu wurden Mäuse mit blockiertem oder funktionsfähigem IL-10 Rezeptor einer der Konditionierung vor der Transplantation ähnlichen Strahlendosis ausgesetzt. Am folgenden Tag wurden die mesenterialen Lymphknoten isoliert und als Stimulatoren für allogene T-Zellen in einer MLR benutzt. Wie Abbildung 19 zeigt sind die Lymphknoten-Zellen der mit dem blockierenden

Ergebnisse

Antikörper behandelten Mäuse potentere Stimulatoren in der MLR und die detektierte T-Zell-Proliferation ist dementsprechend höher. Die gefundenen Veränderungen im Phänotyp der DC sind folglich auch funktionell relevant.

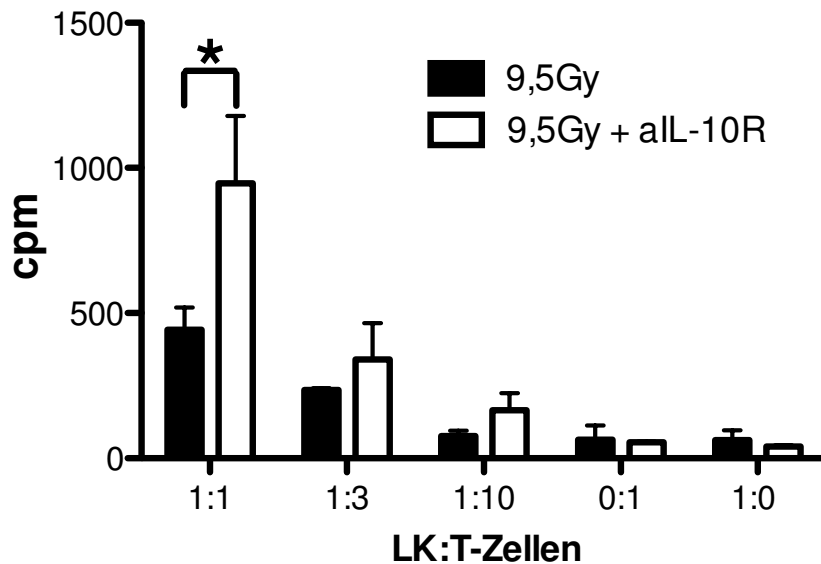


Abbildung 19: Lymphknotenzellen aus Mäusen mit blockiertem IL-10 Rezeptor primen allogene T-Zellen besser

C57BL/6 Mäuse wurden letal bestrahlt (9,5 Gy; schwarze Säulen). Einer Gruppe wurde darüberhinaus ein Antikörper, der den IL-10 Rezeptor blockiert verabreicht (250 µg/Maus *i.p.*; offene Säulen). Am folgenden Tag wurden den Tieren die mesenterialen Lymphknoten entnommen. Diese wurden durch Verdau in eine Einzelzellsuspension überführt, mit Mitomycin C behandelt um weitere Proliferation zu unterbinden und für drei Tage mit CD90.2⁺ T-Zellen aus BALB/c Mäusen kokultiviert. Die T-Zell Proliferation wurde durch ³H-Thymidin-Einbau bestimmt. (*) zeigt statistisch signifikante Unterschiede nach Students t-Test.

3.2.7 IL-10 aus Donor und Empfänger B-Zellen verbessert eine akute GvH-Erkrankung

Um zu überprüfen, ob IL-10 aus B-Zellen auch in der Situation der allogenen HSCT *in vivo* eine Rolle spielt, wurden Transplantationen mit Mäusen durchgeführt, die eine spezifische Inaktivierung des IL-10 Gens in B-Zellen aufweisen¹⁷⁷. Diese Mäuse (B-IL-10^{-/-}) wurden sowohl als Empfänger, als auch als Donoren benutzt um die Rolle von IL-10 aus B-Zellen beider Seiten zu evaluieren. Wie Abbildung 20 zu entnehmen ist, spielen Donor wie auch Empfänger B-Zellen eine Rolle als IL-10 Produzenten nach allogener HSCT. Im Fall der Transplantation mit B-IL-10^{-/-} Tieren als Empfängern ist zu sehen, dass alle Mäuse sterben, wohingegen in der

Kontrollgruppe 10% überleben. Dies äußert sich auch im medianen Überleben, das von 53 auf 24 Tage reduziert ist.

Wenn Zellen aus B-IL-10^{-/-} Mäusen als Transplantat in BALB/c Empfänger gebracht werden sind die Auswirkungen ähnlich. Im Vergleich zur Kontrollgruppe, bei der immerhin 15% der Versuchstiere überleben, sterben bei den Empfängern der B-IL-10^{-/-} Zellen alle Mäuse. Auch hier ist das mediane Überleben deutlich reduziert, nämlich von 33 auf 18 Tage. Daraus lässt sich ableiten, dass B-Zellen vom Donor, wie auch vom Rezipient als IL-10 Produzenten eine wichtige Rolle bei der Abschwächung einer akuten GvH-Erkrankung spielen.

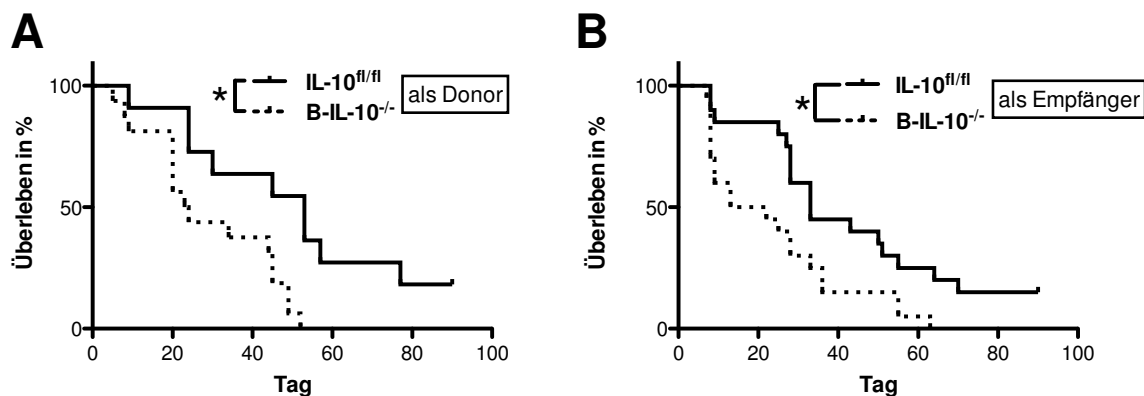


Abbildung 20: Donor und Empfänger B-Zellen verbessern eine GvH-Erkrankung durch IL-10 Produktion

(A) CD19Cre x IL-10^{fl/fl} (B-IL-10^{-/-}, n=16, unterbrochene Linie) Mäuse und Kontrolltiere, die nur das IL-10^{fl/fl}-Transgen tragen (n=11, schwarze Linie) wurden letal bestrahlt (11 Gy), NK-Zellen wurden durch einen Antikörper depletiert und es wurden 10x10⁶ Zellen T-Zell-depletiertes Knochenmark und 5x10⁶ T-Zellen aus BALB/c Mäusen transplantiert. **(B)** BALB/c Mäuse wurden letal bestrahlt (8,5 Gy) und am folgenden Tag mit 0,5x10⁶ CD90.2⁺ T-Zellen und 5x10⁶ Zellen T-Zell-depletiertem Knochenmark von IL-10^{fl/fl} (n=20, schwarze Linie) oder B-IL-10^{-/-} Spendern (n=20, unterbrochene Linie) auf genetischem C57BL/6 Hintergrund transplantiert. Der Krankheitsverlauf wurde 90 Tage lang verfolgt. Die gezeigten Daten sind aus jeweils zwei unabhängigen Experimenten kombiniert. (*) zeigt signifikante Unterschiede nach Mantel-Cox-Test.

Ergebnisse

3.3 Untersuchung der Rolle von DC bei einer akuten GvH-Erkrankung

Im grundlegenden Mechanismus der GvH-Erkrankung werden DC primär als Induktoren der allogenen T-Zell-Antwort wahrgenommen. Im folgenden Abschnitt wird gezeigt, dass die DC des Empfängers allerdings weitreichendere Funktionen haben und auch zur Kontrolle der Erkrankung beitragen.

3.3.1 Verlust der Empfänger DC führt zu verringertem Überleben einer akuten GvH-Erkrankung

Die grundsätzliche Rolle der Rezipienten DC wurde in Transplantationsexperimenten mit DC defizienten Mäusen untersucht. Dafür wurden zwei unterschiedliche transgene Mausstämmen als Empfänger in einer allogenen Transplantation benutzt. Zum Einen die CD11c-DTA Maus, die über ihre gesamte Lebensspanne keine DC entwickelt und zum Anderen die CD11c-iDTR Maus, bei der die DC durch Injektion von Diphtherie Toxin (DT) depletiert werden können. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt. Obwohl es über den Beobachtungszeitraum in keiner Versuchsgruppe Überlebende gibt, sind sowohl beim Verlauf der Kurven, wie auch medianen Überleben deutliche Unterschiede zu sehen. Die DC defizienten CD11c-DTA Mäuse sterben alle bis zum 21. Versuchstag, das mediane Überleben ist mit 11 Tagen im Vergleich zum C57BL/6 Wildtyp mit 39 Tagen stark reduziert. Ein ähnliches Bild zeigt sich bei der Verwendung von CD11c-iDTR Mäusen als Empfänger. Hier wurde der Verlauf zwischen Tieren, die DT erhalten haben und folglich keine DC mehr haben sollten und Mäusen desselben Stamms ohne DT-Gabe verglichen. Durch die Depletion der DC wird das mediane Überleben von 23 auf 8 Tage reduziert.

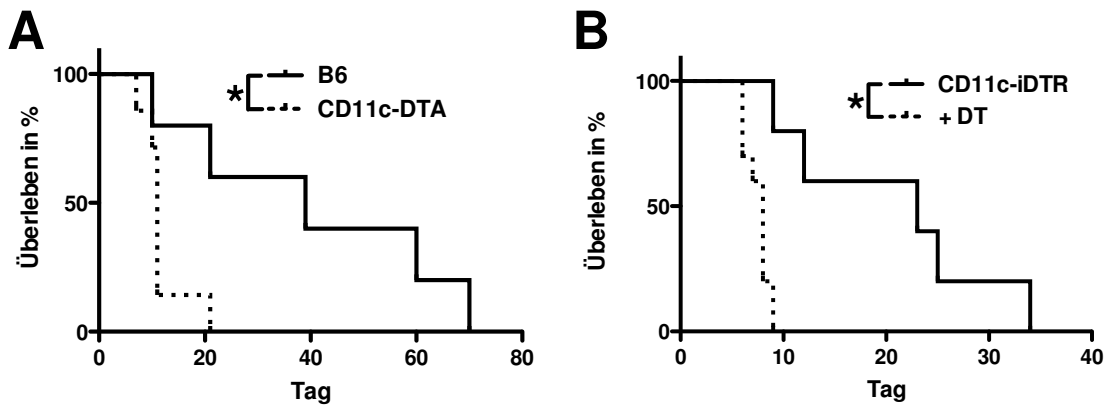


Abbildung 21: Abwesenheit von DC im Rezipienten führt zu verringertem Überleben

Mäuse auf genetischem C57BL/6 Hintergrund wurden letal bestrahlt (11 Gy), NK-Zellen wurden durch einen Antikörper depletiert und es wurden 10×10^6 Zellen T-Zell-depletieretes Knochenmark und 5×10^6 T-Zellen aus BALB/c Mäusen transplantiert. **(A)** Bei den Empfängertieren handelte es sich um C57BL/6 Wildtypen (schwarze Linie, n=5) oder DC defiziente CD11c-DTA Mäuse (unterbrochene Linie, n=7). **(B)** Als Empfänger wurden CD11c-iDTR Mäuse verwendet. Eine Kontrollgruppe wurde nicht weiter behandelt (schwarze Linie, n=5), der zweiten Gruppe wurde an den Tagen -1, 0, 1 und 3 jeweils 1 µg Diphterie Toxin (DT) pro Tier *i.p.* verabreicht um DC zu depletieren (unterbrochene Linie, n=10). (*) zeigt signifikante Unterschiede nach Mantel-Cox-Test.

3.3.2 Verlust der Empfänger DC beeinflusst das Anwachsen des allogenen Knochenmarks nicht

Ein möglicher Grund für das sehr schnelle Ableben der DC defizienten Mäuse wäre ein unzureichendes Anwachsen des allogenen Knochenmarks. Das würde durch die letale Bestrahlung innerhalb weniger Tage zu einem Versterben durch den Verlust der Hämatopoese führen. Um das sog. Engraftment zu überprüfen wurde transplantierten und depletierten CD11c-iDTR Mäusen an Tag 6 nach der Transplantation Knochenmark entnommen und auf Zellen, die positiv für den Oberflächenmarker CD45 sind, untersucht. CD45 wird auf allen Zellen hämatopoetischen Ursprungs exprimiert und im Fall einer gestörten Hämatopoese sollten weniger CD45⁺ Zellen zu finden sein. Wie in Abbildung 22 zu sehen ist, ist dies nicht der Fall. Annähernd alle Zellen des Knochenmarks von C57BL/6, wie auch von depletierten CD11c-iDTR Mäusen sind positiv für CD45 und stammen vom Donor ab, sodass von einer erfolgreichen Rekonstitution des blutbildenden Systems ausgegangen werden kann.

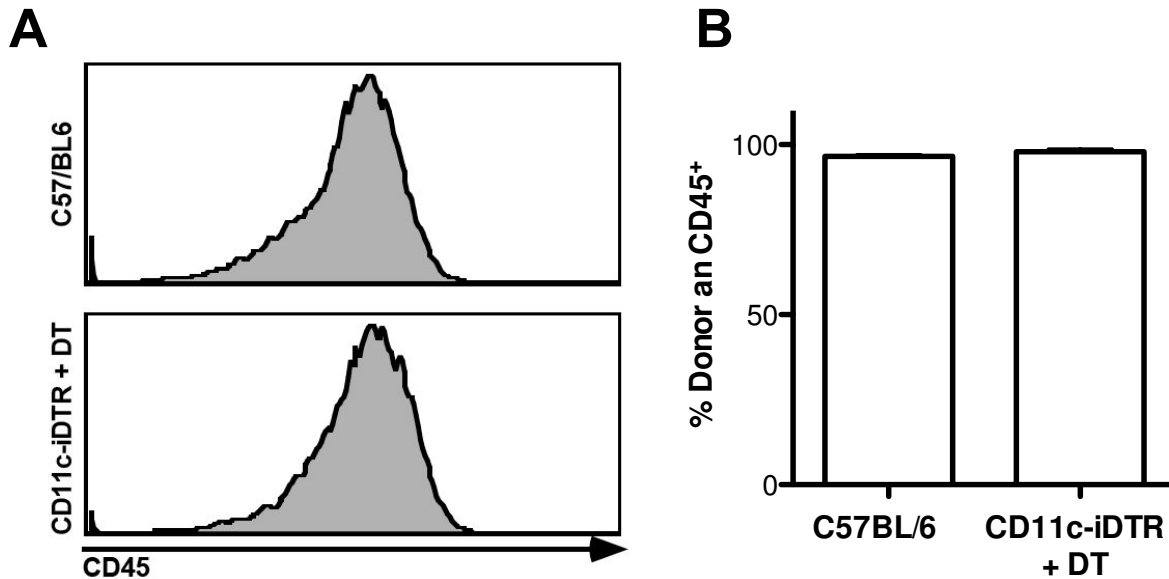


Abbildung 22: Depletion von DC behindert das Engraftment von allogener Knochenmark nicht

C57/BL6 und CD11c-iDTR Mäuse wurden letal bestrahlt (11 Gy), NK-Zellen wurden mit einem Antikörper depletiert und es wurden 10×10^6 Zellen T-Zell-depletiertes Knochenmark und 5×10^6 T-Zellen aus BALB/c Mäusen transplantiert. Den CD11c-iDTR Mäusen wurde an den Tagen -1, 0, 1 und 3 jeweils $1 \mu\text{g}$ Diphtherie Toxin (DT) pro Tier *i.p.* verabreicht. **(A)** An Tag 6 nach der Transplantation wurde Knochenmark gewonnen und durchflusszytometrisch auf die Expression von CD45 untersucht. **(B)** Über MHC I Allele (H2-K^d) wurde der Anteil an Donorzellen bestimmt. Gezeigt sind repräsentative Daten aus zwei unabhängigen Versuchen mit jeweils 3 Versuchstieren pro Gruppe.

3.3.3 Depletion der DC führt zu einer veränderten zellulären Zusammensetzung der Milz nach allogener HSCT

Das T-Zell-Priming nach einer allogenen HSCT findet in den sekundären Organen wie der Milz und den Lymphknoten statt. Deshalb könnte deren zelluläre Zusammensetzung bzw. Veränderungen in der Zusammensetzung durch die Depletion der Empfänger DC Aufschluss über einen möglichen Mechanismus geben. Dazu wurden C57BL/6 Wildtyp und CD11c-iDTR Mäuse, denen DT verabreicht wurde transplantiert und an Tag 6 nach der Transplantation wurden die Milzen durchflusszytometrisch untersucht. Wie in Abbildung 23 zu sehen ist, ist der Anteil an T-Zellen in den CD11c-iDTR Mäusen etwa halbiert, sodass von einem schlechteren Priming ausgegangen werden kann. Der Anteil der DC selbst ist fast unverändert, was auf ein Auffüllen der freien Nische durch Donor-Zellen schließen lässt. Interessanterweise ist in den CD11c-iDTR Mäusen auch ein erhöhter Anteil an Neutrophilen Granulozyten zu finden. Diese sind allgemein starke Vermittler

Ergebnisse

entzündlicher Prozesse und könnten somit am schlechteren Überleben der Mäuse beteiligt sein.

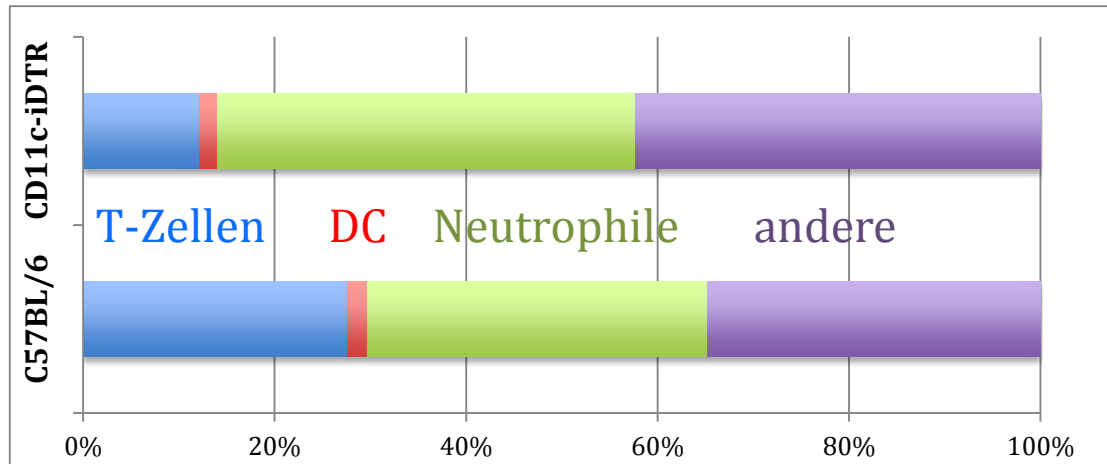


Abbildung 23: Veränderte zelluläre Zusammensetzung der Milz nach Depletion von DC

C57/BL6 und CD11c-iDTR Mäuse wurden letal bestrahlt (11 Gy), NK-Zellen wurden mit einem Antikörper depletiert und es wurden 10×10^6 Zellen T-Zell-depletiertes Knochenmark und 5×10^6 T-Zellen aus BALB/c Mäusen transplantiert. Den CD11c-iDTR Mäusen wurde an den Tagen -1, 0, 1 und 3 jeweils 1 μg Diphtherie Toxin (DT) pro Tier *i.p.* verabreicht. An Tag 6 nach der Transplantation wurden die Milzen der Tiere entnommen und durchflusszytometrisch ihre Zusammensetzung hinsichtlich T-Zellen (CD90⁺), DC (CD11c⁺ MHCII⁺) und Neutrophile (GR-1⁺ CD11b⁺) untersucht.

3.3.4 Depletion von Empfänger DC führt zu einem höheren Anteil an Donor-Zellen nach allogener HSCT

Nach einer allogenen Knochenmarkstransplantation werden die hämatopoetischen Zellen des Empfängers sukzessive durch Zellen aus dem Donor-Knochenmark ersetzt. Mit Hilfe von DC depletierten CD11c-iDTR Mäusen wurde untersucht, wie weit dieser Prozess von den Empfänger DC abhängt. Dazu wurden an Tag 6 nach der Transplantation der Donor- und der Empfängeranteil an verschiedenen Zellpopulationen identifiziert. Zur Unterscheidung wurden die unterschiedlichen MHC I Allele von BALB/c Donoren (H2-K^d) und C57BL/6 Rezipienten (H2-K^b) verwendet. Wie in Abbildung 24 gezeigt, ist bei T-Zellen, DC und Neutrophilen zu beobachten, dass die Depletion der DC zu einem erhöhten Anteil an Zellen des Donors führt. Dieser Effekt ist bei den DC natürlich am stärksten ausgeprägt, weil durch die DT-Gabe annähernd alle DC des Empfängers depletiert wurden. Der erhöhte Anteil an alloreaktiven Donor T-Zellen ist eine passende Erklärung für den ungünstigeren Verlauf der Erkrankung bei DC defizienten Tieren trotz eines verringerten T-Zell-Anteils insgesamt. Allerdings wurden die T-Zellen nicht näher

untersucht, sodass nicht gesagt werden kann, ob z.B. speziell Treg verringert sind. Der erhöhte Donoranteil bei den Neutrophilen lässt zusammen mit dem insgesamt erhöhten Anteil darauf schließen, dass der Verlust der Empfänger DC zu einer vermehrten Neubildung von Neutrophilen aus dem Donor-Knochenmark führt.

