

**Identifizierung und Überexpression  
immunregulatorischer Moleküle in  
dendritischen Zellen zur gezielten Modulation  
ihrer T-Zell-stimulierenden Eigenschaften**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Verena Besche  
geb. am 05.11.1980 in Korbach

Mainz, 2010

Dekan:

1. Berichterstatterin:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 07. September 2010



## Veröffentlichungen

### Originalpublikationen

Bauer M, Marschall L, Reuff M, Besche V, Sartorius-Neef S, Pfeifer F (2008). *Overlapping activator sequences determined for two oppositely oriented promoters in halophilic archaea*. Nucleic Acids Research 36 (2): 598-606.

Bros M, Wiechmann N, Besche V, Castor T, Sudowe S, Grabbe S, Reske-Kunz AB (2009). *A novel plasmid DNA electroporation method allows transfection of murine DC*. Journal of Immunological Methods 343 (1): 13-20.

Bros M, Wiechmann N, Besche V, Art J, Pautz A, Grabbe S, Kleinert H, Reske-Kunz AB (2009). *The RNA binding protein tristetruprolin influences the activation state of murine dendritic cells*. Molecular Immunology: Im Druck.

Bros M, Wiechmann N, Besche V, Hövelmeyer N, Reissig S, Massoumi R, Grabbe S, Waisman A, Reske-Kunz AB (2009). *Mutated CYLD affects the functional state of dendritic cells*. European Journal of Immunology: In Revision.

Besche V, Wiechmann N, Castor T, Trojandt S, Höhn Y, Kunkel H, Grez M, Grabbe S, Reske-Kunz AB, Bros M (2009). *Dendritic cells lentivirally engineered to overexpress IL-10 inhibit contact hypersensitivity responses, despite their partial activation induced by transduction-associated physical stress*. In Revision.

Besche V, Castor T, Wiechmann N, Trojandt S, Grabbe S, Reske-Kunz AB, Bros M. *Murine dendritic cells engineered to de novo express the immunomodulatory cytokine IL-21 exert tolerogenic function*. Manuskript in Vorbereitung.

### Kongressbeiträge

#### Vorträge

Bros M., Besche V, Glowacki C, Wiechmann N, Renzing A, Dang NA, Sudowe S, Knop J and Reske-Kunz AB. *The synthetic glucocorticoid dexamethasone induces a tolerogenic state in murine dendritic cells*. **19. Mainzer Allergieworkshop der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), 16./17. März 2007, Mainz. Allergo-Journal** 16: 42 (Abstract V30).

Bros M, Besche V, Wiechmann N, Trojandt S, Castor T, Bellinghausen I, Saloga J, Grabbe S and Reske-Kunz AB. *In Anwesenheit von Glucocorticoid generierte myeloide dendritische Zellen üben tolerogene Funktion aus*. **20. Mainzer Allergieworkshop der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), 07./08. März 2008, Mainz. Allergo-Journal** 17: 39 (Abstract V12).

Besche V, Wiechmann N, Glowacki C, Dang NA, Grabbe S, Reske-Kunz AB and Bros M. *Glucocorticoids mediate differentiation of dendritic cell progenitors into tolerogenic antigen presenting cells characterized by a protolerogenic gene expression profile*. **49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, 11.-13. März 2008, Mainz.** *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 377 (Suppl. 1): 44 (Abstract 198).

Bros M, Wiechmann N, Besche V, Jährling F, Renzing A, Dang NA, Sutter A, Ross R, Grabbe S, Sudowe S, and Reske-Kunz AB. *Induction of adaptive regulatory T cells by immature and alternatively activated murine dendritic cells*. **49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, 11.-13. März 2008, Mainz.** *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 377 (Suppl. 1): 44 (Abstract 196).

Castor T, Wiechmann N, Besche V, Glowacki C, Dang NA, Trojandt S, Bellinghausen I, Hilmenyuk T, Saloga J, Grabbe S, Reske-Kunz AB and Bros M. *The synthetic glucocorticoid dexamethasone mediates induction of tolerogenic antigen presenting cells*. **49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, 11.-13. März 2008, Mainz.** *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 377 (Suppl. 1): 44 (Abstract 197).

Besche V, Wiechmann N, Trojandt S, Grabbe S, Reske-Kunz AB and Bros M. *Tolerogenic potential of lentivirally transduced murine DC overexpressing antiinflammatory molecules*. **Joint Annual Meeting of Immunology of the Austrian and German Societies (ÖGAI, DGfi), 3. - 6. September 2008; Wien, Österreich.** *Wiener klinische Wochenschrift - The Middle European Journal of Medicine* 120 (Suppl. 1): 45 (Abstract 138).

Bros M, Wiechmann N, Besche V, Hövelmeyer N, Reissig S, Grabbe S, Waisman A and Reske-Kunz AB. *Mutated CYLD affects the functional state of dendritic cells*. **Joint Annual Meeting of Immunology of the Austrian and German Societies (ÖGAI, DGfi), 3. - 6. September 2008; Wien, Österreich.** *Wiener klinische Wochenschrift - The Middle European Journal of Medicine* 120 (Suppl. 1): 33 (Abstract 100).

Bros M, Wiechmann N, Besche V, Art J, Pautz A, Grabbe S, Kleinert K und Reske-Kunz AB. *The RNA binding protein tristetraprolin influences the activation state of murine dendritic cells*. **50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, 10.-12. März 2009, Mainz.** *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 379 (Suppl. 1): 39 (Abstract 174).

Besche V, Wiechmann N, Trojandt S, Grabbe S, Reske-Kunz AB und Bros M. *Genetically modified murine dendritic cells engineered to overexpress immunomodulatory cytokines display a protolerogenic status*. **50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, 10.-12. März 2009, Mainz.** *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 379 (Suppl. 1): 38 (Abstract 171).

Besche V, Wiechmann N, Trojandt S, Grabbe S, Reske-Kunz AB und Bros M. *Eine lentiviral vermittelte Überexpression der immunmodulatorischen Zytokine IL-10, IL-21 und IL-1RA in murinen dendritischen Zellen induziert einen protolerogenen DC-Status*. **21. Mainzer Allergieworkshop der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), 19./20. März 2009, Mainz. Allergo-Journal 18: 36 (Abstract V18).**

Bros M, Wiechmann N, Besche V, Hövelmeyer N, Reissig S, Massoumi R, Grabbe S, Waisman A, Reske-Kunz AB. *Mutationen des Tumorsuppressorgens CYLD können den funktionalen Status dendritischer Zellen beeinflussen*. **21. Mainzer Allergieworkshop der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAKI), 19./20. März 2009, Mainz. Allergo-Journal 18: 35 (Abstract V15).**

Besche V; Wiechmann N; Trojandt S; Grabbe S; Reske-Kunz AB and Bros M. *Murine dendritic cells genetically engineered to overexpress the immunomodulatory cytokines IL-10, IL-21 or IL-1RA display a protolerogenic status*. **World Immune Regulation Meeting III, 22. - 28. März 2009, Davos, Schweiz. Kongressband.**

Besche V, Wiechmann N, Trojandt S, Grabbe S, Reske-Kunz AB and Bros M. *Comparative analysis of the properties of murine DCs genetically engineered to overexpress a panel of antiinflammatory molecules*. **2<sup>nd</sup> European Congress of Immunology, 13. - 16. September 2009, Berlin. European Journal of Immunology 39 (Suppl. 1): 330 (Abstract WSD19/3). (Travel Grant erhalten).**

### **Posterbeiträge**

Besche V, Glowacki C, Wiechmann N, Renzing A, Dang NA, Sudowe S, Knop J, Reske-Kunz AB and Bros M. *Murine dendritic cells exert tolerogenic function at their immature state and upon differentiation in the presence of dexamethasone*. **37. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI), 05. - 08. September 2007, Heidelberg. Kongressband.**

Sudowe S, Martin H, Renzing A, Besche V, Glowacki C, Wiechmann N, Reske-Kunz AB and Bros M. *Murine dendritic cells stimulated in the presence of dexamethasone induce regulatory T cells*. **8th International Conference on New Trends in Immunosuppression and Immunotherapy, 14. - 17. Februar 2008, Berlin. Kongressband.**

Castor T, Wiechmann N, Besche V, Glowacki C, Dang NA, Bellinghausen I, Hilmenyuk T, Saloga J, Grabbe S, Reske-Kunz AB and Bros M. *Dendritic cells generated in the presence of glucocorticoid induce regulatory T cells*. **World Immune Regulation Meeting II, 17. - 20. März 2008, Davos, Schweiz. Kongressband.**

Besche V, Wiechmann N, Glowacki C, Dang NA, Grabbe S, Reske-Kunz AB and Bros M. *Glucocorticoids induce a tolerogenic state in murine dendritic cells*. **World Immune Regulation Meeting II, 17. - 20. März 2008, Davos, Schweiz. Kongressband.**

Wiechmann N, Besche V, Hövelmeyer N, Reissig S, Grabbe S, Waisman A, Reske-Kunz AB and Bros M. *Mutated CYLD affects the functional state of dendritic cells*. **49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, 11.-13. März 2008, Mainz**. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 377 (Suppl. 1): 209.

Castor T, Wiechmann N, Besche V, Glowacki C, Dang NA, Trojandt S, Grabbe S, Reske-Kunz AB and Bros M. *The synthetic glucocorticoid dexamethasone mediates induction of tolerogenic murine DC*. **Joint Annual Meeting of Immunology of the Austrian and German Societies (ÖGAI, DGfi), 3. - 6. September 2008; Wien, Österreich**. *Wiener klinische Wochenschrift - The Middle European Journal of Medicine* 120 (Suppl. 1): 126 (Abstract P219).

Besche V, Wiechmann N, Trojandt S, Grabbe S, Reske-Kunz AB and Bros M. *Lentivirally transduced murine DC engineered to overexpress antiinflammatory molecules exert tolerogenic function*. **The 10<sup>th</sup> International Symposium on Dendritic Cells, 1. - 5. Oktober 2008, Kobe, Japan**. Kongressband.  
(Travel Grant erhalten).

Besche V, Wiechmann N, Trojandt S, Grabbe S, Reske-Kunz AB and Bros M. *Murine myeloid dendritic cells genetically engineered to overexpress immunomodulatory cytokines display a protolerogenic status*. **Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology - Dendritic Cells, 29. März - 3. April 2009, Banff, Alberta, Kanada**. Kongressband.

Castor T, Wiechmann N, Besche V, Glowacki C, Dang NA, Trojandt S, Grabbe S, Reske-Kunz AB and Bros M. *Differentiation of murine myeloid DC progenitors in the presence of glucocorticoid results in the induction of tolerogenic APCs*. **2<sup>nd</sup> European Congress of Immunology, 13. - 16. September 2009, Berlin**. *European Journal of Immunology* 39 (Suppl. 1): 649 (Abstract PA10/16).

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Das Immunsystem	1
1.1.1	Das angeborene Immunsystem	1
1.1.2	Das adaptive Immunsystem	2
1.2	Komponenten des Immunsystems	3
1.3	Die Toleranz	6
1.4	Regulatorische T-Zellen	8
1.5	Dendritische Zellen	9
1.6	Tolerogene dendritische Zellen und ihre Generierung durch pharmakologische Substanzen	11
1.7	Toleranzassoziierte Moleküle	12
1.7.1	Inhibitorische Oberflächenrezeptoren	13
1.7.2	Intrazelluläre Regulatorproteine	15
1.7.3	Sekretierte regulatorische Zytokine	17
1.8	Genetische Modifikation dendritischer Zellen durch lentivirale Transduktion	20
1.9	Zielsetzung der Arbeit	23
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>24</b>
2.1	Material	24
2.1.1	Laborgeräte	24
2.1.2	Material	26
2.1.3	Chemikalien	27
2.1.4	Größenstandards	29
2.1.5	Enzyme	29
2.1.5.1	Allgemeine Enzyme	29
2.1.5.2	Restriktionsendonukleasen	30
2.1.6	Vektoren	30
2.1.7	Oligonukleotide	31
2.1.8	Lentivirale Konstrukte zur Transduktion muriner BM-DCs	37
2.1.9	Antikörper	40
2.1.9.1	Primärantikörper für FACS-Färbungen	40
2.1.9.2	Isotyp-Kontrollantikörper für FACS-Färbungen	40
2.1.9.3	Antikörper zur Zellseparation	41
2.1.9.4	Primärantikörper für ELISA	41
2.1.9.5	Detektionsantikörper für ELISA	42



2.1.9.6	Antikörper für Restimulations- bzw. Suppressionsexperimente	42
2.1.10	Zytokine und andere Substanzen	43
2.1.11	Immunmagnetische Partikel zur Zellseparation	44
2.1.12	Fertigsysteme	44
2.1.13	Puffer und Lösungen	44
2.1.14	Medien	46
2.1.15	Bakterienstamm	47
2.1.16	Zelllinie	47
2.1.17	Versuchstiere	48
2.2	Molekularbiologische Methoden	49
2.2.1	Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	49
2.2.2	Herstellung elektrokompetenter <i>E.coli</i> TOP10 Zellen	49
2.2.3	Transformation elektrokompetenter Bakterienzellen	50
2.2.4	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen	50
2.2.4.1	Plasmid-Isolierung im Kleinmaßstab	50
2.2.4.2	Isopropanol-Minipräparation von Plasmid-DNA	51
2.2.4.3	Plasmid-Isolierung in präparativen Mengen	51
2.2.5	Bestimmung von DNA-Konzentrationen	51
2.2.6	Agarose-Gelelektrophorese von DNA	52
2.2.7	DNA-Elution aus Agarosegelen	52
2.2.8	Hydrolyse von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen	52
2.2.9	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	53
2.2.10	Auffüllen von freien DNA-Enden	53
2.2.11	Ligation	54
2.2.12	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> , PCR)	54
2.2.13	DNA-Sequenzanalyse	56
2.2.14	Präparation von Gesamt-mRNA	57
2.2.15	Präparation von viraler RNA	57
2.2.16	Reverse Transkription	58
2.2.17	Quantitative PCR ( <i>Real-time-PCR</i> )	58
2.2.18	Bestimmung lentiviraler RNA-Titer	59
2.3	Zellbiologische Methoden	60
2.3.1	Bestimmung der Zellzahl	60
2.3.2	Arbeiten mit HEK 293T-Zellen	60
2.3.2.1	Kryokonservierung von HEK 293T-Zellen	60
2.3.2.2	Kultivierung von HEK 293T-Zellen	61
2.3.2.1	Transiente Transfektion von HEK 293T-Zellen für die Produktion lentiviraler Partikel	61
2.3.3	Arbeiten mit knochenmarksabgeleiteten dendritischen Zellen ( <i>bone marrow-derived dendritic cells</i> , BM-DCs)	63

2.3.3.1	Isolierung von Knochenmarks-Vorläuferzellen aus Knochenmark	63
2.3.3.2	Kultivierung von BM-DC Vorläuferzellen	63
2.3.3.3	Ausreifung von BM-DCs	64
2.3.3.4	Behandlung von BM-DC-Vorläufern mit Dexamethason	64
2.3.3.5	Ernten von BM-DCs	64
2.3.3.6	Transduktion von BM-DCs mit lentiviralen Vektoren	65
2.3.3.7	Nachweis der copGFP- und DsRed2-Expression transduzierter BM-DCs	66
2.3.4	Präparation von Lymphknotenzellen	66
2.3.5	Präparation von Milzzellen	66
2.3.6	Aufreinigung von T-Lymphozyten aus der Milz	67
2.3.7	Depletion natürlicher CD25 <sup>+</sup> regulatorischer T-Lymphozyten	68
2.3.8	Primäre MLR (gemischte Leukozyten Reaktion)	69
2.3.9	Syngene Stimulation von MOG-reaktiven 2D2 T-Zellen	70
2.3.10	Separation vorstimulierter CD4 <sup>+</sup> bzw. CD8 <sup>+</sup> T-Lymphozyten	71
2.3.11	Sekundäre MLR	72
2.3.12	Messung von Radioaktivität	73
2.3.13	Murines Krankheitsmodell der haptenermittelten Kontaktallergie ( <i>contact hypersensitivity</i> , CHS)	74
2.3.13.1	Durchführung des Ohrschwellungstests	74
2.3.13.2	T-Zell-Proliferationstest	75
2.3.14	ELISA ( <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )	75
2.3.15	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse, <i>fluorescence activated cell sorter</i> )	76
2.3.16	Grafik und Statistik	77
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>78</b>
3.1	Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von in Gegenwart von Dexamethason generierten APCs	78
3.1.1	DEX-APCs weisen, unabhängig von ihrem Aktivierungszustand, ein stark vermindertes T-Zell-Aktivierungspotential auf	78
3.1.2	Unstimulierte BM-DCs und DEX-APCs haben das Potential, <i>de novo</i> Tregs zu induzieren	80
3.1.3	Durch unstimulierte BM-DCs und DEX-APCs induzierte iTregs sind insbesondere durch eine erhöhte mRNA-Expression von Foxp3 und LIF gekennzeichnet	90
3.1.4	Durch unstimulierte BM-DCs und DEX-APCs <i>de novo</i> induzierte Tregs zeigen divergierende Zytokin-Antworten	96
3.1.5	DEX-APCs zeichnen sich phänotypisch durch ein protolerogenes Genexpressionsprofil aus	99

3.2	Physikalischer Stress und der Kontakt mit lentiviralen Partikeln beeinflussen den Phänotyp und die APC-Aktivität von BM-DCs	108
3.2.1	Durch lentivirale Transduktion erfolgt ein effizienter Gentransfer in murine BM-DCs	109
3.2.2	Der mit der lentiviralen Transduktion assoziierte physikalische Stress resultiert in einer partiellen Ausreifung von BM-DCs	111
3.2.3	Hauptsächlich physikalischer Stress, aber auch der Kontakt mit lentiviralen Partikeln verändert das Genexpressionsprofil von DCs	114
3.2.4	Die lentivirale Transduktion vermindert die maturierungsassoziierte Zunahme der Oberflächenexpression von Effektormolekülen in BM-DCs	116
3.2.5	Der Kontakt mit lentiviralen Partikeln steigert die IL-10 Produktion in LPS-stimulierten BM-DCs	117
3.2.6	Physikalisch gestresste und lentiviral transduzierte BM-DCs induzieren unterschiedliche Zytokinantworten in Kokulturen mit T-Zellen	118
3.3	Generierung lentiviraler Expressionskonstrukte für die Transduktion von BM-DCs	120
3.3.1	Generierung lentiviraler Expressionskonstrukte, bei denen sowohl Transgen, als auch Reporter gen jeweils unter der Kontrolle eines ubiquitär konstitutiv aktiven Promotors stehen	121
3.3.2	Generierung alternativer lentiviraler Vektoren, die eine DC-fokussierte Transgenexpression und/oder eine IRES-gekoppelte Reporter genexpression ermöglichen	125
3.3.3	Generierung lentiviraler Konstrukte zur DC-fokussierten Transgenexpression und/oder IRES-gekoppelter Reporter genexpression	133
3.3.4	Sowohl der DC-spezifische Fascin-Promotor, als auch der alternative Reporter DsRed2 stellen geeignete Komponenten lentiviraler Expressionsvektoren dar	137
3.4	Die Überexpression Oberflächengebundener Moleküle führt zu einer moderaten funktionellen Veränderung muriner BM-DCs	140
3.4.1	Die transgenvermittelte exogene Expression von Oberflächenmolekülen erhöht die jeweilige Gesamt-mRNA-Menge in entsprechend transduzierten DCs	141
3.4.2	Nur für die Moleküle B7-H2 und B7-H3 werden nach einer lentiviral vermittelten Überexpression auf mRNA-Ebene erhöhte Proteinmengen in DCs detektiert	146
3.4.3	Spezifische Modulation des Genexpressionsprofils von Pirb-DCs	148
3.4.4	Pirb-DCs zeigen eine drastisch veränderte Regulation der Produktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10	150
3.4.5	Im Vergleich der überexprimierten Oberflächenmoleküle führt PD-L1 zur effektivsten Reduktion der allogenen T-Zell-Stimulierungskapazität von DCs	151
3.4.6	Die Überexpression von Oberflächenmolekülen in DCs verändert das Zytokinprofil kokultivierter allogener T-Zellen	153
3.4.7	Die Überexpression von PD-L1 führt zu einer Reduktion des syngen T-Zell-Aktivierungspotentials von DCs	155

3.4.8	Die Überexpression von PD-L1 in DCs verändert das Zytokinprofil kokultivierter syngener 2D2 T-Zellen	156
3.5	Die Überexpression intrazellulärer Moleküle moduliert den Phänotyp und die Funktion muriner BM-DCs	158
3.5.1	Die transgenvermittelte exogene Expression der intrazellulären Moleküle I $\kappa$ B $\alpha$ , SOCS-1 und STAT3 beeinflusst deren endogene Expression negativ	158
3.5.2	Das Genexpressionsprofil von DCs wird durch die Überexpression intrazellulärer Regulatormoleküle jeweils spezifisch moduliert	161
3.5.2.1	Spezifische Modulation des Genexpressionsprofils von I $\kappa$ B $\alpha$ -DCs	161
3.5.2.2	Spezifische Modulation des Genexpressionsprofils von MKP1-DCs	163
3.5.2.3	Spezifische Modulation des Genexpressionsprofils von SOCS1-DCs	165
3.5.2.4	Spezifische Modulation des Genexpressionsprofils von STAT3-DCs	167
3.5.3	Die Überexpression von I $\kappa$ B $\alpha$ oder STAT-3 vermindert die Menge an MHCII-Molekülen auf der Oberfläche von BM-DCs	169
3.5.4	LPS-stimulierte I $\kappa$ B $\alpha$ -DCs und SOCS1-DCs zeigen eine signifikant verminderte Sekretion des antiinflammatorischen Mediators IL-10	170
3.5.5	Im Vergleich der lentiviral transferierten intrazellulären Moleküle führt die Überexpression von I $\kappa$ B $\alpha$ zur effektivsten Reduktion der allogenen T-Zell-Stimulierungskapazität von DCs	171
3.5.6	Die Überexpression von intrazellulären Molekülen in DCs induziert jeweils eine distinkte Zytokinantwort kokultivierter allogener T-Zellen	173
3.5.7	Stimulierte I $\kappa$ B $\alpha$ -DCs und MKP1-DCs sind durch eine signifikant reduzierte syngene T-Zell-Stimulierungskapazität gekennzeichnet	175
3.5.8	Die Überexpression von I $\kappa$ B $\alpha$ oder MKP-1 in DCs modifiziert das Zytokinprofil kokultivierter syngener 2D2 T-Zellen	176
3.6	Die Überexpression bestimmter sekretierter Moleküle induziert einen tolerogenen Status in murinen BM-DCs	178
3.6.1	Die Überexpression sekretierter Mediatoren ist in unstimulierten und LPS-stimulierten BM-DCs auf mRNA- und Proteinebene nachweisbar	178
3.6.2	Die Überexpression solubler Moleküle resultiert in einer jeweils spezifischen Modifikation des Genexpressionsprofils von BM-DCs	182
3.6.2.1	Spezifische Modulation des Genexpressionsprofils von IL10-DCs	182
3.6.2.2	Spezifische Modulation des Genexpressionsprofils von IL21-DCs	184
3.6.2.3	Spezifische Modulation des Genexpressionsprofils von IL1RA-DCs	186
3.6.2.4	Spezifische Modulation des Genexpressionsprofils von TGF $\beta$ 1-DCs	188
3.6.3	Die Überexpression von IL-10 oder IL-21 reduziert die Menge an MHCII und kostimulatorischen Rezeptoren auf der Oberfläche von BM-DCs	190
3.6.4	Die Überexpression der löslichen Moleküle IL-21 und TGF- $\beta$ 1 inhibiert in stimulierten DCs die Sekretion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10	192

3.6.5	Innerhalb der Gruppe der lentiviral transferierten solublen Mediatoren reduziert die Überexpression von IL-10 oder IL-21 das allogene T-Zell-Stimulierungspotential muriner DCs am effektivsten	193
3.6.6	Die Überexpression solubler Mediatoren in DCs führt zu spezifischen Modulationen des Zytokinprofils allogener T-Zellen	195
3.6.7	Die Überexpression von IL10 oder IL-1RA resultiert in einem signifikant reduzierten syngenem T-Zell-Aktivierungspotential LPS-stimulierter DCs	197
3.6.8	IL10-DCs, IL21-DCs sowie IL1RA-DCs modulieren die Zytokinantwort kokultivierter syngener 2D2 T-Zellen in unterschiedlicher Weise	199
3.6.9	Die Überexpression von IL-21 in DCs resultiert nicht in einer Induktion von IL-17 sekretierenden CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	200
3.6.10	Die Überexpression von IL-21 in DCs resultiert nicht in einer Induktion follikulärer T-Helferzellen	201
3.6.11	Unstimulierte LV-DCs, IL10-DCs sowie IL21-DCs induzieren Tregs mit einem anergen Status und suppressiven Eigenschaften	203
3.6.12	Unstimulierte LV-DCs, IL10-DCs sowie IL21-DCs induzieren Tregs mit jeweils spezifischen Genexpressionsprofilen	206
3.6.13	In Restimulierungs- und Suppressionsansätzen mit durch LV-DCs, IL10-DCs oder IL21-DCs vorstimulierten T-Zellen ist der Gehalt der Markerzytokinen IFN- $\gamma$ , IL-5, IL-10 sowie IL-17 stark variabel	208
3.6.14	Im Gegensatz zu LV-DCs weisen IL10-DCs und IL21-DCs eine tolerogene Aktivität im murinen Modell der Kontaktallergie auf	211
3.6.15	Milz- und Lymphknotenzellen aus haptentprovozierten Mäusen weisen, abhängig von der Vorbehandlung mit IL10- bzw. IL21-DCs, eine differentielle Restimulierbarkeit auf	213
3.6.16	LV-DCs, IL10-DCs und IL21-DCs induzieren im Rahmen einer CHS differentielle Genexpressionsprofile in T-Zellen	214
3.6.17	Milz- und Lymphknotenzellen aus haptentprovozierten Mäusen weisen in Abhängigkeit von ihrer Vorbehandlung mit IL10- oder IL21-DCs ein moduliertes Zytokinprofil auf	217
<b>4</b>	<b><u>Diskussion</u></b>	<b>220</b>
4.1	Immature BM-DCs und DEX-APCs weisen eine geringe APC-Aktivität auf und induzieren <i>de novo</i> iTregs mit unterschiedlichen phänotypischen Charakteristika	222
4.2	Toleranzinduzierende DEX-APCs weisen ein spezifisches protolerogenes Genexpressionsprofil auf	230
4.3	Die lentivirale Transduktion von BM-DCs ist äußerst effizient, der mit der Methode assoziierte physikalische Stress resultiert jedoch in einer partiellen Ausreifung der Zellen	235
4.4	Differentiell transduzierte BM-DCs weisen voneinander abweichende phänotypische Charakteristika auf und modulieren unterschiedlich die T-Zell-Aktivierung	240

4.4.1	Transgenvermittelte Überexpression der Oberflächenmoleküle PirB, B7-H3, B7-H2 und PD-L1 in DCs	241
4.4.2	Transgenvermittelte Überexpression der intrazellulären Regulatormoleküle I $\kappa$ B $\alpha$ , MKP-1, STAT3 und SOCS-1 in DCs	252
4.4.3	Transgenvermittelte Überexpression der sekretierten Zytokine TGF- $\beta$ 1, IL-1RA, IL-10 und IL-21 in DCs	267
4.5	Untersuchungen zur tolerogenen Aktivität IL10- und IL21-DCs <i>in vivo</i> im murinen Modell der Kontaktallergie	286
4.6	Ausblick	288
<b>5</b>	<b><u>Zusammenfassung</u></b>	<b>290</b>
<b>6</b>	<b><u>Abstract</u></b>	<b>292</b>
<b>7</b>	<b><u>Literaturverzeichnis</u></b>	<b>293</b>
<b>8</b>	<b><u>Abkürzungsverzeichnis</u></b>	<b>347</b>
<b>9</b>	<b><u>Anhang</u></b>	<b>350</b>
<b>10</b>	<b><u>Lebenslauf</u></b>	<b>354</b>
<b>11</b>	<b><u>Eidesstattliche Erklärung</u></b>	<b>355</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Alle Organismen sind permanent Einflüssen ihrer Umwelt ausgesetzt, von denen eine Vielzahl als potenziell schädlich einzustufen ist. Hierzu gehören unter anderem Bakterien, Pilze, Viren und Toxine. Als biologischen Abwehrmechanismus gegen diese Einflüsse haben Organismen ein Immunsystem entwickelt.

Das Immunsystem setzt sich funktionell aus zwei interagierenden Teilsystemen zusammen, dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem. Hauptaufgabe des evolutionär älteren, angeborenen Immunsystems ist eine sofortige Abwehr ohne vorherigen Kontakt mit dem jeweiligen Erreger <sup>1</sup>. Die adaptive Immunität reagiert im Gegensatz dazu wesentlich langsamer, ist aber spezifischer und besitzt eine immunologische Gedächtnisfunktion.

Der Immunologe Paul Ehrlich postulierte zum Ende des 19. bzw. am Anfang des 20. Jahrhunderts das Prinzip des *Horror autotoxicus*, was soviel wie „Furcht vor Selbstzerstörung oder Selbstvergiftung“ bedeutet. Nach dieser Theorie richtet sich die Immunabwehr des Körpers nur gegen Fremd-Antigene. Eine Immunreaktion gegen Selbst-Antigene war nach diesem Prinzip nicht möglich, da sie fatale Folgen hätte, die im Widerspruch mit dem Leben ständen. Solche autoimmunologischen Prozesse werden laut Ehrlich durch körpereigene Schutzmechanismen verhindert, die solche Reaktionen generell nicht zulassen.

Nach heutigem Forschungsstand ist die Differenzierung zwischen Selbst- bzw. harmlosen Antigenen, die toleriert werden und Fremd-Antigenen, die in der Induktion einer Immunantwort resultieren, eine essentielle Eigenschaft des Immunsystems. Ein Verlust dieser Toleranz kann unter anderem zu Autoimmunerkrankungen und allergischen Reaktionen führen <sup>2,3</sup>.

### 1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Die Haut bzw. die verschiedenen Schleimhäute des Körpers bilden zusammen eine erste physikalische Barriere für eindringende Pathogene. Wird diese überwunden, trifft der Krankheitserreger zunächst auf Komponenten des angeborenen Immunsystems <sup>4</sup>. Das Prinzip dieser ersten Immunreaktion beruht auf der Detektion konservierter pathogenassoziierter molekularer Muster (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs) durch bestimmte Mustererkennungsrezeptoren (*pathogen recognition receptors*, PRRs), die

von professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APCs) exprimiert werden<sup>5,6</sup>. Mikrobielle Moleküle, die als PAMPs erkannt werden, sind unter anderem Lipopolysaccharide (LPS), Mannane, bakterielle DNA, doppelsträngige RNA und Glykane. Nach Erkennung der PAMPs durch die jeweiligen PRRs kommt es unter anderem zur Phagozytose von Pathogenen<sup>7</sup>.

Toll-ähnliche Rezeptoren (*toll-like receptors*, TLRs) gehören zu den wichtigsten signalgebenden PRRs. Sie werden von professionellen APCs wie Makrophagen, dendritischen Zellen (DCs) und B-Zellen exprimiert. Mikrobielle Moleküle, die von TLRs als PAMPs erkannt werden, sind neben weiteren LPS (TLR4), bakterielle Lipoproteine und Lipoteichonsäuren (TLR2), Flagelline (TLR5), unmethylierte CpG DNA von Bakterien und Viren (TLR9), doppelsträngige RNA (TLR3) und einzelsträngige, virale RNA (TLR7)<sup>8</sup>. Die Aktivierung dieser PRRs führt zur Induktion von Signaltransduktionskaskaden, in deren Verlauf eine verstärkte Expression kostimulatorischer Moleküle und die Produktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine erfolgt. Dieser Ablauf führt zur Auslösung einer Entzündungsreaktion und ist eine Voraussetzung für die Induktion einer adaptiven Immunantwort<sup>1</sup>.

Alle PRRs sind keimbahnkodiert und damit unveränderlich. Da diese lediglich der effizienten Erkennung allgemeiner Molekülstrukturen dienen, kann die angeborene Immunität von vielen Pathogenen unterwandert werden<sup>9</sup>. Erfolgt die Ausbreitung einer Infektion unter anderem über das lymphatische System, wird eine adaptive Immunantwort eingeleitet.

### 1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Die Aktivierung PRR-tragender Zellen ist ein wichtiger Schritt in der Initiierung einer nachfolgenden adaptiven Immunantwort, in deren Verlauf Pathogene durch humorale und zellvermittelte Komponenten wirksam bekämpft werden.

Im Gegensatz zu den keimbahnkodierten Rezeptoren der angeborenen Immunität sind die antigenspezifischen Rezeptoren des adaptiven Immunsystems genetisch nicht vollständig festgelegt und somit hochgradig variabel. Grundlage dieser Variabilität sind Rearrangements verschiedener Gensegmente, somatische Hypermutationen und Genkonversionen<sup>9</sup>. Diese somatisch rearrangierten Rezeptoren des adaptiven Immunsystems sind T-Zell- und B-Zell-Rezeptoren (TCRs, BCRs), die durch ihre Diversität ein großes Spektrum an Antigenen erkennen<sup>7</sup>. Bindet ein antigenspezifischer Rezeptor eines Lymphozyten an sein spezifisches Antigen, so kommt es gezielt zur Aktivierung und Proliferation dieser Subpopulation. Nach 3-5 Tagen ist diese Population ausreichend expandiert und zu Effektorzellen differenziert<sup>1</sup>. Dieses Prinzip der klonalen Selektion bildet die Basis der erworbenen Immunität<sup>9</sup>.



Die Induktion einer adaptiven Immunantwort erfolgt durch DCs, die das angeborene und das erworbene Immunsystem miteinander verbinden<sup>9,10</sup>. DCs gehören zur Gruppe der professionellen APCs<sup>11</sup>. Im unreifen Zustand nehmen sie Antigene in der Peripherie auf, reifen bei Vorliegen eines Aktivierungsstimulus (TLR-Ligand, proinflammatorische Zytokine) aus und wandern in das lokale Lymphgewebe oder in die Milz. Dort präsentieren sie den zirkulierenden T-Zellen die zuvor prozessierten Antigenfragmente<sup>12</sup>.

Die zellvermittelte Immunantwort wird durch antigenspezifische T-Zellen getragen. T-Zellen können ihr spezifisches Antigen nur dann binden, wenn es als Peptid im Kontext mit MHC- (*major histocompatibility complex*) Molekülen auf der Oberfläche von APCs präsentiert wird. Zusätzlich zu dieser hochaffinen Bindung wird ein zweites, antigenunabhängiges kostimulatorisches Aktivierungssignal von der APC vermittelt. Dies geschieht durch verschiedene Oberflächenmoleküle<sup>13</sup>, wie zum Beispiel CD80, CD86 und CD40, die mit den T-Zell-Oberflächenrezeptoren CD28 bzw. CD40-Ligand interagieren<sup>14,15</sup>. Die Kontaktstelle zwischen den beiden Zellen wird als immunologische Synapse bezeichnet, in deren innerer Zone ringartig MHC-Antigen-Komplexe bzw. TCRs sowie kostimulatorische Rezeptoren bzw. kostimulatorische Liganden vorliegen, während adhäsionsvermittelnde Moleküle in einem äußeren Ring organisiert sind<sup>16</sup>. Die Aktivierung und klonale Proliferation antigenspezifischer T-Zellen erfolgt ausschließlich wenn beide Aktivierungssignale vorliegen. In diesem Rahmen wird dann Interleukin 2 (IL-2) als autokriner Wachstumsfaktor exprimiert<sup>17</sup>. Nach ihrer Aktivierung kontrollieren T-Zellen andere Komponenten der adaptiven Immunantwort wie Makrophagen und B-Zellen<sup>1</sup>.

Die zweite Komponente der adaptiven Immunantwort ist die humorale Immunität, in deren Rahmen B-Zellen durch T-Helferzellen ( $T_H$ ) aktiviert werden. Erstere produzieren und sezernieren im aktivierten Zustand Antikörper, die auf verschiedene Weise die Immunantwort modulieren. Durch Bindung dieser Antikörper an Antigene werden letztere neutralisiert und können nicht mehr mit körpereigenen Zellen wechselwirken. Im Rahmen der Opsonierung wird durch Anlagerung von Antikörpern an Oberflächenmoleküle von Bakterien deren Aufnahme durch Phagozyten erleichtert. Außerdem können Antikörper nach Bindung an Antigenstrukturen auf Mikroorganismen das Komplementsystem aktivieren, indem die gebundenen Antikörper einen Rezeptor für das erste Protein des Komplementsystems bilden<sup>18</sup>.

## 1.2 Komponenten des Immunsystems

Alle zellulären Bestandteile des Immunsystems stammen von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab. Aus diesen entwickeln sich

zunächst myeloide und lymphoide Vorläuferzellen, die durch ein eingeschränktes Potential gekennzeichnet sind <sup>19,20</sup>.

Myeloide Vorläuferzellen differenzieren zu Granulozyten, Mastzellen und Monozyten. Die Granulozyten unterteilen sich in drei Untergruppen, die alle an unspezifischen Immunreaktionen beteiligt sind. Basophile Granulozyten sind Effektorzellen allergischer Reaktionen, die vasoaktive und immunregulatorische Mediatoren produzieren und ins Blut oder den extra-zellulären Raum sezernieren <sup>21,22</sup>. Eosinophile sind an der Bekämpfung eingedrungener Parasiten beteiligt <sup>23</sup> und Neutrophile sind phagozytisch in der Abwehr bakterieller Pathogene im Rahmen der angeborenen Immunität aktiv <sup>24,25</sup>.

Mastzellen sind frühe Effektorzellen, die TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor*), Histamin und vasoaktive Substanzen zur Erhöhung der Gefäßpermeabilität freisetzen und so zu akuten Entzündungsreaktionen beitragen. Histamin ist dabei an der Freisetzung von TNF- $\alpha$  aus Makrophagen beteiligt <sup>6,26</sup>. Monozyten differenzieren nach Eintritt in das periphere Gewebe zu Makrophagen oder zu myeloiden dendritischen Zellen (ausführliche Darstellung in Abschnitt 1.6) <sup>27-29</sup>. Neben ihrer Funktion als APCs sind Makrophagen innerhalb der unspezifischen Immunabwehr phagozytisch aktiv. Sie exprimieren verschiedene PRRs und spüren daher beginnende mikrobielle Invasionen direkt auf <sup>6,30</sup>. DCs sind wie Makrophagen professionelle APCs <sup>31</sup>. Immature DCs sind auf die Aufnahme und Prozessierung von Antigenen aus der Peripherie spezialisiert. Die Antigenfragmente werden dann T-Zellen in den lymphatischen Geweben präsentiert. Als potenteste APCs sind DCs im aktivierten Zustand auf diese Weise in der Lage, naive T-Zellen zu stimulieren und dadurch eine Immunantwort zu induzieren <sup>12,32</sup>. DCs spielen sowohl bei der T-Zell vermittelten Immunantwort als auch bei der Induktion der immunologischen Toleranz eine tragende Rolle <sup>33</sup>.

Lymphoide Vorläuferzellen entwickeln sich zu Lymphozyten, die zu B-Zellen <sup>34</sup>, T-Zellen <sup>35</sup>, Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) oder plasmacytoiden DCs <sup>36</sup> differenzieren. Myeloide und plasmacytoide DC-Populationen besitzen auf Grund ihrer unterschiedlichen hämatopoetischen Abstammung abweichende phänotypische Merkmale, jedoch sind alle DCs in der Lage, antigenspezifisch T-Zellen zu aktivieren und deren Proliferation zu induzieren <sup>37</sup>.

B-Zellen differenzieren vollständig im Knochenmark aus. Sie exprimieren auf ihrer Oberfläche membrangebundene Immunoglobuline, die den BCR darstellen. Dieser Rezeptor erkennt antigene Proteine in ihrer nativen Form. Spezifisch gebundene Antigene werden internalisiert und deren Degradationsprodukte im MHCII-Antigen-Komplex auf der B-Zell-Oberfläche präsentiert. Dieser Komplex wird von T<sub>H</sub>-Zellen erkannt, die einen spezifischen TCR für das entsprechende Antigen besitzen <sup>38</sup>. Als weitere Aktivierungssignale sind kostimulatorische CD40/CD40-Ligand Interaktionen sowie die Produktion von Zytokinen

durch die T<sub>H</sub>-Zelle notwendig<sup>39</sup>. Aktivierte B-Zellen differenzieren terminal zu Plasmazellen. Diese produzieren und sezernieren Antikörper, die spezifisch gegen das Antigen gerichtet sind und tragen so zur humoralen Immunantwort bei<sup>40</sup>.

Im Gegensatz zu B-Zellen ist für die vollständige Entwicklung von T-Zellen ein Reifungsprozess im Thymus essentiell. Weiterhin unterscheiden sich beide Lymphozyten-Typen auf Ebene ihrer Rezeptoren. T-Zellen erkennen Antigene über ihren TCR nur in prozessierter Form als Peptid im Kontext mit MHC-Molekülen auf der Oberfläche von APCs<sup>35,41</sup>. Gleichzeitig ist ein kostimulatorisches Signal, vermittelt durch kostimulatorische Moleküle auf der APC (z.B. CD40, B7-Moleküle), zur Aktivierung naiver T-Zellen notwendig. Sind beide Signale vorhanden, kommt es im Rahmen der Aktivierung zur klonalen Expansion und Differenzierung der naiven T-Zelle zur T-Effektorzelle.

T-Effektorzellen lassen sich auf Grund ihrer exprimierten Korezeptoren in zwei Subpopulationen einteilen. CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkennen Antigen im Kontext mit MHCI-Molekülen. Nach Aktivierung durch Antigenkontakt differenzieren sie zu zytotoxischen T-Zellen (*cytotoxic T lymphocytes*, CTLs). Diese sind an der Erkennung und Beseitigung intrazellulärer Erreger beteiligt, die körpereigene Zellen infizieren und in deren Zytosol replizieren (z.B. Viren). Aktivierte CTLs sezernieren unter anderem Perforin-1<sup>42</sup>, das Poren in der Membran der Zielzelle bildet und Granzyme<sup>43</sup>, die Apoptose in den infizierten Zellen auslösen. Außerdem können sie unter anderem IFN- $\gamma$  (*interferon*), TNF- $\alpha$  und GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) sekretieren<sup>44</sup>, was zur Attraktion und Aktivierung von Makrophagen und NK-Zellen führt.

Die als T<sub>H</sub>-Zellen bezeichneten CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkennen degradierte Proteine, die über MHCII-Moleküle präsentiert werden. Abhängig von Faktoren, wie Art der APC und Ausmaß der Kostimulation oder APC-seitig ausgeschütteten Zytokinen werden CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu T<sub>H</sub>1-Zellen oder T<sub>H</sub>2-Zellen polarisiert<sup>45-48</sup>. Neben den anderen genannten Faktoren scheint das Zytokinmilieu das wichtigste Signal bei der T<sub>H</sub>-Differenzierung zu zellulären oder humoralen Effektorzellen zu sein. IL-6, das unter anderem von reifen Typ 2-DCs sekretiert wird, polarisiert antigenspezifische T<sub>H</sub>-Zellen in Richtung T<sub>H</sub>2-Zellen<sup>49</sup>. Aktivierte T<sub>H</sub>2-Zellen produzieren IL-4, welches als autokriner Wachstumsfaktor fungiert und die Ausdifferenzierung anderer T-Zell-Subpopulationen inhibiert<sup>50</sup>. IL-4 bewirkt über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors (TF) STAT6 (*signal transducers and activators of transcription*) die Differenzierung in Richtung T<sub>H</sub>2<sup>51</sup>. Aktivierte, IFN- $\gamma$  polarisierte Typ 1-DCs<sup>52</sup> sezernieren IL-12, das über den Transkriptionsfaktor STAT4 zur Polarisierung in Richtung T<sub>H</sub>1 beiträgt<sup>51,53</sup>. T<sub>H</sub>1-Zellen produzieren IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , welche zur Aktivierung von CTLs, Makrophagen, Neutrophilen sowie NK-Zellen beitragen und somit zu einer zellulären Immunantwort führen<sup>9</sup>. Aktivierte T<sub>H</sub>2-Zellen schütten vor allem IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 aus<sup>54</sup>. Zusammen mit den genannten Effektormolekülen aktivieren T<sub>H</sub>2-Zellen B-

Zellen, die im weiteren Verlauf eine humorale Immunantwort auslösen<sup>55,56</sup>. Außerdem wird die Ausreifung und Rekrutierung von Eosinophilen induziert<sup>50,57</sup>.

NK-Zellen entwickeln sich vollständig im Knochenmark und zirkulieren anschließend im Blut. Im Gegensatz zu B- und T-Zellen weisen sie keine Antigen-spezifität auf. Jedoch reagieren sie schnell auf eindringende Pathogene, was sie zu einem wichtigen Teil der angeborenen Immunantwort macht<sup>6</sup>. Wie CTLs sezernieren NK-Zellen Perforin, das in die Membran der infizierten Zelle eingebaut wird. Anschließend wird durch die Freisetzung von Granzymen und IFN $\gamma$  die Apoptose der Zelle induziert<sup>58,59</sup>.

### 1.3 Die Toleranz

Eine essentielle Eigenschaft des Immunsystems ist die Unterscheidung zwischen Selbst- und Fremd-Strukturen bzw. zwischen harmlosen und schädlichen Antigenen. Der Verlust der Toleranz gegenüber Selbst- und harmlosen Antigenen kann zu Autoimmunerkrankungen und allergischen Reaktionen führen. Die immunologischen Toleranzvorgänge werden in zentrale und periphere Toleranz eingeteilt<sup>2,3,60</sup>. Realisiert wird die Toleranz durch die Eliminierung, die funktionelle Inaktivierung und die Suppression potentiell autoreaktiver Lymphozyten.

Die Deletion unreifer, autoreaktiver Lymphozyten in den primären lymphatischen Organen ist der Kernmechanismus der zentralen Toleranz. Autoreaktive B-Zellen werden im Knochenmark und T-Zellen im Thymus durch Apoptose eliminiert<sup>41,61</sup>.

Immature B-Zellen, die einen funktionsfähigen BCR exprimieren, der mit hoher Affinität an Autoantigene bindet, werden mit Hilfe von Stromazellen negativ selektioniert. Sie durchlaufen entweder den Prozess der Apoptose oder werden inaktiviert<sup>62</sup>. Anergie B-Zellen reagieren nicht auf Antigene und können nicht mehr durch antigenspezifische T-Zellen aktiviert werden<sup>7</sup>.

T-Lymphozyten werden zunächst positiv selektioniert, indem nur T-Zellen überleben, die Peptid-beladene Eigen-MHCI-<sup>63</sup> oder -MHCII-Moleküle<sup>64</sup> erkennen, die von cTECs (*cortical thymic epithelial cell*) präsentiert werden<sup>65,66</sup>. Überlebende Zellen differenzieren von doppelt positiven CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen zu einfach positiven T-Zellen. Im Rahmen der folgenden Negativselektion werden alle Zellen eliminiert, die Autoantigen:MHCI/II-Komplexe mit einer zu hohen Affinität (Bindungsstärke) oder Avidität (Summe der Bindungsstärken) binden und somit autoreaktiv sind<sup>9,67</sup>. T-Zellen, die eine intermediäre Affinität zu Autoantigenen aufweisen, differenzieren zu einer Population CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen (Treg)<sup>68</sup>. Dieser Selektionsvorgang stellt die Toleranz neu gebildeter T-Zellen gegenüber körpereigenen Antigenen sicher und findet in der kortiko-medullären Grenzregion sowie in der Medulla selbst statt. Während residente DCs und Makrophagen primär im Thymus

exprimierte Antigene präsentieren, sind mTECs (*medullary thymic epithelial cell*) essentiell für die Präsentation von TSAs (*tissue-specific antigen*)<sup>69-71</sup>. In den spezifischen Epithelzellen der Medulla ist die individuelle Regulation der Genexpression partiell außer Kraft gesetzt und mit Hilfe des TF AIRE (*autoimmune regulator*) werden von dieser Zellpopulation zahlreiche Proteine, die nur in bestimmten Geweben oder in definierten Entwicklungsstadien exprimiert werden, im Thymus generiert und präsentiert<sup>72</sup>. Darüber hinaus können DCs TSAs aufnehmen und kreuzpräsentieren, wodurch die Anzahl TSA-präsentierender Zellen weiter erhöht wird<sup>73</sup>. Bonasio und Mitarbeiter<sup>74</sup> demonstrierten, dass antigenbeladene DCs aus der Milz in den Thymus wandern und dort ebenfalls eine Deletion antigenspezifischer T-Zellen induzieren.

Ein weiterer Mechanismus, der zur Präsentation körpereigener Antigene beiträgt, ist die Autophagie<sup>75</sup>. Dieser Prozess bezeichnet die Degradation zelleigener zytoplasmatischer Komponenten (Zellorganellen, langlebige Proteinaggregate)<sup>76</sup>, die im Anschluss von den DCs über MHCII-Moleküle auf der Oberfläche präsentiert werden und so zur zentralen sowie zur peripheren Toleranzinduktion gegenüber intrazellulären Proteinen beitragen. Vor allem immature DCs weisen erhebliche Autophagieaktivitäten auf<sup>77</sup>.

Der Mechanismus der zentralen Toleranz ist nicht in der Lage, alle potentiell autoreaktiven Zellen zu deletieren. Dies kann unter anderem darauf basieren, dass nicht alle körpereigenen Peptide aus den peripheren Geweben in den primären lymphatischen Geweben präsentiert werden. An diesem Punkt folgt ein zweiter Selektionsvorgang – die periphere Toleranz, die sich aus immunologischer Ignoranz, Induktion von Anergie, klonaler Deletion und Suppression durch Tregs zusammensetzt<sup>78</sup>:

Zahlreiche autoreaktive T-Zellen können unter physiologischen Bedingungen gar nicht mit ihrem spezifischen Antigen in Kontakt treten, da dieses entweder in zu geringen Mengen für eine T-Zell-Aktivierung auftritt<sup>79,80</sup> oder unter homöostatischen Bedingungen nicht zugänglich ist<sup>81,82</sup>. Dieser Prozess der immunologischen Ignoranz birgt jedoch auch Gefahren. Kommt es zu einer Störung der Homöostase, kann eine Exposition dieser vorher nicht zugänglichen Antigene erfolgen, wodurch eine T-Zell-Aktivierung stattfindet. Ein alternativer Mechanismus ist die Deletion autoreaktiver T-Zellen durch eine Induktion des AICD (*activation-induced cell death*)<sup>83,84</sup>. Dieser erfolgt nach einer Interaktion von Fas und Fas-Ligand, die beide von aktivierten T-Zellen exprimiert werden<sup>85-87</sup>. T-Zellen, die ein Stimulationssignal über ihren TCR ohne gleichzeitige Kostimulation erhalten, gehen in einen anergen Zustand über oder durchlaufen den Prozess der Apoptose. Anergie T-Zellen sind nicht mehr in der Lage, auf ihr spezifisches Antigen zu reagieren und können auch bei vollständiger Immunstimulation nicht mehr aktiviert werden<sup>88</sup>. Unvollständige Aktivierungssignale entstehen unter anderem bei der Stimulation von T-Zellen durch immature DCs, die kaum kostimulatorische Moleküle

exprimieren<sup>89</sup>. Außerdem kann eine Antigenpräsentation durch immature APCs zur T-Zell Deletion führen<sup>90</sup>.

Wie bereits erwähnt, entstehen im Thymus nicht nur konventionelle T-Zellen, die infolge einer Aktivierung eine Immunantwort induzieren, sondern auch Tregs, die die Aktivierung konventioneller und in diesem Kontext autoreaktiver T-Zellen inhibieren<sup>91</sup>. Somit sind Tregs maßgeblich an der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz in der Peripherie und der Regulation von Immunantworten beteiligt<sup>92,93</sup>. Sie verhindern die Ausbildung von Autoimmunerkrankungen und schädlichen Entzündungsreaktionen wie Asthma<sup>94,95</sup>, da sie unter anderem Immunantworten aktiv supprimieren können. Zusätzlich können verschiedene Treg-Subpopulationen mit suppressiven Eigenschaften in der Peripherie durch eine Interaktion von T-Zellen mit tolerogenen DCs entstehen (vergleiche Abschnitt 1.5; 1.6)<sup>96</sup>. Diese Induktion von Tregs durch spezifische DC-Populationen ist essentiell für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz<sup>97</sup> und gewährleistet eine Toleranz gegenüber harmlosen Umweltantigenen<sup>98</sup>.

### 1.4 Regulatorische T-Zellen

CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften lassen sich in drei Subpopulationen untergliedern. Neben den am intensivsten erforschten, natürlich vorkommenden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs existieren die IL-10-sekretierenden T<sub>R</sub>1-Zellen und TGF-β- (*transforming growth factor β*) sekretierenden T<sub>H</sub>3-Zellen, die zu den induzierten oder auch adaptiven Tregs gehören<sup>95,99</sup>. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs können durch zellkontaktabhängige Mechanismen die Proliferation und Zytokinausschüttung von T-Effektorzellen inhibieren, während der regulatorische Charakter von T<sub>R</sub>1- und T<sub>H</sub>3-Zellen durch die jeweils sekretierten immunsuppressiven Zytokine vermittelt wird<sup>95,100</sup>. Adaptive Tregs erwerben ihre suppressiven Eigenschaften während einer primären Immunantwort in der Peripherie. Zu ihnen gehören neben den genannten Zellpopulationen auch γ/δ T-Zellen<sup>101</sup>, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> T-Zellen<sup>102,103</sup>, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-Zellen<sup>104</sup> und NKT-Zellen. NKT-Zellen unterscheiden sich von allen anderen T-Zellen, da sie keine MHC-Peptid-Komplexe erkennen, sondern Antigene, die durch das MHC-Klasse I ähnliche Molekül CD1d präsentiert werden. Wie andere Tregs sind auch sie an der Suppression von Autoimmunerkrankungen beteiligt<sup>105</sup>.

Charakteristisch für die im Thymus entstandenen natürlichen Tregs ist die hohe Expression von CD25, der α-Kette des IL-2-Rezeptors<sup>106,107</sup>. Ein weiterer spezifischer Marker ist der TF Foxp3 (*forkhead box P3*), der in der Maus fast ausschließlich von dieser Zellpopulation exprimiert wird. Foxp3 ist essentiell für die Entwicklung und Funktion von Tregs – Foxp3-defiziente Mäuse entwickeln keine natürlichen Tregs und weisen verschiedene

Autoimmunerkrankungen auf <sup>108-110</sup>. Wird FoxP3 in konventionellen CD4<sup>+</sup> T-Zellen transgen exprimiert, entstehen funktionell aktive CD25<sup>+</sup> T-Zellen, die *in vitro* und *in vivo* suppressive Eigenschaften aufweisen <sup>109-111</sup>. Weitere Treg-assoziierte Oberflächenmoleküle sind CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen-4*) und GITR (*glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor*) <sup>96,106</sup>. CTLA-4 bindet in Konkurrenz mit CD28 an die kostimulatorischen Oberflächenmoleküle CD80 und CD86 von APCs und hat einen inhibitorischen Einfluss auf APCs und T-Zellen <sup>93,112</sup>. Generell ist zwar die Aktivierung von Tregs antigenspezifisch, die von ihnen vermittelte Suppression aber antigenunspezifisch <sup>113,114</sup>.

### 1.5 Dendritische Zellen

DCs sind von besonderem immunologischen Interesse, da sie als einzige in der Lage sind, Antigene in der Peripherie aufzunehmen und sie zur antigenspezifischen Aktivierung naiven T-Zellen in den sekundären Lymphorganen zu präsentieren <sup>115</sup>. Sie gehen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark hervor. Diese DC-Vorläufer zirkulieren zunächst im Blut und wandern im Folgenden in die peripheren Gewebe ein <sup>116</sup>.

Immature DCs (iDC), die auf die Aufnahme von Antigenen spezialisiert sind, befinden sich als eine Art Wachtposten in nahezu allen Geweben und sondieren dort ständig ihre Umgebung nach Antigenen <sup>117</sup>. Unter homöostatischen Bedingungen sind iDCs durch eine kontinuierliche endozytische Aktivität <sup>118</sup> und eine geringe Oberflächenexpression von MHC-Molekülen und kostimulatorischen Rezeptoren gekennzeichnet. Somit sind iDCs auf Grund ihrer phänotypischen Eigenschaften nicht in der Lage, T-Zellen effektiv zu aktivieren <sup>119</sup>. Generell bilden diese DCs eine heterogene Zellpopulation und können im Wesentlichen in zwei verschiedene Subpopulationen eingeteilt werden, die sich in ihrer Morphologie und der Expression von Oberflächenmarkern unterscheiden. Myeloide DCs weisen eine Monozyten-ähnliche Morphologie auf und exprimieren die myeloiden Marker CD11c, CD13 und CD33 <sup>120</sup>. Plasmazytoide DCs sind ebenfalls mononukleäre Zellen, jedoch wesentlich kleiner als myeloide DCs. Außerdem exprimieren sie die zuvor genannten myeloiden Marker entweder gar nicht oder lediglich in sehr geringen Mengen <sup>121</sup>. Murine plasmazytoide DCs exprimieren den Marker B220 <sup>122</sup>. Die Differenzierung in die unterschiedlichen Subpopulationen wird durch die Kombination verschiedener Zytokine und Transkriptionsfaktoren kontrolliert <sup>123</sup>.

Entsprechend ihrer Funktion weisen iDCs zur Aufnahme exogener Antigene ein hohes Maß an Makropinozytose, Phagozytose und Rezeptor-vermittelter Endocytose auf <sup>116,118</sup>. In diesem Kontext werden unter anderem der Mannose-Rezeptor, DEC-205 <sup>124</sup> und Rezeptoren für die Fc-Domäne von Immunglobulinen zur Antigenaufnahme exprimiert. Exogene

Antigene werden in Endosomen aufgenommen, die mit Lysosomen fusionieren. Anschließend werden die Proteine durch Proteasen degradiert<sup>125</sup>. Endogene Antigene werden im Zytosol ubiquitinyliert und innerhalb von Proteasomen prozessiert<sup>126</sup>. Die entstandenen Peptide werden anschließend auf MHC-Moleküle geladen und auf der Oberfläche präsentiert<sup>127</sup>.

Ein Bruchteil der ruhenden iDCs erlangt unter stationären Bedingungen einen semi-maturen Status und migriert in die drainierenden sekundären lymphoiden Organe. Charakteristisch für semi-mature DCs ist eine starke Oberflächenexpression von MHCII sowie kostimulatorischen Molekülen. Sie sekretieren jedoch keine proinflammatorischen Zytokine, die für eine effektive T-Zell-Aktivierung notwendig sind<sup>89,128,129</sup>. Auf Grund ihres spezifischen tolerogenen Phänotyps sind diese DCs in der Lage, in autoreaktiven T-Zellen, die der negativen Selektion im Thymus entkommen sind, Apoptose, Anergie oder einen regulatorischen Status zu induzieren<sup>130</sup>.

In Gegenwart proinflammatorischer Mediatoren oder von Bakterienkomponenten, wie beispielsweise LPS, kommt es zur Ausreifung von iDCs<sup>4,131</sup>. Im Rahmen der Reifung wird die Expression von Molekülen für die Antigenerkennung, -aufnahme und -prozessierung<sup>132,133</sup> sowie die Neusynthese von MHCII-Molekülen<sup>134</sup> runterreguliert. Charakteristisch für mature DCs (mDC) ist eine vermehrte Expression von MHCI-, MHCII- und kostimulatorischen Molekülen (u.a. CD40, CD80, CD86, OX40-Ligand, 4-1BB-Ligand) auf der Zelloberfläche. Eine auffällige phänotypische Veränderung von mDCs ist die Ausbildung dendritischer Fortsätze. Essentiell für die Generierung der Dendriten ist das Aktinbündelungsprotein Fascin, welches in diesen Strukturen akkumuliert<sup>135,136</sup>. Sowohl humane als auch murine DCs weisen eine reifeinduzierte Fascinexpression auf<sup>136-138</sup>. Gleichzeitig kommt es zu einer veränderten Expression von Chemokinrezeptoren, was zur Auswanderung der DCs aus dem infizierten Gewebe hin zu den T-Zell-Bereichen der drainierenden Lymphknoten führt<sup>139</sup>. Dort präsentieren mDCs die prozessierten Antigenpeptide naiven T-Zellen<sup>116</sup>. Eine effiziente Stimulation naiver T-Zellen ist nur bei gleichzeitiger Bindung von kostimulatorischen Molekülen an die entsprechenden kostimulatorischen Liganden möglich. Dieses Signal führt außerdem zu einer weiteren Maturierung der DCs<sup>140</sup>. Auf Grund ihrer Fähigkeit, naive antigenspezifische T-Zellen effektiv zu stimulieren, stellen vollständig aktivierte DCs die potentesten APCs dar<sup>141</sup>.



## 1.6 Tolerogene dendritische Zellen und ihre Generierung durch pharmakologische Substanzen

DCs sind nicht nur an der Induktion primärer Immunantworten, sondern auch an der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz beteiligt, da sie entscheidend zur Induktion adaptiver Tregs und zur Homöostase aller Treg-Populationen beitragen<sup>142</sup>. Immature und semi-mature DCs üben eine tolerogene Funktion aus, indem sie speziell zur Induktion von T-Zell-Anergie, T-Zell-Apoptose und der Generierung von Tregs beitragen<sup>36,143</sup>. Ob und in welchem Ausmaß eine DC immunogene oder tolerogene Immunantworten auslöst, ist von ihrem Reifungsstatus, der Antigen dosis und dem Zytokinmilieu abhängig<sup>144</sup>.

Ein tolerogener DC-Status kann durch eine Behandlung mit immunsuppressiven und immunmodulatorischen Agenzien<sup>142</sup> sowie durch die Behandlung mit verschiedenen Zytokinen herbeigeführt werden. Diese Substanzen beeinträchtigen die Ausreifung von DCs, die Aufregulierung kostimulatorischer Moleküle in Reaktion auf eine Stimulierung, die Aktivität essentieller TFs wie NF- $\kappa$ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) sowie die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-12<sup>145</sup>. Zusätzlich kann eine verstärkte Expression inhibitorischer Moleküle, wie beispielsweise ILT3 (*immunoglobulin-like transcript*) und ILT4, induziert werden<sup>146</sup>.

Tolerogene oder auch sogenannte regulatorische DCs können *in vitro* durch die DC-Differenzierung humaner Monozyten in Gegenwart von IL-10 generiert werden<sup>147</sup>. IL-10- und TGF- $\beta$ -behandelte DCs sind in der Lage, T-Zell-Anergie und Tregs zu induzieren<sup>144,148</sup>. Unter homöostatischen Bedingungen vermitteln verschiedene DC-Subpopulationen tolerogene Einflüsse, indem sie das potente antiinflammatorische Zytokin IL-10 produzieren. IL-10 wirkt sowohl autokrin, indem es die Differenzierung und Reifung von DCs inhibiert, als auch parakrin, durch die Induktion der Differenzierung von naiven T-Zellen in Tregs<sup>139,149,150</sup>. Innerhalb einer fortschreitenden Immunantwort fungiert IL-10 als negativer Rückkopplungsmechanismus, um die Stärke und Dauer der inflammatorischen Immunantwort zu begrenzen<sup>151</sup>. TGF- $\beta$ 1, welches auch von DCs produziert wird, fördert *in vitro* die frühe Entwicklung dendritischer Zellen und supprimiert die Aktivierung und Ausreifung von iDCs<sup>152,153</sup>. Dabei wird die Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle CD83 und CD86 bei humanen DCs<sup>154</sup> bzw. CD80 und CD86 bei murinen DCs<sup>155</sup> inhibiert, wodurch deren T-Zell-Aktivierungspotenzial reduziert ist. Die Behandlung mit suppressiven pharmakologischen Substanzen wie Corticosteroiden<sup>11,156,157</sup>, Vitamin D3<sup>158</sup> oder Nacystelyn<sup>159</sup> zeigt einen ähnlichen Effekt auf den Phänotyp und die Funktion von DCs wie deren Behandlung mit verschiedenen Zytokinen.

Immunologisch interessant innerhalb der Gruppe der Corticosteroidhormone sind die Glucocorticoide (GCs). Das antiinflammatorische GC Cortisol ist eine der Komponenten, die

innerhalb verschiedenster negativer Rückkopplungsmechanismen den transienten Charakter einer Immunantwort kontrollieren. Die Sekretion von GCs wird über einen hormonellen Regelkreis, die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse, gesteuert. Wird diese durch proinflammatorische Zytokine stimuliert, kommt es zu einer erhöhten Cortisolproduktion<sup>160</sup>. In akuten Stresssituationen wird die Cortisolsekretion zur Limitierung der ablaufenden Immunreaktionen um das 10-fache gesteigert<sup>161</sup>. Synthetische GCs werden auf Grund ihrer antiinflammatorischen Wirkung oft zur Behandlung allergischer und autoimmuner Erkrankungen genutzt<sup>162</sup>.

GCs binden an einen im Zytoplasma lokalisierten, im Ruhezustand inaktiven Glucocorticoidrezeptor (GR) und induzieren seine Konformationsänderung. Im aktivierten Zustand kann der GR durch ein als *Cross-Talk* bezeichnetes Wirkungsprinzip, das auf Protein-Protein-Wechselwirkungen beruht, die Aktivität von TFs (NF- $\kappa$ B, AP-1 (*activating protein*)) direkt beeinflussen<sup>163</sup>. Außerdem agiert der GR als ligandenaktivierter TF und bindet an spezifische Promotorelemente, die so genannten GREs (*glucocorticoid response element*)<sup>164,165</sup>. Auf diese Weise wird die Expression von Genen für proinflammatorische Produkte wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, und IL-6 vermindert<sup>166</sup> und die von Genen für antiinflammatorische Produkte wie CC10 (*clara cell protein*), IL-1 Rezeptor-Antagonist (IL-1RA), IL-10 und MKP-1 gesteigert<sup>167,168</sup>.

Entsprechend ihrer Wirkeigenschaften können GCs die Differenzierung und Reifung humaner<sup>169</sup> und muriner DCs<sup>170</sup> negativ beeinflussen, was auf eine veränderte Aktivität der TFs NF- $\kappa$ B<sup>171</sup> und AP-1<sup>172</sup> zurückzuführen ist, die an der Expression und Regulation zahlreicher zuvor genannter Gene beteiligt sind. Zusätzlich treten GR-vermittelte Genexpressionsveränderungen auf. Die Behandlung von DCs mit dem synthetischen GC Dexamethason (DEX) inhibiert die Expression kostimulatorischer Moleküle und proinflammatorischer Zytokine wie IL-12<sup>145,169,170</sup>. Gleichzeitig weisen DEX-behandelte Zellen eine verminderte Expression von MHCII-Molekülen und der kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD86 auf<sup>173</sup>, was in einer eingeschränkten T-Zell-Stimulierungskapazität resultiert. Die Stimulierung von Zellen der murinen myeloiden DC-Linie SP37A3 in der Gegenwart von DEX führt zur Induktion eines semi-maturen Phänotyps<sup>157</sup>. *In vitro* können diese Zellen Tregs induzieren.

### 1.7 Toleranzassoziierte Moleküle

In der Literatur sind zahlreiche Gene beschrieben, deren Produkte zum regulatorischen Status sowie zur tolerogenen Funktion von DCs beitragen. Insgesamt können die auf verschiedene Weisen identifizierten, potentiell toleranzassoziierten Moleküle in die Gruppen

inhibitorische Oberflächenrezeptoren, intrazelluläre Regulatorproteine sowie sekretierte Zytokine kategorisiert werden. Von besonderem Interesse für die vorliegende Arbeit sind innerhalb der genannten Kategorien die Oberflächenmoleküle PD-L1, B7-H2, B7-H3 und FcγRIIB, die intrazellulären Proteine IκBα, MKP-1, SOCS-1 und STAT3 sowie die sekretierten Mediatoren IL-10, IL-21, IL-1RA und TGF-β1.

### 1.7.1 Inhibitorische Oberflächenrezeptoren

Einer der entscheidenden Faktoren für die von DCs induzierten Immunantworten ist die Balance kostimulatorischer und koinhibitorischer Oberflächenmoleküle. Es ist in diesem Zusammenhang allgemein bekannt, dass B7-Mitglieder eine zentrale Rolle in der positiven und negativen Regulation antigenspezifischer, T-Zell-vermittelter Immunantworten spielen, indem sie an entsprechende Rezeptoren auf T-Zellen binden <sup>174-176</sup>.

PD-L1 (*programmed death ligand-1*, auch als B7-H1 bezeichnet) wird konstitutiv in geringen Mengen von verschiedenen nicht-hämatopoetischen Zellen <sup>177</sup> sowie von T- und B-Zellen, myeloiden Zellen und DCs exprimiert und im Rahmen einer Zell-Aktivierung aufreguliert <sup>178,179</sup>. Bisher sind zwei Bindungspartner für PD-L1 identifiziert worden. Es handelt sich hierbei um den PD-1 (*programmed cell death*) Rezeptor, der von aktivierten T- und B-Zellen und myeloiden Zellen exprimiert wird <sup>180-182</sup> sowie um CD80, dessen Expression in T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und DCs durch mikrobielle Infektionen induziert wird <sup>183</sup>. Die Rolle von PD-L1 in der Regulation der T-Zell-Aktivierung und -Funktion ist divergent. Zum einen wurde gezeigt, dass die Ligation von PD-L1 und PD-1 zur Induktion eines koinhibitorischen Signals in aktivierten T-Zellen führt und so deren Deletion bzw. Apoptose <sup>184,185</sup> oder Anergie fördert <sup>186,187</sup>. In ähnlicher Weise liefert auch die PD-L1-CD80 Interaktion inhibitorische Signale in Richtung aktivierter T-Zellen <sup>183</sup>. Somit kann eine PD-L1-vermittelte Kostimulation zu einer effektiven Inhibition von Immunantworten beitragen <sup>180,188</sup>. In Übereinstimmung damit resultiert die Blockade von PD-L1 Molekülen auf DCs in einer verstärkten Aktivierung von T-Zellen, welche durch eine erhöhte Produktion von Zytokinen gekennzeichnet ist <sup>189</sup>. In einer aktuellen Studie wurde gezeigt, dass PDL1<sup>-/-</sup> DCs CD4<sup>+</sup> T-Zellen effektiver stimulieren als Wildtyp-DCs und dass PDL1<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen *in vitro* eine stärkere Zytokinproduktion aufweisen als die entsprechenden Wildtyp-T-Zellen <sup>190</sup>. Allerdings ist PD-L1 aber auch als ein Kostimulator für die T-Zell-Proliferation und Zytokinproduktion während der frühen T-Zell-Antwort beschrieben worden <sup>191</sup>. Insgesamt legen diese Daten nahe, dass PD-L1 auf T-Zellen und APCs eine kritische Rolle im Kontext der Toleranz spielt. Das Molekül B7-H2, auch bekannt als ICOS- (*inducible costimulator*) Ligand, wird von B-Zellen, Monozyten, DCs und nicht-professionellen APCs wie Fibroblasten und

Endothelzellen exprimiert <sup>192-194</sup>. Es bindet an den T-Zell-spezifischen Rezeptor ICOS, welcher ein Homolog der Rezeptoren CD28 und CTLA-4 darstellt <sup>195,196</sup>. Die Bindung von B7-H2 an ICOS stimuliert die T-Zell-Proliferation sowie die Zytokinproduktion <sup>194,195</sup>. Obwohl die Kostimulation von T-Zellen durch ICOS die Produktion sowohl von T<sub>H</sub>1-, als auch von T<sub>H</sub>2-Zytokinen induziert, scheint der Schwerpunkt im Wesentlichen auf einer Stimulierung der Funktionalität von T<sub>H</sub>2-Effektorzellen zu liegen <sup>197,198</sup>. Wird diese Ligation durch Fusionsproteine oder Antikörper blockiert, kommt es zu einer verminderten DC-vermittelten allogenen Antwort und proteinantigenspezifischen T-Zell-Proliferation <sup>199</sup>. Der genetische *Knock-out* von ICOS in Mäusen führt zu schweren Defiziten in der T-Zell-abhängigen B-Zell-Antwort, einer beeinträchtigten Ausbildung von Keimzentren und zu einer verminderten Sekretion der T<sub>H</sub>2-Zytokine IL-4 und IL-13 <sup>200-202</sup>. Andererseits wurde im humanen System gezeigt, dass nach einer Blockade der B7-H2-ICOS-Ligation tolerogene DCs *in vitro* nicht mehr in der Lage sind, einen anergen und suppressiven Zustand in kokultivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu induzieren <sup>203</sup>.

B7-H3 ist auf Proteinebene in ruhenden Lymphozyten nicht nachweisbar. Erst nach einer Aktivierung können signifikante Mengen an B7-H3 auf T-Zellen <sup>204</sup>, NK-Zellen, Monozyten sowie DCs und Makrophagen detektiert werden <sup>205,206</sup>. Die Rolle von B7-H3 im Immunsystem scheint ambivalent – je nach experimentellem Design variieren die Ergebnisse deutlich. Auf der einen Seite wurde in humanen Studien gezeigt, dass B7-H3 als Kostimulator aktivierter T-Zellen fungiert und so die Proliferation von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen fördert sowie selektiv die IFN- $\gamma$  Sekretion steigert <sup>207</sup>. Andererseits inhibiert B7-H3 sowohl human als auch murin die CD4<sup>+</sup> T-Zell-Aktivierung und die Produktion von Effektorzytokinen <sup>208,209</sup>. Zusätzlich führen eine B7-H3-Gendeletion oder die Blockade mit Antikörpern *in vivo* zu verstärkten Autoimmunantworten <sup>205</sup>.

Neben den genannten Mitgliedern der B7-Familie tragen auch die Moleküle PirB (*paired Ig-like receptor-B*) und Fc $\gamma$ RIIB zu einer Inhibition der T-Zell-Antwort bei. Der inhibitorische Rezeptor PirB wird von verschiedenen hämatopoetischen Zelltypen wie Makrophagen <sup>210</sup>, Granulozyten, B-Zellen <sup>211</sup>, Mastzellen, Megakaryozyten und DCs exprimiert, jedoch nicht von T-Zellen und NK-Zellen <sup>212</sup>. Das Molekül besteht aus einem ungeladenen Transmembransegment und einer langen zytoplasmatischen Domäne, die vier potentielle ITIMs (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) enthält. Diese ITIMs wiederum können die Protein-Tyrosin-Phosphatasen SHP-1 <sup>213-215</sup> und wahrscheinlich auch SHP-2 <sup>216</sup> rekrutieren und auf diese Weise die Zell-Aktivierung inhibieren. Weiterhin wurde gezeigt, dass im Mikromillieu der immunologischen Synapse zwischen antigenpräsentierenden DCs und antigenspezifischen T-Zellen eine Konkurrenz der Moleküle PirB und CD8 um MHC I stattfindet. Bindet PirB in cis oder trans an MHC I, so ist der Zugang für CD8-Moleküle blockiert und die Aktivierung von CTLs wird negativ reguliert <sup>217,218</sup>. In Übereinstimmung

damit induzieren PirB-defiziente DCs wesentlich effizienter CTLs, wodurch es zu einer verstärkten Abstossung von Transplantaten und Tumoren kommt.

Die zytoplasmatische Domäne des inhibitorischen Fcγ-Rezeptors FcγRIIB enthält ebenfalls ein ITIM-Motiv, welches mit der SHIP Inositol-Phosphat-5'-Phosphatase interagieren und so die Phagozytose IgG-gekoppelter Partikel<sup>219</sup>, die Calcium-Mobilisation und zelluläre Proliferation<sup>220,221</sup> sowie die Zell-Aktivierung inhibieren kann<sup>222-224</sup>. Fcγ-Rezeptoren übermitteln Signale von IgG-Immunkomplexen an APCs, B-Zellen und Effektorzellen und sind somit an vielen Immunantworten beteiligt, die durch diese Liganden induziert werden<sup>225</sup>. FcγRIIB, welcher auf APCs exprimiert wird, spielt außerdem eine entscheidende Rolle für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz, da eine Deletion dieses Rezeptors in einer Produktion von Autoantikörpern und in einem erhöhten Auftreten von Autoimmunität resultiert<sup>226-228</sup>.

### 1.7.2 Intrazelluläre Regulatorproteine

Die Ausreifung von DCs kann durch verschiedenste Stimuli erfolgen, die jeweils mittels spezifisch definierter Signaltransduktionskaskaden integriert werden. Wachstumsfaktoren, inflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-18 und TNF-α und chemisch-physikalische Noxen können in einer Induktion des TF NF-κB resultieren<sup>229,230</sup>. LPS sowie andere bakterielle und virale Komponenten aktivieren DCs via TLRs<sup>1,231</sup>, die durch nachgeschaltete Signaltransduktionswege ebenfalls zu einer Aktivierung dieses TF führen. NF-κB spielt eine Schlüsselrolle in der Transkription von Genen, die an angeborenen und adaptiven Immunantworten<sup>232,233</sup>, Zellproliferation<sup>234,235</sup>, Entzündungsreaktionen<sup>236,237</sup>, Apoptose<sup>238</sup> sowie der Aktivierung bzw. Maturierung von Zellen beteiligt sind<sup>239</sup>. Die NF-κB-Familie setzt sich aus den fünf Proteinen RelA (p65)<sup>240,241</sup>, RelB<sup>242</sup>, c-Rel<sup>243</sup>, NF-κB1 (p50 und dessen Vorläufer p105)<sup>244,245</sup> und NF-κB2 (p52 und dessen Vorläufer p100)<sup>246,247</sup> zusammen, die sowohl Homo- als auch Heterodimere bilden können. Die transkriptionale Aktivität von RelA-, RelB- und c-Rel-enthaltenden Dimeren wird durch IκB-Proteine reguliert, wobei IκBα das effektivste ist. Deren Bindung an NF-κB-Dimere resultiert in einer Bildung stabiler, inaktiver IκB-NF-κB-Komplexe im Zytoplasma. Auf Grund maskierter NL- (*nuclear localization*) Signale können die NF-κBs nicht in den Nukleus translozieren und dort an die DNA binden<sup>248,249</sup>. Als Reaktion auf die zuvor genannten Stimuli werden IκB-Proteine durch aktivierte IκB-Kinasen (IKK) phosphoryliert, was zur Ubiquitynylierung von IκB und anschließend zu dessen Degradation durch das 26S Proteasom führt<sup>250,251</sup>. Freigesetztes NF-κB, das in den Nukleus transloziert, kann nun die Transkription von Zielgenen im Nukleus initiieren<sup>252</sup>. In Übereinstimmung damit kann NF-κB in aktivierter Form im Nukleus von mDCs

nachgewiesen werden <sup>253</sup>. Die Blockade von NF- $\kappa$ B durch pharmakologische Substanzen kann Entzündungsreaktionen vermindern und eine funktionelle Veränderung von DCs herbeiführen <sup>254-257</sup>. Eine adenovirale Überexpression von I $\kappa$ B $\alpha$  (AdvI $\kappa$ B $\alpha$ ) in humanen DCs resultiert in einer potenten Inhibition der Expression kostimulatorischer Moleküle, einer stark reduzierten Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-12 und einem Verlust der T-Zell-Stimulierungskapazität <sup>258</sup>. Weiterführende Studien zeigten, dass eine Überexpression dieses inhibitorischen Proteins auch die antigenspezifische T-Zell-Antwort im humanen System negativ reguliert <sup>259</sup>. Stimulierte murine AdvI $\kappa$ B $\alpha$ -DCs zeigen eine stark limitierte IL-6 Produktion und sind ebenfalls durch eine eingeschränkte T-Zell-Stimulierungsfähigkeit gekennzeichnet <sup>260</sup>. Im *in vivo*-Modell der allergischen Kontaktdermatitis zeigen stimulierte AdvI $\kappa$ B $\alpha$ -DCs deutliche immunsuppressive, das heißt tolerogene, Effekte.

Einer der zentralen Signaltransduktionswege, die durch externe Stimuli wie Stress oder mikrobielle Infektionen induziert werden, ist der MAP-Kinase Weg <sup>261</sup>. Die Integration der Signale erfolgt über die MAP- (*mitogen-activated protein*) Kinasen (MAP-Ks) JNK (*c-Jun N-terminal kinases*) <sup>262</sup>, p38 <sup>263</sup> und ERK (*extracellular signal-regulated kinases*) <sup>264</sup>. Aktivierte MAP-Ks translozieren in den Nukleus und stimulieren dort die Genexpression zahlreicher Zytokine, Chemokine und anderer inflammatorischer Mediatoren <sup>265-267</sup> und somit letztendlich auch die Immunantwort <sup>261,268</sup>. Die Regulation der Transkription erfolgt durch eine Beteiligung an Chromatinremodulierungsaktivitäten und die Phosphorylierung von TFs wie AP-1 <sup>269</sup>. Weiterhin regulieren MAP-Ks die Proteinexpression durch Veränderungen von Stabilität, Transport und Translation von ARE- (*AU-rich elements*) enthaltenden mRNA-Transkripten <sup>261</sup>. Alle drei genannten MAP-Ks unterliegen einem negativen Rückkopplungsmechanismus durch MAP-Kinase Phosphatasen (MKP), einer Gruppe von 11 dual-spezifischen Phosphatasen, die MAP-Ks an ihren regulatorischen Threonin- und Serinresten dephosphorylieren <sup>270</sup>. MKP-1<sup>-/-</sup> Makrophagen zeigen eine verlängerte p38- und JNK-Aktivität nach einer Stimulation mit LPS, wohingegen die Kinetik der ERK-Aktivität unverändert bleibt <sup>271,272</sup>. In LPS-stimulierten murinen BM-DCs führt der *Knock out* von MKP-1 zu einer starken Veränderung des Zytokinprofils; die proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-6 sowie das antiinflammatorische Zytokin IL-10 werden in verstärkter Menge produziert, während zeitgleich signifikant verminderte Mengen IL-12 sekretiert werden <sup>273</sup>. Die adenovirale Überexpression von MKP-1 in THP-1 Zellen, die als Modell-Zelllinie für Monozyten verwendet wurden, führt zu einer Hyporeaktivität gegenüber LPS <sup>271</sup>.

Zytokine, Hormone und Wachstumsfaktoren leiten ihre biologischen Informationen durch Bindung an ihre spezifischen Rezeptoren weiter. Diese Rezeptoren sind in vielen Fällen mit Tyrosinkinase der JAK- (*janus kinase*) Familie assoziiert <sup>274,275</sup>. Aktivierte JAKs induzieren unter anderem die Phosphorylierung von STATs <sup>276,277</sup>, die dann in den Nukleus translozieren und dort die Expression von Zielgenen modulieren. JAK- und STAT-Proteine

sind essentielle Komponenten diverser Signaltransduktionskaskaden, die in das Überleben, die Proliferation, die Differenzierung und die Apoptose von Zellen involviert sind <sup>278</sup>. Die Familie der STATs besteht aus sieben Mitgliedern, die alle an der Integration von Signalen beteiligt sind, welche durch Zytokine vermittelt werden <sup>279</sup>. Im Gegensatz zu allen anderen STAT-Familienmitgliedern, führt der *Knock out* von STAT3 zu einem frühen Tod während der Embryogenese <sup>280</sup>. Schon der Verlust von STAT3 in embryonalen Stammzellen ist lethal <sup>281,282</sup>. Im murinen System führt das Fehlen von STAT3 in myeloiden Zellen wie Makrophagen, Neutrophilen und DCs zur Entwicklung chronischer Enterokolitis sowie einer gesteigerten T<sub>H</sub>1-Antwort <sup>283</sup>. Eine erhöhte STAT3-Aktivität in DCs reduziert deren funktionale Aktivität durch die Suppression der Expression von MHCII und kostimulatorischen Molekülen <sup>284</sup>. Diese DCs sind weiterhin durch eine limitierte T-Zell-Stimulierungskapazität gekennzeichnet.

Die Dauer und Intensität zytokininduzierter Signale unterliegen einem negativen Rückkopplungsmechanismus, dessen Mediatoren intrazelluläre SOCS- (*suppressors of cytokine signaling*) Proteine sind <sup>285-287</sup>. Ihre inhibitorische Funktion beruht auf einer direkten Interaktion mit Zytokinrezeptoren und/oder JAK-Kinasen, wodurch die Rekrutierung von STATs zum Signalkomplex verhindert wird <sup>288</sup>. Soweit bekannt, werden SOCS-Proteine durch  $\alpha$ -helikale Zytokine wie IL-6, IL-2 und G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*) <sup>289</sup>, durch Stimulatoren des angeborenen Immunsystems wie LPS <sup>290</sup> und durch inflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 induziert <sup>291</sup>. SOCS-1-defiziente Makrophagen produzieren in Folge einer Stimulation mit LPS stark erhöhte Mengen proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-12 und weisen eine beeinträchtigte LPS-Toleranz auf <sup>292,293</sup>. In DCs führt der Verlust dieses inhibitorischen Proteins zu einer Hyperresponsivität auf IFN- $\gamma$  und IL-4 <sup>294</sup>. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass SOCS<sup>-/-</sup> DCs T<sub>H</sub>1-Hyperreaktionen fördern <sup>295</sup>. Die Überexpression von SOCS-1 in der Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 resultiert in einer Suppression der maturierungsassoziierten Aufregulation von MHCII Molekülen <sup>296</sup>.

### 1.7.3 Sekretierte regulatorische Zytokine

Unter den zahlreichen Faktoren, die die DC-Reifung inhibieren können, sticht vor allem IL-10 als eines der potentesten immunsuppressiven Zytokine hervor. Anfangs wurde IL-10 als ein von T<sub>H</sub>2-Zellen sekretierter Faktor identifiziert <sup>297</sup>. Mittlerweile wurde nachgewiesen, dass dieses Zytokin auch von B-Zellen <sup>298</sup>, Mastzellen, Eosinophilen, Makrophagen, DCs <sup>299</sup> und weiteren T-Zell-Subpopulationen wie CD8<sup>+</sup> T-Zellen <sup>300</sup> sowie natürlichen CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> <sup>301,302</sup> und induzierten CD4<sup>+</sup> Tregs <sup>2,303</sup> produziert wird. Dieses potente immunregulatorische

Zytokin inhibiert unerwünschte Immunantworten des angeborenen und erworbenen Immunsystems<sup>304</sup> und fungiert als negativer Rückkopplungsmechanismus, der das Ausmaß und die Dauer inflammatorischer Antworten reguliert<sup>151</sup>. Es wurde nachgewiesen, dass unter homöostatischen Bedingungen verschiedene DC-Subpopulationen ihre tolerogene Funktion durch die Sekretion von IL-10 vermitteln, welches dann sowohl autokrin durch die Aufrechterhaltung eines maturierungsresistenten DC-Phänotyps<sup>150</sup>, als auch parakrin durch die verstärkte Induktion von Tregs<sup>139</sup> agiert. Die Kultivierung von DCs in Gegenwart von IL-10 inhibiert deren T-Zell-Aktivierungskapazität *in vitro*<sup>305,306</sup> und *in vivo*<sup>128,307</sup>. Außerdem wird durch IL-10 der Transport Peptid-beladener MHCII-Moleküle zur Zelloberfläche humaner Monozyten<sup>308</sup> und DCs<sup>309</sup> verhindert. Solchermaßen behandelte Zellen weisen während der Induktion der Reifung eine stark verminderte maturierungsassoziierte Aufregulation kostimulatorischer Moleküle<sup>147,310</sup> sowie eine reduzierte Produktion proinflammatorischer Zytokine<sup>306,310</sup> auf. Die Transduktion humaner<sup>311</sup> oder muriner DCs<sup>312</sup> mit IL-10-Expressionskonstrukten resultiert in einem vergleichbaren Phänotyp wie bei einer Kultivierung der Zellen in Gegenwart dieses Zytokins. DCs, die in Gegenwart von IL-10 kultiviert<sup>147,305</sup> oder genetisch dergestalt modifiziert wurden, dass sie das antiinflammatorische Zytokin überexprimieren<sup>313</sup>, können antigenspezifisch eine T-Zell-Anergie induzieren. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass IL-10-überexprimierende DCs die Transplantatabstossung verhindern<sup>314</sup> und das Überleben im murinen Sepsismodell verlängern<sup>315</sup>.

Während die antiinflammatorische Funktion von IL-10 im Immunsystem als fest etabliert gilt, wird die biologische Rolle von IL-21, welches auf Grund seiner strukturellen Ähnlichkeiten anfangs als *IL-10-related T cell-derived inducible factor* IL-TIF bezeichnet wurde<sup>316,317</sup>, kontrovers diskutiert. Die Produktion von IL-21 wurde in T<sub>H</sub>2-Zellen<sup>318</sup>, folliculären T-Helferzellen (T<sub>FH</sub>)<sup>319</sup>, NKT-Zellen<sup>320</sup> sowie T<sub>H</sub>17-Zellen<sup>321,322</sup> nachgewiesen. Der IL-21 Rezeptor (IL-21R) wird von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, DCs, Makrophagen sowie Keratinozyten<sup>323,324</sup> exprimiert. IL-21 ist, ähnlich wie IL-10, in der Lage, die Ausreifung von DCs zu inhibieren<sup>325</sup>. Werden murine DC-Vorläuferzellen in Gegenwart von IL-21 kultiviert, exprimieren sie deutlich weniger MHCII auf ihrer Oberfläche und sekretieren signifikant verminderte Mengen proinflammatorischer Zytokine. Weiterhin inhibiert diese Behandlung die DC-vermittelte T-Zell-Aktivierung und die Induktion einer Kontakt-Hypersensitivität durch haptikonjugierte DCs *in vivo*<sup>326</sup>. Im Gegensatz dazu begünstigt IL-21 die Aktivierung von Makrophagen<sup>327</sup>. Weiterhin wurde gezeigt, dass IL-21 die Proliferation von NK-Zellen stimuliert<sup>323</sup> oder inhibiert<sup>328</sup> und, abhängig vom experimentellen Kontext, deren Aktivität fördert<sup>329</sup> oder vermindert<sup>330</sup>. Unter homöostatischen Bedingungen limitiert IL-21 die Anzahl an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, aber unterstützt gleichzeitig deren mitotische Aktivität<sup>331</sup>. Außerdem ist dieses Zytokin essentiell



für die Induktion von T<sub>FH</sub>-Zellen, die wesentlich zur Ausbildung von Keimzentren beitragen<sup>332,333</sup>. Zusätzlich wurde gezeigt, dass IL-21 im Kontext mit TGF- $\beta$ , die Induktion von T<sub>H</sub>17-Zellen steigert<sup>334</sup>. Ein erhöhter IL-21-Spiegel wurde in zahlreichen Autoimmunerkrankungen beobachtet<sup>335</sup> und es wurde nachgewiesen, dass eine systemische Blockade von IL-21 den Krankheitsverlauf der rheumatoiden Arthritis mildert<sup>336</sup>. Übereinstimmend damit wurde demonstriert, dass dieses Zytokin die Empfindlichkeit naiver T-Zellen gegenüber der suppressiven Kapazität natürlicher Tregs im Diabetismodell reduziert<sup>337</sup>. Im Gegensatz dazu weisen IL-21 sowie IL-21R *Knock out* Mäuse einen verschlimmerten Krankheitsverlauf im Modell der EAE (*experimental autoimmune encephalomyelitis*) auf<sup>338</sup>. Weiterhin ist IL-21 essentiell für die korrekte Aktivierung natürlicher Tregs und somit für die Prävention als auch die Remission einer EAE<sup>339</sup>.

Der Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist IL-1RA gehört zur IL-1 Familie und bindet an Typ I und II IL-1 Rezeptoren, ohne dabei eine zelluläre Antwort zu induzieren<sup>340,341</sup>. Auf diese Weise wird der inflammatorische Effekt der beiden Zytokine IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  kompetitiv antagonisiert<sup>342</sup>. Sekretiert wird IL-1RA von diversen Immunzellen wie Makrophagen<sup>343</sup>, Neutrophilen<sup>344</sup> und Mastzellen<sup>345</sup> sowie von epithelialen Zellen<sup>346</sup>, Keratinozyten der Haut<sup>347</sup>, Bindegewebszellen<sup>348,349</sup>, Hepatozyten<sup>350</sup> und Adipozyten<sup>351</sup>. Eine komplette Inhibition der biologischen Aktivität von IL-1 erfordert einen mehr als 100-fachen Überschuss an IL-1RA<sup>340,352</sup>. Die Gabe von IL-1RA-neutralisierenden Antikörpern führt zu einem früheren Beginn und einem schwerwiegenden Verlauf von Krankheiten in verschiedenen Tiermodellen wie beispielsweise der LPS-induzierten Arthritis in Kaninchen<sup>353</sup> oder der Bakterien-induzierten Hepatitis in Mäusen<sup>354</sup>. Genterapeutische Maßnahmen zur Überexpression von IL-1RA zeigen überzeugende Resultate. Synoviale Zellen, die mit einem für IL-1RA kodierenden retroviralen Vektor *ex vivo* transduziert und anschließend in das Kniegelenk von Kaninchen injiziert werden, verhindern eine IL-1-vermittelte Leukozyteninfiltration, ein Anschwellen des Gelenks sowie den Verlust von Proteoglykan aus dem Knorpel<sup>355,356</sup>. Außerdem wurde gezeigt, dass in Kaninchen auch eine antigeninduzierte Arthritis durch eine *ex vivo*-Gentherapie mit IL-1RA deutlich verbessert wird<sup>357</sup>. Weitere erfolgreiche Anwendungsgebiete für eine IL-1RA-Gentherapie ist die Suppression der kollageninduzierten Arthritis<sup>358</sup>, eine Inhibition der IL-1-vermittelten Beschädigung von pankreatischen Inselzellen *in vitro*<sup>359</sup> sowie der murinen viralen Myokarditis *in vivo*<sup>360</sup>.

TGF- $\beta$ 1 gehört zu einer Familie evolutionär konservierter Moleküle mit pleiotropen Effekten auf multiple Zelltypen, wodurch diverse biologische Prozesse wie beispielsweise Immunantworten betroffen sind<sup>361</sup>. Dieses multifunktionale Zytokin ist hierbei unter anderem in Abläufe der Zellzyklus-Kontrolle und Zelldifferenzierung<sup>362,363</sup>, der Immunmodulation sowie der Apoptose<sup>364</sup> involviert. Im Speziellen ist TGF- $\beta$ 1 einer der wichtigsten antiinflammatorischen Mediatoren, der das Wachstum und die Differenzierung von T- und

B-Zellen sowie die Aktivierung von DCs und Makrophagen supprimiert<sup>365</sup>. Produziert wird TGF- $\beta$ 1 von fast allen Zelltypen des Immunsystems und agiert sowohl autokrin, als auch parakrin. Die wohl dominanteste Rolle von diesem Zytokin im Immunsystem ist die Induktion von Toleranz<sup>366</sup>. DCs, die in Gegenwart von TGF- $\beta$ 1 kultiviert werden, sind resistent gegenüber einer Ausreifung mit LPS und zeigen unter bestimmten experimentellen Bedingungen eine verminderte TLR4-Expression<sup>153</sup>. Darüber hinaus reguliert diese Behandlung die allostimulatorische Funktion humaner APCs gegenüber naiven sowie vorstimulierten T-Zellen negativ<sup>367</sup>. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass die Inhibition der *in vitro*-Aktivierung von DCs durch TGF- $\beta$ 1 mit einer verminderten Aufregulation kostimulatorischer Moleküle und einer reduzierten Antigenpräsentation einhergeht<sup>368,369</sup>. Außerdem scheint dieses Zytokin DCs in Richtung eines Phänotyps zu leiten, der die Entwicklung von Tregs fördert<sup>370</sup>. DCs, die mit TGF- $\beta$ 1-kodierenden Vektoren transduziert wurden, weisen ebenfalls eine erhöhte Tolerogenität und in Übereinstimmung damit ein vermindertes allogenes T-Zell-Stimulierungspotential auf<sup>371</sup>. In Bezug auf T-Zellen kann TGF- $\beta$ 1 als positiver Regulator für T<sub>H</sub>2-Zellen sowie als Suppressor für T<sub>H</sub>1-Zellen fungieren<sup>372,373</sup>. Weiterhin trägt dieses Zytokin im Rahmen der Entwicklung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu einer Polarisierung in Richtung eines Treg- oder T<sub>H</sub>17-Phänotyps bei<sup>374</sup>.

### 1.8 Genetische Modifikation dendritischer Zellen durch lentivirale Transduktion

Ein großer Nachteil der Generierung tolerogener DCs durch die Behandlung mit pharmakologischen Substanzen sind ungewollte pleiotrope Effekte, wie eine verminderte Lebensfähigkeit der Zellen und eine eingeschränkte Zellwanderung<sup>375</sup>. Aus den genannten Gründen ist die Identifikation von Schlüsselmolekülen, die direkt an der tolerogenen Funktion von DCs beteiligt sind sowie deren gerichtete Modulation ein attraktiver neuer Forschungsansatz zur Modifikation dendritischer Zellen. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass durch Transfektion mit mRNA *in vitro* und Plasmid-DNA *in vivo* genetisch veränderte DCs transgene Antigene erfolgreich prozessieren und präsentieren<sup>376,377</sup>. Hierdurch wurden gentechnisch modifizierte DCs generiert, die immunmodulatorische Moleküle mit autokrinen Effekten auf die DCs selbst und/oder parakrinen Effekten auf die T-Zell-Differenzierung bzw. -Polarisierung produzieren<sup>378</sup>.

Der effiziente Gen-Transfer in DCs ohne zytotoxische oder andere ungewollte Nebeneffekte stellt sich als äußerst schwierig dar<sup>379,380</sup>. Da die Transfektionseffizienz von DCs mit nicht-viralen Methoden sehr gering ist<sup>377,381</sup>, wurden zahlreiche Protokolle zur viralen Transduktion von DCs etabliert. In verschiedenen Studien wurden für murine DCs Transduktionsraten

zwischen 50 % und 80 % unter Anwendung viraler Methoden beschrieben<sup>382</sup>. Die Verwendung von retroviral-abgeleiteten Vektoren als Quelle für Transgene wurde erstmals 1983 von Mann und Mitarbeitern<sup>383</sup> beschrieben. Die beiden am häufigsten zur Transduktion verwendeten Systeme waren zu Beginn der vorliegenden Arbeit adenovirale und MMLV- (*molony murine leukaemia virus*) Vektoren, die sich jedoch nicht für die Manipulation muriner BM-DCs eignen.

Die Verwendung adenoviraler Vektoren ermöglicht eine effiziente Transduktion von DCs<sup>384-386</sup>, führt jedoch zu einer Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs, was in einer erhöhten Produktion proinflammatorischer Zytokine und in der Ausreifung von DCs resultiert<sup>387-389</sup>. Zusätzlich stellt der adenovirale Vektor selbst einen Aktivator der angeborenen Immunität dar, da die CpG-Motive innerhalb des adenoviralen Genoms mittels eines TLR9/MyD88-abhängigen Signalwegs zur Induktion von Typ-1 Interferonen in DCs führen<sup>390</sup>. Tuettenberg und Mitarbeiter<sup>391</sup> demonstrierten das Auftreten vektorspezifischer Immunantworten infolge einer adenoviralen Transduktion humaner DCs. Die wesentlichen Einschränkungen des MMLV-Systems sind die Instabilität der viralen Partikel<sup>392</sup>, die geringen viralen Titer<sup>393</sup> und die Unfähigkeit, nicht proliferierende Zellen zu transduzieren<sup>394</sup>.

Um diese Defizite der beiden genannten Transduktionssysteme zu überwinden, wurden lentiviral-abgeleitete Vektoren entwickelt<sup>395</sup>. Mit Hilfe des lentiviralen Transduktionssystems können sowohl *ex vivo* als auch *in vivo* verschiedenste Zelltypen, unabhängig von ihrem Proliferationsstatus, transduziert werden<sup>395-398</sup>. Vorteil dieser Methode ist neben der hohen Effizienz auch die Vermeidung ungewollter Nebeneffekte, wie sie unter Verwendung adenoviraler Vektoren auftreten<sup>399</sup>. Lentivirale Vektoren sind replikationsinkompetente Transportsysteme für genetische Informationen, die sich aus dem Kapsid und den Enzymen von Lentiviren und den Hüllproteinen anderer Viren zusammensetzen<sup>400</sup>. Als Hüllproteine werden meist Proteine des vesikulären Stomatitisvirus verwendet<sup>401</sup>. Diese Form der Pseudotypisierung bedeutet eine immense Vergrößerung des Wirkungsspektrums, da nicht ein spezifisches Rezeptorprotein, sondern allgemeine Phospholipide in der Plasmamembran als Bindestelle für virale Partikel dienen. Auf diese Weise ist eine Infektion diverser Zellpopulationen möglich<sup>402</sup>. Im Verlauf einer Infektion mit lentiviralen Viruspartikeln werden die Zielzellen stabil transduziert, was bedeutet, dass die übertragene genetische Information bei Zellteilungen im Genom der Zellen erhalten bleibt<sup>400</sup>. Die Integration in das Genom erfolgt hierbei über LTR- (*long terminal repeat*) Integrationssequenzen<sup>403</sup>.

Das zurzeit effektivste System für humane<sup>404-406</sup> und murine DCs<sup>398,407,408</sup> ist die Verwendung der zuvor genannten lentiviralen Vektoren. Je nach Vektor, Protokoll und DC-Subpopulationen werden für humane<sup>409,410</sup> und murine<sup>408,411</sup> DCs Effizienzen von 70 - 90 % beschrieben. Darüber hinaus behalten lentiviral transduzierte humane DCs ihren immaturren Phänotyp bei, sind in der Lage auf Maturierungssignale zu reagieren<sup>412</sup> und erhalten sowohl

in allogenen als auch im syngenen System ihr immunstimulatorisches Potential aufrecht<sup>413-415</sup>. Inwieweit der Phänotyp und die APC-Funktion unstimulierter muriner BM-DCs durch eine lentivirale Transduktion moduliert wird, wurde bisher nicht untersucht.

Neben der effizienten Transduktion von DCs *in vitro* können lentivirale Vektoren DCs auch in Folge einer *in vivo*-Applikation transduzieren und stabile antigenspezifische Immunantworten hervorrufen<sup>398</sup>. Im Rahmen solcher Forschungskonzepte ist eine DC-fokussierte Genexpression von besonderem Interesse. Ein möglicher Promotor für diese Fokussierung ist der des Aktinbündelungsprotein Fascin<sup>376,416</sup>, das essentiell für die Ausbildung der Dendriten reifer DCs ist<sup>136,138</sup>. In nicht-hämatopoetischen Zellen ist die Expression des Proteins im Wesentlichen auf neuronale Zellen und Endothelialzellen beschränkt<sup>417</sup>. DCs sind die einzigen hämatopoetischen Zellen, die Fascin exprimieren, wobei die Promotoraktivität mit dem Aktivierungsstatus der Zelle korreliert<sup>376,416</sup>. Eine DC-fokussierte Transgenexpression unter der Kontrolle des murinen Fascin-Promotors in Folge von Immunisierungen mit einer Genpistole wurde bereits nachgewiesen<sup>376,418</sup>.

## 1.9 Zielsetzung der Arbeit

Die Generierung tolerogener APCs erfolgt in den meisten Fällen durch eine Behandlung mit pharmakologischen Substanzen oder die Verwendung antiinflammatorischer Zytokine. Der große Nachteil dieser Methoden sind ungewollte pleiotrope Effekte, wie eine verminderte Lebensfähigkeit der Zellen und eine eingeschränkte Migration. Aus den genannten Gründen ist die Identifikation und gerichtete Modulation von Schlüsselmolekülen, die unmittelbar an der tolerogenen Funktion von DCs beteiligt sind, von großem Interesse.

Im ersten Abschnitt der Arbeit sollten zunächst diejenigen Moleküle identifiziert werden, die einen potentiellen Beitrag zum tolerogenen Status muriner APCs leisten. Als Modell für tolerogene APCs sollten murine Knochenmarkszellen unter BM-DC-differenzierenden Bedingungen in Anwesenheit des Glucocorticoids Dexamethason (DEX) kultiviert werden. Die generierten DEX-APCs sollten phänotypisch durch differentielle Genexpressionsanalysen DC-relevanter sowie bekannter Glucocorticoid-responsiver Moleküle charakterisiert werden. Weiterhin sollten die T-Zell-aktivierenden und-polarisierenden Eigenschaften von DEX-APCs durch Kokulturen mit allogenen T-Zellen in Proliferations- und Zytokintesten evaluiert werden.

Da DCs non-viral kaum transfiziert werden können, sollte parallel eine lentivirale Transduktionsmethode für murine BM-DCs etabliert und optimiert werden. Die Transduktanden waren im Vergleich zu nicht-transduzierten DCs phänotypisch und funktional zu charakterisieren, um methodenassoziierte Veränderungen der Zellen zu erfassen. Im Folgenden sollten dann die offenen Leserahmen derjenigen Gene kloniert werden, die in tolerogenen DEX-APCs deutlich stärker als in Kontroll-BM-DCs exprimiert werden und daher gegebenenfalls zum tolerogenen APC-Status beitragen.

Anschließend sollten BM-DCs mit den verschiedenen generierten lentiviralen Expressionskonstrukten transduziert werden. Die Transduktanden waren hinsichtlich der Expression des jeweiligen Transgens und der Auswirkung auf den zellulären Phänotyp zu untersuchen. Im Rahmen funktioneller Analysen sollten die Transduktanden mit allogenen T-Zellen kokultiviert werden. Hierbei sollte neben der T-Zell-Proliferation auch die T-Zell-Polarisierung durch Zytokinnachweise verifiziert werden. Für Transgene, die das allo-T-Zell-Aktivierungspotential der DCs deutlich inhibieren, sollte in syngenen Kokulturen mit TCR-transgenen T-Zellen ein antigenspezifischer, proliferationsinhibierender Effekt untersucht werden. Weiterhin sollte durch Zytokinnachweise in diesen Kokulturen die T-Zell-Polarisierung evaluiert werden.

Im Hinblick auf eine mögliche therapeutische Anwendung sollte für Transduktanden, die eine deutlich reduzierte T-Zell-Aktivierung vermitteln, deren kuratives Potential im murinen Krankheitsmodell der haptenvermittelten Kontaktallergie untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Laborgeräte

Gerät	Modell	Hersteller
Agarosegel-Kammer	Wide Mini-Sub Cell GT Cell; VARIA 1, Elektrophorese- Kammer	Bio-Rad, München Roth, Karlsruhe
Analysenwaage	Precisa 120A	Sartorius AG, Göttingen
Autoklav	V-150	Systemec GmbH, Wetzlar
Bakterienschüttler	RBI-112 Benchtop Incubator Shaker	Infors, Bottmingen, Schweiz
Bakterienbrutschrank	BF	Binder, Tuttingen
Bestrahlungsgerät	Gammacell 2000	Mølsgaard Medical, Risø, Dänemark
Brutschrank	CB 150, CB 210	Binder, Tuttingen
Digitalwaage	Basic Typ 1202	Sartorius AG, Göttingen
Dispensor	Polytron PT 2100	Kinematica AG, Littau, Schweiz
Durchflusszytometer	FACScan	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Elektroporator	Gene Pulser™	Bio-Rad, München
ELISA-Washer	Ultrawash plus	Dynex, Chantilly, USA
Hämozytometer	Neubauer Improved Bright Line, 0,1 mm	AO Spencer, Buffalo, USA
Imaging-System	E.A.S.Y enhanced analysis system	Herolab, Wiesloch
Magnetpartikelkonzentrator	DYNAL MPC® -1 BD IMagnet™ Cell Separation Magnet	DYNAL, Hamburg BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Magnetrührer	IKAMAG® REO	Janke & Kunkel, Staufen
Mehrkanalpipette	m 300: 30 – 300 µl	Biohit, Rosbach
Mikrometer		Mitutoyo, Tokyo
Mikroskop	Labormikroskop CH-2 (4-40x), Inverses Routinemikroskop CK-2 (4-20x)	Olympus, Hamburg

<b>Gerät</b>	<b>Modell</b>	<b>Hersteller</b>
Mikroskop	Inverses Fluoreszenzmikroskop IX70, ausgestattet mit DXC- 950P Digitalkamera (Sony Electronics ; New Jersey, USA)	Olympus, Hamburg
Mikrowelle	Microchef FM 2915 Q	Moulinex
pH-Meter	CG 840 mit Einstabmesskette N2042	Schott, Hofheim am Taunus
Pipetten	Finnpipetten: 1 - 10 µl, 10 - 100 µl, 30 - 300 µl, 200 - 1000 µl	Finpipette, Helsinki, Finnland
Pipettierhilfe	pipetus <sup>®</sup> -akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Präparierbesteck	–	Hammacher, Solingen
Präzisions Mikroplatten Leser	–	MWG Biotech, Ebersberg
Spannungsgerät	Electrophoresis constant power supply ECPS 3000/150	Pharmacia Biotech, Freiburg
Spektrophotometer	Ultrospec 1100 rp	Pharmacia, Freiburg
Sterile Werkbank	Heraeus Air <sup>®</sup>	Heraeus, Hanau
Stickstofftank	BT 40	L'air liquid, Wiesbaden
Szintillationszähler	1205 Betaplate	LKB Wallac, Freiburg
Thermocycler	7300 Real-Time PCR System, DNA Thermocycler 480	Applied Biosystems, Foster City, USA Perkin Elmer, Zaventem, Belgien
Vortexer	Vortex Genie 2 <sup>™</sup>	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
UV-Leuchtkasten	N90 MW 312 NB	Faust, Schaffhausen, Schweiz
Waage	Basic	Sartorius, München
Wasserbad	GFL Typ 1012	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Wasserdeionisierungsanlage	Aktivkohlepatrone, 2 x Reistharz-Patrone, Membranfilterkerze 0,2 µm	Milipore, Bergisch-Gladbach
Zählhilfe	Laboratory Counter	Becton Dickinson
Zellerntegerät	1295-001 Cell Harvester	LKB Wallac, Freiburg
Zentrifuge	Sorvall (Modelle RT 6000D und RC5C) Multifuge 1 L-R Mikrozentrifuge SIGMA 1-14	Du Pont, Bad Homburg Heraeus, Wiesbaden Sigma, Osterode

### 2.1.2 Material

Material	Modell	Hersteller
Abdeckfolie für Realtime-PCR-Platten		Thermo-Abgene, Hamburg
Bakteriologische Petrischalen	Ø 94mm, Höhe 16mm (no 633161)	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Dispensiergerät-Aufsatz	PD-Tips (0,5 ml, 2,5 ml)	Brand, Wertheim/Main
Einfrierdose	CN5100-0001	Nalge, Meckenheim
Einmalspritzen	10 mL, Discardit™ II	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
ELISA-Platten	96-Loch-Flachbodenplatten; high binding	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
FACS-Röhrchen	Falcon 5 ml Rundbodenröhrchen	Becton Dickinson, USA
Filtermembran	–	Perkin Elmer, Wellesley, USA
Glaspipetten	Precicolor: 5 ml und 10 ml	HBG Henneberg-Sander, Giessen
Handschuhe	Sempercare®	Semperit, Österreich
Kanülen	0,7 x 30 mm,  0,4 x 12 mm	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA B. Braun, Melsungen
Kulturflaschen	25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Kulturschalen	Cellstar: Tissue Culture Plate, 96 well, Flat Bottom, Tissue Culture Plate (6 well und 24 well)	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Küvetten	Einmal-Küvetten, 1,5 ml	Brand GmbH & Co.KG, Wertheim
Mattrandobjektträger	–	Diagonal GmbH & Co. KG, Münster
Nylonwolle	MKN-100 Nylon Wool Fiber	Kisker Biotech, Steinfurt
Pasteurpipetten	–	Roth, Karlsruhe
PCR-Reaktionsgefäße		Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Weißer Spitzen: bis 200 µl Gelbe Spitzen: bis 200 µl	Roth, Karlsruhe Sarstedt, Nümbrecht



<b>Material</b>	<b>Modell</b>	<b>Hersteller</b>
Pipettenspitzen	Blaue Spitzen: bis 1000 µl	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Plastikpipetten	Costar 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Corning Incorporated, Corning, USA
Reaktionsgefäße	15 ml, 50ml, 12 ml Rundboden	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Sicherheitsreaktionsgefäße	0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Spritzen	Omnifix <sup>®</sup> 1 ml, Terumo <sup>®</sup> Syringen 10 ml	Braun, Melsungen Terumo Europe, Leuven, Belgien
Sterilfilter	0,45 µm  0,2 µm	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel  Sarstedt AG, Nürnberg
Thermo-96-Loch-Platten	96-Loch-Mikrotestplatte, Thermowell <sup>®</sup> GOLD	Corning Incorporated, Corning, USA
Zellsieb	Ø 40 µm	B&D Bioscience, Erembodegem, Belgien

### 2.1.3 Chemikalien

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
Aceton	Riedel-de Haen, Seelze
Agarose	Invitrogen, Groningen, Niederlande
Alkohopharm 70 (70%iger (v/v) Alkohol)	Brüggemann, Heilbronn
Ammoniumchlorid	Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Ratiopharm, Ulm
Bacto-Agar	Difco, Hedinger, Stuttgart
Bacto-Trypton	Difco, Hedinger, Stuttgart
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bovines Serum Albumin (BSA)	PAA Laboratories, Cölbe
Bromphenolblau, Na-Salz	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
Chloroquindiphosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DNBS (2,4-Dinitrobenzolsulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
DNFB (2,4-Dinitrofluorbenzol)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol (96%ig)	BDH, Karlsruhe
Ethidiumbromid, 1 %ige (v/v) Lösung	Roth, Karlsruhe
Ethyldiamintetraessigsäure, Na <sub>2</sub> -Salz x 2 H <sub>2</sub> O (EDTA)	Roth, Karlsruhe
ExtrAvidin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching, Österreich, PAN-Biotech, Aidenbach
Glycerol	Roth, Karlsruhe
<sup>3</sup> H-Thymidin ( <sup>3</sup> HTdR)	Amersham Biosciences GmbH, Freiburg
Hefe-Extrakt	Gibco BRL, Erlangen
HEPES	Roth, Karlsruhe
Isopropanol (2-Propanol)	Roth, Karlsruhe
L(+)-Glutamin	Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogencarbonat	Riedel-de Haën, Seelze
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kanamycinsulfat	Roche
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	Roth, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Roth, Karlsruhe
Natrium-Acetat	Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natrium-Citrat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Ortho-Phenylendiamin-Dihydrochloride (OPD)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KGaA, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Cambrex, Charles City, USA
Pepton	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth, Karlsruhe
Protaminsulfat vom Hering, Grade III	Sigma-Aldrich, Steinheim
D(+)-Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure, 37 %ig	Roth, Karlsruhe

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
Schwefelsäure, 95 %ig	Roth, Karlsruhe
SYBR Green 490 Q-PCR Mastermix	Abgene, Hamburg
Szintillatorflüssigkeit	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
Tri-Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris/HCl	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween <sup>®</sup> -20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Wasser (steril, pyrogenfrei)	Braun, Melsungen
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt

### 2.1.4 Größenstandards

#### DNA

Gene Ruler<sup>TM</sup> DNA Ladder Mix #SM0331

MBI Ferments, St. Leon-Rot

### 2.1.5 Enzyme

#### 2.1.5.1 Allgemeine Enzyme

**Tab. 1:** Im Rahmen der Arbeit verwendete allgemeine Enzyme

Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	MBI Ferments, St. Leon-Rot
„Extravidin“, Streptavidin-Peroxidase Konjugat	Sigma-Aldrich, Steinheim
GoTaq DNA Polymerase	Promega, Heidelberg
Klenow Fragment	MBI Ferments, St. Leon-Rot
Nukleotide	Sigma-Aldrich, Steinheim
RNAse	MBI Ferments, St. Leon-Rot
SYBR Green 490 Q-PCR Mastermix	Thermo-Abgene, Hamburg
T4-DNA-Ligase	MBI Ferments, St. Leon-Rot

Die 10-fach konzentrierten Reaktionspuffer für die jeweiligen Enzyme wurden von den entsprechenden Herstellern bezogen.

### 2.1.5.2 Restriktionsendonukleasen

**Tab. 2:** Im Rahmen der Arbeit verwendete Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonuklease	Erkennungssequenz <sup>1</sup>	Hersteller
<i>Acc65I</i>	G/GTACC	MBI Ferments, St. Leon-Rot
<i>Apal</i>	GGGCC/C	MBI Ferments, St. Leon-Rot
<i>BamHI</i>	G/GATCC	MBI Ferments, St. Leon-Rot
<i>BclI</i>	A/CTAGT	MBI Ferments, St. Leon-Rot
<i>BglII</i>	A/GATCT	MBI Ferments, St. Leon-Rot
<i>BshT1</i>	A/CCGGT	MBI Ferments, St. Leon-Rot
<i>BspHI</i>	T/CATGA	NEB, Ipswich
<i>Bsp119I</i>	TT/CGAA	MBI Ferments, St. Leon-Rot
<i>Ecl136II</i>	GAG/CTC	MBI Ferments, St. Leon-Rot
<i>EcoRI</i>	G/AATTC	MBI Ferments, St. Leon-Rot
<i>EcoRV</i>	GAT/ATC	MBI Ferments, St. Leon-Rot
<i>FspBI</i>	C/TAG	MBI Ferments, St. Leon-Rot
<i>HindIII</i>	A/AGCTT	MBI Ferments, St. Leon-Rot
<i>NdeI</i>	CA/TATG	MBI Ferments, St. Leon-Rot
<i>NcoI</i>	C/CATGG	MBI Ferments, St. Leon-Rot
<i>NheI</i>	G/CTAGC	MBI Ferments, St. Leon-Rot
<i>Paul</i>	G/CGCGC	MBI Ferments, St. Leon-Rot
<i>PstI</i>	CTGCA/G	MBI Ferments, St. Leon-Rot
<i>SaI</i>	G/TCGAC	MBI Ferments, St. Leon-Rot
<i>SmaI</i>	CCC/GGG	MBI Ferments, St. Leon-Rot
<i>XbaI</i>	T/CTAGA	MBI Ferments, St. Leon-Rot
<i>XhoI</i>	C/TCGAG	MBI Ferments, St. Leon-Rot

<sup>1</sup> Die Schnittstelle innerhalb der Restriktionsenzym-Erkennungssequenz ist durch einen Schrägstrich (/) gekennzeichnet.

Die 10-fach konzentrierten Reaktionspuffer für die jeweiligen Restriktionsendonukleasen wurden von den entsprechenden Herstellern bezogen.

