

Generierung und Charakterisierung tolerogener muriner dendritischer Zellen

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Yvette Höhn

geb. am 30.03.1982 in Mainz

Mainz, 05.09.2011

Dekan:

1. Berichterstatterin:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 04. Mai 2011

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Nieder-Olm, den 05.09.2011

Yvette Höhn

A) Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|--|-------------|
| A | Inhaltsverzeichnis | I |
| B | Danksagungen | VIII |
| C | Veröffentlichungen | IX |
| | | |
| 1. | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Dendritische Zellen | 1 |
| 1.2 | Subtypen von Dendritischen Zellen | 1 |
| 1.3 | Rolle von Dendritischen Zellen in der Immunität | 3 |
| 1.4 | Rolle von Dendritischen Zellen bei der Aufrechterhaltung der Toleranz | 7 |
| 1.5 | Generierung tolerogener Dendritischer Zellen | 11 |
| 1.5.1 | Generierung tolerogener Dendritischer Zellen mit Hilfe immunsuppressiver und antiinflammatorischer Agenzien | 11 |
| 1.5.2 | Generierung tolerogener Dendritischer Zellen mit Hilfe der lentiviralen Transduktion | 14 14 |
| 1.6. | Klinische Relevanz dendritischer Zellen | 16 |
| 1.7 | Die murine DC-Linie SP37A3 als Modell für myeloide DC | 17 |
| 1.8 | Ziele der Arbeit | 18 |
| | | |
| 2. | Material und Methoden | 19 |
| 2.1 | Material | 19 |
| 2.1.1 | Laborgeräte | 19 |
| 2.1.2 | Labor- und Verbrauchsmaterialien | 21 |
| 2.1.3 | Chemikalien und Reagenzien | 24 |
| 2.1.4 | Puffer, Lösungen und Kulturmedien | 27 |
| 2.1.4.1 | Puffer und Lösungen | 27 |
| 2.1.4.2 | Puffer und Lösungen für ELISA | 29 |
| 2.1.4.3 | Puffer und Lösungen für die Transfektion und Transduktion | 30 |
| 2.1.4.4 | Zellkulturzusätze und Zellkulturmedien | 31 |
| 2.1.4.5 | Nährmedien und Nährböden für die Bakterienkultur | 34 |
| 2.1.5 | Modulatorische Substanzen und Inhibitoren für die Behandlung von Zellen | 34 |
| 2.1.6 | Enzyme | 35 |
| | | I |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 2.1.7 | Fertigsysteme | 35 |
| 2.1.8 | Plasmidvektoren | 35 |
| 2.1.9 | Antikörper | 36 |
| 2.1.9.1 | Antikörper zum Absättigen freier Fc-Rezeptoren | 36 |
| 2.1.9.2 | Primärantikörper zur FACS-Färbung | 36 |
| 2.1.9.3 | Sekundärantikörper zur FACS-Färbung | 38 |
| 2.1.9.4 | Isotyp-Kontrollantikörper zur FACS-Färbung | 38 |
| 2.1.9.5 | FoxP3-Färbekit | 39 |
| 2.1.9.6. | Antikörper für Zytokin-ELISA | 40 |
| 2.1.9.6.1 | „Capture“-Antikörper | 40 |
| 2.1.9.6.2 | Detektions-Antikörper | 40 |
| 2.1.10 | Zytokine und andere Substanzen | 41 |
| 2.1.10.1 | Als Standard im Zytokin-ELISA verwendete Zytokine | 41 |
| 2.1.10.2 | Zytokine allgemein | 41 |
| 2.1.11 | Peptid | 42 |
| 2.1.12 | Primer | 42 |
| 2.1.13 | Mäuse | 45 |
| 2.1.14 | Zelllinien | 45 |
| 2.1.14.1 | HEK 293T-Zellen: | 45 |
| 2.1.14.2 | HT-1080-Zellen: | 45 |
| 2.1.14.3 | SP37A3-Zellen: | 45 |
| 2.1.15 | Bakterienstamm | 46 |
| 2.2 | Methoden | 47 |
| 2.2.1 | Methoden der Zellkultur | 47 |
| 2.2.1.1 | Bestimmung der Lebendzellzahl | 47 |
| 2.2.1.2 | Einfrieren von Zellen | 47 |
| 2.2.1.3 | Arbeiten mit HEK 293T-Zellen | 48 |
| 2.2.1.3.1 | Auftauen von HEK 293T-Zellen | 48 |
| 2.2.1.3.2 | Kultivierung von HEK 293T-Zellen | 48 |
| 2.2.1.4 | Arbeiten mit HT1080-Zellen | 49 |
| 2.2.1.4.1 | Auftauen von HT1080-Zellen | 49 |
| 2.2.1.4.2 | Kultivierung von HT1080-Zellen | 49 |
| 2.2.1.5 | Arbeiten mit der murinen DC-Linie SP37A3 | 49 |

| | | |
|-------------|---|----|
| 2.2.1.5.1 | Auftauen von SP37A3-Zellen | 49 |
| 2.2.1.5.2 | Kultivierung von SP37A3-Zellen | 50 |
| 2.2.1.5.3 | Maturierung von SP37A3-Zellen | 51 |
| 2.2.1.5.4 | Behandlung von SP37A3-Zellen mit modulatorischen Substanzen | 51 |
| 2.2.1.5.5 | Ernten von behandelten SP37A3-Zellen | 51 |
| 2.2.1.6 | Arbeiten mit murinen Knochenmarks-abgeleiteten DC (BM-DC) | 52 |
| 2.2.1.6.1 | Gewinnung von Knochenmarkszellen | 52 |
| 2.2.1.6.2 | Kultivierung von Knochenmarkszellen | 53 |
| 2.2.1.6.3 | Ausreifung von BM-DC | 53 |
| 2.2.1.6.4 | Behandlung von BM-DC mit modulatorischen Substanzen | 53 |
| 2.2.1.6.5 | Ernten von BM-DC | 54 |
| 2.2.1.7 | Lentiviraler Gentransfer | 54 |
| 2.2.1.7.1 | Grundlagen des lentiviralen Gentransfers | 54 |
| 2.2.1.7.2 | Transfektion von HEK 293T-Zellen | 55 |
| 2.2.1.7.3 | Konzentrierung des virushaltigen Überstandes mittels Ultrazentrifugation | 56 |
| 2.2.1.7.4 | Lentivirale Transduktion von HT1080-Zellen zur Bestimmung des Virustiters | 57 |
| 2.2.1.7.5 | Lentivirale Transduktion von SP37A3-Zellen | 58 |
| 2.2.1.7.5.1 | Lentivirale Transduktion von SP37A3-Zellen mit Virusüberstand | 58 |
| 2.2.1.7.5.2 | Lentivirale Transduktion von SP37A3-Zellen mit konzentriertem Virus | 59 |
| 2.2.1.7.6 | Lentivirale Transduktion von BM-DC | 59 |
| 2.2.1.7.6.1 | Lentivirale Transduktion von BM-DC mit Virusüberstand | 59 |
| 2.2.1.7.6.2 | Lentivirale Transduktion von BM-DC mit konzentriertem Virus | 60 |
| 2.2.1.7.7 | Bestimmung der Transduktionseffizienz | 61 |
| 2.2.1.8 | Präparation von Milzzellen | 61 |
| 2.2.1.9 | Aufreinigung von T-Lymphozyten über Nylonwolle-Säulen | 61 |
| 2.2.1.10 | MLR (gemischte Lymphozyten Reaktion) | 62 |
| 2.2.1.10.1 | Primäre MLR im 96-Loch-Format | 63 |
| 2.2.1.10.2 | Primäre MLR im 24-Loch-Format | 63 |
| 2.2.1.10.3 | Primäre MLR im 6-Loch-Format | 64 |
| 2.2.1.11 | Syngene Kokultur | 64 |
| 2.2.1.11.1 | Syngene Kokultur im 96-Loch-Format | 64 |
| 2.2.1.12 | MDSC-Suppressionstest | 65 |
| 2.2.1.13 | Messen der Radioaktivität | 66 |
| 2.2.1.14 | ELISA | 66 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 2.2.1.14.1 | Häm-Oxygenase-1 (HO-1) ELISA | 67 |
| 2.2.1.14.2 | Prostaglandin E ₂ (PGE ₂) ELISA | 67 |
| 2.2.1.15 | FACS-Analyse | 68 |
| 2.2.1.15.1 | Extrazelluläre Oberflächenfärbung | 69 |
| 2.2.1.15.2 | Intrazelluläre Färbung mit einem Fascin-spezifischen Antikörper | 70 |
| 2.2.1.15.3 | Oberflächenfärbung mit anschließender intrazellulärer FoxP3-Färbung | 70 |
| 2.2.1.16 | Erstellungen der Grafiken und Statistik | 71 |
| 2.2.2 | Molekularbiologische Methoden | 72 |
| 2.2.2.1 | Präparation von RNA | 72 |
| 2.2.2.2 | Reverse Transkription | 72 |
| 2.2.2.3 | Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren | 73 |
| 2.2.2.4 | Quantitative („Realtime“) –PCR | 73 |
| 2.2.2.5 | Kultivierung von Bakterienzellen | 74 |
| 2.2.2.6 | Herstellung elektrokompetenter TOP10-Zellen | 75 |
| 2.2.2.7 | Transformation elektrokompetenter Bakterien | 75 |
| 2.2.2.8 | Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen mit Hilfe von Fertigsystemen | 76 |
| 2.2.9 | Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA | 76 |
| 2.2.2.10 | Agarose-Gelelektrophorese | 76 |
| 3. | Ergebnisse | 78 |
| 3.1 | Charakterisierung von db-cAMP behandelten BMDC | 79 |
| 3.1.1 | Allogenes T-Zellstimulierungspotential von db-cAMP-DC | 79 |
| 3.1.2 | Syngenes T-Zellstimulierungspotential von db-cAMP-DC | 80 |
| 3.1.3 | Analyse der Expression DC-relevanter Gene in BM-DC und db-cAMP-DC | 82 |
| 3.1.3.1 | Analyse der Expression von Toll Like Rezeptoren | 82 |
| 3.1.3.2 | Analyse der Expression kostimulatorischer Oberflächenmoleküle sowie von Fascin und ICAM-1 | 83 |
| 3.1.3.3 | Analyse der Expression koinhibitorischer Oberflächenmoleküle | 85 |
| 3.1.3.4 | Analyse der Expression proinflammatorischer Zytokine | 86 |
| 3.1.3.5 | Analyse der Expression antiinflammatorischer Zytokine | 88 |
| 3.1.3.6 | Analyse der Expression von toleranzassoziierten Molekülen | 89 |
| 3.1.3.7 | Analyse der Expression von CREB, CREM und ICER | 90 |
| 3.1.4 | Phänotypische Analyse von unbehandelten und in Gegenwart von db-cAMP | |

| | | |
|------------|---|------------|
| | kultivierten BM-DC mittels FACS-Analyse | 91 |
| 3.1.5 | Zytokinprofil von BM-DC und db-cAMP-DC | 99 |
| 3.1.6 | Hämoxygenase-1-Expression der unterschiedlich differenzierten BM-DC | 101 |
| 3.1.7 | Prostaglandin E ₂ Expression der unterschiedlich differenzierten BM-DC | 102 |
| 3.1.8 | Zytokinprofil der mit unterschiedlich differenzierten BM-DC kokultivierten allogenen T-Zellen | 103 |
| 3.1.8.1 | IFN γ -Sekretion der kokultivierten T-Zellen | 103 |
| 3.1.8.2 | IL-5-Sekretion der kokultivierten T-Zellen | 104 |
| 3.1.8.3 | IL-10-Sekretion der kokultivierten T-Zellen | 105 |
| 3.1.8.4 | IL-17-Sekretion der kokultivierten T-Zellen | 106 |
| 3.1.9 | Induktion von regulatorischen T-Zellen durch die unterschiedlich differenzierten BM-DC | 108 |
| 3.1.10 | Beitrag der Proteinkinase A zu der Funktion und dem Phänotyp von db-cAMP behandelter BM-DC | 110 |
| 3.1.10.1 | Allogenes T-Zellstimulierungspotential von db-cAMP-DC mit modulierter PKA-Aktivität | 111 |
| 3.1.10.2 | Analyse der Expression DC-relevanter Gene in Gegenwart von db-cAMP und/oder einem PKA-Inhibitor | 113 |
| 3.1.11 | Beitrag der Cyclooxygenase-2 zu der Funktion db-cAMP behandelter BM-DC | 116 |
| 3.1.12 | Test der unterschiedlich differenzierten BM-DC auf die Charakteristika von MDSC | 119 |
| 3.1.12.1 | Suppressions-Test mit den unterschiedlich differenzierten BM-DC | 119 |
| 3.1.12.2 | Einfluss von NOS, ROS und Arginase auf das T-Zell-Stimulierungspotenzial der unterschiedlich differenzierten BM-DC | 121 |
| 3.1.12.3 | Einfluss von NOS, ROS und Arginase auf die suppressiven Eigenschaften der unterschiedlich differenzierten BM-DC | 123 |
| 3.2 | Etablierung der lentiviralen Transduktion von SP37A3-Zellen | 125 |
| 3.2.1 | Versuche mit virushaltigen Überständen | 126 |
| 3.2.1.1 | Transduktion von SP37A3-Zellen mit für B7-H3 kodierenden virushaltigen Überständen | 126 |
| 3.2.1.2 | Transduktion von BM-DC mit virushaltigen B7-H3 Überständen | 127 |
| 3.2.1.3 | Transduktion von HEK 293T-Zellen mit virushaltigen B7-H3 Überständen | |

| | | |
|------------|--|------------|
| | und Transfektion mit B7-H3 Plasmid-DNA | 131 |
| 3.2.1.4 | Lentivirale Transduktion mit für IL-10 kodierenden virushaltigen Überständen | 134 |
| 3.2.1.4.1 | Transduktion von SP37A3-Zellen mit für IL-10 kodierenden virushaltigen Überständen | 134 |
| 3.2.1.4.2 | Transduktion von BM-DC mit für IL-10 kodierenden virushaltigen Überständen | 136 |
| 3.2.1.4.3 | Transduktion von SP37A3-Zellen mit für IL-10 kodierenden virushaltigen Überständen: Verfahren nach dem Protokoll für BM- DC | 137 |
| 3.2.1.4.4 | Transduktion von BM-DC mit für IL-10 kodierenden virushaltigen Überständen: Verfahren nach dem Protokoll für SP37A3-Zellen | 138 |
| 3.2.1.4.5 | Test von IL-10 virushaltigen Überständen auf den Gehalt an IL-10 | 140 |
| 3.2.1.4.6 | Test auf das Ausmaß an Pseudotransduktion | 141 |
| 3.2.2 | Versuche mit ankonzentriertem Virus | 143 |
| 3.2.2.1 | Test von ankonzentriertem Virus auf den Gehalt an IL-10 | 143 |
| 3.2.2.2 | Versuche mit konzentriertem Virus und Austausch von PCMVΔR8.91 | 144 |
| 3.2.2.3 | Bestimmung des Virustiters | 144 |
| 3.2.2.4 | Transduktion von SP37A3-Zellen mit konzentriertem B7-H3-Virus | 145 |
| 3.2.2.5 | Test der mit konzentriertem Virus transduzierten SP37A3-Zellen auf das Auftreten von Pseudotransduktion | 148 |
| 4. | Diskussion | 152 |
| 4.1 | Wirkungen der intrazellulären Erhöhung des cAMP-Niveaus in BM-DC | 153 |
| 4.1.1 | Die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Levels in BM-DC verhindert ihre LPS-induzierte Ausreifung | 154 |
| 4.1.2 | Die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Levels in BM-DC führt zu einer differenziellen Expression einiger koinhibitorischer Moleküle | 157 |
| 4.1.3 | Die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Levels in BM-DC führt zu einer differenziellen Expression von Molekülen, die mit Toleranz assoziiert sind | 159 |
| 4.1.4 | Die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Levels in BM-DC führt zu einer differenziellen Expression von CREM | 162 |
| 4.1.5 | Die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Levels in BM-DC führt zu einer differenziellen Expression pro- und antiinflammatorischer Zytokine und zu einem differenziellen Zytokinprofil kokultivierter T-Zellen | 163 |

| | | |
|------------|--|--------------|
| 4.1.6 | Durch db-cAMP-DC werden nicht vermehrt regulatorische T-Zellen induziert | 166 |
| 4.1.7 | Beitrag der PKA zum Phänotyp und der Funktion von db-cAMP-DC | 168 |
| 4.1.8 | Beitrag der Cyclooxygenase-2 zu der Funktion von db-cAMP-DC | 169 |
| 4.1.9 | Weisen db-cAMP-DC phänotypische und funktionelle Übereinstimmungen mit myeloiden Suppressorzellen auf? | 170 |
| 4.2 | Etablierung der lentiviralen Transduktion von SP37A3-Zellen | 172 |
| 4.2.1 | Auftreten von Pseudotransduktion bei der lentiviralen Transduktion mit Virusüberständen | 175 |
| 4.2.2 | Titration der MOI zur effizienten Transduktion von SP37A3-Zellen | 178 |
| 5. | Zusammenfassung | 180 |
| 6. | Abstract | 182 |
| E | Abkürzungsverzeichnis | XVIII |
| F | Lebenslauf | XXIV |

B) Danksagungen

C) Veröffentlichungen

Originalpublikationen

S. Kasper, F. Breitenbuecher, Y. Höhn, F. Heidel, D.B. Lipka, B. Markova, C. Huber, T. Kindler and T. Fischer. *The kinase inhibitor LS104 induces apoptosis, enhances cytotoxic effect of chemotherapeutic drugs and is targeting the receptor tyrosine kinase FLT3 in acute myeloid leukemia.* **Leukemia Research**, 2008 Nov, 32 (11): 1698-1708.

M. Bros, N. Dexheimer, R. Ross, S. Trojandt, Y. Höhn, J. Tampe, A. Sutter, F. Jährling, S. Grabbe and A. B. Reske-Kunz. *Differential gene expression analysis identifies murine *Cacnb3* as strongly upregulated in distinct dendritic cell populations upon stimulation.* **Gene**. 2010 Feb 1, 472 (1-2): 18-27.

Kongressbeiträge

Y. Höhn, M. Thamsen, N. Wiechmann, S. Grabbe, A. B. Reske-Kunz and M. Bros. *Long Term treatment of murine dendritic cells with a cAMP analogue induces a tolerogenic state.* **Joint Annual Meeting of Immunology of the Austrian and German Societies (ÖGAI, DGFI)**, 03. - 06. September 2008, Wien, Österreich.

Y. Höhn, M. Thamsen, N. Wiechmann, S. Grabbe, A. B. Reske-Kunz and M. Bros. *Murine dendritic cells generated in the presence of a stable c-AMP analogue show a protolerogenic state.* **World Immune Regulation Meeting-III**, 22 - 25. März 2009, Davos, Schweiz.

Y. Höhn, M. Thamsen, N. Wiechmann, S. Grabbe, A. B. Reske-Kunz and M. Bros. *Differentiation of murine DCs in the presence of a stable cAMP analogue results in the arisal of a protolerogenic DC population.* **2nd European Congress of Immunology (eci)**, 13. - 16. September 2009, Berlin.

Y. Höhn, M. Thamsen, N. Wiechmann, S. Grabbe, A. B. Reske-Kunz and M. Bros. *Eine nachhaltige Erhöhung des cAMP-Spiegels in murinen DC-Vorläuferzellen induziert einen protolerogenen DC-Status.* **21. Mainzer Allergieworkshop der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI)**, 19. - 20. März 2009, Mainz.

Y. Höhn, M. Thamsen, N. Wiechmann, S. Grabbe, A. B. Reske-Kunz and M. Bros. *Long term treatment of murine dendritic cells with a cAMP analogue induces a protolerogenic state.* **50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT)**, 11. - 12. März 2009, Mainz.

1. Einleitung

1.1 Dendritische Zellen

Die Erforschung der Dendritischen Zellen (DC) begann 1868 mit der Entdeckung der DC der Haut, den sogenannten Langerhans-Zellen, durch Paul Langerhans [Sato *et al.*, 2007]. Über 100 Jahre später, 1973, beschrieben Steinman und Cohn Zellen in der Milz von Mäusen mit individuellen morphologischen Merkmalen, den Dendriten, und nannten diese potenten Stimulatoren der primären Immunantwort Dendritische Zellen [Steinman *et al.*, 1973, 1974]. DC sind professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APC = antigen presenting cell). Sie besitzen die einzigartige Fähigkeit Antigen-spezifische primäre T-Zell-Immunantworten zu induzieren. Dies unterscheidet sie von anderen APC wie z.B. B-Zellen oder Makrophagen [Mellman *et al.*, 2001]. DC ermöglichen zum einem die Erkennung von Pathogenen oder veränderten Körperzellen, um den Körper vor Infektionen oder z.B. Tumoren zu schützen. Zum anderen spielen sie eine entscheidende Rolle bei der Induktion und der Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen [Banchereau *et al.*, 1998, Sato *et al.*, 2007]. Die diversen Funktionen der DC hängen sowohl vom Subtyp der DC als auch von ihrer Lokalisation und von ihrem Aktivierungsstatus ab [Takeuchi *et al.*, 2007].

1.2 Subtypen von Dendritischen Zellen

DC-Vorläuferzellen entwickeln sich aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark [Sato *et al.*, 2007]. Alle DC-Subtypen können Antigene aufnehmen, prozessieren und T-Zellen präsentieren, aber sie unterscheiden sich in ihren Oberflächenmarkern, ihren Migrationsmustern und in ihrer Zytokin-Produktion. Diese Unterschiede bestimmen die Polarisierung der T-Zellen, die sie aktivieren. Ihre detaillierte Funktion in der Immunität variiert somit abhängig von ihrem Subtyp und der Anwesenheit bzw. Abwesenheit von inflammatorischen Stimuli wie einer viralen oder bakteriellen Infektion [Wu *et al.*, 2004, Takeuchi *et al.*, 2007].

Murine DC sind grundsätzlich charakterisiert durch ihre Expression von CD11c und MHCII („major histocompatibility complex“) und können CD4, CD8 α , CD11b bzw. CD205 koexprimieren [Sato *et al.*, 2007].

Klassischerweise unterschied man im Blut, den Geweben und den Lymphknoten zwei Subtypen von DC. Bei diesen handelte es sich um myeloide DC (mDC), die aus myeloiden Vorläufern, und um plasmazytoide DC (pDC), die aus lymphoiden Vorläufern hervorgehen [Panoskaltis *et al.*, 2004]. CD8 α ⁺DC wurden als lymphoide DC und CD8 α ⁻DC als myeloide DC bezeichnet. Dieses Konzept ist mittlerweile nicht mehr angebracht [Sato *et al.*, 2007]. Es herrscht jetzt im Großen und Ganzen Einigkeit darüber, dass jeder DC-Subtyp sowohl aus myeloiden als auch aus lymphoiden Vorläuferzellen differenzieren kann [Takeuchi *et al.*, 2007, Wu *et al.*, 2004].

Nach heutigem Stand der Kenntnis können DC in 2 abweichende Hauptgruppen klassifiziert werden: konventionelle (cDC) und plasmazytoide DC (pDC) [Hilkens *et al.*, 2010, Villadangos *et al.*, 2007].

Konventionelle DC üben im Wesentlichen die Immunfunktionen aus, die klassischerweise mit DC assoziiert werden, während die Funktion von pDC eher spezialisierter ist. Konventionelle DC sind in peripheren Geweben in der Nähe der Epithelien der Körperoberfläche, wie den Atemwegen, der gastrointestinalen Schleimhaut und der Haut lokalisiert. Sie sind in der Lage, Material des Pathogens aus der Peripherie über die afferente Lymphe zu den drainierenden Lymphknoten zu befördern, wo sie T-Zellen in ihrem stimulierten Zustand aktivieren [Hilkens und Isaacs 2010]. Konventionelle DC im Thymus, der Milz und den Lymphknoten können in fünf Populationen unterteilt werden, die anhand ihres Expressionsmusters spezifischer Marker unterschieden werden können. Diese Populationen können in Abhängigkeit ihres Eintrittsweges, den sie verfolgen, um in die lymphoiden Organe zu gelangen, in 2 Hauptgruppen unterteilt werden. Hierbei handelt es sich zum einen um migratorische und zum anderen um in lymphoiden Organen ansässige, residente DC. Migratorische DC entwickeln sich aus Vorläuferzellen in peripheren Geweben und wandern durch die afferente Lymphe, um die lokalen drainierenden Lymphknoten zu erreichen. Diese DC kommen gar nicht bzw. kaum in der Milz und dem Thymus vor, da diese Organe keine afferenten Lymphgefäße besitzen. Es gibt zwei Subtypen migratorischer DC. Hierbei handelt es sich um interstitielle oder dermale DC und um Langerhans Zellen. Die zweite Hauptgruppe der DC in den lymphoiden Organen sind die aus dem Blut abgeleiteten residenten DC, die

einen Teil der DC der Lymphknoten und alle DC der Milz und des Thymus stellen. Diese DC-Population beinhaltet drei Subtypen, die anhand ihrer CD4- und CD8-Expression klassifiziert werden können. Es handelt sich bei den drei Subtypen um CD4⁺CD8⁻-DC, CD4⁻CD8⁺-DC und um CD4⁻CD8⁻ DC. Neben den eben beschriebenen DC-Typen gibt es noch sogenannte Monozyten-abgeleitete DC. Monozyten können *in vitro* zu DC differenziert werden, aber es ist unklar, ob diese DC einem DC-Subtypen in den lymphoiden Organen unter ruhenden Bedingungen entsprechen [Villadangos *et al.*, 2007].

Plasmazytoide DC sind charakterisiert durch ihre runde Form, ihre plasmazytoide Morphologie und dadurch, dass sie schnell große Mengen an Typ-1 Interferon (IFN) bilden können. Sie exprimieren TLR7 und TLR9 und können nach deren Stimulierung IFN als Antwort auf virale Stimulation oder bakterielle Oligonukleotid-enthaltende CpG-Motive bilden [Takeuchi *et al.*, 2007, Wu *et al.*, 2004]. Plasmazytoide DC haben einen einzigartigen Oberflächen-Phänotyp. Sie sind CD45RA^{high}B220⁺CD11c^{low}CD11b⁻MHCII^{low}. Sie zirkulieren durch das periphere Blut und die lymphoiden Gewebe und werden zu Entzündungsstellen rekrutiert. Sie erwerben die typische DC-Morphologie nach ihrer Aktivierung [Villadangos *et al.*, 2007, Hilkens und Isaacs 2010]. Plasmazytoide DC im Knochenmark können zu cDC differenzieren und somit, wie Monozyten auch, unter inflammatorischen Bedingungen als prä-DC für konventionelle DC-Subtypen dienen. Prinzipiell können aus B220⁺ prä-DC plasmazytoide und konventionelle DC hervorgehen, während B220⁻ prä-DC nur cDC bilden. [Wu *et al.*, 2004, Takeuchi *et al.*, 2007].

1.3 Rolle von Dendritischen Zellen in der Immunität

Lebewesen sind in ihrer Umwelt ständig einer Vielzahl an Pathogenen ausgesetzt. Der Körper besitzt ein Immunsystem, dessen Aufgabe darin besteht ihn vor Infektionen durch diese Pathogene zu schützen. Das Immunsystem hat angeborene und adaptive Komponenten, die verschiedene Funktionen haben. Die Hauptunterschiede zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem sind die Mechanismen und Rezeptoren, mit denen die Zellen der beiden Komponenten eingedrungene Krankheitserreger erkennen [Medzhitov *et al.*, 2000].

Eine erste Barriere zum Schutz des Körpers vor Pathogenen sind Haut und Schleimhaut des Menschen. Durchdringt der Krankheitserreger diese, trifft er zunächst auf Komponenten des angeborenen Immunsystems [Flores-Romo, 2001]. Dieses beinhaltet zelluläre (z.B.

Phagozyten) und humorale Komponenten wie antimikrobielle Peptide und das Komplementsystem. Es wird wenige Minuten nach der Infektion aktiviert und bietet eine schnelle Kontrolle der Vermehrung des Pathogens [Pasare *et al.*, 2004].

DC sind Antigen-aufnehmende Wächter der peripheren Gewebe. Aus diesem Grund besiedeln sie die Körperoberflächen, die wie schon zuvor erwähnt, die Grenze des Organismus zu der Umwelt darstellen (z.B. Haut, Schleimhaut des Respirations- und Gastrointestinaltraktes) [Novak *et al.*, 2008]. DC sind darauf spezialisiert im immaturren Zustand Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und nach ihrer Ausreifung den Lymphozyten zur Erkennung zu präsentieren [Janeway *et al.*, 2002]. Sie verbinden somit das angeborene mit dem adaptiven Immunsystem [Reid *et al.*, 2000].

Immature DC (iDC) sind charakterisiert durch eine geringe Expression von MHC- und kostimulatorischen Molekülen auf ihrer Oberfläche [Pasare *et al.*, 2004]. Des Weiteren haben sie eine große endozytotische und phagozytotische Kapazität [Banchereau *et al.*, 1998]. Sie sind spezialisiert auf die Antigenaufnahme über Rezeptorvermittelte Endozytose über C-Typ-Lektine (Langerin/CD207, dectin-205 oder CD206) oder im Fall von Allergenaufnahme über multivalentes Kreuzvernetzen der hochaffinen Rezeptoren für IgE (FcγRI) oder durch Internalisierung von Flüssigkeiten oder solublen Materialien über das Aktinskelett mittels Makropinozytose. Außerdem haben DC die Fähigkeit zur phagozytotischen Inkorporation von Antigenen [Novak *et al.*, 2008]. Die iDC erkennen Pathogen-abgeleitete, mikrobielle Produkte anhand hoch konservierter molekularer Strukturen. Hierbei handelt es sich um bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglykane, Lipoteichonsäuren, Mannane, bakterielle und virale DNA, Glykane und um einzel- und doppelsträngige RNA, wie sie für Retroviren charakteristisch ist. Diese sogenannten Pathogen-assoziierten molekularen Muster (PAMP = pathogen associated molecular patterns) mikrobieller Produkte erkennen DC und andere Zellen des angeborenen Immunsystems über eine beschränkte Zahl in der Keimbahn kodierter Rezeptoren, die PRR („pattern recognition receptors“). Die PRR beinhalten u.a. Rezeptoren der Familie der TLR („Toll like receptors“) und die sogenannten „Mannose-Like“ Rezeptoren [Sato *et al.*, 2007, Pasare *et al.*, 2004], sowie die zuvor bereits erwähnten C-Typ-Lektine.

Es kommen sowohl intrazelluläre als auch Plasmamembran-gebundene PRR vor. Intrazelluläre Rezeptoren sind z.B. TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9. Sie erkennen Nukleinsäuren. Prinzipiell auf der Zelloberfläche exprimierte PRR sind z.B. TLR1, TLR2, TLR4, TLR 5 und TLR6. Diese erkennen meist bakterielle Produkte [Moser *et al.*, 2010]. Der

TLR4 z.B. ist für LPS von gramnegativen Bakterien und der TLR2 für Peptidoglykan von grampositiven Bakterien spezifisch. Zu den Aufgaben der PRR gehört die Induktion der Aktivierung der Komplementkaskade, der Phagozytose von Mikroorganismen und der Oponisierung von Mikroorganismen, damit diese für die Erkennung durch das Komplementsystem und durch Phagozyten markiert sind [Pasare *et al.*, 2004].

Erkennen immature DC Antigene nehmen sie diese auf und prozessieren die Proteine zu Peptiden, die sie im Kontext mit MHC-Molekülen auf ihrer Oberfläche präsentieren [Reid *et al.*, 2000]. Hierbei werden extrazelluläre Antigene auf MHCII-Moleküle geladen und im weiteren Verlauf der Immunantwort CD4⁺-T-Zellen präsentiert, während zytoplasmatische Antigene (z.B. von Viren) auf MHCI-Moleküle geladen und CD8⁺-T-Zellen präsentiert werden. Außerdem kann es zur sogenannten Kreuzpräsentation kommen, bei der exogene Antigene aufgenommen und auch auf MHCI-Molekülen präsentiert werden [Schäkel 2009].

Nach der Erkennung eines Pathogens entwickeln die DC einen maturaen Phänotyp und sezernieren große Mengen proinflammatorischer bzw. antiviraler Zytokine, was zu der Aktivierung angeborener Immunzellen führt und somit die Ausbreitung der Infektion limitiert [Sato *et al.*, 2007]. Die Ausreifung der DC wird u.a. durch inflammatorische Zytokine wie Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), IL-1 und durch bakterielle Komponenten wie LPS bewirkt [Bennett *et al.*, 1998]. Der Reifungsprozess der DC ist assoziiert mit einer verminderten Expression der endozytotischen und phagozytotischen Rezeptoren [Sato *et al.*, 2007]. Des Weiteren exprimieren mature DC vermehrt MHCI-, MHCII- und kostimulatorische Moleküle (u.a. CD40, CD80 und CD86) auf ihrer Oberfläche und verlieren ihre Fähigkeit, Antigene aus ihrer Umgebung aufzunehmen und zu prozessieren [Smits *et al.*, 2005]. Außerdem kommt es zu Änderungen in der Morphologie der Zellen: Die DC bilden infolge der Ausreifung zahlreiche lange Dendriten aus, wobei das Aktin-Bündelungs-Protein Fascin bei der Entwicklung der Dendriten eine wichtige Rolle spielt [Ross *et al.*, 1998 Al-Alwan *et al.*, 2001]. Zusätzlich ändern stimulierte DC ihre Chemokinrezeptor-Expression und deren Empfindlichkeit. Dies beinhaltet den Verlust der Sensitivität gegenüber inflammatorischen Chemokinen (CCL3, CCL5 und CCL20) über entweder die Herunterregulierung der Rezeptoren oder deren Desensibilisierung (z.B. CCR1, CCR5 und CCR6). Sie erwerben eine Responsivität gegenüber homöostatischen Chemokinen (z.B. CCL19 und CCL21) über die Aufregulierung von CCR7 [Sato *et al.*, 2007]. Die Veränderung des Expressionsmusters der Chemokin-Rezeptoren führt dazu, dass reife DC vom infizierten Gewebe über die afferente Lymphe zu den T-Zell-Bereichen der drainierenden Lymphknoten wandern [Smits *et al.*, 2005]. Unter ruhenden Bedingungen ist die Rate der DC-Migration hingegen sehr

gering. Die meisten DC residieren in einem ruhenden Status in den Geweben, bereit von Pathogenen aktiviert zu werden. Unter inflammatorischen Konditionen kann die Rate der DC-Migration stark gesteigert werden, um eine gesteigerte Antigenpräsentation in den drainierenden Lymphknoten zu ermöglichen [Sallusto *et al.*, 1999]. Die Wanderung der DC zu den Lymphknoten ist von großer Bedeutung, da die Vermittler der spezifischen adaptiven Immunität, die Lymphozyten, im naiven Zustand nicht in den peripheren Geweben vorkommen [Flores-Romo, 2001]. Das Antigen wird somit in Zell-gebundener Form zu den peripheren lymphoiden Organen transportiert, um dort Antigen-spezifischen T-Zellen präsentiert werden zu können [Wu 2004]. Die maturen DC können somit naive Antigen-spezifische T-Zellen aktivieren und ihre Differenzierung zu Effektorzellen induzieren [Sato *et al.*, 2007].

Hierbei erkennt der Antigen-Rezeptor von T-Zellen kein freies Antigen, sondern nur Peptide, die in der Antigenbindungsgrube von MHC-Moleküle auf der Oberfläche von APC gebunden sind [Medzhitov *et al.*, 2000]. Die Bindung des TCR an Peptid-MHC-Komplexe ist das erste der drei Signale, die für die effiziente T-Zell-Aktivierung benötigt werden. Neben der Erkennung des spezifischen Peptid-MHC-Komplex über den TCR benötigen die naiven T-Zellen als Signal 2 eine gleichzeitige Kostimulation über eine Interaktion von z.B. CD80 und CD86 auf den ausgereiften DC mit CD28 auf der Oberfläche der T-Zellen [Bancharau *et al.*, 1998, Tisch 2010]. Die Antigen-spezifischen aktivierten T-Zellen differenzieren hierdurch zu T-Helfer-Zellen und zu zytotoxischen T-Zellen und aktivieren ihrerseits wiederum die DC über die Interaktion zwischen CD40 auf den DC und CD154 auf den T-Zellen. Die DC sezernieren im Verlauf der Antigenpräsentation Zytokine (Signal 3). Dies ist essenziell für die Polarisierung des Typs der T-Effektor-Zellen. Die maturen DC induzieren dadurch eine T_H1 -, T_H2 - oder eine T_H17 -Antwort [Reid *et al.*, 2000, Bettelli *et al.*, 2006, Tisch 2010]. Interleukin-12 (IL-12) und Interferon- γ (IFN- γ) gehören zu den Zytokinen, die eine T_H1 -Antwort induzieren. Dies führt zu einer zellvermittelten Immunantwort. IL-6 und IL-10 gehören zu den Zytokinen, die eine T_H2 -Antwort induzieren, die zu einer humoralen Immunantwort führt [Janeway *et al.*, 2002]. Diese humorale Immunantwort wird von Antikörper-sezernierenden B-Zellen getragen, die von den T-Helferzellen aktiviert wurden. Diese Antikörper können an verschiedenen Arten der Immunabwehr beteiligt sein. Sie können an bakterielle Toxine binden, um diese zu neutralisieren, damit keine Wechselwirkungen der Toxine mit Körperzellen stattfinden können. Weiterhin können Antikörper durch Opsonisierung von Antigen wirken, um es so für Phagozyten als fremd erkennbar zu machen. Außerdem können Antikörper das Komplementsystem aktivieren. Dies geschieht, indem sie

an einen Mikroorganismus binden. Die gebundenen Antikörper bilden einen Rezeptor für das erste Protein des Komplementsystems wodurch die Komplementkaskade in Gang gesetzt wird [Janeway, 2001]. Neben T_H1 - und T_H2 -Zellen können durch eine Inflammation wie zuvor erwähnt auch T_H17 Zellen induziert werden. Essenziell für die Induktion von T_H17 -Zellen ist TGF β [Bettelli *et al.*, 2006]. Bei diesem Zytokin handelt es sich um einen wesentlichen Regulator von T_H17 -Zellen und regulatorischen T-Zellen [Steinman 2007]. Unter homöostatischen Bedingungen inhibiert TGF β die Generierung von Effektor T-Zellen und induziert FoxP3⁺ regulatorische T-Zellen. Dies führt zur Aufrechterhaltung der Selbst-Toleranz. Unter inflammatorischen Bedingungen, bei denen IL-6 gebildet wird, inhibiert dieses die Bildung regulatorischer T-Zellen. TGF β und IL-6 induzieren somit gemeinsam die Differenzierung von inflammatorischen T_H17 -Zellen aus naiven T-Zellen [Bettelli *et al.*, 2006]. Neben IL-6 spielt auch IL-21 in Kombination mit TGF β eine Rolle für die Generierung von TH-17 Zellen. Wie IL-6 führt es ebenfalls dazu, dass die TGF β -induzierte FoxP3-Expression in T-Zellen supprimiert wird [Korn *et al.*, 2007]. Des Weiteren wird IL-21 in T-Zellen durch die Anwesenheit von IL-6 induziert [Nurieva *et al.*, 2007]. Von T_H17 -Zellen gebildetes IL-21 kann dann wiederum die weitere Differenzierung von T_H17 -Zellen fördern [Korn *et al.*, 2007].

1.4 Rolle von Dendritischen Zellen bei der Aufrechterhaltung der Toleranz

Das Immunsystem muss zwischen Selbst- und Fremd-Antigenen und innerhalb der Gruppe der Fremd-Antigene zwischen harmlosen und schädlichen Antigenen unterscheiden können, da es bei Verlust der Toleranz gegenüber Selbst- und harmlosen Antigenen zu Autoimmun- oder allergischen Erkrankungen kommen kann [Buckner *et al.*, 2004]. Generell vermeidet das Immunsystem den sogenannten „horror Autotoxicus“ oder Autoimmunität, eine Attacke des Körpers gegen seine eigenen Bestandteile. Diese Toleranz setzt voraus, dass autoreaktive T-Zellen eliminiert oder tolerogenisiert werden können [Steinman *et al.*, 2002]. Man unterscheidet zwischen zentraler und peripherer Toleranz. Das Immunsystem verfügt über verschiedene Mechanismen zur Aufrechterhaltung der zentralen und peripheren Toleranz [Buckner *et al.*, 2004]. Bei der Entwicklung der immunologischen Toleranz spielen DC eine entscheidende Rolle [Steinman *et al.*, 2002, Sato *et al.*, 2007]. Sie können nicht nur immunogen, sondern auch tolerogen wirken. Dies ist sowohl im Thymus als auch in der Peripherie der Fall [Adorini *et al.*, 2004]. Die DC sind involviert in die klonale Deletion von

Selbst-reaktiven T-Zellen im Thymus (zentrale Toleranz) und in die Mechanismen der peripheren Toleranz. Diese umfassen die Induktion von Anergie, die immunologische Ignoranz und die Suppressor-Aktivität von regulatorischen T-Zellen [Buckner *et al.*, 2004, Sato *et al.*, 2007].

Zur Aufrechterhaltung der zentralen Toleranz werden unreife Lymphozyten, die autoreaktive Rezeptoren tragen, in den primären lymphatischen Organen eliminiert [Mathis *et al.*, 2004]. Sich entwickelnde B-Zellen und T-Zellen rearrangieren Ig- bzw. T-Zell-Rezeptor-Gene, um Lymphozyten mit einzigartigen Antigen-Rezeptoren zu produzieren. Das Gen-Rearrangement geschieht zufällig, so dass sowohl autoreaktive als auch nicht-autoreaktive Klone entstehen [Steinman *et al.*, 2002]. Heranreifende autoreaktive T-Zellen werden im Thymus, B-Zellen im Knochenmark durch Apoptose eliminiert [Mathis *et al.*, 2004].

B-Zell- und T-Zell-Vorläufer stammen aus dem Knochenmark. Die T-Zell-Vorläufer wandern in den Thymus ein, wo sie zunächst eine Phase der Differenzierung, dann eine Phase der Proliferation durchlaufen. Thymozyten durchlaufen bei der Proliferation und Reifung zu T-Zellen eine Reihe von unterschiedlichen Schritten, die durch eine Veränderung im Zustand der T-Zell-Rezeptor-Gene, der Expression des TCR und der Expression akzessorischer Proteine gekennzeichnet sind [Janeway *et al.*, 2002]. Der TCR erkennt keine freien Protein-Antigene. Er erkennt nur Peptide, die an MHC-Moleküle auf der Oberfläche von APC gebunden sind [Medzhitov *et al.*, 2000]. Aus diesem Grund ist es essentiell, dass zur Entwicklung der zentralen Toleranz Autoantigene im Thymus exprimiert werden [Lauzurica *et al.*, 1994]. Diese Aufgabe übernehmen kortikale Thymusepithelzellen (cTEC), medulläre Thymusepithelzellen (mTEC) und DC [Klein *et al.*, 2009]. Wenn in T-Zellen ein funktionsfähiger Antigenrezeptor rearrangiert wurde, erfolgt die positive Selektion im Cortex des Thymus mit Hilfe von cTEC. Bei der positiven Selektion werden alle T-Zellen, deren TCR ein spezifisches Auto-Antigen erkennen selektiert [Lauzurica *et al.*, 1994, Klein *et al.*, 2009]. Nach der positiven Selektion wandern die T-Zellen in die Medulla des Thymus, wo Thymozyten mit zu hoher Affinität zu Selbst-Antigenen im Laufe der negativen Selektion eliminiert werden. Hierzu werden den T-Zellen Selbst-Antigene von mTEC und von im Thymus ansässigen DCs präsentiert [Pasare *et al.*, 2004, Klein *et al.*, 2009, Steinman *et al.*, 2002].

Aus konventionellen T-Zellen können im Thymus auch $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ („forkhead box P3“) natürliche regulatorische T-Zellen (nTreg) differenzieren. Hierbei scheint der Kontext, in dem die T-Zellen auf das Antigen treffen, eine Rolle dafür zu spielen, ob eine T-Zelle

selektiert oder depletiert wird. Unter Anderem spielt das Autoimmun Regulator Gen (Aire) hierbei eine Rolle. Aire fördert die Expression Gewebe-spezifischer Selbst-Antigene durch mTEC was zu einer Deletion stark autoreaktiver T-Zellen führt. Die Aire-Expression durch Stromazellen kann aber auch die FoxP3-Aufregulierung in CD4⁺T-Zellen und somit die Entwicklung von nTreg als Antwort auf Selbst-Peptide fördern [Workman *et al.*, 2009]. Der Transkriptionsfaktor FoxP3 ist der Hauptregulator der Entwicklung und der Funktion regulatorischer T-Zellen (Treg) [Sakaguchi *et al.*, 2009].

Sich entwickelnde B-Zellen werden direkt im Knochenmark mit Hilfe von Stromazellen selektiert, wobei B-Zellen, deren BCR lösliche Selbst-Antigene erkennen, negativ selektiert werden. Sie durchlaufen einen Prozess der Apoptose oder werden inaktiviert. Solche anergisierten B-Zellen können nicht mehr durch antigenspezifische T-Zellen aktiviert werden [Pasare *et al.*, 2004].

Einige potentiell autoreaktive T-Zellen entgehen der Deletion im Thymus im Laufe der Entwicklung der zentralen Toleranz. Des Weiteren sind viele Selbst-Antigene im Thymus nicht vorhanden und der Körper ist außerdem ständig einer großen Menge an nichtpathogenen Umwelt-Antigenen ausgesetzt, gegen die er tolerant bleiben muss. Bei diesen handelt es sich z.B. um Umwelt-Proteine in den Atemwegen sowie um symbiotische Organismen in dem Intestinal-Trakt. Diese Einschränkungen der zentralen Toleranz machen Mechanismen zur peripheren Toleranzinduktion notwendig, zumal auch autoreaktive T-Zellen in die sekundären lymphatischen Organe einwandern [Pasare *et al.*, 2004, Steinman *et al.*, 2002].

Die periphere Toleranz wird durch verschiedene Mechanismen gewährleistet. Bei diesen Mechanismen handelt es sich um den Aktivierungs-induzierten Zelltod („activation induced cell death“ =AICD), die Induktion von Anergie und um die Induktion regulatorischer T-Zellen (Treg) [Buckner *et al.*, 2004].

Immature DC können Antigen-spezifische periphere Toleranz vermitteln, indem sie lösliche Antigene und auch apoptotische Zellen aufnehmen und entweder die Deletion der interagierenden Antigen-spezifischen T-Zellen oder die Generierung von Treg induzieren [Suciu-Foca *et al.*, 2009]. T-Zellen, die auf der Basis der Peptiderkennung allein nicht zwischen Fremd und Selbst unterscheiden können, benötigen, wie schon zuvor beschrieben (1.3), zu ihrer Aktivierung neben der Erkennung von Peptid-MHC-Komplexen auf der Oberfläche der APC auch noch ein zweites, kostimulatorisches Signal [Medzhitov *et al.*, 2000]. Eine Erkennung von Antigen ohne Kostimulation führt zur Inaktivierung oder

Apoptose der T-Zellen. [Lutz *et al.*, 2002]. Die Expression kostimulatorischer Moleküle wird durch das angeborene Immunsystem kontrolliert. Sie wird induziert, wenn PAMP durch PRR erkannt werden [Medzhitov *et al.*, 2000]. Immature DC präsentieren lediglich eine geringe Menge an Peptid-MHC-Komplexen auf ihrer Oberfläche. Gemeinsam mit ihrer limitierten Expression kostimulatorischer Moleküle hat dies zur Folge, dass die T-Zellen kein ausreichendes erstes und zweites Signal erhalten. Dies führt zu T-Zell-Anergie und/oder Apoptose. Die Apoptose kann ebenfalls durch die Expression von FasL („Fas ligand“) und PD-L1 („programmed death ligand 1“) auf DC induziert werden [Tisch 2010].

Neben dem zuvor beschriebenen Mechanismus spielen regulatorische T-Zellen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz [Suciu-Foca *et al.*, 2005]. Treg sind fähig Antigen-spezifische Immunantworten sowohl Zell-Kontakt-abhängig wie auch unabhängig von Zell-Kontakt durch lösliche Faktoren zu supprimieren [Buckner *et al.*, 2004, Sakaguchi *et al.*, 2009]. Es gibt wie zuvor beschrieben $CD4^+CD25^+$ nTreg, die sich im Thymus entwickeln. Sie supprimieren die Proliferation kokultivierter konventioneller $CD25^-$ T-Zellen. Dies geschieht nach der Aktivierung der nTreg über ihren Antigen-spezifischen TCR. Wurden die nTreg aktiviert, supprimieren sie interagierende T-Zellen Antigen-unspezifisch [Jonuleit *et al.*, 2003]. $CD4^+CD25^+$ nTreg wirken durch Zell-Kontakt-abhängige Mechanismen [Buckner *et al.*, 2004]. Durch Zell-Kontakt können Treg interagierende T-Zellen unter anderem durch Granzym- oder Perforin-abhängige Mechanismen abtöten. Sie können aber auch durch die Aufregulierung des intrazellulären cAMP-Niveaus (= zyklisches Adenosin Monophosphat) in den interagierenden Zellen ein negatives Signal liefern, das zur Inhibition der T-Zell-Proliferation führt [Sakaguchi *et al.*, 2009].

Neben den nTreg gibt es auch Treg, die ihre regulatorischen Eigenschaften in der Peripherie erwerben (adaptive Treg). Adaptive Treg sind Antigen-induziert und inhibieren T-Zell-Antworten entweder durch die Sezernierung inhibitorischer Zytokine (IL-10 und TGF β) oder durch Tolerogenisierung von APC über Zell-Kontakt. Bei der Entstehung adaptiver Treg aus konventionellen $CD4^+CD25^-$ T-Zellen spielen immature und sogenannte semi-mature DC eine wichtige Rolle, da sie einen tolerogenen Charakter besitzen und T-Zellen mit regulatorischem Charakter in der Peripherie induzieren können [Groux *et al.*, 2004, Sucio-Foca, 2009]. Neben dem Reifungsstatus der DCs spielt für die Entwicklung regulatorischer T-Zellen das Zytokinmilieu während der APC-T-Zell-Interaktion eine wichtige Rolle [Buckner *et al.*, 2004].

1.5 Generierung tolerogener Dendritischer Zellen

Neben ihrer Funktion bei der Induktion von primären Immunantworten spielen DCs wie in 1.4 erwähnt auch eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz, da sie anerge und regulatorische T-Zellen induzieren können [Panoskaltis *et al.*, 2004]. Semi-mature DC können z.B. durch eine Kurzzeit-Stimulierung mit TNF α generiert werden [Lutz *et al.*, 2002]. Sie sind gekennzeichnet durch eine hohe Oberflächenexpression von MHCII und kostimulatorischen Molekülen und durch eine geringe oder gar keine Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , IL-6, TNF α und IL-12p70 [Lutz *et al.*, 2002]. Tolerogene DC können außerdem auch mit Hilfe von immunsuppressiven und antiinflammatorischen Substanzen (Zytokine, Pharmaka) generiert werden [Adorini *et al.*, 2004]. Des Weiteren können immunregulatorische DC durch virale Transduktionen z.B. mit tolerogenen Molekülen wie IL-10 generiert werden [u.a. Morita *et al.*, 2001, Dullaers und Thielemans 2006, Coates *et al.*, 2001].

1.5.1 Generierung tolerogener Dendritischer Zellen mit Hilfe immunsuppressiver und antiinflammatorischer Agenzien

Wie zuvor erwähnt, können tolerogene DC mit Hilfe immunsuppressiver und antiinflammatorischer Substanzen generiert werden. Bei solchen immunsuppressiven Substanzen handelt es sich z.B. um Glucocorticoide, Vitamin D3 oder Sirolimus. Diese Substanzen beeinträchtigen die Aktivität von NF- κ B-Transkriptionsfaktoren und somit die Reifung der DC. Hierdurch wird die Aufregulierung kostimulatorischer Moleküle, die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-12 und die allostimulatorische Kapazität inhibiert [Adorini *et al.*, 2004]. Außerdem können immunsuppressive Substanzen die Expression von Molekülen mit koinhibitorischer Funktion vermitteln. Hierzu gehören z.B. die inhibitorischen Rezeptoren ILT3 („immunoglobulin-like transcript 3“) und ILT4 [Vlad *et al.*, 2005].

Ein weiteres Beispiel für Substanzen, die supprimierend auf Dendritische Zellen wirken, sind solche, die das intrazelluläre Niveau an cyclischem AMP (cAMP) erhöhen. Hierbei handelt es sich z.B. um Rolipram, Cicaprost und Prostaglandin E₂ (PGE₂).

Bei cAMP handelt es sich um ein Nukleotid, das als intrazellulärer „second messenger“ agiert [Kambayashi *et al.*, 2001, Eigler *et al.*, 1998]. Substanzen, die das intrazelluläre cAMP-Niveau erhöhen, interferieren mit dem Differenzierungsprozess von DC über den G-Protein-Adenylatcyclase-Weg (siehe Abbildung 1) [Galgani *et al.*, 2004]. Dieser G-Protein-Adenylatcyclase-Weg wird initiiert, wenn ein externer erster Botenstoff (Neurotransmitter, Hormon, Medikament) an Rezeptoren bindet, die ein heterotrimeres G-Protein aktivieren. Die G-Proteine aktivieren die Adenylat-Cyclase, die die Produktion von cAMP aus ATP katalysiert. Das cAMP bindet an die inhibierende regulatorische Untereinheit von Protein-Kinase A (PKA), was zur Freilassung der aktiven katalytischen Untereinheit führt. Die so aktivierte PKA transloziert dann in den Zellkern, um CREB („CRE-binding protein“) zu phosphorylieren. Dieses bindet an sogenannte CRE („cAMP responsive elements“) in den Promotoren verschiedener Gene und reguliert dadurch deren Transkription [Schwartz, 2001, Greenberg und Shaywitz 1999].

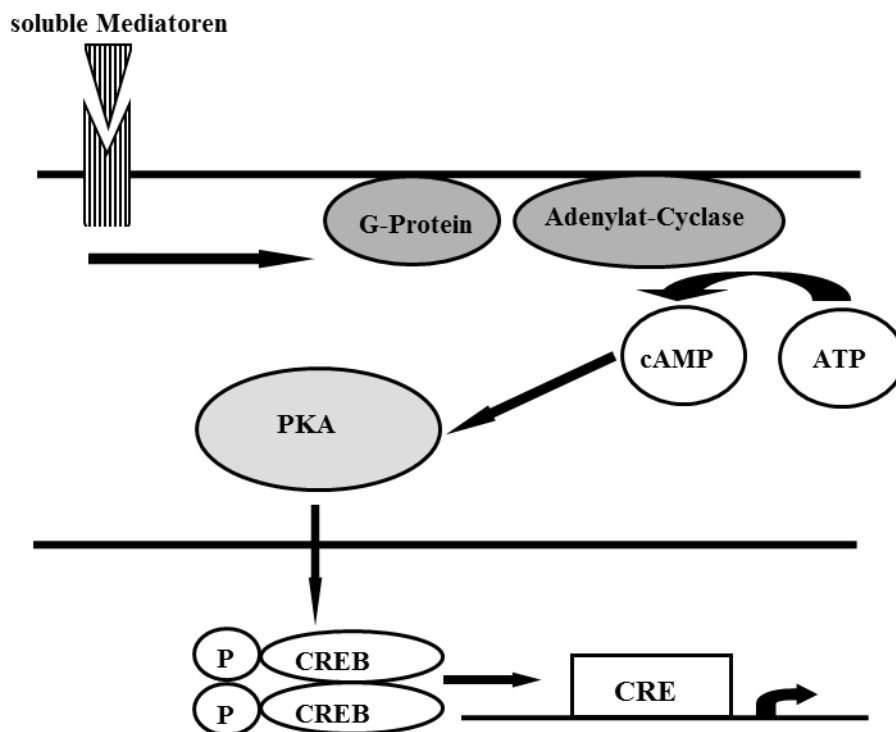


Abb. 1: Wirkungsweise des intrazellulären second messengers cAMP. Abbildung nach Greenberg und Shaywitz (1999).

PGE₂ gilt klassischerweise als ein Immunsuppressivum, das inhibitorisch auf die Differenzierung von T_H1-Zellen wirkt. Prostaglandine, die durch APC produziert werden, inhibieren die Produktion von IL-2 und IFN γ und supprimieren die T-Zell-Proliferation. PGE₂

wirkt als Modulator von T-Zellen durch Erhöhung des intrazellulären cAMP-Niveaus in den T-Zellen [Sakata *et al* 2010]. PGE₂ wirkt aber z.B. auch auf DC selbst durch die Induktion von endogenem IL-10, dass die IL-12 Produktion inhibiert und die Antigen-Präsentation durch die Inhibierung von MHCII verändert [Harizi *et al.*, 2003].

Eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Niveaus durch PGE₂ führt allerdings auch zu unspezifischen Effekten und kann somit nicht als Methode für therapeutische Zwecke dienen. Eine Inhibierung von Phosphodiesterasen (PDE) stellt eine weitere Möglichkeit dar, das cAMP-Niveau zu erhöhen. PDE sind die einzigen bekannten Enzyme, die cAMP degradieren. Rolipram z.B. ist ein PDE4-Inhibitor, der in Makrophagen die TNF α -Sekretion inhibiert und die IL-10-Sekretion erhöht. Kambayashi *et al.* (2001) zeigten in murinen BM-DC („Bone marrow derived dendritic cells“), dass cAMP-erhöhende Agenzien die Antigen-Präsentation durch die DC inhibieren. Des Weiteren inhibieren sie die TNF α und erhöhen die IL-10-Produktion LPS-stimulierter DC. Rolipram führte in dieser Studie zu einer geringeren T-Zell-Proliferation und zu einer Verminderung der LPS-induzierten Aufregulierung von MHCII und CD40, wobei die Expression von CD80 und CD86 nicht inhibiert wurden. Insgesamt folgerte die Arbeitsgruppe, dass das therapeutische Potenzial von cAMP-erhöhenden Agenzien für Autoimmun- und inflammatorische Erkrankungen von Interesse ist, da diese Substanzen die Produktion von IL-10 erhöhen und die von TNF- α und IL-12 inhibieren. Dies könnte zu einer Verschiebung in Richtung einer T_H2-Antwort führen, was von Vorteil bei Autoimmunerkrankungen/Autoimmunerkrankungsmodellen wäre, die T_H1 vermittelt sind [Kambayashi *et al.*, 2001].

Es wurde nicht nur in murinen DC gezeigt, dass Substanzen, die das intrazelluläre cAMP-Niveau erhöhen, eine Steigerung der LPS induzierten IL-10-Synthese und eine Suppression der TNF α -Bildung induzieren. Schon 1998 zeigten Eigler *et al.*, dass eine Behandlung humaner PBMC („peripheral blood mononuclear cell“) mit solchen Substanzen die eben beschriebene Effekte hat [Eigler *et al.*, 1998].

Des Weiteren ist bekannt, dass cAMP von nTreg die Expression kostimulatorischer Moleküle auf DC kontrolliert. Eine Kokultur muriner DC mit nTreg führt zu einem Anstieg des cAMP-Niveaus in den DC und zu einer Herunterregulierung von CD80 und CD86 und zu einer vermehrten Expression von B7-H3. Das cAMP wird hierbei direkt von den nTregs über sogenannte „Gap Junctions“ auf kokultivierte DC übertragen und stellt einen wichtigen Mechanismus der Treg-vermittelten Suppression der DC-Aktivierung dar. Von nTreg gebildetes und übertragenes cAMP kontrolliert somit auch übermäßige Immunantworten

durch die direkte Limitierung der stimulatorischen Kapazität von DC [Fassbender *et al.*, 2010].

All diese Befunde implizieren, dass eine detaillierte Charakterisierung cAMP-behandelter DC von Interesse ist.

1.5.2 Generierung tolerogener Dendritischer Zellen mit Hilfe der lentiviralen Transduktion

Gentherapie-Protokolle beruhen früher auf Vektoren, die von Retroviren wie z.B. dem murinen Leukämie Virus (MLV) abgeleitet sind. Diese Vektoren sind nützlich, da die transduzierten Gene in das Genom der Zielzelle integriert werden, was zu einer langanhaltenden Expression führt. Mit solchen retroviralen Vektoren können jedoch nur Zellen transduziert werden, die sich teilen, was ihre Verwendung limitiert. HIV und andere Lentiviren hingegen können in das Genom nichtproliferierender Zellen integrieren und stellen somit ein optimales System zum Transfer von Genen dar [Naldinid *et al.*, 1996]. Ein weiterer Vorteil lentiviraler Vektoren ist, dass sie im Gegensatz zu z.B. adenoviralen Vektoren nicht für virale Proteine kodieren, die durch die transduzierten DC präsentiert werden und zu einer vektorspezifischen Immunantwort führen können, was Immunisierungsprotokolle mit wiederholten Immunisierungen erschweren kann [He *et al.*, 2005].

Sowohl humane Mo-DC („monocyte-derived dendritic cells“) als auch murine BM-DC können mit Hilfe lentiviraler Vektoren effizient transduziert werden [Dullaers und Thielemans, 2006]. Dullaers und Thielemans beschreiben in ihrem Review von 2006, dass nach den meisten Studien eine lentivirale Transduktion lediglich einen unerheblichen Einfluss auf die Viabilität von DC hat. Der Einfluss auf ihre Ausreifung, ihre T-Zell-Stimulierungskapazität und auf ihre Zytokinproduktion ist danach ebenfalls vernachlässigbar. Es gibt aber auch vereinzelt Veröffentlichungen, die eine verminderte oder gesteigerte Ausreifung der DC beschreiben.

Vakzinierungen gegen Infektionskrankheiten beinhalten eine Injektion von Antigen gemischt mit einem Adjuvanz. Diese werden prophylaktisch gesunden Individuen appliziert und sind in diesem Kontext sehr effizient. Bei schon bestehenden Erkrankungen, bei denen eine therapeutische Vakzinierung stattfindet, ist diese direkte *in vivo* Injektion des Vakzins nicht

effizient. In solchen Fällen werden DC-Vakzine eingesetzt, die autologe DC beinhalten. Deren *ex vivo* Manipulation führt zu optimal aktivierten DC und somit zu einer verbesserten Stimulierung der Immunantwort *in vivo* verglichen mit traditionelleren Vakzinierungsmethoden [Gilboa, 2007].

DC-Vakzine werden unter anderem in der Therapie gegen Krebs eingesetzt. In vielen klinischen Studien werden hierfür DC verwendet, die mit tumorspezifischen Antigenen beladen werden. Diese Vakzine induzieren eine Antigen-spezifische T-Zell-Antwort gegen Tumore [He *et al.*, 2005, Figdor *et al.*, 2004]. Ein weiterer Ansatz ist die virale Transduktion der DC, um das spezifische Antigen endogen zu produzieren, zu prozessieren und zu präsentieren. He *et al.* (2005) zeigten, dass lentiviral transduzierte DC eine stärkere und langanhaltendere T-Zell-Antwort *in vivo* auslösen als solche, die mit Antigen beladen wurden [He *et al.*, 2005]. Die Transduktion mit antigen-kodierenden Vektoren führt dazu, dass das Antigen kontinuierlich in den DC vorliegt [Sumimoto *et al.*, 2002].

Neben der viralen Transduktion von DC zur Induktion von Antigen-spezifischen T-Zell-Antworten können transduzierte DC auch zur Inhibition von Immunantworten eingesetzt werden. Eine Möglichkeit hierfür ist die simultane Modifizierung von DC mit Antigen und immunmodulatorischen Molekülen über bizistronische Vektoren, um den Ausgang der Immunantwort zu beeinflussen. Eine Kotransduktion mit Antigen und einem tolerogenen Molekül wie IL-10 oder B7-H1 könnte zu einer Antigen-spezifischen Toleranz führen, die z.B. bei Autoimmunerkrankungen benötigt wird [Dullaers und Thielemans 2006].

Morita *et al.* (2001) konnten z.B. zeigen, dass murine DC durch retrovirale Transduktion mit einem IL-4 kodierenden Virus und intraperitonealer Injektion der IL-4-transduzierten DC die murine Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) inhibieren können. IL-4 vermittelt die Differenzierung naiver T-Zellen zu einem T_H2-Phänotyp und wirkt der im CIA-Krankheitsverlauf auftretenden T_H1-Differenzierung entgegen. IL-4 wird normalerweise nicht von APC gebildet, sondern hauptsächlich von T-Zellen. Der Vorteil IL-4-transduzierter DC ist, dass sie in lymphoide Organe migrieren können, dort direkt mit T-Zellen interagieren und somit die T-Zell-Antwort mit Hilfe des sezernierten IL-4 modifizieren können [Morita *et al.*, 2001].

Eine weitere Veröffentlichung, die sich mit dem Einsatz von transduzierten DC in einem Krankheitsmodell beschäftigt, ist die von Coates *et al.* aus dem Jahr 2001. Sie zeigten, dass humane DC, die adenoviral mit einem IL-10-Vektor transduziert wurden, die Transplantatabstoßung im humanisierten Mausmodell inhibieren können.

Es gibt also bereits Studien, die einen therapeutischen Effekt genetisch modifizierter DC zeigen. Eine Modifikation von DC mit immunregulatorischen Molekülen wie z.B. koinhibitorischen Oberflächenmolekülen oder antiinflammatorischen Zytokinen um tolerogene DC zu erhalten, könnte somit einen potenziellen Ansatz für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen darstellen.

1.6. Klinische Relevanz dendritischer Zellen

Das zunehmende Wissen über die entscheidende Rolle der DC bei der Regulierung der Immunität/Autoimmunität und der Toleranz/Selbsttoleranz ist Anlass für die Entwicklung von tolerogenen DC als immuntherapeutisches Mittel für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen, Allergien und Komplikationen bei Transplantationen. Wichtig bei der Generierung tolerogener DC für die klinische Applikation ist deren Stabilität. Unreife DC induzieren unter homöostatischen Bedingungen Toleranz, sind aber in der Hinsicht instabil, dass sie als Antwort auf proinflammatorische Zytokine und TLR-Liganden ausreifen. Deshalb ist es für die klinische Applikation wichtig DC mit stabiler tolerogener Funktion zu generieren [Hilkens und Isaacs 2010]. Steinbrink *et al.* (2009) weisen bei der therapeutischen Verwendung tolerogener DC als Suppressoren ungewollter Immunantworten bei der Autoimmunität oder der Allergie ebenfalls darauf hin, dass es nötig ist die Eigenschaften der eingesetzten immunsuppressiven DC genau zu definieren. Nur so kann verhindert werden, dass gefährliche Nebeneffekte *in vivo* auftreten, wie z.B. die Transformation in immunstimulatorische DC, welche eine ungewollte T-Zell-Antwort weiter fördern. Hierbei wurde z.B. für die Verwendung von immunsuppressiven Agenzien gezeigt, dass sie die immunostimulatorische Funktion von immaturren DC blockieren und ihre Differenzierung in stabile tolerogene DC begünstigen. Solche funktionell blockierten DC können nicht mehr effizient auf inflammatorische Stimuli antworten, induzieren Treg und inhibieren T-Effektor-Zell-Antworten. Wesentlich einfacher ist der Einsatz von DC zum Stimulieren von inflammatorischen Immunantworten z.B. in Tumorthérapien. Hierbei dienen mature DC als natürliches Adjuvanz, da sie funktionell resistent gegen eine unerwünschte Konvertierung zu tolerogenen DC durch *in vivo* vorkommende antiinflammatorische Agenzien sind [Steinbrink *et al.*, 2009].

1.7 Die murine DC-Linie SP37A3 als Modell für myeloide DC

Bei der Zelllinie SP37A3 handelt es sich um murine DC myeloiden Ursprungs. Sie wurden in den Laboratorien der Firma Merck (Darmstadt) nach einer modifizierten Methode von Winzler *et al.* (1997) durch wachstumsfaktorabhängige Langzeitkultur von C57BL/6 Milzzellen generiert [Bros *et al.*, 2007]. SP37A3-Zellen exprimieren CD11c, aber keine Marker von pDC wie CD45/B220 und GR-1. Sie weisen durch die Zugabe von Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierendem Faktor (GM-CSF) und von Makrophagen Kolonie stimulierendem Faktor (M-CSF) während der Kultivierung einen immaturren Phänotyp auf. Dieser wird durch die geringe Expression von MHCII und kostimulatorischen Molekülen, sowie durch die geringe T-Zell-Stimulierungskapazität charakterisiert. Nach Stimulierung mit einer Kombination aus TNF- α und IL-1 β erhalten SP37A3-Zellen einen maturaen Phänotyp und können naive T-Zellen vergleichbar potent wie BM-DC aktivieren [Bros *et al.*, 2007].

Das Arbeiten mit der DC-Linie SP37A3 bietet im Vergleich zu dem Arbeiten mit BM-DC einige Vorteile: Für die Arbeit mit BM-DC müssen Knochenmarkszellen aus Mäusen gewonnen und die BM-DC zeitaufwändig generiert werden. Unreife SP37A3-Zellen hingegen können als Expansionskultur gehalten werden. BM-DC-Kulturen können des Weiteren kontaminierend andere Zelltypen enthalten und sie haben insgesamt einen heterogenen Phänotyp betreffend der Expression von MHCII und kostimulatorischen Molekülen [Masurier *et al.*, 1999]. Deshalb ist es interessant mit DC-Zelllinien zu arbeiten, die sich ähnlich wie BM-DC verhalten.

1.8 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Dissertation war es zu untersuchen, ob in unstimulierten und stimulierten DC und in unstimulierten und stimulierten db-cAMP-DC ein differenzielles T-Zell-Stimulierungspotenzial vorhanden ist. Des Weiteren sollten der Phänotyp dieser unterschiedlich konditionierten DC genauer untersucht werden. Hierfür sollte die differentielle Expressionsänderung einer Reihe von Markermolekülen auf mRNA- und auf Proteinebene untersucht werden. Außerdem sollte untersucht werden über welche Mechanismen die db-cAMP-DC ihre spezifische Funktion ausüben. Die Versuche wurden mit murinen Knochenmarks-abgeleiteten DC (BM-DC) durchgeführt. Die unterschiedlich konditionierten BM-DC wurden in eine primäre allogene MLR sowie eine syngene Kokultur eingesetzt, um ihr Potential zur T-Zell-Aktivierung zu überprüfen. Die differentielle Expressionsänderung der Markermoleküle wurde zunächst auf mRNA-Ebene mittels quantitativer „Real-Time“-PCR untersucht. Zur Validierung wurden einige der Moleküle auf Proteinebene durch FACS-Analyse und mittels ELISA nachgewiesen. Außerdem wurde mit Hilfe von Suppressions- und Neutralisierungstests untersucht, ob die cAMP-DC Eigenschaften aufweisen, die denen von myeloiden Suppressorzellen (MDSC = myeloid derived suppressor cells) ähneln.

Anhand der FACS-Analyse von kokultivierten T-Zellen wurde überprüft, ob durch die vier BM-DC-Gruppen regulatorische T-Zellen induziert werden. Mittels ELISA wurde untersucht, ob die BM-DC und db-cAMP-DC in kokultivierten T-Zellen ein differenzielles Zytokinprofil induzieren. Des Weiteren wurde durch die spezifische Hemmung der Proteinkinase A (PKA) und der Cyclooxygenase-2 (Cox-2) untersucht, ob diese Moleküle zu der differentiellen Wirkung der db-cAMP-DC beitragen.