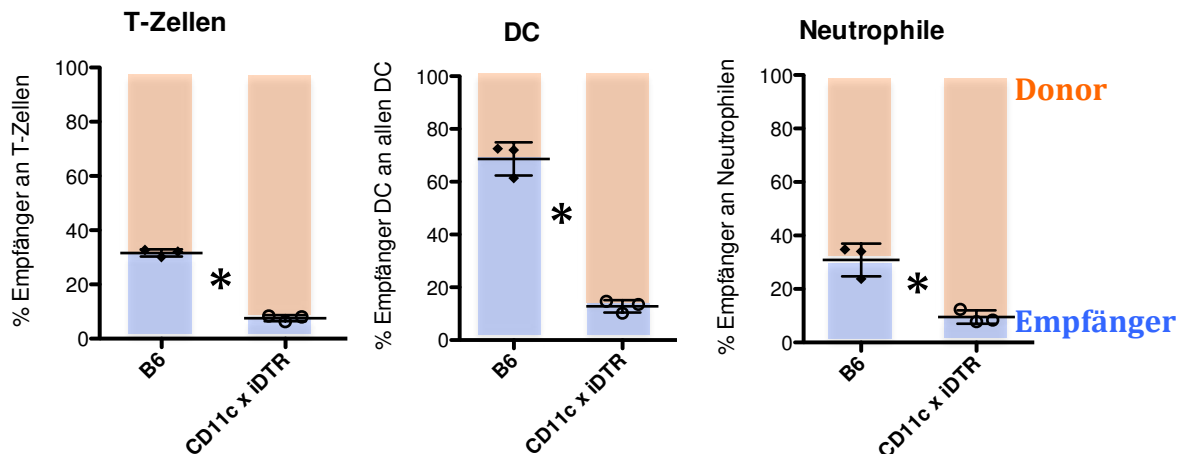


Abbildung 24: Depletion von Empfänger DC führt zu einem erhöhten Anteil an Zellen mit Donorursprung

C57/BL6 und CD11c-iDTR Mäuse wurden letal bestrahlt (11 Gy), NK-Zellen wurden mit einem Antikörper depletiert und es wurden 10×10^6 Zellen T-Zell-depletiertes Knochenmark und 5×10^6 T-Zellen aus BALB/c Mäusen transplantiert. Den CD11c-iDTR Mäusen wurde an den Tagen -1, 0, 1 und 3 jeweils $1 \mu\text{g}$ Diphtherie Toxin (DT) pro Tier *i.p.* verabreicht. An Tag 6 nach der Transplantation wurden die Milzen der Tiere entnommen und T-Zellen (CD90^+), DC ($\text{CD11c}^+ \text{MHCII}^+$) und Neutrophile ($\text{GR-1}^+ \text{CD11b}^+$) wurden durchflusszytometrisch auf die Expression von Donor- (H2-K^d) oder Empfängerallelen (H2-K^b) von MHC I untersucht. (*) zeigt statistisch signifikante Unterschiede nach Students t-Test.

3.3.5 Die Abwesenheit von $\text{CD8}\alpha^+$ DC im Empfänger führt zu einem schlechteren Verlauf einer akuten GvH-Erkrankung

Bei DC handelt es sich um eine heterogene Zellpopulation. Hinsichtlich der Induktion von Treg in der Peripherie ist die $\text{CD8}\alpha^+$ DC Subpopulation von besonderem Interesse, weil diese Zellen als potente Induktoren von Treg beschrieben wurden⁵³. Um zu untersuchen welchen Effekt die Abwesenheit dieses Subtyps im Vergleich zu einer kompletten Defizienz hat, wurde mit Mäusen gearbeitet, die einen Knock-out des Gens *BATF3* tragen. Dies führt zu einem selektiven Verlust der $\text{CD8}\alpha^+$ DC, wohingegen die anderen DC Populationen nicht beeinträchtigt werden⁴⁷. Wie in Abbildung 25 zu sehen, führt das Fehlen der $\text{CD8}\alpha^+$ DC im Empfänger zu einem deutlich schlimmeren Verlauf der GvH-Erkrankung nach allogener Transplantation. Das mediane Überleben ist von 44 auf 8 Tage reduziert und alle Tiere versterben bis

Ergebnisse

zum 41. Versuchstag, wohingegen in der Kontrollgruppe zumindest 6% überleben. Es fällt auf, dass der Verlauf der Kurve dem bei kompletter Abwesenheit aller DC sehr ähnlich ist.

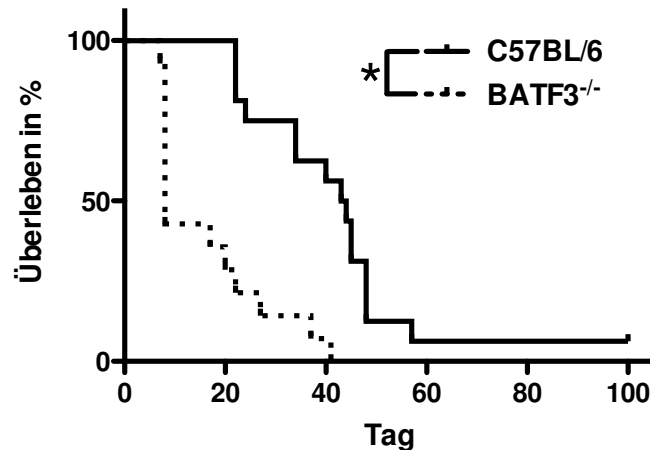


Abbildung 25: Der Verlauf einer akuten GvH-Erkrankung wird durch CD8 α ⁺ DC im Empfänger verbessert

C57/BL6 (schwarze Linie, n=16) und BATF3^{-/-} (unterbrochene Linie, n=14) Mäuse wurden letal bestrahlt (11 Gy), NK-Zellen wurden mit einem Antikörper depletiert und es wurden 10x10⁶ Zellen T-Zell-depletiertes Knochenmark und 5x10⁶ T-Zellen aus BALB/c Mäusen transplantiert. Der Krankheitsverlauf wurde 100 Tage lang verfolgt. Die gezeigten Daten sind aus zwei unabhängigen Experimenten kombiniert. (*) zeigt signifikante Unterschiede nach Mantel-Cox-Test.

3.3.6 In BATF3^{-/-} Mäusen herrscht nach allogener HSCT ein modifiziertes Zytokin-Millieu

Es wurde untersucht, ob das deutlich beschleunigte Ableben der transplantierten BATF3^{-/-} Mäuse mit einer heftigeren Immunreaktion in Verbindung gebracht werden kann. Dazu wurden den Tieren am ersten bzw. zweiten Tag nach der Transplantation die mesenterialen Lymphknoten entnommen und der mRNA-Gehalt für die Zytokine IL-12p35 und IL-10 bestimmt (Abbildung 26). Für IL-12p35 ist zu sehen, dass es an Tag 1 keine Unterschiede im Bezug zur unbehandelten Kontrolle gibt, am zweiten Tag ist der mRNA-Gehalt in den BATF3^{-/-} Mäusen ca. auf das Zehnfache erhöht, während er in den C57BL/6 Tieren auf ca. ein Drittel reduziert ist. Der mRNA-Gehalt von IL-10 ändert sich in den Lymphknoten der WT Kontrollen nicht. In den Zellen der BATF3^{-/-} Mäuse ist er hingegen bereits am ersten Tag auf das ca. 40-fache erhöht.

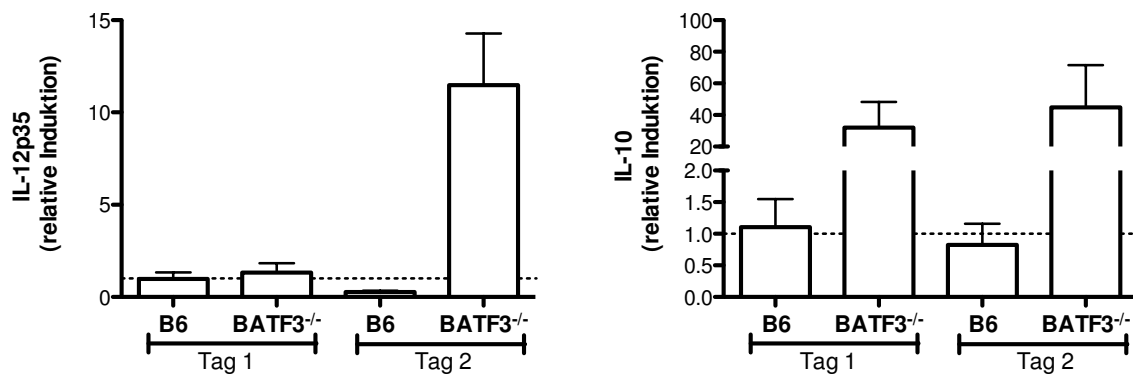


Abbildung 26: Die Lymphknoten von BATF3^{-/-} Mäusen weisen nach allogener HSCT ein modifiziertes Zytokin-Milieu auf

C57/BL6 und BATF3^{-/-} Mäuse wurden letal bestrahlt (11 Gy), NK-Zellen wurden mit einem Antikörper depletiert und es wurden 10×10^6 Zellen T-Zell-depletiertes Knochenmark und 5×10^6 T-Zellen aus BALB/c Mäusen transplantiert. Am ersten bzw. zweiten Tag nach der Transplantation wurden die mesenterialen Lymphknoten entnommen, daraus mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Der Gehalt an RNA für IL-12p35 und IL-10 wurde mittels spezifischer Primer durch quantitative Real-Time-PCR bestimmt. Die Werte wurden auf eine Probe aus einer unbehandelten Maus des jeweiligen Stamms normiert. Als Haushaltsgen wurde *B2M* verwendet. Die gezeigten Werte sind repräsentativ für zwei unabhängige Versuche mit 3 bis 6 Tieren pro Gruppe.

3.3.7 DC aus konditionierten BATF3^{-/-} Mäusen zeigen einen stärker aktivierten Phänotyp

Ein kritischer Punkt für die Induktion einer GvH-Reaktion ist der Aktivierungsstatus der APC. Dieser wurde untersucht, indem stellvertretend die DC in den mesenterialen Lymphknoten genauer betrachtet wurden. Dazu wurden BATF3^{-/-} und WT Mäuse wie im Transplantationsprotokoll konditioniert und der Status von Oberflächenmarkern durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 27). Generell ist bei allen untersuchten Markern kein Unterschied zwischen den unbehandelten Tieren beider Stämme zu sehen. Innerhalb der C57BL/6 WT Mäuse ist jedoch zu sehen, dass die CD8 α^+ Population der DC weniger MHCII und CD80 exprimiert. Nach der Konditionierung bleibt die Expression bei den CD8 α^+ DC relativ niedrig, wohingegen sie bei den anderen DC verstärkt wird. Der Vergleich zwischen Zellen aus konditionierten WT und BATF3^{-/-} Mäusen zeigt, dass in den Knock-out Tieren MHCII und CD86 stärker noch oben reguliert werden, die Expression des inhibitorisch wirkenden Moleküls B7-H4 tendenziell jedoch nur wenig zunimmt. Bei CD80 ist kein Unterschied zu erkennen. Insgesamt kann gesagt werden, dass die

Ergebnisse

DC aus konditionierten $BATF3^{-/-}$ Mäusen einen stärker aktivierten Phänotyp aufweisen.

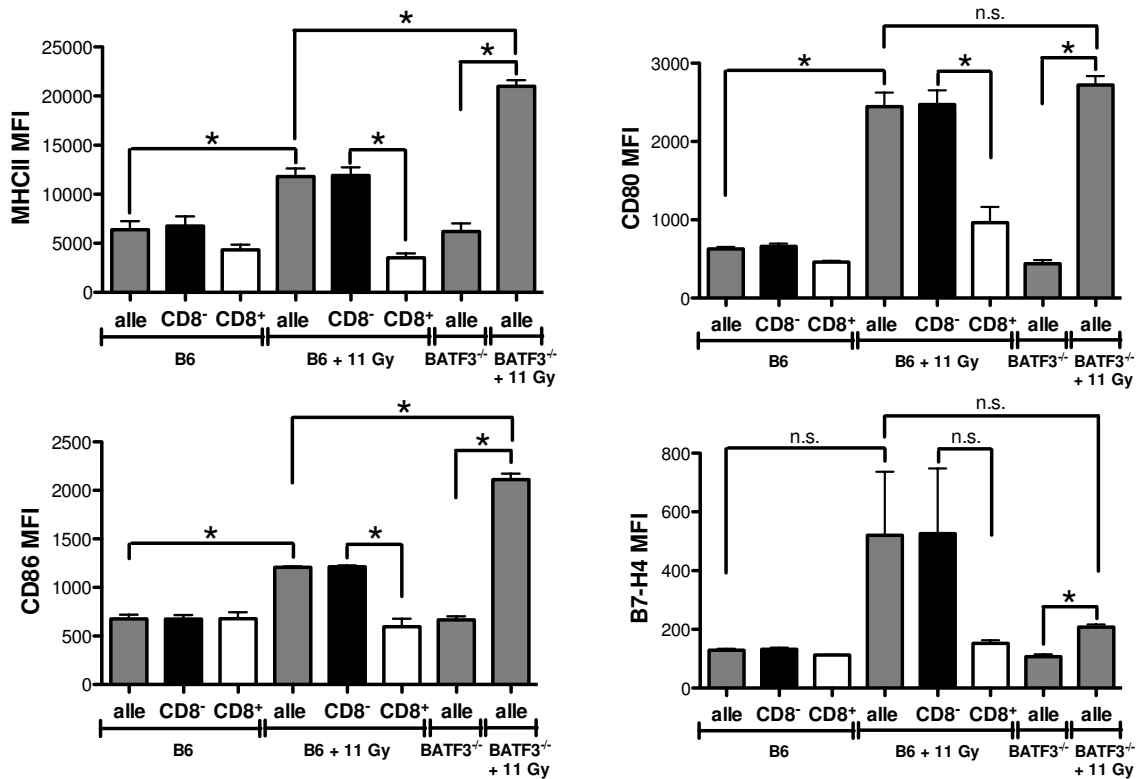


Abbildung 27: Konditionierung induziert in $BATF3^{-/-}$ Mäusen einen stärker aktivierten Phänotyp

C57BL/6 und $BATF3^{-/-}$ Mäuse wurden letal bestrahlt (2 x 5,5 Gy) und NK-Zellen wurden mit einem Antikörper depletiert. An Tag 3 nach der zweiten Bestrahlung wurden die Tiere abgetötet, es wurden die mesenterialen Lymphknoten entnommen, durch Verdau in eine Einzelzellsuspension überführt und durchflusszytometrisch untersucht. Mit unbehandelten Tieren beider Stämme wurde ebenso verfahren. Es wurde die Expression der Oberflächenmarker MHCII, CD80, CD86 und B7-H4 auf allen DC ($CD11c^{+}MHCII^{+}$), sowie getrennt nach der zusätzlichen Expression des Oberflächenmarkers CD8 bestimmt. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. (*) zeigt statistisch signifikante Unterschiede nach Students t-Test bzw. One-Way ANOVA Test. n.s. – keine signifikanten Unterschiede.

3.3.8 Lymphknotenzellen aus konditionierten $BATF3^{-/-}$ Mäusen sind potentere Stimulatoren für allogene T-Zellen als Zellen aus WT Mäusen

Um zu untersuchen, ob die Unterschiede im DC Phänotyp auch funktionell relevant sind, wurden $BATF3^{-/-}$ und C57BL/6 WT Mäuse wie vor der Transplantation konditioniert um den entsprechenden Phänotyp der APC zu induzieren. Daraufhin wurden die mesenterialen Lymphknoten entnommen, in eine Einzelzellsuspension überführt und als Stimulatoren für allogene T-Zellen *in vitro* eingesetzt. Die Ergebnisse in Abbildung 28 zeigen für die Wildtypen eine reduzierte T-Zell-

Proliferation durch die Konditionierung obwohl von einem stärker aktivierten Phänotyp auszugehen ist. Das liegt daran, dass die Bestrahlung Apoptose in den Zellen induziert und somit effektiv weniger Stimulatoren zur Verfügung stehen, als ursprünglich eingesetzt wurden. Die Zellen aus unbehandelten $BATF3^{-/-}$ Mäusen primen die T-Zell-Proliferation etwa gleich gut wie die aus den Wildtypen. Sehr auffällig ist jedoch, dass die Zellen aus konditionierten $BATF3^{-/-}$ Mäusen genauso gute Stimulatoren sind wie die aus den unbehandelten. Den Zellen aus konditionierten Wildtypen sind sie dabei immer überlegen. Das legt den Schluss nahe, dass die APC aus den konditionierten $BATF3^{-/-}$ Mäusen die allogene T-Zell-Proliferation wirklich besser primen und dadurch einen heftigeren Verlauf der GvH-Erkrankung verursachen.

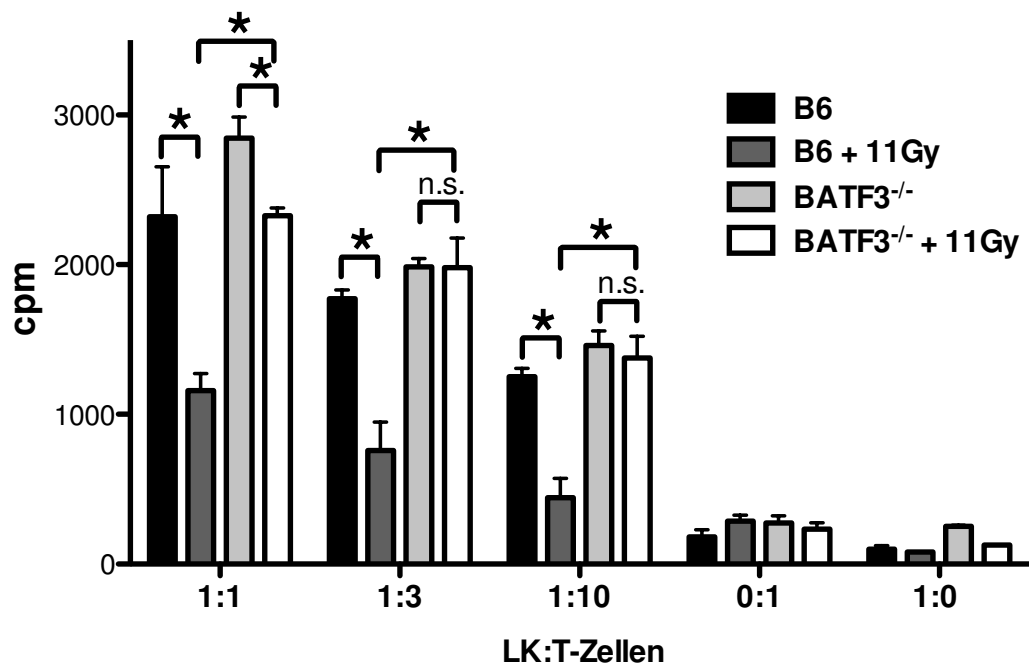


Abbildung 28: Lymphknotenzellen aus konditionierten $BATF3^{-/-}$ Mäusen sind effektivere Stimulatoren für allogene T-Zellen

C57BL/6 und $BATF3^{-/-}$ Mäuse wurden letal bestrahlt ($2 \times 5,5$ Gy) und NK-Zellen wurden mit einem Antikörper depletiert. An Tag 3 nach der zweiten Bestrahlung wurden die Tiere abgetötet, es wurden die mesenterialen Lymphknoten entnommen, durch Verdau in eine Einzelzellsuspension überführt und weitere Zellteilung durch Behandlung mit Mitomycin C unterbunden. Mit unbehandelten Mäusen beider Stämme wurde ebenso verfahren. Die Lymphknotenzellen wurden in den angegebenen Verhältnissen mit allogenen $CD90.2^+$ T-Zellen aus BALB/c Mäusen (1×10^5 pro Kavität) für 3 Tage kokultiviert. Die T-Zell Proliferation wurde durch 3H -Thymidin-Einbau bestimmt. Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. (*) Statistisch signifikante Unterschiede nach Student's-t-Test; n.s. – nicht signifikante Unterschiede.

3.3.9 Die Anzahl an Treg ist in allogenen transplantierten $BATF3^{-/-}$ Mäusen reduziert

Ein möglicher Grund für das stärker inflammatorische Milieu, die stärkere Aktivierung der DC und damit auch für das bessere T-Zell-Priming und das schnellere Versterben der Versuchstiere, ist eine verminderte Zahl an Treg. $CD8\alpha^+$ DC wurden bereits zuvor als potente Induktoren von Treg beschrieben⁵³. Um zu überprüfen, ob deren Abwesenheit im Kontext einer GvH-Erkrankung die Treg beeinflusst, wurden Mäuse allogenen transplantiert und die Treg-Anzahl sechs Tage nach der Transplantation bestimmt. Wie in Abbildung 29 A gezeigt, ist die absolute Anzahl der Treg in der Milz der $BATF3^{-/-}$ Mäuse in der Tat auf ungefähr die Hälfte des Wertes der Kontrollen reduziert. Das wichtigste Zytokin für die Induktion von Treg in der Peripherie ist TGF- β . Eine Analyse der Expression auf RNA-Ebene in den mesenterialen Lymphknoten zeigt dabei jedoch keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 29 B). Somit liegt der Schluss nahe, dass das Fehlen der $CD8\alpha^+$ DC bei allogener HSCT zu einer verringerten Induktion von Treg und damit einem schwereren Verlauf der GvH-Erkrankung führt.