### 2.1.6 Vektoren

**Tab. 3:** Im Rahmen der Arbeit verwendete Vektoren

Vektor <sup>1</sup>	Hersteller bzw. Referenz	Verwendungszweck
pCDH1-MCS1 (Ampicilin <sup>R</sup> )	System Biosciences, Mountain View	Lentiviraler Klonierungsvektor

Vektor	Hersteller bzw. Referenz	Verwendungszweck
pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (Ampicilin <sup>R</sup> )	System Biosciences, Mountain View	Lentiviraler Klonierungsvektor, enthält EGFP-Reportergen
pCI	Promega, Mannheim	Subklonierung
pCMVΔR8.91 (Ampicilin <sup>R</sup> )	Zufferey <i>et al.</i> , 1997	Lentivirales Verpackungsplasmid
pDsRed2-N1	ClonTech, Mountain View	Amplifikation der DsRed2-Kassette zur Klonierung
pMD.G (Ampicilin <sup>R</sup> )	Follenzi <i>et al.</i> , 2002	Kodiert für lentivirale Hüllproteine
pIRES-EGFP (Ampicilin <sup>R</sup> ) (IRES: internal ribosome entry side)	ClonTech, Mountain View	Amplifikation der IRES-EGFP-Kassette zur Klonierung
pJET (Ampicilin <sup>R</sup> )	MBI Ferments	Subklonierung
pUC19 (Ampicilin <sup>R</sup> )	MBI Ferments	Subklonierung
pZero-2 (Kanamycin <sup>R</sup> )	Invitrogen	Subklonierung

1 Der jeweilige strukturelle Aufbau der aufgeführten Vektoren ist im Anhang bzw. in Abschnitt 3.3.1 dargestellt.

### 2.1.7 Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide wurden von den Firmen Operon und MWG-Biotech bezogen.

**Tab. 4:** Oligonukleotide, die zur Klonierung und Sequenzierung verwendet wurden

Bezeichnung	Oligonukleotid-Sequenz (5'- 3') <sup>1</sup>	Verwendungszweck
DsRED-as-BgIII	AAAGATCTCTACAGGAACAGGTGGTGGC	Amplifikation der EF1α-DsRed2-Kassette
EF1α-s-BamHI	AAGGATCCAGGATCTGCGATCGCTCCG	Amplifikation der EF1α-DsRed2-Kassette
IRESEGFP-s	GGAGATCTATGCATCTAGGGCGGCCAATTCCGC	Amplifikation der IRES-EGFP -Kassette
IRESEGFP-as	GGGTCGACAGCTCTAGGGCCGCTTTACTTGTAC	Amplifikation der IRES-EGFP -Kassette
mIL21-ORFNhe-s	GGGCTAGCAGTTCTGGTGGCATGGAGAG	Amplifikation IL-21-ORF
mIL21-ORFBsp-as	GGTTCGAAGGGAATCTTCTCGGATCCTC	Amplifikation IL-21-ORF
mIL10-ORFNhe-s	GGGCTAGCCTTGCAGAAAAGAGAGCTCCA	Amplifikation IL-10-ORF
mIL10-ORFBsp-as	GGTTCGAATGGAGTCCAGCAGACTCAAT	Amplifikation IL-10-ORF
mlkB-ORFNhe-s	GGGCTAGCCGCACAGCCATGTTTCAG	Amplifikation IκBα-ORF
mlkB-ORFBam-as	GGGGATCCGCCACTTTCCAATTATAATGTCAG	Amplifikation IκBα-ORF
mlkB-ORFBsp-as	GGTTCGAAGCCACTTTCCAATTATAATGTCAG	Amplifikation IκBα-ORF

Bezeichnung	Oligonukleotid-Sequenz (5'- 3') <sup>1</sup>	Verwendungszweck
mPDL1-ORFNhe-s	GGGCTAGCAGTCTCCTCGCCTGCAGATA	Amplifikation PD-L1-ORF
mPDL1-ORFEco-as	GGGAATTCGAGGGTTCAACACTGCTTACG	Amplifikation PD-L1-ORF
mPirb-ORFNhe-s	GGGCTAGCGCCATGTCCTGCACCTTCAC	Amplifikation Pir-b-ORF
mPirb-ORFBsp-as	GGTTCGAATCATTGCTCCACATCCTT	Amplifikation Pir-b-ORF
mStat3-ORFNhe-s	GGGCTAGCAGACAGTCGAGACCCCTGAC	Amplifikation STAT3-ORF
mStat3-ORFEco-as	GGGAATTCGCAGCTTCTGGTTTCAGCTC	Amplifikation STAT3-ORF
pCDH1-s	CAACGGGACTTTCCAAAATG	Sequenzierung pCDH1-MCS1, pCDH1-MCS1-EF1-copGFP
pCDH1-as	GGCATTAAAGCAGCGTATCC	Sequenzierung pCDH1-MCS1
pCDH1EF1-as	TCTCTAGGCACCCGTTCAAT	Sequenzierung pCDH1-MCS1-EF1-copGFP

<sup>1</sup> Durch Primer eingeführte Schnittstellen sind unterstrichen.  
 ORF: *Open reading frame*, offener Leserahmen; s: *sense*; as: *antisense*

**Tab. 5:** Oligonukleotide, die in der quantitativen PCR verwendet wurden

Murines Zielgen	Oligonukleotid-Sequenz (5'- 3')
ANXA1	Sense: GGTGACCGTTGTCAGGACTT Antisense: CATTACGTCTGTCCCCTTT
4-1BBL	Sense: CAACAGGGCTCTCCTGTGTT Antisense: TGGCCTGTGTTTGTGAATGT
B7-DC	Sense: TGTGCTGCCTTTTCTGTGTC Antisense: ATTCTCTGCGGTCAAATCG
B7-H1	Sense: AGTCTCCTCGCCTGCAGATA Antisense: ACCACTAACGCAAGCAGGTC
B7-H2	Sense: AGCCTCAAGAACCCAGATT Antisense: GAACCCGCTAGAAACATGGA
B7-H3	Sense: AGTCTGGCACAGCTCAACTC Antisense: CAAAGTCCTGGATGCTCACA
Bax	Sense: TGCAGAGGATGATTGCTGAC Antisense: GATCAGCTCGGGCACTTTAG
Bcl-2	Sense: CTCCCGATTCATTGCAAGTT Antisense: TCTACTTCCTCCGCAATGCT

<b>Murines Zielgen</b>	<b>Oligonukleotid-Sequenz (5'- 3')</b>
Bcl-x1	Sense: GGTGAGTCGGATTGCAAGTT Antisense: TGTCTGGTCACTTCCGACTG
Bid	Sense: TCACAGACCTGCTGGTGTTC Antisense: GTCTGGCAATGTTGTGGATG
CC10	Sense: GCCTCCAACCTCTACCATGA Antisense: CTCTTGTTGGGAGGGTATCCA
CCR7	Sense: GATGTCCCGGAGATTCAAGA Antisense: TTCCCATCATAGAGACCCAA
CD4	Sense: AGGAAGTGAACCTGGTGGTG Antisense: CTCCTGCTTCAGGGTCAGTC
CD8	Sense: TCAGTTCTGTCGTGCCAGTC Antisense: ATCACAGGCGAAGTCCAAT
CD40	Sense: CCTGGCTTTGGAGTTATGGA Antisense: CCGGGACTTTAAACCACAGA
CD54	Sense: TTCACACTGAATGCCAGCTC Antisense: GTCTGCTGAGACCCCTCTTG
CD80	Sense: CCATGTCCAAGGCTCATTCT Antisense: TTCCCAGCAATGACAGACAG
CD83	Sense: GCCTCCAGCTCCTGTTTCTA Antisense: TTGGATCGTCAGGGAATAGG
CD86	Sense: CAGTTACTGTGGCCCTCCTC Antisense: ACTCTGCATTTGGTTTTGCT
c-Rel	Sense: TTACCAGAAATGCCCAGGTC Antisense: GAGTGTTCCCGCTGAGAAAG
FcyRIIB	Sense: CCAAAGGCTGTGGTCAAAC Antisense: TGCTCCATTTGACACCGATA
Foxp3	Sense: CTTATCCGATGGGCCATCCTGGAAG Antisense: TTCCAGGTGGCGGGGTGGTTTCTG
Fscn	Sense: AACCCTTGCCTTTCAAAC Antisense: CATGGAAAGAAGGGGACAGA
GAPDH	Sense: CCATCACCATCTTCCAGGAG Antisense: TTTCTCGTGGTTCACACCC
GATA3	Sense: AAGGCAGGGAGTGTGTGAAC Antisense: AGGATGTCCCTGCTCTCCTT
GILZ	Sense: CGAGCTCCAGAAGGAGAAGA Antisense: GAATCCTGGCGCATTATGTT
HO-1	Sense: GAGCCTGAATCGAGCAGAAC Antisense: AGCCTTCTCTGGACACCTGA

<b>Murines Zielgen</b>	<b>Oligonukleotid-Sequenz (5'- 3')</b>
ICAM-1	Sense: TTCACACTGAATGCCAGCTC Antisense: GTCTGCTGAGACCCCTCTTG
IFN- $\gamma$	Sense: TTTGGGTTCTCTTGGCTGTT Antisense: TCTTTTGGATGCTCTGGTCA
IL-1 $\beta$	Sense: GCCCATCCTCTGTGACTCAT Antisense: AGGCCACAGGTATTTTGTCTG
IL1R2	Sense: GCATCATTGGGGTCAAGACT Antisense: GATCCTCCCTTGTGACTGGA
IL-1RA	Sense: CCAGCTCATTGCTGGGTACT Antisense: TTCTCAGAGCGGATGAAGGT
IL-4	Sense: ACAGGAGAAGGGACGCCAT Antisense: TGTTCTTCGTTGCTGTGAGG
IL-6	Sense: CCGGAGAGGAGACTTCACAG Antisense: CAGAATTGCCATTGCACAAC
IL-10	Sense: TTTTCACAGGGGAGAAATCG Antisense: TCTCTTCCCAAGACCCATGA
IL-12b	Sense: CATCTGCTGCTCCACAAGAA Antisense: CGCCATTCCACATGTCACTGC
IL-17A	Sense: TCCAGAAGGCCCTCAGACTA Antisense: AGCATCTTCTCGACCCTGAA
IL-21	Sense: CGCCTCCTGATTAGACTTCG Antisense: TGTTTCTTTCTCCCTCCT
IDO	Sense: AAGGGCTTCTTCTCGTCTC Antisense: AAAAACGTGTCTGGGTCCAC
LIGHT	Sense: GCATCAACGTCTTGGAGACA Antisense: TAAGATGTGCTGCTGGGTTG
MIF	Sense: CCATGCCTATGTTTCATCGTG Antisense: AGGCCACACAGCAGCTTACT
MKP-1	Sense: GAGCTGTGCAGCAAACAGTC Antisense: CTTCCGAGAAGCGTGATAGG
NF-kb1	Sense: CTGACCTGAGCCTTCTGGAC Antisense: GCAGGCTATTGCTCATCACA
NF-kb2	Sense: TGA CTGTGGAGCTGAAGTGG Antisense: GCCTTTAGAAGGAGGCGAGT
OX40L	Sense: GCTAAGGCTGGTGGTCTCTG Antisense: ACCGAATTGTTCTGCACCTC
PirB	Sense: GCTCCGTCTTGGACTGACTC Antisense: TGTTTGCTGGCTTCTGTTTG



<b>Murines Zielgen</b>	<b>Oligonukleotid- Sequenz (5'- 3')</b>
RelA	Sense: GGCCTCATCCACATGAACTT Antisense: CACTGTCACCTGGAAGCAGA
RelB	Sense: TGATCCACATGGAATCGAGA Antisense: CAGGAAGGGATATGGAAGCA
RORgT	Sense: TGCAAGACTCATCGACAAGG Antisense: AGGGGATTCAACATCAGTGC
SGK-1	Sense: AGGGCAGTTTTGGAAAGGTT Antisense: CAGAACATTCCGCTCTGACA
SLAM	Sense: TCGAGTCCATGGATGCAATA Antisense: GCAGGGGTCCTGATCTGTTA
SOCS-1	Sense: ACACTCACTTCCGCACCTTC Antisense: GAAGCCATCTTCACGCTGAG
STAT3	Sense: GACCCGCCAACAATAAGA Antisense: TCGTGGTAAACTGGACACCA
T-bet	Sense: GGTGTCTGGGAAGCTGAGAG Antisense: GAAGGACAGGAATGGGAACA
TGFβ-1	Sense: TTGCTTCAGCTCCACAGAGA Antisense: TGGTTGTAGAGGGCAAGGGC
TLR2	Sense: CTCCCACTTCAGGCTCTTTG Antisense: AGGAACTGGGTGGAGAACCT
TLR3	Sense: ATATGCGCTTCAATCCGTTT Antisense: CAGGAGCATACTGGTGCTGA
TLR4	Sense: GGCAGCAGGTGGAATTGTAT Antisense: AGGCCCCAGAGTTTTGTTCT
TLR7	Sense: CGGTTTTCTGTTGCCTTCTC Antisense: CGTGTCCACATCGAAAACAC
TLR9	Sense: ACCCTGGTGTGGAACATCAT Antisense: CTGTACCAGGAGGGACAAGG
TNF-α	Sense: CCCCAAAGGGATGAGAAGTT Antisense: CACTTGGTGGTTTGCTACGA
UBC	Sense: GTCTGCTGTGTGAGGACTGC Antisense: CAGGGTGGACTCTTTCTGGA

**Tab. 6:** Oligonukleotide, die zur Bestimmung der endogenen Genexpression in transduzierten Zellen verwendet wurden

Murines Zielgen <sup>1</sup>	Oligonukleotid- Sequenz (5'- 3')
IL1RA[466]-s IL1RA[652]-as	GATGGTTCTCTGCACAACA CCCTGCAAAAAGTTGTTTCCTC
IL10[543]-s IL10[648]-as	GGCCATGAATGAATTTGACA TGGAGTCCAGCAGACTCAAT
IL21[361]-s IL21[566]-as	GGAGGGGAGGAAAGAAACAG TATAGTGTCCGGCGTCTCCT
mB7H2[1065]-s mB7H2[1235]-as	GTCCCCACCGAAGCTATACA CTCGTTGTCCTCTGTCACCA
mB7H3[1011]-s mB7H3[1222]-as	CGTGTGCTGGAGAAAGATCA TCGCATTGAAGCTCAACACT
mFcgRIIB[981]-s mFcgRIIB[1163]-as	CTGGAAGAAGCTGCCAAAAC TACAGCATCCCTTGGACCAG
Mkp1[1205]-s Mkp1[1429]-as	ACCTTAAAAGCCCCATCACC TGCGGTCAAGTCATTGTTGT
mPDL1[873]-s mPDL1[1070]-as	GGAGAAATGTGGCGTTGAAG AGGCTCCTCTCCCAACTT
Nfkba[951]-s Nfkba[1102]-as	ACAGAGGATGAGCTGCCCTA TGTACAAATATACAAGTCCACATTCTT
PirB[2450]-s PirB[2637]-as	CAGCAGGACACTCAGACAGG AAAGTGCAGTCACGTTTCCA
Socs1[745]-s Socs1[954]-as	CTTAACCCGGTACTCCGTGA GAGGTCTCCAGCCAGAAGTG
Stat3[2316]-s Stat3[2521]-as	GGAGGAGGCATTTGGAAAGT CTCCGAGGTCAGATCCATGT
TGFβ1[23616]-s TGFβ1[2521]-as	GTCCTTGCCCTCTACAACCA GGGTGCAGGTGTCCTTAAAT

1 Angaben in den Klammern bezeichnen die jeweils erste Base, an die der jeweilige Primer bindet.  
s: *sense*; as: *antisense*.

**Tab. 7:** Oligonukleotide, die zur Bestimmung der exogenen Genexpression in transduzierten Zellen verwendet wurden

Murines Zielgen <sup>1</sup>	In Kombination mit <sup>1,2</sup>	Oligonukleotid- Sequenz (5'- 3')
pCDHEF[2383]-as	Socs1[745]-s, Stat3[2316]-s	ACTTCTCGGGGACTGTGG
pCDHEF[2394]-as	IL10[543]-s	AGGGCACCCGTTCAATTGCCGA

Murines Zielgen <sup>1</sup>	In Kombination mit <sup>1,2</sup>	Oligonukleotid- Sequenz (5'- 3')
pCDHEF[2336]-as	IL21[361]-s, IL1RA[466]-s, mB7H2[1065]-s, mB7H3[1011]-s, mFcgRIIB[981]-s, Mkp1[1205]-s, mPDL1[873]-s, Nfkba[951]-s, PirB[2450]-s, TGFβ1[23616]-s	ACCGGAGCGATCGCAGATCCT
pCDHEF[2383]-as	Socs1[745]-s, Stat3[2316]-s	ACTTCTCGGGGACTGTGG
pCDHEF[2394]-as	IL10[543]-s	AGGGCACCCGTTCAATTGCCGA

1 Angaben in den Klammern bezeichnen die jeweils erste Base, an die der jeweilige Primer bindet.  
2 Primersequenzen sind in Tabelle 6 angegeben.  
s: *sense*; as: *antisense*.

### 2.1.8 Lentivirale Konstrukte zur Transduktion muriner BM-DCs

**Tab. 8:** Im Rahmen der Arbeit generierte lentivirale Konstrukte zur Transduktion muriner BM-DCs

Konstrukt	Verwendete Schnittstellen	Insertgröße (bp)
pCDH1-MCS1-IRES-EGFP (über IRES gekoppeltes Reporter-gen)	<i>Bam</i> HI bzw. <i>Bgl</i> II, <i>Sal</i> I	1322
pFscn-pCDH1-MCS1 (Austausch von CMV-Promotor gegen murinen Fascin-Promotor)	<i>Bam</i> HI bzw. <i>Bcu</i> I, <i>Nhe</i> I	2600
pFscn-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (Austausch von CMV-Promotor gegen murinen Fascin-Promotor)	<i>Eco</i> RI, <i>Acc</i> 65I	2600
pFscn-pCDH1-MCS1-IRES-EGFP (Austausch von CMV-Promotor gegen murinen Fascin-Promotor, über IRES gekoppeltes Reporter-gen)	pFscn: <i>Bam</i> HI bzw. <i>Bcu</i> I, <i>Nhe</i> I und IRES-EGFP: <i>Bam</i> HI bzw. <i>Bgl</i> II, <i>Sal</i> I	2600 und 1322
pCDH1-MCS1-EF1-DsRed2 (DsRed2 statt copGFP als Reporter-gen)	<i>Bam</i> HI, <i>Bgl</i> II	684
pCDH1-MCS1-IRES-DsRed2 (DsRed2 statt copGFP als Reporter-gen, über IRES gekoppeltes Reporter-gen)	IRES-DsRed2: <i>Bam</i> HI, <i>Bgl</i> II	1269

## 2 Material und Methoden

<b>Konstrukt</b>	<b>Verwendete Schnittstellen</b>	<b>Insertgröße (bp)</b>
pFscn-pCDH1-MCS1-IRES-DsRed2 (Austausch von CMV-Promotor gegen murinen Fascin-Promotor , DsRed2 statt copGFP als Reporter gen)	IRES-DsRed2: <i>Bam</i> HI, <i>Bgl</i> II	1269
B7H2-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP	<i>Nhe</i> I, <i>Bam</i> HI	968
B7H3-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP	<i>Nhe</i> I, <i>Eco</i> RI	950
FcyRIIB-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP	<i>Nhe</i> I, <i>Eco</i> RI	881
IKB $\alpha$ -pCDH1-MCS1-EF1-copGFP	<i>Nhe</i> I, <i>Bam</i> HI	970
IL10-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP	<i>Nhe</i> I, <i>Bam</i> HI	450
IL21-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP	<i>Nhe</i> I, <i>Bsp</i> 119I	496
IL1RA-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP	<i>Nhe</i> I, <i>Bam</i> HI	536
PDL1-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP	<i>Nhe</i> I, <i>Eco</i> RI	872
PirB-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP	<i>Nhe</i> I, <i>Bsp</i> 119I	2534
SOCS1-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP	<i>Nhe</i> I, <i>Eco</i> RI	638
STAT3-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP	<i>Nhe</i> I, <i>Eco</i> RI	2312
TGF $\beta$ 1-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP	<i>Nhe</i> I, <i>Eco</i> RI	1172
B7H2-pCDH1-MCS1	<i>Nhe</i> I, <i>Bam</i> HI	968
B7H3-pCDH1-MCS1	<i>Nhe</i> I, <i>Eco</i> RI	950
FcyRIIB-pCDH1-MCS1	<i>Nhe</i> I, <i>Eco</i> RI	881
IKB $\alpha$ -pCDH1-MCS1	<i>Nhe</i> I, <i>Bam</i> HI	970
IL10-pCDH1-MCS1	<i>Nhe</i> I, <i>Bam</i> HI	450
IL21-pCDH1-MCS1	<i>Nhe</i> I, <i>Bsp</i> 119I	496
IL1RA-pCDH1-MCS1	<i>Nhe</i> I, <i>Bam</i> HI	536
PDL1-pCDH1-MCS1	<i>Nhe</i> I, <i>Eco</i> RI	872
PirB-pCDH1-MCS1	<i>Nhe</i> I, <i>Bsp</i> 119I	2534
SOCS1-pCDH1-MCS1	<i>Nhe</i> I, <i>Eco</i> RI	638
STAT3-pCDH1-MCS1	<i>Nhe</i> I, <i>Eco</i> RI	2312
TGF $\beta$ 1-pCDH1-MCS1	<i>Nhe</i> I, <i>Eco</i> RI	1172
B7H2-pCDH1-MCS1-IRES-EGFP	<i>Nhe</i> I, <i>Eco</i> RI	968
B7H3-pCDH1-MCS1-IRES-EGFP	<i>Nhe</i> I, <i>Eco</i> RI	950
FcyRIIB-pCDH1-MCS1-IRES-EGFP	<i>Nhe</i> I, <i>Eco</i> RI	881
IKB $\alpha$ -pCDH1-MCS1-IRES-EGFP	<i>Nhe</i> I, <i>Bsp</i> 119I	970
IL10-pCDH1-MCS1-IRES-EGFP	<i>Nhe</i> I, <i>Bsp</i> 119I	450
IL21-pCDH1-MCS1-IRES-EGFP	<i>Nhe</i> I, <i>Bsp</i> 119I	496
IL1RA-pCDH1-MCS1-IRES-EGFP	<i>Nhe</i> I, <i>Eco</i> RI	536
PDL1-pCDH1-MCS1-IRES-EGFP	<i>Nhe</i> I, <i>Eco</i> RI	872
PirB-pCDH1-MCS1-IRES-EGFP	<i>Nhe</i> I, <i>Bsp</i> 119I	2534
SOCS1-pCDH1-MCS1-IRES-EGFP	<i>Nhe</i> I, <i>Eco</i> RI	638

## 2 Material und Methoden

<b>Konstrukt</b>	<b>Verwendete Schnittstellen</b>	<b>Insertgröße (bp)</b>
STAT3-pCDH1-MCS1-IRES-EGFP	<i>NheI, EcoRI</i>	2312
TGFβ1-pCDH1-MCS1-IRES-EGFP	<i>NheI, EcoRI</i>	1172
pFscn-B7H2-pCDH1-MCS1	<i>NheI, EcoRI</i>	968
pFscn-B7H3-pCDH1-MCS1	<i>NheI, EcoRI</i>	950
pFscn-FcγRIIB-pCDH1-MCS1	<i>NheI, EcoRI</i>	881
pFscn-IKBα-pCDH1-MCS1	<i>NheI, Bsp119I</i>	970
pFscn-IL10-pCDH1-MCS1	<i>NheI, Bsp119I</i>	450
pFscn-IL21-pCDH1-MCS1	<i>NheI, Bsp119I</i>	496
pFscn-IL1RA-pCDH1-MCS1	<i>NheI, EcoRI</i>	536
pFscn-PDL1-pCDH1-MCS1	<i>NheI, EcoRI</i>	872
pFscn-PirB-pCDH1-MCS1	<i>NheI, Bsp119I</i>	2534
pFscn-SOCS1-pCDH1-MCS1	<i>NheI, EcoRI</i>	638
pFscn-STAT3-pCDH1-MCS1	<i>NheI, EcoRI</i>	2312
pFscn-TGFβ1-pCDH1-MCS1	<i>NheI, EcoRI</i>	1172
pFscn-B7H2-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP	<i>NheI, EcoRI</i>	968
pFscn-B7H3-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP	<i>NheI, EcoRI</i>	950
pFscn-FcγRIIB-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP	<i>NheI, EcoRI</i>	881
pFscn-IKBα-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP	<i>NheI, Bsp119I</i>	970
pFscn-IL10-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP	<i>NheI, Bsp119I</i>	450
pFscn-IL21-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP	<i>NheI, Bsp119I</i>	496
pFscn-IL1RA-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP	<i>NheI, EcoRI</i>	536
pFscn-PDL1-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP	<i>NheI, EcoRI</i>	872
pFscn-PirB-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP	<i>NheI, Bsp119I</i>	2534
pFscn-SOCS1-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP	<i>NheI, EcoRI</i>	638
pFscn-STAT3-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP	<i>NheI, EcoRI</i>	2312
pFscn-TGFβ1-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP	<i>NheI, EcoRI</i>	1172
pFscn-B7H2-pCDH1-MCS1-IRES-EGFP	<i>NheI, EcoRI</i>	968
pFscn-B7H3-pCDH1-MCS1-IRES-EGFP	<i>NheI, EcoRI</i>	950
pFscn-FcγRIIB-pCDH1-MCS1-IRES-EGFP	<i>NheI, EcoRI</i>	881
pFscn-IKBα-pCDH1-MCS1-IRES-EGFP	<i>NheI, Bsp119I</i>	970
pFscn-IL10-pCDH1-MCS1-IRES-EGFP	<i>NheI, Bsp119I</i>	450
pFscn-L21-pCDH1-MCS1-IRES-EGFP	<i>NheI, Bsp119I</i>	496
pFscn-IL1RA-pCDH1-MCS1-IRES-EGFP	<i>NheI, EcoRI</i>	536
pFscn-PDL1-pCDH1-MCS1-IRES-EGFP	<i>NheI, EcoRI</i>	872
pFscn-PirB-pCDH1-MCS1-IRES-EGFP	<i>NheI, Bsp119I</i>	2534
pFscn-SOCS1-pCDH1-MCS1-IRES-EGFP	<i>NheI, EcoRI</i>	638
pFscn-STAT3-pCDH1-MCS1-IRES-EGFP	<i>NheI, EcoRI</i>	2312
pFscn-TGFβ1-pCDH1-MCS1-IRES-EGFP	<i>NheI, EcoRI</i>	1172

Das MKP1-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP-Konstrukt wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Matthias Bros zur Verfügung gestellt.

## 2.1.9 Antikörper

### 2.1.9.1 Primärantikörper für FACS-Färbungen

**Tab. 9:** Primäre Antikörper, die für die FACS-Färbungen verwendet wurden

Antikörper	Isotyp	Klon	Markierung	Verdünnung	Hersteller
B7-H2	Ratte-IgG2b, κ	10F.9G2	PE	1:100	BioLegend, San Diego
B7-H3	Ratte-IgG2a	M3.2D7	PE	1:100	eBioscience, San Diego
CD16/32	Ratte-IgG2a, λ	93	PE	1:100	eBioscience, San Diego
CD40	Ratte-IgG2a, κ	1C10	PE	1:100	eBioscience, San Diego
CD80	Hamster-IgG1, κ	16-10A1	PE	1:100	eBioscience, San Diego
CD86	Ratte-IgG2a, κ	GL1	PE	1:100	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
I-A/I-E (MHCII)	Ratte-IgG2b	M5/114.1 5.2	PE	1:500	eBioscience, San Diego
PD-L1	Ratte-IgG2a, κ	HK5.3	PE	1:100	BioLegend, San Diego

PE: Phycoerythrin

Zur Absättigung der Fc-Rezeptoren wurde der Antikörper des Hybridoms 2.4G2 verwendet, der für FcγRII/III (CD16/32) spezifisch ist. Das Hybridom war von Frau Dr. Helga Huber (Hautklinik Mainz) zur Verfügung gestellt worden.

### 2.1.9.2 Isotyp-Kontrollantikörper für FACS-Färbungen

**Tab. 10:** Antikörper, die als Isotypkontrolle für FACS-Färbungen verwendet wurden

Antikörper	Klon	Markierung	Verdünnung	Hersteller
Ratte-IgG2a	R35-95	PE	1:50	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Ratte-IgG2b	A95-1	PE	1:50	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Hamster-IgG1	A19-3	PE	1:50	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg

PE: Phycoerythrin

### 2.1.9.3 Antikörper zur Zellseparation

**Tab. 11:** Antikörper, die zur Separation von Zellen verwendet wurden

Antikörper	Isotyp	Klon	Hersteller bzw. Beschreibung
Anti-Maus CD25	Ratte-IgG1	PC61.5.3	ImmunoTools, Friesoythe
I-A <sup>d</sup> /I-E <sup>d</sup>	Ratte-IgG2a	2G9	Das B-Zell-Hybridom für die Gewinnung des Antikörpers wurde freundlicherweise von Dr. M. Mohammadzahdeh, Hautklinik Mainz, zur Verfügung gestellt <sup>419</sup>

### 2.1.9.4 Primärantikörper für ELISA

**Tab. 12:** Primäre Antikörper, die für Zytokin-ELISA verwendet wurden

Primärantikörper	Isotyp	Klon	Konzentration (Einsatzkonzentration)	Hersteller
Anti-Maus IFN- $\gamma$	Ratte-IgG1	R4-6A2	(1:1000 verdünnt in 0,1 M NaHCO <sub>3</sub> )	Eigenproduktion in der Arbeitsgruppe
Anti-Maus IL-5	Ratte-IgG1	11B11	0,5 mg/ml (1 ng/ml in 0,1 M NaHCO <sub>3</sub> )	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus IL-10	Ratte-IgG2b, $\kappa$	JESS-16E3	0,5 mg/ml (1 $\mu$ g/ml in 1x PBS)	eBioscience, San Diego
Anti-Maus IL-17	Ratte-IgG2a	50101	0,5 mg/ml (5 $\mu$ g/ml in 1 x PBS)	R&D Systems, Minneapolis
Anti-Maus IL-21	Goat IgG	- <sup>1</sup>	72 $\mu$ g/ml (0,4 $\mu$ g/ml)	R&D Systems, Minneapolis
Rekombinante humane TGF- $\beta$ sRII/Fc Chimäre	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	0,5 mg/ml (0,2 $\mu$ g/ml in 1x PBS)	R&D Systems, Minneapolis

1: Vom Hersteller nicht angegeben.

### 2.1.9.5 Detektionsantikörper für ELISA

**Tab. 13:** Biotinylierte Detektionsantikörper, die für Zytokin-ELISA verwendet wurden

Detektions-antikörper	Isotyp	Klon	Konzentration (Einsatzkonzentration) Inkubation	Hersteller
Anti-Maus IFN- $\gamma$ , biotinyliert	Ratte-IgG1	AN18.17.24	(1:5000 verdünnt) 60 min, 37°	Eigenproduktion in der Arbeitsgruppe
Anti-Maus IL-5, biotinyliert	Ratte-IgG2a	TRFK4	0,5 mg/ml (1 $\mu$ g/ml) 60 min, 37°	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus IL-10, biotinyliert	Ratte-IgG1, $\kappa$	JESS-2A5	0,5 mg/ml (0,5 $\mu$ g/ml) 60 min, RT	eBioscience, San Diego
Anti-Maus IL17, biotinyliert	Ziege-IgG	-1	50 $\mu$ g/ml (0,25 $\mu$ g/ml) 2 h, RT	R&D Systems, Minneapolis
Anti-Maus IL21, biotinyliert	Ziege-IgG	-1	72 $\mu$ g/ml (0,4 $\mu$ g/ml), zusätzlich 2 % hitzeinaktiviertes Ziegenserum, 2 h, RT	R&D Systems, Minneapolis
Anti-Mensch TGF $\beta$ , biotinyliert	Huhn-IgY	-1	50 $\mu$ g/ml (0,1 $\mu$ g/ml) 2 h, RT	R&D Systems, Minneapolis

Alle Detektionsantikörper wurden in 1 x PBS/1 % BSA (w/v) verdünnt.

1: Vom Hersteller nicht angegeben.

### 2.1.9.6 Antikörper für Restimulations- bzw. Suppressionsexperimente

**Tab. 14:** Antikörper, die in Restimulations- bzw. Suppressionsexperimenten eingesetzt wurden

Antikörper	Konzentration bzw. eingesetzte Gesamtmenge	Hersteller
Anti-CD3	5 $\mu$ g	BioLegend, San Diego
Anti-CD28	5 $\mu$ g	BioLegend, San Diego
Anti-CTLA-4	5 $\mu$ g/ml	BioLegend, San Diego
Anti-IL-10	5 $\mu$ g/ml	BioLegend, San Diego



### 2.1.10 Zytokine und andere Substanzen

**Tab. 15:** Zytokine, die im ELISA zur Konzentrationsbestimmung als Standard mitgeführt wurden

Zytokin	Konzentration (Einsatzkonzentration)	Hersteller
rm IFN- $\gamma$	2 $\mu\text{g/ml}$ (5 ng/ml)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
rm IL-5	10 $\mu\text{g/ml}$ (2 ng/ml)	NatuTec, Frankfurt
rm IL-10	5 $\mu\text{g/ml}$ (20 ng/ml)	NatuTec, Frankfurt
rm IL-17	10 $\mu\text{g/ml}$ (2 ng/ml)	R&D Systems, Minneapolis
rm IL-21	110 ng/ml (4 ng/ml)	R&D Systems, Minneapolis
rh TGF- $\beta$ 1	2 $\mu\text{g/ml}$ (10 ng/ml)	Tebu-bio, Offenbach

rm: rekombinant murin; rh: rekombinant human

**Tab. 16:** Zytokine, die in Restimulations- bzw. Suppressionsexperimenten und in T-Zell-Kulturen eingesetzt wurden

Zytokin	Konzentration	Hersteller
IFN- $\gamma$	20 ng/ml	ImmunoTools, Friesoythe
IL-1 $\beta$	20 ng/ml	ImmunoTools, Friesoythe
IL-2	0,5 U/ml	ImmunoTools, Friesoythe
IL-4	20 ng/ml	ImmunoTools, Friesoythe
IL-6	20 ng/ml	ImmunoTools, Friesoythe
IL-15	20 ng/ml	ImmunoTools, Friesoythe
TNF- $\alpha$	20 ng/ml	ImmunoTools, Friesoythe

**Tab. 17:** Weitere im Rahmen der Arbeit verwendete Substanzen

ConA	Concanavalin A, Sigma-Aldrich, Steinheim
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Steinheim
GM-CSF	(Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor) für die BM-DC-Kultur. Verwendet in Form von Kulturüberstand der GM-CSF-produzierenden Zelllinie X63-GM-CSF <sup>420</sup> . Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. B. Stockinger (National Institute for Medical Research, London) zur Verfügung gestellt.
MOG <sub>35-55</sub> Peptid	Myelin-Oligodendrozyten-Glycoprotein (MOG), Neosystems, Straßburg

### 2.1.11 Immunmagnetische Partikel zur Zellseparation

**Tab 18:** Immunmagnetische Partikel, die zur Separation von Zellen verwendet wurden

Immunmagnetische Partikel	Hersteller
Dynabeads <sup>®</sup> M-450 Schaf-anti-Ratte-IgG	Dyna <sup>®</sup> , Biotech, Hamburg
Anti-Maus CD4 Partikel-DM	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
Anti-Maus CD8a Partikel-DM	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg

### 2.1.12 Fertigsysteme

**Tab. 19:** In der Arbeit verwendete Fertigsysteme

System	Hersteller
CloneJET <sup>™</sup> PCR Cloning Kit	MBI Ferments, St. Leon-Rot
GeneJET <sup>™</sup> Plasmid Miniprep Kit	MBI Ferments, St. Leon-Rot
iScript <sup>™</sup> cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad, München
Lenti-X <sup>™</sup> qRT-PCR Titration Kit	ClonTech, Mountain View
NucleoSpin <sup>®</sup> RNAI Total RNA Isolation Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin <sup>®</sup> RNA Virus Kit	Macherey-Nagel, Düren
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Mega Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit in Kombiantion mit QIAshredder	Qiagen, Hilden

### 2.1.13 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit entsalztem Wasser aus der hauseigenen Entsalzungsanlage (Millipore, Molsheim, Frankreich) angesetzt und, soweit nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

#### Allgemeine Puffer und Lösungen

50 x TAE-Puffer	2 M Tris, 1 M Eisessig, 0,5 mM Na <sub>2</sub> EDTA; pH 8,5
1 x TBE-Puffer	89,15 mM Tris; 89 mM Natriumborat; 1,25 mM Na <sub>2</sub> EDTA; pH 8,3
1 x TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM Na <sub>2</sub> EDTA
1 x PBS	0,14 M NaCl; 0,01M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,4

### DNA-Analyse

Bromphenolblau 4 M Harnstoff, 50% (v/v) Saccharose; 0,1 M Na<sub>2</sub>EDTA; 0,1%  
Bromphenolblau

### FACS

FACS-Medium 2% (v/v) FCS (PAN), sterilfiltriert in 1 x PBS; 4 °C  
Fixierlösung 0,7% (w/v) Paraformaldehyd in 1 x PBS

### Plasmidisolierung

Puffer 1 50 mM Tris/HCl; 10 mM Na<sub>2</sub>EDTA; pH 8,0; 100µg/ml RNase; 4 °C  
Puffer 2 0,2 M NaOH; 1% (v/v) SDS  
Puffer 3 3 M Kaliumacetat  
QC 1 M NaCl; 50 mM MOPS; pH 7,0; 15% (v/v) Isopropanol  
QBT 0,75 M NaCl; 50 mM MOPS; pH 7,0; 15% (v/v) Isopropanol; 0,15%  
(v/v) Triton X-100  
QF 1,25 M NaCl; pH 8,5; 15% (v/v) Isopropanol

### Transfektion von HEK 293T

Chloroquinphosphat 100 mM in 1 x PBS, sterilfiltriert, 4 °C  
Kalziumchlorid 2,5 M in H<sub>2</sub>O, sterilfiltriert, 4 °C  
2 x HBS 281 mM NaCl; 100 mM HEPES; 1,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,12;  
sterilfiltriert, -20 °C

### Transduktion von BM-DC

Polybren 8 µg/µl, sterilfiltriert, 4 °C  
Protaminsulfat 4 µg/µl, sterilfiltriert, 4 °C

### Kontaktallergie

DNBS DNBS wurde 0,2 oder 0,4 %ig in einem Gemisch aus 4 Teilen  
Aceton und 1 Teil Olivenöl gelöst  
DNFB 5 µM in 1 x PBS, sterilfiltriert

### Zellzahlbestimmung

Trypanblau 0,01% (w/v) Trypanblau; 0,001% (w/v) Na-Azid in 1 x PBS

### Erythrozyten-Lyse

Gey's Lyse Puffer 10 mM KHCO<sub>3</sub>; 155 mM Ammoniumchlorid; 100 µM EDTA; pH 7,5;  
sterilfiltriert; 4 °C

### ELISA

Blockierungspuffer	1 % BSA (w/v) in 1 x PBS, 4 °C (bei IL-17 zusätzlich 5 % (w/v) Saccharose)
Beschichtungspuffer	0,1 M NaHCO <sub>3</sub> in H <sub>2</sub> O; pH 8,2
OPD-Substratpuffer	0,2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O; 0,1 M Na-Citrat x H <sub>2</sub> O; 1 mg/ml OPD; 1 µl/ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Stopplösung	1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Waschpuffer	0,1% (v/v) Tween 20 in 1 x PBS

### 2.1.14 Medien

#### Medien für *Escherichia coli*

##### Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)

1% (w/v)	Trypton
0,5% (w/v)	Hefe-Extrakt
1% (w/v)	NaCl, pH 7,5
	Bacto-Agar bei Festmedien
1,5% (w/v)	<u>für Selektivmedien:</u> Ampicillin (100 µg/ml), Kanamycin (50 mg/ml)

#### Medien für Zellkultur

##### Mediumzusätze in der Zellkultur

β –Mercaptoethanol	40 µl β–Mercaptoethanol in 114 ml IMDM; sterilfiltriert, 4 °C
Glutamin	200 mM L(+)-Glutamin in 1 x PBS; sterilfiltriert, 4 °C
Pen/Strep	10 <sup>4</sup> I.U.(international unit)/ml Penicillin; 10 mg/ml Streptomycin; 4 °C

##### Kulturmedium für HEK 293T

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

10% (v/v)	FCS (PAA Laboratories)
2 mM	L-Glutamin
50 µM	β-Mercaptoethanol
100 U/ml	Penicillin
100 µg/ml	Streptomycin

##### Waschmedium (allgemein in der Zellkultur verwendet)

EMEM (Eagle's Minimum Essentiell Medium, Bio Whittaker/Cambrex), versetzt mit

2% (v/v)	FCS (PAN-Biotech)
100 U/ml	Penicillin
100 µg/ml	Streptomycin

### Kulturbedium für BM-DCs

IMDM (Iscoe's Modified Dulbecco's Media, Gibco/Invitrogen), versetzt mit

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

2 mM L-Glutamin

50 µM β-Mercaptoethanol

100 U/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

5% (v/v) GM-CSF

Medium für mature BM-DCs: LPS (1 µg/ml) zusätzlich

### Waschmedium (allgemein in der Zellkultur verwendet)

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

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

100 U/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

### Kulturbedium für T-Zellen

IMDM (Iscoe's Modified Dulbecco's Media, Gibco/Invitrogen), versetzt mit

5% (v/v) FCS (PAN-Biotech)

2 mM L-Glutamin

50 µM β-Mercaptoethanol

100 U/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

### 2.1.15 Bakterienstamm

Stamm	Genotyp
<i>Escherichia coli</i> TOP10	F' { <i>proAB</i> , <i>lacI<sup>q</sup></i> , <i>lacZDM15</i> , Tn10 (Tet <sup>R</sup> )} <i>mcrA</i> , D( <i>mmr-hsdRMS-mcrBC</i> ), <i>φ80lacZDM15</i> , D <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , D( <i>ara-leu</i> )7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rspL</i> (Str <sup>R</sup> ), <i>endA1</i> , <i>nupGI</i> -

### 2.1.16 Zelllinie

HEK 293T: Diese Zelllinie ist von humanen fetalen Nierenzellen abgeleitet <sup>421</sup>, die mit gescherter Typ 5-Adenovirus-DNA transformiert wurden. Zusätzlich wurden die Zellen mit dem großen T-Antigen aus SV40 stabil transfiziert, so dass Plasmide mit dem SV40-Replikationsursprung nach der Transfektion in diesen Zellen amplifizieren <sup>422</sup>.

### 2.1.17 Versuchstiere

Alle Experimente wurden mit Inzuchtmäusen der Stämme BALB/cJ (Genotyp H-2<sup>d</sup>) und C57BL/6 (Genotyp H-2<sup>b</sup>) im Alter zwischen zwei bis vier Monaten durchgeführt. Für syngene Kokulturen wurden 2D2 T-Zell-Rezeptor transgene Mäuse verwendet, welche freundlicherweise von Herrn Dr. V. Kuchroo (Center for Neurologic Diseases, Brigham and Women's Hospital, Boston) zur Verfügung gestellt wurden. Dieser Rezeptor erkennt spezifisch das MOG-Peptid MOG<sub>35-55</sub><sup>423</sup>. Die Mäuse wurden in der zentralen Versuchstiereinrichtung der Universität Mainz gezüchtet und unter pathogenfreien Bedingungen gehalten.

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

Sämtliche bakteriologischen Arbeiten wurden mit sterilisierten Arbeitsgeräten, sterilen Verbrauchsmaterialien sowie autoklavierten oder sterilfiltrierten Lösungen durchgeführt

### 2.2.1 Anzucht von *Escherichia coli*

Die Anzucht von *E. coli* Zellen erfolgte unter aeroben Bedingungen über Nacht in LB-Flüssigmedium bei 220 upm und einer Temperatur von 37 °C.

Zur Selektion von Transformanten wurde dem Medium entweder Ampicillin mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml oder Kanamycin mit einer Endkonzentration von 50 mg/ml hinzugefügt.

*E. coli* wurden auf LB-Agarplatten (mit oder ohne Zusatz von Antibiotika) angezüchtet, um Kolonien, die jeweils auf einen einzelnen Klon zurückgehen, zu isolieren. Hierzu wurden 100 µl Bakteriensuspension auf der Agaroberfläche mit Hilfe eines Trizalcki-Spatels gleichmäßig ausgestrichen. Die beimpften Platten wurden mit der Schalenunterseite nach oben über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Aufbewahrung wurden die Platten bei 4 °C gelagert.

### 2.2.2 Herstellung elektrokompetenter *E.coli* TOP10 Zellen

Für die Generierung elektrokompetenter Bakterien wurden zunächst *E.coli* TOP10 Zellen auf LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zum Animpfen der Flüssigkultur wurden aus Einzelkolonien Vorkulturen von 50 ml angeimpft und über Nacht bei 220 upm und 37 °C inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde am nächsten Tag 1 L LB-Medium angeimpft und bei 37 °C und 220 upm inkubiert.

Die Zellen wurden bei Erreichen der mittleren logarithmischen Wachstumsphase ( $OD_{600}$  von 0,4-0,6) in zwei eisgekühlte Zentrifugenbecher überführt, 30 min auf Eis inkubiert und anschließend abzentrifugiert (15 min, 2000 x g, 4 °C). Die Zellsedimente wurden zweimal mit 500 ml eisgekühltem Wasser gewaschen und abzentrifugiert (15 min, 2000 x g, 4 °C). Abschließend wurden die Zellsedimente in 4 ml eisgekühlter 10 %iger (v/v) Glycerollösung resuspendiert und auf Eis aliquotiert. Die Aliquote wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

### 2.2.3 Transformation elektrokompetenter Bakterienzellen

Als Transformation wird das Einschleusen replikationsfähiger zirkulärer DNA in einen Wirtsorganismus bezeichnet. In der Regel besteht die Fremd-DNA aus einem Klonierungs- oder Expressionsvektor, der ein Integrat tragen kann. Diese Fremd-DNA wird dann unter Nutzung der DNA-Synthesemaschine des Wirts amplifiziert.

Bei der hier verwendeten Elektroporation wird für 4 bis 5 Millisekunden ein elektrisches Feld aufgebaut, wodurch kurzzeitig Löcher in der Zellmembran entstehen und Fremd-DNA in die Bakterienzelle eindringen kann.

Die bei -80 °C konservierten elektrokompetenten *E. coli* TOP10 Zellen (40 µl) wurden auf Eis aufgetaut, mit 100 ng Plasmidpräparation bzw. 5 µl oder 10 µl eines gefällten Ligationsansatzes (vgl. 2.2.11) versetzt und für 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine eisgekühlte 0,1 cm Elektroporationsküvette überführt und bei 2,1 kV, 125 µF und 200 Ω transformiert. Danach wurden die Zellen sofort in ein 15 ml Plastikröhrchen überführt und mit 600 µl LB-Medium versetzt. Zur Regeneration der Zellen und der Induktion der Expression der plasmidkodierten Antibiotikum-Resistenz wurden die Zellen bei 37 °C und 220 upm inkubiert. Nach einer Stunde wurden die Zellen sedimentiert, in 100 µl LB-Medium resuspendiert, auf Selektivmedium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### 2.2.4 Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen

#### 2.2.4.1 Plasmid-Isolierung im Kleinmaßstab

Diese modifizierte Form der Plasmid-Isolierung nach Beuken und Mitarbeitern<sup>424</sup> ermöglicht auf effiziente Weise eine schnelle Kontrolle einer großen Anzahl von Transformanten nach einer Klonierung. Durch gelelektrophoretische Auftrennung können derart isolierte Plasmide an Hand ihrer Laufweiten voneinander unterschieden werden und Klone mit potentiell positivem Integrat für nachfolgende Analysen ausgewählt werden.

250 µl einer Flüssigkultur wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und sedimentiert (5 min, 10000 x g). Das Zellsediment wurde mit 30 µl Bromphenolblau und 15 µl Phenol-Chlorophorm-Isoamylalkohol durch Vortexen gemischt und zur vollständigen Zelllyse für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch zur Phasentrennung für 5 min bei 10000 x g zentrifugiert. 15 µl der Nukleinsäure-haltigen blauen Phase wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt.



### 2.2.4.2 Isopropanol-Minipräparation von Plasmid-DNA

Durch diese Methode ist eine vergleichsweise saubere Isolierung von Plasmid-DNA im Kleinmaßstab ohne Verwendung eines kommerziellen Fertigsystems möglich.

2 ml einer Flüssigkultur wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und sedimentiert (5 min, 10000 x g). Das Zellsediment wurde in 250 µl Puffer P1 resuspendiert. Durch Zugabe von 250 µl Puffer P2 und mehrmaliges Invertieren des Reaktionsgefäßes erfolgte die alkalische Lyse der Zellen. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde der Lyseprozess durch Zugabe von 350 µl des Neutralisierungspuffers P3 und gutes Schütteln des Reaktionsgefäßes beendet. Die entstandenen Zellfragmente wurden für 10 min bei 10000 x g abzentrifugiert. Der plasmidhaltige Überstand wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml Isopropanol gemischt. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte für 30 min bei -20 °C. Anschließend wurde die Plasmid-DNA durch 30 min Zentrifugation bei 10000 x g ausgefällt und mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Das erhaltene DNA-Sediment wurde für ca. 5 min bei RT getrocknet. Zuletzt wurde die ausgefällte DNA in 20 µl doppelt deionisiertem H<sub>2</sub>O gelöst und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 2.2.4.3 Plasmid-Isolierung in präparativen Mengen

Die Isolierung von DNA in präparativen Mengen erfolgte mit Hilfe verschiedener Fertigsysteme (QIAGEN Plasmid Mini Kit, QIAGEN Plasmid Midi Kit, QIAGEN Plasmid Maxi Kit, QIAGEN Plasmid Mega Kit) der Firma Qiagen. Soweit nicht anders angegeben, erfolgte die Durchführung in allen Fällen nach Angaben des Herstellers.

Je nach benötigter Menge an Plasmid-DNA erfolgte die Isolierung aus 5 ml, 250 ml, 500 ml oder 1 L Flüssigkulturen. Die isolierte DNA wurde in allen Fällen in doppelt deionisiertem H<sub>2</sub>O gelöst.

### 2.2.5 Bestimmung von DNA-Konzentrationen

Die Bestimmung der DNA-Konzentration einer Lösung erfolgte photometrisch durch Messen der Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm, da sich hier das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren befindet. Hierzu wurde 1 µl einer Lösung 1:100 in 100 µl Endvolumen mit doppelt deionisiertem H<sub>2</sub>O verdünnt.

Die Konzentration (c) doppelsträngiger DNA in µg/ml ergibt sich nach dem Lambert Beer'schen Gesetz aus dem Produkt der Extinktion der Lösung bei 260 nm ( $E_{260}$ ) und dem

Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$ , wobei eine Extinktion von 1 bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von ca. 50  $\mu\text{g/ml}$  entspricht.

$$c[\text{DNA}] = E_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \epsilon$$

Damit auch die Reinheit der Präparationen beurteilt werden konnte, wurde zusätzlich die Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm ( $E_{280}$ ), bei der sich das Absorptionsmaximum von Proteinen befindet, bestimmt. Der Quotient der Extinktionen  $E_{260}/E_{280}$  gibt das Verhältnis von Nucleinsäuren zu Proteinen in einer Lösung an. Ein Verhältnis von 1,8 - 2,0 zeigt eine reine Nucleinsäurelösung an.

### 2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese ist es möglich, DNA-Fragmente nach ihrer molekularen Größe im elektrischen Feld aufzutrennen. Die polyanionische DNA bewegt sich in einem Spannungsfeld durch die Agarosematrix von der Kathode zur Anode. Dabei wandern kleine Fragmente schneller zur Anode als größere, wodurch sie voneinander separiert werden.

Die Auftrennung erfolgte in 1 %igen (w/v) Agarosegelen. Hierzu wurde die abgewogene Agarose mit der entsprechenden Menge TAE-Puffer aufgekocht. Zur Visualisierung wurde den Gelen vor dem Aushärten Ethidiumbromid zugefügt, welches in die DNA interkaliert. Ethidiumbromid wird durch UV-Licht einer Wellenlänge von 254 bis 366 nm angeregt und emittiert dann Licht im orange-roten Bereich (590 nm). Als Gel- sowie als Laufpuffer wurde 1 x TAE-Puffer verwendet. Die angelegte Spannung betrug zwischen 90 und 250 Volt.

### 2.2.7 DNA-Elution aus Agarosegelen

Die Rückgewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte, soweit nicht anders angegeben, mit dem QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers. Die gereinigte DNA wurde mit doppelt deionisiertem  $\text{H}_2\text{O}$  eluiert.

### 2.2.8 Hydrolyse von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen

Doppelsträngige DNA kann sequenzspezifisch von bakteriellen Endonukleasen (Restriktionsenzymen) durch hydrolytische Spaltung der Phosphodiesterbindungen geschnitten werden. Die hydrolytische Spaltung von DNA wurde im Wesentlichen zur

Vorbereitung von Vektoren für eine nachfolgende Ligation eingesetzt. Durch den Einsatz ausgewählter Restriktionsenzyme wurden spezifische DNA-Enden generiert, die zueinander komplementär waren und eine gerichtete Ligation eines DNA-Fragments in einen Vektor ermöglichten.

Des Weiteren diente die Methode zur Charakterisierung von Transformanten. Hierzu wurde deren Plasmid-DNA isoliert, mit den entsprechenden Restriktionsenzymen hydrolytisch gespalten und anschließend elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt. Das sich dabei ergebende Fragmentmuster konnte dann zur Beurteilung der Transformanten herangezogen werden.

Restriktionsanalysen erfolgten zumeist in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Je nach DNA-Konzentration wurden 500 ng bis 1 µg DNA mit 10 U der jeweiligen Restriktionsenzyme unter den vom Hersteller angegebenen Pufferbedingungen für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Bei präparativen Ansätzen für eine nachfolgende Ligation wurden zumeist 25 µg DNA in einem Gesamtvolumen von 50 µl restringiert. Die Inkubation der Ansätze erfolgte über Nacht bei 37 °C.

### 2.2.9 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Während einer Ligation besteht nicht nur die Möglichkeit, dass der eingesetzte Vektor mit dem DNA-Fragment kovalent verbunden wird, sondern auch, dass dieser religiert. Dies geschieht in Fällen von linearisierten Vektoren mit kompatiblen Enden.

Um die Religation von linearisierten Vektoren zu unterbinden, wurden diese vor Verwendung in einem Ligationsansatz mit Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Dieses Enzym hydrolysiert 5'-endständige Phosphatgruppen freier DNA-Enden, wodurch eine Religation nicht mehr möglich ist.

### 2.2.10 Auffüllen von freien DNA-Enden

Das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I verfügt über eine 5'-3'-Polymerase- sowie eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität. Durch diese Kombination ist es in der Lage, überstehende 3'-Enden eines DNA-Fragments zu entfernen und überstehende 5'-Enden aufzufüllen.

Hier wurden die Eigenschaften des Enzym genutzt, um nach einer Restriktion die überstehenden Enden (*sticky ends*) eines Fragments zu glatten Enden (*blunt ends*) aufzufüllen. Solchermaßen behandelte Fragmente wurden im Folgenden für *blunt-end-*

Ligationen verwendet. Das Auffüllen freier DNA-Enden mit dem Klenow Fragment erfolgte stets nach Angaben des Herstellers.

### 2.2.11 Ligation

Mit Hilfe der Ligrationsreaktion wurden DNA-Fragmente, die durch hydrolytische Spaltung mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen komplementäre überhängende oder glatte Enden aufwiesen, kovalent miteinander verknüpft. Die Verknüpfung dieser Enden durch Bildung neuer Phosphodiesterbindungen zwischen der 3'-Hydroxylgruppe des einen Endes und der 5'-Phosphatgruppe des anderen Endes wird durch das ATP-abhängige Enzym T4-Ligase katalysiert <sup>425</sup>.

Für die Ligation wurden linearisierter Vektor und zu integrierendes DNA-Fragment in einem molaren Verhältnis von 1:3 bis 1:10 eingesetzt. Bei Ligrationsreaktionen wurden 200 ng linearisierte Vektor-DNA, die entsprechende Menge zu integrierendes DNA-Fragment, 10 % (v/v) T4-Ligase-Puffer (10 x konzentriert; enthielt 10 mM ATP als Ligase-Kofaktor) und 100-300 Weiß-Einheiten T4-DNA-Ligase vereinigt und mit doppelt deionisiertem H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 50 µl eingestellt. Die Ligrationsansätze wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert.

### 2.2.12 Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction, PCR*)

Durch die Polymerase-Kettenreaktion ist die exponentielle *in vitro* Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente möglich <sup>426</sup>. Hierzu wird zunächst die doppelsträngige DNA-Matrize bei 95-98 °C hitzedenaturiert. In der *Annealing*-Phase, nach Erniedrigung der Reaktionstemperatur auf 55-70 °C, bindet ein jeweils sequenzkomplementäres Oligonukleotid an jeden Einzelstrang. Von dem freien 3'-Hydroxyl-Ende des Primers aus findet die Neusynthese der DNA mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase statt. Das Temperaturoptimum der DNA-Polymerase liegt bei 72 °C. Als Ergebnis des ersten PCR-Zyklus werden somit beide Einzelstränge der DNA-Matrize ab der Primer-Bindungsstelle jeweils zu Doppelsträngen aufgefüllt. Im zweiten PCR-Zyklus fungieren die zuvor neu synthetisierten Einzelstränge ebenfalls als DNA-Matrizen, wodurch die Anzahl der DNA-Fragmente mit jedem PCR-Zyklus exponentiell erhöht wird.

Die PCR-Reaktionen wurden jeweils in einem Volumen von 100 µl nach Angaben des Herstellers mit der GoTaq DNA-Polymerase von der Firma Promega, Heidelberg, durchgeführt.

## 2 Material und Methoden

---

Um die Spezifität der Polymerase-Kettenreaktion zu erhöhen, wurde in allen Fällen eine so genannte *Touch-Down-Reaktion* durchgeführt. Grundlage ist hierbei die höhere Primerspezifität bei höherer Temperatur. Auf diese Weise kann zu Beginn der Reaktion, wenn lediglich eine geringe Menge Matrizen-DNA vorhanden ist, eine Fehlbindung der Primer vermindert werden. Steigt die Menge der Matrizen-DNA im Verlauf der PCR an, kann durch ein Senken der *Annealing*-Temperatur die Primerbindung erleichtert werden.

### Zusammensetzung der PCR-Reaktionsansätze

Reagenz	Volumen
DNA-Matrize (500 ng – 1µg)	1 µl
dNTP-Mix (je 10 mM)	1 µl
5 x Reaktionspuffer (enthält MgCl <sub>2</sub> )	20 µl
Primer <i>sense</i> (10 pmol/µl)	5 µl
Primer <i>antisense</i> (10 pmol/µl)	5 µl
DNA-Polymerase	1 µl
doppelt deionisiertes H <sub>2</sub> O	ad 100 µl

### PCR-Zyklus-Parameter

Amplifikation von PirB und STAT3

Temperatur	Zahl der Zyklen	Dauer
95 °C	1	1 min
70 °C		1 min
72 °C		2 min
95 °C	1	1 min
69 °C		1 min
72 °C		2 min
95 °C	1	1 min
68 °C		1 min
72 °C		2 min
95 °C	1	1 min
67 °C		1 min
72 °C		2 min
95 °C	36	1 min
66 °C		1 min
72 °C		2 min
95 °C	1	1 min
66 °C		1 min
72 °C		7 min

Amplifikation aller anderen Gensequenzen

Temperatur	Zahl der Zyklen	Dauer
94 °C	1	1 min
60 °C		1 min
72 °C		1:30 min
94 °C	1	1 min
59 °C		1 min
72 °C		1:30 min
94 °C	1	1 min
58 °C		1 min
72 °C		1:30 min
94 °C	33	1 min
57 °C		1 min
72 °C		1:30 min
94 °C	1	1 min
57 °C		1 min
72 °C		7 min

### 2.2.13 DNA-Sequenzanalyse

Die Bestimmung der DNA-Sequenz erfolgte nach der Kettenabbruch- bzw. Didesoxy-Methode <sup>427</sup>, bei der durch den Einbau von fluoreszenzmarkierten 2', 3' Didesoxynucleosid-triphosphaten unterschiedlich lange DNA-Fragmente erzeugt werden.

Bei dieser Methode wird die DNA-Polymerisierungsreaktion repetitiv mit nur einem Primer durchgeführt, wodurch nur der Gegenstrang der Matrize (linear) amplifiziert wird. Da den Didesoxynucleosid-triphosphaten in der 3'-Position die Hydroxylgruppe für die Verknüpfung mit der nächsten Base fehlt, terminiert die DNA-Synthese bei deren Einbau (Kettenabbruch). Die Sequenzierungsreaktionen wurden jeweils in einem Volumen von 20 µl mit dem Big Dye Terminator Kit Version 1.1 Cycle von der Firma Applied Biosystems (Darmstadt) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### Zusammensetzung der PCR-Sequenzierungsreaktion

Reagenz	Volumen
DNA-Matrize (200 ng)	1 µl
Primer (10 pmol/µl)	1 µl
Big Dye Mix (enthält <i>Taq</i> -DNA-Polymerase, dNTPs, fluoro-ddNTPs)	6 µl
Sequenzierungspuffer	5 µl
steriles, doppelt deionisiertes H <sub>2</sub> O	7 µl
	<hr/> Σ: 20 µl

### Sequenzier-PCR-Zyklus-Parameter

Temperatur	Zahl der Zyklen	Dauer
94 °C	1	2 min
94 °C 57 °C 72 °C	1	45 sek 45 sek 45 sek
94 °C 56 °C 72 °C	1	45 sek 45 sek 45 sek
94 °C 55 °C 72 °C	30	45 sek 45 sek 45 sek
94 °C 55 °C 72 °C	1	45 sek 45 sek 7 min

Die Produkte der Sequenzierungs-PCR wurden bei 10000 x g mit Isopropanol ausgefällt und mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das DNA-Sediment bei RT getrocknet. Zuletzt wurde die ausgefällte DNA in 25 µl Template Suppression Reagenz (TSR) gelöst und bis zur Sequenzierung bei -20 °C gelagert.

Die aufbereiteten Sequenzierprodukte wurden vom Sequenzierservice des Instituts für Rechtsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz aufgearbeitet. Das erhaltene Sequenzchromatogramm wurde manuell editiert und die Basensequenz EDV-gestützt ausgewertet.

#### **2.2.14 Präparation von Gesamt-mRNA**

Der Aufschluss der Zellen erfolgte mittels QIAshredder-Säulchen. Die Präparation von zellulärer Gesamt-mRNA erfolgte, soweit nicht anders angegeben, mit dem RNeasy Mini Kit von der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers. Die isolierte RNA wurde in allen Fällen mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O eluiert.

#### **2.2.15 Präparation von viraler RNA**

Die Isolierung viraler RNA aus virushaltigem Überstand von HEK 293T-Zellen erfolgte, soweit nicht anders angegeben, mit dem NucleoSpin<sup>®</sup> RNA Virus Kit von der Firma Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellers. Die isolierte RNA wurde in allen Fällen mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O eluiert.

### 2.2.16 Reverse Transkription

Im Rahmen der reversen Transkription von RNA erfolgt die Synthese sequenzkomplementärer DNA (cDNA) mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase. Als Matrize hierfür dient isolierte Gesamt-mRNA<sup>428</sup>.

Die reverse Transkription erfolgte mit dem iScript™ cDNA Synthesis Kit der Firma Bio-Rad nach Angaben des Herstellers. Grundlage des Fertigsystems sind zwei verschiedene Arten von Primern; Oligo(dT)-Primer, die an den Poly(A)-Schwanz der mRNA hybridisieren und Random Hexamer-Primer, die statistisch verteilt an eine RNA-Sequenz binden.

#### Zusammensetzung der cDNA-Synthesereaktion

Reagenz	Volumen
RNA-Matrize	10 µl
5 x iScript Reaktions-Mix (enthält Primer und Reaktionspuffer)	4 µl
Reverse Transkriptase	1 µl
Nuclease-freies H <sub>2</sub> O	5 µl
	<hr/> Σ: 20 µl

#### cDNA-Synthese-Zyklus-Parameter

Temperatur	Zahl der Zyklen	Dauer
25 °C	1	5 min
42 °C	1	60 min
85 °C	1	5 min

Nach Abschluss der Synthese wurde der cDNA-Gehalt photometrisch bestimmt und die Probe bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 2.2.17 Quantitative PCR (*Real-time-PCR*)

Mit Hilfe der *Real-time-PCR* ist eine präzise und sensitive Analyse der Expression interessierender Gene möglich. Grundlage der Methode ist eine kontinuierliche Messung der entstehenden PCR-Produkte<sup>429,430</sup>.

In dieser Arbeit erfolgte die Quantifizierung der DNA-Menge über Fluoreszenz-Messungen. Hierzu wurde der DNA-Farbstoff SYBR-Green verwendet, welcher in die neu synthetisierten



PCR-Produkte interkaliert. Die Fluoreszenzintensität korreliert dabei mit der Menge doppelsträngiger DNA – je größer die neu synthetisierte DNA-Menge, desto stärker ist die Fluoreszenz.

### Zusammensetzung der *Real-time-PCR* Reaktion

Reagenz	Volumen
cDNA (200 ng)	1 $\mu$ l
SYBR Green 490 Lösung (enthält Reaktionspuffer, dNTPs, <i>Taq</i> -Polymerase, Fluoreszenzfarbstoffe)	12,5 $\mu$ l
Primer-Mix ( <i>sense</i> + <i>antisense</i> , je 1 pmol/ $\mu$ l)	1,75 $\mu$ l
steriles, doppelt deionisiertes H <sub>2</sub> O	9,75 $\mu$ l
	$\Sigma$ : 25 $\mu$ l

Die SYBR-Green 490 Lösung enthält weiterhin den Fluoreszenzfarbstoff ROX, der als Beladungskontrolle dient.

### *Real-time-PCR*-Zyklus-Parameter

Temperatur	Zahl der Zyklen	Dauer
95 °C	1	15 min
95 °C 60 °C	50	15 sek 1 min
95 °C 60 °C 95 °C	1	30 sek 30 sek 15 sek

Die Auswertung der quantitativen PCR erfolgte mit der 7300 System Software Version 1.4.0, die vom Hersteller des verwendeten Thermocyclers (7300 Real-Time PCR System, Applied Biosystems) gestellt wurde.

### **2.2.18 Bestimmung lentiviraler RNA-Titer**

Die Bestimmung des Virustiters im Kulturüberstand transfizierter HEK 293T-Zellen erfolgte, soweit nicht anders angegeben, mit dem Lenti-X™ qRT-PCR Titration Kit von der Firma ClonTech nach Angaben des Herstellers. Bei diesem Verfahren wird statt der Menge infektiöser Partikel der Gesamt-Titer lentiviraler RNA bestimmt.

## 2.3 Zellbiologische Methoden

Sämtliche zellbiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer sterilen Werkbank mit sterilisierten Arbeitsgeräten, sterilen Verbrauchsmaterialien sowie autoklavierten oder sterilfiltrierten Lösungen durchgeführt.

### 2.3.1 Bestimmung der Zellzahl

Die Anzahl lebender Zellen in einer Zellsuspension wurde durch Verdünnung eines Aliquots mit Trypanblau ermittelt. Dieser Farbstoff kann selektiv durch die permeabilisierte Membran toter Zellen eindringen und deren Zytoplasma, bzw. die geladenen zytosolischen Proteine blau anfärben. Tote Zellen wurden bei der Bestimmung der Zellzahl nicht berücksichtigt. Die Verdünnung der Zellsuspension betrug in den meisten Fällen 1:10 oder 1:20. Für die Bestimmung der Zellzahl wurde jeweils 1 Großquadrat (enthält 16 Kleinquadrate) des Hämozytometers ausgezählt.

Die Berechnung der Zellzahl erfolgte mit folgender Formel:  $\text{Zellzahl/ml} = \text{Ermittelte Zellzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerfaktor} (10^4)$ .

### 2.3.2 Arbeiten mit HEK 293T-Zellen

Die von humanen fetalen Nierenzellen abgeleitete adhärente Nierenkarzinom-Zelllinie HEK (*human embryonic kidney*) 293T wurde in dieser Arbeit ausschließlich für die Produktion lentiviraler Partikel verwendet.

#### 2.3.2.1 Kryokonservierung von HEK 293T-Zellen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden große Mengen an HEK 293T-Zellen für die Produktion lentiviraler Viruspartikel benötigt. Die Langzeitlagerung dieser Zellen erfolgte in kleinen Aliquoten in flüssigem Stickstoff.

Alle Arbeitsschritte zur Vorbereitung der Zellen für eine langfristige Lagerung erfolgten auf Eis und mit 4 °C gekühltem Medium. Zunächst wurden die Zellen aus den Kulturflaschen geerntet, sedimentiert (10 min, 300 x g, 4 °C), resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden die Zellen mit einer Konzentration von  $10^6$  Zellen pro 1 ml mit Einfriermedium (70 % DMEM, 20 % FCS, 10 % DMSO) eingestellt. DMSO verhindert die

Bildung von Eiskristallen während des Einfrierens. Nachdem je 1 ml der Zellsuspension in ein auf Eis vorgekühltes Einfrierröhrchen aliquotiert worden war, wurden diese sofort in eine mit Isopropanol befüllte, auf 4 °C vorgekühlte Einfrierdose gestellt. Die Einfrierdose wurde über Nacht bei -80 °C gelagert, wodurch ein langsames Einfrieren der eukaryotischen Zellen gewährleistet wurde. Die Einfrierröhrchen wurden am folgenden Tag in Behälter mit flüssigem Stickstoff überführt.

Das Auftauen solchermaßen kryokonservierter HEK 293T-Zellen erfolgte bei 37 °C im Wasserbad, bis nur noch ein kleiner Teil der Suspension gefroren war. Die Zellen wurden dann sofort in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt, in dem 20 ml eisgekühltes Waschmedium vorgelegt wurden. Nach der Überführung der Zellen in das Gefäß wurden weitere 10 ml des eisgekühlten Mediums zugefügt. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert (8 min, 300 x g, 4 °C) und zwei Mal mit 50 ml Waschmedium gewaschen. Die sedimentierten Zellen wurden in 10 ml HEK 293T-Kulturmedium resuspendiert und in eine 25 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche überführt. In den ersten acht Stunden nach dem Auftauen wurde das Kulturmedium alle zwei Stunden gewechselt, um tote Zellen aus der Kultur zu entfernen.

### **2.3.2.2 Kultivierung von HEK 293T-Zellen**

Die Kultivierung der adhärenenten HEK 293T-Zellen erfolgte in 175 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen mit 35 ml Kulturmedium bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und einer gesättigten Wasserdampf-atmosphäre. Die Zellen wurden alle 4 - 6 Tage 1:100 bis 1:200 verdünnt. Hierzu wurden die Zellen vorsichtig mit Hilfe einer 10 ml Plastikpipette vom Boden der Kulturflasche abgespült und im Medium resuspendiert. Ein Teil dieser Zellsuspension wurde dann in eine neue 175 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche mit 35 ml auf 37 °C vorgewärmten Kulturmedium überführt.

Für Transfektionsexperimente wurden die Zellen maximal bis zur 15. Passage verwendet.

### **2.3.2.1 Transiente Transfektion von HEK 293T-Zellen für die Produktion lentiviraler Partikel**

Im Rahmen der transienten Transfektion eukaryotischer Zellen werden DNA-Konstrukte oder mRNA in den Zellkern eingebracht. Die kodierten Gene werden mit Hilfe der zellulären Transkriptions- bzw. Translationsmaschinerie extrachromosomal exprimiert<sup>431</sup>. Infolge von Abbauprozessen werden die Nukleinsäuren degradiert und die Expression der Fremd-Gene bricht ab. Ein weiterer Effekt ist die Verdünnung der transgenen DNA durch Zellteilungen.

HEK 293T-Zellen lassen sich effektiv mit Calcium-Phosphat-Präzipitaten transient transfizieren<sup>432</sup>. Hierbei bindet die DNA in einem Gemisch aus Calciumchlorid und Natriumphosphat an ausgefallene Calciumphosphat-Kristalle, die von den adhärenen HEK 293T-Zellen durch Phagozytose aufgenommen werden<sup>433</sup>.

Vierundzwanzig Stunden vor der Transfektion wurden  $3,5 \times 10^6$  HEK 293T-Zellen in 10 cm Gewebe-Kulturschalen in einem Volumen von 10 ml Kulturmedium ausgesät. Am folgenden Tag wurde zwei Stunden vor der Transfektion der Kulturüberstand gegen 10 ml frisches Kulturmedium ausgetauscht.

Die Herstellung der Calcium-Phosphat-Präzipitate erfolgte in 12 ml Rundboden-Gefäßen. Die zur Virusproduktion notwendigen Plasmide (hier ein lentiviraler Expressionsvektor sowie zwei akzessorische Verpackungsplasmide) wurden in einem festen Mengenverhältnis kotransfiziert: 13,2 µg Expressionsvektor (in allen Fällen pCDH1-MCS1-basiert),

10 µg pCMVΔ8.91 (Verpackungsplasmid),

4 µg pMD.G (kodiert für Hüllproteine).

### Zusammensetzung HEK 293T-Transfektionsansatz

Reagenz	Volumen
Plasmid-DNA (Verhältnis wie oben angegeben)	x µl
2,5 M CaCl <sub>2</sub>	50 µl
H <sub>2</sub> O : 0,1 x TE (1:3)	ad 500 µl

Zu diesem Gemisch wurden unter kontinuierlichem Vortexen 500 µl 2 x HBS-Puffer mit einer Geschwindigkeit von ca. einem Tropfen pro Sekunde zugegeben. Die fertige Lösung wurde für 10 bis 20 min bei RT inkubiert.

In der Zwischenzeit wurden die HEK 293T-Zellen zur Erhöhung der Transfektionseffizienz mit Chloroquin (Endkonzentration 100 µM) behandelt. Anschließend wurden die Calcium-Phosphat-Präzipitate in das Medium der zwei Stunden zuvor frisch versorgten HEK 293T-Zellen gegeben und durch vorsichtiges Schwenken der Gewebe-Kulturschale gleichmäßig auf den adhärenen Zellen verteilt. Die Zellen wurden mit den Calcium-Phosphat-Präzipitaten über Nacht bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und einer gesättigten Wasserdampf-atmosphäre inkubiert.

Nach 14-16 Stunden wurde zur Entfernung der nicht von HEK 293T-Zellen phagozytierten zytotoxischen Calcium-Phosphat-Präzipitate das gesamte Medium aus den Gewebe-Kulturschalen entfernt. Für die Produktion viraler Partikel wurden die Zellen anschließend mit 5 ml frischem, auf 37 °C vorgewärmtem Kulturmedium versorgt. 24 und 48 Stunden nach dem Wechsel des Mediums wurde der virushaltige Überstand geerntet und möglicher

Zelldebris sedimentiert (10 min, 350 x g, RT). Die Überstände wurden vereinigt, in 15 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### **2.3.3 Arbeiten mit knochenmarksabgeleiteten dendritischen Zellen (*bone marrow-derived dendritic cells, BM-DCs*)**

#### **2.3.3.1 Isolierung von Knochenmarks-Vorläuferzellen aus Knochenmark**

Die Isolierung und Kultivierung knochenmarksabgeleiteter dendritischer Zellen wurde wie von Scheicher und Mitarbeitern<sup>434</sup> beschrieben und von Lutz und Mitarbeitern<sup>435</sup> modifiziert durchgeführt. Die Generierung der BM-DCs erfolgte aus isoliertem Knochenmark von C57BL/6-Mäusen. Hierzu wurden Femur und Tibia beider Hinterläufe der Mäuse steril präpariert und verbleibende Muskelreste mit einem in 70 %igen Ethanol getränkten Papiertuch abgerieben. Anschließend wurden zur Freilegung der Knochenkanäle an beiden Enden die Gelenkköpfe mit einer Schere entfernt. Das Knochenmark wurde mit Hilfe einer Spritze (Kanüldurchmesser 0,45 mm) ausgespült und in 20 ml kaltem Waschmedium resuspendiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde über ein Zellsieb (Ø 40 µm) in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und die Zellen sedimentiert (8 min, 300 x g, 4 °C). Die in der Zellsuspension enthaltenen Erythrozyten wurden durch Zugabe von Gey'schem Lyse-Puffer lysiert (1 ml pro Knochenmark einer Maus). Die Lyse erfolgte für eine Minute und wurde durch Zugabe von gekühltem Waschmedium gestoppt. Die isolierten Zellen wurden zwei weitere Male mit gekühltem Waschmedium gewaschen und anschließend in auf 37 °C vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert.

#### **2.3.3.2 Kultivierung von BM-DC Vorläuferzellen**

Die aus Knochenmark isolierten Vorläuferzellen wurden in einer Dichte von 2 oder 2,5 x 10<sup>6</sup> Zellen in einem Volumen von 10 ml BM-DC-Kulturmedium in bakteriologische Petrischalen eingesät. An Tag drei nach Isolierung der Zellen aus dem Knochenmark wurden pro Petrischale 5 ml frisches, auf 37 °C vorgewärmtes Kulturmedium hinzugefügt. An Tag sechs der Kultur wurden pro Petrischale 5 ml Kulturmedium entnommen, in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und die darin enthaltenden Zellen sedimentiert (8 min, 300 x g, RT). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in frischem, vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen, mit insgesamt 5 ml frischem

Kulturmedium pro Schale, in die ursprünglichen Petrischalen eingesät. Für Zellen, die in nachfolgenden Experimenten unstimuliert eingesetzt werden sollten, wurde der Mediumaustausch in dieser Form an Tag acht wiederholt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte über maximal neun Tage bei 37 °C, 10 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Wasserdampfatmosphäre.

### **2.3.3.3 Ausreifung von BM-DCs**

Die Ausreifung immaturer BM-DCs erfolgte in allen Fällen durch Stimulierung der Zellen mit LPS. Hierzu wurden die nicht-adhärenenten Zellen einer Kultur geerntet und sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen in frischem, auf 37 °C vorgewärmtem, Kulturmedium resuspendiert und in Gewebe-Kulturschalen überführt. LPS wurde den Kulturen in einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugesetzt. Die Zellen wurden für weitere 24 h bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

Lentiviral zu transduzierende BM-DCs wurden an Tag fünf von den adhärenenten Zellen einer Kultur getrennt und in bakteriologische 6-Loch-Platten eingesät (vgl. 2.3.5.6). In diesem Fall wurde LPS mit einer Endkonzentration von 1 µg/ml an Tag acht direkt in die Kulturen in den 6-Loch-Platten gegeben.

### **2.3.3.4 Behandlung von BM-DC-Vorläufern mit Dexamethason**

Die Konditionierung von BM-DCs mit der immunmodulatorischen Substanz Dexamethason (DEX) erfolgte ab dem dritten Tag der Kultur. DEX wurde den Kulturen in einer Endkonzentration von 10<sup>-6</sup> M zugesetzt. Bei jeder Versorgung mit frischem Kulturmedium wurde der Kultur entsprechend des Volumens auch DEX zugefügt. Die Kultivierung der Zellen in Gegenwart der immunmodulatorischen Substanz erfolgte maximal über einen Zeitraum von sechs Tagen.

### **2.3.3.5 Ernten von BM-DCs**

Nach maximal neun Kulturtagen wurden BM-DCs für die jeweils nachfolgenden Experimente geerntet. Hierzu wurden die nicht-adhärenenten Zellen einer Kultur in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt, sedimentiert (8 min, 300 x g, RT) und einmal mit vorgewärmtem Kulturmedium

gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

### 2.3.3.6 Transduktion von BM-DCs mit lentiviralen Vektoren

Transduktion bezeichnet die Überführung von Teilen der DNA eines Donors in das Genom eines Rezipienten durch temperente bzw. virulente Phagen oder andere Viren als Vehikel. Im lentiviralen Transduktionssystem dient der durch Transfektion von HEK 293T-Zellen generierte virale Partikel als Vehikel.

Replikationsdefiziente lentivirale Vektoren haben gegenüber anderen viralen Vektoren den Vorteil einer sehr effizienten Transduktion verschiedener Zelltypen, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, unabhängig von deren Proliferationsstatus<sup>395-397</sup>. Außerdem handelt es sich hierbei um eine stabile Transduktion, was bedeutet, dass die übertragene genetische Information bei Zellteilungen im Genom der Zellen erhalten bleibt<sup>400</sup>.

In Vorbereitung auf die lentivirale Transduktion wurden BM-DCs am Tag fünf der Kultur wie bereits beschrieben geerntet (Abschnitt 2.3.3.5), sedimentiert (8 min, 300 x g, RT), in BM-DC-Kulturmedium resuspendiert und mit einer Dichte von  $0,75 \times 10^6$  Zellen pro Loch in einem Volumen von 500  $\mu$ l in bakteriologische 6-Loch-Platten eingesät. Für die eigentliche Transduktion wurden die Zellen jeweils mit 2 ml des entsprechenden virushaltigen Mediums versetzt. Den Kulturen wurde zusätzlich zur Erhöhung der Transduktionseffizienz Protaminsulfat in einer Endkonzentration von 4  $\mu$ g/ml hinzugefügt. Die viralen Partikel wurden für 10 min bei 350 x g und RT auf die Zielzellen zentrifugiert. Fünf Stunden nach der Transduktion wurde pro Loch je 1 ml des Mediums entnommen und die darin enthaltenen Zellen sedimentiert (8 min, 300 x g, RT). Anschließend wurden die Zellen in 1 ml frischem vorgewärmten Kulturmedium resuspendiert und erneut in die ursprünglichen 6-Loch-Platten eingesät. Zu diesem Zeitpunkt betrug die Menge an Medium pro Loch 2,5 ml.

Am Folgetag wurde die Transduktion nach dem zuvor beschriebenen Protokoll wiederholt, wobei dann die Gesamtmenge Medium pro Loch 4,5 ml betrug. Abweichend davon wurden die Kulturen am Ende der zweiten Transduktion pro Loch je 2 ml des Mediums entnommen und zentrifugiert (8 min, 300 x g, RT). Die sedimentierten Zellen wurden anschließend resuspendiert und zusammen mit pro Loch je 5 ml frischem, vorgewärmtem Kulturmedium in die ursprünglichen 6-Loch-Platten eingesät. Das Endvolumen betrug nach Abschluss beider Transduktionsrunden pro Loch somit 7,5 ml.

Transduzierte BM-DC-Zellen wurden am dritten Tag nach der zweiten Transduktion für die jeweiligen Experimente verwendet.

### **2.3.3.7 Nachweis der copGFP- und DsRed2-Expression transduzierter BM-DCs**

Alle im Rahmen der Arbeit verwendeten lentiviralen Vektoren enthielten entweder ein copGFP- oder ein DsRed2-Reportergen zur Bestimmung der jeweiligen Transduktionseffizienz. Der Nachweis der Reportergenexpression erfolgte entweder fluoreszenzmikroskopisch oder zytofluorometrisch drei Tage nach der zweiten Transduktion. Bei fluoreszenzmikroskopischer Auswertung wurden die Zellen in den 6-Loch-Platten belassen und Photographien bei Durchlicht und unter Fluoreszenzanregung aufgenommen. Die Aufnahmen erfolgten mit 10- oder 20-facher Vergrößerung unter Verwendung des Fluoreszenzmikroskops Olympus IX70, das mit einer DXC-950P Digitalkamera und der AnalySIS 3.00 Software ausgestattet war.

FACS-Analysen zum Nachweis der Transduktionseffizienz wurden in allen Fällen mit unfixierten Zellen durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen wie beschrieben geerntet (Abschnitt 2.3.3.5), sedimentiert (10 min, 300 x g, RT) und in 300 µl kaltem 1 x PBS aufgenommen. Pro Probe wurden jeweils 20000 Zellen gemessen (Abschnitt 2.3.15).

### **2.3.4 Präparation von Lymphknotenzellen**

An Tag sieben nach dem Auslösen einer CHS (Abschnitt 2.3.13) erfolgte bei allen Versuchstieren eine Präparation der drainierenden Lymphknoten. Hierzu wurden die mediastinalen, bronchialen, axialen sowie inguinalen Lymphknoten entnommen und für die nachfolgenden Experimente vereinigt.

Die unter sterilen Bedingungen entnommenen Lymphknoten wurden in eine mit 2 ml kaltem Waschmedium gefüllte Petrischale überführt und zwischen den rauen Seiten zweier abgeflammter Objektträger zerrieben. Die solchermaßen vereinzelteten Zellen wurden über ein Zellsieb (Ø 40 µm) in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt, sedimentiert (8 min, 300 x g, RT) und zwei weitere Male mit Waschmedium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium für T-Zellen resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

### **2.3.5 Präparation von Milzzellen**

Die unter sterilen Bedingungen entnommenen Milzen wurden in eine mit 20 ml kaltem Waschmedium gefüllte Petrischale überführt und zwischen den rauen Seiten zweier



abgeflammter Objektträger zerrieben. Die solchermaßen vereinzelteten Zellen wurden über ein Zellsieb ( $\varnothing$  40  $\mu\text{m}$ ) in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Die in der Zellsuspension enthaltenen Erythrozyten wurden durch Zugabe von Gey'schem Lyse-Puffer lysiert (1 ml pro Milz). Die Lyse erfolgte für eine Minute und wurde durch Zugabe von gekühltem Waschmedium gestoppt. Anschließend wurden die isolierten Zellen sedimentiert (8 min, 300 x g, RT), zwei weitere Male mit gekühltem Waschmedium gewaschen und in 1 ml warmem Waschmedium pro Milz aufgenommen.

Aus CHS-Versuchstieren isolierte Milzzellen wurden für nachfolgende Proliferationstests nicht in Waschmedium, sondern in T-Zell-Kulturmedium resuspendiert, und die Zellzahl wurde bestimmt.

### **2.3.6 Aufreinigung von T-Lymphozyten aus der Milz**

Die Aufreinigung von T-Zellen aus einer heterogenen Milzzellsuspension erfolgte über Nylonwolle-Säulen. Grundlage dieses Prinzips ist die Adhärenz vieler Leukozytenarten (B-Lymphozyten, Makrophagen und DCs) sowie von Zelltrümmern an die Oberfläche der Nylonwolle. T-Zellen hingegen binden nicht an Nylonwolle und können somit effizient aus einem heterogenen Leukozyten-Zellgemisch angereichert werden<sup>436</sup>.

Für die Herstellung solcher Säulen wurden 0,6 g Nylonwolle fein gezupft und in eine 10 ml Spritze überführt, die in einem 50 ml Reaktionsgefäß autoklaviert wurde.

Vor Beladung der sterilen Säulen mit der Milzzellsuspension wurde diese mit 20 ml warmem Waschmedium äquilibriert und eventuelle Luftblasen mit einer Pinzette entfernt. Das Volumen der Nylonwolle in den Spritzen wurde in diesem Schritt auf 6 ml eingestellt und die Säulen wurden für 45 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Säulen erneut mit 10 ml warmem Waschmedium äquilibriert. Anschließend wurden die präparierten Milzzellen auf die Nylonwolle-Säule geladen – pro Säule das Äquivalent von maximal zwei Milzen. Auf die beladenen Säulen wurde zum Abschluss jeweils 1 ml warmes Waschmedium gegeben, damit alle Zellen in die Nylonwolle einsickern. Die Säulen wurden für 45 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

Nach der Inkubation folgte die Elution der T-Zellen mit warmem Waschmedium. Hierzu wurde die Nylonwolle-Säule auf eine Kanüle gesteckt (0,7 x 30 mm), die durch den Deckel eines 50 ml Reaktionsgefäßes gestochen wurde. Die T-Zellen wurden mit einem Volumen von 20 ml und einer Fließgeschwindigkeit von ungefähr einem Tropfen pro Sekunde eluiert. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert, in warmem Kulturmedium ohne GM-CSF resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

Der Anreicherungsgrad an T-Zellen in der Zellsuspension nach einer Aufreinigung über Nylonwollensäulen wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse exemplarisch kontrolliert und lag bei durchschnittlich 70 % (persönliche Mitteilung von Herrn Dipl.-Biol. Timo Castor).

### 2.3.7 Depletion natürlicher CD25<sup>+</sup> regulatorischer T-Lymphozyten

Die Depletion natürlich vorkommender CD25<sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen aus einer heterogenen T-Zell Suspension erfolgte mit Hilfe immunmagnetischer Dynabeads. In derart depletierten T-Lymphozyten-Populationen ist der Nachweis einer *de novo*-Induktion regulatorischer T-Zellen durch konditionierte BM-DCs möglich.

Das Prinzip dieser Aufreinigung beruht auf supramagnetischen Kügelchen. Die hier verwendeten Dynabeads M-450 (Dyna<sup>®</sup>, Biotech, Hamburg) haben Schaf-anti-Ratten-IgG kovalent auf ihrer Oberfläche gebunden. An diese Antikörper können Ratten-IgG-Antikörper, die gegen ein Oberflächenprotein auf der zu separierenden Zellpopulation gerichtet sind, binden. Wird die Zellsuspension anschließend mit derart gekoppelten Dynabeads inkubiert, binden an den jeweiligen Ratten-IgG-Antikörper die spezifischen Zellen und können dann mit Hilfe eines Magneten isoliert werden.

Die Depletion von CD25<sup>+</sup> T-Zellen erfolgte mit Hilfe eines anti-Maus CD25 Antikörpers. Pro 10<sup>6</sup> Zellen wurde 1 µg Antikörper zur Depletion eingesetzt, wobei davon ausgegangen wurde, dass es sich bei maximal einem Zehntel aller aus einer Milz isolierten T-Lymphozyten um CD25<sup>+</sup> T-Zellen handelt. Die entsprechende Menge Antikörper wurde zunächst an die Dynabeads gekoppelt, wobei pro zu depletierende Zelle 4 Beads einkalkuliert wurden. Die entsprechende Menge Beads wurde zweimal mit kaltem TC-Iso Puffer (1 x PBS, 1 % Pen/Strep, 2 % (v/v) FCS (PAN Biotech)) gewaschen, in 2 ml des Puffers resuspendiert, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit der jeweiligen Menge anti-CD25-Antikörper versetzt. Die Kopplung erfolgte für 30 min bei 4 °C über Kopf drehend. Anschließend wurde die Suspension in ein 12 ml Rundboden Reaktionsgefäß überführt, und die gekoppelten Beads wurden unter Verwendung eines Magneten zweimal mit 5 ml kaltem TC-Iso Puffer gewaschen. Die zuvor über Nylonwolle-Säulen isolierten T-Zellen wurden sedimentiert, in TC-Iso Puffer resuspendiert und zu den gekoppelten Beads gegeben. Das Volumen wurde so gewählt, dass die gesamte Suspension eine Konzentration von 2 x 10<sup>7</sup> Beads pro ml hatte. Die Bindung der Zellen erfolgte für 30 min bei 4 °C über Kopf drehend. Nach der Inkubation wurde das Reaktionsgefäß in den Dauer-Magneten gestellt und der Überstand abgenommen. Dieser Überstand wurde noch zwei weitere Male über den Magneten gereinigt, die darin enthaltenen Zellen sedimentiert (8 min, 300 x g, 4 °C) und anschließend in warmem Kulturmedium ohne GM-CSF resuspendiert. Die Reinheit der Aufreinigung wurde

mittels durchflusszytometrischer Analysen kontrolliert. Sie lag bei den fünf durchgeführten Analysen jeweils zwischen 95 und 98 %.

### 2.3.8 Primäre MLR (gemischte Leukozyten Reaktion)

Werden zwei Populationen allogener Leukozyten gemischt, so wird die daraus resultierende T-Zell Proliferation als gemischte Leukozyten-Reaktion (MLR) bezeichnet. Den stärksten Stimulus stellen dabei die Zelloberflächenantigene des Hauptgewebeverträglichkeitskomplexes (MHC) dar. Die alloreaktiven T-Zellen des einen Mausstamms erkennen für sie fremde Peptide in Kombination mit allogenen MHC-Molekülen auf den APCs des anderen Mausstamms und werden dadurch zur Proliferation und Lymphokinproduktion stimuliert<sup>437</sup>.

Die Proliferation der T-Zellen wird über den Einbau tritium-markierten Thymidins (<sup>3</sup>HTdR) in die DNA der sich teilenden Zellen gemessen. Da nur die Proliferation der alloreaktiven T-Zellen gemessen werden sollte, wurden die APCs vor Verwendung in einer MLR mit 3000 rad bestrahlt. Hierdurch werden Doppelstrangbrüche in die DNA eingeführt, die eine weitere Proliferation der Zellen verhindern. Die APCs sind jedoch weiterhin in der Lage, antigenspezifische T-Zellen zu aktivieren.

In dieser Arbeit wurden mit DEX konditionierte sowie mit verschiedenen Expressionskonstrukten transduzierte C57BL/6 BM-DCs als APCs in einer MLR verwendet. Die DCs wurden wie zuvor beschrieben geerntet (Abschnitt 2.3.3.5) und nach Bestimmung der Zellzahl bestrahlt. Alle MLR-Experimente wurden in 96-Loch-Platten durchgeführt. Bestrahlte APCs wurden in Triplikat-Ansätzen 15 x seriell 1:3 verdünnt, wobei mit einer Zellzahl von  $5 \times 10^4$  pro Loch begonnen wurde. Wurden transduzierte BM-DCs als APCs in eine MLR eingesetzt, wurde mit einer Zellzahl von  $1,67 \times 10^4$  pro Loch begonnen.

Allogene T-Zellen wurden wie zuvor beschrieben aus den Milzen von Balb/c-Mäusen aufgereinigt (Abschnitt 2.3.6) und entweder als Gesamtpopulation oder nach einer Depletion von CD25<sup>+</sup> T-Zellen in der MLR eingesetzt. Die T-Zellen wurden mit einer Zellzahl von  $3 \times 10^5$  pro Loch zu den zuvor titrierten APCs gegeben. Das Gesamtvolumen pro Loch betrug 200  $\mu$ l.

Als Negativkontrolle dienten Ansätze der verwendeten APCs ohne T-Zellen sowie der T-Zellen ohne APCs.

Die 96-Loch-Platten wurden für 72 Stunden bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden zu den Ansätzen 0,25  $\mu$ Ci/Loch <sup>3</sup>HTdR gegeben und die Zellen für weitere 16 Stunden kultiviert. Bis zur Messung der Radioaktivität wurden die Platten bei -20°C gelagert.

Primäre MLRs wurden im 6-Loch-Format durchgeführt, wenn ausreichend große Mengen vorstimulierter T-Zellen für nachfolgende Analysen generiert sollten. Bestrahlte C57BL/6

APCs wurden in einer Dichte von  $10^6$  Zellen pro Loch mit  $6 \times 10^6$  Gesamt- oder CD25<sup>+</sup> depletierten T-Zellen in einem Gesamtvolumen von 4 ml Kulturmedium ohne GM-CSF pro Loch kokultiviert. Die Kokulturen wurden für sieben Tage bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Wurden transduzierte BM-DCs als APCs in einer MLR eingesetzt, wurden  $3,33 \times 10^5$  bestrahlte DCs mit  $6 \times 10^6$  Gesamt-T-Zellen kokultiviert. Diese Kokulturen wurden für drei Tage bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze geerntet und die APCs immunmagnetisch von den T-Zellen getrennt. Die Depletion der APCs aus diesen Kokulturen erfolgte analog zum Prinzip der im Abschnitt 2.3.7 beschriebenen Depletion CD25<sup>+</sup> natürlicher regulatorischer T-Zellen. Pro  $10^6$  zu depletierender Zellen wurden in diesem Fall 50 µl des MHCII-Antikörpers 2G9 (Ratte-anti-I-A<sup>b</sup>/I-E<sup>b</sup>) eingesetzt. Die Kalkulation der Dynabeads sowie der Ablauf des Protokolls erfolgten wie zuvor beschrieben. Die negativ angereicherten, vorstimulierten T-Zellen wurden nach der Bestimmung der Zellzahl mit einer Dichte von  $6 \times 10^6$  Zellen pro Loch in einem Volumen von 4 ml in eine 6-Loch-Platte eingesät. Zusätzlich wurden die T-Zellen mit 0,5 U IL-2 pro ml versetzt. Die Kulturen wurden für weitere vier Tage bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 2.3.9 Syngene Stimulation von MOG-reaktiven 2D2 T-Zellen

Im Rahmen syngener Kokulturen kann die stimulatorische Kapazität von DCs in einem proteinantigenspezifischen Kontext analysiert werden. Als Modellantigen in diesem System wurde das Myelin-Oligodendrozyten-Glycoprotein (MOG) verwendet. T-Zellen aus 2D2 T-Zell-Rezeptor transgenen Mäusen erkennen spezifisch das MOG-Peptid MOG<sub>35-55</sub>.

In dieser Arbeit wurden mit verschiedenen Expressionskonstrukten transduzierte BM-DCs als APCs in syngenen Kokulturen eingesetzt. Analog zur allogenen MLR wurden die Zellen wie zuvor beschrieben geerntet und bestrahlt. Anschließend wurden die Zellen für 4 h bei 37 °C mit MOG<sub>35-55</sub>-Peptid in einer Konzentration von 10 µM inkubiert. Die Zellsuspension wurde dabei alle 30 min geschüttelt. Ungebundenes Peptid wurde durch dreimaliges Waschen mit 10 ml BM-DC-Medium entfernt. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert, in Kulturmedium ohne GM-CSF resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Alle Kokultur-Experimente wurden in 96-Loch-Platten durchgeführt. Bestrahlte und mit Peptid beladene APCs wurden in Triplikat-Ansätzen 15 x seriell 1:3 verdünnt, wobei mit einer Zellzahl von  $0,75 \times 10^4$  pro Loch begonnen wurde. Syngene T-Zellen wurden wie zuvor beschrieben aus den Milzen von 2D2-Mäusen angereichert (Abschnitt 2.3.6). Diese wurden mit einer Zellzahl von  $4,5 \times 10^4$  pro Loch zu den zuvor titrierten APCs gegeben. Das Gesamtvolumen pro Loch betrug 200 µl.

Als Negativkontrolle dienten Ansätze der verwendeten APCs ohne T-Zellen sowie der T-Zellen ohne APCs. Zusätzlich wurden APCs, die nicht mit Peptid beladen wurden, mit syngenen 2D2 T-Zellen kokultiviert

Die 96-Loch-Platten wurden für 72 Stunden bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden zu den Ansätzen 0,25 µCi/Loch <sup>3</sup>HTdR gegeben und die Zellen für weitere 16 Stunden kultiviert. Bis zur Messung der Radioaktivität wurden die Platten bei -20°C gelagert.

### 2.3.10 Separation vorstimulierter CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten

Durch verschieden konditionierte BM-DCs können im Verlauf einer primären MLR sowohl CD4<sup>+</sup> sowie auch CD8<sup>+</sup> regulatorische T-Lymphozyten *de novo* induziert werden. Daher wurden beide Zellpopulationen voneinander separiert werden, um ihre unterschiedlichen phänotypischen und funktionellen Eigenschaften getrennt zu analysieren.

Die Separation erfolgte mit Hilfe immunmagnetischer Partikel, die bereits mit spezifischen Antikörpern gekoppelt bezogen wurden.

Sieben Tage nach Ansetzen der MLR wurden die stimulierten T-Zellen geerntet, sedimentiert (8 min, 300 x g, 4 °C), einmal mit kaltem Waschmedi um gewaschen und ihre Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden die T-Zellen sedimentiert (8 min, 300 x g, 4 °C) und einmal mit kaltem TC-Iso Puffer gewaschen. Die entsprechende Menge an anti-Maus CD8a Partikel-DM (BD Bioscience) wurde direkt auf das Zellsediment gegeben. Pro 1 x 10<sup>7</sup> T-Zellen wurden 50 µl Partikel eingesetzt. Die Bindung der Zellen erfolgte für 30 min bei 4 °C. Nach der Inkubation wurde die Suspension in 5 ml TC-Iso Puffer aufgenommen und in ein 12 ml Rundboden Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde in den Dauer-Magneten gestellt und der Überstand abgenommen. Die Partikel wurden zwei weitere Male in je 5 ml TC-Iso Puffer aufgenommen, die Reaktionsgefäße in den Dauer-Magneten gestellt und die Überstände gesammelt. Die immunmagnetischen Nanopartikel mit den daran gebundenen CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden in vorgewärmtes Kulturmedium ohne GM-CSF aufgenommen.

Der gesammelte Überstand, in welchem unter anderem die CD4<sup>+</sup> T-Zellen enthalten waren, wurde sedimentiert und mit der entsprechenden Menge anti-Maus CD4 Partikel-DM für 30 min bei 4 °C inkubiert. Pro 1 x 10<sup>7</sup> T-Zellen wurden 50 µl Partikel verwendet. Die magnetische Isolierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen erfolgte analog zur bereits beschriebenen Isolierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die immunmagnetischen Nanopartikel mit den daran gebundenen CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden in vorgewärmtes Kulturmedium ohne GM-CSF aufgenommen.

Die Reinheit der Separation wurde auf Grund der geringen Zellzahlen mittels quantitativer PCR bestimmt. Hierzu wurden zunächst in Vorexperimenten naive T-Zellen, wie in diesem

Abschnitt beschrieben, mit Hilfe immunmagnetischer anti-CD4- bzw. anti-CD8-gekoppelter Partikel separiert und die jeweilige Reinheit der Zellpopulationen durchflußzytometrisch bestimmt. Anschließend wurden Zellen beider Populationen in bekannten Verhältnissen miteinander vermischt und die jeweilige Expression an CD4 bzw. CD8 mittels quantitativer PCR nachgewiesen. Anhand dieses Standards wurde in nachfolgenden Experimenten die Reinheit der vorstimulierten und anschließend separierten T-Zell-Subpopulationen ermittelt. Der Reinheitsgrad der Separationen lag durchschnittlich bei 90 %.

### 2.3.11 Sekundäre MLR

Im Rahmen der sekundären MLR ist eine phänotypische und funktionelle Charakterisierung der in der primären MLR durch unterschiedlich konditionierte APCs vorstimulierten T-Zellen möglich. In zwei getrennten Experimentalansätzen kann analysiert werden, ob diese T-Zellen einen anergen bzw. suppressiven Phänotyp aufweisen.

Die Anergie wurde in einem Restimulationsansatz bestimmt, in dem die vorstimulierten T-Zellen mit allogenen APCs restimuliert wurden. Das suppressive Potential unterschiedlich vorstimulierter T-Zellen wurde in einem Suppressionsansatz ermittelt. Hierbei wurden die vorstimulierten T-Zellen mit frisch isolierten syngenen naiven T-Zellen und allogenen APCs kokultiviert, und es wurde analysiert, ob die Proliferation der naiven T-Zellen inhibiert werden konnte.

Sieben Tagen nach Ansetzen einer primären MLR im 6-Loch-Format wurden die stimulierten T-Zellen geerntet, sedimentiert (8 min, 300 x g, 4 °C), einmal mit kaltem Wachmedium gewaschen und in warmem Kulturmedium ohne GM-CSF resuspendiert. Diese Zellen wurden entweder als heterogene Gesamtzellpopulation oder separiert in CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten in der sekundären MLR eingesetzt. Alle sekundären MLR-Experimente wurden in 96-Loch-Platten durchgeführt.

Im Restimulationsansatz wurden die vorstimulierten T-Zellen in Triplikatanalysen 15 x seriell 1:2 verdünnt, wobei mit einer Zellzahl von  $3 \times 10^5$  pro Loch begonnen wurde. Als APCs wurden Milzzellen von C57BL/6-Mäusen verwendet, die wie zuvor beschrieben frisch isoliert wurden (Abschnitt 2.3.5). Diese wurden mit 3000 rad bestrahlt und in einer Dichte von  $3 \times 10^5$  Zellen pro Loch zu den zuvor verdünnten T-Zellen gegeben. Das Gesamtvolumen pro Loch betrug 200 µl.

Der Suppressionsansatz setzte sich analog zum Restimulationsansatz zusammen. Zusätzlich wurden pro Loch  $3 \times 10^5$  naive T-Zellen zugegeben, die wie zuvor beschrieben aus BALB/c-Mäusen isoliert wurden. Das Gesamtvolumen pro Loch betrug 200 µl.

Als Negativkontrollen in beiden Experimenten dienten Ansätze der als APCs verwendeten Milzzellen ohne T-Zellen sowie der T-Zellen ohne Zusatz von Milzzellen. Als Positivkontrollen wurden naive T-Zellen, in den Verhältnissen 1:1 und 2:1, mit C57BL/6-Milzzellen kokultiviert. Sowohl in den Restimulations- als auch in den Suppressionsexperimenten mit durch immature BM-DCs vorstimulierten T-Zellen wurden Triplikatansätze des jeweils ersten Titrations-Verhältnisses der MLR mit Antikörpern gegen Oberflächenmoleküle oder verschiedenen Zytokinen versetzt, um zu analysieren, ob sich die Anergie der Zellen bzw. die vermittelte Suppression aufheben lässt. Hierzu wurden den Kokulturen entweder anti-CTLA4 bzw. anti-IL-10 Antikörper (je 5 µg/ml) sowie IL-4, IL-6, IL-1β, IL-15 oder TNF-α (jeweils 20 ng/ml) zugefügt.

Die 96-Loch-Platten wurden für 5 Tage bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden zu den Ansätzen 0,25 µCi/Loch <sup>3</sup>HTdR gegeben und die Zellen für weitere 16 Stunden kultiviert. Bis zur Messung der Radioaktivität wurden die Platten bei -20°C gelagert.

Weiterhin wurden 3 x 10<sup>6</sup> durch immature BM-DCs oder DEX-APCs vorstimulierte T-Zellen in anti-CD3 und anti-CD28 beschichteten 24-Loch-Platten inkubiert. Auf diese Weise ist eine direkte Stimulation von T-Zellen ohne APCs möglich. Die Antikörperadhäsion an die Plastikoberfläche (5 µg anti-CD3, 2,5 µg anti-CD28) erfolgte für mindestens 1 h bei 37 °C im Brutschrank. Die Inkubation der T-Zellen in den mit den beiden Antikörpern beschichteten Löchern fand für 24 h bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> statt. Die anti-CD3 und anti-CD28 stimulierten T-Zellen wurden anschließend für Genexpressionsanalysen verwendet.

### 2.3.12 Messung von Radioaktivität

Um den Einbau von tritium-markiertem Thymidin (<sup>3</sup>HTdR) in die genomische DNA mitotisch aktiver Zellen zu bestimmen, 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 auf der Filtermembran präzipitiert. Diese wurde anschließend für 3 min in der Mikrowelle getrocknet und zusammen mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit in eine Folie eingeschweißt. Die Radioaktivität auf den Filtern wurde im Strahlungszähler als cpm (*counts per minute*) gemessen.

### **2.3.13 Murines Krankheitsmodell der haptенvermittelten Kontaktallergie (*contact hypersensitivity, CHS*)**

Die Kontaktallergie ist eine durch T-Zellen vermittelte Immunreaktion, die den verzögerten oder auch Typ IV-Reaktionen zugeordnet wird. Es handelt sich hierbei um eine Überempfindlichkeitsreaktion der Haut gegenüber niedermolekularen, chemisch reaktiven Substanzen (Haptен). Sie äußert sich in Form eines Hautekzems, das bei einer bestehenden Sensibilisierung gegen ein Haptен ca. 48 h nach der Applikation des gleichen Haptens seine maximale Ausprägung erreicht. Das murine Krankheitsmodell der haptенvermittelten Kontaktallergie wurde in diesem Kontext verwendet, um das therapeutische Potential von BM-DCs zu analysieren, die mit verschiedenen Expressionskonstrukten transduziert wurden.

#### **2.3.13.1 Durchführung des Ohrschwellungstests**

Alle in dieser Arbeit durchgeführten *in vivo*-Experimente (Injektion der bereitgestellten transduzierten, gepulsten/ungepulsten Zellen bzw. PBS sowie Messung der Ohrschwellung) wurden freundlicherweise von Herrn Dipl.-Biol. Timo Castor durchgeführt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die experimentelle Kontaktallergie durch DNFB induziert. Weibliche C57BL/6 Mäuse wurden durch die epikutane Applikation von 17 µl einer 0,4 %igen (v/v) DNFB-Lösung in Aceton/Olivenöl (4:1) an zwei aufeinander folgenden Tagen (Tag 0 und Tag 1) auf das zuvor rasierte Abdomen sensibilisiert. Nach 4 Tagen (Tag 5) erfolgte die Injektion transduzierter BM-DCs. Hierzu wurden die DCs zunächst wie zuvor beschrieben geerntet (Abschnitt 2.3.3.5) und bestrahlt. Anschließend wurden die Zellen in einer Dichte von  $5 \times 10^6$ /ml für 10 min bei 37 °C mit DNBS in einer Konzentration von 5 µM inkubiert. Überschüssiges Haptен wurde durch dreimaliges Waschen mit 50 ml 1 x PBS entfernt. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert, in 1 x PBS resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.  $5 \times 10^5$  haptенgepulste Zellen in 100 µl 1 x PBS wurden jeweils subkutan in den Nacken der zuvor sensibilisierten Mäuse injiziert. Tieren der Kontrollgruppe wurden 100 µl 1 x PBS injiziert. Damit durch die verschiedenen DC-Populationen induzierte Veränderungen in der Immunantwort ausgeschlossen werden konnten, wurden in parallelen Experimenten  $5 \times 10^5$  ungepulste Zellen in 100 µl 1 x PBS jeweils subkutan in den Nacken der zuvor sensibilisierten Mäuse injiziert.

An Tag 12 erfolgte die Provokation durch die epikutane Applikation von 8 µl einer 0,2 %igen DNFB-Lösung (in Aceton/Olivenöl) auf jede Ohrfläche beider Ohren. Die Ohrschwellung wurde mit Hilfe eines Mikrometers in 24 h Abständen über einen Zeitraum von 96 h blind gemessen. Die Berechnung der Ohrschwellung erfolgte aus der Differenz zwischen der



Ohrdicke vor der Provokation und den Messwerten zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der Provokation.

An Tag sieben nach dem Auslösen einer CHS wurden die Versuchstiere für nachfolgende *in vitro*-Experimente getötet und die Lymphknoten sowie Milzen entnommen.

### **2.3.13.2 T-Zell-Proliferationstest**

Mit Hilfe dieses Tests wurde *in vitro* die antigenspezifische Restimulierbarkeit der isolierten Lymphknoten- und Milzzellen aus Mäusen nach Induktion einer CHS überprüft.

Hierzu wurden Lymphknoten- bzw. Milzzellen in Triplikatansätzen mit einer Zellzahl von  $2 \times 10^5$  pro Loch in eine 96-Loch-Platte eingesät. Als APCs wurden Milzzellen von C57BL/6-Mäusen verwendet, die wie zuvor beschrieben frisch isoliert wurden (Abschnitt 2.3.5). Diese wurden nach der Bestrahlung (3000 rad) für 10 min bei 37 °C mit DNBS in einer Konzentration von 5 µM inkubiert. Überschüssiges Hapten wurde durch dreimaliges Waschen mit 50 ml 1 x PBS entfernt. Anschließend wurden die Zellen sedimentiert, in Kulturmedium für T-Zellen resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Die APCs wurden mit einer Dichte von  $2 \times 10^5$  pro Loch zu den zuvor eingesäten Zellen gegeben. Das Gesamtvolumen pro Loch betrug 200 µl.

In zusätzlichen Triplikatansätzen wurde den Kokulturen ConA in einer Konzentration von 5 µg/ml zugefügt. Das Lektin ConA, das unter anderem in der Zellwand von Bakterien vorkommt und zu einer antigenunspezifischen Aktivierung von T-Zellen führt, wurde in diesem experimentellen Kontext als Positivkontrolle eingesetzt. Als Negativkontrolle dienten Ansätze der verwendeten Lymphknoten- und Milzzellen ohne APCs sowie der haptenbeladene APCs ohne Lymphknoten- oder Milzzellen.

Die 96-Loch-Platten wurden für 72 Stunden bei 37 °C und 10 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden zu den Ansätzen 0,5 µCi/Loch <sup>3</sup>HTdR gegeben und die Zellen für weitere 16 Stunden kultiviert. Bis zur Messung der Radioaktivität wurden die Platten bei -20°C gelagert.

### **2.3.14 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)**

Als ELISA wird ein immunologisches Testverfahren bezeichnet, mit dem ein Nachweis verschiedener Substanzen möglich ist. Mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen die nachzuweisende Substanz und einer nachfolgenden enzymatischen Farbreaktion ist eine quantitative Konzentrationsbestimmung möglich. In dieser Arbeit wurde die Methode zum quantitativen Nachweis zum Zytokinen im Überstand von Zellen verwendet.

Die Adsorption des *Capture*-Antikörpers an ELISA-Platten erfolgte je nach Antikörper in 0,1 M NaHCO<sub>3</sub> bzw. 1 x PBS in einem Volumen von 50 µl pro Vertiefung bei 4 °C über Nacht. Nach der Inkubation wurde die überschüssige Antikörper-Lösung ausgewaschen. Die Absättigung freier Bindungsstellen fand durch 150 µl Blockierungspuffer pro Loch für eine Stunde bei RT statt. Die Lösung wurde durch Ausklopfen aus der Platte entfernt.

Kulturüberstände, in denen der Gehalt an TGF-β1 bestimmt werden sollte, wurden einer Vorbehandlung unterzogen. Hierzu wurden 120 µl der jeweiligen Probe mit 2-3 µl 1N HCl bis auf pH3 angesäuert und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben durch Zugabe von 3-5 µl 1N NaOH neutralisiert (mindestens pH7). Die neutralisierten Proben wurden direkt für den endgültigen Probenauftrag verwendet. Der Zytokinstandard und die verschiedenen Überstände wurden zur Erstellung einer Verdünnungsreihe seriell 1:2 in 1 x PBS/1 % (w/v) BSA (wurde ebenfalls als Leerwert verwendet) verdünnt. Die Bindung der nachzuweisenden Zytokine an den jeweiligen *Capture*-Antikörper erfolgte bei 4 °C über Nacht. Die Lösung wurde durch zwei Waschschriffe entfernt. Im Anschluss erfolgte die Bindung zytokinspezifischer, biotinylierter Detektions-Antikörper in einem Volumen von 50 µl pro Loch für eine Stunde bei 37 °C bzw. zwei Stunden bei RT. Überschüssiger Detektions-Antikörper wurde durch zweimaliges Waschen entfernt. Im nächsten Schritt wurden 50 µl pro Loch einer 1:2000 Verdünnung von ExtraVidin, einer streptavidin-konjugierten Meerrettich-Peroxidase, die an Biotin bindet, auf die Platten gegeben. Die Bindung erfolgte für 45 min bei RT. Nach der Inkubation wurde überschüssiges Enzym durch drei Waschschriffe entfernt. ExtraVidin katalysiert die Umwandlung des farblosen Substrats OPD (Orthonitrophenoldiamin) in ein photometrisch messbares Produkt. Hierzu wurden pro Loch 50 µl OPD (1 mg/ml Substratpuffer, versetzt mit 1 µl/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) auf die Platten gegeben. Die Reaktion wurde mit 50 µl Stopplösung pro Loch abgestoppt.

Die Extinktion wurde bei 490 nm im Spektralphotometer gemessen. Die Extinktionswerte des Leerwerts wurden von den Messwerten der Proben abgezogen. Mit den Extinktionswerten der Proben und des Standards wurden lineare Regressionsanalysen durchgeführt. Die Zytokinkonzentration des Standards und die Verdünnung der Probe bei einer optischen Dichte (OD) von 0,2 wurden zur Berechnung der Zytokinkonzentration in den Proben in Bezug gesetzt.

### **2.3.15 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse, *fluorescence activated cell sorter*)**

FACS-Analysen (*fluorescence activated cell sorter*) ermöglichen einen quantitativen Nachweis oberflächengebundener Proteine auf Einzelzellebene. Hierzu werden

Zelloberflächenmoleküle mit epitopspezifischen Antikörpern markiert. Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antikörper waren direkt mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt.

Die durchflusszytometrischen Analysen wurden in einem FACScan (*fluorescence activated cell scanner*) durchgeführt. Die Zellen werden dabei einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeführt, der den Fluoreszenzfarbstoff anregt. Gemessen wird die Intensität der Fluoreszenzemission. Parallel werden Streuung bzw. Adsorption gemessen, die die Größe und Granularität der Zellen angeben.

Alle FACS-Färbungen zur Bestimmung der Oberflächenexpression von Molekülen wurden mit nicht fixierten BM-DCs durchgeführt. Die Zellen wurden wie zuvor beschrieben geerntet (Abschnitt 2.3.3.5), in FACS-Medium resuspendiert und bis zur Färbung auf Eis gehalten. Alle nachfolgenden Schritte wurden auf Eis und mit gekühlten Lösungen durchgeführt.

Die Zellen wurden in einer Menge von  $3 - 5 \times 10^5$  Zellen auf FACS-Röhrchen aufgeteilt und mit je 1 ml FACS-Medium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen zur Absättigung der Fc-Rezeptoren Fc $\gamma$ RII/III für 10 min bei 4 °C mit 50  $\mu$ l 1:5 verdünnte m 2.4G2 Antikörper inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch Waschen mit 1 ml FACS-Medium entfernt. Die Färbung erfolgte mit je 50  $\mu$ l des entsprechend verdünnten Antikörpers für 20 min bei 4 °C. Nach der Inkubation wurden die Zellen einmal mit 1 ml FACS-Medium gewaschen und mit 350  $\mu$ l 1 x PBS/0,7 % PFA fixiert. Die Proben wurden bis zur Messung bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

Die Justierung der Empfindlichkeit des Durchflusszytometers erfolgte für jeden Antikörper mit Hilfe einer entsprechend mitgeführten Isotypkontrolle. Die eigentliche Messung erfolgte nach Ausgrenzung von toten Zellen über Größe (FSC, *forward scatter*) und Granularität (SSC, *side scatter*) der Zellen. Pro Probe wurden jeweils 20000 Ereignisse gemessen, die mit Hilfe der CellQuest<sup>TM</sup>-Software (BD Biosciences) analysiert wurden. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der FlowJo7 Software.

### 2.3.16 Grafik und Statistik

Die grafische und statistische Auswertung der experimentellen Daten erfolgte mit Hilfe der Programme SigmaPlot 2001 und Exel. Die mit dem student'schen T-Test bestimmten signifikanten Unterschiede wurden durch entsprechende Symbole gekennzeichnet (\*,+,# p < 0,05; \*\*,+,## p < 0,01; \*\*\*,+,,### p < 0,001).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Phänotypische und funktionelle Charakterisierung von in Gegenwart von Dexamethason generierten APCs

Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit sollten Moleküle identifiziert werden, die einen potentiellen Beitrag zum tolerogenen Status muriner APCs leisten. Als Modell für tolerogene APCs wurden Knochenmarkszellen unter DC-differenzierenden Bedingungen in Anwesenheit des Glucocorticoids (GC) Dexamethason (DEX) generiert (DEX-APCs). Endogen werden GCs als Komponenten eines negativen Rückkopplungsmechanismus bei Entzündungsreaktionen gebildet<sup>160</sup>. Das synthetische GC DEX moduliert die DC-Differenzierung und -Funktion<sup>169,170</sup>. Weiterhin wurde für DEX eine toleranzinduzierende Wirkung auf DCs nachgewiesen<sup>157,438</sup>.