Neben den Versuchen mit BM-DC sollte in einem weiteren Projekt getestet werden, ob in Zellen der murinen DC-Linie SP37A3 mit Hilfe der lentiviralen Transduktion inhibitorische Moleküle überexprimiert werden können. Hierfür wurde exemplarisch Virus mit für das koinhibitorische Oberflächenmolekül B7-H3 kodierenden DNA-Plasmiden hergestellt und SP37A3-Zellen mit diesem unter verschiedenen Versuchsbedingungen transduziert. Hierbei wurde ein Protokoll zur effizienten Transduktion dieser Zellen etabliert.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

| Gerät | Modell | Hersteller |
|---------------------------|---|--------------------------------------|
| Analysenwaage | Precisa 120 A | Otto Mild Waagen, Karlsruhe |
| Autoklav | V-150 | Systec GmbH, Wetzlar |
| Bakterienschüttler | RBI-112 Benchtop Incubator Shaker Áerotron | Infors, Bottmingen, Schweiz |
| Bestrahlungsgerät | Gammacell 2000 | Mølsgaard Medical, Risø, Dänemark |
| Brutschrank | CB 150, CB 210 | Binder, Tutlingen |
| | Heraeus KB 600 | Heraeus, Hanau |
| Digitalwaage | Basic Typ 1202 | Sartorius, München |
| Dispenser | Multipette® 4780 | Eppendorf, Hamburg |
| Durchflusszytometer | FACScan | BD, Heidelberg |
| Elektrophoresekammer | VARIA 1 | Roth, Karlsruhe |
| Elektroporator | Gene Pulser™ | BioRad, München |
| ELISA-Washer | Ultrawash plus | Dynex, Chantilly, USA |
| Fluoreszenzmikroskop | Olympus IX70 | Olympus, Hamburg |
| Folien-Einschweiß-Gerät | Heat Sealer 1295-012 | Audion Elektro, Kleve |
| Gel-Dokumentations-System | Fusion-SL-4.2 MP | PeqLab, Erlangen |
| Magnetrührer | IKAMAG® REO | Janke & Kunkel, Staufen |

| Gerät | Modell | Hersteller |
|-------------------------------|---|--|
| Mehrkanalpipette | Finpipette, 8-Kanalpipette, 30 – 300 µl | Thermo Scientific, Waltham, USA |
| | Finpipette, 12-Kanalpipette, 50 - 300 µl | Labsystems, Helsinki, Finnland |
| Lichtmikroskope | Mikroskop CK2 | Olympus, Hamburg |
| | Mikroskop CH2 | |
| Mikrowelle | EM-120S | Sanyo, San Diego, USA |
| pH-Meter | CG 840 mit Einstabmesskette N2042 | Schott, Hofheim am Taunus |
| Pipetten | Eppendorf-Reference®- Piepetten: 1 – 10 µl, 10 – 100 µl, 200 – 1000 µl | Eppendorf, Hamburg |
| | Finpipette-Digital: 0,5 – 10 µl, 40 – 200 µl, 100 – 1000µl | Labsystems, Helsinki, Finnland |
| Pipettierhilfe | Pipetus®-akku | Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt |
| | Pipetboy plus | Tecnomara, Zürich, Schweiz |
| Präparierbesteck | – | Hammacher, Solingen |
| Präzisions-Mikroplatten-Leser | – | MWG Biotech, Ebersberg |
| Reagenzglasrüttler | Vortex Genie 2™ | Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz |
| Spannungsgerät | Electrophoresis constant power supply ECPS 3000/150 | Pharmacia Biotech, Freiburg |
| Spektrophotometer | Ultrospec 1100 pro | Pharmacia Biotech, Freiburg |
| Sterile Werkbank | Heraeus Lamin Air® HB 2448 | Heraeus, Hanau |
| Stickstofftank | BT 40 | Láir liquid, Wiesbaden |

| Gerät | Modell | Hersteller |
|----------------------------|---|---|
| Szintillationszähler | 1205 Betaplate | LKB Wallac, Freiburg |
| Thermocycler | 7300 HT Fast Real-Time PCR System | Applied Biosystems, Darmstadt |
| | DNA Thermocycler 480 | Perkin Elmer, Zaventem, Belgien |
| Ultrazentrifuge | CENTRIKON T-1170 Rotor : TST 41.14 - 41000 | Kontron Instruments GmbH, Neufahrn |
| UV-Tisch | N90 MV 312 NM | Faust, Schaffhausen, Schweiz |
| Wasserdeionisierungsanlage | Purelab Classic DI | ELGA, Bucks, Großbritannien |
| Zählhilfe | Laboratory Counter | Becton Dickinson GmbH, Heidelberg |
| Zählkammer | Neubauer Improved Bright Line; 0,1 mm | AO, Buffalo, USA |
| Zellerntegerät | 1295-001 Cell Harvester | LKB Wallac, Freiburg |
| Zentrifuge | Sorvall RT 6000D Biofuge | Du Pont, Bad Homburg Heraus, Wiesbaden |
| | Multifuge 1 L-R | Heraeus, Hanau |
| | Biofuge A | Heraeus, Wiesbaden |

2.1.2 Labor- und Verbrauchsmaterialien

| Material | Modell | Hersteller |
|--------------------------------------|--------------|--------------------------------|
| Abdeckfolie für ELISA-Platten | EASYseal™ | Greiner Bio-one, Frickenhausen |
| Abdeckfolie für Realtime-PCR-Platten | — | Abgene, Hamburg |
| Alufolie | 30u-Qualität | Roth, Karlsruhe |

| Material | Modell | Hersteller |
|-------------------------------|---|--|
| Bakteriologische Petrischalen | Ø 94 mm, Höhe 16 mm | Greiner Bio-one, Frickenhausen |
| Dispensiergerät-Aufsatz | PD-Tips 2,5 ml und 5 ml | Brand GmbH & Co. KG, Wertheim/Main |
| Einfrierbox | Cryo 1 Freezing container | Thermo Fisher Scientific, Langenselbold |
| Einfrierröhrchen | Nunc cryo Tube™ vials | Nunc, Roskilde, Dänemark, |
| Einschweißfolien | 102 x 258 mm | Wallac, Turku, Finnland |
| Elektroporationsküvette | — | PeqLab, Erlangen |
| ELISA-Platten | 96-Loch-Flachbodenplatten, Microlon, high binding | Griener-bio-one GmbH, Frickenhausen |
| FACS-Röhrchen | Falcon 5 ml Rundbodenröhrchen | Becton Dickinson GmbH, Heidelberg |
| Gewebekulturschalen | Cellstar: Ø 100 mm, Höhe 20 mm | Greiner Bio-one, Frickenhausen |
| Glasfaserfilter | 102 x 258 mm | Wallac Turku, Finnland |
| Glaspipetten | Precicolor: 5 ml, 10 ml und 25 ml | HBG (Henneberg-Sander GmbH), Giessen |
| Handschuhe | Sempercare® | Semperit, Wien, Österreich |
| Kanülen | 0,7 x 30 mm | Becton Dickinson GmbH, Heidelberg |
| | 0,4 x 12 mm | B. Braun, Melsungen |
| Küvetten | Einmal-Küvetten, 1,5 ml | Brand GmbH & Co. KG, Wertheim/Main |
| Kulturflaschen | 25 cm ² 75 cm ² 175 cm ² | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |

| Material | Modell | Hersteller |
|-----------------------|---|-------------------------------------|
| Kulturplatten | Cellstar Gewebe-Kultur Platte, 6-Loch (Flachboden) | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen |
| | Cellstar Gewebe-Kultur Platte, 24-Loch (Flachboden) | |
| | Cellstar Gewebe-Kultur Platte, 48-Loch (Flachboden) | |
| | Cellstar Gewebe-Kultur Platte, 96-Loch (Flachboden) | |
| | Cellstar Gewebe-Kultur Platte, 96-Loch (U-Boden) | |
| Mattrandobjektträger | 76 x 26 cm | Diagonal GmbH & Co. KG, Münster |
| Nylonwolle | MKN-100 Nylon Wool Fiber | Kisker Biotech, Steinfurt |
| Parafilm | Parafilm N | Nationalcan™, Chicago, USA |
| Pasteurpipetten | 150 mm | VWR GmbH, Darmstadt |
| Pipettenspitzen | Kristallspitzen: Tip one 0,1 -10 µl | STARLAB GmbH, Ahrensburg |
| | Weißer Spitzen: bis 200 µl | Roth, Karlsruhe |
| | Gelbe Spitzen: bis 200 µl | Sarstedt AG, Nümbrecht |
| | Blaue Spitzen: bis 1000 µl | Roth, Karlsruhe |
| Plastikpipetten | Cellstar 5 ml, 10 ml, 25 ml | Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen |
| Polypropylen-Röhrchen | 15 ml und 50 ml | Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen |
| Quarzküvette | 10 mm | Hellma Analytics, Müllheim |

| Material | Modell | Hersteller |
|------------------------------|---|--|
| Reaktionsgefäße | 0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml | Sarstedt AG, Nümbrecht |
| Rundboden-Reaktionsgefäße | 13 ml | Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen |
| Sicherheitsreaktionsgefäße | 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml | Eppendorf, Hamburg |
| Spritzen | Omnifix [®] 1 ml | B/Braun, Melsungen |
| | 10 ml, Discardit [™] II | Becton Dickinson GmbH, Heidelberg |
| Spritzenvorsatzfilter | 0,2 µm Celluloseacetat | Sarstedt AG, Nümbrecht |
| | 0,45 µm Celluloseacetat | Schleicher & Schuell GmbH, Dassel |
| Thermo-96-Loch-Platten | 96-Loch-Mikrotestplatte, Thermowell [®] GOLD | Corning Incorporated, Corning, USA |
| Ultrazentrifugationsröhrchen | Ultra-Clear [™] Tubes ⁹ / ₁₆ x 3 ³ / ₄ in. (14 x 95 mm) | Beckman Instruments, Palo Alto, USA |
| Zellschaber | 24 cm | Renner GmbH, Dannstadt |
| Zellsieb | Cell Strainer Ø 40 µm | Becton Dickinson GmbH, Heidelberg |

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

| Substanz | Hersteller |
|--|-------------------------------------|
| 2-β-Mercaptoethanol | Roth, Karlsruhe |
| ³ H-Thymidin (³ HTdR) | Amersham Biosciences GmbH, Freiburg |
| Agarose | Herolab, Wiesloch |
| Alkopharm 70 (70%iger Alkohol) | Brüggemann, Heilbronn |
| Ammoniumchlorid (NH ₄ CL) | Roth, Karlsruhe |
| Ammoniumsulfat | Roth, Karlsruhe |

| Substanz | Hersteller |
|---|--------------------------------------|
| Ampicillin (C ₁₆ H ₁₈ N ₃ O ₄ S) | Ratiopharm, Ulm |
| Bovines Serum Albumin (BSA) | PAA Laboratories, Cölbe |
| Bromphenolblau, Na-Salz (C ₁₉ H ₃₇ BrNa) | Roth, Karlsruhe |
| Calciumchlorid (CaCl ₂) | Roth, Karlsruhe |
| Catalase | Cayman Chemical, Ann Arbor, USA |
| Chloroquin Diphosphat | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Dibutyryl-cyclo-Adenosin-3',5'-Mono-Phosphat (db-cAMP) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Diethylpyrocarbonat (DEPC) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| D(+)-Saccharose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁) | Roth, Karlsruhe |
| Essigsäure 100%ig (C ₂ H ₄ O ₂) | Roth, Karlsruhe |
| Ethanol 96%ig (C ₂ H ₅ OH) | BD, Karlsruhe |
| Ethidiumbromid (3,8-Diamino-6-Ethyl-5-phenylphenantridiumbromid) | Roth, Karlsruhe |
| Ethyldiamintetraessigsäure, Na ₂ -Salz x 2 H ₂ O (EDTA) (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈ x 2 H ₂ O) | Roth, Karlsruhe |
| Glukose | Sigma, St. Louis, USA |
| H-89 Dichloride ([N- [2- (p-Bromocinnamylamino) ethyl] -5-isoquinolinesulfonamide x 2 HCL], (C ₂₀ H ₂₀ BrN ₃ O ₂ S x 2 HCL) | Alexis Biochemicals, Lausen, Schweiz |
| Harnstoff (CH ₄ N ₂ O ₃) | Roth, Karlsruhe |
| Hefe-Extrakt | Gibco BRL, Erlangen |
| HEPES | Roth, Karlsruhe |
| Isopropanol (2-Propanol) (C ₃ H ₈ O) | Heidinger, Stuttgart |
| Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃) | Riedel-de Haën, Seelze |
| L(+)-Glutamin (C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃) | Roth, Karlsruhe |

| Substanz | Hersteller |
|--|---|
| Lipopolysaccharid (LPS); E.coli | Calbiochen, Darmstadt Sigma-Aldrich, Steinheim |
| L-NMMA | Cayman Chemical, Ann Arbor, USA |
| Methanol | Mallinckrodt-Baker, Deventer, Holland |
| Molekulargewichtsmarker (GeneRuler™ 1kb DNA-Ladder Plus) | Fermentas, St. Leon-Rot |
| MOPS | Roth, Karlsruhe |
| Natriumazid (NaN ₃) | Roth, Karlsruhe |
| Natriumchlorid (NaCl) | Roth, Karlsruhe |
| Natrium-Citrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇) | Roth, Karlsruhe |
| Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃) | Merck KGaA, Darmstadt |
| Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O) | Roth, Karlsruhe |
| Natriumhydroxid (NaOH) | Roth, Karlsruhe |
| Natriumpyruvat (CH ₃ O ₃ x Na) | SERVA Feinbiochemica GmbH & Co., Heidelberg |
| nor-NOHA | Cayman Chemical, Ann Arbor, USA |
| NS-398 ([N- [2- (Cyclohexyloxy) 4-nitrophenyl] –methansulfonamid], (C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₅ S) | Alexis Biochemicals, Lausen, Schweiz |
| Ortho-Phenylendiamin-Dihydrochlorid (OPD), (C ₆ H ₈ N ₂ x 2 HCL) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Paraformaldehyd (PFA) | Merck KGaA, Darmstadt |
| Penicillin/Streptomycin | PAA, Pasching, Österreich |
| Polybren | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Protaminsulfat vom Hering, Grade III | Sigma-Adlrich, Steinheim |
| RNAse-freies Wasser | Qiagen, Hilden |
| Saccharose | Roth, Karlsruhe |

| Substanz | Hersteller |
|---|-------------------------------------|
| Salzsäure (HCL), 37 %ig | Roth, Karlsruhe |
| Schwefelsäure (H ₂ SO ₄) 95 Vol.%ig | Roth, Karlsruhe |
| Streptavidin-Peroxidase (ExtrAvidin) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| SYBR Green (Absolute SYBR Green Rox Mix) | Thermo Fisher Scientific, Bonn |
| Szintillatorflüssigkeit | Perkin Elmer, Turku, Finnland |
| Tris-Hydrochlorid | Roth, Karlsruhe |
| Trypanblau | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Trypsin | GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg |
| Trypton | Roth, Karlsruhe |
| Tween® 20 (Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Wasser, pyrogenfrei, steril | Aqua B. Braun, Melsungen |
| Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂), 30 %ig | Merck KGaA, Darmstadt |

2.1.4 Puffer, Lösungen und Kulturmedien

Zum Herstellen der Puffer und Lösungen wurde, wenn nicht anders angegeben, Wasser aus der hauseigenen Entsalzungsanlage (ELGA, Bucks, Großbritannien) verwendet. Falls nicht anders angegeben, wurden die Kulturmedien, Puffer und Lösungen bei 4°C gelagert.

2.1.4.1 Puffer und Lösungen

Bromphenolblaulösung:

42 g Harnstoff,
50 g D(+)-Saccharose,
0,0037 g Na₂EDTA,
0,1 g Bromphenolblau,
gelöst in 100 ml Aqua dest.

6 x DNA-Gelladepuffer:

0,25% (w/v) Bromphenolblau,
0,25% /w/v) Xylencyanol,
40% (v/v) 30% Glycerin,
gelöst in Aqua dest.

FACS-Medium:

2% (v/v) FCS (PAN Biotech) steril filtriert (0,45 µm), um Partikel zu entfernen, die das FACS-Gerät verstopfen könnten,
in 1 x PBS (pH 7,2) verdünnt.

Fixierlösung für FACS-Analyse (0,7% PFA):

0,7 g Paraformaldehyd (PFA), bei 56°C in 100 ml 1 x PBS (pH 7,2) gelöst.

Gey'scher Lysepuffer:

10 mM KHCO₃,
155 mM Ammoniumchlorid,
100 µM EDTA,
auf pH 7,5 einstellen.

1 x PBS (Phosphat Buffered Saline):

40,2 g NaCl,
7,8 g NaH₂PO₄ x 2 H₂O,
in 5 l Aqua dest. lösen, mit 10 M NaOH auf pH 7,2 einstellen und anschließend autoklavieren.

10 x PBS (Phosphat Buffered Saline):

402 g NaCl,
78 g NaH₂PO₄ x 2 H₂O,
in 5 l Aqua dest. lösen, mit 10 M NaOH auf pH 6,6 einstellen und anschließend autoklavieren.

Puffer für die Durchführung der Messung am Durchflusszytometer

1 x PBS/2 mM EDTA
745 mg EDTA in 1 Liter 1 x PBS (pH 7,2) lösen und anschließend autoklavieren.

50 x Tris-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure (TAE) -Stammlösung:

2 M Tris,

5,7% (v/v) 100%ige Essigsäure,

0,05 M EDTA,

ad H₂O, Lagerung bei Raumtemperatur.

Stammlösung für den Gebrauch im Verhältnis 1:50 mit Aqua dest. verdünnen und bei Raumtemperatur lagern.

Trypanblau-Lösung:

Stammlösung:

0,01% (w/v) Trypanblau,

0,001% (w/v) Na-Azid,

in Aqua dest. lösen.

Stammlösung im Verhältnis 9:1 mit 10 x PBS (pH6,6) verdünnen und bei 4°C lagern.

2.1.4.2 Puffer und Lösungen für ELISA

Platten-Beschichtungspuffer für ELISA:

0,1 M NaHCO₃-Puffer:

8,041 g NaHCO₃ in 1 Liter Aqua dest. lösen und den pH-Wert auf 8,2 einstellen.

Blockierungs- und Verdünnungspuffer für ELISA :

1 x PBS/1% BSA,

1 g BSA,

gelöst in 100 ml 1 x PBS (pH 7,2).

OPD (Orthonitrophenoldiamin) Substratpuffer:

0,2 M NaH₂PO₄ x 2 H₂O,

0,1 M Na-Citrat x H₂O,

1 mg/ml OPD,

1 µl/ml H₂O₂.

Stopplösung für ELISA:

1 M Schwefelsäure (H₂SO₄)

Waschpuffer für Mikrotiterplatten:

1 Teil 10 x PBS (pH 6,6) wird mit 9 Teilen deionisiertem Wasser zu 1 x PBS verdünnt.
Es werden 0,1% (v/v) Tween 20 als Detergenz zugegeben.

2.1.4.3 Puffer und Lösungen für die Transfektion und Transduktion

Chloroquin für die Transfektion:

100 mM Stammlösung:

515,87 mg Chloroquin in 10 ml 1 x PBS (1 x DPBS/Dulbecco's Phosphat Buffered Saline, Invitrogen, Darmstadt) lösen und steril filtrieren (0,2 µm).

CaCl₂ für die Transfektion:

2,5 M Lösung:

36,755 g CaCl₂ in 100 ml Aqua dest. lösen und steril filtrieren (0,2 µm).

Stammlösung bei -20°C und Gebrauchslösung bei 4°C lagern.

2 x HBS-Puffer für die Transfektion:

100 mM HEPES,

281 mM NaCl,

1,5 mM Na₂HPO₄.

Den pH-Werte je einmal auf 7,11, 7,12 und 7,13 einstellen und steril filtrieren (0,2 µm).

Lagerung bei -20°C.

Saccharose-Lösung für die Ultrazentrifugation:

1 x PBS (1 x DPBS/Dulbecco's Phosphat Buffered Saline, Invitrogen, Darmstadt) versetzt mit 20% Saccharose (w/v). Steril filtriert (0,2 µm).

0,1 x TE-Puffer für die Transfektion

500 µl Tris pH 8,0 ,

19 mg Na₂EDTA

in 500 ml Aqua dest. Lösen und steril filtrieren

Gebrauchslösung:

1 Teil H₂O + 2 Teile 0,1 x TE-Puffer

Protaminsulfat für die Transduktion:

4 mg/ml Protaminsulfat in Aqua dest. lösen und steril filtrieren (0,2 µm).

Polybren für die Transduktion:

8 mg/ml Polybren in Aqua dest. lösen und steril filtrieren (0,2 µm).

2.1.4.4 Zellkulturzusätze und Zellkulturmedien

Glutamin:

200 mM Stammlösung:

5,84 g L(+)-Glutamin in 200 ml 1 x PBS (1 x DPBS/Dulbecco's Phosphat Buffered Saline, Invitrogen, Darmstadt) lösen und steril filtrieren (0,2 µm).

Lagerung bis zur weiteren Verwendung bei -20°C.

Natriumpyruvat (NaPyr):

2,75 g Natriumpyruvat in 250 ml 1 x PBS (1 x DPBS/Dulbecco's Phosphat Buffered Saline, Invitrogen, Darmstadt) lösen und steril filtrieren (0,2 µm).

Lagerung bis zur weiteren Verwendung bei -20°C.

Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep):

10⁴ I.U./ml Penicillin,

10⁴ µg/ml Streptomycin.

Lagerung bis zur weiteren Verwendung bei -20°C.

2-β-Mercaptoethanol:

5 mM Stammlösung:

40 µl β-Mercaptoethanol in

114 ml RPMI oder IMDM,

steril filtrieren (0,2 µm).

Lagerung bis zur weiteren Verwendung bei -20°C.

Waschmedium für die Zellkultur:

EMEM (Eagle´s Minimum Essential Medium, Bio Whittaker/Cambrex), versetzt mit

2% (v/v) FCS (PAN-Biotech),

1% (v/v) Pen/Strep-Stammlösung.

Kulturmedium für BM-DC („Bone marrow derived dendritic cells“):

IMDM (Iscove´s Modified Dulbecco´s Media, Gibco/Invitrogen), versetzt mit

10% (v/v) FCS (PAA Laboratories),

1% (v/v) L-Glutamin-Stammlösung,

1% (v/v) β-Mercaptoethanol-Stammlösung,

1% (v/v) Pen/Strep-Stammlösung,

5% (v/v) GM-CSF (Überstand der GM-CSF-produzierenden Zelllinie X63-GM-CSF).

Kulturmedium für SP37A3-Zellen:

1x RPMI 1640 (Gibco/Invitrogen), versetzt mit

10% (v/v) FCS (PAA Laboratories),

1% (v/v) L-Glutamin-Stammlösung,

1% (v/v) β-Mercaptoethanol-Stammlösung,

1% (v/v) Pen/Strep-Stammlösung,

5% (v/v) GM-CSF (Überstand der GM-CSF-produzierenden Zelllinie P388/GM-CSF).

Kulturmedium für HEK 293T-Zellen:

DMEM (Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium, Lonza), versetzt mit

10% (v/v) FCS (PAA Laboratories),

1% (v/v) L-Glutamin-Stammlösung,

1% (v/v) β-Mercaptoethanol-Stammlösung,

1% (v/v) Pen/Strep-Stammlösung.

Kulturmedium für HT1080-Zellen:

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Lonza), versetzt mit
10% (v/v) FCS (PAA Laboratories),
1% (v/v) L-Glutamin-Stammlösung,
1% (v/v) Pen/Strep-Stammlösung.

Allgemeines Einfriermedium für die Zellkultur:

FCS (PAA Laboratories), versetzt mit
10% (v/v) DMSO.

Einfriermedium für SP37A3-Zellen:

RPMI, versetzt mit
20% (v/v) FCS (PAA Laboratories),
8% (v/v) DMSO.

1 x PBS/2 mM Na₂-EDTA zu Ablösen immaturer SP37A3-Zellen:

2 mM Na₂-EDTA in 1 x PBS (1 x DPBS/Dulbecco's Phosphat Buffered Saline, Invitrogen, Darmstadt) lösen und steril filtrieren (0,2 µm).

Trypsin-Stammlösung

2 mM Na₂-EDTA in 1 x PBS (1 x DPBS/Dulbecco's Phosphat Buffered Saline, Invitrogen, Darmstadt) lösen.
10% (w/v) Trypsin gelöst in 1 x PBS/2 mM Na₂-EDTA. Steril filtrieren (0,2 µm).
Lagerung bei -20°C.

1 x PBS 2 mM Na₂-EDTA 0,05 % Trypsin zum Ablösen von HT1080-Zellen:

2 mM Na₂-EDTA in 1 x PBS (1 x DPBS/Dulbecco's Phosphat Buffered Saline, Invitrogen, Darmstadt) lösen und steril filtrieren (0,2 µm).
10%ige Trypsin-Stammlösung darin 1:200 auf 0,05% (v/v) verdünnen.

2.1.4.5 Nährmedien und Nährböden für die Bakterienkultur

LB (Luria Bertani)-Medium

10 g Trypton,

5 g Hefeextrakt,

10 g NaCl,

in 1 l Aqua. dest. lösen, pH-Wert auf 7,2 – 7,4 einstellen und anschließend autoklavieren.

2.1.5 Modulatorische Substanzen und Inhibitoren für die Behandlung von Zellen

Catalase (ROS-Inhibitor):

100 mM in aqua dest. lösen und bei –20°C lagern.

db-cAMP:

1 g in 19,632 ml aqua dest. lösen (100 mM), bei –20°C lagern.

H89 Dihydrochlorid (PKA-Inhibitor):

1 mg in 224 µl DMSO lösen (10mM), bei –20°C lagern.

L-NMMA (NOS-Inhibitor):

100 mM in 1 x PBS (1 x DPBS/Dulbecco's Phosphat Buffered Saline, Invitrogen, Darmstadt)
lösen und bei –20°C lagern.

nor-NOHA (Arginase-Inhibitor):

100 mM in 1 x PBS (1 x DPBS/Dulbecco's Phosphat Buffered Saline, Invitrogen, Darmstadt)
lösen und bei –20°C lagern.

NS-398 (Cox-2-Inhibitor):

5 mg in 1,95 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) lösen (10mM), bei RT lagern.

2.1.6 Enzyme

| Enzym | Hersteller |
|--|--------------------------|
| DNase I (10 mg/ml) | Roche, Mannheim |
| “Extravidin”, Streptavidin-Peroxidase Konjugat | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Restriktionsendonukleasen | Fermentas, St. Leon-Roth |

2.1.7 Fertigsysteme

| System | Hersteller |
|--|---|
| iScript™ cDNA Synthesis Kit | Bio-Rad, München |
| Mouse Heme Oxygenase-1 EIA Kit | TaKaRa, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich |
| RNeasy® Plus Mini Kit | Qiagen, Hilden |
| Prostaglandin E ₂ ELISA Kit | Neogen, Auchincruive, Großbritannien |
| Plasmid Mini Kit | Qiagen, Hilden |
| Plasmid Midi Kit | Qiagen, Hilden |
| Plasmid Maxi Kit | Qiagen, Hilden |

2.1.8 Plasmidvektoren

| Vektor | Hersteller bzw. zur Verfügung gestellt von |
|-------------------------------------|---|
| pCDH1-MCS1-EF1-copEGFP (Ampicillin) | System Biosciences (SBI), Mountain View, USA |
| PCMVΔR8.91 (Ampicillin) | Georg-Speyer Haus, Frankfurt |
| PCMVΔR8.91 (Ampicillin) | Dr. Kneisl, Paul-Ehrlich-Institut (PEI), Langen |
| PMD.G (Ampicillin) | Georg-Speyer Haus, Frankfurt |

| Vektor | Hersteller bzw. zur Verfügung gestellt von |
|-------------------------|--|
| pCDH1-MCS1-EF1-copEGFP | Verena Besche (2010) |
| pCDH1-B7-H3-EF1-copEGFP | Verena Besche (2010) |
| pCDH1-IL-10-EF1-copEGFP | Verena Besche (2010) |

2.1.9 Antikörper

2.1.9.1 Antikörper zum Absättigen freier Fc-Rezeptoren

Zum Absättigen freier Fc-Rezeptoren wurde der Antikörper 2.4G2 verwendet. Dieser wurde aus dem Kulturüberstand des B-Zell-Hybridoms 2.4G2 gewonnen. Er handelt sich um einen Ratte-anti-Maus Fc γ RII/III (CD16/32) Antikörper vom Isotyp Ratte-IgG2b (Unkeless, 1979), der 1:100 verdünnt in FACS-Medium eingesetzt wurde. Dies entsprach einer eingesetzten Antikörpermenge von 0,25 μ g je Probe.

2.1.9.2 Primärantikörper zur FACS-Färbung

| Antikörper gegen | Isotyp | Klon | Markierung | Verdünnung | Hersteller |
|------------------|-------------------------|---------|------------|------------|-----------------------------|
| B7-H3 (CD276) | Ratte-IgG2a κ | RTAA 15 | unmarkiert | 1:50 | BioLegend, San Diego, USA |
| B7-H3 (CD276) | Ratte-IgG2a κ | M3.2D7 | PE | 1:100 | eBioscience, San Diego, USA |
| CD4 | Ratte-IgG2a κ | RM4-5 | PE-Cy5 | 1 :200 | BD Biosciences, Heidelberg |
| CD8a | Ratte-IgG2a κ | 53-6.7 | PE-Cy5 | 1 :200 | BD Biosciences, Heidelberg |
| CD11b (Mac-1) | Ratte-IgG2b | M1/70 | FITC | 1:50 | BD Biosciences, Heidelberg |
| CD11c | Hamster-IgG1, λ | HL3 | FITC | 1:50 | BD Biosciences, Heidelberg |

| Antikörper gegen | Isotyp | Klon | Markierung | Verdünnung | Hersteller |
|---|---------------------------|-----------|------------|-----------------|--|
| CD11c | Hamster-IgG1 λ | HL3 | PE | 1:50 | BD Biosciences, Heidelberg |
| CD14 | Ratte-IgG1 | rmC5-3 | FITC | 1:50 | BD Biosciences, Heidelberg |
| CD25 (IL-2 Rezeptor α -Kette, p55) | Ratte-IgM λ | 7D4 | FITC | 1:50 | BD Biosciences, Heidelberg |
| CD40 | Ratte-IgG2a κ | 1C10 | FITC | 1:25 | Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, USA |
| CD80 (B7-1) | Hamster-IgG | 16-10A1 | FITC | 1:50 | BD Biosciences, Heidelberg |
| CD83 | Ratte-IgG1 | Michel-17 | PE | 1:50 | eBioscience, San Diego, USA |
| CD86 (B7-2) | Ratte-IgG2a κ | GL1 | FITC | 1:100 | BD Biosciences, Heidelberg |
| CD86 (B7-2) | Ratte-IgG2a | GL1 | PE | 1:100 | NatuTec, Frankfurt am Main |
| F4/80 | Ratte-IgG2a κ | BM8 | FITC | 1:50 | BioLegend, San Diego, USA |
| Fascin | Maus-IgG1 | 55K-2 | unmarkiert | 1:50 | DAKO, Glostrup, Dänemark |
| FoxP3 | Maus-IgG1 | 3G3 | PE | 5 μ l/Probe | Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach |
| Gr-1 | Ratte-IgG2b | RB6-8C5 | FITC | 1:100 | BD Biosciences, Heidelberg |
| I-A ^d /I-E ^d | Ratte-IgG2a κ | 2G9 | FITC | 1:100 | BD Biosciences, |

| Antikörper gegen | Isotyp | Klon | Markierung | Verdünnung | Hersteller |
|----------------------------|---------------|-----------------|------------|------------|--------------------------------|
| (MHCII) | | | | | Heidelberg |
| MHCII | Ratte-IgG2a | M5/114.1 5.2 | PE | 1:500 | eBioscience, San Diego, USA |
| PD-L1 (B7-H1, CD274) | Ratte-IgG2b κ | 10F.9G2 | PE | 1:50 | BioLegend, San Diego, USA |

2.1.9.3 Sekundärantikörper zur FACS-Färbung

| Antikörper | Markierung | Verdünnung | Hersteller |
|---|-------------------|------------|--|
| Ziege-anti-Maus-IgG | Rhodamine (TRITC) | 1:200 | Dianova, Hamburg |
| Ziege-anti-Maus-IgG1 (human absorbed) | FITC | 1:50 | SouthernBiotech, Birmingham, USA |
| F(ab') ₂ Fragment Ziege-anti-Ratte IgG (H+L) | PE | 1:100 | Jackson Immuno Research Europe Ltd, Suffolk, Großbritannien |

2.1.9.4 Isotyp-Kontrollantikörper zur FACS-Färbung

| Antikörper | Klon | Markierung | Verdünnung | Hersteller |
|----------------|-----------|------------|------------|-------------------------------|
| Hamster-IgG1 λ | G235-2356 | PE | 1:50 | BD Biosciences, Heidelberg |
| Hamster-IgG1 λ | G235-2356 | FITC | 1:100 | BD Biosciences, Heidelberg |
| Maus-IgG1 | X40 | unmarkiert | 1:50 | BD Biosciences, Heidelberg |

| Antikörper | Klon | Markierung | Ver- dünnung | Hersteller |
|---------------|------------|------------|-----------------|--------------------------------|
| Maus-IgG1 | 203 | PE | 5 µl/Probe | ImmunoTools, Friesoythe |
| Ratte-IgG1 | R3-34 | FITC | 1:50 | BD Biosciences, Heidelberg |
| Ratte-IgG1 | R3-34 | PE | 1:50 | BD Biosciences, Heidelberg |
| Ratte-IgG2a κ | - | unmarkiert | 1:100 | eBioscience, San Diego, USA |
| Ratte-IgG2a | R35-95 | FITC | 1:100 | BD Biosciences, Heidelberg |
| Ratte-IgG2a | R35-95 | PE | 1:100 | BD Biosciences, Heidelberg |
| Ratte-IgG2a | R35-95 | PE-Cy5 | 1:100 | BD Biosciences, Heidelberg |
| Ratte-IgG2b | A95-1 | FITC | 1:50 | BD Biosciences, Heidelberg |
| Ratte-IgG2b | EB149/10H5 | PE | 1:50 | eBioscience, San Diego, USA |
| Ratte IgM κ | - | FITC | 1:50 | eBioscience, San Diego, USA |

2.1.9.5 FoxP3-Färbekit

„FoxP3 Staining Buffer“ Set von Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach).

2.1.9.6. Antikörper für Zytokin-ELISA

2.1.9.6.1 „Capture“-Antikörper

| Antikörper | Isotyp | Klon | Konzentration (Verdünnung) | Hersteller |
|------------------------------|-----------------------|----------|--|--------------------------------|
| Anti-Maus IFN γ | Ratte IgG1, κ | R4-6A2 | 1:1000 verdünnt mit 0,1 M NaHCO ₃ | (Spitalny und Havel, 1984) |
| Anti-Maus IL5 | Ratte IgG1 | TRFK5 | 0,5 mg/ml (1 μ g/ml mit 0,1 M NaHCO ₃) | BD Biosciences, Heidelberg |
| Anti-Maus IL-10 | Ratte IgG2b, κ | JES052A5 | 0,5 mg/ml (1 μ g/ml mit 1 x PBS) | eBioscience, San Diego, USA |
| Anti-Maus IL-12 (p35/p70) | Ratte IgG2a, κ | C18.2 | 0,5 mg/ml (1 μ g/ml mit 1 x PBS) | eBioscience, San Diego, USA |
| Anti-Maus IL-17 | Ratte IgG2a | 50101 | 0,5 mg/ml (5 μ g/ml mit 1 x PBS) | R&D Systems, Wiesbaden |

2.1.9.6.2 Detektions-Antikörper

| Antikörper | Isotyp | Klon | Konzentration/ Verdünnung | Hersteller |
|--|-----------------------|----------------|-------------------------------|---|
| Anti-Maus IFN γ - biotinyliert | Ratte IgG1 | AN 18.17.24 | 1:5000 verdünnt | Cherwinski <i>et</i> <i>al.</i> , 1987 |
| Anti-Maus IL-5- biotinyliert | Ratte IgG2a | TRFK4 | 0,5 mg/ml (1 μ g/ml) | BD Pharmingen, Heidelberg |
| Anti-Maus IL-10- biotinyliert | Ratte IgG1, κ | Polyklonal | 0,5 mg/ml (0,5 μ g/ml) | eBioscience, San Diego, USA |
| Anti-Maus IL-12 (p40)-biotinyliert | Ratte IgG2a, κ | C17.8 | 0,5 mg/ml (0,5 μ g/ml) | eBioscience, San Diego, USA |

| Antikörper | Isotyp | Klon | Konzentration/ Verdünnung | Hersteller |
|----------------------------------|-----------|------|------------------------------|---------------------------|
| Anti-Maus IL-17- biotinyliert | Ziege IgG | - | 50 µg/ml (0,25 µg/ml) | R&D Systems, Wiesbaden |

2.1.10 Zytokine und andere Substanzen

2.1.10.1 Als Standard im Zytokin-ELISA verwendete Zytokine

| Zytokin | Startkonzentration | Hersteller |
|------------------|--------------------|-----------------------------|
| rm IFN- γ | 5 ng/ml | BD Biosciences, Heidelberg |
| rm IL-5 | 2 ng/ml | eBioscience, San Diego, USA |
| rm IL-10 | 4 ng/ml | R&D Systems, Wiesbaden |
| rm IL-12 | 1,5 ng/ml | BD Biosciences, Heidelberg |
| rm IL-17 | 2 ng/ml | R&D Systems, Wiesbaden |

2.1.10.2 Zytokine allgemein

GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor):

GM-CSF für BM-DC:

Kulturüberstand der GM-CSF-produzierenden Zelllinie X63/GM-CSF.

Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. B. Stockinger (National Institute for Medical Research, London) zur Verfügung gestellt [Zal *et al.*, 1994].

GM-CSF für SP37A3-Zellen:

Kulturüberstand der GM-CSF-produzierenden Zelllinie P388/GM-CSF.

Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. Karsten Mahnke, Hautklinik Heidelberg, zur Verfügung gestellt.

rhuM-CSF (rekombinanter humaner Makrophagen-koloniestimulierender Faktor):

Zur Kultivierung immaturer SP37A3 wurden dem Kulturmedium 50 ng/ml rhuM-CSF zugesetzt. Das rhuM-CSF wurde von der Firma R&D Systems (Minneapolis, USA) bezogen.

rmTNF- α (rekombinanter muriner Tumor-Nekrose-Faktor- α) und

rmIL-1 β (rekombinantes murines Interleukin-1 β):

Um die immaturren SP37A3 Zellen ausdifferenzieren zu lassen, wurden dem Kulturmedium rmTNF-a und rmIL-1 β in einer Konzentration von jeweils 15 ng/ml zugegeben.

Beide Zytokine wurden von der Firma ImmunoTools (Friesoythe) bezogen.

2.1.11 Peptid

| Peptid | Hersteller |
|----------------------|----------------------------------|
| MOG ₃₅₋₅₅ | Neosystem, Straßburg, Frankreich |

2.1.12 Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma Operon (Köln) bezogen.

| Murines Zielgen | Primer-Sequenz |
|-----------------|--|
| B7-H2 | Sense: 5'-AGCCTCAAGAACCCAGATT- 3' Antisense: 5'-GAACCCGCTAGAAACATGGA- 3' |
| B7-H3 | Sense: 5'-AGTCTGGCACAGCTCAACTC- 3' Antisense: 5'-CAAAGTCCTGGATGCTCACA- 5' |
| CD40 | Sense: 5'-CCTGGCTTTGGAGTTATGGA- 3' Antisense: 5'-CCGGGACTTTAAACCACAGA- 3' |
| CD80 | Sense: 5'-CCATGTCCAAGGCTCATTCT- 3' Antisense: 5'-TTCCCAGCAATGACAGACAG- 3' |
| CD86 | Sense: 5'-CAGTTACTGTGGCCCTCCTC- 3' Antisense: 5'-ACTCTGCATTTGGTTTTGCT- 3' |
| Cox-2 | Sense: 5'-TCCTCCTGGAACATGGACTC- 3' Antisense: 5'-TTCTGCAGCCATTTCTTCT- 3' |
| Gesamt-CREB | Sense: 5'-CAGCACGGAAGAGAGAGGTC- 3' Antisense: 5'-TTTCAAGCACTGCCACTCTG- 3' |

| Murines Zielgen | Primer-Sequenz |
|-----------------------|--|
| Gesamt-CREM (CREM P1) | Sense: 5'-CCTCCCGTCCGTAATCAGT-3' Antisense: 5'-CTTTTCCTGCCACATTTGC-3' |
| CREM P2 (ICER) | Sense: 5'-ATGGCTGTAAGTGGAGATGAAACT-3' Antisense: 5'-GCAAAGCAGTAGTAGGAGCT-3' |
| Fascin | Sense: 5'-AACCCCTTGCCTTTCAAAC-3' Antisense: 5'-CATGGAAAGAAGGGGACAGA-3' |
| FcγRIIB | Sense: 5'-CCAAAGGCTGTGGTCAAAC-3' Antisense: 5'-TGCTCCATTTGACACCGATA-3' |
| HO-1 | Sense: 5'-GAGCCTGAATCGAGCAGAAC-3' Antisense: 5'-AGCCTTCTCTGGACACCTGA-3' |
| ICAM-1 | Sense: 5'-TTCACACTGAATGCCAGCTC-3' Antisense: 5'-GTCTGCTGAGACCCCTCTTG-3' |
| IDO | Sense: 5'-AAGGGCTTCTTCTCGTCTC-3' Antisense: 5'-AAAAACGTGTCTGGGTCCAC-3' |
| IL-1r2 | Sense: 5'-GCATCATTGGGGTCAAGACT-3' Antisense: 5'-GATCCTCCCTTGTGACTGGA-3' |
| IL-6 | Sense: 5'-CCGGAGAGGAGACTTCACAG-3' Antisense: 5'-CAGAATTGCCATTGCACAAC-3' |
| IL-10 | Sense: 5'-TTTTCACAGGGGAGAAATCG-3' Antisense: 5'-TCTCTTCCCAAGACCCATGA-3' |
| IL-12a/IL-12p35 | Sense: 5'-ACAGGGTGATGGGCTATCTG-3' Antisense: 5'-TATGAGAGAAGCGATGGAGG-3' |
| IL-12b/IL-12p40 | Sense: 5'-CATCTGCTGCTCCACAAGAA-3' Antisense: 5'-CGCCATTCCACATGTCACTGC-3' |
| IL-1RA | Sense: 5'-CCAGCTCATTGCTGGGTAAT-3' Antisense: 5'-TTCTCAGAGCGGATGAAGGT-3' |
| IL-1β | Sense: 5'-GCCCATCCTCTGTGACTCAT-3' Antisense: 5'-AGGCCACAGGTATTTTGTCTG-5' |
| LIGHT | Sense: 5'-GCATCAACGTCTTGGAGACA-3' Antisense: 5'-TAAGATGTGCTGCTGGGTTG-3' |
| Mkp-1 | Sense: 5'-ACCTTAAAAGCCCCATCACC-3' Antisense: 5'-TGCGGTCAAGTCATTGTTGT-3' |

| Murines Zielgen | Primer-Sequenz |
|-----------------|---|
| OX40L | Sense: 5'-GCTAAGGCTGGTGGTCTCTG- 3' Antisense: 5'-ACCGAATTGTTCTGCACCTC- 3' |
| PD-L1 | Sense: 5'-AGTCTCCTCGCCTGCAGATA- 3' Antisense: 5'-ACCATAACGCAAGCAGGTC- 3' |
| PD-L2 | Sense: 5'-TGTGCTGCCTTTTCTGTGTC- 3' Antisense: 5'-ATTCTCTGCGGTCAAAATCG- 3' |
| Pirb | Sense: 5'-GCTCCGTCTTGGACTGACTC- 3' Antisense: 5'-TGTTTGCTGGCTTCTGTTTG- 3' |
| SLAM | Sense: 5'-TCGAGTCCATGGATGCAATA- 3' Antisense: 5'-GCAGGGGTCCTGATCTGTTA- 3' |
| STAT3 | Sense: 5'-GGAGGAGGCATTTGGAAAGT- 3' Antisense: 5'-CTCCGAGGTCAGATCCATGT- 3' |
| TGFβ1 | Sense: 5'-TTGCTTCAGCTCCACAGAGA3' Antisense: 5'-TGTTGTAGAGGGCAAGGGC- 3' |
| TLR2 | Sense: 5'-CTCCCACTTCAGGCTCTTTG- 3' Antisense: 5'-AGGAACTGGGTGGAGAACCT- 3' |
| TLR3 | Sense: 5'-ATATGCGCTTCAATCCGTTTC- 3' Antisense: 5'-CAGGAGCATACTGGTGCTGA- 3' |
| TLR4 | Sense: 5'-GGCAGCAGGTGGAATTGTAT- 3' Antisense: 5'AGGCCCCAGAGTTTTGTTCT- 3' |
| TLR7 | Sense: 5'-CGGTTTTCTGTTGCCTTCTC- 3' Antisense: 5'-CGTGTCCACATCGAAAACAC- 3' |
| TLR9 | Sense: 5'-ACCCTGGTGTGGAACATCAT- 3' Antisense: 5'-CTGTACCAGGAGGGACAAGG- 3' |
| UBC | Sense: 5'-GTCTGCTGTGTGAGGACTGC- 3' Antisense: 5'-CAGGGTGGACTCTTTCTGGA- 3' |
| 4-1BBL | Sense: 5'-CAACAGGGCTCTCCTGTGTT- 3' Antisense: 5'-TGGCCTGTGTTTGTGAATGT- 3' |

2.1.13 Mäuse

Für die Versuche wurden Inzuchtmäuse der Stämme BALB/cJ (Genotyp H-2^d), C57BL/6 (Genotyp H-2^b) und C57BL/6-*Tg*(Tcra2D2,Tcrb2D2) im Alter von zwei bis vier Monaten verwendet.

Die C57BL/6-*Tg*(Tcra2D2,Tcrb2D2)-Mäuse haben einen 2D2 transgenen T-Zell-Rezeptor, der spezifisch das MOG-Peptid MOG_{p35-55} erkennt [Bettelli *et al.* 2003]. Sie wurden freundlicherweise von Herrn Dr. V. Kuchroo (Center for Neurological Diseases, Brigham and Womens´ s Hospital, Boston, USA) zur Verfügung gestellt.

Die Mäuse wurden in der Zentralen Versuchstiereinrichtung der Universität Mainz gezüchtet (ZVTE) und unter SPF-Bedingungen („specific pathogen free“) gehalten.

2.1.14 Zelllinien

2.1.14.1 HEK 293T-Zellen:

Bei der Zelllinie HEK 293T handelt es sich um eine adhärente Nierenkarzinom-Zelllinie.

HEK steht für humane embryonale Nierenzellen (**H**uman **E**mbyonic **K**idney).

HEK 293-Zellen sind ein Transformationsprodukt aus humanen embryonalen Nierenzellen, infiziert mit dem TYP 5-Adenovirus.

Die hier verwendeten HEK 293T-Zellen exprimieren durch stabile Transfektion zusätzlich das große SV40 T-Antigen, welches die DNA-Replikation von Plasmiden mit dem SV40-Replikationsursprung ermöglicht.

2.1.14.2 HT-1080-Zellen:

Bei HT-1080-Zellen handelt es sich um eine humane Sarkomzelllinie, die von Rasheed *et al.* [1974] beschrieben wurde.

2.1.14.3 SP37A3-Zellen:

Bei der Zelllinie SP37A3 handelt es sich um eine murine DC-Linie, die in den Laboratorien der Firma Merck (Darmstadt) nach dem Protokoll von Winzler *et al.* [1997] aus primären myeloiden Vorläuferzellen von Milzen aus C57BL/6-Mäusen durch Langzeitkultur in

Gegenwart von GM-CSF und M-CSF etabliert wurde. Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. A. Sutter und F. Jährling (Merck, Darmstadt) zur Verfügung gestellt. SP37A3-Zellen können bis etwa zur 38. Passage als Expansionskultur gehalten werden, ohne dass sie ihre Eigenschaften verändern (Bros *et. al*, 2007).

2.1.15 Bakterienstamm

Für die Vermehrung von Plasmiden wurde der Bakterienstamm *Escherichia Coli* TOP10 mit dem Genotyp $mcrA \Delta$ (mrr - hsd RMS- $mcrBC$) ϕ 80 lac Z Δ M 15 Δ lac X 74 deo R rec A I ara B 139 Δ (ara - lac) 7697 gal U gal K $rpsI$ ($strR$) end A1 nup G verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Methoden der Zellkultur

Damit keine Kontaminationen der Zellkulturen auftreten, wurden alle Arbeiten mit Zellkulturen unter einer sterilen Werkbank durchgeführt, wobei ausschließlich mit autoklavierten, sterilisierten oder steril filtrierten Lösungen, Substanzen und Geräten gearbeitet wurde.

2.2.1.1 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Ermittlung der Anzahl lebender Zellen in einer Zellsuspension wurden die Zellsuspensionen 1:10 in Trypanblau verdünnt und mit Hilfe des Hämocytometers ausgezählt. Beim Auszählen der Zellen kann man zwischen lebenden und toten Zellen unterscheiden, da Trypanblau aufgrund der zerstörten Zellmembran in tote Zellen eindringen kann und deren Zytoplasma blau färbt. Die blau gefärbten Zellen werden bei der Bestimmung der Zellzahl nicht berücksichtigt. Es wurden 16 Kleinquadrate des Hämocytometers ausgezählt und die Zellzahl mit der folgenden Formel bestimmt:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Anzahl der gezählten Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor (10)} \times \text{Kammerfaktor (10}^4\text{/ml)}.$$

2.2.1.2 Einfrieren von Zellen

Die langfristige Lagerung von Zellen erfolgte bei -196°C in flüssigem Stickstoff. Zum Einfrieren der Zellen wurden diese geerntet, abzentrifugiert und ausgezählt. Das Einfrieren erfolgte in einer Zellzahl von $0,5 - 5 \times 10^6$ je Einfriereröhrchen. Hierfür wurden die Zellen in der entsprechenden Zellzahl in $0,5 - 1$ ml eisgekühltem Einfriermedium aufgenommen. Das im Einfriermedium vorhandene DMSO schützt die Zellmembranen vor der Beschädigung durch Eiskristalle. Die in Einfriermedium resuspendierten Zellen wurden in eisgekühlte Einfriereröhrchen überführt. Die Röhren wurden in eine mit Isopropanol gefüllte, auf 4°C

vorgekühlte Einfrierbox überführt, die für 24 h bei -80°C gelagert wurde. Der mit Isopropanol gefüllte Mantel der Einfrierbox bewirkt ein schnelles Herunterkühlen der Zellen um ca. $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Nach 24 Stunden wurden die Zellen zur endgültigen Lagerung in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

2.2.1.3 Arbeiten mit HEK 293T-Zellen

2.2.1.3.1 Auftauen von HEK 293T-Zellen

Die Lagerung der HEK 293T-Zellen erfolgte bei -196°C in flüssigem Stickstoff in Einfrierröhrchen mit je 2×10^6 Zellen pro Röhrchen. Zum Auftauen wurde ein Röhrchen solange ins 37°C -Wasserbad gehalten, bis noch deutlich ein Eisklumpen sichtbar war. Dieser wurde mit einer Pipette durch Resuspendieren gelöst. Anschließend wurden die Zellen in 20 ml kaltes Waschmedium überführt, mit weiteren 20 ml kaltem Waschmedium versetzt und für 10 Minuten bei 4°C und 410 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment zweimal in 20 ml Waschmedium gewaschen und danach in einer 25 cm^2 -Kulturflasche in 10 ml Kulturmedium ausgesät. Wenn die Zellen eine Dichte von 90 – 100% erreicht hatten, wurden sie in eine 175 cm^2 Kulturflasche umgesetzt und konnten für Versuche verwendet werden.

2.2.1.3.2 Kultivierung von HEK 293T-Zellen

Die Kultivierung der HEK 293T-Zellen erfolgte in 175 cm^2 -Kulturflaschen in 35 ml Kulturmedium, wobei darauf zu achten war, dass das Kulturmedium vor der Zugabe zu den Zellen im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt wurde. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C , 5% CO_2 und gesättigter Wasserdampfatmosphäre kultiviert.

Die HEK 293T-Zellen wurden alle 4 bis 6 Tage 1:100 bis 1:200 verdünnt. Hierzu wurde das Kulturmedium abgenommen, 10 ml frisches Kulturmedium zugegeben und die Zellen mit einer 10 ml Plastik-Stangenpipette vom Boden der Kulturflasche abgespült. Ein Teil der Zellen wurde in eine neue 175 cm^2 -Kulturflasche mit 35 ml Kulturmedium überführt. Die HEK 293T-Zellen konnten bis Passage 12 für Versuche verwendet werden.

2.2.1.4 Arbeiten mit HT1080-Zellen

2.2.1.4.1 Auftauen von HT1080-Zellen

Das Auftauen der HT1080-Zellen geschah wie zuvor für die HEK 293T-Zellen (2.2.1.3.1) beschrieben. Wenn die Zellen eine Dichte von 90 – 100% erreicht hatten, wurden sie wie in 2.2.1.4.2 beschrieben geerntet, in eine 175 cm² Kulturflasche umgesetzt und konnten für Versuche verwendet werden.

2.2.1.4.2 Kultivierung von HT1080-Zellen

Die Kultivierung der HT1080-Zellen erfolgte in 175 cm²-Kulturflaschen in 35 ml Kulturmedium, wobei das Kulturmedium vor der Verwendung im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt wurde. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Wasserdampf Atmosphäre kultiviert.

Die HT1080 wurden alle 4 bis 6 Tage 1:20 verdünnt, wozu das Kulturmedium verworfen, 10 ml warmes 1 x PBS/2mM Na₂-EDTA/0,05% Trypsin zugegeben und die Zellen ca. 2 Minuten im Brutschrank inkubiert wurden, bis die Zellen sich vom Boden abgelöst hatten. Die Reaktion wurde mit 10 ml Kulturmedium gestoppt und die Zellen mit einer 10 ml Plastik-Stangenpipette in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Kulturflasche wurde mit weiteren 10 ml Kulturmedium nachgespült, die ebenfalls in das 50 ml Reaktionsgefäß überführt wurden. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 135 g in der Zentrifuge sedimentiert, in Kulturmedium resuspendiert und 1:20 verdünnt in eine neue 175 cm²-Kulturflasche eingesetzt.

2.2.1.5 Arbeiten mit der murinen DC-Linie SP37A3

Die Kultur der murinen DC-Linie SP37A3 erfolgte wie in Bros *et al.* [2007] beschrieben.

2.2.1.5.1 Auftauen von SP37A3-Zellen

Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -196°C in flüssigem Stickstoff in Einfrierröhrchen. Zum Auftauen wurde ein Röhrchen solange bei 37°C ins Wasserbad gehalten, bis noch deutlich ein Eisklumpen sichtbar war. Dieser wurden mit einer Pipette durch Resuspendieren gelöst.

Anschließend wurden die Zellen in 10 ml kaltes Waschmedium überführt und für 10 Minuten bei 4°C und 300 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment zweimal in 10 ml Waschmedium gewaschen und danach in einer 25 cm²-Kulturflasche in 10 ml SP37A3-Kulturmedium inklusive rhuM-CSF (50 ng/ml) ausgesät. Die Zellen konnten nach einer Passage für Versuche verwendet werden.

2.2.1.5.2 Kultivierung von SP37A3-Zellen

Zur Weiterkultivierung der SP37A3-Zellen wurden diese in einer Dichte von $0,5 \times 10^4$ bis 3×10^4 Zellen/cm² in 75 cm²-Kulturflaschen in 10 - 15 ml Kulturmedium inklusive rhuM-CSF (50 ng/ml) oder in 25 cm²-Kulturflaschen in 5 ml Kulturmedium inklusive M-CSF ausgesät. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Wasserdampf-atmosphäre. Sie erforderte eine tägliche visuelle Kontrolle der Zelldichte unter dem Mikroskop. Waren die Zellen so dicht gewachsen, dass keine größeren Lücken mehr zwischen ihnen zu sehen waren, was je nach ausgesäter Zelldichte nach 3 bis 7 Tagen der Fall war, konnten die Zellen geerntet werden.

Das Kulturmedium (15 ml bzw. 5 ml) wurde nach 3 bis 4 Tagen ausgewechselt, wobei darauf zu achten war, dass das Kulturmedium vor der Zugabe zu den Zellen im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt wurde.

Da es sich bei den immaturren SP37A3-Zellen um adhärenente Zellen handelt, wurden diese mit 1 x PBS/0,1% (v/v) Na₂-EDTA geerntet. Hierzu wurde zunächst das Medium abgenommen und verworfen. Anschließend wurde auf 37°C vorgewärmtes 1 x PBS/0,1% (v/v) Na₂-EDTA zu den Zellen gegeben (1,5 ml bei 25 cm²-Kulturflaschen, 4,5 ml bei 75 cm²-Kulturflaschen) und durch vorsichtiges Klopfen verteilt. Die Zellen wurden für etwa 3 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde unter dem Mikroskop kontrolliert, ob sich die Zellen vom Boden der Kulturflasche abgelöst hatten und in Suspension übergegangen waren. War dies nicht der Fall, wurden die Zellen durch leichtes Klopfen gegen die Kulturflasche von deren Boden abgelöst. Befanden sich die Zellen in Suspension, wurde die Reaktion mit 5 ml (25 cm²-Kulturflaschen) bzw. 10 ml (75 cm²-Kulturflaschen) Kulturmedium gestoppt und die Zellsuspension wurde in ein 15 ml bzw. 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Kulturflaschen mit 5 ml bzw. 10 ml Kulturmedium nachgespült und das Medium wurde ebenfalls in die Reaktionsgefäße überführt. Die Zellsuspension wurde für 8 Minuten bei RT und 300 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment aufgebrochen. Anschließend wurden die Zellen noch zweimal mit jeweils 10 ml bzw. 20 ml Kulturmedium

gewaschen und dann die Zellzahl bestimmt. Bevor die Zellen für den Versuch eingesetzt wurden, wurde eine neue Kulturflasche als Erhaltungskultur wie oben beschrieben angesetzt.

2.2.1.5.3 Maturierung von SP37A3-Zellen

Die Maturierung der SP37A3-Zellen erfolgte in 6-Loch-Platten. Hierfür wurden die SP37A3-Zellen geerntet (2.2.1.2.2), ausgezählt und auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurde je 1 ml dieser eingestellten Zellsuspension in ein Loch einer 6-Loch-Platte ausgesät und 3 ml Kulturmedium hinzu gegeben. Dann wurden entweder 100 ng/ml LPS oder 15 ng/ml TNF- α plus 15 ng/ml IL-1 β zur Ausreifung hinzu gegeben. Die Stimulierung erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ über 24 h oder über 3 Tage, wobei die adhärennten immaturen Zellen in einen maturen Zustand übergehen, in welchem sie sich in Suspension befinden.

2.2.1.5.4 Behandlung von SP37A3-Zellen mit modulatorischen Substanzen

Zur Konditionierung der SP37A3-Zellen mit modulatorischen Substanzen wurden die Zellen, wie in 2.2.1.2.3 beschrieben, ausgesät und über 3 Tage maturiert, wobei ihnen zusätzlich diverse modulatorische Substanzen in verschiedenen Konzentrationen zugegeben wurden.

Sollten die Zellen immatur bleiben, wurden $0,5 \times 10^6$ Zellen/Loch in einer 6-Loch-Platte in Kulturmedium inklusive M-CSF ausgesät und die jeweilige Substanz zugegeben. Falls nicht anders angegeben, wurden die Zellen für 3 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.2.1.5.5 Ernten von behandelten SP37A3-Zellen

Die maturierten und gegebenenfalls behandelten Zellen wurden aus den Löchern direkt in 15 ml oder 50 ml Reaktionsgefäße überführt.

Die immaturen behandelten Zellen wurden geerntet, indem zunächst das Kulturmedium abgenommen und anschließend die adhärennten Zellen mit 0,5 ml 1 x PBS/0,1% (v/v) Na₂-EDTA vom Boden der 6-Loch-Platten abgelöst wurden. Die Reaktion wurde mit 4 ml warmem Kulturmedium gestoppt und die Zellsuspension in ein 15 ml bzw. 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Löcher wurden noch einmal mit 4 ml warmem Kulturmedium ausgespült. Dieses wurde ebenfalls in die Reaktionsgefäße überführt.

Die geernteten Zellen wurden anschließend für 8 Minuten bei RT und 300 g abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellsediment aufgebrochen und noch zweimal mit Kulturmedium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

2.2.1.6 Arbeiten mit murinen Knochenmarks-abgeleiteten DC (BM-DC)

Die Generierung von BM-DC (**b**one **m**arrow derived **d**endritic **c**ells) wurde entsprechend der ursprünglichen Publikation des Verfahrens durch Scheicher *et al.* [1992], modifiziert durch Lutz *et al.* [1999], durchgeführt.

2.2.1.6.1 Gewinnung von Knochenmarkszellen

Zur Gewinnung von BM-DC-Vorläuferzellen wurden Knochenmarkszellen aus C57BL/6-Mäusen isoliert. Diese Zellen wurden aus den Ober- und Unterschenkeln der Hinterbeine präpariert. Hierzu wurde die Maus getötet und zunächst wurden die Knochen freipräpariert, kurz in 70%igem Ethanol geschwenkt und in kaltem Waschmedium aufbewahrt. Die Knochen wurden mit einem in 70%igem Ethanol getränkten Papiertuch abgerieben, um Muskelreste zu entfernen. Dann wurden die Gelenkköpfe mit einer Schere entfernt. Anschließend wurde mit einer 1 ml Spritze mit einer aufgesetzten 0,5 mm-Kanüle das Knochenmark mit 20 ml kaltem Waschmedium in eine frische Petrischale gespült und die Zellen durch wiederholtes Aufziehen in die Spritze vereinzelt. Die Zellen wurden in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt, wobei sie über ein Zellsieb gegeben wurden. Anschließend wurden sie für 8 Minuten bei 4°C und 300 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment aufgebrochen und es erfolgte eine Lyse der Erythrozyten. Hierzu wurde 1 ml Gey'scher Lyse-Puffer je präparierter Maus zu dem Zellsediment gegeben. Die Lyse wurde nach einer Minute durch Zugabe von 10 ml kaltem Waschmedium je Maus gestoppt, die Zellen erneut abzentrifugiert und anschließend noch zwei weitere Male mit 10 ml Waschmedium je Maus gewaschen.

Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in warmem BM-DC-Kulturmedium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

2.2.1.6.2 Kultivierung von Knochenmarkszellen

Zur Generierung von BM-DC aus den Vorläuferzellen wurden 2×10^6 Zellen in 10 ml BM-DC-Kulturmedium in bakteriologische Petrischalen ausgesät. Die Kultivierung der Zellen erfolgte über 9 Tage bei 37°C und 10% CO₂, wobei die Zellen am dritten und sechsten Tag mit frischem Medium versorgt wurden. Am achten Tag erfolgte die Ausreifung der Zellen mit LPS (2.2.1.3.3). Am dritten Tag wurde den Zellen frisches Medium zugegeben (5 ml) und am sechsten Tag wurde die Hälfte des Kulturmediums ausgetauscht. Hierzu wurden pro Schale 7,5 ml Medium abgenommen und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde für 8 Minuten bei RT und 300 g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment aufgebrochen. Anschließend wurden die Zellen in 7,5 ml warmem Kulturmedium aufgenommen und zurück in die Schale gegeben. Bei BM-DC, die für den Versuch immatur verbleiben sollten, wurde dieser Vorgang an Tag acht wiederholt.

2.2.1.6.3 Ausreifung von BM-DC

Um die in Kultur gehaltenen immaturren BM-DC zu maturieren, wurde die Zellsuspension an Tag acht in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und für 8 Minuten bei RT und 300 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment aufgebrochen und die Zellen in 10 ml vorgewärmtem BM-DC-Kulturmedium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen in Gewebe-Kulturschalen überführt und die Kultur mit 1 µg/ml LPS versetzt. Die Zellen wurden weiterhin bei 37°C und 10% CO₂ im Brutschrank kultiviert.

2.2.1.6.4 Behandlung von BM-DC mit modulatorischen Substanzen

Die Behandlung der BM-DC erfolgte an Tag drei, sechs und acht. Am dritten Tag wurde der Kultur die jeweilige Substanz in entsprechender Konzentration für das Gesamtvolumen der Kultur (15 ml) hinzu gegeben. An Tag sechs und acht wurde den Kulturen die Substanz bezogen auf das ausgetauschte Volumen (7,5 ml) hinzu gegeben. Den Zellen, die an Tag acht ausgereift wurden, wurde an diesem Tag die jeweilige Substanz für das Gesamtvolumen der Kultur (10 ml) zugegeben.

2.2.1.6.5 Ernten von BM-DC

Die BM-DC wurden an Tag neun der Kultur geerntet. Hierfür wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt, wobei die Petrischale leicht ausgespült wurde. Die Zellsuspension wurde anschließend für 8 Minuten bei RT und 300 g abzentrifugiert, ein Teil des Überstandes für Zytokin-ELISA in 2 ml Sicherheits-Röhrchen bei -20°C weggefroren, der Rest verworfen und das Zellsediment aufgebrochen. Die Zellen wurden einmal mit 10 ml frischem Kulturmedium gewaschen. Danach wurden die Zellen in frischem BM-DC-Kulturmedium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

2.2.1.7 Lentiviraler Gentransfer

2.2.1.7.1 Grundlagen des lentiviralen Gentransfers

Bei Lentiviren handelt es sich um RNA-Viren. Sie benötigen wie alle Retroviren für ihre Replikation die drei Gene gag, pol und env, die für virale Proteine kodieren. Gag wird für die Herstellung viraler Kernproteine, pol für die Integrase und reverse Transkriptase und env für die Herstellung von Hüllproteinen benötigt. Diese werden im verwendeten System durch sogenannte Verpackungsplasmide bereitgestellt. Das Verpackungsplasmid pCMV Δ R8.91 trägt die Gene gag und pol, das pMG.G-Plasmid das env-Gen.

Zur Herstellung lentiviraler Viruspartikel wird neben einem lentiviralen Expressionsplasmid, das für das erwünschte Transgen und ein Reporter gen codiert, und Helferplasmiden auch eine Verpackungszelllinie benötigt. In dieser Arbeit wurden als Verpackungszellen HEK 293T verwendet.

Durch die Transfektion der Verpackungszelllinie werden von dem Zielgen Transkripte hergestellt, die als RNA in Virionen verpackt werden. Mit diesen können die Zielzellen infiziert werden und es kommt zur Umschreibung der verpackten RNA in DNA durch die virale reverse Transkriptase. Die DNA kann dann stabil in das Genom der Zielzelle integriert werden was dazu führt, dass die Zielzelle sowohl das einzubringende Transgen als auch einen Reporter exprimiert.

2.2.1.7.2 Transfektion von HEK 293T-Zellen

Die Transfektion der Verpackungszelllinie HEK 293T erfolgte mit Hilfe der Calciumphosphat-Methode. Diese basiert darauf, dass die einzubringende DNA mit Calciumchlorid in der Anwesenheit von Phosphat Präzipitate bildet, die von den Zellen durch Endozytose aufgenommen werden können.

24 h vor der Transfektion wurden die HEK 293T-Zellen geerntet. Hierfür wurde das alte Kulturmedium verworfen und 10 ml frisches, im Wasserbad aufgewärmtes HEK 293T-Kulturmedium zu den Zellen zugegeben. Die Zellen wurden mit einer 10 ml Stangenpipette durch kräftiges Spülen vom Flaschenboden abgelöst und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die Flasche mit weiteren 10 ml Kulturmedium nachgespült, das ebenfalls in das 50 ml Reaktionsgefäß überführt wurde. Die Zellen wurden für 10 Minuten bei RT und 410 g abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellsediment aufgebrochen und die Zellen in Kulturmedium aufgenommen und ausgezählt. Die HEK 293T-Zellen wurden in einer Zellzahl von $3 - 3,5 \times 10^6$ Zellen in 9 ml Kulturmedium in 10 cm Gewebekulturschalen ausgesät.

Am darauf folgenden Tag wurde 2 h vor der Transfektion der alte Kulturüberstand verworfen und die Zellen wurden vorsichtig mit 10 ml frischem Kulturmedium überschichtet.

Die Herstellung der Calcium-Phosphat-Präzipitate erfolgte in 12 ml Rundboden-Röhrchen. Hierfür wurden je Ansatz folgende Plasmide in den wie folgt angegeben Mengen in das 12 ml Rundboden-Röhrchen gegeben. Anschließend wurde der Ansatz mit TE/H₂O-Puffer auf 450 µl Gesamtvolumen aufgefüllt.

| |
|---------------------------------------|
| 13,2 µg Expressionsvektor |
| 10 µg pCMVΔ8.91 (Verpackungsplasmid) |
| 4 µg pMG.G (kodiert für Hüllproteine) |
| ad 450 µl TE/ H ₂ O |

Zu dem Ansatz wurden unter kontinuierlichem Rütteln auf dem Reagenzglasrüttler 50 µl 2,5M CaCl₂ tropfenweise zugegeben. Anschließend wurden in der gleichen Weise 500 µl 2 x HBS zugegeben, und das Gemisch wurde für 10 bis 20 Minuten bei RT inkubiert.

Während der Inkubationszeit wurden die HEK 293T-Zellen mit Chloroquin (100µM) versetzt, um die Transfektionseffizienz zu erhöhen. Anschließend wurden die Calcium-Phosphat-Präzipitate durch leichtes Schwenken gleichmäßig in der Gewebe-Kulturschale verteilt und

die Zellen im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Wasserdampfatosphäre weiterkultiviert.

14 bis 16 h nach der Transfektion wurde zum Entfernen der auch zytotoxisch wirkenden Präzipitate der Kulturüberstand verworfen. Für die Gewinnung der viralen Partikel wurde er durch 5 ml vorgewärmtes Kulturmedium ersetzt. Nach 24 wurde der virushaltige Überstand abgenommen, in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und zur Entfernung von Zelltrümmern 10 Minuten bei 4°C und 410 g abzentrifugiert. Der virushaltige Überstand wurde in ein frisches 50 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zum nächsten Tag bei 4°C gelagert. Die Zellen wurden mit 5 ml frischem, vorgewärmtem Kulturmedium versorgt und weitere 24 h im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Wasserdampfatosphäre kultiviert. Nach 24 h wurde der virushaltige Überstand wie am Vortag geerntet und abzentrifugiert. Der virushaltige Überstand wurde nach dem Zentrifugieren mit dem vom Vortag vereinigt, in 15 ml Röhren aliquotiert (maximal 6 ml je Röhren) und bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

2.2.1.7.3 Konzentrierung des virushaltigen Überstandes mittels Ultrazentrifugation

Zur effizienten Transduktion einiger Zielzellen muss der Virustiter relativ hoch sein, sodass eine Verwendung von unkonzentriertem virushaltigem Überstand nicht ausreicht. Die Ankonzentrierung des Virus geschah mittels Ultrazentrifugation über einen Saccharose-Gradienten.

Hierfür wurden jeweils 10 ml des wie in 2.2.1.7.2 beschrieben generierten und bei 4 °C gesammelten Virusüberstandes in ein Röhren zur Ultrazentrifugation gegeben. Die virushaltige Lösung wurde anschließend mit 2 ml steril filtrierter 1 x PBS/20% Saccharose unterschichtet. Die Viruspartikel wurden dann mit Hilfe einer Ultrazentrifuge durch Zentrifugation bei 4°C und 28000 rpm für 3 Stunden sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und restliches Medium mit einem Zellstofftuch entfernt. Es wurden je 110 µl 1 x PBS je Röhren zugegeben und nach 24 h bei 4°C wurde der ankonzentrierte Virus vereinigt, störende HEK 293T-Zellfragmente durch Zentrifugation bei 500 g für 5 Minuten entfernt, der Virus in Gebrauchsmengen aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.1.7.4 Lentivirale Transduktion von HT1080-Zellen zur Bestimmung des Virustiters

Bei der Zelllinie HT1080 handelt es sich um eine Indikatorzelllinie, die in dieser Arbeit verwendet wurde, um die Funktionalität der generierten Virusüberstände und ankonzentrierten Viruspartikel zu überprüfen. Außerdem diente sie zur Bestimmung des Virustiters anhand dessen die MOI (multiplicity of infection) ermittelt werden konnte. Hierbei handelt es sich um die Ratio der Vektorpartikel/Zahl der Zielzellen.

HT1080-Zellen wurden wie in 2.2.1.4.2 beschrieben geerntet, abzentrifugiert und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden mit $5,8 \times 10^4$ pro Loch in 500 μl HT1080-Kulturmedium in 48-Loch-Platten eingesät. Am Tag der Transduktion wurde eine Verdünnungsreihe des konzentrierten Virus erstellt. Hierzu wurden in einer 48-Loch-Platte 30 μl konzentrierter Virus mit 270 μl Medium (1:10 Verdünnung) gemischt und hieraus 6 weitere 1:10 Verdünnungen nach dem gleichen Schema hergestellt. Das Medium wurde von den am Vortag ausgesäten Zellen abgenommen und 250 μl der jeweiligen virushaltigen Verdünnungsstufen zu einem Loch hinzugegeben. Zu diesen Ansätzen wurden 2,5 μl der Polybren-Gebrauchslösung gegeben. Einem Teil der ausgesäten Zellen wurde als Kontrolle statt Virus 250 μl Kulturmedium zugegeben.

24 h nach der Transduktion wurde der Überstand verworfen und je Loch 1 ml Kulturmedium zugegeben. 3 Tage nach der Transduktion wurden die Zellen mit 200 μl je Loch 1 x PBS/2 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ /0,05% Trypsin vom Boden abgelöst und mit 1 ml Kulturmedium in 15 ml Reaktionsgefäße überführt, wobei die Löcher jeweils mit 1 ml Kulturmedium ausgespült wurden. Die Zellen wurden 5 min bei 135 g bei 4°C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 10 ml Kulturmedium gewaschen.

Anschließend wurden die Zellen in je 400 μl 1 x PBS aufgenommen, in FACS-Röhrchen überführt und die EGFP-Fluoreszenz im FACS analysiert.

Die Berechnung des Virustiters erfolgte bei einer Verdünnungsstufe, die zu 5 – 20% EGFP-positiven Zellen führte. Sie erfolgte nach folgender Formel:

% EGFP-positive Zellen x Zellzahl am Tag der Transduktion (Zahl der ausgesäten Zellen x 2)/100 x Verdünnungsfaktor x Faktor, um auf 1 ml Volumen zu kommen (hier: eingesetztes Volumen = 250 μl , also Faktor 4)

Da zur Berechnung der Zellzahl am Tag der Transduktion die Zahl der ausgesäten Zellen mit dem Faktor 2 multipliziert wurde, musste in regelmäßigen Abständen kontrolliert werden, ob die Verdopplungszeit der HT1080-Zellen bei einem mal je 24 h liegt.