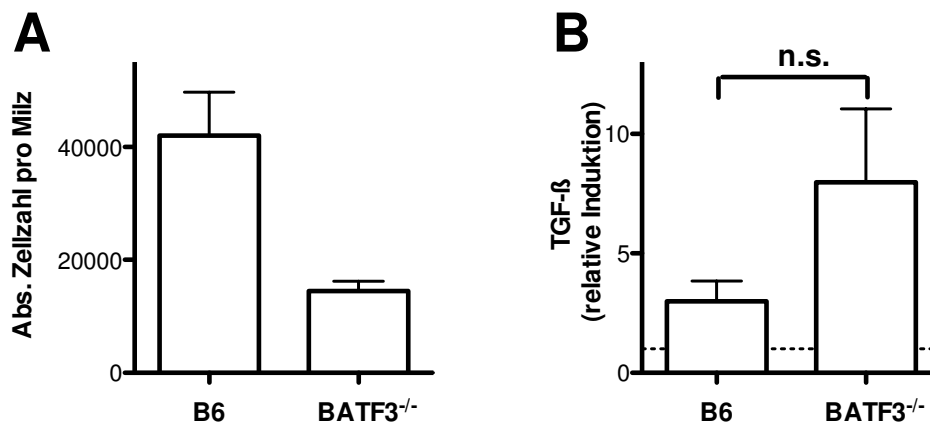


Abbildung 29: Die Anzahl der Treg ist in $BATF3^{-/-}$ Mäusen nach allogener HSCT reduziert.

(A) C57/BL6 (B6) und $BATF3^{-/-}$ Mäuse wurden letal bestrahlt (11 Gy), NK-Zellen wurden mit einem Antikörper depletiert und es wurden 10×10^6 Zellen T-Zell-depletiertes Knochenmark und 5×10^6 T-Zellen aus BALB/c Mäusen transplantiert. An Tag 6 nach der Transplantation wurden die Tiere abgetötet und die Anzahl der Treg in der Milz durchflusszytometrisch bestimmt. Alle T-Zellen ($CD90.2^+$) waren von Donorursprung ($H2-K^d+$). Treg wurden definiert als $CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$. **(B)** C57/BL6 (B6) und $BATF3^{-/-}$ Mäuse wurden letal bestrahlt (11 Gy), NK-Zellen wurden mit einem Antikörper depletiert. Zwei Tage später, wurde aus den mesenterialen Lymphknoten RNA gewonnen und in cDNA umgeschrieben. Der Gehalt an RNA für TGF- $\beta 1$ wurde mittels spezifischer Primer durch quantitative Real-Time-PCR bestimmt. Die Werte wurden auf eine Probe aus einer unbehandelten Maus des jeweiligen Stamms normiert. Als Haushaltsgen wurde *B2M* verwendet. n.s. – nicht signifikante Unterschiede.

4 Diskussion

Die allogene hämotoetische Stammzelltransplantation (HSCT) hat sich seit ihrer Einführung gegen Ende der 1960er Jahre zu einer guten Möglichkeit zur Therapie verschiedener hämatologischer Erkrankungen entwickelt¹. Trotzdem stellen verschiedenen Risiken und Komplikationen weiterhin eine starke Limitierung der Erfolgsaussichten der Therapie dar. GvH-Erkrankungen sind maßgeblich an diesen Einschränkungen beteiligt und ein besseres Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen, ebenso wie deren Kontrolle ist unumgänglich um die Effektivität der allogenen HSCT zu verbessern. Im Rahmen dieser Arbeit wurden dazu verschiedene Ansätze verfolgt.

4.1 Mechanismen der Treg vermittelten Suppression einer GvH-Erkrankung

Die Möglichkeit eine GvH-Erkrankung durch eine zusätzliche Verabreichung von Treg zu mildern ist bereits seit einigen Jahren bekannt und konnte bereits in Studien auf den Menschen übertragen werden^{109,113,114}. Es wurde gezeigt, dass dieser Effekt auch innerhalb des für diese Arbeit verwendeten Mausmodells erzielt werden kann. Weiter wurde gezeigt, dass der suppressive Mechanismus unabhängig von IL-10 funktioniert. Dieser Befund widerspricht zwar einigen Publikationen, allerdings wurde in einer von diesen auch gezeigt, dass die IL-10 abhängige Suppression an enge Parameter geknüpft ist und nicht immer zum Tragen kommt^{109,189}.

Die gezeigten *in vitro* Daten deuten auf einen anderen relevanten Mechanismus. Dabei handelt es sich um den Transfer von cAMP über Gap junctions durch Treg in eine Zielzelle, was in der Literatur prinzipiell bereits beschrieben wurde¹⁰⁶. Auf diesem Weg können sowohl andere T-Zellen, wie auch DC supprimiert werden, wobei DC das bevorzugte Ziel sind^{107,190,191}. Hierbei scheint es keine Rolle zu spielen, ob die DC und Treg zueinander syngen oder allogene sind, wie die cAMP Messungen belegen. Dafür spricht auch der zu beobachtende Phänotyp der DC nach der Kokultur. Für den syngen Fall wurde beschrieben, dass die Gegenwart von Treg

Diskussion

eine durch LPS induzierte verstärkte Expression von kostimulatorischen Molekülen verhindert, während die von inhibitorischen positiv beeinflusst wird¹⁰⁷. Das gleiche Bild ergibt sich in der allogenen Situation.

Der Spiegel von cAMP in der Zelle wird durch zwei Gruppen von Enzymen maßgeblich bestimmt. Dabei handelt es sich einerseits um die Adenylatcyclasen, die aus ATP cAMP bilden und andererseits die Phosphodiesterasen (PDE), die cAMP zu AMP abbauen. Beide Enzymarten kommen in Treg in distinkten Mustern vor^{192,193}. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der PDE näher beleuchtet und untersucht wie sich die Inhibition bestimmter Isoenzyme auf die Treg Funktion auswirkt. Dies ist ein interessantes Ziel für eine Manipulation, weil einige PDE-Hemmer als zugelassene Medikamente in der Klinik bereits zur Verfügung stehen und somit auch ein translationaler Ansatz verfolgt werden könnte¹⁹⁴⁻¹⁹⁶. Durch Inhibition der Isoenzyme PDE-2, -3 und -4 konnte konzentrationsabhängig die T-Zell-Proliferation gehemmt werden. Dabei war die Gegenwart von Treg aber nur nötig um eine maximale Reduktion zu erreichen. Auch die durch allogene DC stimulierten T-Zellen konnten durch PDE-Inhibition direkt in ihrer Proliferation gehemmt werden. Die DC selbst werden durch zwei der Inhibitoren zwar scheinbar in ihrer IL-12 Produktion beeinflusst, jedoch sind diese Unterschiede nicht statistisch signifikant. Keine Anhaltspunkte für Unterschiede zeigen sich bei der Expression der kostimulatorischen Oberflächenmoleküle und der Zell-Viabilität. Allein die verringerte Produktion von IL-12 wäre allerdings auch keine Erklärung für die gehemmte T-Zell-Proliferation¹⁹⁷. Dies konnte durch Versuche mit fixierten Zellen bestätigt werden, da diese nicht mehr in der Lage sind Zytokine zu produzieren. Darüberhinaus haben diese Versuche gezeigt, dass Rolipram sowohl die T-Zell-Proliferation direkt hemmt, als auch die Interaktion von DC und Treg dahingegen moduliert, dass das T-Zell-Priming reduziert wird. In diesem Zusammenhang ist hervorzuheben, dass für die Inhibition von PDE3 bereits gezeigt werden konnte, dass dieses Isoenzym bei der Induktion von Treg bei der Abstoßung von allogenen Transplantaten eine Rolle spielt¹⁹⁶.

Die abschließende Transplantation zeigt, dass Treg und Rolipram kooperativ das Überleben der Versuchstiere deutlich verbessern. Dies reiht sich gut in andere Publikationen ein. Diese konnten zeigen, dass die Inhibition der Adenylatcyclase in einem xenogenen GvH-Modell den protektiven Effekt von humanen Treg

aufhebt^{191,198}. In einer früheren Arbeit konnten erhöhte cAMP Spiegel in konventionellen CD4⁺ T-Zellen ebenfalls mit einem mildern Verlauf einer GvH-Erkrankung miteinander korreliert werden¹⁹⁹. Somit stellt dieser Ansatz einer pharmakologisch modulierten zellulären Therapie einen vielversprechenden Weg dar, um GvH-Reaktionen besser kontrollieren zu können.

4.2 Die Rolle von IL-10 bei der Suppression einer GvH-Erkrankung

Die anti-inflammatorischen und suppressiven Eigenschaften von IL-10 sind bereits seit Längerem bekannt. Für einige Erkrankungen konnte gezeigt werden, dass IL-10 eine wichtige Rolle bei deren Verlauf einnimmt²⁰⁰. Ebenso verhält es sich mit GvH-Erkrankungen. Mehrere Untersuchungen konnten SNPs im IL-10 und IL-10 Rezeptor Gen mit einem ungünstigeren Verlauf in Verbindung bringen^{141,156,157}. In Tiermodellen konnte die wichtige Rolle von IL-10 durch den Einsatz von IL-10^{-/-} Mäusen, wie auch durch die Applikation vom rekombinantem IL-10 näher untersucht werden^{58,201}.

Durch die gezeigten initialen Versuche konnte bestätigt werden, dass diese Mechanismen im für diese Arbeit genutzten Modell zum Tragen kommen. Außerdem konnten die Ergebnisse durch das Verabreichen eines blockierenden Antikörpers für den IL-10 Rezeptor bestätigt werden, was zeigt, dass der autoimmune Phänotyp, der sich in den Knock-out Tieren entwickelt nicht der Grund für den aggressiveren Verlauf der Erkrankung ist¹⁷³. Darüberhinaus konnten sowohl Zellen des Spenders, wie auch die des Empfängers als relevante IL-10 Produzenten identifiziert werden. Dieser Sachverhalt geht zwar nicht mit allen früheren Veröffentlichungen, die sich mit dieser Frage beschäftigt haben konform, dies kann aber unter Anderem auf Unterschiede in den verwendeten Modellen zurückgeführt werden^{189, 203}.

Ein Ziel dieser Arbeit war eine Identifizierung der IL-10 Produzenten während einer GvH-Erkrankung. Eine Schwierigkeit dabei ist, dass es eine weites Spektrum an Zellen gibt, die dafür in Frage kommen¹³⁵. Mit Hilfe einer transgenen Maus, die ein Reporterkonstrukt für die Aktivität des IL-10 Promotors trägt, konnten B-Zellen aus dem Spender, wie auch aus dem Empfänger als wichtige Produzenten identifiziert werden. Damit konnten ältere Daten, die sich mit der Rolle von B-Zellen des Empfängers beschäftigt haben mit moderneren Arbeitsmitteln bestätigt werden¹⁸⁶.

Diskussion

Auch im Zusammenhang mit Toleranzentwicklung nach Transplantation konnte B-Zellen eine Rolle zugeschrieben werden, was weitere Untersuchungen sehr interessant macht²⁰⁵. Donor B-Zellen hingegen wurden erst kürzlich in einem Modell für chronische GvH-Erkrankungen als wichtige IL-10 Produzenten identifiziert²⁰⁶. Zusätzlich konnten die IL-10 produzierenden B-Zellen innerhalb der gesamten Population phänotypisch beschrieben werden. Die Expression von CD1d auf hohem sowie von CD5 auf intermediärem Niveau deckt sich dabei mit in anderen Situationen beschriebenen IL-10 produzierenden B-Zellen^{187,207}. Ein weiterer Oberflächenmarker ist TIM-1, der ebenfalls relativ stark exprimiert wird. Er ist von besonders hohem Interesse, weil gezeigt werden konnte, dass durch Ligandierung von TIM-1 die IL-10 Produktion weiter moduliert werden kann¹⁸⁸.

Die Auswirkungen des fehlenden IL-10 wurden zunächst von Seiten der DC als Antigenpräsentierende Zelle betrachtet. Es ist bereits länger bekannt, dass DC generell auf fehlendes oder zusätzliches IL-10 reagieren^{208,209}. Hier konnte ein entscheidender Unterschied in der Expression des inhibitorischen Oberflächenmoleküls B7-H4 gezeigt werden. Durch Blockade des IL-10 Rezeptors blieb die verstärkte Expression nach der Konditionierung aus. Dies ist stimmig mit früheren Untersuchungen, die gezeigt haben, dass die B7-H4 Expression durch IL-10 induziert wird^{147,210}. Im Kontext von Transplantationen konnte die Relevanz von B7-H4 ebenfalls belegt werden^{211,212}. Die stärkere Aktivierung der DC konnte konsequenterweise auch mit einem besseren Priming allogener T-Zellen *in vitro* korreliert werden.

Die Rolle von B-Zellen als relevante IL-10 Produzenten und damit Immunregulatoren wird weiterhin kontrovers diskutiert. Es konnte in Modellen für MS und entzündliche Darmerkrankungen zwar gezeigt werden, dass IL-10 aus B-Zellen wichtig ist^{125,126}, es gibt jedoch auch Gegenbeispiele wie Helmintheninfektionen oder SLE^{128,129}. Somit stellen die benutzten Mäuse mit einem B-Zell spezifischen IL-10 Knock-out ein sehr wertvolles Werkzeug dar, um diese wichtige Frage im Hinblick auf GvH-Erkrankungen zu untersuchen. So konnte für die IL-10 Produktion durch B-Zellen der Empfänger-, wie auch der Donorseite eine direkte Relevanz nachgewiesen werden. Allerdings fällt auf, dass die Tiere mit dem zellspezifisch inaktivierten IL-10 Gen ein längeres durchschnittliches Überleben aufweisen, als die Tiere der früheren Versuche, bei denen die IL-10 Produktion aller Zellen unterbunden war. Dies führt zu

dem Schluss, dass es noch weitere wichtige IL-10 Produzenten geben muss. Dabei könnte es sich um Epithelzellen handeln, deren Relevanz bereits beschrieben wurde²¹³. Dazu gehören z.B. Keratinozyten, die in großer Zahl vorkommen und in der Lage sind IL-10 zu produzieren, das auf DC einwirken kann^{205,214}.

4.3 Untersuchung der Rolle von DC bei einer akuten GvH-Erkrankung

GvH-Erkrankungen werden durch T-Zellen aus dem Transplantat vermittelt. T-Zellen können jedoch nur durch eine antigenpräsentierende Zelle (APC) über einen MHC/Peptid-Komplex bzw. ein allogenes MHC-Molekül aktiviert werden. Da DC in vielen Situationen als die potentesten APC beschrieben werden liegt der Schluss nahe, dass sie auch die wichtigsten Induktoren von allogenen T-Zell-Antworten sein sollten⁹. Dabei muss prinzipiell zwischen DC von Donor und Empfänger unterschieden werden, die beide eine entsprechende Antwort primen können¹⁶. Um eine GvH-Erkrankung auszulösen sind die Empfänger DC bzw. APC entscheidend, die APC des Spenders wirken jedoch verstärkend^{68,69}. Somit wirkt es auf den ersten Blick unlogisch, dass in Mäusen, die keine DC besitzen, die GvH-Reaktion sehr heftig ausfällt und zu einem extrem schnellen Versterben der Tiere führt. Eine Erklärung dafür, dass es überhaupt zu einer GvH-Erkrankung kommt, sind nicht-hämatopoietische APC in den Zielorganen, die direkt dazu in der Lage eine letale GvH-Reaktion zu primen⁷¹. Der schnelle Tod der Versuchstiere zeigt jedoch, dass die DC weitere Funktionen haben müssen. Das Anwachsen des transplantierten Knochenmarks ist analog zu dem in WT Mäusen, sodass ein sonst einsetzender irreversibler Zusammenbruch des blutbildenden Systems als Ursache auszuschließen ist²¹⁵. Die Aufschlüsselung der zellulären Zusammensetzung der Milz zeigt jedoch z.T. Unterschiede. Der Anteil der DC ist zwar annähernd unverändert, aber das liegt daran, dass mehr Donor DC vorhanden sind. Diese scheinen die Funktion der Empfänger DC jedoch nicht kompensieren zu können. Die Anzahl der Neutrophilen ist durch die Depletion der DC leicht erhöht und daran der Anteil von Donor-Ursprung. Das kann als allgemein stärker inflammatorisches Milieu gedeutet werden, da Neutrophile auf verschiedene proinflammatorische Stimuli reagieren können und dann ihrerseits weitere proinflammatorische Mediatoren ausschütten²⁰². Ob der Ursprung der Zellen einen großen Einfluss hat, ist eher fraglich weil Neutrophile nicht, wie z.B. NK-Zellen, zwischen Selbst und nicht-Selbst

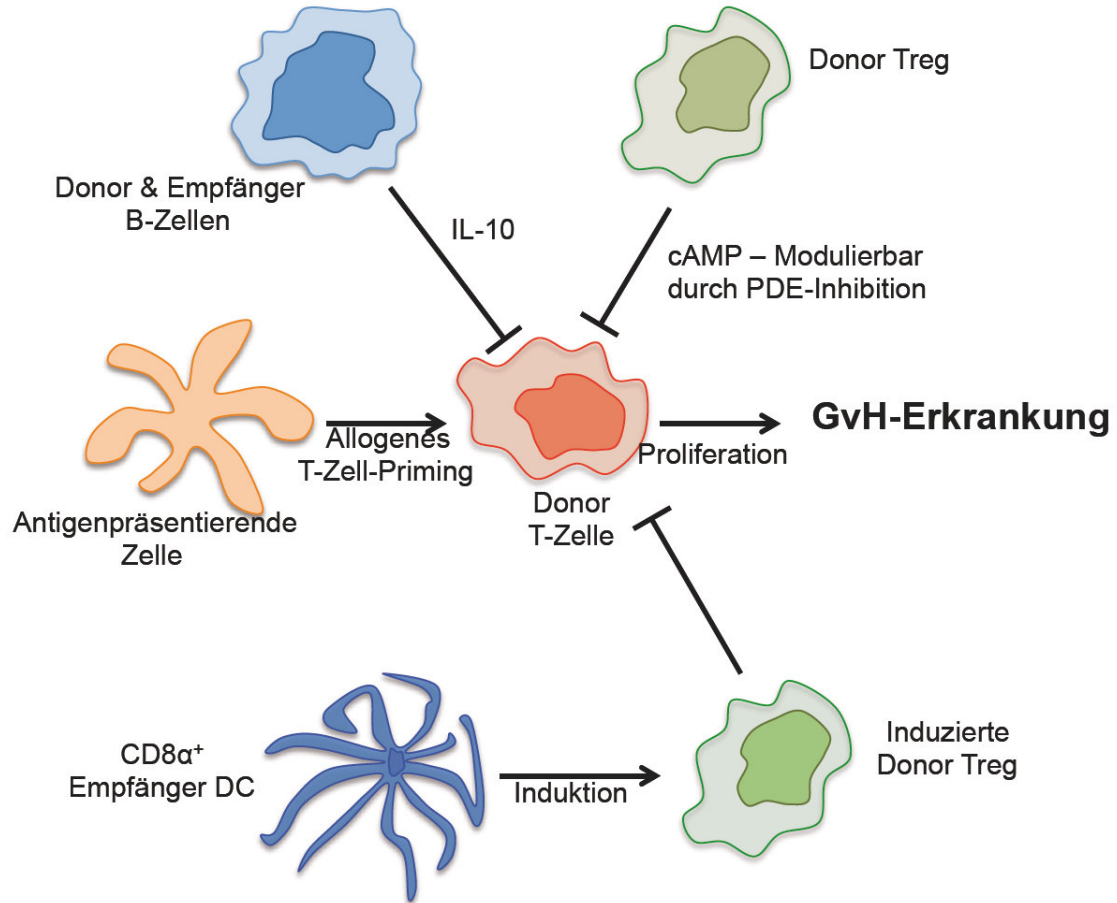
Diskussion

unterscheiden können²⁰⁴. Der geringere Anteil an T-Zellen in den Mäusen ohne DC erscheint logisch, weil die DC als wichtige Stimulatoren fehlen, allerdings sind die T-Zellen auch die Vermittler der GvH-Reaktion, wodurch das Ergebnis wiederum überrascht. In diesem Zusammenhang ist allerdings die Milz als untersuchtes Organ eher ungünstig, da das T-Zell-Priming nach Koyama et al. wahrscheinlich direkt in den Zielorganen stattfindet⁷¹. Das würde ebenso den erhöhten Anteil an T-Zellen von Donor-Ursprung erklären.