In verschiedenen Studien wurde bereits dokumentiert, dass immature DCs<sup>439</sup> sowie DEX-DCs<sup>157</sup> im Rahmen von Kokulturen Tregs induzieren. Eine *de novo*-Induktion von Tregs durch die verschiedenen APC-Populationen wurde bisher nicht beschrieben. Aus diesem Grund wurde zunächst das tolerogene Potential von unstimulierten BM-DCs sowie DEX-APCs durch Kokulturen mit CD25<sup>+</sup> depletierten allogenen T-Zellen (die somit keine natürlichen regulatorischen T-Zellen enthalten) evaluiert. Die in diesem experimentellen Ansatz kokultivierten T-Zellen wurden funktionell in Restimulierungs- und Suppressionsexperimenten sowie durch Analyse ihrer Genexpressions- und Zytokinprofile charakterisiert. Anschließend erfolgte die Identifikation potentieller toleranzinduzierender Schlüsselmoleküle durch Analysen der Genexpressionsänderung von DC-relevanten sowie Glucocorticoid-responsiven Molekülen in unstimulierten und stimulierten DEX-APCs im Vergleich mit unstimulierten (immaturen) sowie LPS-stimulierten (maturen) BM-DCs.

#### 3.1.1 DEX-APCs weisen, unabhängig von ihrem Aktivierungszustand, ein stark vermindertes T-Zell-Aktivierungspotential auf

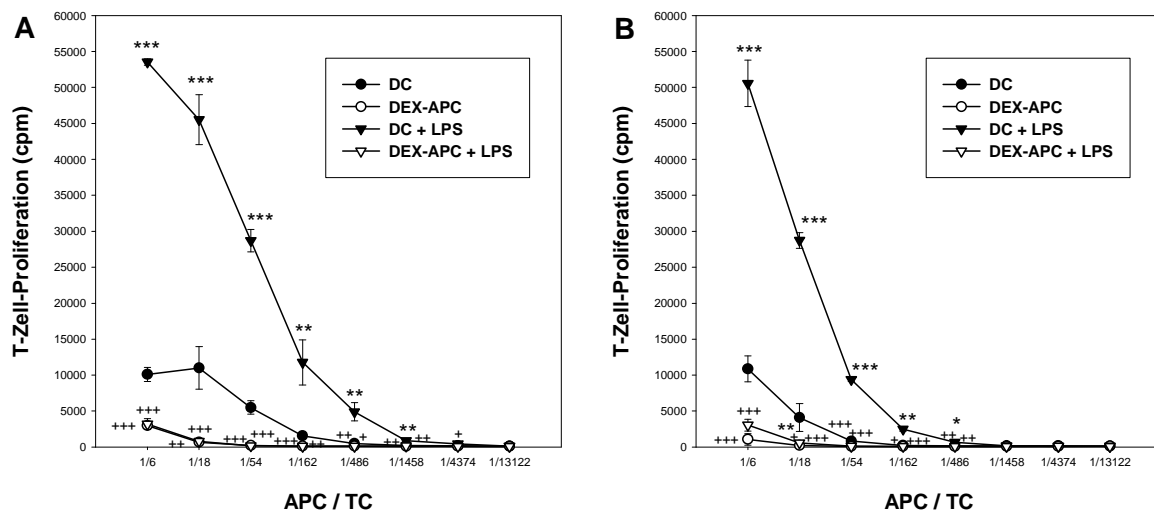
Wie bereits in der Einleitung erwähnt, führt eine Behandlung mit DEX zu einer phänotypischen und funktionellen Veränderung von DCs<sup>169,170</sup>. Kollektiv führen diese, durch GCs induzierten Veränderungen im DC-Status, zu einer verminderten T-Zell-Stimulierungskapazität von DCs, wie sie bereits in verschiedenen Studien nachgewiesen wurde<sup>157,170</sup>. Anknüpfend an diese Untersuchungen wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst mittels gemischter Leukozyten-Reaktionen (MLR) analysiert, inwieweit die in dieser

Arbeit generierten DEX-APCs eine gegenüber BM-DCs veränderte T-Zell-Stimulierungskapazität aufweisen und das Potential haben, in allogenen Gesamt-T-Zellen sowie CD25<sup>+</sup> depletierten T-Zellen eine hypoproliferative Antwort zu induzieren.

Immature BM-DCs besitzen, wie in Abbildung 1A gezeigt, lediglich ein moderates allogenes T-Zell-Aktivierungspotential, wohingegen mit LPS ausgereifte, mature BM-DCs die T-Zellen in hohem Maße zur Proliferation anregen können. Im Gegensatz dazu vermitteln sowohl immature als auch LPS-stimulierte DEX-APCs eine signifikant verminderte T-Zell-Proliferation. Die durch unstimulierte und stimulierte DEX-APCs induzierte Proliferation befindet sich jeweils signifikant unterhalb des Niveaus immaturer Kontroll-DCs.

Werden die verschiedenen BM-DC Populationen mit allogenen, CD25<sup>+</sup> depletierten T-Zellen kokultiviert, so zeichnen sich DEX-APCs, unabhängig von ihrem Aktivierungszustand, ebenfalls durch ein stark vermindertes T-Zell-Aktivierungspotential aus (Abbildung 1B). Die durch unstimulierte sowie LPS-stimulierte DEX-APCs induzierte T-Zell-Proliferation liegt ebenfalls unterhalb des Niveaus immaturer Kontroll-DCs.

In beiden experimentellen Ansätzen führt somit die Stimulierung von DEX-APCs zu keiner signifikant erhöhten T-Zell-Aktivierungsfähigkeit im Vergleich zu unstimulierten DEX-APCs.

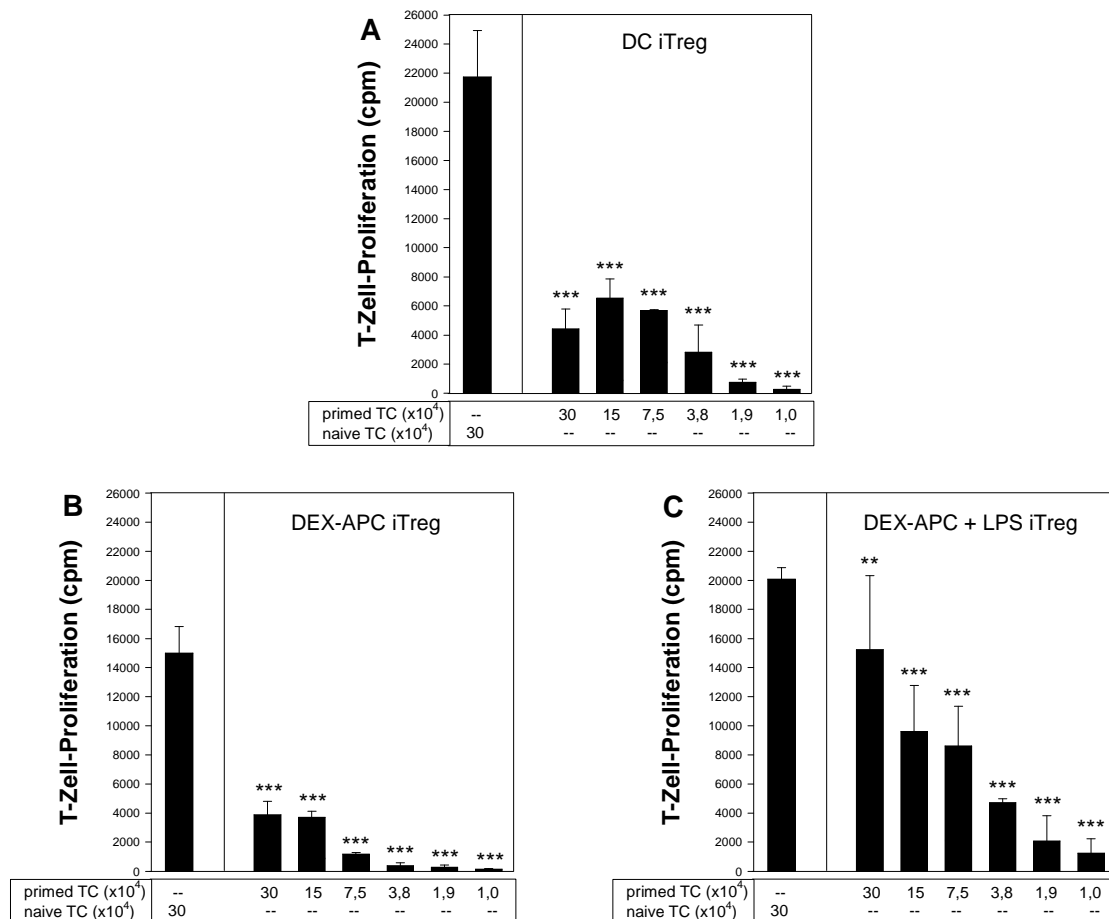


**Abbildung 1: In Gegenwart von Dexamethason generierte APCs zeichnen sich durch ein stark vermindertes T-Zell-Aktivierungspotential aus.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 3 wurde Aliquoten der Kultur  $10^{-6}$  M DEX zugesetzt. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Die verschiedenen APC-Populationen wurden bestrahlt, in Triplikaten seriell verdünnt und mit jeweils  $3 \times 10^5$  T-Zellen für 4 Tage kokultiviert. Hierbei wurden entweder (A) Gesamt-T-Zellen oder (B) CD25<sup>+</sup> depletierte T-Zellen aus BALB/c Mäusen verwendet. Die T-Zell-Proliferation wurde anhand der Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Thymidin während der letzten 16 h der Kultur gemessen. Die Daten repräsentieren den Mittelwert der Triplikatsansätze ± Standardfehler und sind für jeweils 3 Experimente repräsentativ. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen stimulierten und unstimulierten APCs bzw. DCs (\*) sowie zwischen DEX-APCs und BM-DCs (+) sind angegeben (\*<sup>+</sup> p<0,05; \*\*<sup>+</sup> p<0,01; \*\*\*<sup>+</sup> p<0,001).

#### **3.1.2 Unstimulierte BM-DCs und DEX-APCs haben das Potential, *de novo* Tregs zu induzieren**

In früheren Studien wurde gezeigt, dass allogene naive T-Zellen in Kokulturen mit GM-CSF-differenzierten, unstimulierten BM-DCs einen anergen Zustand erlangen<sup>440</sup>. Eine Restimulation dieser vorstimulierten T-Zellen führt im Vergleich mit stimulierten naiven T-Zellen zu einer hypoproliferativen Antwort. Inwieweit hierbei expandierte natürliche Tregs oder *de novo* induzierte Tregs (iTregs) beteiligt sind, war nicht bekannt. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit ein experimentelles Design gewählt, bei dem die Depletion natürlich vorkommender CD25<sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen aus der heterogenen T-Zell-Suspension mit Hilfe immunmagnetischer Dynabeads erfolgte. In derart depletierten T-Lymphozyten-Populationen ist der Nachweis einer *de novo*-Induktion von Tregs durch verschiedene APC-Gruppen möglich. Da sowohl immature BM-DCs, als auch unstimulierte und stimulierte DEX-APCs eine hypoproliferative T-Zell-Antwort im Rahmen primärer MLRs induzieren (Abbildung 1), wurde das Potential aller drei Gruppen analysiert, *de novo* Tregs zu induzieren. In Restimulierungsansätzen wurde zunächst verifiziert, inwiefern die Hypoproliferation der allogenen BALB/c T-Zellen, die mit den verschiedenen APC-Populationen kokultiviert wurden, auf die Induktion von T-Zell-Anergie zurückzuführen ist. Hierzu wurden die über 7 Tage in einer primären MLR vorstimulierten CD25<sup>-</sup> T-Zellen (*primed T-cell*, pTC) durch allogene C57BL/6-Milzzellen restimuliert.

T-Zellen, die aus einer primären Kokultur mit unstimulierten BM-DCs zurückgewonnen wurden, zeigen im Vergleich zu naiven BALB/c T-Zellen eine signifikant verminderte proliferative Antwort nach einer Restimulation mit C57BL/6 Milzzellen (Abbildung 2A). Auf diese Weise vorstimulierte CD25<sup>-</sup> T-Zellen zeichnen sich somit durch einen anergen Phänotyp aus. Analog zu immaturren BM-DCs sind unstimulierte DEX-APCs ebenfalls in der Lage, CD25<sup>-</sup> T-Zellen derart vorzustimulieren, dass sie nicht mehr durch allogene Milzzellen effizient restimuliert werden können (Abbildung 2B). Die induzierte Proliferationsrate der durch DEX-APCs vorstimulierten pTCs liegt ebenfalls signifikant unterhalb derer naiver T-Zellen. Beide APC-Populationen sind demzufolge in der Lage, einen vergleichbar anergen Status in CD25<sup>-</sup>-T-Zell-Populationen zu induzieren. Restimulierungsansätze mit pTCs aus Kokulturen mit LPS-stimulierten DEX-APCs zeigen, dass auch diese APCs in CD25<sup>+</sup> depletierten T-Zell-Populationen einen hypoproliferativen Status induzieren (Abbildung 2C). Dabei ist es für die genannte pTC-Gruppe charakteristisch, dass die induzierte Proliferation in allen durchgeführten Experimenten jeweils nur geringfügig signifikant unterhalb derer von  $3 \times 10^5$  naiven T-Zellen lag. Im Vergleich zu immaturren BM-DCs (Abbildung 2A) und unstimulierten DEX-APCs (Abbildung 2B) ist das Potential stimulierter DEX-APCs, einen anergen Status in T-Zellen zu induzieren, somit wesentlich geringer.



**Abbildung 2: Immature BM-DCs und DEX-APCs induzieren in CD25<sup>-</sup> T-Zell-Populationen einen anergen Status.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 3 wurde Aliquoten der Kultur  $10^{-6}$  M DEX zugesetzt. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit  $1 \mu\text{g/ml}$  LPS für 24 h. Bestrahlte Zellen ( $10^6$ ) wurden für 7 Tage mit  $6 \times 10^6$  CD25<sup>+</sup> depletierten T-Zellen aus BALB/c Mäusen in 6-Loch-Platten in einem Volumen von 4 ml kokultiviert. Durch (A) immature BM-DCs, (B) unstimulierte und (C) stimulierte DEX-APCs vorstimulierte T-Zellen wurden anschließend in Triplikaten seriell verdünnt und mit jeweils  $3 \times 10^5$  bestrahlten C57BL/6 Milzzellen für 6 Tage restimuliert. Als Kontrolle wurden  $3 \times 10^5$  naive BALB/c T-Zellen mit  $3 \times 10^5$  bestrahlten C57BL/6 Milzzellen kokultiviert. Die T-Zell-Proliferation wurde anhand der Aufnahme von  $[^3\text{H}]$ -Thymidin während der letzten 16 h der Kultur gemessen. Die Daten repräsentieren den Mittelwert der Triplikatsätze  $\pm$  Standardfehler und sind für jeweils 6 Experimente repräsentativ. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen vorstimulierten und naiven T-Zellen sind angegeben (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

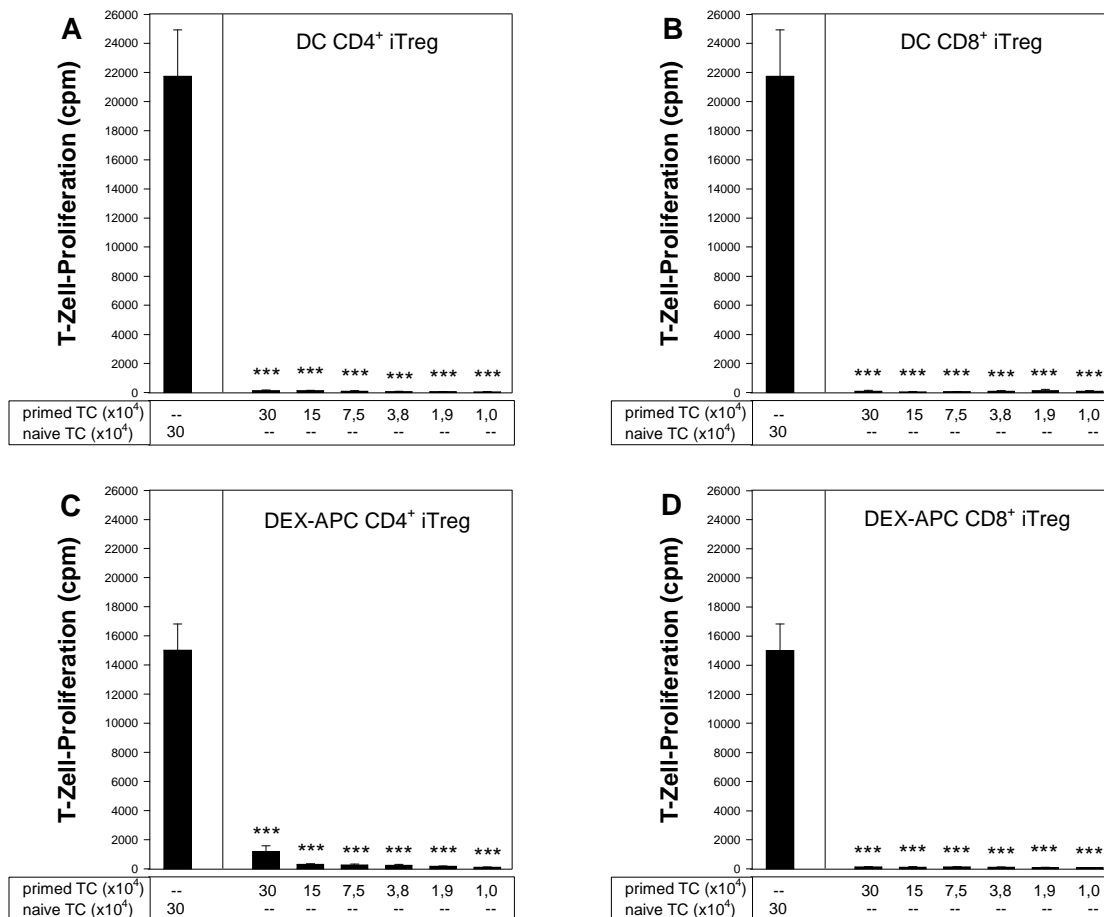
Da bekannt ist, dass durch verschiedene APC-Populationen sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> Tregs induziert werden können<sup>441</sup>, wurden im Folgenden die durch unstimulierte BM-DCs sowie durch unstimulierte oder stimulierte DEX-APCs *de novo* induzierten Tregs näher charakterisiert. Hierzu wurden beide Zellpopulationen mit Hilfe immunmagnetischer Dynabeads voneinander separiert (positive Anreicherung), um ihre funktionellen und phänotypischen Eigenschaften zu analysieren.

Sowohl durch immature BM-DCs, als auch durch unstimulierte DEX-APCs generierte CD4<sup>+</sup> (Abbildung 3A, Abbildung 3C) und CD8<sup>+</sup> pTCs (Abbildung 3B, Abbildung 3D) reagieren im Vergleich mit naiven T-Zellen mit einer signifikant verminderten Proliferation auf eine

### 3 Ergebnisse

Restimulation mit allogenen Milzzellen. Die durch die beiden APC-Gruppen induzierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigen ein stärkeres anerges Niveau, also eine schwächere proliferative Antwort, als die entsprechend vorstimulierten unseparierten T-Zellen (Abbildung 2A, Abbildung 2B).

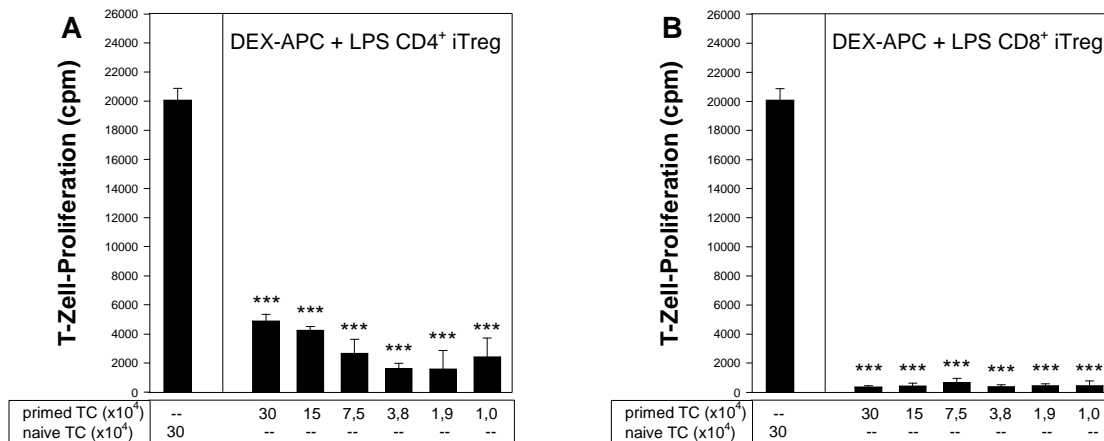
Im direkten Vergleich zeigen alle vier genannten separierten T-Zell-Populationen einen ähnlichen anergen Status.



**Abbildung 3: Immature BM-DCs und unstimulierte DEX-APCs induzieren CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit anergem Status in CD25<sup>-</sup> T-Zell-Populationen.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 3 wurde Aliquoten der Kultur 10<sup>-6</sup> M DEX zugesetzt. Bestrahlte Zellen (10<sup>6</sup>) wurden für 7 Tage mit 6 x 10<sup>6</sup> CD25<sup>+</sup> depletierten T-Zellen aus BALB/c Mäusen in 6-Loch-Platten in einem Volumen von 4 ml kokultiviert. Die verschiedenen vorstimulierten T-Zellen wurden anschließend geerntet und CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen immunmagnetisch angereichert. Durch immature BM-DCs vorstimulierte (A) CD4<sup>+</sup> und (B) CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie durch unstimulierte DEX-APCs vorstimulierte (C) CD4<sup>+</sup> und (D) CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden anschließend in Triplikaten seriell verdünnt und mit jeweils 3 x 10<sup>5</sup> bestrahlten C57BL/6 Milzzellen für 6 Tage restimuliert. Als Kontrolle wurden 3 x 10<sup>5</sup> naive BALB/c T-Zellen mit 3 x 10<sup>5</sup> bestrahlten C57BL/6 Milzzellen kokultiviert. Die T-Zell-Proliferation wurde anhand der Aufnahme von [3H]-Thymidin während der letzten 16 h der Kultur gemessen. Die Daten repräsentieren den Mittelwert der Triplikatansätze ± Standardfehler und sind für jeweils 6 Experimente repräsentativ, wobei A und B (und Abbildung 2A) bzw. C und D (und Abbildung 2B) aus jeweils dem gleichen Experiment stammen. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen vorstimulierten und naiven T-Zellen sind angegeben (\*\*\*)p<0,001).



Im Vergleich zu den durch stimulierte DEX-APCs vorstimulierten heterogenen CD25<sup>-</sup> T-Zellen (Abbildung 2C), weisen die entsprechenden separierten CD4<sup>+</sup> (Abbildung 4A) und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abbildung 4B) einen weitaus stärkeren anergen Status auf. Auf dieser Ebene der Analyse zeigen stimulierte DEX-APCs eine ähnliche tolerogene Kapazität wie die beiden anderen analysierten APC-Gruppen, während sich auf Ebene der CD25<sup>-</sup> Gesamt-T-Zell-Population ein eingeschränktes tolerogenes Potential für diese APC-Gruppe herauskristallisierte.

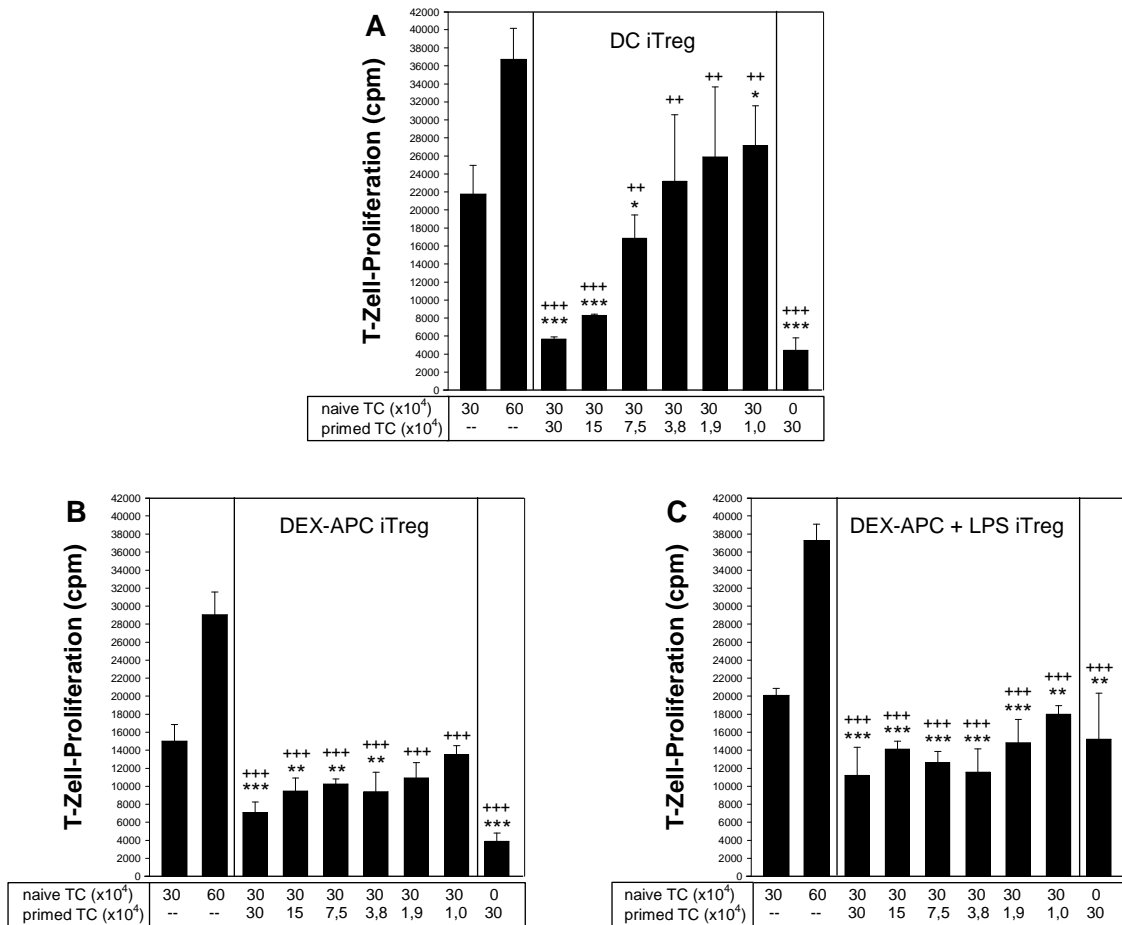


**Abbildung 4: Stimulierte DEX-APCs induzieren CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit anergem Status in CD25<sup>-</sup> T-Zell-Populationen.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 3 wurde Aliquoten der Kultur 10<sup>-6</sup> M DEX zugesetzt. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Bestrahlte Zellen (10<sup>6</sup>) wurden für 7 Tage mit 6 x 10<sup>6</sup> CD25<sup>+</sup> depletierten T-Zellen aus BALB/c Mäusen in 6-Loch-Platten in einem Volumen von 4 ml kokultiviert. Die verschiedenen vorstimulierten T-Zellen wurden anschließend geerntet und CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen immunmagnetisch angereichert. Durch stimulierte DEX-APCs vorstimulierte (A) CD4<sup>+</sup> und (B) CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden anschließend in Triplikaten seriell verdünnt und mit jeweils 3 x 10<sup>5</sup> bestrahlten C57BL/6 Milzzellen für 6 Tage restimuliert. Als Kontrolle wurden 3 x 10<sup>5</sup> naive BALB/c T-Zellen mit 3 x 10<sup>5</sup> bestrahlten C57BL/6 Milzzellen kokultiviert. Die T-Zell-Proliferation wurde anhand der Aufnahme von [3H]-Thymidin während der letzten 16 h der Kultur gemessen. Die Daten repräsentieren den Mittelwert der Triplikatansätze ± Standardfehler und sind für jeweils 6 Experimente repräsentativ, wobei A und B (und Abbildung 2C) aus dem gleichen Experiment stammen. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen vorstimulierten und naiven T-Zellen sind angegeben (\*\*\*)p<0,001).

Anergie ist eine der Schlüsseleigenschaften regulatorischer T-Zellen<sup>97</sup>. Als weiterer Faktor zur Identifikation dieser speziellen T-Zellen gilt per Definition die suppressive Aktivität. Aus diesem Grund wurden alle bereits beschriebenen vorstimulierten T-Zell-Populationen (sowohl CD25<sup>-</sup> Gesamt-T-Zellen, als auch positiv angereicherte CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen) in Suppressionstesten auf ihre suppressive Fähigkeit hin untersucht. Bei diesen experimentellen Ansätzen wurden CD25<sup>-</sup> T-Zellen, die über 7 Tage mit den unterschiedlichen allogenen APC-Populationen vorstimuliert wurden, mit frisch isolierten naiven T-Zellen in Anwesenheit allogener Milzzellen als APCs kokultiviert und die Proliferationsrate der T-Zellen bestimmt.

### 3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Kokultur-Experimente zeigte sich, dass durch immature BM-DCs vorstimulierte CD25<sup>-</sup> T-Zellen das Potential haben, die Proliferation naiver T-Zellen Dosisabhängig zu inhibieren (Abbildung 5A). Bei den nTC/pTC-Verhältnissen 30:30, 30:15 und 30:7,5 liegt die induzierte Proliferation signifikant unterhalb derer von 3 x 10<sup>5</sup> naiven T-Zellen allein sowie derer von 6 x 10<sup>5</sup> naiven T-Zellen, die eine Zelldichte-Kontrolle widerspiegeln. Resultierend aus diesen Ergebnissen ergibt sich, dass immature BM-DCs *in vitro* die Kapazität haben, in einer CD25<sup>-</sup> Zellpopulation *de novo* Tregs (iTregs) zu induzieren.



**Abbildung 5: CD25<sup>-</sup> T-Zellen, die durch immature BM-DCs oder DEX-APCs vorstimuliert wurden, inhibieren Dosisabhängig die Proliferation naiver T-Zellen.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 3 wurde Aliquoten der Kultur 10<sup>-6</sup> M DEX zugesetzt. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Bestrahlte Zellen (10<sup>6</sup>) wurden für 7 Tage mit 6 x 10<sup>6</sup> CD25<sup>+</sup> depletierten T-Zellen aus BALB/c Mäusen in 6-Loch-Platten in einem Volumen von 4 ml kokultiviert. Durch (A) unstimulierte BM-DCs, (B) unstimulierte oder (C) stimulierte DEX-APCs vorstimulierte T-Zellen wurden anschließend in Triplikaten seriell verdünnt und mit jeweils 3 x 10<sup>5</sup> bestrahlten C57BL/6 Milzzellen und 3 x 10<sup>5</sup> naiven BALB/c T-Zellen für 6 Tage kokultiviert. Als Kontrolle wurden 3 x 10<sup>5</sup> bzw. 6 x 10<sup>5</sup> (Zelldichte-Kontrolle) naive BALB/c T-Zellen mit 3 x 10<sup>5</sup> bestrahlten C57BL/6 Milzzellen kokultiviert. Die T-Zell-Proliferation wurde anhand der Aufnahme von [3H]-Thymidin während der letzten 16 h der Kultur gemessen. Die Daten repräsentieren den Mittelwert der Triplikatsansätze ± Standardfehler und sind für jeweils 6 Experimente repräsentativ. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen naiven T-Zellen, die mit pTCs kokultiviert wurden und 3 x 10<sup>5</sup> naiven (\*) bzw. 6 x 10<sup>5</sup> naiven T-Zellen (+) sind angegeben (\* p<0,05; \*\*,++ p<0,01; \*\*\*,+++ p<0,001).

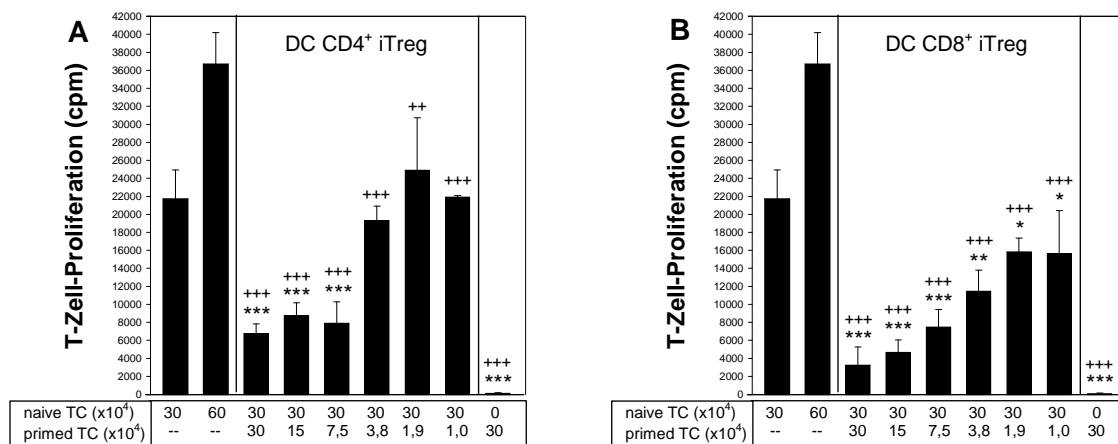
Unstimulierte (Abbildung 5B) und stimulierte DEX-APCs (Abbildung 5C) induzieren ebenfalls suppressive Tregs in CD25<sup>-</sup> T-Zell-Populationen. Im nTC/pTC-Verhältnis 30:30 ist jedoch das suppressive Potential von pTCs, die durch unstimulierte oder stimulierte DEX-APCs vorstimuliert wurden, gegenüber naiven T-Zellen weniger stark als dasjenige von pTCs, die durch immature BM-DCs vorstimuliert wurden (Abbildung 5A). Auf der anderen Seite sind die durch unstimulierte wie auch durch stimulierte DEX-APCs vorstimulierten pTC-Populationen in der Lage, die Proliferation naiver T-Zellen bis zu einem nTC/pTC-Verhältnis von 30:3,8 vergleichbar stark zu unterdrücken. Durch immature BM-DCs induzierte pTCs hingegen inhibieren die Proliferation naiver T-Zellen nur in den ersten beiden nTC/pTC-Verhältnissen in vergleichbarer Stärke. Weiterhin charakteristisch für durch stimulierte DEX-APCs vorstimulierte pTCs ist, dass die im Rahmen einer Restimulation induzierte Proliferation dieser Zellen in Abwesenheit von naiven T-Zellen in keinem der durchgeführten Experimente unterhalb derer des ersten nTC/pTC-Verhältnisses der entsprechenden Suppressionsansätze lag. Dies gilt so für keine andere analysierte pTC-Population. Insgesamt zeigen die durchgeführten Analysen, bezüglich Anergie und Suppression, dass unstimulierte und stimulierte DEX-APCs das Potential haben, *in vitro* in einer CD25<sup>-</sup> Zellpopulation *de novo* iTregs zu induzieren.

Wie zuvor bei der Analyse der Restimulierbarkeit unterschiedlich vorstimulierter T-Zellen wurden auch die suppressiven Eigenschaften der differentiell vorstimulierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen getrennt voneinander evaluiert.

Beide durch immature BM-DCs vorstimulierten T-Zell-Subpopulationen inhibieren effektiv die Proliferation naiver T-Zellen (Abbildung 6). Wie bereits zuvor für derart vorstimulierte CD25<sup>-</sup> Gesamt-T-Zellen gezeigt, ist diese Wirkung sowohl für CD4<sup>+</sup> (Abbildung 6A), als auch für CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abbildung 6B) erkennbar Dosis-abhängig. Desweiteren kristallisiert sich in allen durchgeführten Experimenten deutlich heraus, dass die CD8<sup>+</sup> iTreg-Subpopulation ein erheblich größeres Potential hat, die Proliferation naiver T-Zellen zu inhibieren, als die entsprechenden CD4<sup>+</sup> iTregs. Bei allen nTC/pTC-Verhältnissen liegt die Proliferation naiver T-Zellen, die mit durch immature BM-DCs induzierten CD8<sup>+</sup> iTregs kokultiviert wurden, signifikant unterhalb derer beider naiver T-Zell-Kontrollansätze. CD4<sup>+</sup> iTregs sind im Vergleich dazu ab einem nTC/pTC-Verhältnis von 30:3,8 nicht mehr in der Lage, die Proliferation naiver T-Zellen signifikant zu inhibieren. Dieser Unterschied zwischen den beiden Subpopulationen hat sich auf Ebene der zuvor durchgeführten Anergie-Analysen nicht offenbart, da sie in fast identischem Maße refraktär gegenüber einer Restimulierung mit allogenen C57BL/6 Milzzellen waren (Abbildung 3).

Unstimulierte und stimulierte DEX-APCs sind ebenfalls in der Lage, CD25<sup>+</sup>-Treg-depletierte T-Zellen derart vorzustimulieren, dass die jeweilig induzierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zell-Subpopulationen die Proliferation naiver T-Zellen im Rahmen von Suppressionsansätzen

effektiv inhibieren können (Abbildung 7). Für alle analysierten iTreg Populationen gilt, dass dieser suppressive Effekt, wie schon zuvor für durch immature BM-DCs generierte CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> iTreg gezeigt (Abbildung 6), stark Dosis-abhängig ist. Weiterhin übereinstimmend mit den Daten für durch immature BM-DCs induzierte iTregs ist der durch die jeweilige CD8<sup>+</sup> iTreg-Subpopulation vermittelte suppressive Effekt stärker als der durch die entsprechenden CD4<sup>+</sup> iTregs. CD8<sup>+</sup> iTregs, die durch unstimulierte DEX-APCs induziert wurden, supprimieren die Proliferation naiver T-Zellen in dem nTC/pTC-Verhältnis 30:30 stärker als die entsprechende CD4<sup>+</sup> iTreg-Population. In allen anderen nTC/pTC-Verhältnissen unterscheiden sich die beiden iTreg Subpopulation in ihrem suppressiven Potential nicht voneinander. Durch stimulierte DEX-APCs induzierte CD8<sup>+</sup> iTregs supprimieren die Proliferation naiver T-Zellen signifikant im Vergleich zu 3 x 10<sup>5</sup> naiven T-Zellen über mehr Titrationsstufen als die entsprechenden CD4<sup>+</sup> iTregs. Dieser Unterschied im suppressiven Potential der iTreg-Subpopulationen zeigte sich innerhalb aller durchgeführten Experimente.

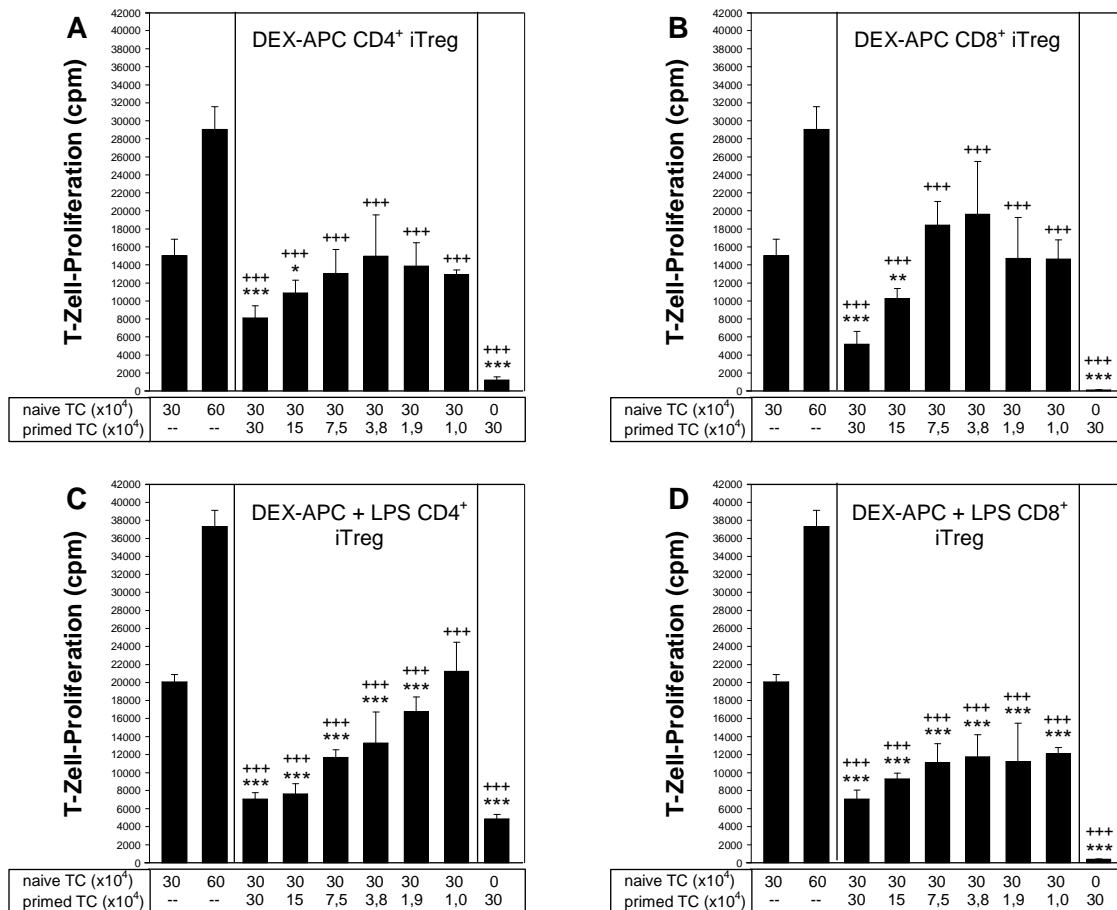


**Abbildung 6: Immature BM-DCs induzieren suppressive CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in CD25<sup>-</sup> T-Zell-Populationen.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. Bestrahlte Zellen (10<sup>6</sup>) wurden für 7 Tage mit 6 x 10<sup>6</sup> CD25<sup>+</sup> depletierten T-Zellen aus BALB/c Mäusen in 6-Loch-Platten in einem Volumen von 4 ml kokultiviert. Die verschiedenen vorstimulierten T-Zellen wurden anschließend geerntet und CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen immunmagnetisch angereichert. Durch immature BM-DCs vorstimulierte (A) CD4<sup>+</sup> und (B) CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden anschließend in seriell dreifach verdünnten Ansätzen mit 3 x 10<sup>5</sup> bestrahlten C57BL/6 Milzzellen und 3 x 10<sup>5</sup> naiven BALB/c T-Zellen für 6 Tage kokultiviert. Als Kontrolle wurden 3 x 10<sup>5</sup> bzw. 6 x 10<sup>5</sup> (Zelldichte-Kontrolle) naive BALB/c T-Zellen mit 3 x 10<sup>5</sup> bestrahlten C57BL/6 Milzzellen kokultiviert. Die T-Zell-Proliferation wurde anhand der Aufnahme von [3H]-Thymidin während der letzten 16 h der Kultur gemessen. Die Daten repräsentieren den Mittelwert der Triplikatansätze ± Standardfehler und sind für jeweils 6 Experimente repräsentativ, wobei A und B (und Abbildung 5A) aus dem gleichen Experiment stammen. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen naiven T-Zellen, die mit pTC kokultiviert wurden und 3 x 10<sup>5</sup> naiven (\*) bzw. 6 x 10<sup>5</sup> naiven T-Zellen (+) sind angegeben (\* p<0,05; \*\*,++ p<0,01; \*\*\*,+++ p<0,001).

Während beide durch DEX-APCs vorstimulierten CD25<sup>-</sup> Gesamt-T-Zell-Populationen die Proliferation naiver T-Zellen auf vergleichbarem Niveau inhibieren (Abbildung 5B, C), enthüllt die getrennte Analyse der iTregs ein voneinander abweichendes suppressives Potential.

### 3 Ergebnisse

Durch unstimulierte DEX-APCs induzierte CD4<sup>+</sup> (Abbildung 7A) und CD8<sup>+</sup> iTregs (Abbildung 7B) sind lediglich bei nTC/pTC-Verhältnissen von maximal 30:15 in der Lage, die Proliferation naiver T-Zellen signifikant zu inhibieren. Im Vergleich dazu zeigen durch stimulierte DEX-APCs induzierte CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> iTregs ein wesentlich höheres suppressives Potential. Diese beiden Populationen inhibieren die Proliferation naiver T-Zellen signifikant bis zu einem nTC/pTC-Verhältnis von 30:1,9 (CD4<sup>+</sup>) bzw 30:1 (CD8<sup>+</sup>).



**Abbildung 7: Unstimulierte und stimulierte DEX-APCs induzieren suppressive CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in CD25<sup>+</sup>-T-Zell-Populationen.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 3 wurde Aliquoten der Kultur 10<sup>-6</sup> M DEX zugesetzt. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Bestrahlte Zellen (10<sup>6</sup>) wurden für 7 Tage mit 6 x 10<sup>6</sup> CD25<sup>+</sup> depletierten T-Zellen aus BALB/c Mäusen in 6-Loch-Platten in einem Volumen von 4 ml kokultiviert. Die verschiedenen vorstimulierten T-Zellen wurden anschließend geerntet und CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen immunmagnetisch angereichert. Durch unstimulierte DEX-APCs vorstimulierte (A) CD4<sup>+</sup> und (B) CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie durch stimulierte DEX-APCs vorstimulierte (C) CD4<sup>+</sup> und (D) CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden anschließend in seriell dreifach verdünnten Ansätzen mit 3 x 10<sup>5</sup> bestrahlten C57BL/6 Milzzellen und 3 x 10<sup>5</sup> naiven BALB/c T-Zellen für 6 Tage kokultiviert. Als Kontrolle wurden 3 x 10<sup>5</sup> bzw. 6 x 10<sup>5</sup> (Zelldichte-Kontrolle) naive BALB/c T-Zellen mit 3 x 10<sup>5</sup> bestrahlten C57BL/6 Milzzellen kokultiviert. Die T-Zell-Proliferation wurde anhand der Aufnahme von [3H]-Thymidin während der letzten 16 h der Kultur gemessen. Die Daten repräsentieren den Mittelwert der Triplikatansätze ± Standardfehler und sind für jeweils 6 Experimente repräsentativ, wobei A und B (und Abbildung 5B) bzw. C und D (und Abbildung 5C) aus jeweils dem gleichen Experiment stammen. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen naiven T-Zellen, die mit pTC kokultiviert wurden und 3 x 10<sup>5</sup> naiven (\*) bzw. 6 x 10<sup>5</sup> naiven T-Zellen (+) sind angegeben (\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\*,+++ p<0,001).

Innerhalb der Restimulierungs- bzw. Suppressionsansätze mit durch unstimulierte BM-DCs induzierten CD4<sup>+</sup> iTregs wurden Triplikatansätze des jeweils ersten Titrationsverhältnisses mit verschiedenen Antikörpern bzw. Zytokinen versetzt, um so zu testen, durch welche Agenzien sich die Anergie der Zellen bzw. deren vermittelte Suppression aufheben lässt.

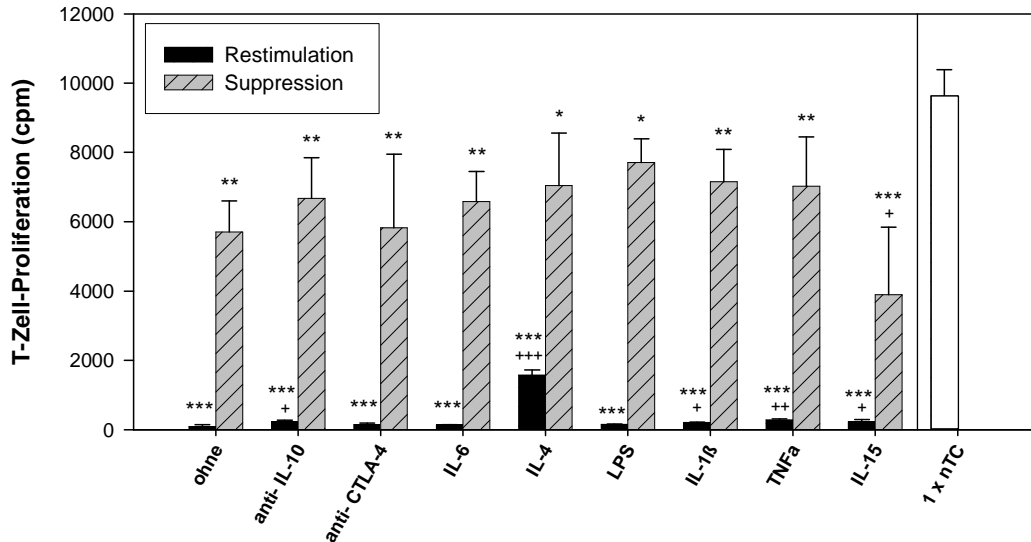
Es gibt diverse Mediatoren und Signaltransduktionswege, über die Tregs ihre suppressiven Effekte vermitteln können. Einer dieser Mediatoren ist das antiinflammatorische Zytokin IL-10, welches unter anderem von T<sub>R</sub>1-Zellen gebildet wird und als Schlüsselfaktor für deren suppressive Funktion gilt <sup>442-444</sup>. Somit kann die Neutralisierung von IL-10 mit den entsprechenden Antikörpern zu einem Verlust der suppressiven Funktion von Tregs führen. Die Zugabe von anti-IL10-Antikörpern zu Restimulierungsansätzen mit durch unstimulierte BM-DCs induzierten CD4<sup>+</sup> Tregs führt zu einer zwar signifikanten, aber dennoch geringen Steigerung der Eigenproliferation, die immer noch eindeutig unterhalb derer von 3 x 10<sup>5</sup> naiven T-Zellen liegt (Abbildung 8). Das suppressive Potential dieser iTreg-Population wird durch die Blockade von IL-10 nicht inhibiert, womit dieses Zytokin vermutlich nicht zu den essentiellen Mediatoren gehört.

Innerhalb des klassischen T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 Paradigmas gilt IL-4, das von aktivierten T-Zellen und einigen Zellen des angeborenen Immunsystems produziert wird, als das Schlüsselzytokin, das die T<sub>H</sub>2-Differenzierung fördert <sup>51</sup>. Weiterhin wurde in einer aktuellen Studie gezeigt, dass IL-4 in T-Zellen via GATA3 die Expression von Foxp3 *in vitro* und *in vivo* limitiert und somit die Induktion von iTregs inhibiert <sup>445</sup>. Der anerge Status der CD4<sup>+</sup> iTregs wird durch das Hinzufügen von IL-4 partiell aufgehoben. Im Vergleich mit allen anderen Substanzen bricht IL-4 den Proliferationsblock innerhalb dieser iTreg-Population am effizientesten. Aber auch hier befindet sich die induzierte Proliferation signifikant unterhalb derer der Kontrollgruppe. Das suppressive Potential wird durch IL-4 nicht beeinflusst.

Das Zytokin IL-6 unterstützt unter anderem die Proliferation von T-Lymphozyten sowie die Differenzierung von zytotoxischen T-Zellen und die IL-2 Produktion <sup>446</sup>. Hinzukommend trägt IL-6 zu der Differenzierung proinflammatorischer T<sub>H</sub>17-Zellen bei <sup>447,448</sup>. In diesem Kontext verhindert IL-6 die Expression von Foxp3 und damit die Generierung von Tregs bei gleichzeitiger Förderung der Entstehung von T<sub>H</sub>17-Zellen <sup>374,449</sup>. Die Zugabe von IL-6 hat keine Auswirkung auf die Anergie und die suppressive Funktion der CD4<sup>+</sup> iTregs.

Die proinflammatorischen Zytokine IL-15, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  steigern in der vorliegenden Arbeit geringfügig, aber signifikant die Eigenproliferation der analysierten iTreg-Population, während sie gleichzeitig deren suppressive Aktivität nicht negativ verändern. Die Zugabe von IL-15 verstärkt in diesem experimentellen System sogar die durch die CD4<sup>+</sup> iTregs vermittelte Suppression. IL-15 weist eine ähnliche Bioaktivität wie IL-2 auf und die Signale der beiden entsprechenden Rezeptoren werden jeweils über die sogenannte gemeinsame  $\gamma$ -Kette (*common gamma chain*,  $\gamma_c$ ) integriert <sup>450</sup>. Unter anderem induziert IL-15 die

Proliferation und Zytokinproduktion von T-Zellen<sup>451,452</sup> und steigert deren Lokomotion und Chemotaxis<sup>453,454</sup>. TNF- $\alpha$  ist in der Lage, die suppressive Funktion sowohl von nTregs, als auch von iTregs zu inhibieren<sup>455</sup>.



**Abbildung 8: Keines der getesteten Zytokine und keiner der Antikörper ist in der Lage, das suppressive Potential von durch unstimulierte BM-DCs induzierten CD4<sup>+</sup> iTregs zu vermindern.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. Bestrahlte Zellen ( $10^6$ ) wurden für 7 Tage mit  $6 \times 10^6$  CD25<sup>+</sup> depletierten T-Zellen aus BALB/c Mäusen in 6-Loch-Platten in einem Volumen von 4 ml kokultiviert. Die verschiedenen vorstimulierten T-Zellen wurden anschließend geerntet und CD4<sup>+</sup> T-Zellen immunmagnetisch angereichert. Im Restimulierungsansatz wurden  $3 \times 10^5$  CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit  $3 \times 10^5$  bestrahlten C57BL/6 Milzzellen in Triplikatsansätzen für 6 Tage kokultiviert. Für die Suppression wurden den Restimulierungsansätzen zusätzlich  $3 \times 10^5$  naive BALB/c T-Zellen zugefügt. Die verschiedenen Triplikate wurden entweder ohne oder mit Zugabe von 5  $\mu$ g/ml anti-IL10 Antikörper, 5  $\mu$ g/ml anti-CTLA-4 Antikörper, 20 ng/ml IL-6, 10 ng/ml IL-4, 1  $\mu$ g/ml LPS, 20 ng/ml IL-1 $\beta$ , 20 ng/ml TNF- $\alpha$  oder 20 ng/ml IL-15 angesetzt. Die Zugabe der entsprechenden Kontroll-Antikörper zu den jeweiligen Ansätzen hatte keinen Einfluss auf die T-Zell-Proliferation (Daten nicht gezeigt). Als Kontrollen wurden  $3 \times 10^5$  (1 x nTC) naive T-Zellen mit  $3 \times 10^5$  bestrahlten C57BL/6 Milzzellen kokultiviert. Die T-Zell-Proliferation wurde anhand der Aufnahme von [3H]-Thymidin während der letzten 16 h der Kultur gemessen. Die Daten repräsentieren den Mittelwert der Triplikatsansätze  $\pm$  Standardfehler und sind für 2 Experimente repräsentativ. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Restimulierungs- und Suppressionsansätzen und  $3 \times 10^5$  naiven (\*) bzw. Ansätzen mit und ohne Zugabe von Zytokinen oder Antikörpern (+) sind angegeben (\*<sup>+</sup> p<0,05; \*\*<sup>+</sup>,+<sup>+</sup> p<0,01; \*\*\*<sup>+</sup>,+++<sup>+</sup> p<0,001).

Erfolgt eine Kostimulation von T-Zellen nicht über CD28, sondern über CTLA-4, kommt es zu einer Verminderung der T-Zell-Proliferation<sup>456,457</sup>. Eine Blockade der inhibitorischen Signale, die über diesen Rezeptor vermittelt werden, führt zu einer verstärkten T-Zell-Antwort und induziert in vielen Tiermodellen Tumorabstoßungen<sup>458,459</sup>. Tregs besitzen weiterhin funktionale TLRs, sodass eine direkte Erkennung von LPS erfolgen kann. TLR-Signale modulieren die suppressiven Eigenschaften von Tregs sowohl positiv, als auch negativ<sup>460-462</sup>. Die Blockade von CTLA-4 mittels Antikörpern sowie die Zugabe von LPS beeinflussen weder den anergen Status noch die suppressiven Eigenschaften der CD4<sup>+</sup> iTregs.

#### **3.1.3 Durch unstimulierte BM-DCs und DEX-APCs induzierte iTregs sind insbesondere durch eine erhöhte mRNA-Expression von Foxp3 und LIF gekennzeichnet**

Die durch die verschiedene APC-Populationen *de novo* induzierten Tregs wurden nicht nur auf funktioneller Ebene im Rahmen von Restimulierungs- und Suppressionsansätzen charakterisiert (Abschnitt 3.1.2), sondern auch phänotypisch hinsichtlich der Genexpressionsprofile für bestimmte Oberflächenproteine, intrazelluläre Moleküle sowie sekretierte Mediatoren analysiert.

Durch unstimulierte BM-DCs *de novo* induzierte CD4<sup>+</sup> (Abbildung 9A) und CD8<sup>+</sup> Tregs (Abbildung 9B) zeigen jeweils eine signifikant erhöhte LAG3 (*lymphocyte activation gene-3*) mRNA-Expression, die bei CD8<sup>+</sup> iTregs wesentlich stärker ausfällt als bei CD4<sup>+</sup> iTregs. LAG3 ist ein transmembranes, CD4-verwandtes Protein, das transient auf aktivierten T-Zellen, aber wesentlich stärker und beständiger nach der Aktivierung von Tregs exprimiert wird <sup>463</sup>. In einer aktuellen Studie wurde gezeigt, dass die Bindung von LAG3 an MHCII auf DCs deren Aktivierung inhibiert und Tregs unter anderem auf diese Weise ihre suppressiven Effekte vermitteln können <sup>464</sup>.

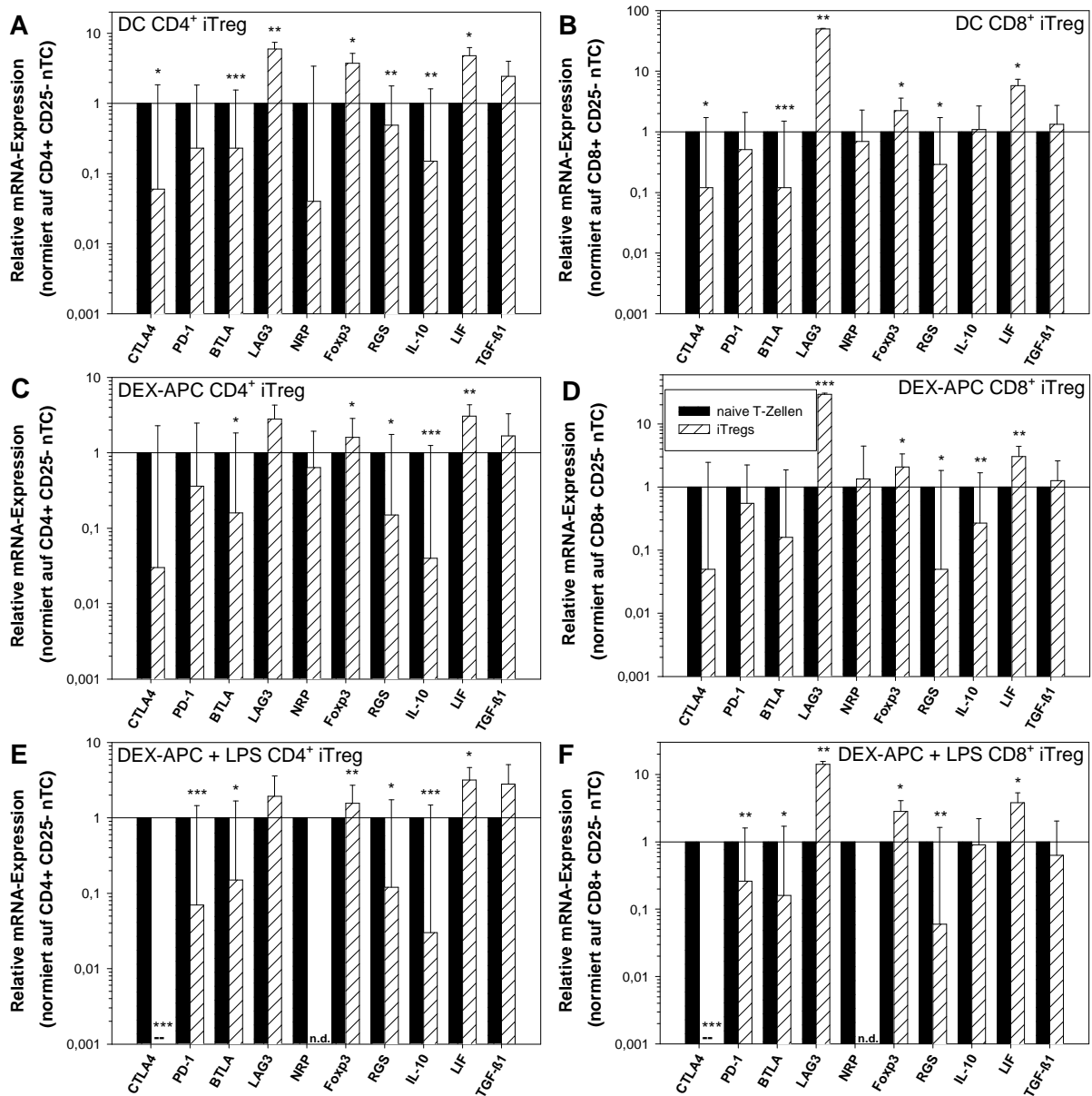
Weiterhin zeigen beide iTreg-Populationen eine verminderte BTLA (*B and T lymphocyte attenuator*) mRNA-Expression. Es handelt sich hierbei um ein CD28-Homolog <sup>465</sup>, dass mit seinem Liganden HVEM (*herpesvirus entry regulator*) interagiert <sup>466</sup> und so zur Aktivierung inhibitorischer Signalkaskaden in T-Effektorzellen führt <sup>467</sup>.

Der mRNA-Gehalt von CTLA-4 ist sowohl in durch unstimulierte BM-DCs induzierten CD4<sup>+</sup>, als auch in CD8<sup>+</sup> iTregs vermindert. Dieses Protein prägt den Phänotyp natürlicher Tregs und interagiert mit CD80 und CD86 wesentlich stärker als deren alternativer Ligand CD28 <sup>468-470</sup>. Durch Bindung von CTLA-4 an diese Rezeptoren werden T-Zellen der CD28-vermittelten Kostimulation entzogen und es kommt zu einer Reduktion der Proliferation und Zytokinproduktion, was zu einer Beendigung der Immunantwort führt <sup>456,457</sup>. Auf diese Weise können Tregs Immuntoleranz und/oder Anergie vermitteln <sup>471,472</sup>.

In beiden iTreg-Populationen findet eine erhöhte mRNA-Expression des TF Foxp3 statt. Obwohl es mehrere Biomarker gibt, die für die Identifizierung von Tregs in verschiedenen physiologischen und pathologischen Bedingungen nützlich sind, repräsentiert Foxp3 den wohl eindeutigsten und am meisten verwendeten Marker. Einzigartig für diesen Treg-Marker ist seine Beteiligung an der Entwicklung und der Vermittlung der suppressiven Funktion in diesen Zellen im murinen System <sup>109-111</sup>. Zusätzlich scheint Foxp3 das molekulare Muster von Tregs festzulegen, indem es an der Anergie und damit assoziiert der Unfähigkeit, IL-2 oder andere zum Überleben wichtige Zytokine zu produzieren, beteiligt ist <sup>473-476</sup>.



### 3 Ergebnisse



**Abbildung 9: Durch unstimulierte BM-DCs und DEX-APCs *de novo* induzierte CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Tregs zeigen eine verstärkte Foxp3 und LIF mRNA-Expression.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 3 wurde Aliquoten der Kultur 10<sup>-6</sup> M DEX zugesetzt. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Bestrahlte Zellen (10<sup>6</sup>) wurden für 7 Tage mit 6 x 10<sup>6</sup> CD25<sup>-</sup> depletierten T-Zellen aus BALB/c Mäusen in 6-Loch-Platten in einem Volumen von 4 ml kokultiviert. Die verschieden vorstimulierten T-Zellen wurden anschließend gerntet und CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen immunmagnetisch angereichert. Die relative mRNA-Expression von Genen in durch immature BM-DCs induzierten (A) CD4<sup>+</sup> und (B) CD8<sup>+</sup> iTregs, in durch unstimulierte DEX-APCs induzierten (C) CD4<sup>+</sup> und (D) CD8<sup>+</sup> iTregs sowie in durch stimulierte DEX-APCs induzierten (E) CD4<sup>+</sup> und (F) CD8<sup>+</sup> iTregs wurde mit Hilfe der quantitativen *Real-time-PCR* bestimmt. Die interne Normalisierung erfolgte über das Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Die Daten geben die relative Änderung der Genexpression in den jeweiligen *de novo* induzierten Tregs bezogen auf das Expressionsniveau in naiven CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> (A, C, E) bzw. CD8<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen (B, D, F) an. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von jeweils 3-6 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen iTregs und den entsprechenden naiven T-Zellen sind angegeben (\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001). n.d.: nicht detektiert.

In beiden durch immature BM-DCs induzierten iTreg-Populationen ist die Expression von RGS (*regulator of G-protein signalling*) Transkripten signifikant runterreguliert. RGS-Proteine inhibieren intrazelluläre Signalereignisse, die durch G-Proteine vermittelt werden, indem sie deren intrinsische GTPase Aktivität erhöhen. Diese Reaktion ist direkt für die Deaktivierung von G-Proteinen verantwortlich<sup>477-479</sup>. Es wurde gezeigt, dass die Hochregulation von RGS Molekülen in Tregs deren Chemokinrezeptoren, die intrazelluläre Signale mittels G-Proteinen integrieren, desensibilisieren und so zu einer verminderten Migration führen<sup>480</sup>.

Weiterhin weisen diese CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> iTregs ein erhöhtes LIF (*leukaemia inhibitory factor*) mRNA-Transkriptionsniveau auf. LIF ist ein neurotrophes Zytokin<sup>481</sup> und gleichzeitig ein Regulator für Stammzellen. Im Model der Transplantattoleranz wurde gezeigt, dass im Fall von Toleranz selektiv LIF sekretiert wird<sup>482</sup>. Außerdem produzieren klonale regulatorische T-Zellen ebenfalls große Mengen an LIF<sup>483</sup>.

Im Gegensatz zur entsprechenden CD8<sup>+</sup> iTreg-Population findet man in durch unstimulierte BM-DCs induzierten CD4<sup>+</sup> iTregs eine verminderte mRNA-Expression für das antiinflammatorische Zytokin IL-10. Die Sekretion löslicher Faktoren wie IL-10 und TGF- $\beta$  ist eine weitere Möglichkeit für Tregs, ihre suppressiven Effekte an andere Zellen zu vermitteln<sup>304,365,484,485</sup>.

Übereinstimmend mit durch unstimulierte BM-DCs induzierten CD4<sup>+</sup> iTregs, zeigen durch unstimulierte DEX-APCs differenzierte CD4<sup>+</sup> iTregs (Abbildung 9C) eine reduzierte BTLA, RGS und IL-10 mRNA-Expression. Außerdem ist diese iTreg Population ebenfalls durch eine erhöhte mRNA-Transkriptmenge des Treg-Markers Foxp3 gekennzeichnet. Im Gegensatz zu durch unstimulierte BM-DCs induzierten CD4<sup>+</sup> iTregs kann zwar keine signifikant verstärkte LAG3 Expression detektiert werden, dafür aber eine signifikante Hochregulation von LIF. In der entsprechenden CD8<sup>+</sup> iTreg-Population (Abbildung 9D) werden analog zu durch unstimulierte BM-DCs differenzierten CD8<sup>+</sup> iTregs die beiden Faktoren LAG3 und LIF in signifikant erhöhten Mengen transkribiert. Weiterhin zeichnen sich diese *de novo* induzierten Tregs durch eine gesteigerte mRNA-Menge an Foxp3 und eine verminderte Expression von RGS und IL-10 aus.

CD4<sup>+</sup> (Abbildung 9E) und CD8<sup>+</sup> Tregs (Abbildung 9F), die durch stimulierte DEX-APCs induziert wurden, weisen jeweils in allen Experimenten eine vergleichbar reduzierte CTLA-4 mRNA-Expression auf, wie sie bei keiner der anderen analysierten Treg Populationen festgestellt wurde.

Ein signifikant vermindertes mRNA-Niveau des PD-1 Rezeptors wurde ebenfalls ausschließlich in diesen beiden Subpopulationen gefunden. PD-1 gehört zur CD28/CTLA-4 Familie und vermittelt negative Signale in Folge einer Antigenstimulation<sup>486,487</sup>. Sowohl für PD-1 als auch für dessen Liganden PD-L1 wurde gezeigt, dass sie auf Tregs exprimiert werden, wobei jedoch bisher nicht bekannt ist, inwieweit sie die Treg-Funktion

beeinflussen<sup>488-490</sup>. Es wird postuliert, dass die Bindung von PD-1 an seine Liganden PD-L1 und PD-L2, die von zahlreichen hämatopoetischen Zellen exprimiert werden, einen möglichen Mechanismus zur Kontrolle der peripheren Toleranz darstellen könnte<sup>491-495</sup>. Zusätzlich wurde gezeigt, dass humane und murine Tregs deutlich geringere Mengen an PD-1 Molekülen auf der Oberfläche tragen als aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen<sup>496</sup>. In Folge einer antigenunspezifischen Stimulierung wird die Oberflächenexpression von PD-1 nur bei konventionellen CD4<sup>+</sup> T-Zellen, nicht aber bei Tregs hochreguliert<sup>497</sup>.

Eine bis auf ein nicht mehr detektierbares Niveau reduzierte mRNA-Expression von NRP (*neuropilin*) trat ebenfalls nur in den beiden durch stimulierte DEX-DCs induzierten iTreg-Populationen auf. NRP-1 ist ein Semaphorin III-Rezeptor<sup>498</sup>, der an der Wegfindung von Axonen beteiligt ist<sup>499</sup> und eine essentielle Komponente der humanen immunologischen Synapse darstellt<sup>500</sup>. NRP-1 wird spezifisch von Tregs, aber nicht von naiven T<sub>H</sub>-Zellen exprimiert. Weiterhin korreliert dieser Faktor mit der Expression von Foxp3 und *in vitro* mit der suppressiven Funktion von Tregs<sup>501</sup>.

Analog zu allen anderen analysierten iTreg-Populationen findet auch in diesem Fall eine signifikante Hochregulation der LIF und der Foxp3 Expression sowie zeitgleich eine deutlich verminderte RGS-Expression statt.

In Übereinstimmung mit den beiden anderen analysierten CD4<sup>+</sup> iTreg-Populationen ist in durch stimulierte DEX-APCs differenzierten CD4<sup>+</sup> iTregs die IL-10 mRNA-Menge signifikant geringer als in naiven T-Zellen. Diese starke Reduktion der IL-10 Expression tritt in den entsprechenden CD8<sup>+</sup> iTregs nicht auf.

Demgegenüber konnte in den entsprechenden CD8<sup>+</sup> iTregs, analog zu allen anderen *de novo* induzierten CD8<sup>+</sup> iTreg-Population, eine deutlich verstärkte Expression von LAG3 mRNA nachgewiesen werden. Damit ist eine Hochregulation der LAG3 mRNA bevorzugt in CD8<sup>+</sup> iTregs zu beobachten. Lediglich durch immature BM-DCs induzierte CD4<sup>+</sup> iTregs zeigen eine verstärkte LAG3 mRNA-Expression, wobei in diesen die Hochregulation nicht so stark ist wie in CD8<sup>+</sup> iTregs.

Im Rahmen einer Stimulation von Tregs kann es zur Aufhebung ihres anergen Status bzw. der vermittelten Suppression kommen. Auch wenn dieses nicht eintritt, könnte im Rahmen einer Stimulation eine Veränderung im Genexpressionsprofil der Tregs stattfinden. Für entsprechende Genexpressionsanalysen wurden die iTregs mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern stimuliert. Durch anti-CD3 erfolgt die Stimulation des T-Zell-Rezeptors und durch anti-CD28 gleichzeitig die notwendige Stimulation des CD28 Moleküls. Somit ist durch eine Kombination beider Antikörper eine direkte Stimulation von T-Zellen ohne APCs möglich.

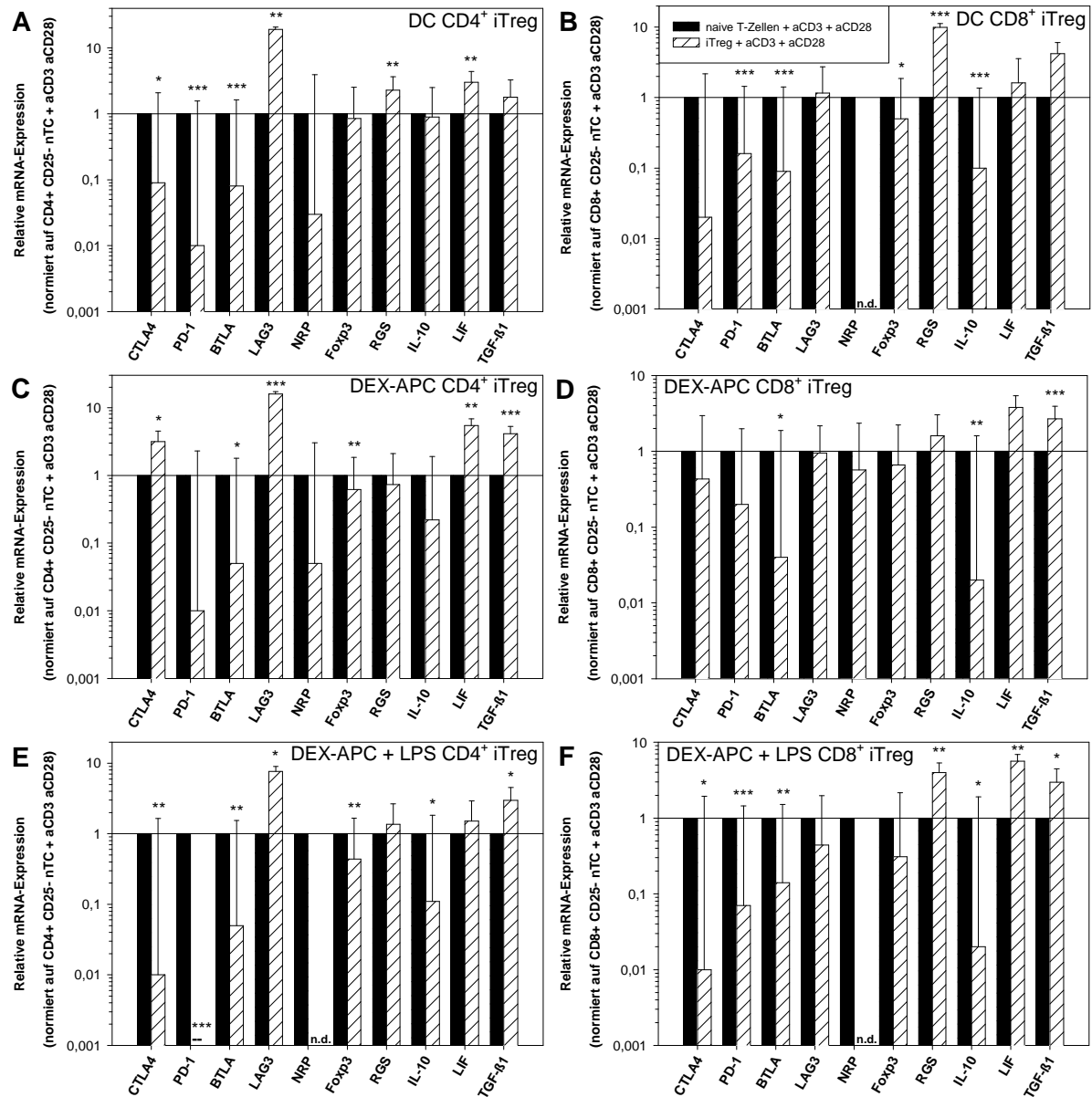
Die Stimulation der verschiedenen iTreg-Populationen durch anti-CD3- und anti-CD28-Antikörper führt jeweils zu einer reduzierten Expression des Treg-Markers Foxp3 (Abbildung 10). Dieser wurde zuvor in allen iTreg-Populationen signifikant stärker exprimiert als in der

entsprechenden naiven T-Zell-Population (Abbildung 9). Auffällig ist weiterhin, dass es in Folge der Stimulation bei allen analysierten iTreg-Gruppen zu einer gesteigerten Expression der RGS mRNA kommt. In keiner der iTreg-Populationen kommt es zu einer signifikanten Veränderung des NRP mRNA-Gehalts. Die mRNA-Expression von BTLA wird lediglich in durch unstimulierte DEX-APCs induzierten CD8<sup>+</sup> iTregs (Abbildung 10D) runterreguliert, alle anderen iTreg Populationen bleiben diesbezüglich unbeeinflusst. In allen CD8<sup>+</sup> iTreg-Populationen wird die Menge an LAG3 mRNA im Zuge der Stimulation vermindert. Das Verhalten der CD4<sup>+</sup> iTregs ist dabei inhomogener. CD4<sup>+</sup> iTregs, die durch unstimulierte (Abbildung 10C) oder stimulierte DEX-APCs (Abbildung 10E) induziert wurden, reagieren mit einer verstärkten LAG3 mRNA-Expression, während durch unstimulierte BM-DCs induzierte CD4<sup>+</sup> iTregs (Abbildung 10A) keine wesentlich veränderte Expression dieses Gens aufweisen. Die mRNA-Expression von LIF wird in den meisten iTreg Populationen durch die Stimulation kaum moduliert. Lediglich CD8<sup>+</sup> iTregs, die durch unstimulierte BM-DCs induziert wurden (Abbildung 10B), reagieren mit einer runterregulierten LIF mRNA-Expression. Die Expression von PD-1 mRNA findet in beiden durch immature BM-DCs induzierten iTreg-Gruppen (Abbildung 10A und B) sowie vor allem in CD4<sup>+</sup> iTregs, die durch stimulierte DEX-APCs induziert wurden, in verminderter Form nach der Stimulation statt. In den anderen induzierten Treg-Gruppen unterliegt die PD-1 mRNA-Menge keiner stimulationsabhängigen Regulation. Eine Steigerung der Expression des antiinflammatorischen Zytokins TGF-β1 in Folge einer Stimulation ergibt sich in allen CD8<sup>+</sup> iTreg-Populationen sowie in CD4<sup>+</sup> iTreg, die durch unstimulierte DEX-APCs differenziert wurden (Abbildung 10C). In den beiden anderen CD4<sup>+</sup> iTreg-Populationen tritt diese stimulationsassoziierte Modulation der TGF-β1-Transkription nicht auf. Auch die mRNA-Expression von CTLA-4 wird in der Mehrzahl der iTreg-Gruppen positiv reguliert. Mit Ausnahme von iTregs, die durch immature BM-DCs induziert wurden, weisen alle analysierten iTreg-Populationen nach einer kombinierten anti-CD3- und anti-CD28-Stimulation eine verstärkte Expression dieses Gens auf.

Die Regulation der mRNA-Expression von IL-10 in Reaktion auf eine Stimulation ist innerhalb der verschiedenen CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> iTreg-Gruppen jeweils homogen. In allen CD8<sup>+</sup> iTreg-Populationen (Abbildung 10B, D, F) wird die IL-10-Expression in Reaktion auf eine Stimulierung vermindert, während alle CD4<sup>+</sup> iTreg-Gruppen im Gegensatz dazu mit einer verstärkten IL-10 mRNA-Expression reagieren (Abbildung 10A, C, F).

Zusammenfassend zeigt sich also, dass alle *de novo* durch immature BM-DCs und DEX-APCs induzierten iTreg-Populationen einheitlich durch eine signifikant erhöhte Expression der Treg-assoziierten Marker Foxp3 und LIF gekennzeichnet sind, ansonsten aber stark divergierende Genexpressionsprofile aufweisen. In Reaktion auf eine Stimulation findet in allen analysierten iTreg-Populationen eine spezifische, teilweise überlappende Modulation der Genexpression statt.

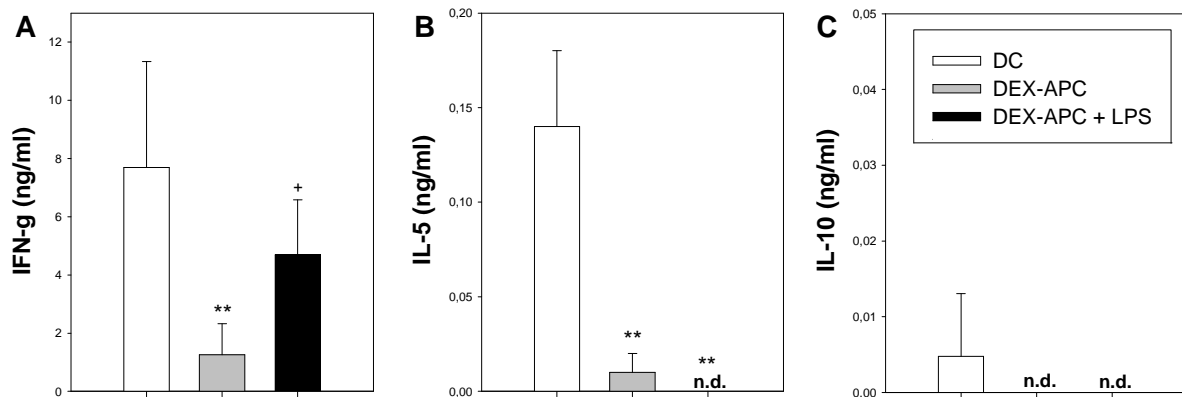
### 3 Ergebnisse



**Abbildung 10: Die Stimulation von *de novo* induzierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Tregs mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern führt zur einer Veränderung der Genexpression.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 3 wurde Aliquoten der Kultur 10<sup>-6</sup> M DEX zugesetzt. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Bestrahlte Zellen (10<sup>6</sup>) wurden für 7 Tage mit 6 x 10<sup>6</sup> CD25<sup>+</sup> depletierten T-Zellen aus BALB/c Mäusen in 6-Loch-Platten in einem Volumen von 4 ml kokultiviert. Die verschiedenen vorstimulierten T-Zellen wurden anschließend geerntet und CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen immunmagnetisch angereichert. Die Stimulation der verschiedenen Tregs erfolgte für 24h mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern. Die relative mRNA-Expression von Genen in durch immature BM-DCs induzierten (A) CD4<sup>+</sup> und (B) CD8<sup>+</sup> iTregs, in durch unstimulierte DEX-APCs induzierten (C) CD4<sup>+</sup> und (D) CD8<sup>+</sup> iTregs sowie in durch stimulierte DEX-APCs induzierten (E) CD4<sup>+</sup> und (F) CD8<sup>+</sup> iTregs wurde mit Hilfe der quantitativen *Real-time-PCR* bestimmt. Die interne Normalisierung erfolgte über das Haushaltgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Die Daten geben die relative Änderung der Genexpression in den jeweiligen *de novo* induzierten Tregs bezogen auf das Expressionsniveau in naiven CD4<sup>+</sup> (A, C, E) bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen (B, D, F) an. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von jeweils 3-4 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Tregs und den entsprechenden naiven T-Zellen sind angegeben (\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001). n.d.: nicht detektiert.

### 3.1.4 Durch unstimulierte BM-DCs und DEX-APCs *de novo* induzierte Tregs zeigen divergierende Zytokin-Antworten

Die durch die verschiedenen APC-Populationen *de novo* induzierten Tregs weichen nicht nur in ihren funktionellen Eigenschaften, wie der Stärke des anergen Status und dem suppressiven Potential voneinander ab (Abschnitt 3.1.2), sondern divergieren auch in ihren Genexpressionsprofilen (Abschnitt 3.1.3). Auf Grund der genannten Resultate ist es sehr wahrscheinlich, dass auch die jeweiligen iTreg-Zytokinprofile voneinander abweichen. Diese wurden im Folgenden für die unterschiedlichen T-Zell Populationen experimentell bestimmt. Die Analyse der Zytokinproduktion von T-Zellen, die für 7 Tage mit den unterschiedlich behandelten APC-Populationen kokultiviert wurden, demonstriert signifikant divergente Profile (Abbildung 11).



**Abbildung 11: In Kokulturen allogener CD25<sup>-</sup> T-Zellen mit unstimulierten und stimulierten DEX-APCs ist die Konzentration von T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Markerzytokinen geringer als in Kokulturen mit immaturren BM-DCs.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 3 wurde Aliquoten der Kultur 10<sup>-6</sup> M DEX zugesetzt. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Bestrahlte Zellen (10<sup>6</sup>) wurden für 7 Tage mit 6 x 10<sup>6</sup> CD25<sup>+</sup> depletierten T-Zellen aus BALB/c Mäusen in 6-Loch-Platten in einem Volumen von 4 ml kokultiviert. Anschließend wurden die Kulturüberstände geerntet und der Gehalt von (A) IFN-γ, (B) IL-5 und (C) IL-10 mittels ELISA bestimmt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von jeweils 3 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber T-Zellen, die mit unstimulierten BM-DCs kokultiviert wurden (\*) sowie zwischen T-Zellen, die mit unstimulierten oder stimulierten DEX-APCs kokultiviert wurde (+) sind angegeben (\* p<0,05; \*\* p<0,01). n.d.: nicht detektiert.

In Kokulturen allogener CD25<sup>-</sup> BALB/c T-Zellen mit unstimulierten oder LPS-stimulierten DEX-APCs ist die Konzentration des T<sub>H</sub>1-Markerzytokins IFN-γ deutlich geringer als in den entsprechenden Kokulturen mit immaturren BM-DCs (Abbildung 11A). Die signifikant geringste IFN-γ Konzentration weisen Kokulturen mit unstimulierten DEX-APCs auf. Zusätzlich sind mit unstimulierten oder stimulierten DEX-APCs kokultivierte T-Zellen im Vergleich zu durch unstimulierte BM-DCs aktivierten T-Zellen durch eine jeweils signifikant

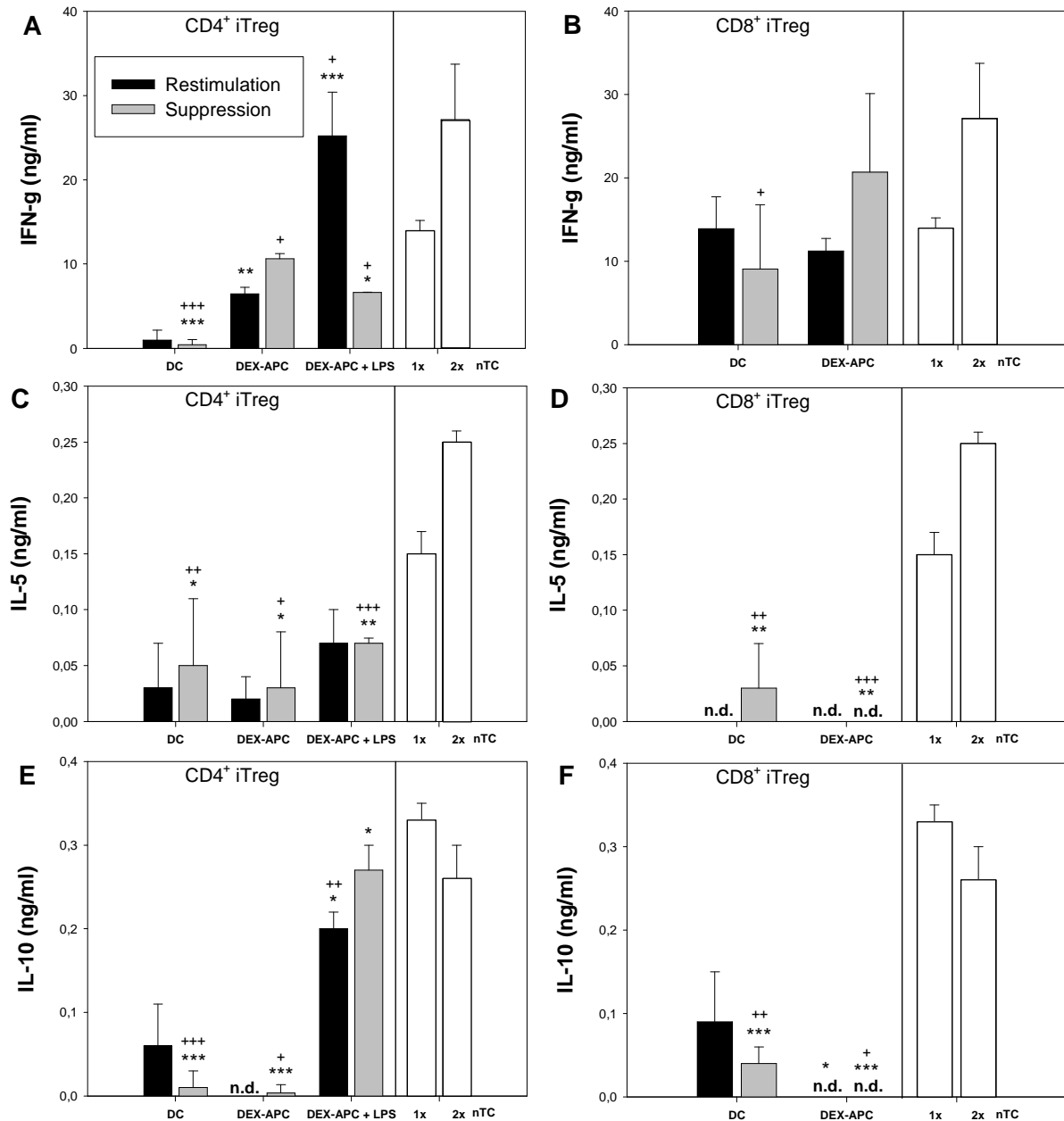
geringere Produktion des  $T_H2$ -Markerzytokins IL5 charakterisiert (Abbildung 11B). Nach einer Kokultivierung  $CD25^+$  depletierter T-Zellen mit einer der beiden DEX-APC-Populationen ist das ambivalente  $T_H2$ /Treg-Markerzytokin IL-10 im entsprechenden Überstand jeweils nicht nachweisbar (Abbildung 11C). Demgegenüber wird dieses Zytokin in Kokulturen mit unstimulierten BM-DCs in geringen Mengen detektiert.

Neben dem Zytokinprofil unterschiedlich vorstimulierter  $CD25^-$  Gesamt-T-Zell-Populationen wurde weiterhin die Zytokinantwort positiv angereicherter, *de novo* induzierter  $CD4^+$  und  $CD8^+$  iTregs in Restimulationsansätzen sowie das Zytokinmuster in den entsprechenden Suppressionsansätzen mit naiven T-Zellen analysiert.

$CD4^+$  iTregs, die durch LPS-stimulierte DEX-APCs induziert wurden, sekretieren infolge einer allogenen Restimulation signifikant höhere Mengen des  $T_H1$ -Markerzytokins IFN- $\gamma$  als durch unstimulierte BM-DCs oder unstimulierte DEX-APCs induzierte  $CD4^+$  iTregs (Abbildung 12A). Der signifikant geringste IFN- $\gamma$ -Gehalt ist in Restimulationsansätzen mit durch unstimulierte BM-DCs differenzierten  $CD4^+$  iTregs nachgewiesen worden. Unabhängig von der zur Induktion verwendeten APC-Gruppe produzieren alle  $CD4^+$  iTreg-Populationen vergleichbare Mengen des  $T_H2$ -Markerzytokins IL-5 (Abbildung 12C). Die signifikant stärkste Produktion des ambivalenten  $T_H2$ /Treg-Markerzytokins IL-10 in Reaktion auf eine Restimulation weisen durch stimulierte DEX-APCs induzierte  $CD4^+$  iTregs auf. Im Gegensatz dazu sind durch unstimulierte BM-DCs und DEX-APCs induzierte  $CD4^+$  iTregs durch eine geringere bzw. eine nicht vorhandene IL-10 Sekretion gekennzeichnet (Abbildung 12E).

Im Gegensatz zu den entsprechenden  $CD4^+$  iTregs ist die IFN- $\gamma$ -Sekretion von durch unstimulierte BM-DCs oder unstimulierte DEX-APCs induzierten  $CD8^+$  iTregs vergleichbar stark (Abbildung 12B). Interessanterweise sekretieren diese beiden Zellpopulationen nach einer Restimulation kein IL-5 (Abbildung 12D). Während durch immature BM-DCs induzierte  $CD8^+$  iTregs in Restimulationsansätzen IL-10 produzieren, wird dieses Zytokin von  $CD8^+$  iTregs, die durch unstimulierte DEX-APCs induziert wurden, nicht sekretiert (Abbildung 12F). Eine Inhibition der IFN- $\gamma$  Produktion kokultivierter naiver T-Zellen wird durch  $CD4^+$  iTregs vermittelt, die durch immature BM-DCs oder stimulierte DEX-APCs induziert wurden. Unabhängig von der zur Induktion verwendeten APC-Population ist in allen Suppressionsansätzen mit  $CD4^+$  iTregs der IL-5-Gesamtgehalt jeweils signifikant reduziert im Vergleich zu den Kontrollansätzen mit  $3 \times 10^6$  naiven T-Zellen (Abbildung 12A und C). Zusätzlich supprimieren durch unstimulierte BM-DCs und DEX-APCs induzierte  $CD4^+$  iTregs effektiv die IL-10 Produktion naiver T-Zellen (Abbildung 12E). Im Gegensatz dazu ist die IL-10 Konzentration in Suppressionsansätzen mit durch stimulierte DEX-APCs induzierten  $CD4^+$  iTregs nur geringfügig geringer als in der entsprechenden Kontrolle.

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 12: Durch verschiedene APCs induzierte CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> iTregs zeigen infolge einer Restimulation ein jeweils spezifisches Zytokinprofil und supprimieren die Zytokinantwort naiver T-Zellen in unterschiedlicher Weise.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 3 wurde Aliquoten der Kultur 10<sup>-6</sup> M DEX zugesetzt. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Bestrahlte Zellen (10<sup>6</sup>) wurden für 7 Tage mit 6 x 10<sup>6</sup> CD25<sup>+</sup> depletierten T-Zellen aus BALB/c Mäusen in 6-Loch-Platten in einem Volumen von 4 ml kokultiviert. Die verschiedenen vorstimulierten T-Zellen wurden anschließend gerntet und CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen immunmagnetisch angereichert. Für die Restimulation wurden 3 x 10<sup>6</sup> durch die verschiedenen APC-Populationen differenzierte (A, C und E) CD4<sup>+</sup> und (B, D und F) CD8<sup>+</sup> iTregs mit 3 x 10<sup>6</sup> bestrahlten C57BL/6 Milzzellen in einem Volumen von 2 ml für 6 Tage kokultiviert. Für die Suppression wurden den Restimulierungsansätzen zusätzlich 3 x 10<sup>6</sup> naive BALB/c T-Zellen zugefügt. Als Kontrollen wurden 3 x 10<sup>6</sup> (1 x nTC) bzw. 6 x 10<sup>6</sup> (2 x nTC) naive T-Zellen mit 3 x 10<sup>6</sup> bestrahlten C57BL/6 Milzzellen in einem Volumen von 2 ml kokultiviert. Anschließend wurden die Kulturüberstände gerntet und der Gehalt an (A und B) IFN-γ, (B und D) IL-5 und (E und F) IL-10 mittels ELISA bestimmt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von je 4 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede in Restimulierungsansätzen gegenüber durch unstimulierte DCs induzierten iTregs (\*) und zwischen iTregs, die durch unstimulierte oder stimulierte DEX-APCs induziert wurden (+) sowie in Suppressionsansätzen mit unterschiedlichen iTregs gegenüber 1 x nTCs (\*) und 2 x nTCs (+), sind angegeben (\*: p<0,05; \*\*: p<0,01; \*\*\*: p<0,001). n.d.: nicht detektiert.



CD8<sup>+</sup> iTregs, die durch unstimulierte BM-DCs oder DEX-APCs induziert wurden, haben im Gegensatz zu den entsprechenden CD4<sup>+</sup> iTreg-Populationen keine regulatorische Wirkung auf die IFN- $\gamma$  Produktion kokultivierter naiver T-Zellen (Abbildung 12B). Andererseits ist die IL-5 Konzentration in den Suppressionsansätzen beider CD8<sup>+</sup> iTreg-Populationen im Unterschied zu Kontrollansätzen mit  $3 \times 10^6$  naiven T-Zellen signifikant reduziert (Abbildung 12D). In Ansätzen mit CD8<sup>+</sup> iTregs, die durch unstimulierte DEX-APCs induziert wurden, ist dieses Zytokin nicht mehr nachweisbar. Darüber hinaus supprimieren beide CD8<sup>+</sup> iTreg-Populationen signifikant die IL-10 Produktion, wobei auch dieses Zytokin in Suppressionsansätzen mit durch unstimulierte DEX-APCs induzierten CD8<sup>+</sup> iTregs nicht mehr detektiert wird (Abbildung 12F).

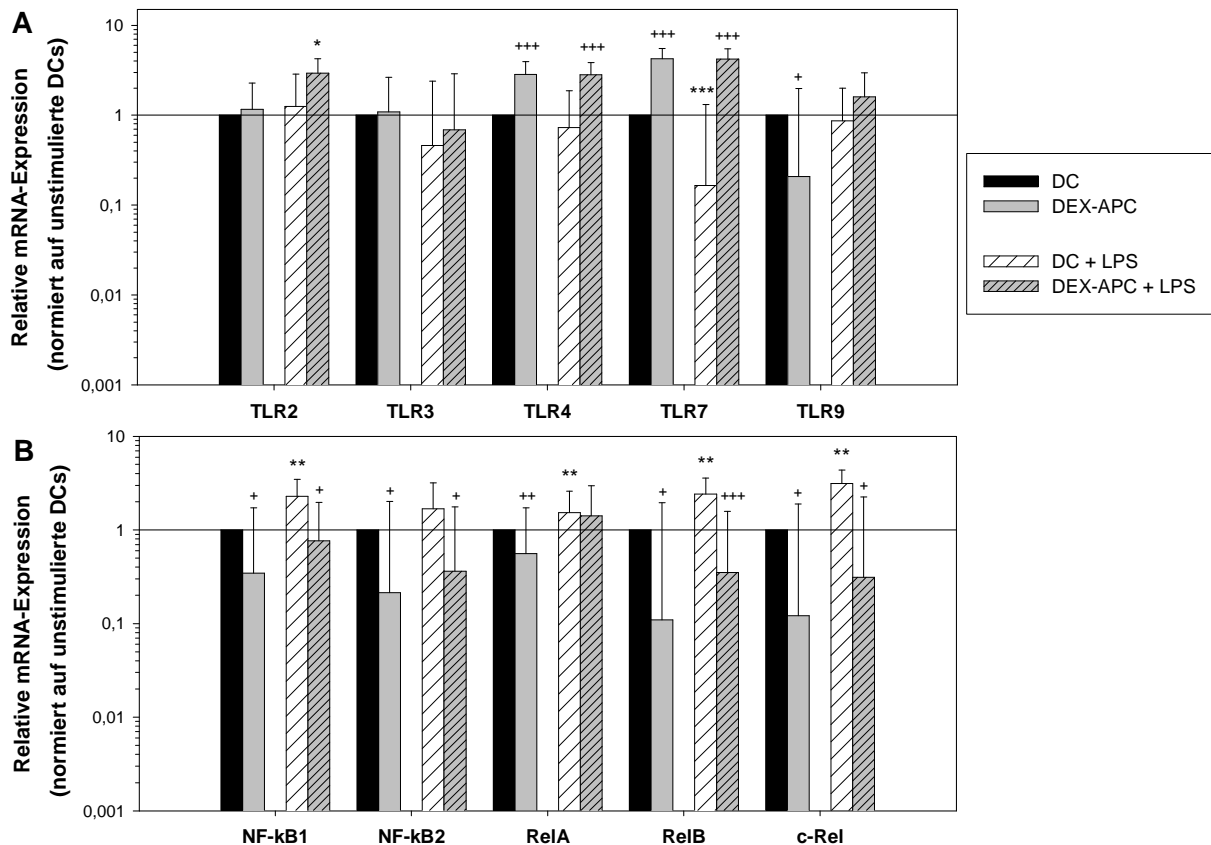
#### **3.1.5 DEX-APCs zeichnen sich phänotypisch durch ein protolerogenes Genexpressionsprofil aus**

In den vorhergehenden Abschnitten dieses Kapitels wurde gezeigt, dass DEX-APCs, unabhängig von ihrem Aktivierungszustand, das Potential haben, *de novo* iTregs zu induzieren und somit eine tolerogene Funktion besitzen. Auf Basis einer Analyse des Genexpressionsprofils dieser Modell-APCs sollte im Folgenden eine Identifikation potentieller toleranzassoziiertes Schlüsselmoleküle für eine gerichtete genetische Modifikation in BM-DCs erfolgen.

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass die entzündungsinhibierende Wirkung von GCs unter anderem auf einer reduzierten Aktivität der Transkriptionsfaktoren (TF) NF- $\kappa$ B<sup>171</sup> und AP-1<sup>172</sup> basiert. Zusätzlich wirkt der aktivierte Glucocorticoidrezeptor selbst als TF und reguliert so direkt die Transkription verschiedener Gene<sup>164,502</sup>. Die durch unterschiedliche Mechanismen übertragene GC-abhängige Modulation der Genexpression resultiert in DCs in einer veränderten mRNA-Transkription von Oberflächenrezeptoren, proinflammatorischen Zytokinen sowie DEX-responsiven Genen<sup>157,503</sup>.

TLRs spielen eine entscheidende Rolle in der angeborenen Verteidigung des Immunsystems gegen Mikroorganismen, indem sie an der Erkennung konservierter molekularer Muster mikrobiellen Ursprungs, den sogenannten PAMPs, beteiligt sind<sup>504,505</sup>. Als erstes identifiziert und bis heute am besten untersucht ist TLR4, der *Signal-Transducer* für LPS<sup>506</sup>. Die Liganden für TLR2 sind Lipoproteine und Peptidoglykane<sup>507</sup>, für TLR3 doppelsträngige RNA<sup>508</sup>, für TLR7 einzelsträngige RNA<sup>509</sup> und für TLR9 nicht-methylierte CpG DNA<sup>510</sup>. Eine Aktivierung von TLRs resultiert in der Initiation von Signaltransduktionskaskaden, die wiederum zu inflammatorischen Immunantworten führen<sup>511-513</sup>.

Im Rahmen der Ausreifung mit LPS weisen BM-DCs gegenüber unstimulierten BM-DCs eine unveränderte (TLR2, TLR3, TLR4, TLR9) oder sogar verminderte Expression (TLR7) verschiedener TLR mRNAs auf (Abbildung 13A). In unstimulierten DEX-APCs ist im Vergleich zu der entsprechenden Kontroll-Population ohne DEX-Behandlung die Expression von TLR4 und TLR7 signifikant höher, während TLR9 signifikant vermindert exprimiert wird. Die Stimulierung von DEX-APCs mit LPS führt bei keiner mRNA-Spezies außer TLR2 zu einer Steigerung der Expression.



**Abbildung 13: In Gegenwart von Dexamethason generierte APCs weisen eine veränderte Genexpression von Toll-like Rezeptoren und NF-κB Familien-Mitgliedern auf.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 3 wurde Aliquoten der Kultur  $10^{-6}$  M DEX zugesetzt. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit  $1 \mu\text{g/ml}$  LPS für 24 h. Die relative mRNA-Expression von Genen, die für (A) TLRs und (B) NF-κB Familien-Mitglieder kodieren, wurde mit Hilfe der quantitativen *Real-time-PCR* bestimmt. Die interne Normalisierung erfolgte über das Haushaltgen Ubiquitin C (UBC). Die Daten geben die relative Änderung der Genexpression in DEX-APCs, LPS-stimulierten BM-DCs und LPS-stimulierten DEX-APCs bezogen auf das Expressionsniveau in unstimulierten BM-DCs an. Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler von jeweils 3-8 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten DEX-APCs bzw. DCs (\*) sowie zwischen DEX-APCs und DCs in beiden Aktivierungszuständen (+) sind angegeben (\*<sup>+</sup>  $p < 0,05$ ; \*\*,++  $p < 0,01$ ; \*\*\*,+++  $p < 0,001$ ).

In Säugerzellen besteht die NF-κB-Familie aus fünf Mitgliedern: RelA, RelB, NF-κB1, NF-κB2 und c-Rel<sup>252</sup>. NF-κB TFs sind evolutionär konservierte Signalmoleküle, die unter anderem eine essentielle Rolle in der angeborenen sowie der adaptiven Immunität spielen<sup>232</sup>. In

diesem Kontext agieren NF- $\kappa$ B-Komplexe entweder als Aktivatoren oder Repressoren der Genexpression<sup>514</sup>. Die Aktivierung von DCs via TLRs oder Zytokinrezeptor-Liganden führt zur Translokation von Mitgliedern der NF- $\kappa$ B-Familie in den Nukleus<sup>515</sup> und dort unter anderem zu deren verstärkter Expression<sup>171</sup>.

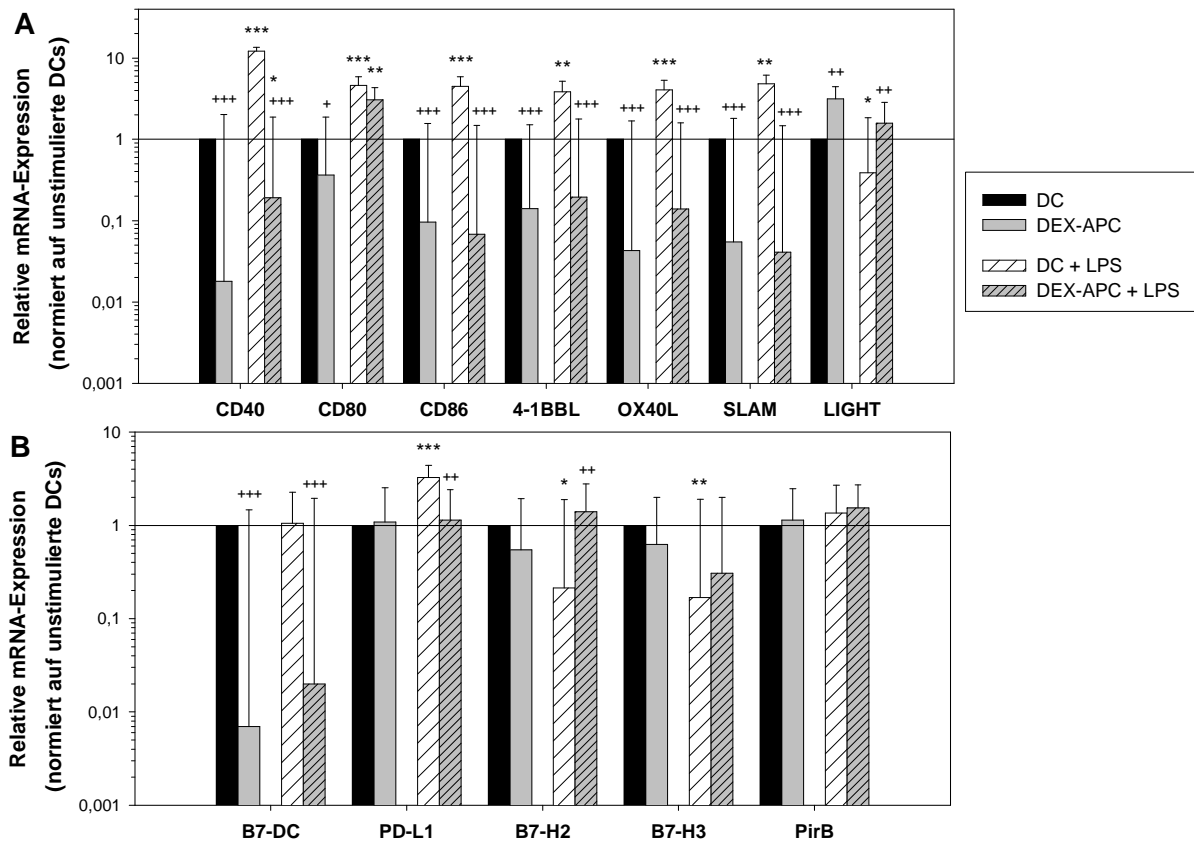
Dementsprechend sind LPS-stimulierte BM-DCs durch eine signifikant erhöhte Expression aller NF- $\kappa$ B-Familienmitglieder auf mRNA-Ebene gekennzeichnet, die nur im Fall von NF- $\kappa$ B2 nicht signifikant ist (Abbildung 13B). DEX-APCs weisen eine deutlich verringerte Expression dieser Moleküle auf, die auch im Rahmen der Stimulierung jeweils nur moderat erhöht wird. Im stimulierten Zustand weisen DEX-APCs, mit Ausnahme von RelA, signifikant verminderte Expressionsniveaus der NF- $\kappa$ B-Komponenten im Vergleich zur entsprechenden Kontroll-DC-Population auf.

Die Behandlung von DCs mit DEX resultiert in einer verminderten Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD86 sowie von MHCII-Molekülen<sup>173</sup>. Die Interaktion von CD80 und CD86 mit CD28 oder CTLA-4 auf T-Zellen ist der am besten charakterisierte regulatorische Wirkmechanismus, der in der Aktivierung bzw. Inhibierung von T-Zellen resultiert<sup>470,516,517</sup>. CD40 ist ein weiteres Oberflächenmolekül, das essentiell für den Crosstalk zwischen T-Zellen und APCs ist. Die Stimulation von DCs durch CD40/CD40L Interaktion führt zur Hochregulation von MHCI-, MHCII und akzessorischen Molekülen wie CD80/CD86 sowie zu einer Produktion von Zytokinen wie IL-12<sup>140</sup> und IL-1. In der Summe führen diese Faktoren zu einer erhöhten Kapazität der DCs, T-Zellen effektiv zu stimulieren<sup>518,519</sup>. Für die Expression kostimulatorischer Moleküle ist die Aktivität des TF NF- $\kappa$ B, dessen Komponenten durch eine Stimulierung mit LPS erhöht exprimiert werden (Abbildung 13B), unerlässlich.

In Übereinstimmung damit wird die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 sowie darüber hinaus von 4-1BB-Ligand, OX40-Ligand sowie SLAM (*signaling lymphocyte activation molecule*) in stimulierten BM-DCs signifikant hochreguliert (Abbildung 14A).

Signale, die durch 4-1BBL vermittelt werden, resultieren in einer Induktion der Proliferation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen<sup>520</sup>. In neueren Studien wurde gezeigt, dass mittels 4-1BB-Ligation sowohl die klonale Expansion, als auch das Überleben von CD8<sup>+</sup> T-Zellen reguliert wird<sup>521,522</sup>. Demgegenüber führt die Interaktion von OX40L mit seinem Bindungspartner OX40 zur Induktion der Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen<sup>523</sup> und stimuliert die Produktion unter anderem von IL-2 und IL-4<sup>524</sup>. Bei dem Oberflächenmolekül SLAM handelt es sich um einen Selbst-Ligand-Rezeptor, der auf der Oberfläche von aktivierten T- und B-Zellen, Lymphozyten, Makrophagen und DCs zu finden ist<sup>525-527</sup>. Die Oberflächenexpression von SLAM wird durch verschiedene Maturierungsstimuli (z.B. TLR Agonisten, proinflammatorische Zytokine, CD40-Ligation) in DCs hochreguliert<sup>528-530</sup>. Die Funktion von SLAM-SLAM-Interaktionen wird

kontrovers diskutiert; es gibt Studien, die einen proinflammatorischen<sup>530</sup> bzw. antiinflammatorischen Effekt<sup>531</sup> belegen.



**Abbildung 14: In Gegenwart von Dexamethason generierte APCs weisen eine veränderte Genexpression von kostimulatorischen und koinhibitorischen Rezeptoren auf.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 3 wurde Aliquoten der Kultur  $10^{-6}$  M DEX zugesetzt. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit  $1 \mu\text{g/ml}$  LPS für 24 h. Die relative mRNA-Expression von Genen, die für (A) kostimulatorische und (B) koinhibitorische Rezeptoren kodieren, wurde mit Hilfe der quantitativen *Real-time-PCR* bestimmt. Die interne Normalisierung erfolgte über das Haushaltsgen Ubiquitin C (UBC). Die Daten geben die relative Änderung der Genexpression in DEX-APC, LPS-stimulierten BM-DC und LPS-stimulierten DEX-APC bezogen auf das Expressionsniveau in unstimulierten DC an. Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler von jeweils 3-8 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten DEX-APCs bzw. DCs (\*) sowie zwischen DEX-APCs und DCs in beiden Aktivierungszuständen (+) sind angegeben (\*, \* p<0,05; \*\*, \*\* p<0,01; \*\*\*, \*\*\* p<0,001; \*\*\*\*, \*\*\*\* p<0,0001).

Unstimulierte DEX-APCs zeigen, im Vergleich zu unstimulierten BM-DCs eine signifikant verminderte mRNA-Expression aller genannten, für kostimulatorische Moleküle kodierenden Gene. Im Rahmen der Stimulierung mit LPS steigt lediglich die Expression von CD40 und CD80 in DEX-APCs signifikant an. Interessanterweise liegen die mRNA-Transkriptmengen fast aller analysierten kostimulatorischen Moleküle bei stimulierten DEX-APCs unterhalb des Niveaus unstimulierter BM-DCs.

Im Unterschied zu den vorgenannten Transkripten ist die Expression von LIGHT mRNA in unstimulierten DEX-APCs signifikant stärker als in unstimulierten BM-DCs. Dieser Effekt wird

auch durch die Stimulierung der Zellen mit LPS nicht weiter erhöht, jedoch liegt das Gesamtniveau in stimulierten DEX-APCs geringfügig, aber signifikant über dem stimulierter BM-DCs. Die immunologische Rolle von LIGHT ist bisher nicht klar. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass eine Blockade von LIGHT die frühe T-Zell-Proliferation und Zytokinsekretion in allogenen MLRs inhibiert<sup>532-534</sup>. Im Gegensatz dazu sind LIGHT-defiziente DCs uneingeschränkt in der Lage, *in vitro* die Proliferation von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in allogenen MLRs zu stimulieren<sup>535</sup>.

Neben kostimulatorischen Molekülen besitzen DCs auch Zelloberflächenmoleküle, die inhibitorische Funktionen erfüllen. Zwei dieser Moleküle, B7-DC<sup>536</sup> und PD-L1<sup>537</sup>, stellen die Liganden des PD-1 Rezeptors dar. Beide Moleküle scheinen sowohl positive kostimulatorische als auch negative Signale zu vermitteln<sup>538,539</sup>. Neuere Studien zeigen, dass B7-DC und PD-L1 *in vivo* an der Runterregulierung von T-Zell Antworten und an der Aufrechterhaltung der T-Zell-Toleranz beteiligt sind<sup>540,541</sup>. Der Bindungspartner von B7-H2 ist ICOS, welches von aktivierten T-Zellen exprimiert wird<sup>195</sup>. Die Interaktion der beiden Moleküle führt zur Induktion der T-Zell-Proliferation sowie zur Sekretion von IL-4, IFN- $\gamma$  und IL-10<sup>194,195</sup>, nicht jedoch zur Produktion des potenten T<sub>H</sub>1-Zytokins IL-2. Der Schwerpunkt einer B7-H2-Kostimulation scheint trotz einer Induktion der Produktion von T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zytokinen auf einer Stimulierung der Funktionalität von T<sub>H</sub>2-Effektorzellen zu liegen<sup>197,198</sup>. Da die Expression von B7-H3 in murinen DCs durch IFN- $\gamma$  verstärkt und durch IL-4 vermindert wird<sup>209</sup>, besteht die Möglichkeit, dass dieses Molekül Immunantworten reguliert, die durch T<sub>H</sub>1-Zellen vermittelt werden<sup>205</sup>. PirB, ein MHCII-Rezeptor, reguliert die Aktivierung von CTLs, indem es den Zugang von CD8-Molekülen zu MHCII blockiert<sup>218</sup>.

Die Expression von PD-L1, B7-H2, B7-H3 und PirB befindet sich in immaturren BM-DCs und unstimulierten DEX-APCs auf vergleichbarem Niveau (Abbildung 14B). Einzig der mRNA-Gehalt von B7-DC ist in DEX-APCs signifikant geringer. Die Expression dieses Moleküls wird weder in BM-DCs noch in DEX-APCs durch LPS beeinflusst. In stimulierten BM-DCs ist die Expression von PD-L1 hochreguliert, bei gleichzeitig reduziertem B7-H2 und B7-H3 mRNA-Niveau und gleichbleibendem PirB-Niveau. Bei DEX-APCs führt eine Stimulierung mit LPS zu einer signifikant verringerten Expression von PD-L1 und einer höheren Expression von B7-H2 im Vergleich zu maturaen BM-DCs.

Die APC-vermittelte Polarisierung von T-Zellen wird unter anderem durch die Sekretion von Zytokinen und anderen solublen Mediatoren getragen. Einer dieser Faktoren ist das proinflammatorische Zytokin IL-12, ein heterodimeres Protein (bestehend aus IL-12a (p35) und IL-12b (p40)), das im Wesentlichen von aktivierten myeloiden DCs produziert wird<sup>542</sup>. Dieses Zytokin spielt eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung und Expansion von T<sub>H</sub>1-Zellen<sup>53,543,544</sup>. IL-6 ist ein proinflammatorisches Zytokin, das die Differenzierung von B-Lymphozyten in Plasma-Zellen sowie die Proliferation von T-Lymphozyten, die

Differenzierung von CTLs und die IL-2 Produktion induziert<sup>446</sup>. Ein weiterer wichtiger Mediator ist TNF- $\alpha$ , ein Mitglied der TNF-Familie, die alle Liganden von TNFRs (*TNF receptor*) umfasst<sup>545</sup>. TNF- $\alpha$  wird von verschiedenen Immunzellen exprimiert und vermittelt zahlreiche inflammatorische und immunregulatorische Effekte<sup>546</sup>.

Im Vergleich zu immaturren BM-DCs weisen unstimulierte DEX-APCs entweder unveränderte (TNF- $\alpha$ ) oder signifikant verminderte (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12b) mRNA-Mengen für die genannten proinflammatorische Zytokine auf (Abbildung 15A). Die Ausreifung unbehandelter BM-DCs resultiert in einer signifikanten Hochregulation aller analysierten Transkripte. In DEX-APCs wird als Antwort auf eine Stimulierung mit LPS die Expression von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  signifikant erhöht, während der mRNA-Gehalt von IL-6 und IL-12b unverändert bleiben. In allen Fällen, außer bei TNF- $\alpha$ , befinden sich die erreichten Werte unterhalb des Niveaus in maturateden BM-DCs.