2.2.1.7.5 Lentivirale Transduktion von SP37A3-Zellen

2.2.1.7.5.1 Lentivirale Transduktion von SP37A3-Zellen mit Virusüberstand

Die Transduktion der SP37A3-Zellen mit Lentiviren geschah im immaturren Zustand der Zellen. Für die Transduktion mit Lentiviren wurden die SP37A3-Zellen an Tag 0, wie in 2.2.1.5.2 beschrieben, geerntet. Die Zellen wurden in einer Dichte von 50.000 Zellen je Loch in 6-Loch-Platten in 2 ml SP37A3-Kulturmedium inklusive M-CSF ausgesät. An Tag 3 erfolgte die erste Transduktion mit virushaltigem Überstand. Hierzu wurden je 1,5 ml aus jedem Loch der 6-Loch-Platten verworfen (500 µl verblieben im Loch). Der bei -80°C gelagerte virushaltige Überstand wurde bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Es wurden 2 ml des Virusüberstandes je Loch zu den Zellen gegeben. Anschließend wurden je Loch 4 µg/ml Protaminsulfat, bezogen auf das Gesamtvolumen, sowie GM-CSF und M-CSF für den frischen Anteil an Medium zugegeben. Die Zellen wurden für 5 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde 1 ml des Kulturüberstandes verworfen und durch 1 ml frisches, im Wasserbad erwärmtes HEK 293 T-Kulturmedium inklusive GM-CSF und M-CSF ersetzt.

An Tag 4 der Kultur erfolgte die zweite Transduktion der SP37A3-Zellen. Hierfür wurden jeweils 1,5 ml Kulturüberstand je Loch verworfen (1 ml verblieb im Loch). Es wurden 2 ml im Wasserbad aufgetauter Virusüberstand je Loch zu den Zellen zugegeben, 4 µg/ml Protaminsulfat (bezogen auf das Gesamtvolumen) und für den frischen Teil an Medium GM-CSF und M-CSF. Die Zellen wurden für 5 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden 2,5 ml des Kulturüberstandes verworfen und durch 1 ml frisches, warmes HEK 293T-Kulturmedium inklusive M-CSF ersetzt.

An Tag 6 wurde der Kulturüberstand komplett verworfen und die Zellen wurden 2 x mit 4 ml warmen SP37A3-Kulturmedium gewaschen. Sollten die Zellen immatur verbleiben, erhielten sie 2 ml frisches SP37A3-Kulturmedium inklusive GM-CSF und M-CSF.

Zur Ausreifung wurden die Zellen in 4 ml Kulturmedium ohne M-CSF aufgenommen und 100 ng/ml LPS zugegeben. An Tag 7 wurden die transduzierten Zellen in Versuche eingesetzt und die Transduktionseffizienz, wie in 2.2.1.7.7 beschrieben, bestimmt.

2.2.1.7.5.2 Lentivirale Transduktion von SP37A3-Zellen mit konzentriertem Virus

Die lentivirale Transduktion der SP37A3-Zellen mit konzentriertem Virus glich bis Tag 3 der lentiviralen Transduktion mit virushaltigem Überstand. An Tag 3 wurden die Zellen eines Lochs einer 6-Loch-Platte mit 1 ml vorgewärmten 1 x PBS/0,1% (v/v) Na₂-EDTA vom Boden abgelöst, die Reaktion mit 4 ml warmem Kulturmedium gestoppt und die Zellen in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt, abzentrifugiert und einmal gewaschen. Anschließend wurde die Zellzahl je Loch zur Berechnung des einzusetzenden Virus für die erwünschte MOI bestimmt.

Bei den restlichen Zellen wurde das Medium aus den 6-Loch-Platten verworfen und 1 ml frisches SP37A3-Kulturmedium inklusive M-CSF sowie der konzentrierte Virus (2.2.1.7.3) und 4 µg/ml Protaminsulfat, bezogen auf das Gesamtvolumen, zugegeben. Die Negativkontrolle erhielt nur 1 ml frisches SP37A3-Kulturmedium inklusive M-CSF. An Tag 4 wurde zu allen Zellen 1 ml frisches warmes Kulturmedium inklusive M-CSF zugegeben. Den transduzierten Zellen wurde zusätzlich ein zweites Mal Virus und Protaminsulfat zugegeben. An Tag 6 wurde das alte Medium verworfen und die Zellen wurden mit 4 ml frischem SP37A3-Kulturmedium versorgt.

3 Tage nach der 2. Transduktion konnten die Zellen in Versuche eingesetzt und die Transduktionseffizienz wie in 2.2.1.7.7 beschrieben bestimmt werden.

2.2.1.7.6 Lentivirale Transduktion von BM-DC

2.2.1.7.6.1 Lentivirale Transduktion von BM-DC mit Virusüberstand

Die Transduktion von BM-DC mit lentiviralem Virusüberstand geschah im immaturren Zustand der Zellen an Tag 5 der Kultur. Die Knochenmarkszellen wurden wie in 2.2.1.6 beschrieben aus dem Knochenmark von C57BL/6-Mäusen isoliert und in einer Zellzahl von $2,5 \times 10^6$ Zellen (statt wie zuvor beschrieben 2×10^6) in 10 ml BM-DC-Kulturmedium in bakteriologische Petrischalen ausgesät. Die Kultivierung der Zellen erfolgte über 5 Tage bei 37°C und 10% CO₂, wobei den Zellen am zweiten Tag 10 ml frisches Kulturmedium zugegeben wurde.

Für die Transduktion mit Virusüberständen wurden die BM-DC an Tag 5 aus den Petrischalen geerntet (2.2.1.6.5). Die Zellen wurden in einer Dichte von 750.000 Zellen je Loch in 6-Loch-Platten in 500 µl HEK 293T-Kulturmedium inklusive GM-CSF ausgesät und es folgte die

erste Transduktion mit Virusüberstand. Hierzu wurden je Loch 2 ml des bei -80°C gelagerten und bei 37°C im Wasserbad aufgetauten Virusüberstandes zugegeben. Anschließend wurden je Loch 4 $\mu\text{g/ml}$ Protaminsulfat, sowie GM-CSF für 2 ml zugegeben. Die 6-Loch-Platten wurden 10 Minuten bei RT und 300 g zentrifugiert, um den Virus mit den Zellen in Kontakt zu bringen und anschließend für 5 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde 1 ml des Kulturüberstandes abgenommen, 8 Minuten bei RT und 300 g abzentrifugiert und das Zellsediment in 1 ml frischem, im Wasserbad erwärmtem, HEK 293T-Kulturmedium inklusive GM-CSF aufgenommen und in das Loch zurückgegeben.

Am folgenden Tag erfolgte die zweite Transduktion der BM-DC mit je 2 ml im Wasserbad aufgetautem Virusüberstand. Es wurden 4 $\mu\text{g/ml}$ Protaminsulfat und GM-CSF für 2 ml zugegeben und die Platten 10 Minuten bei RT und 300 g abzentrifugiert. Die Zellen wurden für 5 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Anschließend wurden je 2 ml des Kulturüberstandes abgenommen, 8 Minuten bei RT und 300 g zentrifugiert und das Zellsediment in 1 ml warmen HEK 293T-Kulturmediums inklusive GM-CSF aufgenommen und in das Loch zurückgegeben.

Zwei Tage später wurde ein Teil der Zellen durch Zugabe von 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS stimuliert. 24 h später konnten die BM-DC mit Hilfe eines Zellschabers geerntet und für Versuche eingesetzt werden. Des Weiteren wurde die Transduktionseffizienz bestimmt (2.2.1.7.7).

2.2.1.7.6.2 Lentivirale Transduktion von BM-DC mit konzentriertem Virus

Die Behandlung der BM-DC für die lentivirale Transduktion mit konzentriertem Virus glich bis Tag 5 der lentiviralen Transduktion mit Virusüberstand. Es wurden jedoch 750.000 Zellen je Loch in 6-Loch-Platten in 1 ml BM-DC-Kulturmedium ausgesät. Dann folgte die erste Transduktion durch Zugabe von konzentriertem Virus und 4 $\mu\text{g/ml}$ Protaminsulfat (bezogen auf das Gesamtvolumen). Das Volumen an zugegebenen Virus richtete sich hierbei nach der MOI und dem ermittelten Virustiter. Die Wildtypkontrolle erhielt nur 1 ml Kulturmedium. An Tag 6 wurde allen Zellen 1 ml frisches warmes BM-DC-Kulturmedium zugegeben und den transduzierten Zellen wurde ein zweites Mal Virus und Protaminsulfat zugegeben. An Tag 8 wurde allen Zellen 2 ml frisches Medium zugegeben und am folgenden Tag (3 Tage nach der 2. Transduktion) konnten die Zellen in Versuche eingesetzt und die Transduktionseffizienz wie in 2.2.1.7.7 beschrieben bestimmt werden.

2.2.1.7.7 Bestimmung der Transduktionseffizienz

Die in dieser Arbeit verwendeten lentiviralen Vektoren exprimieren EGFP unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven EF1 α -Promotors. Die Transduktionseffizienz wurde mit Hilfe der Messung EGFP-positiver Zellen durchflusszytometrisch ermittelt.

Hierfür wurden $3\text{--}5 \times 10^5$ Zellen in ein FACS-Röhrchen gegeben, abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in $300\text{--}400\ \mu\text{l}$ 1 x PBS aufgenommen.

Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Messung von EGFP im FL1-Kanal.

2.2.1.8 Präparation von Milzzellen

Zur Entnahme der Milz wurde die Maus getötet und die Milz unter sterilen Bedingungen entnommen. Anschließend wurde die Milz in eine Petrischale mit 20 ml kaltem Waschmedium überführt und mit Hilfe von zwei abgeflamnten Mattrand-Objektträgern zerrieben. Die Zellsuspension wurde über ein Zellsieb ($\text{\O} 40\ \mu\text{m}$) in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Objektträger und die Petrischale wurden sorgfältig mit 10 ml kaltem Waschmedium abgespült, welches ebenfalls über das Zellsieb in das Reaktionsgefäß überführt wurde. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 4°C und $300\ \text{g}$ für 8 Minuten abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment aufgebrochen. Danach wurde eine Lyse der Erythrozyten durchgeführt. Hierzu wurde den Zellen 1 ml Gey'scher Lysepuffer pro Milz zugegeben und für 1 Minute inkubiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 10 ml kaltem Waschmedium pro Milz gestoppt und die Zellen wurden erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 10 ml Waschmedium pro Milz gewaschen.

2.2.1.9 Aufreinigung von T-Lymphozyten über Nylonwolle-Säulen

Die Aufreinigung von T-Zellen aus einer heterogenen Milzzellsuspension erfolgte über Nylonwolle-Säulen. Um diese Säulen herzustellen, wurden 0,6 g Nylonwolle pro Säule abgewogen, die anschließend mit gezähnten Pinzetten von Knoten befreit wurde. Die Nylonwolle wurde in eine 10 ml Spritze überführt, diese in ein 50 ml Reaktionsgefäß gegeben und anschließend autoklaviert.

Zum Äquilibrieren der Säulen wurden 20 ml auf 37°C vorgewärmtes Waschmedium auf die Säule gegeben und eventuell vorhandene Luftblasen mit einer abgeflamnten Pinzette entfernt, wobei das Volumen der Nylonwolle auf 6 ml reduziert wurde. Die Säulen wurden

anschließend für 45 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Säulen in neue 50 ml Reaktionsgefäße überführt und nochmals mit 10 ml warmem Waschmedium äquilibriert. Währenddessen wurden die wie in 2.2.1.4 beschriebenen präparierten Milzzellen in 1 ml warmes Waschmedium pro Milz aufgenommen. Das Medium, das durch die Säulen gelaufen war, wurde aus den 50 ml Reaktionsgefäßen entfernt und auf jede Säule wurde die Zellsuspension von maximal zwei Milzen aufgetropft. Anschließend wurde 1 ml warmes Waschmedium auf die Säulen getropft, um zu verhindern, dass die Zellen mit Luft in Kontakt kommen. Die Säulen wurden für 45 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurden die T-Zellen eluiert. Hierzu wurde der Deckel jedes 50 ml Reaktionsgefäßes mit 70%igem Ethanol sterilisiert, anschließend wurden die Deckel mit 0,7 x 30 mm Kanülen durchstoßen. Die Säule wurde mit einer abgeflammt Pinzette aus dem Reaktionsgefäß entnommen und auf eine neue Kanüle aufgesetzt, die in das vorgestochene Loch gesteckt wurde. Anschließend wurden die Zellen mit 20 ml warmem Waschmedium eluiert, wobei das Medium in 5 ml Portionen auf die Säulen gegeben wurde. Die Durchflussgeschwindigkeit wurde durch Drehen des Deckels auf einen Tropfen pro Sekunde eingestellt. Anschließend wurde der Deckel des Reaktionsgefäßes ausgetauscht und das Eluat für 8 Minuten bei RT und 300 g abzentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Zellsediment aufgebrochen, die Zellen wurden in warmem Kulturmedium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Das Kulturmedium richtete sich hierbei nach den verwendeten APC.

2.2.1.10 MLR (gemischte Lymphozyten Reaktion)

Bei der MLR („mixed lymphocyte reaktion“) wird die Proliferation alloreaktiver T-Zellen nachgewiesen. In dieser Arbeit wurden unterschiedlich behandelte Antigen-präsentierende Zellen (APC) mit allogenen T-Zellen kokultiviert. Das Kulturmedium dieser Versuche richtete sich nach den verwendeten APC. Da nur die Proliferation der T-Zellen gemessen werden sollte, wurden die APC, bevor sie in die MLR gegeben wurden, mit 3000 rad bestrahlt. Dadurch kommt es zu Doppelstrangbrüchen in der DNA, die eine Proliferation der Zellen verhindern. Die APC sind aber noch in der Lage T-Zellen zu aktivieren. Durch die Messung eingebauten tritium-markierten Thymidins ($^3\text{HTdR}$) in die DNA der sich teilenden T-Zellen wurde das Maß ihrer Proliferation ermittelt.

2.2.1.10.1 Primäre MLR im 96-Loch-Format

Als APC für die primäre MLR im 96-Loch-Format dienten unterschiedlich behandelte SP37A3-Zellen und BM-DC. Die BM-DC wurden aus C57BL/6 Mäusen generiert und die Zelllinie SP37A3 basiert ebenfalls auf einem C57BL/6-Hintergrund. Die APC wurden wie in 2.2.1.5.5 und 2.2.1.6.5 beschrieben geerntet und nach dem Zählen bestrahlt. Die Versuche wurden in 96-Loch-Platten durchgeführt. Die bestrahlten APC wurden in Triplikatanisätzen achtmal seriell 1:3 verdünnt, wobei mit einer Anzahl von 5×10^4 Zellen pro Loch begonnen wurde.

Als allogene T-Zellen dienten naive T-Zellen aus BALB/cJ-Mäusen. Die wie in 2.2.1.9 beschrieben aufgereinigten T-Zellen wurden in einer Dichte von 3×10^5 Zellen pro Loch zu den zuvor titrierten APC gegeben. Das Verhältnis der APC zu den naiven T-Zellen betrug somit in der ersten Verdünnungsstufe 1:6, wobei das Gesamtvolumen pro Loch 200 μ l betrug. Als Negativkontrollen dienten Ansätze mit APC ohne T-Zellen sowie T-Zellen ohne APC. Die 96-Loch-Platten wurden für 72 Stunden bei 37°C bei 5% (SP37A3-Zellen als APC) bzw. 10% CO₂ (BM-DC als APC) im Brutschrank inkubiert. Dann wurden zu den Ansätzen 0,25 μ Ci/Loch ³HTdR zugegeben und die Zellen für weitere 16 Stunden kultiviert. Anschließend wurden die Platten bis zur Messung der Radioaktivität bei -20°C gelagert.

Von den für die MLR geernteten APC wurden je 5×10^5 Zellen in 300 μ l Lysepuffer („RNeasy[®] Plus Mini Kit“ von Qiagen, Hilden) aufgenommen und für die spätere RNA-Isolierung bei -20°C eingefroren.

2.2.1.10.2 Primäre MLR im 24-Loch-Format

Die primäre MLR im 24-Loch-Format wurde durchgeführt, um Kulturüberstände der Kokultur von APC mit T-Zellen für Zytokin-ELISA zu erhalten. Für die primäre MLR im 24-Loch-Format dienten unterschiedlich behandelte BM-DC als APC. Die BM-DC wurden wie in 2.2.1.6.5 beschrieben geerntet, nach dem Zählen bestrahlt und mit 5×10^5 Zellen pro Loch ausgesät. Als allogene T-Zellen dienten naive T-Zellen aus BALB/cJ-Mäusen, die in einer Dichte von 3×10^6 Zellen pro Loch zu den zuvor ausgesäten APC gegeben wurden. Das Verhältnis der APC zu den naiven T-Zellen betrug somit 1:6, wobei das Gesamtvolumen pro Loch 2 ml betrug. Die APC wurden anschließend mit den T-Zellen bei 37°C und 10% CO₂ im Brutschrank kokultiviert. Nach 3 Tagen wurde der Kulturüberstand in 2 ml Reaktionsgefäße überführt, 8 Minuten bei 4°C und 300 g zentrifugiert, um eventuell vorhandene Zellen zu

entfernen, in neue 2 ml Reaktionsgefäße überführt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.1.10.3 Primäre MLR im 6-Loch-Format

Bei der primären MLR im 6-Loch-Format wurden wie in der primären MLR im 96- und 24-Loch-Format (2.2.1.10.1 und 2.2.1.10.2) unterschiedlich behandelte APC mit allogenen T-Zellen kokultiviert. Dies geschah um anschließend zu untersuchen, ob in der kokultivierten T-Zell-Population FoxP3/CD25 doppelt positive T-Zellen induziert wurden.

Als APC für diese Art der primären MLR dienten unterschiedlich behandelte BM-DC. Die APC wurden wie in 2.2.1.6.5 beschrieben geerntet, nach dem Auszählen bestrahlt und mit 1×10^6 Zellen pro Loch ausgesät. Als allogene T-Zellen dienten naive T-Zellen aus BALB/cJ-Mäusen. Die naiven T-Zellen wurden in einer Dichte von 6×10^6 Zellen pro Loch zu den zuvor ausgesäten APC gegeben. Das Verhältnis der APCs zu den naiven T-Zellen betrug somit 1:6, wobei das Gesamtvolumen pro Loch 4 ml betrug. Die APC wurden anschließend für 7 Tage mit den T-Zellen bei 37°C und 5 bzw. 10% CO_2 im Brutschrank kokultiviert.

Von den für die MLR geernteten APC wurden je 5×10^5 Zellen in 300 μl Lysepuffer („RNeasy[®] Plus Mini Kit“ von Qiagen, Hilden) aufgenommen und für die spätere RNA-Isolierung bei -20°C eingefroren.

2.2.1.11 Syngene Kokultur

Die syngene Kokultur ist eine Methode zum Nachweis der Proliferation antigenspezifischer T-Zellen, die mit Peptid-beladenen APC kokultiviert wurden.

2.2.1.11.1 Syngene Kokultur im 96-Loch-Format

Zum Beladen mit MOG_{p33-55}-Peptid wurden die BM-DC wie in 2.2.1.6.5 beschrieben geerntet, in 15 ml Reaktionsgefäße überführt, gezählt und auf $5 \times 10^6/1\text{ml}$ eingestellt. Anschließend wurden die Zellen für 3 – 4 Stunden mit dem Peptid beladen. Hierfür wurde $10\mu\text{M}$ MOG_{p33-35} zu den Zellen zugegeben. Die BM-DC wurden mit leicht aufgedrehtem Deckel, um den Gasaustausch zu gewährleisten, in den 10% CO_2 Brutschrank gestellt und alle 30 Minuten leicht geschüttelt. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Zellen bei 3000 rad bestrahlt und dann drei Mal mit 10 ml Kulturmedium gewaschen und erneut

ausgezählt. Die peptidbeladenen und bestrahlten APC wurden in Triplikatansätzen achtmal seriell 1:3 verdünnt, wobei mit einer Anzahl von $1,5 \times 10^4$ Zellen pro Loch begonnen wurde.

Als syngene T-Zellen dienten T-Zellen aus 2D2-Mäusen, die einen MOG-spezifischen T-Zell-Rezeptor haben. Die wie in 2.2.1.9 beschrieben aufgereinigten T-Zellen wurden in einer Dichte von 5×10^4 Zellen pro Loch zu den zuvor verdünnten APC gegeben. Das Verhältnis der APC zu den T-Zellen betrug somit anfangs 1:3,3 wobei das Gesamtvolumen pro Loch 200 μ l betrug. Als Negativkontrollen dienten Ansätze mit den APC ohne T-Zellen sowie T-Zellen ohne APC. Die 96-Loch-Platten wurden für 72 Stunden bei 37°C bei 10% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Dann wurden zu den Ansätzen 0,25 μ Ci/Loch ³HTdR zugegeben und die Zellen für weitere 16 Stunden kultiviert. Anschließend wurden die Platten bis zur Messung der Radioaktivität bei -20°C gelagert.

2.2.1.12 MDSC-Suppressionstest

Der MDSC-Suppressionstest (MDSC = **m**yeloid **d**erived **s**uppressor **c**ells) wurde durchgeführt, um zu klären, ob die untersuchten, mit db-cAMP behandelten BM-DC eine Funktion haben, die denen von MDSC ähnlich ist. Als APC für diesen Test dienten mature BM-DC (Hintergrund C57BL/6). Die APC wurden wie in 2.2.1.6.5 beschrieben geerntet, nach dem Zählen bestrahlt und wenn angegeben in einer Zellzahl von 1×10^4 je Loch in eine 96-Loch-Platte gegeben. Als allogene T-Zellen (TC) dienten T-Zellen aus BALB/cJ-Mäusen. Die wie in 2.2.1.9 beschrieben aufgereinigten naiven T-Zellen wurden in einer Dichte von 4×10^5 Zellen pro Loch zugegeben. Bei den Testpopulationen (TP) handelte es sich um immature, immature mit db-cAMP behandelte und stimulierte und stimulierte mit db-cAMP behandelte BM-DC, die in unterschiedlichen Zellzahlen zu den Ansätzen hinzugegeben wurden. Als Negativkontrollen dienten Ansätze mit den APC, TP und TC alleine und als Positivkontrolle dienten APC plus T-Zellen ohne die Testpopulationen. Den Ansätzen wurden, wenn angegeben, nor-NOHA (Arginase-Inhibitor), L-NMMA (NOS-Inhibitor) und Catalase (ROS-Inhibitor) in den Konzentrationen 0,5 mM zugegeben. Die Versuche wurden in 96-Loch-Platten in Triplikatansätzen durchgeführt, wobei das Gesamtvolumen pro Loch 200 μ l betrug. Die 96-Loch-Platten wurden für 72 Stunden bei 37°C bei 10% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Dann wurden zu den Ansätzen 0,25 μ Ci/Loch ³HTdR zugegeben und die Zellen für weitere 16 Stunden kultiviert. Anschließend wurden die Platten bis zur Messung der Radioaktivität bei -20°C gelagert.

2.2.1.13 Messen der Radioaktivität

Zur Messung der in der syngenen und allogenen Kokultur, sowie im Suppressionstest in die DNA der T-Zellen eingebauten Radioaktivität wurden die Zellen aus den 96-Loch-Platten im Zellerntegerät mit Hilfe von destilliertem Wasser auf eine Filtermembran übertragen. Hierbei lysieren die Zellen, und die DNA wird an der Membran festgehalten. Die Filtermembran wurde anschließend 2 Minuten in der Mikrowelle getrocknet und dann mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit in eine Folie eingeschweißt. Die Radioaktivität auf den Filtern wurde im Strahlungszähler als cpm („counts per minute“) gemessen.

2.2.1.14 ELISA

Der ELISA (**E**nzyme-**L**inked **I**mmunosorbent **A**ssay) ist ein immunologischer Test zum quantitativen Nachweis von Proteinen. Mit Hilfe des ELISA wurde der Gehalt der Zytokine IFN γ , IL-5, IL-10, IL-12 und IL-17 in SP37A3- und BM-DC-Kultur-Überständen und in BM-DC-T-Zell-Kokulturüberständen ermittelt.

Für die Versuche wurden 96-Loch-Mikrotiterplatten verwendet, die zunächst mit 50 μ l eines zytokinspezifischen primären Antikörpers beschichtet wurden. Die Verdünnung dieser Antikörper erfolgte in 0,1M NaHCO₃ (IFN- γ und IL-5) bzw. in 1 x PBS (IL-10, IL-12 und IL-17). Die mit dem primären Antikörper beschichtete Platte wurde über Nacht bei 4°C (IFN- γ , IL-5 und IL-17) bzw. bei RT (IL-10 und IL-12) inkubiert. Die überschüssige Antikörperlösung wurde im ELISA-Waschgerät in 2 Waschgängen ausgewaschen, wobei mit je 3 x 150 μ l PBS/0,05% Tween pro Loch gewaschen wurde. Anschließend wurde die restliche Waschlösung aus der Platte ausgeschlagen. Danach wurden die Platten zum Blockieren freier Bindungsstellen mit jeweils 150 μ l 1 x PBS/1% BSA pro Loch versetzt und für 1 bis 2 Stunden bei RT inkubiert. Nach dem Blockieren erfolgte das Herausschlagen der Blockierlösung. 100 μ l der Proben und des in 1 x PBS/1% BSA verdünnten Standardzytokins wurden aufgetragen und seriell zweifach in 50 μ l 1 x PBS/1% BSA verdünnt. 50 μ l 1 x PBS/1% BSA wurde als Leerwertkontrolle aufgetragen.

Die Platten wurden nach dem Auftragen der Proben über Nacht bei 4°C inkubiert, wobei das nachzuweisende Protein an den primären Antikörper bindet, der an den Plattenboden gebunden ist. Anschließend wurden die Platten zweimal mit 1 x PBS/0,05% Tween im ELISA-Waschgerät gewaschen. Die restliche Waschlösung wurde ausgeschlagen. Den Platten wurden pro Loch 50 μ l eines sekundären, an Biotin gekoppelten Detektionsantikörpers

zugegeben. Dieser wurde für 2 h bei RT (IL-10, IL-12 und IL-17) bzw. bei 37°C (IFN- γ und IL-5) inkubiert. Anschließend wurde überschüssiger Detektionsantikörper durch zweimaliges Waschen im ELISA-Waschgerät entfernt. Nach Zugabe des Enzyms ExtrAvidin-Peroxidase (1:2000 in 1 x PBS/1% BSA) wurden die Platten für eine Stunde bei RT inkubiert. Durch die ExtrAvidin-Peroxidase findet ein enzymatischer Substratumsatz von farblosem OPD (Orthonitrophenoldiamin) zu einem farbigen Produkt statt. Je mehr antikörpergeladenes Zytokin in der Probe vorhanden ist, desto intensiver wird die Färbung. Auf diese Weise kann die Zytokinmenge in der Probe nachgewiesen werden. Durch dreimaliges Waschen wurde überschüssiges Enzym aus den Platten ausgewaschen. Zur Detektion wurden 50 μ l OPD (1 mg/ml in Substratpuffer gelöst), versetzt mit 1 μ l/ml H₂O₂, je Loch zugegeben. Nach dem Eintreten einer Färbung wurde die Reaktion mit 50 μ l Stopp-Lösung (1M H₂SO₄) pro Loch abgestoppt. Die Messung erfolgte anschließend im Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 490 nm.

Durch die Berechnung der linearen Regression konnte der Zytokingehalt in den untersuchten Proben anhand des Vergleiches mit dem Zytokin-Standard ermittelt werden.

2.2.1.14.1 Häm-Oxygenase-1 (HO-1) ELISA

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten HO-1 ELISA handelt es sich um ein Fertigsystem der Firma TaKaRa (Mouse Heme Oxygenase-1 EIA Kit, TaKaRa, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich), das nach den Angaben des Hersteller verwendet wurde. Es handelt sich bei dem Häm-Oxygenase-1 ELISA Kit um einen *in vitro* Enzym Immunoassay (EIA) für die quantitative Bestimmung der Expression des Enzyms HO-1 in murinen Zellen. Je 5×10^5 der zu untersuchenden Zellen wurden für den Test in 200 μ l Lysepuffer (Puffer 8, Mouse Heme Oxygenase-1 EIA Kit, TaKaRa) resuspendiert und bis zur Messung bei -20°C gelagert. Die Funktionsweise des HO-1 ELISA gleicht der Funktionsweise des in 2.2.1.14 beschriebenen ELISA zum Nachweis von Zytokinen in Kulturüberständen.

2.2.1.14.2 Prostaglandin E₂ (PGE₂) ELISA

Bei dem in dieser Arbeit verwendete Prostaglandin E₂ ELISA handelt es sich um ein Fertigsystem der Firma Neogen (Prostaglandin E₂ ELISA Kit), das nach Angaben des Herstellers durchgeführt wurde. Es handelt sich bei dem Prostaglandin E₂ ELISA Kit um einen ELISA für die quantitative Bestimmung von PGE₂ in Zellkulturüberständen. Die

Funktionsweise des PGE₂ ELISA beruht auf Basis der Konkurrenz zwischen einem Enzym-Konjugat und dem PGE₂ in der Probe um eine limitierte Anzahl an Bindungsstellen auf einer antikörperbeschichteten Mikrotiterplatte. Es wurde die Menge an gebundenem Enzym-Konjugat bestimmt. Die Intensität der Farbe des umgesetzten Enzym-Substrats war somit invers proportional zu der Menge an PGE₂ in der Probe.

2.2.1.15 FACS-Analyse

Die FACS-Analyse ("fluorescence activated cell sorter"/Fluoreszenz aktivierter Zellsortierer) wurde in dieser Arbeit zur phänotypischen Charakterisierung von unterschiedlich behandelten BM-DC und SP37A3-Zellen sowie zur Untersuchung der Induktion von regulatorischen T-Zellen durch unterschiedlich konditionierte BM-DC eingesetzt.

Es handelt sich bei der FACS-Analyse um eine Methode zum semiquantitativen Proteinnachweis, wobei sowohl intrazelluläre Proteine als auch Proteine, die auf der Oberfläche von Zellen exprimiert werden, nachgewiesen werden können. Hierbei wird den Zellen ein Antikörper zugegeben, der an das entsprechende Protein bindet. Ist dieser proteinspezifische Antikörper direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, kann er ohne Einsatz eines sekundären Antikörpers detektiert werden. Handelt es sich bei dem proteinspezifischen Antikörper um einen unmarkierten Antikörper, ist zur Detektion ein markierter sekundärer Antikörper erforderlich, der an den primären Antikörper bindet. Um eventuelle unspezifische Bindungen des jeweiligen Antikörperisotypen in die Analyse miteinzubeziehen, wird eine Isotypkontrolle (2.1.8.3) zu jedem verwendeten Antikörper mitgeführt. Die eigentliche Messung erfolgt mit Hilfe eines fluoreszenzaktivierten Durchflusszytometers nach Ausgrenzung von toten Zellen über Größe und Granularität der Zellen. Bei der Messung werden die Zellen durch eine Kapillare gesaugt und passieren einzeln einen Laserstrahl. Die Zellen streuen dann einen Teil des Lichtes, das mit einem Detektor gemessen wird. Hierbei korreliert die Menge des gestreuten Lichtes mit der Größe und der Granularität der Zellen. Das Vorwärtsstreulicht (FSC, „forward scatter“) lässt Aussagen über die Größe der Zellen, das Seitwärtsstreulicht (SSC, „side scatter“) über ihre Granularität zu. Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpers kann die Expressionsstärke und die Verteilung des jeweils untersuchten Moleküls auf der Oberfläche der Zellen bzw. intrazellulär bestimmt werden. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden bei 488 nm angeregt und emittieren Licht verschiedener Wellenlänge.

Es wurden jeweils 10.000 - 20.000 lebende Zellen pro Probe gemessen, die mit Hilfe der CellQuest™-Software (BD Biosciences) analysiert wurden. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des Programmes FlowJo (FlowJow, Ashland, USA) graphisch und statistisch ausgewertet.

Alle im folgenden beschriebenen Färbungen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern wurden auf Eis durchgeführt, um eine antikörperaktivierte Endozytose zu vermeiden. Des Weiteren wurden die Färbungen im Dunkeln durchgeführt, um die Fluoreszenzfarbstoffe vor dem Ausbleichen zu schützen.

2.2.1.15.1 Extrazelluläre Oberflächenfärbung

Die BMDC und SP37A3-Zellen wurden für die FACS-Färbung in einer Menge von $3 - 5 \times 10^5$ Zellen auf FACS-Röhrchen verteilt und in 1 ml FACS-Puffer gewaschen (10 min, 4°C, 300 g). Der Überstand wurde abgesaugt und 50 µl 1:3 in FACS-Puffer verdünntes Gamma Globulin (Maus Gamma Globulin, Dianova, Hamburg) (SP37A3-Zellen) bzw. 50 µl 1:5 verdünnter 2.4G2-Überstand (BM-DC) zum Absättigen unspezifischer Bindungen zugegeben. Die FACS-Röhrchen wurden kurz auf einem Vortex gerüttelt und für insgesamt 20 Minuten im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Nach 10 Minuten wurden die FACS-Röhrchen erneut kurz gerüttelt. Nach der Inkubation wurde die überschüssige Absättigungslösung durch Waschen mit 1 ml FACS-Puffer entfernt. Anschließend wurden 50 µl des entsprechend in FACS-Puffer verdünnten primären Antikörpers (2.1.8.1) zugegeben. Die FACS-Röhrchen wurden kurz gerüttelt und für 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert, wobei die FACS-Röhrchen nach 10 Minuten erneut kurz gerüttelt wurden. Nach der Inkubation wurde überschüssiger Antikörper durch 1 x Waschen mit 1 ml FACS-Puffer entfernt. Die Proben, die mit einem direkt markierten Antikörper gefärbt worden waren, wurden in 300 - 400 µl 1 x PBS/0,7% PFA fixiert und bis zur Messung im Dunkeln bei 4°C gelagert. Den Proben, die mit einem unmarkierten Antikörper behandelt worden waren, wurden nach dem Waschen 50 µl des entsprechend verdünnten markierten sekundären Antikörpers (2.1.8.2) zugegeben. Nach kurzem Aufrütteln wurden diese Proben für 20 Minuten im Dunkeln bei 4°C inkubiert, wobei sie nach 10 Minuten kurz gerüttelt wurden. Nach der Inkubation wurde der überschüssige Antikörper mit 1 ml FACS-Puffer ausgewaschen, und die Proben wurden nach Zugabe von 300 - 400 µl 1 x PBS/0,7% PFA bis zur Messung im Dunkeln bei 4°C gelagert.

2.2.1.15.2 Intrazelluläre Färbung mit einem Fascin-spezifischen Antikörper

Für die intrazelluläre FACS-Färbung von BMDC mit einem Fascin-spezifischen Antikörper wurden die Zellen zunächst mit Methanol permeabilisiert. Hierfür wurden die Zellen in einer Menge von $3 - 5 \times 10^5$ Zellen auf FACS-Röhrchen verteilt und in 1 ml FACS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden in 500 μ l absolutem Methanol je FACS-Röhrchen resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Hierdurch kommt es zur Permeabilisierung der Zellwände, was dazu führt, dass die Antikörper in die Zellen eindringen können. Anschließend folgten zwei Waschschrte mit je 2 ml FACS-Puffer. Nach dem zweiten Waschschrte wurden die Fc-Rezeptoren der Zellen wie in 2.2.1.15.1 beschrieben mit 2.4G2-Überstand abgesättigt und gefärbt. Die Proben wurden nach Zugabe von 300 - 400 μ l 1 x PBS/0,7% PFA bis zur Messung bei 4°C im Dunkeln gelagert.

2.2.1.15.3 Oberflächenfärbung mit anschließender intrazellulärer FoxP3-Färbung

Anhand der FoxP3-Färbung von T-Zellen, die mit DCs in einer Primärkultur stimuliert wurden (2.2.1.10.3), kann man eine Aussage darüber treffen, inwieweit regulatorische T-Zellen induziert wurden. Es wurde das FoxP3-Färbe-Kit der Firma Miltenyi verwendet. Für die Färbung der Oberflächenmoleküle CD25, CD4 oder CD8 und die kombinierte intrazelluläre FoxP3-Färbung wurden jeweils 5×10^5 Zellen aus einer primären Kokultur auf FACS-Röhrchen verteilt, 1 ml FACS-Puffer zugegeben und die Zellen bei 300 g und 4°C für 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und je Röhrchen 25 μ l 2.4G2 zum Absättigen der Fc-Rezeptoren zugegeben, die Röhrchen auf dem Reagenzglasrüttler gerüttelt und die Zellen für 10 min bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde 25 μ l Antikörpercocktail nach folgendem Schema zugegeben, wobei zunächst nur die Oberflächenmarker und ihre dazugehörigen Isotypkontrollantikörper verwendet wurden.

Für alle Proben:

- 1) CD4-Cy5PE + Ratte-IgM-FITC + Maus-IgG1-PE
- 2) CD8-Cy5PE + Ratte-IgM-FITC + Maus-IgG1-PE
- 3) CD4-Cy5PE + CD25-FITC + FoxP3-PE
- 4) CD8-Cy5PE + CD25-FITC + FoxP3-PE

Für eine Gruppe zur Durchführung der Voreinstellungen am Durchflusszytometer:

- 5) Ratte-IgG2a-Cy5PE + Ratte-IgM-FITC + Maus-IgG1-PE
- 6) Ratte-IgG2a-Cy5PE + CD25-FITC + Maus-IgG1-PE
- 7) Ratte-IgG2a-Cy5PE + Ratte-IgM-FITC + FoxP3-PE

Nach einer Inkubation der Zellen mit den Antikörpern für 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln, während der die Röhren noch ein weiteres mal gerüttelt wurden, wurde 1 ml FACS-Puffer je Röhren zugegeben und die Zellen bei 300 g und 4°C 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und 0,5 ml frisch angesetzte kalte Fix/Perm-Lösung (Miltenyi-FoxP3 Staining Kit, 1 Teil Lösung 1 + 3 Teile Lösung 2) zugegeben, die FACS-Röhren gerüttelt und für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden 2 ml FACS-Puffer zugegeben, die Zellen bei 300 g und 4°C für 10 Minuten abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Den Proben wurde 1 ml frisch angesetzter Permeabilisierungspuffer (Miltenyi-FoxP3 Staining Kit, 1 Teil 10 x Perm + 9 Teile Aqua dest.) pro Röhren zugegeben, gerüttelt, die Zellen erneut abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Den Zellen wurde 50 µl 2.4G2 zum Absättigen der Fc-Rezeptoren zugegeben, sie wurden durch Rütteln gemischt und für 5 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 5 µl des FoxP3-Antikörpers oder des entsprechenden Isotypkontroll-Antikörpers zu den Proben gegeben, die Proben durch Rütteln gemischt und die Zellen für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert, wobei die Zellen nach der Hälfte der Zeit nochmals aufgerüttelt wurden. Nach der Inkubation wurden die Antikörper mit 1 ml kaltem Permeabilisierungspuffer ausgewaschen (300 g, 10 min, 4°C) und das Zellsediment nach Absaugen des Überstandes in 400 µl 1 x PBS/0,7% PFA aufgenommen. Die Proben wurden bis zur Messung im Durchflusszytometer bei 4°C im Dunkeln gelagert.

2.2.1.16 Erstellungen der Grafiken und Statistik

Die Auswertung und graphische Darstellung der erarbeiteten Versuchsdaten erfolgte, falls nicht anders angegeben, mit Hilfe des Programms Sigma Plot 2001. Zur Bestimmung signifikanter Unterschiede zwischen verschiedenen Gruppen wurde der Studentsche t-Test verwendet. Hierbei gelten p-Werte $\leq 0,05$ signifikant, wobei $p \leq 0,05$ als 1-fach, $p \leq 0,01$ als 2-fach und $p \leq 0,001$ als 3-fach signifikant gelten. Signifikante Unterschiede wurden durch Symbole gekennzeichnet.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Präparation von RNA

Es wurde RNA aus unterschiedlich konditionierten BM-DC und SP37A3-Zellen isoliert. Hierzu wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen zur Lyse in 300 µl Lysepuffer (RNeasy[®] Plus Mini Kit, Qiagen, Hilden) aufgenommen und die Zelllysate bis zur Präparation der RNA bei -20°C gelagert. Der Lysepuffer enthält chaotrope Ionen, welche die dreidimensionale Struktur von Proteinen und somit auch die der Zellwände zerstören. Dadurch kommt es zur Lyse der Zellen.

Bei der Isolierung von RNA ist auf eine RNase-freie Umgebung zu achten, da die RNA ansonsten degradiert wird. Da RNasen auf allen Körperoberflächen vorkommen, ist es notwendig, bei der RNA-Isolierung Handschuhe zu tragen. Des Weiteren ist darauf zu achten, dass alle Arbeitslösungen, die für die RNA-Isolierung benötigt werden, mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser angesetzt werden, um möglicherweise vorhandene RNasen zu zerstören. Vor der RNA-Präparation wurde der Arbeitsplatz mit 70% Alkohol gesäubert. Es wurden Pipetten verwendet, die ausschließlich für die RNA-Isolierung eingesetzt werden. Die Isolierung der RNA erfolgte mit Hilfe des „RNeasy[®] Plus Mini Kit“ und der „QIAshredder“ (Qiagen, Hilden) nach dem Herstellerprotokoll.

2.2.2.2 Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription wird eine RNA-Matrize mit Hilfe einer Reversen Transkriptase enzymatisch in cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben. Eine Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die anhand einer RNA-Matrize komplementär dNTPs anfügt. Bei der Reversen Transkription binden Primer, die sowohl genspezifisch oder genunspezifisch sein können, an die einzelsträngige RNA und bilden somit die Startpunkte für die Reverse Transkription.

In dieser Arbeit wurde für die Reverse Transkription das „iScript[™] cDNA Synthesis Kit“ (Bio-Rad) verwendet. Das iScript[™] cDNA Synthesis Kit beinhaltet zwei verschiedene Arten von Primern. Es handelt sich hierbei um Oligo(dT)- und Random Hexamer-Primer. Die Oligo(dT)-Primer binden an den Poly(A)-Schwanz der mRNA und Random Hexamer-Primer binden statistisch verteilt an eine RNA-Sequenz.

Bei der Reversen Transkription wurden zu 11 µl RNA 4 µl Nuclease-freies Wasser (Bio-Rad), 4 µl 5x iScript Reaction Mix, der die Primer und den Enzym-Puffer enthält, und 1 µl iScript Reverse Transkriptase gegeben. Dieses Gemisch wurde zunächst für 5 Minuten bei 25°C, dann für 40 Minuten bei 42°C und abschließend für 5 Minuten bei 85°C im Thermocycler inkubiert. Anschließend wurde der cDNA-Gehalt der Probe bestimmt (2.2.2.3) und die cDNA bis zu ihrer Weiterverwendung bei -20°C gelagert.

2.2.2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

In einer Quarzküvette wurde vor der eigentlichen Konzentrationsbestimmung mit 100 µl aqua bidest. der Leerwert bestimmt. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration einer Probe wurde die Probe zunächst 1:100 in Wasser verdünnt und in eine Quarzküvette gegeben. Anschließend wurde die Absorption bei 260 nm gemessen, bei der das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt. Zusätzlich zu der Konzentration der DNA wird im Photometer der Reinheitsgrad der DNA bestimmt. Hierzu wird zusätzlich zu der Absorption bei 260 nm die Absorption bei 280 nm gemessen. Bei 280 nm liegt das Absorptionsmaximum von Proteinen. Anhand des Quotienten aus der Extinktionen bei 260 und 280 nm ($E_{260/280}$) kann eine Aussage über die Reinheit der DNA getroffen werden. Der Quotient sollte bei 1,8 – 2,1 liegen.

2.2.2.4 Quantitative („Realtime“) –PCR

Bei der Realtime-PCR (PCR = „polymerase chain reaction“, Polymerase-Kettenreaktion) handelt es sich um eine Methode zur Quantifizierung von mRNA.

Sie wurde in dieser Arbeit zur Klärung der Fragestellung eingesetzt, wie stark ein untersuchtes Gen in unterschiedlich konditionierten BM-DC oder SP37A3-Zellen exprimiert wird.

Bei der quantitativen PCR werden nach jedem Zyklus die PCR-Produkte mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen detektiert. In dieser Arbeit wurde hierzu der DNA-Farbstoff SYBR Green eingesetzt, der in die doppelsträngigen PCR-Produkte interkaliert, wodurch dieser Farbstoff bei Anregung fluoresziert. Die Fluoreszenzintensität korreliert mit der Menge doppelsträngiger DNA.

Für die quantitative PCR wurde eine SYBR Green-Lösung verwendet (Absolute SYBR Green Rox Mix, Thermo Fisher Scientific, Bonn), die neben dem SYBR-Green Reaktionspuffer, dNTP's und die Taq-Polymerase enthält. Des Weiteren enthielt die SYBR Green-Lösung den

Fluoreszenzfarbstoff ROX, der als passive Referenz dient (Beladungskontrolle). Die Primer für die Reaktion wurden als Primer-Mix, bestehend aus „sense“- und „antisense“-Primer zugegeben.

Es ergibt sich folgendes Reaktionsgemisch für jeden Einzelansatz:

1,75 µl Primer- Mix (je 1 pmol/µl)
9,75 µl H₂O (Aqua B. Braun, B.Braun, Melsung)
12,5 µl SYBR Green-Lösung
1 µl cDNA (200 ng/µl)

$\Sigma = 25 \mu\text{l}$

Das Reaktionsgemisch wurde in die 96-Loch-Platte (Corning, USA) pipettiert, mit einer Abdeckfolie (Absolute QPCR Seal, Abgene, Hamburg) verschlossen und anschließend für 5 Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Die Platte wurde bis zur Messung im Thermozykler bei -20°C gelagert.

Die Messung erfolgte im Thermozykler (ABI 7300) nach folgendem Protokoll:

| Zyklus | Zyklenzahl | Zeit | Temperatur |
|--------|------------|---|----------------------|
| 1 | 1 | 15 Minuten | 95°C („Hot-Start“) |
| 2 | 50 | 15 Sekunden 1 Minute | 95°C 60°C |
| 3 | 1 | 30 Sekunden 30 Sekunden 15 Sekunden | 95°C 60°C 95°C |

2.2.2.5 Kultivierung von Bakterienzellen

Die Anzucht und Kultivierung der in dieser Arbeit verwendeten *Eschichia coli* TOP10 erfolgte über Nacht in LB-Medium bei 37°C und 220 upm auf dem Bakterienschüttler unter aeroben Bedingungen.

Zur Selektion transformierter Bakterien wurde dem Medium Ampicillin (100 mg/ml) zugegeben.

2.2.2.6 Herstellung elektrokompetenter TOP10-Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter TOP10-Zellen wurde eine Einzelkolonie über Nacht in 50 ml LB-Medium bei 37°C auf dem Bakterienrüttler (220 upm) inkubiert. Am nächsten Tag wurden dieser Kultur weitere 950 ml LB-Medium zugegeben und für weitere 2 bis 3 Stunden bei 37°C und 180 upm auf dem Bakterienrüttler inkubiert. Hatte die Bakterienkultur eine mittlere logarithmische Wachstumsphase erreicht ($OD_{600} \sim 0,4$), wurde sie für 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 15 Minuten bei 4°C und 2000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die sedimentierten Bakterien in 500 ml eiskühlem Aqua dest. resuspendiert und anschließend für 15 Minuten bei 4°C und 4000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterien noch weitere zwei Mal in Aqua dest. gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand verworfen und das Bakteriensediment in 4 ml eiskühler 10%iger Glycerinlösung resuspendiert. Die so hergestellten elektrokompetenten Bakterien wurden bis zur weiteren Verwendung in 100 µl Aliquoten bei -80°C gelagert.

2.2.2.7 Transformation elektrokompetenter Bakterien

Die Transformation elektrokompetenter Bakterien dient der Propagation von Plasmiden. Bei den in dieser Arbeit verwendeten elektrokompetenten Bakterien handelt es sich um *E. coli* TOP10 Zellen. Die Transformation der Bakterien erfolgte mittels Elektroporation. Hierfür wurden die bei -80°C gelagerten Bakterienzellen auf Eis aufgetaut, mit 100 ng Plasmid-DNA vermischt und das Gemisch 1 – 2 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension in eine bei -20°C gelagerte, 0,1 cm Elektroporationsküvette überführt. Die Bakterienzellen wurden bei 2,1 kV, 125 µF und 200 Ω transformiert und anschließend mit 600 µl LB-Medium ohne Antibiotikum in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden zur Induktion der Expression der plasmidkodierten Antibiotikum-Resistenz 45 Minuten bei 37°C auf dem Bakterienrüttler (220 upm) inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Bakterien in einen mit 250 bzw. 500 ml LB-Medium inklusive 100 µg/ml Ampicillin gefüllten (500 ml bzw. 1 l) Erlenmeyerkolben gegeben. Die Flüssigkultur wurde über Nacht bei 37 °C auf dem Bakterienrüttler (220 upm) kultiviert.

Da die transformierten Bakterien das plasmidkodierte Resistenzgen exprimierten, konnten sie sich in dem antibiotikumhaltigen LB-Medium vermehren.

2.2.2.8 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen mit Hilfe von Fertigsystemen

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Fertigsystemen handelt es sich um Systeme der Firma Qiagen. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte aus 250 ml (Plasmid Midi Kit) oder 500 ml Flüssigkulturen (Plasmid Maxi Kit). Die isolierte DNA wurde jeweils in aqua dest. (Aqua B. Braun, B.Braun, Melsungen) gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.9 Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA

Für die Analyse der wie in 2.2.2.8 beschrieben präparierten Plasmid-DNA wurden sequenzspezifische Typ II-Restriktionsendonukleasen verwendet. Diese schneiden die zu untersuchende DNA innerhalb sogenannter Erkennungssequenzen. Bei diesen Erkennungssequenzen handelt es sich um definierte, spezifisch kurze Nukleotidsequenzen der DNA-Moleküle. Die Nukleotidsequenzen der DNA-Moleküle bilden Palindrome, das bedeutet, dass dieselbe Folge von 4 bis 8 Nukleotiden in gegenläufiger Orientierung auf beiden DNA-Strängen vorliegt. Die Restriktionsansätze enthielten die zu analysierende DNA, das spezifische Restriktionsenzym und Reaktionspuffer und wurden wie folgt angesetzt:

1 - 2 μg DNA
0,5 μl Enzym (10 U/ μl)
2 μl 10 x Puffer
ad 20 μl aqua dest.

Die Restriktionen wurden 1 bis 2 h oder über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend bis zum Auftragen auf ein Agarose-Gel bei 4°C gelagert.

2.2.2.10 Agarose-Gelelektrophorese

In dieser Arbeit wurde die Agarose-Gelelektrophorese zur Überprüfung präparierter Plasmid-DNA eingesetzt.

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Die aufgrund ihrer Phosphat-Gruppen negativ geladenen DNA-Fragmente wandern je nach ihrer Größe in einem elektrischen Feld unterschiedlich schnell zur Kathode. Hierdurch werden sie ihrer Größe nach aufgetrennt. Kleine Fragmente wandern schneller als große. Die Größe der DNA-Fragmente kann anhand eines DNA-Größenstandards ermittelt werden.

Das verwendete Agarosegel wurde hergestellt, indem die benötigte Menge an Agarose (in der Regel 1g) in 100 ml 1 x Tris-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer (TAE-Puffer) in der Mikrowelle erhitzt wurde, bis eine klare Lösung entstand. Nachdem die Lösung auf ca. 40°C abgekühlt war, wurden 10 µl einer 1%igen (v/v) Ethidiumbromidlösung zugegeben und durch leichtes Schwenken gleichmäßig verteilt. Ethidiumbromid interkaliert zwischen den Basen der DNA-Fragmente, wodurch diese unter UV-Licht bei 310 nm sichtbar gemacht werden können. Die Lösung wurde in eine horizontale Gelkammer gegossen, in der sich ein Kamm zur Aussparung der Probenaschen befand. Nach der Polymerisierung wurde das Gel in eine mit 1 x TAE gefüllte Elektrophoresekammer überführt. Die aufzutragenden DNA-Proben wurden mit 5 x DNA-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Des Weiteren wurden 6 µl des nach Herstellerangaben mit Ladepuffer und Wasser versetzten cDNA-Fragment-Größenstandards in eine Geltasche pipettiert. Es wurde eine Spannung von 90 – 120 V angelegt und nach einer 30 bis 60 minütigen Laufzeit konnten die DNA-Fragmente mit Hilfe eines UV-Transilluminators sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert werden.

3. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten potenziell tolerogene dendritische Zellen (DC) generiert und hinsichtlich ihrer phänotypischen und funktionellen Veränderung untersucht werden. Hierbei wurden BM-DC und Zellen der murinen DC-Linie SP37A3 verwendet.

Es sollten zum einen BM-DC funktionell untersucht werden, die während der Differenzierungskultur mit Dibutyryl-cyclo-Adenosin-3',5'-Mono-Phosphat (db-cAMP) behandelt, und im unstimulierten bzw. stimulierten Zustand mit allogenen oder syngenen T-Zellen kokultiviert wurden. Es wurde untersucht, ob diese db-cAMP-behandelten APC (db-cAMP-DC) sich hinsichtlich ihres T-Zell-Stimulierungspotenzials in der primären Kokultur von unbehandelten stimulierten bzw. unstimulierten BM-DC unterscheiden. Des Weiteren sollte untersucht werden, inwieweit T-Zellen, die in einer primären MLR durch unstimulierte und stimulierte BM-DC oder unstimulierte und stimulierte db-cAMP-DC stimuliert wurden ein differentielles Zytokinprofil aufweisen und ob durch die unterschiedlichen BM-DC-Populationen T-Zellen mit regulatorischem Charakter induziert wurden. Mit Hilfe der quantitativen PCR wurde außerdem eine db-cAMP- bzw. LPS-bedingte Expressionsänderung von Markergenen in den verschiedenen APC-Gruppen untersucht. Zur Validierung wurde die Expression einiger Moleküle auf Proteinebene im FACS und mittels ELISA untersucht.

Außerdem sollte in einem weiteren Projekt untersucht werden, ob eine lentivirale Transduktion von SP37A3-Zellen zur Überexpression koinhibitorischer Oberflächenmoleküle möglich ist. Exemplarisch wurde dies für das Molekül B7-H3 etabliert. Die transduzierten Zellen sollten dann ebenfalls hinsichtlich ihrer phänotypischen und funktionellen Veränderungen untersucht werden.

3.1 Charakterisierung von db-cAMP behandelten BMDC

Bei db-cAMP handelt es sich um ein stabiles, zellpermeables cAMP-Analogon. cAMP ist ein Nukleotid, das als intrazellulärer „second messenger“ agiert und die Aktivität verschiedener zellulärer Prozesse moduliert [Kambayashi *et al.* 2001]. Es ist bekannt, dass das intrazelluläre cAMP-Niveau durch verschiedene soluble Mediatoren erhöht wird. Hierbei wird cAMP von der membranständigen Adenylat-Cyclase aus ATP synthetisiert und kann die Protein Kinase A (PKA) aktivieren, die wiederum den Transkriptionsfaktor CREB („CRE-binding protein“) durch Phosphorylierung aktiviert. Phosphoryliertes CREB bindet im Zellkern als Dimer an CRE („cAMP-responsive elements“) in den Promotoren verschiedener Gene, deren Transkription dadurch reguliert wird (Abb.1) (Greenberg und Shaywitz, 1999).

3.1.1 Allogenes T-Zellstimulierungspotential von db-cAMP-DC

Zur Untersuchung der toleranzinduzierenden Wirkung von db-cAMP auf BM-DC wurde zunächst die allogene T-Zell-Aktivierung durch BM-DC untersucht, die ab Tag 3 der Kultur in Gegenwart von db-cAMP [0,25 mM] kultiviert wurden (db-cAMP-DC). Als Kontrollen wurden unstimulierte BM-DC mitgeführt, die allogene T-Zellen moderat, und stimulierte BM-DC, die allogene T-Zellen in hohem Maße zur Proliferation anregen.

Abbildung 2 zeigt die allogene T-Zellstimulierungsfähigkeit von unstimulierten und mit LPS stimulierten BM-DC sowie von in Gegenwart von db-cAMP differenzierten BM-DC im unstimulierten und stimulierten Zustand. Anhand der Abbildung wird ersichtlich, dass stimulierte BM-DC im Vergleich zu unstimulierten BM-DC ein signifikant erhöhtes allogenes T-Zell-Stimulierungspotential besitzen. Die in Anwesenheit von db-cAMP differenzierten mit LPS stimulierten Zellen weisen im Gegensatz zu stimulierten BM-DC ein signifikant vermindertes Potential auf, allogene T-Zellen zur Proliferation anzuregen. Ihr T-Zell-Stimulierungspotential liegt etwa auf dem Niveau unstimulierter BM-DC. Bei den ersten BM-DC/T-Zell-Verhältnissen weisen mit db-cAMP differenzierte unstimulierte BM-DC ebenfalls ein geringeres T-Zell-Aktivierungs-Potential auf als unstimulierte BM-DC.

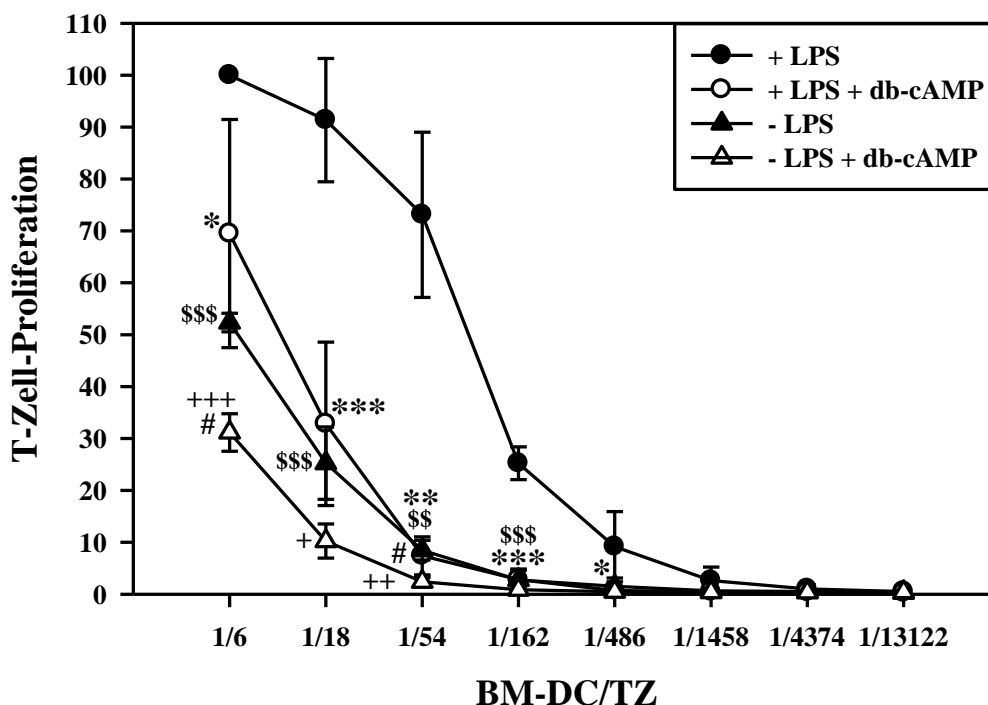


Abb. 2: Einfluss von db-cAMP auf die allogene T-Zell-Stimulierungsfähigkeit von BM-DC. Ein Teil der BM-DC wurde ab Tag 3 der Kultur mit db-cAMP [0,25 mM] behandelt. Zur Ausreifung wurde dem Medium an Tag 9 LPS [1 µg/ml] zugegeben. Die unterschiedlich behandelten BM-DC wurden bestrahlt und in Triplikatsätzen in Löcher einer 96-Loch-Platte eingesät und seriell dreifach verdünnt (5×10^4 – $2,4 \times 10^3$). Sie wurden mit jeweils 3×10^5 BALB/cJ-T-Zellen für 3 Tage kokultiviert. Anschließend wurde zu den Kulturen jeweils 0,25 µCi $^3\text{HTdR}$ pro Loch zugegeben. Nach 16-stündiger Inkubation wurde durch Messen der Radioaktivität die Proliferationsrate der alloreaktiven T-Zellen bestimmt. Dargestellt sind der Mittelwert \pm Standardfehler von 4 Experimenten, wobei die Proliferation der T-Zellen als Antwort auf stimulierte BM-DC bei dem BM-DC/TZ-Verhältnis von 1/6 gleich 100% gesetzt wurde. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten BM-DC (\$), zwischen BM-DC und db-cAMP-DC in jeweils unstimuliertem und stimuliertem Zustand (+ bzw. *) und zwischen db-cAMP behandelten BM-DC im unstimuliertem und stimuliertem Zustand (#) sind angegeben.

3.1.2 Sygenes T-Zellstimulierungspotential von db-cAMP-DC

Um die verminderte allogene T-Zell-Stimulierungskapazität der db-cAMP-DC Proteinantigenspezifisch zu validieren, wurde die syngene T-Zell-Aktivierung durch ab Tag 3 der Differenzierungskultur mit db-cAMP [0,25 mM] behandelten BM-DC untersucht. Die DC-Populationen wurden hierfür am Tag der DC/T-Zell-Kokultur mit MOG₃₅₋₅₅ Peptid [10µM] beladen und mit 2D2-T-Zellen kokultiviert, die einen MOG₃₅₋₅₅-spezifischen T-Zell-Rezeptor tragen. Als Kontrollen dienten wie in der allogenen MLR (3.1.1) unstimulierte und

stimulierte BM-DC, die im Fall der unstimulierten BMDC syngene T-Zellen nur gering und im Fall stimulierter BM-DC syngene T-Zellen stark zur Proliferation anregen.

Das syngene T-Zellaktivierungs-Potential von unstimulierten und LPS-stimulierten Kontroll-BM-DC sowie in Anwesenheit von db-cAMP differenzierter BM-DC ist in Abbildung 3 dargestellt. Stimulierte MOG_{p33-35} beladene BM-DC weisen ein signifikant höheres Potenzial auf, syngene T-Zellen zur Proliferation anzuregen als unstimulierte BM-DC. Die db-cAMP behandelten, LPS-stimulierten BM-DC haben ein ähnliches T-Zellstimulierungspotenzial wie unstimulierte BM-DC, welches signifikant niedriger ist als das der LPS-ausgereiften unbehandelten Kontroll-BM-DC.

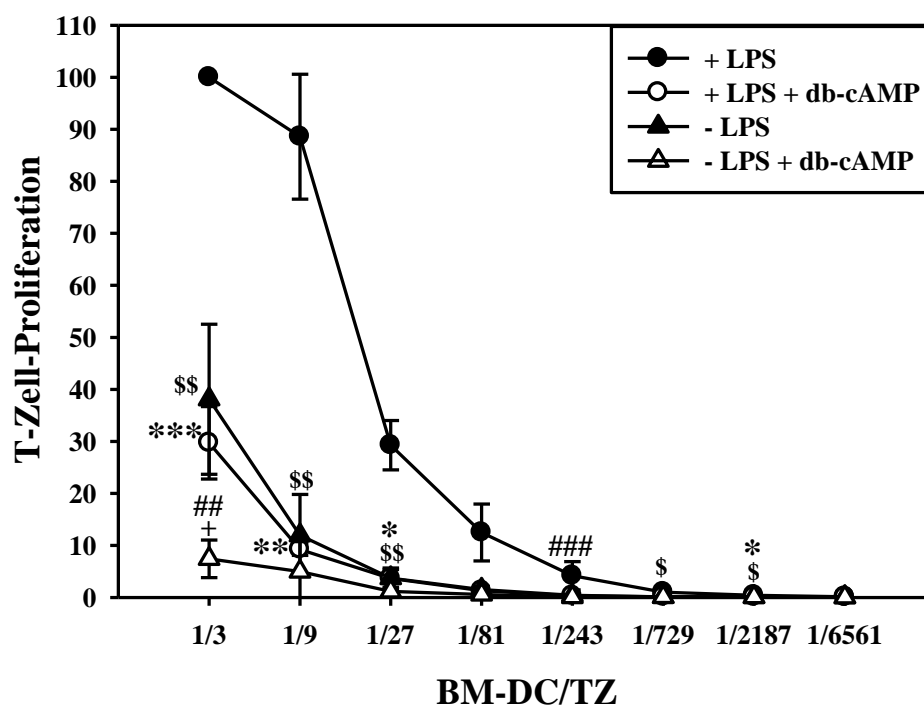


Abb. 3: Einfluss von db-cAMP auf das T-Zell-Stimulierungspotential von peptidgepulsten BM-DC in der syngen Kokultur. Ein Teil der BM-DC wurde ab Tag 3 der Kultur mit db-cAMP [0,25 mM] behandelt. Zur Ausreifung wurde dem Medium an Tag 9 LPS [1 µg/ml] zugegeben. Die unterschiedlich behandelten BM-DC wurden 24 Stunden später geerntet mit MOG_{p33-35} [10µM] beladen, bestrahlt und in Triplikatsätzen in Löcher einer 96-Loch-Platte eingesät und seriell dreifach verdünnt, beginnend mit $1,5 \times 10^4$ Zellen. Sie wurden mit jeweils 5×10^4 2D2-T-Zellen für 3 Tage kokultiviert. Anschließend wurde zu den Kulturen jeweils 0,25 µCi $^3\text{HTdR}$ pro Loch zugegeben. Nach 16-stündiger Inkubation wurde durch Messen der Radioaktivität die Proliferationsrate der T-Zellen bestimmt. Dargestellt sind der Mittelwert \pm Standardfehler von 3 Experimenten, wobei die Proliferation der T-Zellen als Antwort auf stimulierte BM-DC bei dem BM-DC/TZ-Verhältnis von 1/3 gleich 100% gesetzt wurde. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten BM-DC (\$), zwischen BM-DC und db-cAMP-DC in jeweils unstimuliertem und stimuliertem Zustand (+ bzw. *) und zwischen db-cAMP behandelten BM-DC im unstimuliertem und stimuliertem Zustand (#) sind angegeben.

Das T-Zellstimulierungspotenzial der unstimulierten, in Gegenwart von db-cAMP differenzierten BM-DC ist nur bei dem niedrigsten BM-DC/T-Zell-Verhältnis signifikant vermindert im Vergleich zu unstimulierten BM-DC und zu LPS-stimulierten db-cAMP-DC.

3.1.3 Analyse der Expression DC-relevanter Gene in BM-DC und db-cAMP-DC

Zur Überprüfung des differentiellen Genexpressionsprofils der unterschiedlich behandelten BM-DC-Populationen wurde eine Reihe von Genen ausgewählt und deren Expressionsniveau mittels quantitativer Realtime-PCR (2.2.2.4) untersucht. Mittels Realtime-PCR wurde die mRNA-Expression von Toll Like Rezeptoren (TLR), kostimulatorischen und koinhibitorischen Oberflächenmolekülen, pro- und antiinflammatorischen Zytokinen und Toleranzmarkern in den unterschiedlich behandelten BM-DC untersucht. Hierdurch sollte überprüft werden, inwieweit sich die Expression der Gene durch eine DC-Differenzierung in Anwesenheit von db-cAMP bzw. durch LPS-Stimulierung verändert.

Die mRNA-Expression unstimulierter BM-DC ist in allen folgenden Abbildungen von Ergebnissen der quantitativen PCR gleich 1 gesetzt.

3.1.3.1 Analyse der Expression von Toll Like Rezeptoren

Um zu überprüfen, ob die db-cAMP behandelten BM-DC potentiell über Toll Like Rezeptoren stimulierbar sind, wurde die mRNA Expression von TLR2, TLR3, TLR4, TLR7 und TLR9 gemessen und die Ergebnisse in Abbildung 4 dargestellt.

Der TLR2 wird nur von LPS ausgereiften BM-DC im Vergleich zu unstimulierten vermindert exprimiert. Im Vergleich zu unstimulierten BM-DC wird er in unstimulierten db-cAMP-DC signifikant verstärkt exprimiert. Ebenso ist die mRNA Expression in stimulierten db-cAMP-DC signifikant gesteigert verglichen mit stimulierten BM-DC.

Auf das Expressionsniveau von TLR3, TLR4 und TLR7 hat eine Ausreifung der BM-DC keinen statistisch signifikanten Einfluss. Bei db-cAMP-DC ist eine gesteigerte mRNA Expression dieser TLR verglichen mit Kontroll-BM-DC im jeweils unstimulierten und stimulierten Zustand zu sehen. Diese Unterschiede sind in unstimulierten db-cAMP-DC für alle TLR signifikant, während sie in den stimulierten db-cAMP-DC für TLR3 und TLR7, nicht für TLR4, signifikant sind. Das mRNA-Expressionsniveau des TLR3 ist in stimulierten db-cAMP-DC signifikant gesteigert verglichen mit unstimulierten db-cAMP-DC.

Die mRNA Expression von TLR9 ist im Gegensatz zu den anderen TLR im Vergleich zu unstimulierten BM-DC in unstimulierten und stimulierten db-cAMP-DC und in LPS stimulierten unbehandelten BM-DC vermindert. Dieser Unterschied ist für unstimulierte db-cAMP-DC statistisch signifikant.

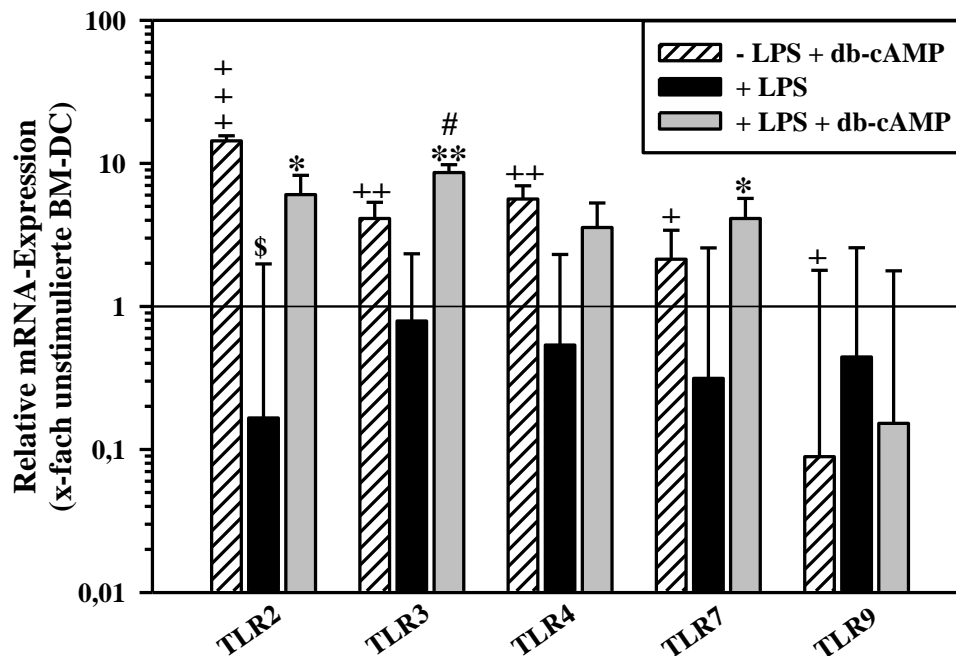


Abb. 4: Ergebnisse der quantitativen PCR für Toll Like Rezeptoren (TLR's). Die jeweilige mRNA-Expression wurde in unstimulierten und LPS stimulierten BM-DC, sowie in unstimulierten und LPS-stimulierten db-cAMP-DC untersucht. Dargestellt sind der Mittelwert \pm Standardfehler von drei bis sechs unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, wobei die mRNA-Expression unstimulierter BM-DC gleich 1 gesetzt wurde. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten BM-DC (\$), zwischen BM-DC und db-cAMP-DC in jeweils unstimuliertem und stimuliertem Zustand (+ bzw. *) und zwischen db-cAMP behandelten BM-DC im unstimuliertem und stimuliertem Zustand (#) sind angegeben.

3.1.3.2 Analyse der Expression kostimulatorischer Oberflächenmoleküle sowie von Fascin und ICAM-1

Abbildung 5 zeigt die mRNA-Expression der kostimulatorischen Oberflächenmoleküle CD40, CD80, CD86, OX40L und 4-1BBL sowie von Fascin und ICAM-1. Die mRNA-Expression des kostimulatorischen Moleküls CD40 ist, verglichen mit unstimulierten BM-DC, bei unstimulierten db-cAMP-DC, signifikant herunterreguliert. Eine Maturierung der unbehandelten BM-DC mit LPS führt zu einer signifikanten Aufregulierung der CD40 mRNA-Expression auf etwa das 10-fache im Vergleich zu unstimulierten BM-DC. LPS stimulierte, in Anwesenheit von db-cAMP kultivierte BM-DC, haben eine signifikant

verminderte CD40 mRNA Expression verglichen mit ihrer unbehandelten LPS stimulierten Kontrolle.