Bei DC handelt es sich um eine sehr heterogene Zellpopulation. Verschiedene Subpopulationen zeichnen sich durch unterschiedliche Spezialisierungen und Funktionsweisen aus. Bezogen auf die allogene HSCT konnte gezeigt werden, dass z.B. Langerhanszellen und pDC für die Induktion der GvH-Reaktion nicht benötigt werden^{66,67}. Durch den Knock-out des BATF3 Gens wurde eine Maus erzeugt, die keine CD8 α ⁺ DC entwickelt, sonst aber keine Abnormitäten aufweist^{47,217}. In einem mHag-Modell wurde gezeigt, dass das Fehlen von CD8 α ⁺ DC im Empfänger zu keiner erhöhten Sterblichkeit bei einer GvH-Erkrankung führt⁵⁷. Im für diese Arbeit verwendeten MHC mismatch Modell verhalten sich die Mäuse hingegen anders. Sie sterben deutlich schneller als die verwendeten Kontrollen. Das mediane Überleben ist dem der Mäuse ohne alle DC zwar sehr ähnlich, danach verläuft die Erkrankung bei den BATF3^{-/-} Tieren jedoch weniger schnell. Das spricht dafür, dass die CD8 α ⁺ DC vor allem in der initialen Phase der GvH-Erkrankung eine Rolle spielen. Das Zytokin-Milieu in den mesenterialen Lymphknoten spiegelt dies auch wieder. Die erhöhten Werte für IL-12p35 sprechen für eine stärker inflammatorische Umgebung. Hohe IL-10 Spiegel sind ebenfalls oft mit heftigeren GvH-Reaktionen assoziiert, sie werden als Gegenregulation interpretiert^{159,160}. Passend dazu zeigen die DC aus den mesenterialen Lymphknoten der konditionierten BATF3^{-/-} Mäuse einen stärker aktivierten Phänotyp und sind *in vitro* bessere Stimulatoren für die Proliferation allogener T-Zellen. Dieser Sachverhalt muss auf die Konditionierung zurückzuführen sein, da die Kapazitäten zum T-Zell-Priming von frisch isolierten CD8 α ⁺ DC denen von CD8 α ⁻ entsprechen²¹⁶. Darüberhinaus wurde beschrieben, dass CD8 α ⁺ DC vermehrt den Zelltod von T-Zellen auslösen können oder diese in immunsuppressive regulatorische T-Zellen umwandeln^{53,56}. Dies scheint sich auch im Kontext der allogenen HSCT zu bestätigen. In transplantierten BATF3^{-/-} Mäusen ist die Anzahl der Treg ungefähr halbiert. Dieser Sachverhalt wäre auch eine passende Erklärung für den stärker aktivierten Status der DC und das bessere T-Zell Priming *in vitro* und

damit auch für den ungünstigeren Verlauf der GvH-Erkrankung insgesamt. Das Zytokin TGF- β ist für die Induktion von Treg wichtig, es konnten jedoch keine Unterschiede gefunden werden. Allerdings ist zu beachten, dass lediglich das Expressionsniveau auf RNA Ebene untersucht wurde. TGF- β wird jedoch als inaktive Pro-Form gebildet und erst später aktiv, sodass keine klaren Aussagen zu machen sind^{218,219}. Zusammengefasst zeigt dies, dass die CD8 α^+ DC, die bereits zuvor als immunregulatorisch beschrieben wurden, auch bei GvH-Erkrankungen diese Funktion erfüllen. Darüberhinaus ist dieser Aspekt anscheinend wichtiger als die Rolle als APC und Induktor von GvH-Reaktionen.

5 Graphische Zusammenfassung



6 Abkürzungen

7AAD	7-Aminoactinomycin
AML	Akute myeloische Leukämie
AMP	Adenosinmonophosphat
APC	Allophycocyanin
APC	Antigenpräsentierende Zelle
BATF	Basic Leucin Zipper Transcription Factor ATF-Like
BMDC	Bone marrow-derived dendritic cell
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of Differentiation
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
DAMP	Danger associated molekular pattern
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonuceinacid
DNGR-1	DC NK lectin group receptor-1
DT	Diphtherietoxin
DTA	Diphtherietoxin A
DTR	Diphtheritoxinrezeptor
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
eGFP	enhanced green fluorescent protein
ER	Endoplasmatische Retikulum
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GvH	Graft-versus-Host
GvL	Graft-versus-Leukemia

Abkürzungen

Gy	Gray, Engergiedosis
HBSS	Hank's balanced salt solution
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HSCT	Hematopoietic stem cell transplantation
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
<i>i.p.</i>	intraperitoneal
<i>i.v.</i>	intravenös
KM	Knochenmark
KO	Knock-out
LTA	Lymphotoxin alpha
mDC	myeloide Dendritische Zelle
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MFI	Mittlere Fluoeszenzintensität
mHag	Minorhistokompatibilitätsantigen
MHC	Major Histocompatibility Complex
MS	Multiple Sklerose
PAMP	Pathogen associated molekular pattern
PE	Phycoerythrin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PFA	Paraformaldehyd
SA	Streptavidin
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus
TIM-1	T cell Ig and mucin-1
TLR	Toll-like Rezeptor
Treg	Regulatorische T-Zelle
TZR	T-Zell-Rezeptor
WT	Wildtyp

7 Literaturverzeichnis

1. Beelen, D. W., Ottinger, H., Mytilineos, L. & Müller, C. *Jahresbericht 2011*. (Deutsches Register für Stammzelltransplantation, 2012).
2. Parmar, S., de Lima, M., Deeg, H. J. & Champlin, R. E. Hematopoietic stem cell transplantation for myelodysplastic syndrome: a review. *Semin. Oncol.* **38**, 693–704 (2011).
3. Weiden, P. L. *et al.* Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N. Engl. J. Med.* **300**, 1068–1073 (1979).
4. Ruggeri, L. *et al.* Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* **94**, 333–339 (1999).
5. Goldman, J. M. *et al.* Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase. Increased risk for relapse associated with T-cell depletion. *Ann. Intern. Med.* **108**, 806–814 (1988).
6. Horowitz, M. M. *et al.* Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* **75**, 555–562 (1990).
7. Strober, S., Spitzer, T. R., Lowsky, R. & Sykes, M. Translational studies in hematopoietic cell transplantation: treatment of hematologic malignancies as a stepping stone to tolerance induction. *Semin. Immunol.* **23**, 273–281 (2011).
8. Ferrara, J. L. M., Levine, J. E., Reddy, P. & Holler, E. Graft-versus-host disease. *Lancet* **373**, 1550–1561 (2009).
9. Sathe, P. & Shortman, K. The steady-state development of splenic dendritic cells. *Mucosal Immunol* **1**, 425–431 (2008).
10. Blazar, B. R., Murphy, W. J. & Abedi, M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat Rev Immunol* **12**, 443–458 (2012).
11. STIMPFLING, J. H. & RICHARDSON, A. Recombination within the Histocompatibility locus of the mouse. *Genetics* **51**, 831–846 (1965).
12. McDevitt, H. O. *et al.* Genetic control of the immune response. Mapping of the Ir-1 locus. *J Exp Med* **135**, 1259–1278 (1972).
13. Santos, P. S. C., Kellermann, T., Uchanska-Ziegler, B. & Ziegler, A. Genomic architecture of MHC-linked odorant receptor gene repertoires among 16 vertebrate species. *Immunogenetics* **62**, 569–584 (2010).
14. Rammensee, H. G., Juretic, A., Nagy, Z. A. & Klein, J. Class I restricted interaction between suppressor and cytolytic cells in the response to minor histocompatibility antigens. *J Immunol* **132**, 668–672 (1984).
15. Villadangos, J. A. & Schnorrer, P. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol* **7**, 543–555 (2007).
16. Stenger, E. O., Turnquist, H. R., Mapara, M. Y. & Thomson, A. W. Dendritic cells and regulation of graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia activity. *Blood* **119**, 5088–5103 (2012).
17. Mahnke, K., Bedke, T. & Enk, A. H. Regulatory conversation between antigen presenting cells and regulatory T cells enhance immune suppression. *Cell. Immunol.* **250**, 1–13 (2007).
18. Kündig, T. M. *et al.* Fibroblasts as efficient antigen-presenting cells in

- lymphoid organs. *Science* **268**, 1343–1347 (1995).
19. Derbinski, J. & Kyewski, B. How thymic antigen presenting cells sample the body's self-antigens. *Curr. Opin. Immunol.* **22**, 592–600 (2010).
 20. Chastain, E. M. L., Duncan, D. S., Rodgers, J. M. & Miller, S. D. The role of antigen presenting cells in multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta* **1812**, 265–274 (2011).
 21. Yung Yu, C., Yang, Z., Blanchong, C. A. & Miller, W. The human and mouse MHC class III region: a parade of 21 genes at the centromeric segment. *Immunol. Today* **21**, 320–328 (2000).
 22. Xie, T. *et al.* Analysis of the gene-dense major histocompatibility complex class III region and its comparison to mouse. *Genome Res.* **13**, 2621–2636 (2003).
 23. Snell, G. D. & HIGGINS, G. F. Alleles at the histocompatibility-2 locus in the mouse as determined by tumor transplantation. *Genetics* **36**, 306–310 (1951).
 24. Hill, A. V. *et al.* Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature* **352**, 595–600 (1991).
 25. Robinson, J. *et al.* The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Res.* **41**, D1222–7 (2013).
 26. Trowsdale, J. The gentle art of gene arrangement: the meaning of gene clusters. *Genome Biol.* **3**, COMMENT2002 (2002).
 27. Snell, G. D. Methods for the study of histocompatibility genes. *J. Genet.* **49**, 87–108 (1948).
 28. Ceppellini, R., Mattiuz, P. L., Scudeller, G. & Visetti, M. Experimental allotransplantation in man. I. The role of the HL-A system in different genetic combinations. *Transplant. Proc.* **1**, 385–389 (1969).
 29. Simpson, E. *et al.* Minor H antigens: genes and peptides. *Eur. J. Immunogenet.* **28**, 505–513 (2001).
 30. Bonnet, D., Warren, E. H., Greenberg, P. D., Dick, J. E. & Riddell, S. R. CD8(+) minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocyte clones eliminate human acute myeloid leukemia stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 8639–8644 (1999).
 31. Pierce, R. A. *et al.* The HA-2 minor histocompatibility antigen is derived from a diallelic gene encoding a novel human class I myosin protein. *J Immunol* **167**, 3223–3230 (2001).
 32. Fontaine, P. *et al.* Adoptive transfer of minor histocompatibility antigen-specific T lymphocytes eradicates leukemia cells without causing graft-versus-host disease. *Nat Med* **7**, 789–794 (2001).
 33. Bleakley, M. & Riddell, S. R. Exploiting T cells specific for human minor histocompatibility antigens for therapy of leukemia. *Immunol. Cell Biol.* **89**, 396–407 (2011).
 34. Warren, E. H. *et al.* Therapy of relapsed leukemia after allogeneic hematopoietic cell transplantation with T cells specific for minor histocompatibility antigens. *Blood* **115**, 3869–3878 (2010).
 35. Robbins, P. F. *et al.* Cutting edge: persistence of transferred lymphocyte clonotypes correlates with cancer regression in patients receiving cell transfer therapy. *J Immunol* **173**, 7125–7130 (2004).
 36. Morgan, R. A. *et al.* Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* **314**, 126–129 (2006).
 37. Langerhans, P. Ueber die Nerven der menschlichen Haut. *Virchows archiv* **44**, 325–337 (1868).
 38. Steinman, R. M. & Cohn, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral

- lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* **137**, 1142–1162 (1973).
39. Steinman, R. M. *et al.* Dendritic cells of the mouse: identification and characterization. *J Invest Dermatol* **75**, 14–16 (1980).
 40. Ardavin, C., Wu, L., Li, C. L. & Shortman, K. Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature* **362**, 761–763 (1993).
 41. Shi, Y., Evans, J. E. & Rock, K. L. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* **425**, 516–521 (2003).
 42. Bernard, J. J. *et al.* Ultraviolet radiation damages self noncoding RNA and is detected by TLR3. *Nat Med* (2012). doi:10.1038/nm.2861
 43. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C. A. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394–397 (1997).
 44. Medzhitov, R. & Janeway, C. A. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* **91**, 295–298 (1997).
 45. Banchereau, J. & Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245–252 (1998).
 46. Poulin, L. F. *et al.* DNGR-1 is a specific and universal marker of mouse and human Batf3-dependent dendritic cells in lymphoid and non-lymphoid tissues. *Blood* (2012). doi:10.1182/blood-2012-01-406967
 47. Hildner, K. *et al.* Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* **322**, 1097–1100 (2008).
 48. Edelson, B. T. *et al.* Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8alpha+ conventional dendritic cells. *J Exp Med* **207**, 823–836 (2010).
 49. Wilson, N. S. *et al.* Most lymphoid organ dendritic cell types are phenotypically and functionally immature. *Blood* **102**, 2187–2194 (2003).
 50. Schulz, O. & Reis E Sousa, C. Cross-presentation of cell-associated antigens by CD8alpha+ dendritic cells is attributable to their ability to internalize dead cells. *Immunology* **107**, 183–189 (2002).
 51. Haan, den, J. M., Lehar, S. M. & Bevan, M. J. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med* **192**, 1685–1696 (2000).
 52. Schulz, O. *et al.* CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. *Immunity* **13**, 453–462 (2000).
 53. Yamazaki, S. *et al.* CD8+ CD205+ splenic dendritic cells are specialized to induce Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* **181**, 6923–6933 (2008).
 54. Proietto, A. I. *et al.* Dendritic cells in the thymus contribute to T-regulatory cell induction. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 19869–19874 (2008).
 55. Kronin, V. *et al.* A subclass of dendritic cells regulates the response of naive CD8 T cells by limiting their IL-2 production. *J Immunol* **157**, 3819–3827 (1996).
 56. Kronin, V., Hochrein, H., Shortman, K. & Kelso, A. Regulation of T cell cytokine production by dendritic cells. *Immunol. Cell Biol.* **78**, 214–223 (2000).
 57. Toubai, T. *et al.* Host-derived CD8+ dendritic cells are required for induction of optimal graft-versus-tumor responses after experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* **121**, 4231–4241 (2013).
 58. Toubai, T. *et al.* Immunization with host-type CD8{alpha}+ dendritic cells reduces experimental acute GVHD in an IL-10-dependent manner. *Blood* **115**, 724–735 (2010).

59. Belz, G. T. & Nutt, S. L. Transcriptional programming of the dendritic cell network. *Nat Rev Immunol* **12**, 101–113 (2012).
60. Allenspach, E. J., Lemos, M. P., Porrett, P. M., Turka, L. A. & Laufer, T. M. Migratory and lymphoid-resident dendritic cells cooperate to efficiently prime naive CD4 T cells. *Immunity* **29**, 795–806 (2008).
61. Dudziak, D. *et al.* Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science* **315**, 107–111 (2007).
62. Bajénoff, M., Granjeaud, S. & Guerder, S. The strategy of T cell antigen-presenting cell encounter in antigen-draining lymph nodes revealed by imaging of initial T cell activation. *J Exp Med* **198**, 715–724 (2003).
63. Watanabe, N. *et al.* Kinetics of pDCs, mDCs, $\gamma\delta$ T cells and regulatory T cells in association with graft versus host disease after hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Lab Hematol* **33**, 378–390 (2011).
64. Horváth, R. *et al.* Kinetics of dendritic cells reconstitution and costimulatory molecules expression after myeloablative allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: implications for the development of acute graft-versus host disease. *Clin. Immunol.* **131**, 60–69 (2009).
65. Haniffa, M. A. *et al.* Differential rates of replacement of human dermal dendritic cells and macrophages during hematopoietic stem cell transplantation. *J Exp Med* **206**, 371–385 (2009).
66. Li, H. *et al.* Langerhans cells are not required for graft-versus-host disease. *Blood* **117**, 697–707 (2011).
67. Li, H. *et al.* Profound Depletion of Host Conventional Dendritic Cells, Plasmacytoid Dendritic Cells, and B Cells Does Not Prevent Graft-versus-Host Disease Induction. *J Immunol* (2012). doi:10.4049/jimmunol.1102795
68. Shlomchik, W. D. *et al.* Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* **285**, 412–415 (1999).
69. Duffner, U. A. *et al.* Host dendritic cells alone are sufficient to initiate acute graft-versus-host disease. *J Immunol* **172**, 7393–7398 (2004).
70. Markey, K. A. *et al.* Conventional dendritic cells are the critical donor APC presenting alloantigen after experimental bone marrow transplantation. *Blood* **113**, 5644–5649 (2009).
71. Koyama, M. *et al.* Recipient nonhematopoietic antigen-presenting cells are sufficient to induce lethal acute graft-versus-host disease. *Nat Med* **18**, 135–142 (2012).
72. Asselin-Paturel, C. *et al.* Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol* **2**, 1144–1150 (2001).
73. Colonna, M., Trinchieri, G. & Liu, Y.-J. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* **5**, 1219–1226 (2004).
74. Swiecki, M. & Colonna, M. Unraveling the functions of plasmacytoid dendritic cells during viral infections, autoimmunity, and tolerance. *Immunol Rev* **234**, 142–162 (2010).
75. Gurney, K. B., Colantonio, A. D., Blom, B., Spits, H. & Uittenbogaart, C. H. Endogenous IFN- α production by plasmacytoid dendritic cells exerts an antiviral effect on thymic HIV-1 infection. *J Immunol* **173**, 7269–7276 (2004).
76. Hoeffel, G. *et al.* Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* **27**, 481–492 (2007).
77. Reizis, B., Bunin, A., Ghosh, H. S., Lewis, K. L. & Sisirak, V. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 163–183 (2011).
78. Waller, E. K. *et al.* Larger numbers of CD4(bright) dendritic cells in donor

- bone marrow are associated with increased relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* **97**, 2948–2956 (2001).
79. Koyama, M. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells prime alloreactive T cells to mediate graft-versus-host disease as antigen-presenting cells. *Blood* **113**, 2088–2095 (2009).
 80. Kappler, J. W., Roehm, N. & Murrack, P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* **49**, 273–280 (1987).
 81. Mariathasan, S., Jones, R. G. & Ohashi, P. S. Signals involved in thymocyte positive and negative selection. *Semin. Immunol.* **11**, 263–272 (1999).
 82. Ma, D., Wei, Y. & Liu, F. Regulatory mechanisms of thymus and T cell development. *Dev. Comp. Immunol.* **39**, 91–102 (2013).
 83. Melief, C. J. *et al.* Dendritic cells and antigen presentation in the regulation of cytotoxic T lymphocyte responses against viruses and transplantation antigens. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **532**, 280–291 (1988).
 84. Kapsenberg, M. L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* **3**, 984–993 (2003).
 85. Acuto, O. & Michel, F. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol* **3**, 939–951 (2003).
 86. Schwartz, R. H. T cell anergy. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 305–334 (2003).
 87. Hsieh, C. S. *et al.* Development of TH1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* **260**, 547–549 (1993).
 88. Moser, M. & Murphy, K. M. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol* **1**, 199–205 (2000).
 89. Wang, X. *et al.* Mechanisms of antigen presentation to T cells in murine graft-versus-host disease: cross-presentation and the appearance of cross-presentation. *Blood* **118**, 6426–6437 (2011).
 90. Li, J. *et al.* Roles of CD28, CTLA4, and inducible costimulator in acute graft-versus-host disease in mice. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **17**, 962–969 (2011).
 91. 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. *J Immunol* **155**, 1151–1164 (1995).
 92. Malek, T. R., Yu, A., Vincek, V., Scibelli, P. & Kong, L. CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity* **17**, 167–178 (2002).
 93. Thornton, A. M., Donovan, E. E., Piccirillo, C. A. & Shevach, E. M. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4⁺CD25⁺ T cell suppressor function. *J Immunol* **172**, 6519–6523 (2004).
 94. Schwartz, R. H. Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nat Immunol* **6**, 327–330 (2005).
 95. Schubert, L. A., Jeffery, E., Zhang, Y., Ramsdell, F. & Ziegler, S. F. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J Biol Chem* **276**, 37672–37679 (2001).
 96. Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**, 1057–1061 (2003).
 97. Wildin, R. S., Smyk-Pearson, S. & Filipovich, A. H. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J. Med. Genet.* **39**, 537–545 (2002).
 98. Oberle, N., Eberhardt, N., Falk, C. S., Krammer, P. H. & Suri-Payer, E. Rapid suppression of cytokine transcription in human CD4⁺CD25⁺ T cells by

- CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells: independence of IL-2 consumption, TGF- β , and various inhibitors of TCR signaling. *J Immunol* **179**, 3578–3587 (2007).
99. Asseman, C., Mauze, S., Leach, M. W., Coffman, R. L. & Powrie, F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* **190**, 995–1004 (1999).
 100. Jonuleit, H. *et al.* Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J Exp Med* **196**, 255–260 (2002).
 101. Bardel, E., Larousserie, F., Charlot-Rabiega, P., Coulomb-L'Herminé, A. & Devergne, O. Human CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells do not constitutively express IL-35. *J Immunol* **181**, 6898–6905 (2008).
 102. Wang, L. *et al.* Graft-versus-host disease is enhanced by selective CD73 blockade in mice. *PLoS ONE* **8**, e58397 (2013).
 103. Jenabian, M.-A. *et al.* Regulatory T Cells Negatively Affect IL-2 Production of Effector T Cells through CD39/Adenosine Pathway in HIV Infection. *PLoS Pathog.* **9**, e1003319 (2013).
 104. Read, S., Malmström, V. & Powrie, F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* **192**, 295–302 (2000).
 105. Huang, C.-T. *et al.* Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* **21**, 503–513 (2004).
 106. Bopp, T. *et al.* Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med* **204**, 1303–1310 (2007).
 107. Fassbender, M. *et al.* Cyclic adenosine monophosphate and IL-10 coordinately contribute to nTreg cell-mediated suppression of dendritic cell activation. *Cell. Immunol.* **265**, 91–96 (2010).
 108. Weber, M. *et al.* Mechanisms of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases in Modulating T Cell Responses in Murine Graft-versus-Host Disease. *PLoS ONE* **8**, e58110 (2013).
 109. Hoffmann, P., Ermann, J., Edinger, M., Fathman, C. G. & Strober, S. Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med* **196**, 389–399 (2002).
 110. Edinger, M. *et al.* CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med* **9**, 1144–1150 (2003).
 111. Jonuleit, H. *et al.* Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* **193**, 1285–1294 (2001).
 112. Hoffmann, P., Eder, R., Kunz-Schughart, L. A., Andreesen, R. & Edinger, M. Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4(+)CD25^{high} regulatory T cells. *Blood* **104**, 895–903 (2004).
 113. Brunstein, C. G. *et al.* Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood* **117**, 1061–1070 (2011).
 114. Koreth, J. *et al.* Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *N. Engl. J. Med.* **365**, 2055–2066 (2011).
 115. Allman, D., Li, J. M. & Hardy, R. R. Commitment to the B lymphoid lineage occurs before DH-JH recombination. *J Exp Med* **189**, 735–740 (1999).
 116. Melamed, D., Benschop, R. J., Cambier, J. C. & Nemazee, D. Developmental