Neben den bereits erwähnten inflammatorischen Zytokinen gibt es innerhalb der Gruppe der sekretierten Moleküle auch solche mit antiinflammatorischen Eigenschaften, wie zum Beispiel IL-1RA. Die IL-1 Familie besteht im Wesentlichen aus proinflammatorischen Zytokinen, die an der Regulation inflammatorischer Prozesse des Immunsystems und des endokrinen Systems beteiligt sind<sup>547</sup>. Innerhalb dieser Gruppe ist IL-1RA ein negativer Regulator, der autokrin die IL-12 Produktion in DCs limitiert<sup>548</sup>.

Die Expression von IL-1RA wird in BM-DCs durch eine Ausreifung mit LPS nicht verändert (Abbildung 15B). Im Gegensatz dazu weisen DEX-APCs eine leicht gesteigerte (nicht statistisch signifikant) Expression dieses Moleküls auf, die im Rahmen der LPS-vermittelten Stimulierung noch signifikant erhöht wird. Die IL-1 Rezeptor Typ II (IL-1R2) mRNA wird von immaturren BM-DCs sowie unstimulierten DEX-APCs in nahezu identischem Grad exprimiert. In maturateden BM-DCs ist die IL-1R2 Expression signifikant runterreguliert, während sie in stimulierten DEX-APCs unverändert bleibt.

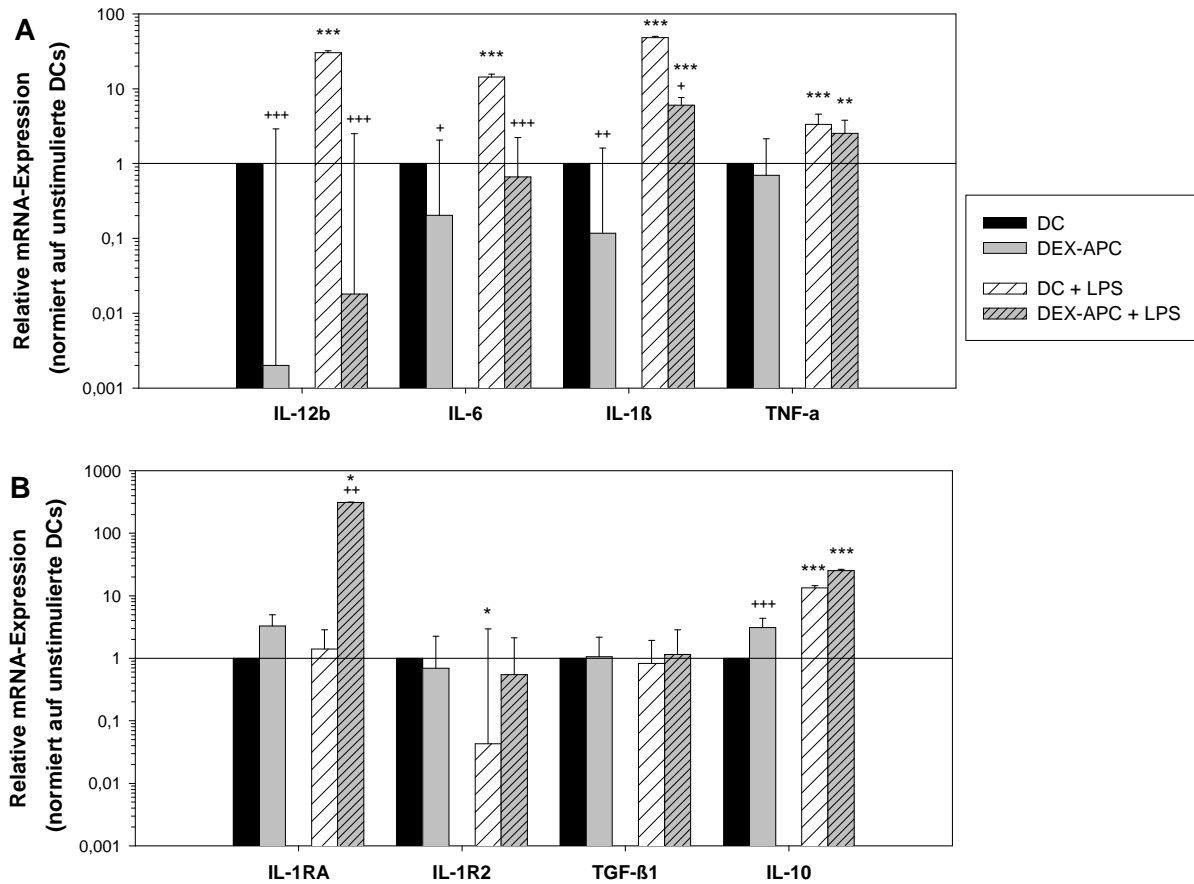
Das antiinflammatorische Zytokin TGF- $\beta$ 1 kann die Proliferation und Differenzierung von B-Lymphozyten vermindern<sup>549</sup> sowie die T-Zell-Proliferation durch Runterregulierung der IL-2 Rezeptor Expression inhibieren<sup>550</sup>. Zusätzlich verhindert dieses Zytokin *in vitro* die Produktion von IL-1, IFN- $\gamma$  und TNF in Monozyten sowie Makrophagen<sup>551,552</sup>.

Alle vier analysierten APC-Populationen zeigen sowohl unter basalen Bedingungen ohne Stimulation, als auch nach einer Stimulierung mit LPS jeweils vergleichbare Mengen an TGF- $\beta$ 1 mRNA.

Autokrin limitiert das antiinflammatorische Zytokin IL-10 in Monozyten, Makrophagen und DCs die Expression proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ <sup>553</sup>, IL-1 $\beta$ <sup>554</sup>, IL-6<sup>555</sup> und IL-12<sup>556</sup> sowie die Oberflächenexpression von MHCII<sup>557</sup> und CD80/CD86. Parakrin inhibiert IL-10 die Produktion von IFN- $\gamma$  und IL-2 in T<sub>H</sub>1-Zellen<sup>297</sup> sowie von IL-4 und IL-5 in T<sub>H</sub>2-Zellen<sup>558,559</sup>.

### 3 Ergebnisse

Im Vergleich zu unreifen BM-DCs ist die Expression von IL-10 mRNA in unstimulierten DEX-APCs signifikant höher. Im stimulierten Zustand zeigen BM-DCs und DEX-APCs eine deutliche Hochregulation der IL-10 Expression.



**Abbildung 15: In Gegenwart von Dexamethason generierte APCs weisen eine veränderte Genexpression von proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinen auf.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 3 wurde Aliquoten der Kultur  $10^{-6}$  M DEX zugesetzt. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit  $1 \mu\text{g/ml}$  LPS für 24 h. Die relative mRNA-Expression von Genen, die für (A) proinflammatorische und (B) antiinflammatorische Zytokine kodieren, wurde mit Hilfe der quantitativen *Real-time-PCR* bestimmt. Die interne Normalisierung erfolgte über das Haushaltsgen Ubiquitin C (UBC). Die Daten geben die relative Änderung der Genexpression in DEX-APC, LPS-stimulierten BM-DC und LPS-stimulierten DEX-APC bezogen auf das Expressionsniveau in unstimulierten DC an. Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler von jeweils 3-8 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten DEX-APCs bzw. DCs (\*) sowie zwischen DEX-APCs und DCs in beiden Aktivierungszuständen (+) sind angegeben (\*, +  $p < 0,05$ ; \*\*, ++  $p < 0,01$ ; \*\*\*, +++  $p < 0,001$ ).

Neben den Oberflächenmolekülen und Zytokinen erfolgte auch eine Analyse weiterer, in die DC/T-Zell-Interaktion involvierter Moleküle. Unter diesen ist das Aktinbündelungsprotein Fascin (FSCN1) essentiell für die Ausbildung der Dendriten reifer DCs<sup>136,138</sup>. Adhäsive Interaktionen unter der Beteiligung des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 (CD54) sind grundlegend von Bedeutung für die Aktivierung von T-Zellen, bei der die ICAM-1-Bindung ein koaktivierendes Signal darstellt und für die transendotheliale Migration von Leukozyten<sup>560</sup>.

CCR7 ist ein Chemokinrezeptor, der wichtig für die Kolokalisierung maturer DCs und T-Zellen in den lokalen drainierenden Lymphknoten in verschiedenen Geweben ist <sup>561-563</sup>.

Die Analyse der verschiedenen DC/T-Zell-Interaktionsmoleküle zeigte, dass DEX-APCs im Vergleich zu immaturren BM-DCs signifikant reduzierte mRNA-Mengen von FSCN1, ICAM-1 und CCR7 exprimieren (Abbildung 16A). Die Stimulation mit LPS bewirkt in BM-DCs eine signifikant verstärkte Expression der genannten Moleküle, während in stimulierten DEX-APCs lediglich die ICAM-1-Expression signifikant gesteigert wird. Bemerkenswert ist, dass die Absolutwerte der FSCN1 und CCR7 mRNA-Expression in stimulierten DEX-APCs deutlich unterhalb des Niveaus in immaturren Kontroll-DCs liegen.

Das Enzym Hämoxxygenase 1 (HO-1), welches antiinflammatorische Eigenschaften besitzt, katalysiert die Degradation von Häm, einem potenten Oxidans, wobei Biliverdin-IX $\alpha$ , Eisen und CO entstehen <sup>564</sup>. Biliverdin-IX $\alpha$  wird in Bilirubin-IX $\alpha$  umgewandelt, welches ein potentes endogenes Antioxidans <sup>565</sup> mit antiinflammatorischen Eigenschaften darstellt <sup>566</sup>. CO hat verschiedenste biologische Funktionen, zu denen unter anderem auch antiinflammatorische Effekte zählen <sup>567,568</sup>.

HO-1 wird in DEX-APCs, unabhängig von ihrem Aktivierungsstatus, signifikant stärker exprimiert als in der jeweils entsprechenden Kontroll-DC-Population.

Bei der Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO) handelt es sich um ein Tryptophanabbauvermittelndes Enzym, dessen Induktion in einer Inhibition der T-Zell-Proliferation resultiert <sup>569,570</sup>. Beide unstimulierten APC-Populationen weisen eine vergleichbare IDO Expression auf, die durch die Stimulierung mit LPS auch in beiden Fällen gleichermaßen hochreguliert wird.

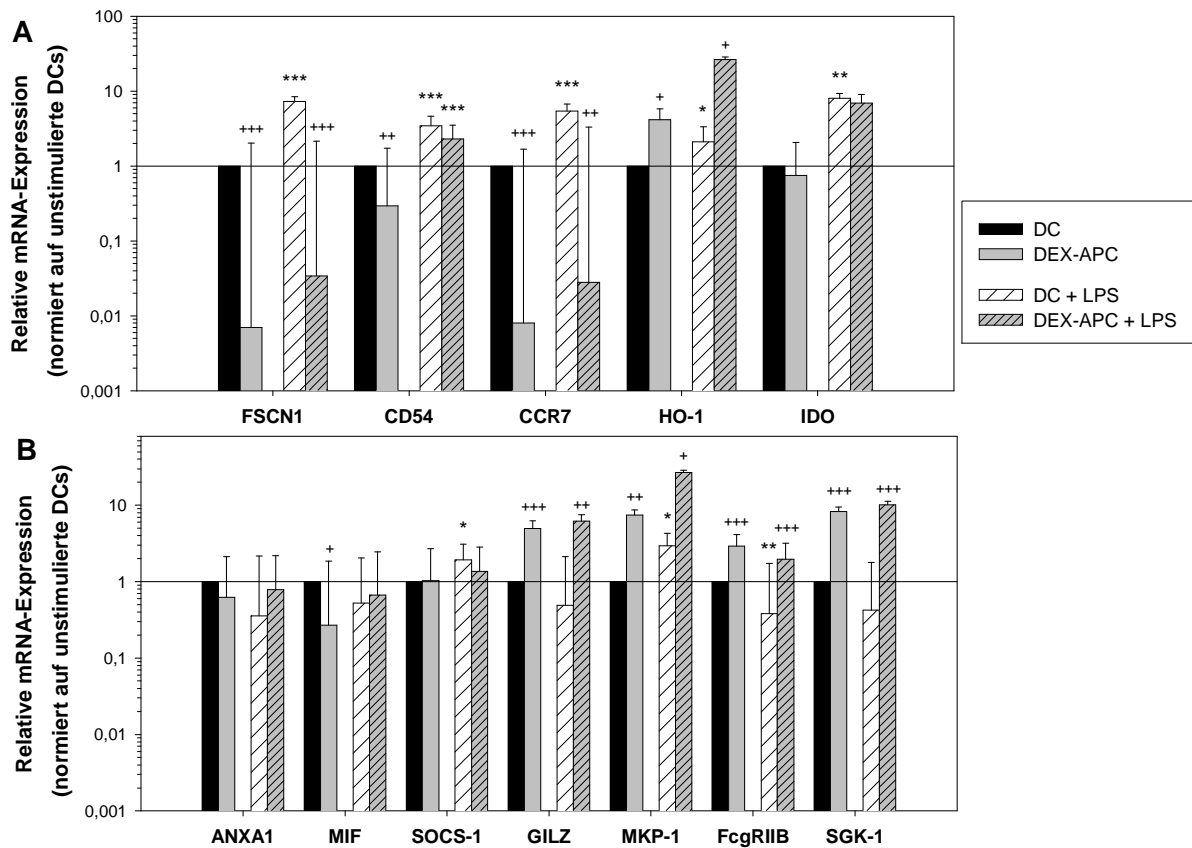
Neben den Expressionsanalysen für DC-relevante mRNA-Spezies, wurde auch die mRNA-Expression von Molekülen mit potentiell immunologischen Funktionen untersucht, für die bekannt ist, dass sie in anderen Zelltypen GC-responsiv sind. Annexin A1 (ANXA1) ist eines der Moleküle, das als endogener Mediator der antiinflammatorischen Wirkung von GCs identifiziert wurde <sup>571</sup>. In experimentellen Entzündungsmodellen führt die Verabreichung von ANXA1 zu einer potenten Inhibition aller Prozesse, die mit der Zellmigration in Verbindung stehen <sup>572,573</sup>. Die Sekretion des Makrophagen Migrations-Inhibitions-Faktors MIF kann ebenfalls durch GCs begünstigt werden <sup>574,575</sup>. MIF bindet an seinen Rezeptor CD74 und stimuliert die Expression und Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 <sup>576</sup>.

Die Expression von ANXA1, MIF und SOCS-1, einem Regulator des JAK/STAT-Signalweges <sup>577,578</sup>, ist in DEX-APCs, unabhängig von ihrem Aktivierungsstatus vergleichbar stark (Abbildung 16B). Im Gegensatz zu den beiden anderen Molekülen wird MIF in unstimulierten DEX-APCs auf geringerem Niveau exprimiert als in unstimulierten BM-DCs.



### 3 Ergebnisse

Auch der TF GILZ (*glucocorticoid-induced leucine zipper*) gehört zur Gruppe der DEX-responsiven Moleküle. Dieser interagiert direkt mit Ras<sup>579</sup> sowie mit Raf-1<sup>580</sup> und ist so in die Regulation der MAP-Kinase Signaltransduktionswege involviert. Ein weiterer Regulator dieses Signalwegs ist die MAP-Kinase Phosphatase MKP-1, die die Aktivität der MAP-Kinasen p38 und JNK negativ beeinflusst<sup>272,581,582</sup>.



**Abbildung 16: In Gegenwart von Dexamethason generierte APCs weisen eine veränderte Genexpression von Molekülen, die in die DC/T-Zell Interaktion involviert sind sowie von DEX-responsiven Molekülen auf.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 3 wurde Aliquoten der Kultur  $10^{-6}$  M DEX zugesetzt. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit  $1 \mu\text{g/ml}$  LPS für 24 h. Die relative mRNA-Expression von Genen, die für (A) Moleküle, die an der DC-T-Zell Interaktion involviert sind und (B) DEX-responsive Moleküle kodieren, wurde mit Hilfe der quantitativen *Real-time-PCR* bestimmt. Die interne Normalisierung erfolgte über das Haushaltsgen Ubiquitin C (UBC). Die Daten geben die relative Änderung der Genexpression in DEX-APC, LPS-stimulierten BM-DC und LPS-stimulierten DEX-APC bezogen auf das Expressionsniveau in unstimulierten DC an. Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler von jeweils 3-8 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen stimulierten und unstimulierten APCs bzw. DCs (\*) sowie zwischen DEX-APCs und BM-DCs (+) sind angegeben (\*<sup>+</sup>  $p < 0,05$ ; \*\*<sup>+</sup>  $p < 0,01$ ; \*\*\*<sup>+</sup>  $p < 0,001$ ).

DEX-APCs weisen im Vergleich zu unstimulierten Kontroll-DCs signifikant höhere Expressionsniveaus für GILZ, MKP-1, den inhibitorischen Fc Rezeptor FcγRIIB, und das antiapoptotische Molekül SGK-1 (*serum- and glucocorticoid-regulated kinase-1*) auf. Im aktivierten Zustand werden diese Gene in BM-DCs entweder runterreguliert (FcγRIIB) oder

bleiben unverändert (GILZ, SGK-1). Lediglich für MKP-1 wurde eine maturierungsassoziierte Hochregulation in BM-DCs nachgewiesen. Verglichen mit maturen BM-DCs sind die mRNA-Mengen der zuvor genannten Moleküle in stimulierten DEX-APCs signifikant erhöht.

Zusammenfassend ist das Genexpressionsprofil von DEX-APCs somit durch eine reduzierte mRNA-Expression kostimulatorischer Oberflächenrezeptoren, proinflammatorischer Zytokine sowie von DC-Maturierungsmarkern geprägt. Von besonderem Interesse in dieser Arbeit ist jedoch das deutlich erhöhte Transkriptionsniveau toleranzassoziiierter Moleküle wie HO-1, GILZ, MKP-1, FcγRIIB, SGK-1 (jeweils in unstimulierten und stimulierten DEX-APCs), B7-H2, IL-1RA (jeweils in stimulierten DEX-APCs) und IL-10 (in unstimulierten DEX-APCs) in dieser Modell-APC-Population.

## **3.2 Physikalischer Stress und der Kontakt mit lentiviralen Partikeln beeinflussen den Phänotyp und die APC-Aktivität von BM-DCs**

Die Generierung tolerogener DCs durch eine Behandlung mit pharmakologischen Substanzen führt meist zu ungewollten pleiotropen Effekten, wie einer verminderten Lebensfähigkeit oder einer eingeschränkten Zellmigration<sup>375</sup>. Eine Alternative zu diesem Konzept ist die gerichtete genetische Modifikation der Expression von Schlüsselmolekülen, die an der tolerogenen Funktion von DCs beteiligt sind. Die Identifizierung möglicher Kandidatenmoleküle ist in Abschnitt 3.1 der vorliegenden Arbeit beschrieben.

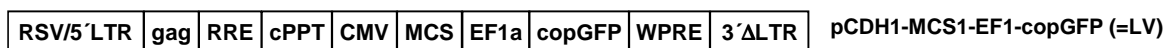
Humane und vor allem murine DCs können non-viral auf Grund der geringen Transfektionseffizienz kaum manipuliert werden<sup>377,381</sup>, weshalb in dieser Arbeit zunächst die Etablierung sowie Optimierung eines effizienten lentiviralen Transduktionssystems notwendig war. Da bisher die Nebeneffekte dieser Methode nur für transduzierte DCs nach einer Stimulierung bestimmt wurden<sup>408,583</sup>, sollte zeitgleich eine Analyse potentieller Einflüsse auf unstimulierte DCs erfolgen.

Weiterhin ist bekannt, dass murine DCs sensitiv gegenüber physikalischem Stress sind und darauf mit einer Aufregulation von MHCII und kostimulatorischen Molekülen (CD80, CD86) reagieren<sup>584</sup>. Es galt daher zu klären, inwieweit der physikalische Stress beim Ernten und Einsäen der DCs in Vorbereitung auf die virale Transduktion den Phänotyp und die antigepräsentierende Funktion muriner BM-DCs verändert.

### 3.2.1 Durch lentivirale Transduktion erfolgt ein effizienter Gentransfer in murine BM-DCs

In den meisten Studien, die sich mit der lentiviralen Transduktion muriner BM-DCs befassen, werden Effizienzen von rund 80 % erreicht <sup>382</sup>. Nur in wenigen Fällen werden Transduktionseffizienzen von 90 % oder mehr beschrieben <sup>408</sup>. Als Reporter wurde in diesen Experimenten tNGFR (*truncated form of the nerve growth factor receptor*) verwendet, welches über entsprechende Antikörper mittels FACS nachgewiesen wurde. Ein Problem bei der Verwendung dieses Reporters ist der Prozess der Pseudotransduktion (eine Übertragung des auch in den Verpackungszellen exprimierten Markerproteins auf Zielzellen) <sup>585</sup>, der bei Verwendung des eGFP-Proteins nicht auftritt <sup>586</sup>.

Da eine der vorliegenden Arbeitsstrategien den Einsatz genetisch tolerogener DCs in bereits bestehenden Immunantworten wie Autoimmunerkrankungen vorsieht, scheint eine Selektion der Transduktanden, zum Beispiel mittels FACS, vor der Applikation äußerst wichtig zu sein. Eine zweite Lösung dieses Problems ist eine Erhöhung der Transduktionseffizienz innerhalb dieses Systems durch Variierung verschiedener Parameter. Die Transduktion muriner BM-DCs erfolgte mit dem selbst-inaktivierenden lentiviralen Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV) der sogenannten dritten Generation, der als Reporter ein alternatives GFP-Protein (copGFP) unter der Kontrolle des ubiquitär konstitutiv aktiven EF1-Promotors enthält (Abbildung 17).

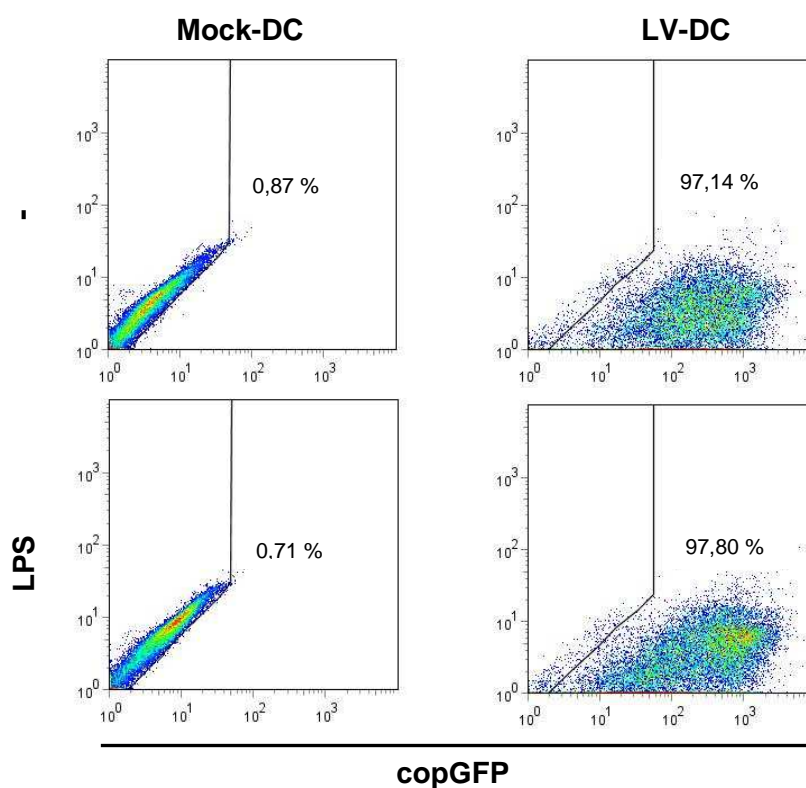


**Abbildung 17: Struktur des lentiviralen Vektors pCDH1-MCS1-EF1-copGFP, der sowohl als Kontrolle, als auch für die Klonierung ausgewählter Transgene verwendet wurde.** RSV/5'LTR, chimärer RSV Promotor/U5 *long terminal repeat* von HIV-1; gag, Verpackungssignal; RRE, *rev response element*; cPPT, zentraler Polypurin-Trakt; CMV, *human immediate early cytomegalovirus*-Promotor; MCS, *multiple cloning site*; EF1a, *human elongation factor 1 alpha*-Promotor; copGFP, *copepod green fluorescent protein*; WPRE, *woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element*; 3'ΔLTR, selbst-inaktivierender 3'LTR mit einer Deletion in der U3 Region.

Für die Generierung viraler Partikel wurden zwei weitere Plasmide, die für strukturelle Gene, Replikationsgene und regulatorische Gene (pCMVΔ8.91) bzw. für die Hüllproteine des Vesikulären Stomatitis Virus (Glykoproteine des Vesikulären Stomatitis Virus; VSV.G) zur Pseudotypisierung (pMD.G2) kodieren, verwendet.

Anfänglich wurden unter Verwendung eines etablierten Protokolls für die Generierung lentiviraler Partikel, das freundlicherweise von Herrn Dr. Manuel Grez zur Verfügung gestellt wurde, BM-DC-Transduktionseffizienzen von rund 70 % erreicht (Daten nicht gezeigt).

In verschiedenen Veröffentlichungen wurde demonstriert, dass eine Erhöhung der DNA-Konzentrationen der für die Produktion der viralen Partikel verwendeten Vektoren oder eine Zunahme der für die Transduktion verwendeten MOI (*multiplicity of infection*) die Effizienz der Virenproduktion bzw. die Transduktionseffizienz maßgeblich erhöhen kann. Auch eine Kozenrifugation von DCs mit den viralen Partikeln im Transduktionsansatz sowie eine Wiederholung des Transduktionsvorgangs können die lentivirale Transduktionsrate für DCs positiv beeinflussen<sup>406,410,587</sup>. Analog zu diesen Studien wurden die verschiedenen für die Generierung der viralen Partikel und die Transduktion von DCs essentiellen Parameter optimiert (Daten nicht gezeigt) und ein Protokoll etabliert, das durchweg zu Transduktionseffizienzen von über 90 % führt (Abbildung 18).

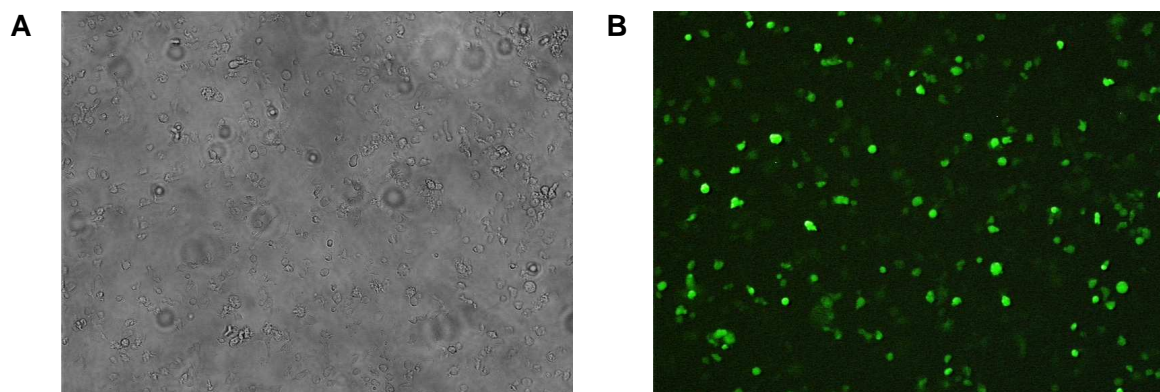


**Abbildung 18: Ein optimiertes Protokoll für die Herstellung lentiviraler Partikel und die Transduktion von murinen BM-DCs ist hoch effizient.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder pseudo-transduziert (Mock-DC) oder mit dem lentiviralen Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP transduziert (LV-DC). Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. An Tag 9 wurde die Transduktionseffizienz mittels FACS-Analyse des copGFP-Proteins bestimmt. Die Graphiken sind repräsentativ für 7 voneinander unabhängige Experimente.

Dies gilt sowohl für unstimulierte als auch für mit LPS-stimulierte murine BM-DCs, wie mit FACS Analysen des copGFP-Proteins ermittelt wurde. Als Negativkontrolle wurden unstimulierte und LPS-stimulierte, mit dem Überstand nicht-transfizierter HEK 293T-Zellen pseudo-transduzierte DCs (*mock-transduced DC*, Mock-DC) verwendet, die der gleichen

Transduktionsprozedur unterzogen wurden wie mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP lentiviral transduzierte DCs (LV-DC), jedoch keinen Kontakt mit lentiviralen Partikeln hatten. Da mit dem im Rahmen dieser Arbeit etablierte Protokoll konstante Transduktionseffizienzen von über 90 % erreicht werden ist somit eine Aufreinigung der Transduktanden für nachfolgende Analysen nicht erforderlich.

Erwähnenswert bei der Verwendung des alternativen GFP-Proteins copGFP als Reportergen zur Ermittlung der Transduktionseffizienz ist, dass eine fluoreszenzmikroskopische Detektion der copGFP Expression (Abbildung 19) in murinen BM-DCs generell erst am dritten Tag nach der zweiten Transduktion möglich war. Aus diesem Grund erfolgten auch alle FACS-Analysen zum Nachweis positiver Transduktanden mittels der copGFP Proteinexpression ebenfalls am dritten Tag nach dem zweiten Transduktionsvorgang. Ob und in welcher Stärke die Reportergenexpression im FACS schon zu einem früheren Zeitpunkt detektierbar ist, wurde in dieser Arbeit nicht weiter analysiert.



**Abbildung 19: Erst an Tag 3 nach der zweiten Transduktion ist die copGFP Expression in murinen BM-DCs fluoreszenzmikroskopisch detektierbar.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Zellen mit dem lentiviralen Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP transduziert. Die (A) Durchlichtaufnahme sowie die entsprechende (B) fluoreszenzmikroskopische Aufnahme immaturer transduzierter BM-DCs bei 10-facher Vergrößerung erfolgten an Tag 3 nach der zweiten Transduktion.

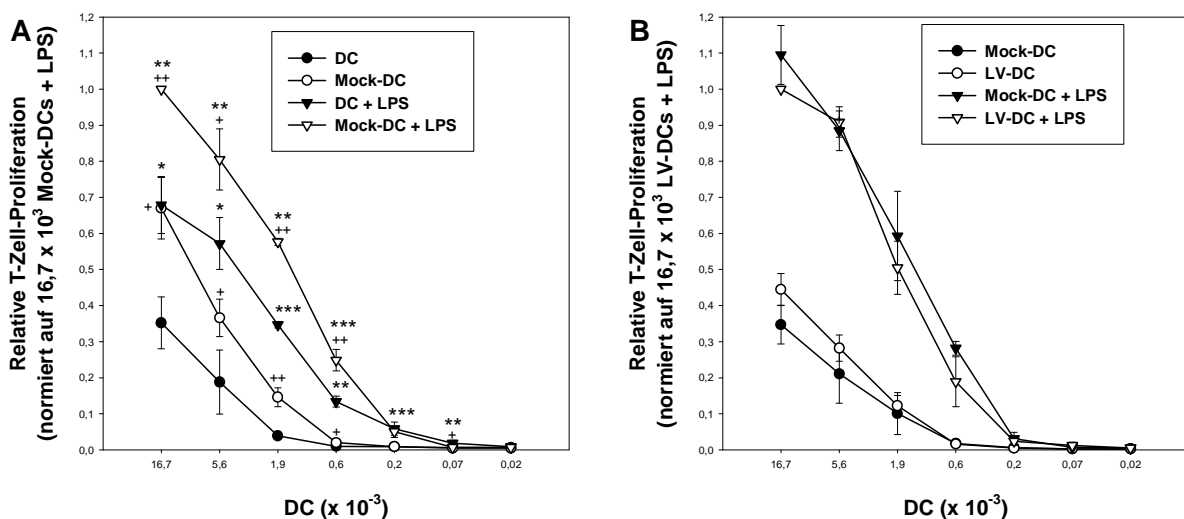
#### **3.2.2 Der mit der lentiviralen Transduktion assoziierte physikalische Stress resultiert in einer partiellen Ausreifung von BM-DCs**

Das Protokoll für eine optimale lentivirale Transduktion von BM-DCs sieht vor, dass die nicht-adhären Zellen einer Kultur geerntet und erneut eingesät werden. Außerdem sind im Rahmen dieser Methode mehrere Zentrifugations- und Waschschrte essentiell für eine hohe Transduktionseffizienz (Materialien und Methoden, Abschnitt 2.3.5.6). Die verschiedenen Schritte stellen jeweils einen physikalischen Stressmoment für DCs dar. Da

### 3 Ergebnisse

bekannt ist, dass physikalischer Stress zu einer Aufregulation von MHCII und kostimulatorischen Molekülen (CD80, CD86) in DCs führt<sup>584</sup>, besteht die Möglichkeit, dass die technische Prozedur der Transduktion von DCs als Maturierungsstimulus wahrgenommen wird. Aus diesen Gründen wurde die T-Zell-Stimulierungsfähigkeit unbehandelter DCs (DC), pseudo-transduzierter DCs (Mock-DC) sowie lentiviral transduzierter DCs (LV-DC) vergleichend analysiert.

Unstimulierte BM-DCs sind durch ein moderates allostimulatorisches Potential gekennzeichnet, welches in Folge einer Stimulierung mit LPS signifikant gesteigert wird (Abbildung 20A). Im Gegensatz dazu induzieren Mock-DCs, in beiden Aktivierungszuständen, eine signifikant stärkere proliferative T-Zell-Antwort als ihr jeweils unbehandeltes Pendant. Der Kontakt mit lentiviralen Partikeln führt zu keiner weiteren Aktivierung von DCs, da LV-DCs eine vergleichbare T-Zell-Proliferation wie Mock-DCs induzieren. Dies gilt sowohl im unstimulierten Zustand, als auch nach einer Ausreifung mit LPS (Abbildung 20B).

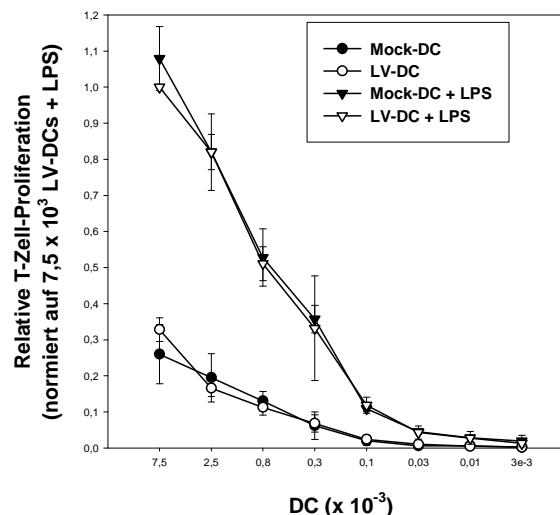


**Abbildung 20: Physikalischer Stress, wie er mit der lentiviralen Transduktion assoziiert ist, verstärkt das T-Zell-Aktivierungspotential von BM-DCs.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder unbehandelt gelassen (DC), pseudo-transduziert (Mock-DC) oder mit dem lentiviralen Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP transduziert (LV-DC). Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Die verschiedenen BM-DC Populationen wurden bestrahlt, in Triplikaten seriell verdünnt und mit jeweils  $3 \times 10^5$  T-Zellen aus BALB/c Mäusen für 4 Tage kokultiviert. Die T-Zell-Proliferation wurde anhand der Aufnahme von [3H]-Thymidin während der letzten 16 h der Kultur gemessen. Die Daten geben die relative T-Zell Proliferation (bezogen auf die durch  $16,7 \times 10^3$  (A) Mock-DCs + LPS bzw. (B) LV-DCs + LPS induzierte Proliferation), berechnet als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler von drei (A) und fünf (B) voneinander unabhängigen Experimenten wieder, die jeweils in Triplikatenansätzen durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen (A) Mock-DCs und unbehandelten DCs gleichen Aktivierungszustandes (+) sowie zwischen stimulierten und unstimulierten DCs (\*) sind angegeben (\*, + p<0,05; \*\*, + p<0,01; \*\*\*, + p<0,001). (B) Unstimulierte sowie stimulierte Mock-DCs und LV-DCs zeigen statistisch signifikante Unterschiede in jedem Datenpunkt (p<0,05).

Somit weisen unstimulierte und stimulierte, lentiviral transduzierte BM-DCs eine gesteigerte T-Zell-Stimulierungskapazität auf, die aus dem physikalischen Stress, der mit der Transduktionsprozedur verbunden ist, resultiert.

Je nach experimenteller Fragestellung, wie zum Beispiel dem murinen Krankheitsmodell der haptenermittelten Kontaktallergie, sollen lentiviral transduzierte BM-DCs auch in einem syngenen Rahmen eingesetzt werden. Es war daher zwingend notwendig zu validieren, inwieweit der Kontakt mit viralen Partikeln das syngene T-Zell-Aktivierungspotential muriner BM-DCs verändert. Hierzu wurden Mock-DCs und LV-DCs mit MOG<sub>35-55</sub>-Peptid gepulst und anschließend mit MOG-reaktiven 2D2 T-Zellen kokultiviert.

Wie schon zuvor für allogene Kokultursysteme gezeigt (Abbildung 20B), führt die lentivirale Transduktion per se nicht zu einer Erhöhung des syngenen T-Zell-Aktivierungspotentials muriner BM-DCs (Abbildung 21).



**Abbildung 21: Der Kontakt mit lentiviralen Partikeln führt zu keiner Erhöhung des syngenen T-Zell-Aktivierungspotentials von BM-DCs verglichen mit physikalisch gestressten Mock-DCs.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder pseudo-transduziert (Mock-DC) oder mit dem lentiviralen Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP transduziert (LV-DC). Die Ausreifung erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Die verschiedenen bestrahlten, MOG<sub>35-55</sub> Peptid gepulsten BM-DC Populationen wurden in Triplikaten seriell verdünnt und mit jeweils  $4,5 \times 10^4$  MOG<sub>35-55</sub>-reaktiven 2D2 T-Zellen für 4 Tage kokultiviert. Die T-Zell-Proliferation wurde anhand der Aufnahme von [3H]-Thymidin während der letzten 16 h der Kultur gemessen. Die Daten geben die relative T-Zell Proliferation (bezogen auf die durch  $7,5 \times 10^3$  LV-DCs + LPS induzierte Proliferation), berechnet als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler von drei (A) und fünf (B) voneinander unabhängigen Experimenten wieder, die jeweils in Triplikatansätzen durchgeführt wurden, an. Unstimulierte sowie stimulierte Mock-DCs und LV-DCs zeigen statistisch signifikante Unterschiede in jedem Datenpunkt ( $p < 0,05$ ).

### **3.2.3 Hauptsächlich physikalischer Stress, aber auch der Kontakt mit lentiviralen Partikeln verändert das Genexpressionsprofil von DCs**

Physikalischer Stress führt nachweislich zu einer partiellen Aktivierung von BM-DCs, was unter anderem in einem signifikanten Anstieg des T-Zell-Aktivierungspotentials von DCs resultiert (Abschnitt 3.2.2). Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass die Einwirkung physikalischer Stressmomente auf DCs zu einer Modulation ihrer Genexpression führt. Aus diesem Grund wurde das Expressionsprofil immunrelevanter Gene (vergleiche Abschnitt 3.1.5) von unbehandelten DCs, pseudo-transduzierten DCs und lentiviral transduzierten DCs vergleichend analysiert.

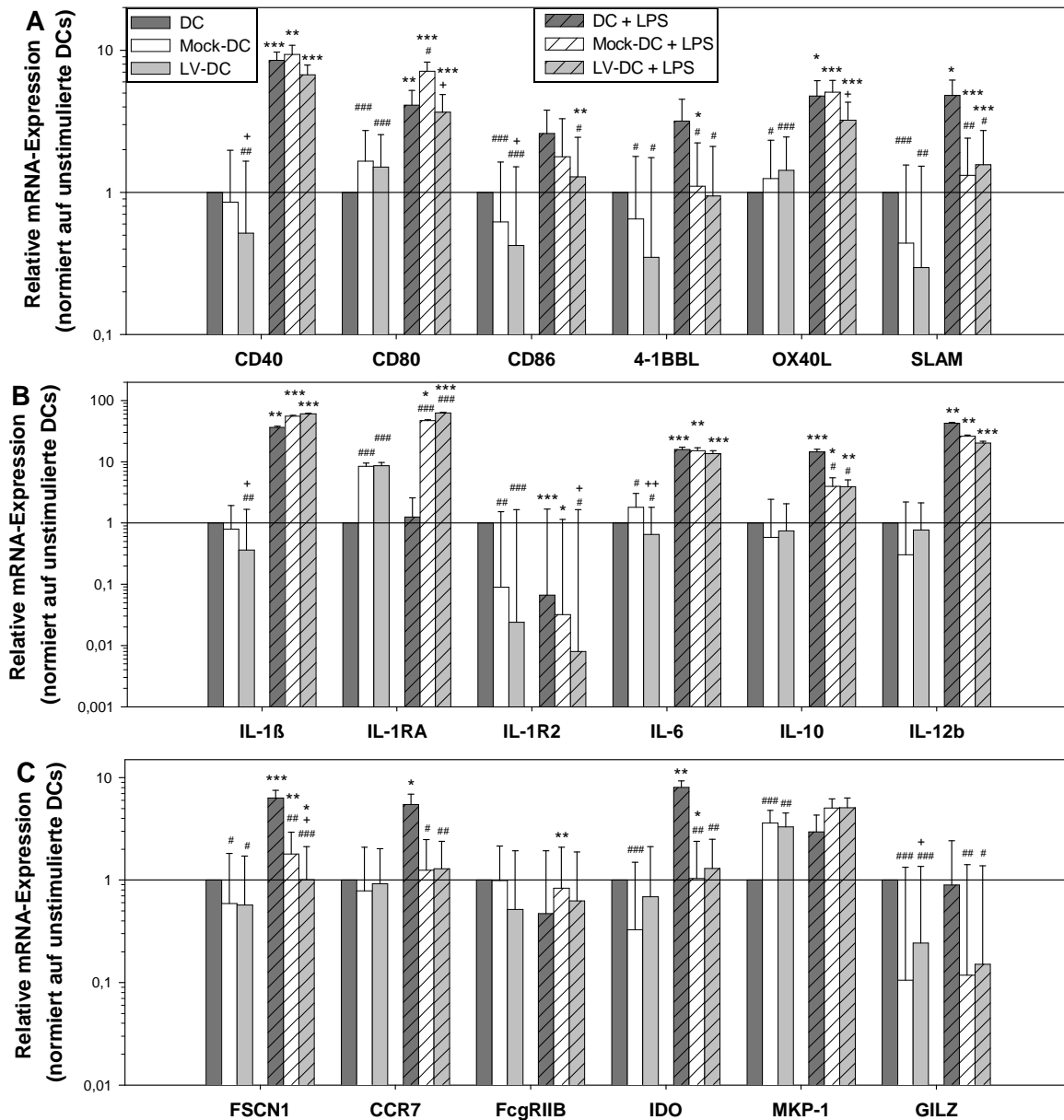
Unstimulierte Mock-DCs weisen gegenüber unbehandelten BM-DCs signifikant erhöhte mRNA-Mengen für die kostimulatorischen Rezeptoren CD80 und OX40L (Abbildung 22A) sowie für das proinflammatorische Zytokin IL-6 und die Toleranzmarker IL-1RA (Abbildung 22B) und MKP-1 (Abbildung 22C) auf. Gleichzeitig ist die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD86, 4-1BBL und SLAM sowie der Toleranzmarker IL-1R2, IDO und GILZ signifikant reduziert. Interessanterweise ist auch die mRNA-Expression des DC-Maturierungsmarkers FSCN1 in unstimulierten Mock-DCs signifikant vermindert.

Der zusätzliche Kontakt mit lentiviralen Partikeln hat bei den meisten der analysierten Moleküle im Vergleich zur Expression in Mock-DCs keinen weiteren Einfluss. Allerdings werden einige mRNA-Spezies (CD40, CD86, IL-1 $\beta$ , IL-6) in LV-DCs in geringerem Maße als in Mock-DCs exprimiert. Einzig die mRNA-Expression von GILZ wird durch die zusätzliche lentivirale Transduktion in BM-DCs hochreguliert.

Eine Stimulierung mit LPS führt in den verschiedenen DC-Populationen zu einer signifikanten Hochregulation der mRNA-Expression von kostimulatorischen Molekülen, Zytokinen und Maturierungsmarkern. Lediglich die Gene der Toleranzmarker IL-1R2, Fc $\gamma$ RIIB und GILZ werden nicht verstärkt transkribiert. Die mRNA-Expressionsniveaus von CD40, den Zytokinen IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12b sowie von MKP-1 waren vergleichbar in stimulierten DCs, stimulierten Mock-DCs sowie stimulierten LV-DCs. Allerdings findet die normalerweise maturierungsassoziierte Aufregulation der Genexpression von 4-1BBL, SLAM, IL-10, CCR7, FSCN1 und IDO in maturen Mock-DCs und maturen LV-DCs nur eingeschränkt statt. Weiterhin werden im direkten Vergleich zu stimulierten Mock-DCs signifikant reduzierte mRNA-Mengen von CD80, OX40L und IL-1R2 in stimulierten LV-DCs gebildet. Als einzige Ausnahme wird CD80 signifikant am stärksten in stimulierten Mock-DCs exprimiert. Interessanterweise wird die mRNA-Expression von IL-1RA, die unter basalen Bedingungen in den beiden behandelten DC-Populationen Mock- und LV-DCs signifikant gegenüber unbehandelten BM-DCs hochreguliert ist, im Rahmen der Ausreifung mit LPS in vergleichbarem Maße verstärkt.



### 3 Ergebnisse

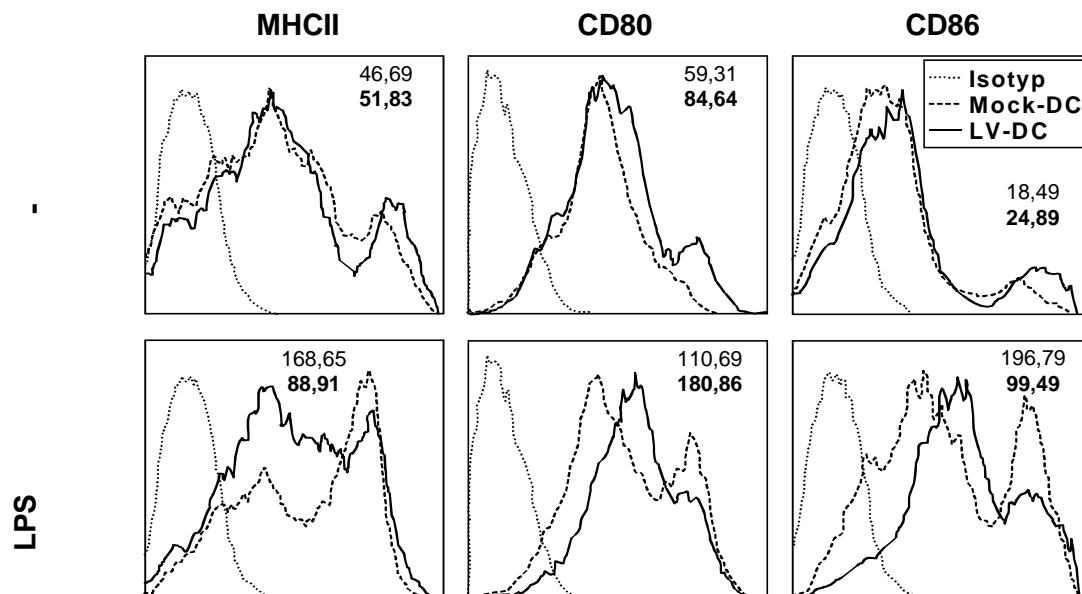


**Abbildung 22: Sowohl physikalischer Stress, als auch der Kontakt mit lentiviralen Partikeln beeinflussen die Genexpression von kostimulatorischen Molekülen, solublen Mediatoren sowie Maturierungs- und Toleranzmarkern in BM-DCs.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder unbehandelt gelassen (DC), pseudo-behandelt (Mock-DC) oder mit dem lentiviralen Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP transduziert (LV-DC). Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Die relative mRNA-Expression von Genen die für (A) kostimulatorische Moleküle, (B) soluble Mediatoren sowie (C) Maturierungs- und Toleranzmarker kodieren, wurde mit Hilfe der quantitativen *Real-time-PCR* bestimmt. Die interne Normalisierung erfolgte über das Haushaltsgen Ubiquitin C (UBC). Die Daten geben die relative Änderung der Genexpression in den verschiedenen DC-Populationen bezogen auf das Expressionsniveau in unstimulierten DCs an. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von jeweils 3-6 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber unbehandelten DCs in beiden Aktivierungszuständen (#), gegenüber Mock-DCs in beiden Aktivierungszuständen (+), sowie zwischen stimulierten und unstimulierten DCs (\*) sind angegeben (\*, #, + p<0,05; \*\*, ##, ++ p<0,01; \*\*\*, ###, +++ p<0,001).

Insgesamt legen diese experimentellen Daten nahe, dass physikalischer Stress zu einer deutlichen Veränderung des Genexpressionsprofils muriner BM-DCs führt, welches durch den Kontakt der Zellen mit lentiviralen Partikeln noch weiter moduliert wird.

### 3.2.4 Die lentivirale Transduktion vermindert die maturierungsassoziierte Zunahme der Oberflächenexpression von Effektormolekülen in BM-DCs

Der Kontakt von BM-DCs mit lentiviralen Partikeln führt zu einer nicht sehr ausgeprägten, aber nachweislich signifikanten Modulation des Genexpressionsprofils, wie im direkten Vergleich von Mock-DCs und LV-DCs im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde (Abschnitt 3.2.3). Diese Variierung der mRNA-Expression könnte zu einer veränderten Menge des jeweiligen Proteins führen. Aus diesem Grund wurde die Zelloberflächenexpression verschiedener DC-typischer Maturierungsmarker von Mock-DCs und LV-DCs mittels FACS ermittelt (Abbildung 23).



**Abbildung 23: Der Kontakt mit lentiviralen Partikeln verändert den Phänotyp muriner BM-DCs.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder unbehandelt gelassen, pseudo-behandelt (Mock-DC) oder mit dem lentiviralen Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP transduziert (LV-DC). Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Die verschiedenen DC-Populationen wurden mit spezifischen Antikörpern für MHCII, CD80 oder CD86 (jeweils PE-gekoppelt) behandelt und mittels FACS analysiert. Die Histogramme repräsentieren die spezifische Antikörper-Bindung auf der Oberfläche von Mock-DCs (unterbrochene Linie) und LV-DCs (durchgezogene Linie). Die Bindung des jeweils entsprechenden Isotyp Kontroll-Antikörpers ist angegeben (dünne, gepunktete Linie). Die jeweils entsprechende mittlere Fluoreszenzintensität von Mock-DCs (normale Schrift) und LV-DCs (fette Schrift) ist angegeben. Die Graphiken sind jeweils für 3 voneinander unabhängige Experimente repräsentativ.

Unter basalen Bedingungen werden MHCII sowie die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 von beiden DC-Populationen in vergleichbarer Menge exprimiert (Abbildung 23, obere Reihe).

In Folge einer Stimulierung mit LPS wird die Oberflächenexpression aller drei Marker in beiden DC-Populationen hochreguliert, wobei diese Zunahme bei stimulierten LV-DCs im Fall von MHCII und CD86 weniger stark ausfällt (Abbildung 23, untere Reihe). Dieses Ergebnis entspricht den Befunden der zuvor ermittelten verminderten CD86 mRNA-Expression in LPS-stimulierten LV-DCs (Abbildung 22). Im Gegensatz zu den Resultaten der Genexpressionsanalysen wird der kostimulatorische Rezeptor CD80 infolge einer Stimulation auf der Oberfläche von LV-DCs nicht geringer exprimiert als auf der Oberfläche von Mock-DCs.

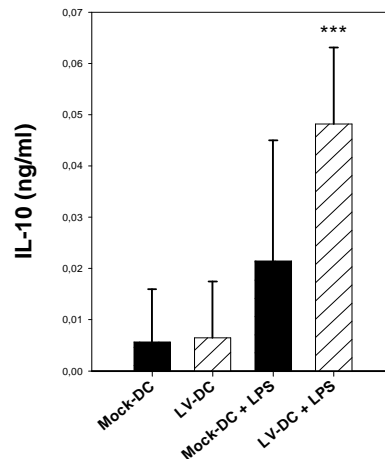
Insgesamt ergibt sich aus diesen Analysen, dass der Kontakt von murinen BM-DCs mit lentiviralen Partikeln die LPS-vermittelte Aufregulation der getesteten Oberflächenmoleküle in variablem Maße moduliert.

#### **3.2.5 Der Kontakt mit lentiviralen Partikeln steigert die IL-10 Produktion in LPS-stimulierten BM-DCs**

Das antiinflammatorische Zytokin IL-10 ist einer der wichtigsten löslichen Mediatoren zur Regulation von Immunantworten sowie zur Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz. Der mit der lentiviralen Transduktion assoziierte physikalische Stress limitiert die maturierungsassoziierte Aufregulation der IL-10 Transkription in DCs, die auch durch den Kontakt mit lentiviralen Partikeln nicht weiter moduliert wird (Abschnitt 3.2.3). Die Überprüfung dieses Ergebnisses auf Proteinebene erfolgte durch die Bestimmung der Konzentration an IL-10 Protein im Kulturüberstand von Mock-DCs und LV-DCs mittels ELISA.

Mock-DCs und LV-DCs zeichnen sich unter basalen Bedingungen durch eine vergleichbare moderate Sekretion des Zytokins IL-10 aus (Abbildung 24). Im Rahmen der Ausreifung mit LPS wird diese Produktion in Mock-DCs nicht signifikant hochreguliert. Demgegenüber findet in LV-DCs eine signifikante maturierungsassoziierte Steigerung der IL-10 Produktion statt.

Auf Proteinebene zeigt sich somit, dass der Kontakt von BM-DCs mit lentiviralen Partikeln die IL-10 Produktion auf Proteinebene reguliert.



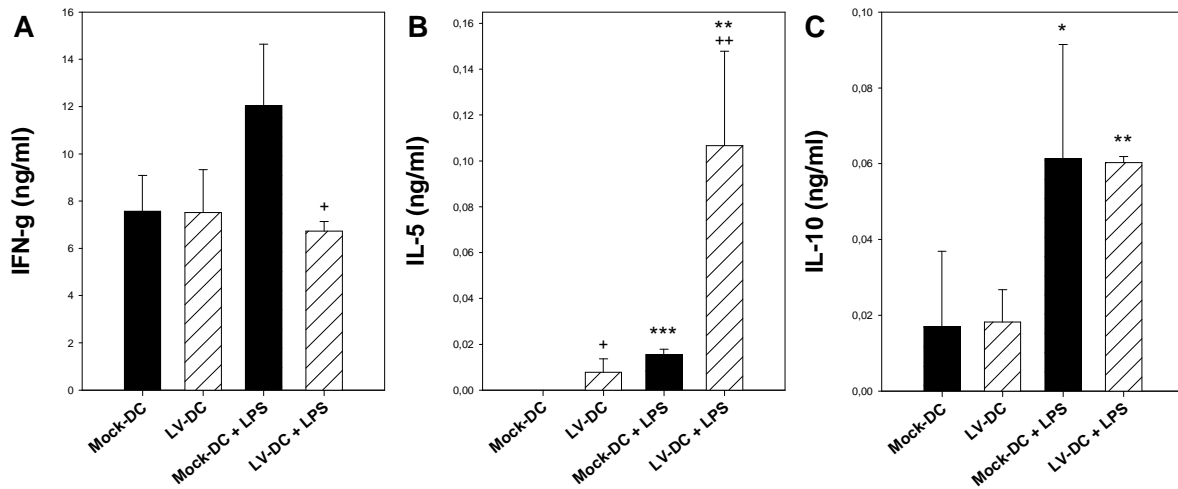
**Abbildung 24: Der Kontakt mit lentiviralen Partikeln resultiert in einer maturierungsassoziierten Steigerung der IL-10 Produktion in BM-DCs.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder unbehandelt gelassen, pseudo-behandelt (Mock-DC) oder mit dem lentiviralen Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP transduziert (LV-DC). Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Anschließend wurden die Kulturüberstände geerntet und der Gehalt von IL-10 mittels ELISA bestimmt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von 6 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen stimulierten und unstimulierten DCs sind angegeben (\*\*\*) ( $p < 0,001$ ).

### 3.2.6 Physikalisch gestresste und lentiviral transduzierte BM-DCs induzieren unterschiedliche Zytokinantworten in Kokulturen mit T-Zellen

Da der Kontakt von BM-DCs mit lentiviralen Partikeln in einer modulierten LPS-induzierten Hochregulation der Maturierungsmarker MHCII, CD80 und CD86 auf der Zelloberfläche resultiert (Abschnitt 3.2.4), wurde ebenfalls analysiert, inwieweit sich Mock-DCs und LV-DCs auf Ebene der sekretierten Zytokine in ihren T-Zell-polarisierenden Eigenschaften unterscheiden.

In Kokulturen unstimulierter Mock-DCs oder LV-DCs mit allogenen BALB/c T-Zellen wurde eine jeweils vergleichbare Konzentration des  $T_H1$ -Markerzytokins IFN- $\gamma$  nachgewiesen (Abbildung 25A). Eine Kokultivierung LPS-stimulierte Mock-DCs mit allogenen T-Zellen resultiert in einer deutlich verstärkten IFN- $\gamma$  Produktion, während sich die Menge dieses Zytokins in Ansätzen mit stimulierten LV-DCs ungefähr auf dem Niveau mit derjenigen in Kokulturen mit unstimulierten Mock-DCs und LV-DCs befindet.

Im Gegensatz zu Kokulturen mit Mock-DCs wurde in Ansätzen mit unstimulierten LV-DCs eine geringe Produktion des  $T_H2$ -Markerzytokins IL-5 detektiert (Abbildung 25B). LPS-stimulierte Mock-DCs vermitteln eine ähnlich geringe Produktion dieses Zytokins wie unstimulierte LV-DCs. Im Gegensatz dazu ist die IL-5 Konzentration in Kokulturen mit stimulierten LV-DCs, verglichen mit allen anderen APC-Populationen, drastisch erhöht.



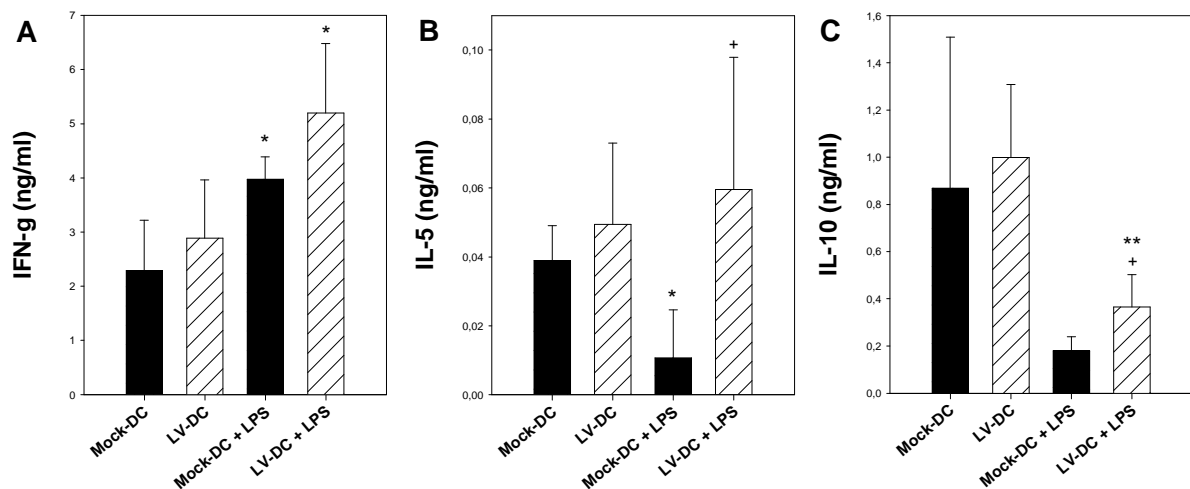
**Abbildung 25: Die lentivirale Transduktion von BM-DCs verändert das Zytokinprofil kokultivierter allogener T-Zellen.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder unbehandelt gelassen, pseudo-transduziert (Mock-DC) oder mit dem lentiviralen Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP transduziert (LV-DC). Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Bestrahlte Mock-DCs und LV-DCs im unstimulierten und stimulierten Zustand (jeweils  $1,67 \times 10^5$ ) wurden für 4 Tage mit  $3 \times 10^6$  T-Zellen aus BALB/c Mäusen in einem Volumen von 2 ml kokultiviert. Anschließend wurden die Kulturüberstände geerntet und der Gehalt von (A) IFN- $\gamma$ , (B) IL-5 und (C) IL-10 mittels ELISA bestimmt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler von jeweils 3-6 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Mock-DCs und LV-DCs in beiden Aktivierungszuständen (+) sowie zwischen stimulierten und unstimulierten DCs (\*) sind angegeben (\*<sup>+</sup>  $p < 0,05$ ; \*\*<sup>+</sup>  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Eine jeweils übereinstimmende Produktion des ambivalenten  $T_H2$ /Treg Markerzytokins IL-10 wurde in Ansätzen mit unstimulierten Mock-DCs oder LV-DCs sowie stimulierten Mock-DCs oder LV-DCs nachgewiesen (Abbildung 25C).

Konträr zu den Ergebnissen im allogenen System, ist die IFN- $\gamma$  Produktion in Kokulturen mit Mock-DCs oder LV-DCs, unabhängig von ihrem Aktivierungszustand, und syngenen 2D2 T-Zellen jeweils vergleichbar stark (Abbildung 26A).

Weiterhin abweichend ist die vergleichbar starke Induktion der IL-5 Produktion in Ansätzen mit unstimulierten Mock-DCs oder LV-DCs (Abbildung 26B). Dienen LPS-stimulierte Mock-DCs als APCs in der syngenen Kokultur, werden signifikant reduzierte Mengen IL-5 produziert, wohingegen stimulierte LV-DCs eine Zytokinproduktion auf dem Niveau der durch die beiden unstimulierten DC-Populationen induzierten Menge vermitteln.

In Überständen von Kokulturen unstimulierter Mock-DCs oder LV-DCs und syngener T-Zellen wurde eine jeweils vergleichbar stark ausgeprägte Produktion des Zytokins IL-10 detektiert (Abbildung 26C). Anders als im allogenen System, tritt in Ansätzen mit LPS-stimulierten Mock-DCs und LV-DCs keine weitere Erhöhung der IL-10 Konzentration auf: In beiden Fällen ist die Gesamtmenge des Zytokins stark vermindert, wobei in Kokulturen mit stimulierten LV-DCs, im direkten Vergleich zu denjenigen mit stimulierten Mock-DCs, eine signifikant höhere IL-10 Produktion stattfindet (Abbildung 26C).



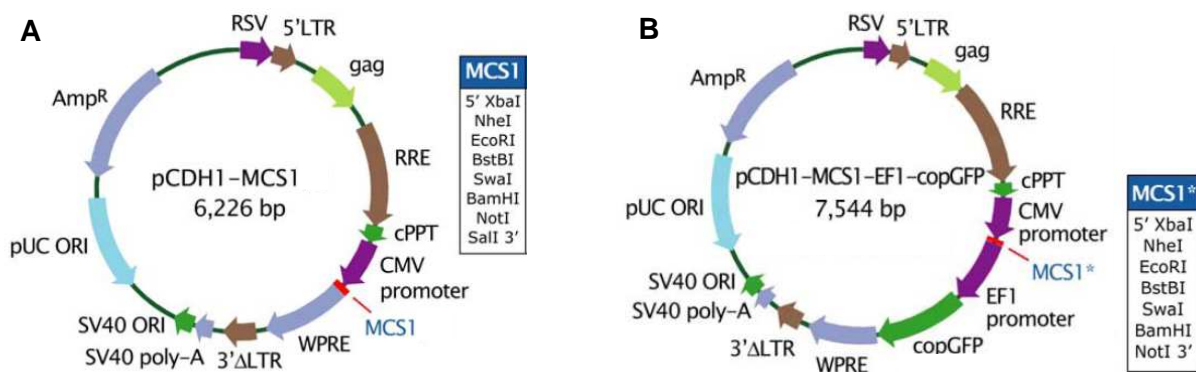
**Abbildung 26: Die lentivirale Transduktion von BM-DCs verändert das Zytokinprofil kokultivierter syngener 2D2 T-Zellen.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder unbehandelt gelassen, pseudo-transduziert (Mock-DC) oder mit dem lentiviralen Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP transduziert (LV-DC). Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Bestrahlte, MOG<sub>35-55</sub> Peptid gepulste Mock-DCs und LV-DCs im unstimulierten und stimulierten Zustand (jeweils  $1,5 \times 10^5$ ) wurden für 4 Tage mit  $4,5 \times 10^5$  MOG<sub>35-55</sub>-reaktiven T-Zellen aus 2D2 Mäusen in einem Volumen von 2 ml kokultiviert. Anschließend wurden die Kulturüberstände geerntet und der Gehalt von (A) IFN-γ, (B) IL-5 und (C) IL-10 mittels ELISA bestimmt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von jeweils 3-6 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Mock-DCs und LV-DCs in beiden Aktivierungszuständen (+) sowie zwischen stimulierten und unstimulierten DCs (\*) sind angegeben (\*, + p<0,05; \*\* p<0,01).

### 3.3 Generierung lentiviraler Expressionskonstrukte für die Transduktion von BM-DCs

Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch die phänotypische Analyse von DEX-APCs verschiedene Moleküle identifiziert, die an der tolerogenen Funktion der DEX-APCs beteiligt sein könnten (Abschnitt 3.1). Fünf der auf transkriptionaler Ebene evaluierten Moleküle, die in DEX-APCs entweder im unstimulierten (IL-10), im LPS-stimulierten (B7-H2, IL-1RA) oder in beiden Aktivierungszuständen (MKP-1; FcγRIIB) signifikant stärker exprimiert werden als in der entsprechenden unbehandelten BM-DC-Population, wurden für eine lentivirale Überexpression ausgewählt. Erweitert wurde diese Auswahl um acht Moleküle, die ebenfalls einen potentiellen Beitrag zum tolerogenen Status muriner APCs leisten können und basierend auf intensiven Literaturrecherchen selektiert wurden. Hierbei handelt es sich um die Moleküle STAT3, PirB, SOCS-1, PD-L1, B7-H3, TGF-β1, IκBα sowie das in BM-DCs nicht vorkommende IL-21.

### 3.3.1 Generierung lentiviraler Expressionskonstrukte, bei denen sowohl Transgen, als auch Reporter gen jeweils unter der Kontrolle eines ubiquitär konstitutiv aktiven Promotors stehen

Die offenen Leserahmen aller ausgewählten Moleküle sollten zunächst in die beiden kommerziell erwerbbaaren lentiviralen Expressionsvektoren pCDH1-MCS1 (Abbildung 27A) und pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (Abbildung 27B) der Firma System Biosciences kloniert werden.



**Abbildung 27: Schematische Darstellung der lentiviralen Expressionsvektoren pCDH1-MCS1 und pCDH1-MCS1-EF1-copGFP, von denen ausgehend alle anderen im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Konstrukte generiert wurden.** (A) Der pCDH1-MCS1-Vektor wurde im Folgenden für verschiedene Anwendungen weiter variiert. (B) Der pCDH1-MCS1-EF1-copGFP wurde wie hier abgebildet zur Transduktion und Transgenexpression in BM-DCs verwendet. RSV/5'LTR, chimärer RSV Promotor/U5 *long terminal repeat* von HIV-1; gag, Verpackungssignal; RRE, *rev response element*; cPPT, zentraler Polypurin-Trakt; CMV, *human immediate early cytomegalovirus*-Promotor; MCS, *multiple cloning site*; EF1a, *human elongation factor 1 alpha*-Promotor; copGFP, *copepod green fluorescent protein*; WPRE, *woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element*; 3'ΔLTR, selbst-inaktivierende 3'LTR mit einer Deletion in der U3 Region; SV40 poly-A, Transkriptionsterminations- und Polyadenylierungssignal; SV 40 ORI, Replikationsursprung in eukaryotischen Zellen; pUC ORI, Replikationursprung in *E. coli*; Amp<sup>R</sup>, Ampicillinresistenz.

Die Vektoren unterscheiden sich im Wesentlichen nur auf Ebene des Reporter gens. Während der pCDH1-MCS1-Vektor keinen Reporter enthält, befindet sich im pCDH1-MCS1-EF1-copGFP-Vektor zusätzlich die Sequenz des alternativen GFP-Proteins copGFP. Demzufolge können Transduktanden mittels FACS ermittelt werden. Der Vorteil des pCDH1-MCS1-Vektors besteht darin, dass, je nach experimenteller Fragestellung, der Promotor ausgetauscht und/oder ein variables Reporter gen eingeführt werden kann. Ein solcher Austausch ist generell auch bei dem pCDH1-MCS1-EF1-copGFP-Vektor möglich, jedoch ist in diesem Fall die Entfernung der Reporter genkassette auf Grund fehlender Schnittstellen zwischen dem EF1-Promotor und dem copGFP-Gen deutlich diffiziler. Durch den Austausch einzelner Vektorkomponenten können zum Beispiel Konstrukte generiert werden, bei denen das Transgen unter der Kontrolle eines DC-spezifischen Promotors zur gezielten Expression in BM-DCs steht oder ein zu copGFP alternatives Reporter gen für die Ermittlung von

Doppeltransduktanden verfügbar ist. Wird der ubiquitär konstitutiv aktive CMV-Promotor gegen einen zelltypspezifischen ausgetauscht, ist es erstrebenswert, dass das jeweilige Reportergen ebenfalls nur in dieser einen Zellpopulation exprimiert wird. Die einfachste Möglichkeit ist hierbei die Kopplung des Reportergens über eine IRES (*internal ribosome entry site*), so dass kein zweiter Promotor (im Fall des vorliegenden pCDH1-MCS1-EF1-copGFP-Vektors der ubiquitär konstitutiv aktive EF1-Promotor) für die Transkription notwendig ist. Die verschiedenen, in der hier vorliegenden Arbeit generierten, Varianten werden in den folgenden Abschnitten detaillierter erläutert und experimentell beschrieben.

Die offenen Leserahmen der Moleküle TGF- $\beta$ 1, IL-1RA, SOCS-1, Fc $\gamma$ RIIB, B7-H2 und B7-H3 lagen zu Beginn der Arbeit bereits als pZero-2-Konstrukte vor. Sie mussten somit nicht zuvor mittels PCR aus einem cDNA-Pool amplifiziert werden. In 3'-Orientierung standen bei allen pZero-2-Konstrukten die Restriktionsschnittstellen für *Bam*HI, *Eco*RI, *Not*I, *Xba*I und *Eco*RV zur Auswahl.

Damit eine gerichtete Klonierung der Gene in die genannten Zielvektoren erfolgen konnte, musste zunächst eine weitere, in 5'-Orientierung des jeweiligen offenen Leserahmens liegende, kompatible Restriktionsschnittstelle in den pZero-2-Konstrukten generiert werden. Hierzu wurde in allen Fällen eine vorhandene *Hind*III-Restriktionsschnittstelle in eine *Nhe*I-Restriktionsschnittstelle umgewandelt. Der Verdau der Konstrukte mit der Restriktionsendonuklease *Hind*III führte zur Generierung zweier freier, überhängender Enden. Diese freien Enden wurden nachfolgend unter Verwendung des Enzyms Klenow-Fragment mit Nukleotiden aufgefüllt, wodurch es zur Entstehung glatter Enden kam. Nachfolgend wurden diese glatten Enden religiert und somit, durch die neu entstandene Nukleotidsequenz, eine Restriktionsschnittstelle für *Nhe*I innerhalb der pZero-2-Vektoren generiert. Die Generierung der neuen Restriktionsschnittstelle wurde in allen Fällen durch eine Linearisierung des jeweiligen pZero-2-Konstrukts mit der Restriktionsendonuklease *Nhe*I, die durch eine anschließende elektrophoretische Auftrennung in einem analytischen Agarosegel überprüft wurde, kontrolliert (Daten nicht gezeigt). Im Anschluss konnten dann die offenen Leserahmen über zwei Enzyme, die jeweils überhängende und zum Zielvektor komplementäre Enden bilden, exzisiert und umklont werden. In allen Fällen wurde dafür in 5'-Orientierung des offenen Leserahmens die neu generierte *Nhe*I-Restriktionsschnittstelle in Kombination mit einer in 3'-Orientierung-liegenden *Bam*HI- (IL-1RA, B7-H2) oder *Eco*RI-Restriktionsschnittstelle (TGF- $\beta$ 1, Fc $\gamma$ RIIB, SOCS-1, B7-H3) verwendet. Nach der Hydrolyse mit den jeweiligen beiden Restriktionsendonukleasen wurden die Restriktionsansätze elektrophoretisch in einem 1 %igen TAE-Agarosegel aufgetrennt und die gewünschten Fragmente mittels Gelextraktion aufgereinigt.

Weiterhin standen die Moleküle PirB, PD-L1 und IL-10 als pCI-Konstrukte zur Verfügung. Aus den Konstrukten PirB-pCI und PD-L1-pCI wurde der jeweilige offene Leserahmen mittels



PCR mit spezifischen Primern amplifiziert. In beiden Fällen wurden durch die jeweils verwendeten Primer neue Restriktionsschnittstellen am 5'- und 3'-Ende in die Gensequenzen eingeführt, die zur direkten Umklonierung in die Zielvektoren verwendet werden konnten. In 5'-Orientierung wurde jeweils eine *NheI*-Restriktionsschnittstelle in Kombination mit einer in 3'-Orientierung-liegenden *Bsp119I*- (PirB: mPirb-ORFNhe-s und mPirb-ORFBsp-as) oder *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle (PD-L1: mPDL1-ORFNhe-s und mPDL1-ORFEco-as) verwendet. Der offene Leserahmen des Moleküls IL-10 wurde mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *NheI* und *BamHI* aus dem Konstrukt IL-10-pCI exzisiert.

Die Gensequenzen aller anderen im Rahmen der Arbeit verwendeten Moleküle wurden mittels PCR mit spezifischen Primern aus verschiedenen cDNA-Pools amplifiziert. Die Amplifikation der offenen Leserahmen von IκBα und STAT3 erfolgte aus cDNA von unstimulierten und stimulierten BM-DCs, die als Matrize in der PCR im Verhältnis 1:1 eingesetzt wurden. Da IL-21 von BM-DCs nicht exprimiert wird, wurde als Matrize cDNA aus mit stimulierten BM-DCs vorstimulierten T-Zellen verwendet. Für eine nachfolgende Umklonierung wurden bei allen Gensequenzen durch die in der PCR eingesetzten Primer neue Restriktionsschnittstellen eingefügt. Hierbei wurde erneut eine *NheI*-Restriktionsschnittstelle mit einer *BamHI*- (IκBα: mIκB-ORFNhe-s und mIκB-ORFBam-as), einer *EcoRI*- (STAT3: mStat3-ORFNhe-s und mStat3-ORFEco-as) oder einer *Bsp119I*-Restriktionsschnittstelle (IL-21: mL21-ORFNhe-s und mL21-ORFBsp-as) kombiniert.

In allen Fällen konnten durch die in Abschnitt 2.2.12 angegebenen Bedingungen die gewünschten PCR-Produkte amplifiziert und durch Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Alle generierten PCR-Produkte wurden direkt im Anschluss an die Amplifikation mit den beiden jeweiligen Restriktionsendonukleasen hydrolysiert. Anschließend wurden alle Restriktionsansätze elektrophoretisch in einem 1 %igen TAE-Agarosegel aufgetrennt und die DNA mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen aus dem Agarosegel isoliert.

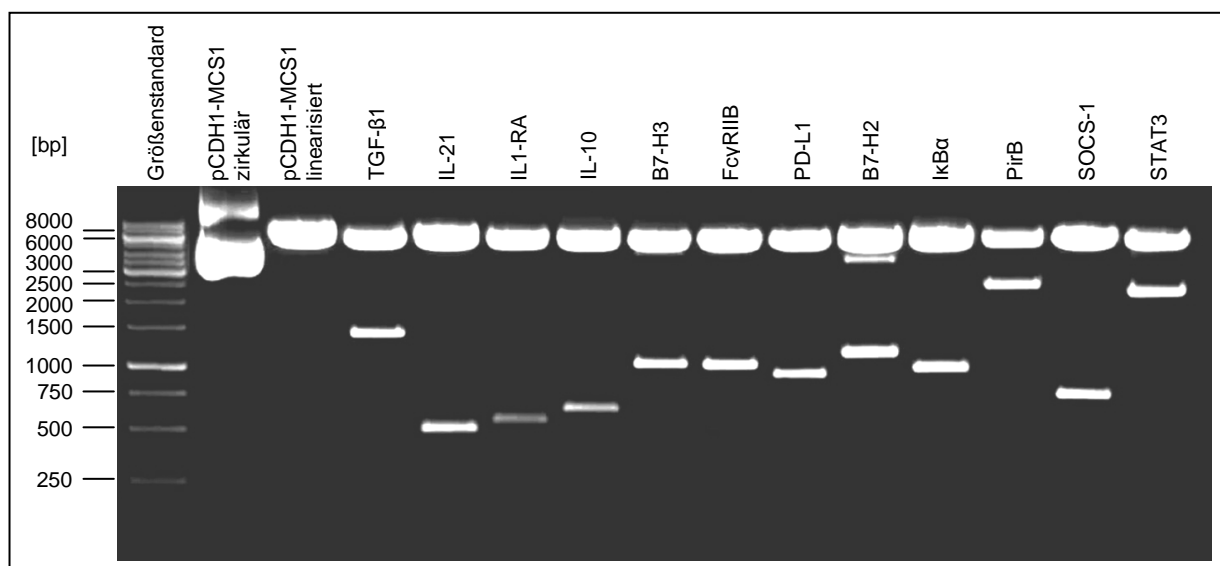
Die beiden Zielvektoren pCDH1-MCS1 und pCDH1-MCS1-EF1-copGFP wurden ebenfalls jeweils mit den beiden Restriktionsendonukleasen *NheI* und *BamHI*, *NheI* und *EcoRI* oder *NheI* und *Bsp119I* hydrolysiert, über ein 1 %iges TAE-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Gelextraktion aufgereinigt. Auf diese Weise sind linearisierte Vektoren entstanden, die überhängende, zu den zu inserierenden DNA-Fragmenten komplementäre Enden aufweisen. Für die nachfolgende Ligation wurden linearisierter Vektor und zu inserierendes DNA-Fragment in einem molaren Verhältnis von 1:3 bis 1:10 eingesetzt. Die verschiedenen Ligationsansätze wurden zur Transformation elektrokompeter *E. coli* TOP10-Zellen eingesetzt. Eine Selektion der Transformanten erfolgte durch eine plasmid-kodierte Ampicillinresistenz. Aus den erhaltenen Transformanten wurde die Plasmid-DNA mittels Isopropanol-Minipräparation isoliert und in einer Restriktionsanalyse mit den jeweils

zur Klonierung verwendeten Restriktionsendonukleasen überprüft. In Tab. 20 sind die in der Kontrollrestriktion erwarteten Fragmentlängen der verschiedenen Moleküle sowie die für die Klonierung und ebenfalls zur Kontrolle verwendeten Restriktionsschnittstellen angegeben.

**Tab. 20:** Fragmentlängen der offenen Leserahmen verschiedener Moleküle, die über die angegebenen Restriktionsschnittstellen in die lentiviralen Vektoren pCDH1-MCS1 und pCDH1-MCS1-EF1-copGFP kloniert wurden

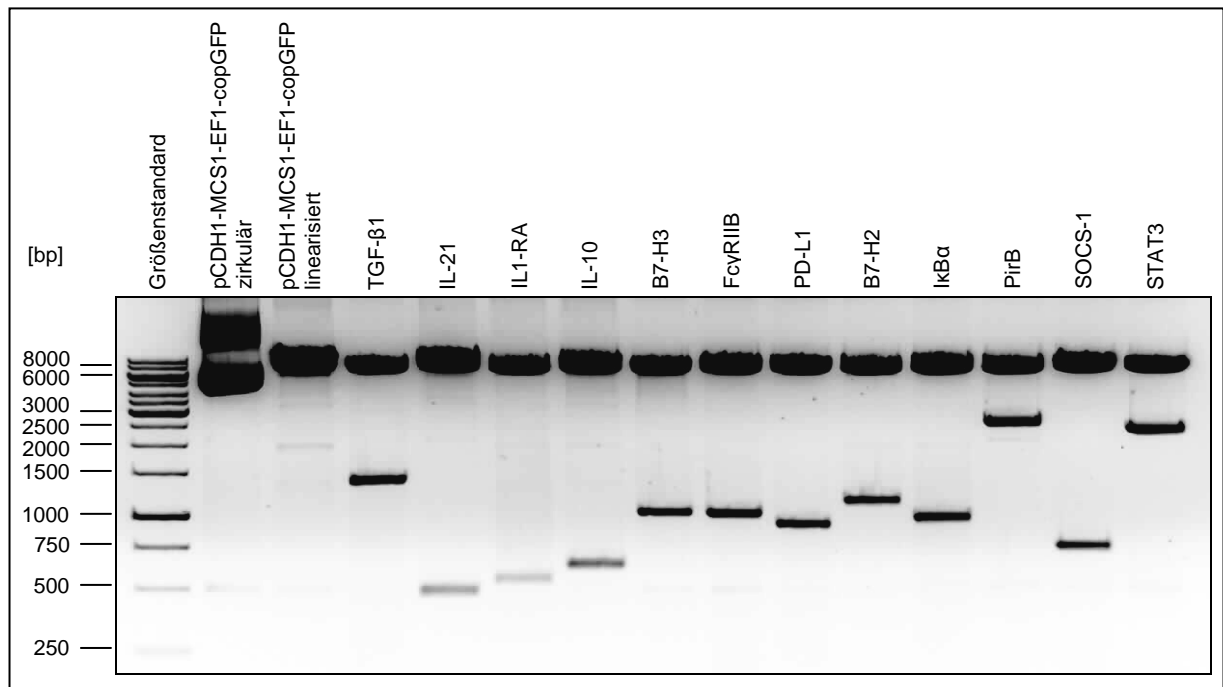
Murines Gen	Fragmentlänge (bp)	Zur Klonierung verwendete Restriktionsschnittstellen
B7-H2	968	<i>NheI</i> , <i>Bam</i> HI
B7-H3	950	<i>NheI</i> , <i>Eco</i> RI
FcγRIIB	881	<i>NheI</i> , <i>Eco</i> RI
IκBα	970	<i>NheI</i> , <i>Bam</i> HI
IL-10	450	<i>NheI</i> , <i>Bam</i> HI
IL-21	496	<i>NheI</i> , <i>Bsp</i> 119I
IL-1RA	536	<i>NheI</i> , <i>Bam</i> HI
PD-L1	872	<i>NheI</i> , <i>Eco</i> RI
PirB	2534	<i>NheI</i> , <i>Bsp</i> 119I
SOCS-1	638	<i>NheI</i> , <i>Eco</i> RI
STAT3	2312	<i>NheI</i> , <i>Eco</i> RI
TGF-β1	1172	<i>NheI</i> , <i>Eco</i> RI

Die Restriktionsanalysen zeigten bei allen isolierten pCDH1-MCS1- (Abbildung 28) und pCDH1-MCS1-EF1-copGFP-Konstrukten (Abbildung 29) das erwartete Restriktionsmuster. Im Rahmen einer Restriktionsanalyse als potentiell richtig detektierte Konstrukte wurden anschließend zur eindeutigen Identifizierung im Institut für Rechtsmedizin der Johannes Gutenberg- Universität Mainz sequenziert.



**Abbildung 28: Restriktionsanalyse der generierten pCDH1-MCS1-Konstrukte.** Die verschiedenen aus *E. coli* TOP10-Transformanten isolierten pCDH1-MCS1-Konstrukte wurden mit den jeweils zur Klonierung verwendeten Restriktionsendonukleasen hydrolysiert und in einem 1 %igen TAE-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Bestimmung der Fragmentgrößen erfolgte jeweils mit Hilfe des auf der linken Seite angegebenen Größenstandards. Die erwarteten Fragmentgrößen sowie die verwendeten Restriktionsschnittstellen sind in Tab. 20 angegeben.

Die verschiedenen pCDH1-MCS1-EF1-copGFP-Konstrukte wurden im weiteren Verlauf der Arbeit zur lentiviralen *in vitro*-Transduktion von BM-DCs eingesetzt. Die pCDH1-MCS1-Konstrukte, welche das copGFP-Reportergen nicht enthalten, wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht verwendet, stehen aber für spätere *in vivo*-Experimente zur Verfügung.



**Abbildung 29: Restriktionsanalyse der generierten pCDH1-MCS1-EF1-copGFP-Konstrukte.** Die verschiedenen aus *E. coli* TOP10-Transformanten isolierten pCDH1-MCS1-EF1-copGFP-Konstrukte wurden mit den jeweils zur Klonierung verwendeten Restriktionsendonukleasen hydrolysiert und in einem 1 %igen TAE-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Bestimmung der Fragmentgrößen erfolgte jeweils mit Hilfe des auf der linken Seite angegebenen Größensstandards. Die erwarteten Fragmentgrößen sowie die verwendeten Restriktionsschnittstellen sind in Tab. 20 angegeben.

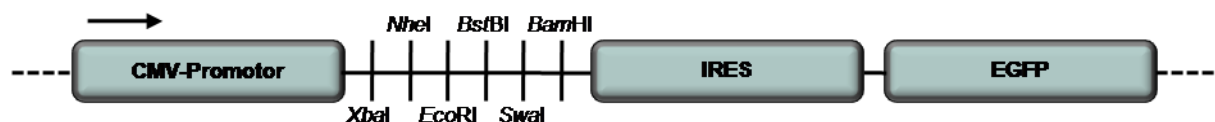
### 3.3.2 Generierung alternativer lentiviraler Vektoren, die eine DC-fokussierte Transgenexpression und/oder eine IRES-gekoppelte Reporterexpression ermöglichen

Da lentivirale Vektoren in der Lage sind, DCs in Folge einer *in vivo*-Applikation effektiv zu transduzieren und stabile antigenspezifische Immunantworten hervorzurufen<sup>398</sup>, ist eine DC-fokussierte Transgenexpression von besonderem experimentellen Interesse. Diese transkriptionale Restriktion auf DCs sollte durch den Promotor des Aktinbündelungsproteins Fascin erfolgen, der in der Gruppe der hämatopoetischen Zellen einzig in DCs aktiv ist. Hierbei korreliert die Aktivität des Promotors mit dem Aktivierungszustand der Zellen<sup>136,138</sup>. Damit auch das für den Nachweis positiver Transduktanden notwendige Reportergen

ebenfalls nur innerhalb einer bestimmten Zellpopulation exprimiert wird, sollte es unter die Kontrolle einer IRES gestellt werden. Es handelt sich hierbei um eine spezifische Sekundärstruktur der mRNA, die ohne weitere Initiationsfaktoren direkt als Bindungsstelle für Proteine des Translationsapparats fungiert. Auf diese Weise kann die Bildung des Reporterproteins ohne einen zweiten Promotor erfolgen und ist direkt abhängig von der Aktivität des im Vektor vorhandenen Transgen-Promotors.

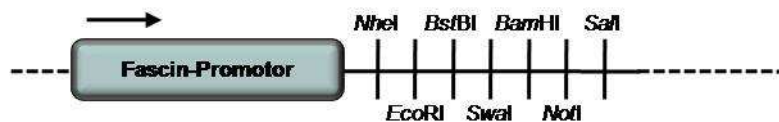
Aus den genannten Gründen sollten im Rahmen dieser Arbeit, ausgehend von den lentiviralen Vektoren pCDH1-MCS1 und pCDH1-EF1-copGFP, alternative Konstrukte generiert werden, bei denen der ubiquitär konstitutiv aktive Promotor CMV, der die Expression des Transgens kontrolliert, gegen den DC-spezifischen Fascin-Promotor ersetzt wird. In weiteren Varianten sollte außerdem der ubiquitär konstitutiv aktive EF1-Promotor der Reporterengenkassette durch eine IRES ausgetauscht werden. Damit eine Identifikation von Doppeltransduktanden möglich ist, wurden zusätzlich Vektoren generiert, bei denen das copGFP-Protein gegen den alternativen Reporter DsRed2 ausgetauscht wurde.

Zunächst erfolgte die Generierung des Vektors pCDH1-IRES-EGFP (Abbildung 30), bei dem das Reportergen EGFP durch eine IRES an die Aktivität des CMV-Promotors gekoppelt ist. Hierzu wurde die IRES-EGFP-Kassette mittels PCR amplifiziert, wobei der Vektor pIRES-EGFP als Matrize verwendet wurde. Durch die beiden in der PCR-Reaktion verwendeten spezifischen Primer, IRESEGFP-s und IRESEGFP-as, wurde am 5'-Ende der Gensequenz eine *Bgl*II- und am 3'-Ende eine *Sal*I-Restriktionsschnittstelle generiert. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden mit den genannten Restriktionsendonukleasen hydrolysiert und über ein 1 %iges TAE-Agarosegel aufgereinigt. Der Zielvektor pCDH1-MCS1 wurde mit den Enzymen *Bam*HI und *Sal*I restringiert, deren Erkennungssequenzen nahe am 3'-Ende der MCS liegen. Somit bleibt innerhalb des neu generierten Vektors ein Großteil der ursprünglichen MCS zur Klonierung von Transgenen erhalten. Da durch die Restriktion mit *Bgl*II bzw. *Bam*HI überhängende kompatible kohäsive Enden entstanden sind, konnte eine gerichtete Ligation der IRES-EGFP-Kassette in den lentiviralen Zielvektor erfolgen.



**Abbildung 30: Schematische Darstellung des lentiviralen Expressionsvektors pCDH1-MCS1-IRES-EGFP.** In Rechtecken dargestellt sind der CMV- (*human immediate early cytomegalovirus*) Promotor, wobei die Transkriptionsrichtung durch einen Pfeil gekennzeichnet wurde, die IRES (*internal ribosomal entry side*) sowie das gekoppelte Reportergen EGFP (*enhanced green fluorescent protein*). Weiterhin sind die in der MCS (*multiple cloning side*) des Vektors enthaltenen Restriktionsschnittstellen angegeben.

Der isolierte murine Fascin-Promotor lag bereits in Form des pFascin-pZero-2-Konstrukts zu Beginn der Arbeit vor. Für dessen einseitig gerichtete Klonierung in den lentiviralen Vektor pCDH1-MCS1 wurde das pFascin-pZero-2-Plasmid zunächst mit der Restriktionsendonuklease *Bam*HI hydrolysiert und das entstandene überhängende Ende mittels Klenow-Fragment aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Exzision des Fascin-Promotors (ca. 2600 bp) durch Restriktion des bereits linearisierten Plasmids mit dem Enzym *Nhe*I. Analog zu dem isolierten DNA-Fragment wurde der Zielvektor zunächst mit dem Enzym *Bcu*I verdaut und das entsprechende überhängende Ende mit Hilfe des Klenow-Fragments geglättet. Nachfolgend wurde durch die Hydrolyse des Vektors mit der Restriktionsendonuklease *Nhe*I der CMV-Promotor entfernt und ein zum zu inserierenden Fascin-Promotor komplementäres überhängendes Ende generiert. Durch die Ligation der beiden entsprechend vorbereiteten DNA-Fragmente konnte die Generierung des Vektors pFscn-pCDH1-MCS1 (Abbildung 31) stattfinden.

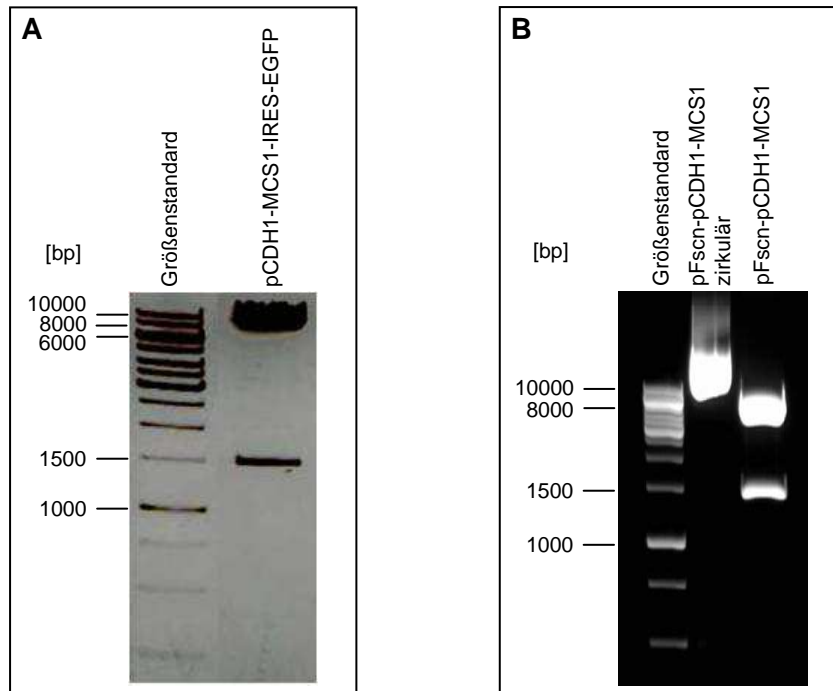


**Abbildung 31: Schematische Darstellung des lentiviralen Expressionsvektors pFscn-pCDH1-MCS1.** Der Fascin-Promotor ist als Rechteck dargestellt, wobei die Transkriptionsrichtung durch einen Pfeil gekennzeichnet wurde. Das vorliegende Konstrukt enthält keinen Reporter zur Ermittlung der Transduktionseffizienz. Weiterhin sind die in der MCS (*multiple cloning side*) des Vektors enthaltenen Restriktionsschnittstellen angegeben.

Die Ligationsansätze für die Generierung der beiden lentiviralen Vektoren pCDH1-MCS1-IRES-EGFP und pFscn-pCDH1-MCS1 wurden zur Transformation elektrokompenter *E. coli* TOP10-Zellen eingesetzt, wobei deren Selektion durch eine plasmidkodierte Ampicillinresistenz stattfand. Aus den erhaltenen Transformanten wurde die Plasmid-DNA mittels Isopropanol-Minipräparation isoliert.

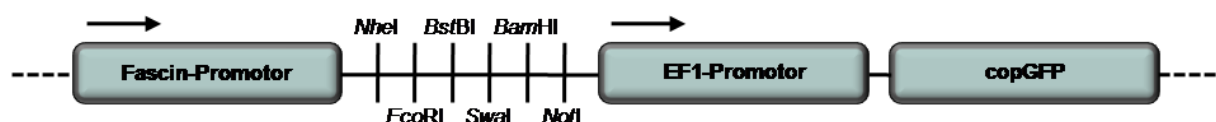
Die Kontrolle des pCDH1-MCS1-IRES-EGFP-Vektors erfolgte durch eine Hydrolyse mit den Enzymen *Eco*RI und *Sal*I, deren Erkennungssequenzen sich 5'-bzw. 3'-flankierend zur inserierten Expressionskassette befinden. Das dabei entstehende IRES-EGFP-Fragment hat eine Länge von 1322 bp (Abbildung 32A). Der Nachweis des Fascin-Promotors erfolgte mit der Restriktionsendonuklease *Xba*I, die an zwei Stellen in der Gensequenz des Promotors restringiert, wodurch ein 1419 bp Fragment entsteht (Abbildung 32B).

Damit bei Verwendung des pFscn-pCDH1-MCS1-Vektors eine Bestimmung der Transduktionseffizienz möglich ist, muss ein adäquater Reporter im Plasmid enthalten sein. Aus diesem Grund wurde der genannte Vektor mit Anteilen des pCDH1-MCS1-EF1-copGFP-Vektors fusioniert, um das Expressionsplasmid pFscn-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP zu generieren (Abbildung 33).



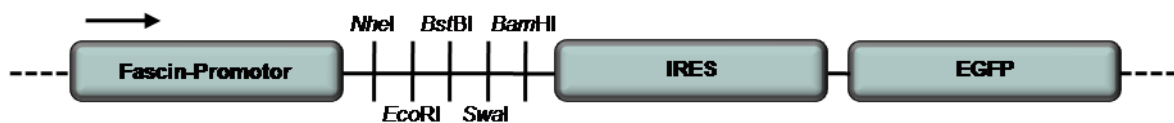
**Abbildung 32: Restriktionsanalyse der generierten lentiviralen Expressionsvektoren pCDH1-MCS1-IRES-EGFP und pFscn-pCDH1-MCS1.** (A) Die Kontrolle des pCDH1-MCS1-IRES-EGFP-Vektors erfolgte durch eine Restriktion mit den Enzymen *EcoRI* und *SalI*. (B) Der Nachweis positiver pCDH1-MCS1-pFscn-Konstrukte fand durch eine Hydrolyse mit der Restriktionsendonuklease *XbaI* statt. Anschließend wurden die Restriktionsansätze in einem 1 %igen TAE-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Bestimmung der Fragmentgrößen erfolgte jeweils mit Hilfe des auf der linken Seite angegebenen Größenstandards.

In Vorbereitung auf die nachfolgende Klonierung wurden die beiden Ausgangsvektoren pFscn-pCDH1-MCS1 und pCDH1-MCS1-EF1-copGFP mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *Acc65I* hydrolysiert und über ein 1 %iges TAE-Agarosegel aufgereinigt. Der größte Anteil des neuen Konstrukts stammt aus dem pFscn-pCDH1-MCS1-Vektor (8199 bp) und enthält alle Elemente bis auf die MCS und das WPRE Fragment. Durch die Wahl der beiden angegebenen Restriktionsschnittstellen wurde aus dem pCDH1-MCS1-EF1-copGFP-Vektor ein 1945 bp langes Fragment isoliert, das die MCS, den EF1-Promotor, das copGFP-Reportergen und das WPRE Fragment enthält. Die aus dem Gel isolierten DNA-Fragmente wiesen überhängende, zueinander komplementäre Enden auf, wodurch eine gerichtete Ligation erfolgen konnte.



**Abbildung 33: Schematische Darstellung des lentiviralen Expressionsvektors pFscn-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP.** In Rechtecken dargestellt sind der Fascin- und der EF1- (*human elongation factor 1 alpha*) Promotor, wobei die Transkriptionsrichtung jeweils durch einen Pfeil gekennzeichnet wurde, sowie das Reportergen copGFP (*copepod green fluorescent protein*). Weiterhin sind die in der MCS (*multiple cloning side*) des Vektors enthaltenen Restriktionsschnittstellen angegeben.

Auch der pFscn-pCDH1-MCS1-Vektor wurde um das Reporter-gen EGFP, das über eine IRES an die Aktivität des Fascin-Promotors gekoppelt ist, erweitert und somit der pFscn-pCDH1-MCS1-IRES-EGFP-Vektor (Abbildung 34) generiert. Die einfachste Variante zur Erstellung des Vektors pFscn-pCDH1-MCS1-IRES-EGFP war der Austausch des CMV-Promotors gegen den Fascin-Promotor in dem bereits zuvor generierten pCDH1-MCS1-IRES-EGFP-Vektor. Dieser Umbau erfolgte analog zu demjenigen, der im Abschnitt der Generierung des pFscn-pCDH1-MCS1-Vektors beschrieben wurde, nur dass das pCDH1-MCS1-IRES-EGFP-Konstrukt statt dem pCDH1-MCS1-Vektor als Zielplasmid eingesetzt wurde.

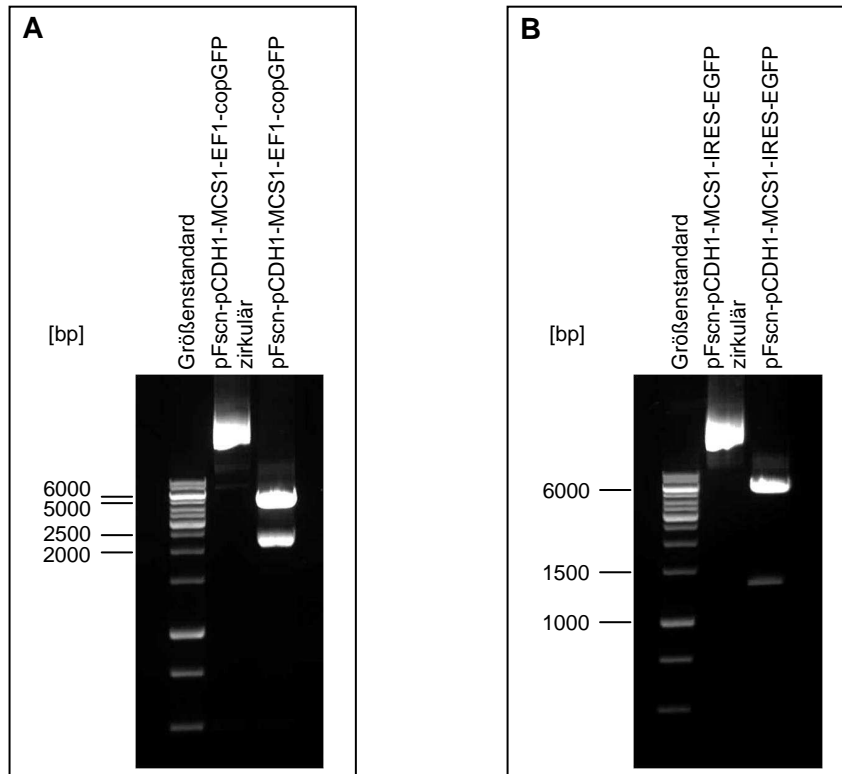


**Abbildung 34: Schematische Darstellung des lentiviralen Expressionsvektors pFscn-pCDH1-MCS1-IRES-EGFP.** In Rechtecken dargestellt sind der Fascin-Promotor, wobei die Transkriptionsrichtung durch einen Pfeil gekennzeichnet wurde, die IRES (*internal ribosomal entry side*) sowie das gekoppelte Reporter-gen EGFP (*enhanced green fluorescent protein*). Weiterhin sind die in der MCS (*multiple cloning side*) des Vektors enthaltenen Restriktionsschnittstellen angegeben.

Mit den verschiedenen Ligationsansätzen wurden *E. coli* TOP10-Zellen elektroporiert. Die Selektion potentiell positiver Transformanten erfolgte mittels der plasmidkodierten Ampicillinresistenz. Aus diesen wurde dann die Plasmid-DNA mit Hilfe von Isopropanol-Minipräparationen isoliert.

Die Kontrolle der beiden Vektoren pFscn-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP und pFscn-pCDH1-MCS1-IRES-EGFP erfolgte jeweils durch eine Hydrolyse mit der Restriktionsendonuklease *ApaI*. Restriktionsschnittstellen für dieses Enzym befinden sich in den Sequenzen des Fascin-Promotors, des copGFP-Reportergens sowie der der IRES-EGFP-Kassette. Im Fall des pFscn-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP-Vektors (Abbildung 35A) entsteht durch die Restriktion ein Fragment mit einer Länge von 2287 bp und im Fall des pFscn-pCDH1-MCS1-IRES-EGFP-Vektors (Abbildung 35B) ein 1220 bp langes Fragment.

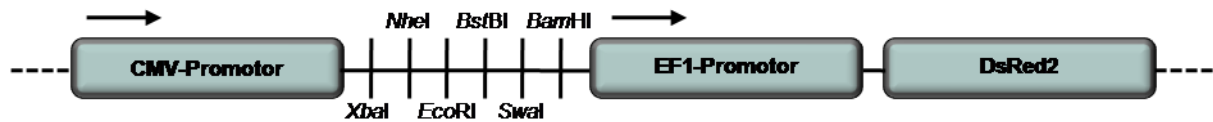
Damit neben dem copGFP-Protein ein alternativer Reporter für die Ermittlung von Doppeltransduktanden zur Verfügung steht, wurde der pCDH1-MCS1-Vektor um eine EF1-DsRed2- (*red fluorescent protein*) Kassette erweitert und der lentivirale Vektor pCDH1-MCS1-EF1-DsRed2 (Abbildung 36) generiert. Es handelt sich hier um ein Konstrukt, bei dem die Expression des DsRed2-Gens durch den ubiquitär konstitutiv aktiven EF1-Promotor kontrolliert wird.



**Abbildung 35: Restriktionsanalyse der generierten lentiviralen Expressionsvektoren pFscn-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP und pFscn-pCDH1-MCS1-IRES-EGFP.** Die Kontrolle des (A) pFscn-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP-Vektors sowie die des (B) pFscn-pCDH1-MCS1-IRES-EGFP-Vektors erfolgte jeweils durch eine Hydrolyse mit der Restriktionsendonuklease *Apal*. Anschließend wurden die Restriktionsansätze in einem 1 %igen TAE-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Bestimmung der Fragmentgrößen erfolgte jeweils mit Hilfe des auf der linken Seite angegebenen Größenstandards.

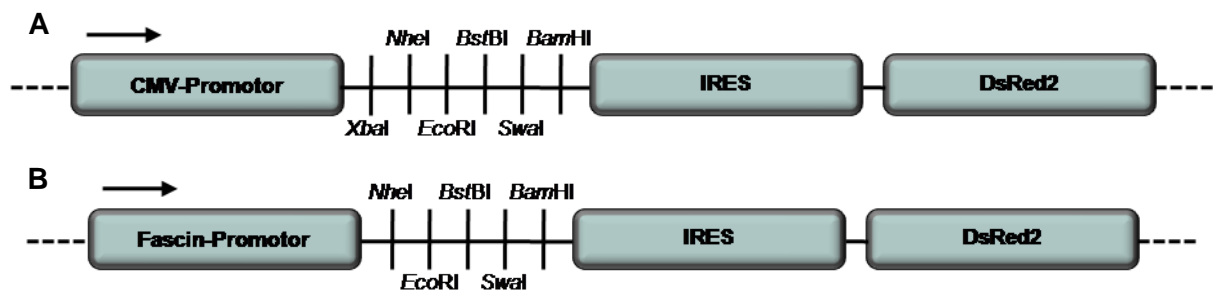
Für die Generierung dieses Vektors wurde zunächst die EF1-DsRed2-Kassette mit den spezifischen Primern EF1 $\alpha$ -s-*Bam*HI und DsRED-as-*Bg*II im Rahmen einer PCR amplifiziert. Als Matrize wurde in dieser Reaktion der Vektor pDsRed2-N1-EF1 eingesetzt, der freundlicherweise von Frau Dipl.-Biol. Yvonne Höhn, klinische Forschergruppe Allergie, zur Verfügung gestellt wurde. Mit Hilfe der angegebenen Primer wurde am 5'-Ende der Gensequenz eine *Bam*HI- und am 3'-Ende eine *Bg*II-Restriktionsschnittstelle generiert. Die Produkte der PCR-Reaktion wurden direkt im Anschluss mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen hydrolysiert und über ein 1 %iges TAE-Agarosegel aufgereinigt. Der Zielvektor pCDH1-MCS1 wurde mit dem Enzym *Bam*HI restringiert und nachfolgend zur Vermeidung einer Religation dephosphoryliert. Da durch die Restriktion mit dem Enzym *Bg*II ein überhängendes Ende entstanden ist, das zu dem durch das Enzym *Bam*HI generierten kompatibel ist, fand eine gerichtete Ligation der EF1-DsRed2-Kassette in den lentiviralen Zielvektor statt.





**Abbildung 36: Schematische Darstellung des lentiviralen Expressionsvektors pCDH1-MCS1-EF1-DsRed2.** In Rechtecken dargestellt sind der CMV- (*human immediate early cytomegalovirus*) und der EF1- (*human elongation factor 1 alpha*) Promotor, wobei die Transkriptionsrichtung jeweils durch einen Pfeil gekennzeichnet wurde, sowie das Reporterogen DsRed2 (*red fluorescent protein*). Weiterhin sind die in der MCS (*multiple cloning side*) des Vektors enthaltenen Restriktionsschnittstellen angegeben.

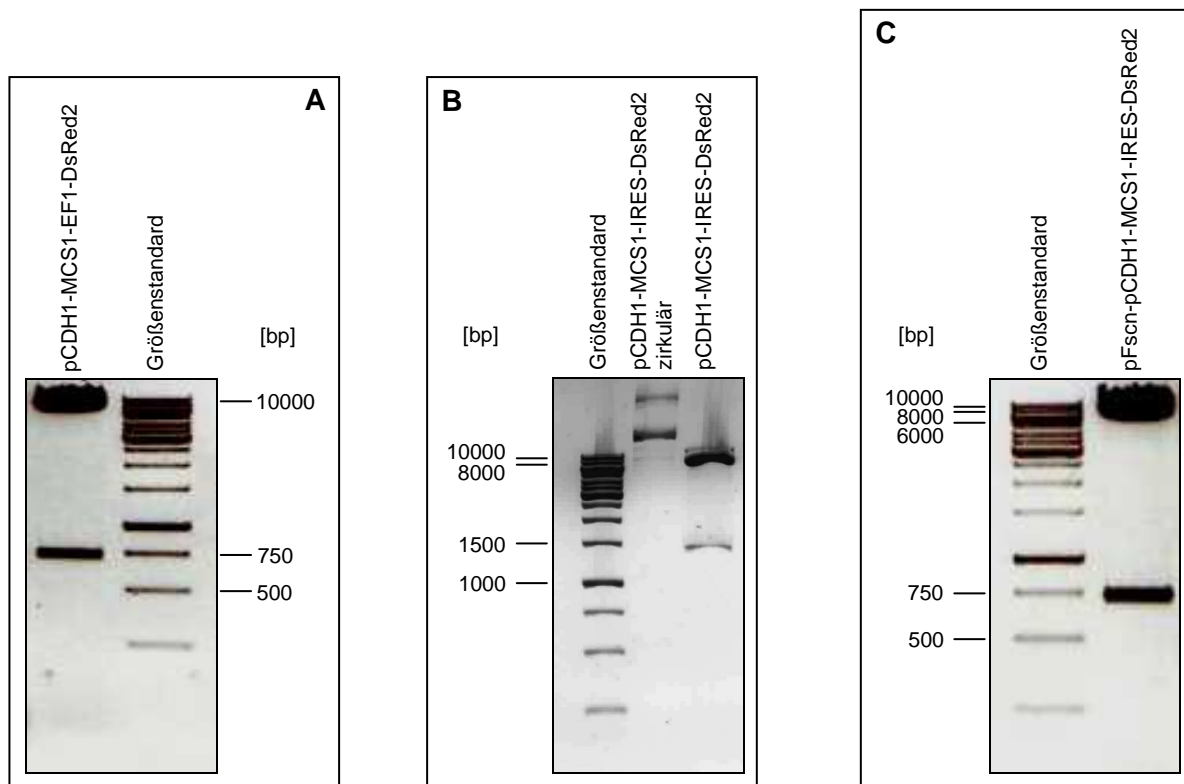
Die lentiviralen Vektoren pCDH1-MCS1-IRES-DsRed2 (Abbildung 37A) und pFscn-pCDH1-MCS1-EF1-DsRed2 (Abbildung 37B) wurden analog zum pCDH1-MCS1-EF1-DsRed2-Vektor generiert. Die IRES-DsRed2-Kassette wurde mit den Primern IRESEGFP-s und DsRED-as-*Bgl*I in einer PCR-Reaktion amplifiziert, wobei der ebenfalls von Frau Dipl.-Biol. Yvonne Höhn zur Verfügung gestellte Vektor pDsRed2-N1-IRES als Matrize eingesetzt wurde. Auch bei diesem DNA-Fragment wurde durch die eingesetzten Primer am 5'-Ende der Sequenz eine *Bam*HI- und am 3'-Ende eine *Bgl*I-Restriktionsschnittstelle eingeführt. Nach der Restriktion der PCR-Produkte mit den beiden genannten Enzymen wurden diese über ein 1 %iges TAE-Agarosegel aufgereinigt. Die beiden Zielvektoren pCDH1-MCS1 und pFscn-pCDH1-MCS1 wurden mit der Restriktionsendonuklease *Bam*HI hydrolysiert und im Anschluss zur Unterbindung ungewünschter Religationsereignisse dephosphoryliert. In beiden Fällen war die Ligation auf Grund der ausgewählten Restriktionsschnittstellen ungerichtet.



**Abbildung 37: Schematische Darstellung der lentiviralen Expressionsvektoren pCDH1-MCS1-IRES-DsRed2 und pFscn-pCDH1-MCS1-IRES-DsRed2.** In Rechtecken dargestellt sind der CMV- (*human immediate early cytomegalovirus*) und der Fascin-Promotor, wobei die Transkriptionsrichtung jeweils durch einen Pfeil gekennzeichnet wurde, sowie das Reporterogen DsRed2 (*red fluorescent protein*). Weiterhin sind die in der MCS (*multiple cloning side*) des Vektors enthaltenen Restriktionsschnittstellen angegeben.

Alle Ligationsansätze wurden für die Transformation elektrokompeter *E. coli* TOP10-Zellen verwendet. Eine Selektion der Transformanten erfolgte bei allen drei Vektoren mittels einer plasmidkodierten Ampicillinresistenz. Die Plasmid-DNA wurde aus den Transformanten durch eine Isopropanol-Minipräparation isoliert.

Zwischen der IRES bzw. dem EF1-Promotor und dem Reporter DsRed2 befindet sich eine Restriktionsschnittstelle für das Enzym *BshTI*, welche zur Kontrolle der isolierten Plasmide verwendet wurde. Hierfür wurden potentiell positive pCDH1-MCS1-EF1-DsRed2- und pFscn-pCDH1-MCS1-IRES-DsRed2-Konstrukte mit den beiden Restriktionsendonukleasen *BshTI* und *NotI* hydrolysiert, wodurch jeweils das 684 bp große DsRed2-Fragment entsteht. Im Gegensatz dazu wurde der pCDH1-MCS1-IRES-DsRed2-Vektor zur Kontrolle mit den beiden Enzymen *BamHI* und *NotI* restringiert, wobei das IRES-DsRed2-Fragment mit einer Größe von 12464 bp entsteht. Mit Hilfe der durchgeführten Restriktionsanalysen konnten für alle zu generierenden lentiviralen Expressionskonstrukte potentiell positive Plasmide identifiziert werden (Abbildung 38). Diese Plasmide wurden anschließend durch Sequenzierungen im Institut für Rechtsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz verifiziert.



**Abbildung 38: Restriktionsanalyse der generierten lentiviralen Expressionsvektoren pCDH1-MCS1-EF1-DsRed2, pCDH1-MCS1-IRES-DsRed2 und pFscn-pCDH1-MCS1-IRES-DsRed2.** Die Kontrolle des (A) pCDH1-MCS1-EF1-DsRed2- und des (C) pFscn-pCDH1-MCS1-IRES-DsRed2-Vektors erfolgte jeweils durch eine Hydrolyse mit den Restriktionsendonukleasen *BshTI* und *NotI*. Der (B) pCDH1-MCS1-IRES-DsRed2-Vektors wurde mit Hilfe der Enzyme *BamHI* und *NotI* kontrolliert. Anschließend wurden die Restriktionsansätze in einem 1 %igen TAE-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Bestimmung der Fragmentgrößen erfolgte jeweils mit Hilfe des angegebenen Größenstandards.

Die Vektoren pCDH1-MCS1-IRES-EGFP, pFscn-pCDH1-MCS1, pFscn-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP und pFscn-pCDH1-MCS1-IRES-EGFP wurden im folgenden zur Klonierung der verschiedenen in Abschnitt 3.3.1 angegebenen Transgene verwendet.

### 3.3.3 Generierung lentiviraler Konstrukte zur DC-fokussierten Transgenexpression und/oder IRES-gekoppelter Reporterexpression

Die vier lentiviralen Expressionsvektoren pCDH1-MCS1-IRES-EGFP, pFscn-pCDH1-MCS1, pFscn-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP und pFscn-pCDH1-MCS1-IRES-EGFP, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit generiert wurden (Abschnitt 3.3.2), wurden analog zu den kommerziell erworbenen Vektoren pCDH1-MCS1 und pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (Abschnitt 3.3.1) für die Klonierung der offenen Leserahmen potentiell tolerogener Moleküle verwendet. Auf diese Weise ist es möglich, die Transgen- und/oder die Reporterexpression auf die DC-Population zu restringieren. Je nach experimenteller Fragestellung (zum Beispiel *in vitro*- oder *in vivo*-Transduktion) kann somit der am besten geeignete Satz an Expressionsvektoren ausgewählt werden.

Die Generierung der verschiedenen pFscn-pCDH1-MCS1-Konstrukte (Abbildung 40) fand für alle Gene analog zur Generierung der pCDH1-MCS1- bzw. der pCDH1-MCS1-EF1-copGFP-Konstrukte (Abschnitt 3.3.1) statt. So erfolgte die Amplifikation von Genfragmenten mit den gleichen Primern und die Klonierungen fand in allen Fällen unter Verwendung der bereits zuvor angegebenen Restriktionsschnittstellen statt. Zusammengefasst sind diese Angaben in Tabelle 21.