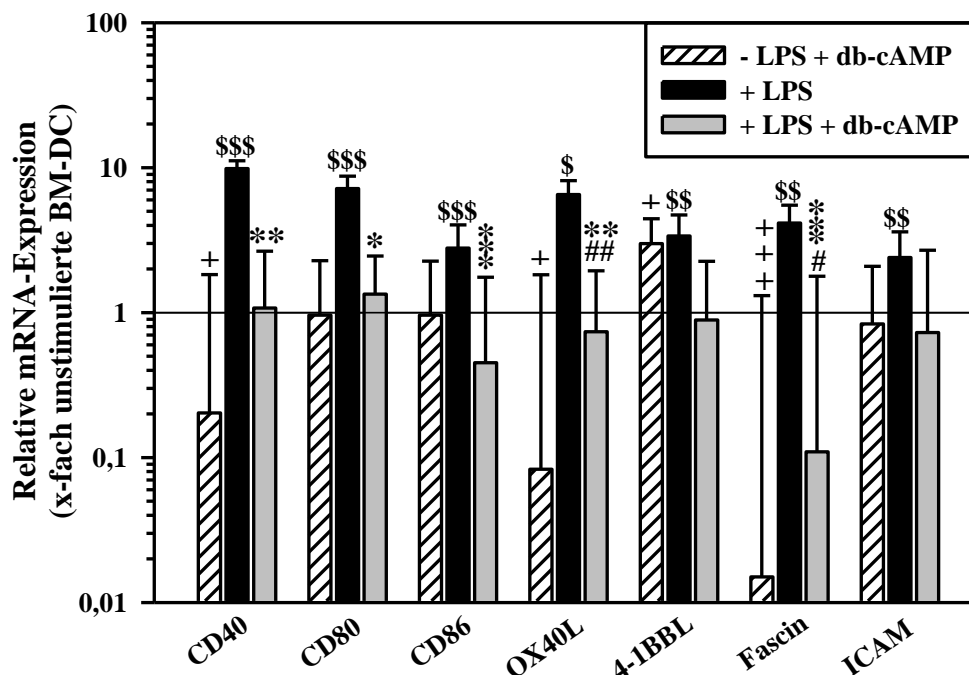


Abb. 5: Ergebnisse der quantitativen PCR für kostimulatorische Oberflächenmoleküle sowie für Fascin und ICAM-1. Die jeweilige mRNA-Expression wurde in unstimulierten und LPS stimulierten BM-DC, sowie in unstimulierten und LPS stimulierten db-cAMP-DC untersucht. Dargestellt sind der Mittelwert \pm Standardfehler von drei bis neun unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, wobei die mRNA-Expression in unstimulierten BM-DC gleich 1 gesetzt wurde. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten BM-DC (\$), zwischen BM-DC und db-cAMP-DC in jeweils unstimuliertem und stimuliertem Zustand (+ bzw. *) und zwischen db-cAMP behandelten BM-DC im unstimuliertem und stimuliertem Zustand (#) sind angegeben.

Unstimulierte db-cAMP-DC weisen auf mRNA-Ebene eine Expression des kostimulatorischen Moleküls CD80 auf dem Niveau der unstimulierten BM-DC auf. Demgegenüber zeigen LPS stimulierte BM-DC eine signifikant gesteigerte mRNA Expression von CD80, die im Vergleich hierzu bei stimulierten db-cAMP-DC signifikant vermindert ist.

Die mRNA-Expression von CD86 ist bei unstimulierten BM-DC durch die Kultivierung mit db-cAMP nicht verändert. Stimulierte BM-DC weisen gegenüber unstimulierten BM-DC eine signifikant gesteigerte Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 auf. LPS ausgereifte db-cAMP-DC zeigen hingegen keine Aufregulation der CD86-Expression.

Fascin und das kostimulatorische Molekül OX40-Ligand (OX40L) werden im Vergleich zu den unstimulierten BM-DC in stimulierten BM-DC signifikant stärker exprimiert. Stimulierte

und unstimulierte db-cAMP-DC weisen verglichen mit unstimulierten und stimulierten BM-DC jeweils eine signifikant verminderte OX40L- und Fascin-mRNA-Expression auf.

Bei 4-1BBL handelt es sich um ein kostimulatorisches Molekül, das sowohl von unstimulierten db-cAMP behandelten, als auch von LPS stimulierten BM-DC in einem höheren Maße exprimiert wird als von unstimulierten BM-DC. Seine Expression in stimulierten db-cAMP-DC ist geringer als in stimulierten BM-DC und ähnlich wie OX40L auch auf dem Niveau unstimulierter BM-DC.

Eine db-cAMP Behandlung führt zu keiner nachweisbaren Veränderung der ICAM-1 mRNA Expression, wohingegen die Ausreifung unbehandelter Zellen mit LPS zu einer gesteigerten ICAM-1 mRNA Expression führt.

3.1.3.3 Analyse der Expression koinhibitorischer Oberflächenmoleküle

In Abbildung 6 ist die mRNA-Expression von Oberflächenmolekülen mit koinhibitorischem Potenzial B7-H1, B7-H2, B7-H3, B7-DC, SLAM und LIGHT dargestellt.

Das koinhibitorische Molekül B7-H1 (PD-L1) wird, im Vergleich zu unstimulierten BM-DC, in stimulierten BM-DC signifikant vermehrt exprimiert, während das koinhibitorische Molekül LIGHT durch eine LPS-Stimulation der BM-DC nicht reguliert exprimiert wird. In db-cAMP-DC sind die B7-H1 und die LIGHT Expression signifikant höher als in BM-DC, sowohl bei unstimulierten als auch bei LPS-stimulierten Zellen.

Die mRNA-Expression von B7-H2 ist in unstimulierten db-cAMP-DC vermindert, verglichen mit den unstimulierten BM-DC, während sowohl stimulierte BM-DC als auch stimulierte db-cAMP-DC keine veränderte Expression dieses Moleküls aufweisen.

B7-H3 ist ein koinhibitorischer Rezeptor, dessen mRNA-Expression in keiner der untersuchten Gruppen signifikant reguliert ist.

Die mRNA Expression von B7-DC bleibt durch eine Ausreifung mit LPS unverändert, verglichen mit unstimulierten BM-DC, während eine Ausreifung der BM-DC mit LPS eine signifikant aufregulierte (7,5-fach) SLAM Expression zu Folge hat. Db-cAMP-DC weisen in beiden Reifungsstadien eine signifikant verminderte B7-DC und SLAM mRNA-Expression im Vergleich zu den unbehandelten BM-DC auf.

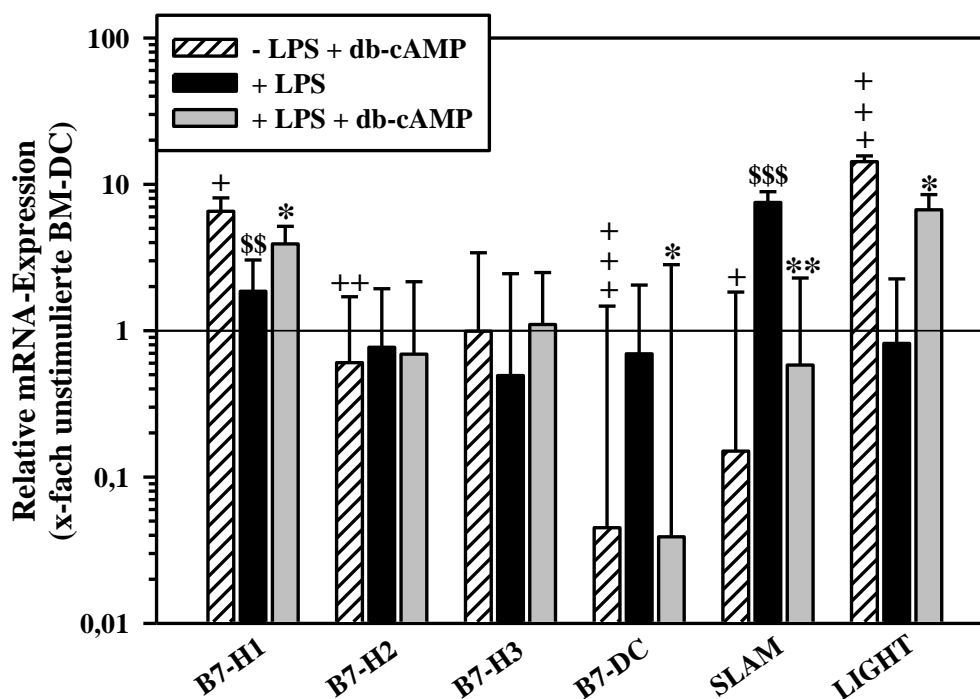


Abb. 6: Ergebnisse der quantitativen PCR für koinhibitorische Oberflächenmoleküle. Die jeweilige mRNA-Expression wurde in unstimulierten und LPS stimulierten BM-DC, sowie unstimulierten und LPS stimulierten db-cAMP-DC untersucht. Dargestellt sind der Mittelwert \pm Standardfehler von drei bis neun unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, wobei die mRNA-Expression in unstimulierten BM-DC gleich 1 gesetzt wurde. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten BM-DC (\$), zwischen BM-DC und db-cAMP-DC in jeweils unstimuliertem und stimuliertem Zustand (+ bzw. *) und zwischen db-cAMP behandelten BM-DC im unstimuliertem und stimuliertem Zustand (#) sind angegeben.

3.1.3.4 Analyse der Expression proinflammatorischer Zytokine

Die Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokin-mRNA (IL-1 β , IL-6, IL-12p35 und IL-12p40) in den unterschiedlichen BM-DC-Gruppen wurde ebenfalls mittels quantitativer Realtime-PCR untersucht und ist in Abb. 7 dargestellt.

Das Zytokin IL-1 β wird auf mRNA-Ebene von unstimulierten db-cAMP-DC und von LPS stimulierten BM-DC signifikant vermehrt exprimiert, verglichen mit unstimulierten BM-DC (21 bzw. 31-fach erhöht). Die stimulierten db-cAMP-DC weisen eine etwa auf das 630-fache gesteigerte mRNA Expression von IL-1 β auf. Diese ist signifikant höher als in unstimulierten db-cAMP-DC und als in stimulierten BM-DC.

Die IL-12p35-Untereinheit des proinflammatorischen Zytokins IL-12 ist in unstimulierten db-cAMP-DC im Vergleich zu unstimulierten BM-DC signifikant auf das 156-fache verstärkt exprimiert. Durch eine LPS-induzierte Ausreifung von BM-DC kommt es ebenfalls zu einer

signifikanten Expressionserhöhung (26-fach), verglichen mit der unstimulierten Kontrolle. Eine Differenzierung der BM-DC mit db-cAMP, gefolgt von einer Ausreifung mit LPS führt dazu, dass die IL-12p35 mRNA-Expression etwa auf das 916-fache gesteigert wird. Sie ist signifikant höher als die der stimulierten unbehandelten Kontrolle.

Die IL-12p40-Untereinheit von IL-12 (IL-12b) und das proinflammatorische Zytokin IL-6 unterscheiden sich in ihrer mRNA-Expression in unstimulierten db-cAMP-DC nicht signifikant von unstimulierten BM-DC. Durch eine Ausreifung mit LPS werden die IL-12p40 und die IL-6 mRNA-Expression in BM-DC signifikant erhöht (38- bzw. 11-fach). Ebenso führt eine Stimulierung der db-cAMP-DC zu einer signifikant vermehrten mRNA-Expression der untersuchten Zytokine im Vergleich zu unstimulierten db-cAMP-DC.

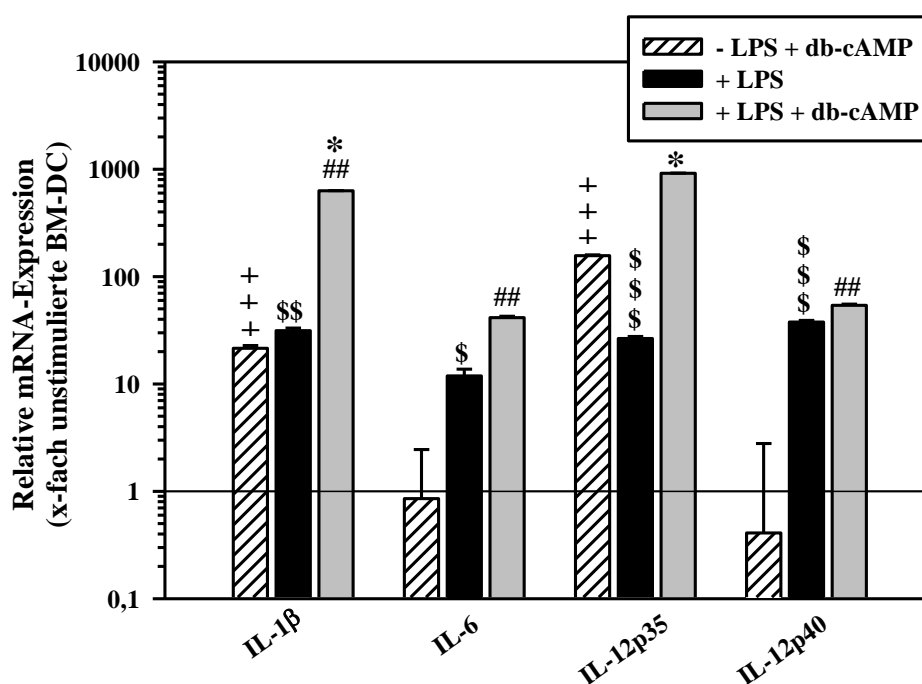


Abb. 7: Ergebnisse der quantitativen PCR für proinflammatorische Zytokine. Die jeweilige mRNA-Expression wurde in unstimulierten und LPS stimulierten BM-DC, sowie unstimulierten und LPS stimulierten db-cAMP-DC untersucht. Dargestellt sind der Mittelwert \pm Standardfehler von drei bis sechs unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, wobei die mRNA-Expression in unstimulierten BM-DC gleich 1 gesetzt wurde. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten BM-DC (\$), zwischen BM-DC und db-cAMP-DC in jeweils unstimuliertem und stimuliertem Zustand (+ bzw. *) und zwischen db-cAMP behandelten BM-DC im unstimuliertem und stimuliertem Zustand (#) sind angegeben.

3.1.3.5 Analyse der Expression antiinflammatorischer Zytokine

Die Expression der antiinflammatorischen Zytokin-mRNA IL-1RA, IL-1r2, IL-10 und TGF β 1 in den verschiedenen BM-DC-Populationen ist in Abb. 8 dargestellt.

In db-cAMP-DC ist sowohl bei unstimulierten als auch bei stimulierten Zellen eine vermehrte mRNA Expression des IL-1 Rezeptor Antagonisten (IL-1RA) und des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 zu beobachten, verglichen mit ihren jeweiligen unbehandelten Kontrollen. Eine LPS-Ausreifung von BM-DC führt zu keiner veränderten Expression des IL-1RA. Im Gegensatz dazu führt eine Ausreifung der BM-DC zu einer signifikanten Steigerung der IL-10 mRNA Expression auf das etwa 3-fache verglichen mit der unstimulierten Kontrolle.

IL-1r2 und TGF β 1 werden sowohl in unstimulierten und stimulierten db-cAMP-DC als auch in LPS stimulierten BM-DC vermindert exprimiert verglichen mit den unstimulierten BM-DC. Die Expressionsänderung von IL-1r2 ist nur für die stimulierten BM-DC statistisch signifikant und die von TGF β 1 für die stimulierten BM-DC und die stimulierten db-cAMP-DC.

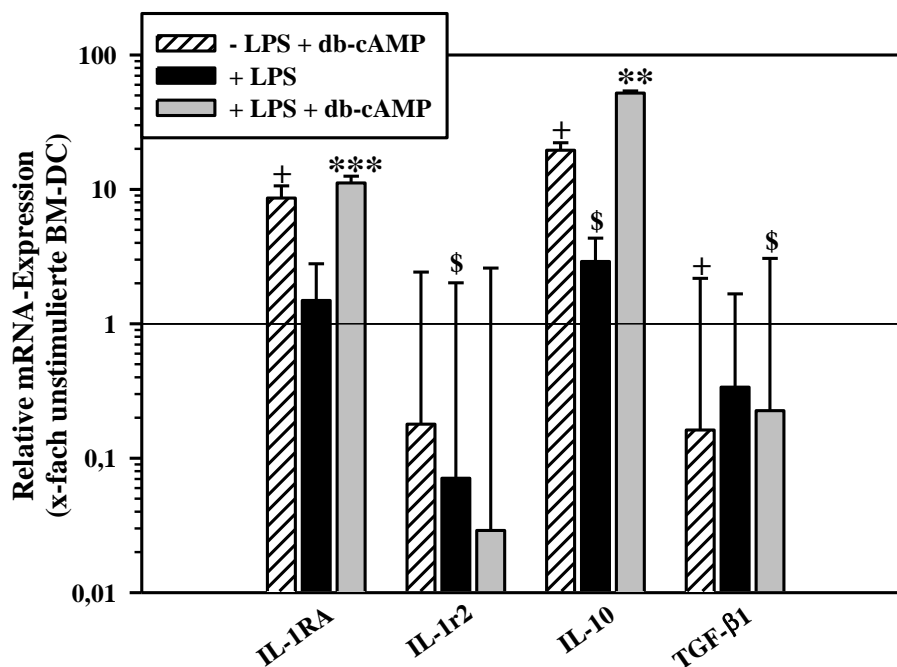


Abb. 8: Ergebnisse der quantitativen PCR für antiinflammatorische Zytokine. Die jeweilige mRNA-Expression wurde in unstimulierten und LPS stimulierten BM-DC, sowie in unstimulierten und LPS stimulierten db-cAMP-DC untersucht. Dargestellt sind der Mittelwert \pm Standardfehler von drei bis neun unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, wobei die mRNA-Expression in unstimulierten BM-DC gleich 1 gesetzt wurde. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten BM-DC (\$), zwischen BM-DC und db-cAMP-DC in jeweils unstimuliertem und stimuliertem Zustand (+ bzw. *) und zwischen db-cAMP behandelten BM-DC im unstimuliertem und stimuliertem Zustand (#) sind angegeben.

3.1.3.6 Analyse der Expression von toleranzassoziierten Molekülen

Die mRNA-Expression der Toleranzmarker FcγRIIB, Pirb, HO-1, IDO, Cox-2, STAT3 und Mkp-1 in den unterschiedlichen Versuchsgruppen ist in Abb. 9 dargestellt.

Bei dem Molekül HO-1 (Hämoxygenase 1) handelt es sich um ein Enzym, das Häm zu Biliverdin, Kohlenmonoxid und freiem Eisen abbaut. Die Expression des inhibitorischen Rezeptors FcγRIIB und von HO-1 ist in den beiden db-cAMP-DC-Gruppen, im Vergleich zu unstimulierten bzw. stimulierten BM-DC, signifikant erhöht. Eine LPS-induzierte Ausreifung hat keinen Effekt auf die FcγRIIB- und die HO-1-mRNA-Expression in BM-DC.

Stimulierte BM-DC haben des Weiteren keine aufregulierte mRNA-Expression von Pirb verglichen mit der unstimulierten Kontrollgruppe. In unstimulierten db-cAMP-DC ist die mRNA-Expression dieses Moleküls signifikant vermindert im Vergleich zu unstimulierten BM-DC. Bei LPS stimulierten db-cAMP-DC liegt die Pirb-mRNA-Expression ähnlich niedrig.

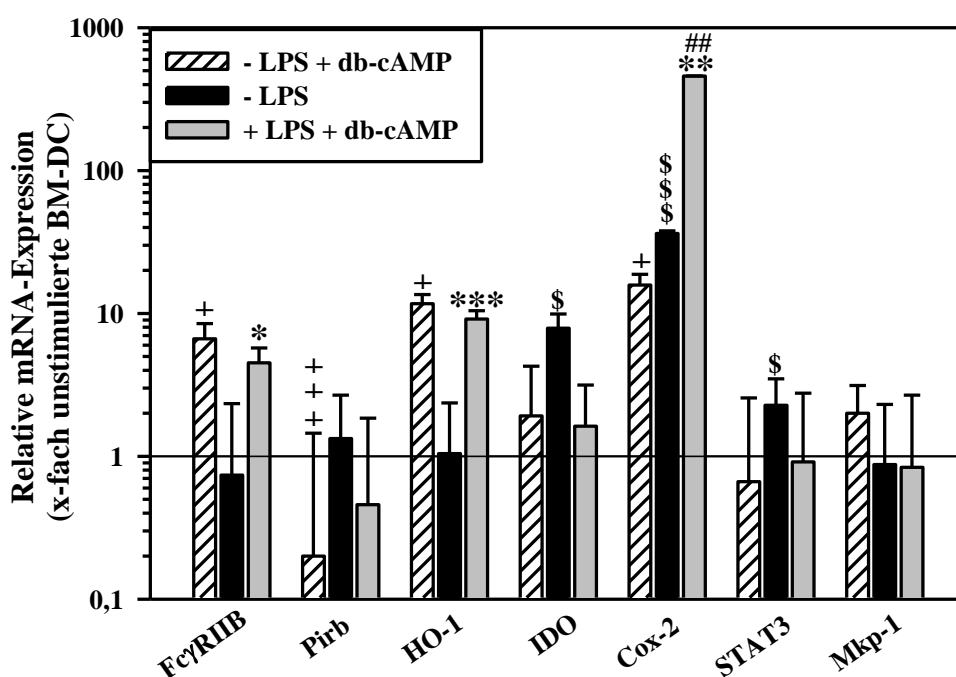


Abb. 9: Ergebnisse der quantitativen PCR für Moleküle, die mit Toleranz assoziiert sind. Die jeweilige mRNA-Expression wurde in unstimulierten und LPS stimulierten BM-DC, sowie unstimulierten und LPS stimulierten db-cAMP-DC untersucht. Dargestellt sind der Mittelwert \pm Standardfehler von drei bis neun unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, wobei die mRNA-Expression in unstimulierten BM-DC gleich 1 gesetzt wurde. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten BM-DC (\$), zwischen BM-DC und db-cAMP-DC in jeweils unstimuliertem und stimuliertem Zustand (+ bzw. *) und zwischen db-cAMP behandelten BM-DC im unstimuliertem und stimuliertem Zustand (#) sind angegeben.

Bei IDO (Indoleamin-2,3-dioxygenase) handelt es sich um ein Tryptophan abbauendes Enzym, das, wie der Transkriptionsfaktor STAT3 auch, in stimulierten BM-DC signifikant vermehrt exprimiert wird, verglichen mit unstimulierten Zellen. Db-cAMP-DC weisen gegenüber BM-DC keine signifikant veränderte Expression von IDO und STAT3 auf mRNA-Ebene auf.

Die mRNA-Expression des Enzyms Cyclooxygenase 2 (Cox-2) ist in unstimulierten db-cAMP-DC, stimulierten BM-DC und stimulierten db-cAMP-DC höher als in unstimulierten BM-DC. Unstimulierte db-cAMP-DC und stimulierte BM-DC weisen ein Expressionsniveau von Cox-2 mRNA auf, welches in beiden Fällen signifikant gesteigert ist verglichen mit den unstimulierten BM-DC (etwa 15,8- bzw. 36-fach). Die Cox-2 Expression von stimulierten db-cAMP-DC ist etwa 560-fach gesteigert verglichen mit der unstimulierten BM-DC-Kontrolle und auch signifikant gesteigert im Vergleich zu stimulierten BM-DC und unstimulierten db-cAMP-DC.

Für Mkp1 ist lediglich bei unstimulierten db-cAMP-DC gegenüber BM-DC eine leichte Steigerung der mRNA Expression zu beobachten, die aber nicht statistisch signifikant ist. Die anderen untersuchten Gruppen zeigen ein ähnliches Mkp1-Expressionsniveau.

3.1.3.7 Analyse der Expression von CREB, CREM und ICER

In Abbildung 10 ist die mRNA-Expression von Transkriptionsfaktoren der CREB-Familie, CREB (siehe Abbildung 1), CREM und ICER, dargestellt. Bei CREM handelt es sich um ein Gen mit 4 Genpromotoren (P1 - P4), die alle CRE (cAMP-responsive elements) aufweisen. Durch alternatives Spleißen werden die verschiedenen Isoformen generiert. Eine P2-abhängige CREM-Isoform ist ICER. CREM-Isoformen wirken aktivierend oder auch inhibierend, ICER stets inhibierend auf die Expression ihrer Zielgene.

Wie in der Abbildung zu sehen ist, wird CREB in BM-DC und db-cAMP-DC nach Stimulierung auf ähnlichem Niveau wie in unstimulierten BM-DC exprimiert. Unstimulierte db-cAMP-DC haben eine signifikant geringere mRNA-Expression von CREB als unstimulierte BM-DC.

Die mRNA-Expression von CREM ist in unstimulierten und stimulierten BM-DC auf einem vergleichbaren Niveau. Unstimulierte db-cAMP-DC haben eine ca. 3,5-fach gesteigerte und stimulierte db-cAMP-DC eine ca. 7-fach gesteigerte mRNA-Expression von CREM als unstimulierte BM-DC. Verglichen mit den stimulierten BM-DC ist diese Steigerung für die stimulierten db-cAMP-DC signifikant.

ICER wird von allen BM-DC-Populationen auf einem vergleichbaren Niveau exprimiert.

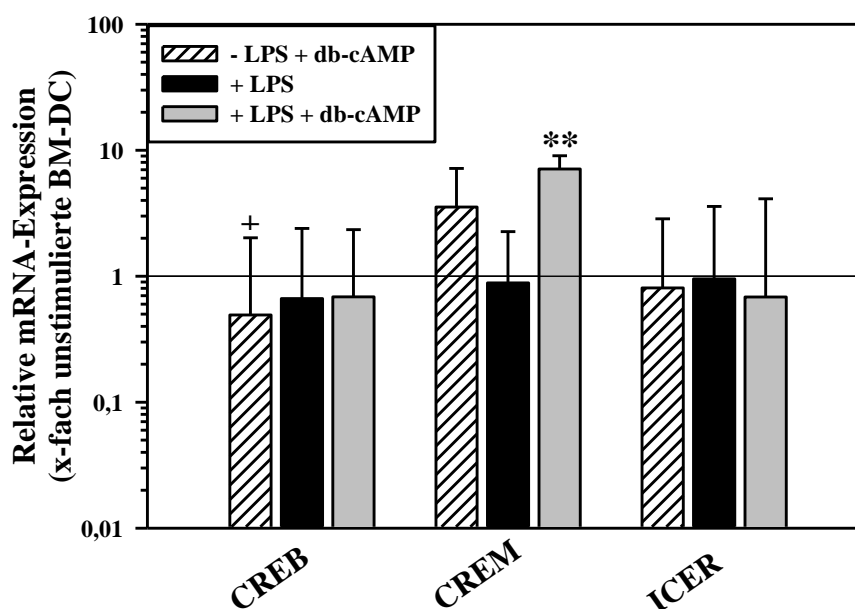


Abb. 10: Ergebnisse der quantitativen PCR für CREB, CREM und ICER. Die jeweilige mRNA-Expression wurde in unstimulierten und LPS stimulierten BM-DC, sowie in unstimulierten und LPS stimulierten db-cAMP-DC untersucht. Dargestellt sind der Mittelwert \pm Standardfehler von drei bis sechs unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, wobei die mRNA-Expression in unstimulierten BM-DC gleich 1 gesetzt wurde. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten BM-DC (\$), zwischen BM-DC und db-cAMP-DC in jeweils unstimuliertem und stimuliertem Zustand (+ bzw. *) und zwischen db-cAMP behandelten BM-DC im unstimuliertem und stimuliertem Zustand (#) sind angegeben.

3.1.4 Phänotypische Analyse von unbehandelten und in Gegenwart von db-cAMP kultivierten BM-DC mittels FACS-Analyse

Zur Validierung der Ergebnisse der quantitativen PCR und zur weiteren phänotypischen Charakterisierung der unterschiedlich differenzierten BM-DC wurde die Oberflächenexpression ausgewählter Moleküle auf Proteinebene mittels FACS-Analyse untersucht. Im Folgenden sind die Histogramme der untersuchten Moleküle (Abb. 11 – Abb.13) sowie eine tabellarische Aufstellung (Tabelle 1) und eine graphische Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) (Abb. 14) dargestellt.

Bei allen FACS-Analysen wurden nur lebende Zellen untersucht. Dies geschah durch Ausgrenzung kleiner granulärer Zellen.

In Abbildung 11 ist die Oberflächenexpression der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 sowie von MHCII dargestellt. Wie in Abb. 11A zu sehen ist, exprimieren unstimulierte BM-DC CD40 und CD80 auf der Oberfläche. Bei unstimulierten db-cAMP-DC

(Abb. 11B) ist die Oberflächenexpression dieser beiden Moleküle vermindert, verglichen mit unstimulierten BM-DC. LPS-bedingt kommt es zu einer gesteigerten Oberflächenexpression von CD40 und CD80 auf BM-DC (Abb. 11C). Diese Steigerung ist im Vergleich zu unstimulierten BM-DC für CD80 signifikant (Abb. 14). Bei db-cAMP-DC (Abb. 11D) kommt es nicht zu einer LPS-vermittelt gesteigerten Expression dieser beiden Moleküle.

Für die Oberflächenexpression von CD86 ist zu erkennen, dass die unstimulierten BM-DC (Abb. 11A) eine Mischpopulation bilden, da es Zellen gibt, die wenig bzw. kein CD86 auf der Oberfläche exprimieren und solche, bei denen eine Oberflächenexpression von CD86 nachweisbar ist. Nach Stimulierung mit LPS exprimieren, bis auf einen kleinen Anteil, alle Zellen in hohem Maße CD86 auf der Oberfläche (Abb. 11C). Die CD86-Oberflächenexpression von stimulierten BM-DC ist signifikant stärker als von unstimulierten (Abb. 14). Eine Behandlung mit db-cAMP führt sowohl bei der unstimuliert belassenen als auch bei der LPS ausgereiften Gruppe zu einer signifikant verminderten Oberflächenexpression von CD86 (Abb. 14). Es sind bei unstimulierten db-cAMP-DC (Abb. 11B) kaum und bei stimulierten db-cAMP-DC (Abb. 11D) keine CD86 positiven Zellen nachweisbar.

Das für die Antigenpräsentation benötigte MHCII ist auf unstimulierten und stimulierten BM-DC jeweils unterschiedlich stark exprimiert (Abb. 11A, C). Es gibt Zellen, die viele und solche, die keine bzw. kaum MHCII-Moleküle auf der Oberfläche tragen. Die MFI der MHCII-Expression ist bei db-cAMP-DC signifikant vermindert verglichen mit den jeweiligen BM-DC-Populationen (Abb. 14). Es gibt lediglich wenige db-cAMP-DC, die dieses Molekül auf der Oberfläche tragen (Abb. 11B, D).

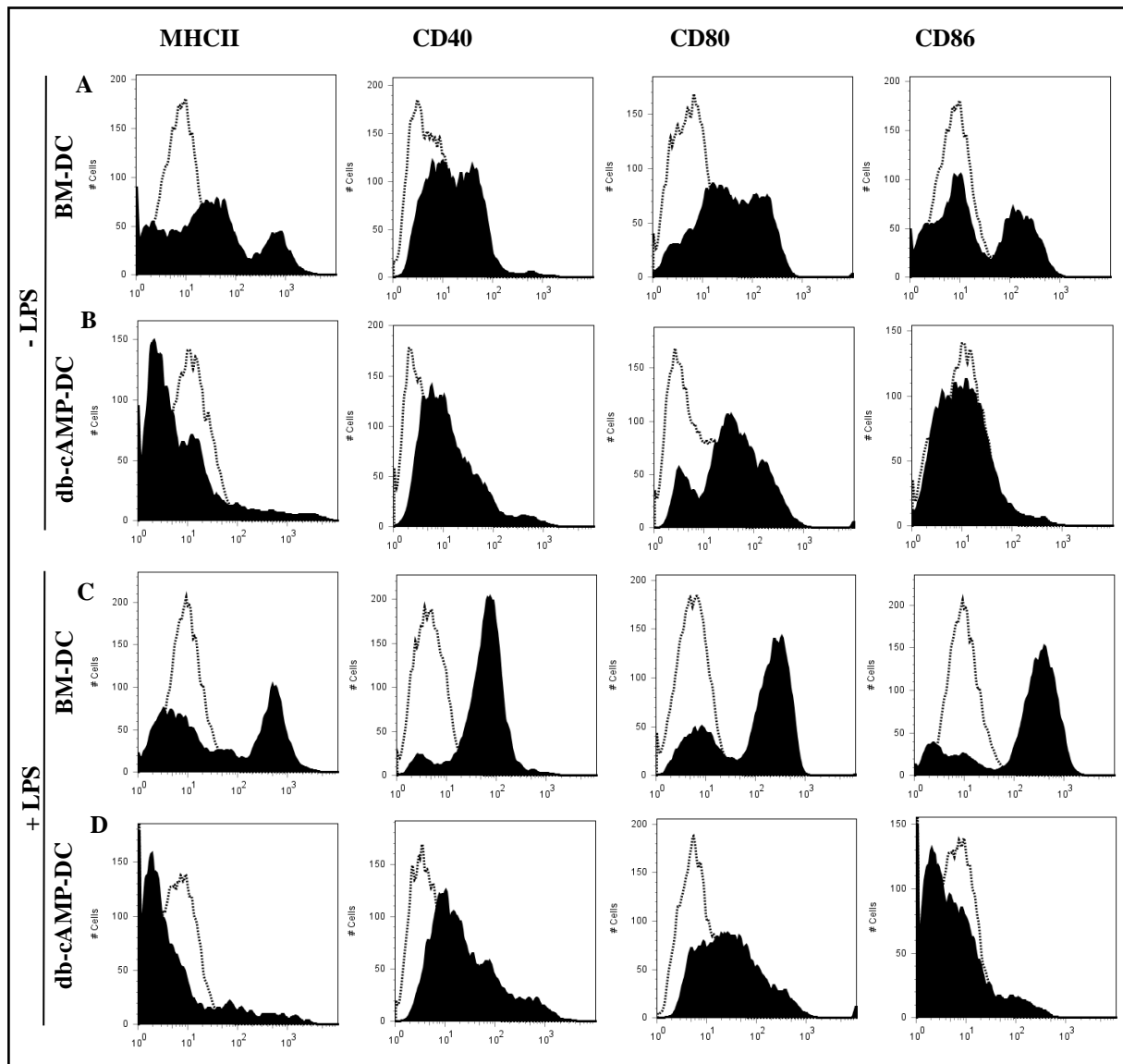


Abb. 11: Oberflächenexpression von MHCII und kostimulatorischer Moleküle auf BM-DC und db-cAMP-DC. Aliquote der BM-DC-Vorläufer wurden ab Tag 3 der Kultur mit db-cAMP [0,25 mM] behandelt. Zur Ausreifung wurde dem Medium an Tag 9 LPS [1 $\mu\text{g/ml}$] zugegeben. Die unterschiedlich differenzierten BM-DC wurden an Tag 10 auf die Oberflächenexpression der Moleküle MHCII, CD40, CD80, und CD86 hin untersucht. Gestrichelt dargestellt ist die jeweilige Isotypkontrolle. **(A):** Expression der Oberflächenmoleküle auf unstimulierten BM-DC, **(B):** auf unstimulierten db-cAMP-DC, **(C):** auf stimulierten BM-DC und auf **(D):** stimulierten db-cAMP-DC. Die FACS-Analyse erfolgte nach Markierung der Oberflächenmoleküle mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern. Die Histogramme sind repräsentativ für 3 – 5 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

In Abbildung 12 ist die Oberflächenexpression der Moleküle CD11c, CD11b, CD83 sowie die intrazelluläre Fascin-Expression dargestellt. Der myeloide DC-Marker CD11c wird von unstimulierten (Abb. 12A) und LPS-stimulierten BM-DC (Abb. 12C) in gleichen Maße auf der Oberfläche exprimiert. Bei den db-cAMP-DC ist in beiden Aktivierungszuständen eine deutlich schwächere Oberflächenexpression von CD11c zu beobachten (Abb. 12B, D), die geringer ist als bei BM-DC. Für unstimulierte db-cAMP-DC ist die MFI verglichen mit den unstimulierten unbehandelten Zellen signifikant vermindert (Abb. 14).

CD11b ist in den untersuchten Gruppen auf einem ähnlichen Niveau zu finden (Abb. 12 und 14). Lediglich LPS-stimulierte db-cAMP-DC haben eine etwas schwächere CD11b Oberflächenexpression.

Die Analyse der Oberflächenexpression des Reifungsmarkers CD83 zeigt, dass die unstimulierten BM-DC (Abb. 12A) eine Mischpopulation bilden. Es gibt Zellen, die wenig bzw. kein CD83 exprimieren und solche, die CD83 auf der Oberfläche exprimieren. Eine Stimulierung der BM-DC mit LPS führt dazu, dass fast alle Zellen in hohem Maße CD83 auf der Oberfläche exprimieren (Abb. 12C). Im Vergleich zu BM-DC weisen db-cAMP-DC sowohl im unstimulierten, als auch im stimulierten Zustand eine signifikant verminderte Oberflächenexpression von CD83 auf (Abb. 14). Bei unstimulierten db-cAMP-DC (Abb. 12B) sind kaum und bei stimulierten db-cAMP-DC (Abb. 12D) keine CD83-positiven Zellen nachweisbar.

Das Aktinbündelungsprotein Fascin wurde mittels intrazellulärer FACS-Analyse nachgewiesen. Bei unstimulierten und stimulierten BM-DC ist ein Teil der untersuchten Zellen positiv für Fascin (Abb. 12A, C). Für unstimulierte db-cAMP-DC ist kein Fascin-Protein nachweisbar (Abb. 12B). Die meisten stimulierten db-cAMP-DC exprimieren ebenfalls kein Fascin. Nur in einer sehr kleinen Population ist intrazelluläres Fascin nachweisbar. Diese Zellen exprimieren Fascin auf einem hohen Niveau (Abb. 12D). Die MFI ist aber insgesamt verglichen mit stimulierten BM-DC signifikant vermindert (Abb. 14).

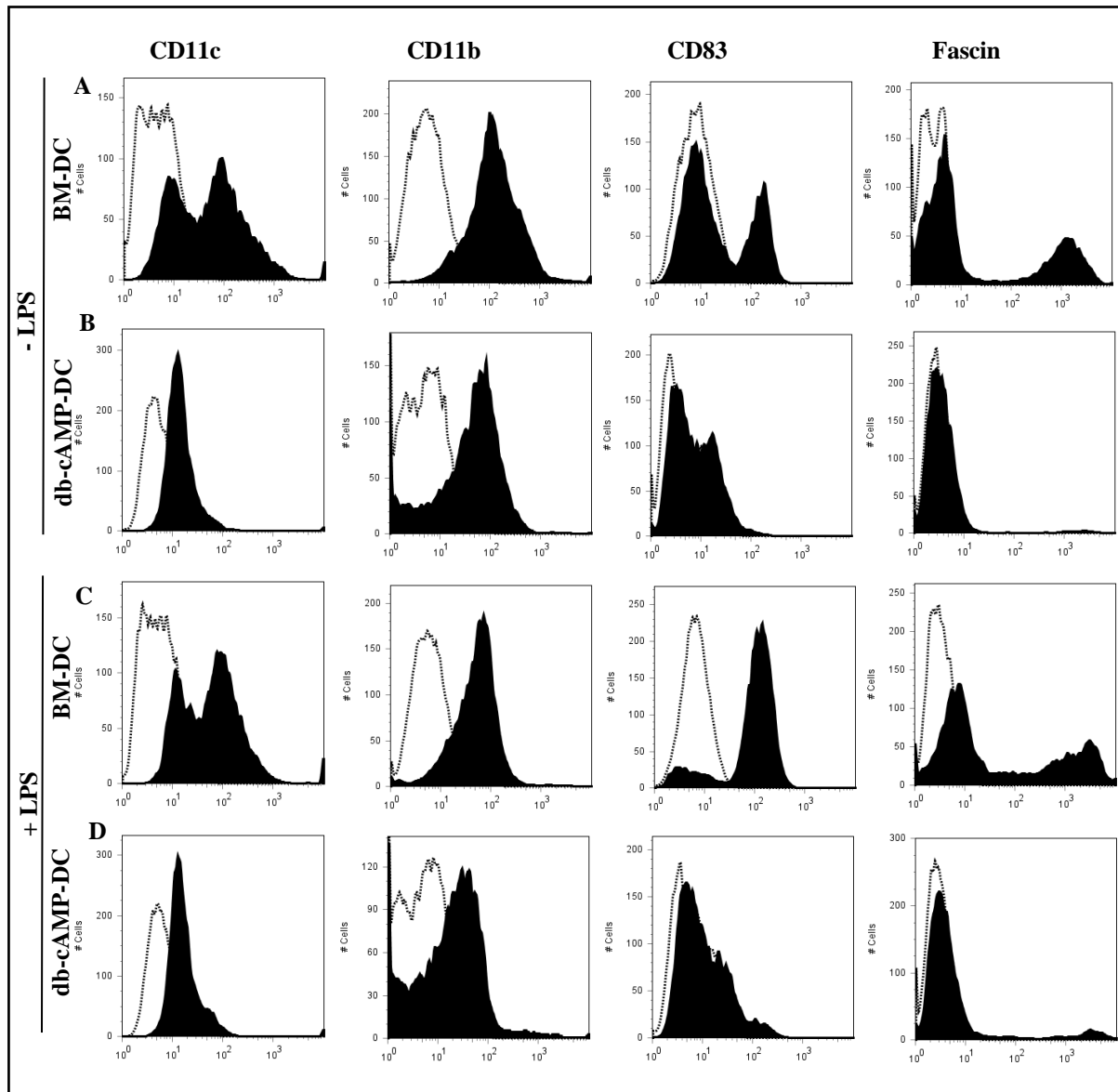


Abb. 12: Expression DC-relevanter Oberflächenmoleküle und von Fascin bei BM-DC und db-cAMP-DC. Aliquote der BM-DC-Vorläufer wurden ab Tag 3 der Kultur mit db-cAMP [0,25 mM] behandelt. Zur Ausreifung wurde dem Medium an Tag 9 LPS [1 µg/ml] zugegeben. Die unterschiedlich differenzierten BM-DC wurden an Tag 10 auf die Oberflächenexpression der Moleküle CD11c, CD11b, CD83 und intrazellulär auf die Expression des Moleküls Fascin hin untersucht. Gestrichelt dargestellt ist die jeweilige Isotypkontrolle. . (A): Expression der untersuchten Moleküle auf unstimulierten BM-DC, (B): auf unstimulierten db-cAMP-DC, (C): auf stimulierten BM-DC und auf (D): stimulierten db-cAMP-DC. Die FACS-Analyse erfolgte nach Markierung der untersuchten Moleküle mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern. Die Histogramme sind repräsentativ für 3 – 5 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Um sicher zu gehen, dass es sich bei den in Anwesenheit von db-cAMP differenzierten APC um DC und nicht um andere Zellen wie z.B. myeloide Suppressorzellen handelt, wurde außerdem die Oberflächenexpression von CD14, F4/80 und Gr-1 mittels FACS-Analyse untersucht und in Abbildung 13 dargestellt. Die untersuchten Moleküle sind bei den verschiedenen BM-DC Gruppen wenn überhaupt nur in sehr geringem Maße auf der Oberfläche nachweisbar.

Bei den beiden BM-DC-Populationen (Abb. 13A, C) ist keine Oberflächenexpression von CD14 zu beobachten. Die beiden db-cAMP-DC-Gruppen weisen eine nur sehr schwache Oberflächenexpression von CD14 auf, wobei die meisten Zellen CD14 negativ sind (Abb. 13B, D).

F4/80 wird von unstimulierten und stimulierten BM-DC sowie von stimulierten db-cAMP-DC schwach auf der Zelloberfläche exprimiert (Abb. 13A, C, D). Bei unstimulierten db-cAMP-DC ist diese leichte Expression nicht zu beobachten (Abb. 13B).

Unstimulierte und stimulierte BM-DC (Abb. 13A, C) sowie stimulierte db-cAMP-DC (Abb. 13D) sind negativ für Gr-1. Bei unstimulierten db-cAMP-DC (Abb. 13B) befindet sich die Expression auf einem sehr moderaten Niveau.

Auf Ebene der hier ausgewählten Moleküle weisen die db-cAMP-DC einige geringe Übereinstimmungen mit myeloiden Suppressorzellen auf. Sie zeigen aber auch essenzielle Übereinstimmungen mit DC. Es handelt sich bei den db-cAMP-DC somit um DC mit einer geringen Expression von DC-spezifischen Markern wie CD11c, von kostimulatorischen Oberflächenmolekülen und von MHCII.

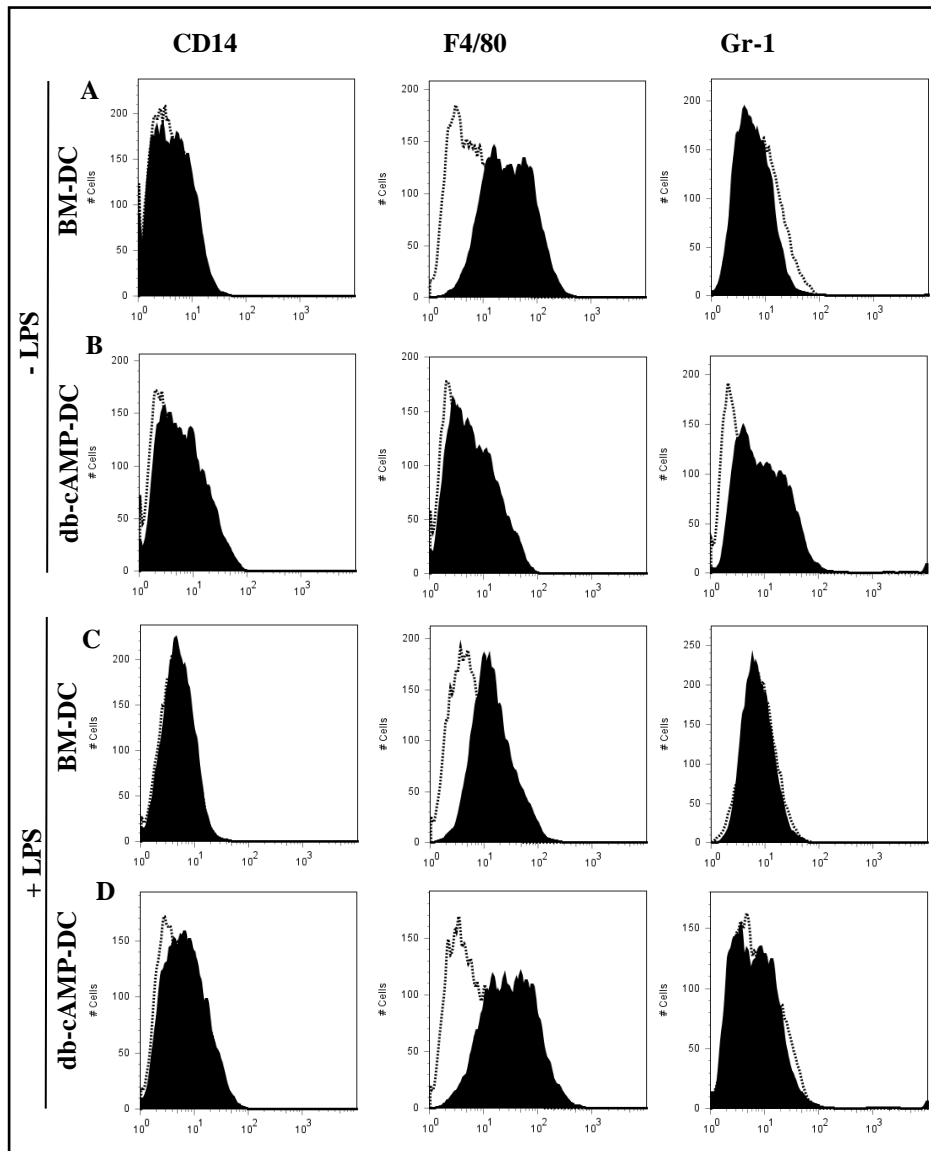


Abb. 13: Oberflächenexpression von CD14, F4/80 und Gr-1 bei BM-DC und db-cAMP-DC. Aliquote der BM-DC-Vorläufer wurden ab Tag 3 der Kultur mit db-cAMP [0,25 mM] behandelt. Zur Ausreifung wurde dem Medium an Tag 9 LPS [1 µg/ml] zugegeben. Die unterschiedlich differenzierten BM-DC wurden an Tag 10 auf die Oberflächenexpression der genannten Moleküle hin untersucht. Gestrichelt dargestellt ist die jeweilige Isotypkontrolle. (A): Expression der Oberflächenmoleküle auf unstimulierten BM-DC, (B): auf unstimulierten db-cAMP-DC, (C): auf stimulierten BM-DC und auf (D): stimulierten db-cAMP-DC. Die FACS-Analyse erfolgte nach Markierung der Oberflächenmoleküle mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern. Die Histogramme sind repräsentativ für 3 – 5 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Tabelle 1: Vergleich der mittleren Fluoreszenzaktivitäten (MFI) der untersuchten Moleküle (aus Abb. 11 – Abb. 13) von unterschiedlich behandelten BM-DC aus 3 – 5 Experimenten. Dargestellt ist der Mittelwert der MFI \pm Standardfehler.

| Molekül | - LPS | | - LPS + db-cAMP | | + LPS | | +LPS + db-cAMP | |
|---------------|--------|--------|-----------------|-------|--------|--------|----------------|-------|
| | MW | Stbw. | MW | Stbw. | MW | Stbw. | MW | Stbw. |
| CD11c | 107,69 | 65,53 | 42,39 | 25,50 | 74,94 | 62,31 | 66,54 | 46,96 |
| CD11b | 186,3 | 44,79 | 104,15 | 11,56 | 133,66 | 35,53 | 92,32 | 6,35 |
| Gr-1 | 26,39 | 7,75 | 36,92 | 17,84 | 19,22 | 3,22 | 30,56 | 7,38 |
| CD14 | 12,23 | 16,48 | 0,61 | 1,74 | 7,5 | 10,16 | 32,56 | 43,99 |
| F4/80 | 33,61 | 7,06 | 35,63 | 16,33 | 11,16 | 3,86 | 31,83 | 10,72 |
| MHCII | 365,91 | 208,77 | 84,11 | 63,99 | 549,61 | 300,92 | 93,08 | 70,82 |
| CD40 | 14,28 | 16,33 | 15,46 | 21,80 | 39,98 | 54,77 | 31,1 | 47,98 |
| CD80 | 102,43 | 41,07 | 139,12 | 50,58 | 199,15 | 107,26 | 162,19 | 74,21 |
| CD83 | 43,35 | 22,51 | 2,49 | 3,79 | 92,12 | 25,96 | 9,17 | 8,30 |
| CD86 | 80,11 | 49,59 | 30,98 | 24,58 | 300,51 | 170,34 | 49,33 | 40,84 |
| Fascin | 488,73 | 266,27 | 90,33 | 42,84 | 799,14 | 196,57 | 161,55 | 82,27 |

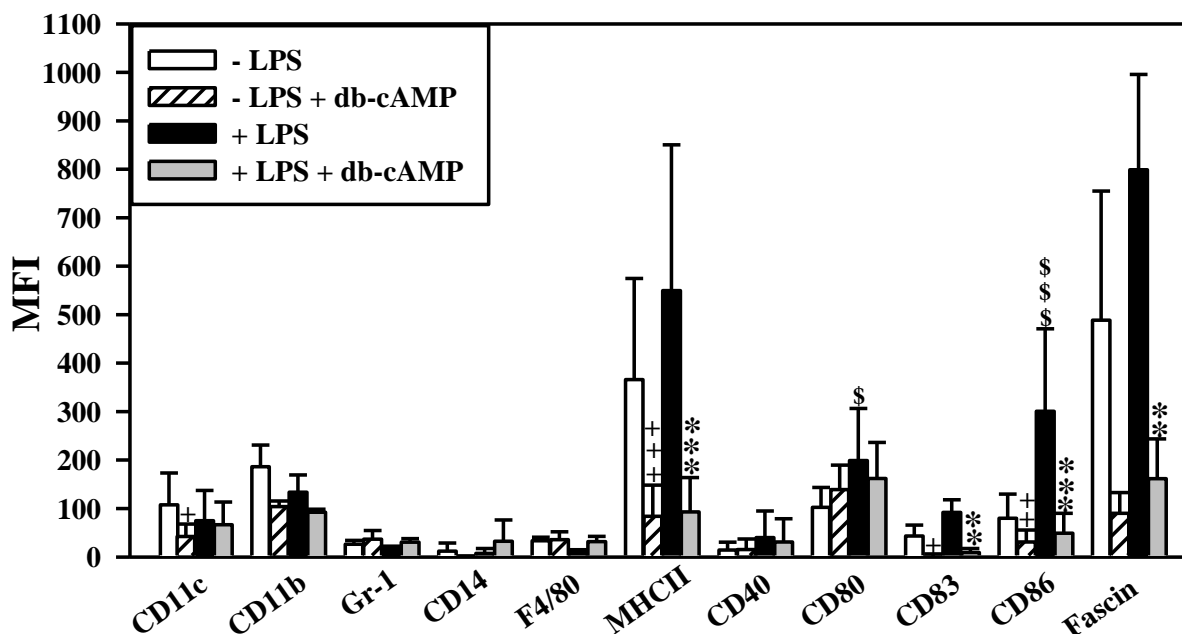


Abb. 14: Graphische Darstellung der zusammengefassten FACS-Ergebnisse aus Tabelle 1. Für die untersuchten Moleküle bei unstimulierten und stimulierten BM-DC und unstimulierten und stimulierten db-cAMP-DC ist der Mittelwert der MFI \pm Standardfehler der 3 - 5 durchgeführten Experimente dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten BM-DC (\$), zwischen stimulierten bzw. unstimulierten BM-DC und stimulierten bzw. unstimulierten db-cAMP-DC (* bzw. +) und zwischen stimulierten und unstimulierten db-cAMP-DC (#) sind angegeben.

3.1.5 Zytokinprofil von BM-DC und db-cAMP-DC

Um zu untersuchen, ob eine Differenzierung von BM-DC in Anwesenheit von db-cAMP zu einer veränderten Produktion von Zytokinen führt, wurde die Sezernierung von IL-10 und IL-12 in den Kulturüberstand untersucht.

Die Menge an IL-10 und IL-12 in den Kulturüberständen der unterschiedlich differenzierten BM-DC-Populationen an Tag 10 der Kultur ist in Abbildung 15 dargestellt. Abb. 15A zeigt die Ergebnisse für IL-10 und Abb. 15B die für IL-12.

In den Überständen unbehandelter unstimulierter BM-DC ist die geringste Menge IL-10 nachweisbar. Durch eine DC-Differenzierung in Gegenwart von db-cAMP wird die IL-10-Konzentration in dem Kulturüberstand unstimulierter DC signifikant gesteigert. Bei LPS ausgereiften BM-DC ist eine größere Menge IL-10 im Überstand nachweisbar als in unstimulierten Zellen. Dieser Unterschied in der IL-10-Produktion ist aber nicht statistisch signifikant. Bei stimulierten db-cAMP-DC ist die IL-10-Konzentration signifikant erhöht verglichen mit unstimulierten db-cAMP-DC und mit stimulierten unbehandelten BM-DC.

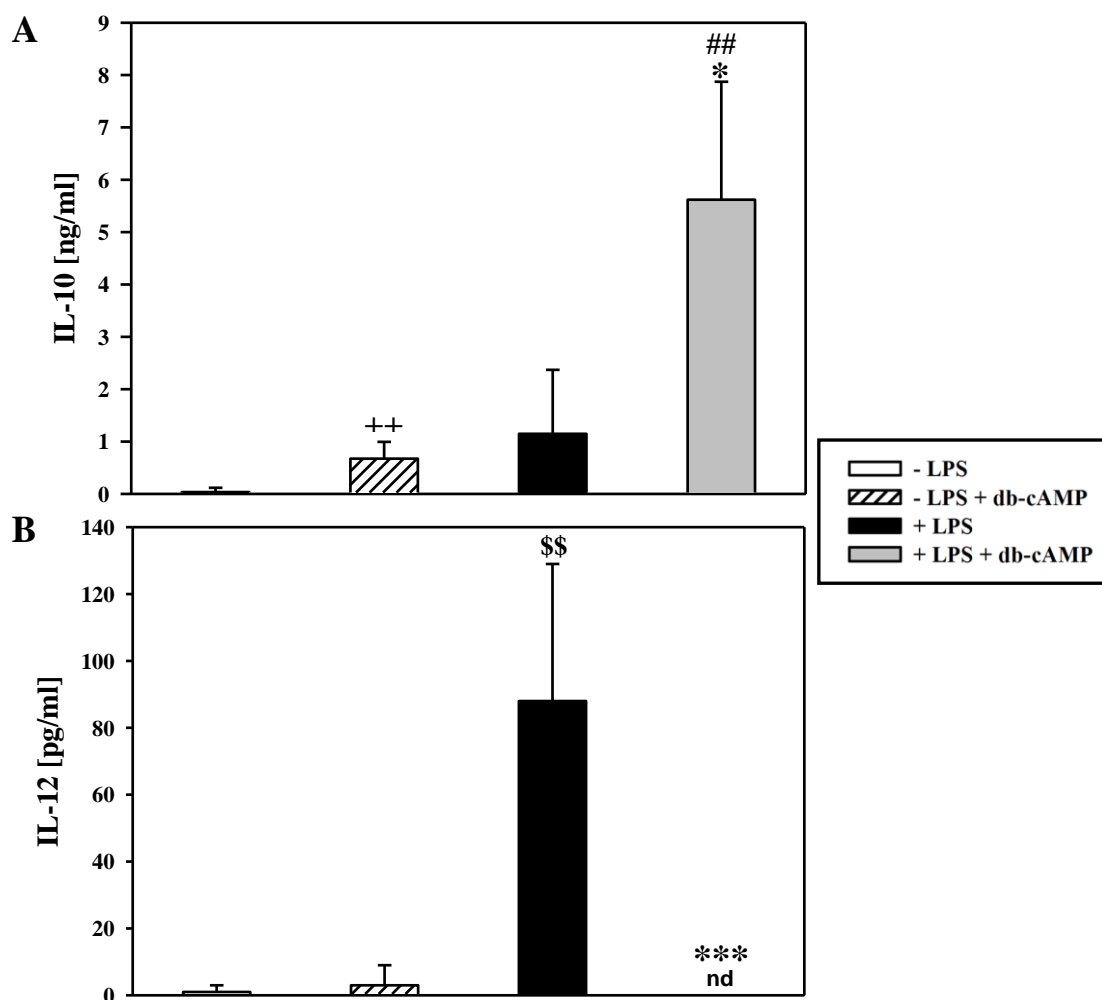


Abb. 15: IL-10- und IL-12-Produktion von BM-DC und db-cAMP-DC. Aliquote der BM-DC-Vorläufer wurden ab Tag 3 der Kultur mit db-cAMP [0,25 mM] behandelt. Zur Ausreifung wurde dem Medium an Tag 9 LPS [1 µg/ml] zugegeben. 24 h später wurden die Kulturüberstände gesammelt und mittels ELISA auf ihren IL-10 (A) und IL-12 (B) Gehalt hin getestet. Dargestellt sind der Mittelwert ± Standardfehler der 3 - 5 durchgeführten Experimente. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten BM-DC (\$), zwischen stimulierten bzw. unstimulierten BM-DC und stimulierten bzw. unstimulierten db-cAMP-DC (* bzw. +) und zwischen stimulierten und unstimulierten db-cAMP-DC (#) sind angegeben.

Die Menge an IL-12 in den Kulturüberständen der unterschiedlich differenzierten BM-DC ist in Abb. 15B dargestellt. Insgesamt sind in den Kulturüberständen nur geringe IL-12-Mengen detektierbar. Für unstimulierte BM-DC und unstimulierte db-cAMP-DC ist eine ähnliche Menge an IL-12 im Kulturüberstand zu beobachten (1 bzw 3 pg/ml). Ausreifungsbedingt kommt es zu einer Steigerung der Menge an IL-12 im Überstand von BM-DC auf etwa 88 pg/ml. Das ist signifikant mehr als in unstimulierten BM-DC. Demgegenüber ist kein IL-12 im Kulturüberstand LPS-stimulierter db-cAMP-DC detektierbar.

3.1.6 Hämoxygenase-1-Expression der unterschiedlich differenzierten BM-DC

Wie in Abbildung 9 zu sehen ist, wird die Hämoxygenase-1 (HO-1) auf mRNA-Ebene von db-cAMP-DC vermehrt exprimiert im Vergleich zu unstimulierten BM-DC. HO-1 baut Häm zu Kohlenmonoxid (CO), Biliverdin und freiem Eisen (Fe^{2+}) ab. Diese Produkte haben eine antiinflammatorische und antiproliferative Wirkung [Sato *et al.*, 2001]. Aus diesem Grund wurde die HO-1 Expression in den unterschiedlich differenzierten BM-DC mittels eines Enzym-Immunoassays untersucht. Die Resultate sind in Abbildung 16 dargestellt.

In unstimulierten und LPS-stimulierten BM-DC sind geringe Mengen an HO-1 auf vergleichbarem Niveau nachweisbar. Db-cAMP-DC weisen in beiden Aktivitätszuständen eine signifikant vermehrte HO-1-Menge auf.

Somit kann die vermehrte Expression von HO-1 auf mRNA-Ebene auch auf Ebene der Enzymaktivität bestätigt werden.

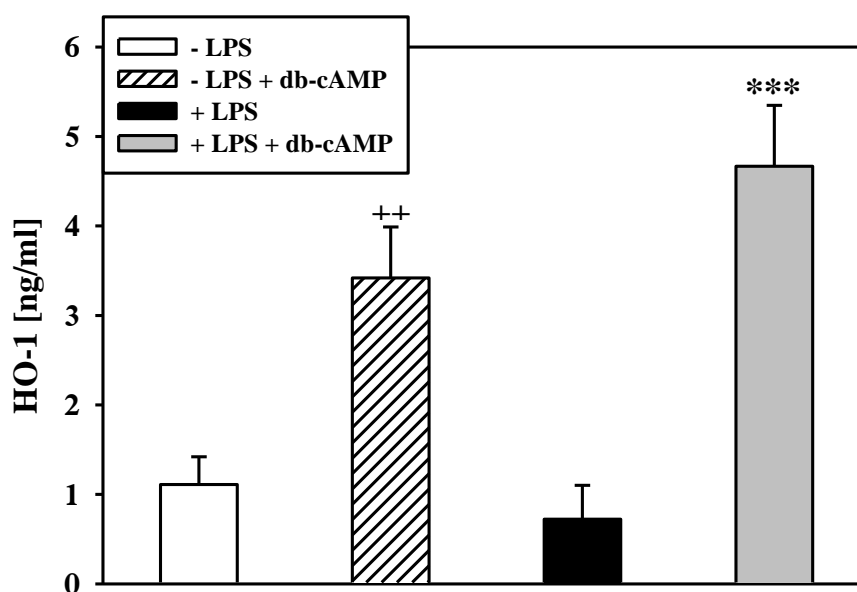


Abb. 16: HO-1 Expression von BM-DC db-cAMP-DC. Aliquote der BM-DC-Vorläufer wurden ab Tag 3 der Kultur mit db-cAMP [0,25 mM] behandelt. Zur Ausreifung wurde dem Medium an Tag 9 LPS [1 $\mu\text{g}/\text{ml}$] zugegeben. 24 h später wurden 5×10^5 Zellen je Gruppe lysiert und anhand eines Enzym-Immunoassays mittels ELISA auf ihre Expression von HO-1 getestet. Dargestellt sind der Mittelwert \pm Standardfehler der 3 durchgeführten Experimente. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten BM-DC (\$), zwischen stimulierten bzw. unstimulierten BM-DC und stimulierten bzw. unstimulierten db-cAMP-DC (* bzw. +) und zwischen stimulierten und unstimulierten db-cAMP-DC (#) sind angegeben.

3.1.7 Prostaglandin E₂ Expression der unterschiedlich differenzierten BM-DC

Wie in Abbildung 9 gezeigt, ist in stimulierten und unstimulierten db-cAMP-DC eine erhöhte Cox-2 mRNA Expression zu beobachten als in den jeweiligen BM-DC-Gruppen.

Bei der Cyclooxygenase handelt es sich um ein Enzym, das Prostaglandine aus Arachidonsäure bildet. Es gibt 2 Isoformen der Cyclooxygenase: Cox-1 wird konstitutiv exprimiert, wohingegen Cox-2 durch proinflammatorische Agenzien induziert wird, was zur Bildung von Prostaglandinen führt [Bryn *et al.* 2008].

Aufgrund der erhöhten Cox-2 mRNA-Expression bei db-cAMP-DC wurde der Prostaglandin E₂-Gehalt im Kulturüberstand der vier untersuchten BM-DC Populationen getestet. Wie in Abbildung 17 zu sehen ist, kann in den Kulturüberständen aller BM-DC Gruppen Prostaglandin E₂ (PGE₂) nachgewiesen werden. In den Überständen unstimulierter BM-DC sind etwa 2 ng/ml und in denen LPS-stimulierter etwa 1,7 ng/ml PGE₂ enthalten. Db-cAMP-DC zeigen eine vermehrte PGE₂-Produktion: im Kulturüberstand der unstimulierten und stimulierten db-cAMP-DC sind jeweils ca. 3 ng/ml PGE₂ vorhanden. Für die LPS ausgereiften Zellen bedeutet dies eine signifikante Steigerung der PGE₂-Menge.

Insgesamt zeigte sich bei der Expression von PGE₂ auf Protein-Ebene ein Unterschied zu der mRNA-Expression der Cox-2 in BM-DC und db-cAMP (Abb. 9). Dies deutet auf eine Regulation der PGE₂-Bildung hin.

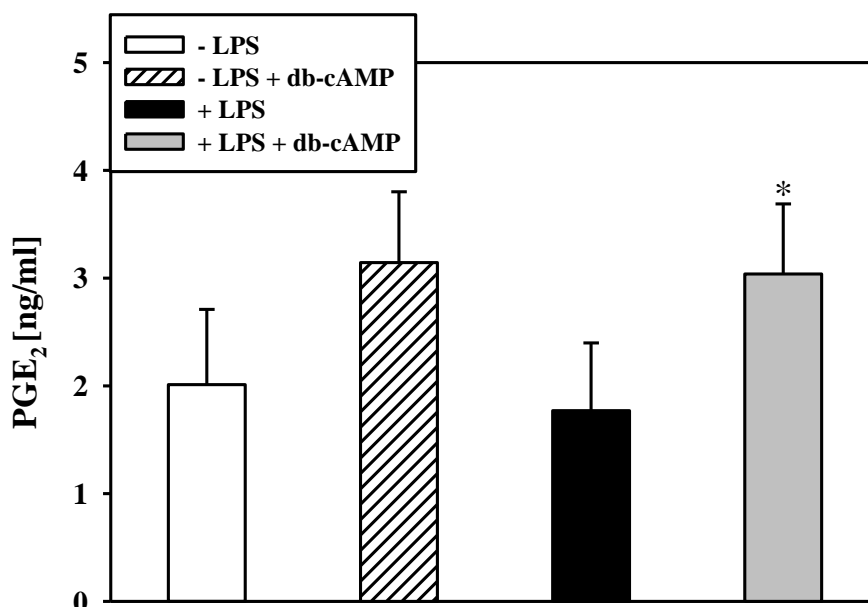


Abb. 17: PGE₂-Bildung von BM-DC und db-cAMP-DC. Aliquote der BM-DC-Vorläufer wurden ab Tag 3 der Kultur mit db-cAMP [0,25 mM] behandelt. Zur Ausreifung wurde dem Medium an Tag 9 LPS [1 µg/ml] zugegeben. 24 h später wurden Kulturüberstände genommen und anhand eines ELISA auf ihren Gehalt an PGE₂ getestet. Dargestellt sind der Mittelwert ± Standardfehler der 4 durchgeführten Experimente. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten BM-DC (\$), zwischen stimulierten bzw. unstimulierten BM-DC und stimulierten bzw. unstimulierten db-cAMP-DC (* bzw. +) und zwischen stimulierten und unstimulierten db-cAMP-DC (#) sind angegeben.

3.1.8 Zytokinprofil der mit unterschiedlich differenzierten BM-DC kokultivierten alloge- nen T-Zellen

Um zu überprüfen, ob unstimulierte und LPS-stimulierte BM-DC sowie unstimulierte und LPS-stimulierte db-cAMP-DC in kokultivierten T-Zellen ein differenzielles Zytokinprofil induzieren, wurden DC/T-Zell-Kokulturüberstände mittels ELISA untersucht. Die BM-DC-Populationen wurden hierfür für 3 Tage mit alloge- nen BALB/cJ T-Zellen kokultiviert (2.2.1.10.2) und die Überstände auf die Zytokingehalte an IFN γ , IL-5, IL-10 und IL-17 getestet.

3.1.8.1 IFN γ -Sekretion der kokultivierten T-Zellen

Die in den Kokulturen der unterschiedlich differenzierten BM-DC mit alloge- nen T-Zellen nachgewiesene Menge des T_H1 Zytokins IFN γ ist in Abbildung 18A dargestellt.

Unstimulierte BM-DC induzieren in kokultivierten alloge- nen T-Zellen eine IFN γ -Produktion von etwa 8 ng/ml. Bei T-Zellen, die mit unstimulierten db-cAMP-DC kokultiviert wurden, ist

die gebildete Menge an IFN γ signifikant auf ca. 18 ng/ml gesteigert. In den Überständen von T-Zellen, die mit LPS-stimulierten BM-DC kokultiviert wurden- ist ein IFN γ -Niveau von etwa 14 ng/ml zu beobachten. Dies ist nicht signifikant vermehrt verglichen zu den Kokulturan Ansätzen mit unstimulierten BM-DC als Stimulatoren. T-Zellen, die mit stimulierten db-cAMP-DC kokultiviert wurden, sezernieren die größte Menge an IFN γ , nämlich ca. 22 ng/ml. Verglichen mit der Kokultur aus T-Zellen mit stimulierten unbehandelten BM-DC und unstimulierten db-cAMP-DC ist dies jedoch keine signifikant gesteigerte Bildung des untersuchten Zytokins.

3.1.8.2 IL-5-Sekretion der kokultivierten T-Zellen

In Abbildung 18B ist die Menge des T_H2 Zytokins IL-5 in den Kokulturen der unterschiedlich differenzierten BM-DC mit allogenen T-Zellen dargestellt.

In allen Gruppen sind vergleichsweise geringe Mengen an IL-5 detektierbar. Unstimulierte BM-DC und unstimulierte db-cAMP-DC induzieren die geringsten IL-5-Mengen (0,08 bzw. 0,04 ng/ml), die sich statistisch nicht signifikant voneinander unterscheiden.

Den höchsten IL-5-Gehalt weisen Kokulturen auf, in denen mit LPS-stimulierte BM-DC als APC genutzt wurden (0,6 ng/ml). Dies ist eine signifikante Steigerung verglichen mit Kokulturen, in denen T-Zellen mit unstimulierten BM-DC kokultiviert worden sind. Stimulierte db-cAMP-DC induzieren eine signifikant geringere IL-5-Sekretion (0,2 ng/ml) als durch stimulierte BM-DC induziert wurde. Allerdings ist dieser Gehalt signifikant höher als durch unstimulierte db-cAMP-DC induziert.

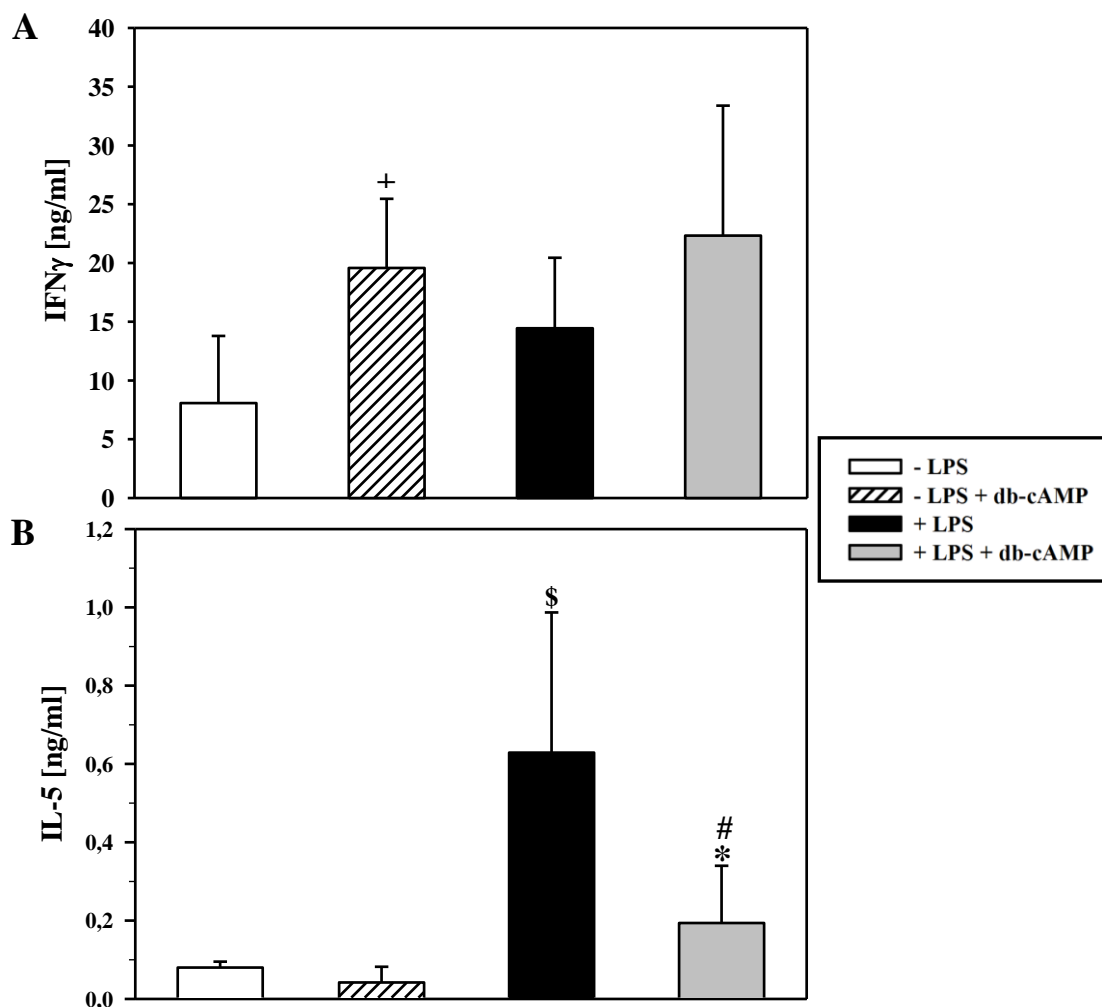


Abb. 18: IFN γ - und IL-5-Produktion in DC/T-Zell-Kokulturen unter Verwendung von BM-DC und db-cAMP-DC als APC. Aliquote der BM-DC-Vorläufer wurden ab Tag 3 der Kultur mit db-cAMP [0,25 mM] behandelt. Zur Ausreifung wurde dem Medium an Tag 9 LPS [1 μ g/ml] zugegeben. 24 h später wurden 5×10^5 bestrahlte BM-DC mit 3×10^6 allogenen T-Zellen aus BALB/cJ-Mäusen in einem Gesamtvolumen von 2 ml in Löcher einer 24-Loch-Platte eingesät. Nach 3 Tagen wurden die Kokulturüberstände gesammelt und mittels ELISA auf ihren Gehalt an IFN γ (A) und IL-5 (B) getestet. Dargestellt sind der Mittelwert \pm Standardfehler der 5 durchgeführten Experimente. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen unbehandelten unstimulierten und stimulierten BM-DC (\$), zwischen stimulierten bzw. unstimulierten BM-DC und stimulierten bzw. unstimulierten db-cAMP-DC (* bzw. +) und zwischen stimulierten und unstimulierten db-cAMP-DC (#) sind angegeben.