- regulation of B lymphocyte immune tolerance compartmentalizes clonal selection from receptor selection. *Cell* **92**, 173–182 (1998).
117. Casellas, R. *et al.* Contribution of receptor editing to the antibody repertoire. *Science* **291**, 1541–1544 (2001).
 118. Balázs, M., Martin, F., Zhou, T. & Kearney, J. Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity* **17**, 341–352 (2002).
 119. McHeyzer-Williams, M. *et al.* Helper T-cell-regulated B-cell immunity. *Microbes Infect.* **5**, 205–212 (2003).
 120. Vallé, A. *et al.* Activation of human B lymphocytes through CD40 and interleukin 4. *Eur J Immunol* **19**, 1463–1467 (1989).
 121. Jumper, M. D., Splawski, J. B., Lipsky, P. E. & Meek, K. Ligation of CD40 induces sterile transcripts of multiple Ig H chain isotypes in human B cells. *J Immunol* **152**, 438–445 (1994).
 122. Schebesta, M., Heavey, B. & Busslinger, M. Transcriptional control of B-cell development. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 216–223 (2002).
 123. Di Noia, J. M. & Neuberger, M. S. Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 1–22 (2007).
 124. Schroeder, H. W. & Cavacini, L. Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, S41–52 (2010).
 125. Fillatreau, S., Sweenie, C. H., McGeachy, M. J., Gray, D. & Anderton, S. M. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol* **3**, 944–950 (2002).
 126. Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Takedatsu, H., Blumberg, R. S. & Bhan, A. K. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity* **16**, 219–230 (2002).
 127. Lampropoulou, V. *et al.* TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity. *J Immunol* **180**, 4763–4773 (2008).
 128. Teichmann, L. L. *et al.* B cell-derived IL-10 does not regulate spontaneous systemic autoimmunity in MRL.Fas(lpr) mice. *J Immunol* **188**, 678–685 (2012).
 129. Haben, I. *et al.* T-cell-derived, but not B-cell-derived, IL-10 suppresses antigen-specific T-cell responses in *Litomosoides sigmodontis*-infected mice. *Eur J Immunol* (2013). doi:10.1002/eji.201242929
 130. Duddy, M. *et al.* Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J Immunol* **178**, 6092–6099 (2007).
 131. Goetz, M., Atreya, R., Ghalibafian, M., Galle, P. R. & Neurath, M. F. Exacerbation of ulcerative colitis after rituximab salvage therapy. *Inflamm. Bowel Dis.* **13**, 1365–1368 (2007).
 132. Zdanov, A. *et al.* Crystal structure of interleukin-10 reveals the functional dimer with an unexpected topological similarity to interferon gamma. *Structure* **3**, 591–601 (1995).
 133. Pestka, S. *et al.* Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 929–979 (2004).
 134. Fiorentino, D. F., Bond, M. W. & Mosmann, T. R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* **170**, 2081–2095 (1989).
 135. Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. & O'Garra, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 683–765 (2001).
 136. Monfrecola, G. *et al.* Nicotinamide downregulates gene expression of

- interleukin-6, interleukin-10, monocyte chemoattractant protein-1, and tumour necrosis factor- α gene expression in HaCaT keratinocytes after ultraviolet B irradiation. *Clin. Exp. Dermatol.* **38**, 185–188 (2013).
137. Weber-Nordt, R. M., Meraz, M. A. & Schreiber, R. D. Lipopolysaccharide-dependent induction of IL-10 receptor expression on murine fibroblasts. *J Immunol* **153**, 3734–3744 (1994).
 138. Mirmohammadsadegh, A. *et al.* Differential modulation of pro- and anti-inflammatory cytokine receptors by N-(4-trifluoromethylphenyl)-2-cyano-3-hydroxy-crotonic acid amide (A77 1726), the physiologically active metabolite of the novel immunomodulator leflunomide. *Biochem. Pharmacol.* **55**, 1523–1529 (1998).
 139. Wolk, K., Kunz, S., Asadullah, K. & Sabat, R. Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? *J Immunol* **168**, 5397–5402 (2002).
 140. Takeda, K. *et al.* Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity* **10**, 39–49 (1999).
 141. Glocker, E.-O., Kotlarz, D., Klein, C., Shah, N. & Grimbacher, B. IL-10 and IL-10 receptor defects in humans. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1246**, 102–107 (2011).
 142. Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Mosmann, T. R., Howard, M. & O'Garra, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* **147**, 3815–3822 (1991).
 143. D'Andrea, A. *et al.* Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med* **178**, 1041–1048 (1993).
 144. Kopydlowski, K. M. *et al.* Regulation of macrophage chemokine expression by lipopolysaccharide in vitro and in vivo. *J Immunol* **163**, 1537–1544 (1999).
 145. de Waal Malefyt, R. *et al.* Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* **174**, 915–924 (1991).
 146. Veldhoen, M., Moncrieffe, H., Hocking, R. J., Atkins, C. J. & Stockinger, B. Modulation of dendritic cell function by naive and regulatory CD4⁺ T cells. *J Immunol* **176**, 6202–6210 (2006).
 147. Kryczek, I. *et al.* Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells. *J Immunol* **177**, 40–44 (2006).
 148. Akbari, O., DeKruyff, R. H. & Umetsu, D. T. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol* **2**, 725–731 (2001).
 149. de Waal Malefyt, R., Yssel, H. & de Vries, J. E. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4⁺ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J Immunol* **150**, 4754–4765 (1993).
 150. Jinquan, T. *et al.* CXC chemokine receptor 4 expression and stromal cell-derived factor-1 α -induced chemotaxis in CD4⁺ T lymphocytes are regulated by interleukin-4 and interleukin-10. *Immunology* **99**, 402–410 (2000).
 151. Rousset, F. *et al.* Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 1890–1893 (1992).
 152. Itoh, K. & Hirohata, S. The role of IL-10 in human B cell activation, proliferation, and differentiation. *J Immunol* **154**, 4341–4350 (1995).

153. Bustamante, M. F. *et al.* Cellular immune responses in multiple sclerosis patients treated with interferon-beta. *Clin. Exp. Immunol.* **171**, 243–246 (2013).
154. Kotlarz, D. *et al.* Loss of interleukin-10 signaling and infantile inflammatory bowel disease: implications for diagnosis and therapy. *Gastroenterology* **143**, 347–355 (2012).
155. Grimbaldston, M. A., Nakae, S., Kalesnikoff, J., Tsai, M. & Galli, S. J. Mast cell-derived interleukin 10 limits skin pathology in contact dermatitis and chronic irradiation with ultraviolet B. *Nat Immunol* **8**, 1095–1104 (2007).
156. Chien, J. W. *et al.* Evaluation of published single nucleotide polymorphisms associated with acute GVHD. *Blood* **119**, 5311–5319 (2012).
157. Dickinson, A. M. *et al.* Impact of genomic risk factors on outcome after hematopoietic stem cell transplantation for patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica* **95**, 922–927 (2010).
158. Holler, E. *et al.* Prognostic significance of increased IL-10 production in patients prior to allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* **25**, 237–241 (2000).
159. Min, C.-K. *et al.* The kinetics of circulating cytokines including IL-6, TNF-alpha, IL-8 and IL-10 following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* **28**, 935–940 (2001).
160. Baker, K. S. *et al.* High spontaneous IL-10 production in unrelated bone marrow transplant recipients is associated with fewer transplant-related complications and early deaths. *Bone Marrow Transplant* **23**, 1123–1129 (1999).
161. Williamson, E., Garside, P., Bradley, J. A., More, I. A. & Mowat, A. M. Neutralizing IL-12 during induction of murine acute graft-versus-host disease polarizes the cytokine profile toward a Th2-type alloimmune response and confers long term protection from disease. *J Immunol* **159**, 1208–1215 (1997).
162. Morris, E. S. *et al.* Donor treatment with pegylated G-CSF augments the generation of IL-10-producing regulatory T cells and promotes transplantation tolerance. *Blood* **103**, 3573–3581 (2004).
163. Min, C.-K., Kim, B.-G., Park, G., Cho, B. & Oh, I.-H. IL-10-transduced bone marrow mesenchymal stem cells can attenuate the severity of acute graft-versus-host disease after experimental allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* **39**, 637–645 (2007).
164. Blazar, B. R., Carroll, S. F. & Valleria, D. A. Prevention of murine graft-versus-host disease and bone marrow alloengraftment across the major histocompatibility barrier after donor graft preincubation with anti-LFA1 immunotoxin. *Blood* **78**, 3093–3102 (1991).
165. van Leeuwen, L., Guiffre, A., Atkinson, K., Rainer, S. P. & Sewell, W. A. A two-phase pathogenesis of graft-versus-host disease in mice. *Bone Marrow Transplant* **29**, 151–158 (2002).
166. Schroeder, M. A. & DiPersio, J. F. Mouse models of graft-versus-host disease: advances and limitations. *Dis Model Mech* **4**, 318–333 (2011).
167. Welniak, L. A., Blazar, B. R. & Murphy, W. J. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 139–170 (2007).
168. Sprent, J., Schaefer, M., Gao, E. K. & Korngold, R. Role of T cell subsets in lethal graft-versus-host disease (GVHD) directed to class I versus class II H-2 differences. I. L3T4+ cells can either augment or retard GVHD elicited by Lyt-2+ cells in class I different hosts. *J Exp Med* **167**, 556–569 (1988).

169. Chakraverty, R. *et al.* An inflammatory checkpoint regulates recruitment of graft-versus-host reactive T cells to peripheral tissues. *J Exp Med* **203**, 2021–2031 (2006).
170. Billiau, A. D., Fevery, S., Rutgeerts, O., Landuyt, W. & Waer, M. Transient expansion of Mac1+Ly6-G+Ly6-C+ early myeloid cells with suppressor activity in spleens of murine radiation marrow chimeras: possible implications for the graft-versus-host and graft-versus-leukemia reactivity of donor lymphocyte infusions. *Blood* **102**, 740–748 (2003).
171. Bennett, M. *et al.* Cytokine and cytotoxic pathways of NK cell rejection of class I-deficient bone marrow grafts: influence of mouse colony environment. *Int Immunol* **10**, 785–790 (1998).
172. Schüll, C. *et al.* Linear-Hyperbranched Graft-Copolymers via Grafting-to Strategy Based on Hyperbranched Dendron Analogues and Reactive Ester Polymers. *Macromolecules* **45**, 5901–5910 (2012).
173. Kühn, R., Löhler, J., Rennick, D., Rajewsky, K. & Müller, W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* **75**, 263–274 (1993).
174. Berg, D. J. *et al.* Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *J. Clin. Invest.* **98**, 1010–1020 (1996).
175. Neves, P. *et al.* Signaling via the MyD88 adaptor protein in B cells suppresses protective immunity during *Salmonella typhimurium* infection. *Immunity* **33**, 777–790 (2010).
176. Roers, A. *et al.* T cell-specific inactivation of the interleukin 10 gene in mice results in enhanced T cell responses but normal innate responses to lipopolysaccharide or skin irritation. *J Exp Med* **200**, 1289–1297 (2004).
177. Madan, R. *et al.* Nonredundant roles for B cell-derived IL-10 in immune counter-regulation. *J Immunol* **183**, 2312–2320 (2009).
178. Ohnmacht, C. *et al.* Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *J Exp Med* **206**, 549–559 (2009).
179. Okuyama, M. *et al.* A novel in vivo inducible dendritic cell ablation model in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2010). doi:10.1016/j.bbrc.2010.05.157
180. Vignoni, M. *et al.* Mechanisms of DNA damage by photoexcited 9-methyl- β -carboline. *Org. Biomol. Chem.* (2013). doi:10.1039/c3ob40344k
181. Rausch, K., Reuter, A., Fischer, K. & Schmidt, M. Evaluation of Nanoparticle Aggregation in Human Blood Serum. *Biomacromolecules* (2010). doi:10.1021/bm100971q
182. Dehzad, N. *et al.* Regulatory T cells more effectively suppress Th1-induced airway inflammation compared with Th2. *J Immunol* **186**, 2238–2244 (2011).
183. Fluegel, S. *et al.* Self-assembly of monodisperse oligonucleotide-elastin block copolymers into stars and compound micelles. *Chemistry* **17**, 5503–5506 (2011).
184. Giembycz, M. A., Corrigan, C. J., Seybold, J., Newton, R. & Barnes, P. J. Identification of cyclic AMP phosphodiesterases 3, 4 and 7 in human CD4+ and CD8+ T-lymphocytes: role in regulating proliferation and the biosynthesis of interleukin-2. *Br. J. Pharmacol.* **118**, 1945–1958 (1996).
185. Michie, A. M., Lobban, M., Müller, T., Harnett, M. M. & Houslay, M. D. Rapid regulation of PDE-2 and PDE-4 cyclic AMP phosphodiesterase activity following ligation of the T cell antigen receptor on thymocytes: analysis using the selective inhibitors erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)-adenine (EHNA) and

- rolipram. *Cell. Signal.* **8**, 97–110 (1996).
186. Rowe, V. *et al.* Host B cells produce IL-10 following TBI and attenuate acute GVHD after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* **108**, 2485–2492 (2006).
 187. Yanaba, K. *et al.* A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity* **28**, 639–650 (2008).
 188. Ding, Q. *et al.* Regulatory B cells are identified by expression of TIM-1 and can be induced through TIM-1 ligation to promote tolerance in mice. *J. Clin. Invest.* **121**, 3645–3656 (2011).
 189. Tawara, I. *et al.* Donor- but not host-derived interleukin-10 contributes to the regulation of experimental graft-versus-host disease. *J. Leukoc. Biol.* **91**, 667–675 (2012).
 190. Tang, Q. & Bluestone, J. A. Plasmacytoid DCs and T(reg) cells: casual acquaintance or monogamous relationship? *Nat Immunol* **7**, 551–553 (2006).
 191. Klein, M. *et al.* Repression of cyclic adenosine monophosphate upregulation disarms and expands human regulatory T cells. *J Immunol* **188**, 1091–1097 (2012).
 192. Bazhin, A. V., Kahnert, S., Kimpfler, S., Schadendorf, D. & Umansky, V. Distinct metabolism of cyclic adenosine monophosphate in regulatory and helper CD4+ T cells. *Mol. Immunol.* **47**, 678–684 (2010).
 193. Gavin, M. A. *et al.* Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* **445**, 771–775 (2007).
 194. Yassin, A. A. & Saad, F. Testosterone and erectile dysfunction. *J. Androl.* **29**, 593–604 (2008).
 195. Antoniu, S. A. New therapeutic options in the management of COPD - focus on roflumilast. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* **6**, 147–155 (2011).
 196. Feng, G. *et al.* Functional regulatory T cells produced by inhibiting cyclic nucleotide phosphodiesterase type 3 prevent allograft rejection. *Sci Transl Med* **3**, 83ra40 (2011).
 197. Germann, T. *et al.* Interleukin-12/T cell stimulating factor, a cytokine with multiple effects on T helper type 1 (Th1) but not on Th2 cells. *Eur J Immunol* **23**, 1762–1770 (1993).
 198. Becker, C. *et al.* Protection from graft-versus-host disease by HIV-1 envelope protein gp120-mediated activation of human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Blood* **114**, 1263–1269 (2009).
 199. O'Shaughnessy, M. J. *et al.* Elevation of intracellular cyclic AMP in alloreactive CD4(+) T Cells induces alloantigen-specific tolerance that can prevent GVHD lethality in vivo. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **13**, 530–542 (2007).
 200. Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N. K., Valdez, P. A. & Hymowitz, S. G. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 71–109 (2011).
 201. Blazar, B. R., Taylor, P. A., Smith, S. R. & Vallera, D. A. Interleukin-10 administration decreases survival in murine recipients of major histocompatibility complex disparate donor bone marrow grafts. *Blood* **85**, 842–851 (1995).
 202. Mantovani, A., Cassatella, M. A., Costantini, C. & Jaillon, S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* **11**, 519–531 (2011).
 203. Foley, J. E., Mariotti, J., Ryan, K., Eckhaus, M. & Fowler, D. H. Th2 cell

- therapy of established acute graft-versus-host disease requires IL-4 and IL-10 and is abrogated by IL-2 or host-type antigen-presenting cells. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **14**, 959–972 (2008).
204. Németh, T. & Mócsai, A. The role of neutrophils in autoimmune diseases. *Immunol Lett* **143**, 9–19 (2012).
205. Fehr, T. *et al.* Alloreactive CD8 T cell tolerance requires recipient B cells, dendritic cells, and MHC class II. *J Immunol* **181**, 165–173 (2008).
206. Le Huu, D. *et al.* Donor-derived regulatory B cells are important for suppression of murine sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. *Blood* **121**, 3274–3283 (2013).
207. DiLillo, D. J., Matsushita, T. & Tedder, T. F. B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1183**, 38–57 (2010).
208. de Smedt, T. *et al.* Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur J Immunol* **27**, 1229–1235 (1997).
209. Wang, B. *et al.* Enhanced epidermal Langerhans cell migration in IL-10 knockout mice. *J Immunol* **162**, 277–283 (1999).
210. Sica, G. L. *et al.* B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity. *Immunity* **18**, 849–861 (2003).
211. Wang, X. *et al.* B7-H4 induces donor-specific tolerance in mouse islet allografts. *Cell Transplant* **21**, 99–111 (2012).
212. Reichardt, W. *et al.* Impact of mammalian target of rapamycin inhibition on lymphoid homing and tolerogenic function of nanoparticle-labeled dendritic cells following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Immunol* **181**, 4770–4779 (2008).
213. Takiishi, T., Tadokoro, C. E., Rizzo, L. V. & de Moraes, L. V. Early IL-10 production is essential for syngeneic graft acceptance. *J. Leukoc. Biol.* **92**, 259–264 (2012).
214. Ullrich, S. E. Mechanism involved in the systemic suppression of antigen-presenting cell function by UV irradiation. Keratinocyte-derived IL-10 modulates antigen-presenting cell function of splenic adherent cells. *J Immunol* **152**, 3410–3416 (1994).
215. Farrés, J. *et al.* Parp-2 is required to maintain hematopoiesis following sublethal γ -irradiation in mice. *Blood* **122**, 44–54 (2013).
216. Rizzitelli, A., Hawkins, E., Todd, H., Hodgkin, P. D. & Shortman, K. The proliferative response of CD4 T cells to steady-state CD8+ dendritic cells is restricted by post-activation death. *Int Immunol* **18**, 415–423 (2006).
217. Murphy, T. L., Tussiwand, R. & Murphy, K. M. Specificity through cooperation: BATF-IRF interactions control immune-regulatory networks. *Nat Rev Immunol* **13**, 499–509 (2013).
218. Derynck, R. *et al.* Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* **316**, 701–705 (1985).
219. Rifkin, D. B. Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability. *J Biol Chem* **280**, 7409–7412 (2005).

8 Eigene Publikationen

Publizierte Teile dieser Arbeit:

- Weber, M., Lupp, C., Stein, P., Kreft, A., Bopp, T., Wehler, T.C., Schmitt, E., Schild, H., Radsak, M.P., Mechanisms of cyclic nucleotide phosphodiesterases in modulating T cell responses in murine Graft-versus-Host Disease. *PLoS ONE* **8**, e58110 (2013).
- Weber, M., Stein, P., Prüfer, S., Kreft, A., Schmitt, E., Bopp, T., Roers, A., Fillatreau, S., Schild, H., Radsak, M.P., B cell derived IL-10 is critical for suppression of Graft-versus-Host Disease. - In Vorbereitung -

Weitere Publikationen:

- Stein, P., Weber, M., Prüfer, S., Schmid, B., Schmitt, E., Probst, H., Waisman, A., Langguth, P., Schild, H., Radsak, M.P., Regulatory T cells and IL-10 independently counterregulate cytotoxic T lymphocyte responses induced by transcutaneous immunization. *PLoS ONE* **6**, e27911 (2011).
- Prüfer, S., Weber, M., Stein, P., Bosmann, M., Stassen, M., Kreft, A., Schild, H., Radsak, M.P., Oxidative Burst and Neutrophil elastase contribute to clearance of *Aspergillus fumigatus* pneumonia in mice. *Immunobiology*, accepted for publication

8 Lebenslauf

Mechanisms of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases in Modulating T Cell Responses in Murine Graft-versus-Host Disease

Michael Weber¹, Corinna Lupp¹, Pamela Stein¹, Andreas Kreft², Tobias Bopp¹, Thomas C. Wehler², Edgar Schmitt¹, Hansjörg Schild¹, Markus P. Radsak^{3*}

1 Institute for Immunology, Johannes Gutenberg-University Medical Center, Mainz, Germany, **2** Institute of Pathology, Johannes Gutenberg-University Medical Center, Mainz, Germany, **3** Department Internal of Medicine III, University Medical Center, Johannes Gutenberg-University, Mainz, Germany

Abstract

Graft-versus-host disease (GvHD) is a key contributor to the morbidity and mortality after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). Regulatory Foxp3⁺ CD4⁺ T cells (T_{reg}) suppress conventional T cell activation and can control GvHD. In our previous work, we demonstrate that a basic mechanism of T_{reg} mediated suppression occurs by the transfer of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) to responder cells. Whether this mechanism is relevant for T_{reg} mediated suppression of GvHD is currently unknown. To address this question, bone marrow and T cells from C57BL/6 mice were transferred into lethally irradiated BALB/c recipients, and the course of GvHD and survival were monitored. Transplanted recipients developed severe GvHD that was strongly ameliorated by the transfer of donor T_{reg} cells. Towards the underlying mechanisms, *in vitro* studies revealed that T_{reg} communicated with DCs via gap junctions, resulting in functional inactivation of DC by a metabolic pathway involving cAMP that is modulated by the phosphodiesterase (PDE) 4 inhibitor rolipram. PDE2 or PDE3 inhibitors as well as rolipram suppressed allogeneic T cell activation, indirectly by enhancing T_{reg} mediated suppression of DC activation and directly by inhibiting responder T cell proliferation. In line with this, we observed a cooperative suppression of GvHD upon T_{reg} transfer and additional rolipram treatment. In conclusion, we propose that an important pathway of T_{reg} mediated control of GvHD is based on a cAMP dependent mechanism. These data provide the basis for future concepts to manipulate allogeneic T cell responses to prevent GvHD.