**Tab. 21:** Fragmentlänge der offenen Leserahmen verschiedener Moleküle, die über die angegebenen Restriktionsschnittstellen in die lentiviralen Vektoren pFscn-pCDH1-MCS1, pFscn-pCDH1-MCS-EF1-copGFP, pCDH1-MCS1-IRES-EGFP und pFscn-pCDH1-MCS1-IRES-EGFP kloniert wurden

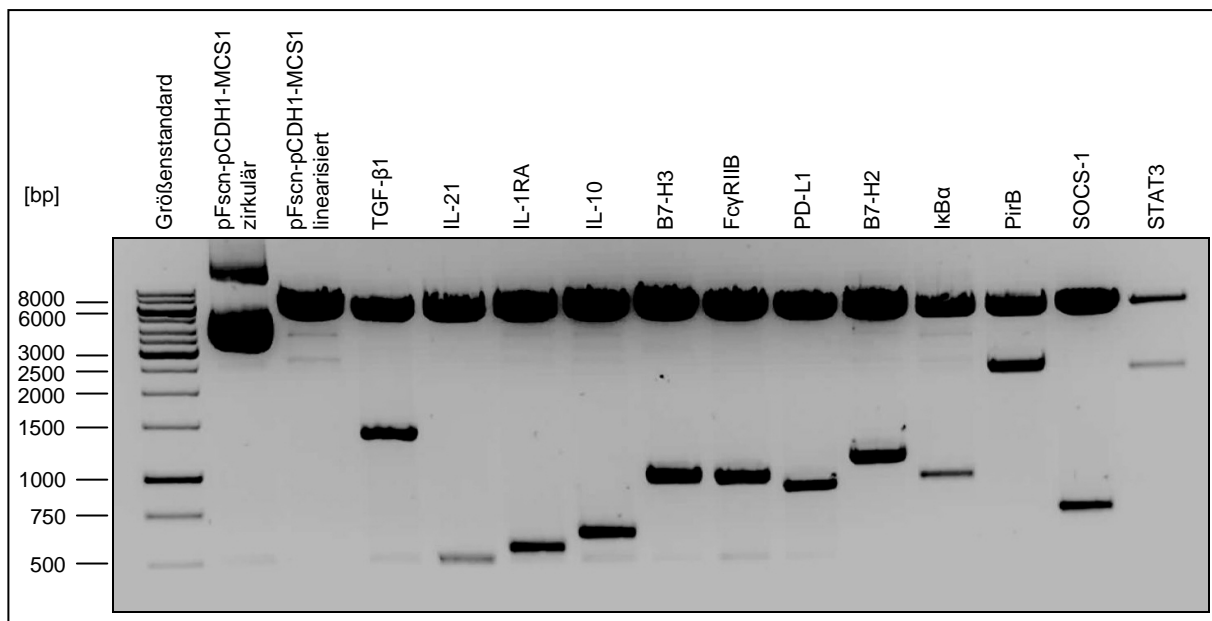
Murines Gen	Fragmentlänge (bp)	Zur Klonierung in die nachstehenden Vektoren verwendete Restriktionsschnittstellen		
		pFscn-pCDH1-MCS1	pFscn-pCDH1-MCS-EF1-copGFP	pCDH1-MCS1-IRES-EGFP, pFscn-pCDH1-MCS1-IRES-EGFP
B7-H2	968	<i>NheI, BamHI</i>	<i>NheI, BamHI</i>	<i>NheI, EcoRI</i>
B7-H3	950	<i>NheI, EcoRI</i>	<i>NheI, EcoRI</i>	<i>NheI, EcoRI</i>
FcyRIIB	881	<i>NheI, EcoRI</i>	<i>NheI, EcoRI</i>	<i>NheI, EcoRI</i>
IkB $\alpha$	970	<i>NheI, BamHI</i>	<i>NheI, BamHI</i>	<i>NheI, Bsp119I</i>
IL-10	450	<i>NheI, BamHI</i>	<i>NheI, Bsp119I</i>	<i>NheI, Bsp119I</i>
IL-21	496	<i>NheI, Bsp119I</i>	<i>NheI, Bsp119I</i>	<i>NheI, Bsp119I</i>
IL-1RA	536	<i>NheI, BamHI</i>	<i>NheI, EcoRI</i>	<i>NheI, EcoRI</i>
PD-L1	872	<i>NheI, EcoRI</i>	<i>NheI, EcoRI</i>	<i>NheI, EcoRI</i>
PirB	2534	<i>NheI, Bsp119I</i>	<i>NheI, Bsp119I</i>	<i>NheI, Bsp119I</i>
SOCS-1	638	<i>NheI, EcoRI</i>	<i>NheI, EcoRI</i>	<i>NheI, EcoRI</i>
STAT3	2312	<i>NheI, EcoRI</i>	<i>NheI, EcoRI</i>	<i>NheI, EcoRI</i>
TGF- $\beta$ 1	1172	<i>NheI, EcoRI</i>	<i>NheI, EcoRI</i>	<i>NheI, EcoRI</i>

Auch die Herstellung der pFscn-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP-Konstrukte (Abbildung 40) fand zum Großteil entsprechend der bereits zuvor beschriebenen Strategie unter Verwendung der gleichen Primer und Restriktionsendonukleasen statt. Jedoch wurde dazu der offene

### 3 Ergebnisse

Leserahmen des Moleküls IL-10 nicht aus dem Konstrukt IL-10-pCI exziiert, sondern mit Hilfe der spezifischen Primer mL10-ORFNhe-s und mL10-ORFBsp-as in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Auf diese Weise wurde am 5'-Ende eine *NheI*- und am 3'-Ende eine *Bsp119I*-Restriktionsschnittstelle in die Gensequenz eingeführt.

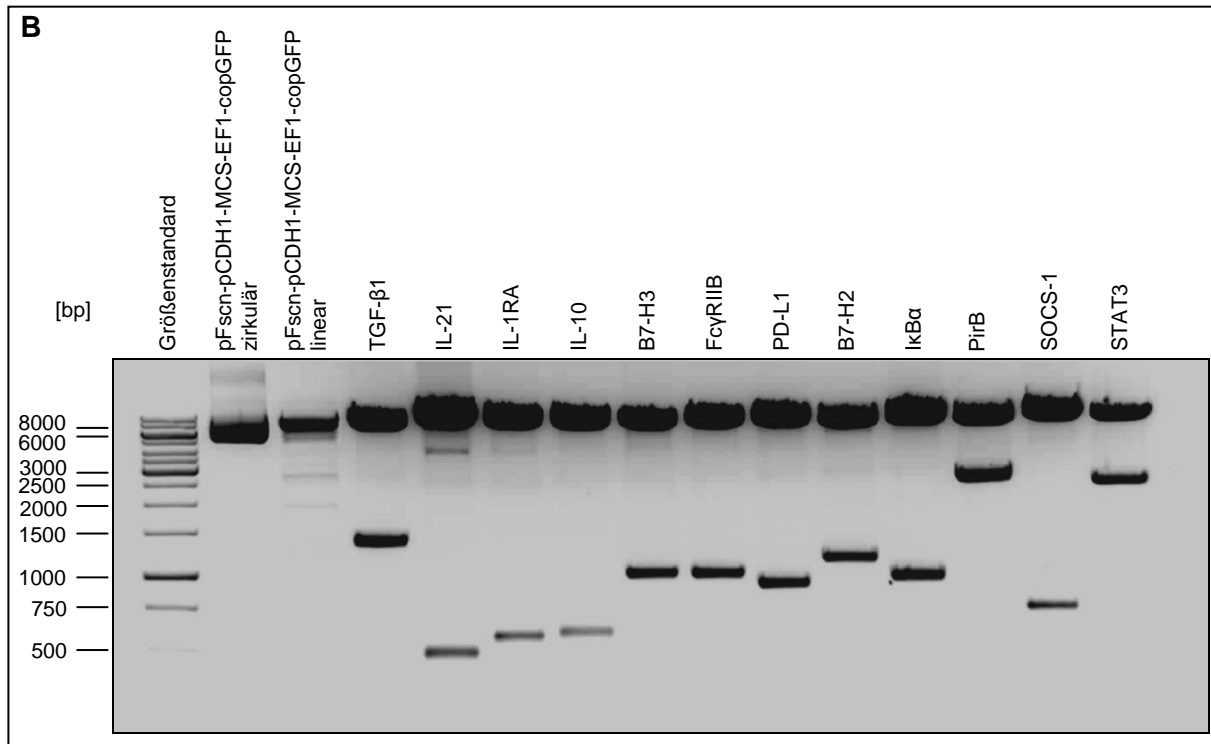
Direkt nach der Amplifikation erfolgte die Restriktion der entstandenen DNA-Fragmente mit Hilfe der beiden entsprechenden Enzyme. Die Isolierung des offenen Leserahmens von IL-1RA aus dem Konstrukt IL-1RA-pZero-2 wurde mit den Restriktionsendonukleasen *NheI* und *EcoRI* durchgeführt und nicht wie für die vorherigen Konstrukte beschrieben mit *NheI* und *BamHI*.



**Abbildung 39: Restriktionsanalyse der generierten pFscn-pCDH1-MCS1-Konstrukte.** Die verschiedenen aus *E. coli* TOP10-Transformanten isolierten pFscn-pCDH1-MCS1-Konstrukte wurden mit den jeweils zur Klonierung verwendeten Restriktionsendonukleasen hydrolysiert und in einem 1 %igen TAE-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Bestimmung der Fragmentgrößen erfolgte in beiden Fällen mit Hilfe des auf der linken Seite angegebenen Größenstandards. Die erwarteten Fragmentgrößen sowie die verwendeten Restriktionsschnittstellen sind in Tabelle 21 angegeben.

Da sich innerhalb der IRES-EGFP-Expressionskassette eine *BamHI*-Restriktionsschnittstelle befindet, konnte dieses Enzym nicht für die Generierung überhängender Enden zur nachfolgenden Ligation mit den Zielvektoren pCDH1-MCS1-IRES-EGFP und pFscn-pCDH1-MCS1-IRES-EGFP verwendet werden. Soweit möglich, erfolgte die Generierung der verschiedenen Konstrukte (Abbildung 41) analog zu dem im (Abschnitt 1.3.1) beschriebenen Vorgehen. Jedoch fand bei den Konstrukten B7-H2-pZero-2 und IL-1RA-pZero-2 die Exzision des jeweiligen offenen Leserahmens unter Verwendung der Enzymkombination *NheI* und *EcoRI* statt, so dass am 3'-Ende eine zu *BamHI* alternative Restriktionsschnittstelle zur Klonierung in die beiden Zielvektoren verwendet werden konnte. Weiterhin abweichend

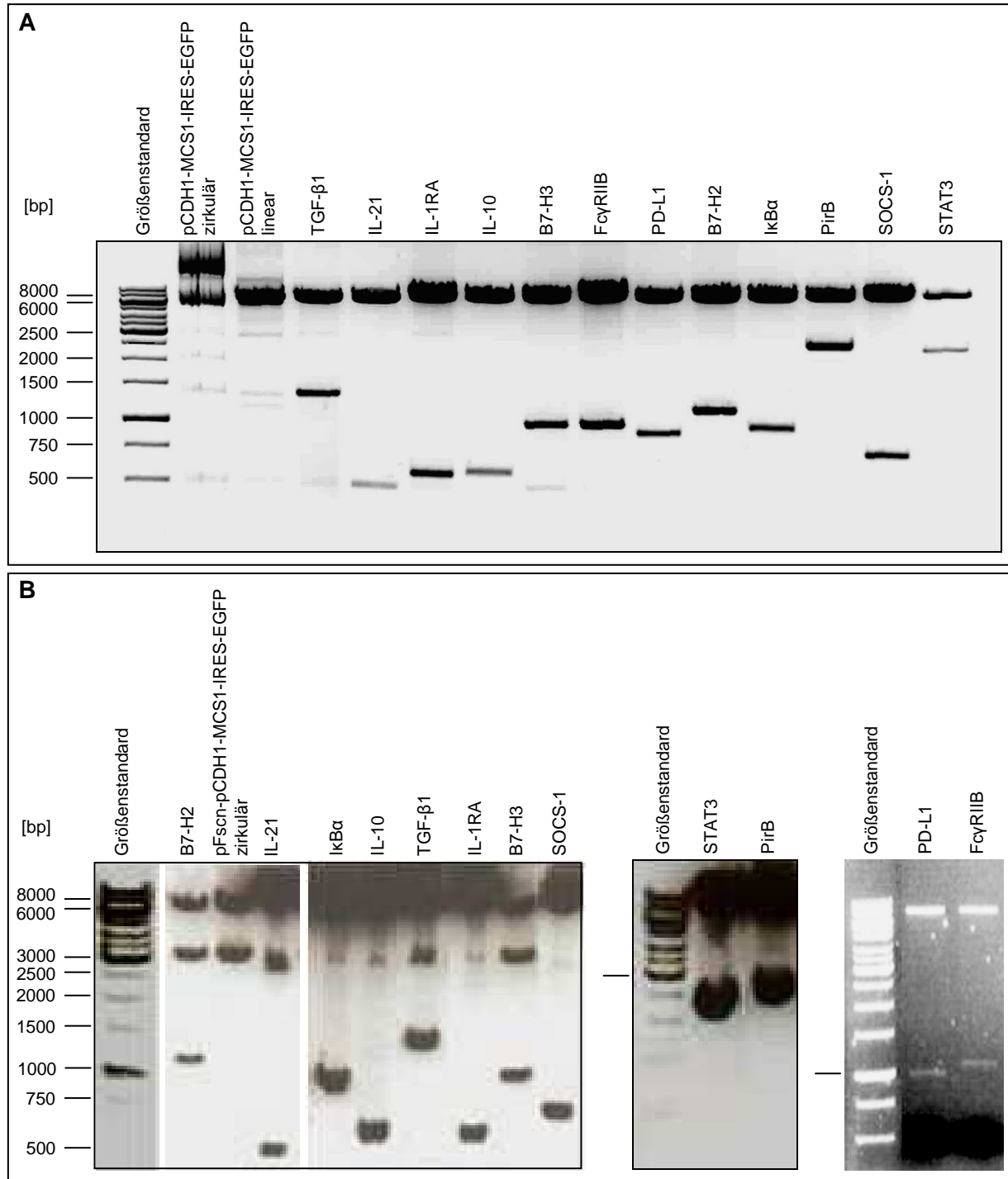
wurde die Amplifikation des offenen Leserahmens von IκBα mit einem alternativen Primer (mlkB-ORFNhe-s und mlkB-ORFBsp-as) durchgeführt, sodass am 3'-Ende der Gensequenzen keine *Bam*HI- sondern eine *Bsp*119I-Restriktionsschnittstelle eingeführt wurde. Damit die Generierung von IL-10-Expressionskonstrukten ohne die Verwendung der *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle erfolgen konnte, war es notwendig, die Gensequenz dieses Moleküls mittels der spezifischen Primer mL10-ORFNhe-s und mL10-ORFBsp-as in einer PCR-Reaktion zu amplifizieren.



**Abbildung 40: Restriktionsanalyse der generierten pFscn-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP-Konstrukte.** Die verschiedenen aus *E. coli* TOP10-Transformanten isolierten pFscn-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP-Konstrukte wurden mit den jeweils zur Klonierung verwendeten Restriktionsendonukleasen hydrolysiert und in einem 1 %igen TAE-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Bestimmung der Fragmentgrößen erfolgte in beiden Fällen mit Hilfe des auf der linken Seite angegebenen Größenstandards. Die erwarteten Fragmentgrößen sowie die verwendeten Restriktionsschnittstellen sind in Tabelle 21 angegeben.

In allen Fällen wurden die verschiedenen DNA-Fragmente direkt im Anschluss an die PCR-Reaktion mit den jeweils entsprechenden Enzymen restringiert und nachfolgend über ein 1 %iges TAE-Agarosegel aufgereinigt.

Die vier Zielvektoren pCDH1-MCS1-IRES-EGFP, pFscn-pCDH1-MCS1, pFscn-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP und pFscn-pCDH1-MCS1-IRES-EGFP wurden ebenfalls jeweils mit den beiden Restriktionsendonukleasen *Nhe*I und *Bam*HI, *Nhe*I und *Eco*RI oder *Nhe*I und *Bsp*119I hydrolysiert, über ein 1 %iges TAE-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Gelextraktion aufgereinigt.



**Abbildung 41: Restriktionsanalyse der generierten pCDH1-MCS1-IRES-EGFP- und pFscn-pCDH1-MCS1-IRES-EGFP-Konstrukte.** Die verschiedenen aus *E. coli* TOP10-Transformanten isolierten (A) pCDH1-MCS1-IRES-EGFP- und (B) pFscn-pCDH1-MCS1-IRES-EGFP-Konstrukte wurden mit den jeweils zur Klonierung verwendeten Restriktionendonukleasen hydrolysiert und in einem 1 %igen TAE-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Bestimmung der Fragmentgrößen erfolgte jeweils mit Hilfe des auf der linken Seite angegebenen Größenstandards. In (B) ist zur Orientierung die 3000 bp Bande angegeben und in (C) die 1000 bp Bande. Die erwarteten Fragmentgrößen sowie die verwendeten Restriktionsschnittstellen sind in Tabelle 19 angegeben.

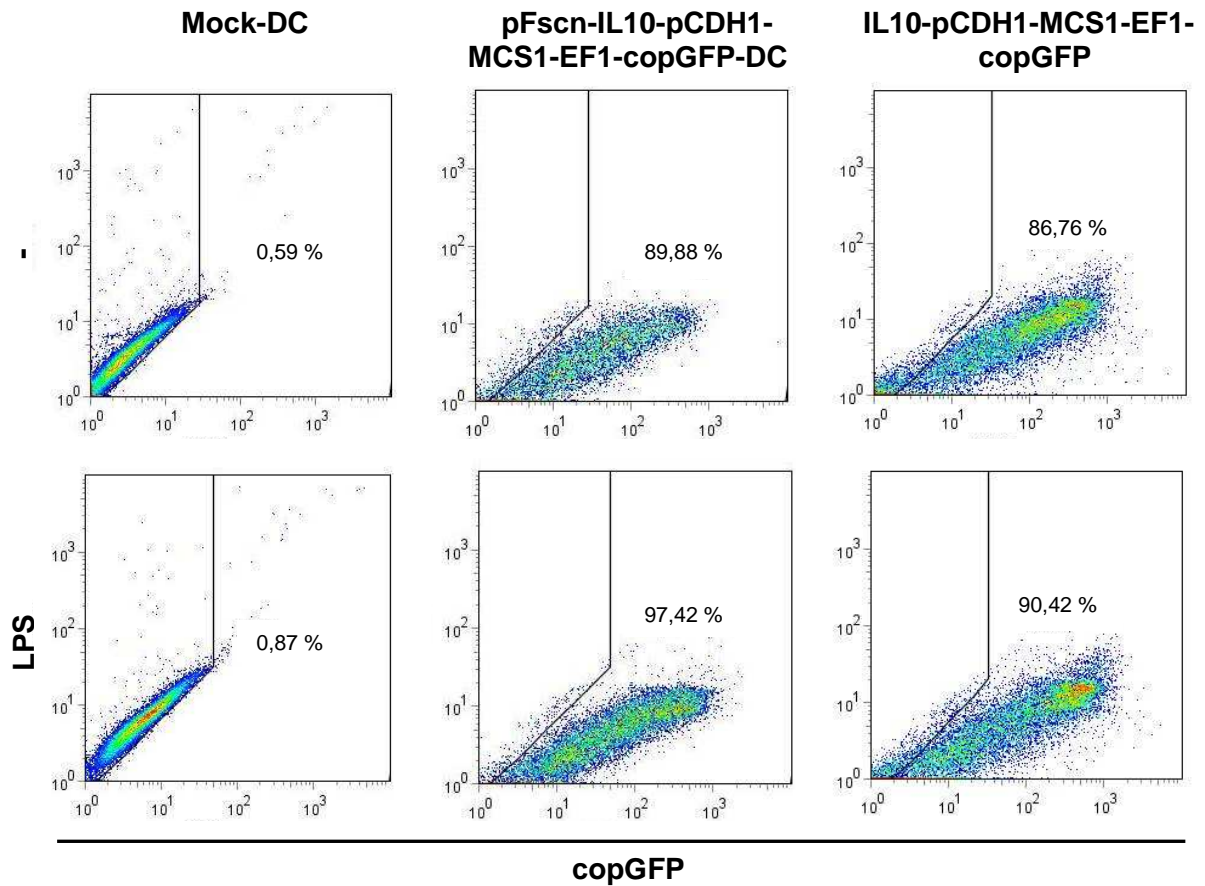
Die auf diese Weise linearisierten Vektoren wurden in der nachfolgenden Ligation mit dem zu inserierenden DNA-Fragment in einem molaren Verhältnis von 1:3 bis 1:10 eingesetzt. Mit diesen Ligationsansätzen wurden dann *E. coli* TOP10-Zellen elektroporiert, wobei die Selektion der Transformanten mittels der plasmidkodierten Ampicillinresistenz stattfand. Aus diesen wurde dann die Plasmid-DNA isoliert und in einer Restriktionsanalyse mit den jeweils zur Klonierung verwendeten Restriktionsendonukleasen überprüft. Diese sind, ebenso wie die erwarteten Fragmentlängen, in Tabelle 21 angegeben.

Bei allen isolierten Plasmiden zeigten die durchgeführten Restriktionsanalysen die jeweils erwarteten Fragmentmuster (Abbildung 39, Abbildung 40, Abbildung 41). Die definitive Identifizierung positiver Plasmide erfolgte durch anschließende Sequenzierungen im Institut für Rechtsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

#### **3.3.4 Sowohl der DC-spezifische Fascin-Promotor, als auch der alternative Reporter DsRed2 stellen geeignete Komponenten lentiviraler Expressionsvektoren dar**

In früheren Studien wurde bereits gezeigt, dass ein 2,5 kb langer 5'-flankierender Sequenzabschnitt des ersten Exons des murinen Fascin-Gens als Promotor mit Spezifität für ausreifende und reife DCs agiert und so die Transgenexpression von DNA-Vakzinen nach einem biolistischen Transfer *in vivo* ermöglicht<sup>376</sup>. Im Hinblick auf eine Applikation lentiviraler Partikel, die *in vivo* eine DC-spezifische Expression des Transgens gewähren, wurde das Potential des murinen Fascin-Promotors im lentiviralen Kontext eruiert. Hierzu wurde als Modelltransgen das antiinflammatorische Zytokin IL-10 ausgewählt, welches sowohl auf DCs als auch auf interagierende T-Zellen ausgeprägte Toleranz-induzierende Auswirkungen hat<sup>313</sup>.

Die lentivirale Transduktion von BM-DCs mit den beiden für IL-10 kodierenden lentiviralen Expressionskonstrukten IL10-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP und pFscn-IL10-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP, bei denen das Transgen unter der Kontrolle des ubiquitär konstitutiv aktiven CMV-Promotors bzw. des DC-spezifischen Fascin-Promotors steht, führte jeweils zu einer vergleichbar hohen Rate copGFP-positiver Zellen (Abbildung 42). Diese entsprachen in beiden Fällen den für Leervektor transduzierte DCs ermittelten Transduktionseffizienzen (Abschnitt 3.2.1, Abbildung 18).



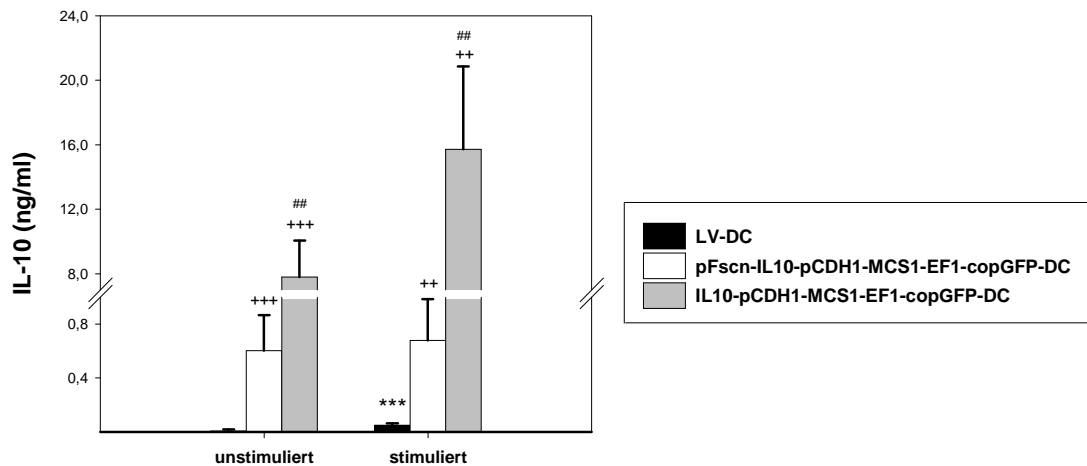
**Abbildung 42: Unabhängig vom verwendeten IL-10-kodierenden lentiviralen Expressionskonstrukt findet ein zu LV-DCs vergleichbarer effizienter Gentransfer in murine BM-DCs statt.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder pseudo-transduziert (Mock-DC) oder dem Konstrukt IL10-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP oder dem Konstrukt pFscn-IL10-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit  $1 \mu\text{g/ml}$  LPS für 24 h. An Tag 9 wurde die Transduktionseffizienz mittels FACS-Analyse des copGFP-Proteins bestimmt. Die Graphiken sind repräsentativ für drei voneinander unabhängige Experimente.

Die Überprüfung der Funktionalität des Fascin-Promotors erfolgte durch Bestimmung der Menge an IL-10 im Kulturüberstand entsprechend transduzierter DCs. Im Vergleich zu LV-DCs vermittelte der Fascin-Promotor in beiden Aktivierungszuständen eine signifikant erhöhte IL-10 Produktion, wobei die Stimulierung mit LPS keinen Einfluss auf die gebildete Menge dieses Zytokins hat (Abbildung 43). Wie erwartet aktiviert der starke virale CMV-Promotor die IL-10 Produktion wesentlich effizienter als der zelluläre Fascin-Promotor. Ein weiterer Unterschied zwischen diesen beiden Promotoren ist die, wenn auch nicht signifikante, Steigerung der Aktivität des CMV-Promotors nach einer Stimulierung der betreffenden Zellen mit LPS.

Ein interessanter Aspekt der durchgeführten ELISA-Analysen ist die robuste Aktivität des Fascin-Promotors in unstimulierten Transduktanden, die sich durch eine Stimulierung der Zellen mit LPS nicht weiter steigern lässt. In vorherigen Studien wurde belegt, dass die Expression des Aktinbündelungsproteins Fascin in DCs mit deren Aktivierungszustand



korreliert. Zusammengefasst mit einem innerhalb der hämatopoetischen Zelltypen exklusiv auf DCs limitierten Expressionsmuster kann das Protein Fascin als Maturierungsmarker für murine<sup>136</sup> und humane<sup>138</sup> DC-Studien bezeichnet werden. Da also der Promotor des Maturierungsmarkers Fascin in unstimulierten transduzierten DCs aktiv ist, kann dieses Resultat als weiterer Hinweis darauf gewertet werden, dass durch den mit der lentiviralen Transduktion verbundenen physikalischen Stress eine partielle Aktivierung muriner DCs ausgelöst wird (Abschnitt 3.2).

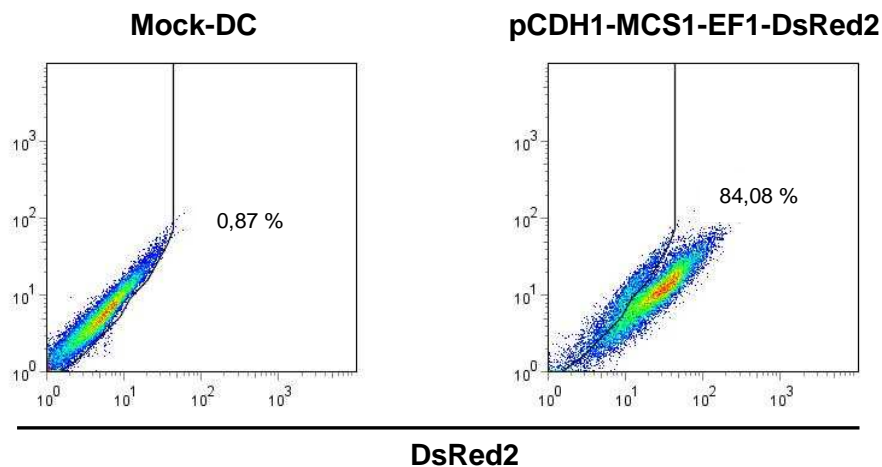


**Abbildung 43: Der DC-spezifische Fascin-Promotor ermöglicht eine effiziente Transgenexpression lentiviraler Konstrukte.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur mit den Vektoren pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV-DC), IL10-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP oder IL10-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. An Tag 9 wurden die Kulturüberstände geerntet und der Gehalt von IL-10 mittels ELISA bestimmt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von jeweils 3 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen IL10-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP- bzw. pFscn-IL10-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP-DCs und LV-DCs (+) und zwischen IL10-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP- und pFscn-IL10-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP-DCs (#) sowie zwischen stimulierten und unstimulierten DCs (\*) sind angegeben (\*\*,## p<0,01; \*\*\*,+++ p<0,001).

Die Eignung des Proteins DsRed2 als alternativer Reporter im lentiviralen Kontext wurde mittels FACS-Analysen überprüft. Hierzu wurden unstimulierte BM-DCs entweder pseudo-transduziert (Mock-DC) oder mit dem Konstrukt pCDH1-MCS1-EF1-DsRed2 lentiviral transduziert (Abbildung 44).

Es zeigte sich, dass auch mit diesem Reporter positive BM-DC Transduktanden eindeutig identifiziert werden können, wobei die ermittelte Transduktionseffizienz ungefähr derjenigen von pCDH1-MCS1-EF1-copGFP transduzierten DCs entsprach (Abschnitt 3.2.1, Abbildung 18). Allerdings ist die mittlere Fluoreszenzintensität von DCs infolge einer Transduktion mit einem DsRed2-Reportergergen geringer als bei Verwendung des copGFP-Reportergergens. Der pCDH1-MCS1-EF1-copGFP-Vektor stellt das kommerziell erwerbbar Pendant des hier

getesteten pCDH1-MCS1-EF1-DsRed2-Konstrukts dar, wobei sich beide Vektoren lediglich in ihrem Reporter gen unterscheiden.



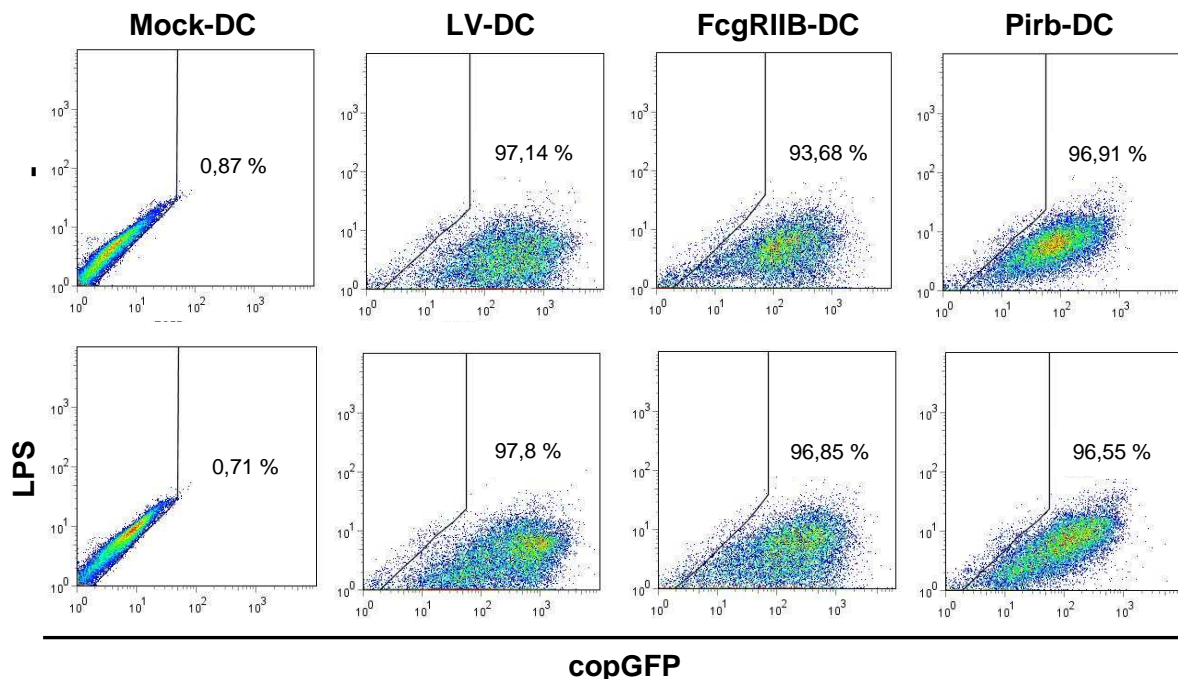
**Abbildung 44: Das Protein DsRed2 ist ein geeigneter alternativer Reporter im lentiviralen Kontext.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder pseudo-transduziert (Mock-DC) oder mit dem Konstrukt pCDH1-MCS1-EF1-DsRed2 lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. An Tag 9 wurde die Transduktionseffizienz mittels FACS-Analyse des DsRed2-Proteins bestimmt. Die Graphiken sind repräsentativ für drei voneinander unabhängige Experimente.

#### 3.4 Die Überexpression Oberflächen-gebundener Moleküle führt zu einer moderaten funktionellen Veränderung muriner BM-DCs

Das Grundkonzept der vorliegenden Arbeit beruht auf der genetischen Modifikation der Expression von toleranzassoziierten Schlüssel-molekülen in murinen BM-DCs. Potentielle Kandidatenmoleküle wurden zunächst, wie in Abschnitt 3.1 beschrieben, durch die phänotypische Analyse von DEX-APCs und durch intensive Literaturrecherchen identifiziert. Die entsprechenden offenen Leserahmen dieser Kandidatengene wurden in lentivirale Expressionsvektoren kloniert (Abschnitt 3.3). Fünf dieser Moleküle sind oberflächengebundenen. Unter ihnen befinden sich PD-L1 (B7-H1), B7-H2 und B7-H3, die alle der B7-Familie koregulatorischer Liganden angehören. Weiterhin wurden die potentiell inhibitorischen Oberflächenrezeptoren PirB und FcγRIIB für eine Überexpression in DCs ausgewählt.

### 3.4.1 Die transgenvermittelte exogene Expression von Oberflächenmolekülen erhöht die jeweilige Gesamt-mRNA-Menge in entsprechend transduzierten DCs

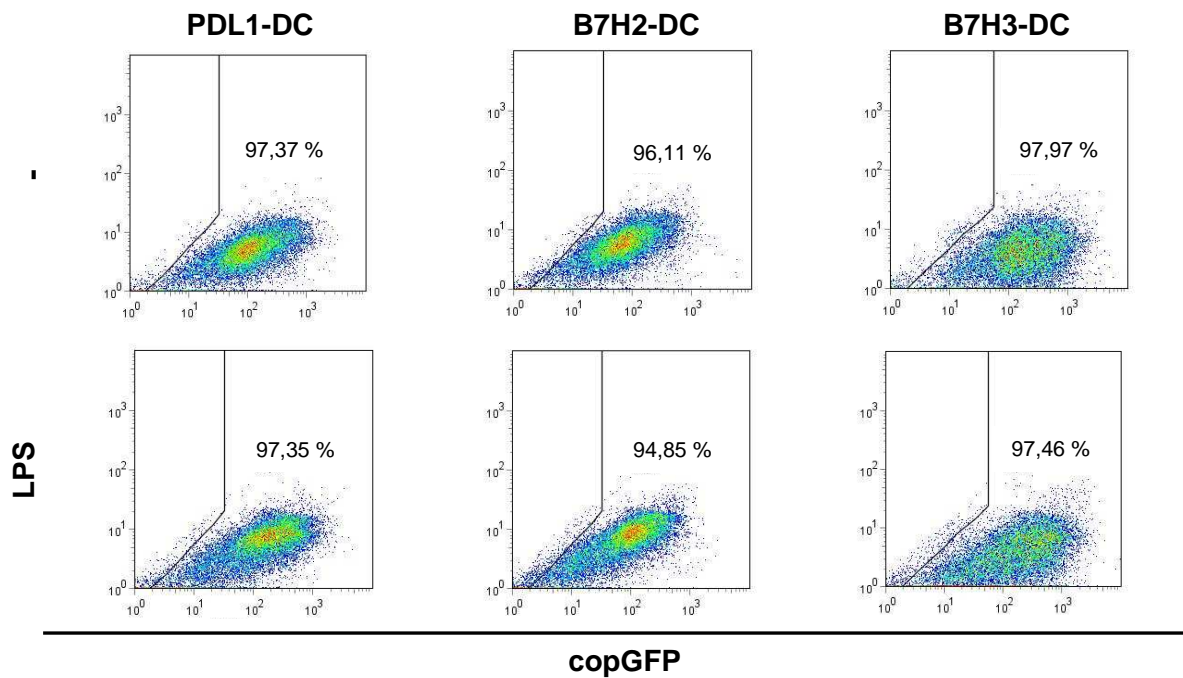
Die wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben generierten Expressionskonstrukte PDL1-, B7H2-, B7H3-, FcγRIIB- oder PirB-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP wurden nachfolgend für die lentivirale Transduktion von BM-DCs verwendet. Die Ermittlung positiver Transduktanden erfolgte mittels FACS-Analyse des copGFP-Proteins. Unabhängig von Größe und Sequenz des kodierten Transgens, erfolgte für alle Plasmide ein effizienter Transfer in DCs (Abbildung 45, Abbildung 46). In allen Fällen lagen die Transduktionseffizienzen sowohl im unstimulierten als auch im LPS-stimulierten Zustand bei über 90 % und befanden sich somit auf einem zu LV-DCs vergleichbaren Niveau.



**Abbildung 45: Unabhängig vom Transgen werden die für Oberflächenmoleküle kodierenden Expressionsvektoren effizient in BM-DCs transferiert.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder pseudo-transduziert (Mock-DC), mit dem Vektor pCDH1-EF1-copGFP (LV-DC) oder mit den Konstrukten FcγRIIB- (FcgRIIB-DC), PirB- (Pirb-DC), PDL1-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (PDL1-DC) lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. An Tag 9 wurde die Transduktionseffizienz in unstimulierten (jeweils obere Reihe) sowie LPS-stimulierten (jeweils untere Reihe) DC-Populationen mittels FACS-Analyse des copGFP-Proteins bestimmt. Die Graphiken sind repräsentativ für 3-6 voneinander unabhängige Experimente.

Eine Analyse der Transgenexpression in PDL1-, B7H2-, B7H3-, FcγRIIB- und PirB-DCs erfolgte zunächst auf mRNA-Ebene. Gleichzeitig wurde bei diesem Nachweisverfahren nicht nur die exogene, das heißt transgenvermittelte, sondern auch die jeweilige endogene

Genexpression eruiert. Dies ist vor allem deshalb von Interesse, da für zahlreiche Gene bekannt ist, dass sie ihre Expression autoregulieren.



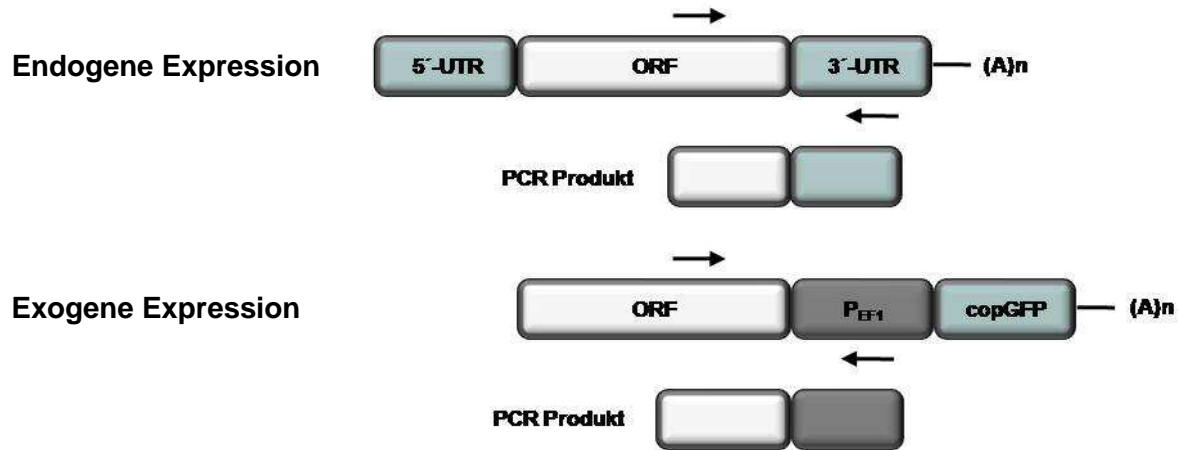
**Abbildung 46: Unabhängig vom Transgen werden alle für B7-Oberflächenmoleküle kodierenden Expressionsvektoren effizient in BM-DCs transferiert.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder pseudo-transduziert (Mock-DC), mit dem Vektor pCDH1-EF1-copGFP (LV-DC) (vergleiche Abbildung 45) oder mit den Konstrukten PDL1- (PDL1-DC), B7H2- (B7H2-DC) oder B7H3-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (B7H3-DC) lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. An Tag 9 wurde die Transduktionseffizienz in unstimulierten (jeweils obere Reihe) sowie LPS-stimulierten (jeweils untere Reihe) DC-Populationen mittels FACS-Analyse des copGFP-Proteins bestimmt. Die Graphiken sind repräsentativ für 3-6 voneinander unabhängige Experimente.

Der Nachweis beider Expressionsformen erfolgte mit dem identischen *sense* Primer, der, je nach Bedarf, mit einem in der 3'-untranslatierten Region bindenden *antisense* Primer (endogene Expression) oder einem im EF1-Promotorbereich bindenden *antisense* Primer (exogene Expression) kombiniert wurde (Abbildung 47).

Infolge eines lentiviralen Transfers werden die Transgene PD-L1 (Abbildung 48A), B7-H2 (Abbildung 48B), B7-H3 (Abbildung 48C), FcγRIIB (Abbildung 49A) und PirB (Abbildung 49B) in den entsprechenden unstimulierten und stimulierten BM-DC-Populationen auf vergleichbarem Niveau exprimiert. Die exogene mRNA-Expression von PD-L1, B7-H2, B7-H3 sowie FcγRIIB hat in entsprechend transduzierten BM-DCs keinen Einfluss auf die jeweilige endogenen mRNA-Expression.

Im Gegensatz dazu wird die endogene PirB mRNA-Menge durch eine exogene mRNA-Expression moduliert (Abbildung 49B). Im Vergleich zu LV-DCs resultiert die transgenvermittelte PirB Expression in unstimulierten PirB-DCs in einer geringfügigen, aber

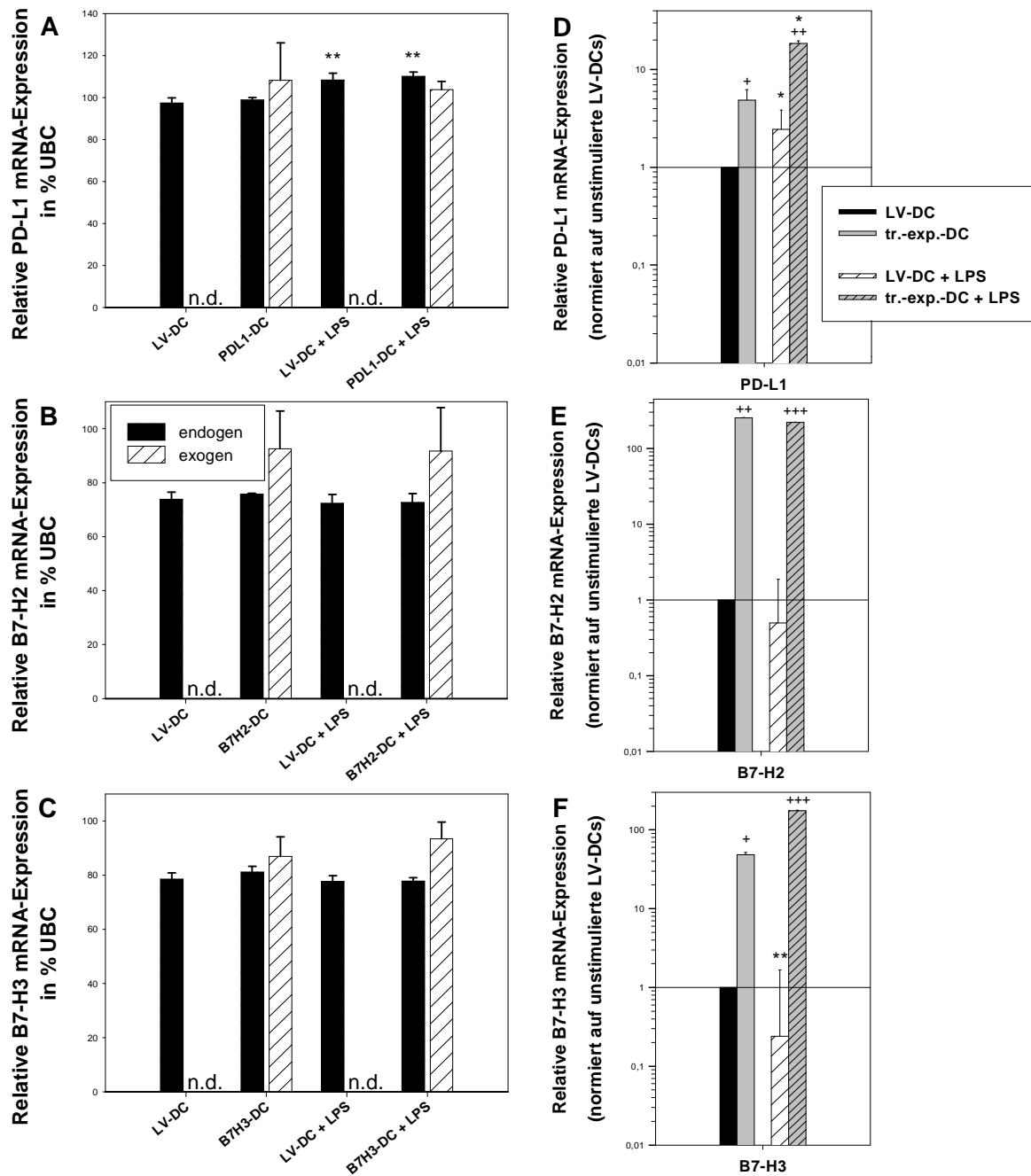
statistisch signifikanten Erhöhung der endogenen Transkription. Dieses Phänomen tritt nach der Aktivierung der Zellen mit LPS nicht auf, hier ist die endogene PirB Expression in LV-DCs und PirB-DCs vergleichbar stark.



**Abbildung 47: Schematische Darstellung der getrennten Analyse der endogenen und exogenen mRNA-Expression lentiviral in BM-DCs transferierter Transgene.** Die jeweilige Primerkombination zur Bestimmung der endogenen bzw. exogenen mRNA-Expression unterscheidet sich im verwendeten antisense Primer, der entweder im 3'-UTR oder im EF1-Promotorbereich bindet. Der sense Primer bindet jeweils im ORF des betreffenden Transgens. UTR, *untranslated region*; ORF, *open reading frame*; P<sub>EF1</sub>, *human elongation factor 1 alpha Promotor*; copGFP, *copepod green fluorescent protein*; (A)n, Polyadenylierung.

Die Gesamtmenge an PD-L1 (Abbildung 48D), B7-H2 (Abbildung 48E), B7-H3 (Abbildung 48E), FcγRIIB (Abbildung 49C) mRNA ist in den entsprechenden unstimulierten und stimulierten BM-DC-Populationen durch die jeweils zusätzliche exogene mRNA-Expression signifikant gegenüber LV-DCs erhöht. Die effektivste transgenvermittelte Überexpression wurde dabei für die Moleküle B7-H2 und B7-H3 detektiert, gefolgt von PD-L1 und abschließend von FcγRIIB.

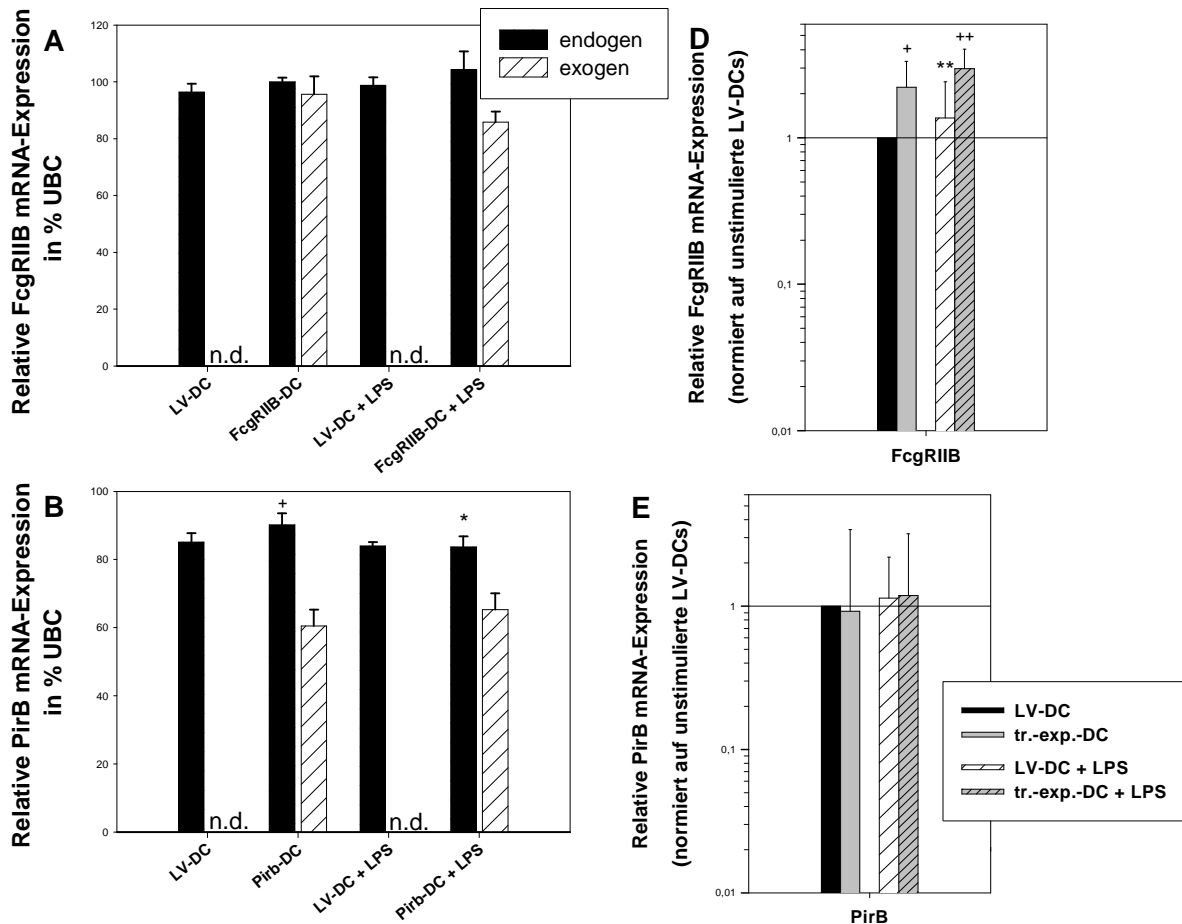
Infolge einer Stimulierung mit LPS nimmt die B7-H3 Gesamt-mRNA-Expression in LV-DCs signifikant ab. Diese maturierungsassoziierte Regulation der Genexpression tritt in stimulierten B7H3-DCs nicht auf; hier wurde kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der B7-H3 mRNA-Expression in unstimulierten und stimulierten B7H3-DCs detektiert. In FcγRIIB-DCs findet im Gegensatz zu LV-DCs in Reaktion auf eine Stimulierung keine signifikante Aufregulation der FcγRIIB Gesamt-mRNA-Expression statt.



**Abbildung 48: Die exogene Expression von PD-L1, B7-H2 und B7-H3 resultiert in einem deutlichen Anstieg der jeweiligen Gesamt-mRNA-Menge.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV-DC) oder mit den Konstrukten (A, D) PDL1- (PDL1-DC), (B, E) B7H2- (B7H2-DC) oder (C, F) B7H3-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (B7H3-DC) lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS für 24 h. Die endogene, exogene und Gesamt-mRNA-Expression wurden mit Hilfe der quantitativen *Real-time-PCR* bestimmt. (A, B, C) Die relative endo- und exogene mRNA-Expression ist als prozentualer Anteil der Expression des Haushaltsgen Ubiquitin C (UBC) angegeben. Die Distinktion der endo- und exogene mRNA-Expression erfolgte durch die Verwendung unterschiedlicher *antisense* Primer (Abbildung 47). (D, E, F) Die relative Gesamt-mRNA-Expression wurde intern über UBC normalisiert und ist auf die Expression in unstimulierten LV-DCs normiert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler von jeweils 3 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen transgenexpmierenden DCs (tr.-exp.-DC) und LV-DCs in beiden Aktivierungszuständen (+) sowie zwischen stimulierten und unstimulierten DCs (\*) sind angegeben (\*, +  $p < 0,05$ ; \*\*, ++  $p < 0,01$ ; \*\*\*, +++  $p < 0,001$ ). n.d.: nicht detektiert.

### 3 Ergebnisse

Die Gesamtmenge an PirB mRNA (Abbildung 49D) ist in unstimulierten und stimulierten Pirb-DCs im Vergleich zu LV-DCs nicht erhöht, obwohl eine effiziente exogene Genexpression vorliegt und keine negative Regulation der endogenen PirB Transkription detektiert wurde.



**Abbildung 49: Die transgenvermittelte exogene Expression von PirB beeinflusst dessen endogenes Expressionsniveau in DCs.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV-DC) oder mit den Konstrukten (A, C) FcγRIIB- (FcγRIIB-DC), (B, D) oder PirB-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (Pirb-DC) lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Die endogene, exogene und Gesamt-mRNA-Expression wurden mit Hilfe der quantitativen *Real-time-PCR* bestimmt. (A, B) Die relative endo- und exogene mRNA-Expression ist als prozentualer Anteil der Expression des Haushaltsgen Ubiquitin C (UBC) angegeben. Die Distinktion der endo- und exogene mRNA-Expression erfolgte durch die Verwendung unterschiedlicher *antisense* Primer (Abbildung 47). (C, D) Die relative Gesamt-mRNA-Expression wurde intern über UBC normalisiert und ist auf die Expression in unstimulierten LV-DCs normiert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von jeweils 3 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen transgenexprimierenden DCs (tr.-exp.-DC) und LV-DCs in beiden Aktivierungszuständen (+) sowie zwischen stimulierten und unstimulierten DCs (\*) sind angegeben (\*<sup>+</sup> p<0,05; \*\*<sup>+</sup> p<0,01). n.d.: nicht detektiert.

### **3.4.2 Nur für die Moleküle B7-H2 und B7-H3 werden nach einer lentiviral vermittelten Überexpression auf mRNA-Ebene erhöhte Proteinmengen in DCs detektiert**

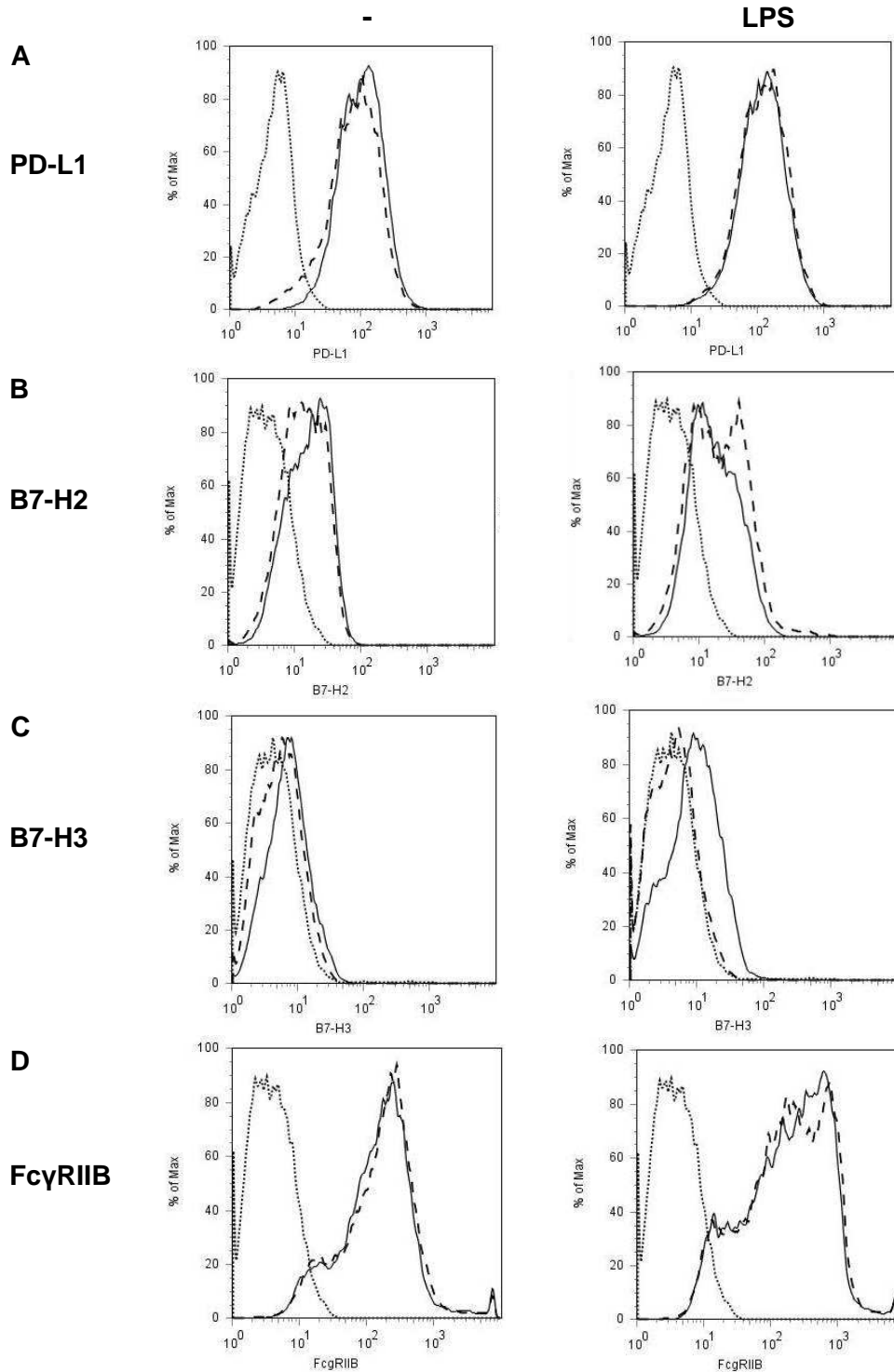
Die Analyse der Gesamtexpression von PD-L1, B7-H2, B7-H3 und FcγRIIB erfolgte nicht nur auf mRNA- sondern auch auf Proteinebene mit Hilfe der entsprechenden spezifischen Antikörper.

Im Rahmen dieser Validierung der lentiviral vermittelten Überexpression von Oberflächenmolekülen in DCs zeigte sich, dass die Proteine PD-L1 (Abbildung 50A) und FcγRIIB (Abbildung 50D) bei entsprechend transduzierten Zellen gegenüber LV-DCs, weder im unstimulierten noch im LPS-stimulierten Zustand, in erhöhter Menge auf der DC-Oberfläche nachgewiesen werden konnten.

Besonders interessant ist das Resultat für B7-H2-DCs. Im unstimulierten Zustand wurde dieses Protein auf entsprechend transduzierten Zellen im Vergleich zu LV-DCs in leicht erhöhter Menge nachgewiesen (Abbildung 50B). Konträr dazu weisen B7H2-DCs nach einer Stimulierung deutlich geringere Mengen an B7-H2 auf ihrer Oberfläche auf als stimulierte LV-DCs.

Von allen vier auf FACS-Ebene analysierten Transgenen wurde lediglich das Protein B7-H3 in erhöhten Mengen auf der Oberfläche entsprechend transduzierter unstimulierter sowie stimulierter DCs detektiert (Abbildung 50D). Im unstimulierten Zustand ist die B7-H3 Proteinmenge im Vergleich zu LV-DCs nur leicht erhöht, während nach einer Stimulierung mit LPS B7H3-DCs deutlich mehr B7-H3 Protein auf ihrer Oberfläche tragen als stimulierte LV-DCs.





**Abbildung 50: Nur das Molekül B7-H3 wird im Kontext einer Überexpression in deutlich höheren Mengen auf der Oberfläche von BM-DCs exprimiert.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor (A, B, C, D) pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV-DC) oder mit den Konstrukten (A) PDL1-, (B) B7H2-, (C) B7H3- oder (D) FcγRIIB-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Die verschiedenen DC-Populationen wurden mit spezifischen Antikörpern für B7-H2 oder B7-H3 (jeweils PE-gekoppelt) behandelt und mittels FACS analysiert. Die Histogramme repräsentieren die spezifische Antikörper-Bindung auf der Oberfläche von LV-DCs (unterbrochene Linie) und potentiell transgen exprimierenden DCs (durchgezogene Linie). Die Bindung des jeweils entsprechenden Isotyp Kontroll-Antikörpers ist angegeben (dünne, gepunktete Linie). Die Graphiken sind jeweils für 3 voneinander unabhängige Experimente repräsentativ.

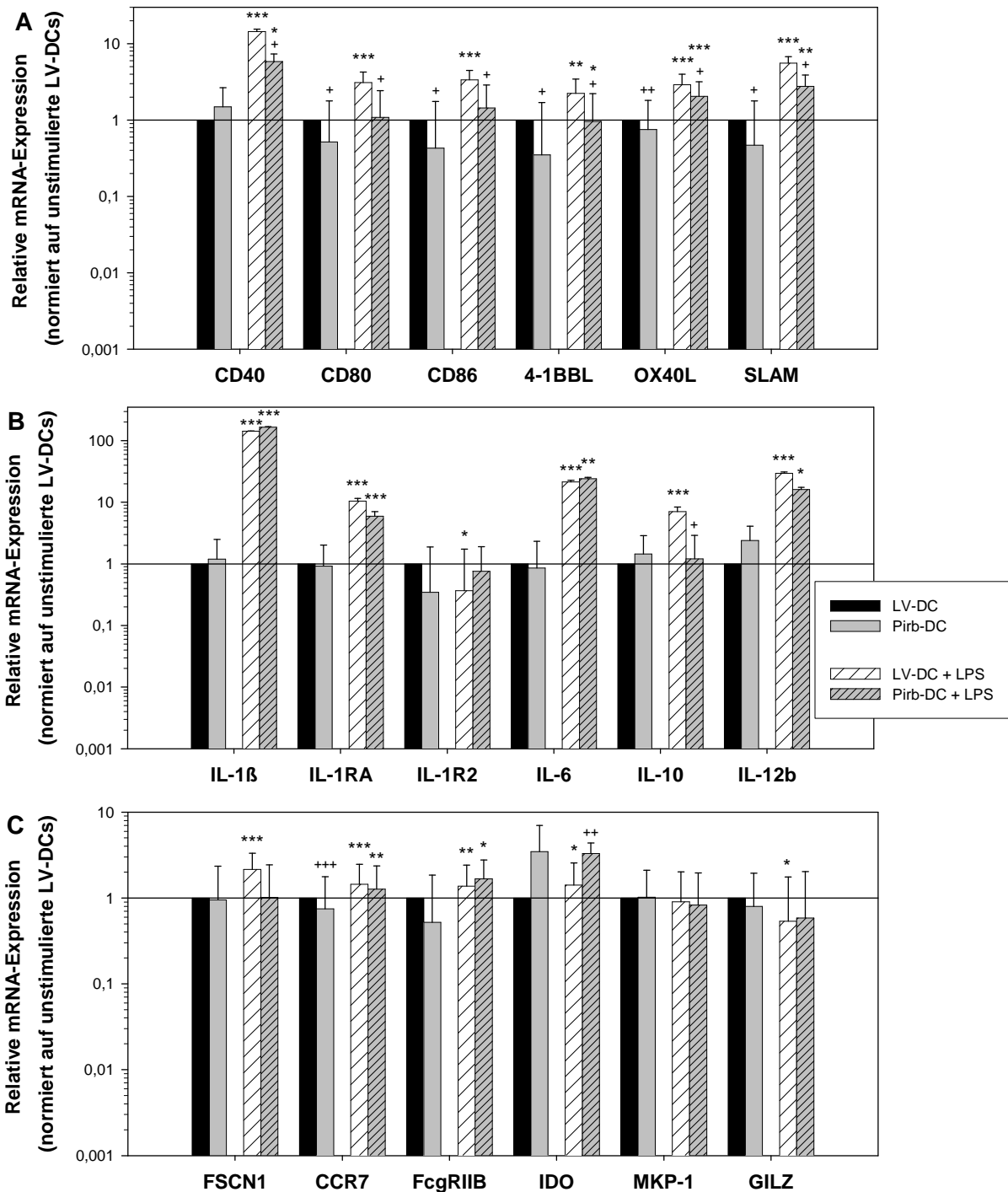
#### 3.4.3 Spezifische Modulation des Genexpressionsprofils von Pirb-DCs

Wie bereits einleitend in dieser Arbeit erwähnt wurde, ist die zytoplasmatische Domäne des Transmembranrezeptors PirB in der Lage, via ITIM-Motiven die inhibitorische SHP-1-Protein-Tyrosin-Phosphatase zu rekrutieren. Generell ist SHP-1 in die negative Regulation der Zell-Aktivierung involviert, indem es wachstumvermittelnde Rezeptoren sowie deren Liganden inhibiert<sup>588,589</sup>. In Folge einer Überexpression von PirB könnten somit potentiell mehr SHP-1 Moleküle rekrutiert werden, wodurch die Genexpression in Pirb-DCs unter Umständen eine signifikante Veränderung erfahren könnte. Außerdem könnte eine PirB-MHCI-Ligation von DCs in trans untereinander oder in cis auf derselben Zelle<sup>217,218</sup> zu einer Beeinflussung der Transkription in den Zellen führen. Auf Grund der genannten Hypothesen wurde das Expressionsprofil immunrelevanter Gene (vergleiche Abschnitt 3.1.5) in Pirb-DCs und LV-DCs vergleichend analysiert.

Unstimulierte Pirb-DCs weisen gegenüber LV-DCs signifikant reduzierte mRNA-Mengen für die kostimulatorischen Rezeptoren CD80, CD86, 4-1BBL, OX40L und SLAM (Abbildung 51A) sowie für den an der DC-Migration beteiligten Chemokinrezeptor CCR7 auf (Abbildung 51C). Weiterhin resultiert eine transgenvermittelte Expression von PirB in unstimulierten DCs in einer deutlichen, aber nicht signifikanten, transkriptionalen Erhöhung des Toleranzmarkers IDO.

Im Rahmen der Ausreifung mit LPS wird die Transkription der Gene für alle analysierten kostimulatorischen Moleküle in LV-DCs signifikant erhöht (Abbildung 51A). Diese maturierungsassoziierte Aufregulation der Genexpression findet in stimulierten Pirb-DCs entweder gar nicht (CD80, CD86) oder nur eingeschränkt (CD40, 4-1BBL, OX40L, SLAM) statt. Ähnlich wie im unstimulierten Zustand, weisen LPS-stimulierte Pirb-DCs im Vergleich zu LV-DCs keine wesentliche Veränderung der mRNA-Mengen pro- und antiinflammatorischer Zytokine auf (Abbildung 51B). Einzige Ausnahme ist dabei das Zytokin IL-10, das in unstimulierten und stimulierten Pirb-DCs auf vergleichbarem Niveau transkribiert wird und dessen Expression im Rahmen der Ausreifung in Abweichung zu LV-DCs nicht hochreguliert wird. Im Gegensatz zu LV-DCs wird auch die mRNA-Expression des DC-Maturierungsmarkers FSCN1 in Pirb-DCs in Folge einer Ausreifung mit LPS nicht signifikant erhöht (Abbildung 51C). Gleichzeitig wird der Toleranzmarker IDO in stimulierten Pirb-DCs im Vergleich zur entsprechenden LV-Population signifikant stärker exprimiert.

### 3 Ergebnisse



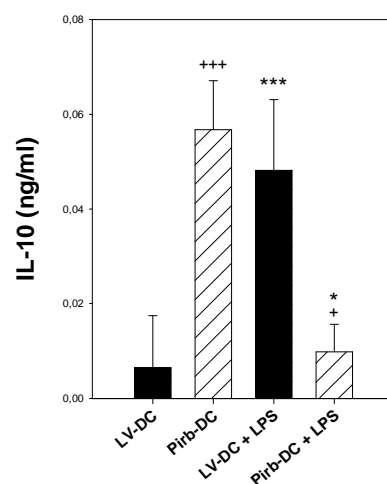
**Abbildung 51: Die Überexpression von PirB resultiert in einer veränderten Genexpression kostimulatorischer Moleküle in DCs.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV-DC) oder mit dem Konstrukt PirB-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (Pirb-DC) lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Die relative mRNA-Expression von Genen die für (A) kostimulatorische Moleküle, (B) soluble Mediatoren sowie (C) Maturierungs- und Toleranzmarker kodieren, wurde mit Hilfe der quantitativen *Real-time-PCR* bestimmt. Die interne Normalisierung erfolgte über das Haushaltsgen Ubiquitin C. Die Daten geben die relative Änderung der Genexpression in den verschiedenen DC-Populationen bezogen auf das Expressionsniveau in unstimulierten LV-DCs an. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von jeweils 3-5 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Pirb- und LV-DCs in beiden Aktivierungszuständen (+) sowie zwischen stimulierten und unstimulierten DCs (\*) sind angegeben (\*, + p<0,05; \*\*, + p<0,01; \*\*\*, + p<0,001).

### 3.4.4 Pirb-DCs zeigen eine drastisch veränderte Regulation der Produktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10

In mehreren Studien ist IL-10 als ein entscheidender Faktor *in vitro*-tolerogener DCs sowie bestimmter tolerogener DC-Populationen *in vivo* identifiziert worden. Auf transkriptioneller Ebene sind LPS-stimulierte Pirb-DCs im Vergleich zu stimulierten LV-DCs durch einen signifikant reduzierten IL-10 mRNA-Gehalt gekennzeichnet (Abschnitt 3.4.3). Somit scheint die Überexpression von Pirb die normalerweise maturierungsassoziierte Aufregulation der IL-10 Transkription in DCs zu unterbinden. Inwieweit sich diese Konsequenz auch auf Proteinebene durchsetzt, wurde mittels ELISA-Analysen der Kulturüberstände von LV- und Pirb-DCs evaluiert.

Unstimulierte LV-DCs weisen eine moderate IL-10 Produktion auf, die in Folge einer Stimulierung der Zellen mit LPS drastisch ansteigt (Abbildung 52). Demgegenüber produzieren Pirb-DCs im unstimulierten Zustand nahezu identische Mengen dieses antiinflammatorischen Zytokins wie LPS-stimulierte LV-DCs. Im Rahmen einer Stimulierung nimmt die IL-10 Produktion von Pirb-DCs im Gegensatz zu LV-DCs signifikant ab.

Folglich unterscheiden sich die Ergebnisse für die IL-10 Expression in Pirb-DCs auf mRNA- (Abschnitt 3.4.3, Abbildung 51B) und Proteinebene deutlich voneinander.

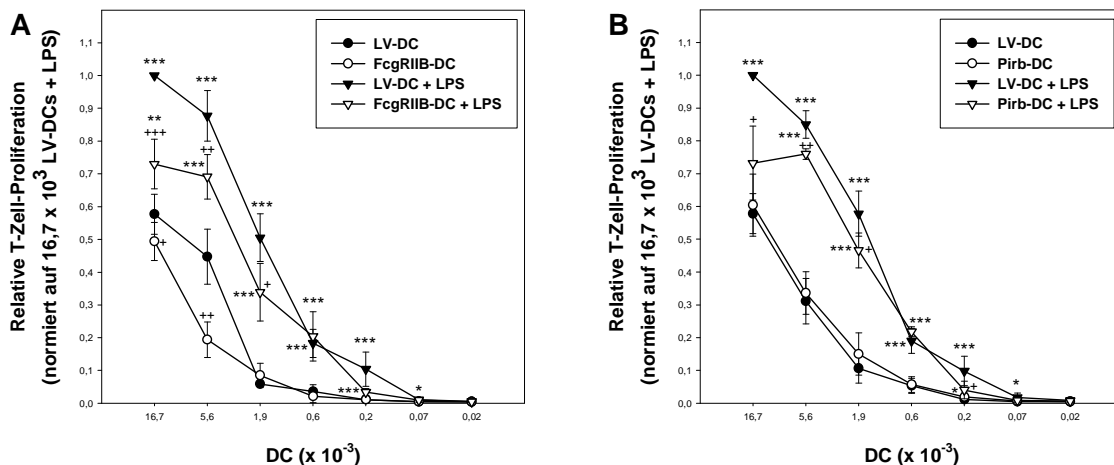


**Abbildung 52: Die Überexpression des Moleküls Pirb verändert die IL-10 Produktion in BM-DCs.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV-DC) oder mit dem Konstrukt PirB-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (Pirb-DC) lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Anschließend wurden die Kulturüberstände geerntet und der Gehalt von IL-10 mittels ELISA bestimmt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von jeweils 4 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Pirb- und LV-DCs in beiden Aktivierungszuständen (+) sowie zwischen stimulierten und unstimulierten DCs (\*) sind angegeben (\*, + p<0,05; \*\*\*, \*\*\*\* p<0,001).

### 3.4.5 Im Vergleich der überexprimierten Oberflächenmoleküle führt PD-L1 zur effektivsten Reduktion der allogenen T-Zell-Stimulierungskapazität von DCs

Wie bereits eingangs beschrieben, sind alle im Rahmen dieser Arbeit überexprimierten Oberflächenmoleküle bekanntermaßen an der negativen Regulation immunologischer Reaktionen beteiligt. Mittels DC/T-Zell-Kokulturen wurde deshalb untersucht, inwieweit die Überexpression der Moleküle PD-L1, B7-H2, B7-H3, FcγRIIB sowie PirB zu einer veränderten allogenen primären T-Zell-Aktivierungskapazität von DCs führt (Abbildung 53, Abbildung 54).

Diese Analyse erfolgte auch mit Transduktanden, die keine erhöhte Menge des Transgens auf ihrer Oberfläche aufwiesen (Abschnitt 3.4.2).

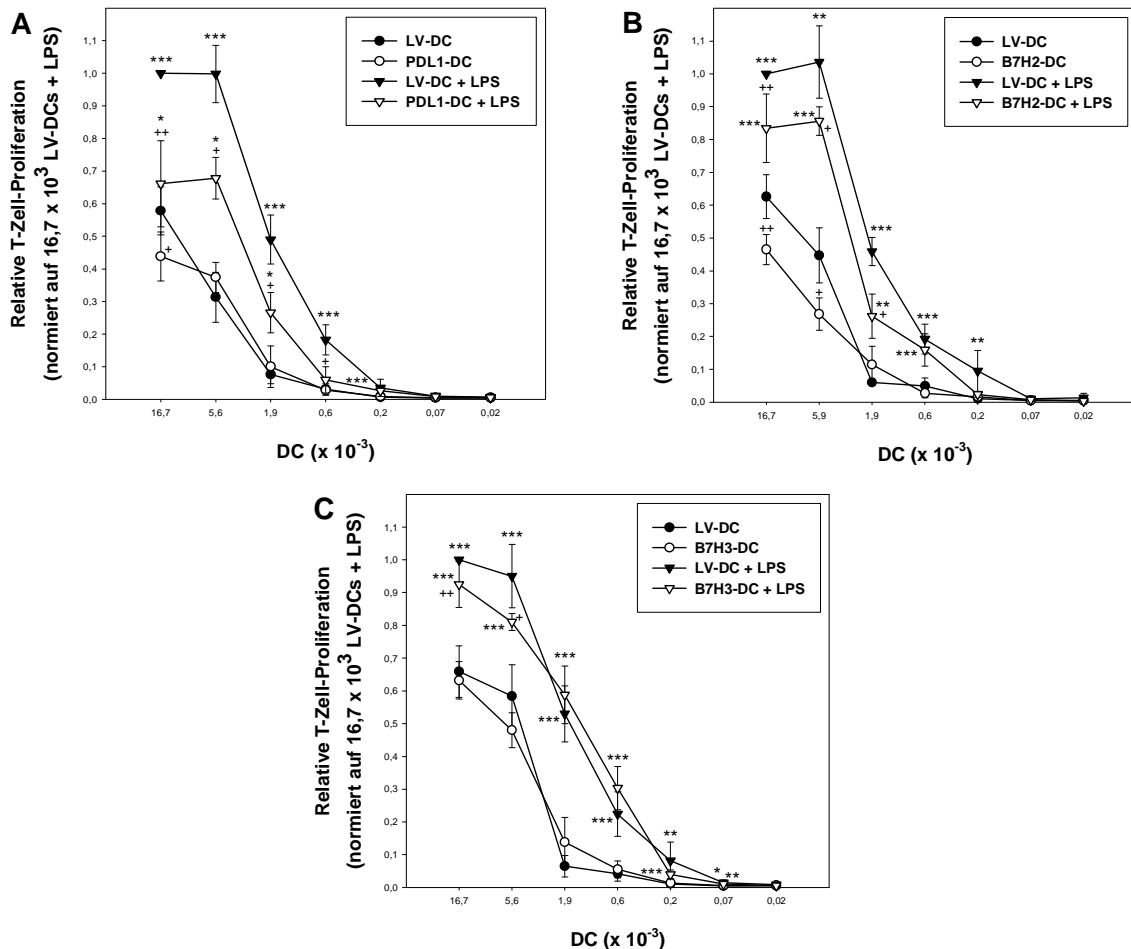


**Abbildung 53: Die Überexpression der Moleküle FcγRIIB und PirB in BM-DCs führt zu einer moderaten Reduktion ihrer allogenen T-Zell-Stimulierungskapazität.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV-DC) oder mit den Konstrukten (A) FcγRIIB- (FcγRIIB-DC) oder (B) PirB-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (Pirb-DC) lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Die verschiedenen DC-Populationen wurden bestrahlt, in Triplikaten seriell verdünnt und mit jeweils  $3 \times 10^5$  T-Zellen aus BALB/c Mäusen für 4 Tage kokultiviert. Die T-Zell-Proliferation wurde anhand der Aufnahme von [ $^3$ H]-Thymidin während der letzten 16 h der Kultur gemessen. Die Daten geben die relative T-Zell Proliferation (bezogen auf die durch  $16,7 \times 10^3$  LV-DCs + LPS induzierte Proliferation) an, berechnet als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler von acht voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils in Triplikaten durchgeföhrt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen transgenexprimierenden DCs und LV-DCs in beiden Aktivierungszuständen (+) sowie zwischen stimulierten und unstimulierten DCs (\*) sind angegeben (\* $^+$   $p < 0,05$ ; \*\* $^+$   $p < 0,01$ ; \*\*\* $^+$   $p < 0,001$ ).

Im unstimulierten Zustand führt die Überexpression des inhibitorischen Rezeptors FcγRIIB zu einer signifikanten Verminderung der allogenen T-Zell-Aktivierung im Vergleich zu LV-DCs (Abbildung 53A). Demgegenüber induzieren unstimulierte Pirb-DCs eine zu LV-DCs unveränderte T-Zell-Proliferation (Abbildung 53B). Die Stimulierung mit LPS führt bei diesen beiden DC-Populationen zu einem signifikanten Anstieg der T-Zell-Aktivierungskapazität. Die

### 3 Ergebnisse

durch die beiden stimulierten DC-Populationen induzierte T-Zell-Proliferation liegt dabei in den drei höchsten DC/T-Zell-Verhältnissen jeweils signifikant unterhalb der durch LPS-stimulierte LV-DCs hervorgerufenen. Die Überexpression von FcγRIIB erwies sich in diesem Kontext als effektiver als die Überexpression von PirB.



**Abbildung 54:** In der Gruppe der getesteten B7-Familienmitglieder reduzierte die Überexpression von PD-L1 das allogene T-Zell-Aktivierungspotential von BM-DCs am effektivsten. Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV-DC) oder mit den Konstrukten (A) PDL1- (PDL1-DC), (B) B7H2- (B7H2-DC) oder (C) B7H3-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (B7H3-DC) lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Die verschiedenen DC-Populationen wurden bestrahlt, in Triplikaten seriell verdünnt und mit jeweils  $3 \times 10^5$  T-Zellen aus BALB/c Mäusen für 4 Tage kokultiviert. Die T-Zell-Proliferation wurde anhand der Aufnahme von  $[^3\text{H}]$ -Thymidin während der letzten 16 h der Kultur gemessen. Die Daten geben die relative T-Zell Proliferation (bezogen auf die durch  $16,7 \times 10^3$  LV-DCs + LPS induzierte Proliferation) an, berechnet als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler von sechs (A), sieben (B) und neun (C) voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils in Triplikatansetzten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen transgenexprimierenden DCs und LV-DCs in beiden Aktivierungszuständen (+) sowie zwischen stimulierten und unstimulierten DCs (\*) sind angegeben (\*<sup>+</sup> p<0,05; \*\*<sup>+</sup> p<0,01; \*\*\*<sup>+</sup> p<0,001).

Innerhalb der Gruppe der B7-Familienmitglieder vermitteln sowohl unstimulierte PDL1- (Abbildung 54A, höchstes DC/T-Zell-Verhältnis) als auch B7H2-DCs (Abbildung 54B, die beiden höchsten DC/T-Zell-Verhältnisse) eine signifikant geringere allogene BALB/c T-Zell-

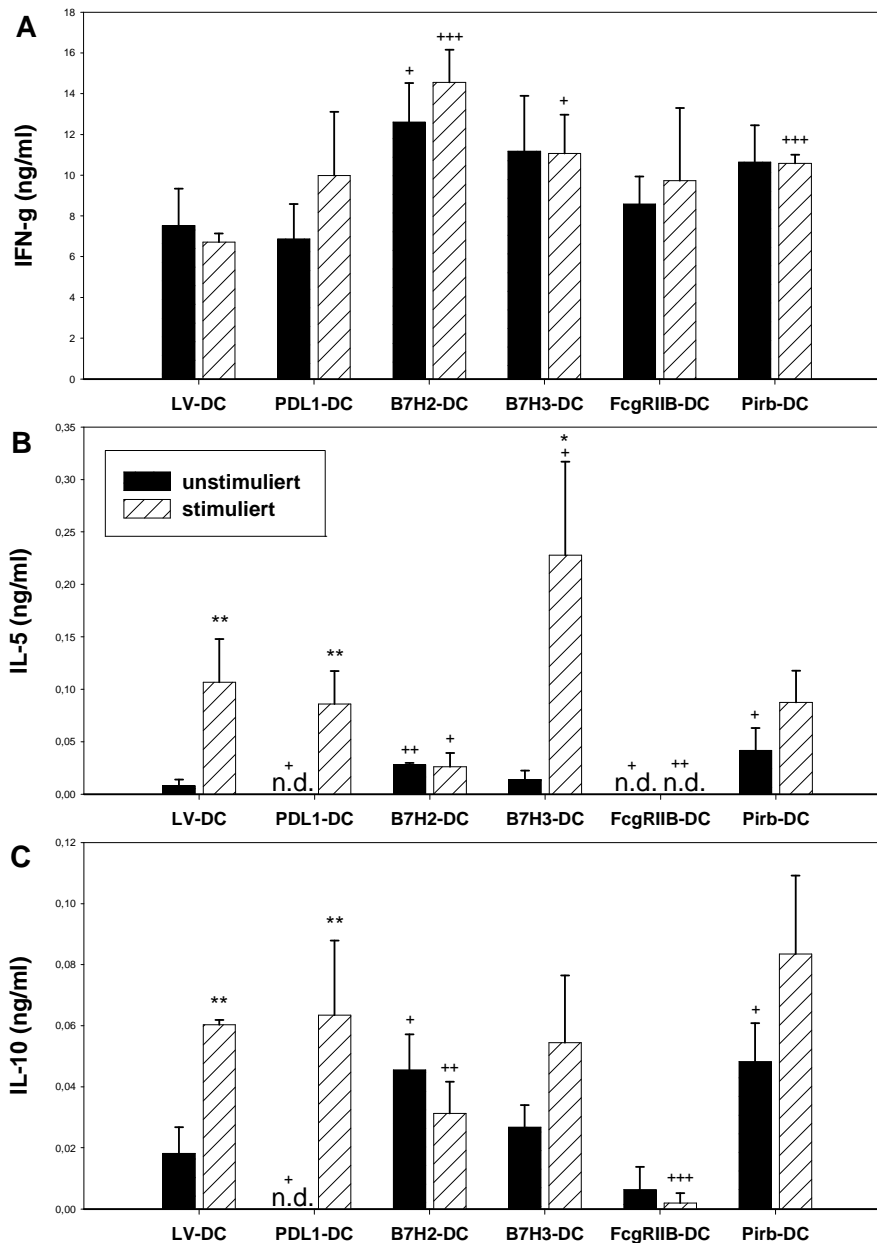
Proliferation als unstimulierte LV-DCs. Die Überexpression von B7-H3, das in erhöhter Menge auf der Oberfläche entsprechend transduzierter DCs nachgewiesen wurde, hat keinen Einfluss auf die allogene T-Zell-Aktivierung unstimulierter DCs (Abbildung 54C). Im Rahmen der Ausreifung mit LPS weisen PDL1-DCs, B7H2-DCs und B7H3-DCs ebenfalls ein gegenüber dem unstimulierten Zustand signifikant erhöhtes allogenenes T-Zell-Aktivierungspotential auf. Verglichen mit stimulierten LV-DCs ist die durch die jeweils ein B7-Familienmitglied überexprimierenden DCs induzierte T-Zell-Proliferation jedoch signifikant reduziert. Die potenteste Reduktion wird dabei durch die Überexpression von PD-L1 in DCs erreicht. Eine weniger effektive Verminderung der allostimulatorischen Kapazität wurde für B7H2-DCs, gefolgt von B7H3-DCs, detektiert.

Von allen fünf analysierten Oberflächenmolekülen erwies sich somit die Überexpression von B7-H2 und FcγRIIB im unstimulierten und die Überexpression von PD-L1 im stimulierten Zustand als am effektivsten zur Reduktion des allogenem primären T-Zell-Aktivierungspotentials von DCs.

#### **3.4.6 Die Überexpression von Oberflächenmolekülen in DCs verändert das Zytokinprofil kokultivierter allogener T-Zellen**

Eine Form der Regulation von immunologischen Reaktionen durch kostimulatorische bzw. koinhibitorische Oberflächenmoleküle auf DCs ist die Modulation der Zytokinproduktion von interagierenden T-Zellen. Das im Kontext von DC/T-Zell-Kokulturen ermittelte Zytokinprofil ermöglicht einen Rückschluss auf die T-Zell-polarisierenden Eigenschaften verschiedener DC-Populationen. Die Konzentrationen der sekretierten Zytokine in Kokulturen von transgenexprimierenden DCs mit allogenen BALB/c T-Zellen wurden hierzu mittels ELISA bestimmt.

In Kokulturen mit den verschiedenen unstimulierten transgenexprimierenden DC-Populationen und allogenen BALB/c T-Zellen wurde eine jeweils zu Kontrollansätzen mit unstimulierten LV-DCs vergleichbare Sekretion des T<sub>H</sub>1-Markerzytokins IFN-γ detektiert (Abbildung 55A). Einzige Ausnahme bilden hier unstimulierte B7H2-DCs; in den entsprechenden Kokulturen wurde eine erhöhte Konzentration dieses Zytokins nachgewiesen. Die Ausreifung von LV-DCs mit LPS führt zu keiner weiteren Modulation der IFN-γ Produktion in den entsprechenden Kokulturen mit allogenen T-Zellen. Werden stimulierte B7H2-, B7H3- oder Pirb-DCs als APCs in der allogenen Kokultur eingesetzt, ist die Menge an IFN-γ signifikant höher als in Kokulturen mit stimulierten LV-DCs.



**Abbildung 55: Die Überexpression von Oberflächenmolekülen in BM-DCs resultiert in einer Modulation der Zytokinmuster in Kokulturen mit allogenen T-Zellen.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV-DC) oder mit den Konstrukten PDL1- (PDL1-DC), B7H2- (B7H2-DC), B7H3- (B7H3-DC), FcγRIIB- (FcγRIIB-DC) oder PirB-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (Pirb-DC) lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Bestrahlte DCs im unstimulierten und stimulierten Zustand (jeweils  $1,67 \times 10^5$ ) wurden für 4 Tage mit  $3 \times 10^6$  T-Zellen aus BALB/c Mäusen in einem Volumen von 2 ml kokultiviert. Anschließend wurden die Kulturüberstände geerntet und der Gehalt von (A) IFN-γ, (B) IL-5 und (C) IL-10 mittels ELISA bestimmt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von jeweils 3-6 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen transgenexprimierenden DCs und LV-DCs in beiden Aktivierungszuständen (+) sowie zwischen stimulierten und unstimulierten DCs (\*) sind angegeben (\*, + p<0,05; \*\*+, \*\*\* p<0,01; \*\*\*\* p<0,001). n.d.: nicht detektiert.

Im Gegensatz zu IFN-γ ist die Induktion der Produktion des T<sub>H</sub>2-Markerzytokins IL-5 durch die verschiedenen DC-Populationen hochgradig variiert (Abbildung 55B). Während



unstimulierte LV-DCs eine geringe IL-5 Produktion induzieren, vermitteln PDL1- und FcγRIIB-DCs keine Sekretion dieses Zytokins. In Kokulturen mit unstimulierten B7H2- und Pirb-DCs hingegen wurde jeweils eine signifikant erhöhte Menge IL-5 im Vergleich zu Kontrollansätzen mit LV-DCs detektiert. Stimulierte LV-, PDL1- und B7H3-DCs induzieren, verglichen zum unstimulierten Zustand, eine signifikant erhöhte IL-5 Produktion kokultivierter T-Zellen, wobei die in Kokulturen mit stimulierten B7H3-DCs als APCs detektierte Menge dieses Zytokins deutlich höher ist als diejenige im entsprechenden LV-DC-Kontrollansatz. Pirb- und B7H2-DCs vermitteln im Unterschied dazu nach einer Stimulierung mit LPS keine höhere IL-5 Sekretion als im unstimulierten Zustand. Außerdem ist die Menge an IL-5 in Kokulturen mit stimulierten B7H2-DCs als APCs im Vergleich zum LV-DC-Ansatz signifikant reduziert. Wie schon im unstimulierten Zustand, induzieren FcγRIIB-DCs ebenfalls nach einer Ausreifung mit LPS keine IL-5 Sekretion in allogenen T-Zellen.

Auch die Konzentration des ambivalenten T<sub>H</sub>2/Treg-Markerzytokins IL-10 wird in allogenen Kokulturen durch die Überexpression der verschiedenen Oberflächenmoleküle in DCs transgenabhängig stark beeinflusst (Abbildung 55C). Im Gegensatz zu Kontrollansätzen mit unstimulierten LV-DCs wurde in Kokulturen von PDL1-DCs und BALB/c T-Zellen keine Produktion von IL-10 detektiert. Eine Kokultivierung mit unstimulierten B7H2- und Pirb-DCs resultiert im Vergleich zu Ansätzen mit LV-DCs in einer signifikant erhöhten Konzentration des genannten Zytokins in den entsprechenden Überständen. Eine maturierungsassoziierte gesteigerte IL-10 Produktion, wie sie in Kokulturen mit LV-DCs auftritt, wurde bei entsprechenden Ansätzen mit stimulierten B7H2- und FcγRIIB-DCs nicht detektiert. Hier lag die Menge an IL-10 in den Kulturüberständen jeweils signifikant unterhalb derer in Kokulturen mit stimulierten LV-DCs.

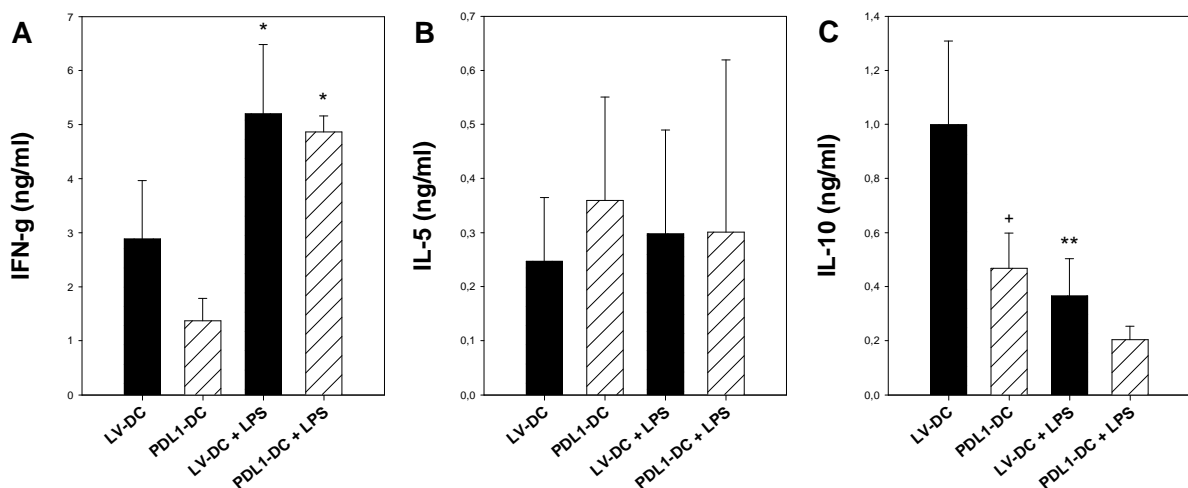
#### **3.4.7 Die Überexpression von PD-L1 führt zu einer Reduktion des syngen T-Zell-Aktivierungspotentials von DCs**

Im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung soll das kurative Potential von Transduktanden, die im Rahmen der *in vitro*-Analysen ein deutlich reduziertes T-Zell-Aktivierungspotential aufweisen, im murinen Krankheitsmodell der haptenvermittelten Kontaktallergie untersucht werden. Da dieses Modell auf einem syngen Hintergrund basiert, wurde, zusätzlich zur allogenen T-Zell-Stimulierungskapazität, bei ausgewählten transgenexprimierenden DC-Populationen auch die syngene T-Zell-Aktivierungsfähigkeit analysiert. Die Überexpression von PD-L1 resultierte in der effektivsten Reduktion der allogenen T-Zell-Stimulierungskapazität LPS-stimulierter DCs (Abschnitt 3.4.5), weshalb



kokultivierter T-Zellen. Vor diesem Hintergrund wurde das durch MOG<sub>35-55</sub> Peptid beladene PDL1-DCs in Kokulturen mit syngenen 2D2 T-Zellen induzierte Zytokinprofil mittels ELISA bestimmt.

Unabhängig von Aktivierungszustand der APCs sind die Konzentrationen des T<sub>H</sub>1-Markerzytokins IFN- $\gamma$  (Abbildung 57A) sowie des T<sub>H</sub>2-Markerzytokins IL-5 (Abbildung 57B) in Kokulturen mit PDL1-DCs und syngenen T-Zellen jeweils vergleichbar zu den entsprechenden Kontrollansätzen mit LV-DCs. Die einzige Veränderung des Zytokinprofils findet auf Ebene der IL-10 Produktion statt (Abbildung 57C) – in Kokulturen mit unstimulierten PDL1-DCs wurden im Vergleich zu Kontrollansätzen mit LV-DCs signifikant reduzierte Mengen dieses T<sub>H</sub>2/Treg-Markerzytokins detektiert. Im Gegensatz zu Ansätzen mit LV-DCs resultiert die Verwendung LPS-stimulierter PDL1-DCs als APCs, im Vergleich zu Kokulturen mit den entsprechenden unstimulierten DC-Populationen, in keiner zusätzlichen Verminderung der IL-10 Konzentration.



**Abbildung 57: Die Überexpression von PD-L1 in BM-DCs resultiert in einem veränderten Zytokinprofil in Kokulturen mit syngenen T-Zellen.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV-DC) oder mit dem Konstrukt PDL1-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (PDL1-DC) lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1  $\mu$ g/ml LPS für 24 h. Die verschiedenen bestrahlten, MOG<sub>35-55</sub> Peptid gepulsten DC-Populationen (jeweils  $1,5 \times 10^5$ ) wurden für 4 Tage mit  $4,5 \times 10^5$  MOG<sub>35-55</sub>-reaktiven T-Zellen aus 2D2 Mäusen in einem Volumen von 2 ml kokultiviert. Anschließend wurden die Kulturüberstände geerntet und der Gehalt von (A) IFN- $\gamma$ , (B) IL-5 und (C) IL-10 mittels ELISA bestimmt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler von 3 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen PDL1- und LV-DCs in beiden Aktivierungszuständen (+) sowie zwischen stimulierten und unstimulierten DCs (\*) sind angegeben (\*<sup>+</sup>  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

Konträr zum allogenen System, in dem in Kokulturen mit unstimulierten PDL1-DCs keine Produktion der Zytokine IL-5 und IL-10 detektiert wurde, fällt die Regulation der Zytokinprofile in Ansätzen mit syngenen T-Zellen wesentlich moderater aus. In Übereinstimmung mit dem allogenen System wird auch hier die IL-10 Produktion in Kokulturen mit unstimulierten PDL1-

DCs, wenn auch in einem geringeren Ausmaß, negativ moduliert. Die Produktion von IL-5 ist jedoch im Vergleich zu Kontrollansätzen mit LV-DCs, unverändert. Eine Modulation der Zytokinprofile durch eine Kokultivierung mit stimulierten PDL1-DCs findet in beiden Systemen nicht statt.

## **3.5 Die Überexpression intrazellulärer Moleküle moduliert den Phänotyp und die Funktion muriner BM-DCs**

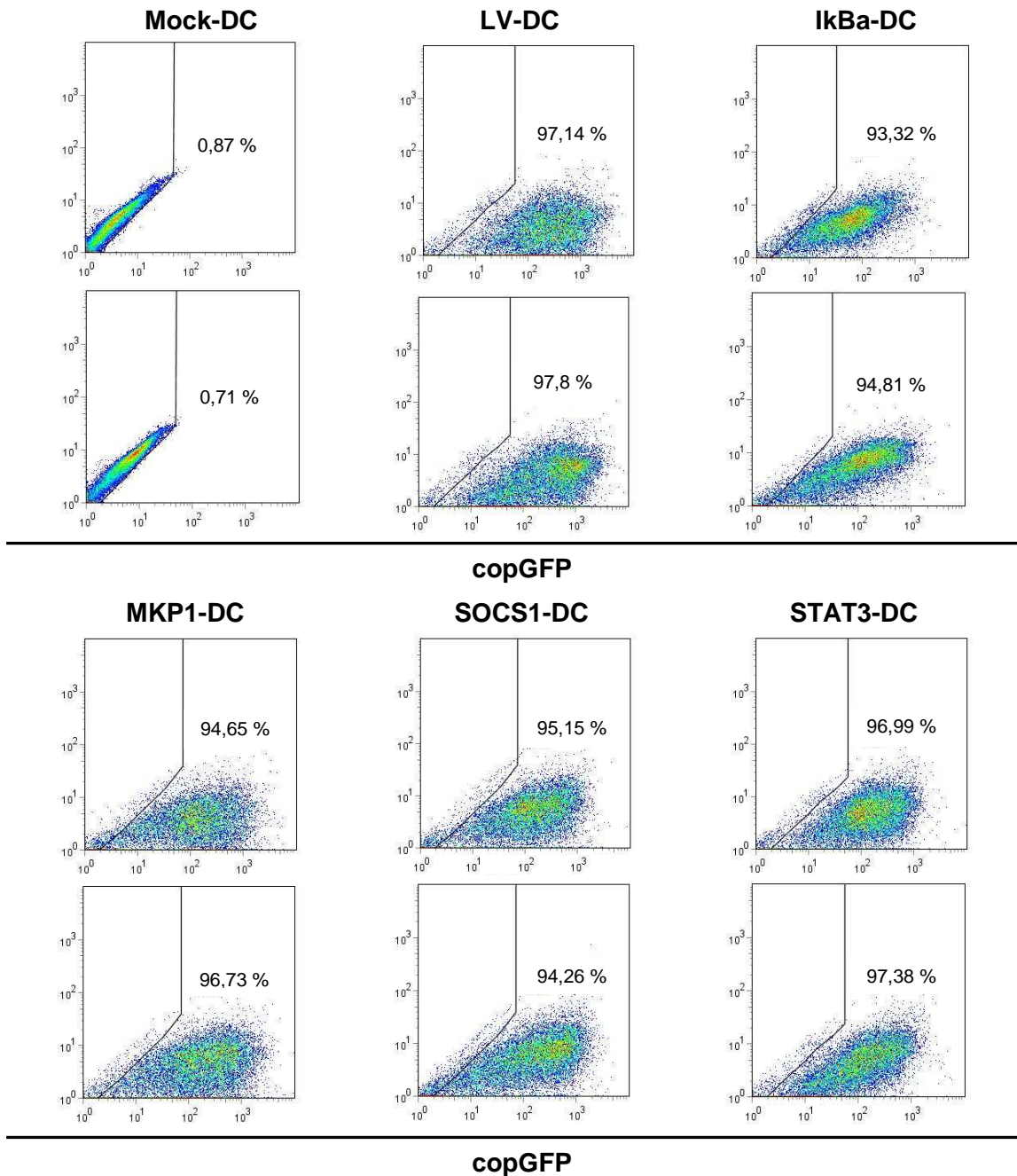
Die tolerogene Funktion von DCs beruht essentiell auf der Aktivität intrazellulärer Elemente wie Transkriptionsfaktoren, Kinasen und Phosphatasen. Durch die phänotypische Analyse von DEX-APCs (Abschnitt 3.1) wurde innerhalb der Gruppe intrazellulärer Signalmoleküle der TF GILZ, das Enzym HO-1, welches die Degradation von Häm katalysiert, das antiapoptotische Molekül SGK-1 sowie die MAP-Kinase Phosphatase MKP-1 als potentiell toleranzassoziierte Schlüsselmoleküle identifiziert. Von den genannten vier Molekülen wurde MKP-1 für eine Überexpression in DCs ausgewählt. Sowohl unter basalen Bedingungen, als auch nach einer Stimulierung mit LPS weisen DEX-APCs signifikant höhere MKP-1 mRNA-Mengen auf als die jeweils entsprechende BM-DC-Population (Abschnitt 3.1.5, Abbildung 16B). In Folge intensiver Literaturrecherchen wurden zusätzlich der TF STAT3, das Protein SOCS-1 sowie das inhibitorische  $\kappa$ B-Protein I $\kappa$ B $\alpha$  für eine lentiviral vermittelte Überexpression in BM-DCs ausgewählt.

### **3.5.1 Die transgenvermittelte exogene Expression der intrazellulären Moleküle I $\kappa$ B $\alpha$ , SOCS-1 und STAT3 beeinflusst deren endogene Expression negativ**

Murine BM-DCs wurden an den Tagen 5 und 6 der Kultur mit den Expressionskonstrukten I $\kappa$ B $\alpha$ -, MKP1-, SOCS1- oder STAT3-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP lentiviral transduziert (vergleiche Abschnitt 3.3.1). Die Verifizierung positiver Transduktanden erfolgte mittels FACS-Analysen als Expressionsnachweis des im jeweiligen Expressionsvektor kodierten Reporters copGFP. Die verschiedenen Konstrukte wurden, unabhängig von der Größe und der Sequenz des enthaltenden Transgens, effizient in murine BM-DCs transferiert (Abbildung 58). Mit allen lentiviralen Vektoren wurden Transduktionseffizienzen von rund 95 % erreicht. Dies gilt sowohl für unstimulierte DCs, als auch nach deren Aktivierung mit LPS und

### 3 Ergebnisse

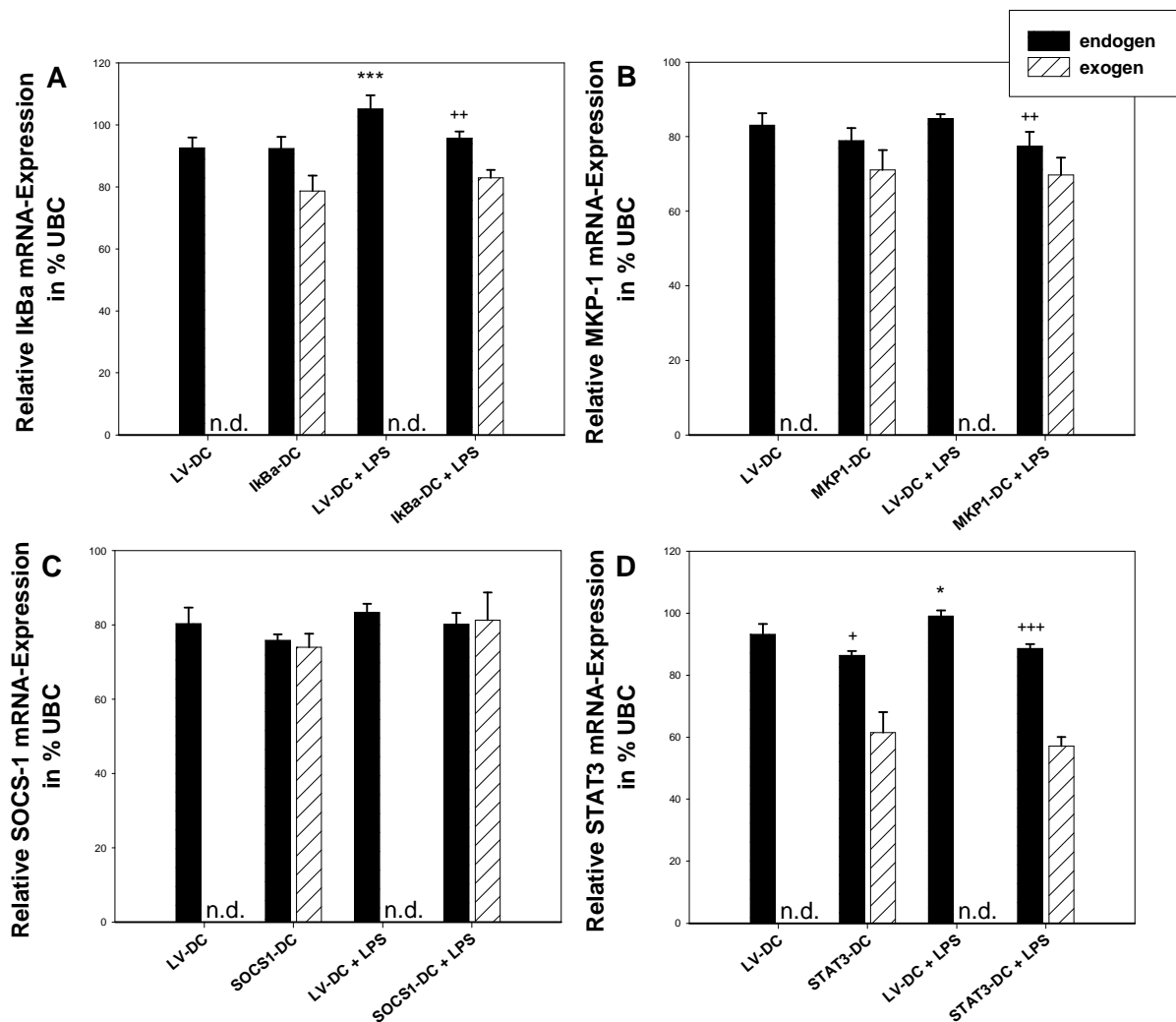
entspricht somit dem Niveau, das mit dem als Kontrolle verwendeten Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP in LV-DCs erreicht wird.



**Abbildung 58: Unabhängig vom Transgen werden alle für intrazelluläre Moleküle kodierenden Expressionsvektoren effizient in BM-DCs transferiert.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder pseudo-transduziert (Mock-DC), mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV-DC) oder mit den Konstrukten IkB $\alpha$ - (IkBa-DC), MKP1- (MKP1-DC), SOCS1- (SOCS1-DC), oder STAT3-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (STAT3-DC) lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1  $\mu$ g/ml LPS für 24 h. An Tag 9 wurde die Transduktionseffizienz mittels FACS-Analyse des copGFP-Proteins bestimmt. Die Graphiken sind repräsentativ für 3-6 voneinander unabhängige Experimente.

### 3 Ergebnisse

Der Nachweis der effektiven Transgenexpression erfolgte für alle Moleküle auf mRNA-Ebene mit Hilfe quantitativer PCR Analysen (Abbildung 59). Neben der exogenen wurde gleichzeitig, durch die Verwendung distinkter *antisense* Primer, die endogene Genexpression erfasst (vergleiche Abschnitt 3.4.1, Abbildung 47). Sie gibt Aufschluss darüber, ob autoregulative Genexpressionsmechanismen bzw. autokrine Effekte vorliegen, wie sie für zahlreiche Gene bereits nachgewiesen wurden.



**Abbildung 59: Die transgenvermittelte Expression von IκBα, MKP-1 und STAT3 beeinflusst deren endogenes Expressionsniveau.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV-DC) oder mit den Konstrukten (A) IκBα- (IκBα-DC), (B) MKP1- (MKP1-DC), (C) SOCS1- (SOCS1-DC), oder (D) STAT3-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (STAT3-DC) lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Die relative endo- und exogene mRNA-Expression wurde mit Hilfe der quantitativen *Real-time-PCR* bestimmt und ist als prozentualer Anteil bezogen auf die Expression des Haushaltsgen Ubiquitin C (UBC) angegeben. Die Unterscheidung der endo- und exogenen mRNA-Expression erfolgte durch die Verwendung unterschiedlicher *antisense* Primer. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von jeweils 4 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen transgenexprimierenden DCs und LV-DCs in beiden Aktivierungszuständen (+) sowie zwischen stimulierten und unstimulierten DCs (\*) sind angegeben (\*\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\*\* p<0,001). n.d.: nicht detektiert.

Die Transgene I $\kappa$ B $\alpha$  (Abbildung 59A), MKP-1 (Abbildung 59B), SOCS-1 (Abbildung 59C) und STAT3 (Abbildung 59D) werden infolge eines lentiviralen Transfers in den entsprechenden unstimulierten und LPS-stimulierten BM-DC-Populationen auf vergleichbarem Niveau exprimiert.

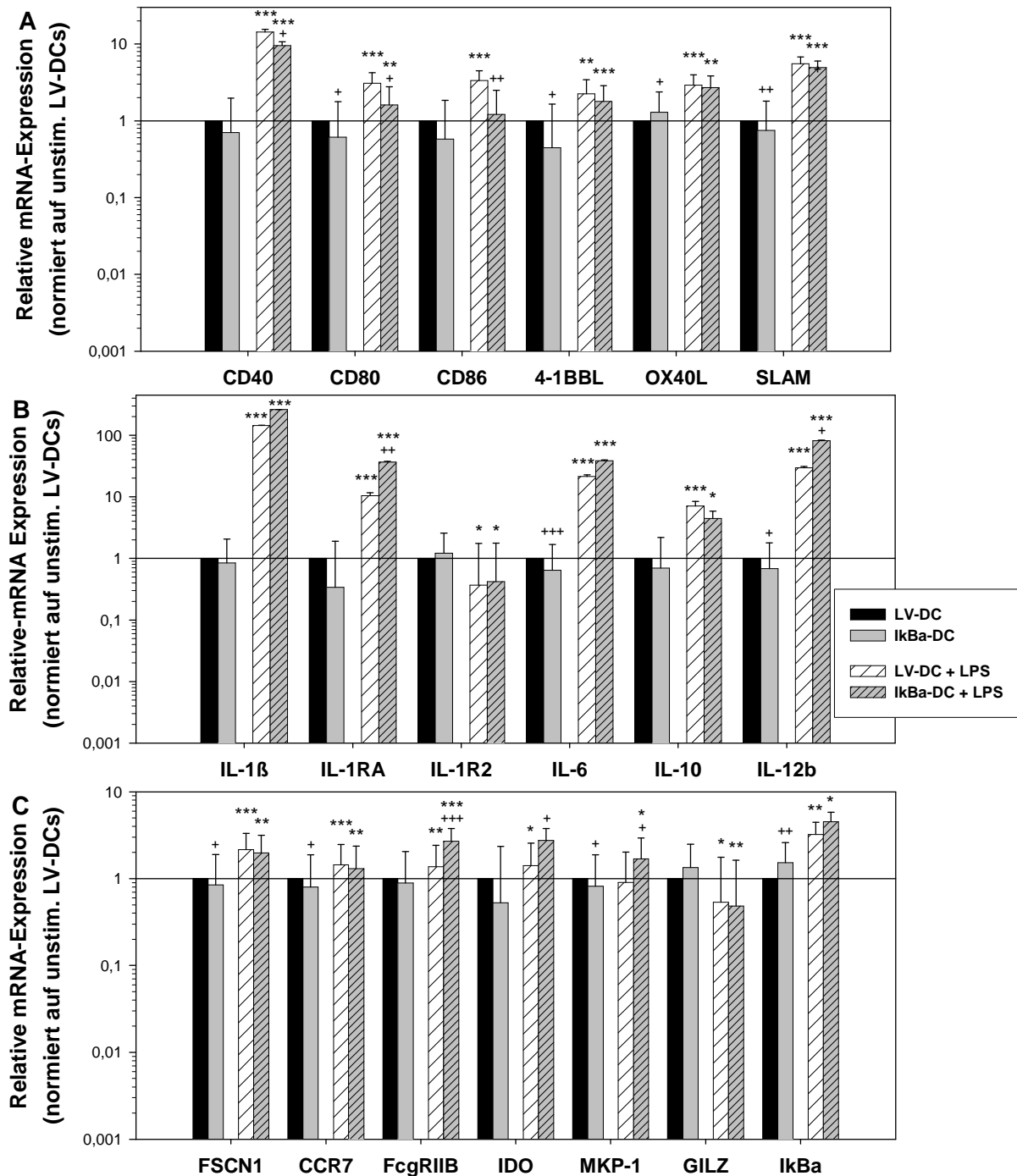
Während die Überexpression von SOCS-1 keinen Einfluss auf die endogene Genexpression hat, verminderte die transgene Expression von STAT3 im unstimulierten Zustand signifikant dessen endogene mRNA-Menge. Außerdem wird der endogene, stimulationsassoziierte Anstieg in der STAT3 Genexpression, wie er bei LV-DCs stattfindet, durch die exogene Expression unterbunden. Analog dazu zeigen I $\kappa$ B $\alpha$ - und MKP1-DCs ebenfalls eine signifikant reduzierte endogene Expression des jeweils entsprechenden Gens im stimulierten Zustand. Zusätzlich wurde in den verschiedenen Transduktanden die dem Transgen entsprechende Gesamt-mRNA-Menge bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den jeweiligen Kapiteln zur Analyse des Genexpressionsprofils entsprechend transduzierter DCs angegeben.

#### **3.5.2 Das Genexpressionsprofil von DCs wird durch die Überexpression intrazellulärer Regulatormoleküle jeweils spezifisch moduliert**

Wie bereits vorhergehend beschrieben, sind die Moleküle I $\kappa$ B $\alpha$ , MKP-1, SOCS-1 und STAT3 an der negativen Regulation aktivierungsassoziiierter Signaltransduktionskaskaden in DCs beteiligt. Der jeweilige Mechanismus der Inhibition ist für die verschiedenen Proteine spezifisch, auch wenn es Überschneidungen gibt. Angesichts dieser Diversität wurde das Expressionsprofil immunrelevanter Gene (vergleiche Abschnitt 3.1.5) in transgenexprimierenden DCs und LV-DCs vergleichend analysiert.

##### **3.5.2.1 Spezifische Modulation des Genexpressionsprofils von I $\kappa$ B $\alpha$ -DCs**

Unter basalen Bedingungen ist in I $\kappa$ B $\alpha$ -DCs die Transkription der kostimulatorischen Moleküle CD80, 4-1BBL und SLAM (Abbildung 60A) sowie der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-12b (Abbildung 60B) im Vergleich zu LV-DCs signifikant reduziert. Darüber hinaus weisen sie eine verminderte mRNA-Menge für den Maturierungsmarker FSCN1 und die Moleküle CCR7 und MKP-1 auf (Abbildung 60C).



**Abbildung 60: Die Überexpression von IκBa resultiert in einer spezifischen Veränderung des Genexpressionsprofils von DCs.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV-DC) oder mit dem Konstrukt IκBa-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (IκBa-DC) lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Die relative mRNA-Expression von Genen, die für (A) kostimulatorische Moleküle, (B) soluble Mediatoren sowie (C) Maturierungs- und Toleranzmarker kodieren, wurde mit Hilfe der quantitativen *Real-time-PCR* bestimmt. Die interne Normalisierung erfolgte über das Haushaltsgen Ubiquitin C (UBC). Die Daten geben die relative Änderung der Genexpression in den verschiedenen DC-Populationen bezogen auf das Expressionsniveau in unstimulierten LV-DCs an. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von jeweils 3-6 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen IκBa-DCs und LV-DCs in beiden Aktivierungszuständen (+) sowie zwischen stimulierten und unstimulierten DCs (\*) sind angegeben (\*, + p<0,05; \*\*, +++ p<0,01; \*\*\*, \*\*\*\* p<0,001).



Analog zu LV-DCs wird in I $\kappa$ B $\alpha$ -DCs die Expression aller analysierten kostimulatorischen Moleküle, löslicher Mediatoren (außer IL-1R2) sowie Maturierungs- und Toleranzmarker (außer GILZ) im Rahmen der Stimulierung mit LPS hochreguliert. Im direkten Vergleich zu stimulierten LV-DCs zeigt sich jedoch, dass die maturierungsassoziierten mRNA-Mengen der Kostimulatoren CD40, CD80 und CD86 signifikant reduziert sind, während gleichzeitig der proinflammatorische Mediator IL-12b verstärkt exprimiert wird.

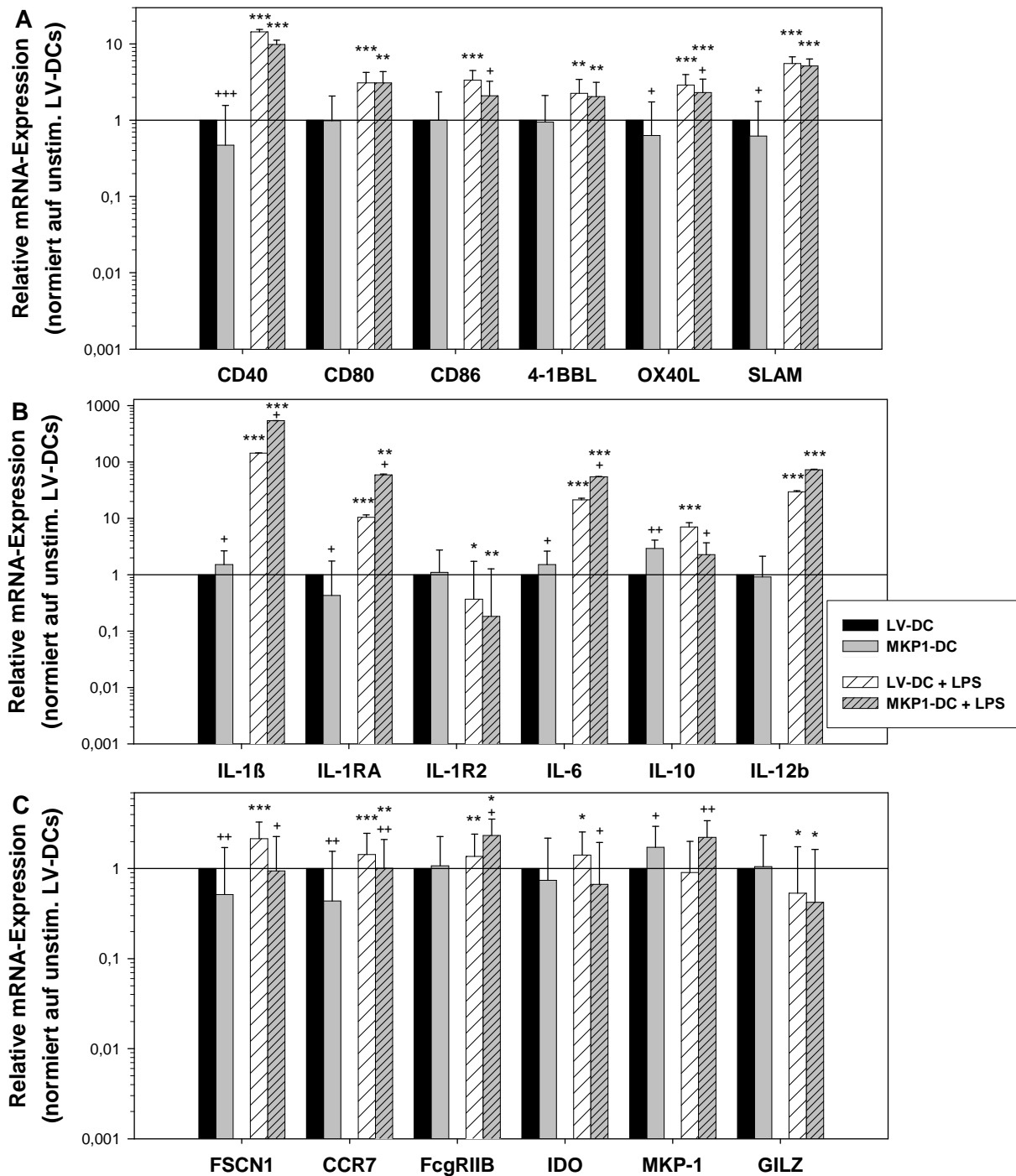
In LPS-stimulierten I $\kappa$ B $\alpha$ -DCs wird nicht nur die Expression von kostimulatorischen Rezeptoren schwächer aufreguliert, sondern gleichzeitig auch die Transkription der toleranzassoziierten Moleküle IL-1RA, Fc $\gamma$ RIIB,IDO sowie MKP-1, verglichen mit stimulierten LV-DCs, signifikant gesteigert.