3.1.8.3 IL-10-Sekretion der kokultivierten T-Zellen

Die IL-10-Sezernierung in die Kokulturüberstände ist in Abbildung 19A dargestellt. Bei allen Gruppen sind nur geringe IL-10 Mengen nachweisbar, die sich innerhalb der untersuchten Gruppen nicht statistisch signifikant voneinander unterscheiden. Im Kulturüberstand der DC/T-Zell-Kokulturen, die unstimulierte BM-DC als Stimulatoren enthalten, sind ca. 0,320

ng/ml IL-10 enthalten und bei solchen, die unstimulierte db-cAMP-DC aufweisen, 0,540 ng/ml. T-Zellen, die mit LPS stimulierten BM-DC kokultiviert werden, geben 2,500 ng/ml IL-10 in den Kulturüberstand ab, solche die mit stimulierten db-cAMP-DC kokultiviert wurden, deutlich weniger (0,950 ng/ml).

3.1.8.4 IL-17-Sekretion der kokultivierten T-Zellen

Die Kokultur-Gehalte des T_H17 -Zytokins IL-17 sind in Abbildung 19B dargestellt. Im Überstand der T-Zellen, die mit unstimulierten BM-DC kokultiviert wurden, ist die geringste Menge an IL-17 (ca. 0,4 ng/ml) detektierbar. Unstimulierte db-cAMP-DC induzieren verglichen mit den unstimulierten BM-DC eine signifikant auf 3,8 ng/ml gesteigerte IL-17-Konzentration. In den Überständen der Kokulturen, in denen T-Zellen mit LPS-stimulierten BM-DC stimuliert wurden, sind etwa 1,2 ng/ml IL-17 detektierbar. Das ist eine signifikante Steigerung verglichen mit den Kokultur-Ansätzen, in denen unstimulierte BM-DC vorliegen. LPS-stimulierte db-cAMP-DC induzieren eine IL-17-Sezernierung auf ähnlichem Niveau wie unstimulierte db-cAMP-DC.

T-Zellen, die mit db-cAMP-DC kokultiviert wurden, weisen somit insgesamt ein differenzielles Zytokinprofil aus verglichen mit T-Zellen, die mit BM-DC kokultiviert wurden

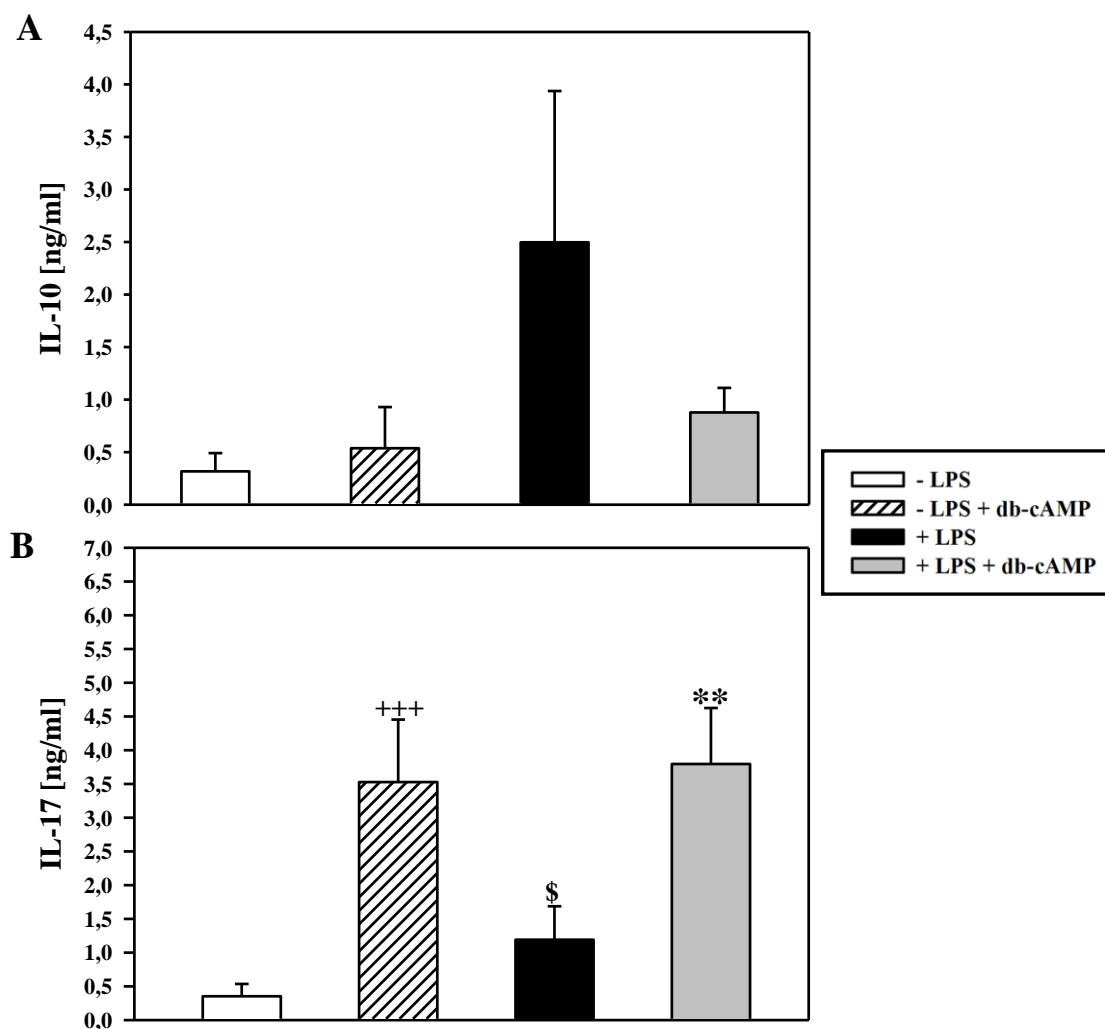


Abb. 19: IL-10- und IL-17-Produktion in DC/T-Zell-Kokulturen unter Verwendung von BM-DC und db-cAMP-DC als APC. Aliquote der BM-DC-Vorläufer wurden ab Tag 3 der Kultur mit db-cAMP [0,25 mM] behandelt. Zur Ausreifung wurde dem Medium an Tag 9 LPS [1 µg/ml] zugegeben. 24 h später wurden 5×10^5 bestrahlte BM-DC mit 3×10^6 allogeenen T-Zellen aus BALB/cJ-Mäusen in einem Gesamtvolumen von 2 ml in Löcher einer 24-Loch-Platte eingesät. Nach 3 Tagen wurden die Kokulturüberstände gesammelt und mittels ELISA auf ihren Gehalt an IL-10 (**A**) und IL-17 (**B**) getestet. Dargestellt sind der Mittelwert \pm Standardfehler der 5 durchgeführten Experimente. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten BM-DC (\$), zwischen stimulierten bzw. unstimulierten BM-DC und stimulierten bzw. unstimulierten db-cAMP-DC (* bzw. +) und zwischen stimulierten und unstimulierten db-cAMP-DC (#) sind angegeben.

3.1.9 Induktion von regulatorischen T-Zellen durch die unterschiedlich differenzierten BM-DC

Um zu untersuchen, ob in Kokulturen von db-cAMP-DC mit allogenen T-Zellen vermehrt regulatorische T-Zellen induziert werden, wurden T-Zellen aus Kokulturem mit unstimulierten und LPS-stimulierten BM-DC bzw. unstimulierten und LPS-stimulierten db-cAMP-DC mittels FACS-Analyse auf ihre Expression von FoxP3 und CD25 hin untersucht. In Abbildung 20 ist dargestellt, welche Zellen in die Analyse einbezogen wurden (Abb. 20A, C - D). Des Weiteren ist exemplarisch eine Abbildung für die verwendeten Isotypenkontrollen (Abb. 20 B und E) und für die CD25/FoxP3-Färbung gezeigt (Abb. 20F).

Zur Auswertung der FACS-Analysen wurden zunächst wie in Abbildung 20A dargestellt im FSC/SSC die T-Zellen eingegrenzt. Innerhalb dieser Population wurden mit Hilfe eines Isotypkontroll-Antikörpers (Abb. 20B) und von Fluoreszenz markierten anti-CD4- bzw anti CD8-Antikörpern die CD4- bzw. CD8-positiven T-Zellen eingegrenzt (Abb. 20C, D). Diese Populationen wurden nach CD25 und FoxP3 doppelt positiven Zellen hin untersucht (Abb. 20F). Die dazugehörige Negativkontrolle ist in Abbildung 20E dargestellt.

Die Prozentzahl an CD25/FoxP3 doppelt positiven T-Zellen innerhalb der CD4- bzw. CD8-positiven T-Zell-Populationen ist in Abbildung 21 dargestellt. Sowohl für die CD4⁺ als auch für die CD8⁺ T-Zellen gibt es keine signifikanten Unterschiede in der prozentualen Anzahl an FoxP3⁺/CD25⁺-T-Zellen. Wie jedoch aus Abbildung 21 ersichtlich ist, sind in beiden T-Zell-Populationen am meisten FoxP3⁺/CD25⁺-T-Zellen vorhanden, wenn die T-Zellen mit unstimulierten BM-DC kokultiviert wurden. Die geringste Anzahl FoxP3⁺/CD25⁺-T-Zellen ist in den Kokulturen mit stimulierten db-cAMP-DC nachzuweisen. In den Kokulturen der T-Zellen mit den db-cAMP-DC sind jeweils insgesamt weniger FoxP3⁺/CD25⁺-T-Zellen vorhanden als in der jeweiligen Gruppen mit unbehandelten BM-DC.

Somit kommt es durch db-cAMP-DC zu keiner vermehrten Treg-Induktion in kokultivierten T-Zellen verglichen mit BM-DC.

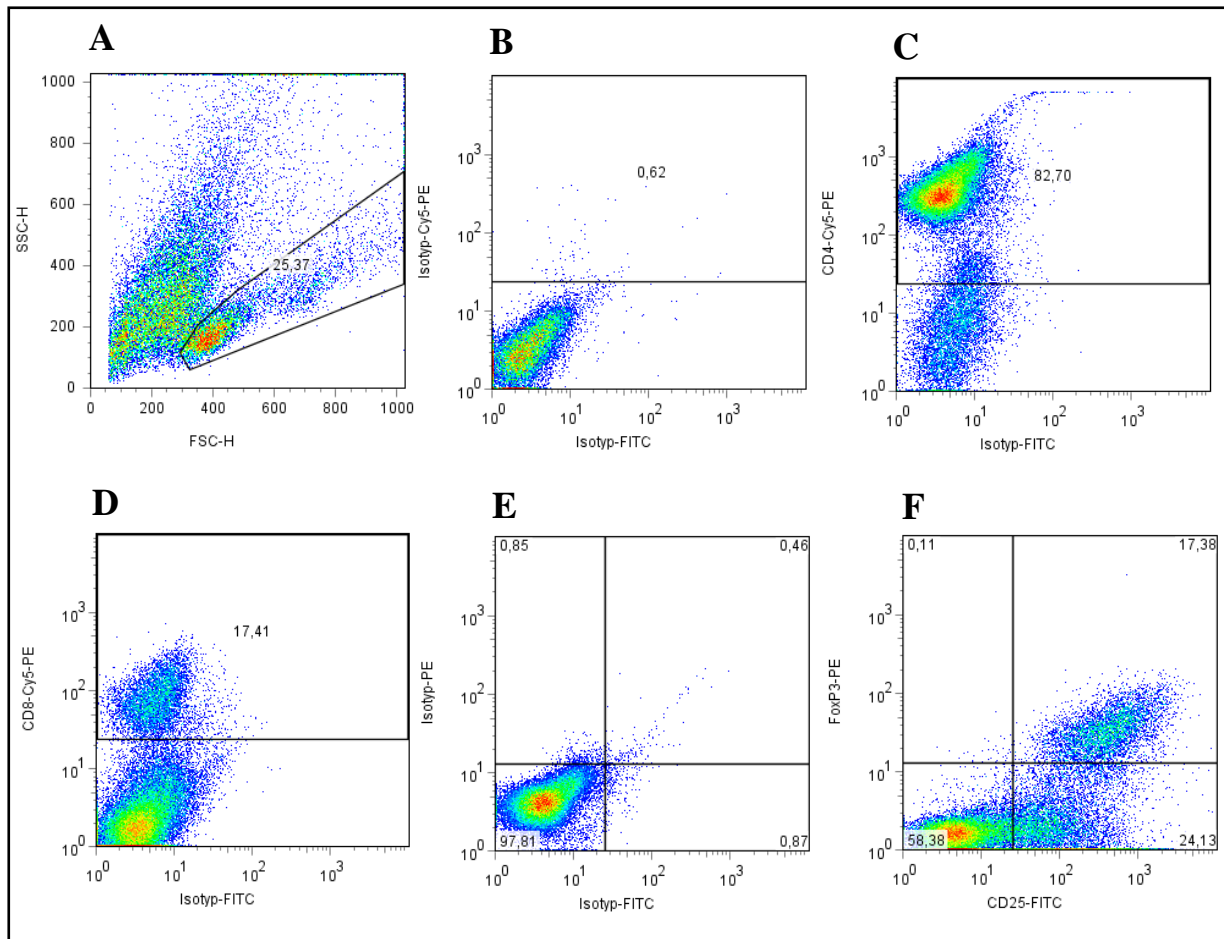


Abb. 20: Induktion von regulatorischen T-Zellen durch die unterschiedlich konditionierten BM-DC: Durchführungsstrategie der FACS-Analyse. Die BM-DC wurden ab Tag 3 der Kultur mit db-cAMP [0,25 mM] behandelt. Zur Ausreifung wurde dem Medium an Tag 9 LPS [1 µg/ml] zugegeben. Die unterschiedlich vorbehandelten BM-DC wurden an Tag 10 gerntet und für 7 Tage mit T-Zellen aus BALBc/J-Mäusen kokultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Antikörpern gegen CD4, CD8, CD25 und FoxP3 gefärbt und auf ihre Expression von FoxP3 und CD25 hin untersucht. Hierfür wurden zunächst die T-Zellen eingegrenzt (A), innerhalb dieser Eingrenzung wurden mit Hilfe eines Isotypkontroll-Antikörpers (B) die CD4- (C) und CD8-positiven Zellen eingegrenzt (D), um dann in diesen positiven Populationen mit Hilfe eines Isotypkontroll-Antikörpers als Kontrolle (E) und Antikörpern gegen CD25 und FoxP3 regulatorische T-Zellen nachweisen zu können (F).

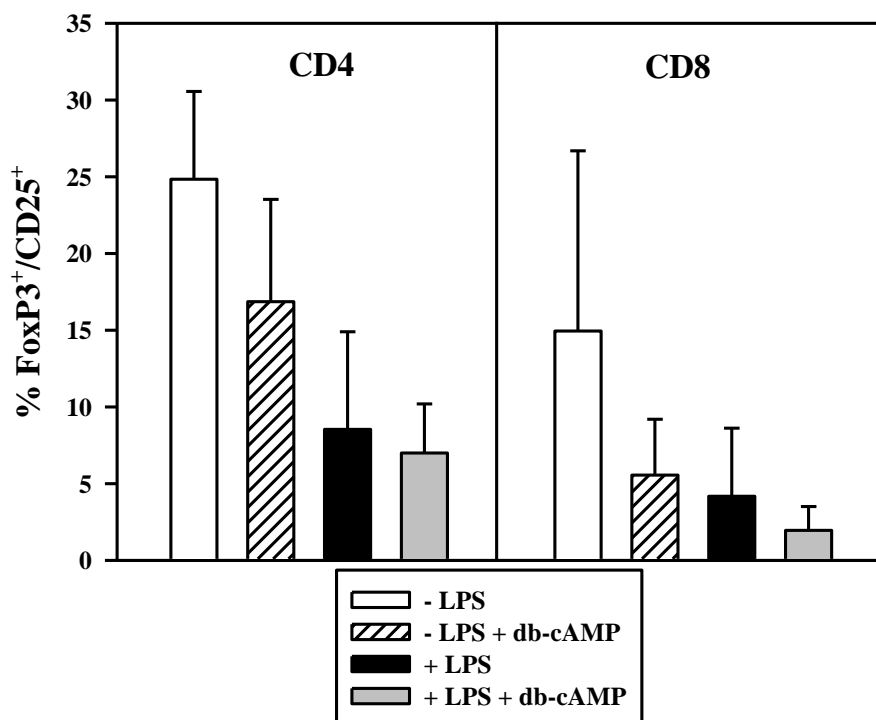


Abb. 21: Induktion von regulatorischen T-Zellen durch die unterschiedlich konditionierten BM-DC.

Aliquote der BM-DC-Vorläufer wurden ab Tag 3 der Kultur mit db-cAMP [0,25 mM] behandelt. Zur Ausreifung wurde dem Medium an Tag 9 LPS [1 µg/ml] zugegeben. Die unterschiedlich differenzierten BM-DC wurden an Tag 10 geerntet und für 72h mit T-Zellen aus BALBc/J-Mäusen kokultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Antikörpern gegen CD4, CD8, CD25 und FoxP3 gefärbt und auf ihre Expression von FoxP3 und CD25 hin untersucht. Für die Auswertung wurden die Zellen auf CD4 bzw. CD8 eingegrenzt und innerhalb dieser Eingrenzung der prozentuale Anteil FoxP3/CD25 doppelt positiver T-Zellen ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler der 3 durchgeführten Experimente. Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

3.1.10 Beitrag der Proteinkinase A zu der Funktion und dem Phänotyp von db-cAMP behandelter BM-DC

Wie in Abbildung 1 dargestellt, wirkt cAMP insbesondere über die Proteinkinase A (PKA). Aus diesem Grund wurde der PKA-Inhibitor H-89 eingesetzt, um zu testen, ob das verminderte T-Zellstimulierungspotential der db-cAMP-DC über die PKA vermittelt wird. Des Weiteren wurden einige Gene ausgewählt und deren Expressionsniveau mittels quantitativer Realtime-PCR (2.2.2.4) untersucht.

3.1.10.1 Allogenes T-Zellstimulierungspotential von db-cAMP-DC mit modulierter PKA-Aktivität

Zur Untersuchung des Einflusses einer Inhibition der PKA auf das allogene T-Zell-Stimulierungspotenzial von BM-DC bzw. db-cAMP-DC wurden Aliquote der DC-Vorläufer ab Tag 3 der Kultur in Gegenwart von db-cAMP bzw. H-89 [1 und 10 μM] differenziert.

Die Ergebnisse für unstimulierte BM-DC und db-cAMP-DC sind in Abbildung 22A, die für die LPS-stimulierten Populationen in Abbildung 22B dargestellt. Es ist exemplarisch die T-Zell-Proliferation bei einem BM-DC/T-Zell-Verhältnis von 1:18 gezeigt, wobei die durch BM-DC induzierte T-Zell-Proliferation jeweils gleich 1 gesetzt wurde.

Wie in Abbildung 22A gezeigt, hat der PKA-Inhibitor H-89 alleine keine signifikante Änderung der T-Zell-Stimulierungskapazität unstimulierter BM-DC zur Folge. Eine Kultivierung der unstimulierten BM-DC in Anwesenheit von db-cAMP führt wie zuvor beschrieben (3.1.1) zu einer verminderten T-Zell-Stimulierungsfähigkeit. Die zusätzliche Gabe von H-89 während der Kultur führt bei beiden verwendeten Konzentrationen zu einer signifikant gesteigerten Proliferation der T-Zellen verglichen mit den Ansätzen, in denen stimulierte db-cAMP-DC als APC eingesetzt wurden.

Die Ergebnisse für LPS-stimulierte BM-DC sind in Abbildung 22B dargestellt. Eine BM-DC-Differenzierung in Anwesenheit von H-89, gefolgt von einer LPS-Stimulierung, hat bei einer H-89-Konzentration von 1 μM keine, bei der 10-fach höheren Konzentration einen signifikant inhibierenden Effekt auf die T-Zell-Stimulierungsaktivität. Wie zuvor beschrieben (3.1.1), resultiert die Differenzierung von BM-DC in Gegenwart von db-cAMP mit anschließender LPS Stimulierung im Vergleich mit stimulierten BM-DC zu einer signifikant verminderten T-Zell-Stimulierung. Eine db-cAMP-Differenzierung in Gegenwart von H-89 führt wie bei den unstimulierten BM-DC (Abb.22A) auch bei LPS-stimulierten BM-DC bei beiden verwendeten Konzentrationen zu einer signifikant gesteigerten Proliferation der T-Zellen verglichen mit solchen, die mit stimulierten db-cAMP-DC kultiviert wurden.

Die PKA trägt also zu der verminderten T-Zell-Stimulierungskapazität von db-cAMP-DC bei.

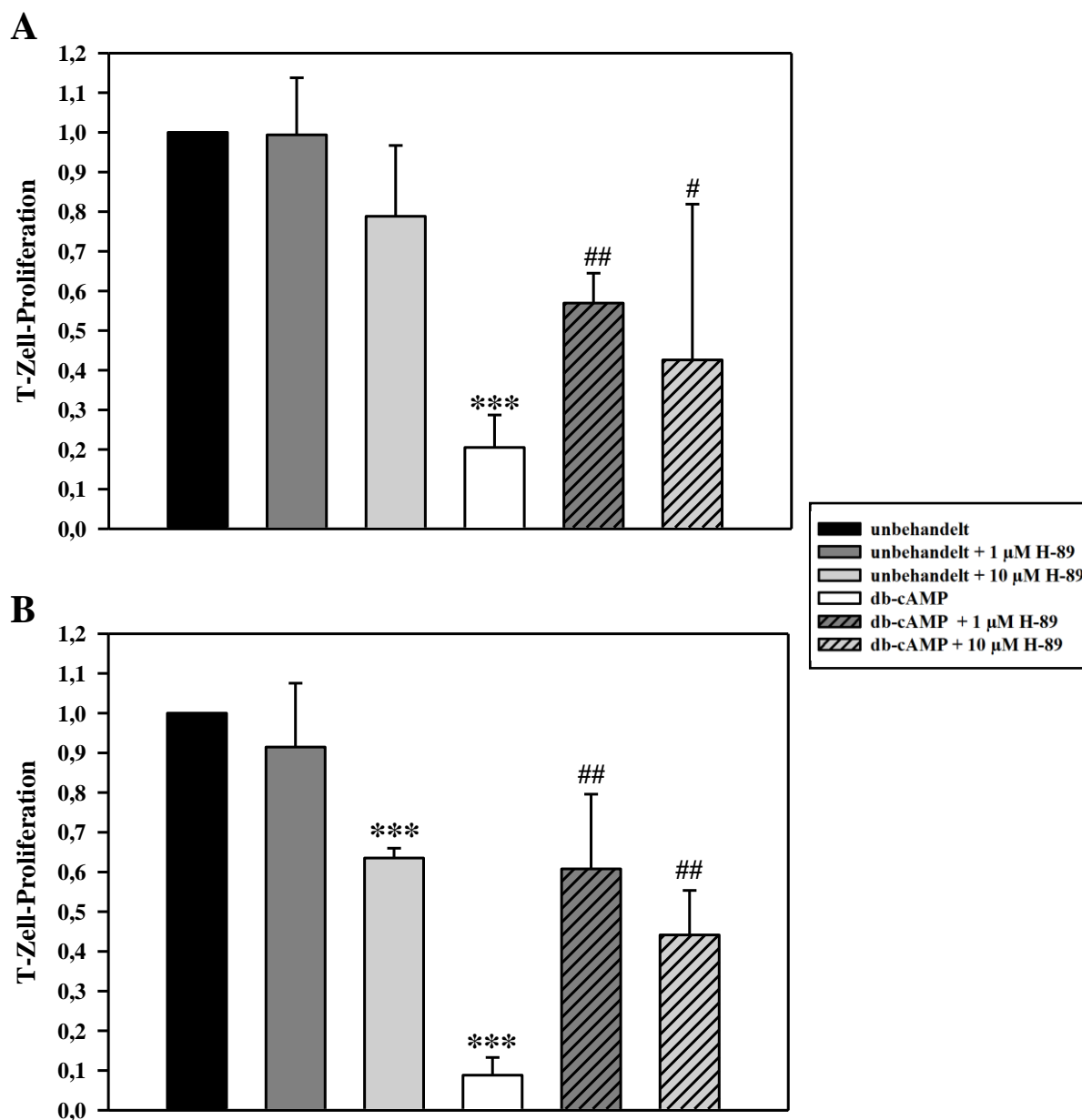


Abb. 22: Einfluss des PKA-Inhibitors H-89 auf das allogene T-Zell-Stimulierungspotenzial von unstimulierten (A) und stimulierten (B) BM-DC und db-cAMP-DC. DC-Vorläufer wurden ab Tag 3 der Kultur mit db-cAMP [0,25 mM] und/oder H-89 [1 oder 10 μM] behandelt. Zur Ausreifung der unstimulierten Zellen (A) wurde dem Medium an Tag 9 LPS [1 μg/ml] zugegeben (B). Die unterschiedlich behandelten BM-DC-Populationen wurden an Tag 10 geerntet, bestrahlt und in Triplikatansätzen in Löcher einer 96-Loch-Platte eingesät ($1,7 \times 10^4$). Sie wurden mit jeweils 3×10^5 BALB/cJ-T-Zellen für 3 Tage kokultiviert. Anschließend wurde zu den Kulturen jeweils $0,25 \mu\text{Ci } ^3\text{HTdR}$ pro Loch zugegeben. Nach 16-stündiger Inkubation wurde durch Messen der Radioaktivität die Proliferationsrate der alloreaktiven T-Zellen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler der einzelnen Gruppen von 4 durchgeführten Experimenten, wobei die Proliferation der T-Zellen als Antwort auf unbehandelte BM-DC gleich 1 gesetzt wurde. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen unbehandelten und db-cAMP bzw. H-89 behandelten BM-DC (*) und zwischen db-cAMP behandelten und db-cAMP + H-89 behandelten BM-DC (#) sind angegeben.

3.1.10.2 Analyse der Expression DC-relevanter Gene in Gegenwart von db-cAMP und/oder einem PKA-Inhibitor

Zur Überprüfung, ob eine H-89-vermittelte Inhibierung der Proteinkinase A einen Einfluss auf das differentielle Genexpressionsprofil der verschiedenen BM-DC-Populationen hat, wurden einige Gene ausgewählt deren Expressionsniveau mittels quantitativer Realtime-PCR untersucht wurde. Für diese Untersuchung wurden cDNAs von BM-DC verwendet, die mit LPS stimuliert waren und solche, die mit db-cAMP [0,25 mM] und/oder H-89 [10 µM] differenziert wurden. Als Referenz wurden cDNA unstimulierter BM-DC mitgeführt und die mRNA-Expression der untersuchten Gene in diesen Zellen jeweils gleich 1 gesetzt. Die Ergebnisse der quantitativen PCR für diese Versuchsgruppen sind in Abbildung 23 dargestellt.

Wie schon zuvor beschrieben (3.1.3.2) werden die kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 in BM-DC ausreifungsbedingt vermehrt exprimiert. Eine Differenzierung der BM-DC in Anwesenheit von db-cAMP, gefolgt von einer LPS-Stimulation, führt zu einer geringeren mRNA-Expression dieser Moleküle verglichen mit LPS-stimulierten BM-DC. Eine Differenzierung der BM-DC in Gegenwart von H-89 mit anschließender Stimulierung führt ebenfalls zu einem geringeren mRNA-Niveau der 3 kostimulatorischen Moleküle verglichen mit stimulierten BM-DC, wobei die Unterschiede für CD40 und CD86 statistisch signifikant sind. BM-DC, die sowohl in Anwesenheit von db-cAMP als auch von H-89 differenziert und anschließend ausgereift wurden, weisen im Vergleich zu LPS-stimulierten db-cAMP-DC kein verändertes CD40-mRNA-Expressionsniveau auf. Die beiden Moleküle CD80 und CD86 werden von den BM-DC, die parallel mit db-cAMP und H-89 behandelt wurden, auf einem geringeren Niveau exprimiert als von den db-cAMP-DC. Dieser Unterschied in der mRNA-Expression ist für CD80 statistisch signifikant.

Bei Fascin ist wie in 3.1.3.2 beschrieben nach einer Stimulierung der BM-DC eine signifikant gesteigerte mRNA-Expression zu beobachten. Eine Differenzierung der BM-DC in Gegenwart von H-89 mit anschließender LPS-Ausreifung hat verglichen mit der unbehandelten Kontrolle ein leicht vermindertes Fascin-Expressionsniveau zur Folge, wobei der Unterschied nicht statistisch signifikant ist. BM-DC, die während der Kultur sowohl mit db-cAMP als auch mit H-89 differenziert und anschließend stimuliert wurden, zeigen verglichen mit LPS-stimulierten db-cAMP-DC eine moderat stärkere Expression der Fascin mRNA. Letztere exprimieren signifikant weniger Fascin mRNA als unbehandelte stimulierte BM-DC.

Das koinhibitorische Oberflächenmolekül B7-H1 wird auf mRNA Ebene von stimulierten BM-DC verglichen mit unstimulierten BM-DC signifikant vermehrt exprimiert. Eine Differenzierung der BM-DC in Anwesenheit von db-cAMP oder H-89 oder in deren Kombination mit anschließender Stimulierung führt lediglich bei db-cAMP alleine zu einer gesteigerten mRNA-Expression von B7-H1, verglichen mit stimulierten BM-DC.

Die Expression des koinhibitorischen Moleküls SLAM wird reifungsbedingt signifikant aufreguliert. Eine Differenzierung der BM-DC mit db-cAMP alleine oder in Kombination mit H-89 führt zu einer Verminderung der SLAM-Expression gegenüber stimulierten BM-DC, die für db-cAMP alleine signifikant ist. Eine Differenzierung der BM-DC mit H-89 führt zu keiner veränderten SLAM-Expression verglichen mit unbehandelten stimulierten BM-DC.

Das koinhibitorische Molekül LIGHT wird im Vergleich zu unstimulierten BM-DC lediglich von stimulierten db-cAMP-DC vermehrt exprimiert. Die 3 anderen untersuchten Gruppen weisen eine LIGHT-mRNA-Expression auf, die unter dem Niveau der unstimulierten Kontrolle liegt. Stimulierte db-cAMP-DC haben außerdem ein signifikant erhöhtes LIGHT mRNA-Expressionsniveau verglichen mit stimulierten BM-DC. Eine Differenzierung in Anwesenheit von db-cAMP und H-89 hat in den erhaltenen BM-DC eine signifikant verminderte mRNA-Expression von LIGHT zur Folge.

Eine Stimulierung der BM-DC führt verglichen mit der unstimulierten Kontrolle zu keiner Veränderung des mRNA-Levels des IL-1 Rezeptor Antagonisten (IL-1RA). Durch die Differenzierung der BM-DC in Anwesenheit von db-cAMP, gefolgt von einer LPS-Stimulierung, kommt es zu einer signifikant gesteigerten Menge an IL-1RA mRNA, verglichen mit LPS-stimulierten BM-DC. Eine Differenzierung der BM-DC in Gegenwart von H-89 hat keinen Einfluss auf das IL-1RA-Expressionsniveau stimulierter Zellen. Die db-cAMP-DC, die in Anwesenheit von H-89 differenziert wurden, weisen das gleiche IL-1RA-Expressionsniveau auf, wie die nur in Anwesenheit von db-cAMP differenzierten BM-DC.

Das antiinflammatorische Zytokin IL-10 wird von stimulierten BM-DC auf einem höheren Niveau exprimiert als von unstimulierten BM-DC. Die Differenzierung der BM-DC in Gegenwart von db-cAMP mit anschließender Stimulierung führt zu einer signifikant höheren IL-10 mRNA-Expression im Vergleich mit stimulierten BM-DC. In den BM-DC, die in Anwesenheit von H-89 alleine oder mit db-cAMP und H-89 in Kombination differenziert und stimuliert wurden, ist eine Expression der IL-10 mRNA zu beobachten, die etwa auf dem Niveau der unbehandelten und schwächer als die der db-cAMP behandelten Gruppe ist.

Die mRNA des Enzyms Hämoxygenase-1 kann nach einer Differenzierung der BM-DC mit db-cAMP oder H89 verglichen mit stimulierten BM-DC vermehrt nachgewiesen werden,

wobei der Unterschied für die db-cAMP-DC statistisch signifikant ist. Das Expressionsniveau von HO-1 in den in Anwesenheit von db-cAMP und H-89 differenzierten BM-DC liegt etwa auf dem Level der db-cAMP-DC.

Die Cyclooxygenase-2 wird durch LPS-Stimulierung signifikant vermehrt exprimiert. Eine Differenzierung der BM-DC in Anwesenheit von H-89 alleine führt verglichen mit stimulierten BM-DC zu keiner Änderung des Expressionsniveaus, während eine Differenzierung mit db-cAMP zu einer signifikant vermehrten Cox-2 mRNA-Expression führt, die durch die zusätzliche Applikation von H-89 während der Differenzierung nicht beeinflusst wird.

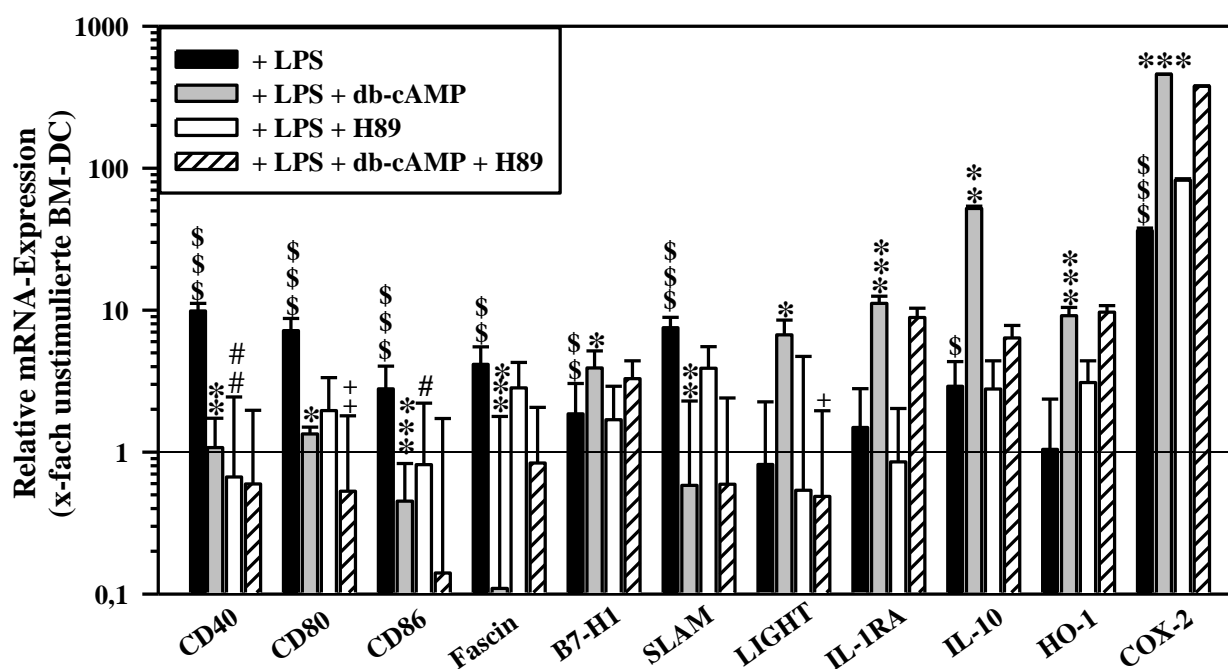


Abb. 23: Ergebnisse der quantitativen PCR für unstimulierte BM-DC und für stimulierte BM-DC +/- db-cAMP +/- H-89. Aliquote der BM-DC-Vorläufer wurden ab Tag 3 der Kultur mit db-cAMP [0,25 mM] und/oder H-89 [10 µM] behandelt. Zur Ausreifung wurde dem Medium an Tag 9 LPS [1 µg/ml] zugegeben. Die jeweilige mRNA-Expression wurde in Proben der BM-DC von Tag 10 untersucht. Dargestellt sind der Mittelwert ± Standardfehler der drei bis neun durchgeführten Experimente, wobei die mRNA-Expression unstimulierter BM-DC gleich 1 gesetzt wurde. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen unbehandelten unstimulierten und stimulierten BM-DC (\$); zwischen stimulierten unbehandelten BM-DC und stimulierten db-cAMP-DC (*); zwischen stimulierten db-cAMP behandelten und stimulierten db-cAMP und H-89 behandelten BM-DC (+) und stimulierten unbehandelten und stimulierten H-89 behandelten BM-DC (#) sind angegeben.

3.1.11 Beitrag der Cyclooxygenase-2 zu der Funktion db-cAMP behandelter

BM-DC

Wie in Abbildung 9 zu erkennen, ist in unstimulierten und stimulierten db-cAMP-DC eine gesteigerte Expression von Cyclooxygenase-2 (Cox-2) mRNA vorhanden. Des Weiteren führt die Differenzierung von BM-DC mit db-cAMP zu einer erhöhten Prostaglandin E₂-Konzentration im Kulturüberstand (Abbildung 17). PGE₂ wiederum moduliert die Zytokinproduktion und Proliferation von T-Zellen und induziert in CD4⁺CD25⁻-T-Zellen die Expression von FoxP3 und einen suppressiven, regulatorischen Phänotyp [Bryn *et al.* 2008]. Aus diesem Grund wurde der selektive Cox-2-Inhibitor NS-398 eingesetzt, um zu testen, ob das verminderte T-Zellstimulierungspotential der db-cAMP-DC durch die erhöhte Cox-2-Aktivität in db-cAMP-DC vermittelt wird.

Das allogene T-Zellstimulierungspotenzial der unterschiedlich differenzierten BM-DC ist in Abbildung 24 dargestellt. Unbehandelten und in Gegenwart von db-cAMP [0,25 mM] differenzierten BM-DC wurde ab dem dritten Tag der DC-Kultur oder während der letzten 24 h der Kultur der Cox-2-Inhibitor NS-389 [10 µM] zugegeben. Zusätzlich wurde für jede Gruppe noch ein Ansatz mitgeführt, bei dem auch während der Kokultur NS-398 in der gleichen Konzentration hinzugefügt wurde.

Die T-Zell-Proliferation bei einem BM-DC/T-Zell-Verhältnis von 1:18 ist exemplarisch gezeigt, wobei die T-Zell-Proliferation als Antwort auf unbehandelte unstimulierte bzw. stimulierte BM-DC jeweils gleich 1 gesetzt wurde.

Die Ergebnisse für unstimulierte BM-DC sind in Abbildung 24A, die für stimulierte in Abbildung 24B dargestellt.

Für die unstimulierten BM-DC ist zu beobachten, dass eine Kultivierung der BM-DC in Gegenwart von NS-398 ab Tag 3 der DC-Kultur oder während der letzten 24 h der Kultur zu einem moderaten, nicht statistisch signifikant, verminderten T-Zell-Stimulierungspotential führt. Auf das T-Zell-Stimulierungspotenzial stimulierter BM-DC hat die Differenzierung in Gegenwart von NS-398 keinen Einfluss.

T-Zellen, die mit unstimulierten und stimulierten unbehandelten BM-DC kokultiviert wurden und denen während der Kokultur der Cox-2 Inhibitor zugegeben wurde, weisen im Vergleich zu den T-Zellen, die mit unstimulierten und stimulierten BM-DC kokultiviert wurden, eine Hypoproliferation auf. Ebenso weisen T-Zellen, die mit BM-DC kokultiviert wurden, die ab Tag 3 in Anwesenheit von NS-398 differenziert wurden und denen zusätzlich NS-398

während der Kokultur zugegeben wurde, eine geringe Proliferation auf. Diese ist bei unstimulierten BM-DC signifikant geringer als bei solchen T-Zellen, die mit BM-DC kultiviert wurden, denen ab Tag 3 der Kultur, aber nicht während der Kokultur der Cox-2 Inhibitor zugegeben wurde.

Für T-Zellen, die mit stimulierten und unstimulierten BM-DC kokultiviert wurden, die während der letzten 24 Stunden der Kultur mit NS-398 behandelt wurden, sieht das Ergebnis ähnlich aus, nur ist der Unterschied in diesem Fall für beide Reifungsstadien nicht statistisch signifikant.

Unstimulierte und stimulierte db-cAMP-DC weisen, wie schon zuvor beschrieben, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle ein signifikant vermindertes T-Zell-Stimulierungspotential auf. Dieses Ergebnis lässt sich auch in diesen Versuchen bestätigen.

Eine Behandlung der unstimulierten db-cAMP-DC mit NS-398 ab Tag 3 der Kultur führt zu keiner Veränderung der T-Zell-Stimulierung verglichen mit db-cAMP-DC. Eine Differenzierung der stimulierten db-cAMP-DC in Gegenwart von NS-398 ab Tag 3 der Kultur oder während der Ausreifung führt verglichen mit unbehandelten db-cAMP-DC zu einer leichten Verminderung der T-Zell-Stimulierungskapazität. Diese Verminderung ist aber nicht statistisch signifikant. Die Kultur der unstimulierten und stimulierten BM-DC mit NS-398 während der letzten 24 h der Kultur führt, verglichen mit den unbehandelten db-cAMP-DC zu einem leicht verminderten T-Zell-Stimulierungspotential. Die Proliferation der T-Zellen ist in allen untersuchten Ansätzen bei Verwendung unstimulierter und stimulierter db-cAMP-DC als Stimulatoren geringer, wenn während der Kokultur NS-398 zugegeben wurde, wobei die Unterschiede nur für unbehandelte stimulierte db-cAMP-DC statistisch signifikant sind.

Die eben beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass die Cox-2 nicht zu dem verminderten T-Zell-Stimulierungspotenzial der db-cAMP-DC beiträgt.

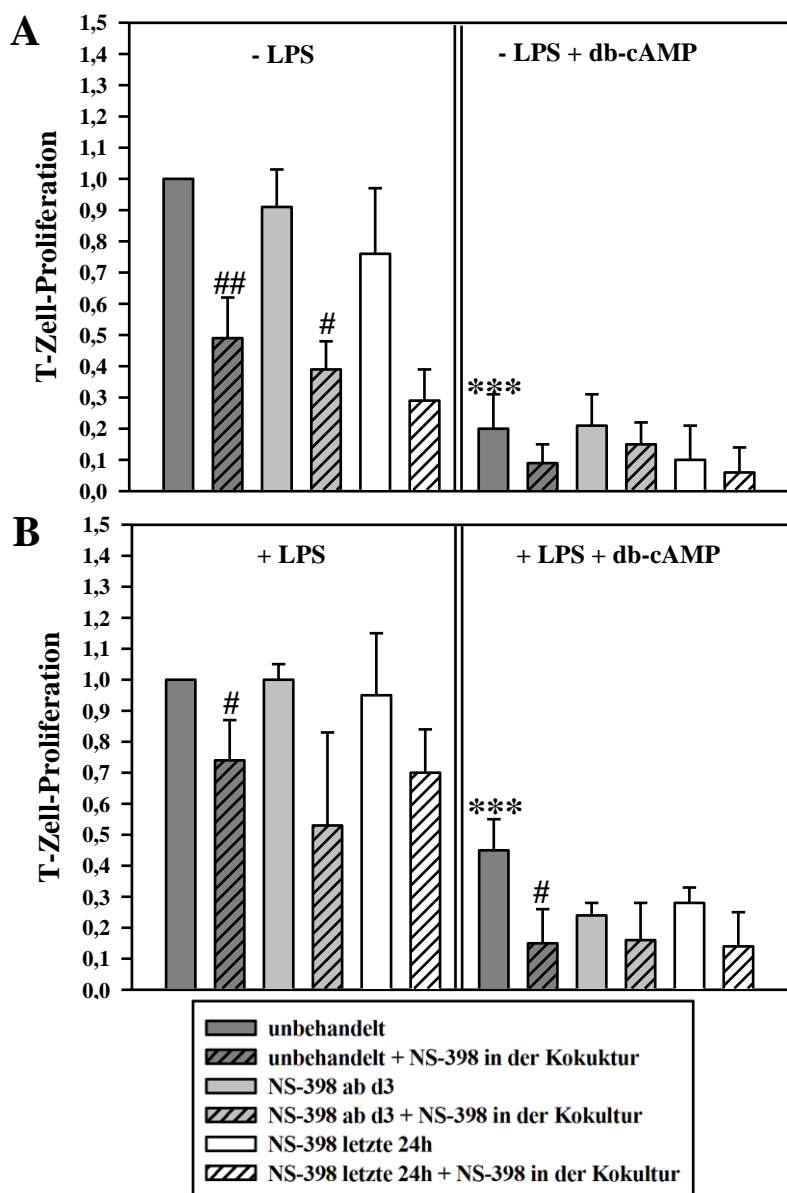


Abb. 24: Einfluss von Cox-2 auf das allogene T-Zellstimulierungspotenzial von BM-DC und db-cAMP-DC. Dargestellt sind die Ergebnisse für unstimulierte BM-DC und unstimulierte db-cAMP-DC (**A**) und für stimulierte BM-DC und stimulierte db-cAMP-DC (**B**). Aliquote der BM-DC-Vorläufer wurden ab Tag 3 der Kultur mit db-cAMP [0,25 mM] und zusätzlich ab Tag 3 der Kultur oder während der letzten 24 h der Kultur mit NS-398 [10 µM] differenziert. Zur Ausreifung wurde dem Medium an Tag 9 LPS [1 µg/ml] zugegeben. Die unterschiedlich differenzierten BM-DC wurden an Tag 10 geerntet, bestrahlt und in Triplikatsansätzen in Löcher einer 96-Loch-Platte eingesät ($1,7 \times 10^4$ Zellen). Sie wurden mit jeweils 3×10^5 BALB/cJ-T-Zellen für 3 Tage kokultiviert. Einer Hälfte der verschiedenen Ansätze wurde NS-398 [10 µM] während der Kokultur hinzugefügt. Nach 3 Tagen wurde zu den Kulturen jeweils $0,25 \mu\text{Ci } ^3\text{HTdR}$ pro Loch zugegeben. Nach 16-stündiger Inkubation wurde durch Messen der Radioaktivität die Proliferationsrate der alloreaktiven T-Zellen bestimmt. Dargestellt sind der Mittelwert \pm Standardfehler der 3 durchgeführten Experimente, wobei die Proliferation der T-Zellen als Antwort auf unbehandelte BM-DC gleich 1 gesetzt wurde. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen unbehandelten BM-DC und db-cAMP-DC (*), zwischen BM-DC bzw. db-cAMP-DC und NS-398 behandelten BM-DC (+) und zwischen BM-DC bzw. db-cAMP-DC bzw. NS-398 behandelten BM-DC und der jeweiligen Gruppe mit NS-398 in der Kokultur (#) sind angegeben.

3.1.12 Test der unterschiedlich differenzierten BM-DC auf die Charakteristika von MDSC

Bei MDSC („myeloid derived suppressor cells“) handelt es sich um myeloide Zellen, die suppressive Eigenschaften aufweisen. Sie bestehen aus Vorläuferzellen von Makrophagen, Granulozyten und DC und aus myeloiden Zellen in frühen Differenzierungsstadien [Youn *et al.*, 2008]

Um zu überprüfen, ob die in Gegenwart von db-cAMP differenzierten BM-DC in ähnlichem Ausmaß wie myeloide Suppressorzellen die T-Zell-Proliferation limitieren können, wurde ein wie in 2.2.1.12 beschriebener MDSC-Suppressionstest in Anlehnung an die Veröffentlichung von Youn *et al.* (2008) durchgeführt. Zusätzlich wurde untersucht, ob eine Hemmung von NOS („nitric oxide synthase“), ROS („reactive oxygen species“) oder der Arginase 1 einen Einfluss auf die T-Zell-stimulatorische Aktivität der untersuchten BM-DC-Gruppen hat.

3.1.12.1 Suppressions-Test mit den unterschiedlich differenzierten BM-DC

Die Ergebnisse des Suppressionstestes sind in Abbildung 25 dargestellt. Bei dem Suppressionstest dienten stimulierte BM-DC als APC. Diese wurden mit allogenen BALB/cJ T-Zellen kokultiviert. Die vier zu untersuchenden Testpopulationen wurden in vier unterschiedlichen Zellzahlen zugegeben, wobei es sich bei den Testpopulationen um unstimulierte BM-DC, unstimulierte db-cAMP-DC, stimulierte BM-DC und stimulierte db-cAMP-DC handelte. Als Kontrolle dienten T-Zellen, die ausschließlich mit stimulierten BM-DC kokultiviert wurden.

Stimulierte BM-DC, die zu den APC und T-Zellen zugegeben wurden, supprimieren entgegen der Erwartung in den beiden niedrigeren Zellzahlen die Proliferation der T-Zellen signifikant verglichen zur Kontrolle, nicht aber in den höheren Zellzahlen. Es wäre zu erwarten, dass stimulierte BM-DC die T-Zell-Proliferation nicht supprimieren. Die stimulierten db-cAMP-DC supprimieren, außer in der höchsten Konzentration, die T-Zell-Proliferation signifikant verglichen mit der Kontrolle. Außerdem ist die T-Zell-Proliferation in dieser Gruppe bei allen Konzentrationen geringer als die der T-Zellen, denen neben den APC noch zusätzlich stimulierte BM-DC zugegeben wurden. Die aus unstimulierten BM-DC bestehende Testpopulation vermittelt in allen untersuchten Zellzahlen eine signifikant verminderte T-Zell-Proliferation, ebenso die unstimulierten db-cAMP-DC. Nach Zugabe von 5×10^3 , 1×10^4

und 2×10^4 unstimulierten db-cAMP-DC zu dem APC-T-Zell-Ansatz ist die T-Zell-Proliferation am geringsten.

Da entgegen der Erwartungen auch stimulierte BM-DC in diesem Test die T-Zell-Proliferation inhibieren, ist es schwierig anhand der vorliegenden Ergebnisse Aussagen über die Funktion der db-cAMP-DC zu machen.

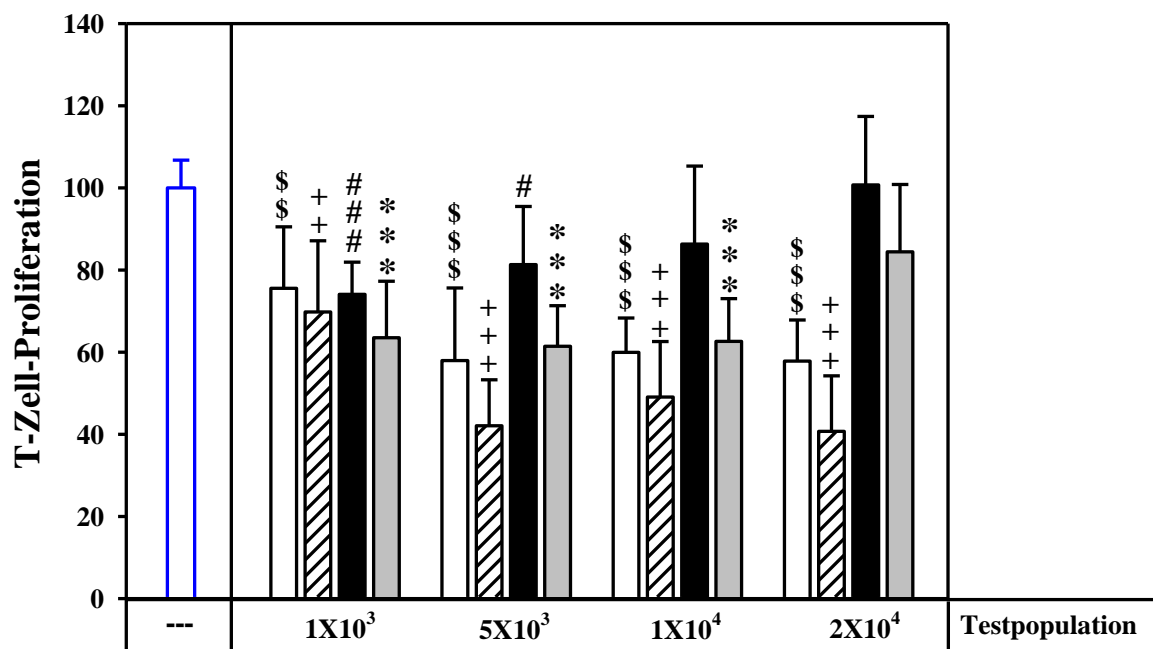
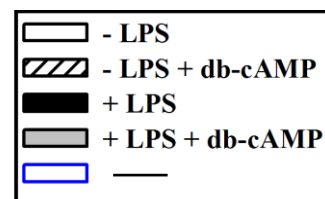


Abb. 25: Suppressionstest mit BM-DC und db-cAMP-DC.

Aliquote der BM-DC-Vorläufer wurden ab Tag 3 der Kultur mit db-cAMP [0,25 mM] differenziert. Zur Ausreifung wurde dem Medium an Tag 9 LPS [1 µg/ml] zugegeben. Als APC dienten bestrahlte stimulierte BM-DC, die in einer Zellzahl von 1×10^4 je Loch einer 96-Loch-Platte eingesetzt

wurden. Als allogene T-Zellen (TC) dienten T-Zellen aus BALB/cJ-Mäusen, die in einer Dichte von 4×10^5 Zellen pro Loch zu den APC zugegeben wurden. Bei den untersuchten Testpopulationen handelt es sich um bestrahlte unstimulierte BM-DC, unstimulierte db-cAMP-DC, stimulierte BM-DC und stimulierte db-cAMP-DC, die in 4 verschiedenen Zellzahlen in Triplikatsansätzen zu den APC und TC zugegeben und für 3 Tage kokultiviert wurden. Anschließend wurde zu den Kokulturen jeweils $0,25 \mu\text{Ci } ^3\text{HTdR}$ pro Loch zugegeben. Nach 16-stündiger Inkubation wurde durch Messen der Radioaktivität die Proliferationsrate der T-Zellen bestimmt. Dargestellt sind der Mittelwert \pm Standardfehler der 2 durchgeführten Experimente, wobei die Proliferation der T-Zellen als Antwort auf 1×10^4 APC gleich 100% gesetzt wurde. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der APC-T-Zell-Kontrolle und unstimulierten BM-DC (\$), unstimulierten db-cAMP-DC (+), stimulierten BM-DC (#) und stimulierten db-cAMP-DC (*) sind angegeben.



3.1.12.2 Einfluss von NOS, ROS und Arginase auf das T-Zell-Stimulierungspotenzial der unterschiedlich differenzierten BM-DC

Der Einfluss von NOS („nitric oxide synthase“), ROS („reactive oxygen species“) und der Arginase 1 auf das allogene T-Zell-Stimulierungspotenzial der vier untersuchten BM-DC Populationen ist in Abbildung 26 gezeigt.

Als APC dienten unstimulierte BM-DC, unstimulierte db-cAMP-DC, stimulierte BM-DC und stimulierte db-cAMP-DC, die mit allogenen T-Zellen kokultiviert wurden. Je ein Ansatz der vier Gruppen blieb unbehandelt als Kontrolle, zu den anderen wurde entweder der NOS-Inhibitor L-NMMA, der Arginase-Inhibitor nor-NOHA oder der ROS-Inhibitor Catalase zugegeben. Wie schon zuvor in Abbildung 2 gezeigt, weisen in Gegenwart von db-cAMP differenzierte unstimulierte und stimulierte BM-DC ein geringeres allogenes T-Zell-Stimulierungspotenzial auf als die jeweils unbehandelte Kontrolle. Durch eine Zugabe des NOS-Inhibitors L-NMMA zu der Kokultur kommt es in keiner der untersuchten Gruppe zu einer veränderten T-Zell-Stimulierungskapazität. Eine Kokultur der BM-DC mit allogenen T-Zellen in Anwesenheit des Arginase 1-Inhibitors nor-NOHA führt bei unstimulierten und stimulierten BM-DC und unstimulierten db-cAMP-DC zu einer signifikant verminderten T-Zell-Proliferation, wohingegen stimulierte db-cAMP-DC kein verändertes T-Zell-Stimulierungspotenzial aufweisen. Die Zugabe des ROS-Inhibitors Catalase hat keinen Effekt auf die T-Zell-Stimulation stimulierter BM-DC und stimulierter db-cAMP-DC, während die T-Zell-Stimulierungsfähigkeit der unstimulierten BM-DC und der unstimulierten db-cAMP-DC verglichen mit der jeweiligen unbehandelten Kontrolle signifikant gesteigert ist.

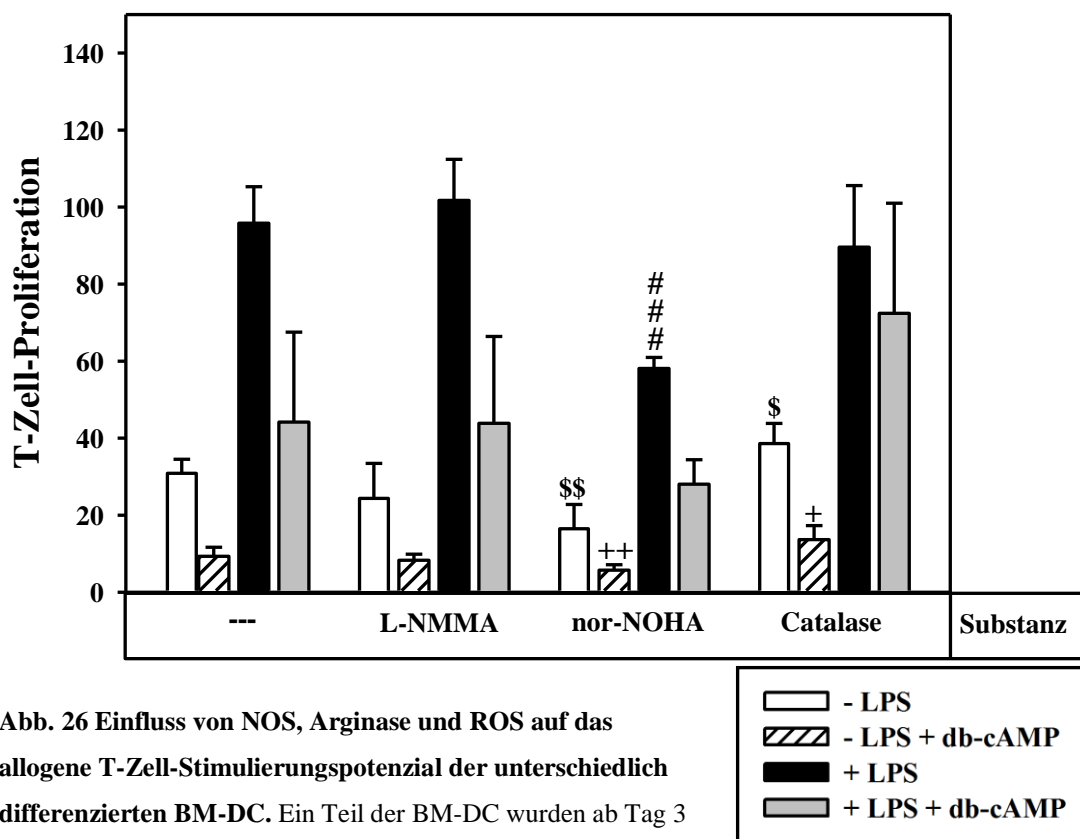


Abb. 26 Einfluss von NOS, Arginase und ROS auf das allogene T-Zell-Stimulierungspotenzial der unterschiedlich differenzierten BM-DC. Ein Teil der BM-DC wurden ab Tag 3

der Kultur mit db-cAMP [0,25 mM] differenziert. Zur Ausreifung

wurde dem Medium an Tag 9 LPS [1 µg/ml] zugegeben. 24 h später wurden die BM-DC geerntet, bestrahlt und in einer Zahl von 2×10^4 Zellen zu 4×10^5 allogenen T-Zellen aus BALB/cJ-Mäusen in Löcher einer 96-Loch-Platte gegeben. Je ein Triplikat verblieb unbehandelt, zu den anderen wurden L-NMMA, nor-NOHA oder Catalase in einer Konzentration von je 0,5 mM zugegeben und die Ansätze 3 Tage kultiviert. Anschließend wurde zu den Kulturen jeweils $0,25 \mu\text{Ci } ^3\text{HTdR}$ pro Loch zugegeben. Nach 16-stündiger Inkubation wurde durch Messen der Radioaktivität die Proliferationsrate der alloreaktiven T-Zellen bestimmt. Dargestellt sind der Mittelwert \pm Standardfehler der 2 durchgeführten Experimente, wobei die Proliferation der T-Zellen als Antwort auf stimulierte BM-DC gleich 100% gesetzt wurde. Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb der jeweiligen BM-DC-Gruppe zwischen den unbehandelten Kontrollen und den mit den verschiedenen Substanzen behandelten Ansätzen sind wie folgt angegeben: unstimuliert (\$), unstimuliert db-cAMP (+), stimuliert (#) und stimuliert db-cAMP (*),

3.1.12.3 Einfluss von NOS, ROS und Arginase auf die suppressiven Eigenschaften der unterschiedlich differenzierten BM-DC

Neben dem Einfluss von NOS, ROS und Arginase 1 auf das allogene T-Zell-Stimulierungspotenzial der vier untersuchten BM-DC Populationen wurde durch ihre Inhibition ebenfalls ihr Einfluss auf die suppressiven Eigenschaften der BM-DC untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 27 dargestellt. Wie zuvor für den Suppressionstest beschrieben, dienten auch hier stimulierte unbehandelte BM-DC als APC. Zu diesen wurden allogene T-Zellen (4×10^5) und die Testpopulationen in einer Zahl von 2×10^4 Zellen pro Ansatz zugegeben. Je einer dieser Ansätze blieb unbehandelt als Kontrolle, zu den anderen wurden der NOS-Inhibitor L-NMMA, der Arginase-Inhibitor nor-NOHA oder der ROS-Inhibitor Catalase zugegeben.

Die mitgeführte Kontrolle ohne Zugabe einer der untersuchten Substanzen stellt das Ergebnis mit 2×10^4 Zellen der jeweiligen Testpopulationen aus Abbildung 25 dar.

Eine Inhibition der NOS durch L-NMMA und der ROS durch Catalase hat bei keiner der vier BM-DC-Populationen einen Einfluss auf die Gesamt-T-Zell-Proliferation. Eine Hemmung der Arginase durch nor-NOHA hingegen führt zu einer Reduktion der T-Zell-Proliferation in den 4 Gruppen verglichen mit der jeweiligen Kontrolle.

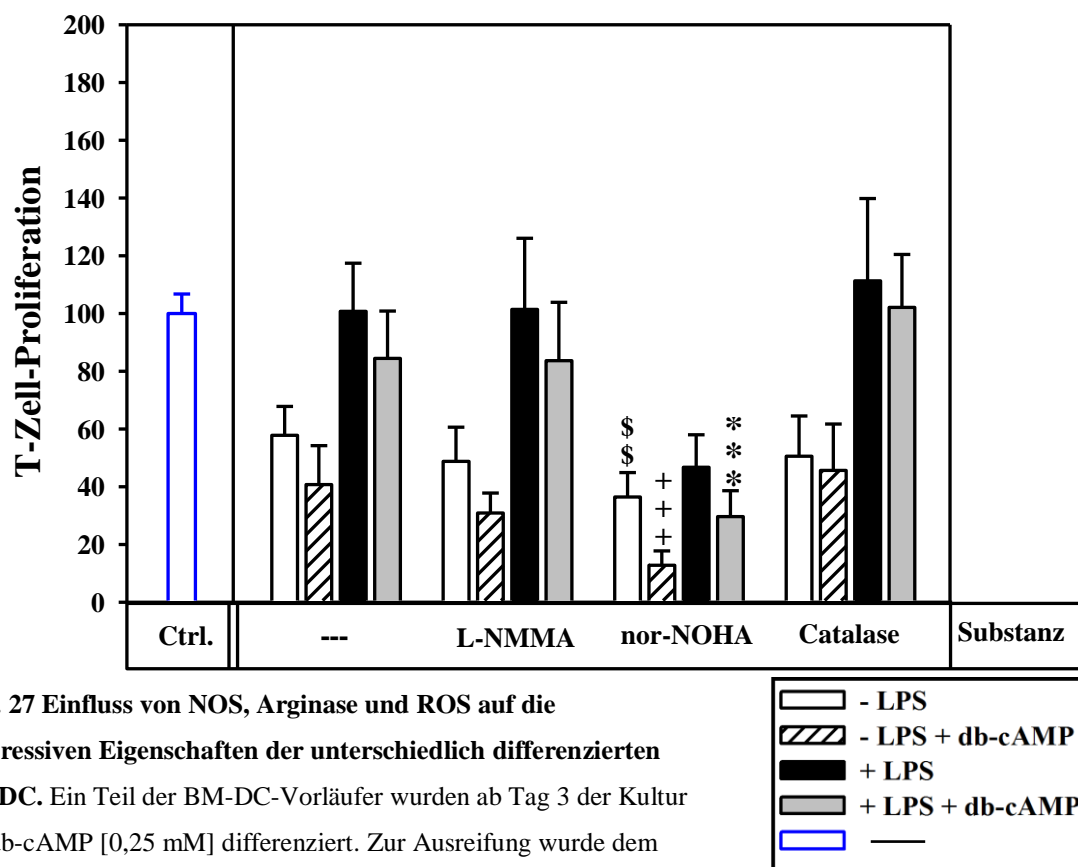


Abb. 27 Einfluss von NOS, Arginase und ROS auf die suppressiven Eigenschaften der unterschiedlich differenzierten BM-DC. Ein Teil der BM-DC-Vorläufer wurden ab Tag 3 der Kultur mit db-cAMP [0,25 mM] differenziert. Zur Ausreifung wurde dem Medium an Tag 9 LPS [1 µg/ml] zugegeben. Als APC dienten

bestrahlte stimulierte BM-DC, die in einer Zellzahl von 1×10^4 je Loch einer 96-Loch-Platte eingesetzt wurden. Als allogene T-Zellen (TC) dienten T-Zellen aus BALB/cJ-Mäusen, die in einer Dichte von 4×10^5 Zellen pro Loch zu den APC zugegeben wurden. Bei den untersuchten Testpopulationen handelt es sich um bestrahlte unstimulierte BM-DC, unstimulierte db-cAMP-DC, stimulierte BM-DC und stimulierte db-cAMP-DC, die in einer Zellzahl von 2×10^4 in Triplikatansatz zu den APC und TC zugegeben wurden. Zu Parallel-Ansätzen wurden L-NMMA, nor-NOHA oder Catalase in einer Konzentration von je 0,5 mM zugegeben und die Ansätze 3 Tage kokultiviert. Anschließend wurde zu den Kulturen jeweils $0,25 \mu\text{Ci } ^3\text{HTdR}$ pro Loch zugegeben. Nach 16-stündiger Inkubation wurde durch Messen der Radioaktivität die Proliferationsrate der alloreaktiven T-Zellen bestimmt. Dargestellt sind der Mittelwert \pm Standardfehler der 2 durchgeführten Experimente, wobei die Proliferation der T-Zellen als Antwort auf 1×10^4 APC gleich 100% gesetzt wurde. Statistisch signifikante Unterschiede innerhalb der jeweiligen BM-DC-Gruppe zwischen den unbehandelten Kontrolle und der mit den verschiedenen Substanzen behandelten Ansätzen sind wie folgt angegeben: unstimuliert (\$), unstimuliert db-cAMP (+), stimuliert (#) und stimuliert db-cAMP (*).

3.2 Etablierung der lentiviralen Transduktion von SP37A3-Zellen

Um zu überprüfen, ob Gene in der DC-Linie SP37A3 mit Hilfe lentiviraler Transduktion überexprimiert werden können, wurden die Zellen zum Einen mit virushaltigen Überständen und zum Anderen mit konzentriertem Virus transduziert.

Neben SP37A3-Zellen wurden noch HEK 293T-Zellen und BM-DC als Positivkontrollen mitgeführt. HEK 293T-Zellen sind Zellen, die vergleichsweise einfach kultivierbar und transduzierbar sind. Von BM-DC ist ebenfalls bekannt, dass ein lentiviraler Gentransfer möglich ist [Dullaers und Thielemans, 2006].

Das Schema der Durchführung der Transduktion der 3 unterschiedlichen Zelltypen ist in Abbildung 28 dargestellt. Abbildung 28A zeigt den zeitlichen Ablauf für SP37A3, Abb. 28B für HEK 293T-Zellen und Abb. 28C für BM-DC.

Die SP37A3 Zellen wurden ausgesät (Tag 0) und an Tag drei und vier mit virushaltigen Überständen oder konzentriertem Virus transduziert. An Tag sechs erfolgte ein Mediumwechsel mit zweimaligem Waschen der Zellen, damit diese potenziell ausgereift werden können. Die Ausreifung wurde durch Zugabe von LPS induziert. Unstimulierte SP37A3-Zellen werden in Anwesenheit von M-CSF kultiviert, das eine Ausreifung verhindert. Drei Tage nach der zweiten Behandlung mit Virus wurden die SP37A3-Zellen mittels FACS-Analyse auf die Expression des Reporters EGFP und mittels FACS-Analyse oder ELISA auf die Expression des jeweiligen Transgens hin untersucht.

Die lentivirale Transduktion der HEK 293T- ähnelt der von SP37A3-Zellen. Die Zellen wurden jedoch direkt am Tag nach dem Aussäen mit Virus behandelt. Die HEK 293T-Zellen wurden analog zu den SP37A3-Zellen einen Tag vor der Analyse der Transduktionseffizienz und der Transgenexpression gewaschen.

Zur Generierung lentiviral transduzierter BM-DC wurde an Tag 0 Knochenmark aus C57BL/6-Mäusen gewonnen, unter DC-Differenzierungsbedingungen kultiviert und an Tag zwei mit frischem Medium versorgt. An den Tagen 5 und 6 erfolgten die Transduktionen. Im Gegensatz zu den beiden anderen Zell-Typen wurden die BM-DC vor der Analyse der EGFP- und der Transgenexpression nicht gewaschen.