Citation: Weber M, Lupp C, Stein P, Kreft A, Bopp T, et al. (2013) Mechanisms of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases in Modulating T Cell Responses in Murine Graft-versus-Host Disease. PLoS ONE 8(3): e58110. doi:10.1371/journal.pone.0058110

Editor: Christian Taube, Leiden University Medical Center, The Netherlands

Received: September 3, 2012; **Accepted:** January 30, 2013; **Published:** March 6, 2013

Copyright: © 2013 Weber et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to M.P.R. and H.S. (Ra988/4-2), SFB TR52 TPA1 (T.B. and E.S.), the GRK 1043 International Graduate School of Immunotherapy (E.S. and T.B.), "Forschungszentrum Immunologie (FZI)" of the University medical center (H.S., E.S. and T.B.). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: radsak@uni-mainz.de

Introduction

For patients with high risk hematological malignancies allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is the only curative treatment option [1]. The therapeutic principle of HSCT relies on a graft versus leukemia (GvL) or graft versus tumor (GvT) effect generated by donor lymphocytes that specifically recognize and eliminate malignant cells in the recipient [2]. However, after HSCT additional immune responses may occur against healthy tissues creating graft-versus-host disease (GvHD), an important contributor to transplant related morbidity and mortality [3]. To improve the feasibility of HSCT, it will be crucial to gain the ability to guide immune responses in the desired way maintaining anti-viral and anti-tumor responses while controlling undesired responses, namely GvHD.

Naturally occurring regulatory T cells (T_{reg}) are responsible for maintaining peripheral self tolerance [4], but they may also play a role in the failure to control tumor growth as T_{reg} cell depletion can facilitate tumor rejection [5,6]. In the context of HSCT, T_{reg} cells have been shown to control GvHD [7–9], while on the other hand preserving GvT reactions [10]. However, the strategies to control effector T or T_{reg} cell

activity might be relevant since stringent inhibition of both may result in poor tumor outcome [9]. In addition, current clinical protocols demonstrate the feasibility and safety of T_{reg} cell transfer in humans [11], possibly opening T_{reg} based treatment options for patients beyond experimental settings in the near future. Hence, it is important to understand the relevant mechanisms of T_{reg} mediated suppression in HSCT.

Donor T cells are activated by conventional CD11c⁺ dendritic cells (DC) in the HSCT recipient [12–14]. In this context, the blockade of costimulatory molecules induces transplantation tolerance that is mediated by T cell anergy or T_{reg} subpopulations depending on the particular model used [15–17]. In general, T_{reg} mediated suppression occurs by cytokine independent [18–20], but contact dependent ways, i. e. via the glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor (GITR) [20], CTLA-4 or membrane-bound TGF-β [21]. Beyond this, the transfer of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) to target cells via gap junction intercellular communication (GJIC) is a key mechanism of T_{reg} mediated suppression [22,23], also important in T_{reg}-DC interaction that occurs by a direct contact (cAMP) dependent and by a contact independent pathway [24].

To examine the suppressive mechanisms utilized by T_{reg} cells in the context of HSCT, we investigated a MHC mismatched mouse model of acute GvHD. We confirm an important role for T_{reg} cells in ameliorating GvHD and show that T_{reg} cells communicate with DC via a GJIC and a cAMP dependent mechanism, resulting in the cooperative suppression of allogeneic MLR using the cAMP elevating drugs/phosphodiesterase (PDE) inhibitors. Conversely, we observed cooperative amelioration of GvHD by T_{reg} transfer and treatment with the PDE inhibitor rolipram. These results suggest that multimodal strategies combining T_{reg} cellular transfer with cAMP modulating drug therapies may be a new treatment strategy for acute GvHD. This may contribute to future concepts in improving the feasibility and efficacy of HSCT.

Materials and Methods

Reagents

Biotinylated anti-CD25 (7D4) was purchased from BD (Heidelberg, Germany), PE- conjugated streptavidin was obtained from Dianova (Hamburg, Germany), anti-PE beads were obtained from Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany). The following additional mAbs were used: anti-CD3 mAb (145-2C11) and anti-CD28 mAb (37.51). If required, mAbs were affinity purified using protein G–Sepharose (GE Healthcare, Munich, Germany). Mouse recombinant IL-2 was affinity purified. Rolipram was purchased from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany), Cilostazol was obtained from Tocris Biosciences (Bristol, UK), BAY-60-7550 was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, USA).

Mice

C57BL/6, BALB/c, and B6.SJL (CD45.1⁺) mice were obtained from Charles River Laboratories and bred in a specific pathogen-free colony in the animal facility of the JGU Mainz. All animal procedures were performed in accordance with the institutional guidelines and approved by the responsible national authority (National Investigation Office Rheinland-Pfalz, Approval ID: AZ 23 177-07/G07-1-009).

Cell Purification and Culture

Splenic DC from BALB/c mice were purified by density centrifugation as described previously [25] or bone marrow derived DC (BMDC) generated from bone marrow as described previously [26] and used as stimulators for allogeneic mixed lymphocyte reactions (MLR). Briefly, bone marrow from 6–8 weeks old mice was cultured in Iscoves medium supplemented with 5% fetal calf serum (FCS, inactivated at 56°C), 1% glutamine, 1% sodium pyruvate and GM-CSF (50 ng/ml). These cells were typically >85% CD11c⁺ as determined by flow cytometry. Furthermore, CD11c⁺ cells were CD80^{low}. Medium was changed on days 2 and 4. Cells were used for the experiments at day 6 as immature DC.

Responder T cells from C57BL/6 splenocytes were purified by anti-CD90.2 conjugated magnetic beads (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany) according to the manufacturer's instructions. T_{reg} depletion of CD90.2⁺ T cells was performed with biotinylated anti-CD25 (7D4) and magnetic streptavidin-conjugated microbeads (Miltenyi Biotec).

T_{reg} were isolated as described previously [22] using biotin-conjugated anti-CD25 mAb (7D4), PE-conjugated streptavidin and magnetic anti-PE microbeads (Miltenyi). CD25 sort was performed twice. CD25⁺-enriched T_{reg} cells were additionally depleted from CD8⁺ T cells, B cells and macrophages using anti-CD8, anti-B220 and anti-MAC1 Dynabeads (DynaL Biotech,

Hamburg, Germany). The purity of the resulting CD25⁺ Foxp3⁺ T_{reg} cells was typically >95%. In some experiments, T_{reg} cells were preactivated by a combination of plate-bound anti-CD3 mAb (145-2C11; 3 µg/ml) and anti-CD28 mAb (37.51; 3 µg/ml) in presence of 1000 U/ml IL-2 (Proleukine from Novartis, Nuremberg, Germany). Cells were splitted on day 3 without further anti-CD3/anti-CD28 stimulation and harvested on day 5 and used as preactivated T_{reg} (pre T_{reg}). In some experiments, T_{reg} cells were labelled with calcein (1 µM, from Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) for 30 min. at 37°C, and washed twice in medium before use. Where indicated the GJIC inhibitor GAP27 (300 µM, from Biozol, Eching, Germany) was added [22].

For MLR, 2×10^5 CFDA-SE labelled (1 µM, from Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) responder T cells per well were added to DC and/or T_{reg} in titrated ratios as indicated and cultured for 4 days in 96 well plates before cell harvest. Cells were washed, labelled with specific mAbs and analyzed for CFDA-SE dilution as indicator for proliferation by flow cytometry. Alternatively, where indicated activation of responder T cells in MLR was assessed by ³H-thymidine incorporation as follows: unlabeled C57BL/6 T cells (CD90.2⁺ T cells purified by magnetic sorting) were added to the MLR culture. ³H-thymidine (0.5 µCi/well) was added on day 3 of the culture, cells were harvested 18 h later for assessment of ³H-thymidine uptake by β scintillation counting.

Where indicated, DC or T_{reg} were fixed after 4 h of cocultivation as follows: Cells were washed twice in PBS and suspended in 0.1% glutaraldehyde (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in PBS. After 30 seconds lysine (0.2 M) and FCS were added to quench the reaction. The cells were washed twice in medium and added to secondary cultures as indicated.

Flow Cytometric Analyses and Calcein Transfer

After coculture cells were harvested, washed and stained for 30 minutes with antibodies. The following mAbs were used for analyses by flow cytometry: CD8 (clone 53-6.7), CD11c (N418), CD80 (16-10A1), CD86 (GL1), CD40 (3/23), B7-H1 (MIH5), B7-DC (122), MHCII (M5/114.15.2), CD90.2 (53-2.1), CD45.1 (clone A20; all from eBiosciences or BD Pharmingen, Hamburg, Germany). Viability was determined by propidium iodide.

For calcein transfer assays, calcein labelled pre T_{reg} and BMDC were cocultured in a ratio of 5:1 for 4 hours and subsequently harvested for FACS analysis.

Intracellular cAMP levels were assessed by a cAMP specific mAb (SMP486, Abcam, Cambridge, UK) [27] labelled with fluorescein (Lightning-Link fluorescein conjugation kit, Innova Biosciences, Cambridge, UK). After 4 h of coculture of pre T_{reg} and BMDC, the cell surface was stained with anti-CD11c and anti-CD90.2, cells were fixed with 4% PFA and permeabilized with saponine and subsequently stained with fluorescein-labeled anti-cAMP or an fluorescein-labeled isotype control.

All analyses were performed with a FACSCanto or a LSRII flow cytometer and FACSDiva software (BD) or FlowJo (Tree Star Inc.).

Purification of DC after Cocultures

After 4 h of coculture of pre T_{reg} and DC, cells were separated by anti-CD11c microbeads (Miltenyi Biotec) according to the manufacturers instructions. Purity of CD11c⁺ MHCII⁺ double positive cells was assessed by flow cytometry and was >97%.

Cyclic AMP ELISA

To assess cytosolic cAMP concentrations, DC were washed three times in PBS, lysed in 0.1 N HCl (1 × 10⁷/ml) and a cAMP specific ELISA was performed (Direct cAMP EIA kit, Enzo Life

Sciences, Lörrach, Germany). The resulting cAMP concentration (pmol/ml) was calculated for 1×10^6 cells.

IL-12 ELISA

Splenic DC were stimulated in triplicate wells (96-well plate) for 2 days as indicated. The cell free supernatants were collected and frozen at -20°C until required. The concentration of IL-12p40/p70 was assessed in the supernatants by sandwich ELISA (obtained from BD Pharmingen), according to the manufacturer's instructions.

Bone Marrow Transplantations

Mice were transplanted following a standard protocol. At day -1 recipient animals received total body irradiation (TBI, 850 cGy for BALB/c) from ^{137}Cs source (OB58-BA, Buchler, Braunschweig, Germany). On day 0, allogeneic donor T cell depleted bone marrow cells (TCD-BM; 5×10^6 cells per animal) and 5×10^5 CD90.2⁺ T cells (BM/T) were transferred by intravenous injection. Where indicated T_{reg} cells (5×10^5 cells per animal) were co-injected. The animals were maintained under specific pathogen free conditions and received antibiotics (Sulfa-doxin-Trimethoprim 1 g/ml in the drinking water) post transplantation.

Bone marrow cells were isolated from femura and tibiae, erythrocytes were lysed, T cells were depleted by using magnetic anti-CD90.2 microbeads (Miltenyi Biotec). Cells were washed twice and injected suspended in PBS.

Assessment of GvHD

The degree of systemic GvHD was examined at least every other day using a scoring system as described elsewhere [28]. The scoring system includes 5 clinical parameters: weight loss, posture, activity, fur texture, and skin integrity. The scoring system was modified as pointed out in Table 1 using four instead three categories for weight loss to reduce animal suffering. Animals with a score of 2 or greater were inspected daily. To further limit animal suffering, mice with severe symptoms of GvHD, such as severe weight loss, reduced activity, hunched posture and scrubby fur texture as determined by clinical scores equal or greater than 6, were immediately euthanized by CO_2 , as required by the institutional animal ethics guide lines and the day subsequent to death determined as the following day.

Histology

Mice were sacrificed on day 10 after transplantation, fur on the back was removed mechanically and biopsies of the skin were taken, fixed in 4% buffered formalin, parafine wax embedded,

sectioned and stained with haematoxylin and eosin according to standard protocols.

Statistical Analysis

Statistical analyses comparing two groups of assumed Gaussian distribution were performed by a two-tailed Student's *t*-test using GraphPad Prism (version 5.0a for Mac OSX, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com). Alternatively, a Mann-Whitney *U*-test was used as indicated for other distributions. For differences in survival, the indicated groups were compared and analyzed by Mantel-Cox test. For all analyses, $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Regulatory T cells Suppress Graft-versus-Host Disease

In HSCT, it has been clearly demonstrated that T_{reg} cells can control GvHD [3,7]. However, it is not clear how this is mediated in detail and multiple mechanisms of T_{reg} mediated suppression have been described. To address this issue, we used a MHC mismatched HSCT model where BALB/c wild type hosts are lethally irradiated and transplanted with bone marrow and purified T cells from C57BL/6 mice. As depicted in Fig. 1, the animals succumbed to GvHD with a median survival of 40 days. Upon transfer of T_{reg} cells, we observed protection from lethal GvHD in the transplanted animals (median survival not reached, $p < 0.001$) which is consistent with previous reports [7].

Regulatory T cells Communicate with Allogeneic Dendritic Cells via Gap Junctions and Mediate a Suppressive Dendritic Cell Phenotype

In our previous work, we have characterized the principle ability of T_{reg} cells to inhibit T cell responses by suppression of DC activation. In continuation of this work, we were interested whether these mechanisms of T_{reg} mediated inhibition of DC activation are also relevant for the suppression of allogeneic T cell activation and the initiation of GvHD. We and others have demonstrated before that T_{reg} cells utilize a GJIC dependent pathway to suppress CD8⁺ T cell, CD4⁺ T cell and DC activation [22,24,29]. Therefore we asked for the relevant T_{reg} interaction partners in the setting of alloreactive T cell activation. We used the fluorescent dye calcein that can be

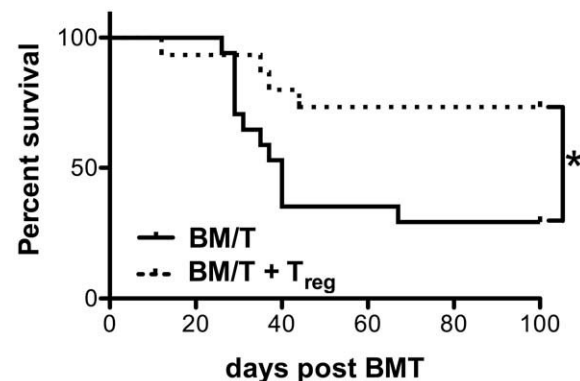


Figure 1. T_{reg} cells suppress GvHD. BALB/c recipient mice were lethally irradiated (8,5 Gy) and received allogeneic C57BL/6 TCD-BM (5×10^6 cells) and Thy1.2⁺ T cells (5×10^5 cells, WT, black line, $n = 17$). A second group additionally received C57BL/6 T_{reg} cells (5×10^5 cells, WT+WT T_{reg}, broken line, $n = 15$). Survival was monitored for 100 days. Combined data from 3 independent experiments are shown. (*) indicates for $P < 0,05$ according to a Mantel-Cox-Test. doi:10.1371/journal.pone.0058110.g001

Table 1. GvHD clinical Score.

Score	Weight loss	Skin	Activity	Posture	Fur texture
0	<5%	normal	normal	normal	normal
1	5–10%	flaked	reduced	hunched	scrubby
2	10–20%	explicit fur loss	inactive	severely hunched	severely scrubby
3	>20%				

Mice were evaluated for clinical signs of GvHD twice weekly according to Table 1 for each category. Individual scoring points were cumulated. Mice were sacrificed when exceeding a cumulative score ≥ 6 .

doi:10.1371/journal.pone.0058110.t001

transferred from one cell to another only via GJIC [24,30]. T_{reg} cells were labelled with calcein and cocultured with DC and responder T cells for 4 hours. Subsequently, the amount of green fluorescent calcein was quantified in the lymphocyte or DC gate after exclusion of conjugates and doublets as illustrated in Fig. 2A. In the quantitative analysis (Fig. 2B), we detected a transfer of calcein from T_{reg} to T cells. However, the relative amount transferred to DC was significantly higher. As a control, we co-incubated the cells with T_{reg} cells that had been labelled with CFDA-SE, a green fluorescent dye that cannot be passed over from one cell to another by GJIC [29]. In this situation, we did not detect any transfer of fluorescence to DC or T cell populations (Fig. 2B, grey bars). The transfer of calcein was inhibited by the GJIC inhibitory peptide GAP27 (Fig. 2B, open bars) suggesting that T_{reg} cells and DC truly communicate via GJIC also in the context of allogeneic T cell activation.

To directly address whether this contact also affects the levels of intracellular cAMP in DC, we cocultured DC with T_{reg} cells for 4 h and separated the cells afterwards by magnetic sorting. Subsequently, we used a cAMP specific ELISA to quantify the amounts of cAMP in DC [22,24]. As depicted in Fig. 2C, DC harbour low levels of intracellular cAMP at baseline. Consistent with our previous results in the syngenic setting [24], cAMP levels in DC were significantly increased upon contact with T_{reg} cells. Importantly, the increase in cAMP after contact with T_{reg} cells was partly inhibited in the presence of the GJIC inhibitor GAP27 further supporting the relevance of a GJIC dependent pathway in this situation. Moreover, intracellular cAMP was even further increased in the presence of the PDE4 inhibitor rolipram. In addition, we analyzed the intracellular cAMP content in T_{reg} cells before or after cocultivation with DC by flow cytometry [27] and found that the cAMP levels in T_{reg} cells were significantly

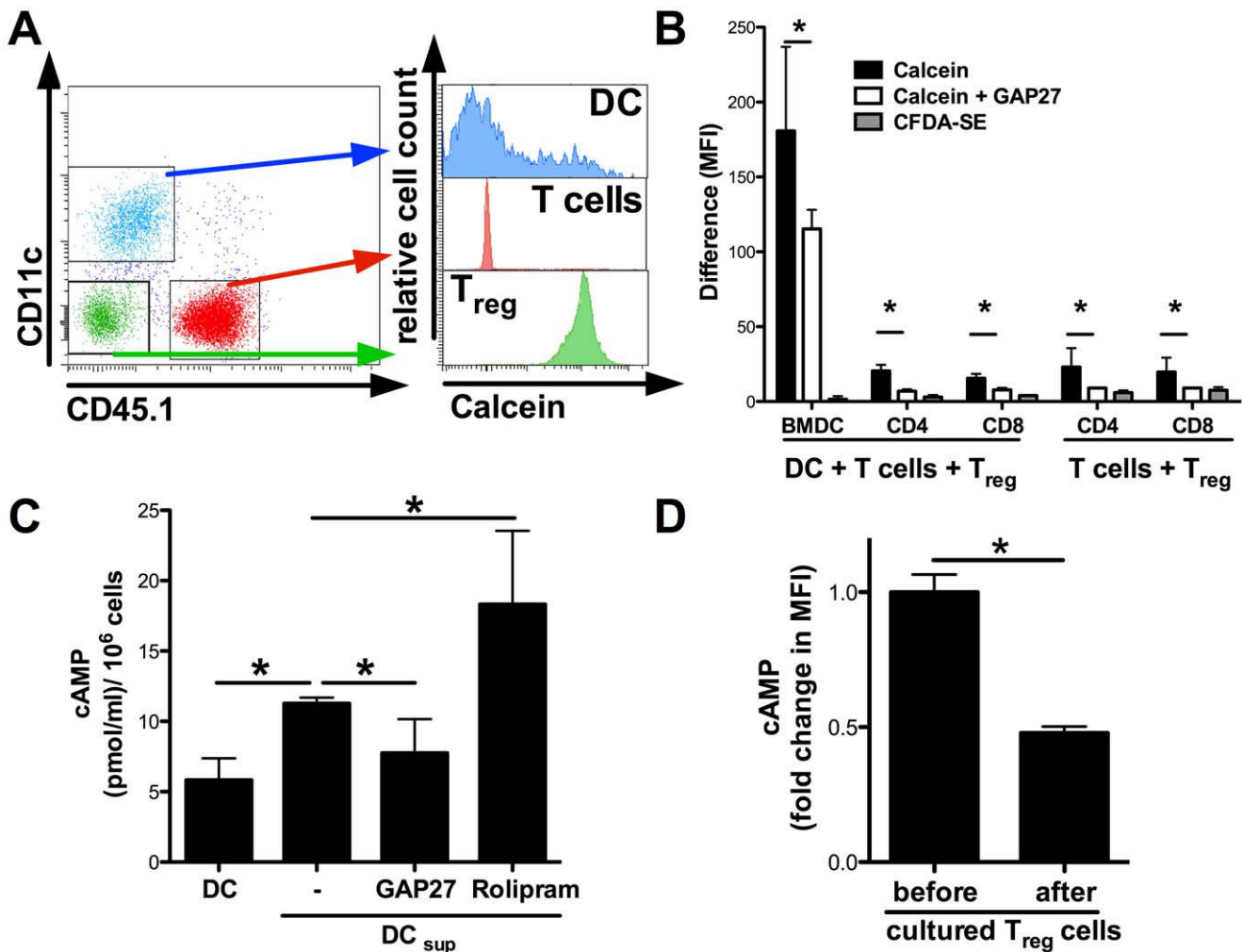


Figure 2. T_{reg} cells communicate with allogeneic DC directly via cell-to-cell contact and GJIC dependent manner. Bone marrow derived dendritic cells (BMDC from BALB/c mice, 3×10^4 per well) were cocultured with B6.SJL CD45.1⁺ T cells and C57BL/6 CD45.1⁻ calcein-labelled pre T_{reg} cells for 20 h in a 1:1:3 ratio. (A) Transfer of green fluorescent calcein after 20 h was analyzed by gating on CD45.1⁻CD11c⁺ DC, CD45.1⁻CD11c⁻ T_{reg} cells and CD45.1⁺CD11c⁻ T cells, respectively. (B) Differences of median fluorescence intensity (MFI) among BMDC, CD4⁺ and CD8⁺ T cells was assessed. Where indicated T_{reg} cells were preincubated with the gap junction inhibitor GAP27 (300 ng/ml). CFDA-SE (1 μ M) labelled T_{reg} cells were used as a control. (C) BALB/c BMDC were left untreated or cocultured with C57BL/6 pre T_{reg} cells in a 1:1 ratio in presence of soluble anti-CD3-mAb (3 μ g/ml). Where indicated GAP27 (300 ng/ml) or rolipram (300 nM) were added. After 4 h suppressed DC (DC_{sup}) were purified by CD11c specific MACS. Intracellular cAMP concentration was assessed by a specific ELISA after lysis of the cells. (D) Changes in cAMP levels after a 4 h coculture with BALB/c BMDC were measured by flow cytometry in C57BL/6 pre T_{reg} . (*) indicates significant differences by Mann-Whitney *U*-test. The data shown are representative for 2 independent experiments in duplicate or triplicate wells. doi:10.1371/journal.pone.0058110.g002

decreased after coculture, further supporting the idea of cAMP transfer to DC (Fig. 2D).