Die Gesamtmenge an I $\kappa$ B $\alpha$  mRNA ist in unstimulierten I $\kappa$ B $\alpha$ -DCs im Vergleich zu LV-DCs signifikant gesteigert (Abbildung 60C). Im Rahmen der Ausreifung mit LPS wird die I $\kappa$ B $\alpha$  mRNA-Menge in beiden BM-DC-Populationen deutlich hochreguliert. Zwar ist das mRNA-Niveau in stimulierten I $\kappa$ B $\alpha$ -DCs verglichen mit stimulierten LV-DCs erhöht, dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Dieses Resultat ist konsistent mit dem Befund, dass nach einer Aktivierung mit LPS in I $\kappa$ B $\alpha$ -DCs die endogene I $\kappa$ B $\alpha$  mRNA-Expression gegenüber LV-DCs signifikant reduziert ist (Abschnitt 3.5.1, Abbildung 59A).

#### **3.5.2.2 Spezifische Modulation des Genexpressionsprofils von MKP1-DCs**

Hinsichtlich der analysierten kostimulatorischen Rezeptoren weisen MKP1-DCs verglichen mit LV-DCs unter basalen Bedingungen eine signifikant verminderte mRNA-Expression für die Moleküle CD40, OX40L sowie SLAM auf (Abbildung 61A). Zusätzlich ist die Transkription der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-6 sowie des antiinflammatorischen Mediators IL-10 in unstimulierten MKP1-DCs deutlich erhöht (Abbildung 61B). Die mRNA-Menge des negativen Regulators IL-1RA ist signifikant niedriger als in der entsprechenden LV-DC-Population. Weiterhin resultiert die transgenvermittelte Überexpression von MKP-1 in unstimulierten DCs in einer deutlich reduzierten Expression des Maturierungsmarkers FSCN1 und des Chemokinrezeptors CCR7 (Abbildung 61C).

Im Gegensatz zu LV-DCs findet in MKP1-DCs im Rahmen der Stimulation mit LPS keine signifikante maturierungsassoziierte Hochregulation der mRNA-Expression von CD86, IL-10, FSCN1 und IDO statt. Auch die Transkription der Moleküle OX40L und CCR7 ist in stimulierten MKP-1 signifikant weniger aufreguliert, während das Zytokin IL-6 und der inhibitorische Rezeptor Fc $\gamma$ RIIB stärker als in stimulierten LV-DCs exprimiert werden.



**Abbildung 61: Die Überexpression von MKP-1 resultiert in einer spezifischen Veränderung des Genexpressionsprofils von DCs.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV-DC) oder mit dem Konstrukt MKP1-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (MKP1-DC) lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Die relative mRNA-Expression von Genen, die für (A) kostimulatorische Moleküle, (B) soluble Mediatoren sowie (C) Maturierungs- und Toleranzmarker kodieren, wurde mit Hilfe der quantitativen *Real-time-PCR* bestimmt. Die interne Normalisierung erfolgte über das Haushaltsgen Ubiquitin C (UBC). Die Daten geben die relative Änderung der Genexpression in den verschiedenen DC-Populationen bezogen auf das Expressionsniveau in unstimulierten LV-DCs an. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von jeweils 3-6 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen MKP1-DCs und LV-DCs in beiden Aktivierungszuständen (+) sowie zwischen stimulierten und unstimulierten DCs (\*) sind angegeben (\*, + p<0,05; \*\*, +++ p<0,01; \*\*\*, \*\*\*\* p<0,001).

Interessanterweise führt die Überexpression von MKP-1 in LPS-stimulierten DCs zu einer drastisch erhöhten Expression des an der T<sub>H</sub>1-Induktion beteiligten Zytokins IL-1 $\beta$ . Zeitgleich ist jedoch auch die mRNA-Menge des für IL-1 antagonistischen solublen Mediators IL-1RA im Vergleich zu stimulierten LV-DCs signifikant gesteigert.

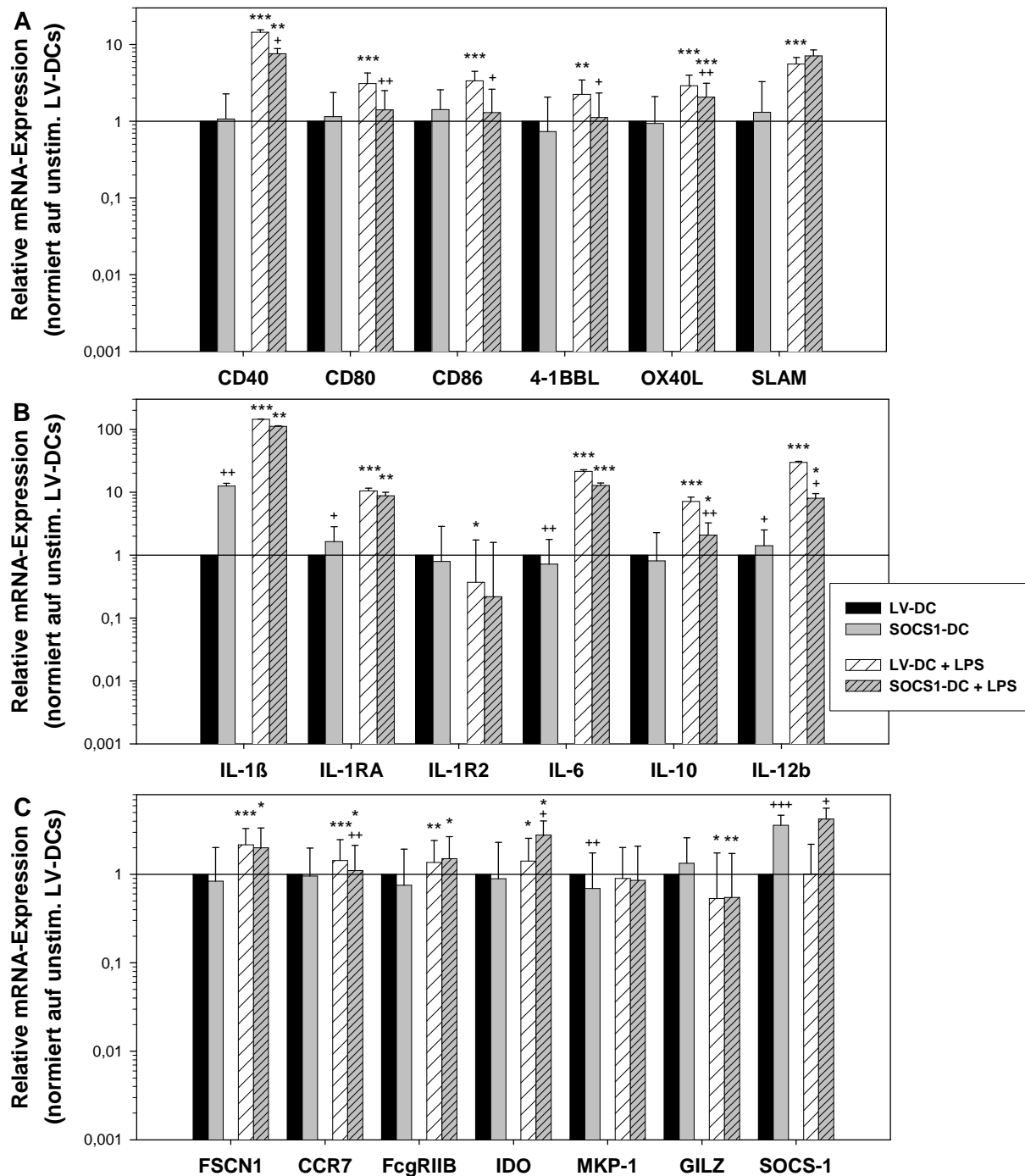
Die Gesamtmenge an MKP-1 mRNA ist sowohl unter basalen Bedingungen, als auch nach einer Stimulierung mit LPS gegenüber der entsprechenden LV-DC-Population signifikant erhöht (Abbildung 61C), obwohl in unstimulierten DCs die endogene MKP-1 Expression durch eine exogene Überexpression negativ reguliert wird (Abschnitt 3.5.1, Abbildung 59B).

#### **3.5.2.3 Spezifische Modulation des Genexpressionsprofils von SOCS1-DCs**

Im unstimulierten Zustand hat die Überexpression des negativen Regulators SOCS-1 in BM-DCs keinen Einfluss auf die mRNA-Expression kostimulatorischer Moleküle (Abbildung 62A). Am stärksten wirkt sich die transgenvermittelte Expression dieses Proteins unter basalen Bedingungen auf die Transkription des proinflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  aus – die mRNA-Menge in SOCS1-DCs ist ungefähr 12 mal höher als in der entsprechenden LV-DC-Population (Abbildung 62B). Gleichzeitig ist auch die Expression des IL-1 $\beta$  Antagonisten IL-1RA sowie des Zytokins IL-12b signifikant hochreguliert. Eine negative Regulation der Genexpression in unstimulierten SOCS1-DCs tritt im Fall des proinflammatorischen Zytokins IL-6 sowie des Toleranzmarkers MKP-1 (Abbildung 62C) auf.

In Reaktion auf eine Stimulierung mit LPS wird in SOCS1-DCs im Gegensatz zu LV-DCs die Transkription der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86, 4-1BBL und SLAM nicht signifikant hochreguliert. Zusätzlich sind die mRNA-Mengen von CD40 und OX40L in LPS-stimulierten SOCS1-DCs signifikant geringer aufreguliert. In der Gruppe der solublen Mediatoren liegt die Expression von IL-10 und IL-12b deutlich unterhalb derer stimulierter LV-DCs. Darüber hinaus ist auch das mRNA-Niveau des an der DC-Migration beteiligten Chemokinrezeptors CCR7 signifikant vermindert. Wie bereits zuvor für I $\kappa$ B $\alpha$  gezeigt, führt auch die Überexpression von SOCS-1 in stimulierten DCs zu einer starken transkriptionalen Erhöhung des Toleranzmarkers IDO.

Die Gesamtmenge an SOCS-1 mRNA ist sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach einer Stimulierung mit LPS gegenüber der entsprechenden LV-DC-Population um jeweils ungefähr das Vierfache erhöht (Abbildung 62B). Dieses Ergebnis ist konsistent mit dem Befund, dass sich die exogene Expression von SOCS-1 in unstimulierten und stimulierten DCs auf einem vergleichbarem Niveau befindet und die endogene SOCS-1 Transkription durch die Überexpression nicht moduliert wird (Abschnitt 3.5.1, Abbildung 59C).



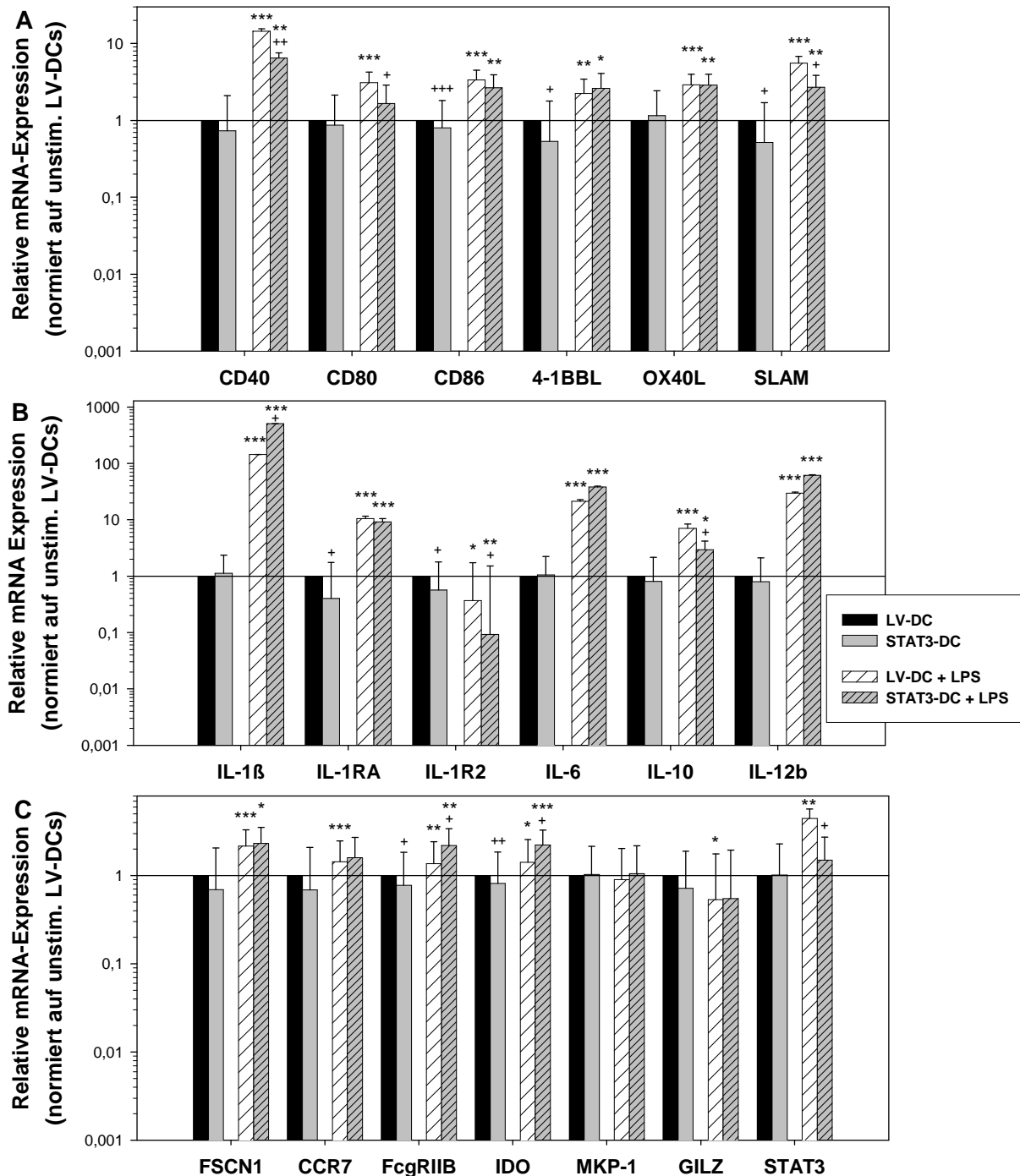
**Abbildung 62: Die Überexpression von SOCS-1 resultiert in einer spezifischen Veränderung des Genexpressionsprofils von DCs.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV-DC) oder mit dem Konstrukt SOCS1-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (SOCS1-DC) lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Die relative mRNA-Expression von Genen, die für (A) kostimulatorische Moleküle, (B) soluble Mediatoren sowie (C) Maturierungs- und Toleranzmarker kodieren, wurde mit Hilfe der quantitativen *Real-time-PCR* bestimmt. Die interne Normalisierung erfolgte über das Haushaltsgen Ubiquitin C (UBC). Die Daten geben die relative Änderung der Genexpression in den verschiedenen DC-Populationen bezogen auf das Expressionsniveau in unstimulierten LV-DCs an. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von jeweils 3-6 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen SOCS1-DCs und LV-DCs in beiden Aktivierungszuständen (+) sowie zwischen stimulierten und unstimulierten DCs (\*) sind angegeben (\*, + p < 0,05; \*\*, ++ p < 0,01; \*\*\*, +++ p < 0,001).

### **3.5.2.4 Spezifische Modulation des Genexpressionsprofils von STAT3-DCs**

Im unstimulierten Zustand reduziert die transgenvermittelte Expression von STAT3 in DCs signifikant die Transkription der kostimulatorischen Moleküle CD86, 4-1BBL sowie SLAM in DCs (Abbildung 63A). Interessanterweise zeigen STAT3-DCs unter basalen Bedingungen gegenüber unstimulierten LV-DCs eine signifikant verminderte mRNA-Expression für die Toleranzmarker IL-1RA (Abbildung 63B), FcγRIIB und IDO (Abbildung 63C). Zusätzlich ist auch die mRNA-Menge von IL-1R2, einem IL-1 Decoyrezeptor, in unstimulierten STAT3-DCs reduziert.

Im Rahmen einer Ausreifung mit LPS wird die mRNA-Expression aller analysierten kostimulatorischen Moleküle und Zytokine in beiden DC-Populationen signifikant hochreguliert. Einzige Ausnahme ist hierbei die Transkription von CD80, die in STAT3-DCs keine maturierungsassoziierte Steigerung erfährt. Die Gesamtmenge an CD40, CD80 und SLAM mRNA ist in STAT3-DCs im Vergleich zu LPS-stimulierten LV-DCs signifikant reduziert. Interessanterweise resultiert die Überexpression von STAT3 in stimulierten DCs in einem starken Anstieg der Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-1β. Daneben werden das antiinflammatorische Zytokin IL-10 sowie IL-1R2 in dieser DC-Population auf RNA-Ebene deutlich geringer exprimiert als in der Kontrollpopulation. Analog zu stimulierten IκBa-DCs zeigen mit LPS stimulierte STAT3-DCs im Vergleich zu stimulierten LV-DCs ebenfalls eine signifikante transkriptionale Erhöhung der toleranzassoziierten Moleküle FcγRIIB und IDO.

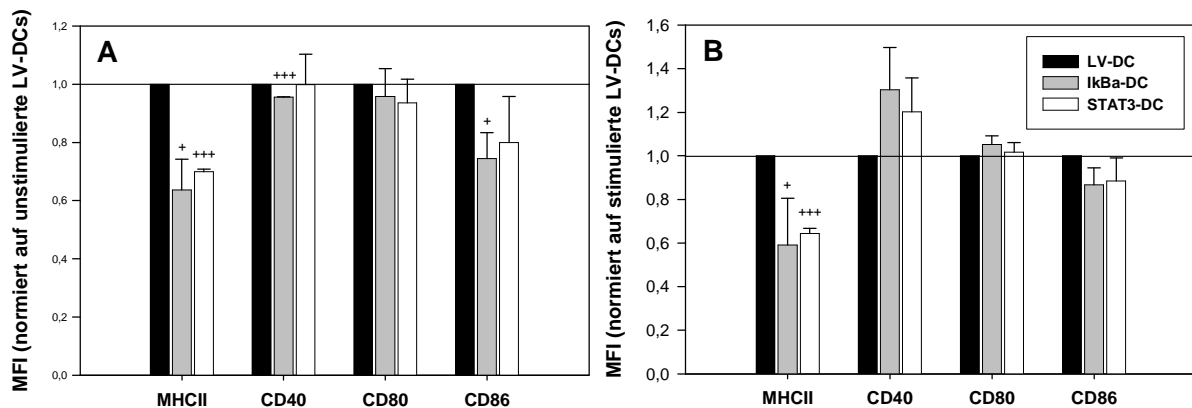
Die Gesamtmenge an STAT3 mRNA befindet sich unter basalen Bedingungen in STAT3-DCs und LV-DCs auf einem vergleichbaren Niveau (Abbildung 63C). Infolge einer Aktivierung mit LPS wird die Transkription dieses Gens in der Kontrollpopulation signifikant hochreguliert. In stimulierten STAT3-DCs findet diese maturierungsassoziierte Aufregulation der Genexpression nicht statt – die mRNA-Menge ist im direkten Vergleich zu stimulierten LV-DCs sogar um das Dreifache verringert. Diese Form der Modulation deutete sich bereits bei der Bestimmung der exo- bzw. endogenen Genexpression an: Sowohl in unstimulierten als auch in LPS-stimulierten DCs resultiert die transgenvermittelte exogene Expression von STAT3 in einer negativen Regulation der endogenen mRNA-Expression dieses Proteins (Abschnitt 3.5.1, Abbildung 59D).



**Abbildung 63: Die Überexpression von STAT3 resultiert in einer spezifischen Veränderung des Genexpressionsprofils von DCs.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV-DC) oder mit dem Konstrukt STAT3-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (STAT3-DCs) lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Die relative mRNA-Expression von Genen, die für (A) kostimulatorische Moleküle, (B) soluble Mediatoren sowie (C) Maturierungs- und Toleranzmarker kodieren, wurde mit Hilfe der quantitativen *Real-time-PCR* bestimmt. Die interne Normalisierung erfolgte über das Haushaltsgen Ubiquitin C (UBC). Die Daten geben die relative Änderung der Genexpression in den verschiedenen DC-Populationen bezogen auf das Expressionsniveau in unstimulierten LV-DCs an. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von jeweils 3-6 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen STAT3-DCs und LV-DCs in beiden Aktivierungszuständen (+) sowie zwischen stimulierten und unstimulierten DCs (\*) sind angegeben (\*, + p<0,05; \*\*, + p<0,01; \*\*\*, + p<0,001).

### 3.5.3 Die Überexpression von I $\kappa$ B $\alpha$ oder STAT-3 vermindert die Menge an MHCII-Molekülen auf der Oberfläche von BM-DCs

Die Überexpression verschiedener intrazellulärer Regulatoren in BM-DCs resultiert jeweils in einer distinkten Modulation des entsprechenden Genexpressionsprofils (Abschnitt 3.5.2). Darüber hinaus wurde in anderen Studien gezeigt, dass eine erhöhte STAT3-Aktivität in DCs die Expression der Kostimulatoren MHCII, CD40 und CD80 supprimiert<sup>284</sup> und dass die adenovirale Überexpression von I $\kappa$ B $\alpha$  in humanen DCs die Menge an kostimulatorischen Rezeptoren auf der Oberfläche der Zellen negativ reguliert<sup>258</sup>. Aus den genannten Gründen erfolgte eine Validierung der variierenden mRNA-Expressionen auf Proteinebene. Hierzu wurde die Zelloberflächenexpression verschiedener DC-typischer Maturierungsmarker von I $\kappa$ B $\alpha$ -DCs und STAT3-DCs mittels FACS analysiert (Abbildung 64).



**Abbildung 64: Die Überexpression von I $\kappa$ B $\alpha$  oder STAT-3 reguliert die Expression von MHCII und kostimulatorischen Rezeptoren auf der Oberfläche von DCs negativ.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV-DC) oder mit den Konstrukten I $\kappa$ B $\alpha$ - (I $\kappa$ B $\alpha$ -DC) oder STAT3-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (STAT3-DC) lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1  $\mu$ g/ml LPS für 24 h. Die verschiedenen DC-Populationen wurden mit spezifischen Antikörpern für MHCII, CD40, CD80 oder CD86 (jeweils PE-gekoppelt) behandelt und mittels FACS analysiert. Die Graphen geben die spezifische Antikörper-Bindung auf der Oberfläche von (A) unstimulierten und (B) LPS-stimulierten DCs an, dargestellt als MFI (*mean fluorescent intensity*). Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler von jeweils 2 Experimenten und wurden normalisiert auf den MFI von (A) unstimulierten oder (B) stimulierten LV-DCs. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen transgenexprimierenden DCs und LV-DCs sind angegeben (+  $p < 0,05$ ; +++  $p < 0,001$ ).

Unter basalen Bedingungen weisen beide transgenexprimierenden DC-Populationen gegenüber LV-DCs signifikant reduzierte Mengen des Maturierungsmarkers MHCII auf ihrer Oberfläche auf (Abbildung 64A). Gleichzeitig wird auch die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 auf Proteinebene durch die Überexpression von I $\kappa$ B $\alpha$  oder STAT3 supprimiert, wobei letztere deutlich, jedoch nicht signifikant vermindert ist.

Unstimulierte I $\kappa$ B $\alpha$ -DCs sind weiterhin durch eine moderate, aber signifikante Reduktion der Menge an CD40 auf der Zelloberfläche gekennzeichnet. Das Molekül CD80 wurde auf LV-DCs und auf beiden transgenexprimierenden DC-Populationen demgegenüber in vergleichbarer Menge detektiert.

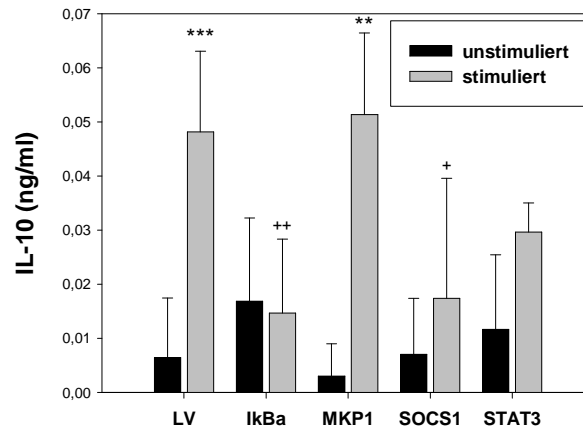
Wie zuvor für den unstimulierten Zustand beschrieben, ist die Menge an MHCII-Molekülen auf LPS-stimulierten I $\kappa$ B $\alpha$ -DCs und STAT3-DCs im Vergleich zur entsprechenden LV-DC-Population signifikant vermindert (Abbildung 64B). Die Oberflächenexpression der kostimulatorischen Rezeptoren CD80 und CD86 wird durch die jeweilige Transgenexpression nicht moduliert. Auffällig ist, dass sowohl I $\kappa$ B $\alpha$ -DCs, als auch STAT3-DCs nach einer Stimulierung mit LPS deutlich, wenn auch nicht signifikant, höhere Mengen CD40 aufweisen als stimulierte LV-DCs.

#### **3.5.4 LPS-stimulierte I $\kappa$ B $\alpha$ -DCs und SOCS1-DCs zeigen eine signifikant verminderte Sekretion des antiinflammatorischen Mediators IL-10**

Das antiinflammatorische Zytokin IL-10 trägt entscheidend zum tolerogenen Status von DCs bei und ist einer der essentiellen Mediatoren für die Regulation von Immunantworten. In vergleichenden Genexpressionsanalysen zeigte sich, dass MKP1-DCs, SOCS1-DCs sowie STAT3-DCs nach einer Stimulierung mit LPS eine jeweils signifikant geringere IL-10 Transkription aufweisen als entsprechende LV-DCs (Abschnitt 3.5.2). Alle drei Proteine scheinen also die normalerweise maturierungsassoziierte Aufregulation der IL-10 Transkription in DCs negativ zu regulieren. Die Validierung dieser Resultate auf Proteinebene erfolgte durch die Bestimmung der IL-10 Konzentration im Kulturüberstand von transgenexprimierenden DCs sowie von LV-DCs mittels ELISA-Analysen.

Im unstimulierten Zustand weisen alle vier transgenexprimierenden DC-Populationen eine vergleichbar moderate IL-10 Produktion auf wie unstimulierte LV-DCs (Abbildung 65). Während LV-DCs infolge einer Stimulierung mit LPS die Produktion des genannten antiinflammatorischen Zytokins deutlich hochregulieren, wird diese maturierungsassoziierte Steigerung durch die Überexpression von I $\kappa$ B $\alpha$  oder SOCS-1 in der entsprechenden DC-Population verhindert. Auch in den Kulturüberständen stimulierter STAT3-DCs wurden deutlich geringere IL-10 Mengen detektiert, wobei dieser Unterschied zu stimulierten LV-DCs jedoch nicht statistisch signifikant ist. Die Überexpression von MKP-1 führt weder im unstimulierten, noch im stimulierten Zustand zu einer Modulation der IL-10 Sekretion von BM-DCs.





**Abbildung 65: Die Überexpression der Moleküle IκBα und SOCS-1 verändert autokrin die IL-10 Produktion die BM-DCs.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV-DC) oder mit den Konstrukten IκBα-, MKP1-, SOCS1-, oder STAT3-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Anschließend wurden die Kulturüberstände geerntet und der Gehalt von IL-10 mittels ELISA bestimmt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von jeweils 4 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen transgenexprimierenden DCs und LV-DCs in beiden Aktivierungszuständen (+) sowie zwischen stimulierten und unstimulierten DCs (\*) sind angegeben (\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001).

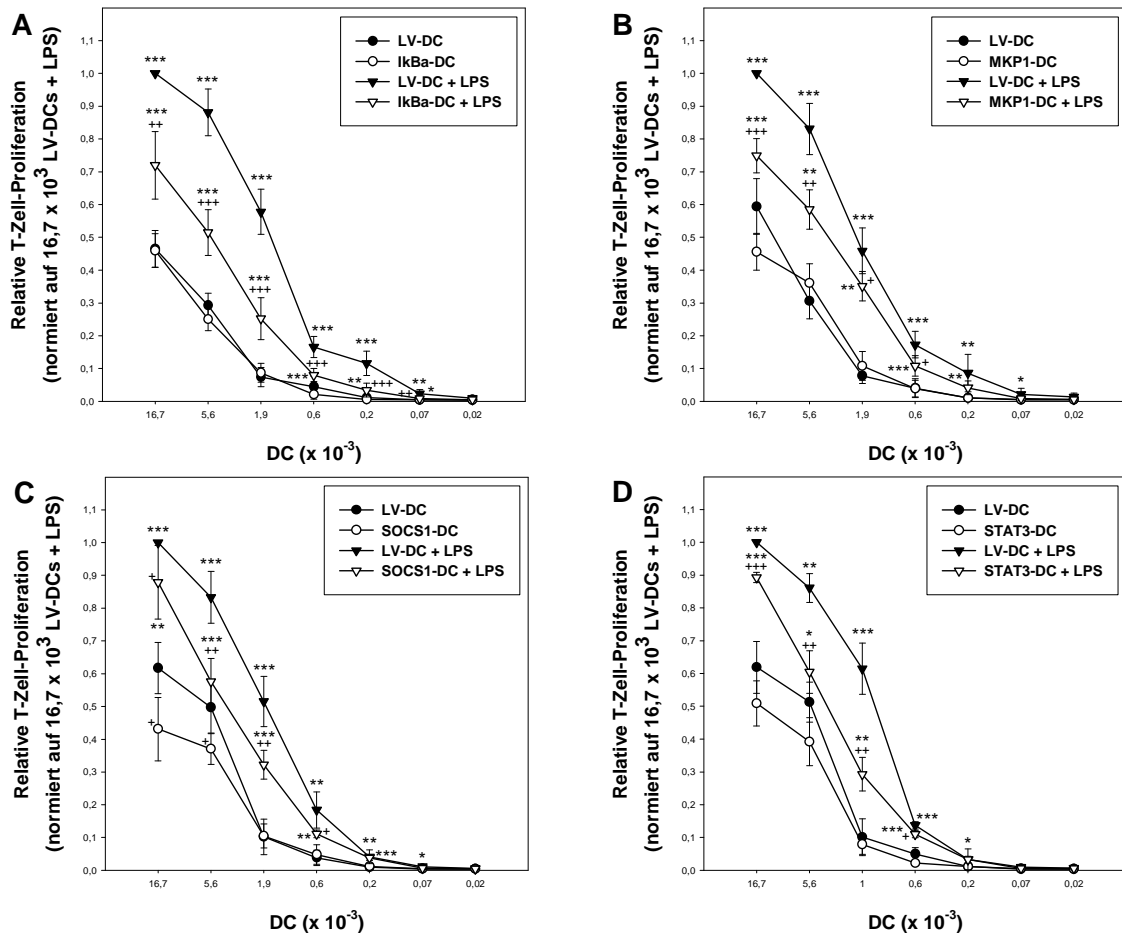
### 3.5.5 Im Vergleich der lentiviral transferierten intrazellulären Moleküle führt die Überexpression von IκBα zur effektivsten Reduktion der allogenen T-Zell-Stimulierungskapazität von DCs

Wie in den vorhergehenden Abschnitten dieser Arbeit beschrieben, führt die Überexpression verschiedener intrazellulärer Moleküle zu einer jeweils distinkten phänotypischen Veränderung der entsprechend transduzierten DC-Population. Inwieweit sich die Modulationen im Genexpressionsprofil (Abschnitt 3.5.2), der Expression von MHCII und kostimulatorischen Molekülen auf der Zelloberfläche (Abschnitt 3.5.3) und der Sekretion des antiinflammatorischen Mediators IL-10 (Abschnitt 3.5.4) auch auf die Funktion von DCs auswirken, wurde im Rahmen allogener DC/T-Zell-Kokulturen analysiert.

Unter basalen Bedingungen induzieren IκBα-DCs (Abbildung 66A), MKP1-DCs (Abbildung 66B) sowie STAT3-DCs (Abbildung 66D) eine vergleichbar moderate allogene T-Zell-Proliferation wie unstimulierte LV-DCs. Einzig die Überexpression von SOCS-1 resultiert in einem signifikant verminderten T-Zell-Aktivierungspotential unstimulierter DCs ((Abbildung 66C), die beiden höchsten DC/T-Zell-Verhältnisse).

Infolge einer Ausreifung mit LPS steigt die T-Zell-Aktivierungskapazität aller DC-Populationen gegenüber dem unstimulierten Zustand in allen Titrationsstufen deutlich an. In einem direkten Vergleich mit stimulierten LV-DCs zeigt sich jedoch, dass die durch die

jeweils ein intrazelluläres Molekül überexprimierenden DCs induzierte T-Zell-Proliferation signifikant reduziert ist. Die potenteste Reduktion der allogenen T-Zell-Aktivierung wird hierbei durch die Überexpression von I $\kappa$ B $\alpha$  in DCs erzielt. MKP1-DCs, STAT3-DCs sowie SOCS1-DCs sind im stimulierten Zustand in genannter Reihenfolge effizientere T-Zell-Stimulatoren als I $\kappa$ B $\alpha$ -DCs.



**Abbildung 66: Die Überexpression intrazellulärer Regulatorproteine resultiert in einem signifikant reduziertem allogenen T-Zell-Aktivierungspotential LPS-stimulierter DCs** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV-DC) oder mit den Konstrukten (A) I $\kappa$ B $\alpha$ - (I $\kappa$ B $\alpha$ -DC), (B) MKP1- (MKP1-DC), (C) SOCS1- (SOCS1-DC) oder (D) STAT3-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (STAT3-DC) lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1  $\mu$ g/ml LPS für 24 h. Die verschiedenen BM-DC Populationen wurden bestrahlt, in Triplikaten seriell verdünnt und mit jeweils  $3 \times 10^5$  T-Zellen aus BALB/c Mäusen für 4 Tage kokultiviert. Die T-Zell-Proliferation wurde anhand der Aufnahme von [ $^3$ H]-Thymidin während der letzten 16 h der Kultur gemessen. Die Daten geben die relative T-Zell Proliferation (bezogen auf die durch  $16,7 \times 10^3$  LV-DCs + LPS induzierte Proliferation) an, berechnet als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler von acht (A), sieben (B,C) und fünf (D) voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils in Triplikatanätzen durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen transgenexprimierenden DCs und LV-DCs in beiden Aktivierungszuständen (+) sowie zwischen stimulierten und unstimulierten DCs (\*) sind angegeben (\*, + p<0,05; \*\*, +++ p<0,01; \*\*\*, +\*\*\* p<0,001).

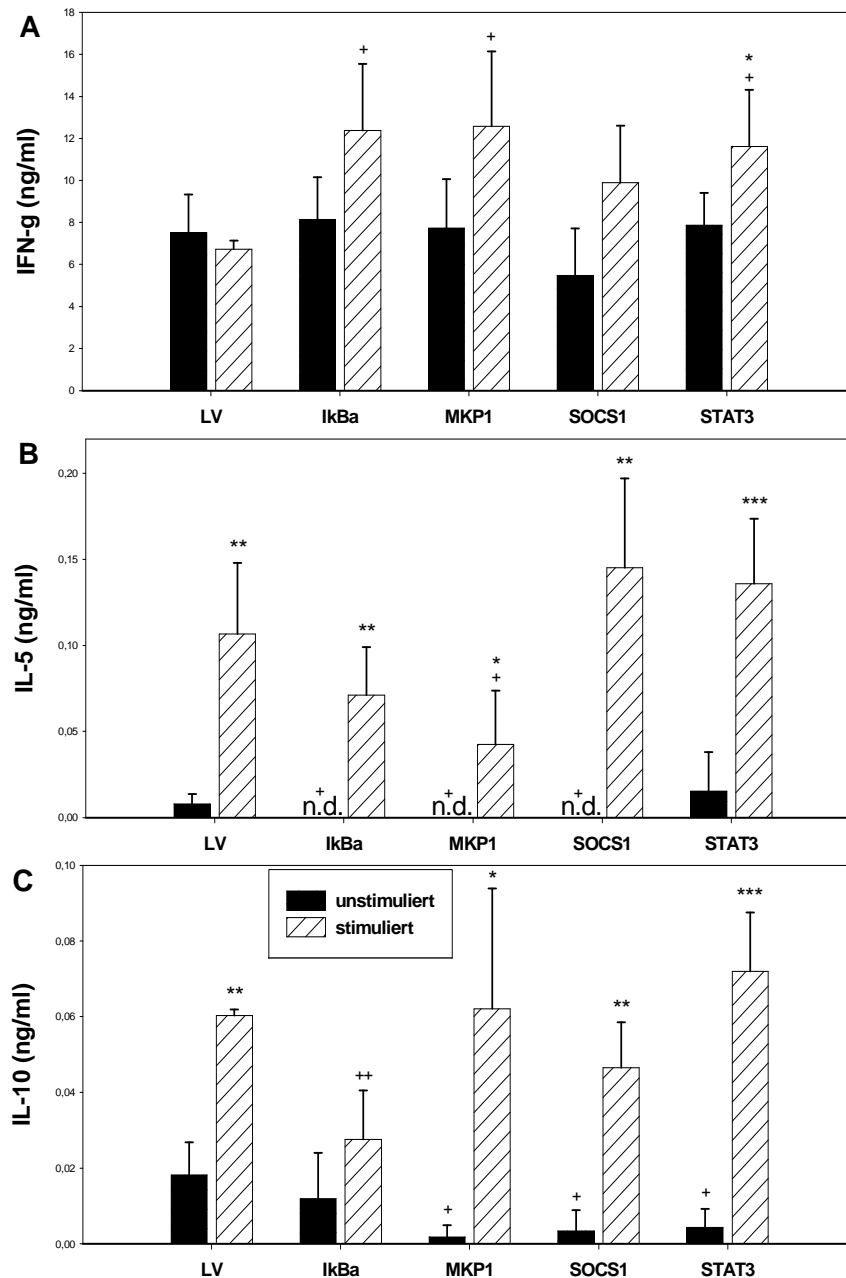
Von den vier analysierten intrazellulären Molekülen erwies sich demzufolge die Überexpression von SOCS-1 im unstimulierten und die Überexpression von I $\kappa$ B $\alpha$  im stimulierten Zustand am wirkungsvollsten bezüglich der Reduktion des allogenen primären T-Zell-Aktivierungspotentials von DCs.

#### **3.5.6 Die Überexpression von intrazellulären Molekülen in DCs induziert jeweils eine distinkte Zytokinantwort kokultivierter allogener T-Zellen**

Durch die Überexpression intrazellulärer Moleküle in DCs verändert sich deren Expression kostimulatorischer Moleküle sowie löslicher Mediatoren sowohl auf transkriptionaler (Abschnitt 3.5.2) als auch auf Proteinebene (Abschnitte 3.5.3 und 3.5.4). Beide Molekülgruppen sind entscheidend für die Regulation immunologischer Prozesse, da sie wesentlich zur Modulation der Zytokinantwort von T-Zellen beitragen. Die T-Zell-polarisierenden Eigenschaften der verschiedenen transgenexprimierenden DC-Populationen wurden daher mittels ELISA-Analysen der Kulturüberstände von Kokulturen transduzierter DCs mit allogenen BALB/c T-Zellen differenziert.

Unabhängig vom lentiviral transferierten Transgen wurde in Kokulturen der verschiedenen unstimulierten DC-Populationen und allogener BALB/c T-Zellen eine jeweils zu Kontrollansätzen mit LV-DCs vergleichbare Produktion des T<sub>H</sub>1-Markerzytokins IFN- $\gamma$  detektiert (Abbildung 67A). Die infolge einer Kokultivierung mit LPS-stimulierten LV-DCs nachgewiesene Sekretion dieses Zytokins befindet sich ungefähr auf dem gleichen Niveau wie die im Rahmen von Kokulturen mit unstimulierten LV-DCs. Die IFN- $\gamma$  Konzentration in Kokulturen mit stimulierten I $\kappa$ Ba-DCs, MKP1-DCs, SOCS1-DCs oder STAT3-DCs (hier ist die Steigerung statistisch signifikant) hingegen stieg im Vergleich zu Kokulturen mit der jeweiligen unstimulierten APC-Population deutlich an. Außer bei der Verwendung stimulierter SOCS1-DCs liegt die ermittelte IFN- $\gamma$  Konzentration in allen Kokulturen jeweils signifikant oberhalb derer in Ansätzen mit LPS-stimulierten LV-DCs.

Bemerkenswerterweise induzieren unstimulierte I $\kappa$ Ba-DCs, MKP1-DCs und auch SOCS1-DCs keine Sekretion des T<sub>H</sub>2-Markerzytokins IL-5, während unstimulierte STAT3-DCs eine mit unstimulierten LV-DCs ähnlich moderate Produktion dieses Zytokins in allogenen T-Zellen vermitteln (Abbildung 67B). Werden die verschiedenen DC-Populationen im stimulierten Zustand als APCs in der Kokultur verwendet, so steigt in allen Fällen die IL-5 Konzentration im Kulturüberstand signifikant an. Dies gilt zwar auch für stimulierte MKP1-DCs, jedoch liegt die detektierte Menge an IL-5 signifikant unterhalb des Niveaus in DC/T-Zell-Kokulturen mit LPS-stimulierten LV-DCs.



**Abbildung 67: Die Überexpression von intrazellulären Molekülen in BM-DCs resultiert in einer Modulation der Zytokinantworten kokultivierter allogener T-Zellen.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV) oder mit den Konstrukten IkbA-, MKP1-, SOCS1-, oder STAT3-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Bestrahlte DCs im unstimulierten und stimulierten Zustand (jeweils  $1,67 \times 10^5$ ) wurden für 4 Tage mit  $3 \times 10^6$  T-Zellen aus BALB/c Mäusen in einem Volumen von 2 ml kokultiviert. Anschließend wurden die Kulturüberstände geerntet und der Gehalt von (A) IFN- $\gamma$ , (B) IL-5 und (C) IL-10 mittels ELISA bestimmt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler von jeweils 3-6 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen transgenexpressierenden DCs und LV-DCs in beiden Aktivierungszuständen (+) sowie zwischen stimulierten und unstimulierten DCs (\*) sind angegeben (\*<sup>+</sup>  $p < 0,05$ ; \*\*<sup>+</sup>  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). n.d.: nicht detektiert.

Auch die Konzentration des ambivalenten  $T_H2$ /Treg-Markerzytokins IL-10 in allogenen Kokulturen wird durch die Überexpression von intrazellulären Molekülen in DCs transgenabhängig moduliert (Abbildung 67C). Während eine Kokultivierung unstimulierter I $\kappa$ Ba-DCs mit allogenen T-Zellen in einer zu Kontrollansätzen mit LV-DCs vergleichbaren IL-10 Produktion resultiert, ist die Konzentration dieses Zytokins in Kokulturen mit unstimulierten MKP1-DCs, SOCS1-DCs sowie STAT3-DCs signifikant reduziert. Eine maturierungsassoziierte gesteigerte IL-10 Konzentration auf einem zu LV-DCs ähnlichem Niveau wurde in Kokulturen mit MKP1-DCs, SOCS1-DCs sowie STAT3-DCs detektiert. Im Gegensatz dazu resultiert eine Kokultivierung mit LPS-stimulierten I $\kappa$ Ba-DCs im Vergleich zu Kontrollansätzen mit stimulierten LV-DCs in einer signifikant reduzierten IL-10 Menge in den entsprechenden Kulturüberständen.

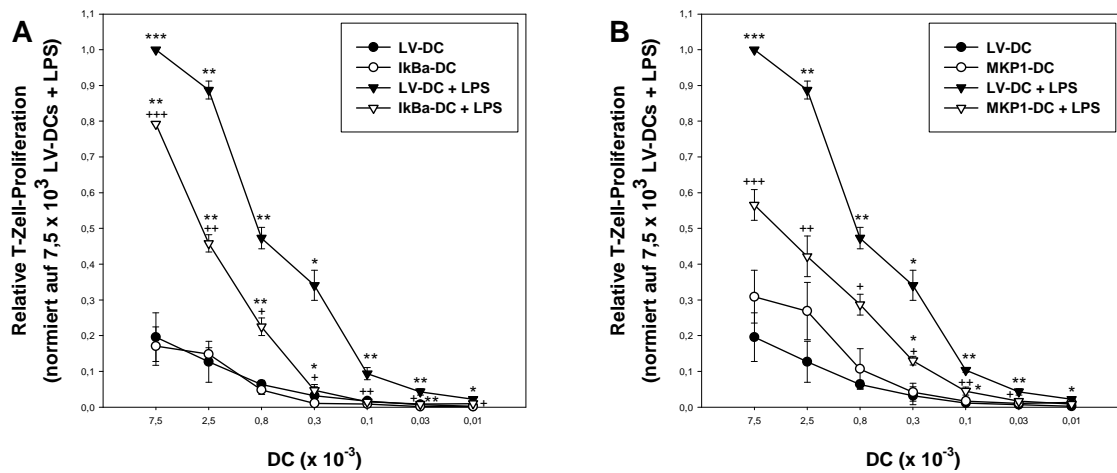
#### **3.5.7 Stimulierte I $\kappa$ Ba-DCs und MKP1-DCs sind durch eine signifikant reduzierte syngene T-Zell-Stimulierungskapazität gekennzeichnet**

Da die vergleichenden Analysen zur Überexpression intrazellulärer Moleküle in DCs zeigten, dass LPS-stimulierte I $\kappa$ Ba-DCs sowie MKP1-DCs das am stärksten reduzierte allogene T-Zell-Aktivierungspotential aufweisen, wurden die entsprechenden unstimulierten und stimulierten Transduktanden mit MOG<sub>35-55</sub> Peptid gepulst und zur Ermittlung der syngenen T-Zell-Stimulierungskapazität mit MOG<sub>35-55</sub>-reaktiven 2D2 T-Zellen kokultiviert.

Wie in Abschnitt 3.5.6 auch für allogene Kokulturen gezeigt, induzieren unstimulierte I $\kappa$ Ba-DCs (Abbildung 68A) sowie MKP1-DCs (Abbildung 68B) eine mit unstimulierten LV-DCs vergleichbare geringe Proliferation kokultivierter syngener 2D2-T-Zellen.

Infolge einer Stimulierung mit LPS steigt das 2D2 T-Zell-Aktivierungspotential von LV-DCs und I $\kappa$ Ba-DCs in allen DC/T-Zell-Verhältnissen signifikant an. Diese Steigerung der maturierungsassoziierten T-Zell-Aktivierung tritt bei MKP1-DCs dagegen in den ersten drei Titrationsstufen nicht auf. Insgesamt liegt die jeweils durch stimulierte I $\kappa$ Ba-DCs oder MKP1-DCs induzierte T-Zell-Proliferation in allen DC/T-Zell-Verhältnissen signifikant unterhalb der durch stimulierte LV-DCs hervorgerufenen.

Analog zum allogenen System wurde somit auch im Rahmen syngener Kokulturen gezeigt, dass eine Überexpression von I $\kappa$ B $\alpha$  oder MKP-1 die T-Zell-Stimulierungskapazität von LPS-stimulierten DCs limitiert, wobei sich in diesem experimentellen Design MKP1-DCs als diejenige DC-Population mit der geringeren T-Zell-Aktivierungskapazität darstellten. In allogenen Kokulturen hingegen war der durch stimulierte I $\kappa$ Ba-DCs vermittelte Effekt stärker.



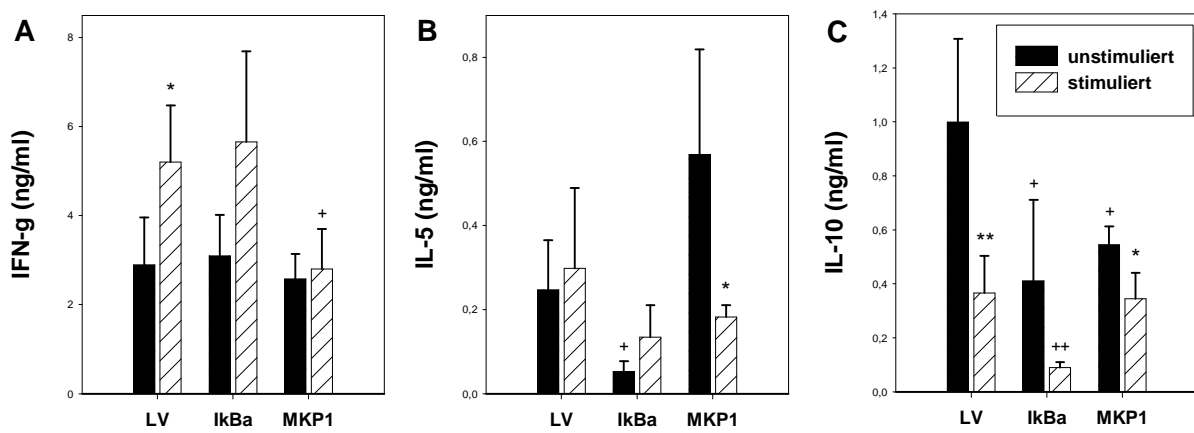
**Abbildung 68: IkBa- und MKP1-DCs weisen auch in syngenem Kokulturen ein vermindertes T-Zell-Aktivierungspotential auf.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV-DC) oder mit den Konstrukten (A) IkBa- (IkBa-DC) oder (B) MKP1-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (MKP1-DCs) lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Die verschiedenen bestrahlten, MOG<sub>35-55</sub> Peptid gepulsten DC-Populationen wurden in Triplikaten seriell verdünnt und mit jeweils  $4,5 \times 10^4$  MOG<sub>35-55</sub>-reaktiven 2D2 T-Zellen für 4 Tage kokultiviert. Die T-Zell-Proliferation wurde anhand der Aufnahme von [3H]-Thymidin während der letzten 16 h der Kultur gemessen. Die Daten geben die relative T-Zell Proliferation (bezogen auf die durch  $7,5 \times 10^3$  LV-DCs + LPS induzierte Proliferation) an, berechnet als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler von jeweils 4 voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils in Triplikatsansätzen durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen transgenexpressierenden DCs und LV-DCs in beiden Aktivierungszuständen (+) sowie zwischen stimulierten und unstimulierten DCs (\*) sind angegeben (\*<sup>+</sup> p<0,05; \*\*<sup>+</sup> p<0,01; \*\*\*<sup>+</sup> p<0,001).

### 3.5.8 Die Überexpression von IkBa oder MKP-1 in DCs modifiziert das Zytokinprofil kokultivierter sygener 2D2 T-Zellen

Wie in Abschnitt 3.5.7 gezeigt, vermitteln LPS-stimulierte IkBa-DCs und MKP1-DCs eine im Vergleich zu stimulierten LV-DCs signifikant reduzierte syngene T-Zell-Proliferation. Diese Veränderung in der APC-Funktion der beiden transgenexpressierenden DC-Populationen könnte auch eine Modulation in der Regulation der Zytokinantwort kokultivierter 2D2 T-Zellen implizieren. Auf Grund dieser Überlegung wurde das durch IkBa-DCs und MKP1-DCs in syngenem 2D2 T-Zellen induzierte Zytokinprofil mittels ELISA validiert.

In Kokulturen mit unstimulierten IkBa-DCs oder MKP1-DCs und syngenem 2D2 T-Zellen wurde eine jeweils zu Kontrollansätzen mit LV-DCs vergleichbare Konzentration des T<sub>H</sub>1-Markerzytokins IFN-γ detektiert (Abbildung 69A). Werden LPS-stimulierte LV-DCs oder IkBa-DCs in der Kokultur eingesetzt, steigt die Menge an IFN-γ in den entsprechenden Kulturüberständen deutlich an (nicht statistisch signifikant für IkBa-DCs). Im Gegensatz dazu befindet sich die Konzentration dieser Zytokine in Ansätzen mit stimulierten MKP1-DCs ungefähr auf dem Niveau wie in Kokulturen mit unstimulierten MKP1-DCs.

Unstimulierte IκBα-DCs induzieren eine zu LV-DCs signifikant reduzierte Sekretion des T<sub>H</sub>2-Markerzytokins IL-5 in kokultivierten T-Zellen (Abbildung 69B). Im Gegensatz dazu ist die durch unstimulierte MKP1-DCs verursachte IL-5 Sekretion gegenüber LV-DCs erheblich, wenn auch nicht signifikant, erhöht. Werden LPS-stimulierte MKP1-DCs als APCs in der syngenen Kokultur eingesetzt, ist die IL-5 Menge im Kulturüberstand signifikant geringer als bei Kokulturen unter Verwendung dieser DC-Population im unstimulierten Zustand. Generell liegt die durch stimulierte IκBα- und MKP1-DCs induzierte IL-5 Produktion in syngenen T-Zellen deutlich, aber nicht statistisch signifikant, niedriger als in Kokulturen mit stimulierten LV-DCs.



**Abbildung 69: Die Überexpression von IκBα oder MKP-1 in BM-DCs resultiert in einem veränderten Zytokinprofil kokultivierter syngener T-Zellen.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV) oder mit den Konstrukten IκBα- oder MKP1-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Bestrahlte, MOG<sub>35-55</sub> Peptid gepulste DCs im unstimulierten und stimulierten Zustand (jeweils  $1,5 \times 10^5$ ) wurden für 4 Tage mit  $4,5 \times 10^5$  MOG<sub>35-55</sub>-reaktiven T-Zellen aus 2D2 Mäusen in einem Volumen von 2 ml kokultiviert. Anschließend wurden die Kulturüberstände geerntet und der Gehalt von (A) IFN-γ, (B) IL-5 und (C) IL-10 mittels ELISA bestimmt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von jeweils 3 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen transgenexprimierenden DCs und LV-DCs in beiden Aktivierungszuständen (+) sowie zwischen stimulierten und unstimulierten DCs (\*) sind angegeben (\*+ p<0,05; \*\*,+ p<0,01).

Die Konzentrationsbestimmungen des ambivalenten T<sub>H</sub>2/Treg-Markerzytokins IL-10 zeigte, dass in Kokulturen mit unstimulierten IκBα-DCs sowie MKP1-DCs und syngenen 2D2 T-Zellen eine wesentlich geringere Menge dieses solublen Mediators auftritt, als in Kontrollansätzen mit unstimulierten LV-DCs (Abbildung 69C). Werden die drei DC-Populationen nach einer Aktivierung mit LPS in syngenen Kokulturen eingesetzt, ist die IL-10 Konzentration in den Kulturüberständen jeweils geringer als bei Verwendung der jeweils entsprechenden unstimulierten APC-Population. Die geringste IL-10 Konzentration wurde in Kulturüberständen mit stimulierten IκBα-DCs gefunden – sie lag signifikant unterhalb derjenigen in Kokulturen mit stimulierten LV-DCs.

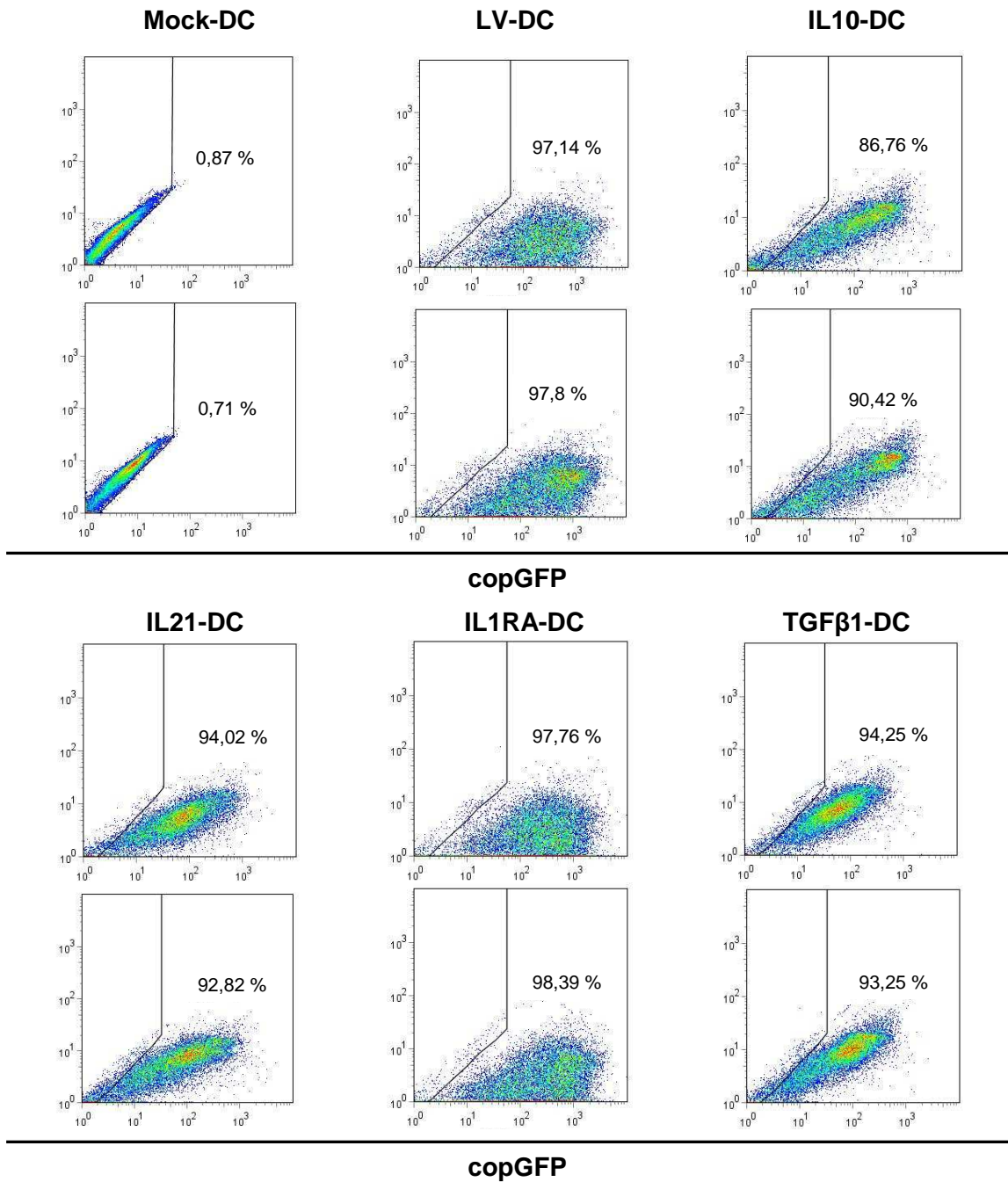
### **3.6 Die Überexpression bestimmter sekretierter Moleküle induziert einen tolerogenen Status in murinen BM-DCs**

Ein elementarer Faktor zur Vermittlung inhibitorischer Signale durch DCs ist die Sekretion solubler Mediatoren. Diese werden in das umgebende Mikromilieu der Zelle sezerniert und können so entweder autokrin, auf die Produzentenzelle selbst, oder parakrin auf andere, in der Nähe befindliche Zellen, wie zum Beispiel T-Zellen oder auch andere DCs wirken. Die Identifizierung potentiell toleranzassoziiertes sekretierter Moleküle erfolgte zunächst, wie in Abschnitt 3.1 beschrieben, durch die phänotypische Analyse von DEX-APCs. Selektiert wurden hierbei der IL-1 Rezeptor-Antagonist IL-1RA, der in LPS-stimulierten DEX-APCs signifikant stärker transkribiert wird als in stimulierten BM-DCs sowie das antiinflammatorische Zytokin IL-10, das im unstimulierten Zustand von DEX-APCs vermehrt exprimiert wird (Abschnitt 3.1, Abbildung 15B). Erweitert wurde diese Auswahl nach intensiven Literaturrecherchen durch das antiinflammatorische Zytokin TGF- $\beta$ 1 und das von DCs nicht exprimierte Zytokin IL-21.

#### **3.6.1 Die Überexpression sekretierter Mediatoren ist in unstimulierten und LPS-stimulierten BM-DCs auf mRNA- und Proteinebene nachweisbar**

Die offenen Leserahmen der ausgewählten Moleküle wurden, wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben, in lentivirale Expressionvektoren kloniert. Anschließend wurden murine BM-DCs an Tag 5 und 6 der Kultur mit den Konstrukten IL10-, IL21-, IL1RA- oder TGF $\beta$ 1-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP lentiviral transduziert. Der Nachweis positiver Transduktanden erfolgte jeweils mittels FACS-Analysen des als Reporter verwendeten copGFP-Proteins. Unabhängig von der Größe und der Sequenz des kodierten Transgens wurde für alle Expressionsvektoren ein effizienter lentiviraler Transfer in murine BM-DCs nachgewiesen (Abbildung 70). In allen Fällen lagen die ermittelten Transduktionseffizienzen im unstimulierten und LPS-stimulierten Zustand zwischen ca. 87 % und 98 %. Diese Werte entsprechen somit dem Niveau, das unter Verwendung des Leervektors pCDH1-MCS1-EF1-copGFP in LV-DCs erreicht wird.

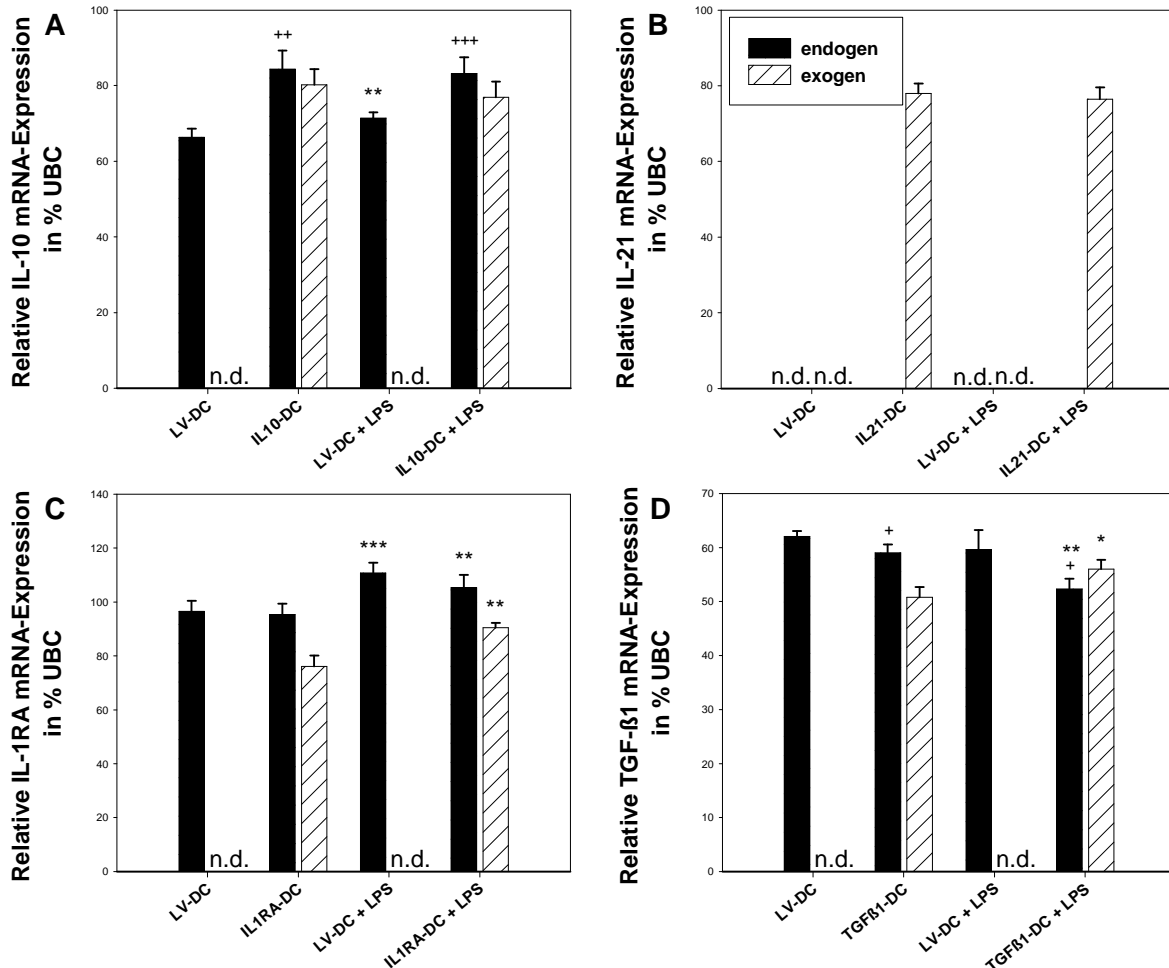




**Abbildung 70: Alle für sekretierte Moleküle kodierenden Expressionsvektoren werden, unabhängig vom Transgen, effizient in BM-DCs transferiert.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder pseudo-transduziert (Mock-DC), mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV-DC) oder mit den Konstrukten IL10- (IL10-DC), IL21- (IL21-DC), IL1RA- (IL1RA-DC) oder TGFβ1-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (TGFβ1-DC) lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. An Tag 9 wurde die Transduktionseffizienz mittels FACS-Analyse des copGFP-Proteins bestimmt. Die Graphiken sind repräsentativ für 3-6 voneinander unabhängige Experimente.

Die Verifizierung der Transgenexpression in entsprechend transduzierten DCs erfolgte zunächst für alle Moleküle auf mRNA-Ebene mit Hilfe quantitativer PCR Analysen (Abbildung 71). Durch die Verwendung verschiedener *antisense* Primer, die entweder in der 3'-untranslatierten Region oder im EF1-Promotorbereich binden, wurde hierbei nicht nur die

exogene, sondern parallel dazu auch die endogene Genexpression bestimmt (vergleiche Abschnitt 3.4.1, Abbildung 47). Auf diese Weise ist eine Aufdeckung eventueller autoregulativer Expressionsmechanismen, die für zahlreiche Gene bekannt sind, möglich.



**Abbildung 71: Die transgenvermittelte exogene Expression von IL-10 und TGF-β1 beeinflusst deren endogenes Expressionsniveau.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV-DC) oder mit den Konstrukten (A) IL10- (IL10-DC), (B) IL21- (IL21-DC), (C) IL1RA- (IL1RA-DC) oder (D) TGFβ1-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (TGFβ1-DC) lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Die relative endo- und exogene mRNA-Expression wurde mit Hilfe der quantitativen *Real-time-PCR* bestimmt und ist als prozentualer Anteil, bezogen auf die Expression des Haushaltsgen Ubiquitin C angegeben. Die Unterscheidung der endo- und exogenen mRNA-Expression erfolgte durch die Verwendung unterschiedlicher *antisense* Primer. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von jeweils 4-5 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen transgenexprimierenden DCs und LV-DCs in beiden Aktivierungszuständen (+) sowie zwischen stimulierten und unstimulierten DCs (\*) sind angegeben (\*+ p<0,05; \*\*,+++ p<0,01; \*\*\*,++++ p<0,001). n.d.: nicht detektiert.

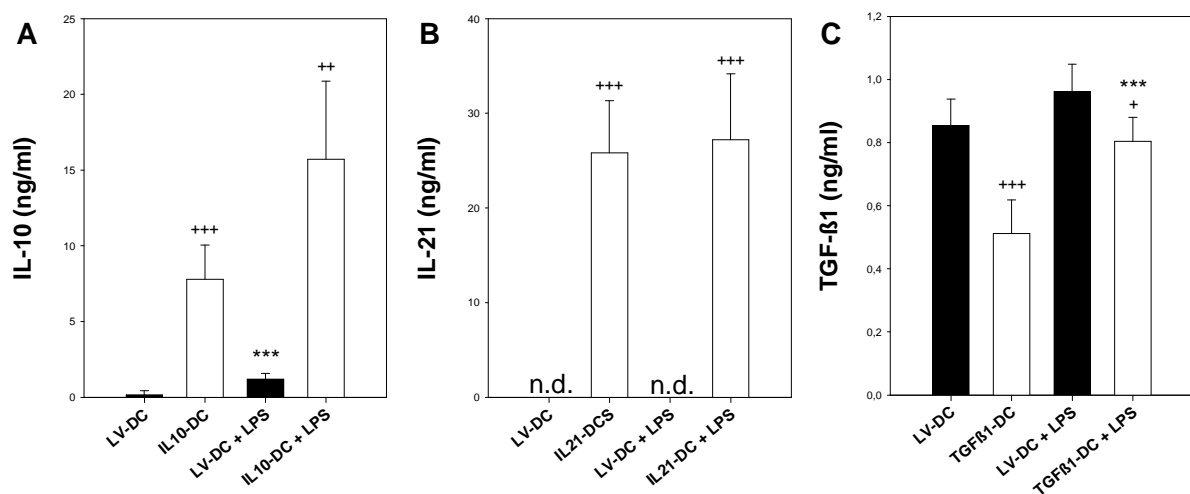
Die Transgene IL-10 (Abbildung 71A) und IL-21 (Abbildung 71B) werden in entsprechend transduzierten BM-DCs im unstimulierten und stimulierten Zustand auf vergleichbarem Niveau exprimiert. Auch die Transgene IL-1RA (Abbildung 71C) und TGF-β1 (Abbildung 71D) werden effizient in DCs transkribiert, wobei in beiden DC-Populationen nach einer

Stimulierung mit LPS eine jeweils signifikant höhere Transgenexpression detektiert wurde, als unter basalen Bedingungen.

Während die Überexpression von IL-1RA keinen Einfluss auf die endogene Genexpression hat, erhöht die transgene Expression von IL-10 im basalen Zustand sowie nach einer Stimulierung mit LPS signifikant dessen endogene mRNA-Menge. Im Gegensatz dazu zeigen unstimulierte und stimulierte TGFβ1-DCs ein signifikant vermindertes endogenes TGF-β1 mRNA-Niveau im Vergleich zu stimulierten LV-DCs. Eine endogene Transkription des Zytokins IL-21 findet, unabhängig vom Aktivierungszustand, in keiner der analysierten DC-Populationen statt.

Zusätzlich wurde in den verschiedenen Transduktanden die dem Transgen entsprechende Gesamt-mRNA-Menge bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den jeweiligen Kapiteln zur Analyse des Genexpressionsprofils entsprechend transduzierter DCs angegeben.

Der Nachweis einer effizienten Transgenexpression erfolgte für die Moleküle IL-10, IL-21 und TGF-β1 auch auf Proteinebene mittels ELISA-Analysen der Kulturüberstände entsprechend transduzierter DC-Populationen (Abbildung 72).



**Abbildung 72: Die Moleküle IL-10 und IL-21 werden infolge einer Überexpression in DCs in stark erhöhten Mengen im Kulturüberstand detektiert.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV-DC) oder mit den Konstrukten (A) IL10- (IL10-DC), (B) IL21- (IL21-DC) oder (C) TGFβ1-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (TGFβ1-DC) lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Anschließend wurden die Kulturüberstände geerntet und der Gehalt von (A) IL-10, (B) IL-21 oder (C) TGF-β1 mittels ELISA bestimmt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von jeweils 3-6 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen transgenexprimierenden DCs und LV-DCs in beiden Aktivierungszuständen (+) sowie zwischen stimulierten und unstimulierten DCs (\*) sind angegeben (\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\*,+++ p<0,001). n.d.: nicht detektiert.

Infolge dieser Validierung der lentiviral vermittelten Überexpression löslicher Mediatoren in DCs zeigte sich, dass die Zytokine IL-10 (Abbildung 72A) und IL-21 (Abbildung 72B) von den

jeweiligen DC-Populationen, im Vergleich zu LV-DCs, in beiden Aktivierungszuständen in signifikant höherer Menge produziert werden. In Übereinstimmung mit der nicht vorhandenen endogenen IL-21 mRNA-Expression in DCs (Abbildung 71B) wurde das Zytokin IL-21 auch nicht im Überstand von LV-DCs detektiert.

Besonders interessant ist die Auswirkung der lentiviral vermittelten Überexpression von TGF- $\beta$ 1 auf die Proteinmenge dieses Zytokins. Während IL10- und IL-21-DCs eine deutlich gesteigerte Produktion des jeweiligen Transgens auf Proteinebene zeigen, ist die TGF- $\beta$ 1 Konzentration im Kulturüberstand unstimulierter sowie LPS-stimulierter TGF $\beta$ 1-DCs signifikant geringer als bei der entsprechenden LV-DC-Population (Abbildung 72C).

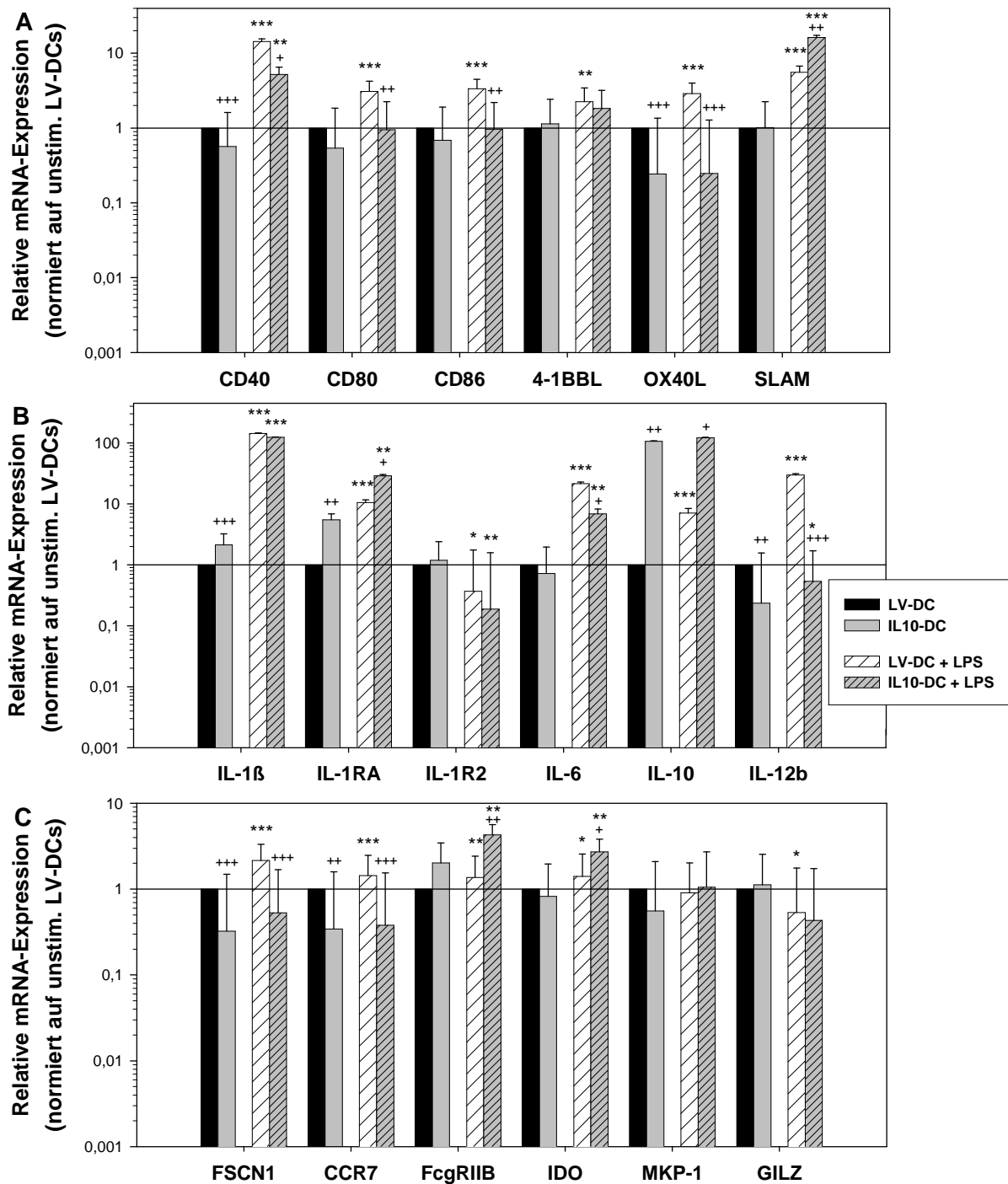
#### **3.6.2 Die Überexpression solubler Moleküle resultiert in einer jeweils spezifischen Modifikation des Genexpressionsprofils von BM-DCs**

Eine spezielle Eigenschaft der im Rahmen dieser Arbeit überexprimierten sekretierten Moleküle IL-10, IL-21, IL-1RA und TGF- $\beta$ 1 ist, dass sie sowohl parakrin auf in der Nähe befindliche Zellen, als auch autokrin, auf die Produzentenzelle selbst, wirken können. Dieser autokrine Effekt ist deshalb möglich, da BM-DCs Rezeptoren für alle vier genannten Proteine besitzen. Eine Bindung an diese Rezeptoren induziert eine jeweils spezifische Signaltransduktion, die in einer individuellen Regulation von Genaktivitäten resultiert. Auf dieser Basis wurde das Expressionsprofil verschiedener immunrelevanter Gene (vergleiche Abschnitt 3.1.5) in transgenexprimierenden DCs und LV-DCs vergleichend evaluiert.

##### **3.6.2.1 Spezifische Modulation des Genexpressionsprofils von IL10-DCs**

Unter basalen Bedingungen sind IL10-DCs, verglichen mit LV-DCs, durch eine signifikant verminderte Transkription der kostimulatorischen Moleküle CD40 und OX40L (Abbildung 73A), des proinflammatorischen Zytokins IL-12b (Abbildung 73B) sowie der Maturierungsmarker FSCN1 und CCR7 (Abbildung 73C) gekennzeichnet. Darüber hinaus weist diese DC-Population eine verstärkte Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  und gleichzeitig auch des IL-1 Antagonisten IL-1RA auf.

Im Gegensatz zu LV-DCs wird in IL10-DCs die Expression der kostimulatorischen Rezeptoren CD80, CD86, 4-1BBL sowie OX40L in Reaktion auf eine Stimulierung mit LPS nicht hochreguliert. Auch die maturierungsassoziierte Aufregulation der Genexpression von FSCN1 und CCR7 findet in IL10-DCs nicht statt.



**Abbildung 73: Die Überexpression von IL-10 resultiert in einer spezifischen Veränderung des Genexpressionsprofils von DCs.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV-DC) oder mit dem Konstrukt IL10-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (IL10-DCs) lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Die relative mRNA-Expression von Genen die für (A) kostimulatorische Moleküle, (B) soluble Mediatoren sowie (C) Maturierungs- und Toleranzmarker kodieren, wurde mit Hilfe der quantitativen *Real-time-PCR* bestimmt. Die interne Normalisierung erfolgte über das Haushaltsgen Ubiquitin C (UBC). Die Daten geben die relative Änderung der Genexpression in den verschiedenen DC-Populationen bezogen auf das Expressionsniveau in unstimulierten LV-DCs an. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von jeweils 3-6 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen IL10-DCs und LV-DCs in beiden Aktivierungszuständen (+) sowie zwischen stimulierten und unstimulierten DCs (\*) sind angegeben (\*, + p<0,05; \*\*, ++ p<0,01; \*\*\*, +++ p<0,001).

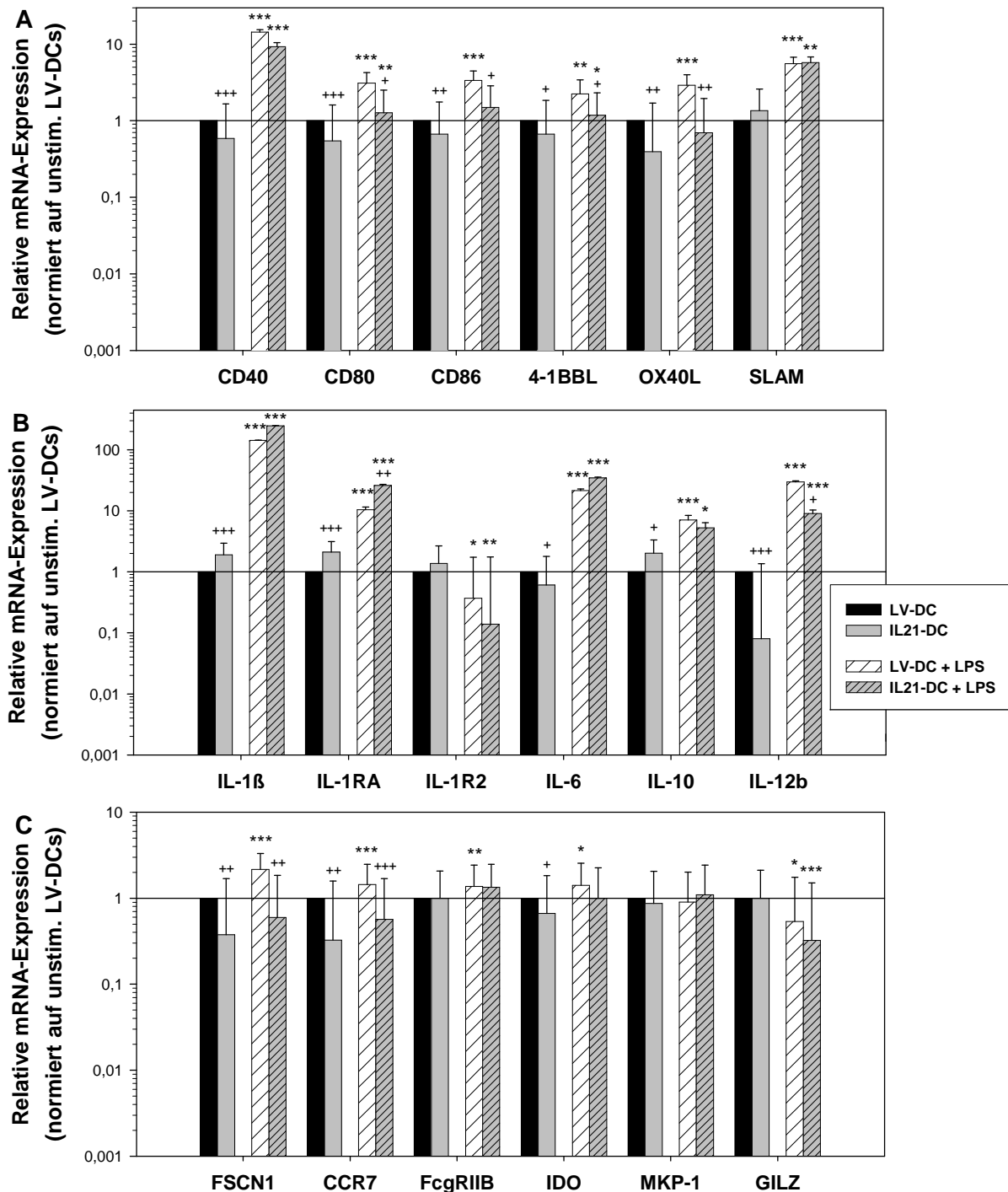
Weiterhin ist in diesen DCs, im Vergleich zu stimulierten LV-DCs, die CD40 und IL-6 mRNA-Expression deutlich weniger stark aufreguliert. Besonders drastisch ist der Einfluss der IL-10 Überexpression in stimulierten DCs auf die IL-12b Transkription - LV-DCs weisen einen 56 x höhere mRNA-Menge dieses Zytokins auf als IL10-DCs. Der Oberflächenrezeptor SLAM, für den sowohl pro- als auch antiinflammatorische Effekte nachgewiesen wurden, wird von LPS-aktivierten IL10-DCs signifikant stärker transkribiert als von der entsprechenden LV-DC-Population. Darüber hinaus sind auch die mRNA-Mengen der Toleranzmarker IL-1RA, FcγRIIB undIDO in dieser transgenexprimierenden DC-Population stark erhöht.

Die Gesamtmenge an IL-10 mRNA ist in transgenexprimierenden DCs gegenüber LV-DCs sowohl unter basalen Bedingungen, als auch nach einer Stimulierung mit LPS stark erhöht (Abbildung 73B). Dieses Ergebnis befindet sich im Einklang mit dem Befund, dass die exogene IL-10 Transkription in unstimulierten und stimulierten DCs zu einer signifikant gesteigerten endogenen Expression führt (Abschnitt 3.6.1, Abbildung 71A), sodass in der Summe deutlich mehr IL-10 mRNA in den entsprechend transduzierten DC-Populationen vorhanden ist als in den jeweiligen Kontroll-Populationen. Auf Proteinebene wurde dieser Effekt ebenfalls bestätigt, da im Kulturüberstand von IL10-DCs in beiden Aktivierungszuständen deutlich höhere IL-10 Konzentrationen nachgewiesen wurden als bei den entsprechenden Kontrollen mit LV-DCs (Abschnitt 3.6.1, Abbildung 72A).

#### **3.6.2.2 Spezifische Modulation des Genexpressionsprofils von IL21-DCs**

Im unstimulierten Zustand reduziert die Überexpression von IL-21 in DCs signifikant die Transkription der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86, CD40, 4-1BBL sowie OX40L (Abbildung 74A) und der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-12b (Abbildung 74B). Weiterhin weisen IL21-DCs, verglichen mit LV-DCs, signifikant verminderte mRNA-Mengen für die Maturierungsmarker FSCN1 und CCR7 auf (Abbildung 74C). Interessanterweise ist auch die mRNA-Expression des Toleranzmarkers IDO in unstimulierten IL21-DCs geringer. Wie bereits zuvor für IL10-DCs gezeigt, ist in IL21-DCs gleichzeitig die Transkription des proinflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  sowie des IL-1 Antagonisten IL-1RA signifikant erhöht. Auch für das antiinflammatorische Zytokin IL-10 wurde in unstimulierten IL21-DCs gegenüber LV-DCs eine transkriptionale Steigerung nachgewiesen.

Im Rahmen einer Stimulierung mit LPS findet in IL21-DCs, im Gegensatz zu LV-DCs, entweder keine (CD86, OX40L) oder lediglich eine eingeschränkte Steigerung (CD80, 4-1BBL) des Expressionsniveaus kostimulatorischer Moleküle statt. Auch die mRNA-Expression des Zytokins IL-12b wird in Folge einer solchen Aktivierung in IL21-DCs nur eingeschränkt hochreguliert.



**Abbildung 74: Die Überexpression von IL-21 resultiert in einer spezifischen Veränderung des Genexpressionsprofils von DCs.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV-DC) oder mit dem Konstrukt IL21-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (IL21-DCs) lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Die relative mRNA-Expression von Genen die für (A) kostimulatorische Moleküle, (B) soluble Mediatoren sowie (C) Maturierungs- und Toleranzmarker kodieren, wurde mit Hilfe der quantitativen *Real-time-PCR* bestimmt. Die interne Normalisierung erfolgte über das Haushaltgen Ubiquitin C (UBC). Die Daten geben die relative Änderung der Genexpression in den verschiedenen DC-Populationen bezogen auf das Expressionsniveau in unstimulierten LV-DCs an. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von jeweils 3-6 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen IL21-DCs und LV-DCs in beiden Aktivierungszuständen (+) sowie zwischen stimulierten und unstimulierten DCs (\*) sind angegeben (\*, + p < 0,05; \*\*, +++ p < 0,01; \*\*\*, \*\*\*\* p < 0,001).

Bemerkenswert ist, dass IL21-DCs nach einer Stimulierung mit LPS vergleichbar geringe Mengen der Maturierungsmarker FSCN1 und CCR7 exprimieren, wie unter basalen Bedingungen. Positiv wirkt sich die Überexpression von IL-21 in stimulierten DCs einzig auf die Expression von IL-1RA aus - entsprechend transduzierte DCs weisen ein signifikant höheres mRNA-Niveau für dieses Protein auf, als stimulierte LV-DCs.

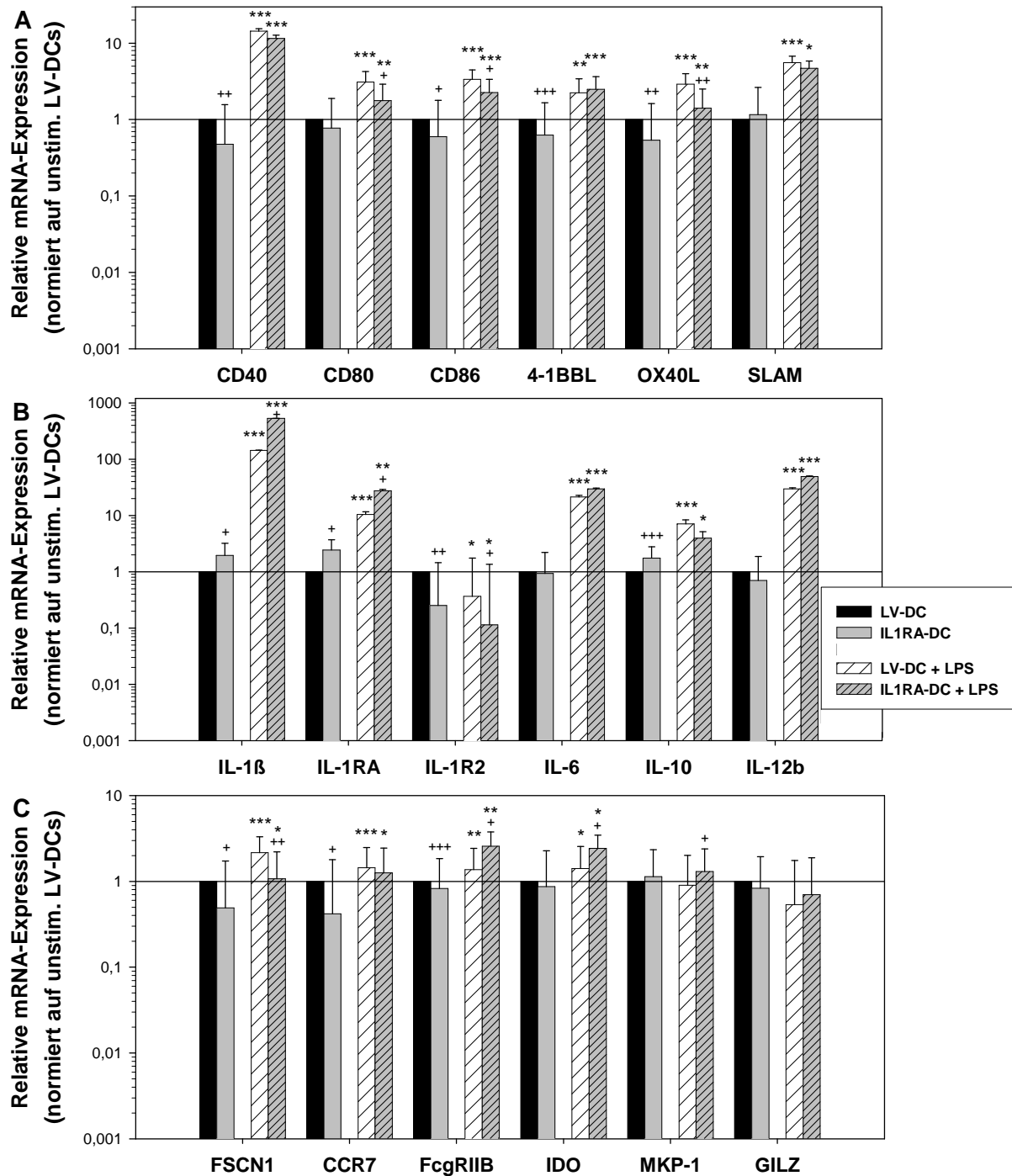
#### **3.6.2.3 Spezifische Modulation des Genexpressionsprofils von IL1RA-DCs**

Hinsichtlich der analysierten kostimulatorischen Rezeptoren sind IL1RA-DCs, verglichen mit LV-DCs, unter basalen Bedingungen durch eine signifikant verminderte Transkription der Moleküle CD86, CD40, 4-1BBL sowie OX40L gekennzeichnet (Abbildung 75A). Darüber hinaus resultiert die forcierte Überexpression von IL-1RA in einer verminderten Expression der Maturierungsmarker FSCN1 und CCR7 (Abbildung 75C) sowie des IL-1-Decoyrezeptors IL-1R2 (Abbildung 75B). Interessanterweise wird auch der inhibitorische Rezeptor FcγRIIB von unstimulierten IL1RA-DCs in geringerem Maße exprimiert, als von der entsprechenden LV-DC-Population. Eine signifikante transkriptionale Erhöhung in dieser transgenexpressierenden DC-Population wurde für das proinflammatorische Zytokin IL-1β sowie für den antiinflammatorischen Mediator IL-10 nachgewiesen.

LPS-stimulierte IL1RA-DCs zeigen im Gegensatz zu stimulierten LV-DCs eine eingeschränkte maturierungsassoziierte Aufregulation der Genexpression für die Moleküle CD80, CD86, OX40L, IL-1R2 sowie den Maturierungsmarker FSCN1. Zusätzlich weisen diese DCs eine im Vergleich zu stimulierten LV-DCs signifikante transkriptionale Erhöhung der toleranzassoziierten Moleküle FcγRIIB,IDO sowie MKP-1 auf. Interessanterweise resultiert die Überexpression von IL-1RA in stimulierten DCs in einem starken Anstieg der Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-1β.

Die Gesamtmenge an IL-1RA mRNA ist sowohl unter basalen Bedingungen, als auch nach einer Stimulierung mit LPS in IL1RA-DCs signifikant höher als in der entsprechenden LV-DC-Population (Abbildung 75B). Dieses Resultat ist konsistent mit dem Befund, dass die exogene IL-1RA Expression in DCs, unabhängig vom Aktivierungszustand, die endogene Genexpression nicht negativ beeinflusst (Abschnitt 3.6.1, Abbildung 71C). Somit ist in der Summe in entsprechend transduzierten DC-Populationen vermutlich mehr IL-1RA mRNA vorhanden, als in der jeweiligen Kontroll-Population.





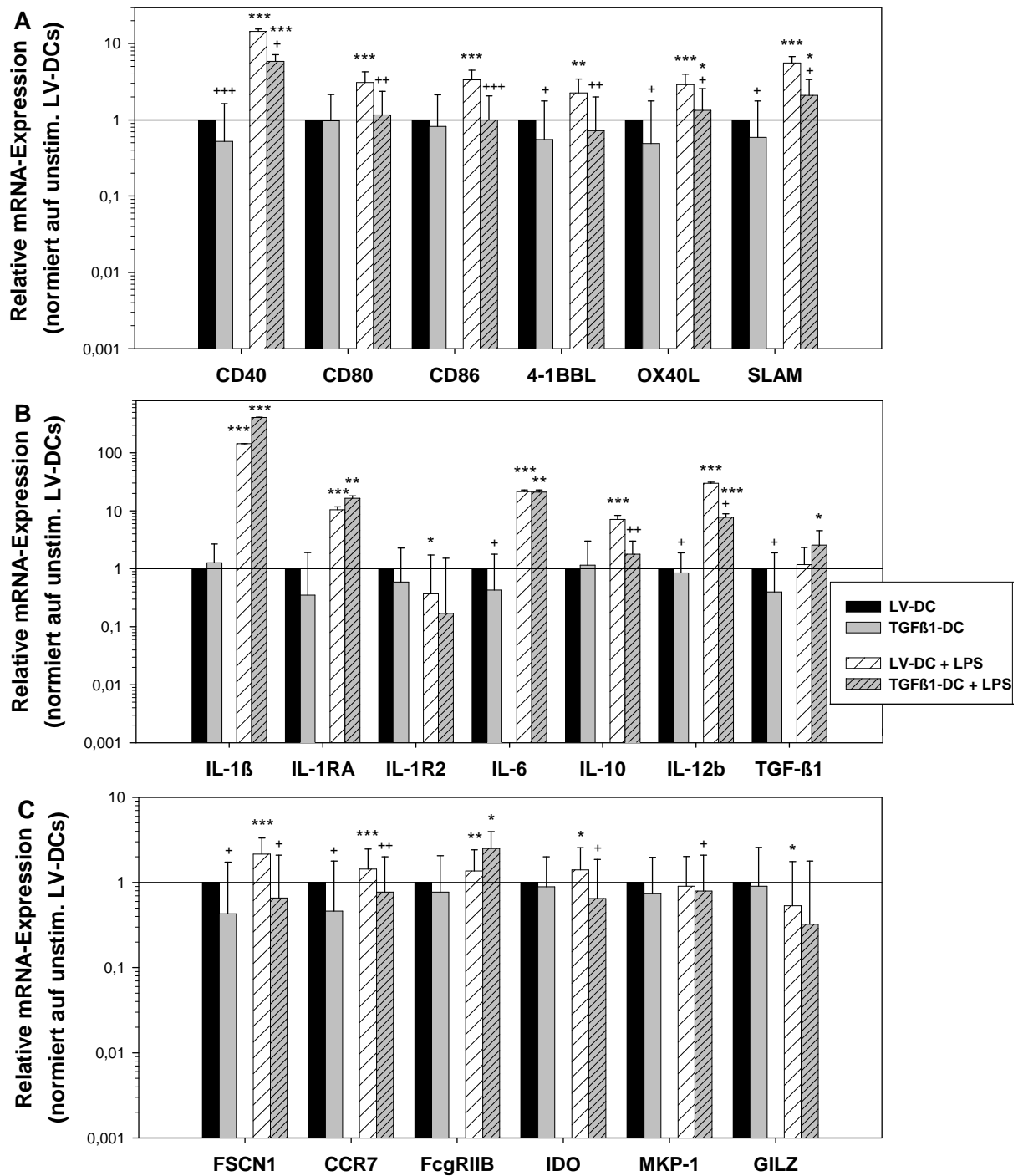
**Abbildung 75: Die Überexpression von IL-1RA resultiert in einer spezifischen Veränderung des Genexpressionsprofils von DCs.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV-DC) oder mit dem Konstrukt IL1RA-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (IL1RA-DCs) lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Die relative mRNA-Expression von Genen die für (A) kostimulatorische Moleküle, (B) soluble Mediatoren sowie (C) Maturierungs- und Toleranzmarker kodieren, wurde mit Hilfe der quantitativen *Real-time-PCR* bestimmt. Die interne Normalisierung erfolgte über das Haushaltsgen Ubiquitin C (UBC). Die Daten geben die relative Änderung der Genexpression in den verschiedenen DC-Populationen bezogen auf das Expressionsniveau in unstimulierten LV-DCs an. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von jeweils 3-6 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen IL1RA-DCs und LV-DCs in beiden Aktivierungszuständen (+) sowie zwischen stimulierten und unstimulierten DCs (\*) sind angegeben (\*, + p<0,05; \*\*, + p<0,01; \*\*\*, + p<0,001).

### **3.6.2.4 Spezifische Modulation des Genexpressionsprofils von TGF $\beta$ 1-DCs**

Unstimulierte TGF $\beta$ 1-DCs weisen im Gegensatz zu LV-DCs signifikant geringere mRNA-Mengen für die kostimulatorischen Rezeptoren CD40, 4-1BBL, OX40L und SLAM (Abbildung 76A) sowie für die proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-12b (Abbildung 76B) auf. In Übereinstimmung mit den drei weiteren im Rahmen dieses Kapitels beschriebenen DC-Populationen, die jeweils einen löslichen Mediator überexprimieren, ist auch in TGF $\beta$ 1-DCs unter basalen Bedingungen die Transkription der Maturierungsmarker FSCN1 und CCR7 signifikant reduziert (Abbildung 76C).

Während in LV-DCs infolge einer Stimulierung mit LPS die Transkription aller analysierten kostimulatorischen Moleküle signifikant ansteigt, findet diese maturierungsassoziierte Hochregulation der Genexpression in TGF $\beta$ 1-DCs entweder gar nicht (CD80, CD86, 4-1BBL), oder nur eingeschränkt (CD40, OX40L, SLAM) statt. Interessanterweise wird auch die Expression des antiinflammatorischen Mediators IL-10 sowie der Maturierungsmarker FSCN1 und CCR7 in Reaktion auf eine LPS-Stimulierung nicht signifikant hochreguliert. Zusätzlich wurden in stimulierten TGF $\beta$ 1-DCs im Vergleich zur entsprechenden LV-DC-Population verminderte mRNA-Mengen für das proinflammatorische Zytokin IL-12b sowie für den Toleranzmarker IDO nachgewiesen.

In unstimulierten TGF $\beta$ 1-DCs ist die Gesamtmenge an TGF- $\beta$ 1 mRNA signifikant geringer als in unstimulierten LV-DCs, was vermutlich auf der reduzierten exogenen TGF- $\beta$ 1 mRNA-Expression in unstimulierten TGF $\beta$ 1-DCs beruht (Abschnitt 3.6.1, Abbildung 71D). Während in der Kontrollpopulation die Transkription dieses Gens bei Ausreifung mit LPS nicht moduliert wird, weisen stimulierte TGF $\beta$ 1-DCs eine signifikant stärkere TGF- $\beta$ 1 Expression auf, als unstimulierte transgenexprimierende DCs. Obwohl sich die exogene TGF- $\beta$ 1 Expression negativ auf die endogene Transkription dieses Moleküls auswirkt in stimulierten TGF $\beta$ 1-DCs, ist die Gesamtmenge an TGF- $\beta$ 1 mRNA in stimulierten TGF $\beta$ 1-DCs höher (nicht statistisch signifikant) als in stimulierten LV-DCs.

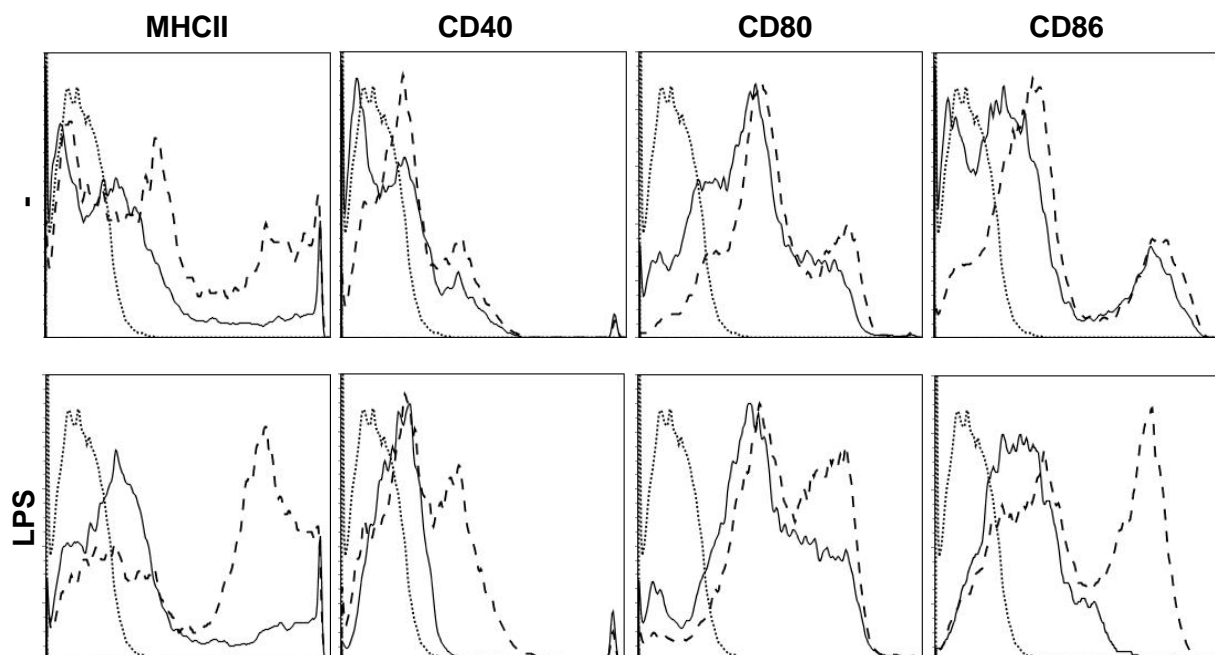


**Abbildung 76: Die Überexpression von TGF-β1 resultiert in einer spezifischen Veränderung des Genexpressionsprofils von DCs.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV-DC) oder mit dem Konstrukt TGFβ1-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (TGFβ1-DCs) lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Die relative mRNA-Expression von Genen die für (A) kostimulatorische Moleküle, (B) soluble Mediatoren sowie (C) Maturierungs- und Toleranzmarker kodieren, wurde mit Hilfe der quantitativen *Real-time-PCR* bestimmt. Die interne Normalisierung erfolgte über das Haushaltgen Ubiquitin C (UBC). Die Daten geben die relative Änderung der Genexpression in den verschiedenen DC-Populationen bezogen auf das Expressionsniveau in unstimulierten LV-DCs an. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von jeweils 3-6 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen TGFβ1-DCs und LV-DCs in beiden Aktivierungszuständen (+) sowie zwischen stimulierten und unstimulierten DCs (\*) sind angegeben (\*<sup>+</sup> p<0,05; \*\*<sup>+</sup> p<0,01; \*\*\*<sup>+</sup> p<0,001).

### 3.6.3 Die Überexpression von IL-10 oder IL-21 reduziert die Menge an MHCII und kostimulatorischen Rezeptoren auf der Oberfläche von BM-DCs

Im Rahmen vergleichender Genexpressionsstudien wurde nachgewiesen, dass die Überexpression von IL-10 oder IL-21 in unstimulierten sowie LPS-stimulierten DCs in einer signifikant verminderten Transkription kostimulatorischer Moleküle resultiert (Abschnitte 3.6.2.1, Abbildung 73A und 3.6.2.2, Abbildung 74A). Eine Validierung dieser Resultate erfolgte auf Ebene der Zelloberflächenexpression verschiedener DC-typischer Maturierungsmarker mittels FACS-Analyse.

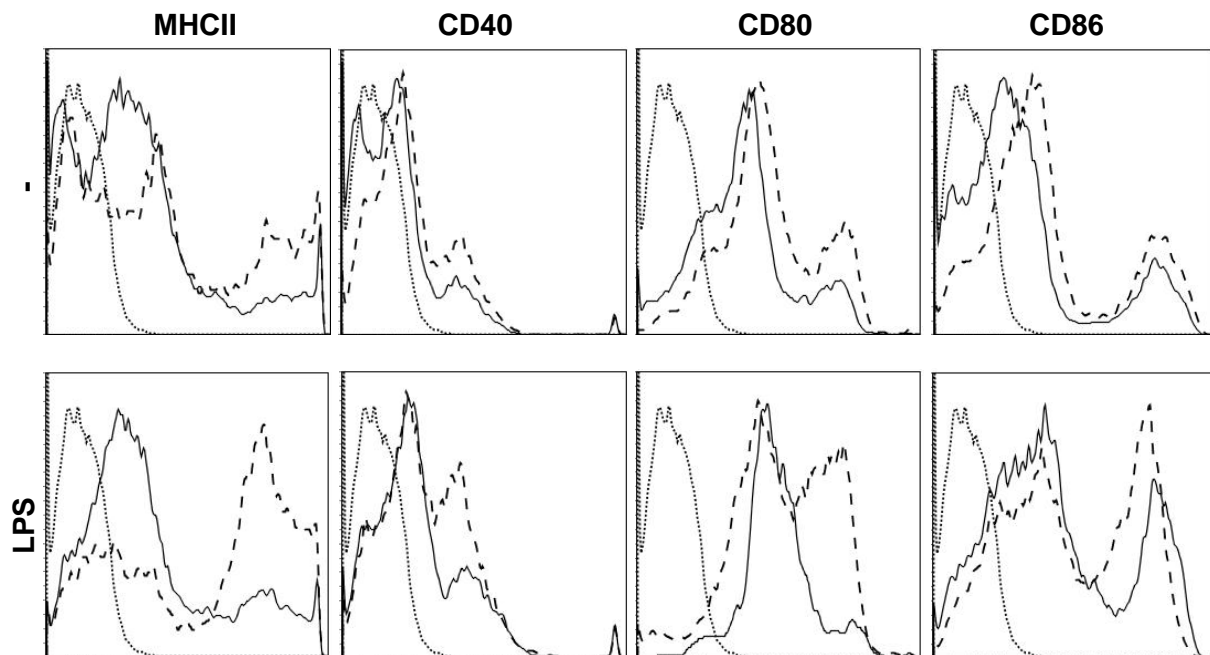
Im unstimulierten Zustand weisen IL10-DCs gegenüber LV-DCs deutlich verminderte Mengen an MHCII, CD40, CD80 sowie CD86 auf ihrer Oberfläche auf (Abbildung 77, obere Reihe).



**Abbildung 77: Die Überexpression von IL-10 reguliert die Expression von MHCII sowie kostimulatorischer Moleküle auf der Oberfläche von DCs negativ.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV-DC) oder mit dem Konstrukt IL10-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (IL10-DC) lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Die verschiedenen DC-Populationen wurden mit spezifischen Antikörpern für MHCII, CD40, CD80 oder CD86 (jeweils PE-gekoppelt) behandelt und mittels FACS analysiert. Die Histogramme repräsentieren die spezifische Antikörper-Bindung auf der Oberfläche von LV-DCs (unterbrochene Linie) und IL10-DCs (durchgezogene Linie). Die Bindung des jeweils entsprechenden Isotyp Kontroll-Antikörpers ist angegeben (dünne, gepunktete Linie). Die Graphiken sind jeweils für 3 voneinander unabhängige Experimente repräsentativ.

Während LV-DCs in Reaktion auf eine Stimulierung mit LPS die Oberflächenexpression aller vier analysierten Markerproteine hochregulieren, weisen IL10-DCs keine entsprechende Veränderung der MHCII, CD40 und CD80 Expression auf (Abbildung 77, untere Reihe). Die Menge an CD86 ist in der transgenexprimierenden DC-Population im Vergleich zum unstimulierten Zustand nur moderat erhöht.

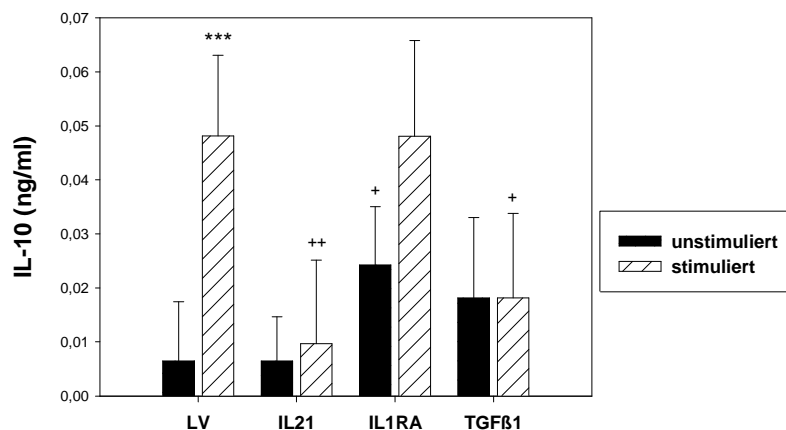
Auf Proteinebene supprimiert die Überexpression von IL-21 die Oberflächenexpression der vier Maturierungsmarker MHCII, CD40, CD80 sowie CD86 in unstimulierten DCs (Abbildung 78, obere Reihe). Im Gegensatz zu LV-DCs regulieren IL21-DCs infolge einer Stimulation mit LPS die Expression der Moleküle MHCII, CD40 sowie CD80 nicht hoch (Abbildung 78, untere Reihe). Interessanterweise ist jedoch die Aufregulation der Oberflächenexpression des kostimulatorischen Rezeptors CD86 bei stimulierten IL21-DCs vergleichbar deutlich wie bei stimulierten LV-DCs. Dieses Phänomen tritt bei einer Überexpression von IL-10 nicht auf.



**Abbildung 78: IL21-DCs weisen unabhängig von ihrem Aktivierungszustand deutlich verminderte Mengen an MHCII und kostimulatorischen Molekülen auf ihrer Oberfläche auf.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV-DC) oder mit dem Konstrukt IL21-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (IL21-DC) lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Die verschiedenen DC-Populationen wurden mit spezifischen Antikörpern für MHCII, CD40, CD80 oder CD86 (jeweils PE-gekoppelt) behandelt und mittels FACS analysiert. Die Histogramme repräsentieren die spezifische Antikörper-Bindung auf der Oberfläche von LV-DCs (unterbrochene Linie) und IL21-DCs (durchgezogene Linie). Die Bindung des jeweils entsprechenden Isotyp Kontroll-Antikörpers ist angegeben (dünne, gepunktete Linie). Die Graphiken sind jeweils für 2 voneinander unabhängige Experimente repräsentativ.

### 3.6.4 Die Überexpression der löslichen Moleküle IL-21 und TGF- $\beta$ 1 inhibiert in stimulierten DCs die Sekretion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10

Einer der am intensivsten studierten und am besten etablierten Faktoren, der an der Regulation von Immunantworten beteiligt ist, ist das antiinflammatorische Zytokin IL-10. Dieses Molekül trägt unter anderem entscheidend zum tolerogenen Status von DCs bei. Im Rahmen vergleichender Genexpressionsstudien wurde nachgewiesen, dass die Überexpression von IL-21 oder IL-1RA in unstimulierten DCs in einer signifikant gesteigerten Transkription dieses Zytokins resultiert (Abschnitte 3.6.2.2, Abbildung 74B und 3.6.2.3, Abbildung 75B). Im Gegensatz dazu weisen LPS-stimulierte TGF $\beta$ 1-DCs eine zu stimulierten LV-DCs deutlich reduzierte IL-10 mRNA-Expression auf (Abschnitt 3.6.2.4, Abbildung 76B). Die Verifizierung dieser Differenzen in der mRNA-Expression auf Proteinebene erfolgte durch die Bestimmung der IL-10 Konzentration im Kulturüberstand von transgenexpmierenden DCs sowie von LV-DCs mittels ELISA-Analysen (Abbildung 79).



**Abbildung 79: Eine Überexpression der Moleküle IL-21, IL-1RA sowie TGF- $\beta$ 1 moduliert die IL-10 Produktion entsprechend transduzierter BM-DCs.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV-DC) oder mit den Konstrukten IL21-, IL1RA-, oder TGF $\beta$ 1-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1  $\mu$ g/ml LPS für 24 h. Anschließend wurden die Kulturüberstände geerntet und der Gehalt von IL-10 mittels ELISA bestimmt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler von jeweils 4 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen transgenexpmierenden DCs und LV-DCs in beiden Aktivierungszuständen (+) sowie zwischen stimulierten und unstimulierten DCs (\*) sind angegeben (\*, + p<0,05; \*\*, \*\*\*, \*\*\*\*, \*\*\*\*\* p<0,01; \*\*\*\*\*, \*\*\*\*\* p<0,001).

Unter basalen Bedingungen weisen IL21-DCs und TGF $\beta$ 1-DCs eine mit unstimulierten LV-DCs vergleichbar moderate IL-10 Produktion auf (Abbildung 79). Im Gegensatz dazu resultiert die Überexpression von IL-1RA in unstimulierten DCs in einer signifikant erhöhten Sekretion dieses antiinflammatorischen Zytokins. Infolge einer Stimulierung mit LPS wird die

IL-10 Produktion von LV-DCs und IL1RA-DCs einheitlich stark hochreguliert. Diese maturierungsassoziierte Steigerung wird durch die Überexpression von IL-21 oder TGF- $\beta$ 1 verhindert - die jeweils entsprechende DC-Population weist eine signifikant geringere IL-10 Konzentration im Kulturüberstand auf, als LPS-stimulierte LV-DCs.

Somit konnten also die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse für unstimulierte IL1RA-DCs sowie unstimulierte und LPS-stimulierte TGF $\beta$ 1-DCs mittels ELISA-Analysen auch auf Proteinebene nachgewiesen werden.

#### **3.6.5 Innerhalb der Gruppe der lentiviral transferierten solublen Mediatoren reduziert die Überexpression von IL-10 oder IL-21 das allogene T-Zell-Stimulierungspotential muriner DCs am effektivsten**

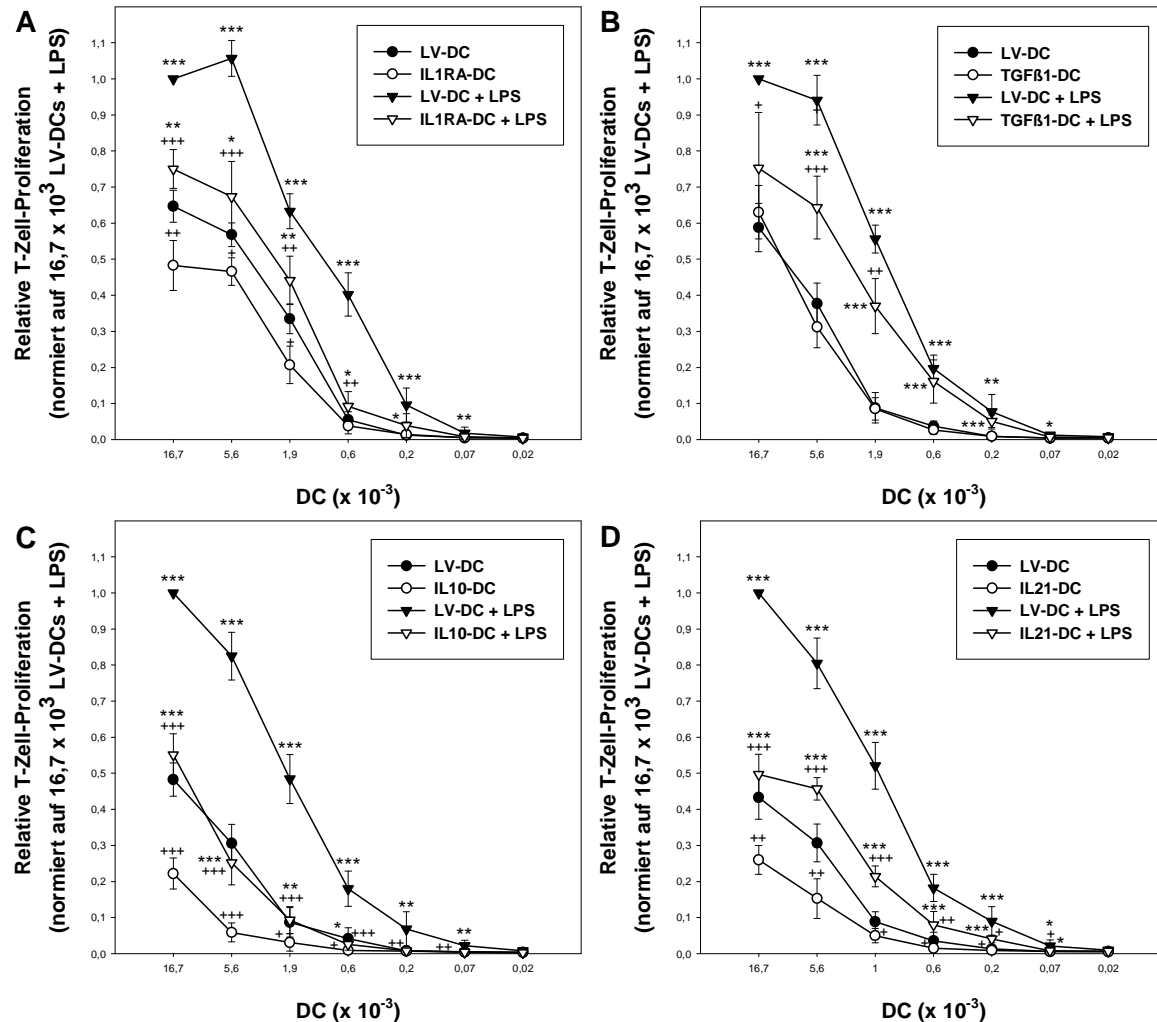
Die phänotypische Analyse transduzierter DC-Populationen zeigte, dass die Überexpression verschiedener solubler Mediatoren in einer jeweils spezifischen Veränderung der Genexpressionssignatur (Abschnitt 3.6.2), der Expression von MHCII und kostimulatorischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche (Abschnitt 3.6.3) und der Sekretion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 (Abschnitt 3.6.4) resultiert. Da sich diese Faktoren gravierend auf die T-Zell-Stimulierungskapazität von DCs auswirken, wurde diese für die verschiedenen transduzierten DC-Populationen im Rahmen allogener DC/T-Zell-Kokulturen bestimmt.