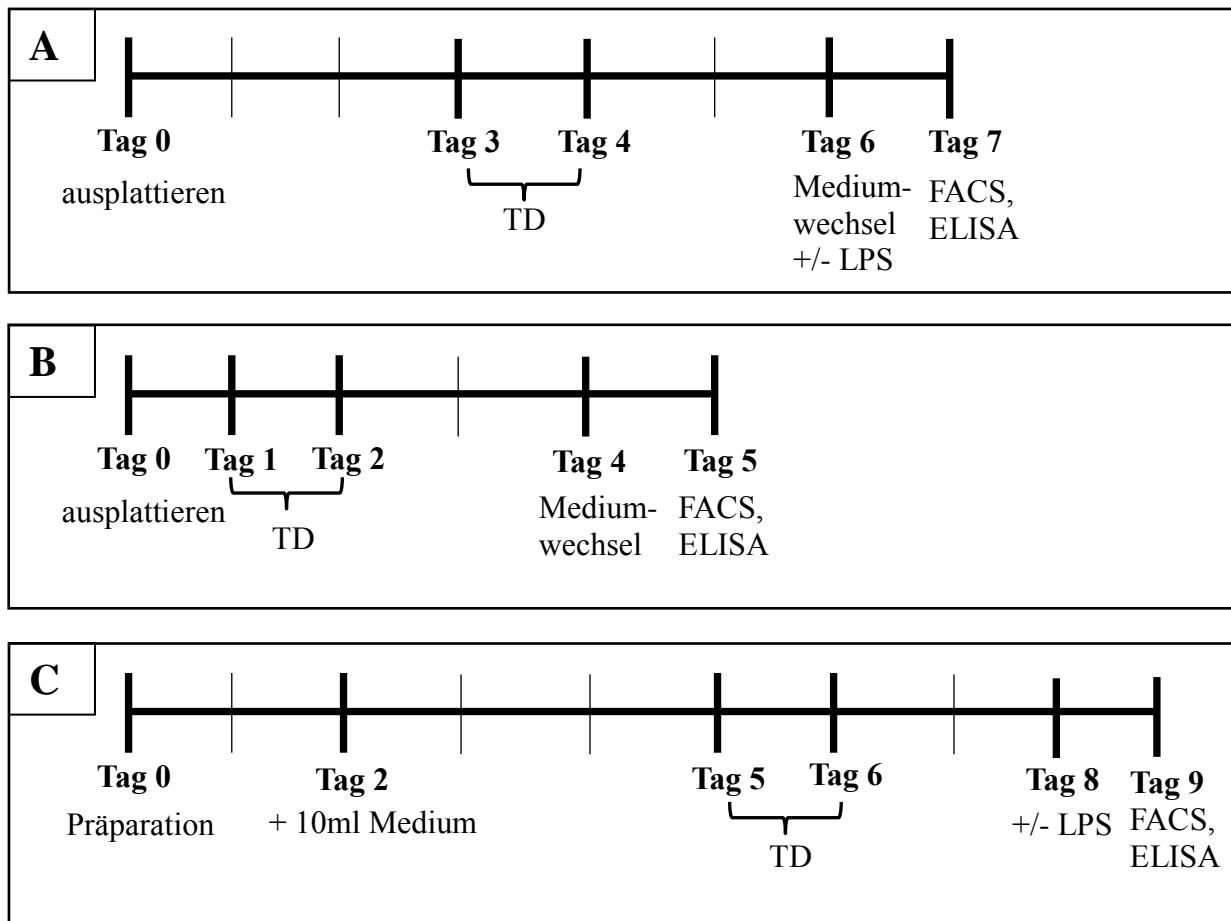


Abb. 28 Schematische Darstellung der Transduktion (TD) von (A) SP37A3-Zellen, (B) HEK 293T-Zellen und (C) BM-DC mit lentiviralen Partikeln.

3.2.1 Versuche mit virushaltigen Überständen

3.2.1.1 Transduktion von SP37A3-Zellen mit für B7-H3 kodierenden virushaltigen Überständen

Zunächst wurden mit Hilfe von HEK 293T-Zellen, den Expressionsplasmiden pCDH1-B7-H3-EF1-copEGFP bzw. pCDH1-MCS1-EF1-copEGFP (Leervektorkontrolle = LV) und den Helferplasmiden PCMVΔR8.91 (Georg-Speyer Haus, Frankfurt) und PMD.G virushaltige Überstände produziert. Mit diesen wurden die SP37A3-Zellen wie in Abbildung 28 beschrieben transduziert und anschließend mittels FACS-Analyse auf ihre Expression des Reporters EGFP und auf ihre B7-H3 Expression hin untersucht. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte SP37A3-Zellen.

Die Ergebnisse der lentiviralen Transduktion immaturer SP37A3 mit virushaltigen B7-H3-Überständen ist in Abbildung 29 dargestellt. Anhand der Abb. 29A ist zu erkennen, dass sich die Granularität der SP37A3-Zellen nach der Behandlung mit virushaltigen Überständen im Vergleich zu der Kontrolle erhöht. Im FSC/SSC eingegrenzte Zellen wurden zunächst auf ihre Expression an EGFP hin untersucht. Die Ergebnisse der EGFP-Fluoreszenz sind in Abbildung 29B dargestellt. Anhand der negativen Kontroll-Zellen wurde eine Abgrenzung zur Trennung positiver und negativer Zellen gezogen. In diesem Beispiel können mit dem virushaltigen LV-Überstand 86% und mit dem B7-H3 Überstand 97% EGFP-positive Zellen detektiert werden. Sowohl bei den Kontroll-SP37A3 als auch bei den LV- und B7-H3-transduzierten SP37A3-Zellen sind keine B7-H3 positiven Zellen zu finden (Abb. 29C)

Wie zuvor für die immaturen SP37A3-Zellen wurde auch mit SP37A3-Zellen verfahren, die nach der Transduktion mit LPS stimuliert wurden. Die Ergebnisse für die stimulierten SP37A3-Zellen sind in Abbildung 30 dargestellt. Auch bei den stimulierten SP37A3-Zellen steigt die Granularität der Zellen durch die Transduktion im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle an (Abb. 30A). Sowohl bei den LV- als auch bei den B7-H3-transduzierten SP37A3-Zellen sind über 95% EGFP-positive Zellen zu beobachten (Abb. 30B). Wie auch bei den immaturen BM-DC ist in keiner der drei untersuchten Gruppen eine B7-H3-Expression auf der Zell-Oberfläche vorhanden (Abb. 30C).

3.2.1.2 Transduktion von BM-DC mit virushaltigen B7-H3 Überständen

Wie die Abb. 31A zeigt, wird durch die Transduktion der unstimulierten BM-DC mit den virushaltigen Überständen weder die Größe noch die Granularität der Zellen im Vergleich zu der Negativkontrolle verändert. Im FSC/SSC eingegrenzte Zellen wurden auf ihre Expression an EGFP und B7-H3 hin untersucht. Die Ergebnisse der EGFP-Fluoreszenznachweise sind in Abbildung 31B dargestellt. Anhand der negativen Kontroll-Zellen wurde eine Abgrenzung zur Trennung positiver und negativer Zellen gezogen, um die prozentuale Anzahl positiver Zellen bestimmen zu können. In diesem Beispiel können mit dem virushaltigen LV-Überstand 86% und mit dem B7-H3 Überstand 84% EGFP-positive Zellen beobachtet werden. In allen drei untersuchten BM-DC-Gruppen sind keine B7-H3 positiven Zellen zu beobachten (Abb. 31C).

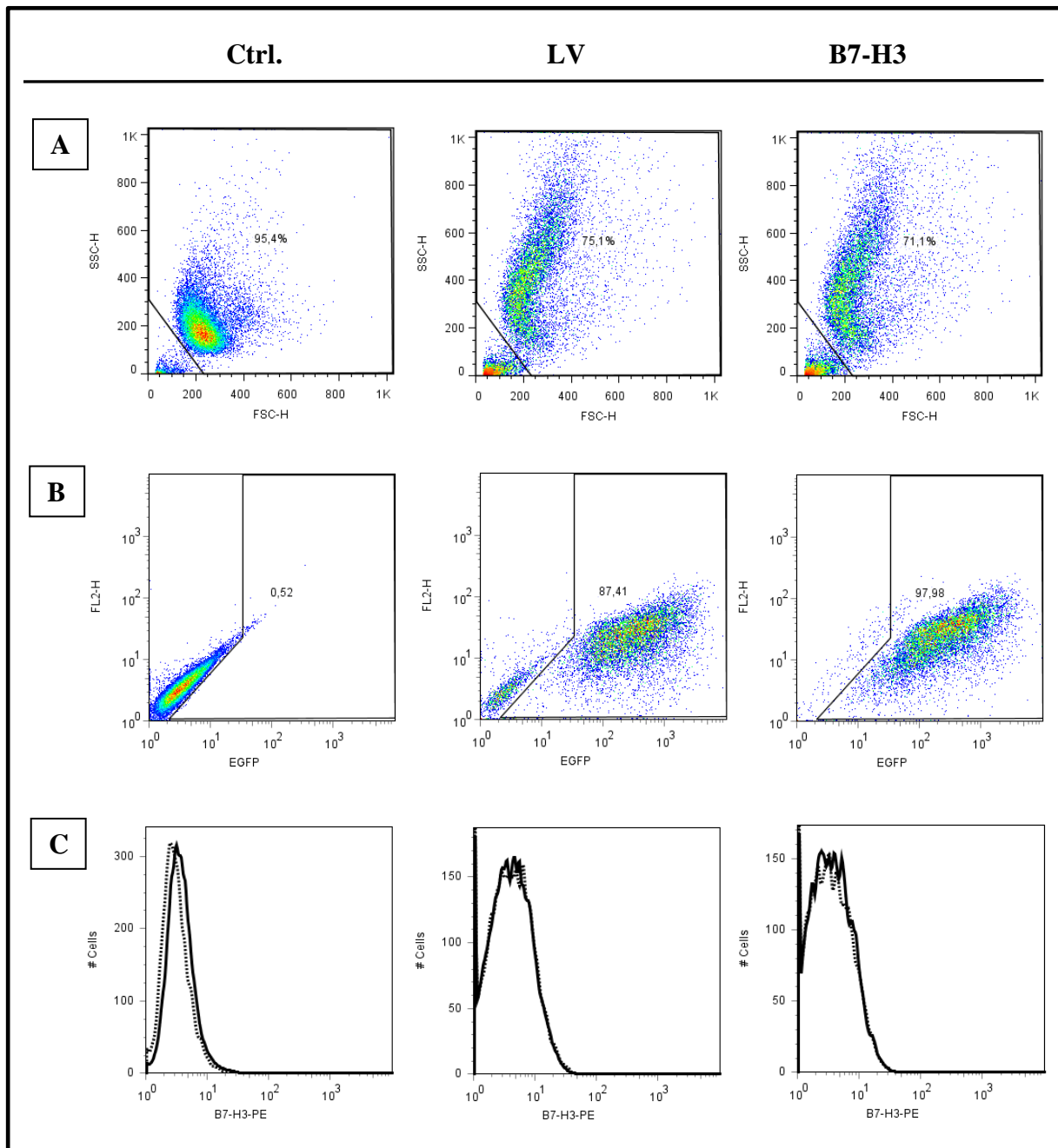


Abb. 29 Lentivirale Transduktion mit virushaltigen Überständen zur Überexpression von B7-H3 auf der Oberfläche von immaturren SP37A3. SP37A3-Zellen wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit Leervektor (LV) oder für B7-H3 kodierenden virushaltigen Überständen transduziert. Aliquote der Zellen wurden als Kontrolle (Ctrl.) parallel dazu mit Medium behandelt. 48 h später wurden die unterschiedlich behandelten Zellen gewaschen, nach weiteren 24 h geerntet und auf ihre Expression von EGFP und mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern auf ihre Oberflächenexpression von B7-H3 hin untersucht. Hierfür wurden die Zellen zunächst im FCS/SSC eingegrenzt (A) und dann innerhalb der eingegrenzten Populationen die Prozentzahl an EGFP-positiven Zellen (B) und mit Hilfe eines Isotypkontroll-Antikörpers als Kontrolle die B7-H3-Expression (C) bestimmt. Gestrichelt dargestellt ist die jeweilige Isotypkontrolle. Die Histogramme sind repräsentativ für 2 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

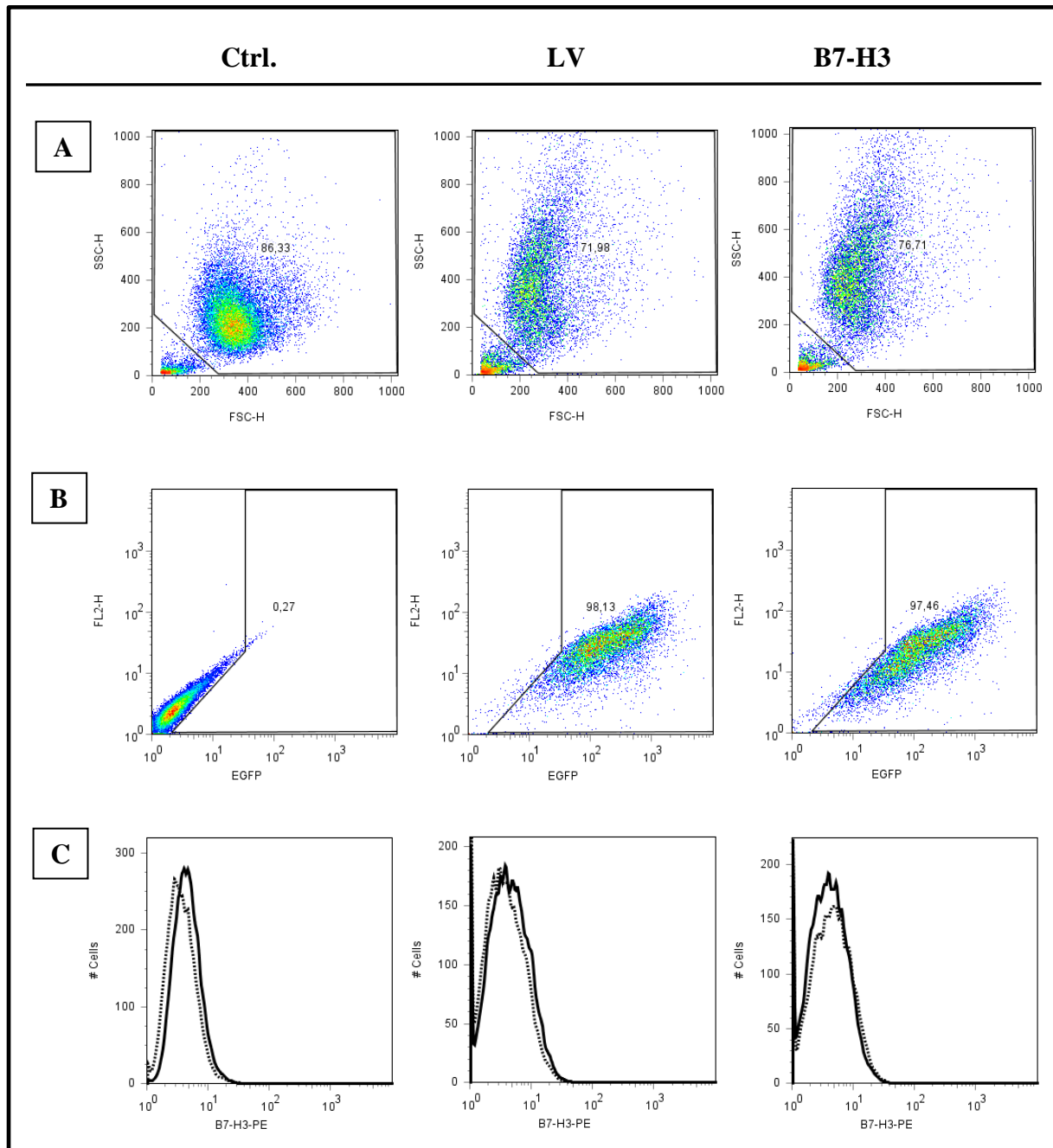


Abb. 30 Lentivirale Transduktion mit virushaltigen Überständen zur Überexpression von B7-H3 auf der Oberfläche von stimulierten SP37A3-Zellen. SP37A3-Zellen wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit Leervektor (LV) oder für B7-H3 kodierenden virushaltigen Überständen transduziert. Aliquote der Zellen wurden als Kontrolle (Ctrl.) parallel dazu mit Medium behandelt. 48 h später wurden die unterschiedlich behandelten Zellen gewaschen, mit LPS [100 ng/ml] stimuliert, nach weiteren 24 h geerntet und auf ihre Expression von EGFP und mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern auf ihre Oberflächenexpression von B7-H3 hin untersucht. Hierfür wurden die Zellen zunächst im FCS/SSC eingegrenzt (A) und dann innerhalb der eingegrenzten Populationen die Prozentzahl an EGFP-positiven Zellen (B) und mit Hilfe eines Isotypkontroll-Antikörpers als Kontrolle die B7-H3-Expression (C) bestimmt. Gestrichelt dargestellt ist die jeweilige Isotypkontrolle. Die Histogramme sind repräsentativ für 2 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

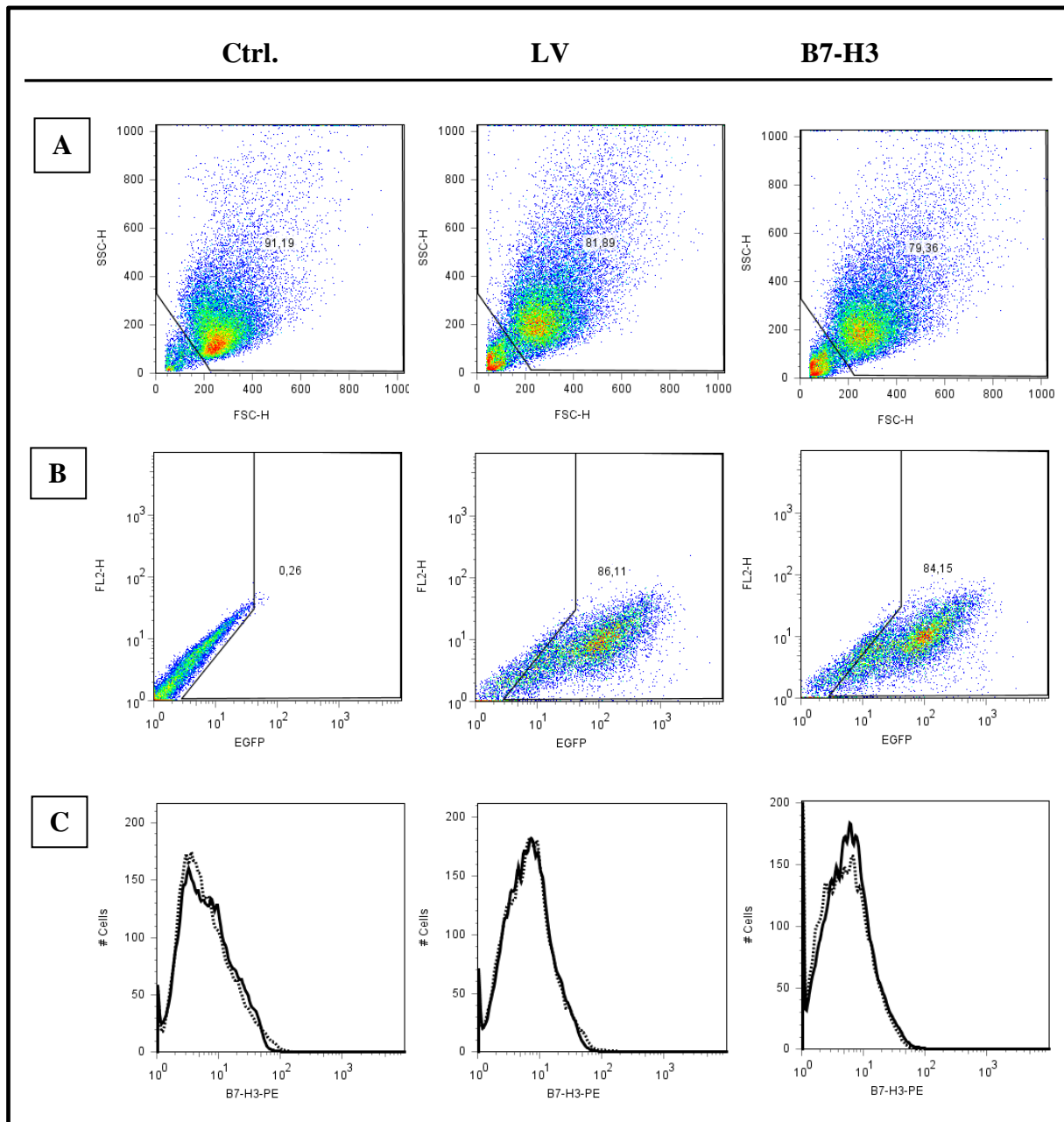


Abb. 31 Lentivirale Transduktion mit virushaltigen Überständen zur Überexpression von B7-H3 auf der Oberfläche von immaturren BM-DC. BM-DC-Vorläuferzellen wurden ab Tag 5 der Kultur an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit Leervektor (LV) oder für B7-H3 kodierenden virushaltigen Überständen transduziert. Aliquote der Zellen wurden als Kontrolle (Ctrl.) parallel dazu mit Medium behandelt. 72 h später wurden die Zellen geerntet und auf ihre Expression von EGFP und mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörpern auf ihre Oberflächenexpression von B7-H3 hin untersucht. Hierfür wurden die Zellen zunächst im FCS/SSC eingegrenzt (A) und dann innerhalb der eingegrenzten Populationen die Prozentzahl an EGFP-positiven Zellen (B) und mit Hilfe eines Isotypkontroll-Antikörpers als Kontrolle die B7-H3-Expression (C) bestimmt. Gestrichelt dargestellt ist die jeweilige Isotypkontrolle. Die Histogramme sind repräsentativ für 2 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Wie zuvor für die unstimulierten BM-DC wurde auch mit LPS-stimulierten transduzierten BM-DC verfahren. Die Ergebnisse der FACS-Analyse der stimulierten BM-DC sind in Abbildung 32 dargestellt. Auch bei den stimulierten BM-DC ändert eine lentivirale Transduktion mit Virusüberständen nichts an der Größe und der Granularität der Zellen (Abb. 32A). Bei den LV-BM-DC sind in diesem Beispiel über 91% und bei den B7-H3-transduzierten BM-DC sind 86% EGFP-positive Zellen zu beobachten (Abb. 32B). Wie bei den immaturren BM-DC ist auch in keiner der drei untersuchten Gruppen LPS-stimulierter BM-DC eine B7-H3-Expression auf der Zell-Oberfläche zu beobachten (Abb. 32C).

3.2.1.3 Transduktion von HEK 293T-Zellen mit virushaltigen B7-H3 Überständen und Transfektion mit B7-H3 Plasmid-DNA

Da nach einer Transduktion mit virushaltigen B7-H3 Überständen keine Expression des Transgens in SP37A3-Zellen und BM-DC nachweisbar war, wurden zusätzlich HEK 293T-Zellen mit den LV- und B7-H3-virushaltigen Überständen transduziert, da es in dieser Zelllinie einfach ist, Gene auch mittels non-viralem Gentransfer zu überexprimieren. Als Positivkontrolle wurden HEK 293T-Zellen mit Hilfe der Calcium-Phosphat-Methode mit den Plasmiden pCDH1-MCS1-EF1-copEGFP oder pCDH1-B7-H3-EF1-copEGFP transfiziert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte HEK 293T-Zellen. Die transduzierten und transfizierten HEK 293T-Zellen wurden mittels FACS-Analyse auf ihre Expression von EGFP und B7-H3 hin untersucht.

Die Ergebnisse für die mit den viralen Überständen transduzierten HEK 293T-Zellen sind in Abbildung 33 dargestellt. Nach Eingrenzung der lebenden Zellen im FSC/SSC (Abb. 33A) wurde innerhalb der eingegrenzten Population die EGFP-Fluoreszenz und die B7-H3-Expression untersucht. Sowohl bei LV- als auch bei B7-H3 transduzierten HEK 293T-Zellen ist eine EGFP-Fluoreszenz zu beobachten, die jedoch lediglich eine geringe Intensität hat (Abb. 33B). In allen untersuchten Gruppen sind kaum B7-H3-positiven Zellen zu beobachten (Abb. 33C)

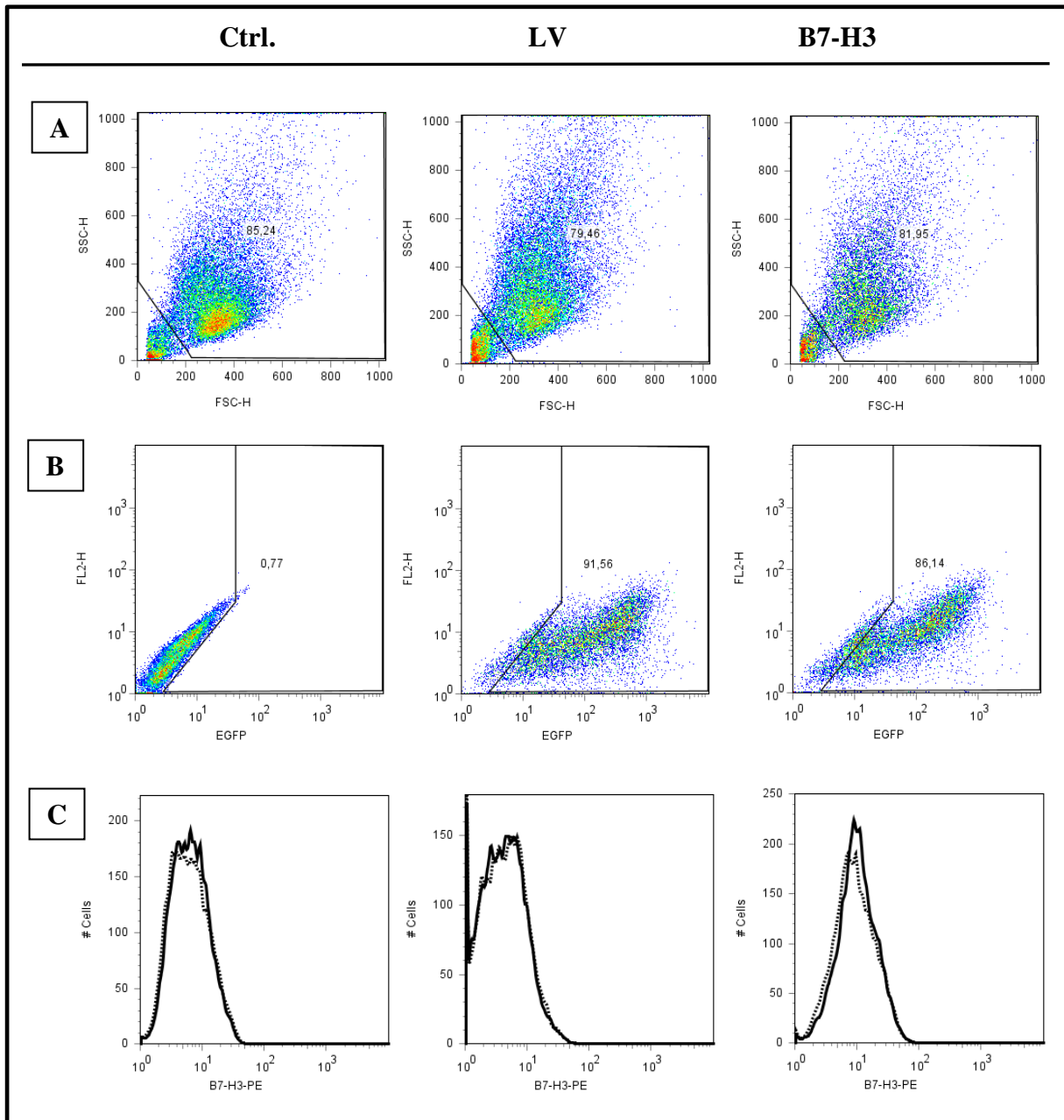


Abb. 32 Lentivirale Transduktion mit virushaltigen Überständen zur Überexpression von B7-H3 auf der Oberfläche von stimulierten BM-DC. BM-DC-Vorläuferzellen wurden ab Tag 5 der Kultur an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit Leervektor (LV) oder für B7-H3 kodierenden virushaltigen Überständen transduziert. Aliquote der Zellen wurden als Kontrolle (Ctrl.) parallel dazu mit Medium behandelt. 48 h später wurden die Zellen mit LPS [1 µg/ml] ausgereift und weitere 24 h später auf ihre Expression von EGFP und mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern auf ihre Oberflächenexpression von B7-H3 hin untersucht. Hierfür wurden die Zellen zunächst im FCS/SSC eingegrenzt (A) und dann innerhalb der eingegrenzten Populationen die Prozentzahl an EGFP-positiven Zellen (B) und mit Hilfe eines Isotypkontroll-Antikörpers als Kontrolle die B7-H3-Expression (C) bestimmt. Gestrichelt dargestellt ist die jeweilige Isotypkontrolle. Die Histogramme sind repräsentativ für 2 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

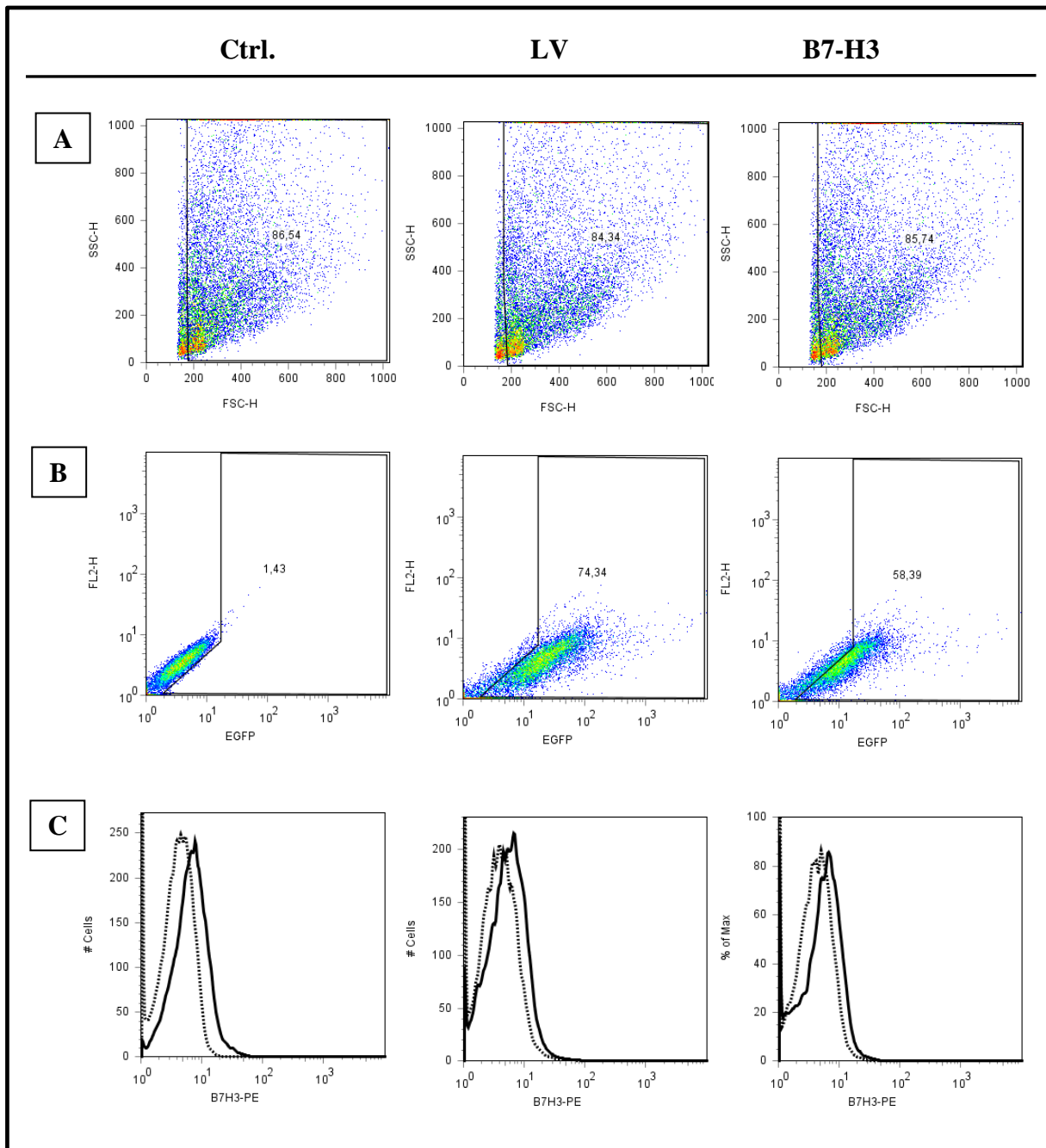


Abb. 33 Lentivirale Transduktion mit virushaltigen Überständen zur Überexpression von B7-H3 auf der Oberfläche von HEK 293T-Zellen. HEK 293T-Zellen wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit Leervektor (LV) oder für B7-H3 kodierenden virushaltigen Überständen transduziert. Aliquote der Zellen wurden als Kontrolle (Ctrl.) parallel dazu mit Medium behandelt. 48 h später wurden die Zellen gewaschen, weitere 24 h später auf ihre Expression von EGFP und mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern auf ihre Oberflächenexpression von B7-H3 hin untersucht. Hierfür wurden die Zellen zunächst im FCS/SSC eingegrenzt (A) und dann innerhalb der eingegrenzten Populationen die Prozentzahl an EGFP-positiven Zellen (B) und mit Hilfe eines Isotypkontroll-Antikörpers als Kontrolle die B7-H3-Expression (C) bestimmt. Gestrichelt dargestellt ist die jeweilige Isotypkontrolle. Die Histogramme sind repräsentativ für 2 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Die Ergebnisse der Transfektion der HEK 293T-Zellen mit Plasmid-DNA sind in Abbildung 34 dargestellt. Die Transfektion der Zellen erhöht ihre Granularität verglichen mit den unbehandelten Kontroll-Zellen (Abb. 34A). Wie in Abb. 34B zu sehen, führt die Transfektion der HEK 293T-Zellen zu einer starken EGFP-Fluoreszenz. Wie in Abbildung 34C zu sehen ist, exprimieren die B7-H3 transfizierten-HEK 293T-Zellen B7-H3 auf ihrer Oberfläche.

3.2.1.4 Lentivirale Transduktion mit für IL-10 kodierenden virushaltigen Überständen

Da wie in 3.2.1.1 – 3.2.1.3 gezeigt eine Überexpression von B7-H3 in SP37A3-Zellen, BM-DC und HEK 293T-Zellen mittels einer Transduktion mit virushaltigen Überständen nicht möglich ist, wurden SP37A3-Zellen und BM-DC mit IL-10 Virusüberständen transduziert, um zu sehen, ob hierbei eine Expression dieses Transgen erreicht werden kann.

Hierfür wurden zunächst mittels HEK 293T-Zellen, die mit den Expressionsplasmiden pCDH1-IL-10-EF1-copEGFP bzw. pCDH1-MCS1-EF1-copEGFP (Leervektorkontrolle = LV) und den Helferplasmiden PCMV Δ R8.91 (Georg-Speyer Haus, Frankfurt) und PMD.G transfiziert wurden, virushaltige Überstände produziert. SP37A3-Zellen und BM-DC wurden mit diesen transduziert und ihre Kulturüberstände anschließend mittels ELISA auf ihren Gehalt an IL-10 hin untersucht. Als Negativkontrolle dienten jeweils unbehandelte Zellen.

3.2.1.4.1 Transduktion von SP37A3-Zellen mit für IL-10 kodierenden virushaltigen Überständen

Die Ergebnisse der Transduktion von SP37A3-Zellen mit IL-10-Virusüberständen sind in Abbildung 35 gezeigt. In den Kulturüberständen aller untersuchten Gruppen sind lediglich geringe Mengen an IL-10 detektierbar. Des Weiteren gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen.

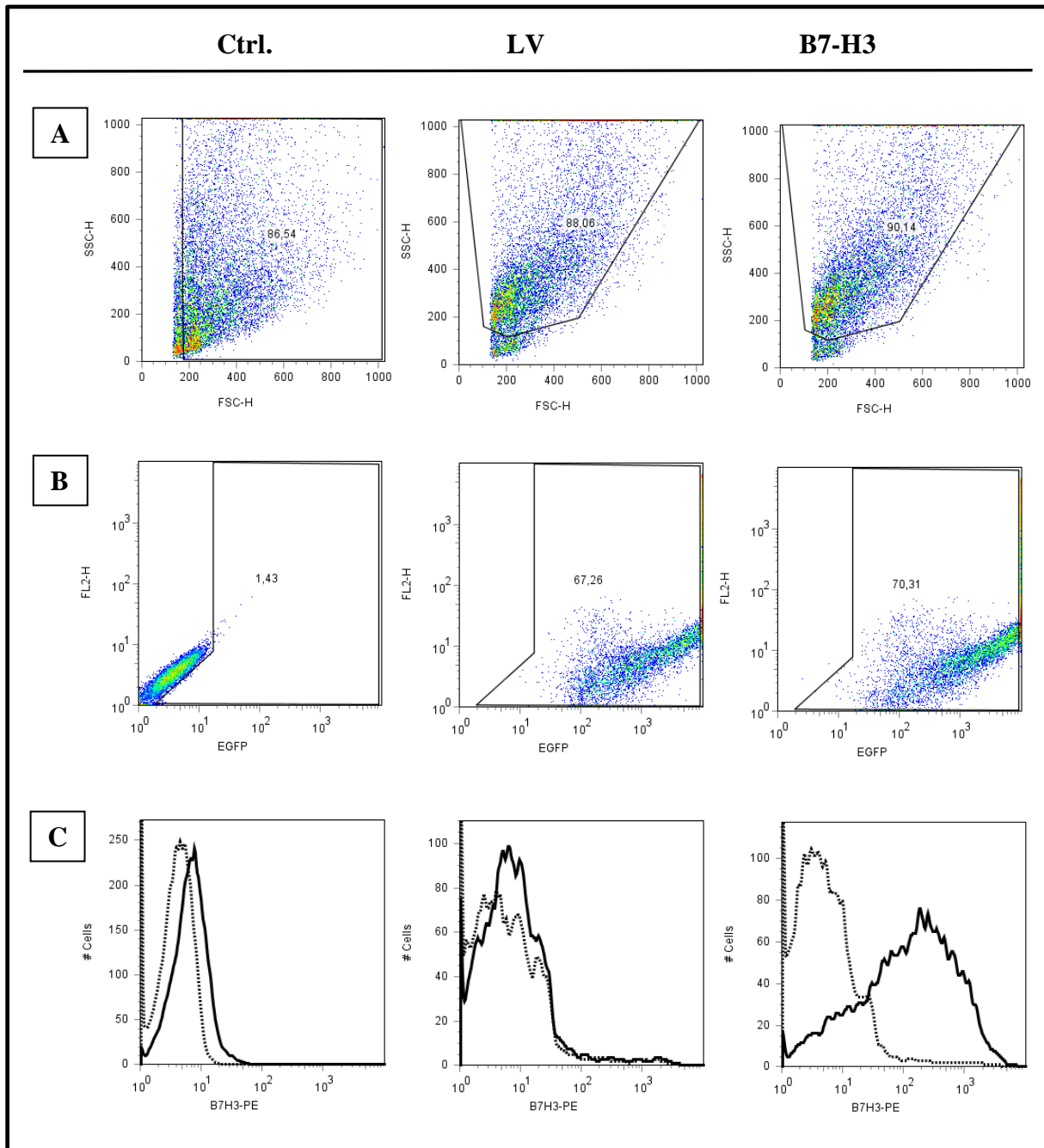


Abb. 34 Transfektion mit Plasmis-DNA zur Überexpression von B7-H3 auf der Oberfläche von HEK 293T-Zellen. HEK 293T-Zellen wurden mit Hilfe der Calcium-Phosphat-Methode mit Plasmid-DNA transfiziert. Aliquote der Zellen wurden als Kontrolle (Ctrl.) parallel dazu in Medium alleine kultiviert. 72 h später wurden die Zellen auf ihre Expression von EGFP und mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern auf ihre Oberflächenexpression von B7-H3 hin untersucht. Hierfür wurden die Zellen zunächst im FCS/SSC eingegrenzt (A) und dann innerhalb der eingegrenzten Populationen die Prozentzahl an EGFP-positiven Zellen (B) und mit Hilfe eines Isotypkontroll-Antikörpers als Kontrolle die B7-H3-Expression (C) bestimmt. Gestrichelt dargestellt ist die jeweilige Isotypkontrolle. Die Histogramme sind repräsentativ für 2 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

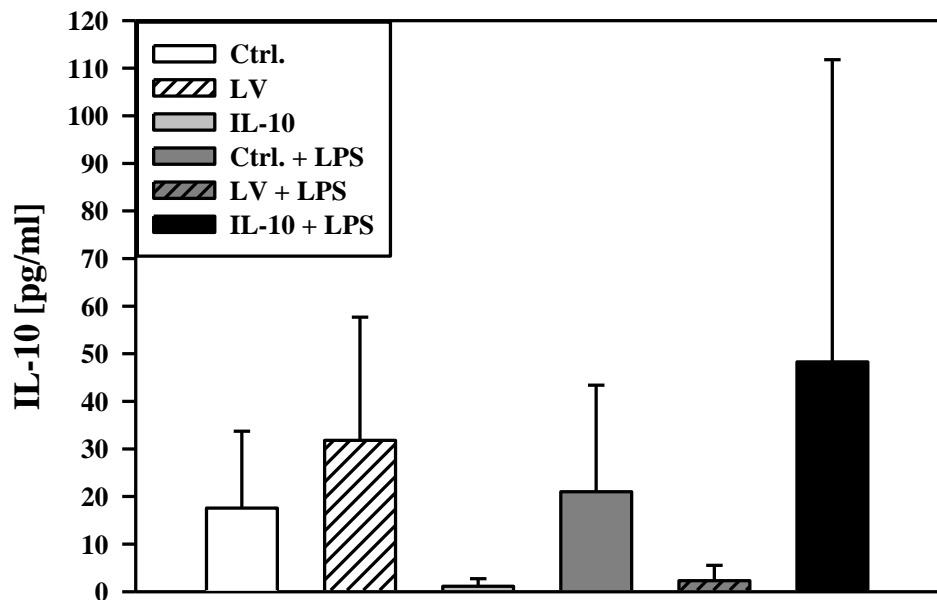


Abb. 35 Lentivirale Transduktion mit virushaltigen Überständen zur Überexpression von IL-10 in SP37A3-Zellen. SP37A3-Zellen wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit Leervektor (LV) oder für IL-10 kodierenden virushaltigen Überständen transduziert. Aliquote der Zellen wurden als Kontrolle (Ctrl.) parallel dazu mit Medium behandelt. 48 h später wurden die unterschiedlich behandelten Zellen gewaschen, die Hälfte der Zellen mit LPS [100 ng/ml] stimuliert und nach weiteren 24 h wurde der Kulturüberstand der SP37A3-Zellen gesammelt und mittels ELISA auf den Gehalt an IL-10 hin getestet. Dargestellt sind der Mittelwert \pm Standardfehler der 3 durchgeführten Experimente. Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen.

3.2.1.4.2 Transduktion von BM-DC mit für IL-10 kodierenden virushaltigen Überständen

In Abbildung 36 sind die Ergebnisse der Transduktion von BM-DC mit virushaltigen IL-10-Überständen dargestellt. In den Kulturüberständen der Kontroll-BM-DC und der LV-BM-DC sind geringe Mengen an IL-10 nachweisbar. In den Überständen der IL-10-BM-DC ist die Menge an IL-10 gegenüber den anderen beiden Gruppen signifikant gesteigert.

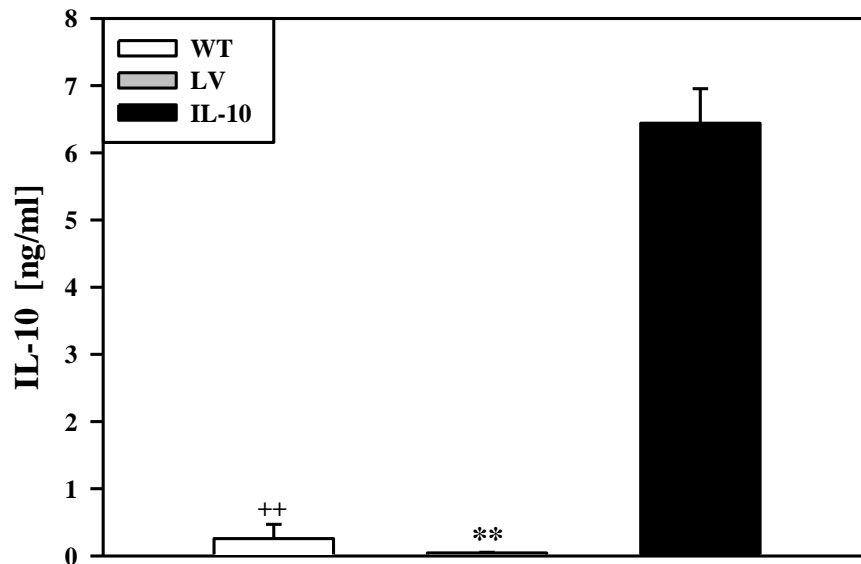


Abb. 36 Lentivirale Transduktion mit virushaltigen Überständen zur Überexpression von IL-10 in immaturren BM-DC. Die BM-DC Vorläuferzellen wurden ab Tag 5 der Kultur an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit Leervektor (LV) oder für IL-10 kodierenden virushaltigen Überständen transduziert. Aliquote der Zellen wurden als Kontrolle (Ctrl.) parallel dazu mit Medium behandelt. 72 h später wurde der Kulturüberstand der BM-DC gesammelt und mittels ELISA auf den Gehalt an IL-10 hin getestet. Dargestellt sind der Mittelwert \pm Standardfehler der 2 durchgeführten Experimente. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Ctrl.-BM-DC und IL-10-transduzierten BM-DC (+) und LV- und IL-10-transduzierten BM-DC (*) sind angegeben.

3.2.1.4.3 Transduktion von SP37A3-Zellen mit für IL-10 kodierenden virushaltigen Überständen: Verfahren nach dem Protokoll für BM- DC

Da die lentivirale Transduktion mit virushaltigen IL-10-Überständen nicht zu einer vermehrten Sezernierung von IL-10 in den Kulturüberstand der SP37A3-Zellen führt (3.2.1.4.2), wurde in einem weiteren Versuch mit den SP37A3 ähnlich wie mit den BM-DC verfahren. Die SP37A3-Zellen wurden mit virushaltigen Überständen transduziert und abweichend von dem Standardprotokoll wurde vor dem Waschen und Ausreifen der Zellen der Kulturüberstand gesammelt und ebenfalls mittels ELISA auf seinen IL-10-Gehalt hin getestet. 24 und 72 Stunden nach dem Waschen der Zellen wurden erneut Kulturüberstände gesammelt und auf ihren IL-10-Gehalt untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 37 dargestellt. Wie in Abb. 37A zu sehen ist, können in den Überständen aller Kontroll-Gruppen nur geringe Mengen an IL-10 gemessen werden. Es gibt keine signifikanten Unterschiede innerhalb der unterschiedlichen Gruppen der untransduzierten Kontroll-SP37A3-Zellen. Dies trifft ebenfalls für die LV-SP37A3-Zellen zu (Abb. 37B). In den Kulturüberständen der IL-10-SP37A3-Zellen, bei denen vor dem Waschen der Kulturüberstand gesammelt wurde, sind

ca. 20 ng/ml IL-10 detektierbar. Dies ist signifikant mehr als im Überstand der Kontroll- und LV-SP37A3 vor dem Waschen. Sowohl 24 als auch 72 Stunden nach dem Waschen sind signifikant kleinere IL-10 Mengen ($< 0,1$ ng/ml) in den Überständen immaturer und stimulierter SP37A3-Zellen nachweisbar (Abb. 37C).

3.2.1.4.4 Transduktion von BM-DC mit für IL-10 kodierenden virushaltigen Überständen: Verfahren nach dem Protokoll für SP37A3-Zellen

Da nur in den Überständen von IL-10-SP37A3-Zellen, die vor dem Messen des IL-10-Gehaltes in ihren Überständen nicht gewaschen wurden große Mengen an IL-10 nachgewiesen werden konnten, wurden in einem weiteren Versuch Aliquote der BM-DC vor dem IL-10-Nachweis gewaschen. Als weitere Kontrolle neben unbehandelten BM-DC diente ein Ansatz, in dem keine Zellen, sondern nur IL-10 Virusüberstand vorhanden war. Mit diesem Kontrollansatz wurde so verfahren, wie mit den IL-10-BM-DC. Die Ergebnisse dieses Experimentes sind in Abbildung 38 dargestellt. In den Überständen der Kontroll- und LV-BM-DC ist wie zuvor beschrieben kaum IL-10 nachweisbar (siehe 3.2.1.4.2). In den Überständen der nicht gewaschenen IL-10-DC ist die Menge an IL-10 im Vergleich dazu signifikant auf etwa 25 ng/ml gesteigert. In den Kulturüberständen der IL-10-DC, die 24 h vor der Entnahme des Kulturüberstandes gewaschen wurden, ist 1 ng/ml IL-10 detektierbar. Das ist eine signifikant geringere IL-10-Menge im Vergleich zu den ungewaschenen Zellen. In dem Kontrollansatz ohne Zellen ist eine vergleichbare Menge an IL-10 vorhanden wie in den Überständen der nicht gewaschenen IL-10-DC.

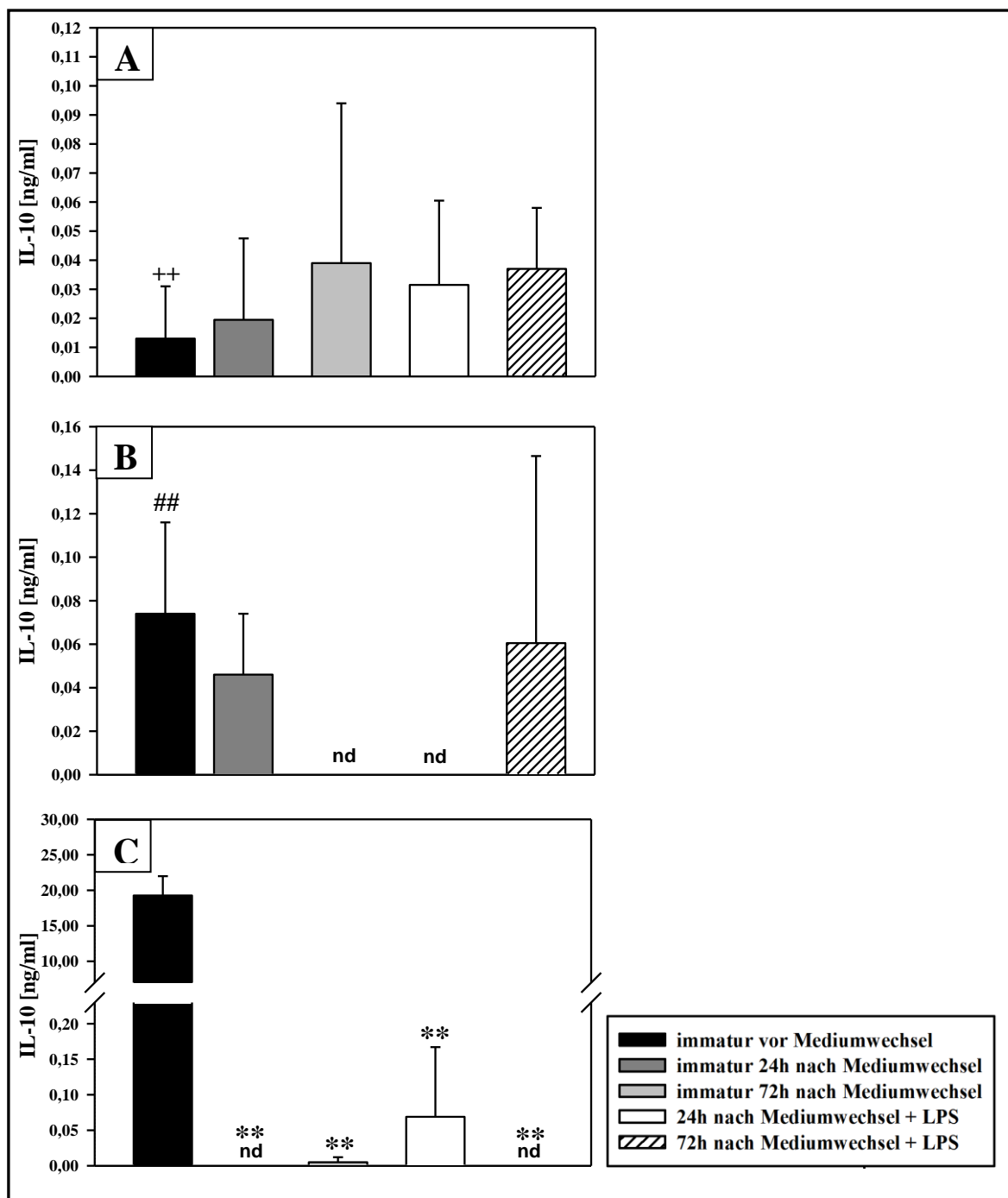


Abb. 37 Lentivirale Transduktion mit virushaltigen Überständen zur Überexpression von IL-10 in SP37A3-Zellen: Test des IL-10-Gehaltes vor und nach Waschen der Zellen. (A) Ctrl-SP37A3-Zellen, (B) LV- und (C) IL-10-transduzierte SP37A3-Zellen. Die SP37A3-Zellen wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit Leervektor (LV) oder für IL-10 kodierenden virushaltigen Überständen transduziert. Aliquote der Zellen wurden als Kontrolle (Ctrl.) parallel dazu mit Medium behandelt. 48 h später wurden der Kulturüberstand der unterschiedlich behandelten Zellen für die Bestimmung des IL-10-Gehaltes gesammelt und die Zellen anschließend gewaschen. Die Hälfte der Zellen wurde mit LPS [100 ng/ml] stimuliert und nach weiteren 24 bzw. 72 h wurde der Kulturüberstand der SP37A3-Zellen gesammelt und mittels ELISA auf den Gehalt an IL-10 hin getestet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler der 2 durchgeführten Experimente. Statistisch

signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen vor und nach dem Waschen (*) und zwischen Ctrl.- (+) bzw. LV-SP37A3-Zellen (#) vor dem Waschen gegen IL-10-SP37A3-Zellen vor dem Waschen sind angegeben.

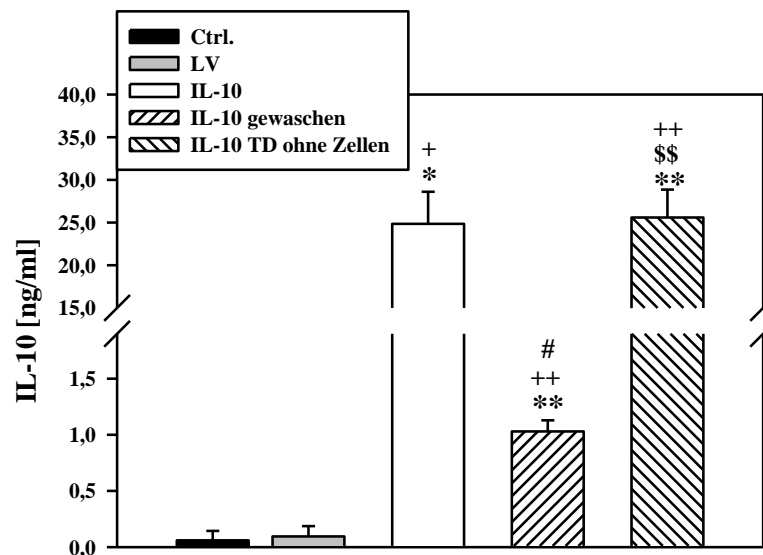


Abb. 38 Versuch zur lentiviralen Transduktion mit virushaltigen Überständen zur Überexpression von IL-10 in BM-DC: Test des IL-10-Gehaltes vor und nach Waschen der Zellen. BM-DC-Vorläufer-Zellen wurden ab Tag 5 der Kultur an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit Leervektor (LV) oder für IL-10 kodierenden virushaltigen Überständen transduziert. Aliquote der Zellen wurden als Kontrolle (Ctrl.) parallel dazu mit Medium behandelt. Als zusätzliche Kontrolle diente ein Loch einer 6-Loch-Platte, das keine Zellen enthielt. Diesem wurde analog zu den anderen Ansätzen der IL-10-haltige Virusüberstand zugegeben. 48 h später wurde ein IL-10-Ansatz gewaschen und nach weiteren 24 h wurde der Kulturüberstand der BM-DC gesammelt und mittels ELISA auf den Gehalt an IL-10 hin getestet. Dargestellt sind der Mittelwert \pm Standardfehler der 2 durchgeführten Experimente. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Ctrl. und transduzierten BM-DC (*), LV-BM-DC und den verschiedenen IL-10-Gruppen (+), ungewaschenen BM-DC und gewaschenen BM-DC bzw. dem IL-10-Ansatz ohne Zellen (#) sowie gewaschenen IL-10-BM-DC und dem IL-10 Ansatz ohne Zellen (\$) sind angegeben.

3.2.1.4.5 Test von IL-10 virushaltigen Überständen auf den Gehalt an IL-10

Da wie in Abbildung 38 gezeigt auch in Ansätzen IL-10 nachweisbar ist, in denen keine Zellen vorhanden sind, wurde der IL-10-Gehalt des IL-10-virushaltigen Überstandes mittels ELISA getestet. Wie in Abbildung 39 zu sehen ist, kann in LV-virushaltigem Überstand kein IL-10 nachgewiesen werden. In den IL-10-virushaltigen Überständen sind etwa 100 ng/ml IL-10 vorhanden.

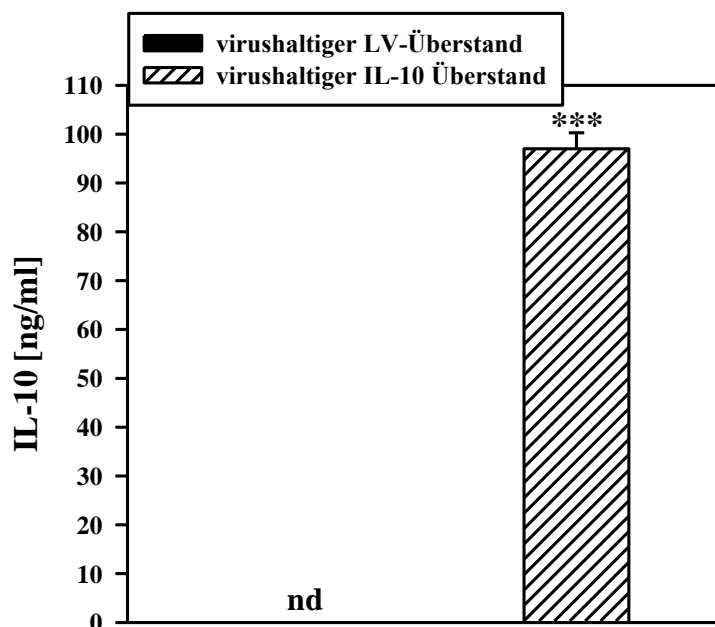


Abb. 39 IL-10-Gehalt virushaltiger Überstände. Von transfizierten HEK 293T-Zellen generierte virushaltige LV- und IL-10-virushaltige Überstände wurden mittels ELISA auf den Gehalt an IL-10 getestet. Dargestellt sind der Mittelwert \pm Standardfehler der 2 durchgeführten Experimente. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen sind angegeben (*).

3.2.1.4.6 Test auf das Ausmaß an Pseudotransduktion

Da wie zuvor gezeigt eine Transduktion mit B7-H3- und IL-10- virushaltigen Überständen in den untersuchten Zelltypen nicht möglich war, wurde untersucht, ob es sich bei den beobachteten EGFP-positiven Zellen um das Ergebnis einer echten Transduktion mit Integration des Reportergens in das Genom der Zielzelle oder um eine sogenannte Pseudotransduktion handelt.

Hierfür wurden HT1080-Zellen, die sich wie HEK 293T-Zellen auch mit niedriger MOI („multiplicity of infection“) gut transduzieren lassen, mit virushaltigen Überständen behandelt und die Frequenz EGFP-positiver Zellen über 14 Tage nach der Transduktion hinweg im FACS kontrolliert. Als Negativkontrolle wurden unbehandelte HT1080-Zellen mitgeführt. In Abbildung 40 sind exemplarisch 2 der 15 untersuchten Virusüberstände dargestellt. Anhand der Kontrolle (Ctrl.), die in Abbildung 40A gezeigt ist, wurde am jeweiligen Tag der FACS-Analyse eine Grenze gesetzt, um EGFP-positive von -negativen Zellen zu unterscheiden. An Tag 4 nach der Transduktion (Abb. 40B, C) ist in allen untersuchten transduzierten Gruppen eine deutliche EGFP-Fluoreszenz zu beobachten, die an Tag 7 nach der Transduktion deutlich abnimmt. 14 Tage nach der Transduktion gibt es innerhalb der 15 mit den unterschiedlichen

Virusüberständen behandelten Gruppen Zellpopulationen, die keine EGFP-Fluoreszenz mehr aufweisen (Abb. 40B). Es gibt aber auch präparationsabhängig eine kleine Population mit sehr hoher EGFP-Expression (Abb. 40C).

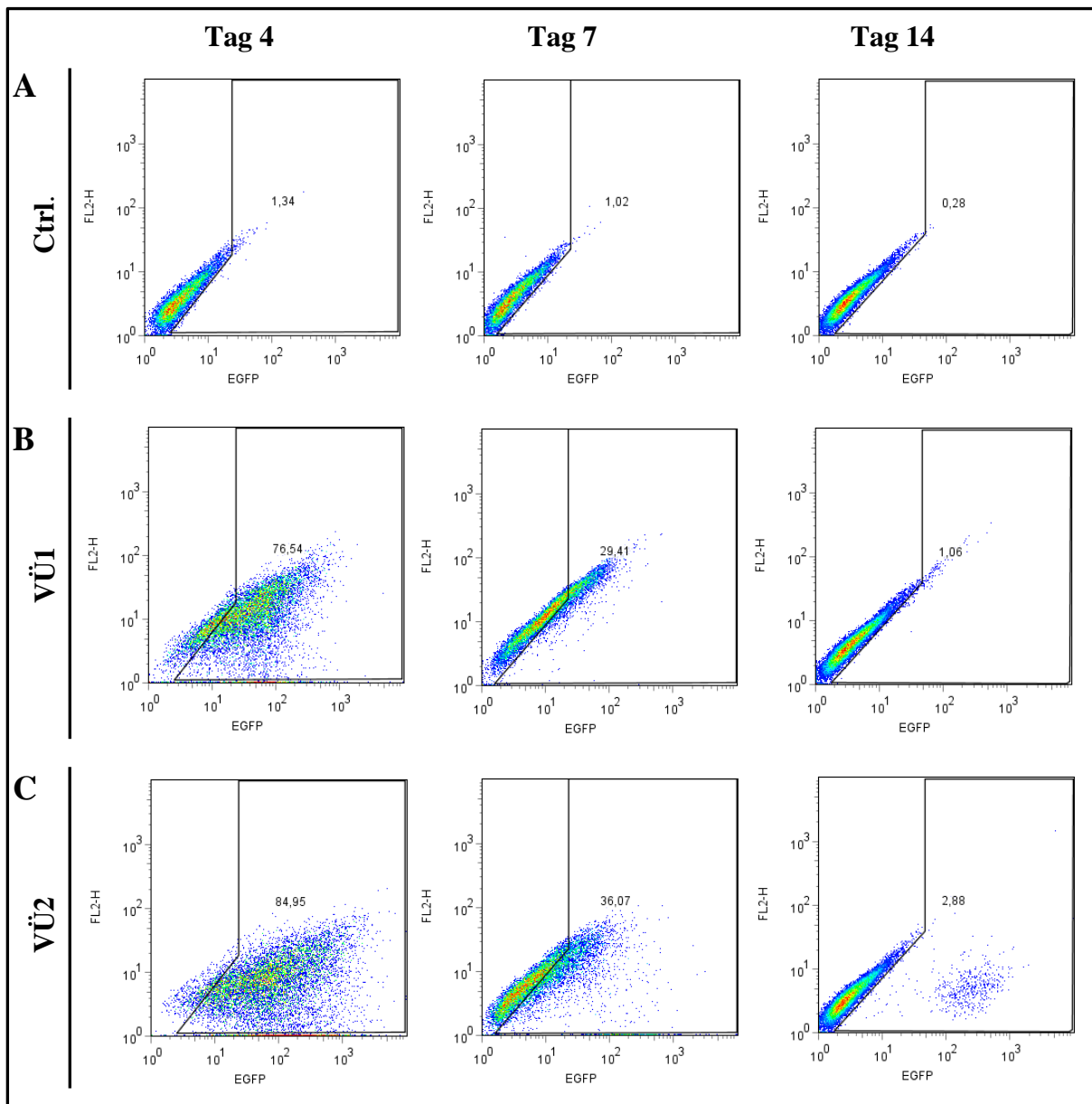


Abb. 40 Pseudotransduktion bei der Behandlung von HT1080-Zellen mit virushaltigen Überständen. HT1080-Zellen wurden mit 15 verschiedenen virushaltigen Überständen transduziert, die EGFP als Reporter beinhalten. Ein Aliquot an Zellen verblieb als Kontrolle (Ctrl.) unbehandelt (A). In (B) und (C) sind exemplarisch die Ergebnisse für 2 der virushaltigen Überstände dargestellt. Die HT1080-Zellen wurden mittels FACS-Analyse an Tag 4, 7 und 14 nach der Transduktion auf ihre EGFP-Expression hin untersucht. Hierfür wurden zunächst lebende Zellen eingegrenzt und innerhalb dieser Population die Frequenz EGFP-positiver Zellen untersucht.

3.2.2 Versuche mit ankonzentriertem Virus

Aufgrund der Beobachtung, dass IL-10 im virushaltigen IL-10-Überstand (Abb. 39) nachweisbar ist, wurden im Folgenden Versuche mit mittels Ultrazentrifugation ankonzentriertem Virus durchgeführt. Hierbei sollte ermittelt werden, ob auch bei der Ultrazentrifugation Proteine, die von der Produzenten-Zelllinie HEK293T gebildet wurden, in der Viruspräparation übertragen werden können. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob der Gentransfer in SP37A3 Zellen mit Hilfe dieses konzentrierten Virus möglich ist.

3.2.2.1 Test von ankonzentriertem Virus auf den Gehalt an IL-10

Zur Überprüfung des IL-10-Gehaltes in den mit Hilfe der Ultrazentrifugation ankonzentrierten Viruspartikeln wurden HEK 293T-Zellen mit der Calcium-Phosphat-Methode transfiziert und der virushaltige Überstand dieser Zellen gesammelt. Ein Aliquot dieses Überstandes wurde abgenommen, der restliche Überstand ankonzentriert und die Viruspartikel anschließend in 110 µl 1 x PBS je 10 ml Virusüberstand aufgenommen. Der Gehalt an IL-10 wurde mittels ELISA bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 41 dargestellt. Der virushaltige IL-10-Überstand enthält in den durchgeführten Experimenten durchschnittlich etwa 76 ng/ml IL-10. Nach dem Konzentrieren ist die Menge an IL-10 signifikant auf etwa 22 ng/ml vermindert.

Insgesamt hat sich die IL-10-Menge im konzentrierten Virus somit auf 0,32% vom Ausgangswert reduziert, da das Ausgangsvolumen (10 ml) des Virusüberstandes eine Gesamtmenge von 760 ng IL-10 enthält und die 110 µl ankonzentrierter Virus nur noch 2,42 ng.

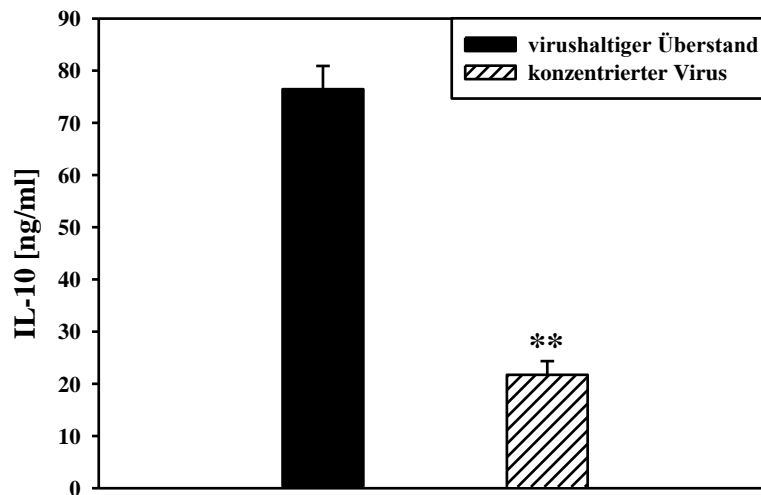


Abb. 41 IL-10-Gehalt in virushaltigen Überständen und in ankonzentriertem Virus. HEK 293T-Zellen wurden zur IL-10-Virusproduktion transfiziert. Den virushaltigen IL-10-Überständen wurde ein Aliquot entnommen und der restliche Virus mit Hilfe der Ultrazentrifugation konzentriert und anschließend in 110 μ l 1xPBS je 10 ml Ausgangsvolumen aufgenommen. Die virushaltigen IL-10-Überstände und der konzentrierte IL-10-Virus wurden mittels ELISA auf den Gehalt an IL-10 hin getestet. Dargestellt sind der Mittelwert \pm Standardfehler der 2 durchgeführten Experimente. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen sind angegeben (*).

3.2.2.2 Versuche mit konzentriertem Virus und Austausch von PCMV Δ R8.91

Aufgrund der auftretenden Pseudotransduktion wurde das bisher in dieser Arbeit verwendete Verpackungsplasmid PCMV Δ R8.91 (Georg-Speyer Haus, Frankfurt) gegen ein anderes (von Dr. Kneisl, Paul-Ehrlich-Institut, Langen erhalten) ausgetauscht. Des Weiteren wurden aufgrund der potenziellen Verschleppung von Protein (z.B. IL.10), das durch die Produzenten-Zelllinie HEK 293T gebildet wird, alle folgenden Versuche nur noch mit konzentriertem Virus durchgeführt.

3.2.2.3 Bestimmung des Virustiters

Um Zellen mit konzentriertem Virus einer bestimmten MOI zu transduzieren, muss zunächst der Virustiter bestimmt werden. Hierfür dienten Zellen der Zelllinie HT1080. Diese Indikatorzellen werden für die Bestimmung des Virustiters mit seriell verdünnten Mengen des konzentrierten Virus einmal transduziert und 72 h später auf ihre EGFP-Expression hin mittels FACS-Analyse untersucht. Als Kontrolle dienen unbehandelte Zellen.

In Abbildung 42 ist exemplarisch eine FACS-Analyse zur Bestimmung des Virustiters dargestellt. Nach dem Eingrenzen der lebenden Zellen bei Kontroll- und transduzierten Zellen (Abb. 42A) wird innerhalb dieser eingegrenzten Populationen die EGFP-Fluoreszenz untersucht. Hierzu wird wie in Abbildung 42B dargestellt zunächst anhand des Kontrollansatzes, der wie in der Abbildung zu sehen ist negativ für EGFP ist, eine Eingrenzung zum Unterscheiden von EGFP-positiven und –negativen Zellen gesetzt. Mit ansteigender Verdünnung des eingesetzten Virus sinkt die Anzahl EGFP-positiver Zellen sowie die Intensität der Fluoreszenz (Abb. 42C). Der Virustiter wird bei der Verdünnung berechnet, bei der 5 – 20% der Zellen EGFP-positiv sind, damit die Berechnung in einem linearen Meßbereich stattfindet. In diesem Beispiel ist dies bei einer Verdünnung von 1:1000 der Fall. Hier sind 19,99% der transduzierten HT1080-Zellen EGFP-positiv. Der Virustiter wird nach folgender Formel berechnet:

$$(\% \text{ EGFP-positive Zellen} \times \text{Zellzahl am Tag der Transduktion}/100) \times \text{Verdünnungsfaktor} \\ \times \text{Faktor, um auf 1 ml Zellkultur-Volumen zu kommen}$$

Der ermittelte Virustiter im gezeigten Beispiel beträgt somit $9,28 \times 10^7$ Viren je ml (Abb. 42D).

3.2.2.4 Transduktion von SP37A3-Zellen mit konzentriertem B7-H3-Virus

Die SP37A3-Zellen wurden zur weiteren Analyse ihrer Transduzierbarkeit mit konzentriertem LV- und B7-H3-Virus mit einer MOI von 10, 50 und 100 behandelt. Die zellulären Analysen der lentiviralen Transduktion mit konzentriertem Virus an Tag 3 sind in den Abbildungen 43 - 45 dargestellt. Abb. 43 zeigt die Analyse der Größe und der Granularität, Abb. 44 die der EGFP- und Abb. 45 die der B7-H3-Expression auf der Oberfläche der SP37A3-Zellen. Es wurden für die Versuche unstimulierte SP37A3-Zellen verwendet.

Wie in Abbildung 43 anhand des FSC/SSC zu sehen ist, weisen Kontroll- (Abb.43A), LV- (Abb.43B) und B7-H3-SP37A3-Zellen (Abb. 43C) eine ähnliche Größe und Granularität auf, unabhängig davon, ob und mit wie viel Virus sie transduziert wurden.