As a functional consequence of the contact with T_{reg} cells, DC downregulate the costimulatory molecule CD80 while upregulating the inhibitory molecules B7-H1 and B7-DC (Fig. 3 and Fig. S1), as also demonstrated by us previously in a syngeneic setting [24]. Taken together, our results suggest that T_{reg} cells induce a suppressive DC phenotype in a cell contact dependent manner that involves cAMP.

Inhibition of Phosphodiesterases and Regulatory T cells Cooperatively Suppress Allogeneic Mixed Lymphocyte Reactions

We have previously shown that the transfer of cAMP via GJIC from T_{reg} to recipient cells is important for T_{reg} mediated suppression. To enhance this metabolic pathway, the intracellular break down of cAMP may be blocked by inhibitors of PDEs, such as the PDE4 inhibitor rolipram which leads to an enhanced efficacy of T_{reg} mediated suppression *in vitro* and also *in vivo*, as recently demonstrated in an asthma model [23]. Beyond PDE4, also other PDEs can affect T_{reg} functionality as recently demonstrated by Feng and coworkers who find a pivotal role for the inhibition of PDE3 in allograft rejection [31].

Therefore we evaluated the role of inhibitors for PDE2 (BAY-60-7550), PDE3 (Cilostazol) or PDE4 (rolipram) in the suppression of allogeneic T cell responses in the presence or absence of T_{reg} cells. As shown in Fig. 4A, the additional presence of each of these inhibitors suppressed MLR induced T cell proliferation in a concentration dependent manner, even when not adding T_{reg} cells. Nevertheless, when T_{reg} cells were added to the MLR, T cell proliferation was further suppressed, either titrating the respective inhibitors (Fig. 4B) or the number of T_{reg} cells in the culture (Fig. 4C).

Since we found T_{reg} dependent as well as independent suppression of MLR by all tested PDE inhibitors, these results suggest that cAMP elevating drugs and T_{reg} cells have cooperative effects despite the fact that PDE isoforms differentially expressed, i.

e. PDE3b being highly repressed by T_{reg} cells [32]. This indicates that these drugs mediate suppression of MLR by multiple mechanisms.

Rolipram Enhances T_{reg} Function and Suppresses DC and Responder T cell Activation

Because we observed similar effects by all PDE inhibitors, we decided to focus our further studies for the underlying mechanisms on the PDE4 inhibitor rolipram where we have observed cooperative effects with T_{reg} cells in an asthma model [23]. We asked whether rolipram directly suppresses the activation of responder T cells or indirectly, i. e. by modulating the T_{reg} /DC interaction. Firstly, we incubated DC in the presence or absence of rolipram and found that IL-12 production was diminished in escalating doses of rolipram, while we did not observe a significant impact on the activation (CD80, CD86 or CD40) phenotype or viability (Fig. S2). Next, we cocultured DC with allogeneic T_{reg} cells in the additional absence or presence of rolipram and fixed the cells after 4 h with glutaraldehyde, as illustrated in Fig. S3A. Subsequently, the cells were cultured with allogeneic responder T cells, again in the absence or presence of rolipram. As shown in Fig. S3B, fixed DC induced the activation of allogeneic T cells, although markedly less than viable DC depicted in comparison. Nevertheless, preactivation of DC with the TLR4 agonist LPS resulted in a significant increase in T cell activation that was suppressed in the presence of T_{reg} cells (Fig. S3C). It is important to notice that the 4 h coinubation period of viable DC with T_{reg} before fixation was necessary and sufficient for the impairment of subsequent allogeneic T cell activation since coinubation of DC with fixed T_{reg} cells had no impact on the MLR (Fig. S3D).

To further support a role for cAMP in this situation, we added the PDE4 inhibitor rolipram into the MLR culture. Under these stringent conditions, we did not observe any direct suppressive effect of rolipram on DC in terms of inhibition of T cell activation (Fig. 5A). Upon contact of DC with T_{reg} alone, this brief incubation period also did not result in significant suppression of T

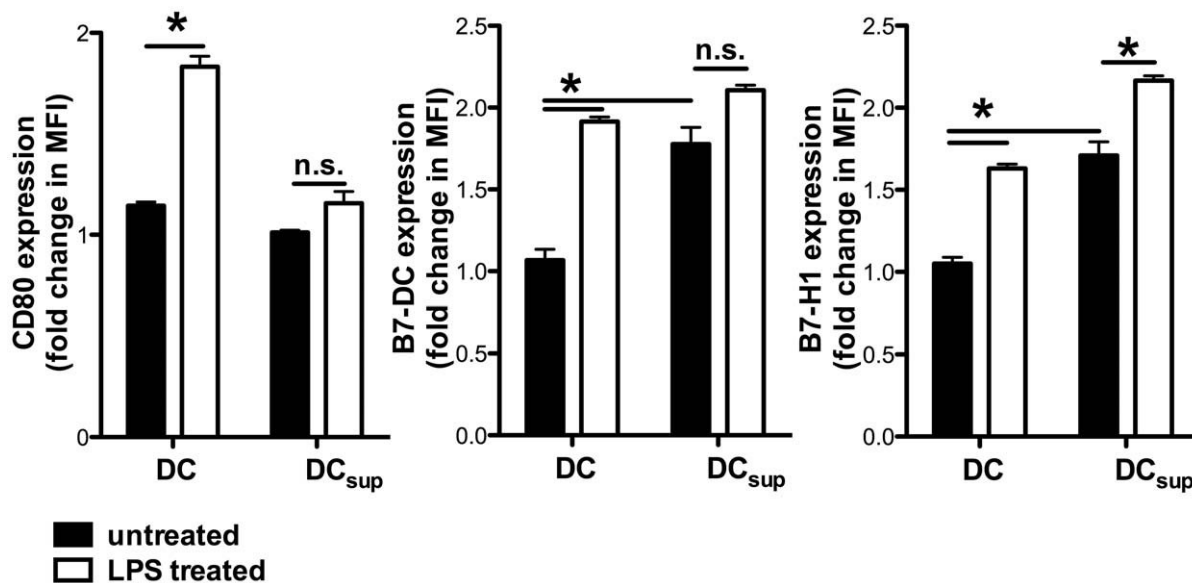


Figure 3. T_{reg} cells induce a suppressive DC phenotype. BALB/c BMDC were left untreated or stimulated with LPS (100 ng/ml) and cocultured with C57BL/6 T_{reg} cells in an 1:1 ratio (DC_{sup}). For optimal T_{reg} stimulation, a soluble anti-CD3-mAb (3 μ g/ml) was added. After 4 h expression of CD80, B7-H1 and B7-DC was determined by flow cytometry gating on CD11c⁺ MHCII⁺ cells. All depicted results were assayed in triplicate wells and are representative of three independent experiments. (*) indicates significant differences by Mann-Whitney test; n.s. – no significant differences. doi:10.1371/journal.pone.0058110.g003

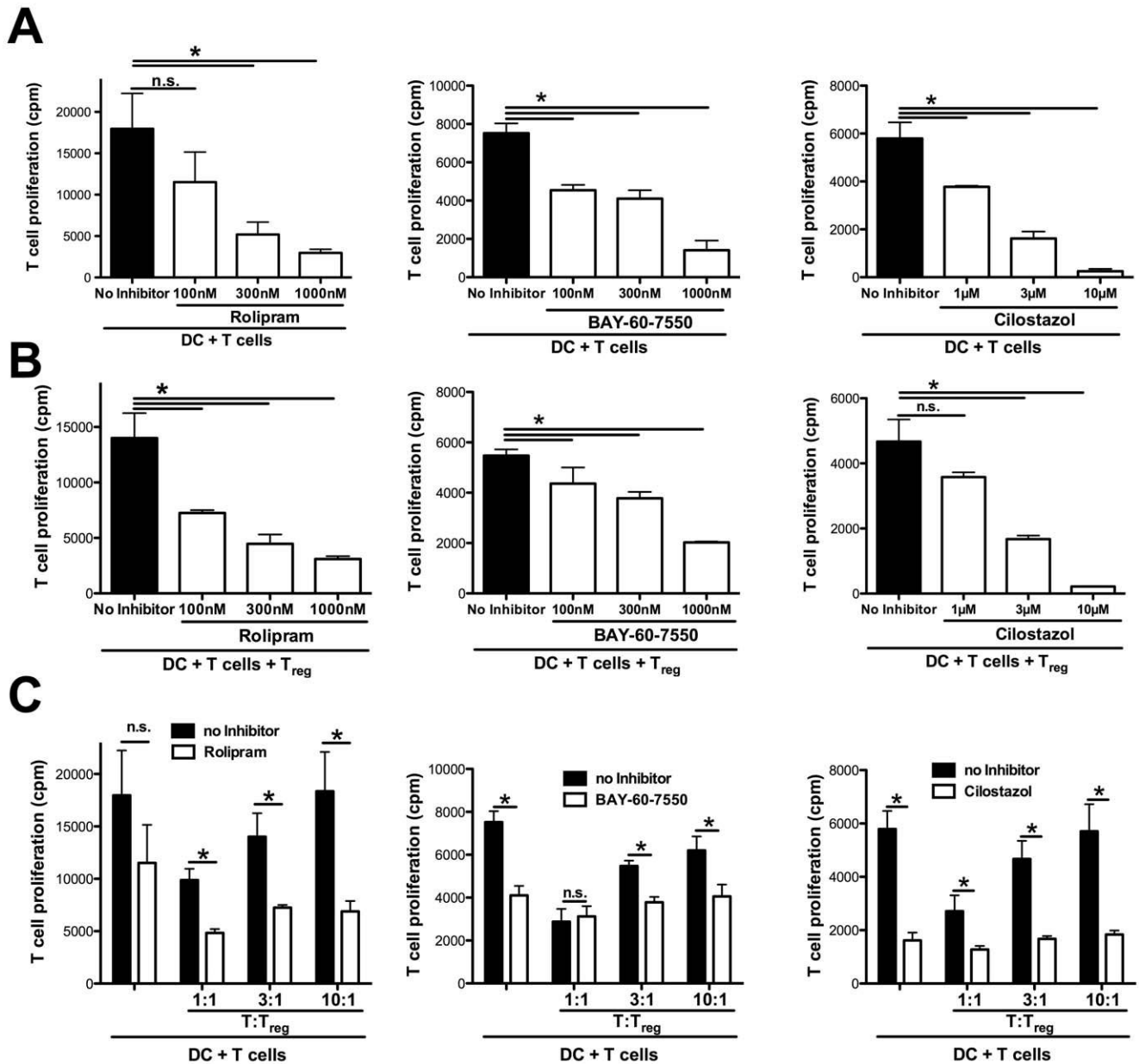


Figure 4. Rolipram enhances the suppressive capacities of T_{reg} cells *in vitro*. (A, B) BALB/c splenic DC (3×10^4 per well) were cocultured with allogeneic C57BL/6 Thy1.2⁺ T cells (1×10^5 per well) with titrated amounts of the PDE4 inhibitor rolipram (100 to 1000 nM), PDE2 inhibitor BAY-60-7550 (100 to 1000 nM) or PDE3 inhibitor Cilostazol (1 μM to 10 μM) for 3 days. Cell proliferation was determined after 3 days by ³H-thymidine incorporation. (B) DC (3×10^4 per well) were cocultured with allogeneic C57BL/6 Thy1.2⁺ T cells (1×10^5 per well) as in (A), but C57BL/6 T_{reg} cells (3×10^4 per well) were added. (C) DC (3×10^4 per well) were cocultured with allogeneic C57BL/6 Thy1.2⁺ T cells (1×10^5 per well) and C57BL/6 T_{reg} cells in indicated ratios for 3 days. Where indicated PDE4 inhibitor rolipram (100 nM), PDE2 inhibitor BAY-60-7550 (300 nM) or PDE3 inhibitor (3 μM) was added and proliferation was assessed after 3 days by ³H-thymidine incorporation. All depicted results were assayed in triplicate wells and are representative of three independent experiments. (*) indicates significant differences by Mann-Whitney *U*-test; n.s. – no significant differences. doi:10.1371/journal.pone.0058110.g004

cell activation. In contrast, only in the presence of rolipram and T_{reg} cells the capability of DC to induce allogeneic T cell activation was significantly suppressed.

To clarify whether rolipram also directly affects the activation of responder T cells, we coincubated fixed DC with allogeneic responder T cells in the additional presence or absence of rolipram demonstrating that rolipram also directly inhibited allogeneic T cell proliferation (Fig. 5B). These results indicate that rolipram suppresses MLR by at least three distinct mechanisms: the inhibition of IL-12 production by DC, the direct inhibition of allogeneic T cell

proliferation and a T_{reg}/DC dependent pathway involving cAMP that mediates a diminished alloreactive capacity of DC.

Rolipram and Regulatory T cells Cooperatively Ameliorate Acute Graft-versus-Host Diseases

To see whether these results obtained by *in vitro* experiments are also relevant *in vivo*, we performed allogeneic BMT, similar to the above described experiments, in the absence or presence of T_{reg} cells and additionally treated the mice with the PDE4 inhibitor

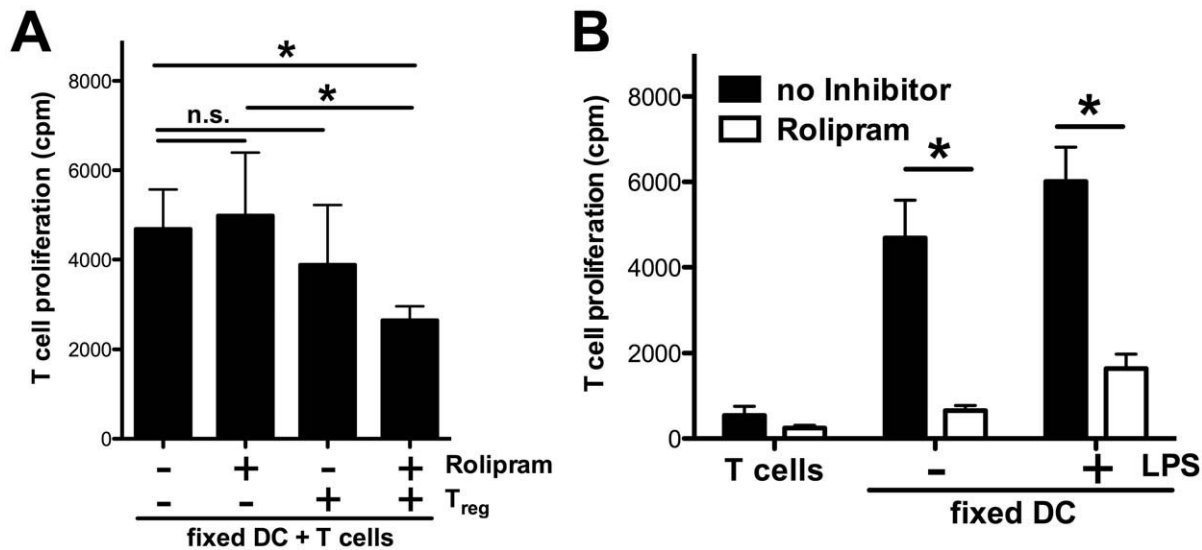


Figure 5. Rolipram suppresses MLR directly by inhibiting T cell proliferation and indirectly by modulating DC/T_{reg} interaction. (A) BALB/c BMDC were cultured in absence or presence of C57BL/6 T_{reg} cells (1:1 ratio) and rolipram (300 nM) for 4 h. Anti-CD3 (3 μg/ml) was added to every well. After fixation cells were cocultured with C57BL/6 Thy1.2⁺ T cells in a 10:1 ratio for 3 days. Proliferation was determined by ³H-thymidine incorporation. (B) BALB/c BMDC were stimulated with LPS (100 ng/ml) for 4 h or left untreated and subsequently fixed with glutaraldehyde. C57BL/6 Thy1.2⁺ CD25⁻ T cells were cocultured with LPS stimulated or unstimulated fixed BMDC (1 × 10⁴ per well) for 3 days in a 10:1 ratio. All depicted results were assayed in triplicate wells and are representative of three independent experiments. (*) indicates significant differences by Mann-Whitney U-test; n.s. – no significant differences.
doi:10.1371/journal.pone.0058110.g005

rolipram. In contrast to the experiments shown in Fig. 1, we used C57BL/6 derived CD90.2⁺ T cells that had been T_{reg} depleted using a CD25 specific antibody (clone 4D7) for transplantation in order to exclude rolipram driven effects on T_{reg} cells present in the CD90.2⁺ T cell graft. As shown in Fig. 6A and Fig. S4, in mice transplanted with T_{reg} depleted T cells alone we observed acute and lethal GvHD (filled squares, median survival 7 days) comparable to the experiments shown in Fig. 1. Upon the additional transfer of T_{reg} cells (open squares, median survival 29 days), the onset of GvHD was delayed, but we observed an increased mortality (compare Fig. 1: median survival not reached), most likely due to a durable protective effect by an increased number of T_{reg} cells in the initial (not CD25 depleted) transplantation setting. Interestingly, the mice treated with the PDE4 inhibitor rolipram alone showed a prolonged median survival (Fig. 6, filled circles, median survival 25 days). However, only the group of mice that received T_{reg} and rolipram was almost completely protected from lethal GvHD (open circles, median survival not reached). Additional histology skin sections as a classical target organ showed typical GvHD findings, i.e. focal spongiosis of the epidermis associated with only scant lymphoid cell infiltration of the dermis and scattered apoptotic keratinocytes, that appeared less prominent in mice that had received T_{reg} and rolipram (Fig. 6B).

Collectively, these results confirm and extend the concept that T_{reg} mediated suppression of T cell responses involves a cAMP dependent pathway, which can be manipulated by drugs like rolipram.

Discussion

Utilizing donor derived T_{reg} cells to control GvHD has a great potential to decrease the morbidity and mortality after allogeneic HSCT. The basic capability of T_{reg} cells for this has been demonstrated in experimental settings [7,10,11] and is confirmed

by our results. However, along with current studies that provide evidence for the clinical feasibility of T_{reg} based immunotherapy [11], it becomes increasingly urgent to clarify the relevant mechanisms of T_{reg} mediated suppression in the context of GvHD in order to be able to define the risks, limits and potentials of such treatments.