Während TGF $\beta$ 1-DCs (Abbildung 80B) unter basalen Bedingungen eine mit LV-DCs vergleichbare Induktion der allogenen T-Zell-Proliferation aufweisen, inhibiert die Überexpression von IL-10 (Abbildung 80C), IL-21 (Abbildung 80D) oder IL-1RA (Abbildung 80A) signifikant das T-Zell-Aktivierungspotential unstimulierter DCs. Die Effizienz der Inhibition nimmt hierbei in genannter Reihenfolge ab.

In Reaktion auf eine Stimulierung mit LPS steigt die allogene T-Zell-Aktivierungskapazität aller analysierten DC-Populationen gegenüber dem unstimulierten Zustand signifikant an. Ein direkter Vergleich mit stimulierten LV-DCs zeigt jedoch, dass die durch die verschiedenen transgenexprimierenden DC-Populationen induzierten T-Zell-Proliferationen jeweils signifikant reduziert sind. Interessanterweise vermitteln stimulierte IL10-DCs eine zu unstimulierten LV-DCs kongruente moderate T-Zell-Proliferation. Auch das allogene Aktivierungspotential stimulierter IL21-DCs liegt tendenziell im Bereich unstimulierter Kontroll-DCs. Demgegenüber ist die Überexpression von IL-1RA sowie TGF- $\beta$ 1 weniger potent in Bezug auf eine Reduktion der allogenen T-Zell-Stimulierungskapazität LPS-

### 3 Ergebnisse

stimulierter DCs. Zusammenfassend zeigten die Analysen demzufolge, dass von den vier analysierten löslichen Mediatoren die Überexpression von IL-10 oder IL-21 am effektivsten das allogene primäre T-Zell-Aktivierungspotential unstimulierter sowie LPS-stimulierter DCs reduziert.



**Abbildung 80: Innerhalb der Gruppe der getesteten sekretierten Moleküle reduziert die Überexpression von IL-10 das allogene T-Zell-Aktivierungspotential von BM-DCs am effektivsten.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV-DC) oder mit den Konstrukten (A) IL1RA- (IL1RA-DC), (B) TGFβ1- (TGFβ1-DC), (C) IL10- (IL10-DC) oder (D) IL21-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (IL21-DC) lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Die verschiedenen DC-Populationen wurden bestrahlt, in Triplikaten seriell verdünnt und mit jeweils  $3 \times 10^5$  T-Zellen aus BALB/c Mäusen für 4 Tage kokultiviert. Die T-Zell-Proliferation wurde anhand der Aufnahme von [3H]-Thymidin während der letzten 16 h der Kultur gemessen. Die Daten geben die relative T-Zell Proliferation (bezogen auf die durch  $16,7 \times 10^3$  LV-DCs + LPS induzierte Proliferation) an, berechnet als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler von acht (C), sieben (A,D) und fünf (B) voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils in Triplikatansetzten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen transgenexpressierenden DCs und LV-DCs in beiden Aktivierungszuständen (+) sowie zwischen stimulierten und unstimulierten DCs (\*) sind angegeben (\*,+ p<0,05; \*\*,+ p<0,01; \*\*\*,+ p<0,001).



### **3.6.6 Die Überexpression löslicher Mediatoren in DCs führt zu spezifischen Modulationen des Zytokinprofils allogener T-Zellen**

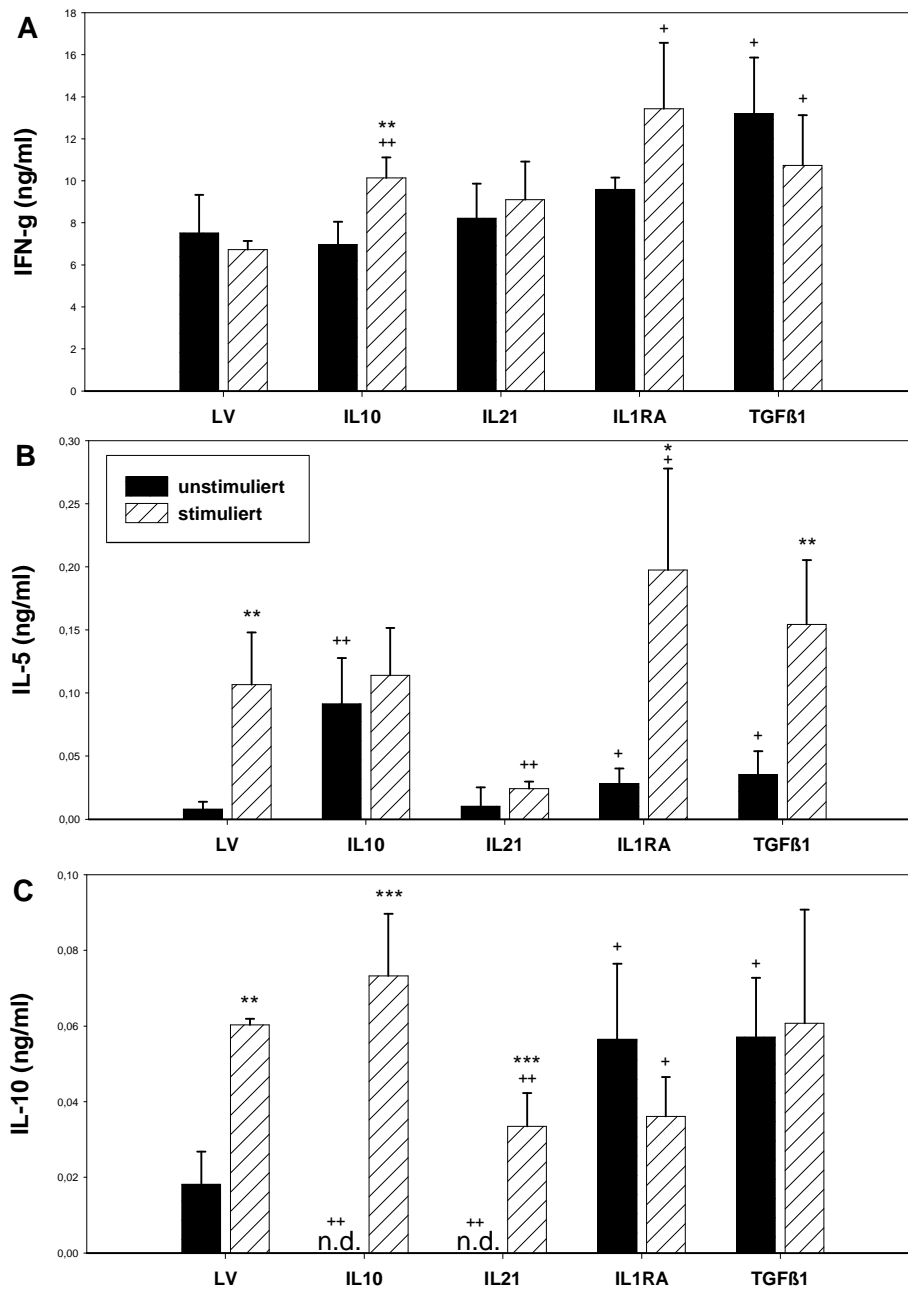
Die funktionelle Veränderung von DCs durch die Überexpression löslicher Faktoren beinhaltet unter Umständen nicht nur eine Veränderung der T-Zell-Aktivierungskapazität, sondern auch ihrer T-Zell-polarisierenden Eigenschaften. Da die Zytokinantwort von T-Zellen einer der entscheidenden Prozesse zur Regulation immunologischer Reaktionen ist, wurde der Einfluss transgenexprimierender DCs auf das Zytokinprofil allogener BALB/c T-Zellen im Rahmen von DC/T-Zell Kokulturen mittels ELISA-Analysen der Kulturüberstände bestimmt.

In Kokulturen mit unstimulierten IL10-DCs, IL21-DCs oder IL1RA-DCs und allogener BALB/c T-Zellen wurden jeweils vergleichbare Konzentrationen des  $T_H1$ -Markerzytokins IFN- $\gamma$  detektiert wie in Kontrollansätzen mit unstimulierten LV-DCs (Abbildung 81A). Eine Ausnahme bilden unstimulierte TGF $\beta$ 1-DCs; in den entsprechenden Kulturüberständen wurden signifikant erhöhte Mengen dieses Zytokins nachgewiesen. Die Stimulierung von LV-DCs mit LPS resultiert in keiner zusätzlichen Modulation der IFN- $\gamma$  Produktion in den Ansätzen mit allogeneren T-Zellen. Werden stimulierte IL10-, IL1RA- oder TGF $\beta$ 1-DCs als APCs in einer Kokultur eingesetzt, ist die detektierte IFN- $\gamma$  Konzentration im Kulturüberstand signifikant höher, als bei Verwendung stimulierter LV-DCs. Darüber hinaus wurde für stimulierte IL10-DCs ein maturierungsassoziierter, statistisch signifikanter Anstieg in der IFN- $\gamma$  Menge innerhalb der entsprechenden Kokulturen mit allogeneren T-Zellen nachgewiesen.

Während LV-DCs sowie IL21-DCs unter basalen Bedingungen lediglich eine geringfügige Produktion des  $T_H2$ -Markerzytokins IL-5 vermitteln, induzieren IL1RA-DCs, TGF $\beta$ 1-DCs und vor allem IL10-DCs eine signifikant gesteigerte Sekretion dieses Zytokins in kokultivierten allogeneren T-Zellen (Abbildung 81B). In Reaktion auf eine Aktivierung mit LPS vermitteln LV-DCs, IL1RA-DCs sowie TGF $\beta$ 1-DCs im Vergleich zum unstimulierten Zustand eine verstärkte IL-5 Antwort, wobei die Konzentrationen in Kokulturen mit stimulierten IL1RA-DCs signifikant höher sind als bei Verwendung stimulierter LV-DCs als APCs. In DC/T-Zell-Kokulturen mit stimulierten IL10-DCs wurde ein derartiger maturierungsassoziierter Anstieg der IL-5 Konzentration nicht nachgewiesen, hier liegt die Menge in Ansätzen mit unstimulierten sowie stimulierten DCs auf einem vergleichbaren Niveau. Einzig die Kokultivierung mit stimulierten IL-21-DCs resultiert in einer signifikanten Reduktion der IL-5 Sekretion kokultivierter allogener T-Zellen.

Interessanterweise wurde in Kokulturen mit unstimulierten IL10- oder IL21-DCs und BALB/c T-Zellen im Gegensatz zu Kontrollansätzen mit LV-DCs keine Produktion des  $T_H2$ /Treg-Markerzytokins IL-10 detektiert (Abbildung 81C). Demgegenüber ist die Konzentration dieses Zytokins infolge einer Kokultivierung mit unstimulierten IL1RA- oder TGF $\beta$ 1-DCs signifikant höher als bei Verwendung unstimulierter LV-DCs als APCs. Eine maturierungsassozierte

Steigerung der IL-10 Produktion, wie sie in Ansätzen mit LV-DCs auftritt, wurde in Kokulturen mit IL1RA-DCs sowie TGF $\beta$ 1-DCs nicht detektiert.

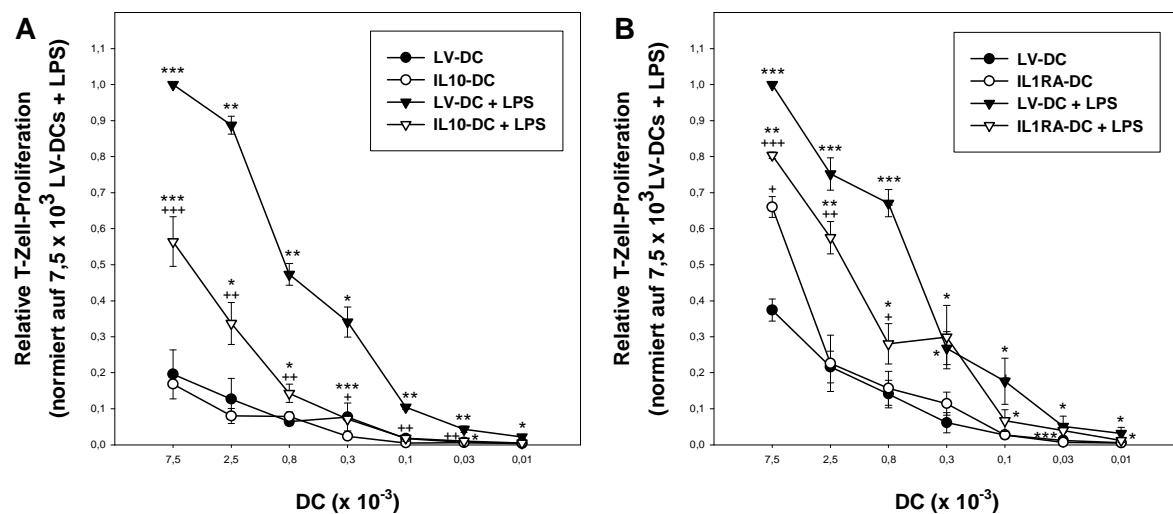


**Abbildung 81: Die Überexpression von sekretierten Molekülen in BM-DCs resultiert in einer transgenabhängig veränderten Modifikation der Zytokinantworten kokultivierter allogener T-Zellen.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV-DC) oder mit den Konstrukten IL10-, IL21-, IL1RA-, oder TGF $\beta$ 1-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1  $\mu$ g/ml LPS für 24 h. Bestrahlte DCs im unstimulierten und stimulierten Zustand (jeweils  $1,67 \times 10^5$ ) wurden für 4 Tage mit  $3 \times 10^6$  T-Zellen aus BALB/c Mäusen in einem Volumen von 2 ml kokultiviert. Anschließend wurden die Kulturüberstände geerntet und der Gehalt von (A) IFN- $\gamma$ , (B) IL-5 und (C) IL-10 mittels ELISA bestimmt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler von jeweils 3-6 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen transgenexprimierenden DCs und LV-DCs in beiden Aktivierungszuständen (+) sowie zwischen stimulierten und unstimulierten DCs (\*) sind angegeben (\*: + p<0,05; \*\*:+ p<0,01; \*\*\*: + p<0,001).

Weiterhin zeigte sich, dass in Ansätzen mit stimulierten IL1RA-DCs oder IL21-DCs eine gegenüber den entsprechenden LV-DC-Kontrollansätzen signifikant reduzierte IL-10 Produktion stattfindet.

### 3.6.7 Die Überexpression von IL10 oder IL-1RA resultiert in einem signifikant reduzierten syngenen T-Zell-Aktivierungspotential LPS-stimulierter DCs

Wie bereits vorhergehend beschrieben, wurde für einige DC-Populationen neben der allogenen auch die syngene T-Zell-Stimulierungskapazität *in vitro* getestet. Nachdem nachgewiesen wurde, dass die Überexpression von IL-10, IL-21 sowie IL-1RA in einer effektiven Reduktion des allogenen T-Zell-Aktivierungspotentials unstimulierter und LPS-stimulierter DCs resultiert (Abschnitt 3.6.6), wurden die entsprechenden DC-Populationen nach Beladen mit MOG<sub>35-55</sub> Peptid im Rahmen syngener Kokulturen mit MOG<sub>35-55</sub>-reaktiven 2D2 T-Zellen eingesetzt (Abbildung 82, Abbildung 83).

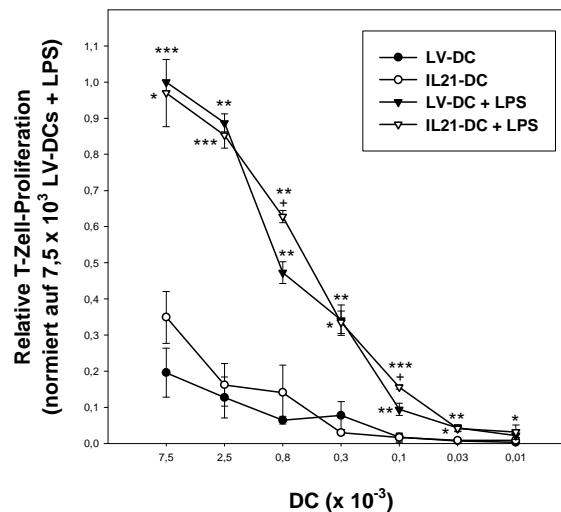


**Abbildung 82: Die Überexpression von IL-10 oder IL-1RA vermindert die syngene T-Zell-Aktivierungskapazität LPS-stimulierter BM-DCs.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV-DC) oder mit den Konstrukten (A) IL10- (IL10-DC) oder (B) IL1RA-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (IL1RA-DCs) lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Die verschiedenen bestrahlten, MOG<sub>35-55</sub> Peptid gepulsten DC-Populationen wurden in Triplikaten seriell verdünnt und mit jeweils  $4,5 \times 10^4$  MOG<sub>35-55</sub>-reaktiven 2D2 T-Zellen für 4 Tage kokultiviert. Die T-Zell-Proliferation wurde anhand der Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Thymidin während der letzten 16 h der Kultur gemessen. Die Daten geben die relative T-Zell Proliferation (bezogen auf die durch  $7,5 \times 10^3$  LV-DCs + LPS induzierte Proliferation) an, berechnet als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler von jeweils 4 voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils in Triplikatanalysen durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen transgenexprimierenden DCs und LV-DCs in beiden Aktivierungszuständen (+) sowie zwischen stimulierten und unstimulierten DCs (\*) sind angegeben (\*, + p<0,05; \*\*, + p<0,01; \*\*\*, + p<0,001).

Anders als im allogenen System induzieren unstimulierte IL10-DCs (Abbildung 82A) und IL21-DCs (Abbildung 83) eine mit unstimulierten LV-DCs vergleichbar moderate Proliferation syngener 2D2 T-Zellen. Unstimulierte IL1RA-DCs (Abbildung 82B) weisen im ersten DC/T-Zell Verhältnis sogar ein gegenüber LV-DCs signifikant erhöhtes Aktivierungspotential auf.

Im Rahmen einer Stimulierung mit LPS steigt das 2D2 T-Zell-Aktivierungspotential von LV-DCs sowie von IL10- und IL1RA-DCs in allen DC/T-Zell-Verhältnissen signifikant an. In einem direkten Vergleich mit stimulierten LV-DCs zeigt sich jedoch, dass vor allem die durch stimulierte IL10-DCs, aber auch die durch stimulierte IL1RA-DCs induzierte T-Zell-Proliferation (hier in den ersten drei DC/T-Zell-Verhältnissen) signifikant unterhalb der durch LPS-stimulierte LV-DCs vermittelten liegt.

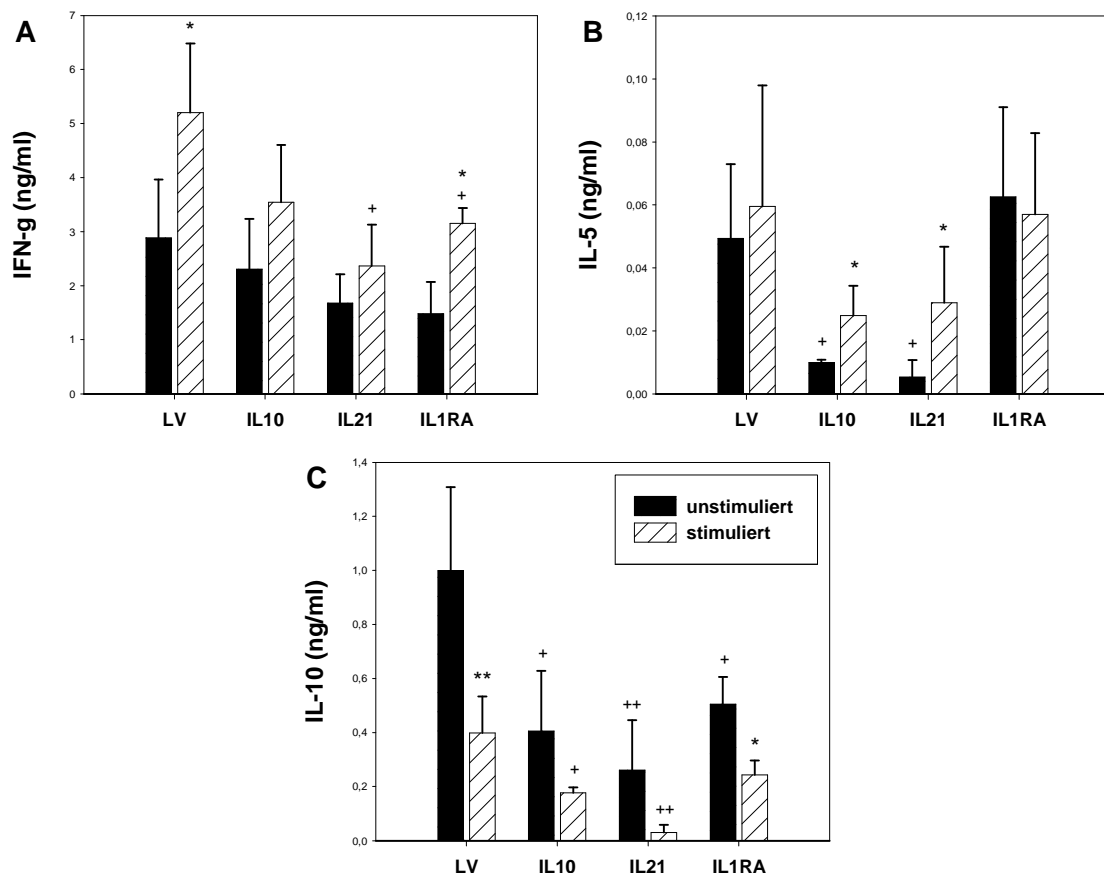
Besonders bemerkenswert ist die syngene T-Zell-Aktivierungskapazität stimulierter IL21-DCs – sie ist nahezu deckungsgleich mit der stimulierten LV-DCs. Anders ausgedrückt scheint die Überexpression von IL-21, anders als im allogenen System, keinen Einfluss auf das syngene Aktivierungspotential unstimulierter sowie LPS-stimulierter BM-DCs zu haben.



**Abbildung 83: Die Überexpression von IL-21 hat keinen Einfluss auf das syngenes T-Zell-Stimulierungspotential von BM-DCs.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV-DC) oder mit dem Konstrukt IL21-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (IL21-DCs) lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Die verschiedenen bestrahlten, MOG<sub>35-55</sub> Peptid gepulsten DC-Populationen wurden in Triplikaten seriell verdünnt und mit jeweils  $4,5 \times 10^4$  MOG<sub>35-55</sub>-reaktiven 2D2 T-Zellen für 4 Tage kokultiviert. Die T-Zell-Proliferation wurde anhand der Aufnahme von [3H]-Thymidin während der letzten 16 h der Kultur gemessen. Die Daten geben die relative T-Zell Proliferation (bezogen auf die durch  $7,5 \times 10^3$  LV-DCs + LPS induzierte Proliferation), berechnet als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler von 4 voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils in Triplikatsansätzen durchgeführt wurden, an. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen IL21-DCs und LV-DCs in beiden Aktivierungszuständen (+) sowie zwischen stimulierten und unstimulierten DCs (\*) sind angegeben (\*<sup>+</sup> p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001).

### 3.6.8 IL10-DCs, IL21-DCs sowie IL1RA-DCs modulieren die Zytokinantwort kokultivierter syngener 2D2 T-Zellen in unterschiedlicher Weise

Da sich die Überexpression solubler Mediatoren, wie bereits zuvor erwähnt, sowohl auf den Phänotyp als auch auf die APC-Funktion von DCs auswirkt, wurde das durch IL10-DCs, IL21-DCs oder IL1RA-DCs in syngenen 2D2 T-Zellen induzierte Zytokinprofil mittels ELISA validiert (Abbildung 84).



**Abbildung 84: Die Überexpression von IL-10, IL-21 oder IL-1RA in BM-DCs moduliert die Zytokinantwort kokultivierter syngener T-Zellen.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV) oder mit den Konstrukten IL10-, IL21-, oder IL1RA-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1  $\mu$ g/ml LPS für 24 h. Bestrahlte, MOG<sub>35-55</sub> Peptid gepulste DCs im unstimulierten und stimulierten Zustand (jeweils  $1,5 \times 10^5$ ) wurden für 4 Tage mit  $4,5 \times 10^5$  MOG<sub>35-55</sub>-reaktiven T-Zellen aus 2D2 Mäusen in einem Volumen von 2 ml kokultiviert. Anschließend wurden die Kulturüberstände geerntet und der Gehalt von (A) IFN- $\gamma$ , (B) IL-5 und (C) IL-10 mittels ELISA bestimmt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler von 3 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen transgenexpromierenden DCs und LV-DCs in beiden Aktivierungszuständen (+) sowie zwischen stimulierten und unstimulierten DCs (\*) sind angegeben (\*\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,01$ ).

In Kokulturen mit den verschiedenen unstimulierten transgenexprimierenden DC-Populationen und syngenen 2D2 T-Zellen wurde eine jeweils vergleichbare Produktion des  $T_H1$ -Markerzytokins IFN- $\gamma$  detektiert wie in Kontrollansätzen mit LV-DCs (Abbildung 84A). Nach einer Stimulierung der APCs mit LPS steigt die Konzentration dieses Zytokins lediglich in Kokulturen mit LV-DCs und IL1RA-DCs signifikant an. Insgesamt ist die IFN- $\gamma$  Konzentration in Kokulturen mit stimulierten IL21-DCs oder IL1RA-DCs signifikant geringer als bei Verwendung LPS-stimulierter LV-DCs als APCs.

Sowohl IL21-DCs, als auch IL10-DCs rufen im unstimulierten Zustand eine im Vergleich zu unstimulierten LV-DCs stark reduzierte Produktion des  $T_H2$ -Markerzytokins IL-5 hervor (Abbildung 84B). Während eine Stimulation mit LPS die durch LV-DCs induzierte IL-5 Antwort im Vergleich zum unstimulierten Zustand nicht weiter moduliert, induzieren stimulierte IL10- und IL21-DCs eine signifikant stärker Sekretion dieses Zytokins in kokultivierten T-Zellen als unter basalen Bedingungen.

Eine Kokultivierung der drei analysierten transgenexprimierenden DC-Populationen unter basalen Bedingungen mit syngenen T-Zellen resultiert in einer signifikant geringeren Produktion des ambivalenten  $T_H2$ /Treg-Markerzytokins IL-10 als in Kontrollansätzen mit unstimulierten LV-DCs (Abbildung 84C). Infolge einer Aktivierung von LV-DCs sowie IL1RA-DCs mit LPS ist die IL-10 Menge in den entsprechenden Kokulturen signifikant vermindert im Vergleich zu Ansätzen mit der jeweiligen APC-Population im unstimulierten Zustand. Dies gilt nicht für stimulierte IL10- und IL21-DCs, wobei jedoch die IL-10 Konzentrationen in Kokulturen mit diesen beiden APC-Populationen jeweils signifikant unterhalb derer in Kokulturen mit LPS stimulierten LV-DCs liegen.

#### **3.6.9 Die Überexpression von IL-21 in DCs resultiert nicht in einer Induktion von IL-17 sekretierenden $CD4^+$ T-Zellen**

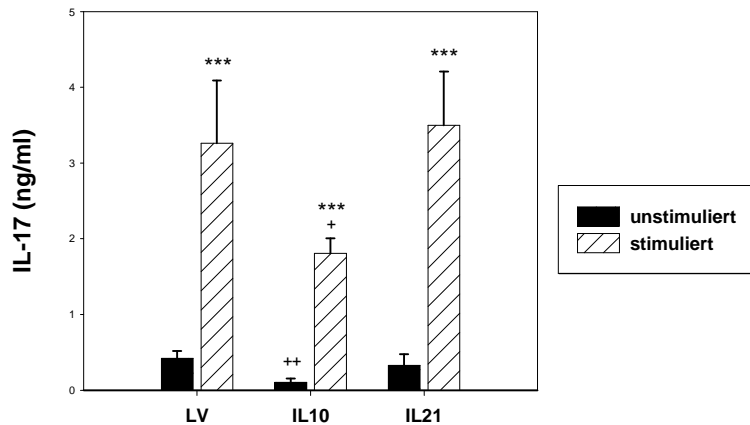
Wie bereits einleitend in dieser Arbeit erwähnt, vermittelt das Zytokin IL-21, vor allem in Kombination mit TGF- $\beta$ 1,  $T_H17$  polarisierende Effekte. Auf Grund dieser speziellen IL-21 Eigenschaft wurde die Menge an IL-17 in allogenen Kokulturen von IL21-DCs oder IL10-DCs als weitere Kontrolle und BALB/c T-Zellen mittels ELISA bestimmt.

Unstimulierte IL21-DCs induzieren eine vergleichbar moderate IL-17 Sekretion in kokultivierten allogenen BALB/c T-Zellen wie unstimulierte LV-DCs (Abbildung 85). Im Gegensatz dazu ist die durch unstimulierte IL10-DCs vermittelte IL-17 Antwort im Vergleich zur entsprechenden LV-DC-Population signifikant reduziert.

Werden LV-DCs oder IL21-DCs nach einer Stimulierung mit LPS als APCs verwendet, steigt die IL-17 Konzentration jeweils signifikant an und befindet sich in beiden Ansätzen auf einem

ähnlich hohem Niveau. Auch in Kokulturen mit stimulierten IL10-DCs steigt die IL17 Konzentration gegenüber Ansätzen mit unstimulierten IL10-DCs signifikant an, wobei sich die Gesamtmenge dieses Zytokins deutlich unterhalb des Niveaus in Kokulturen mit LPS-stimulierten LV-DCs befindet.

Anhand der Bestimmung der IL-17 Konzentration im Überstand von DC/T-Zell-Kokulturen mittels ELISA konnte somit nachgewiesen werden, dass die Überexpression von IL-21 in DCs nicht in einer gesteigerten Induktion von T<sub>H</sub>17-Zellen resultiert.



**Abbildung 85: IL21-DCs induzieren keine gesteigerte Sekretion des T<sub>H</sub>17-Markerzytokins IL-17 in kokultivierten allogenen T-Zellen.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV) oder mit den Konstrukten IL10- oder IL21-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP lentiviral transduziert. Die Ausreifung der Zellen erfolgte an Tag 8 mit 1 µg/ml LPS für 24 h. Bestrahlte DCs im unstimulierten und stimulierten Zustand (jeweils  $1,67 \times 10^5$ ) wurden für 4 Tage mit  $3 \times 10^6$  T-Zellen aus BALB/c Mäusen in einem Volumen von 2 ml kokultiviert. Anschließend wurden die Kulturüberstände geerntet und der Gehalt von IL-17 mittels ELISA bestimmt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler von jeweils 3-6 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen transgenexprimierenden DCs und LV-DCs in beiden Aktivierungszuständen (+) sowie zwischen stimulierten und unstimulierten DCs (\*) sind angegeben (+ p<0,05; ++ p<0,01; \*\*\* p<0,001).

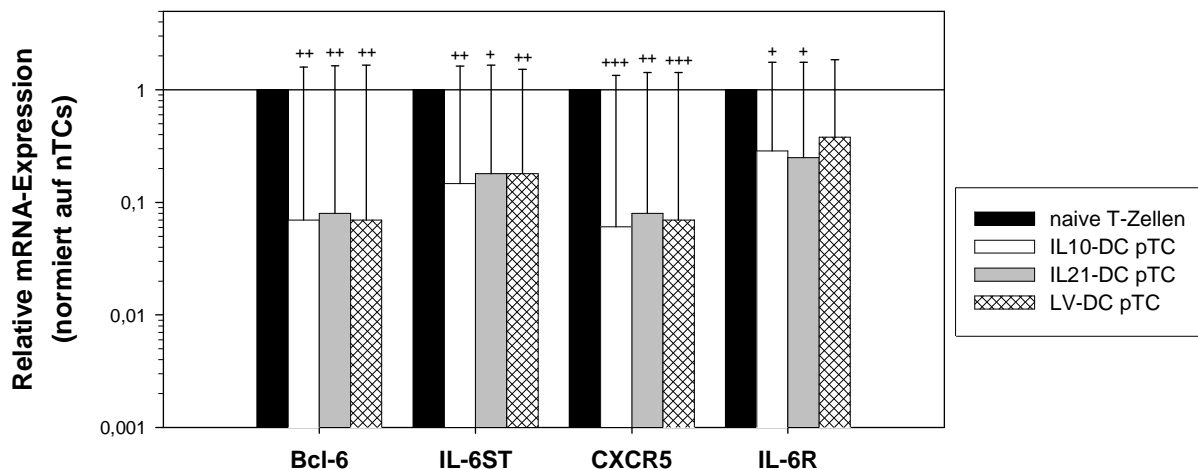
### 3.6.10 Die Überexpression von IL-21 in DCs resultiert nicht in einer Induktion folliculärer T-Helferzellen

Eine der zahlreichen Eigenschaften des Zytokins IL-21 ist seine essentielle Beteiligung an der Induktion von CD4<sup>+</sup> T<sub>FH</sub>-Zellen. Da die Möglichkeit besteht, dass IL21-DCs diese T<sub>FH</sub>-Zellen spezifisch induzieren, wurde das Genexpressionsprofil charakteristischer T<sub>FH</sub>-Zell-Marker in durch unstimulierte IL21-DCs vorstimulierten allogenen BALB/c T-Zellen analysiert. Zwei der wesentlichen transkriptionalen Eigenschaften von T<sub>FH</sub>-Zellen ist die selektive Expression des Transkriptionsfaktors Bcl-6<sup>333,590</sup>, der als sequenzspezischer Repressor der Genexpression<sup>591</sup> des TFs STAT3<sup>592</sup> und der NF-κB1 p105/p50 Untereinheit<sup>593</sup> fungiert, sowie des Chemokinrezeptors CXCR5<sup>594</sup>. Darüber hinaus zeigte sich im Rahmen von

Microarray-Analysen, dass  $T_{FH}$ -Zellen hohe mRNA-Mengen für die Moleküle IL-6R (*receptor*) sowie IL-6ST (*signal transducer*) aufweisen<sup>333</sup>. Beide Moleküle zusammen bilden den Zelloberflächen-Rezeptorkomplex, der für die Integration von Signalen essentiell ist, die durch das Zytokin IL-6 vermittelt werden<sup>595</sup>.

Alle T-Zell-Populationen, die durch unstimulierte transduzierte DCs (LV-, IL10-, IL21-DCs) vorstimuliert wurden, exprimieren die vier analysierten  $T_{FH}$ -Marker auf jeweils ähnlichem Niveau (Abbildung 86). Im Vergleich zu naiven T-Zellen ist die Transkription der Gene Bcl-6, IL6ST, CXCR5 sowie IL6R in allen pTC-Populationen signifikant reduziert. Eine Ausnahme bildet hierbei lediglich die Expression von IL6R in durch unstimulierte IL21-DCs vorstimulierten T-Zellen – die Reduktion ist verglichen mit naiven T-Zellen nicht statistisch signifikant.

Anhand der durchgeführten Genexpressionsanalysen konnte somit nachgewiesen werden, dass die Überexpression von IL-21 in DCs nicht in einer Induktion von  $T_{FH}$ -Zellen resultiert.



**Abbildung 86: IL21-DCs induzieren keine gesteigerte Genexpression folliculärer T-Helferzell ( $T_{FH}$ ) -Marker in kokultivierten allogenen T-Zellen.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV-DC) oder mit den Konstrukten IL10- (IL10-DC) oder IL21-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (IL21-DC) lentiviral transduziert. Bestrahlte Zellen ( $3,3 \times 10^5$ ) wurden für 3 Tage mit  $6 \times 10^6$  T-Zellen aus BALB/c Mäusen in 6-Loch-Platten in einem Volumen von 4 ml kultiviert. Anschließend wurden die APCs mit Hilfe immunmagnetischer anti-MHCII-gekoppelter Dynabeads aus der Kokultur entfernt und die vorstimulierten T-Zellen wurden für 4 Tage in Anwesenheit von 0,5 U IL-2/ml kultiviert. Die relative mRNA-Expression von Genen, die für  $T_{FH}$ -Marker kodieren, wurde mit Hilfe der *Real-time-PCR* bestimmt. Die interne Normalisierung erfolgte über das Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Die Daten geben die relative Änderung der Genexpression in der jeweiligen vorstimulierten T-Zell-Population an, bezogen auf das Expressionsniveau in naiven T-Zellen (nTCs). Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler von jeweils 3 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen vorstimulierten T-Zellen und nTCs sind angegeben (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).



### **3.6.11 Unstimulierte LV-DCs, IL10-DCs sowie IL21-DCs induzieren Tregs mit einem anergen Status und suppressiven Eigenschaften**

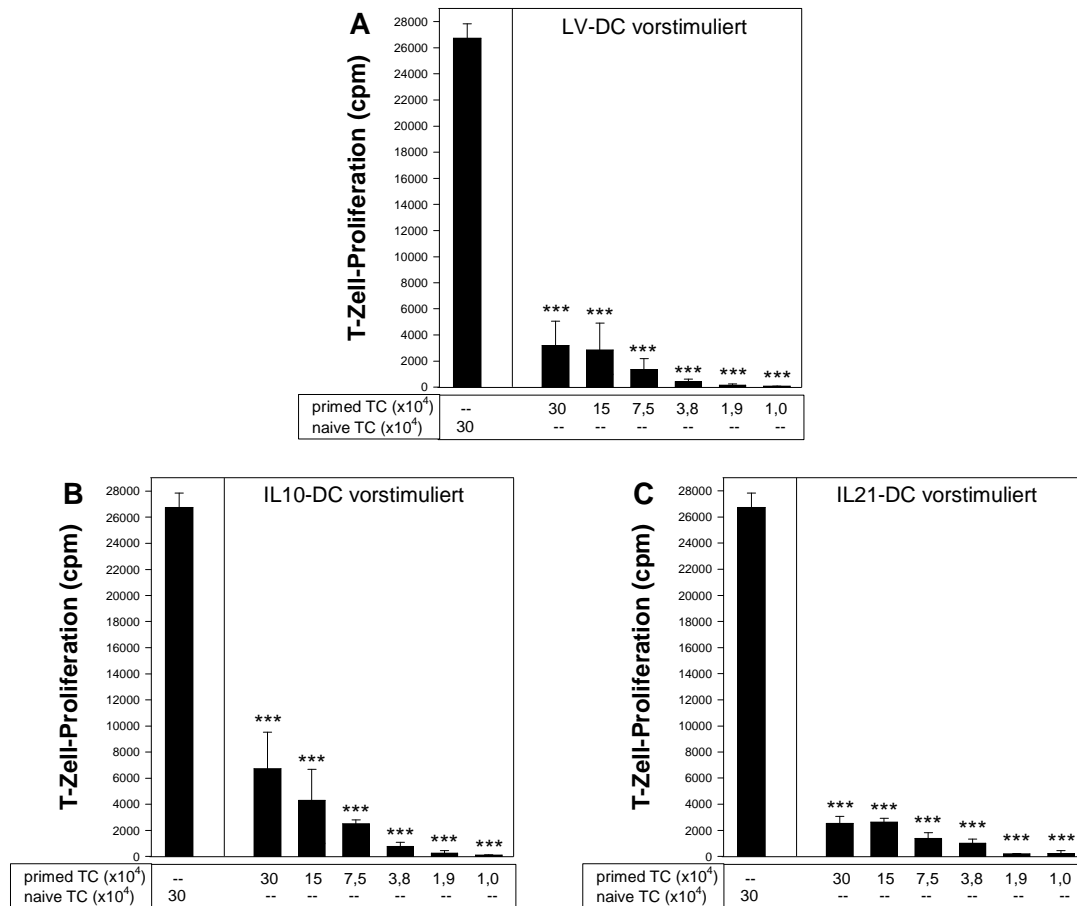
Wie bereits zuvor beschrieben, weisen IL10-DCs und IL21-DCs einen protolerogenen Phänotyp auf (Abschnitte 3.6.2, 3.6.3) und sind jeweils durch eine signifikant reduzierte allogene T-Zell-Aktivierungskapazität gekennzeichnet (Abschnitt 3.6.5). Auf Grund dieser Eigenschaften könnten die transgenexprimierenden DC-Populationen, ähnlich wie bereits im Rahmen dieser Arbeit für unstimulierte BM-DCs und DEX-APCs in beiden Aktivierungszuständen gezeigt wurde, das Potential haben, Tregs zu induzieren.

Zunächst wurde in Form von Restimulierungsansätzen getestet, inwieweit die durch die verschiedenen DC-Populationen induzierte Hypoproliferation allogener T-Zellen auf eine Induktion von T-Zell-Anergie zurückzuführen ist. Für diese Analyse wurden die in einer primären MLR mit LV-DCs, IL10-DCs oder IL21-DCs für 3 Tage vorstimulierten BALB/c T-Zellen nach einer Ruhephase mit allogenen C57BL/6-Milzzellen restimuliert.

T-Zellen, die aus einer primären Kokultur mit LV-DCs (Abbildung 87A), IL10-DCs (Abbildung 87B) oder IL21-DCs (Abbildung 87C) zurückgewonnen wurden, zeigen jeweils im Vergleich zu stimulierten naiven BALB/c T-Zellen eine signifikant verminderte proliferative Antwort nach einer Restimulation mit C57BL/6 Milzzellen. Interessanterweise zeigt ein direkter Vergleich der drei parallel durchgeführten Restimulierungsassays, dass durch IL10-DCs vorstimulierte T-Zellen nach einer Restimulation am stärksten proliferieren (bezogen auf das erste APC/pTC-Verhältnis).

Insgesamt wurde im Rahmen der durchgeführten Restimulierungsexperimente somit nachgewiesen, dass alle drei transduzierten unstimulierten DC-Populationen das Potential haben, einen anergen Status in kokultivierten allogenen T-Zellen zu induzieren, wobei die Anergie-induzierende Kapazität von IL10-DCs und IL21-DCs nicht stärker ausgeprägt ist als die von LV-DCs.

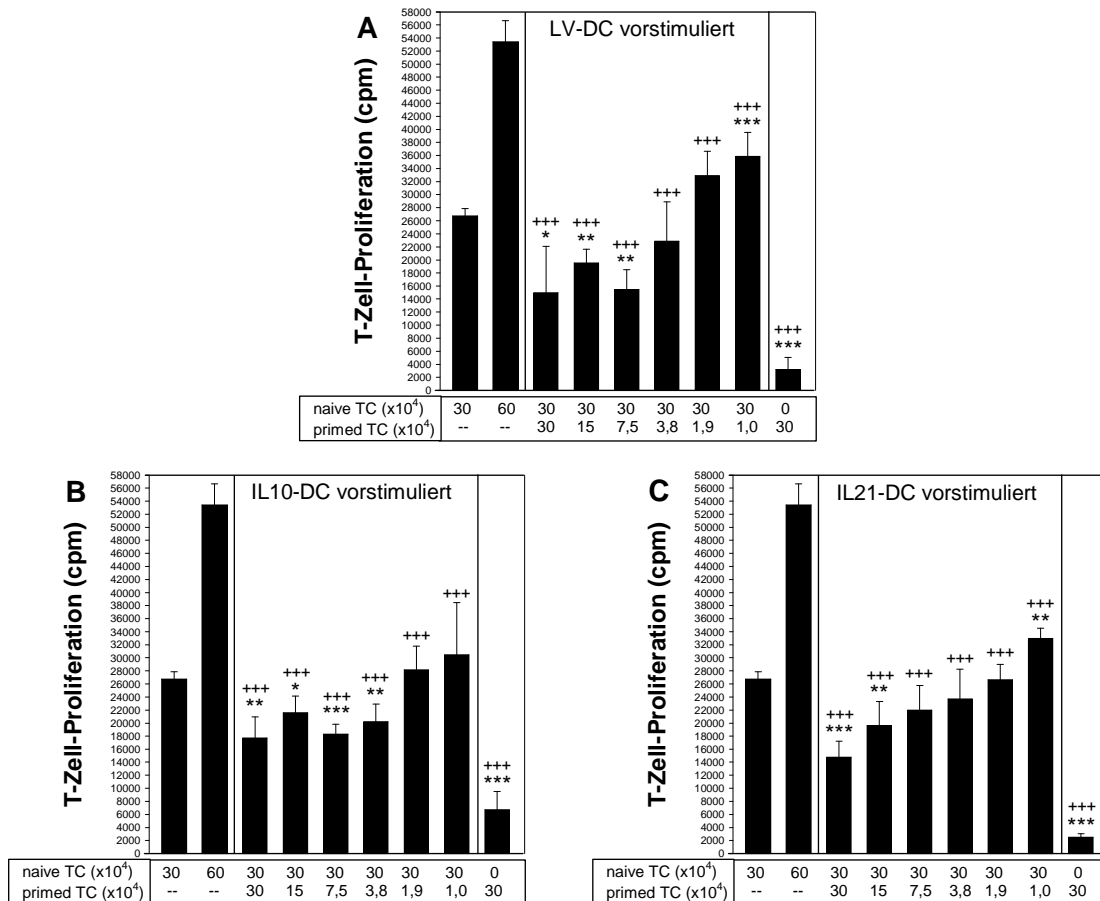
Neben der Anergie, die als eine der Schlüsseleigenschaften regulatorischer T-Zellen gilt<sup>97</sup>, ist eine weitere Eigenschaft von Tregs ihre suppressive Aktivität. Aus diesem Grund wurden im Folgenden die suppressiven Fähigkeiten der unterschiedlich vorstimulierten T-Zell-Populationen im Rahmen von Suppressionsassays untersucht. Für diese Analysen wurden die durch verschiedene APC-Populationen vorstimulierten T-Zellen mit frisch isolierten naiven T-Zellen in Anwesenheit allogener Milzzellen als APCs kokultiviert und die Proliferationsrate der T-Zellen bestimmt.



**Abbildung 87: LV-DCs, IL10-DCs sowie IL21-DCs induzieren einen anergen Status in kokultivierten allogenen T-Zellen.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV-DC) oder mit den Konstrukten IL10-(IL10-DC) oder IL21-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (IL21-DC) lentiviral transduziert. Bestrahlte Zellen ( $3,3 \times 10^5$ ) wurden für 3 Tage mit  $6 \times 10^6$  T-Zellen aus BALB/c Mäusen in 6-Loch-Platten in einem Volumen von 4 ml kultiviert. Anschließend wurden die APCs mit Hilfe immunmagnetischer anti-MHCII-gekoppelter Dynabeads aus der Kokultur entfernt und die vorstimulierten T-Zellen wurden für 4 Tage in Anwesenheit von 0,5 U IL-2/ml kultiviert. Durch (A) unstimulierte LV-DCs, (B) unstimulierte IL10-DCs und (C) unstimulierte IL21-DCs vorstimulierte T-Zellen wurden anschließend in Triplikaten seriell verdünnt und mit jeweils  $3 \times 10^5$  bestrahlten C57BL/6 Milzzellen für 6 Tage restimuliert. Als Kontrolle wurden  $3 \times 10^5$  naive BALB/c T-Zellen mit  $3 \times 10^5$  bestrahlten C57BL/6 Milzzellen kokultiviert. Die T-Zell-Proliferation wurde anhand der Aufnahme von  $[3H]$ -Thymidin während der letzten 16 h der Kultur gemessen. Die Daten repräsentieren den Mittelwert der Triplikatsätze  $\pm$  Standardfehler und sind für jeweils 3 Experimente repräsentativ. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen vorstimulierten und  $3 \times 10^5$  naiven T-Zellen sind angegeben (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

Im Rahmen dieser Kokultur-Experimente zeigte sich, dass durch LV-DCs (Abbildung 88A), durch IL10-DCs (Abbildung 88B) sowie durch IL21-DCs (Abbildung 88C) vorstimulierte T-Zellen das Potential haben, die Proliferation naiver T-Zellen Dosis-abhängig zu inhibieren. Die verschiedenen transduzierten DC-Populationen sind jedoch unterschiedlich potent bezüglich ihrer Vermittlung suppressiver Eigenschaften. Am potentesten scheinen IL10-DCs zu sein, da entsprechend vorstimulierte T-Zellen die Proliferation naiver T-Zellen in den ersten vier nTC/pTC-Verhältnissen signifikant gegenüber  $3 \times 10^5$  naiven T-Zellen allein sowie gegenüber  $6 \times 10^5$  naiven T-Zellen, die als Zelldichte-Kontrolle fungieren, inhibieren. Durch

LV-DCs vorstimulierte T-Zellen supprimieren die Proliferation naiver T-Zellen etwas weniger effektiv – sie liegt nur in den ersten drei nTC/pTC-Verhältnissen signifikant unterhalb derer von  $3 \times 10^5$  naiven T-Zellen. Die am wenigsten potente Inhibition der naiven T-Zell-Proliferation wurde in Suppressionsansätzen mit durch IL21-DCs vorstimulierten T-Zellen erreicht. Hier wurde nur in den ersten beiden nTC/pTC-Verhältnissen eine im Vergleich zu  $3 \times 10^5$  naiven T-Zellen signifikant verminderte T-Zell-Proliferation nachgewiesen.



**Abbildung 88: Durch LV-DCs, IL10-DCs oder IL21-DCs vorstimulierte T-Zellen inhibieren Dosisabhängig die Proliferation stimulierter naiver T-Zellen.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV-DC) oder mit den Konstrukten IL10- (IL10-DC) oder IL21-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (IL21-DC) lentiviral transduziert. Bestrahlte Zellen ( $3,3 \times 10^5$ ) wurden für 3 Tage mit  $6 \times 10^6$  T-Zellen aus BALB/c Mäusen in 6-Loch-Platten in einem Volumen von 4 ml kultiviert. Anschließend wurden die APCs mit Hilfe immunmagnetischer anti-MHCII-gekoppelter Dynabeads aus der Kokultur entfernt und die vorstimulierten T-Zellen wurden für 4 Tage in Anwesenheit von 0,5 U IL-2/ml kultiviert. Durch (A) unstimulierte LV-DCs, (B) unstimulierte IL10-DCs und (C) unstimulierte IL21-DCs vorstimulierte T-Zellen wurden anschließend in Triplikaten seriell verdünnt und mit jeweils  $3 \times 10^5$  bestrahlten C57BL/6 Milzzellen und  $3 \times 10^5$  naiven BALB/c T-Zellen für 6 Tage restimuliert. Als Kontrolle wurden  $3 \times 10^5$  bzw.  $6 \times 10^5$  (Zelldichte-Kontrolle) naive BALB/c T-Zellen mit  $3 \times 10^5$  bestrahlten C57BL/6 Milzzellen kokultiviert. Die T-Zell-Proliferation wurde anhand der Aufnahme von  $[^3\text{H}]$ -Thymidin während der letzten 16 h der Kultur gemessen. Die Daten repräsentieren den Mittelwert der Triplikatansätze  $\pm$  Standardfehler und sind für jeweils 3 Experimente repräsentativ. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen vorstimulierten und  $3 \times 10^5$  (\*) bzw.  $6 \times 10^5$  (+) naiven T-Zellen sind angegeben (\*, \*\*  $p < 0,05$ ; \*\*, \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*, \*\*  $p < 0,001$ ).

Insgesamt zeigen die Suppressionsassay deutlich, dass sowohl LV-DCs als auch IL10- und IL21-DCs *in vitro* die Kapazität haben, im Rahmen allogener Kokulturen Tregs mit suppressiven Eigenschaften zu induzieren.

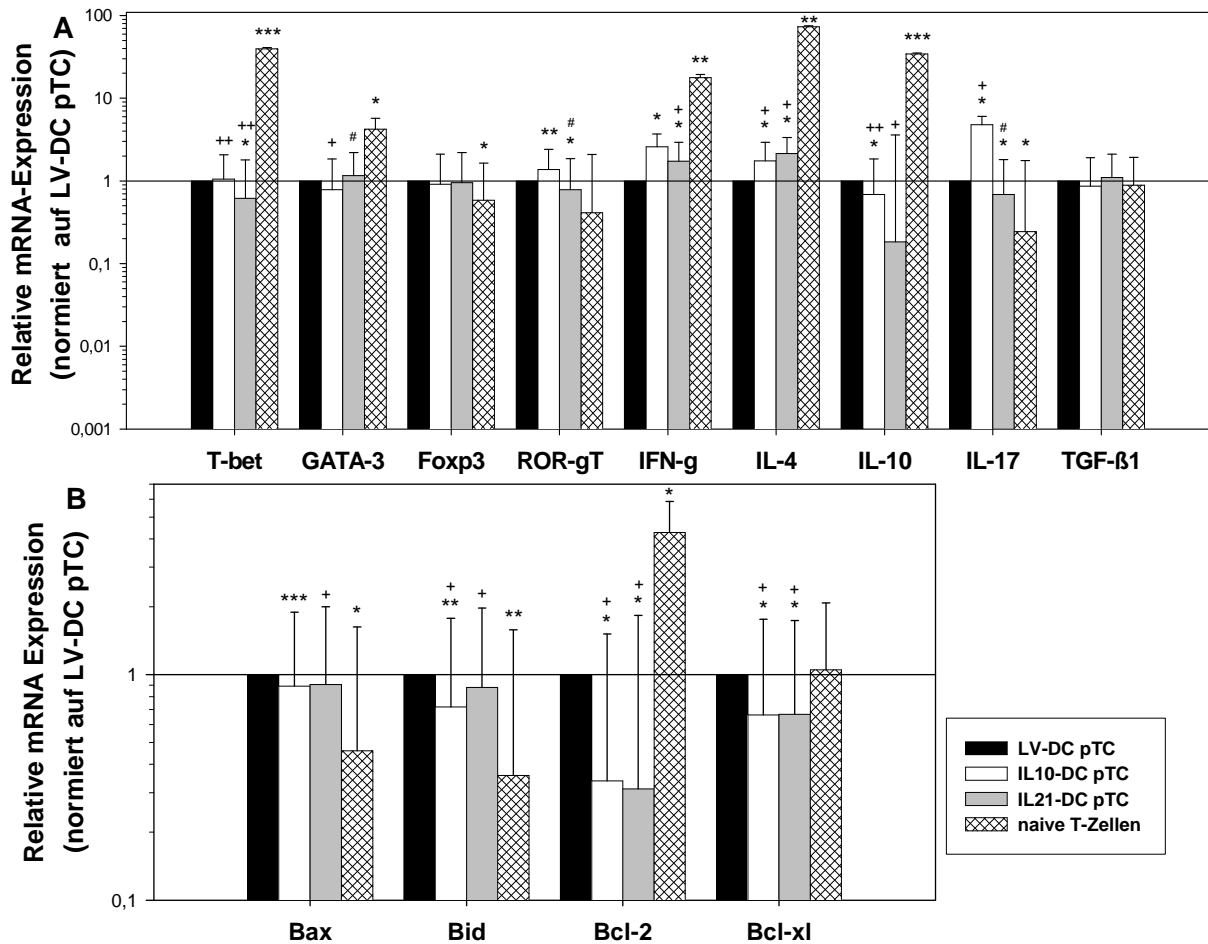
#### **3.6.12 Unstimulierte LV-DCs, IL10-DCs sowie IL21-DCs induzieren Tregs mit jeweils spezifischen Genexpressionsprofilen**

Differentiell polarisierte T-Helfer-Effektorzellen ( $T_H1$ ,  $T_H2$ ,  $T_H17$  und Treg) können anhand spezifischer Zytokinsignaturen sowie eines individuellen Expressionsprofils von Transkriptionsfaktoren untereinander differenziert werden. Der Masterregulator von  $T_H1$ -Zellen ist der TF T-bet<sup>596,597</sup>, der die Expression des spezifischen Zytokins IFN- $\gamma$  induziert<sup>598</sup>. Für  $T_H2$ -Zellen sind der TF GATA-3<sup>599</sup> und die Sekretion des Zytokins IL-4<sup>600</sup> charakteristisch. Die Aktivität des TF ROR $\gamma$ t<sup>601</sup> ist zusammen mit der Sekretion des löslichen Mediators IL-17<sup>447</sup> kennzeichnend für  $T_H17$ -Zellen. Charakteristisch für Tregs ist der TF Foxp3<sup>110,602</sup>. Je nach Subpopulationen sekretieren Tregs unterschiedliche Zytokine.  $T_R1$ -Zellen sind beispielsweise vor allem durch die Sekretion von IL-10 gekennzeichnet<sup>603</sup> und  $T_H3$ -Zellen weisen eine Produktion des Mediators TGF- $\beta$ 1 auf<sup>604</sup>.

Im Vergleich zu naiven BALB/c T-Zellen zeigen die drei unterschiedlich vorstimulierten T-Zell-Populationen eine jeweils deutlich verminderte mRNA-Expression der  $T_H1$ -Marker T-bet und IFN- $\gamma$  (nur bei durch IL10-DCs vorstimulierten T-Zellen nicht statistisch signifikant) sowie der  $T_H2$ -Marker GATA-3 (nur bei durch IL21-DCs vorstimulierten T-Zellen nicht statistisch signifikant) und IL-4 (Abbildung 89A). Gleichzeitig weisen durch IL10-DCs und IL21-DCs vorstimulierte T-Zellen eine signifikant höhere Transkription des  $T_H1$ -Markerzytokins IFN- $\gamma$  sowie des  $T_H2$ -Markerzytokins IL-4 auf als durch LV-DCs vorstimulierte T-Zellen. Darüber hinaus ist die Menge an GATA-3 mRNA in durch IL10-DCs vorstimulierten T-Zellen signifikant geringer als in durch IL21-DCs vorstimulierten T-Zellen.

In durch LV-DCs vorstimulierten T-Zellen ist die mRNA-Transkription der  $T_H17$ -Marker ROR $\gamma$ t (nicht statistisch signifikant) und IL-17 sowie des Treg-Markers Foxp3 deutlich höher als in naiven T-Zellen. Die Transkription des zweiten Treg-Markerzytokins IL-10 ist in allen drei vorstimulierten T-Zell-Populationen wesentlich geringer als in naiven BALB/c T-Zellen. Interessanterweise ist die Expression der beiden  $T_H17$ -Marker ROR $\gamma$ t und IL-17 in durch IL21-DCs vorstimulierten T-Zellen signifikant geringer als in durch LV-DCs vorstimulierten T-Zellen. Im Gegensatz dazu weisen durch IL10-DCs vorstimulierte T-Zellen im Vergleich zu durch LV-DCs vorstimulierten T-Zellen für beide Marker ein signifikant höheres mRNA-Niveau auf, das jeweils auch über dem der durch IL21-DCs vorstimulierten T-Zell-Population liegt. Bemerkenswert ist weiterhin, dass die IL-17 Transkription in durch unstimulierte IL10-

DCs vorstimulierten T-Zellen ebenfalls stärker ist als in naiven T-Zellen. Die mRNA-Menge des TF Foxp3 befindet sich in allen T-Zell-Populationen, die durch transduzierte DCs vorstimuliert wurden, auf einem vergleichbaren Niveau.



**Abbildung 89: LV-DCs, IL10-DCs sowie IL21-DCs induzieren Tregs mit jeweils spezifischen Genexpressionsprofilen.** Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV-DC) oder mit den Konstrukten IL10- (IL10-DC) oder IL21-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (IL21-DC) lentiviral transduziert. Bestrahlte Zellen ( $3,3 \times 10^5$ ) wurden für 3 Tage mit  $6 \times 10^6$  T-Zellen aus BALB/c Mäusen in 6-Loch-Platten in einem Volumen von 4 ml kultiviert. Anschließend wurden die APCs mit Hilfe immunmagnetischer anti-MHCII-gekoppelter Dynabeads aus der Kokultur entfernt und die vorstimulierten T-Zellen wurden für 4 Tage in Anwesenheit von 0,5 U IL-2/ml kultiviert. Die relative mRNA-Expression von Genen, die für (A) Marker verschiedener T-Zelllinien sowie (B) Zellapoptose kodieren wurde mit Hilfe der *Realtime-PCR* bestimmt. Die interne Normalisierung erfolgte über das Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase. Die Daten geben die relative Änderung der Genexpression in der jeweiligen vorstimulierten T-Zell-Population an, bezogen auf das Expressionsniveau in naiven T-Zellen (nTCs). Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler von jeweils 3 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen allen analysierten T-Zell-Populationen und durch LV-DCs vorstimulierten T-Zellen (\*), zwischen vorstimulierten T-Zellen und nTCs (+) sowie zwischen durch IL21-DCs und IL10-DCs vorstimulierten T-Zellen (#) sind angegeben (\*,+,#  $p < 0,05$ ; \*\*,++  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Durch IL10-DCs vorstimulierte T-Zellen sind durch eine gegenüber von LV-DCs vorstimulierten T-Zellen geringfügige, aber statistisch signifikant verminderte Transkription

des T<sub>H</sub>2/Treg-Markerzytokins IL-10 gekennzeichnet. Der IL-10 mRNA-Gehalt ist auch in durch IL21-DCs vorstimulierten T-Zellen im Vergleich zu durch LV-DCs vorstimulierten T-Zellen deutlich, aber nicht statistisch signifikant, vermindert. Die Transkription des zweiten Treg-Markerzytokins TGF- $\beta$ 1 findet in allen analysierten T-Zell-Populationen auf vergleichbarem Niveau statt.

Da in verschiedenen Studien nachgewiesen wurde, dass sowohl IL-10<sup>605</sup>, als auch IL-21<sup>606,607</sup> die Apoptose von T-Zellen fördern, wurde für die unterschiedlich vorstimulierten T-Zell-Populationen das spezifische Genexpressionsprofil ausgewählter Apoptosemarker analysiert. Die Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie bilden eine essentielle Gruppe für die Regulation der Zellapoptose und wurden als Produkte von Onkogenen identifiziert<sup>608</sup>. Die genannte Familie beinhaltet sowohl antiapoptotische Moleküle wie Bcl-2 und Bcl-xL, als auch proapoptotische Moleküle wie Bax und Bid<sup>609,610</sup>.

Interessanterweise ist die Transkription der beiden antiapoptotische Moleküle Bcl-2 und Bcl-xl in durch IL10-DCs oder IL21-DCs vorstimulierten T-Zellen signifikant niedriger als in durch LV-DCs vorstimulierten T-Zellen und naiven BALB/c T-Zellen (Abbildung 89B). Darüber hinaus ist die mRNA-Menge des proapoptotische Moleküls Bid in durch IL10-DCs oder IL21-DCs vorstimulierten T-Zellen deutlich höher als in naiven T-Zellen. Durch IL21-DCs oder IL10-DCs (nicht statistisch signifikant) vorstimulierte T-Zellen transkribieren im Vergleich zu naiven T-Zellen auch den zweiten proapoptotischen Marker Bax signifikant stärker. T-Zellen, die durch IL10-DCs vorstimuliert wurden, sind im Vergleich zu T-Zellen, die mit LV-DCs kokultiviert wurden, durch eine signifikant reduzierte mRNA-Expression der proapoptotische Moleküle Bax und Bid gekennzeichnet. Bemerkenswert ist weiterhin, dass durch LV-DCs vorstimulierte T-Zellen eine zu naiven T-Zellen vergleichbare Bcl-xl Transkription aufweisen, jedoch das zweite antiapoptotische Markerprotein Bcl-2 signifikant vermindert exprimieren. Zusätzlich zeigt diese T-Zell-Population ein im Vergleich zu naiven T-Zellen jeweils deutlich erhöhtes mRNA-Niveau für die proapoptotischen Moleküle Bax und Bid.

#### **3.6.13 In Restimulierungs- und Suppressionsansätzen mit durch LV-DCs, IL10-DCs oder IL21-DCs vorstimulierten T-Zellen ist der Gehalt der Markerzytokinen IFN- $\gamma$ , IL-5, IL-10 sowie IL-17 stark variabel**

Da im Rahmen der vergleichenden Genexpressionsanalysen unterschiedlich vorstimulierter T-Zellen ein für die jeweilige T-Zell-Population spezifisches Genexpressionsprofil nachgewiesen wurde (Abschnitt 3.6.12), sollte eine Validierung dieser Resultate auf



als  $3 \times 10^6$  stimulierte naive T-Zellen (Abbildung 90A). Darüber hinaus sind beide T-Zell-Populationen nach einer Restimulation, verglichen mit naiven T-Zellen, durch eine signifikant reduzierte Produktion des  $T_H2$ -Markerzytokins IL-5 gekennzeichnet (Abbildung 90B). Durch IL10-DCs vorstimulierte T-Zellen zeigen im Gegensatz zu den beiden anderen T-Zell-Populationen in Restimulierungsansätzen keine Unterschiede in der IFN- $\gamma$  und IL-5 Produktion, aber eine gegenüber stimulierten naiven T-Zellen drastisch reduzierte Sekretion des  $T_H2$ /Treg-Markerzytokins IL-10 (Abbildung 90C). Sowohl mit IL21-DCs sowie vor allem mit IL10-DCs kokultivierte T-Zellen weisen, verglichen mit der Kontrollgruppe, nach einer Restimulationen mit allogenen Milzzellen eine deutlich erhöhte Produktion des  $T_H17$ -Markerzytokins IL-17 auf (Abbildung 90D).

In Suppressionsansätzen mit durch LV-DCs oder IL21-DCs vorstimulierten T-Zellen ist die Konzentration an IFN- $\gamma$  signifikant geringer als in den entsprechenden Kontrollansätzen mit  $3 \times 10^6$  stimulierten naiven T-Zellen. Besonders hervorzuheben ist weiterhin, dass sich der IFN- $\gamma$  Gehalt in Restimulierungs- und Suppressionsansätzen mit durch LV-DCs oder IL10-DCs vorstimulierten T-Zellen auf einem vergleichbaren Level befindet. Dies legt einen inhibitorischen Effekt der vorstimulierten T-Zellen auf die IFN- $\gamma$  Produktion naiver T-Zellen nahe.

Interessanterweise ist die detektierte Menge an IL-5 in Suppressionsansätzen mit durch IL10-DCs vorstimulierten T-Zellen deutlich geringer, als diejenige nach einer Restimulation der genannten T-Zell-Population mit allogenen Milzzellen. Außerdem ist sie signifikant niedriger als in Kontrollansätzen mit  $3 \times 10^6$  stimulierten naiven T-Zellen. In ähnlicher Weise supprimieren auch durch IL21-DCs vorstimulierte T-Zellen die IL-5 Produktion stimulierter naiver T-Zellen sehr stark – in den entsprechenden Überständen wurde dieses Zytokin nicht nachgewiesen.

Während durch LV-DCs vorstimulierte T-Zellen die IL-10 Sekretion naiver T-Zellen nicht modulieren, ist die Konzentration dieses Zytokins in Suppressionsansätzen mit durch IL10-DCs oder IL21-DCs vorstimulierten T-Zellen signifikant niedriger. Im Detail betrachtet ist die Menge an IL-10 in Suppressions- und Restimulierungsansätzen mit durch IL10-DCs vorstimulierten T-Zellen vergleichbar gering. Wie schon zuvor für IL-5 gezeigt, wird auch IL-10 in Suppressionsansätzen mit durch IL21-DCs vorstimulierten T-Zellen nicht detektiert. Somit scheinen beide T-Zell-Populationen einen inhibitorischen Effekt auf die IL-10 Produktion naiver T-Zellen auszuüben.

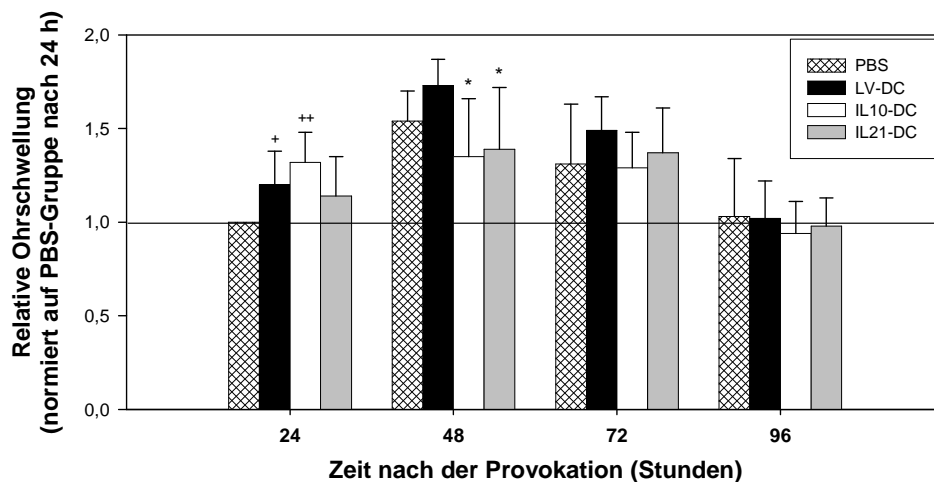
Die Produktion des Zytokins IL-17 in naiven T-Zellen wird durch LV-DCs vorstimulierte T-Zellen nicht modifiziert. Interessanterweise ist im Gegensatz dazu die IL-17 Konzentration in Suppressionsansätzen sowohl mit durch IL21-DCs, als auch durch IL10-DCs vorstimulierten T-Zellen signifikant höher als in den entsprechenden Kontrollansätzen mit  $3 \times 10^6$  stimulierten naiven T-Zellen.



### 3.6.14 Im Gegensatz zu LV-DCs weisen IL10-DCs und IL21-DCs eine tolerogene Aktivität im murinen Modell der Kontaktallergie auf

In früheren Studien wurde demonstriert, dass sich BM-DCs, die mit den Zytokinen IL-10<sup>611</sup> oder IL-21<sup>325,326</sup> vorbehandelt wurden, im murinen Krankheitsmodell der haptensvermittelten Kontaktallergie (CHS) durch tolerogene Aktivitäten auszeichnen. Da sowohl LV-DCs, als auch IL10-DCs und IL21-DCs *in vitro* tolerogene Eigenschaften aufweisen, sollte deren tolerogenes Potential *in vivo* im Rahmen der CHS evaluiert werden. Alle in dieser Arbeit durchgeführten *in vivo*-Experimente (Injektion der bereitgestellten transduzierten, gepulsten/ungepulsten Zellen bzw. PBS sowie Messung der Ohrschwellung) wurden freundlicherweise von Herrn Dipl.-Biol. Timo Castor durchgeführt.

In einem initialen Experiment wurden die unterschiedlich transduzierten BM-DC-Populationen zunächst ungepulst, das heißt ohne ein spezifisches Antigen zu tragen, in DNFB-sensibilisierte C57BL/6 Mäuse injiziert. Sieben Tage später erfolgte die Provokation mit DNFB, in deren Anschluss die Ohrschwellung über 96 h im Abstand von jeweils 24 h gemessen wurde (Abbildung 91).

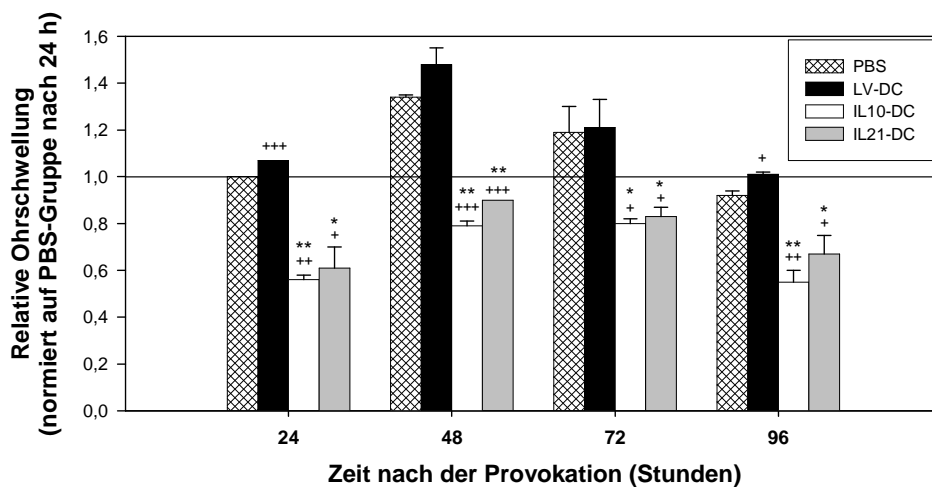


**Abbildung 91: LV-DCs, IL10-DCs sowie IL21-DCs induzieren keine Antigen-unspezifischen Veränderungen im Verlauf der murinen Kontaktallergie.** Weibliche C57BL/6 Mäuse (n=3) wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen (Tag 0 und 1) durch eine epikutane Applikation von 17 µl DNFB (0,4 %) auf das rasierte Abdomen sensibilisiert. Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV-DC) oder mit den Konstrukten IL10- (IL10-DC) oder IL21-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (IL21-DC) lentiviral transduziert. An Tag 9 der Kultur wurden die verschiedenen BM-DC-Populationen geerntet und bestrahlt. Ungepulste BM-DCs ( $5 \times 10^5$ /Tier) oder PBS (als Kontrolle) wurden an Tag 5 nach dem Beginn der Sensibilisierung subkutan injiziert. Sieben Tage nach der Injektion erfolgte die Provokation mit 8,5 µl DNFB (0,2 %) auf jeder Ohrfläche beider Ohren. Die Ohrschwellung wurde über einen Zeitraum von 96 h in einem Abstand von 24 h gemessen. Die Daten repräsentieren den mittleren Messwert der Ohrschwellung (bezogen auf die Ohrschwellung der PBS-Gruppe an Tag 1 nach der Provokation; = 0,04 mm)  $\pm$  Standardfehler von jeweils 6 Messwerten pro Zeitpunkt. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der PBS-Gruppe (+) sowie gegenüber Mäusen, die eine LV-DC Injektion erhielten (\*), sind angegeben (\*<sup>+</sup> p<0,05; \*\* p<0,01).

Generell ist die Ohrschwellung aller drei Gruppen, denen transduzierte BM-DCs injiziert wurden, vergleichbar stark wie in der Kontrollgruppe, die PBS-Injektionen erhielt (Abbildung 91). Einzig nach 24 h ist die Ohrschwellung in Mäusen, denen LV-DCs oder IL10-DCs injiziert wurden, signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Interessanterweise liegt die Ohrschwellung der Gruppen, denen entweder IL10-DCs oder IL21-DCs injiziert wurden, 48 h Stunden nach der Provokation signifikant unterhalb derjenigen Gruppe, die eine LV-DC-Injektion erhalten haben. Insgesamt vermitteln alle drei transduzierten BM-DC Populationen somit keine antigenunspezifischen Effekte im generellen Verlauf einer Immunantwort innerhalb des Krankheitsmodells der murinen Kontaktallergie.

Nach einer Injektion mit DNBS-gepulsten LV-DCs ist die Ohrschwellung der betreffenden Mäuse 48 h sowie 72 h nach der Provokation unverändert gegenüber derjenigen der PBS-Gruppe. Zu den Zeitpunkten 24 h sowie 96 h zeigt die LV-DC-Gruppe sogar eine signifikant stärker Ohrschwellung als die Kontrollgruppe (Abbildung 92).

Mäuse, die entweder eine Injektion mit haptengepulsten IL10-DCs oder IL21-DCs erhalten haben, weisen zu allen vier Zeitpunkten eine im Vergleich zur Kontrollgruppe sowie zur haptengepulsten LV-DC-Gruppe signifikant verminderte Ohrschwellung auf.



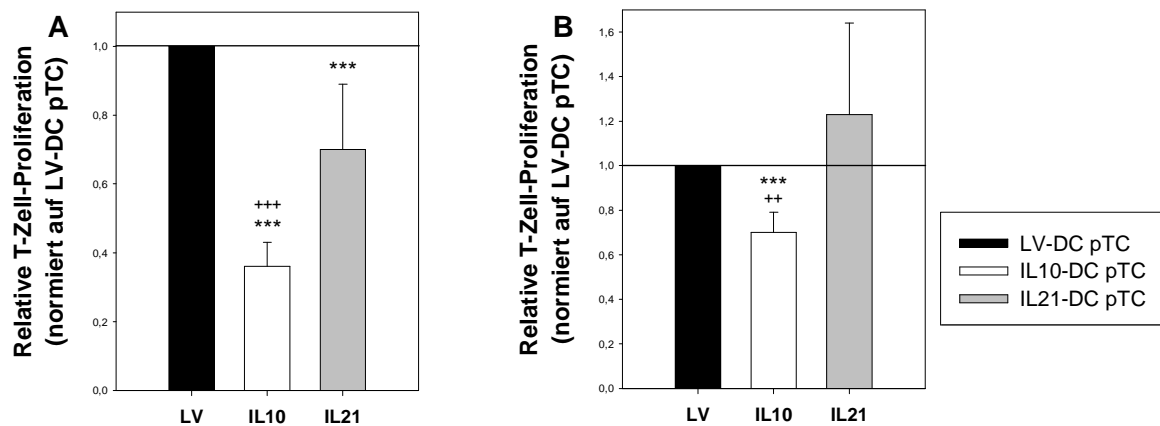
**Abbildung 92: IL10-DCs und IL21-DCs induzieren im Modell der CHS eine vergleichbar effiziente Suppression der allergischen Reaktion.** Weibliche C57BL/6 (n=9-10) Mäuse wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen (Tag 0 und 1) durch eine epikutane Applikation von 17  $\mu$ l DNFB (0,4 %) auf das rasierte Abdomen sensibilisiert. Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV-DC) oder mit den Konstrukten IL10- (IL10-DC) oder IL21-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (IL21-DC) lentiviral transduziert. An Tag 9 der Kultur wurden die verschiedenen BM-DC-Populationen geerntet, bestrahlt und für 10 min mit 5  $\mu$ M DNBS gepulst. Gepulste BM-DCs ( $5 \times 10^5$ /Tier) oder PBS (als Kontrolle) wurden an Tag 5 nach dem Beginn der Sensibilisierung subkutan injiziert. Sieben Tage nach der Injektion erfolgte die Provokation mit 8,5  $\mu$ l DNFB (0,2 %) auf jeder Ohrfläche beider Ohren. Die Ohrschwellung wurde über einen Zeitraum von 96 h in einem Abstand von 24 h gemessen. Die Ohrschwellung wurde über einen Zeitraum von 96 h in einem Abstand von 24 h gemessen. Die Daten repräsentieren den Messwert der Ohrschwellung (bezogen auf die Ohrschwellung der PBS-Gruppe an Tag 1 nach der Provokation, = 0,06 mm)  $\pm$  Standardfehler aus 2 voneinander unabhängigen Experimenten. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der PBS-Gruppe (+) sowie gegenüber Mäusen, die eine LV-DC Injektion erhielten (\*), sind angegeben (\*\*+ p<0,05; \*\*++ p<0,01; +++ p<0,001).

### **3.6.15 Milz- und Lymphknotenzellen aus haptengenprovozierten Mäusen weisen, abhängig von der Vorbehandlung mit IL10- bzw. IL21-DCs, eine differentielle Restimulierbarkeit auf**

Grundlage der allergischen Kontaktdermatitis sind die im Rahmen der Sensibilisierung induzierten antigenspezifischen T-Zellen. Diese T-Zellen wurden *in vivo* im Modell der murinen CHS durch den Kontakt mit haptengepulsten tolerogenen IL10- oder IL21-DCs in ihrer immunogenen Aktivität inhibiert (Abschnitt 3.6.14). Die Suppression der antigenspezifischen T-Zell-Aktivität durch die beiden DC-Populationen kann mittels diverser Mechanismen stattfinden. Aus diesem Grund erfolgten nach Abklingen der CHS-Reaktion *in vitro*-Analysen der in den zervikalen, axillaren und inguinalen Lymphknoten und der Milz enthaltenen T-Zellen von Mäusen, denen haptengepulste DCs injiziert worden waren. Da Anergie als eine der Schlüsseleigenschaften von Tregs gilt<sup>97</sup> und durchaus die Möglichkeit besteht, dass IL10- und IL21-DCs *in vivo* antigenspezifische T-Zellen in diese Richtung polarisieren, wurde zunächst das anerge Potential der unterschiedlichen Milzzell- und Lymphknotenzell-Populationen im Rahmen einer Restimulierung mit DNBS-gepulsten Milzzellen als APCs untersucht.

Milzzellen, die aus Mäusen isoliert wurden, die zuvor eine Injektion haptengepulster IL10-DCs oder IL21-DCs erhielten, zeigen bei einer Restimulation mit haptengepulsten APCs eine signifikant geringere Proliferation als Milzzellen aus Mäusen, die mit haptengepulsten LV-DCs vorbehandelt wurden (Abbildung 93A). Im Detail betrachtet ist die Proliferation von Milzzellen, die aus der IL10-DC-Gruppe isoliert wurden, niedriger als diejenige, die nach einer Restimulation von Milzzellen aus IL21-DC-Mäusen detektiert wurde.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Restimulation verschiedener Milzzell-Populationen weisen lediglich vereinigte Lymphknotenzellen, die aus IL10-DC vorbehandelten Mäusen isoliert wurden, eine gegenüber der LV-DC-Gruppe signifikant verminderte Proliferation in Reaktion auf eine Restimulation auf (Abbildung 93B). Lymphknotenzellen aus IL21-DC vorbehandelten Mäusen hingegen zeigen eine ähnlich starke proliferative Antwort, wie die Kontrollgruppe.



**Abbildung 93: Milzzellen und vereinigte Lymphknotenzellen aus haptensprovozierten Mäusen, die mit IL10- oder IL21-DCs vorbehandelt wurden, zeigen infolge einer Restimulation unterschiedliche haptenspezifische proliferative Antworten.** Weibliche C57BL/6 (n=9-10) Mäuse wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen (Tag 0 und 1) durch eine epikutane Applikation von 17  $\mu$ l DNFB (0,4 %) auf das rasierte Abdomen sensibilisiert. Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV) oder mit den Konstrukten IL10- oder IL21-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP lentiviral transduziert. An Tag 9 der Kultur wurden die verschiedenen BM-DC-Populationen geerntet, bestrahlt und für 10 min mit 5  $\mu$ M DNBS gepulst. Gepulste BM-DCs ( $5 \times 10^5$ /Tier) oder PBS (als Kontrolle) wurden an Tag 5 nach dem Beginn der Sensibilisierung subkutan injiziert. Sieben Tage nach der Injektion erfolgte die Provokation mit 8,5  $\mu$ l DNFB (0,2 %) auf jeder Ohrfläche beider Ohren. An Tag 7 nach der Provokation erfolgte die Präparation der Milzzellen bzw. vereinigten Lymphknotenzellen.  $2 \times 10^5$  (A) Milzzellen bzw. (B) vereinigte Lymphknotenzellen der verschiedenen Gruppen wurden mit jeweils  $2 \times 10^5$  bestrahlten, DNBS-gepulsten Milzzellen aus C57BL/6 Mäusen für 4 Tage kokultiviert. Die Zellproliferation wurde als Aufnahme von [ $^3$ H]-Thymidin für die letzten 16 h der Kultur gemessen. Die Daten geben die relative Zellproliferation (jeweils bezogen auf die Proliferation von Zellen infolge einer Restimulation, die aus LV-DC-injizierten Mäusen isoliert wurden), berechnet als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler von 2 voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils in Triplikatansätzen durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber Zellen, die aus LV-DC-Mäusen isoliert wurden (\*) sowie zwischen Zellen aus IL10-DC-Mäusen und IL21-DC-Mäusen (+) sind angegeben (\*, + p<0,05; \*\*, ++ p<0,01; \*\*\*, \*\*\* p<0,001).

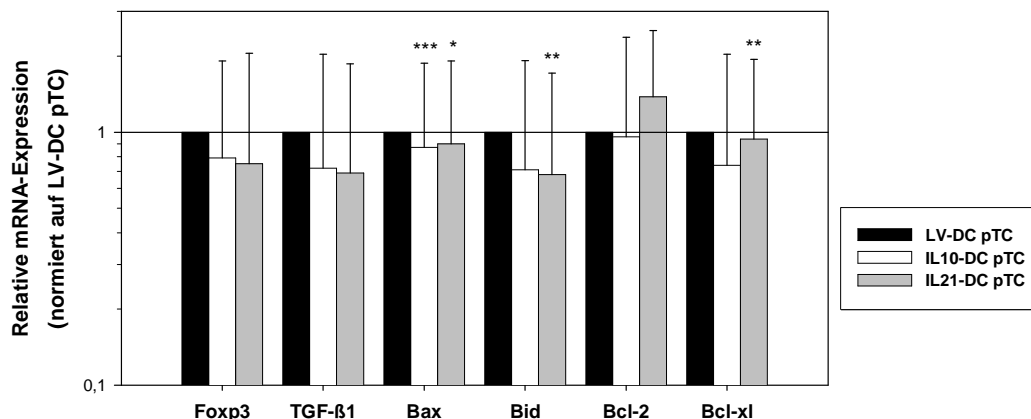
### 3.6.16 LV-DCs, IL10-DCs und IL21-DCs induzieren im Rahmen einer CHS differentielle Genexpressionsprofile in T-Zellen

Wie in den beiden vorhergehenden Abschnitten dieses Kapitels dargestellt wurde, weisen haptengepulste IL10- und IL21-DCs eine tolerogene Aktivität *in vivo* auf (Abschnitt 3.6.14) und modulieren die immunogene Aktivität antigenspezifischer T-Zellen (Abschnitt 3.6.15). Da Tregs anhand spezifischer Zytokin- sowie Transkriptionsfaktorsignaturen identifiziert werden können (vergleiche Abschnitt 3.6.12), wurden zur genaueren Charakterisierung der T-Zellen aus den Lymphknoten- und den Milzkompartimenten von Mäusen, denen haptengepulste LV-DCs, IL10-DCs oder IL21-DCs injiziert wurden, die Genexpressionsprofile spezifischer Treg-Markermoleküle bestimmt. Darüber hinaus kann es auch zur Induktion von Apoptose innerhalb der antigenspezifischen T-Zell-Population durch die verschiedenen DC-

Populationen kommen, weshalb zusätzlich das Expressionsprofil ausgewählter pro- und antiapoptotischer Marker analysiert wurde.

Innerhalb der Milzzell-Populationen zeigte sich, dass die mRNA-Transkription der meisten analysierten Gene in Zellen aus Mäusen, denen haptengepulste IL10-DCs oder IL21-DCs injiziert wurden, verglichen mit der Kontrollgruppe, in ähnlicher Weise reguliert werden. In Gruppen, die mit LV-DCs, IL10-DCs oder IL21-DCs vorbehandelt wurden, werden die Treg-Marker Foxp3 und TGF- $\beta$ 1 auf mRNA-Ebene in jeweils vergleichbarer Stärke exprimiert (Abbildung 94).

Milzzellen aus haptengestützten Mäusen, die mit transgenexprimierenden DCs vorbehandelt wurden, sind im Vergleich zur LV-DC-Gruppe durch eine deutlich verminderte mRNA-Expression der proapoptotischen Marker Bax und Bid (in der IL10-DC-Gruppe nicht statistisch signifikant) gekennzeichnet (Abbildung 94). Gleichzeitig wird in Milzzellen der IL21-DC-Gruppe der antiapoptotische Marker Bcl-2 stärker (nicht statistisch signifikant) transkribiert als in der LV-DC-Gruppe. Auch die mRNA-Menge des zweiten antiapoptotischen Markers Bcl-xl ist in der IL21-DC-Gruppe geringfügig, aber signifikant gegenüber der LV-DC-Gruppe erhöht.

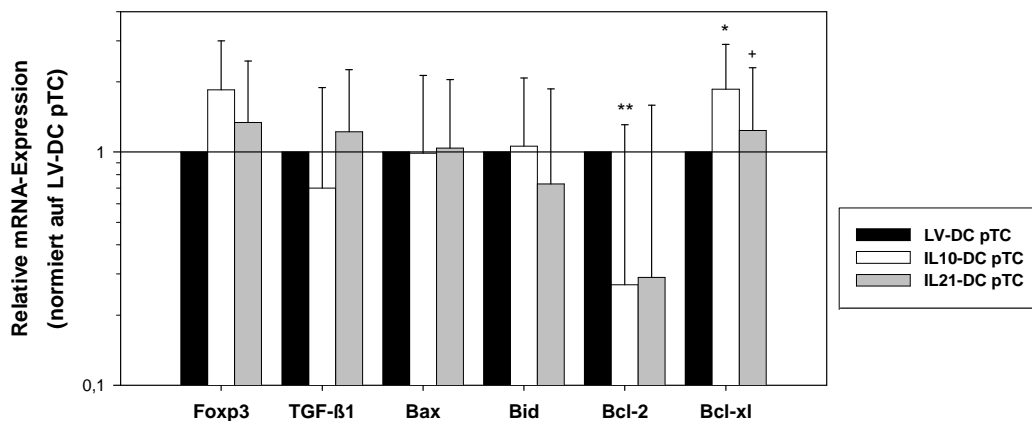


**Abbildung 94: Milzzellen haptengestützter Mäuse, die mit LV-, IL10- oder IL21-DCs vorbehandelt wurden, weisen voneinander abweichende Genexpressionsprofile auf.** Weibliche C57BL/6 Mäuse wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen (Tag 0 und 1) durch eine epikutane Applikation von 17  $\mu$ l DNFB (0,4 %) auf das rasierte Abdomen sensibilisiert. Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquots der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV) oder mit den Konstrukten IL10- oder IL21-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP lentiviral transduziert. An Tag 9 der Kultur wurden die verschiedenen BM-DC-Populationen geerntet, bestrahlt und für 10 min mit 5  $\mu$ M DNBS gepulst. Gepulste BM-DCs ( $5 \times 10^5$ /Tier) oder PBS (als Kontrolle) wurden an Tag 5 nach dem Beginn der Sensibilisierung subkutan injiziert. Sieben Tage nach der Injektion erfolgte die Provokation mit 8,5  $\mu$ l DNFB (0,2 %) auf jeder Ohrfläche beider Ohren. An Tag 7 nach der Provokation erfolgte die Präparation der Milzzellen. Die relative mRNA-Expression von Genen, die für Treg- und für Apoptosemarker kodieren, wurde mit Hilfe der *Real-time-PCR* bestimmt. Die interne Normalisierung erfolgte über das Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Die Daten geben die relative Änderung der Genexpression in der jeweiligen T-Zell-Population, bezogen auf das Expressionsniveau in T-Zellen Mäusen, denen LV-DCs injiziert wurden, an. Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler von jeweils 2 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber T-Zellen, die aus LV-DC-Mäusen isoliert wurden sind angegeben (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Während die aus den verschiedenen Gruppen isolierten Milzzellen lediglich geringe Variationen bezüglich der Genexpressionssignaturen von Treg- sowie Apoptosemarker zeigen, weisen die jeweils entsprechenden vereinigten Lymphknotenzellen stärker divergierende mRNA-Transkriptmuster auf.

Im Vergleich zur LV-DC-Gruppe weisen Lymphknotenzellen aus haptenprovozierten Mäusen, die mit IL10-DCs oder IL21-DCs vorbehandelt wurden, deutlich höhere mRNA-Mengen des Treg-Markers Foxp3 (nicht statistisch signifikant) auf (Abbildung 95). Gleichzeitig ist die Expression des Treg-Markerzytokins TGF- $\beta$ 1 in den verschiedenen Zellpopulationen kaum moduliert.

Die beiden proapoptotischen Marker Bax und Bid werden von allen analysierten Lymphknotenzell-Populationen auf einem vergleichbaren Niveau transkribiert (Abbildung 95). Interessanterweise ist die mRNA-Expression der beiden antiapoptotischen Marker Bcl-2 und Bcl-xl in den Zellen der IL10-DC- sowie der IL21-DC-Gruppe vergleichbar reguliert - während Bcl-2 im Vergleich zur LV-DC-Gruppe stark vermindert exprimiert wird, ist die Transkription von Bcl-xl hochreguliert (in beiden Fällen nicht statistisch signifikant für die IL21-DC-Gruppe).



**Abbildung 95: Vereinigte Lymphknotenzellen haptenprovozierter Mäuse, die mit LV-, IL10- oder IL21-DCs vorbehandelt wurden, weisen voneinander abweichende Genexpressionsprofile auf.**

Weibliche C57BL/6 Mäuse wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen (Tag 0 und 1) durch eine epikutane Applikation von 17  $\mu$ l von 0,4 % DNFB auf das rasierte Abdomen sensibilisiert. Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV) oder mit den Konstrukten IL10- oder IL21-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP lentiviral transduziert. An Tag 9 der Kultur wurden die verschiedenen BM-DC-Populationen geerntet, bestrahlt und für 10 min mit 5  $\mu$ M DNBS gepulst. Gepulste BM-DCs ( $5 \times 10^5$ /Tier) oder PBS (als Kontrolle) wurden an Tag 5 nach dem Beginn der Sensibilisierung subkutan injiziert. Sieben Tage nach der Injektion erfolgte die Provokation mit 8,5  $\mu$ l DNFB (0,2 %) auf jeder Ohrfläche beider Ohren. An Tag 7 nach der Provokation erfolgte die Präparation der vereinigten Lymphknotenzellen. Die relative mRNA-Expression von Genen, die Treg- und für Apoptosemarker kodieren wurde mit Hilfe der *Real-time-PCR* bestimmt. Die interne Normalisierung erfolgte über das Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Die Daten geben die relative Änderung der Genexpression in der jeweiligen T-Zell-Population, bezogen auf das Expressionsniveau in T-Zellen Mäusen, denen LV-DCs injiziert wurden, an. Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler von jeweils 2 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber T-Zellen, die aus LV-DC-Mäusen isoliert wurden (\*) sowie zwischen T-Zellen aus IL10-DC-Mäusen und IL21-DC-Mäusen (+) sind angegeben (\*: \* p < 0,05; \*\* p < 0,01).

### **3.6.17 Milz- und Lymphknotenzellen aus haptенprovozierten Mäusen weisen in Abhängigkeit von ihrer Vorbehandlung mit IL10- oder IL21-DCs ein moduliertes Zytokinprofil auf**

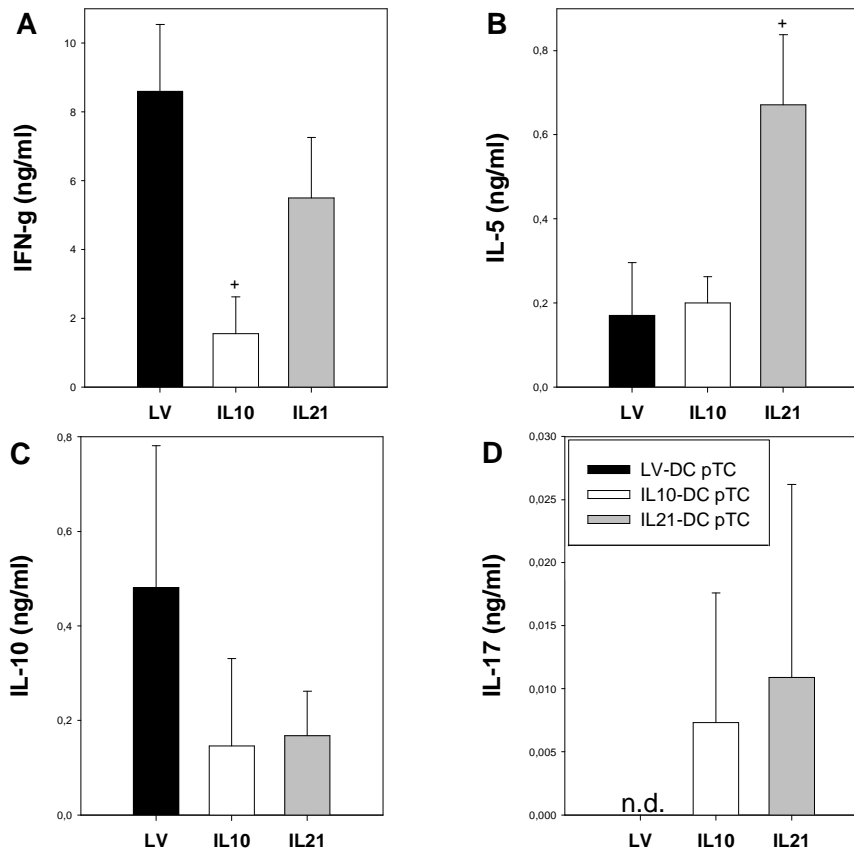
Wie in vorgehenden Abschnitten dieser Arbeit gezeigt, reagieren Milzzellen sowie vereinigte Lymphknotenzellen aus haptенprovozierten Mäusen je nach Vorbehandlung mit LV-, IL10- oder IL21-DCs unterschiedlich auf eine Restimulation mit haptенgepulsten APCs (Abschnitt 3.6.15) und weisen jeweils ein spezifisches mRNA-Expressionsmuster auf (Abschnitt 3.6.16). Diese Unterschiede im Phänotyp und der Funktion sollten anschließend auf Proteinebene mittels ELISA-Analysen der entsprechenden Kulturüberstände verifiziert werden.

Während Milzzellen aus haptенprovozierten Mäusen, die mit LV-DCs oder IL21-DCs vorbehandelt wurden, in Reaktion auf eine Restimulation mit haptенgepulsten APCs eine vergleichbar starke Sekretion des  $T_H1$ -Markerzytokins IFN- $\gamma$  aufweisen, ist die Produktion dieses Zytokins in Zellen der IL10-DC-Gruppe signifikant reduziert (Abbildung 96A).

Demgegenüber ist die Sekretion des  $T_H2$ -Markerzytokins IL-5 nur in der IL21-DC-Population moduliert – in entsprechenden Kulturüberständen wurden deutlich höhere Konzentrationen dieses Zytokins detektiert als in Restimulierungsansätzen der LV-DC- oder IL10-DC-Gruppe (Abbildung 96B).

Das ambivalente  $T_H2$ /Treg-Markerzytokin IL-10 wird von Milzzellen, die aus IL10-DC oder IL21-DC Mäusen isoliert wurden, in deutlich geringerer Menge (jeweils nicht statistisch signifikant) sekretiert als von der Kontrollgruppe (Abbildung 96C).

Interessanterweise zeigen Milzzellen der LV-DC-Gruppe infolge einer Restimulation keine Produktion des  $T_H17$ -Markerzytokins, während dieses Zytokin sowohl in Kulturüberständen der IL10-DC-Gruppe, als auch in denen der IL21-DC-Gruppe nachgewiesen wurde (Abbildung 96D).



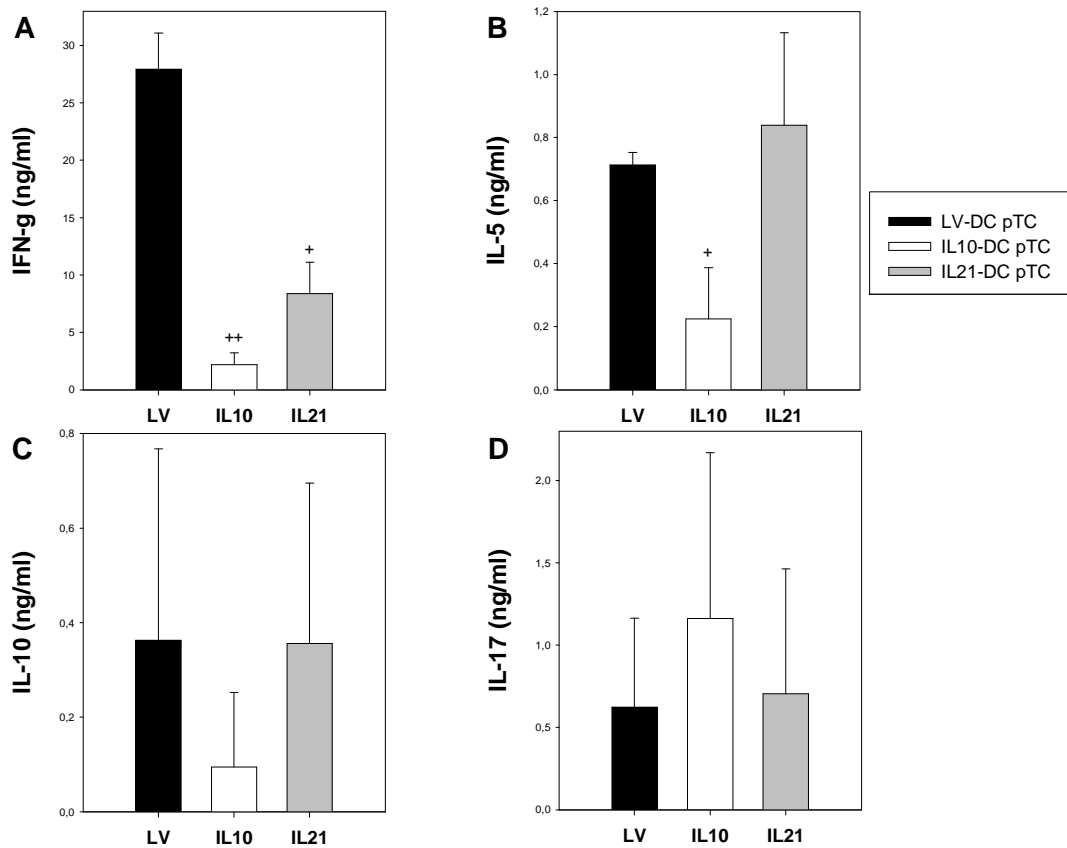
**Abbildung 96: Milzzellen aus haptenprovozierten Mäusen, die mit IL10- oder IL21-DCs vorbehandelten wurden, weisen infolge einer Restimulation voneinander abweichende Zytokinprofile auf.** Weibliche C57BL/6 Mäuse wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen (Tag 0 und 1) durch eine epikutane Applikation von 17  $\mu$ l DNFB (0,4 %) auf das rasierte Abdomen sensibilisiert. Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV) oder mit den Konstrukten IL10- oder IL21-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP lentiviral transduziert. An Tag 9 der Kultur wurden die verschiedenen BM-DC-Populationen geerntet, bestrahlt und für 10 min mit 5  $\mu$ M DNBS gepulst. Gepulste BM-DCs ( $5 \times 10^5$ /Tier) oder PBS (als Kontrolle) wurden an Tag 5 nach dem Beginn der Sensibilisierung subkutan injiziert. Sieben Tage nach der Injektion erfolgte die Provokation mit 8,5  $\mu$ l DNFB (0,2 %) auf jeder Ohrfläche beider Ohren. An Tag 7 nach der Provokation erfolgte die Präparation der Milzzellen.  $2 \times 10^6$  Milzzellen der verschiedenen Gruppen wurden mit jeweils  $2 \times 10^6$  bestrahlten, DNBS-gepulsten Milzzellen aus C57BL/6 Mäusen in einem Volumen von 2 ml für 4 Tage kokultiviert. Anschließend wurden die Kulturüberstände geerntet und der Gehalt an (A) IFN- $\gamma$ , (B) IL-5, (C) IL-10 und (D) IL-17 mittels ELISA bestimmt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler von jeweils 2 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber T-Zellen, die aus LV-DC-Mäusen isoliert wurden, sind angegeben (+  $p < 0,05$ ). n.d.: nicht detektiert.

Vereinigte Lymphknotenzellen aus Mäusen, denen entweder IL10-DCs oder IL21-DCs injiziert wurden, sind nach einer antigenspezifischen Restimulation durch eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduzierte Sekretion des Zytokins IFN- $\gamma$  gekennzeichnet (Abbildung 97A).

Während Lymphknotenzellen der IL21-DC-Gruppe eine im Vergleich zur LV-DC-Gruppe ähnlich starke Produktion des  $T_H2$ -Markerzytokins IL-5 aufweisen, sekretieren Lymphknotenzellen aus IL10-DC Mäusen signifikant geringere Mengen dieses Zytokins (Abbildung 97B). Darüber hinaus ist die Konzentration des ambivalenten  $T_H2$ /Treg-



Markerzytokins IL-10 in Kulturüberständen der IL10-DC-Gruppe im Vergleich zur LV-DC-Gruppe deutlich, jedoch nicht statistisch signifikant, reduziert (Abbildung 97C). Bemerkenswert ist weiterhin, dass nach einer Restimulation mit haptengepulsten APCs Lymphknotenzellen aus IL10-DC vorbehandelten Mäusen mehr IL-17 (nicht statistisch signifikant) sekretieren als Zellen aus LV-DC Mäusen (Abbildung 97D). Im Gegensatz dazu ist der IL-17 Gehalt in Restimulierungsansätzen der IL21-DC-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe nicht moduliert.



**Abbildung 97: Lymphknotenzellen aus haptengepulsten Mäusen, die mit IL10- oder IL21-DCs vorbehandelten wurden, weisen infolge einer Restimulation unterschiedliche Zytokinprofile auf.** Weibliche C57BL/6 Mäuse wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen (Tag 0 und 1) durch eine epikutane Applikation von 17  $\mu$ l DNFB (0,4 %) auf das rasierte Abdomen sensibilisiert. Knochenmarkszellen wurden aus C57BL/6 Mäusen isoliert und mittels GM-CSF über 9 Tage zu myeloiden BM-DCs differenziert. An Tag 5 und 6 wurden Aliquote der Kultur entweder mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP (LV) oder mit den Konstrukten IL10- oder IL21-pCDH1-MCS1-EF1-copGFP lentiviral transduziert. An Tag 9 der Kultur wurden die verschiedenen BM-DC-Populationen geerntet, bestrahlt und für 10 min mit 5  $\mu$ M DNBS gepulst. Gepulste BM-DCs ( $5 \times 10^5$ /Tier) oder PBS (als Kontrolle) wurden an Tag 5 nach dem Beginn der Sensibilisierung subkutan injiziert. Sieben Tage nach der Injektion erfolgte die Provokation mit 8,5  $\mu$ l DNFB (0,2 %) auf jeder Ohrfläche beider Ohren. An Tag 7 nach der Provokation erfolgte die Präparation der vereinigten Lymphknotenzellen.  $2 \times 10^6$  vereinigte Lymphknotenzellen der verschiedenen Gruppen wurden mit jeweils  $2 \times 10^6$  bestrahlten, DNBS-gepulsten Milzzellen aus C57BL/6 Mäusen in einem Volumen von 2 ml für 4 Tage kokultiviert. Anschließend wurden die Kulturüberstände geerntet und der Gehalt an (A) IFN- $\gamma$ , (B) IL-5, (C) IL-10 und (D) IL-17 mittels ELISA bestimmt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler von jeweils 2 Experimenten, die in Duplikaten durchgeführt wurden. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber T-Zellen, die aus LV-DC-Mäusen isoliert wurden, sind angegeben (+  $p < 0,05$ ; ++  $p < 0,01$ ).

## 4 Diskussion

Eine der wichtigsten Komponenten des Immunsystems sind DCs, da sie das Potential besitzen, sowohl als Initiatoren, wie auch als Modulatoren von Immunantworten zu agieren. Obwohl sich die Gruppe der DCs aus mehreren Subpopulationen zusammensetzt<sup>612</sup>, weisen sie alle eine außerordentliche Fähigkeit bezüglich der Prozessierung sowie der Präsentation von Antigenen auf. Immature DCs (iDC) befinden sich in fast allen peripheren Geweben. In diesem Zustand sind sie auf die Aufnahme von Antigenen spezialisiert, aber nicht in der Lage, T-Zellen effektiv zu aktivieren<sup>89,117</sup>. Unter stationären Bedingungen erlangt ein Bruchteil dieser ruhenden DCs einen semi-maturen Status und migriert in die drainierenden sekundären lymphoiden Organe. Dort ist das vorherrschende Charakteristikum semi-maturer DCs ihre tolerogene Funktionalität. Sie induzieren in interagierenden autoreaktiven T-Zellen, die im Thymus der negativen Selektion entkommen sind, Apoptose, Anergie oder einen regulatorischen Status<sup>130</sup>. Zusätzlich zu natürlichen Tregs, die im Thymus generiert werden, sind durch tolerogene DCs induzierte Tregs somit ebenfalls essentiell für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz<sup>97</sup> und gewährleisten eine Toleranz gegenüber harmlosen Umweltantigenen<sup>98</sup>.

Im Kontext einer Infektion sind DCs auf die Aufnahme und Prozessierung von pathogenem Material konzentriert. Kommen DCs mit pathogenabgeleiteten Molekülen wie LPS oder mit proinflammatorischen Zytokinen in Kontakt, die von Zellen im umgebenden Mikromilieu sekretiert werden, wird die vollständige Ausreifung von DCs induziert. Diese resultiert in einer starken Aufregulation der Oberflächenexpression kostimulatorischer Rezeptoren und in der Produktion proinflammatorischer Zytokine<sup>141</sup>. Mature DCs sind die potentesten antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems, da sie das Potential haben, naive antigenspezifische T-Zellen zu stimulieren und auf diese Weise primäre Immunantworten zu induzieren.

Da nicht aktivierte DCs als tolerogene Modulatoren des Immunsystems fungieren, stehen sie im Fokus zahlreicher Studien zur Intervention im Kontext von Autoimmunerkrankungen und Allergien<sup>11</sup>. Beide Krankheitsformen entstehen auf Grund einer unerwünschten Induktion von Immunantworten gegenüber Selbst-Antigenen bzw. harmlosen Umweltantigenen. Aktuelle Forschungsansätze konzentrieren sich deshalb auf die Generierung tolerogener DCs, die antigenspezifische Tregs induzieren können und so die Toleranz gegenüber diesen Antigenen wiederherstellen<sup>99</sup>. Auch auf dem Gebiet der Transplantatabstossung wurden tolerogene Donor- und Wirts-DCs erfolgreich zur Induktion von Toleranz in Transplantatempfängern eingesetzt<sup>613</sup>. Die Aufrechterhaltung eines homogenen immaturren Status ist in *in vitro* generierten DCs diffizil, da sowohl humane, als auch murine DCs spontan ausreifen können<sup>435</sup>. Diese Zellen sind hochgradig sensitiv bezüglich der

Kultivierungsbedingungen<sup>584</sup> sowie gegenüber inflammatorischen Stimuli<sup>614</sup>. Für eine *in vivo*-Applikation immaturer tolerogener DCs ist es daher zwingend erforderlich, ihre Ausreifung zu blockieren<sup>615</sup>. Ein spezifischer Maturierungsblock zur Konservierung des iDCs Phänotyps wurde erstmals nach einer Behandlung von Langerhanszellen mit UV-Licht beschrieben<sup>616</sup>. Nachfolgend wurde für verschiedene Substanzen gezeigt, dass sie die DC-Ausreifung effektiv inhibieren können. Hierzu gehören unter anderem IL-10, TGF- $\beta$ 1, Glucocorticoide sowie Vitamin-D3 Analoga<sup>142</sup>.

Eine gängige Methode, APCs mit einem tolerogenen Phänotyp zu generieren, basiert auf der Behandlung mit immunmodulatorischen Mediatoren, die beispielsweise in hohen Mengen von bestimmten Tumoren sekretiert werden<sup>617</sup>. Zu diesen tumorabgeleiteten Faktoren gehören unter anderem IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ 1, VEGF (*vascular endothelial growth factor*) sowie Galectin-1<sup>618,619</sup>. Alle vorgenannten Faktoren haben eine inhibierende Wirkung auf die Differenzierung und Maturierung von DCs. Im Tumormikromilieu resultiert diese anormale Differenzierung in einer Akkumulation von MDSCs (*myeloid-derived suppressor cell*), zu denen auch redifferenzierte DC-Vorläufer gehören<sup>620</sup>. Insofern kommt es zu einer verminderten Generierung aktivierbarer DCs<sup>618</sup>. In der Konsequenz werden im Mikromilieu des Tumors nur ineffektive Tumorantworten induziert oder sogar eine Tumortoleranz ausgebildet und das Tumorwachstum letztendlich nicht beeinträchtigt.

Andere Protokolle zur Generierung tolerogener APCs beruhen auf der Verwendung pharmakologischer Inhibitoren<sup>11</sup>, wie beispielsweise Corticosteroide<sup>156,157</sup>. Gemeinsam ist all diesen Substanzen, dass sie die Differenzierung und Maturierung von DCs inhibieren, indem sie sich negativ auf die NF- $\kappa$ B Aktivität auswirken und somit die Oberflächenexpression kostimulatorischer Moleküle und die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-12 reduzieren und die T-Zell-Aktivierungskapazität vermindern<sup>145</sup>. Darüber hinaus weisen diese Substanzen jedoch unerwünschte pleiotrope Nebenwirkungen auf, die unter anderem die Lebensfähigkeit sowie das Migrationsverhalten von DCs negativ beeinflussen<sup>375</sup>. Aus diesem Grund ist die gegenwärtige Forschung auf die Identifikation und gerichtete Modulation von Schlüsselmolekülen fokussiert, die essentiell für die tolerogene Funktion konditionierter DCs sind. Eine effiziente Überexpression dieser Moleküle in DCs könnte die Zellen in einem tolerogenen Modus arretieren, wodurch sie ein interessantes Vakzin für immuntherapeutische Anwendungen darstellen<sup>621</sup>.

## 4.1 Immature BM-DCs und DEX-APCs weisen eine geringe APC-Aktivität auf und induzieren *de novo* iTregs mit unterschiedlichen phänotypischen Charakteristika

Die vorliegende Arbeit knüpft in ihren Zielsetzungen an die vorgenannten Forschungsansätze an: Im ersten Abschnitt erfolgte die Identifikation von Molekülen, die einen potentiellen Beitrag zum tolerogenen Status muriner APCs leisten. Nachfolgend wurden verschiedene dieser Moleküle einzeln in DCs lentiviral überexprimiert und die Transduktanden phänotypisch sowie funktionell charakterisiert.

Als Modell für tolerogene, maturierungsresistente APCs wurden neben iDCs auch Knochenmarkszellen unter DC-differenzierenden Bedingungen in Gegenwart des Glucocorticoids (GC) Dexamethason (DEX) kultiviert (DEX-APCs). Das antiinflammatorische Pharmakon DEX wurde als tolerogenisierendes Agens ausgewählt, da GCs endogen als Komponente eines negativen Rückkopplungsmechanismus infolge einer Immunreaktion von Zellen des adrenalen Cortexes generiert werden <sup>160</sup>. In der klinischen Anwendung werden GCs auf Grund ihrer antiinflammatorischen Auswirkungen auf viele Zelltypen oft zur Behandlung von Autoimmunreaktionen und schweren allergischen Erkrankungen eingesetzt <sup>11</sup>. Die antiinflammatorische Wirkung von GCs korreliert in DCs mit einer reduzierten Aktivität der TFs NF- $\kappa$ B und AP-1 und resultiert dadurch in einer verminderten Expression von MHCII Molekülen, kostimulatorischen Rezeptoren <sup>169,622</sup> und proinflammatorischen Zytokinen wie IL-12 <sup>623</sup>. Diese Veränderungen im DC-Phänotyp durch die Behandlung mit GCs führt zu einer verminderten T-Zell-Stimulierungskapazität von DCs, wie sie bereits in verschiedenen Studien nachgewiesen wurde <sup>157,170</sup>. Darüber hinaus ist bereits bekannt, dass murine DEX-behandelte DCs einen tolerogenen Status aufweisen <sup>170</sup> und im Rahmen von Kokulturen anerge T<sub>H</sub>1-Zellen <sup>438</sup> sowie Tregs induzieren <sup>157</sup>. Inwieweit hierbei jedoch expandierte natürliche Tregs (nTreg) oder *de novo* induzierte Tregs (iTreg) beteiligt sind, wurde bisher nicht geklärt. Ähnliche Effekte wurden auch für DEX-behandelte humane Mo-DCs nachgewiesen <sup>622,624</sup>. Weiterhin resultiert die Stimulation allogener T-Zellen mit DEX-behandelten immaturren BM-DCs in einer Induktion suppressiver Tregs in Ratten <sup>625</sup>. In einer vergleichenden Studie wurde gezeigt, dass in Ratten diese alloantigenspezifische T-Zell-Hyporesponsivität auf eine Expansion von nTregs zurückgeht und IL-2 abhängig ist, während humane DEX-DCs auch in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> depletierten T-Zell-Populationen Tregs induzieren, die durch eine erhöhte IL-10 Sekretion charakterisiert sind <sup>626</sup>. Sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* wurde gezeigt, dass eine Stimulation mit DEX-DCs in einer Abnahme IFN- $\gamma$  produzierender und einer Zunahme IL-10 produzierender Zellen resultiert <sup>627</sup>. In Übereinstimmung mit diesen Analysen wurde in einer aktuellen Studie belegt, dass humane

DEX-DCs in naiven  $CD4^+CD25^-$  T-Zell Populationen antigenunspezifische IL-10 sekretierende,  $T_R1$ -ähnliche Tregs induzieren, deren suppressive Aktivität zellkontaktabhängig ist <sup>158</sup>.

In dieser Arbeit wurde zunächst bestätigt, dass allogene Gesamt-T-Zellen sowie  $CD25^+$  depletierte T-Zellen infolge einer Kokultur mit DEX-APCs durch eine starke Hypoproliferation gekennzeichnet sind. Das T-Zell-Aktivierungspotential von DEX-APCs befindet sich sowohl unter basalen Bedingungen sowie nach einer Stimulierung mit LPS deutlich unterhalb des Aktivierungspotentials immaturer BM-DCs. Eine ähnlich stark verminderte T-Zell-Stimulierungskapazität wurde bereits für stimulierte IL-10-vorbehandelte DCs nachgewiesen, die ebenfalls ein deutliches tolerogenes Potential aufweisen <sup>611</sup>. Aus der Feststellung, dass immature BM-DCs sowie unstimulierte und LPS-stimulierte DEX-APCs ineffiziente Stimulatoren allogener T-Zellen sind, resultierte die Annahme, dass alle drei APC-Populationen das Potential haben, *de novo* Tregs zu induzieren.