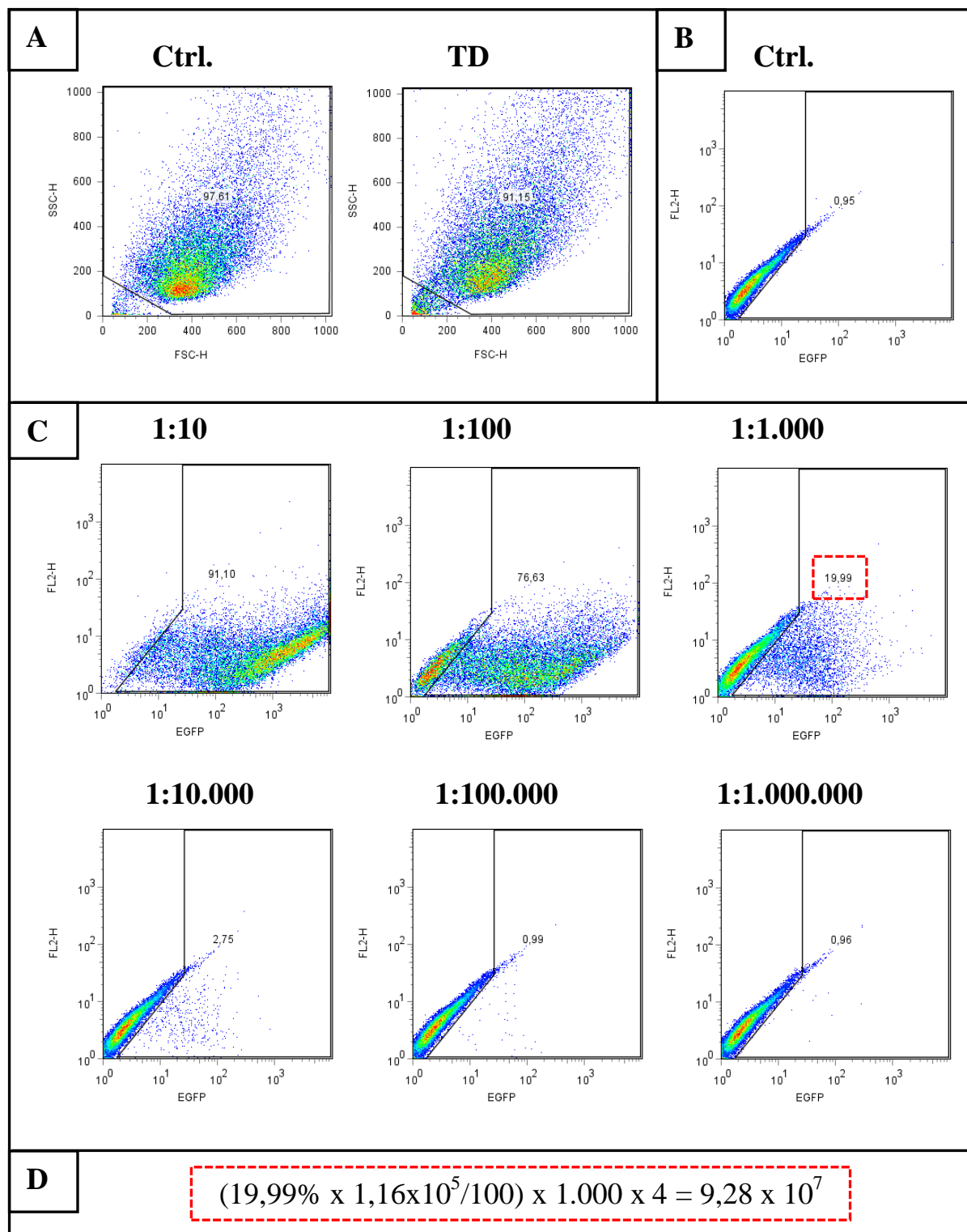


Abb. 42 FACS-Analyse zur Bestimmung des Virustiters. HT1080-Zellen wurden einmal mit konzentriertem Virus transduziert (transduzierte Zellen = TD), wobei dieser seriell 1:10 verdünnt wurde. Ein Aliquot an Zellen verblieb unbehandelt als Kontrolle (Ctrl.). Nach dem Eingrenzen der lebenden Zellen (A) wurde anhand der Kontrolle eine Grenze zwischen EGFP-positiven und -negativen Zellen gesetzt (B). In (C) ist die EGFP-Fluoreszenz der mit den unterschiedlichen Virusverdünnungen transduzierten HT1080-Zellen dargestellt. Die Berechnung des Virustiters ist in (D) dargestellt.

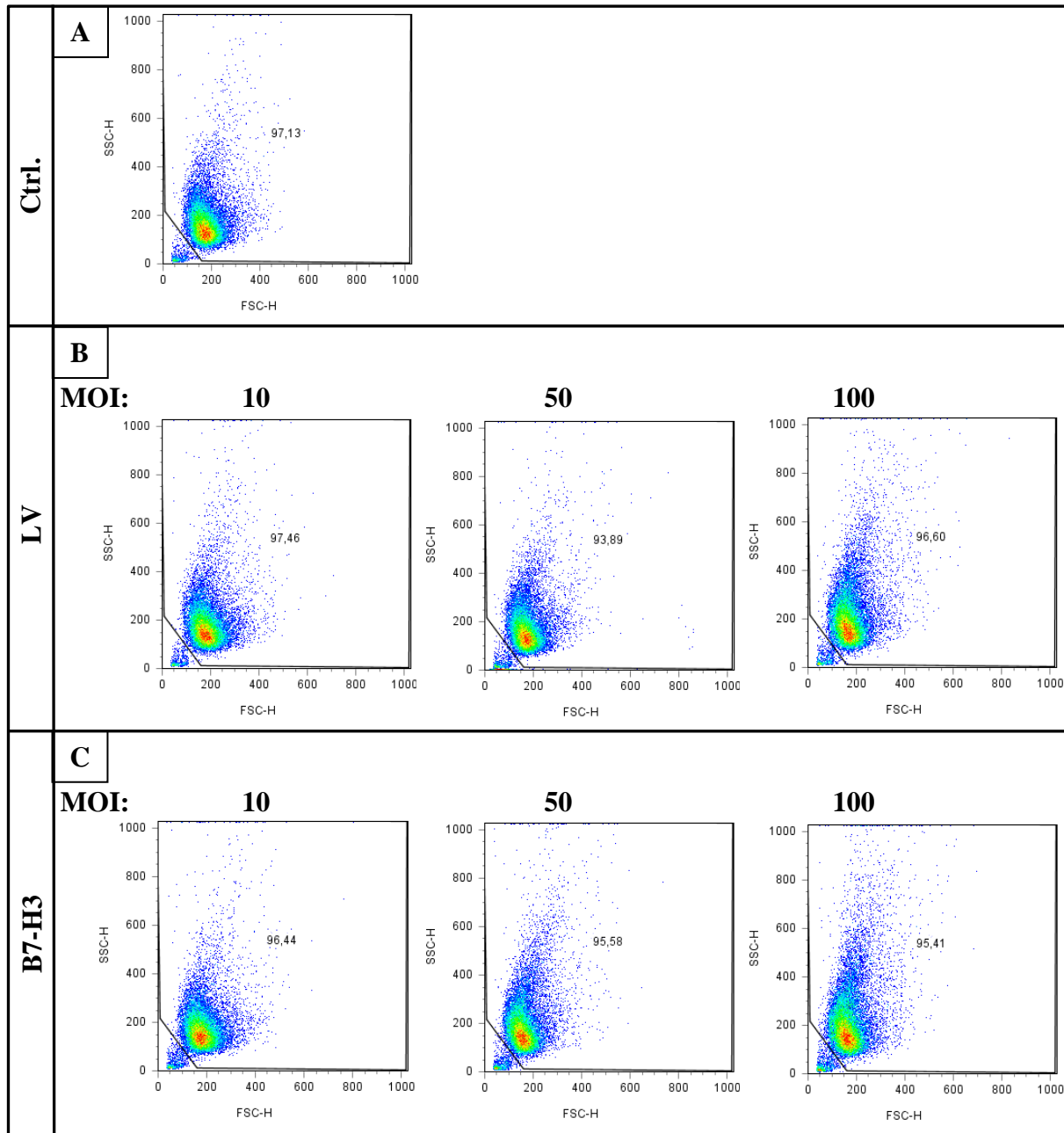


Abb. 43 Lentivirale Transduktion unstimulierter SP37A3-Zellen mit konzentriertem LV- und B7-H3-Virus: Größe und Granularität der Zellen. SP37A3-Zellen wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils mit Leervektor- (LV) bzw. B7-H3-Virus transduziert. Aliquote der Zellen wurden als Kontrolle (Ctrl.) parallel dazu unbehandelt mitgeführt. 72h später wurden die unterschiedlich behandelten Zellen im FACS auf ihre Größe und Granularität hin untersucht. Die Zellen wurden für folgende Analysen (Abb. 48 und 49) im FCS/SSC eingegrenzt. (A): Kontroll-SP37A3-Zellen (Ctrl.), (B): LV-SP37A3 und (C): B7-H3-SP37A3-Zellen. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 2-3 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

In Abbildung 44 ist die EGFP-Expression der unterschiedlich behandelten SP37A3-Zellen dargestellt. Die Zellen wurden zunächst im FCS/SSC für die weitere Analyse eingegrenzt (Abb. 43). Innerhalb dieser eingegrenzten Population wurde die EGFP-Expression der

unterschiedlichen Gruppen untersucht. Hierfür wurde mit Hilfe der Negativkontrolle (Abb. 44A) zur Bestimmung der prozentualen Anzahl an EGFP-positiven Zellen in den transduzierten Gruppen eine Grenze zwischen negativen und positiven Zellen gesetzt.

Wie in Abbildung 44B zu sehen ist, führt eine LV-Transduktion mit einer MOI von 10 zu ca. 63% EGFP-positiven Zellen, wobei diese keine starke EGFP-Fluoreszenz aufweisen. LV-SP37A3-Zellen, die mit einer MOI von 50 und 100 transduziert wurden, weisen zu über 95% eine EGFP-Fluoreszenz auf. Diese ist stärker als bei solchen Zellen, die mit 10 Viruspartikeln je Zielzelle behandelt wurden.

Bei den B7-H3-SP37A3-Zellen (Abb. 44C) ist nach der Transduktion mit einer MOI von 10 ebenfalls die schwächste EGFP-Fluoreszenz sichtbar, verglichen mit den Zellen, die mit einer größeren Anzahl an Viren je Zielzelle behandelt wurden. Es sind 53% der SP37A3-Zellen EGFP-positiv. Nach der B7-H3-Transduktion mit einer MOI von 50 oder 100 sind jeweils ca. 88% der Zellen EGFP-positiv.

In den Kontroll-SP37A3-Zellen sowie auch in allen drei LV-SP37A3-Gruppen kann man keine B7-H3 Expression feststellen (Abb. 45A und B). Wie in Abb. 49 zu sehen ist, kann auch in B7-H3-SP37A3-Zellen, die mit einer MOI von 10 transduziert wurden, keine B7-H3-Oberflächenexpression beobachtet werden. Die mit einer MOI von 50 und 100 transduzierten B7-H3-SP37A3-Zellen weisen hingegen eine Expression von B7-H3 auf der Zell-Oberfläche auf, die in beiden Gruppen vergleichbar stark ist.

3.2.2.5 Test der mit konzentriertem Virus transduzierten SP37A3-Zellen auf das Auftreten von Pseudotransduktion

Um zu überprüfen, ob bei der Transduktion mit konzentrierten Viruspartikeln Pseudotransduktion auftritt, wurden die SP37A3-Zellen, die mit einer MOI von 50 transduziert wurden, auch 10 Tage nach der Transduktion auf ihre Expression an EGFP hin untersucht. Die Ergebnisse hiervon sind in Abbildung 46 dargestellt.

Für diese Untersuchung wurden die Zellen zunächst im FSC/SSC eingegrenzt (Abb. 46A) und anschließend auf ihre EGFP-Expression hin untersucht (Abb. 46B). Mit Hilfe der Kontroll-SP37A3-Zellen wurde eine Grenze zwischen EGFP-negativen und –positiven Zellen gesetzt. Sowohl LV- als auch B7-H3-SP37A3-Zellen weisen eine EGFP-Expression auf. 92% der LV- und 80% der B7-H3-SP37A3-Zellen sind EGFP positiv.

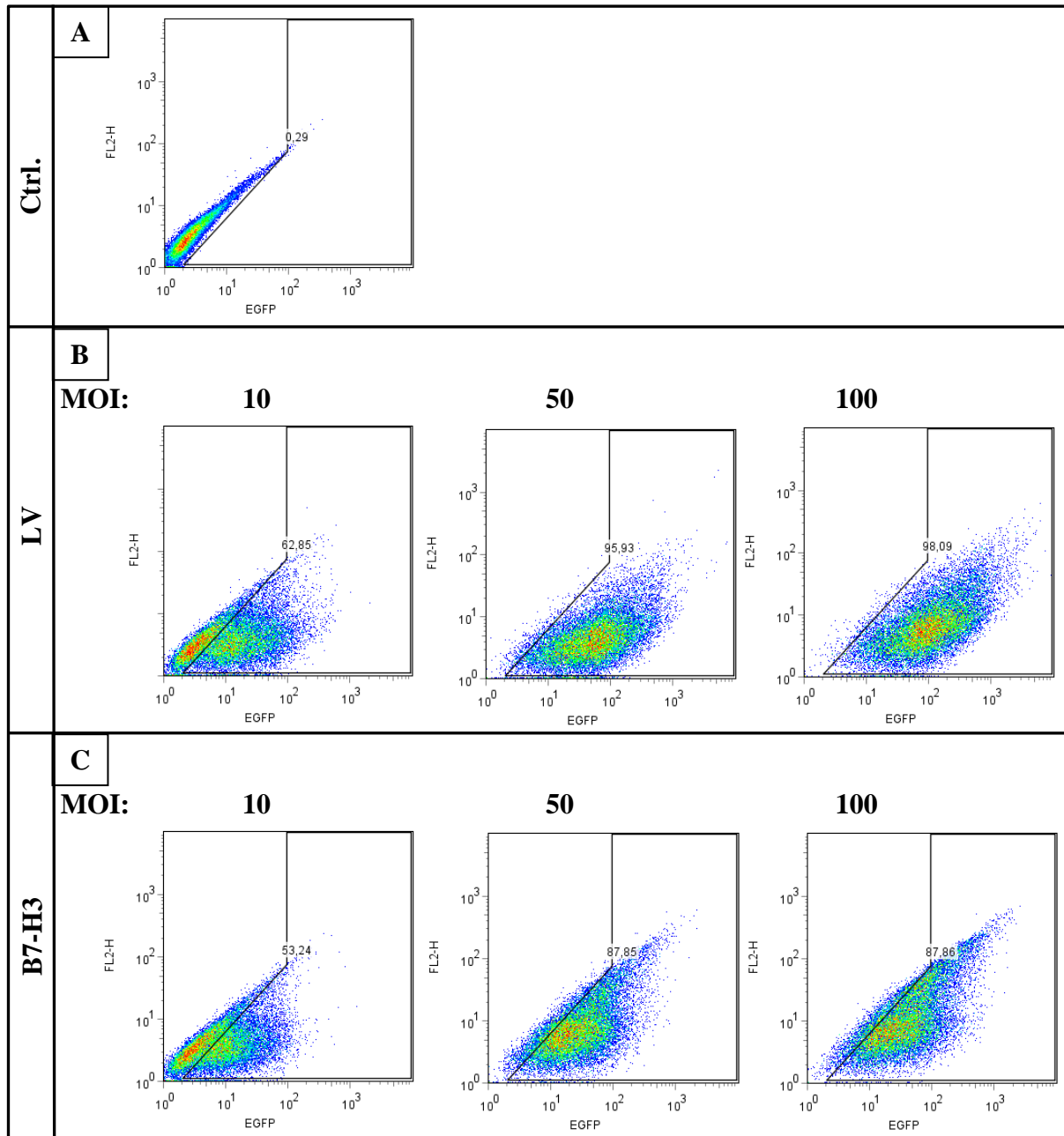


Abb. 44 Lentivirale Transduktion unstimulierter SP37A3-Zellen mit konzentriertem LV- und B7-H3-Virus: EGFP-Expression der Zellen. SP37A3-Zellen wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils mit Leervektor- (LV) bzw. B7-H3-Virus transduziert. Aliquote der Zellen wurden als Kontrolle (Ctrl.) parallel dazu unbehandelt mitgeführt. 72h später wurden die unterschiedlich behandelten Zellen im FACS auf ihre EGFP-Expression hin untersucht. Dafür wurden die Zellen zunächst im FCS/SSC eingegrenzt (Abb. 47). Anhand der Negativkontrolle wurde eine Grenze zwischen EGFP-negativen und positiven Zellen gesetzt. **(A)**: Kontroll-SP37A3-Zellen (Ctrl.), **(B)**: LV-SP37A3 und **(C)**: B7-H3-SP37A3-Zellen. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 2-3 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

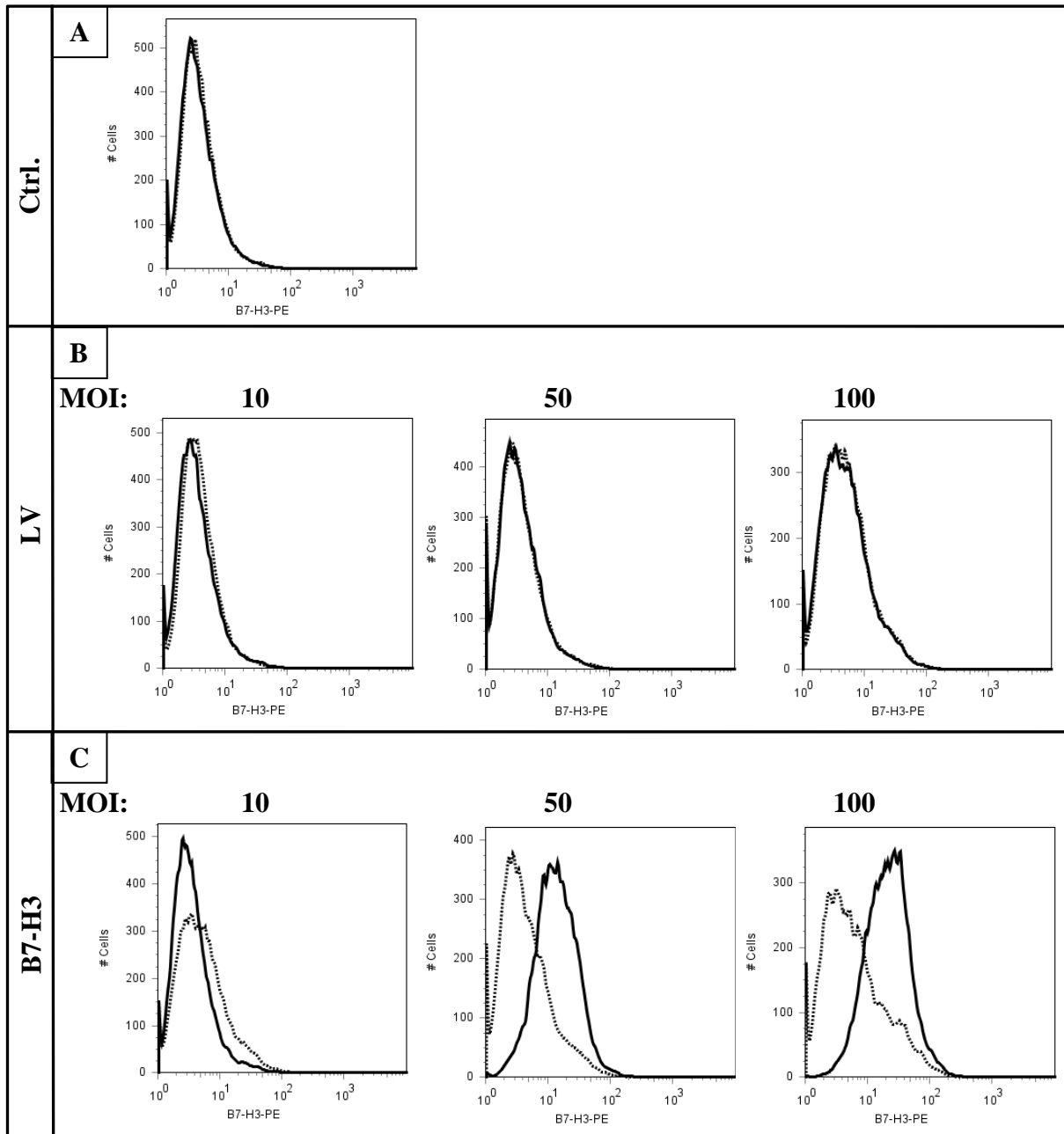


Abb. 45 Lentivirale Transduktion unstimulierter SP37A3-Zellen mit konzentriertem LV- und B7-H3-Virus: B7-H3-Oberflächenexpression. SP37A3-Zellen wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils mit Leervektor- (LV) bzw. B7-H3-Virus transduziert. Aliquote der Zellen wurden als Kontrolle (Ctrl.) parallel dazu unbehandelt mitgeführt. 72h später wurden die unterschiedlich behandelten Zellen im FACS mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern gegen B7-H3 und eines Isotyp-Kontrollantikörpers auf ihre Oberflächenexpression von B7-H3 hin untersucht. Dafür wurden die Zellen zunächst im FCS/SSC eingegrenzt (Abb.47). Anhand der Negativkontrolle wurde eine Grenze zwischen EGFP-negativen und -positiven Zellen gesetzt (Abb.48). Gestrichelt dargestellt ist die jeweilige Isotypkontrolle. (A): Kontroll- (Ctrl.), (B): LV- und (C): B7-H3-SP37A3-Zellen. Die Histogramme sind repräsentativ für 2-3 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

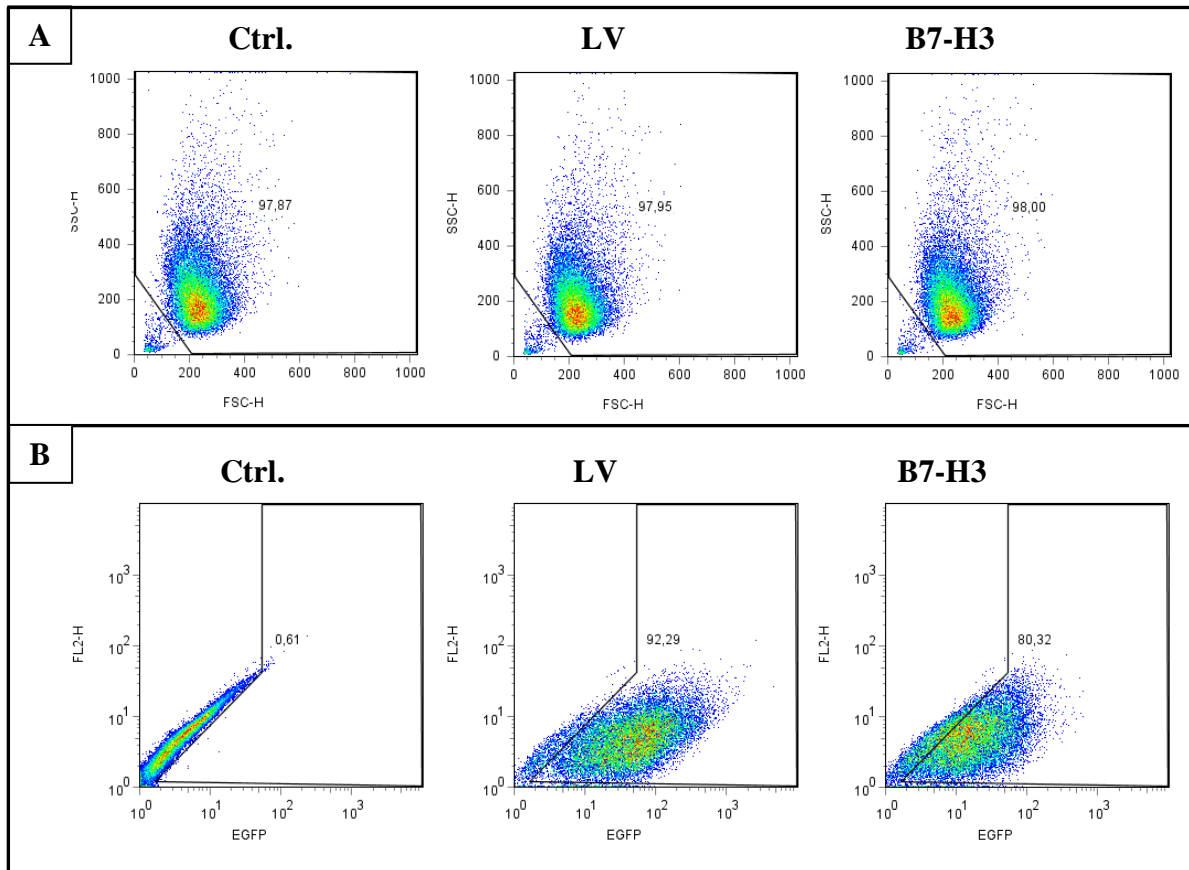


Abb. 46 EGFP-Expression in SP37A3-Zellen 7 Tage nach der lentiviralen Transduktion mit konzentriertem LV- und B7-H3-Virus. SP37A3-Zellen wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils mit Leervektor- (LV) bzw. B7-H3-Virus mit einer MOI von 50 transduziert. Aliquote der Zellen wurden als Kontrolle (Ctrl.) parallel dazu unbehandelt mitgeführt. 72h später wurden die unterschiedlich behandelten Zellen geerntet, ihre EGFP-Expression im FACS untersucht (Abb. 48) und ein Teil der Zellen für weitere 7 Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mittels FACS-Analyse auf ihre EGFP-Expression hin untersucht. Dafür wurden die Zellen im FCS/SSC eingegrenzt (**A**) und innerhalb der eingegrenzten Population die Anzahl EGFP-positiver Zellen bestimmt (**B**). Anhand der Negativkontrolle wurde eine Grenze zwischen EGFP-negativen und positiven Zellen gesetzt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 2 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

4. Diskussion

Um den Körper vor schädlichen Immunreaktionen auf Autoantigene oder harmlose Umweltantigene zu schützen, ist die Aufrechterhaltung der Toleranz essenziell [Buckner *et al.*, 2004]. Die Toleranz gliedert sich in die zentrale und die periphere Toleranz. Bei der zentralen Toleranz werden unreife autoreaktive Lymphozyten in den primären lymphatischen Organen beseitigt [Mathis *et al.*, 2004]. Zur Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz wird die Aktivierung potentiell autoreaktiver T-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen durch verschiedene Mechanismen verhindert [Buckner *et al.*, 2004]. Diese umfassen die immunologische Ignoranz, die Induktion von Anergie und die Suppressor-Aktivität von regulatorischen T-Zellen. Es gibt natürlich vorkommende und adaptive regulatorische T-Zellen. Die natürlich vorkommenden CD4⁺CD25⁺ Treg entwickeln sich im Thymus und sind in den sekundären lymphatischen Organen ansässig [Pasare *et al.*, 2004]. Sie spielen eine Rolle bei der Toleranz gegenüber Autoantigenen [Buckner *et al.*, 2004]. Adaptive regulatorische T-Zellen werden in der Peripherie induziert. Hierbei spielen DC eine wichtige Rolle. Deren Reifungsstatus und das Zytokin-Milieu während der DC-T-Zell-Interaktion sind bei der Induktion regulatorischer T-Zellen ausschlaggebend.

Sogenannte tolerogene DC sind in der Lage, regulatorische T-Zellen zu induzieren. Es gibt verschiedene Mechanismen zur Generierung tolerogener DC. Sie können z.B. mit Hilfe immunmodulatorischer Substanzen, aber auch durch die Virus-vermittelte Überexpression von toleranz-assoziierten Molekülen generiert werden [Adorini *et al.*, 2004, Morita *et al.*, 2001, Dullaers und Thielemans 2006, Coates *et al.*, 2001].

Der tolerogenisierende Effekt einiger immunmodulatorischer Substanzen wie z.B. Rolipram und PGE₂ wird u.a. durch den intrazellulären sekundären Botenstoff cAMP vermittelt [Greenberg und Shaywitz, 1999]. Ein Ziel dieser Arbeit war es aufzuklären, welche Wirkung eine direkte Erhöhung des intrazellulären cAMP-Niveaus von BM-DC auf deren Phänotyp und Funktion hat und ob DC mit tolerogene Eigenschaften induziert werden.

Da tolerogene DC auch mit Hilfe von lentiviralen Transduktionen generiert werden können, war ein weiteres Ziel zu klären, ob mit Hilfe dieser Methode tolerogene SP37A3-Zellen durch die Überexpression toleranzassoziiierter Moleküle generiert werden können.

4.1 Wirkungen der intrazellulären Erhöhung des cAMP-Niveaus in BM-DC

Für das Immunsystem sind cAMP-Signalwege wichtig für die Kontrolle einer Reihe zellulärer Funktionen, wie z.B. die Freisetzung von Mediatoren und die Proliferation. Ein Anstieg des cAMP-Niveaus ist mit einer Inhibierung inflammatorischer Prozesse assoziiert [Heystek *et al.*, 2003].

Das intrazelluläre cAMP-Niveau kann auf verschiedene Arten erhöht werden. Ein Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration kann mit Hilfe immunregulatorischer Substanzen wie PGE₂ erreicht werden [Kabayashi *et al.* 2001]. Eine Erhöhung von intrazellulärem cAMP durch PGE₂ führt jedoch zu unspezifischen Effekten und stellt somit keine Methode für therapeutische Zwecke dar. Eine weitere Möglichkeit zur Erhöhung des cAMP-Niveaus ist der Einsatz von Phosphodiesterase (PDE)-Inhibitoren wie Rolipram (PDE-4-Inhibitor) [Kabayashi *et al.* 2001]. Phosphodiesterasen sind Enzyme, die cAMP degradieren. Das therapeutische Potenzial von cAMP-erhöhenden Agenzien, speziell von PDE-Inhibitoren bei Autoimmun- und inflammatorischen Erkrankungen ist von Interesse. Diese Substanzen führen zu einer vermehrten IL-10- und zu einer verminderten TNF- α - und IL-12-Produktion [Kabayashi *et al.* 2001]. Hierdurch kann es zu einer Verschiebung der T-Zell-Antwort in die Richtung von T_H2-Zellen kommen. Dies spielt eine Rolle bei T_H1-vermittelten Erkrankungen bzw. Erkrankungsmodellen, wie z.B. der EAE (experimentelle autoimmune Enzephalitis). Solche Autoimmunerkrankungsmodelle wurden erfolgreich mit PDE Typ 3 und 4 Inhibitoren behandelt [Kabayashi *et al.* 2001]. Studien in Asthma oder atopischen Modellen zeigten aber gegensätzliche Effekte. In diesen Studien zeigt sich präferenziell eine Inhibierung von T_H2-Antworten [Kabayashi *et al.* 2001]. Sakata *et al.* (2010) beschreiben für PGE₂, dass es konträr zu der „traditionellen Ansicht“ auch als Vermittler der Immuninflammation wirken kann. Es fördert sowohl im humanen als auch murinen System die Expandierung von T_H17-Zellen durch die Erhöhung des cAMP-Niveaus über PGE-Rezeptoren (EP2 und EP4) und kann unter bestimmten Bedingungen auch eine T_H1-Differenzierung induzieren. PGE₂ fördert z.B. die T_H1-Differenzierung und die T_H17-Expandierung von murinen T-Zellen *in vitro*. Diese T-Helfer-Zelltypen sind beide in die Immuninflammation involviert. Dies ist konträr zu der traditionellen Ansicht der Wirkung von PGE₂, nach der es als Immunsuppressivum bekannt ist, das inhibitorisch auf die T_H1-Differenzierung wirkt [Sakata *et al.*, 2010]. Auch Yao *et al.* beschreiben, dass PGE₂, das auf T-Zellen und DC wirkt, die T_H1-Differenzierung und die IL-23-vermittelte T_H17-Expandierung *in vitro* fördert. Auch *in vivo* könnte die Polarisierung der T-Zell-Antwort durch soluble Mediatoren im lokalen inflammatorischen

Milieu beeinflusst werden. Kandidaten hierfür sind Prostanoiden wie PGE₂. Die Effekte von PGE₂ werden allerdings über verschiedene Signalwege vermittelt. Die T_H1-Differenzierung wird über die PI3K (Phosphoinositid-3-Kinasen) und die T_H17-Expansion über cAMP vermittelt [Yao *et al.*, 2009].

4.1.1 Die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Niveaus in BM-DC verhindert ihre LPS-induzierte Ausreifung

Von Bergwelt-Baildon *et al.* (2006) beschreiben, dass PGE₂ ein potenzieller Kandidat für die Induktion tolerogener DC in einer Tumorumgebung ist, da in vielen Tumoren ein erhöhtes PGE₂-Niveau vorhanden ist. Dieses PGE₂ ist mit der Induktion von Treg und mit der T-Zell-Inhibition assoziiert. Es induziert auch antiinflammatorische Reaktionen in Makrophagen und DC. Die Reifung *in vitro* generierter DC in Anwesenheit von PGE₂ führt zu einer DC-vermittelten T-Zell-Toleranz [Von Bergwelt-Baildon *et al.*, 2006]. Harizi *et al.* (2002) zeigten, dass exogenes PGE₂ die allogene T-Zell-Stimulierungsfähigkeit von BM-DC vermindert.

Um differenziert die Wirkung der Erhöhung des cAMP-Niveaus in DC zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit das stabile cAMP-Analogon db-cAMP verwendet.

Um zu überprüfen, ob die db-cAMP-DC potenziell ausreifen können, wurde ihre Expression der Toll Like Rezeptoren 2, 3, 4, 7 und 9 überprüft. Verglichen mit unstimulierten BM-DC weisen unstimulierte db-cAMP-DC eine vermehrte mRNA Expression der TLR 2, 3, 4 und 7 auf. Der TLR4 erkennt spezifisch LPS von gramnegativen Bakterien [Pasare *et al.*, 2004]. Mit diesem wurden die BM-DC in dieser Arbeit stimuliert. Potenziell sollten die unstimulierten db-cAMP-DC also besser mit LPS stimulierbar sein als die unstimulierten BM-DC. Im Gegensatz zu den BM-DC, die einhergehend mit der LPS Stimulierung die Expression von TLR 2, 3, 4 und 7 leicht herunterregulieren, findet diese LPS-induzierte Regulierung der TLR-Expression bei db-cAMP-DC nicht statt. Dies ist ein Indiz dafür, dass das db-cAMP einer Stimulus-bedingten Reifung entgegenwirkt.

Anhand der primären allogenen MLR und der syngenen Kokultur wurde gezeigt, dass eine Behandlung muriner DC-Vorläufer mit db-cAMP zu einer T-Zell-Hypoproliferation führt. Die verminderte T-Zell-Stimulierungskapazität ist besonders auffällig für LPS-stimulierte db-cAMP-DC, deren T-Zell-Stimulierungskapazität in etwa auf dem Niveau von unstimulierten BM-DC liegt.

Nach der Stimulierung von db-cAMP-DC mit LPS ist sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 verglichen mit deren Expression stimulierter BM-DC vermindert. Dies impliziert, dass db-cAMP die LPS-vermittelte Aufregulation der Expression dieser Moleküle verhindert. Des Weiteren verhindert die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Niveaus die LPS-induzierte vermehrte Expression von MHCII. Bei der Ausreifung von DC kommt es zu einer Veränderung der Morphologie der Zellen: Die DC bilden infolge der Ausreifung zahlreiche lange Dendriten aus. Hierbei spielt das Aktin-Bündelungs-Protein Fascin eine wichtige Rolle [Ross *et al.*, 1998 Al-Alwan *et al.*, 2001]. Die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Niveaus verhindert auch die LPS-induzierte gesteigerte mRNA- und intrazelluläre Protein-Expression von Fascin. Bei 4-1BBL und OX40L handelt es sich um kostimulatorische Moleküle, die zur TNF-Familie gehören und von APC exprimiert werden [Ndhlovu *et al.*, 2001, Cheuk *et al.* 2004]. Ihre Expression auf APC wird durch verschiedene Stimuli wie z.B. TLR-Liganden induziert. [Croft 2009]. Ihre Rezeptoren 4-1BB und OX40 werden von T-Zellen exprimiert [Ndhlovu *et al.*, 2001, Cheuk *et al.* 2004]. Interaktionen zwischen Molekülen der TNF-Familie mit TNF-Rezeptoren kontrollieren die T-Zell-Antwort auf verschiedenen Wegen. Sie regulieren die Frequenz von Effektor- und/oder Gedächtnis-T-Zellen, die aus naiven T-Zellen als Antwort auf die Stimulierung in Gegenwart von Antigen generiert werden können. Diese Interaktionen beeinflussen des Weiteren direkt die Funktion der interagierenden T-Zellen, indem sie die Produktion von Zytokinen wie IL-4 und IFN γ fördern. Sie beeinflussen sie aber auch indirekt durch die Stimulierung der Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 oder IL-12 durch APC [Croft 2009]. Ndhlovu *et al.* (2001) zeigten z.B., dass das Fehlen von OX40L-Signalen zu einer verminderten CD4-T-Zell-Antwort führt [Ndhlovu *et al.* 2001]. Die Interaktion von 4-1BBL mit 4-1BB liefert kostimulatorische Signale für CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen, fördert aber präferenziell die Expansion von CD8⁺-T-Zellen. 4-1BB-vermittelte Signale steigern die IFN γ -Produktion von CD8⁺-T-Zellen [Cheuk *et al.*, 2003].

In den für diese Arbeit durchgeführten QPCR-Versuchen wiesen stimulierte BM-DC eine gesteigerte Expression von 4-1BBL und OX40L verglichen mit unstimulierten BM-DC auf. Diese gesteigerte Expression von 4-1BBL und OX40L durch die stimulierten BM-DC könnte zu ihrer, im Vergleich zu unstimulierten BM-DC, gesteigerten Produktion von IL-12 beitragen. Des Weiteren induzieren stimulierte BM-DC verglichen mit unstimulierten BM-DC auch eine moderat höhere IFN γ -Produktion in kokultivierten T-Zellen. Diese Beobachten entsprechen den Aussagen von Croft (2009). Die Expression von OX40L war in unstimulierten und stimulierten db-cAMP-DC vermindert. Da Moleküle der TNF-Familie wie

zuvor beschrieben die Produktion proinflammatorischer Zytokine fördern, könnte die verminderte OX40L-Expression der stimulierten db-cAMP-DC zu ihrer fehlenden Produktion von IL-12 beitragen. Entgegen der Erwartungen induzieren db-cAMP-DC in kokultivierten T-Zellen aber eine gesteigerte Produktion von IFN γ verglichen mit BM-DC. Nach Croft (2009) wäre bei einer verminderten OX40L-Expression eine geringere IFN-Produktion zu erwarten. Für 4-1BBL zeigte sich ein anderes Bild. Seine Expression war in unstimulierten db-cAMP-DC auf das Niveau stimulierter BM-DC gesteigert und in stimulierten db-cAMP-DC auf das Niveau unstimulierter BM-DC gesenkt.

Die in dieser Arbeit beobachtete verminderte Expression kostimulatorischer Moleküle nach einer intrazellulären Erhöhung des cAMP-Niveaus von DC scheint sich mit den Ergebnissen von Fassbender *et al.* (2010) zu decken. Die Autoren konnten zeigen, dass cAMP von nTreg die Expression kostimulatorischer Moleküle auf DC kontrolliert. Eine Kokultur muriner DC mit nTreg führt zu einem Anstieg des cAMP-Niveaus in den interagierenden DC, woraufhin die Expression von CD80, CD86 und MHCII vermindert wird. Das cAMP wird hierbei direkt von den Treg über Zell-Kontakt abhängige „Gap-Junctions“ in die DC transferiert. Dies ist ein wichtiger Mechanismus der Treg vermittelten Suppression der DC-Aktivierung [Fassbender *et al.*, 2010]. Allerdings konnten in Vorarbeiten zu der vorliegenden Arbeit nur dann inhibitorische Effekte von db-cAMP nachgewiesen werden, wenn es während der Differenzierungsphase der DC zu der Kultur gegeben wurde. Eine db-cAMP-Gabe während der Reifungsphase der BM-DC führte z.B. zu keiner verminderten T-Zell-Stimulierungskapazität.

Galgani *et al.* (2004) zeigten konträr zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, dass cAMP (8-Br-cAMP) keinen Einfluss auf phänotypische Veränderungen hat, die durch die Ausreifung von DC induziert werden. Sie fanden keinen Effekt der cAMP-Behandlung auf CD86, CD83 und auf HLA-DR, dem humanen Homolog von MHCII [Galgani *et al.*, 2004]. Es handelte sich bei dieser Studie allerdings auch um humane, nicht um murine DC.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete stark verminderte Oberflächenexpression der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 sowie von MHCII und Fascin in db-cAMP-DC kann die verminderte T-Zell-Stimulatorische Kapazität der stimulierten db-cAMP-DC erklären. Die geringe Expression der genannten Moleküle ist normalerweise charakteristisch für unstimulierte DC. T-Zellen, die über ihren T-Zell-Rezeptor mit Peptid/MHC-Komplexen auf DC in Kontakt treten und von diesen keine Kostimulation erfahren, erhalten keine ausreichenden Aktivierungs-Signale von den DC. Dies führt zu T-

Zell-Anergie und/oder Apoptose in den interagierenden T-Zellen und/oder zu einer Induktion regulatorischer T-Zellen [Lutz *et al.*, 2002, Tisch 2010].

4.1.2 Die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Levels in BM-DC führt zu einer differenziellen Expression einiger koinhibitorischer Moleküle

Die T-Zell-Aktivierung wird durch das angeborene Immunsystem mit Hilfe von positiven und negativen kostimulatorischen Molekülen reguliert [Prasad *et al.*, 2004]. DC exprimieren neben kostimulatorischen Molekülen auch solche mit koinhibitorischer Funktion. Im Gegensatz zu den kostimulatorischen Rezeptoren, die eine Förderung der Immunantwort vermitteln, mildern die koinhibitorischen Rezeptoren sie ab [Collins *et al.*, 2005]. B7-H1 (PD-L1 = „programmed death ligand 1“) und B7-DC (PD-L2) sind solche koinhibitorischen Moleküle. Sie werden sowohl von unstimulierten als auch von stimulierten DC exprimiert und sind Liganden von PD-1 („programmed death-1“), das von aktivierten Lymphozyten exprimiert wird [Brown *et al.* 2003]. PD-1 spielt eine inhibitorische Rolle bei der Regulation der T-Zell-Aktivierung in der Peripherie [Loke *et al.* 2003].

PD-L1 wird in der vorliegenden Arbeit von stimulierten BM-DC in einem höheren Maße exprimiert als von unstimulierten. In db-cAMP-DC in beiden Reifungsstadien ist die Expression von PD-L1 gesteigert verglichen mit den jeweiligen BM-DC. Somit könnte durch diese gesteigerte Expression der db-cAMP-DC von PD-L1 deren T-Zell-Aktivierungspotenzial inhibiert werden. Ein weiteres koinhibitorisches Molekül, das auf mRNA-Ebene von db-cAMP-DC verglichen mit BM-DC gesteigert exprimiert wird, ist LIGHT. LIGHT gehört zu den Molekülen der TNF-Familie, die zur Regulation von Immunantworten beitragen. Es wird von verschiedenen Zelltypen, u.a. von DC, T-Zellen und B-Zellen exprimiert. Unstimulierte DC exprimieren membrangebundenes LIGHT, verlieren diese Expression aber während der Reifung. Dies geschieht eventuell aufgrund einer Abspaltung des membrangebundenen LIGHT von der Oberfläche stimulierter DC [Wang *et al.*, 2009]. Xu *et al.* (2007) beschreiben, dass murine LPS-stimulierte LIGHT-defiziente BM-DC eine verminderte Produktion von IL-12 aufweisen.

PD-L2 wird im Gegensatz zu PD-L1 in BM-DC im unstimulierten und stimulierten Zustand in gleichem Maße exprimiert. Die Expression von PD-L2 ist hingegen in den unstimulierten db-cAMP-DC im Vergleich zu den BM-DC vermindert. Db-cAMP weisen in beiden Aktivierungszuständen verglichen mit BM-DC ebenfalls eine verminderte SLAM-Expression

(„signaling lymphocyte activation molecule“) auf. Von BM-DC wird SLAM auf mRNA-Ebene LPS-induziert vermehrt exprimiert. Bei SLAM handelt es sich um einen Rezeptor, der als Selbst-Ligand dient. SLAM wird von aktivierten T-Zellen, B-Zellen Makrophagen und DC exprimiert. SLAM-SLAM-Interaktionen haben negative Effekte auf eine CD40L- oder LPS-induzierte DC-Aktivierung [Réthi *et al.*, 2006]. Aufgrund der verminderten SLAM-Expression von db-cAMP-DC scheint dieses Molekül aber nicht zu deren verglichen mit BM-DC verminderten Ausreifung beizutragen.

Wang *et al.* beschrieben 2000 ihre Entdeckung von B7-H2 (ICOSL) auf humanen DC. Es wird von unstimulierten DC exprimiert und seine Expression kann durch eine Stimulierung der DC mit LPS herunterreguliert werden. B7-H2 ist ein Ligand für ICOS auf T-Zellen. Es stimuliert die Proliferation und Zytokinproduktion humaner T-Zellen [Wang *et al.* 2000].

Im Gegensatz zu der Stimulierungs-assoziiert reduzierten B7-H2-Expression, die durch Wang *et al.* beschrieben wird, beschreiben Taylor *et al.* (2005), dass seine Expression auf APC durch LPS aufreguliert wird [Taylor *et al.* 2005]. Neben dem von Wang *et al.* (2000) beschriebenen kostimulatorischen Effekt von B7-H2, der die Proliferation und Zytokinproduktion von T-Zellen positiv beeinflusst, scheint B7-H2 aber auch inhibitorische Effekte zu vermitteln. Tuettenberg *et al.* (2009) untersuchten die Rolle von ICOS im Differenzierungsprozess humaner CD4⁺ T-Zellen nach deren Interaktion mit tolerogenen DC. Sie konnten zeigen, dass eine siRNA-vermittelte Inhibierung der ICOS-Expression bzw. eine Blockade der B7-H2/ICOS-Interaktion die Induktion von T-Zell-Anergie durch tolerogene DC verhindert. B7-H2 scheint somit eine essenzielle Rolle bei der Abmilderung der CD4-T-Zell-Antwort durch tolerogene DC zu haben. B7-H2 wird in der vorliegenden Arbeit durch eine LPS-Stimulierung von BM-DC nicht reguliert. Dies entspricht tendenziell den Ergebnissen von Wang *et al.* 2000. Db-cAMP-DC weisen im unstimulierten Zustand verglichen mit den unstimulierten BM-DC eine moderat verminderte B7-H2 mRNA-Expression auf, wohingegen die B7-H2-Expression der stimulierten db-cAMP-DC verglichen mit den stimulierten BM-DC nicht reguliert ist. B7-H2 wird somit durch eine intrazelluläre Erhöhung des cAMP-Niveaus kaum reguliert und scheint somit auch keine Rolle für die funktionellen Unterschiede zwischen BM-DC und db-cAMP-DC zu spielen.

B7-H3 ist ebenfalls ein koinhibitorisches Molekül. Es wird von verschiedenen Zelltypen exprimiert und hat wahrscheinlich eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Selbst-Toleranz [Xu *et al.*, 2006]. Murines B7-H3 wird von professionellen APC exprimiert, und die Expression auf DC scheint durch die Stimulierung mit LPS aufreguliert zu werden. Es inhibiert die T-Zell-Aktivierung und die Effektor-Zytokin-Produktion [Prasad *et al.*, 2004].

Die Anwesenheit von B7-H3 auf der Oberfläche von APC führt zu einer negativen Regulierung der allogenen T-Zell-Proliferation. Der Einsatz von APC aus B7-H3-defizienten Mäusen in der MLR führt zu einer gesteigerten T-Zell-Proliferation verglichen mit APC aus Kontroll-Mäusen [del Rio *et al.*, 2008]. Entgegen der von Prasad *et al.* (2004) beschriebenen vermehrten B7-H3-Expression nach LPS-Stimulierung wurde in der vorliegenden Arbeit die mRNA-Expression von B7-H3 in keiner der untersuchten Gruppen verglichen mit unstimulierten BM-DC moduliert. B7-H3 scheint somit wie B7-H2 ebenfalls keine Rolle für die funktionellen Unterschiede zwischen BM-DC und db-cAMP-DC zu spielen.

Insgesamt kann man sagen, dass die db-cAMP-DC im Vergleich zu BM-DC eine differenzielle Expression einiger der untersuchten koinhibitorischen Moleküle aufweisen. So ist ihre mRNA-Expression von B7-H1 und LIGHT gesteigert, wohingegen ihre Expression von B7-DC und SLAM vermindert ist. Somit kann keine allgemeine Aussage über die Wirkung einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Niveaus von BM-DC auf deren Expression koinhibitorischer Oberflächenmoleküle getroffen werden.

4.1.3 Die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Levels in BM-DC führt zu einer differenziellen Expression von Molekülen, die mit Toleranz assoziiert sind

Es gibt eine Reihe von Molekülen, die klassischerweise mit Toleranz assoziiert sind. Einige wurden in BM-DC und db-cAMP-DC untersucht.

Der FcγRIIB wirkt inhibitorisch, da er intrazellulär negative Regulations-Motive (ITIM-Motive) hat. Bei Ig-Bindung blockiert er die DC-Reifung und vermindert ihre IL-12-Produktion [Dhodapkar *et al.*, 2005]. Die db-cAMP-DC weisen im Vergleich zu BM-DC eine gesteigerte Expression dieses inhibitorischen Rezeptors auf. Ihre Reifung und IL-12-Produktion kann somit potenziell stärker inhibiert werden als die von BM-DC.

Bei Pirb („paired immunoglobulin-like receptor B“) handelt es sich um einen MHCI-Rezeptor, der von murinen APC exprimiert wird und die Zugänglichkeit für CD8-Moleküle der T-Zellen zu MHCI blockieren kann. Hierdurch kann die CTL-Antwort (CTL = zytotoxische T-Lymphozyten) beeinträchtigt werden [Endo *et al.*, 2008]. ILT-4 ist das humane Homolog von Pirb. Tolerogene DC, die die inhibitorischen Rezeptoren ILT3 und ILT4 exprimieren, induzieren eine Immunsuppression durch die blockierte Kapazität der APC, CD4⁺ T_H-Zellen und CD8⁺ CTL zu stimulieren [Zhao *et al.*, 2010]. Im Vergleich zu BM-DC exprimieren db-cAMP-DC Pirb mRNA auf einem niedrigeren Niveau. Die Zugänglichkeit für CD8-Moleküle

von T-Zellen sollte somit bei db-cAMP-DC nicht beeinträchtigt sein verglichen mit BM-DC. Somit sollte auch die Induktion von CTL-Antworten nicht beeinträchtigt sein.

Bei der Hämoxygenase 1 (HO-1) handelt es sich um ein Enzym, das Häm zu Biliverdin, Kohlenmonoxid und freiem Eisen abbaut. Von HO-1 und seinen Abbauprodukten ist bekannt, dass sie antiinflammatorische Eigenschaften besitzen [Otterbein *et al.* 2003]. In humanen DC und DC aus Ratten wurde gezeigt, dass eine Induktion der HO-1-Expression während der Reifung der DC die alloreaktive T-Zell-Proliferation inhibiert. Die HO-1-Induktion in unstimulierten DC hatte hingegen in beiden Spezies keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten alloreaktiver T-Zellen in der MLR [Chauveau *et al.*, 2005].

Im Vergleich zu BM-DC ist die mRNA-Expression von HO-1 und auch die Expression von funktionellem HO-1-Enzym in db-cAMP-DC signifikant gesteigert. Diese gesteigerte HO-1-Expression könnte neben der Verhinderung der LPS-induzierten phänotypischen Ausreifung durch db-cAMP (4.1.1) auch zu der verminderten T-Zell-Stimulierungskapazität der db-cAMP-DC beitragen.

IDO (Indolamin-2,3-dioxygenase) ist ein Enzym, das den Abbau der essentiellen Aminosäure Tryptophan katalysiert. Eine gezielte Überexpression von IDO in DC führt zu einer Inhibierung der T-Zell-Proliferation [Funeshima *et al.* 2005]. PGE₂ z.B. induziert in unstimulierten DC IDO-mRNA, aber kein IDO-Protein. Eine Ausreifung von DC in Anwesenheit von PGE₂ führt zu einer Aufregulierung der IDO-mRNA- und Protein-Expression. Auch eine Ausreifung von DC führt per se zu einer vermehrten IDO-mRNA-Expression, aber nur durch die zusätzliche Gabe von PGE₂ kommt es vermehrt zur Bildung von funktionellem IDO-Protein. Als Ergebnis daraus wird die T-Zell-Proliferation und Zytokinproduktion signifikant inhibiert, was durch den IDO-vermittelten Tryptophan-Abbau vermittelt wird [Von Bergwelt-Baildon *et al.*, 2006].

Durch die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Levels in BM-DC mit Hilfe von db-cAMP ist keine signifikante Steigerung der IDO-mRNA-Expression zu beobachten. Nur stimulierte BM-DC weisen eine erhöhte IDO-mRNA-Expression auf. Somit scheint IDO bei db-cAMP-DC keinen Beitrag zu der inhibierten T-Zell-Stimulierungskapazität von db-cAMP-DC zu leisten. Gänzlich auszuschließen wäre dies allerdings nur nach einer Untersuchung der Menge an funktionellem IDO-Protein.

Die Cyclooxygenase ist ein Enzym, das Prostaglandine aus Arachidonsäure bildet. Es gibt 2 Cyclooxygenase-Isoformen: Cox-1 und Cox-2. Cox-1 wird konstitutiv exprimiert. Cox-2 wird durch proinflammatorische Agenzien induziert. Dies führt zur Bildung von Prostaglandinen [Bryn *et al.* 2008].

In BM-DC wird reifungsbedingt die Expression von COX-2 induziert. Db-cAMP-DC weisen verglichen mit BM-DC im unstimulierten und im stimulierten Zustand eine gesteigerte mRNA-Expression von Cox-2 auf. Aus diesem Grund war es interessant, die PGE₂-Expression von BM-DC und db-cAMP-DC zu untersuchen. Im Vergleich zu BM-DC weisen db-cAMP-DC eine gesteigerte Sezernierung von PGE₂ auf. Für die stimulierten Zellen ist dieser Unterschied auch statistisch signifikant. Das von den db-cAMP-DC vermehrt gebildete PGE₂ kann auf interagierende T-Zellen wirken.

PGE₂ agiert lokal als autokriner oder parakriner Mediator durch die Bindung an die G-Protein-gekoppelten E Prostanoid Rezeptoren (EP1 - 4). Die Aktivierung von EP2 und EP4 löst die Adenylat-Cyclase vermittelte cAMP-Produktion und die Inhibierung der T-Zell-Immunantwort aus. PGE₂ induziert FoxP3-Expression und einen suppressiven regulatorischen Phänotyp in CD4⁺CD25⁻ T-Zellen [Bryn *et al.* 2008]. Es kann aber unter einigen Bedingungen als Immunaktivator dienen. Es inhibiert die durch IL-6 und TGF-β induzierte T_H17-Differenzierung aus naiven T-Zellen, fördert aber die Expandierung von T_H17-Zellen in Gegenwart von IL-23 sowie die T_H1-Differenzierung [Yao *et al.*, 2009, Sakata *et al.*, 2010].

STAT3 („signal transducer and activator of transcription 3“) ist ein Transkriptionsfaktor, der DC-Funktionen negativ reguliert [Sun *et al.*, 2009]. DC, die aktiviertes STAT 3 exprimieren, produzieren vergleichsweise weniger IL-12. Dies resultiert in einer geringeren Entwicklung von T-Effektor-Zellen. Außerdem exprimieren DC, die vermehrt aktives STAT3 aufweisen,IDO [Barton 2006]. Nur stimulierte BM-DC, nicht aber die db-cAMP-DC, weisen eine gesteigerte mRNA-Expression von STAT3 auf. Die stimulierten BM-DC sezernieren jedoch auch am meisten IL-12. Die Aktivierung von STAT3 benötigt eine posttranskriptionale Phosphorylierung [Sun *et al.*, 2009]. Das mRNA-Niveau gibt also keinen Aufschluss darüber, ob aktives STAT3 vorliegt.

Die mRNA-Expression von Mkp-1 (MAP Kinase Phosphatase-1) ist lediglich in unstimulierten db-cAMP-DC gegenüber BM-DC moderat aufreguliert. Dieser Effekt ist allerdings nicht statistisch signifikant. Mkp-1 ist essenziell für die Dephosphorylierung, also die Deaktivierung der MAP-Kinase p38 (MAP = „mitogen activated Protein“) und von JNK (c-Jun N-terminale Kinase). Hierdurch wird die Biosynthese proinflammatorischer Zytokine durch Zellen des angeborenen Immunsystems limitiert [Wang und Liu 2007]. Eine Stimulierung von TLR induziert normalerweise die Expression von Mkp-1, was zu einer Limitierung der TLR-vermittelten Produktion proinflammatorischer Zytokine führt. Dies stellt einen Mechanismus zur Begrenzung übermäßiger Immunantworten dar [Chi und Flavell

2008]. Mkp-1 scheint bei db-cAMP-DC aber keine Rolle für die Inhibition von Immunantworten zu spielen, da es im Vergleich zu BM-DC nicht vermehrt exprimiert wird. Insgesamt weisen BM-DC und db-cAMP-DC abweichende Muster der untersuchten toleranzassoziierten Moleküle auf. Von den untersuchten toleranzassoziierten Molekülen werden lediglich FcγRIIB, HO-1 und Cox-2 auf mRNA Ebene vermehrt von db-cAMP-DC exprimiert. Diese Moleküle könnten zu der im Vergleich zu BM-DC differenziellen Funktion der db-cAMP-DC beitragen. Insbesondere die antiinflammatorisch wirkende HO-1 und das Cox-2 vermittelt gebildete PGE₂, welche T-Zell-Antworten inhibieren können, könnten zu der verminderten T-Zell-Stimulierungskapazität der db-cAMP-DC beitragen.

4.1.4 Die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Levels in BM-DC führt zu einer differenziellen Expression von CREM

Da cAMP die PKA aktivieren kann, die wiederum den Transkriptionsfaktor CREB („CRE-binding protein“) durch Phosphorylierung aktiviert, wurde auch die Expression von Angehörigen der CREB-Familie auf mRNA-Ebene untersucht.

CREB wird von unstimulierten db-cAMP-DC im Vergleich zu BM-DC vermindert exprimiert. Stimulierte db-cAMP-DC und BM-DC in beiden Reifungsstadien haben eine CREB-Expression auf etwa vergleichbarem Niveau. Dies gibt aber noch keine Auskunft über eine CREB-Aktivität, da keine Aussage über dessen Phosphorylierungsstatus gemacht werden kann. Wurde CREB durch die PKA phosphoryliert, bindet es im Zellkern als Dimer an CRE („cAMP-responsive elements“) in den Promotorregionen verschiedener Gene. Dadurch wird deren Transkription reguliert [Greenberg und Shaywitz, 1999]. Im Vergleich zu BM-DC haben die db-cAMP-DC eine gesteigerte Expression von CREM („cAMP responsive element modulator“), das ebenfalls an CRE bindet und isoformenabhängig entweder genexpressionssteigernd oder aber inhibierend wirkt. Bei ICER („inducible cAMP early repressor“) handelt es sich um einen endogenen Antagonisten von CREB [Mioduszevska *et al.*, 2003]. ICER ist konstitutiv aktiv. Die ICER-Expression ist in den untersuchten Gruppen nicht differenziell moduliert.

4.1.5 Die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Levels in BM-DC führt zu einer differenziellen Expression pro- und antiinflammatorischer Zytokine und zu einem differenziellen Zytokinprofil kokultivierter T-Zellen

Während des Kontaktes mit T-Zellen sezernieren DC Zytokine. Diese Zytokine sind essenziell für die Polarisierung der T-Effektor-Zellen [Tisch 2010]. Somit ist das Zytokinmuster der DC essenziell für die nachfolgende T-Zell-Antwort.

In der vorliegenden Arbeit wurden die inflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und IL-12 untersucht. An antiinflammatorischen Zytokinen wurden IL-1RA, IL-1r2, IL-10 und TGF β untersucht.

Die Synthese von inaktivem IL-1 β wird durch TLR-Liganden initiiert. Das inaktive IL-1 β wird dann durch andere Mechanismen in seine aktive Form überführt [Dinarello 2005].

LPS-stimulierte BM-DC haben im Vergleich zu unstimulierten eine gesteigerte mRNA-Expression von IL-1 β . Db-cAMP-DC weisen in beiden Differenzierungsstadien eine gesteigerte mRNA-Expression von IL-1 β verglichen mit BM-DC auf. Diese mRNA-Expression gibt allerdings noch keinen Aufschluss darüber, ob auf Proteinebene mehr IL-1 β gebildet wird.

Bei IL-1RA (IL-1 Rezeptor Antagonist) handelt es sich um den Inhibitor des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β . IL-1RA inhibiert dessen Bindung an den funktionellen IL-1 Rezeptor [Dinarello 1996]. Der IL-1RA wird in db-cAMP-DC vermehrt exprimiert verglichen mit BM-DC. Dies ist, wie zuvor beschrieben, auch für IL-1 β der Fall. Somit weisen die db-cAMP-DC eine vermehrte Expression beider Moleküle auf. Das führt dazu, dass das durch db-cAMP-DC gebildete IL-1 β durch seinen Inhibitor abgefangen werden könnte und somit nicht zur Aktivierung der T-Zellen beitragen würde. LPS-stimulierte BM-DC bilden hingegen vermehrt IL-1 β , aber nicht IL-1RA verglichen mit unstimulierten BM-DC. Somit kann bei ihnen IL-1 β zur T-Zell-Aktivierung beitragen.

Neben IL-1RA spielt aber auch der IL-1r2 bei der Aktivität von IL-1 β eine Rolle. Dieser hat keine zytoplasmatischen Domänen und somit keine Fähigkeit zur Signaltransduktion [Van Minkelen *et al.*, 2007]. Durch die Bindung von IL-1 reguliert IL-1r2 die Menge an IL-1, die an den funktionellen IL1r1 binden kann. Der IL-1r2 wird aber verglichen mit unstimulierten BM-DC sowohl von stimulierten BM-DC als auch von unstimulierten und stimulierten db-cAMP-DC in vergleichbar geringerem Maße exprimiert und dürfte somit keine entscheidende Rolle für die IL-1 β -Wirkung dieser DC haben.

IL-6 gehört zu den Zytokinen, die eine T_{H2} -Antwort induzieren, welche eine humorale Immunantwort nach sich zieht [Janeway *et al.*, 2002]. Sowohl LPS-stimulierte BM-DC als auch db-cAMP-DC zeigen eine vermehrte mRNA-Expression von IL-6 als ihr jeweiliges unstimuliertes Pendant.

Dass die db-cAMP-DC eine vermehrte mRNA-Expression von IL-6 aufweisen als die BM-DC, kann zu der Annahme führen, dass die kokultivierten T-Zellen eher einen T_{H2} -Phänotyp aufweisen. Dies ist jedoch nicht der Fall: T-Zellen, die mit stimulierten BM-DC kokultiviert wurden, sezernieren die größte Menge an IL-5 und T-Zellen, die mit stimulierten db-cAMP-DC kokultiviert wurden, geringere Mengen. T-Zellen, die mit unstimulierten BM-DC oder db-cAMP-DC kokultiviert wurden sezernieren kaum IL-5.

IL-12 gehört zu den Zytokinen, die eine T_{H1} -Antwort induzieren, was zu einer zellvermittelten Immunantwort führt [Janeway *et al.*, 2002]. IL-12p35 mRNA wird reifungsbedingt vermehrt von BM-DC exprimiert. Seine Expression ist sowohl in unstimulierten als auch LPS-stimulierten db-cAMP-DC verglichen mit der jeweiligen BM-DC-Population gesteigert. Die IL-12p40-Untereinheit wird sowohl in stimulierten BM-DC als auch in stimulierten db-cAMP-DC vermehrt exprimiert verglichen mit der jeweiligen unstimulierten Kontrolle. Bioaktives IL-12 wird hauptsächlich von stimulierten BM-DC sezerniert. Db-cAMP-DC sezernieren kaum IL-12. In der Literatur wird ebenfalls beschrieben, dass Agenzien, die das cAMP-Niveau erhöhen, IL-12 inhibieren [Kambayashi *et al.* 2001, Galgani *et al.*, 2004]. Von Bergwelt-Baildon *et al.* (2006) beschreiben für in vitro-generierte DC, dass eine PGE_2 -Gabe während der Ausreifung eher zu einem T_{H2} -induzierenden Phänotyp der DC führt. Dies geschieht aufgrund der Herunterregulierung von IL-12 [Von Bergwelt-Baildon *et al.*, 2006]. Die IL-12-Produktion von BM-DC wird auch durch endogene Prostaglandine vermindert [Harizi *et al.*, 2001].

Bei den beiden wichtigsten antiinflammatorischen Zytokinen handelt es sich um IL-10 und TGF- β . Sie limitieren die Induktion proinflammatorischer Mediatoren. Von natürlichen Treg gebildetes IL-10 und TGF- β spielt eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz [Grütz 2005]. Von IL-10 ist weiterhin bekannt, dass es die Antigenpräsentation von APC und die T-Zell-Aktivierung inhibiert. Es inhibiert bevorzugt die Proliferation von T_{H1} -Zellen. LPS-induziert exprimieren BM-DC vermehrt IL-10 mRNA und sezernieren mehr IL-10 als unstimulierte BM-DC. Die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Levels der BM-DC durch db-cAMP führt bei unstimulierten und stimulierten Zellen zu einer vermehrten Bildung

von IL-10. In humanen PBMC führt eine Erhöhung des cAMP-Niveaus ebenfalls zu einer Erhöhung der LPS-induzierten IL-10-Synthese [Eigler *et al.*, 1998]. Harizi *et al.* (2003) beschreiben, dass eine Behandlung von DC mit db-cAMP für 18h zu einer dosisabhängigen Stimulierung der endogenen IL-10-Produktion führt [Harizi *et al.*, 2003]

Das antiinflammatorische Zytokin TGF- β 1 wird von stimulierten BM-DC und von unstimulierten und stimulierten db-cAMP-DC verglichen mit unstimulierten BM-DC vermindert exprimiert.

Aufgrund der vermehrten IL-10- und der geringen IL-12-Sezernierung der db-cAMP-DC könnte man vermuten, dass die kokultivierten T-Zellen wenig T_H1-Zytokine sezernieren, da IL-10 wie zuvor erwähnt die T_H1-Proliferation hemmt und IL-12 für die Entwicklung der T_H1-Zellen mitverantwortlich ist.

Es ist tatsächlich aber so, dass in den Überständen der T-Zellen, die mit db-cAMP-DC kokultiviert wurden, das T_H1-Zytokin IFN γ auf einem etwas höheren Niveau nachgewiesen werden kann als bei solchen, die mit BM-DC kokultiviert wurden. Die T-Zellen, die mit unstimulierten db-cAMP-DC kokultiviert wurden produzieren sogar signifikant mehr IFN γ als solche, die mit unstimulierten BM-DC kokultiviert wurden. Insgesamt kann man also, zusammen mit der geringen Sezernierung von IL-5 durch T-Zellen, die mit db-cAMP-DC kokultiviert wurden, eher von einer Polarisierung in T_H1-Richtung als von einer T_H2- oder einer gemischten T-Zell-Antwort sprechen.

Neben den beiden zuvor beschriebenen von T-Zellen gebildeten Zytokinen IFN γ und IL-5 wurden auch noch das T_H2/Treg-Zytokin IL-10 und das T_H17-Zytokin IL-17 untersucht.

Es wird von allen T-Zellen IL-10 gebildet, jedoch am meisten von den T-Zellen, die mit stimulierten BM-DC kokultiviert wurden. IL-17 wird von allen vier untersuchten Gruppen sezerniert. BM-DC induzieren in den kokultivierten T-Zellen im stimulierten Zustand eine deutlich größere IL-17-Menge als im unstimulierten. T-Zellen, die mit db-cAMP-DC kultiviert wurden, sezernieren jedoch eine deutlich größere Menge an IL-17 als solche, die mit BM-DC interagierten.

Yao *et al.* (2009) beschreiben, dass PGE₂, das über seinen Rezeptor auf T-Zellen und DC wirkt, nicht nur die T_H1-Differenzierung sondern auch die IL-23 vermittelte T_H17-Expandierung *in vitro* fördert. T_H17-Zellen werden durch Antigenstimulation in Gegenwart von TGF- β und IL-6 induziert und durch IL-23 expandiert. Sie konnten des Weiteren zeigen, dass eine Aktivierung von DC über CD40 zu einer signifikanten Produktion von IL-23 führt, die durch die Zugabe von PGE₂ weiter gesteigert wird [Yao *et al.*, 2009]. Um zu klären, ob es

sich hier um eine Expandierung oder eine de Novo Induktion von T_H17-Zellen handelt, müssen weitere Untersuchungen gemacht werden. Es spricht allerdings gegen eine Induktion von T_H17-Zellen, dass von den db-cAMP-DC nicht vermehrt TGF- β , sondern nur vermehrt IL-6 sezerniert wird verglichen mit den BM-DC. Es wäre zur Klärung dieser Frage aber wichtig, die IL-23-Sezernierung der BM-DC und db-cAMP-DC zu testen.

PGE₂ fördert die T_H17-Expandierung in Gegenwart von IL-23 über cAMP-Induktion in den T-Zellen [Sakata *et al.*, 2010]. Wie zuvor erwähnt (4.1.4), weist der Überstand von db-cAMP-DC, vor allem der stimulierter db-cAMP-DC, vermehrt PGE₂ auf, verglichen mit den BM-DC. Dieses PGE₂ könnte zu einem Teil also auch einen Beitrag zu einer eventuellen Expandierung von T_H17-Zellen leisten.

Insgesamt kann man anhand der Ergebnisse der Untersuchung der Zytokin-Expression der DC sehen, dass die db-cAMP-DC ein anderes Zytokinprofil aufweisen als BM-DC. Des Weiteren induzieren db-cAMP-DC verglichen mit BM-DC auch in kokultivierten T-Zellen ein differenzielles Zytokinprofil. Db-cAMP-DC induzieren präferenziell eher einen T_H1- als einen T_H2-Phänotyp in kokultivierten T-Zellen.

4.1.6 Durch db-cAMP-DC werden nicht vermehrt regulatorische T-Zellen induziert

Tolerogene DC, die Treg induzieren, können mit Hilfe immunsuppressiver und antiinflammatorischer Substanzen generiert werden. Solche Substanzen beeinträchtigen die Reifung der DC. Sie inhibieren u.a. die Aufregulierung kostimulatorischer Moleküle und die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-12 [Adorini *et al.*, 2004]. Wie zuvor beschrieben (4.1.1), weisen db-cAMP-DC eine geringere Expression kostimulatorischer Moleküle und auch eine geringere Sezernierung von IL-12 auf als BM-DC (4.1.5).

Insgesamt spielt der Reifungsstatus der DC und das Zytokinmilieu während der Interaktion mit T-Zellen eine wichtige Rolle für die Entwicklung regulatorischer T-Zellen [Buckner *et al.*, 2004]. Wie zuvor beschrieben, sind sowohl der Reifungsstatus wie auch das Muster pro- und antiinflammatorischer Zytokine der db-cAMP-DC abweichend von dem der BM-DC. Des Weiteren induzieren die db-cAMP-DC eine T-Zell-Hypoproliferation. Aus diesen Gründen wurde die Induktion regulatorischer FoxP3⁺ T-Zellen durch BM-DC und db-cAMP-DC vergleichend untersucht.

CD4⁺CD25⁺ nTreg sind durch die Expression von GITR (Glucocorticoid-induzierter Tumor Nekrose Faktor Rezeptor), OX40 (CD134), L-Selectin (CD62L) und CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen 4; CD152) gekennzeichnet [Jonuleit und Schmitt 2003]. Es gibt aber nur einen spezifischen Marker muriner nTreg. Hierbei handelt es sich um den Transkriptionsfaktor FoxP3. FoxP3 ist der Hauptregulator der Entwicklung und Funktion von nTreg. FoxP3-defiziente Mäuse (scurfy Mäuse) haben keine nTreg und entwickeln ein schwerwiegendes lymphoproliferatives Autoimmunsyndrom, das zum Tod der Mäuse bereits 4 - 5 Wochen nach der Geburt führt. Diese Mäuse können aber durch den Transfer von CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ nTreg aus Wildtyp-Mäusen gerettet werden.

Murin wird FoxP3 exklusiv von Treg exprimiert und eine ektopische Expression in konventionellen CD4⁺CD25⁻ T-Zellen führt zu einer suppressiven Funktion dieser Zellen. Diese exklusive Expression unterscheidet FoxP3 von anderen Treg-Markern wie CD25 und GITR, die generell auf aktivierten T-Zellen exprimiert werden. Human wird FoxP3 im Gegensatz zum murinen System auch nach einer TCR-abhängigen Stimulierung in konventionellen CD4⁺ T-Helfer-Zellen aufreguliert, so dass FoxP3 human eher ein Aktivierungsmarker ist [Becker *et al.*, 2006].

Im Gegensatz zu nTreg sind adaptive Treg phänotypisch heterogen, mit einem variablen Niveau der CD25- und FoxP3-Expression. FoxP3 wird aber auch von einigen adaptiven Treg-Populationen exprimiert. TGF- β -sezernierende T_H3-Zellen exprimieren FoxP3 nach ihrer Induktion, während IL-10-sezernierende Tr1 Zellen kein FoxP3 exprimieren [Becker *et al.*, 2006, Workman *et al.*, 2009]

Da FoxP3 der einzig exklusive Treg-Marker ist, wurden mit BM-DC und db-cAMP-DC kokultivierte T-Zellen in dieser Arbeit auf ihre Expression von CD25 und FoxP3 hin untersucht. Dabei wurde zwischen CD4- und CD8-positiven T-Zellen unterschieden.