Multiple T_{reg} subpopulations and mechanisms of T_{reg} mediated suppression have been described [33,34]. Inducible T_{reg} cells can suppress GvHD in an antigen specific manner, as recently demonstrated [35]. However, in our current work we followed up on previous observations demonstrating that a major mechanism of suppression by naturally occurring T_{reg} cells is mediated by a pathway involving the transfer of cAMP via GJIC. Current concepts of GvHD priming highlight the role of host derived DC populations in the initiation phase of GvHD [3,12,13] and the interaction with T_{reg} cells in this context [36]. Concerning the potential mechanisms of T_{reg} mediated suppression in the context of GvHD, we have recently demonstrated a contact and cAMP dependent pathway of T_{reg} mediated suppression of CD4⁺ T cells [22]. This metabolic pathway is also important for the suppression of DC activation as shown by us *in vitro* [24] as well as *in vivo* as demonstrated in a model for contact hypersensitivity [29] and asthma [23]. Therefore we sought to evaluate this cAMP dependent pathway in the context of allogeneic T cell activation. We found that indeed T_{reg} cells preferentially make contact with DC and transfer the small fluorescent dye calcein as surrogate for cAMP to DC rather than directly to effector T cells. In line with this and consistent with our previous results obtained in the syngeneic setting [24], DC downregulate costimulatory molecules coincidentally with elevated levels of cAMP that can be blocked in part by the GJIC inhibitor GAP27. The significance of this mechanism in suppression of GvHD is underpinned by Yi et al. demonstrating that the interaction of host APC with T_{reg} cells via CD80/B7H1 is important for T_{reg} expansion post HSCT [37]. To evaluate the functional contribution of cAMP in this situation, we

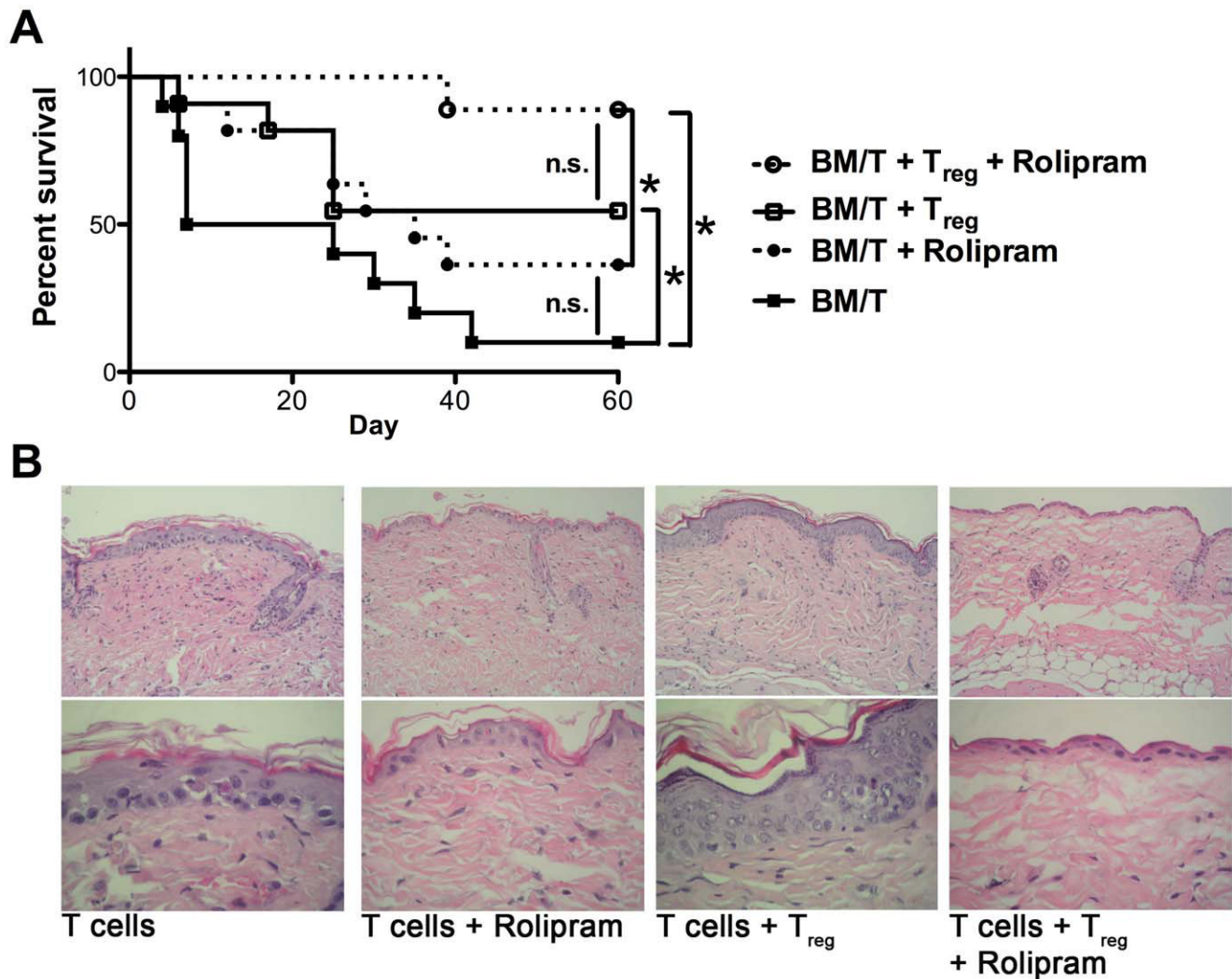


Figure 6. Rolipram enhances suppressive capacities of T_{reg} cells *in vivo* and ameliorates GvHD. (A) BALB/c mice were lethally irradiated (8.5 Gy) and received either TCD bone marrow (5×10^6 cells) and $Thy1.2^+ CD25^-$ T cells (5×10^5 cells) from C57BL/6 donors ($n = 10$, filled squares), $Thy1.2^+ CD25^-$ T cells plus T_{reg} cells (1:1 ratio, $n = 10$, open squares), $Thy1.2^+ T$ cells plus rolipram ($n = 10$, filled circles) or $Thy1.2^+ T$ cells plus T_{reg} cells and rolipram ($n = 9$, open circles). Rolipram (0.3 mg/kg) was injected *i.p.* on days 0 to 20 once per day. Results show the combined survival data from 2 independent experiments (* $p < 0.0005$ by Mantel-Cox test). (B) Transplantation and rolipram treatment were performed as described above, but the mice were sacrificed on day 10. Representative skin sections from the back were stained with haematoxylin and eosin. The upper pictures are showing an overview (original magnification 200 \times), the lower pictures are showing a detailed view (original magnification 630 \times). doi:10.1371/journal.pone.0058110.g006

used three different PDE inhibitors, all confirming previous results obtained with rolipram for enhanced cAMP levels and suppressive function of T_{reg} cells *in vitro* and also *in vivo* [22,23]. Apparently, all PDE inhibitors used had suppressive effects on MLR despite differential PDE expression patterns among T cell populations [32] and distinct specificity of the inhibitors arguing for a general effect by this class of inhibitors. However, our studies using viable or fixed DC as stimulators clearly show that rolipram affects three distinct mechanisms that may be relevant in the suppression of MLR: a direct effect inhibiting IL-12 production by DC, another direct effect on responder T cell proliferation and interestingly, also an indirect effect that enhances the suppressive effect of T_{reg} cells. This particular mechanism is mediated by interfering with the activation of DC and their subsequent ability to prime alloreactive T cells in a cAMP dependent manner. We are unable to differentiate whether the elevated levels of cAMP in DC are truly achieved by the transfer via GJIC as suggested by our

calcein assay and the decreased cAMP levels in suppressed DC in the presence of the GJIC inhibitor. On the other hand, the GJIC inhibitory peptide GAP27 can not inhibit all potential gap junction variants with equal efficiency [38]. Alternatively, T_{reg} cells may trigger other surface receptors, such as A_{2A} or A_{2B} receptors that in turn activate cAMP dependent signalling pathways [39]. However, using the A_{2A} receptor inhibitor SCH58261 in an MLR, we did not observe any enhancing or inhibitory effects on T cell proliferation (data not shown) arguing against a major role of this particular mechanism in the context of allogeneic T cell activation.

Conversely, our data allow the conclusion that T_{reg} /DC communications require live cell interactions as fixed T_{reg} cells are unable to confer the suppressive phenotype (Fig. S3D). Importantly, under our experimental conditions where T_{reg} cells had been depleted from the T cell graft before transplantation (Fig. 6), we merely observed a moderate delay in the course of

GvHD as illustrated by the survival plots when T_{reg} cells were transplanted alone. The same is true for rolapram alone in this situation, suggesting that the pronounced direct effect of rolapram on responder T cell proliferation might not be the most relevant mechanism of rolapram in suppression of GvHD *in vivo*. On the contrary, the fact that we observe nearly full protection in the group of T_{reg} transfer and rolapram suggests that a mechanism involving the cAMP dependent T_{reg} /DC interaction is more important in the *in vivo* situation. However, we can not exclude off-target effects of rolapram *in vivo*, i.e. on PDE3 which is important for the induction of T_{reg} cells in the context of allograft rejection [31]. Here, we are unable to differentiate whether rolapram affects transplanted T_{reg} cells or mediates the induction of T_{reg} cells which is a limitation of our study.

Never the less, our findings are corroborated by the recent work of Klein and coworkers who demonstrate the cAMP in human T_{reg} cells is essential for T_{reg} mediated suppression in general and also in the context of GvHD using a humanized mouse model [40]. Finally, our results fit well with previous data from O'Shaughnessy et al. who demonstrate that elevated cAMP levels in $CD4^+$ T cells are protective in GvHD [41]. We can now extend this notion by showing that this protection involves the enhanced suppressive action of T_{reg} cells indicating that one important pathway of T_{reg} mediated suppression is via a metabolic pathway involving cAMP. This pathway can be modulated by drugs like the phosphodiesterase inhibitor rolapram.

Taken together, our results provide the basis for an advanced understanding of T_{reg} mediated suppression of GvHD that may allow the establishment of combined approaches incorporating adoptive immunotherapy with targeted drug treatments to overcome the current limitations of allogeneic HSCT.

Supporting Information

Figure S1 T_{reg} cells induce a suppressive DC phenotype. (A) Gating strategy to discriminate between BMDC and pre T_{reg} after coculture. (B) BALB/c BMDC were left untreated (DC, filled grey area) or cultured with C57BL/6 pre T_{reg} cells (DC_{sup}, solid black line) in a 1:1 ratio. Where indicated LPS (100 ng/ml) was added to the culture (solid black line). For optimal pre T_{reg} stimulation soluble anti-CD3-mAb (3 μ g/ml) was added. After 4 h expression of CD80, B7-H1 and B7-DC was determined by flow cytometry. (TIFF)

Figure S2 Rolapram affects LPS induced IL-12 production by DC, but not the activation phenotype. BALB/c splenic DC were left untreated (black bars) or stimulated with LPS (100 ng/ml, white bars) over night in presence of different concentrations of the PDE4 inhibitor rolapram (100 to 1000 nM). (A, B, C) Expression of the activation markers CD80, CD86 and CD40 was assessed by flow cytometry. (D) Release of

IL-12 into the media was measured by a specific ELISA after 2 days of incubation. (E) Viability of the DC was determined after over night incubation by staining with propidium iodide (PI) and flowcytometric determination of the percentage of PI negative cells.

(TIFF)

Figure S3 Fixed BMDC are sufficient stimulators in MLR. (A) Scheme of the experimental setup. (B) C57BL/6 Thy1.2⁺ T cells were left untreated, cocultured with fixed BALB/c BMDC or viable BALB/c BMDC (1×10^4 per well) in a 10:1 ratio for 3 days. Proliferation was determined by ³H-thymidine incorporation. (C) BALB/c BMDC were stimulated with LPS (100 ng/ml) in absence or presence of C57BL/6 pre T_{reg} cells in a 1:1 ratio for 4 h with soluble anti-CD3 (3 μ g/ml). After fixation cells were cultured with viable C57BL/6 Thy1.2⁺ T cells in a 10:1 T/DC ratio for 3 days. Proliferation was determined by ³H-thymidine incorporation. (D) BALB/c BMDC were left alone or cocultured with C57BL/6 Treg in a 1:1 ratio for 4 h with soluble anti-CD3 (3 μ g/ml). Without separation the cells were subsequently fixed and used as stimulators for C57BL/6 T cells (T/DC 10:1) for 3 days. As a additional control C57BL/6 T cells were stimulated with viable BALB/c DC alone or together with fixed C57BL/6 Treg in the same ratios as stated above. Proliferation was determined by ³H-thymidine incorporation. All depicted results were assayed in six replicate wells and are representative for two independent experiments. (*) indicates significant differences by Mann-Whitney test. n.s. – no significant differences. (TIFF)

Figure S4 Rolapram enhances suppressive capacities of T_{reg} cells *in vivo*. BALB/c mice were lethally irradiated (8,5 Gy) and received either TCD bone marrow (5×10^6 cells) and Thy1.2⁺ CD25⁻ T cells (5×10^5 cells) from C57BL/6 donors (n = 10, filled squares), Thy1.2⁺ T cells plus T_{reg} cells (1:1 ratio, n = 10, open squares), Thy1.2⁺ T cells plus rolapram (n = 10, filled circles) or Thy1.2⁺ T cells plus T_{reg} cells and rolapram (n = 9, open circles). Rolapram (0,3 mg/kg) was injected *i.p.* on days 0 to 20 once a day. Results show the combined scoring data evaluated according to the clinical scoring system from 2 independent experiments. (TIFF)

Acknowledgments

The authors express their gratitude to Annekatri Klaric, Andrea Drescher and Giusy Carlino for excellent technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: HS MPR. Performed the experiments: MW CL PS AK. Analyzed the data: TCW. Contributed reagents/materials/analysis tools: ES TB AK. Wrote the paper: HS MPR.

References

1. Dochner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Buechner T, et al. (2010) Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 115: 453–474. doi:10.1182/blood-2009-07-235358.
2. KOLB H, SCHATTEBERG A, GOLDMAN J, HERTENSTEIN B, JACOBSEN N, et al. (1995) Graft-Versus-Leukemia Effect of Donor Lymphocyte Transfusions in Marrow Grafted Patients. *Blood* 86: 2041–2050.
3. Ferrara JLM, Levine JE, Reddy P, Holler E (2009) Graft-versus-host disease. *Lancet* 373: 1550–1561. doi:10.1016/S0140-6736(09)60237-3.
4. Sakaguchi S (2004) Naturally Arising CD4⁺ Regulatory T Cells for Immunologic Self-Tolerance and Negative Control of Immune Responses. *Ann Rev Immunol* 22: 531–562.
5. Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T, et al. (1999) Tumor rejection by *in vivo* administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res* 59: 3128–3133.
6. Suttmuller RP, van Duivenvoorde LM, van Elsas A, Schumacher TN, Wildenberg ME, et al. (2001) Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* 194: 823–832.
7. Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S (2002) Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med* 196: 389–399.
8. Vela-Ojeda J, Montiel-Cervantes L, Granados-Lara P, Reyes-Maldonado E, García-Latorre E, et al. (2010) Role of CD4+CD25+ highFoxp3+CD62L+

- Regulatory T Cells and Invariant NKT Cells in Human Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Stem Cells and Development* 19: 333–340. doi:10.1089/scd.2009.0216.
9. Zeiser R, Nguyen VH, Beilhack A, Buess M, Schulz S, et al. (2006) Inhibition of CD4+CD25+ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production. *Blood* 108: 390–399. doi:10.1182/blood-2006-01-0329.
 10. Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, Drago K, Fathman CG, et al. (2003) CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med* 9: 1144–1150. doi:10.1038/nm915.
 11. Brunstein CG, Miller JS, Cao Q, McKenna DH, Hippen KL, et al. (2011) Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood* 117: 1061–1070. doi:10.1182/blood-2010-07-293795.
 12. Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, McNiff J, Robert ME, et al. (1999) Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* 285: 412–415.
 13. Duffner UA, Maeda Y, Cooke KR, Reddy P, Ordemann R, et al. (2004) Host dendritic cells alone are sufficient to initiate acute graft-versus-host disease. *J Immunol* 172: 7393–7398.
 14. Teshima T, Ordemann R, Reddy P, Gagin S, Liu C, et al. (2002) Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. *Nat Med* 8: 575–581. doi:10.1038/nm0602-575.
 15. Kurtz J, Shaffer J, Lic A, Anosova N, Benichou G, et al. (2004) Mechanisms of early peripheral CD4 T-cell tolerance induction by anti-CD154 monoclonal antibody and allogeneic bone marrow transplantation: evidence for anergy and deletion but not regulatory cells. *Blood* 103: 4336–4343. doi:10.1182/blood-2003-08-2642.
 16. Zhai Y, Meng L, Gao F, Wang Y, Busuttill RW, et al. (2006) CD4+ T regulatory cell induction and function in transplant recipients after CD154 blockade is TLR4 independent. *J Immunol* 176: 5988–5994.
 17. Fehr T, Takeuchi Y, Kurtz J, Wekerle T, Sykes M (2005) Early regulation of CD8 T cell alloreactivity by CD4+CD25- T cells in recipients of anti-CD154 antibody and allogeneic BMT is followed by rapid peripheral deletion of donor-reactive CD8+ T cells, precluding a role for sustained regulation. *Eur J Immunol* 35: 2679–2690. doi:10.1002/eji.200526190.
 18. Fahlen L (2005) T cells that cannot respond to TGF- escape control by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med* 201: 737–746. doi:10.1084/jem.20040685.
 19. Kearley J, Barker JE, Robinson DS, Lloyd CM (2005) Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. *J Exp Med* 202: 1539–1547. doi:10.1084/jem.20051166.
 20. McHugh R, Whitters M, Piccirillo C, Young D, Shevach E, et al. (2002) CD4(+)/CD25(+) immunoregulatory T cells: Gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 16: 311–323.
 21. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, et al. (2008) CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 322: 271–275. doi:10.1126/science.1160062.
 22. Bopp Becker, Klein Klein-Heßling, Palmethofer, et al. (2007) Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med* 204: 1303–1310. doi:10.1084/jem.20062129.
 23. Bopp T, Dehzad N, Reuter S, Klein M, Ullrich N, et al. (2009) Inhibition of cAMP degradation improves regulatory T cell-mediated suppression. *J Immunol* 182: 4017–4024. doi:10.4049/jimmunol.0803310.
 24. Fassbender M, Gerlitzki B, Ullrich N, Lupp C, Klein M, et al. (2010) Cyclic adenosine monophosphate and IL-10 coordinately contribute to nTreg cell-mediated suppression of dendritic cell activation. *Cell Immunol* 265: 91–96. doi:10.1016/j.cellimm.2010.07.007.
 25. Ruedl C, Rieser C, Böck G, Wick G, Wolf H (1996) Phenotypic and functional characterization of CD11c+ dendritic cell population in mouse Peyer's patches. *Eur J Immunol* 26: 1801–1806. doi:10.1002/eji.1830260821.
 26. Warger T, Osterloh P, Rechtsteiner G, Fassbender M, Heib V, et al. (2006) Synergistic activation of dendritic cells by combined Toll-like receptor ligation induces superior CTL responses in vivo. *Blood* 108: 544–550. doi:10.1182/blood-2005-10-4015.
 27. Vaeth M, Schliesser U, Müller G, Reissig S, Satoh K, et al. (2012) Dependence on nuclear factor of activated T-cells (NFAT) levels discriminates conventional T cells from Foxp3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 16258–16263. doi:10.1073/pnas.1203870109.
 28. Rowe V, Banovic T, MacDonald KP, Kuns R, Don AL, et al. (2006) Host B cells produce IL-10 following TBI and attenuate acute GVHD after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 108: 2485–2492. doi:10.1182/blood-2006-04-016063.
 29. Ring S, Karakhanova S, Johnson T, Enk AH, Mahnke K (2010) Gap junctions between regulatory T cells and dendritic cells prevent sensitization of CD8(+) T cells. *J Allergy Clin Immunol* 125: 237–246.e237. doi:10.1016/j.jaci.2009.10.025.
 30. Neijssen J, Herberts C, Drijfhout JW, Reits E, Janssen L, et al. (2005) Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature* 434: 83–88. doi:10.1038/nature03290.
 31. Feng GG, Nadig SNS, Bäckdahl LL, Beck SS, Francis RSR, et al. (2011) Functional regulatory T cells produced by inhibiting cyclic nucleotide phosphodiesterase type 3 prevent allograft rejection. *Science Translational Medicine* 3: 83ra40–83ra40. doi:10.1126/scitransmed.3002099.
 32. Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, et al. (2007) Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* 445: 771–775. doi:10.1038/nature05543.
 33. Bluestone JA, Abbas AK (2003) Opinion-Regulatory Lymphocytes: Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 3: 253–257. doi:10.1038/nri1032.
 34. Shevach EM (2006) From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 25: 195–201. doi:10.1016/j.immuni.2006.08.003.
 35. Sela U, Olds P, Park A, Schlesinger SJ, Steinman RM (2011) Dendritic cells induce antigen-specific regulatory T cells that prevent graft versus host disease and persist in mice. *J Exp Med* 208: 2489–2496. doi:10.1084/jem.20110466.
 36. Tawara I, Shlomchik WD, Jones A, Zou W, Nieves E, et al. (2010) A Crucial Role for Host APCs in the Induction of Donor CD4+CD25+ Regulatory T Cell-Mediated Suppression of Experimental Graft-versus-Host Disease. *J Immunol*. doi:10.4049/jimmunol.1001625.
 37. Yi T, Li X, Yao S, Wang L, Chen Y, et al. (2011) Host APCs Augment In Vivo Expansion of Donor Natural Regulatory T Cells via B7H1/B7.1 in Allogeneic Recipients. *The Journal of Immunology* 186: 2739–2749. doi:10.4049/jimmunol.1002939.
 38. Evans WH, Boitano S (2001) Connexin mimetic peptides: specific inhibitors of gap-junctional intercellular communication. *Biochem Soc Trans* 29: 606–612.
 39. Sitkovsky MV (2009) T regulatory cells: hypoxia-adenosinergic suppression and re-direction of the immune response. *Trends Immunol* 30: 102–108. doi:10.1016/j.it.2008.12.002.
 40. Klein M, Vaeth M, Scheel T, Grabbe S, Baumgrass R, et al. (2012) Repression of cyclic adenosine monophosphate upregulation disarms and expands human regulatory T cells. *The Journal of Immunology* 188: 1091–1097. doi:10.4049/jimmunol.1102045.
 41. O'Shaughnessy MJ, Chen Z-M, Gramaglia I, Taylor PA, Panoskaltis-Mortari A, et al. (2007) Elevation of intracellular cyclic AMP in alloreactive CD4(+) T Cells induces alloantigen-specific tolerance that can prevent GVHD lethality in vivo. *Biol Blood Marrow Transplant* 13: 530–542. doi:10.1016/j.bbmt.2007.01.071.