Weder bei CD4- noch bei CD8-positiven T-Zellen wurden vermehrt CD25⁺FoxP3⁺Treg durch cAMP-DC induziert. Insgesamt gab es auch keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Treg-Induktion durch BM-DC und db-cAMP-DC. Die meisten CD4- und auch CD8-positiven CD25⁺FoxP3⁺Treg wurden durch unstimulierte BM-DC induziert, die wenigsten durch stimulierte BM-DC und stimulierte db-cAMP-DC.

Somit gehen die phänotypischen Veränderungen der db-cAMP-DC verglichen mit den BM-DC nicht mit einer Induktion von Treg einher. Gegen eine Induktion von IL-10-produzierenden Tr1-Zellen spricht auch, dass von allen T-Zell-Populationen IL-10 gebildet wird, unabhängig davon ob sie mit BM-DC oder db-cAMP-DC kokultiviert wurden, jedoch am meisten von den T-Zellen, die mit stimulierten BM-DC kokultiviert wurden (4.1.6).

Es kann aber auch sein, dass die T-Zellen aufgrund der mangelnden Kostimulation und auch durch die geringe Expression von MHCII lediglich keine adäquate Stimulierung erfahren. So führt z.B. eine Erkennung von Antigen ohne Kostimulation durch die APC zur Inaktivierung oder Apoptose von T-Zellen [Lutz *et al.*, 2002]. Es wäre daher interessant in weiteren Versuchen die Induktion von Apoptose in T-Zellen durch kokultivierte db-cAMP-DC zu untersuchen.

4.1.7 Beitrag der PKA zum Phänotyp und der Funktion von db-cAMP-DC

Da cAMP insbesondere über die Proteinkinase A wirkt, wurde getestet, ob das verminderte T-Zell-Stimulierungspotential der db-cAMP-DC über die PKA vermittelt wird und ob eine Hemmung der PKA zu einem differenziellen Profil DC-relevanter sowie bekanntermaßen durch CREB-regulierter Gene in den db-cAMP-DC führt. Dies wurde durch den Einsatz des PKA-Inhibitors H-89 untersucht.

Für die Untersuchung der Beteiligung der PKA am verminderten T-Zell-Stimulierungspotenzial der db-cAMP-DC wurde der PKA-Inhibitor H-89 in zwei Konzentrationen eingesetzt. Er wurde wie das db-cAMP auch ab Tag 3 der Kultur zu den DC-Vorläuferzellen gegeben. Der PKA-Inhibitor H-89 hat in beiden verwendeten Konzentrationen keinen signifikanten Einfluss auf das T-Zell-Stimulierungspotenzial unstimulierter BM-DC. Die T-Zell-Stimulierungsfähigkeit der stimulierten BM-DC ist hingegen bei der höheren Konzentration vermindert. Wie schon zuvor beschrieben (4.1.1) vermitteln unstimulierte und stimulierte db-cAMP eine T-Zell-Hypoproliferation verglichen mit BM-DC. Diese kann teilweise durch eine Kultivierung der db-cAMP-DC in Gegenwart des PKA-Inhibitors bei beiden Konzentrationen aufgehoben werden.

Die PKA trägt somit zum verminderten T-Zell-Stimulierungspotenzial der db-cAMP-DC bei.

Wie zuvor beschrieben, wirkt db-cAMP der LPS-vermittelten gesteigerten Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 entgegen (4.1.1). Eine Inhibition der PKA wirkt ebenfalls der LPS-induzierten gesteigerten mRNA-Expression dieser drei Gene in BM-DC entgegen. Bei den db-cAMP-DC hat eine Inhibierung der PKA lediglich einen signifikanten Effekt auf CD80. Die CD80 mRNA-Expression wird aufgrund der PKA-Inhibierung signifikant vermindert verglichen mit den unbehandelten db-cAMP-DC.

Auf die Expression des Aktin-bündelungs Proteins Fascin hat die PKA-Inhibierung sowohl bei BM-DC als auch bei db-cAMP-DC keinen Einfluss. Dies ist ebenso für die Gene B7-H1 und SLAM, IL-1RA, IL-10, HO-1 und Cox-2 der Fall. Lediglich die mRNA-Expression von LIGHT ist signifikant vermindert in den db-cAMP-DC mit inhibierter PKA.

Außer auf die mRNA-Expression von CD40, CD80 und CD86 hat die PKA-Inhibierung also keinen bzw. kaum einen Effekt auf die Expression der untersuchten Gen. Sie wirkt also nicht der db-cAMP-vermittelten Inhibierung dieser kostimulatorischen Moleküle entgegen. Die inhibierte Expression dieser kostimulatorischen Moleküle in H-89-behandelten BM-DC könnte aber das verminderte T-Zell-Stimulierungspotenzial dieser Zellen erklären.

4.1.8 Beitrag der Cyclooxygenase-2 zu der Funktion von db-cAMP-DC

Neben der PKA können noch andere Moleküle eine Rolle bei der Vermittlung der verminderten T-Zell-Stimulierungskapazität von db-cAMP-DC eine Rolle spielen. Hierbei könnte Cox2 eine entscheidende Rolle zukommen. Eine Cox-2 vermittelte Produktion von PGE₂ erhöht die IL-10 Produktion, die wiederum die IL-12p70-Produktion und die APC-Funktion von BM-DC vermindert [Harizi *et al.*, 2002]. In der vorliegenden Arbeit konnte eine gesteigerte mRNA-Expression von Cox-2 sowie eine gesteigerte IL-10- und eine verminderte IL-12-Produktion durch eine Behandlung von BM-DC mit db-cAMP beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde das allogene T-Zell-Stimulierungspotential von BM-DC und db-cAMP-DC getestet, deren Cox-2 durch den selektiven Inhibitor NS-398 inhibiert wurde. Des Weiteren wurde der Inhibitor auch in die allogenen DC-/T-Zell-Kokulturen zugegeben, um einen eventuellen Effekt auf die T-Zellen zu untersuchen.

Eine Kultur von unstimulierten und stimulierten BM-DC in Anwesenheit des Cox-2-Inhibitors während der Differenzierung und/oder der Reifung führte zu keiner signifikanten Veränderung des T-Zell-Stimulierungspotenzials der BM-DC. Diese Ergebnis ist gegensätzlich zu dem von Harizi *et al.* (2002), die gezeigt haben, dass eine Inhibition der Cox-2 zu einer Steigerung des stimulatorischen Potenzials von BM-DC führt. Kalinski *et al.* (1997) zeigten jedoch auch konträre Ergebnisse zu denen von Harizi *et al.* (2002).

Wurde der Cox-2 Inhibitor hingegen während der DC-/T-Zell-Kokultur zugegeben, zeigte sich bei allen Gruppen eine signifikant verminderte Proliferation der kokultivierten T-Zellen. Für unstimulierte BM-DC waren die Unterschiede in der T-Zell-Proliferation am größten.

Insgesamt scheint Cox-2 in den T-Zellen mit eine Rolle bei der Proliferation der T-Zellen zu spielen.

Auf die T-Zell-Stimulierungskapazität unstimulierter db-cAMP-DC hat eine Inhibition der Cox-2 unabhängig von der Dauer der Inhibitor-Einwirkung keinen Einfluss. Die Proliferation von T-Zellen, die mit stimulierten db-cAMP-DC kokultiviert wurden, ist lediglich dann signifikant beeinflusst, wenn der Cox-2 Inhibitor zu den T-Zellen und zu den unbehandelten db-cAMP-DC in die Kultur zugegeben wurde. Die T-Zell-Proliferation ist dann signifikant geringer.

Insgesamt ist also ersichtlich, dass das verminderte T-Zell-Stimulierungspotenzial der db-cAMP-DC nicht über Cox-2-abhängig gebildete Mediatoren vermittelt wird.

4.1.9 Weisen db-cAMP-DC phänotypische und funktionelle Übereinstimmungen mit myeloiden Suppressorzellen auf?

Da das db-cAMP beginnend ab einem frühen Zeitpunkt in die BM-DC-Kultur, d.h. während der Differenzierung, zugegeben wird, könnte es sein, dass es sich bei den differenzierten db-cAMP-Zellen um myeloide Suppressorzellen (MDSC = „myeloid-derived suppressor cells“) handelt. Gr1⁺ CD11b⁺ MDSC tauchen üblicherweise nur transient in BM-DC-Kulturen auf. Sie zeigen *in vitro* eine suppressive Aktivität auf allogene und auf OVA-spezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Antworten [Rößner *et al.*, 2005]. MDSC spielen eine kritische Rolle in der Tumor-assoziierten Immunsuppression und inhibieren T-Zell-Antworten antigenspezifisch oder unspezifisch [Youn *et al.*, 2008]. Aus diesem Grund wurden die db-cAMP-DC mittels FACS-Analyse auf typische DC- aber auch auf MDSC-Marker hin untersucht.

MDSC sind negativ für MHCII und CD86, aber positiv für CD80 [Rößner *et al.*, 2005]. Db-cAMP-DC waren in beiden Differenzierungsstadien ebenfalls CD80-positiv. CD86- und MHCII-positiv war nur eine sehr kleine Population der db-cAMP-DC. Da es sich bei MDSC um Gr-1⁺CD11b⁺ Zellen handelt [Rößner *et al.*, 2005, Youn *et al.*, 2008], wurde auch die Expression dieser Marker auf db-cAMP-DC untersucht. Es ist aber nur eine sehr kleine Population der db-cAMP-DC positiv für das myeloide Differenzierungsantigen Gr-1. Diese Expression ist allerdings sehr schwach. Db-cAMP-DC exprimieren, wie auch BM-DC, CD11b. Sie exprimieren aber auch den DC-Marker CD11c, für den MDSC negativ sind.

Des Weiteren sind MDSC negativ für CD14, aber positiv für F4/80 [Rößner *et al.*, 2005]. BM-DC exprimieren kein, die db-cAMP-DC kaum CD14 auf ihrer Oberfläche. Unstimulierte BM-DC sowie unstimulierte und stimulierte db-cAMP-DC exprimieren F4/80.

Insgesamt weisen die db-cAMP-DC auf Ebene ausgewählter Oberflächenmarker einige Übereinstimmungen mit MDSC auf. Sie zeigen aber auch essenzielle Übereinstimmungen mit DC.

Um zu überprüfen, ob sich db-cAMP-DC wie MDSC verhalten, wurde in Anlehnung an die Veröffentlichung von Youn *et al.* (2008) ein Suppressionstest durchgeführt.

Unstimulierte BM-DC supprimieren die durch stimulierte BM-DC induzierte T-Zell-Proliferation in allen verwendeten Zellzahlen. Es war zu erwarten, dass stimulierte BM-DC die T-Zell-Proliferation nicht supprimieren. Entgegen der Erwartung supprimieren stimulierte BM-DC in den beiden niedrigeren eingesetzten Zellzahlen ebenfalls die Proliferation der T-Zellen. Weshalb dies der Fall war, ist mit dem gegenwärtigen Kenntnisstand nicht erklärbar.

Stimulierte db-cAMP-DC supprimieren, außer in der höchsten Konzentration, ebenfalls die T-Zell-Proliferation, wohingegen unstimulierte db-cAMP-DC bei allen Zellzahlen die T-Zell-Proliferation inhibieren. Insgesamt ist es anhand der Ergebnisse dieses Tests schwer, Aussagen über die Funktion der db-cAMP-DC zu machen, da auch die stimulierten BM-DC die T-Zell-Proliferation inhibieren können. Jedoch beobachteten auch Youn *et al.* (2008), dass unterschiedliche MDSC-Zahlen zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können. Bei einer Ratio an MDSC/APC von 1/3 supprimierten alle von ihnen untersuchten MDSC-Populationen, jedoch nicht bei einer Ratio von 1/12 [Youn *et al.*, 2008].

Es gibt unterschiedliche mögliche Mechanismen der suppressiven Aktivität verschiedener MDSC-Subtypen. Diese können insbesondere auf der Aktivität der Arginase und der NO- und ROS-Produktion basieren [Youn *et al.*, 2008].

Youn *et al.* (2008) fanden heraus, dass weder granulozytische noch monozytische MDSC ihre suppressive Aktivität über Arginase vermitteln. Diese beiden Populationen verwenden aber unterschiedliche Mechanismen der T-Zell-Suppression. Granulozytäre MDSC zeigen ein hohes ROS-Niveau und monozytäre ein hohes NO-Niveau. Ihre suppressive Aktivität kann durch die entsprechenden Inhibitoren gehemmt werden [Youn *et al.*, 2008].

Eine Inhibition der NOS2 und der ROS hatte weder bei BM-DC noch bei db-cAMP-DC einen Einfluss auf deren suppressive Eigenschaften. Eine Inhibierung der Arginase-1 führte aber

sowohl bei BM-DC als auch bei db-cAMP-DC in beiden Differenzierungsstadien zu einer Steigerung der suppressiven Kapazität.

Da die Hemmung keines der untersuchten Moleküle zu einem Bruch der suppressiven Eigenschaften von db-cAMP-DC, aber auch der BM-DC führte, handelt es sich bei den untersuchten Zellen nicht um myeloide Suppressorzellen im klassischen Sinne.

Neben dem Einfluss der Arginase und von NO und ROS auf die suppressiven Eigenschaften der BM-DC und db-cAMP-DC wurde auch ihr Einfluss auf das allogene T-Zell-Stimulierungspotenzial der verschiedenen DC-Populationen untersucht. Die Inhibition der NOS2 führt zu keinem veränderten T-Zell-Stimulierungspotenzial der BM-DC und db-cAMP-DC. Eine Inhibition der Arginase-1 führt zu einer verminderten T-Zell-Stimulierungskapazität aller untersuchten DC-Gruppen. Diese Verminderung der T-Zell-Stimulierungskapazität war aber nur bei stimulierten BM-DC und bei unstimulierten db-cAMP-DC statistisch signifikant. Die ROS-Inhibition führt bei allen untersuchten Gruppen zu einer signifikant gesteigerten T-Zell-Stimulierungskapazität. Allein bei unstimulierten BM-DC ist diese Steigerung signifikant. ROS scheint somit einen, wenn auch geringen, negativen Effekt auf die T-Zell-Stimulierungskapazität von DC zu haben.

4.2 Etablierung der lentiviralen Transduktion von SP37A3-Zellen

Für Studien mit murinen DC wird hauptsächlich auf BM-DC zurückgegriffen. Diese haben aber Nachteile: Sie müssen nicht nur zeitaufwändig generiert werden, die BM-DC-Kulturen können außerdem Kontaminationen anderer Zelltypen enthalten. Des Weiteren haben sie insgesamt einen heterogenen Phänotyp [Masurier *et al.*, 1999]. Um diese Probleme zu umgehen, ist es interessant, Studien mit DC-Zelllinien durchzuführen, die sich ähnlich wie BM-DC verhalten. Die murine DC-Zelllinie SP37A3 wurde 2007 von Bros *et al.* charakterisiert. Sie zeigten, dass die SP37A3-Zellen eine geeignete Alternative für BM-DC sind. Sowohl im unreifen als auch im stimulierten Zustand weisen sie einen Phänotyp und eine Funktion auf, die denen von BM-DC ähnelt. Unstimulierte SP37A3-Zellen, wie auch unstimulierte BM-DC, stimulieren naive T-Zellen nur in einem geringen Maße. Stimulierte SP37A3 hingegen stimulieren naive T-Zellen ebenso potent wie stimulierte BM-DC. Bros *et al.* testeten außerdem, ob es möglich ist, einen tolerogenen Status in SP37A3-Zellen zu induzieren. Hierfür verwendeten sie Dexamethason (DEX), das zu der Gruppe der

Glucocorticoide gehört. Hierbei handelt es sich um antiinflammatorische und immunsuppressive Wirkstoffe, die bei der Behandlung von Autoimmun- und allergischen Erkrankungen eingesetzt werden [Vieira *et al.*, 1998]. Für SP37A3-Zellen zeigte sich, dass durch eine alternative Aktivierung in Gegenwart von DEX ein tolerogener Status induziert werden konnte. SP37A3-Zellen stellen somit eine geeignete Zelllinie für das Studium von DC-Funktionen in unterschiedlichen Reifungsstadien dar

Für die Etablierung der lentiviralen Transduktion der DC-Linie SP37A3 wurde das Molekül B7-H3 ausgewählt, da es, wie in dieser Arbeit gezeigt, von unbehandelten SP37A3-Zellen, aber auch von BM-DC nicht auf der Oberfläche exprimiert wird. Dieser Umstand erleichtert es festzustellen, ob ein lentiviraler Gentransfer stattgefunden hat, da B7-H3-positive Zellen nur nach einer erfolgreichen Transduktion vorliegen können. Zur Etablierung der lentiviralen Transduktion der SP37A3-Zellen wurde zunächst versucht, die Zellen mit B7-H3-kodierenden Virus-Überständen zu transduzieren. Drei Tage nach der Transduktion mit B7-H3- und LV-kodierenden Virus-Überständen konnten EGFP-positive SP37A3-Zellen nachgewiesen werden. Die mit den B7-H3-kodierenden Virus-Überständen transduzierten SP37A3-Zellen wiesen aber, wie die LV- und Kontroll-SP37A3-Zellen auch, keine Expression von B7-H3 auf. Dies war sowohl bei unstimulierten als auch bei stimulierten SP37A3-Zellen der Fall. Aufgrund dessen wurden BM-DC und die humane embryonale Nierenzelllinie HEK293T ebenfalls mit den B7-H3- und LV-kodierenden Virus-Überständen transduziert, um zu prüfen, ob ein methodisches Problem der Grund war oder ob es an den SP37A3-Zellen lag. Die HEK 293T-Zellen wurden als Positivkontrolle zusätzlich mit Plasmid-DNA transfiziert.

Von murinen BM-DC ist bekannt, dass sie mit Hilfe von Lentiviren effizient transduziert werden können [Dullaers und Thielemans, 2006]. In BM-DC, die mit B7-H3- und LV-kodierenden Virus-Überständen transduziert wurden, war wie bei den SP37A3-Zellen auch, eine Expression des Reporters EGFP im FACS nachweisbar. Aber auch keine der BM-DC-Gruppen wies im unstimulierten oder stimulierten Zustand eine Expression des Transgens B7-H3 auf der Zelloberfläche auf. Auch das Ergebnis der Transduktion der HEK 293T-Zellen fiel negativ aus: Die transduzierten HEK 293T-Zellen zeigten zwar eine EGFP-Expression, es war aber in keiner der untersuchten Gruppen eine B7-H3-Expression nachzuweisen.

Als Positivkontrolle wurden HEK 293T-Zellen mit LV- und B7-H3-kodierenden Plasmiden transfiziert. Dies führte zu einer sehr starken EGFP-Expression mit einer viel stärkeren Intensität als bei den transduzierten HEK 293T-Zellen. Des Weiteren exprimierten die mit

dem B7-H3-kodierenden Vektor transfizierten HEK 293T-Zellen B7-H3 in hohem Maße auf der Oberfläche. Somit ist auszuschließen, dass der Nachweis der B7-H3-Expression das Problem war, sondern die Transduktion an sich. Außerdem konnte hierdurch gezeigt werden, dass das verwendete Expressionskonstrukt in Ordnung ist.

Zusätzlich zu den Versuchen mit B7-H3 wurde, da dessen Überexpression nicht erfolgreich war, ein weiteres Transgen getestet. Hierfür wurde kein membrangebundenes Molekül ausgesucht, sondern ein sezerniertes, IL-10. Für das Zytokin IL-10 wurde gezeigt, dass eine Überexpression in humanen DC durch adenovirale Transduktion möglich ist [Coates *et al.*, 2001].

Diese Versuche wurden ebenfalls parallel mit BM-DC und SP37A3-Zellen durchgeführt, um eventuelle Unterschiede in der Transduzierbarkeit beider Zelltypen festzuhalten.

Zwischen Kontroll-, LV- und IL-10-SP37A3-Zellen im unstimulierten und stimulierten Zustand konnten allerdings keine Unterschiede in der IL-10 Sezernierung festgestellt werden. Somit war eine Transduktion von SP37A3-Zellen mit virushaltigen Überständen auch in diesem Fall nicht möglich.

IL-10 transduzierte BM-DC hingegen weisen eine signifikant höhere IL-10-Sezernierung auf als die beiden Kontrollgruppen. Um zu untersuchen, worauf die Unterschiede zwischen den BM-DC und den SP37A3-Zellen basieren, ist es entscheidend sich das unterschiedliche Transduktionsprotokoll dieser beiden DC-Typen anzusehen: Prinzipiell verläuft die Transduktion mit den virushaltigen Überständen bei BM-DC und SP37A3-Zellen ähnlich. Der einzige relevante Unterschied ist, dass die SP37A3-Zellen einen Tag vor der Analyse der EGFP- und Transgenexpression vollständig gewaschen wurden. Dies geschah aufgrund dessen, dass die SP37A3-Zellen im unstimulierten Zustand in Gegenwart von M-CSF kultiviert werden, um eine Ausreifung der Zellen zu verhindern. Verbleibt das M-CSF in der Kultur, sind die SP37A3-Zellen nicht stimulierbar. Das M-CSF muss somit ausgewaschen werden. Bei BM-DC ist dieser Waschschrift nicht nötig. Um zu untersuchen, ob dieser Waschschrift den Unterschied in der Expression bzw. Sezernierung von IL-10 bedingt, wurden SP37A3-Zellen nach dem Protokoll der BM-DC transduziert und umgekehrt.

Wurden die SP37A3-Zellen nicht gewaschen, konnten in ihren Kulturüberständen, wie bei IL-10-BM-DC auch, größere Mengen an IL-10 detektiert werden. Wurden die Zellen aber anschließend wieder gewaschen und für weitere 24 bzw. 72 Stunden kultiviert, konnte unabhängig vom Reifungsstadium der SP37A3-Zellen keine vermehrte IL-10 Produktion beobachtet werden. Wurden die BM-DC vor der Analyse gewaschen, konnten anschließend nur noch sehr geringe Mengen an IL-10 im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Die in

diesem Versuch mitgeführte Kontrolle, die keine Zellen enthielt, sondern nur virushaltigen Überstand, wies die gleiche IL-10 Menge im Überstand wie die ungewaschenen IL-10-BM-DC auf. Dies lässt die Vermutung zu, dass es sich bei dem nachgewiesenen IL-10 nicht um IL-10 handelt, das durch die transduzierten Zellen produziert wurde. Vielmehr hat es den Anschein, dass das IL-10 schon in den virushaltigen Überständen vorhanden ist. Diese Vermutung konnte durch die Überprüfung des IL-10-Gehaltes von virushaltigen LV- und IL-10-Überständen bestätigt werden.

Eine Erklärung dafür, dass die eben beschriebenen Transduktionen nicht erfolgreich im Sinne einer Transgenüberexpression verliefen ist ein Auftreten von Pseudotransduktion [Haas *et al.*, 2000, Nash und Lever, 2004].

4.2.1 Auftreten von Pseudotransduktion bei der lentiviralen Transduktion mit Virusüberständen

Nash und Lever (2004) beschreiben, dass bei einer Verwendung von EGFP als Reporter eine grüne Fluoreszenz der Zielzellen nicht unbedingt gleichbedeutend mit einer Expression des Reportergens ist. Bei der Transduktion kann es in den Zielzellen entweder zur Integration des Reportergens GFP in das Genom oder aber auch zum passiven Transfer von GFP-Protein aus dem Zellkulturüberstand der Produktionszelllinie HEK 293T kommen. Diesen passiven Transfer von GFP bezeichnet man als Pseudotransduktion. Zum Nachweis von Pseudotransduktion verwendeten Nash und Lever zwei unterschiedliche lentivirale Plasmide. Das eine enthielt ein funktionelles Verpackungssignal, was dazu führt, dass die RNA in virale Partikel verpackt werden kann. Das Zweite enthielt kein funktionelles Verpackungssignal, wodurch die RNA nicht in virale Partikel verpackt und somit nicht in die Zielzelle transferiert werden kann. Drei Tage nach der Transduktion von Hepatozyten mit konzentriertem Virus erhielten Nash und Lever mit beiden Plasmiden eine annähernd gleiche Anzahl an GFP-positiven Zellen, obwohl in der einen Gruppe kein funktionales GFP-Gen übertragen worden sein sollte. In der Gruppe, die ohne funktionelles Verpackungssignal transduziert wurde, war an Tag 7 nach der Transduktion jedoch keine GFP-Fluoreszenz mehr im FACS nachweisbar. Es handelte sich hierbei also nicht um eine echte Transduktion, sondern um einen passiven Transfer von Protein innerhalb der viralen Partikel, also um eine Pseudotransduktion. Bei dieser degradiert, in dem vorliegenden Fall, das Protein bis Tag 7 nach der Transduktion. Bei einer funktionellen Transduktion mit intaktem Verpackungssignal hingegen beschreiben Nash

und Lever, dass die GFP-Expression aufrechterhalten bleibt, wobei die Expression des Reporters in den ersten 7 Tagen leicht schwächer wird. Man kann also davon ausgehen, dass Pseudotransduktion zu einem gewissen Teil auch zu dem hohen GFP-Expressionsniveau zu früheren Zeitpunkten beiträgt. Ein Fazit aus den Versuchen ist, dass die GFP-Expression in Zielzellen zu frühen Zeitpunkten nicht unbedingt eine erfolgreiche Transduktion widerspiegelt. Es ist daher immer besser, eine Analyse der transduzierten Zielzellen über 7 Tage durchzuführen, da immer Proteine passiv in die viralen Partikeln inkorporiert und somit in die Zielzelle transferiert werden können. Nach 7 Tagen kann man von einer echten Transgenexpression ausgehen [Nash und Lever, 2004]

Eine weitere Publikation, die sich mit dem Thema der Pseudotransduktion beschäftigt, ist von Haas *et al.* (2000). Diese Studie beschäftigt sich mit der Fragestellung, ab welchem Zeitpunkt nach der Transduktion EGFP-positive Zellen im FACS als Indikator für eine stabile Transduktion dienen. Die Autoren gehen davon aus, dass die FACS-Analyse der Transduktionseffizienz zu frühen Zeitpunkten nach der Transduktion durch 2 Artefakte erschwert wird: Hierbei handelt es sich um Pseudotransduktion und um die transiente Expression von nicht integriertem Vektor. Bei der Pseudotransduktion handelt es sich, wie zuvor erwähnt, um den direkten Transfer des Markergen-Proteins durch seine Anwesenheit im Vektorüberstand oder durch seine Inkorporierung in die Viruspartikel. Bei der transienten Expression von nicht integriertem Vektor geschieht die Expression des Marker-Gens des Vektors in der Zielzelle vor der Integration in das Genom der Zielzelle.

Zum Nachweis der Pseudotransduktion tauschten Haas *et al.* das von ihnen verwendete lentivirale Plasmid gegen ein nicht lentivirales, CMV-Promotor-getriebenes EGFP-Expressionsplasmid aus. Dies führt dazu, dass das EGFP-Protein von den virusproduzierenden Zellen gebildet wird, aber kein Vektor-Transkript für die Inkorporierung in Viruspartikel vorhanden ist. Das führt zur Bildung von pseudolentiviralen Überständen, die freies EGFP Protein und Viruspartikel enthalten können, die frei von Vektor-Genom sind, mit denen aber eine Infektion der Zielzellen noch möglich ist. 12 Stunden nach einer einzelnen Behandlung mit pseudolentiviralen Überständen ist eine Population von schwach EGFP-positiven Zellen zu beobachten. Diese sind an Tag 7 nach der Vektorgabe nicht mehr vorhanden. Zur Beantwortung der Frage, ob auch eine transiente Expression von nicht integriertem Vektor möglich ist, wurde ein Verpackungsplasmid mit funktioneller Integrase gegen ein Verpackungsplasmid ausgetauscht, das für ein funktionsloses Integraseprotein codiert. Dies führte dazu, dass die viralen Überstände Viruspartikel enthalten, die nicht in das Genom der Zielzelle integrieren können. Nach 12 Stunden gab es auch in diesem Ansatz

positive Zellen durch Pseudotransduktion. Nach 7 und 14 Tagen sind mit dem Integrase-defekten Vektor noch positive Zellen zu finden, einige davon sogar mit hoher EGFP-Fluoreszenz. Entweder ist bei diesen Zellen die Vektor-Integration nicht nötig für die Expression oder eine geringe Zahl an Integration passiert durch einen nicht-Integrase-vermittelten Mechanismus. Die Stabilität von EGFP, die üblicherweise größer als 24 Stunden ist, trägt ebenfalls zu den EGFP-positiven Zellen infolge der Applikation Integrase-defizienten Plasmids bei. Dies zeigen Versuche von Haas *et al.* mit destabilisiertem EGFP, das eine Halbwertszeit von lediglich 4 Stunden hat. Es zeigte sich, dass der Integrase-defiziente Vektor mit dem destabilisiertem EGFP in den Zielzellen nur bis zu vier Tage nach der Transduktion zu positiven Zellen führt, im Gegensatz zu Tag 14 unter Verwendung konventionellen EGFPs. Auch die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass man bei der Interpretation von EGFP-Expressionsdaten, die zu früheren Zeitpunkten nach der Transduktion im FACS generiert werden, vorsichtig sein muss [Haas *et al.*, 2000]. In jedem Fall ist es besser, neu generierten Virus nach einem längeren Zeitraum von mindestens 7 Tagen zu testen.

In der vorliegenden Arbeit kam es zur Pseudotransduktion von SP37A3-, HEK 293T-, HT1080-Zellen und BM-DC. Alle verwendeten Zelltypen weisen 3 Tage nach der Transduktion EGFP-positive Zellen auf. Wie jedoch anhand der Transduktion der HT1080 Zellen mittels virushaltiger Überstände gezeigt werden kann, ging die EGFP-Fluoreszenz nach 7 Tagen in den meisten Zellen verloren. Lediglich eine kleine Zell-Population verbleibt auch nach 14 Tagen noch EGFP-positiv. Dies könnte an dem von Haas *et al.* beschriebenen Integrase-unabhängigen Mechanismus der Integration liegen. Es konnte somit die Hypothese aufgestellt werden, dass dies in der vorliegenden Arbeit auch der Fall war. Aus diesem Grund wurde das bis dahin verwendete PCMV Δ R8.91-Plasmid, das für das virale pol und somit für die Integrase kodiert, ausgetauscht. Nach dem Austausch des potenziell defekten Plasmids PCMV Δ R8.91 konnte in SP37A3-Zellen über einen längeren Zeitpunkt (10 Tage) eine EGFP-Fluoreszenz beobachtet werden, die somit nicht aus einer Pseudotransduktion hervorzugehen scheint.

In der vorliegenden Arbeit konnte des Weiteren gezeigt werden, dass das Problem der Pseudotransduktion nicht auf den Reporter EGFP limitiert ist. Auch Transgene können davon betroffen sein. Die Produzenten-Zelllinie HEK 293T exprimiert nach der Transfektion mit dem Ziel der Virusproduktion nicht nur EGFP, sondern auch das entsprechende Transgen, im vorliegenden Fall B7-H3 oder IL-10. Handelt es sich bei dem Transgen um einen solublen Faktor wie IL-10, ist die Interpretation einer Transduktion problematisch. Eine Transduktion

von Zielzellen mit virushaltigen Überständen schien in der vorliegenden Arbeit eine Überexpression des Transgens zu vermitteln. Bei genauerer Untersuchung zeigte sich, dass es zu keiner Expression des Transgens IL-10, sondern lediglich zu einer extrazellulären Behandlung der Zielzellen mit IL-10 kam. Dies ist dadurch ersichtlich, dass nach einem Entfernen des virushaltigen Überstandes sowohl von SP37A3-Zellen als auch BM-DC zu keiner nennenswerten IL-10-Abgabe in der Überstand kommt. Ein weiterer Beweis dafür ist, dass auch in Ansätzen, die keine Zellen, sondern nur virushaltigen Überstand enthalten, ebenso viel IL-10 nachweisbar ist, wie in solchen Ansätzen, die bspw. BM-DC enthalten. Aus diesem Grund ist es essenziell, mit ankonzentriertem Virus zu arbeiten, da bei diesem die Konzentration an IL-10 verringert ist. Trotzdem findet bei solublen Transgenen auch mit ankonzentriertem Virus noch eine, wenn auch geringere, Behandlung der Zielzellen mit dem von den Produzenten-Zellen produzierten Protein statt.

4.2.2 Titration der MOI zur effizienten Transduktion von SP37A3-Zellen

Neben dem Problem der Pseudotransduktion zeigte sich aber auch, dass zu geringe Mengen an Virus, also eine zu geringe eingesetzte MOI („multiplicity of infection“), nicht zu einer Transgenexpression in SP37A3-Zellen führt. Bei der MOI handelt es sich um die Ratio der Gesamtzahl der Viruspartikel und der Zahl der Zielzellen. In dieser Arbeit wurden drei verschiedene MOI zum Test der Transduktion und zur Annäherung an Idealbedingungen zur Überexpression von Transgenen verwendet. So zeigt sich auch, dass SP37A3-Zellen, die mit 10 Viruspartikeln je Zelle behandelt wurden nur eine relativ geringe Prozentzahl EGFP-positiver Zellen mit niedriger Fluoreszenzintensität aufwiesen. Bei der 5- und 10-fach höheren MOI waren weitaus mehr Zellen EGFP-positiv und exprimierten EGFP mit einer höheren Intensität. Des Weiteren kam es zu einer de novo Expression von B7-H3 auf der Oberfläche der SP37A3-Zellen nur wenn eine MOI von 50 und 100 verwendet wurde. SP37A3-Zellen sind somit prinzipiell mit ankonzentriertem Virus mit einer MOI von 50 und größer transduzierbar und können als Modell myeloider DC in Versuche, die eine lentiviral vermittelte Überexpression ausgewählter Moleküle voraussetzen, eingesetzt werden.

Es muss zukünftig noch untersucht werden, inwieweit eine Behandlung der SP37A3-Zellen mit viralen Partikeln methodenbedingt zu phänotypischen oder funktionellen Veränderung der Zellen führt. Für das Molekül B7-H3 muss im Weiteren untersucht werden, ob seine Überexpression einen Einfluss auf das T-Zell-Stimulierungs-Potenzial der SP37A3-Zellen,

aber auch auf ihre Expression kostimulatorischer Moleküle und auf ihre Zytokinproduktion hat.

Zusammenfassend kann zu der lentiviralen Transduktion gesagt werden, dass es essenziell ist, neuen Virus bzw. neu eingesetzte Plasmide immer erst einmal über einen Zeitraum von mindestens 7 Tagen zu testen, um eine Pseudotransduktion ausschließen zu können. Des Weiteren ist es essenziell mit konzentriertem Virus und nicht mit Virusüberständen zu arbeiten, da es sonst zu einer ausgeprägten Verschleppung des zu untersuchenden Proteins von den Produzenten-Zellen auf die Zielzellen kommt.

5. Zusammenfassung

Mechanismen der zentralen und der peripheren Toleranz schützen den Körper vor Immunreaktionen gegen körpereigenes Gewebe oder gegen harmlose Umweltantigene. An der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz sind tolerogene Dendritische Zellen (DC) beteiligt. Tolerogene DC können *in vitro* u.a. mit Hilfe von immunsuppressiven und antiinflammatorischen Substanzen, aber auch durch virale Transduktionen, die zur Denovo- oder Überexpression toleranzassoziierter Moleküle führen, generiert werden.

Da die Wirkung einiger immunmodulatorischer Substanzen über den intrazellulären sekundären Botenstoff cAMP vermittelt wird, sollte getestet werden, welchen Einfluss eine direkte Erhöhung des intrazellulären cAMP-Niveaus mittels Dibutyryl-cyclo-Adenosin-3',5'-Mono-Phosphat (db-cAMP) auf die phänotypischen und funktionellen Eigenschaften von BM-DC („bone marrow derived dendritic cells“) hat.

Im Vergleich zu unbehandelten BM-DC wiesen db-cAMP-DC ein vermindertes T-Zell-Stimulierungspotenzial auf. Dieses verminderte T-Zell-Stimulierungspotenzial wird teilweise über die Proteinkinase A, nicht aber über Cyclooxygenase-2 (Cox-2) vermittelt.

Anhand der FACS-Analyse mit DC- und MDSC- („myeloid derived suppressor cells“) spezifischen Markern konnte gezeigt werden, dass es sich bei den db-cAMP-DC um CD11c-positive DC mit einer vergleichsweise niedrigen Expression von MHCII und kostimulatorischen Oberflächenmolekülen handelt. Des Weiteren zeigte sich, dass sie verglichen mit BM-DC eine vermehrte mRNA-Expression der koinhibitorischen Moleküle B7-H1 und LIGHT und der toleranzassozierten Moleküle FcγRIIB, HO-1 und Cox-2 aufweisen. Mittels ELISA konnte eine gesteigerte Expression der HO-1- und eine moderat gesteigerte PGE₂-Synthese beobachtet werden. PGE₂ wird mit Hilfe der Cox-2 aus Arachidonsäure gebildet.

Im Gegensatz zu BM-DC wiesen db-cAMP-DC in beiden Reifungsstadien ein verändertes Zytokinprofil auf: Auf mRNA-Ebene zeigte sich, dass db-cAMP-DC verglichen mit BM-DC vermehrt IL-1RA und IL-10 exprimieren. Dieser Unterschied konnte für IL-10 auch mittels ELISA bestätigt werden. In den Kulturüberständen der stimulierten db-cAMP-DC konnte, im Gegensatz zu denen stimulierter BM-DC, kaum bioaktives IL-12 nachgewiesen werden.

Db-cAMP-DC induzierten des Weiteren in kokultivierten allogenen T-Zellen ein differenzielles Zytokinprofil: Sie förderten die INFγ- und IL-17-Sezernierung durch T-Zellen, während die IL-5-Sezernierung geringer war, wenn T-Zellen mit stimulierten db-cAMP-DC kokultiviert wurden. Db-cAMP-DC hatten hingegen keinen Einfluss auf die IL-10-

Produktion. Außerdem führte eine Kokultur der db-cAMP-DC mit allogenen T-Zellen nicht zu einer gesteigerten Induktion von FoxP3⁺ Treg.

In einem zweiten Ansatz sollte getestet werden ob es möglich ist die murine DC-Linie SP37A3 lentiviral mit dem toleranzassoziierten Oberflächenprotein B7-H3 zu transduzieren. Dies ist von Interesse, da die SP37A3-Zellen einige Vorteile gegenüber BM-DC aufweisen, wie z.B. ihren homogenen Phänotyp und die Möglichkeit sie in einer Expansionskultur zu halten.

Es konnte gezeigt werden, dass SP37A3-Zellen als Modell für myeloide DC für die Transduktion mit lentiviralen Partikeln geeignet sind. Hierbei zeigte es sich aber, dass darauf geachtet werden muss, mit konzentriertem Virus zu arbeiten und dass die Reporterexpression der Zielzellen über mehr als 3 Tage (mindestens 7 Tage) untersucht werden muss. Nur so kann eine eventuell auftretende Pseudotransduktion erkannt und verhindert werden. Ab einer MOI („multiplicity of infection“) von 50 konnte in SP37A3-Zellen eine Transgen-Expression nachgewiesen werden.

6. Abstract

The mechanisms of central and peripheral tolerance protect the body from unwanted immune reactions against self and harmless antigens. Tolerogenic dendritic cells (DC) contribute to the maintenance of the peripheral tolerance. DC can be tolerized *in vitro* by applying immunomodulatory substances or via lentiviral transduction that leads to the de novo or overexpression of tolerance associated molecules.

The tolerizing effect of several immunomodulatory compounds was shown to involve the activation of the intracellular second messenger cAMP. Therefore, the effect of a direct increase in the intracellular cAMP-level of murine BM-DC by dibutyryl-cAMP (db-cAMP) on the phenotypical and functional properties was elucidated.

Compared to BM-DC, db-cAMP-DC exerted a diminished T-cell-stimulatory capacity. This was partially mediated by Protein kinase A, but not by Cyclooxygenase 2 (Cox-2).

When DC- and myeloid derived suppressor cell markers were analyzed by FACS-analysis, db-cAMP-DC were characterized as CD11c-positive dendritic cells with low surface expression of costimulatory molecules and MHCII. Furthermore they had an increased mRNA-level of the coinhibitory molecules B7-H1 and LIGHT and of the tolerance associated molecules Fc γ RIIB, HO-1 and Cox-2. Accordingly, on the protein level an increased amount of HO-1 and PGE₂ was detected. Cox-2 mediates the synthesis of PGE₂ from arachidonic acid. Compared with BM-DC, db-cAMP-DC displayed an altered cytokine pattern: They expressed more IL-1RA and IL-10 on the mRNA level. This upregulation could also be validated for IL-10 by ELISA. In contrast to stimulated BM-DC, the culture supernatants of db-cAMP-DC hardly contained bioactive IL-12.

Db-cAMP-DC induced a different cytokine pattern in cocultivated T-cells as compared with BM-DC: They increased the INF γ - and IL-17-secretion by interacting T-cells, while the secretion of IL-5 was lower when employing stimulated db-cAMP-DC. Db-cAMP-DC had no effect on IL-10 production or on the induction of FoxP3⁺ regulatory T-cells.

In a second approach, it should be tested whether it is possible to overexpress the tolerance associated surface protein B7-H3 in the murine DC line SP37A3 by lentiviral transduction. SP37A3 cells display an attractive alternative to BM-DC because they constitute a more homogenous population and they can be cultured over a long time period without losing their properties.

It could be shown that SP37A3 cells represent a proper myeloid DC model for the transduction with lentiviruses. In this respect it has to be emphasized that it is important to use concentrated virus particles and to analyze the expression of the reporter gene for more than 3 days (at least 7 days), in order to exclude pseudotransduction. SP37A3 cells were efficiently transduced starting at MOI (multiplicity of infection) 50.

D) Literaturverzeichnis

- Adorini,L.**, Giarratana,N., and Penna,G. 2004. Pharmacological induction of tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells. *Semin. Immunol.* **16**:127-134.
- Al-Alwan,M.M.**, Rowden,G., Lee,T.D., and West,K.A. 2001. Fascin is involved in the antigen presentation activity of mature dendritic cells. *J. Immunol.* **166**:338-345.
- Banchereau,J.**, and Steinman,R.M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**:245-252.
- Becker,C.**, Stoll,S., Bopp,T., Schmitt,E., and Jonuleit,H. 2006. Regulatory T cells: present facts and future hopes. *Med. Microbiol. Immunol.* **195**:113-124.
- Bennett,S.R.**, Carbone,F.R., Karamalis,F., Flavell,R.A., Miller,J.F., and Heath,W.R. 1998. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* **393**:478-480.
- Besche, V.**, Identifizierung und Überexpression immunregulatorischer Moleküle in dendritischen Zellen zur gezielten Modulation ihrer T-Zell-stimulierenden Eigenschaften. Dissertationsschrift am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Januar 2010
- Betтели,E.**, Pagany,M., Weiner,H.L., Linington,C., Sobel,R.A., and Kuchroo,V.K. 2003. Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J. Exp. Med.* **197**:1073-1081.
- Betтели,E.**, Carrier,Y., Gao,W., Korn,T., Strom,T.B., Oukka,M., Weiner,H.L., and Kuchroo,V.K. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **441**:235-238.
- Bros,M.**, Jahrling,F., Renzing,A., Wiechmann,N., Dang,N.A., Sutter,A., Ross,R., Knop,J., Sudowe,S., and Reske-Kunz,A.B. 2007. A newly established murine immature dendritic cell line can be differentiated into a mature state, but exerts tolerogenic function upon maturation in the presence of glucocorticoid. *Blood* **109**:3820-3829.
- Brown,J.A.**, Dorfman,D.M., Ma,F.R., Sullivan,E.L., Munoz,O., Wood,C.R., Greenfield,E.A., and Freeman,G.J. 2003. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J. Immunol.* **170**:1257-1266.
- Bryn,T.**, Yaqub,S., Mahic,M., Henjum,K., Aandahl,E.M., and Tasken,K. 2008. LPS-activated monocytes suppress T-cell immune responses and induce FOXP3+ T cells through a COX-2-PGE2-dependent mechanism. *Int. Immunol.* **20**:235-245.
- Buckner,J.H.**, and Ziegler,S.F. 2004. Regulating the immune system: the induction of regulatory T cells in the periphery. *Arthritis Res. Ther.* **6**:215-222.
- Chauveau,C.**, Remy,S., Royer,P.J., Hill,M., Tanguy-Royer,S., Hubert,F.X., Tesson,L., Brion,R., Beriou,G., Gregoire,M. et al 2005. Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood* **106**:1694-1702.

- Cherwinski,H.M.**, Schumacher,J.H., Brown,K.D., and Mosmann,T.R. 1987. Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* **166**:1229-1244.
- Cheuk,A.T.**, Mufti,G.J., and Guinn,B.A. 2004. Role of 4-1BB:4-1BB ligand in cancer immunotherapy. *Cancer Gene Ther.* **11**:215-226.
- Chi,H.**, and Flavell,R.A. 2008. Acetylation of MKP-1 and the control of inflammation. *Sci. Signal.* **1**:e44.
- Coates,P.T.**, Krishnan,R., Kireta,S., Johnston,J., and Russ,G.R. 2001. Human myeloid dendritic cells transduced with an adenoviral interleukin-10 gene construct inhibit human skin graft rejection in humanized NOD-scid chimeric mice. *Gene Ther.* **8**:1224-1233.
- Collins,M.**, Ling,V., and Carreno,B.M. 2005. The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome Biol.* **6**:223.
- Croft,M.** 2009. The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nat. Rev. Immunol.* **9**:271-285.
- del Rio,M.L.**, Buhler,L., Gibbons,C., Tian,J., and Rodriguez-Barbosa,J.I. 2008. PD-1/PD-L1, PD-1/PD-L2, and other co-inhibitory signaling pathways in transplantation. *Transpl. Int.* **21**:1015-1028.
- Dhodapkar,K.M.**, Kaufman,J.L., Ehlers,M., Banerjee,D.K., Bonvini,E., Koenig,S., Steinman,R.M., Ravetch,J.V., and Dhodapkar,M.V. 2005. Selective blockade of inhibitory Fcγ receptor enables human dendritic cell maturation with IL-12p70 production and immunity to antibody-coated tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**:2910-2915.
- Dinarello,C.A.** 1996. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* **87**:2095-2147.
- Dinarello,C.A.** 2005. Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J. Exp. Med.* **201**:1355-1359.
- Dullaers,M.**, and Thielemans,K. 2006. From pathogen to medicine: HIV-1-derived lentiviral vectors as vehicles for dendritic cell based cancer immunotherapy. *J. Gene Med.* **8**:3-17.
- Eigler,A.**, Siegmund,B., Emmerich,U., Baumann,K.H., Hartmann,G., and Endres,S. 1998. Anti-inflammatory activities of cAMP-elevating agents: enhancement of IL-10 synthesis and concurrent suppression of TNF production. *J. Leukoc. Biol.* **63**:101-107.
- Endo,S.**, Sakamoto,Y., Kobayashi,E., Nakamura,A., and Takai,T. 2008. Regulation of cytotoxic T lymphocyte triggering by PIR-B on dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**:14515-14520.
- Fassbender,M.**, Gerlitzki,B., Ullrich,N., Lupp,C., Klein,M., Radsak,M.P., Schmitt,E., Bopp,T., and Schild,H. 2010. Cyclic adenosine monophosphate and IL-10 coordinately contribute to nTreg cell-mediated suppression of dendritic cell activation. *Cell Immunol.* **265**:91-96.
- Figdor,C.G.**, de Vries,I.J., Lesterhuis,W.J., and Melief,C.J. 2004. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat. Med.* **10**:475-480.

- Flores-Romo,L.** 2001. In vivo maturation and migration of dendritic cells. *Immunology* **102**:255-262.
- Flores-Romo,L.** 2001. In vivo maturation and migration of dendritic cells. *Immunology* **102**:255-262.
- Funeshima,N.,** Fujino,M., Kitazawa,Y., Hara,Y., Hara,Y., Hayakawa,K., Okuyama,T., Kimura,H., and Li,X.K. 2005. Inhibition of allogeneic T-cell responses by dendritic cells expressing transduced indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Gene Med.* **7**:565-575.
- Galgani,M.,** De,R., V, De,S.S., Leonardi,A., D'Oro,U., Napolitani,G., Masci,A.M., Zappacosta,S., and Racioppi,L. 2004. Cyclic AMP modulates the functional plasticity of immature dendritic cells by inhibiting Src-like kinases through protein kinase A-mediated signaling. *J. Biol. Chem.* **279**:32507-32514.
- Gilboa,E.** 2007. DC-based cancer vaccines. *J. Clin. Invest* **117**:1195-1203.
- Groux,H.,** Fournier,N., and Cottrez,F. 2004. Role of dendritic cells in the generation of regulatory T cells. *Semin. Immunol.* **16**:99-106.
- Grutz,G.** 2005. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J. Leukoc. Biol.* **77**:3-15.
- Haas,D.L.,** Case,S.S., Crooks,G.M., and Kohn,D.B. 2000. Critical factors influencing stable transduction of human CD34(+) cells with HIV-1-derived lentiviral vectors. *Mol. Ther.* **2**:71-80.
- Harizi,H.,** Juzan,M., Grosset,C., Rashedi,M., and Gualde,N. 2001. Dendritic cells issued in vitro from bone marrow produce PGE(2) that contributes to the immunomodulation induced by antigen-presenting cells. *Cell Immunol.* **209**:19-28.
- Harizi,H.,** Juzan,M., Pitard,V., Moreau,J.F., and Gualde,N. 2002. Cyclooxygenase-2-issued prostaglandin e(2) enhances the production of endogenous IL-10, which down-regulates dendritic cell functions. *J. Immunol.* **168**:2255-2263.
- Harizi,H.,** Grosset,C., and Gualde,N. 2003. Prostaglandin E2 modulates dendritic cell function via EP2 and EP4 receptor subtypes. *J. Leukoc. Biol.* **73**:756-763.
- He,Y.,** Zhang,J., Mi,Z., Robbins,P., and Falo,L.D., Jr. 2005. Immunization with lentiviral vector-transduced dendritic cells induces strong and long-lasting T cell responses and therapeutic immunity. *J. Immunol.* **174**:3808-3817.
- Heystek,H.C.,** Thierry,A.C., Soulard,P., and Moulon,C. 2003. Phosphodiesterase 4 inhibitors reduce human dendritic cell inflammatory cytokine production and Th1-polarizing capacity. *Int. Immunol.* **15**:827-835.
- Hilkens,C.M.,** Isaacs,J.D., and Thomson,A.W. 2010. Development of dendritic cell-based immunotherapy for autoimmunity. *Int. Rev. Immunol.* **29**:156-183.
- Janeway,C.A.,** Jr. 2001. How the immune system protects the host from infection. *Microbes. Infect.* **3**:1167-1171.

- Janeway CA,** Travers P, Walport M, Shlomchik M. Immunologie. *Spektrum Akademischer Verlag*, 5.Auflage, 2002
- Jonuleit,H., and Schmitt,E.** 2003. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J. Immunol.* **171**:6323-6327.
- Kambayashi,T.,** Wallin,R.P., and Ljunggren,H.G. 2001. cAMP-elevating agents suppress dendritic cell function. *J. Leukoc. Biol.* **70**:903-910.
- Klein,L.,** Hinterberger,M., Wirnsberger,G., and Kyewski,B. 2009. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat. Rev. Immunol.* **9**:833-844.
- Korn,T.,** Bettelli,E., Gao,W., Awasthi,A., Jager,A., Strom,T.B., Oukka,M., and Kuchroo,V.K. 2007. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* **448**:484-487.
- Lauzurica,P.,** and Krangel,M.S. 1994. Temporal and lineage-specific control of T cell receptor alpha/delta gene rearrangement by T cell receptor alpha and delta enhancers. *J. Exp. Med.* **179**:1913-1921.
- Loke,P.,** and Allison,J.P. 2003. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**:5336-5341.
- Lutz,M.B.,** Kukutsch,N., Ogilvie,A.L., Rossner,S., Koch,F., Romani,N., and Schuler,G. 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Methods* **223**:77-92.
- Lutz,M.B.,** and Schuler,G. 2002. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* **23**:445-449.
- Masurier,C.,** Pioche-Durieu,C., Colombo,B.M., Lacave,R., Lemoine,F.M., Klatzmann,D., and Guigon,M. 1999. Immunophenotypical and functional heterogeneity of dendritic cells generated from murine bone marrow cultured with different cytokine combinations: implications for anti-tumoral cell therapy. *Immunology* **96**:569-577.
- Mathis,D.,** and Benoist,C. 2004. Back to central tolerance. *Immunity.* **20**:509-516.
- Medzhitov,R., and Janeway,C., Jr.** 2000. Innate immunity. *N. Engl. J. Med.* **343**:338-344.
- Mellman,I., and Steinman,R.M.** 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* **106**:255-258.
- Mioduszevska,B.,** Jaworski,J., and Kaczmarek,L. 2003. Inducible cAMP early repressor (ICER) in the nervous system--a transcriptional regulator of neuronal plasticity and programmed cell death. *J. Neurochem.* **87**:1313-1320.
- Morita,Y.,** Yang,J., Gupta,R., Shimizu,K., Shelden,E.A., Endres,J., Mule,J.J., McDonagh,K.T., and Fox,D.A. 2001. Dendritic cells genetically engineered to express IL-4 inhibit murine collagen-induced arthritis. *J. Clin. Invest* **107**:1275-1284.
- Moser,M.,** and Leo,O. 2010. Key concepts in immunology. *Vaccine* **28 Suppl 3**:C2-13.

Naldini,L., Blomer,U., Gallyat,P., Ory,D., Mulligan,R., Gage,F.H., Verma,I.M., and Trono,D. 1996. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**:263-267.

Nash,K.L., and Lever,A.M. 2004. Green fluorescent protein: green cells do not always indicate gene expression. *Gene Ther.* **11**:882-883.

Ndhlovu,L.C., Ishii,N., Murata,K., Sato,T., and Sugamura,K. 2001. Critical involvement of OX40 ligand signals in the T cell priming events during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* **167**:2991-2999.

Novak,N., and Bieber,T. 2008. 2. Dendritic cells as regulators of immunity and tolerance. *J. Allergy Clin. Immunol.* **121**:S370-S374.

Nurieva,R., Yang,X.O., Martinez,G., Zhang,Y., Panopoulos,A.D., Ma,L., Schluns,K., Tian,Q., Watowich,S.S., Jetten,A.M. et al 2007. Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* **448**:480-483.

Otterbein,L.E., Soares,M.P., Yamashita,K., and Bach,F.H. 2003. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol.* **24**:449-455.

Panoskaltis,N., Reid,C.D., and Knight,S.C. 2004. Immune modulation with dendritic cells. *Transfus. Med.* **14**:81-96.

Pasare,C., and **Medzhitov,R.** 2004. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes. Infect.* **6**:1382-1387.

Prasad,D.V., Nguyen,T., Li,Z., Yang,Y., Duong,J., Wang,Y., and Dong,C. 2004. Murine B7-H3 is a negative regulator of T cells. *J. Immunol.* **173**:2500-2506.

Rasheed,S., Nelson-Rees,W.A., Toth,E.M., Arnstein,P., and Gardner,M.B. 1974. Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer* **33**:1027-1033.

Reid,S.D., Penna,G., and Adorini,L. 2000. The control of T cell responses by dendritic cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* **12**:114-121.

Rethi,B., Gogolak,P., Szatmari,I., Veres,A., Erdos,E., Nagy,L., Rajnavolgyi,E., Terhorst,C., and Lanyi,A. 2006. SLAM/SLAM interactions inhibit CD40-induced production of inflammatory cytokines in monocyte-derived dendritic cells. *Blood* **107**:2821-2829.

Ross,R., Ross,X.L., Schwing,J., Langin,T., and Reske-Kunz,A.B. 1998. The actin-bundling protein fascin is involved in the formation of dendritic processes in maturing epidermal Langerhans cells. *J. Immunol.* **160**:3776-3782.

Rossner,S., Voigtlander,C., Wiethe,C., Hanig,J., Seifarth,C., and Lutz,M.B. 2005. Myeloid dendritic cell precursors generated from bone marrow suppress T cell responses via cell contact and nitric oxide production in vitro. *Eur. J. Immunol.* **35**:3533-3544.

Sakaguchi,S., Wing,K., Onishi,Y., Prieto-Martin,P., and Yamaguchi,T. 2009. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int. Immunol.* **21**:1105-1111.

- Sakata,D.**, Yao,C., and Narumiya,S. 2010. Prostaglandin E2, an immunoactivator. *J. Pharmacol. Sci.* **112**:1-5.
- Sallusto,F.**, and Lanzavecchia,A. 1999. Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation. *J. Exp. Med.* **189**:611-614.
- Sato,K.**, Balla,J., Otterbein,L., Smith,R.N., Brouard,S., Lin,Y., Csizmadia,E., Sevigny,J., Robson,S.C., Vercellotti,G. et al 2001. Carbon monoxide generated by heme oxygenase-1 suppresses the rejection of mouse-to-rat cardiac transplants. *J. Immunol.* **166**:4185-4194.
- Sato,K.**, and Fujita,S. 2007. Dendritic cells: nature and classification. *Allergol. Int.* **56**:183-191.
- Schäkel,K.** 2009. Dendritic cells--why can they help and hurt us. *Exp. Dermatol.* **18**:264-273.
- Scheicher,C.**, Mehlig,M., Zecher,R., and Reske,K. 1992. Dendritic cells from mouse bone marrow: in vitro differentiation using low doses of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Immunol. Methods* **154**:253-264.
- Schwartz,J.H.** 2001. The many dimensions of cAMP signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**:13482-13484.
- Shaywitz,A.J.**, and Greenberg,M.E. 1999. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu. Rev. Biochem.* **68**:821-861.
- Smits,H.H.**, de Jong,E.C., Wierenga,E.A., and Kapsenberg,M.L. 2005. Different faces of regulatory DCs in homeostasis and immunity. *Trends Immunol.* **26**:123-129.
- Spitalny,G.L.**, and Havell,E.A. 1984. Monoclonal antibody to murine gamma interferon inhibits lymphokine-induced antiviral and macrophage tumoricidal activities. *J. Exp. Med.* **159**:1560-1565.
- Steinbrink,K.**, Mahnke,K., Grabbe,S., Enk,A.H., and Jonuleit,H. 2009. Myeloid dendritic cell: From sentinel of immunity to key player of peripheral tolerance? *Hum. Immunol.* **70**:289-293.
- Steinman,R.M.**, Lustig,D.S., and Cohn,Z.A. 1974. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo. *J. Exp. Med.* **139**:1431-1445.
- Steinman,R.M.**, and Nussenzweig,M.C. 2002. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**:351-358.
- Steinman,R.M.**, and Cohn,Z.A. 2007. Pillars Article: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 1973. **137**: 1142-1162. *J. Immunol.* **178**:5-25.
- Steinman,R.M.**, and Banchereau,J. 2007. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* **449**:419-426.
- Suciu-Foca,N.**, Manavalan,J.S., Scotto,L., Kim-Schulze,S., Galluzzo,S., Naiyer,A.J., Fan,J., Vlad,G., and Cortesini,R. 2005. Molecular characterization of allospecific T suppressor and tolerogenic dendritic cells: review. *Int. Immunopharmacol.* **5**:7-11.

- Suciu-Foca,N.**, Berloco,P., and Cortesini,R. 2009. Tolerogenic dendritic cells in cancer, transplantation, and autoimmune diseases. *Hum. Immunol.* **70**:277-280.
- Sumimoto,H.**, Tsuji,T., Miyoshi,H., Hagihara,M., Takada-Yamazaki,R., Okamoto,S., Ikeda,Y., Takahashi,T., and Kawakami,Y. 2002. Rapid and efficient generation of lentivirally gene-modified dendritic cells from DC progenitors with bone marrow stromal cells. *J. Immunol. Methods* **271**:153-165.
- Sun,Y.**, Chin,Y.E., Weisiger,E., Malter,C., Tawara,I., Toubai,T., Gatza,E., Mascagni,P., Dinarello,C.A., and Reddy,P. 2009. Cutting edge: Negative regulation of dendritic cells through acetylation of the nonhistone protein STAT-3. *J. Immunol.* **182**:5899-5903.
- Takeuchi,S.**, and **Furue,M.** 2007. Dendritic cells: ontogeny. *Allergol. Int.* **56**:215-223.
- Taylor,P.A.**, Panoskaltsis-Mortari,A., Freeman,G.J., Sharpe,A.H., Noelle,R.J., Rudensky,A.Y., Mak,T.W., Serody,J.S., and Blazar,B.R. 2005. Targeting of inducible costimulator (ICOS) expressed on alloreactive T cells down-regulates graft-versus-host disease (GVHD) and facilitates engraftment of allogeneic bone marrow (BM). *Blood* **105**:3372-3380.
- Tisch,R.** 2010. Immunogenic versus tolerogenic dendritic cells: a matter of maturation. *Int. Rev. Immunol.* **29**:111-118.
- Tuettenberg,A.**, Huter,E., Hubo,M., Horn,J., Knop,J., Grimbacher,B., Kroczeck,R.A., Stoll,S., and Jonuleit,H. 2009. The role of ICOS in directing T cell responses: ICOS-dependent induction of T cell anergy by tolerogenic dendritic cells. *J. Immunol.* **182**:3349-3356.
- Unkeless,J.C.** 1979. Characterization of a monoclonal antibody directed against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptors. *J. Exp. Med.* **150**:580-596.
- Van Minkelen R.**, de Visser,M.C., Houwing-Duistermaat,J.J., Vos,H.L., Bertina,R.M., and Rosendaal,F.R. 2007. Haplotypes of IL1B, IL1RN, IL1R1, and IL1R2 and the risk of venous thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**:1486-1491.
- Vieira,P.L.**, Kalinski,P., Wierenga,E.A., Kapsenberg,M.L., and de Jong,E.C. 1998. Glucocorticoids inhibit bioactive IL-12p70 production by in vitro-generated human dendritic cells without affecting their T cell stimulatory potential. *J. Immunol.* **161**:5245-5251.
- Villadangos,J.A.**, and Schnorrer,P. 2007. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat. Rev. Immunol.* **7**:543-555.
- Vlad,G.**, Cortesini,R., and Suciu-Foca,N. 2005. License to heal: bidirectional interaction of antigen-specific regulatory T cells and tolerogenic APC. *J. Immunol.* **174**:5907-5914.
- Von Bergwelt-Baildon,M.S.**, Popov,A., Saric,T., Chemnitz,J., Classen,S., Stoffel,M.S., Fiore,F., Roth,U., Beyer,M., Debey,S. et al 2006. CD25 and indoleamine 2,3-dioxygenase are up-regulated by prostaglandin E2 and expressed by tumor-associated dendritic cells in vivo: additional mechanisms of T-cell inhibition. *Blood* **108**:228-237.
- Wang,S.**, Zhu,G., Chapoval,A.I., Dong,H., Tamada,K., Ni,J., and Chen,L. 2000. Costimulation of T cells by B7-H2, a B7-like molecule that binds ICOS. *Blood* **96**:2808-2813.

- Wang,X.**, and Liu,Y. 2007. Regulation of innate immune response by MAP kinase phosphatase-1. *Cell Signal.* **19**:1372-1382.
- Wang,Y.**, Zhu,M., Miller,M., and Fu,Y.X. 2009. Immunoregulation by tumor necrosis factor superfamily member LIGHT. *Immunol. Rev.* **229**:232-243.
- Winzler,C.**, Rovere,P., Rescigno,M., Granucci,F., Penna,G., Adorini,L., Zimmermann,V.S., Davoust,J., and Ricciardi-Castagnoli,P. 1997. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J. Exp. Med.* **185**:317-328.
- Workman,C.J.**, Szymczak-Workman,A.L., Collison,L.W., Pillai,M.R., and Vignali,D.A. 2009. The development and function of regulatory T cells. *Cell Mol. Life Sci.* **66**:2603-2622.
- Wu,L.**, and Dakic,A. 2004. Development of dendritic cell system. *Cell Mol. Immunol.* **1**:112-118.
- Xu,G.**, Liu,D., Okwor,I., Wang,Y., Korner,H., Kung,S.K., Fu,Y.X., and Uzonna,J.E. 2007. LIGHT Is critical for IL-12 production by dendritic cells, optimal CD4+ Th1 cell response, and resistance to *Leishmania major*. *J. Immunol.* **179**:6901-6909.
- Xu,J.**, Huang,B., Xiong,P., Feng,W., Xu,Y., Fang,M., Zheng,F., and Gong,F. 2006. Soluble mouse B7-H3 down-regulates dendritic cell stimulatory capacity to allogenic T cell proliferation and production of IL-2 and IFN-gamma. *Cell Mol. Immunol.* **3**:235-240.
- Yao,C.**, Sakata,D., Esaki,Y., Li,Y., Matsuoka,T., Kuroiwa,K., Sugimoto,Y., and Narumiya,S. 2009. Prostaglandin E2-EP4 signaling promotes immune inflammation through Th1 cell differentiation and Th17 cell expansion. *Nat. Med.* **15**:633-640.
- Youn,J.I.**, Nagaraj,S., Collazo,M., and Gabrilovich,D.I. 2008. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J. Immunol.* **181**:5791-5802.
- Zal,T.**, Volkman,A., and Stockinger,B. 1994. Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. *J. Exp. Med.* **180**:2089-2099.
- Zhao,J.**, Luo,Y., Wang,X., Zhou,H., Li,Q., You,Y., and Zou,P. 2010. Prevention of murine acute graft-versus-host disease by recipient-derived paired immunoglobulin-like receptor B lentivirus-transfected dendritic cells. *Acta Haematol.* **124**:134-140.

E) Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|--|
| % (v/v) | Volumen-Prozent |
| % (w/v) | Gewichtsprozent |
| μCi | Mikro-Curie |
| μF | Mikro-Farad |
| μg | Mikrogramm |
| μl | Mikroliter |
| μM | Mikromolar |
| μm | Mikrometer |
| Abb. | Abbildung |
| Ag | Antigen |
| AICD | aktivierungs-induzierten Zelltod („activation induced cell death“) |
| AIRE | Autoimmun Regulator Gen |
| APC | antigenpräsentierende Zelle („antigen presenting cell“) |
| BCR | B-Zell-Rezeptor („B cell receptor“) |
| BM-DC | Knochenmark-abgeleitete DC („bone marrow derived dendritic cell“) |
| BSA | Rinderserumalbumin („Bovine Serum Albumin“) |
| C | Celsius |
| cAMP | zyklisches Adenosin Monophosphat |
| CD | „Cluster of Differentiation“ |
| cDC | konventionelle DC |
| cDNA | komplementäre DNA („complementary DNA“) |
| CIA | Kollagen-induzierte Arthritis |
| Cm | Zentimeter |
| cm ² | Quadratzentimeter |
| CO | Kohlenstoffmonoxid |
| COX | Cyclooxygenase |
| cpm | „counts per minute“ |
| CRE | „cAMP-responsive elements“ |
| CREB | „CRE-binding protein“ |

| | |
|------------------|---|
| CREM | „cAMP responsive element modulator“ |
| cTEC | kortikale Thymusepithelzellen |
| CTL | zytotoxische T-Lymphozyten |
| CTLA-4 | „cytotoxic T lymphocyte antigen 4“ |
| Ctrl. | Kontrolle |
| db-cAMP | Dibutyryl-cyclo-Adenosin-3',5'-Mono-Phosphat |
| db-cAMP-DC | db-cAMP behandelte BM-DC |
| DC | Dendritische Zelle („dendritic cell“) |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| dest. | destilliert |
| DMEM | „Dulbecco's Modified Eagle's Medium“ |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| DPBS | „Dulbecco's Phosphat Buffered Saline“ |
| E | Extinktion |
| EAE | experimentelle autoimmune Enzephalitis |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGFP | „enhanced green fluorescent protein“ |
| EIA | Enzym Immunoassay |
| ELISA | „enzyme linked immunosorbent assay“ |
| EMEM | „Eagle's Minimum Essential Medium“ |
| EP | E Prostanoid Rezeptor |
| FACS | Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer („fluorescence activated cellsorter“) |
| FasL | Fas Ligand |
| FCS | fötales Kälberserum („fetal calf serum“) |
| Fc γ RIIB | Fc γ Rezeptor IIB |
| FITC | Fluorescein Isothiocyanat Dextran |
| FoxP3 | „Forkhead Box P3“ |
| FSC | „forward scatter“ |
| G | Gramm |
| GFP | grün fluoreszierendes Protein |

| | |
|-------------------------------|--|
| GM-CSF | Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor |
| H | Stunde |
| H ₂ O | Wasser |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| HEK | humane embryonale Nierenzellen („human embryonic kidney cells“) |
| HLA | humanes Leukozyten Antigen |
| HO-1 | Hämoxygenase-1 |
| HSP | Hitzeschockprotein |
| ³ HTdR | Trithium-markiertes Thymidin |
| I.U. | internationale Einheit („international Unit“) |
| ICAM-1 | „Inter-Cellular Adhesion Molecule 1“ |
| ICER | „inducible cAMP early repressor“ |
| ICOS | „inducible costimulator“ |
| ICOSL | Ligand von ICOS |
| iDC | immature DC |
| IDO | Indolamin-2,3-dioxygenase |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| IL-1RA | IL-1 Rezeptor Antagonist |
| ILT | „Immunglobulin-like transkript“ |
| IMDM | „Iscoe´s Modified Dulbecco´s Media“ |
| JNK | c-Jun N-terminale Kinase |
| kV | Kilovolt |
| L | Liter |
| LB | Luria Bertani |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| LV | Leervektorkontrolle |
| M | Mol |
| MAP | „mitogen activated Protein“ |
| M-CSF | Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor („macrophage colony stimulating factor“) |

| | |
|---------------|---|
| mDC | myeloide Dendritische Zelle („myeloid dendritic cell“) |
| MDSC | „myeloid derived suppressor cells“ |
| MFI | mittlere Fluoreszenzintensität |
| mg | Milligramm |
| MHC | Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex („major histocompatibility complex“) |
| Mkp1 | MAP Kinase Phosphatase |
| ml | Milliliter |
| MLR | Gemischte Lymphozyten-Reaktion („mixed lymphocyte reaktion“) |
| MLV | muriner Leukämie Virus |
| mM | Millimol |
| mm | Millimeter |
| Mo-DC | „monocyte-derived dendritic cells“ |
| MOG | Myelin oligodendrozyten Glycoprotein |
| MOI | „multiplicity of infection“ |
| mRNA | „messenger RNA“ |
| mTEC | medulläre Thymusepithelzellen |
| Na-Azid | Natrium-Azid |
| NF κ B | „nuclear factor κ B“ |
| Ng | Nanogramm |
| NK-Zelle | natürliche Killerzelle |
| Nm | Nanometer |
| NOS | „nitric oxide synthase“ |
| nTC | naive T-Zellen |
| nTreg | natürliche regulatorische T-Zellen |
| Ø | Durchmesser |
| OPD | Orthonitrophenoldiamin |
| P | Irrtumswahrscheinlichkeit |
| PAMP | Pathogen-assoziierte molekulare Muster („pathogen-associated molecular patterns“) |
| PBMC | „peripheral blood mononuclear cell“ |
| PBS | „phosphate buffered saline“ |

| | |
|------------------|--|
| PCR | Polymerase-Ketten-Reaktion („polymerase chain reaction“) |
| PD-1 | „programmed death-1“ |
| pDC | plasmazytoide Dendritische Zelle |
| PDE | Phosphodiesterase |
| PD-L | „programmed death ligand“ |
| PE | Phycoerythrin |
| PEI | Paul-Ehrlich-Institut |
| Pen/Strep | Penicillin/Streptomycin |
| PFA | Paraformaldehyd |
| Pg | Pikogramm |
| PGE ₂ | Prostaglandin E2 |
| pH | pondus Hydrogenii |
| PI3K | Phosphoinositid-3-Kinasen |
| Pirb | „paired immunoglobulin-like receptor B“ |
| PKA | Protein Kinase A |
| pmol | Pico Mol |
| PRR | Mustererkennungszepreptor („pattern recognition receptor“) |
| pTC | vorstimulierte T-Zellen („primed t cells“) |
| Q-PCR | quantitative PCR |
| rad | „radiation absorbed dose“ |
| rhu | rekombinant human |
| Rm | rekombinant murin |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| ROS | „reactive oxygen species“ |
| rpm | Umdrehungen pro Minute („rounds per minute“) |
| RPMI | „Roswell Park Memorial Institute“ |
| RT | Raumtemperatur |
| SC | Milzzelle („spleen cell“) |
| SLAM | „signaling lymphocyte activation molecule“ |
| SSC | „side scatter“ |
| STAT | „signal transducer and activator of transcription“ |
| TAE | Tris-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure |
| TARC | „Thymus and activation regulated chemokine“ |

| | |
|----------------|--|
| TC | T-Zelle („t cell“) |
| TCR | T-Zell-Rezeptor („t cell receptor“) |
| TD | Transduktion |
| TGF | „Transforming Growth Factor“ |
| T _H | T-Helfer-Zelle |
| TLR | Toll-ähnlicher Rezeptor („Toll-like-receptor“) |
| TNF | Tumor-Nekrose-Faktor |
| TP | Testpopulation |
| Treg | regulatorische T-Zelle |
| U | Units |
| u.a. | unter anderem |
| UBC | Ubiquitin C |
| UV | Ultraviolett |
| x g | Zentifugalbeschleunigung |
| z.B. | zum Beispiel |
| ZVTE | Zentrale Versuchstiereinrichtung |
| Σ | Summe |
| Ω | Ohm |

F) Lebenslauf