Eine der beiden Schlüsseleigenschaften von Tregs ist die Anergie <sup>97,628</sup>. Anergie ist immunologisch definiert als die Unfähigkeit antigenspezifischer T-Zellen, nach einer Reaktivierung mit APCs, IL-2 zu produzieren und klonal zu expandieren <sup>629</sup>. Die Induktion von Anergie ist ein aktiver Prozess, der unter anderem dann eintritt, wenn TCRs an Antigenpeptid/MHC-Komplexe binden, jedoch keine gleichzeitige Kostimulation stattfindet <sup>630</sup>. Eine weitere spezifische Eigenschaft von Tregs ist ihre suppressive Aktivität, was bedeutet, dass antigenspezifische Tregs effektiv die Antwort naiver oder antigenspezifischer T-Effektorzellen inhibieren können <sup>119</sup>.

In verschiedenen Studien wurde nachgewiesen, dass die Präsentation von Antigenpeptiden durch iDCs in antigenspezifischen T-Zellen einen solchen anergen oder toleranten Status induzieren kann <sup>631,632</sup>. *In vitro* resultiert die repetitive Stimulation humaner naiver  $CD4^+$  T-Zellen mit allogeneren iDCs in einer Generierung alloantigenspezifischer Tregs <sup>439</sup>. Die Injektion allogener iDCs induziert eine alloantigenspezifische Hyporesponsivität in murinen T-Lymphozyten *in vivo* (Lutz et al., 2000). Weiterhin verlängert die Injektion von iDCs vor einer allogeneren Herztransplantation die Überlebenszeit des Transplantats <sup>633,634</sup>. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass nicht nur das  $CD4^+$ -, sondern auch das  $CD8^+$ -Kompartiment betroffen ist, da *in vivo* eine Induktion von Influenza-Matrix-Peptid-spezifischen  $CD8^+$  Tregs infolge einer Injektion mit antigengepulsten humanen iDCs auftritt <sup>635</sup>. Durch iDCs induzierte suppressive T-Zell-Populationen weisen einen äußerst geringen Proliferationsstatus auf und produzieren große Mengen an IL-10. Ihre inhibitorische Aktivität galt lange Zeit als strikt zellkontaktabhängig <sup>113,439</sup>. Sie gleichen somit in ihren Eigenschaften stark nTregs, die im Thymus generiert werden. Neuere Studien zeigen jedoch, dass eine repetitive Stimulierung humaner naiver  $CD4^+$  T-Zellen mit Monozyten-abgeleiteten iDCs in einer Generierung adaptiver regulatorischer TGF- $\beta$ 1/IL-10 doppelt-positiver  $T_R1$ -Zellen resultiert <sup>636,637</sup>.  $T_R1$ -

Zellen differenzieren typischerweise in der Gegenwart von IL-10 und regulieren T-Zell-Antworten durch ihre Fähigkeit, die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$ 1 zu produzieren<sup>442,444</sup>.

An dieser Stelle setzt die vorliegende Arbeit an - im murinen System wurden alle Analysen zur Induktion von Tregs durch iDCs bislang mit Gesamt-T-Zellen durchgeführt. Es kann daher keine definitive Aussage darüber getroffen werden, ob iDCs eine Expansion von nTregs initiieren, oder tatsächlich fähig sind, *de novo* iTregs zu induzieren. Abweichend von den bisherigen experimentellen *in vitro*-Systemen wurden hier deshalb allogene CD25<sup>+</sup> nTreg-depletierte T-Zellen mit immaturren BM-DCs vorstimuliert und anschließend phänotypisch und funktionell charakterisiert. Es zeigte sich, dass das tolerogene Potential immaturren BM-DCs stark genug ist, um in einer CD25<sup>-</sup> T-Zell-Population tatsächlich *de novo* iTregs zu induzieren. Entsprechend vorstimulierte alloreaktive T-Zellen waren refraktär gegenüber einer Restimulation und zeigten ausgeprägte suppressive Eigenschaften, indem sie die Proliferation kokultivierter naiver T-Zellen infolge einer allogener Stimulation inhibierten. Studien mit IL-10-behandelten humanen DCs zeigen, dass tolerogene DCs *in vitro* sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> Tregs induzieren können<sup>441</sup>. Ausgehend von diesem Befund wurden die durch immature BM-DCs vorstimulierten nTreg-depletierten T-Zellen in die beiden zuvor genannten Subpopulationen positiv separiert und getrennt voneinander analysiert. Soweit bekannt, konnte hierdurch erstmals gezeigt werden, dass immature BM-DCs *de novo* CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Tregs mit einem anergen Status induzieren, die jeweils die proliferative Antwort naiver T-Zellen effektiv supprimieren.

Analog zu den hier durchgeführten Analysen mit immaturren BM-DCs und aufbauend auf den eingangs genannten Studien zur tolerogenen Aktivität DEX-behandelter DCs wurde in dieser Arbeit demonstriert, dass sowohl unstimulierte, als auch LPS-stimulierte DEX-APCs in allogener nTreg-depletierte T-Zellen einen anergen Status induzieren. Darüber hinaus sind die durch DEX-APCs *de novo* induzierten iTreg-Populationen im Stande, die Proliferation naiver T-Zellen effektiv zu inhibieren. Die jeweils induzierten iTregs wurden ebenfalls positiv in die Subpopulationen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> separiert. Mit Hilfe von Restimulierungs- und Suppressionsassays wurde in dieser Arbeit erstmals gezeigt, dass unstimulierte und LPS-stimulierte DEX-DCs in einer CD25<sup>-</sup> T-Zell-Population *de novo* anerge CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> iTregs mit suppressivem Potential induzieren können.

Es gilt als erwiesen, dass neben CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> nTregs, die im Thymus generiert werden, weitere CD4<sup>+</sup> iTregs existieren. Es handelt sich hierbei um sekundäre suppressive T-Zellen, die sich aus konventionellen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen in der Peripherie entwickeln. Anders als CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> nTregs übermitteln diese iTregs ihre suppressiven Eigenschaften nicht zwangsläufig zellkontaktabhängig, sondern vielfach über Zytokine wie IL-10 und TGF-

$\beta 1$ <sup>442,638,639</sup>. Aktuell werden insbesondere zwei Subtypen von  $CD4^+$  iTregs,  $T_{R1}$ -<sup>444</sup> und  $T_{H3}$ -Zellen<sup>604</sup>, diskutiert. Die Generierung von  $T_{R1}$ -Zellen aus einer Population humaner oder muriner  $CD4^+$  T-Zellen *in vitro* wurde erstmals von Groux und Mitarbeitern beschrieben<sup>442</sup>. Das Zytokinprofil dieser Zellen zeichnet sich durch eine starke Sekretion von IL-10<sup>640</sup>, gemäßigten Mengen an IL-5 und IFN- $\gamma$  mit oder ohne TGF- $\beta 1$ <sup>444</sup> aus. Darüber hinaus weisen  $T_{R1}$ -Zellen eine lediglich marginale oder gar keine Sekretion von IL-2 und IL-4 auf<sup>641</sup>. Es gibt Studien, die zeigen, dass  $T_{R1}$ -Zellen ihre suppressive Aktivität mittels der Zytokine IL-10 und TGF- $\beta 1$  ausüben<sup>442,642</sup>. Andere Untersuchungen hingegen zeigten eine zytokinunabhängige, Zell-Zell-Kontakt vermittelte Suppression<sup>113</sup>. Diese Diskrepanzen könnten darauf hinweisen, dass verschiedene  $T_{R1}$ -Subpopulationen existieren, oder beruhen auf den unterschiedlichen experimentellen Systemen.  $T_{R1}$ -Zellen sind in die Regulation verschiedener Autoimmunerkrankungen involviert, wie im Rahmen der murinen Krankheitsmodelle Kolitis<sup>442</sup> und EAE<sup>643</sup> demonstriert wurde und tragen zur Transplantattoleranz bei<sup>644</sup>. Weiterhin ist bekannt, dass bestimmte Tumorarten<sup>645,646</sup> und Krankheitserreger<sup>647,648</sup>  $T_{R1}$ -Zellen induzieren, um so ein immunsuppressives Mikromilieu zu generieren bzw. der Immunabwehr zu entgehen.  $T_{H3}$ -Zellen wurden erstmals in Mäusen nach einer oralen Toleranzinduktion gegenüber MBP (*myelin basic protein*) identifiziert<sup>649</sup>. Phänotypisch zeichnen sich diese Zellen durch eine hohe TGF- $\beta 1$  Produktion<sup>650,651</sup>, studienabhängig mit oder ohne Sekretion von IL-10, IL-4 sowie IFN- $\gamma$ , aus<sup>604,652</sup>. IL-2 wird von  $T_{H3}$ -Zellen nicht sekretiert<sup>652</sup>. Soweit bisher bekannt, wird die suppressive Aktivität dieser iTregs hauptsächlich durch die Sekretion von TGF- $\beta$  getragen und ist zellkontaktunabhängig.  $T_{H3}$ -Zellen tragen nachweislich zur regulatorischen Kontrolle verschiedener Autoimmunerkrankungen bei<sup>604,653</sup>. Darüber hinaus sind  $T_{H3}$ -Zellen in der Lage, Allotransplantattoleranz zu vermitteln<sup>654</sup> und eine antigenspezifische Hyporesponsivität von Immunzellen im Rahmen einer Helmintheninfektion zu induzieren<sup>655</sup>. Konventionelle  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen können außerhalb des Thymus in  $Foxp3^+$  Tregs umgewandelt werden, die sich phänotypisch und funktionell nicht von nTregs unterscheiden<sup>656-658</sup>. *In vitro* findet diese Induktion in Gegenwart von TGF- $\beta$ <sup>659</sup> und typischerweise in Situationen mit geringer Kostimulation statt<sup>660,661</sup>. Zusätzlich erfordert dieser Prozess eine CTLA-4-vermittelte negative Kostimulation<sup>662</sup>. *In vivo* tritt die periphere Induktion von  $Foxp3^+$  Tregs bei einer subimmunogenen Antigenstimulation ein<sup>663-665</sup>. In Übereinstimmung mit *in vitro*-Studien wird hierzu TGF- $\beta$ - und eine geringfügige B7-Kostimulation benötigt<sup>666,667</sup>.

$CD8^+$  Tregs wurden erstmals von Gershon und Mitarbeitern<sup>668</sup> beschrieben.  $CD8^+CD28^-$  Tregs supprimieren Antikörperantworten auf lösliche und zellassozierte Antigene<sup>669,670</sup> sowie Antworten gegen Superantigene<sup>671,672</sup>. *In vivo* sind diese Zellen an der Suppression von Autoimmunerkrankungen<sup>673,674</sup>, Transplantatabstossungen<sup>675</sup> sowie virusinduziertem

Asthma<sup>676</sup> beteiligt. Die Immunregulation durch CD8<sup>+</sup> Tregs kann mutmaßlich über verschiedene Mechanismen erfolgen. Entweder kann es zur direkten Lyse oder zur Induktion von Apoptose kommen, oder es findet eine Inaktivierung von Zielzellen durch soluble Faktoren wie immunsuppressive Zytokine statt. Indirekt ist auch eine Suppression durch eine CD8<sup>+</sup> Treg-vermittelte Modifikation von APCs möglich<sup>104,677</sup>. Potentielle Zytokine für die Vermittlung suppressiver Eigenschaften sind IL-4, TGF- $\beta$ 1 oder auch IL-10<sup>678-680</sup>.

Wie vorstehend erläutert, variieren verschiedene iTreg-Populationen phänotypisch und funktionell stark voneinander und können somit auf Grund ihrer Zytokinprofile sowie Genexpressionssignaturen bestimmter Treg-Markerproteine kategorisiert werden. In Kokulturen immaturer BM-DCs mit nTreg-depletierten allogenen T-Zellen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit höhere Mengen der drei Markerzytokine IFN- $\gamma$ , IL-5 und IL-10 nachgewiesen, als in den entsprechenden Kokulturen mit unstimulierten und LPS-stimulierten DEX-DCs. Das ambivalente T<sub>H</sub>2/Treg-Markerzytokin IL-10 wurde in den beiden letztgenannten Kokulturen nicht detektiert.

Infolge einer allogenen Restimulation weisen die verschiedenen CD4<sup>+</sup> iTreg-Populationen eine jeweils vergleichbare IL-5 Sekretion auf. Durch stimulierte DEX-APCs induzierte CD4<sup>+</sup> iTregs weisen darüber hinaus im Gegensatz zu den beiden anderen iTreg-Populationen eine hohe IFN- $\gamma$  und IL-10 Produktion auf. Anergie CD8<sup>+</sup> iTregs, die durch immature BM-DCs oder unstimulierte DEX-APCs induziert wurden, zeigen nach einer Restimulation keine IL-5 Sekretion sowie eine jeweils vergleichbare IFN- $\gamma$  Produktion. Während durch immature BM-DCs induzierte CD8<sup>+</sup> iTregs zusätzlich auch IL-10 produzieren, wurde dieses Zytokin nach einer allogenen Restimulation von durch unstimulierte DEX-APCs induzierten CD8<sup>+</sup> iTregs nicht detektiert.

Der Einfluss der verschiedenen in dieser Arbeit generierten iTreg-Populationen auf die Zytokinsekretion kokultivierter naiver allogener T-Zellen ist ebenfalls variabel. Alle drei *de novo* induzierten CD4<sup>+</sup> iTreg-Populationen hemmen die IL-5 Produktion kokultivierter naiver T-Zellen vergleichbar stark. Die IFN- $\gamma$  Produktion hingegen wird am stärksten von CD4<sup>+</sup> iTregs supprimiert, die durch immature BM-DCs induziert wurden. Durch unstimulierte BM-DCs und DEX-APCs induzierte CD4<sup>+</sup> iTreg inhibieren ebenfalls effektiv die IL-10 Sekretion, während der suppressive Mechanismus von durch stimulierte DEX-APCs induzierten CD4<sup>+</sup> iTregs sich nur geringfügig auf die Produktion dieses Zytokins in naiven T-Zellen auswirkt. Auffallend ist, dass durch unstimulierte BM-DCs induzierte CD8<sup>+</sup> iTregs im Gegensatz zu den entsprechenden CD4<sup>+</sup> iTreg-Populationen keinen Einfluss auf die IFN- $\gamma$  Sekretion naiver T-Zellen haben. Durch immature BM-DCs induzierte CD8<sup>+</sup> iTregs verringern die IL-5 und IL-10 Produktion, während die Sekretion beider Zytokine durch CD8<sup>+</sup> iTregs, die durch unstimulierte DEX-APCs induziert wurden, vollständig unterbunden wird.



Die verschiedenen, bislang wissenschaftlich beschriebenen iTreg-Populationen unterscheiden sich nicht nur in der Sekretion bestimmter Markerzytokine, sondern auch in ihren Genexpressionsprofilen. Trotzdem gibt es diverse generelle Treg-assoziierte Marker, die diese Populationen von naiven und Effektor-T-Zellen abgrenzen. In Übereinstimmung mit ihren funktionellen Eigenschaften zeigen die hier beschriebenen, durch immature BM-DCs und DEX-APCs *de novo* induzierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> iTregs eine deutlich erhöhte mRNA-Expression des im murinen System am besten etablierten Treg-Markers Foxp3 sowie des vor allem im Zusammenhang von Transplantattoleranz<sup>483</sup> diskutierten sekretierten Moleküls LIF im Vergleich zu naiven T-Zellen. Die entsprechenden CD8<sup>+</sup> iTreg-Populationen sind darüber hinaus durch eine gesteigerte LAG3 mRNA-Menge charakterisiert. Dieses Protein wird ebenfalls von durch immature BM-DCs vorstimulierten CD4<sup>+</sup> iTregs verstärkt exprimiert. Auffällig ist, dass alle drei CD4<sup>+</sup> iTreg-Populationen das antiinflammatorische Zytokin IL-10 gegenüber naiven T-Zellen in signifikant reduzierten Mengen transkribieren. Unter den CD8<sup>+</sup> iTreg-Populationen weisen durch unstimulierte DEX-APCs induzierte CD8<sup>+</sup> iTregs das gleiche Phänomen auf. Durch stimulierte DEX-APCs induzierte CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> iTregs grenzen sich von den vier anderen analysierten iTreg-Populationen durch ihr extrem stark reduziertes CTLA-4 mRNA-Niveau, bezogen auf die Transkription in naiven T-Zellen, sowie eine nicht nachweisbare NRP-Transkription ab. NRP wird in murinen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen mit Foxp3 koreguliert und korreliert *in vitro* mit der suppressiven Funktion von Tregs<sup>501</sup>. Eine Stimulation der verschiedenen induzierten iTregs hebt ihren anergen Status bzw. ihre suppressive Aktivität nicht auf, verändert jedoch in dieser Arbeit in allen Fällen das jeweilige Genexpressionsprofil. Bemerkenswert ist, dass durch eine kombinierte anti-CD3 und anti-CD28 Stimulation in allen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> iTregs die Transkription des Treg-Markers Foxp3 deutlich abnimmt und sich ungefähr auf dem Expressionsniveau in den entsprechenden naiven T-Zellen befindet. Ebenfalls einheitlich wird in allen iTreg-Populationen die mRNA-Expression von RGS-Proteinen hochreguliert. Mit Ausnahme von iTregs, die durch immature BM-DCs differenziert wurden, wird auch die Transkription des Oberflächenrezeptors CTLA-4 in Reaktion auf den Stimulus in allen iTreg-Gruppen gesteigert. Alle drei CD8<sup>+</sup> iTreg-Populationen zeigen im Zuge der Stimulation eine verminderte LAG3 und IL-10 Expression. Im Gegensatz dazu wird einheitlich in allen analysierten CD4<sup>+</sup> iTreg-Populationen die IL-10 mRNA-Expression positiv reguliert. Außerdem reagieren CD4<sup>+</sup> iTregs, die durch unstimulierte oder LPS-stimulierte DEX-APCs induziert wurden, mit einer Aufregulation der LAG3 Expression auf den Stimulus. Auffällig ist, dass durch stimulierte DEX-APCs induzierte iTregs auch nach einer Restimulation keine nachweisbare NRP mRNA-Expression zeigen, wodurch sie sich deutlich von den anderen iTreg-Populationen unterscheiden.

Ein wichtiges Merkmal zur Identifizierung bzw. genaueren Charakterisierung von Tregs ist der zur Vermittlung der suppressiven Aktivität verwendete Mechanismus. Wie bereits beschrieben, kann dies entweder zellkontaktabhängig oder durch soluble Mediatoren stattfinden. Vor allem das Oberflächenprotein CTLA-4 kann als negativer Regulator der T-Zell-Aktivierung fungieren<sup>681</sup>, während das antiinflammatorische Zytokin IL-10 häufig als sekretierter Faktor auftritt. Eine Blockade von CTLA-4 oder IL-10 durch Antikörper hat in der vorliegenden Arbeit keinen Einfluss auf das suppressive Potential von CD4<sup>+</sup> iTregs, die durch immature BM-DCs induziert wurden. Auch die Zugabe verschiedener Zytokine oder LPS führte zu keiner veränderten suppressiven Funktion.

In der Gesamtheit betrachtet dokumentieren die Zytokin- und Genexpressionsprofile der verschiedenen CD4<sup>+</sup> iTreg-Populationen, dass eine Einordnung in die bisher beschriebenen Gruppen (T<sub>R</sub>1, T<sub>H</sub>3 sowie induzierte CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen) nicht direkt möglich ist. Durch immature BM-DCs induzierte CD4<sup>+</sup> iTregs könnten auf Grund ihrer Zytokinsekretion, also wenig oder kein IL-10 und IFN- $\gamma$ , als T<sub>H</sub>3-ähnliche Zellen kategorisiert werden. Allerdings ist das ermittelte Genexpressionsprofil nicht konsistent mit dieser Eingruppierung. T<sub>H</sub>3-Zellen weisen eine erhöhte CTLA-4 Expression<sup>682</sup> sowie eine gesteigerte TGF- $\beta$  Sekretion auf<sup>444</sup>, die hier in beiden Fällen auf mRNA-Ebene auch infolge einer Stimulation nicht detektiert wurde. Vor allem letzterer ist ein sehr wichtiger Faktor für T<sub>H</sub>3-Zellen, da sie *in vitro* über diesen Mechanismus ihre suppressive Funktion ausüben. Übereinstimmend mit den in der Literatur beschriebenen T<sub>H</sub>3-Eigenschaften, resultiert eine Blockade von IL-10 nicht in einem Verlust des suppressiven Potentials dieser CD4<sup>+</sup> iTregs. Diese Daten stehen somit im Kontrast zu Resultaten mit humanen Monozyten-abgeleiteten iDCs, für die eine Induktion TGF- $\beta$ 1/IL-10 doppelt-positiver T<sub>R</sub>1-Zellen nachgewiesen wurde<sup>636,637</sup>.

Durch unstimulierte DEX-APCs induzierte CD4<sup>+</sup> iTregs zeigen ein mit CD4<sup>+</sup> iTregs, die durch immature BM-DCs vorstimuliert wurden, tendenziell übereinstimmend T<sub>H</sub>3-artiges Zytokinprofil. Darüber hinaus weisen diese Zellen nach einer Restimulation aber zusätzlich auch eine Aufregulation der CTLA-4 und TGF- $\beta$ 1 Transkription auf.

Für die beiden genannten CD4<sup>+</sup> iTreg-Populationen liegen somit phänotypische Profile vor, die jeweils eine Tendenz in Richtung *de novo* induzierter T<sub>H</sub>3-Zellen favorisieren. Eine zweifelsfreihere Einordnung erfordert jedoch vor allem eine Analyse der TGF- $\beta$ 1 Sekretion sowie die Klärung der Frage nach einer Beteiligung dieses Zytokins am suppressiven Mechanismus, da TGF- $\beta$ 1 einen zentralen Mediator von T<sub>H</sub>3-Zellen darstellt. Zusätzliche Transparenz könnte durch die Bestimmung der Oberflächenexpression von CTLA-4 erreicht werden, da dieses Molekül in erhöhten Mengen auf der Oberfläche von T<sub>H</sub>3-Zellen auftritt. Steinbrink und Mitarbeiter<sup>441</sup> haben gezeigt, dass durch IL-10-behandelte humane DCs CD4<sup>+</sup> Tregs induziert werden, deren suppressive Aktivität über den CTLA-4

Signaltransduktionsweg vermittelt wird. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde durch Blockierungsanalysen zwar ausgeschlossen, dass durch immature BM-DCs vorstimulierte CD4<sup>+</sup> iTregs diesen Mechanismus verwenden, jedoch könnte er eine essentielle Relevanz für CD4<sup>+</sup> iTregs haben, die durch unstimulierte DEX-APCs induziert wurden.

CD4<sup>+</sup> iTregs, die durch LPS-stimulierte DEX-APCs induziert wurden, weichen phänotypisch stark von den beiden zuvor genannten iTreg-Populationen ab. Ihr Zytokinprofil ist durch eine hohe Sekretion der beiden Markerzytokine IFN- $\gamma$  und IL-10, sowie eine gemäßigte IL-5 Produktion geprägt. Insofern handelt es sich hierbei somit eher um T<sub>R</sub>1-ähnliche, *de novo* induzierte iTregs. Diese Daten decken sich mit einer aktuellen Studie, in der gezeigt wurde, dass humane DEX-DCs in naiven CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zell-Populationen IL-10 sekretierende T<sub>R</sub>1-ähnliche Tregs induzieren können<sup>158</sup>. Das ermittelte Genexpressionsprofil fügt sich jedoch nicht in diese Annahme, da durch stimulierte DEX-APCs induzierte CD4<sup>+</sup> iTregs eine äußerst geringe CTLA-4 mRNA-Expression aufweisen, wie sie eigentlich für T<sub>R</sub>1-Zellen untypisch ist<sup>646</sup>. Auch nach einer Restimulation wird in diesen iTregs die Transkription von CTLA-4 nur marginal gesteigert. Besser vereinbar mit der Annahme, dass es sich um eine Subpopulation von T<sub>R</sub>1-Zellen handeln könnte, ist die vor allem nach einer Restimulation erhöhte TGF- $\beta$ 1 Transkription. Dieser Befund ist konform mit Studien, die gezeigt haben, dass *in vitro* eine Induktion adaptiver regulatorischer TGF- $\beta$ 1/IL-10 doppelt-positiver T<sub>R</sub>1-Zellen möglich ist<sup>636,637</sup>. Auch hier gilt, dass die Analysen der CTLA-4 sowie TGF- $\beta$ 1 mRNA-Expression auf Proteinebene verifiziert werden sollten, um eine bessere Eingruppierung der durch stimulierte DEX-APCs induzierten CD4<sup>+</sup> iTregs vornehmen zu können. Darüber hinaus würden Blockierungsstudien, vor allem für IL-10, einen besseren Einblick in den oder die zugrundeliegenden Mechanismen der Suppression gewähren.

Alle in dieser Arbeit analysierten APC-Populationen (immature BM-DCs, unstimulierte und LPS-stimulierte DEX-APCs) haben darüber hinaus auch das Potential, anerge CD8<sup>+</sup> iTregs mit suppressiven Eigenschaften zu induzieren. Im Gegensatz zu CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist eine induzierte Anergie von CD8<sup>+</sup> T-Zellen bisher wesentlich weniger intensiv untersucht worden<sup>683,684</sup>. Auch die Mechanismen, die zur Vermittlung suppressiver Aktivitäten von CD8<sup>+</sup> Tregs eingesetzt werden, sind bisher nur in sehr wenigen Studien analysiert worden. Ähnlich wie für CD4<sup>+</sup> Tregs gibt es auch im Bereich der CD8<sup>+</sup> Tregs keinen eindeutigen Marker, der sie von konventionellen T-Zellen unterscheidet. Stattdessen werden diese Tregs auf Grund der Zusammensetzung ihrer Zelloberflächenexpression in zahlreiche Subpopulationen unterschieden. Da die drei im Rahmen dieser Arbeit durch die verschiedenen APC-Populationen *de novo* induzierten CD8<sup>+</sup> iTreg-Populationen den TF Foxp3 in erhöhten Mengen transkribieren, könnten sie den CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup><sup>685</sup>, CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup><sup>686</sup> oder CD8<sup>+</sup>CD45RC<sup>low</sup><sup>687</sup> Tregs angehören, da diese Foxp3<sup>+</sup> sind. Alle anderen bisher bekannten

CD8<sup>+</sup> iTreg-Populationen sind Foxp3<sup>+</sup>. Darüber hinaus ist bekannt, dass die drei vorgenannten CD8<sup>+</sup> Treg-Populationen das Oberflächenprotein CTLA-4 tragen und IL-10 sekretieren. Für CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs wurde außerdem eine IFN- $\gamma$  Produktion<sup>686</sup> und für CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> Tregs eine TGF $\beta$  Sekretion<sup>688</sup> nachgewiesen. Auf transkriptionaler Ebene liegt die Menge an CTLA-4 in allen hier analysierten CD8<sup>+</sup> iTreg-Populationen auch nach einer Restimulation nicht höher als in den entsprechenden stimulierten naiven T-Zellen. Durch unstimulierte oder stimulierte DEX-APCs vorstimulierte CD8<sup>+</sup> iTregs zeigen außerdem eine deutlich erhöhte TGF $\beta$ -1 mRNA-Expression in Reaktion auf eine Restimulation, als stimulierte naive T-Zellen. Damit eine detailliertere Charakterisierung der *de novo* induzierten CD8<sup>+</sup> iTregs erfolgen kann, ist es erforderlich, die Expression der beiden genannten Faktoren auch auf Proteinebene zu überprüfen. Das Zytokinprofil von CD8<sup>+</sup> iTregs, die durch unstimulierte BM-DCs oder DEX-APCs vorstimuliert wurden, zeigt einheitlich in Reaktion auf eine allogenen Restimulation keine IL-5 Produktion sowie eine jeweils vergleichbar starke IFN- $\gamma$  Sekretion. Außerdem produzieren durch immature BM-DCs induzierte CD8<sup>+</sup> iTregs deutliche Mengen an IL-10.

Auf Grund der wenigen Vergleichsdaten aus anderen Studien kann auch das hier ermittelte Zytokinprofil nur eingeschränkt für die Eingruppierung der verschiedenen induzierten CD8<sup>+</sup> iTreg-Populationen verwendet werden. Vorteilhaft wäre in nachfolgenden Studien eine Bestimmung der Oberflächenexpression verschiedener im Kontext mit CD8<sup>+</sup> Tregs nachgewiesener Proteine wie CD25, CD28, CD45RC oder CD122.

### **4.2 Toleranzinduzierende DEX-APCs weisen ein spezifisches protolerogenes Genexpressionsprofil auf**

Die Kultivierung von Knochenmarkszellen unter DC-differenzierenden Bedingungen in Gegenwart des synthetischen GCs DEX resultiert in der Ausbildung tolerogener, maturierungsresistenter APCs. Diese DEX-APCs haben, wie in dieser Arbeit erstmals beschrieben, unabhängig von ihrem Aktivierungszustand das tolerogene Potential, *de novo* iTregs zu induzieren. Von besonderer Relevanz ist vor allem das Genexpressionsprofil dieser Modell-APCs, auf dessen Grundlage toleranzassoziierte Moleküle für eine lentivirale Überexpression in BM-DCs selektiert werden sollten. Eine selektive genetische Modulation solcher Schlüsselmoleküle in DCs könnte ausreichen, diese Zellen in einem tolerogenen Status zu arretieren und auf diese Weise T-Zell-Toleranz zu induzieren.

Es ist bekannt, dass DEX mit der NF- $\kappa$ B-Aktivität interferiert und über diesen Mechanismus einen Großteil seiner antiinflammatorischen Aktivität vermittelt<sup>689</sup>. Im Detail induzieren GCs unter anderem die Transkription von I $\kappa$ B $\alpha$ , was in einer erhöhten I $\kappa$ B $\alpha$ -Proteinsynthese

resultiert und zu einer Reduktion der freien Menge an NF- $\kappa$ B führt, das in den Nukleus translozieren kann<sup>690-692</sup>. Außerdem kann der Glucocorticoidrezeptor (GR) in seiner aktivierten Form eine physikalische Interaktion mit der p65-Untereinheit des NF- $\kappa$ B-Komplexes eingehen, wodurch entweder die Bindung des TF an die DNA blockiert wird<sup>693-695</sup> und/oder ein Verlust der DNA-Bindungsaffinität des TF eintritt<sup>696,697</sup>. Weiterhin reduzieren GCs die Aktivität des TF AP-1. Die zugrunde liegenden Mechanismen der negativen AP-1 Regulation ähneln stark denen für NF- $\kappa$ B. So kann der aktivierte GR mit der c-Jun Untereinheit von AP-1 eine direkte Protein-Protein Interaktion eingehen und so die transkriptionale Aktivität supprimieren<sup>698</sup>.

Eine Aktivierung von DCs beispielsweise via TLRs resultiert in einer Translokation des TF NF- $\kappa$ B in den Nukleus<sup>515</sup> sowie in einer erhöhten Transkription von NF- $\kappa$ B-Familienmitgliedern<sup>171</sup>. In Übereinstimmung mit ihrem tolerogenen, maturierungsresistenten Phänotyp weisen die hier generierten DEX-APCs unter basalen Bedingungen sowie nach einer Stimulierung mit LPS gegenüber BM-DCs deutlich verminderte mRNA-Expressionsraten für die NF- $\kappa$ B-Familienmitglieder NF- $\kappa$ B1, NF- $\kappa$ B2, RelB und c-Rel auf. Die Transkription von RelA ist lediglich in unstimulierten DEX-APCs reduziert. In ähnlicher Weise fanden Xing und Mitarbeiter<sup>699</sup> in Reaktion auf eine DEX-Behandlung in murinen DCs ebenfalls eine verringerte mRNA-Expression der Moleküle c-Rel und RelB, während die RelA Transkription nicht moduliert wird.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen zeigen, dass DEX-APCs einen distinkten protolerogenen Genexpressionsstatus aufweisen, jedoch nicht komplett resistent gegenüber einer Stimulation sind. Sie zeigen sogar eine erhöhte Transkription verschiedener TLRs wie beispielsweise TLR4. Dies könnte die Sensitivität von DEX-APCs gegenüber pathogenabgeleiteten, immunstimulatorischen Komponenten wie LPS erhöhen. Konsistent mit diesen Resultaten wurde auch in humanen DEX-behandelten DCs eine erhöhte Expression von TLR2, TLR3 und TLR4 gefunden<sup>700</sup>.

Die Expression kostimulatorischer Moleküle auf DCs ist essentiell für die Induktion einer effektiven Immunantwort. Die Erkennung von MHC-Peptid-Komplexen durch TCRs resultiert in einer initialen Aktivierung von T-Zellen. Folgt diesem ersten Kontakt keine Bindung kostimulatorischer Moleküle sowie keine Sekretion inflammatorischer Zytokine, wird die T-Zelle nicht vollständig aktiviert, sondern erlangt einen hyporesponsiven Status<sup>60,89</sup>. Daraus ergibt sich, dass unstimulierte und LPS-stimulierte DEX-APCs, für die in dieser Arbeit nachgewiesen wurde, dass sie *de novo* iTregs induzieren können, eine ähnlich ineffiziente Expression kostimulatorischer Rezeptoren aufweisen könnten wie iDCs. In den entsprechenden Genexpressionsstudien kristallisierte sich deutlich heraus, dass DEX-APCs eine wesentlich geringere Transkriptionsrate für die kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80, CD86, 4-1BBL, OX40L sowie SLAM aufweisen, als iDCs. Mit Ausnahme von CD80

wird in DEX-APCs im Gegensatz zu muren DCs keines der vorgenannten Moleküle in Reaktion auf eine Stimulation mit LPS verstärkt exprimiert. Dieses mRNA-Profil konvergiert mit Befunden, dass stimulierte murine BM-DCs, die zuvor mit DEX behandelt wurden, im Vergleich zu muren DCs, eine verminderte Oberflächenexpression von CD40 und CD86 aufweisen, während die Expression von CD80 nicht beeinträchtigt wird<sup>173</sup>. In humanen DCs wurde nach einer Kultivierung in Gegenwart von DEX eine starke<sup>438</sup> bzw. partielle<sup>169</sup> Inhibition der Expression von CD40, CD80 und CD86 detektiert. Im Rahmen einer Ausreifung mit LPS wurde die Oberflächenexpression der drei genannten Rezeptoren in humanen DCs nicht hochreguliert<sup>624</sup>. Interessanterweise resultierte eine Behandlung mit DEX während der Stimulation in der murinen DC-Linie SP37A3 in keiner Modulation der mRNA-Expression von CD40, CD80 und CD86, obwohl die Oberflächenexpression aller drei Rezeptoren im Vergleich zu stimulierten Kontrollansätzen stark reduziert war<sup>157</sup>. In der gleichen Studie wurde weiterhin gezeigt, dass DEX einen negativen Einfluss auf die OX40L Transkription in DCs ausübt. Es ist anzunehmen, dass die starke Varianz zwischen den verschiedenen Studien darauf zurückzuführen ist, dass GCs den DC Status je nach Differenzierungs- bzw. Reifungsstadium zum Zeitpunkt der Behandlung unterschiedlich stark beeinflussen<sup>701</sup>.

Abgesehen von der deutlich reduzierten Expression kostimulatorischer Rezeptoren, ist das Genexpressionsprofil der hier generierten, tolerogenen DEX-APCs zusätzlich durch eine äußerst geringe Transkription der beiden Reifungsmarker Fascin1 und CCR7 geprägt. Humane<sup>136</sup> und murine<sup>138</sup> DCs regulieren die Expression des Aktinbündelungsprotein Fascin, welches essentiell für die Ausbildung der Dendriten reifer DCs ist, in Reaktion auf eine Stimulierung stark hoch. Diese maturierungsassoziierte Modulation der transkriptionalen Aktivität tritt in DEX-APCs nicht auf. Eine eingeschränkte Aufregulation der Fascin Expression zeigte sich auch in SP37A3-Zellen, die in Gegenwart von DEX stimuliert wurden<sup>157</sup>. Auch der Chemokinrezeptor CCR7 wird infolge einer Ausreifung in DCs verstärkt exprimiert<sup>561,702</sup>. Eine Kultivierung von Milz-abgeleiteten Zellen der DC-Linie D1 in der Gegenwart von DEX resultierte ebenfalls in einer Inhibition der stimulierungsassoziierten Aufregulation der CCR7 Expression auf mRNA- und Protein-Ebene<sup>703</sup>. Zusammengefasst bestätigen die vergleichsweise geringen Expressionsniveaus kostimulatorischer Rezeptoren und DC-Maturierungsmarker in DEX-APCs die Annahme, dass es sich hier um äußerst potente, maturierungsresistente tolerogene murine APCs handelt.

Neben kostimulatorischen Rezeptoren besitzen DCs auch Zelloberflächenmoleküle mit potentiell inhibitorischer Funktion. Eine kontinuierliche DEX-Behandlung von BM-DC-Vorläufern hat in der hier durchgeführten Studie im Wesentlichen keinen Einfluss auf das Transkriptionsniveau koinhibitorischer Rezeptoren in den resultierenden murinen DEX-APCs, mit Ausnahme von B7-DC und B7-H2. Im Gegensatz dazu zeigt eine neuere Studie, dass

humane DEX-DCs eine erhöhte PD-L1 Oberflächenexpression aufweisen<sup>704</sup>. Die mRNA-Expression von B7-DC, welches scheinbar sowohl in positive als auch negative Stimulationsvorgänge involviert sein kann<sup>538,539</sup>, ist in unstimulierten und stimulierten DEX-APCs im Vergleich zur entsprechenden Kontroll-DC-Population stark reduziert. Infolge einer Stimulation mit LPS wird B7-H2 in DEX-APCs deutlich stärker transkribiert als in BM-DCs. Generell stimuliert die Bindung von B7-H2 an seinen Liganden ICOS die T-Zell-Proliferation sowie die Zytokinproduktion<sup>194,195</sup>. Eine aktuelle Studie im humanen System belegt jedoch, dass tolerogenen DCs nach einer Blockade der B7-H2-Ligation *in vitro* nicht mehr in der Lage sind, einen anergen und suppressiven Zustand in kokultivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu induzieren<sup>203</sup>. Es besteht also durchaus die Option, dass B7-H2 einen entscheidenden Beitrag zum tolerogenen Status LPS-stimulierter DEX-APCs leistet und somit einen potentiellen Kandidaten für eine lentivirale Überexpression in BM-DCs darstellt. In stimulierten SP7A3-Zellen wird die mRNA-Expressionsrate der inhibitorischer Oberflächenmoleküle B7-DC, PD-L1, B7-H2 sowie B7-H3 durch eine Aktivierung in Gegenwart von DEX nicht tangiert<sup>157</sup>.

Die Reduktion der Aktivität des TF NF- $\kappa$ B durch GCs resultiert in einer verminderten Transkription proinflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 und TNF- $\alpha$ <sup>166,705</sup>. Für Monozyten und Makrophagen wurde eine herunterregulierte Sekretion der vier genannten Zytokine nach einer Behandlung mit GCs auf Proteinebene detektiert<sup>623</sup>. Murine Monozyten zeigen in Reaktion auf eine Kultivierung in Gegenwart von DEX eine reduzierte IL-6 Transkription<sup>503</sup>. Nach einer Stimulierung mit LPS sekretieren humane DEX-DCs ebenfalls stark verminderte Mengen IL-1 $\beta$ , IL-12 und TNF- $\alpha$ . In Übereinstimmung mit diesen Daten weisen die hier generierten DEX-APCs eine deutlich runterregulierte mRNA-Expression für die Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 sowie IL-12b auf. Eine Stimulierung mit LPS führt in DEX-APCs, im Gegensatz zu BM-DCs, zu keiner maturierungsassoziierten Aufregulation der Expression von IL-6 und IL-12b. Auch SP37A3-Zellen, die in Gegenwart von DEX stimuliert wurden, zeigen eine inhibierte Aufregulation der Genexpression von IL-6 und IL-12b<sup>157</sup>. Obwohl IL-1 $\beta$  in DEX-APCs nach einer Stimulation stärker transkribiert wird als unter basalen Bedingungen, befindet sich die Expressionsrate deutlich unterhalb derer stimulierter BM-DCs. In dem vorliegenden System wird die Transkription von TNF- $\alpha$  durch die DEX-Behandlung nicht beeinflusst.

Innerhalb der Gruppe der antiinflammatorischen Zytokine zeigen LPS-stimulierte murine DEX-APCs hier eine Aufregulation der Transkription des Moleküls IL-1RA. Es ist bekannt, dass GCs die Synthese verschiedener antiinflammatorischer Zytokine steigern, zu denen auch IL-1RA zählt<sup>167</sup>. Diese erhöhte mRNA-Expressionsrate in stimulierten DEX-APCs ist konsistent mit dem Befund, dass Zellen der murinen DC-Linie SP37A3 auf eine DEX-Behandlung während der Stimulierung mit einer drastisch gesteigerten IL-1RA Transkription

reagieren<sup>157</sup>. IL-1RA ist ein kompetitiver IL-1 Antagonist, da es ebenfalls an den IL-1 Rezeptor bindet, ohne jedoch eine zelluläre Antwort zu induzieren<sup>341,342</sup>. Eine Überexpression von IL-1RA könnte sich toleranzfördernd auswirken, indem es sowohl zu einer Beeinträchtigung der IL-1-vermittelten Ausreifung von DCs<sup>706,707</sup> sowie einer negativen Regulation der T-Zell-Stimulation und Polarisierung beiträgt<sup>708,709</sup>. Übereinstimmend damit wurde in klinischen Untersuchungen gezeigt, dass die Applikation von IL-1RA effizient zur Behandlung rheumatoider Arthritis beiträgt<sup>710</sup>, allergische Reaktionen verhindert<sup>711</sup> und das Überleben von Alлотransplantaten verlängert<sup>712</sup>.

Weiterhin ist unter basalen Bedingungen die mRNA-Expression von IL-10 in DEX-APCs gegenüber iDCs erhöht. Eine gesteigerte IL-10 mRNA-Menge wurde ebenfalls in DEX-behandelten murinen Monozyten detektiert<sup>503</sup>. Auf Proteinebene wurden infolge einer DEX-Behandlung in DCs sowohl gesteigerte<sup>624,713</sup> als auch gleich bleibende<sup>169</sup> IL-10 Sekretionen nachgewiesen. Generell vermitteln verschiedene tolerogene DC-Populationen ihre T-Zell-inhibitorischen Effekte via IL-10<sup>139</sup>. Somit eignet sich dieses Molekül ebenfalls gut für eine gerichtete Überexpression in DCs zur Induktion eines tolerogenen Status. Analog zu Ergebnissen aus Expressionsanalysen DEX-behandelter humaner Monozyten<sup>503</sup> und in Gegenwart von DEX stimulierter SP37A3-Zellen<sup>157</sup> zeigen demgegenüber auch murine DEX-APCs hier keine veränderte Regulation der TGF- $\beta$ 1 Transkription.

Positive regulatorische Effekte auf die Genexpression in DEX-APCs wurden im Rahmen dieser Arbeit vor allem für toleranzassoziierte bzw. DEX-responsive Moleküle detektiert. Unabhängig von ihrem Aktivierungszustand liegt in DEX-APCs die Transkriptionsmenge für HO-1, Fc $\gamma$ RIIB, GILZ, MKP-1 sowie SGK-1 deutlich höher als in der entsprechenden Kontroll-DC-Population. Das Enzym HO-1 katalysiert die Degradation von Häm in die Komponenten Kohlenmonoxid (CO), Biliverdin und Eisen<sup>564</sup>. HO-1 und vor allem das Abbauprodukt CO haben einen inhibitorischen Einfluss auf die LPS-induzierte Expression proinflammatorischer Zytokine sowie eine steigernde Wirkung auf die LPS-vermittelte IL-10 Expression in Makrophagen<sup>568</sup>. In humanen und Ratten-DCs vermindert eine Induktion der HO-1 Expression während der Reifung von DCs deren allogene T-Zell-Stimulierungskapazität<sup>714</sup>.

Die erhöhte Expression des inhibitorischen Rezeptors Fc $\gamma$ RIIB in den hier generierten DEX-APCs, die ebenfalls in SP37A3-Zellen auftritt, die in Gegenwart von DEX stimuliert wurden<sup>157</sup>, könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese APCs einen erhöhten Schwellenwert gegenüber einer Aktivierung haben und somit maturierungsresistenter sind. Die Expression von Fc $\gamma$ RIIB ist essentiell für die Aufrechterhaltung der tolerogenen Aktivität von DCs unter homöostatischen Bedingungen infolge einer Bindung von lokalem IgG in Mukosa-drainierenden Lymphknoten<sup>715</sup>.



In verschiedenen Studien wurde belegt, dass DEX die Expression der dualspezifischen Phosphatase MKP-1 induziert, die effektiv die MAP-Kinase p38 inhibiert<sup>168,581,716</sup>. Aktivierte MAP-Kinasen sind an der Transkription proinflammatorischer Zytokine beteiligt<sup>269</sup> und tragen außerdem zum Transport, der Stabilisation sowie der Translation von zytokinkodierenden mRNAs bei<sup>261</sup>.

In humanen DCs wurde demonstriert, dass der TF GILZ einer der Schlüsselregulatoren für die Induktion eines protolerogenen Phänotyps sein kann<sup>717</sup>, und dass GILZ-exprimierende humane DCs das Potential haben, antigenspezifische Tregs zu induzieren<sup>718</sup>. Ähnlich wie GCs an sich, blockiert GILZ in verschiedenen Zelltypen die Aktivität der TFs NF- $\kappa$ B und AP-1 sowie der MAP-Kinase p38<sup>719,720</sup>.

Die vier Moleküle HO-1, Fc $\gamma$ RIIB, GILZ und MKP-1 tragen folglich entscheidend zum tolerogenen Phänotyp von DCs bei und stellen somit Kandidaten für eine Überexpression dar.

Basierend auf dem Genexpressionsprofil tolerogener, maturierungsresistenter DEX-APCs wurden die potentiell toleranzassoziierten Moleküle B7-H2, IL-1RA, IL-10, Fc $\gamma$ RIIB und MKP-1 für eine Überexpression in murinen BM-DCs selektiert. Erweitert wurde diese Auswahl durch die Moleküle PD-L1, B7-H3, PirB, I $\kappa$ B $\alpha$ , SOCS-1, STAT3, TGF- $\beta$ 1 sowie IL-21, welches ursprünglich nicht von DCs exprimiert wird. Alle diese Kandidatenmoleküle werden zwar in DEX-APCs nicht vermehrt exprimiert, haben aber ebenfalls, wie in anderen Studien gezeigt, eine Schlüsselfunktion im Kontext der Induktion und Aufrechterhaltung von Toleranz durch DCs.

### **4.3 Die lentivirale Transduktion von BM-DCs ist äußerst effizient, der mit der Methode assoziierte physikalische Stress resultiert jedoch in einer partiellen Ausreifung der Zellen**

Wie bereits eingangs thematisiert, gehören DCs mit zu den wichtigsten Modulatoren von Immunreaktionen, da sie die Fähigkeit besitzen, abhängig von ihrem Aktivitätsstatus in Reaktion auf ein Antigen entweder Immunantworten oder Toleranz zu induzieren. Auf Grund dieser besonderen DC-Eigenschaften gibt es zahlreiche Studien, in denen modifizierte DCs als Vakzine in Immuntherapien eingesetzt wurden. Problematisch bei allen gentechnischen Manipulationsverfahren ist die geringe Transfektionseffizienz humaner und vor allem muriner DCs<sup>377,381</sup>, weshalb im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Etablierung eines viralen Transduktionssystems für murine BM-DCs erfolgte. Generell ist eine effiziente genetische

Modifikation von DCs ohne zytotoxische oder andere ungewollte Nebeneffekte in hohem Maße diffizil<sup>379,380</sup>. Die in der Praxis am häufigsten eingesetzten Transduktionssysteme für den Transfer von Transgenen basieren auf einer Verwendung adenoviral oder von MMLV- (*molony murine leukaemia virus*) abgeleiteter Vektoren. Beide Verfahren können jedoch nicht für eine effektive Transduktion von murinen BM-DCs herangezogen werden, da infolge einer adenoviralen Transduktion eine Ausreifung von DCs induziert wird<sup>387-389</sup> und das MMLV-System neben seiner Instabilität der viralen Partikel<sup>392</sup> sowie geringen Virustitern<sup>393</sup> nicht fähig ist, eine Transduktion ruhender Zellen zu bewerkstelligen<sup>394</sup>.

Aktuell sind nur lentiviral-abgeleitete Vektoren<sup>397</sup> für eine effektive Transduktion humaner<sup>404-406</sup> und muriner<sup>398,407,408</sup> DCs geeignet. Die für humane<sup>409,410</sup> und murine<sup>408,411</sup> DCs in verschiedenen Studien beschriebenen lentiviralen Transduktionseffizienzen variieren zwischen 70 % und 90 %. Transduktionraten über 90 % wurden, soweit bekannt, nur unter Verwendung des Reportergens tNGFR (*truncated form of the nerve growth factor receptor*) berichtet, das mittels entsprechender Antikörper im FACS nachgewiesen wurde<sup>408</sup>. Problematisch ist bei Verwendung dieses Reporters der begleitende Prozess der Pseudotransduktion (eine Übertragung des auch in den Verpackungszellen exprimierten Markerproteins auf Zielzellen)<sup>585</sup>, der bei Verwendung des eGFP-Proteins nicht auftritt<sup>586</sup>. Eine Steigerung der zur Transduktion verwendeten MOI (*multiplicity of infection*), eine Erhöhung der DNA-Mengen der für die Produktion der viralen Partikel verwendeten Vektoren, eine Zentrifugation der Transduktionsansätze sowie eine Wiederholung der Transduktion kann die Effizienz der Virenproduktion bzw. die Transduktionseffizienz von DCs maßgeblich erhöhen<sup>406,410,587</sup>. Entsprechend dieser Kenntnisse wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die verschiedenen angesprochenen Parameter der lentiviralen Transduktion für murine BM-DCs in Vorexperimenten soweit optimiert, dass, unabhängig von der Größe und der Sequenz des enthaltenden Transgens, konstante Transduktionseffizienzen zwischen 90 % und 98 % erreicht werden und somit eine Aufreinigung der Transduktanden für nachfolgende phänotypische und funktionale Studien nicht erforderlich ist.

In immuntherapeutischen Behandlungsansätzen, wie beispielsweise der Behandlung von Autoimmunantworten, Allergien und Transplantatabstossungen, in denen Immunantworten inhibiert werden sollen, ist die Verwendung unstimulierter, nicht-immunogener DCs zwingend erforderlich. Allerdings ist der Prozess der genetischen Modifikation von DCs in vielen Fällen (auch bei der hier durchgeführten lentiviralen Transduktion) mit physikalischem Stress assoziiert. In einer früheren Studie wurde jedoch bereits gezeigt, dass physikalischer Stress in einer partiellen Aktivierung von DCs resultiert<sup>584</sup>. Mechanischer Stress kann zur Auslösung intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden beitragen, indem es zur Zerstörung von interzellulären Kontakten (*adherens junctions*) kommt, indem Adhärenzmoleküle

Interaktionen mit dem Zytoskelett eingehen bzw. indem eine differentielle Regulation mechanosensitiver Ionenkanäle eintritt<sup>721</sup>. Es musste daher vor Beginn der Überexpressionsstudien evaluiert werden, inwieweit der physikalische Stress beim Ernten und Einsäen der DCs in Vorbereitung auf die lentivirale Transduktion sowie die für hohe Transduktionseffizienzen essentiellen Zentrifugations- und Waschschriffe den Phänotyp und die antigenpräsentierende Funktion muriner BM-DCs verändert.

Im Rahmen der durchgeführten vergleichenden Genexpressionsanalysen für eine Auswahl an kostimulatorischen Rezeptoren sowie Maturierungs- und Toleranzmarkern zeigte sich deutlich, dass unstimulierte und LPS-stimulierte, physikalisch gestresste BM-DCs (Mock-DC) ein von unbehandelten BM-DCs abweichendes Genexpressionsprofil aufweisen. In beiden Aktivierungszuständen ist in Mock-DCs im Vergleich zu Kontroll-DCs die Transkription des kostimulatorischen Moleküls CD80 deutlich aufreguliert, während die mRNA-Expression der Oberflächenrezeptoren 4-1BBL und SLAM sowie des Toleranzmarkers IDO vermindert stattfindet. Obwohl physikalischer Stress nachweislich in einer partiellen Aktivierung von DCs resultiert<sup>584</sup>, transkribieren Mock-DCs unstimuliert sowie nach einer Stimulierung mit LPS im Vergleich zu unbehandelten BM-DCs reduzierte Mengen des Maturierungsmarkers Fascin1. Neben dem Genexpressionsprofil erfährt auch die allogene T-Zell-Stimulierungskapazität von BM-DCs durch physikalischen Stress eine prägnante Veränderung. Unabhängig von ihrem Aktivierungszustand induzieren Mock-DCs eine im Vergleich zu unbehandelten Kontroll-DCs erhöhte proliferative Antwort kokultivierter allogener T-Zellen.

Insgesamt erweitern die Befunde einer stressassoziierten Veränderung des Genexpressionsprofils und einer begleitenden partiellen Aktivierung von BM-DCs auf der funktionellen Ebene die Resultate von Gallucci und Mitarbeitern<sup>584</sup>, die eine stressinduzierte Aufregulation der Oberflächenexpression von MHCII und kostimulatorischen Molekülen für murine BM-DCs demonstrieren haben. Darüber hinaus sind diese Ergebnisse von generellem Interesse, da nahezu jede *ex situ*-Behandlung von DCs mit mechanischem Stress assoziiert sein kann.

Neben der Thematik der stressbedingten Effekte, die mit der Prozedur der lentiviralen Transduktion assoziiert sind, kann auch der direkte Kontakt mit lentiviralen Partikeln zu einer Veränderung der Eigenschaften von DCs führen. Monozyten-abgeleitete humane DCs reagieren auf eine hochdosige lentivirale Transduktion mit einer Aufregulation von adhäsiven, kostimulatorischen und HLA-Molekülen sowie einer verstärkten Sekretion von IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$ <sup>399</sup>. Außerdem ist die allostimulatorische Kapazität dieser DCs erhöht. Eine Transduktion mit einer niedrigen MOI resultiert in keiner phänotypischen und funktionellen Ausreifung humaner DCs<sup>399,415</sup>. Soweit bekannt, wurden im murine System bislang nur Mock-DCs und lentiviral transduzierte DCs nach einer Stimulierung mit LPS bzw. CpG-Oligonukleotiden vergleichend analysiert<sup>583</sup>. Inwieweit jedoch der Phänotyp und die APC-

Aktivität unstimulierter BM-DCs durch den Transduktionsvorgang und einen Kontakt mit lentiviralen Partikeln moduliert wird, ist bisher noch nicht untersucht worden.

In der vorliegenden Studie kristallisierte sich heraus, dass lentiviral transduzierte BM-DCs (LV-DCs) gegenüber Mock-DCs distinkte Veränderungen in ihrem Genexpressionsprofil aufweisen. Unter basalen Bedingungen resultiert die Transduktion in keiner ausgeprägten Regulation der mRNA-Expression ausgewählter kostimulatorischer Rezeptoren, pro- und antiinflammatorischer Zytokine, Toleranzmarker und anderer in die DC/T-Zell-Interaktion involvierter Moleküle. Lediglich die Moleküle CD40, CD86, IL-1 $\beta$ , IL-6 und GILZ werden in reduziertem Maß transkribiert. In Reaktion auf eine Stimulation mit LPS weisen LV-DCs gegenüber Mock-DCs eine eingeschränkte maturierungsassoziierte Aufregulation für einige der analysierten mRNA-Spezies auf (CD80, OX40L, IL-1R2). Bemerkenswerterweise wird auch die mRNA-Expression des Maturierungsmarkers Fascin1 in LV-DCs im Vergleich zum basalen Zustand nur geringfügig gesteigert.

Im unstimulierten Zustand weisen Mock-DCs und LV-DCs keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich der Oberflächenexpression von MHCII sowie den kostimulatorischen Rezeptoren CD80 und CD86 auf, obwohl letztgenannter in LV-DCs auf mRNA-Ebene in verminderter Stärke exprimiert wird. In Folge einer Aktivierung mit LPS findet in LV-DCs, verglichen mit Mock-DCs, eine lediglich intermediäre Aufregulation der Oberflächenexpression von MHCII und CD86 statt. Dieses Resultat bildet einen auffälligen Kontrast zu einer Studie von He und Mitarbeitern<sup>583</sup>, in der gezeigt wurde, dass stimulierte murine Mock-DCs und LV-DCs MHCII Moleküle sowie kostimulatorische Rezeptoren in vergleichbarer Stärke auf ihrer Oberfläche exprimieren. Diese offenkundigen Differenzen basieren eventuell auf den unterschiedlichen Modalitäten der BM-DC Kulturbedingungen. In der zitierten Studie wurden BM-DCs in der Gegenwart von IL-4 zusätzlich zu GM-CSF generiert. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass dieses Zytokin in unstimulierten BM-DCs die Oberflächenexpression von MHCII sowie den kostimulatorischen Rezeptoren CD40, CD80 und CD86 drastisch aufreguliert<sup>722-724</sup>. Es besteht durchaus die Option, dass diese IL-4-assoziierte partielle Aktivierung die begleitenden Effekte der lentiviralen Transduktion maskiert, die in dieser Arbeit für einzig in Gegenwart von GM-CSF generierte BM-DCs detektiert wurden. Darüber hinaus sind die hier beschriebenen Befunde konsistent mit einer Studie von Breckpot und Mitarbeitern<sup>408</sup>, in der für LV-DCs im Vergleich zu Mock-DCs, die jeweils nur in Gegenwart von GM-CSF generiert wurden, eine höhere CD80 Oberflächenexpression nachgewiesen wurde.

Ungeachtet der phänotypischen Differenzen zwischen Mock-DCs und LV-DCs zeigen beide DC-Populationen im unstimulierten Zustand sowie nach einer Aktivierung mit LPS eine jeweils vergleichbare allogene, wie auch syngene T-Zell-Stimulierungskapazität. Auch in einer vorhergehenden Studie wurde bereits demonstriert, dass LPS-stimulierte murine Mock-DCs und LV-DCs eine gleich starke allostimulatorische Kapazität aufweisen<sup>408</sup>.

Obwohl sich die beiden genannten DC-Populationen in ihrem T-Zell-Aktivierungspotential nicht voneinander unterscheiden, induzieren sie variierende Zytokinmuster in kokultivierten allogenen und syngenem T-Zellen. Im allogenen System wurde für LPS-stimulierte LV-DCs im Vergleich zur entsprechenden Mock-DC-Population eine Veränderung der Zytokinantwort kokultivierter T-Zellen verzeichnet, da in den korrespondierenden LV-DC/T-Zell-Kokulturen eine gegenüber Mock-DC/T-Zell-Kokulturen erhöhte Produktion des T<sub>H</sub>2-Markerzytokins IL-5 sowie reduzierte Mengen des T<sub>H</sub>1-Markerzytokins IFN- $\gamma$  detektiert wurden. In einer Studie mit BM-DCs, die in Gegenwart von GM-CSF und IL-4 generiert wurden, induzierten beide DC-Populationen im stimulierten Zustand eine vergleichbar starke IFN- $\gamma$  Sekretion alloreaktiver T-Zellen<sup>583</sup>. Die Sekretion von T<sub>H</sub>2-Zytokinen wurde in der vorgenannten Studie nicht analysiert. Analog zu den Resultaten allogener DC/T-Zell Kokulturen tritt in Kokulturen mit stimulierten LV-DCs in Relation zu stimulierten Mock-DCs im syngenem System ebenfalls eine Veränderung der Zytokinantwort von T-Zellen auf. Auf der einen Seite ist in Kokulturen stimulierter LV-DCs mit syngenem 2D2 T-Zellen eine signifikant stärkere Produktion von IL-5 und IL-10 detektierbar als in den entsprechenden Mock-DC/T-Zell-Kokulturen, während die jeweilige Menge des T<sub>H</sub>1-Markerzytokins IFN- $\gamma$  in etwa vergleichbar ist. Generell ist zu erwähnen, dass die gemessenen Konzentrationen an IL-5 und IL-10 in den Kokulturen sehr gering sind und diese *in vitro*-Analysen deshalb keine Aussage über die biologische Signifikanz der veränderten Zytokinmuster erlauben. Soweit bekannt, wurden bisher keine vergleichbaren *in vitro*-Studien bezüglich der syngenem APC-Funktionen von LV-DCs veröffentlicht.

Ein weiterer Indikator für die partielle Aktivierung von BM-DCs durch die Prozedur der lentivirale Transduktion sind die Resultate der Transduktionsstudien mit einem Vektor, der den DC-fokussierten Promotor des Aktinbündelungsproteins Fascin1 enthält. Unter den hämatopoetischen Zellen exprimieren ausschließlich DCs dieses Protein<sup>417</sup>. In DCs korreliert die Stärke der Fascin Expression mit dem Aktivierungsgrad der Zellen<sup>138,721</sup>. Darüber hinaus wurde in vorhergehenden Studien nachgewiesen, dass der 2,5 kb lange Promotor des murinen Fascin-Gens eine DC-fokussierte Expression von Transgenen nach einer biologischen Immunisierung gewährleistet und potente Immunantworten ausgelöst werden<sup>376,418</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass lentivirale Vektoren, die eine IL-10 Expressionseinheit unter der transkriptionellen Kontrolle des DC-spezifischen Fascin-Promotors oder des ubiquitär aktiven CMV-Promotors enthalten, effizient in BM-DCs transferiert werden können und dass keine Interferenzen zwischen den beiden genannten Promotoren und dem EF1-Promotor des Reportergens copGFP auftreten, wie sie für andere Promotorkombinationen bekannt sind<sup>725</sup>. Unter der Kontrolle des Fascin-Promotors ist das jeweilige IL-10 Expressionsniveau in transduzierten unstimulierten sowie LPS-stimulierten BM-DCs vergleichbar hoch, was auf einen ähnlichen Aktivierungszustand transaktivierender

Transkriptionsfaktoren in beiden Zellpopulationen hindeutet. Die geringere Expression von IL-10 unter der Kontrolle des Fascin-Promotors im Vergleich mit dem starken viralen CMV-Promotor in DCs steht im Einklang mit Befunden von Morita und Mitarbeitern<sup>726</sup>, die vergleichend die Aktivität des Dectin-2-Promotors mit der Aktivität des SV40-Promotors nach einer Transfektion von Zellen einer DC-Linie analysiert haben. Das stark erhöhte IL-10 Transkriptionniveau in LPS-stimulierten gegenüber unstimulierten BM-DCs, die mit einem lentiviralen Vektor unter der Kontrolle des CMV-Promotors transduziert wurden, kann auf einer stimulationsabhängig stärkeren NF- $\kappa$ B-Aktivität beruhen, da NF- $\kappa$ B responsive Elemente in repetitiver Anordnung im Bereich der CMV-Promotorsequenz vorhanden sind<sup>727</sup>. Vergleichbare Elemente sind in der Fascin-Promotorsequenz nicht enthalten. Diese Daten belegen somit die Eignung des Fascin-Promotors für eine Transgenexpression in BM-DCs infolge einer lentiviralen Transduktion. Der genannte Promotor könnte sich demzufolge als nützlich für eine DC-spezifische lentivirale Transduktion auch *in vivo* erweisen.

Insgesamt zeigen die durchgeführten Analysen, dass die lentivirale Transduktion zwar in einer partiellen Ausreifung von DCs resultiert, diese jedoch durch einen Aktivierungsstimulus wie beispielsweise LPS noch weiter gesteigert werden kann. Somit ist dieses System für einen effizienten Transgentransfer in DCs geeignet, wobei die begleitenden Nebeneffekte weniger stark ausfallen, als bei Verwendung eines adenoviralen oder MMLV-Systems.

### **4.4 Differentiell transduzierte BM-DCs weisen voneinander abweichende phänotypische Charakteristika auf und modulieren unterschiedlich die T-Zell-Aktivierung**

Die auf der Basis phänotypischer Analysen von DEX-APCs sowie intensiver Literaturrecherchen für eine genetische Modifikation in BM-DCs selektierten potentiell toleranzassoziierten Moleküle können in Oberflächenrezeptoren (PD-L1, B7-H2, B7-H3, Fc $\gamma$ RIIB, Pirb), intrazelluläre Regulatormoleküle (I $\kappa$ B $\alpha$ , MKP-1, SOCS-1, STAT3) sowie sekretierte Mediatoren (IL-10, IL-21, IL-1RA, TGF- $\beta$ 1) kategorisiert werden. Wie bereits einleitend in dieser Arbeit dargestellt, wurden für diese Moleküle in vorhergehenden Studien autokrine Effekte auf die DC und/oder parakrine Einflüsse auf interagierende T- bzw. B-Zellen nachgewiesen.

Eine komparative Analyse differentiell transgenüberexprimierender BM-DCs, die sowohl eine Betrachtung der jeweiligen autokrinen als auch parakrinen Effekte beinhaltet, wurde, soweit bekannt, bisher nicht durchgeführt. Im Hinblick auf potentielle therapeutische Anwendungen wurde, im Anschluss an die komparativen *in vitro*-Analysen, das kurative Potential einiger

Transduktanden-Populationen, die eine deutlich reduzierte T-Zell-Aktivierung vermitteln, im murinen Krankheitsmodell der haptenermittelten Kontaktallergie untersucht.

### **4.4.1 Transgenvermittelte Überexpression der Oberflächenmoleküle PirB, B7-H3, B7-H2 und PD-L1 in DCs**

Lange Zeit wurde die Kostimulation von T-Zellen lediglich auf Basis einer „zwei-Signal-Theorie“ betrachtet: Eine optimale Initiation der Effektorfunktion von T-Zellen in Reaktion auf die Bindung von MHC-Peptid-Komplexen erfolgt nur, wenn dieses Signal durch eine zusätzliche Kostimulation ergänzt wird. In der Abwesenheit dieses zweiten Signals kommt es zur Ausbildung von T-Zell-Toleranz oder Anergie<sup>728</sup> und die T-Zellen reagieren auf eine sekundäre TCR-Stimulation mit Hyporesponsivität<sup>729,730</sup>. Der am intensivsten untersuchte kostimulatorische Signaltransduktionsweg beruht auf der Interaktion zwischen den B7-Familienmitgliedern CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) auf APCs und CD28 auf T-Zellen, die in einer Induktion der IL-2 Produktion und Proliferation von T-Zellen resultiert. CD28 gilt als der wichtigste kostimulatorische Rezeptor auf T-Zellen<sup>731</sup>: CD28- sowie CD80/CD86-negative Mäuse weisen eine entscheidende Beeinträchtigung in der Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf<sup>732,733</sup>. Im Gegensatz dazu beruht die Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen weniger stark auf einer Kostimulation durch den CD28-Rezeptor<sup>734</sup>. Mittlerweile ist bekannt, dass auch inhibitorische Signalwege existieren, die die T-Zell-Funktion negativ regulieren. Neben der beschriebenen positiven Kostimulation durch CD28 können die Moleküle CD80 und CD86 auch mit dem Rezeptor CTLA-4 auf T-Zellen interagieren, was in einer Reduktion der T-Zell-Aktivierung und Proliferation resultiert<sup>457,735</sup>.

Im Rahmen der Suche nach toleranzassoziierten DC-Molekülen sind vor allem negative regulatorische Oberflächenmoleküle von besonderem Interesse, die an spezifische Rezeptoren auf T-Zellen binden. In dieser Arbeit wurden als potentielle Kandidatenmoleküle die drei Mitglieder der B7-Familie PD-L1 (B7-H1), B7-H2 und B7-H3 sowie der inhibitorische Fc-Rezeptor FcγRIIB und der inhibitorische Rezeptor PirB für eine Überexpression in DCs selektiert.

Für die vier Rezeptoren PD-L1, B7-H2, B7-H3 und FcγRIIB wurde in den entsprechenden Transduktanden auf mRNA-Ebene eine effektive exogene Expression des Transgens ohne Einfluss auf die endogene Expression nachgewiesen. Analysen der Gesamt-mRNA-Mengen zeigten, dass alle vier Rezeptoren in den entsprechenden unstimulierten und LPS-stimulierten DC-Populationen im Vergleich zu LV-DCs auf deutlich erhöhtem Niveau transkribiert wurden, wobei die stärkste Überexpression für die Moleküle B7-H2 und B7-H3 detektiert wurde. Auch das für den inhibitorischen Rezeptor PirB kodierende Transgen wurde

in DCs nachweislich exprimiert. Im Gegensatz zu den vier zuvor genannten Oberflächenmolekülen reguliert jedoch die exogene PirB mRNA-Expression in unstimulierten DCs die endogene Transkription dieses Gens geringfügig negativ. Darüber hinaus wurde weder in unstimulierten noch in stimulierten PirB-DCs eine im Vergleich zu LV-DCs erhöhte PirB Gesamt-mRNA-Expression gefunden. Inwieweit hierbei autoregulative Mechanismen beteiligt sind, wie sie für andere Gene wie beispielsweise I $\kappa$ B $\alpha$ <sup>736</sup> nachgewiesen wurden, ist auf Grund fehlender Studien nicht bekannt.

Abweichend von den Resultaten auf mRNA-Ebene konnten die beiden Rezeptoren PD-L1 sowie Fc $\gamma$ RIIB nicht in erhöhten Mengen auf der Oberfläche entsprechend transduzierter DCs nachgewiesen werden. Während B7H2-DCs im unstimulierten Zustand gegenüber LV-DCs minimal erhöhte Mengen des B7-H2 Proteins exprimieren, ist die B7-H2 Oberflächenexpression in diesen DCs nach einer Stimulation mit LPS im Vergleich zu LV-DCs deutlich reduziert. Lediglich der Rezeptor B7-H3 wurde in beiden Aktivierungszuständen, verglichen mit LV-DCs, in erhöhter Menge auf der Oberfläche von B7H3-DCs detektiert. Eine Analyse der Oberflächenexpression von PirB in PirB-DCs erfolgte nicht im Rahmen dieser Arbeit, sollte aber für nachfolgende Studien nachgeholt werden.

Bisher liegen, soweit bekannt, keine vergleichbaren komparativen Studien vor, in denen die genannten Oberflächenmoleküle in DCs überexprimiert wurden. Lediglich der Rezeptor PD-L1 wurde von Kuipers und Mitarbeitern<sup>737</sup> mittels eines retroviralen Transfers des entsprechenden Expressionsvektors erfolgreich auf Proteinebene in murinen BALB/c DCs überexprimiert. Kim und Mitarbeitern<sup>738</sup> gelang es außerdem, PD-L1 retroviral in stark erhöhter Menge auf der Oberfläche der murinen Langerhans-Zelllinie XS106 zu überexprimieren. Die Diskrepanz zwischen den genannten Studien und der vorliegenden Arbeit beruht vermutlich auf der Verwendung eines anderen Transfersystems und den Eigenschaften der Zielzellen. In dieser Arbeit wurden *in vitro* generierte C57BL/6 BM-DCs transduziert, die sich phänotypisch und funktionell eventuell von BALB/c BM-DCs unterscheiden. Im Gegensatz zu einer homogenen, immortalisierten Zelllinie wie XS106<sup>739</sup> handelt es sich hier um eine heterogene Zellpopulation, die wesentlich empfindlicher gegenüber äußeren Einflüssen ist.

Die starke Diskrepanz in punkto Überexpression von Oberflächenrezeptoren in BM-DCs auf mRNA- und Proteinebene basiert vermutlich auf der Existenz posttranskriptionaler Regulationsmechanismen. Die Regulation der Genexpression bzw. des Translationsvorgangs ist ein mehrstufiger Prozess, der auf verschiedenen Ebenen reguliert wird<sup>740,741</sup>.

Da die Gesamtmenge an PirB mRNA weder in unstimulierten noch in LPS-stimulierten PirB-DCs gegenüber LV-DCs erhöht ist, findet eine negative Regulation der Genexpression vermutlich in einem frühen Stadium der mRNA-Synthese statt. Eine der ersten Stationen der



Genexpression, die häufig einer Adaption unterliegt, ist die Anlagerung von Transkriptionsfaktoren an spezifische DNA-Sequenzen proximal zu den Genen, die sie regulieren sowie die Rekrutierung der RNA-Polymerase für die nachfolgende RNA-Synthese. Eventuell spielt auch die Gensequenz eine entscheidende Rolle in der Regulation der Transkriptionseffektivität, da auch in kodierenden Genabschnitten TF-Bindungsstellen existieren, wie sie beispielsweise für die CD28-Gensequenz nachgewiesen wurden <sup>742</sup>. Sobald mRNA-Vorläufer gebildet worden sind, kommt es zu einer Assoziation mit zahlreichen RNA-Bindeproteinen (RNA-BP), die anschließende RNA-Prozessierungsreaktionen (*5'-Capping*, *Splicing*, *Editing*, *3'-Polyadenylierung*) vermitteln <sup>743,744</sup>. Der Prozess des *pre-mRNA-Splicing*s wird vermutlich in *cis* durch eine Bindung von *Splicing*-Faktoren an *Splicing-Enhancer*-Gensequenzen katalysiert, die sich sowohl in nicht-kodierenden als auch in kodierenden Genabschnitten befinden <sup>745,746</sup>. Im Anschluss an das *Splicing* werden oft Abschnitte der muren mRNA in bestimmte RNA-Sekundärstrukturen gefaltet, die die mRNA-Degradationsrate <sup>747</sup> sowie die mRNA-Lokalisierung <sup>748</sup> determinieren. Auch die Translationseffizienz wird durch spezifische Sekundärstrukturen in der mRNA beeinflusst <sup>749</sup>. Obwohl die Ausbildung funktionaler Sekundärstrukturen in den meisten Fällen auf die Bereiche der 5'- und 3'-untranslatierten Region (UTR) beschränkt ist, wurde diese Form der posttranskriptionalen Modifikation auch in kodierenden Teilbereichen von mRNAs nachgewiesen <sup>750</sup>. Inwieweit die Expression des PirB-Gens durch TFs reguliert wird und welche RNA-BPs anschließend mit den entsprechenden mRNA-Vorläufern assoziieren, wurde, soweit bekannt, bisher nicht untersucht.

Da für die vier Rezeptoren PD-L1, B7-H2, B7-H3 und FcγRIIB in den entsprechenden Transduktanden eine Überexpression auf mRNA-Ebene nachgewiesen wurde, finden potentielle negative Regulationsvorgänge vermutlich erst nach dem Export aus dem Nukleus statt. In einigen Fällen erfolgt zunächst durch die Ausbildung von Komplexen aus mRNAs mit Motorproteinen sowie RNA-BPs, oder durch die Assoziation mit Signalerkennungspartikeln eine Lokalisation der mRNA in subzellulären Regionen <sup>751</sup>. Der anschließende Eintritt in den Translationsprozess durch die Anlagerung von Translationsfaktoren und Ribosomen wird ebenfalls durch globale und/oder transkriptspezifische Mechanismen reguliert <sup>752</sup>. Abschließend unterliegt die mRNA einem Nuklease-vermittelten Abbau durch diverse *Decay*-Abläufe <sup>753</sup>. Die Lokalisation und Halbwertszeit von Proteinen kann darüber hinaus durch eine Modifikation spezifischer Aminosäuren, eine Spaltung mittels spezifischer Proteasen sowie eine Degradation durch das Proteasom kontrolliert werden <sup>754</sup>.

Besonders in den letzten Jahren wurden miRNAs (microRNA) als relevante Regulatoren der Genexpression bestätigt. Es handelt sich hierbei um sehr kurze, nicht-kodierende, doppelsträngige RNA-Moleküle, die die Genexpression primär regulieren, indem sie eine

translationale Repression oder eine Degradation spezifischer mRNAs initiieren<sup>755</sup>. Auf molekularer Ebene interagieren reife miRNAs mit jeweils einer spezifischen mRNA durch die Basenpaarung von Nukleotiden zwischen der miRNA-Sequenz und komplementären Sequenzen in der (3'UTR) der mRNA<sup>756,757</sup>. Es ist bekannt, dass miRNAs auch in APCs wie DCs und Makrophagen eine wichtige regulatorische Rolle spielen. Die miRNA-155 ist beispielsweise in die durch Interferon- $\beta$  oder TLR-Liganden induzierte Stimulation von DCs bzw. Makrophagen involviert<sup>758</sup>, während die miRNA-125b die TNF- $\alpha$  Produktion in Makrophagen reguliert<sup>759</sup>.

In verschiedenen Studien wurde belegt, dass RNA-BPs wesentlich an der posttranskriptionalen Regulation beteiligt sind, indem sie die Expression von Genen kontrollieren, die für Protoonkogene, Wachstumsfaktoren, Zytokine, TFs und andere Proteine kodieren<sup>760</sup>. Zahlreiche RNA-BPs interagieren mit spezifischen AU-reichen Elementen (ARE), die sich im 3'UTR ihrer Ziel-mRNAs befinden<sup>761,762</sup>. Eines der am besten charakterisierten ARE-bindenden Proteine ist das Zinkfingerprotein Tristetraprolin (TTP), das die mRNA-Stabilität zahlreicher inflammatorischer Mediatoren wie TNF- $\alpha$ <sup>763</sup>, IL-2<sup>764</sup>, IL-6<sup>765</sup>, IL-1 $\beta$ <sup>766</sup> und GM-CSF<sup>767</sup> reguliert. Eine aktuelle Studie zeigt, dass TTP in murinen myeloiden BM-DCs aktiv an der Regulation der Genexpression beteiligt ist<sup>768</sup>. In humanen DCs reguliert TTP unter anderem auch die Expression des Oberflächenmoleküls CD86, obwohl die entsprechende mRNA keine klassischen AREs im 3'UTR aufweist<sup>769</sup>.

Soweit bekannt, wurde bisher nicht gezeigt, inwieweit die Expression der Rezeptoren PD-L1, B7-H2, B7-H3 und Fc $\gamma$ RIIB durch miRNAs, RNA-BPs oder durch eine Ausbildung funktionaler Sekundärstrukturen in kodierenden Teilbereichen der entsprechenden mRNAs<sup>750</sup> reguliert wird. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass vor allem die beiden zuerst genannten Mechanismen in DCs an der Regulation der Genexpression (auch von Oberflächenmolekülen) beteiligt sind und deshalb auch in dem vorliegenden System einen entscheidenden Einfluss haben könnten. Eine genauere Identifikation der zu Grunde liegenden Mechanismen erfolgte im Rahmen dieser Arbeit nicht, wäre aber vor allem für folgende Studien von großem Interesse, in denen Oberflächenmoleküle in DCs überexprimiert werden sollen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass die lentivirale Transduktion von BM-DCs äußerst effizient ist, der mit der Methode assoziierte physikalische Stress jedoch in einer partiellen Aktivierung der Zellen resultiert (in Abschnitt 4.3 diskutiert). Generell ist Stress, der als Hitzeschock, UV-Strahlung, osmotischer Schock, Sauerstoffmangel, virale Infektion, Kontakt mit toxischen Substanzen oder ähnliches auftreten kann<sup>770</sup>, ein Stimulus, der eine ständige Adaption von Zellen an die neue Situation erfordert. In Reaktion auf eine solche Stresssituation wird der mRNA-Metabolismus in Zellen neu programmiert, um die anabolische Energie für eine Reparatur stressinduzierter

Beschädigungen zu konservieren<sup>771</sup>. Im Rahmen dieser Prozedur wird selektiv die Translation konstitutiv exprimierter Haushaltsgene runterreguliert, während die Translation stressassoziiierter mRNAs erhalten bzw. aufreguliert wird, die unter anderem für Chaperone, Hitzeschockproteine und bestimmte TFs kodieren. Überschüssige, translational inaktive mRNA wird dabei zusammen mit einigen TFs, der 40S ribosomalen Untereinheit und verschiedenen RNA-BPs aggregiert und für eine spätere Translation in sogenannten Stressgranula gelagert<sup>772</sup>. Es ist nicht ausgeschlossen, dass durch den mit der lentiviralen Transduktion assoziierten physikalischen Stress die Ausbildung dieser Stressgranula induziert wird und somit eine zytoplasmatische Anreicherung derjenigen mRNAs stattfindet, die durch die transgenvermittelte exogene Expression in stark erhöhten Mengen auftreten und für eine Stressreaktion irrelevant sind. In diesem Fall wäre eine im Vergleich zu LV-DCs erhöhte Proteinsynthese von PD-L1, B7-H2 sowie FcγRIIB in entsprechend transduzierten BM-DCs nicht möglich.

Eine intrazelluläre Anreicherung der Transgene würde auch erfolgen, wenn kein adäquater Proteintransport an die Zelloberfläche stattfindet<sup>773</sup>. Ein zweifelsfreier Nachweis der intrazellulären Akkumulation von Transgenen in DCs könnte mit Hilfe intrazellulärer FACS-Färbungen erfolgen, die im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt wurden.

Eine weitere Möglichkeit der posttranskriptionalen Regulation der Expression von Oberflächenrezeptoren stellt das *Shedding* dar. Bei diesem Prozess werden extrazelluläre „Proteinabschnitte“ durch eine proteolytische Spaltung von der Zelloberfläche abgetrennt. In B-Zellen wurde nachgewiesen, dass die Menge an CD40<sup>774</sup> sowie B7-H2<sup>775</sup> auf der Oberfläche der Zellen durch *Shedding* reguliert wird. In vielen Fällen wird dieser Prozess durch eine Rezeptor/Ligand-Bindung induziert<sup>776,777</sup>. In humanen aktivierten T-Zellen, Monozyten sowie Monozyten-abgeleiteten DCs wird die Oberflächenexpression von B7-H3 ebenfalls durch Abspaltungen reguliert, die von einer Metalloproteinase katalysiert werden<sup>778</sup>. Solubles B7-H3 wurde auch im murinen System nachgewiesen, wo es die allogene T-Zell-Stimulierungskapazität von DCs negativ beeinflusst<sup>779</sup>. De la Salle und Mitarbeiter<sup>780</sup> haben gezeigt, dass humane epidermale Langerhans-Zellen zwei unterschiedliche FcγRII-Rezeptortypen exprimieren, eine membrangebundene und eine soluble Form, die von zwei verschiedenen Transkripten kodiert werden. Trotzdem gibt es experimentelle Hinweise darauf, dass solubles FcγRII auch durch *Shedding* des membranständigen Proteins von diesen Zellen generiert wird<sup>780,781</sup>.

Somit könnte die proteolytische Abspaltung der Moleküle PD-L1, B7-H2 und FcγRIIB von der Oberfläche entsprechend transduzierter DCs einen der potentiellen Faktoren darstellen, der dazu beiträgt, dass in dieser Arbeit keine auf Proteinebene nachweisbare Überexpression der genannten Rezeptoren stattfand. Eventuell wird dieser Prozess durch den mit der lentiviralen Transduktion assoziierten Stressstimulus induziert, der in einer partiellen

Aktivierung von DCs resultiert. Das Vorhandensein der jeweiligen löslichen Faktoren könnte durch entsprechende ELISA-Systeme im Zellkulturüberstand detektiert werden. Diese Untersuchungen sollten in nachfolgenden Studien durchgeführt werden.

Von den fünf im Rahmen dieser Arbeit überexprimierten Oberflächenrezeptoren nimmt PirB eine Sonderstellung ein. In Studien mit murinen Mastzellen<sup>217</sup> und BM-DCs<sup>218</sup> wurde gezeigt, dass PirB in trans an MHCI-Moleküle umgebender Zellen sowie in cis an MHCI-Moleküle auf derselben Zelle bindet. Die Signaltransduktion von PirB erfolgt via ITIMs, die eine Rekrutierung der inhibitorischen Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP-1 ermöglichen<sup>212,214,215</sup>. Da SHP-1 generell an der negativen Regulation der Zell-Aktivierung beteiligt ist, könnte infolge einer Überexpression von PirB in DCs eine erhöhte SHP-1 Signaltransduktion stattfinden, die in einer Modifikation der Genexpression resultiert. Tatsächlich wurde hier in unstimulierten PirB-DCs im Vergleich zu LV-DCs eine reduzierte mRNA-Expression der kostimulatorischen Rezeptoren CD80, CD86, 4-1BBL, OX40L und SLAM nachgewiesen, die im Rahmen der Ausreifung mit LPS in PirB-DCs im Vergleich zu LV-DCs entweder gar nicht oder nur eingeschränkt hochreguliert wurde. Auch die Transkription des DC-Maturierungsmarkers Fascin1 sowie des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 erfährt in stimulierten PirB-DCs im Gegensatz zu LV-DCs keine maturierungsassoziierte Aufregulation. In Übereinstimmung mit den Befunden auf mRNA-Ebene wurde für stimulierte PirB-DCs eine gegenüber LV-DCs drastisch reduzierte IL-10 Produktion auf Proteinebene nachgewiesen. Abweichend von ihrem Genexpressionsprofil sekretieren unstimulierte PirB-DCs jedoch wesentlich höhere Mengen IL-10 als LV-DCs. Die Gründe für diese Abweichungen basieren vermutlich auf dem in Kraft treten verschiedener posttranskriptionaler Regulationsmechanismen, die im vorangehenden Abschnitt beschrieben wurden. Soweit bekannt, wurde bisher in keiner Studie gezeigt, dass eine exogene PirB-Expression in DCs in einer autokrinen Modifikation der Genexpression resultiert.

Der inhibitorische Effekt des Rezeptors PirB basiert im Wesentlichen darauf, durch die Interaktion mit MHCI auf der Oberfläche von APCs den Zugang für CD8-Moleküle zu blockieren und so die Aktivierung von CTLs zu verhindern<sup>217,218</sup>. Eine effektive Aktivierung von CTLs kann nur erfolgen, wenn eine Ligation der CD8-Moleküle an Peptid-MHCI-Komplexe sowie gleichzeitig an TCRs erfolgt<sup>116,782,783</sup>. Weiterhin wurde gezeigt, dass HLA-G (*human histocompatibility leukocyte antigen*) die Funktion muriner DCs durch eine Bindung an PirB inhibiert<sup>784</sup>.

Das T-Zell-Aktivierungspotential unstimulierter DCs wird in der vorliegenden Arbeit durch eine transgenvermittelte Expression von PirB nicht moduliert, obwohl für PirB-DCs eine verminderte mRNA-Expression kostimulatorischer Rezeptoren wie CD80 und CD86

detektiert wurde. Demgegenüber induzieren stimulierte Pirb-DCs eine gegenüber LV-DCs reduzierte proliferative Antwort allogener T-Zellen, was unter anderem auf einer eingeschränkten maturierungsassoziierten Aufregulation der mRNA-Expression kostimulatorischer Moleküle in Pirb-DCs basieren könnte. Da stimulierte Pirb-DCs deutlich geringere Mengen IL-10 sekretieren als stimulierte LV-DCs, ist dieses antiinflammatorische Zytokin wahrscheinlich nicht an der Mediation des inhibitorischen Potentials stimulierter Pirb-DCs beteiligt. Das tatsächliche tolerogene Potential von Pirb-DCs würde sich vermutlich am deutlichsten in DC/T-Zell-Kokulturen mit ausschließlich CD8<sup>+</sup> T-Zellen bestimmen lassen. In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch heterogene Gesamt-T-Zellen verwendet, die sich mehrheitlich aus CD4<sup>+</sup> T-Zellen zusammensetzen.

Die Rolle von B7-H3 in der Regulation der T-Zell-Aktivierung und –Funktion ist divergent. Im humanen System kostimuliert dieses Molekül die anti-CD3-Antikörper induzierte CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zell-Proliferation und die Produktion von Effektorzytokinen wie IFN- $\gamma$  und IL-10<sup>207</sup>. Mit einem B7-H3-Expressionskonstrukt transient transfizierte Melanomzellen erhöhten *in vitro* die Induktion von CTLs. In verschiedenen murinen Tumormodellen wurde nachgewiesen, dass eine ektopische Expression von B7-H3 zu einer Aktivierung tumorspezifischer CTLs führt, die entweder das Tumorstadium verlangsamen oder den Tumor vollständig beseitigen<sup>785-787</sup>. Konträr zu diesen Resultaten wurden sowohl im humanen, als auch im murinen System gezeigt, dass B7-H3 die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowie die Produktion der Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-4 deutlich inhibiert<sup>208,209</sup>. In Übereinstimmung damit weisen APCs aus B7-H3-defizienten Mäusen ein erhöhtes T-Zell-Aktivierungspotential auf<sup>209</sup>.

In der vorliegenden Arbeit reduzierte die Überexpression von B7-H3 die T-Zell-Stimulierungskapazität LPS-stimulierter DCs lediglich geringfügig, obwohl stimulierte B7H3-DCs im Vergleich zu LV-DCs deutlich erhöhte Mengen dieses Rezeptors auf ihrer Zelloberfläche tragen. In den meisten der zuvor genannten Studien erfolgte die Aktivierung der T-Zellen über den TCR sowie eine begleitende CD3- und CD28-Kostimulation meist durch antikörpervermittelte Signale. Diese Diskrepanz bezüglich der Effektivität der durch eine B7-H3-Ligation vermittelten inhibitorischen Signale in Richtung der T-Zellen basiert vermutlich auf den unterschiedlichen experimentellen Systemen. Vor allem *in vitro* erfolgte die B7-H3-Kostimulation in früheren Studien fast ausschließlich über B7-H3-Ig bzw. B7-H3-Fc Fusionsproteine oder Zelllinien, die dieses Molekül infolge einer Transfektion oder Transduktion überexprimierten. Diese Herangehensweise birgt jedoch die Gefahr, ein äußerst eingeschränktes experimentelles System zu verwenden, das auf Grund der polyklonalen Stimulierung ein unphysiologisches Resultat liefern könnte. Darüber hinaus werden durch eine Verwendung artifizieller APCs oder einer direkten Ligation aufgereinigter

T-Zellen durch Antikörper sämtliche APC-abhängigen Effekte ignoriert, die die T-Zell-Aktivierung beeinflussen (z.B. die Sekretion von Zytokinen) <sup>788,789</sup>. In dieser Arbeit wurden stattdessen für eine Stimulierung von T-Zellen B7-H3 überexprimierende BM-DCs als APCs in DC/T-Zell-Kokulturen eingesetzt. Die genannten Varianzen könnten durchaus dazu beitragen, dass in dem hier verwendeten experimentellen System der inhibitorische Effekt von B7-H3 geringer ausfällt, sich diese Resultate vermutlich aber eher den Gegebenheiten in physiologischen alloreaktiven Situationen annähern.

Der Bindungspartner des APC-Oberflächenrezeptors B7-H2 ist ICOS, der auf aktivierten, aber nicht auf ruhenden T-Zellen exprimiert wird <sup>195,196</sup>. Eine B7-H2-ICOS-Ligation induziert die Proliferation von T-Zellen und resultiert in einer Sekretion der Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-4 sowie des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 <sup>192,195,790</sup>. Darüber hinaus gibt es in mehreren Studien Hinweise darauf, dass die ICOS-Signaltransduktion an der Funktion von Tregs beteiligt ist <sup>150,791,792</sup> und eine potentielle Rolle in der negativen Regulation der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Antwort durch tolerogene DCs spielt. In den murinen Krankheitsmodellen der EAE <sup>793</sup> und des autoimmunen Typ I Diabetes <sup>794</sup> resultiert eine Blockade der B7-H2-ICOS-Interaktion durch anti-ICOS-Antikörper in einer Verschiebung der Balance zwischen Tregs und Effektor-T-Zellen, wodurch sich der Krankheitsverlauf verschlimmert. Im humanen System wurde kürzlich gezeigt, dass tolerogene DCs infolge einer Blockade der B7-H2-ICOS-Ligation nicht mehr imstande sind, anerge sowie suppressive CD4<sup>+</sup> T-Zellen *in vitro* zu induzieren <sup>203</sup>. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde außerdem gezeigt, dass LPS-stimulierte tolerogene DEX-APCs, verglichen mit Kontroll-DCs, eine deutlich erhöhte B7-H2 mRNA-Expression aufweisen.

Übereinstimmend mit den zuvor genannten Studien resultierte die Überexpression von B7-H2 auf mRNA-Ebene hier in einem verminderten T-Zell-Aktivierungspotential unstimulierter sowie LPS-stimulierter DCs, obwohl letztere eine gegenüber LV-DCs reduzierte B7-H2 Oberflächenexpression aufweisen. Wie bereits zuvor für B7H3-DCs beschrieben, würde der inhibitorische Effekt dieses Rezeptors im Rahmen einer polyklonalen, antikörpervermittelten Stimulation der T-Zellen, wie sie in den anderen Studien durchgeführt wurde, vermutlich stärker ausfallen. Ein weiteres Testsystem für das inhibitorische Potential von B7H2-DCs wäre vermutlich eine Kokultur von DCs und mit aktivierten T-Zellen anstatt, wie in dieser Arbeit durchgeführt, mit naiven T-Zellen, da letztere den Bindungspartner ICOS nicht exprimieren <sup>195,196</sup> bzw. dessen Expression zunächst induziert werden muss.

Der inhibitorische Rezeptor Fc $\gamma$ RIIB ist unter anderem primär an der negativen Regulation der zellulären Proliferation <sup>220,221</sup> sowie der Zell-Aktivierung <sup>222-224</sup> beteiligt. Die Expression von Fc $\gamma$ RIIB auf B-Zellen und anderen APCs spielt eine kritische Rolle bei der

Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz. FcγRIIB-defiziente C57BL/6 Mäuse entwickeln spontan eine Lupus-ähnliche Autoimmunität und weisen eine frühzeitige Mortalität auf <sup>227</sup>. Weiterhin resultiert eine Deletion dieses Rezeptors in einer Produktion von Autoantikörpern und generell in einer deutlich erhöhten Prädisposition für Autoimmunität <sup>226,228</sup>. Darüber hinaus wurde innerhalb der vorliegenden Studie gezeigt, dass tolerogene DEX-APCs im unstimulierten und stimulierten Zustand eine im Vergleich zu Kontroll-DCs stark erhöhte mRNA-Expression für diesen Rezeptor aufweisen.

Im Einklang mit den genannten Studien ist in dieser Arbeit die allogene T-Zell-Stimulierungsfähigkeit unstimulierter und LPS-stimulierter FcγRIIB-DCs gegenüber LV-DCs deutlich reduziert, obwohl dieser Rezeptor nicht in erhöhten Mengen auf der Oberfläche entsprechend transduzierter DCs detektiert wurde. Der inhibitorische Effekt könnte jedoch durch lösliche, von der Zelloberfläche abgespaltene FcγRIIB-Moleküle vermittelt werden <sup>780,781</sup>. Soweit bekannt wurde der Einfluss von FcγRIIB auf die T-Zell-Proliferation bisher noch nicht im Rahmen von DC/T-Zell-Kokulturen analysiert, so dass keine Vergleichsdaten zu dieser Arbeit vorliegen.

Die Funktion von PD-L1 in der Kostimulation von T-Zellen wird kontrovers diskutiert. In initialen Studien resultierte die gleichzeitige Stimulation primärer humaner T-Zellen mit einem PD-L1-Ig Fusionsprotein sowie anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern in einer verstärkten T-Zell-Proliferation und Sekretion der Zytokine IFN-γ und IL-10 <sup>537,795</sup>. Diese kostimulatorischen Effekte von PD-L1 kommen vor allem in der frühen T-Zell-Antwort zum tragen <sup>191,796</sup>. Eine Mehrheit der Publikationen zur immunregulatorischen Rolle von PD-L1 belegt jedoch, dass PD-L1 als negativer Regulator der T-Zell-Aktivierung und -Funktion fungiert: APC-Zelllinien, die den Rezeptor PD-L1 überexprimieren, inhibieren die Proliferation muriner TCR-transgener CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen <sup>180</sup>. Eine Überexpression von PD-L1 in der murinen Langerhans-Zelllinie XS106 inhibiert die Proliferation sowie die IFN-γ und IL-2 Produktion kokultivierter haptenspezifischer T-Zellen <sup>738</sup>. Bemerkenswerterweise hat die retroviral-vermittelte Überexpression dieses Rezeptors in murinen BALB/c BM-DCs keinen inhibitorischen Einfluss auf die Proliferation von DO11.10 CD4<sup>+</sup> T-Zellen <sup>737</sup>. Je nach experimentellem System kann die Stimulation von T-Zellen mit PD-L1-Ig Fusionsproteinen sowie anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern auch zu einer reduzierten T-Zell-Proliferation führen, die von einer verminderten Sekretion der Zytokine IFN-γ, IL-10 und IL-4 begleitet wird <sup>536,797</sup>.

In Übereinstimmung mit der Mehrheit der genannten Studien sind in dieser Arbeit LPS-stimulierte PDL1-DCs funktionell durch eine gegenüber LV-DCs deutlich verminderte allogene sowie syngene T-Zell-Stimulierungskapazität gekennzeichnet, obwohl auf Proteinebene keine Überexpression von PD-L1 auf der Oberfläche entsprechend

transduzierter DCs detektiert wurde. Physiologisch gesehen reflektiert das in dieser Arbeit gewählte *in vitro*-System, verglichen mit den vorgenannten experimentellen Ansätzen, vermutlich am ehesten die *in vivo*-Situation.

Insgesamt zeigt sich also, dass obwohl nur die beiden Moleküle B7-H2 und vor allem B7-H3 in erhöhter Menge auf der Oberfläche entsprechend transduzierter unstimulierter bzw. stimulierter DCs detektiert wurden, die Überexpression aller fünf analysierten Rezeptoren im Rahmen von DC/T-Zell-Kokulturen in einer Verminderung der allogenen T-Zell-Stimulierungskapazität muriner BM-DCs resultiert. Unter basalen Bedingungen zeigen FcγRIIB-DCs und B7H2-DCs eine vergleichbar starke Reduktion der T-Zell-Aktivierung gegenüber LV-DCs. In LPS-stimulierten transduzierten DCs wird die effektivste Reduktion der allogene T-Zell-Stimulierungskapazität durch eine Überexpression von PD-L1 erreicht, gefolgt in genannter Reihenfolge von FcγRIIB, B7-H2, PirB und B7-H3. Eine transgenvermittelte Expression von PD-L1 resultiert darüber hinaus auch in einer deutlichen Limitierung der syngenen T-Zell-Stimulierungsfähigkeit LPS-stimulierter DCs, weshalb diese DC-Population als potentiell geeignet für eine therapeutische Applikation, beispielsweise im Rahmen des murinen Krankheitsmodells der haptenermittelten Kontaktallergie (syngenes System), betrachtet werden kann.

Obwohl alle fünf analysierten transgenexprimierenden DC-Populationen in unterschiedlicher Stärke die Proliferation kokultivierter allogener T-Zellen inhibieren, variieren sie in ihrer Fähigkeit, die Produktion von IL-5 und IL-10 in Kokulturen zu induzieren. Interessanterweise wurde jedoch in keiner der Kokulturen von transgenexprimierenden DCs und allogenen T-Zellen eine negative Regulation der Produktion des T<sub>H</sub>1-Markerzytokins IFN-γ nachgewiesen.

In PirB-DC/T-Zell-Kokulturen ist die Konzentration des T<sub>H</sub>2-Markerzytokins IL-5 und des T<sub>H</sub>2/Treg-Markerzytokins IL-10, im Gegensatz zu den Kontrollansätzen mit LV-DCs, deutlich erhöht. Abweichend davon weisen Kokulturen mit stimulierten PirB-DCs signifikant erhöhte Mengen IFN-γ auf. Da bisher nur der Einfluss von PirB auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen wurde, liegen keine zu dieser Studie vergleichbaren Analysen der T-Zell-polarisierenden Eigenschaften dieses Rezeptors vor.

Das gleiche gilt für FcγRIIB; auch hier liegen bisher keine adäquaten *in vitro*-Studien vor. In dem vorliegenden Testsystem wurde im Gegensatz zu Kontrollansätzen mit LV-DCs IL-5 weder in Kokulturen mit unstimulierten noch in denjenigen mit stimulierten FcγRIIB-DCs nachgewiesen. Darüber hinaus ist auch die Konzentration von IL-10 in Kokulturen mit stimulierten FcγRIIB-DCs, verglichen mit der entsprechenden Kontrolle, stark reduziert. Die



IFN- $\gamma$ -Konzentration befindet sich jeweils auf vergleichbarem Niveau zu Ansätzen mit LV-DCs.

Eine Kokultivierung allogener T-Zellen mit unstimulierten und stimulierten B7H2-DCs resultiert einheitlich in einer gegenüber den Kontrollansätzen erhöhten Sekretion von IFN- $\gamma$ . Demgegenüber induzieren unstimulierte B7H2-DCs eine gegenüber LV-DCs verstärkte IL-5 und IL-10 Produktion, die im Gegensatz zu den Kontrollansätzen bei Verwendung stimulierter B7H2-DCs jeweils nicht zunimmt. Dieses Zytokinprofil spiegelt teilweise die Befunde früher Studien wider, in denen gezeigt wurde, dass eine B7-H2-ICOS-Ligation bei gleichzeitiger Stimulierung die Sekretion von IFN- $\gamma$ , IL-4 und IL-10 induziert <sup>192,195,790</sup>.

Das Zytokinprofil allogener T-Zellen wird durch eine Kokultur mit unstimulierten B7H3-DCs im Vergleich zu LV-DCs nicht reguliert. In Kokulturen mit stimulierten B7H3-DCs sind jedoch die Konzentrationen der Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-5 signifikant erhöht. Dieser Befund bildet einen starken Kontrast zu bisher veröffentlichten Studien, in denen B7-H3 *in vitro* <sup>208</sup> und *in vivo* <sup>209</sup> als negativer Regulator der T<sub>H</sub>1-Antwort identifiziert und eine verminderte IFN- $\gamma$  und IL-4 Sekretion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen wurde. Diese Diskrepanz basiert vermutlich darauf, dass in der vorliegenden Arbeit keine positiv angereicherten CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Kokultur eingesetzt wurden, sondern naive Gesamt-T-Zellen, und dass die Stimulation nicht antikörpervermittelt, sondern allein über transgenexprimierende DCs erfolgte.

In Kokulturen unstimulierter PDL1-DCs und allogener T-Zellen liegt die Konzentration der Zytokine IL-5 und IL-10 im Gegensatz zu den Kontrollansätzen mit LV-DCs unterhalb der Nachweisgrenze. Auch in syngenesischen Kokulturen mit unstimulierten PDL1-DCs ist die Menge an IL-10 deutlich reduziert. Diese Veränderung des Zytokinprofils entspricht den Befunden, dass die Stimulation von T-Zellen durch PD-L1-Ig Fusionsprotein sowie anti-CD3- und anti-CD28-Antikörper die IL-4- und IL-10-Sekretion negativ reguliert <sup>536,797</sup>. Stimulierte PDL1-DCs induzieren hingegen keine Modulation des Zytokinprofils kokultivierter allogener sowie syngener T-Zellen.

Zusammengefasst resultiert die transgenvermittelte Expression potentiell inhibitorischer Rezeptoren in DCs im Vergleich zu einer Überexpression von beispielsweise IL-21 oder IL-10 zwar nicht in einer effektiven Reduktion der T-Zell-Stimulierungskapazität, verändert aber in gewissem Maße die T-Zell-polarisierenden Eigenschaften der DCs, weshalb entsprechend transduzierte DC-Populationen durchaus für eine Applikation in verschiedenen Krankheitsmodellen interessant sein könnten.

#### **4.4.2 Transgenvermittelte Überexpression der intrazellulären Regulatormoleküle I $\kappa$ B $\alpha$ , MKP-1, STAT3 und SOCS-1 in DCs**

Der tolerogene Charakter von DCs basiert nicht nur auf der Kombination ihrer Oberflächenmoleküle, sondern ist essentiell von der Aktivität regulatorischer intrazellulärer Komponenten wie TFs, Kinasen und Phosphatasen abhängig, die in vielen Fällen in Form negativer Rückkopplungssysteme die Aktivierung von DCs durch Stimuli wie TLR-Liganden, Zytokine und Wachstumshormone negativ regulieren und somit einer Hyperresponsivität entgegenwirken. Entsprechend der immunologischen Funktion intrazellulärer Regulatorproteine wurde im Rahmen dieser Arbeit in unstimulierten und LPS-stimulierten DEX-APCs eine gegenüber Kontroll-DCs stark erhöhte mRNA-Expression für die MAP-Kinase-Phosphatase MKP-1 nachgewiesen. Ferner ist der Aktivitätszustand des TF NF- $\kappa$ B<sup>171</sup>, auf dessen Inhibition die entzündungshemmende Wirkung von GCs beruht<sup>162</sup>, kritisch für den tolerogenen Status von DCs. Eine direkte Inhibition der NF- $\kappa$ B-Aktivität kann beispielsweise durch eine Überexpression von I $\kappa$ B $\alpha$  erfolgen<sup>798</sup>, welches mit diesem TF komplexiert. Neben MKP-1 und I $\kappa$ B $\alpha$  wurden in dieser Arbeit die Moleküle SOCS-1 und STAT3 als potentiell toleranzassoziierte Regulatorproteine der DC-Aktivierung für eine lentiviral vermittelte Überexpression in BM-DCs ausgewählt. Eine erhöhte STAT3-Aktivität<sup>284</sup> sowie eine Überexpression von SOCS-1<sup>296</sup> resultiert jeweils in einer verminderten Oberflächenexpression von MHCII und kostimulatorischen Molekülen in APCs.

Die effektive exogene Transgenexpression der intrazellulären Moleküle I $\kappa$ B $\alpha$ , MKP-1, SOCS-1 und STAT3 wurde auf mRNA-Ebene mittels spezifischer Primer nachgewiesen. Im Gegensatz zu einer transgenvermittelten Überexpression von Oberflächenmolekülen resultierte eine exogene Expression bestimmter intrazellulärer Regulatorproteine (I $\kappa$ B $\alpha$ , MKP-1 und STAT3) in DCs in einer negativen Autoregulation des jeweiligen endogenen Transkriptionsstatus. Stimulierte I $\kappa$ B $\alpha$ - und MKP1-DCs wiesen jeweils eine gegenüber LV-DCs reduzierte endogene mRNA-Expression für I $\kappa$ B $\alpha$  bzw. MKP-1 auf. Für STAT3-DCs wurde in beiden Aktivierungszuständen infolge der exogenen Transgenexpression eine verminderte endogene mRNA-Transkriptionsrate detektiert. Einzig SOCS1-DCs zeigen infolge einer exogenen Transgenexpression keine Veränderung des endogenen SOCS-1 mRNA-Expressionsniveaus. Soweit bekannt, wurde bisher in keiner anderen Studie gezeigt, dass die exogene Transgenexpression intrazellulärer Regulatorproteine in DCs in einer Modulierung der entsprechenden endogenen mRNA-Expression resultiert.

Ein Nachweis der Transgenexpression intrazellulärer Moleküle auf Proteinebene erfolgte im Rahmen dieser Arbeit für keines der vier ausgewählten Regulatorproteine, sollte aber für ergänzende Studien nachgeholt werden. Auch eine Analyse des jeweiligen Protein-Aktivierungszustands, beispielsweise durch Bestimmung des Phosphorylierungsstatus,

könnte einen präziseren Aufschluss über die durch eine transgenvermittelte Expression ausgelösten Effekte in DCs geben.

Der TF NF- $\kappa$ B spielt unter anderem eine Schlüsselrolle in der Regulation von Genen, die an der Zellproliferation<sup>234,235</sup> sowie der Aktivierung bzw. Maturierung von Zellen<sup>239</sup> beteiligt sind. Da die Aktivierung von NF- $\kappa$ B essentiell in die Ausreifung von DCs involviert ist<sup>260,799,800</sup>, führt eine limitierte NF- $\kappa$ B-Aktivität in DCs zu einem immaturren Phänotyp und somit zu einem tolerogenen Status von DCs<sup>801</sup>. Die adenoviral-vermittelte Überexpression des NF- $\kappa$ B Inhibitors I $\kappa$ B $\alpha$  in humanen DCs (AdvI $\kappa$ Ba-DCs) resultiert in einer starken Inhibition der Ausreifung dieser Zellen<sup>258,798,802</sup>. Stimulierte AdvI $\kappa$ Ba-DCs weisen eine deutlich verminderte Oberflächenexpression für die Moleküle HLA-DR, HLA-DQ, CD40, CD80 und CD86 auf. Darüber hinaus ist in diesen Zellen die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-12 und TNF- $\alpha$  reduziert. In Übereinstimmung mit diesem tolerogenen Phänotyp ist das allogene T-Zell-Stimulierungspotential stimulierter AdvI $\kappa$ Ba-DCs deutlich reduziert. Antigenbeladene humane AdvI $\kappa$ Ba-DCs induzieren in DC/T-Zell-Kokulturen ebenfalls eine geringere autologe T-Zell-Proliferation sowie eine verminderte Sekretion der Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-4 und IL-10<sup>259</sup>. Eine adenovirale Transduktion muriner BALB/c-DCs mit einem I $\kappa$ B $\alpha$ -Expressionskonstrukt resultiert in einem verringerten T-Zell-Aktivierungspotential stimulierter DCs sowie in einer herabgesetzten IL-6 Sekretion<sup>260</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit wurde darüber hinaus gezeigt, dass eine Generierung muriner BM-DCs in Gegenwart von GCs (in diesem Fall DEX), deren Wirkung ebenfalls insbesondere auf einer Reduktion der NF- $\kappa$ B-Aktivität basiert<sup>162</sup>, in einer verminderten mRNA-Expression kostimulatorischer Rezeptoren und einer gesteigerten Transkription toleranzassoziierte Moleküle resultiert.

Infolge einer transgenvermittelten Expression ist die Gesamtmenge an I $\kappa$ B $\alpha$  mRNA in der vorliegenden Arbeit nur in unstimulierten I $\kappa$ Ba-DCs gegenüber LV-DCs gesteigert. In stimulierten I $\kappa$ Ba-DCs ist die Gesamt-mRNA-Menge vermutlich auf Grund der reduzierten endogenen I $\kappa$ B $\alpha$  Expression nicht erhöht. Entsprechend dieses Befundes ist bekannt, dass die I $\kappa$ B $\alpha$  Expression einem autoregulativen Rückkopplungsmechanismus unterliegt. Eines der wichtigsten Zielgene des TF NF- $\kappa$ B ist sein Inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$ , in dessen Promotorregion drei NF- $\kappa$ B-Bindungsstellen identifiziert wurden<sup>736</sup>. In verschiedenen Studien wurde beschrieben, dass auf diese Weise eine negative Rückkopplungsschleife entsteht, die die Genexpression von I $\kappa$ B $\alpha$  kontrolliert und somit die transiente Aktivierung von NF- $\kappa$ B limitiert<sup>803-805</sup>. Ein ähnlicher autoregulativer Rückkopplungsmechanismus könnte auch die transgenvermittelte Überexpression von I $\kappa$ B $\alpha$  regulieren. Eine erfolgreiche Überexpression von I $\kappa$ B $\alpha$  in unstimulierten und stimulierten humanen<sup>258,798,802</sup> und murinen<sup>260</sup> DCs auf Proteinebene

infolge eines adenoviralen Transfers der entsprechenden Expressionsvektoren wurde in verschiedenen Studien nachgewiesen.

In allen bisherigen Studien wurde lediglich der Einfluss einer I $\kappa$ B $\alpha$  Überexpression auf den Phänotyp stimulierter DCs untersucht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit weisen unstimulierte I $\kappa$ B $\alpha$ -DCs eine gegenüber LV-DCs verminderte mRNA-Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80, 4-1BBL und SLAM sowie der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-12b auf. Diese phänotypischen Veränderungen passen in den Kontext der vorgenannten Studien, was eventuell unter anderem auf eine partielle Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs durch den mit der lentiviralen Transduktion assoziierten physikalischen Stress zurückzuführen ist. Weiterhin wurden in unstimulierten I $\kappa$ B $\alpha$ -DCs verminderte mRNA-Mengen für die beiden DC-Maturierungsmarker Fascin1 und CCR7 und für das toleranzassoziierte Molekül MKP-1 detektiert.

Ähnlich zu den Ergebnissen stimulierter humaner AdvI $\kappa$ B $\alpha$ -DCs auf Proteinebene<sup>258,798,802</sup> sind LPS-stimulierte I $\kappa$ B $\alpha$ -DCs im Vergleich zu LV-DCs durch eine eingeschränkte mRNA-Expression der kostimulatorischen Rezeptoren CD40, CD80 sowie CD86 gekennzeichnet. Interessanterweise ist in stimulierten I $\kappa$ B $\alpha$ -DCs die IL-6 mRNA-Menge nicht verändert und die Expression von IL-12b hochreguliert. Anhand der vorgenannten Studien wäre für beide Zytokine eher ein vermindertes Transkriptionsniveau erwartet worden. Möglicherweise weicht das für stimulierte I $\kappa$ B $\alpha$ -DCs ermittelte Genexpressionsprofil auf Grund von Speziesunterschieden von Analysen im humanen System<sup>258,798,802</sup> ab. In der genannten Studie im murinen System<sup>260</sup> wurden BALB/c-DCs adenoviral transduziert und mit TNF- $\alpha$  und LPS gleichzeitig für zwei Tage stimuliert, während in der vorliegenden Arbeit C57BL/6 BM-DCs lentiviral transduziert und für einen Tag einzig mit LPS stimuliert wurden. Somit unterscheiden sich die DC-Populationen möglicherweise nicht nur phänotypisch und funktionell voneinander, sondern auch das Transduktionssystem und die Ausreifungsstimuli weichen voneinander ab. Vor allem die Verwendung adenoviraler Vektoren führt zu einer Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs, was in einer erhöhten Produktion proinflammatorischer Zytokine und folgerichtig in der Ausreifung von DCs resultiert<sup>387-389</sup>. Zusammen mit der kombinierten TNF- $\alpha$ - und LPS-Stimulierung weisen entsprechende Kontroll-DCs, die mit leerem Vektor transduziert wurden, in der Vergleichsstudie somit einen stärker aktivierten Zustand auf als LV-DCs in der vorliegenden Arbeit, weshalb dort I $\kappa$ B $\alpha$  eventuell einen Einfluss auf die systemabhängig erhöhte IL-6 Sekretion hat. Neben den genannten Gründen besteht auch die Option, dass posttranskriptionale Regulationsmechanismen, wie sie im Abschnitt 4.4.1 beschrieben wurden, die Sekretion von IL-6 und IL-12 in I $\kappa$ B $\alpha$ -überexprimierenden DCs beeinflussen und deswegen nicht zwangsläufig eine verminderte mRNA-Expression von IL-6 in LPS-stimulierten I $\kappa$ B $\alpha$ -DCs auftreten muss. Entsprechend dieser Annahme haben Gealy und Mitarbeiter<sup>806</sup> demonstriert, dass die Expression von IL-6

durch eine Interaktion des RNA-BP HurR mit AREs im 3'UTR der IL-6 mRNA reguliert wird. In TTP-defizienten Makrophagen findet in Reaktion auf eine Stimulierung mit LPS eine verstärkte Sekretion von IL-6 und IL-12 statt<sup>807</sup>, was auf eine posttranskriptionale Regulation dieser beiden Zytokine durch RNA-BPs schließen lässt. Weiterhin findet in den hier generierten stimulierten IκBa-DCs eine Aufregulation der Transkription toleranzassoziierter Moleküle wie IL-1RA, FcγRIIB,IDO und MKP-1 statt, wie sie in dieser Arbeit, mit Ausnahme von IDO, auch für tolerogene DEX-APCs gezeigt wurde. Soweit bekannt, wurde der Einfluss einer Überexpression von IκBα in murinen DCs auf die Genexpression der in dieser Studie analysierten toleranzassozierten Moleküle bisher noch nicht untersucht. Einzig in unstimulierten und stimulierten humanen Monozyten-abgeleiteten DCs wurde demonstriert, dass eine Inhibition des kanonischen NF-κB-Signaltransduktionswegs durch NBD- (*NEMO-binding domain*) Peptide in keiner Modulation der IDO-Proteinmenge resultiert<sup>808</sup>. Da es sich dabei aber um ein stark abweichendes experimentelles System handelt, können die Ergebnisse nicht unmittelbar auf die vorliegende Arbeit transferiert werden.

Auf Proteinebene resultiert die transgenvermittelte IκBα-Expression in unstimulierten IκBa-DCs in einer im Vergleich zu LV-DCs reduzierten Menge an MHCII, CD40 und CD86 auf der Oberfläche der Zellen. In LPS-stimulierten IκBa-DCs ist die Oberflächenexpression von MHCII gegenüber LV-DCs herabgesetzt, jedoch nicht die von CD40, CD80 und CD86. Für die drei letztgenannten Moleküle wurde im Gegensatz dazu in stimulierten IκBa-DCs eine, verglichen zu LV-DCs, verminderte mRNA-Expression detektiert. Vor allem die Reduktion der MHCII-Expression auf der Oberfläche unstimulierter und stimulierter IκBa-DCs fügt sich gut in den Kontext der Befunde von Yoshimura und Mitarbeitern<sup>260</sup>, dass die Antigenpräsentation in murinen DCs *in vitro* und *in vivo* vom Aktivitätszustand des TF NF-κB abhängig ist. Darüber hinaus sekretieren stimulierte IκBa-DCs in der vorliegenden Arbeit, obwohl keine Veränderung auf mRNA-Niveau detektiert wurde, im Vergleich zu LV-DCs eingeschränkte Mengen des antiinflammatorischen Zytokins IL-10. Diese Limitierung der IL-10 Sekretion in stimulierten IκBa-DCs könnte auf der erhöhten MKP-1 mRNA-Expression und damit auf einer verstärkten Aktivität dieses Proteins beruhen, das in die Inhibition des MAP-Kinase-Signaltransduktionswegs involviert ist. In Übereinstimmung damit weisen murine MKP-1<sup>-/-</sup> BM-DCs eine drastisch gesteigerte IL-10 Sekretion auf<sup>273</sup>. Eine weitere Option ist die Regulation durch RNA-BPs, da Tudor und Mitarbeiter<sup>809</sup> in TTP<sup>-/-</sup> Makrophagen eine massive Überexpression von IL-10 detektiert haben. Außerdem wurde im Rahmen bioinformatischer Analysen eine hsa-miRNA-106a Bindestelle im 3'UTR der IL-10 mRNA identifiziert<sup>810</sup>, die ein potentielles Ziel posttranskriptionaler Regulation darstellt.

Obwohl unstimulierte IκBa-DCs eine gegenüber LV-DCs reduzierte Oberflächenexpression von MHCII, CD40 und CD86 aufweisen und auf mRNA-Ebene eine reduzierte IL-6 und IL-12b Expression detektiert wurde, induzieren diese Zellen eine jeweils zu LV-DCs

vergleichbare Proliferation allogener sowie syngener T-Zellen. In Einklang mit den zuvor genannten humanen<sup>258,259,798,802</sup> und murinen<sup>260</sup> Studien wurde in der vorliegenden Arbeit für LPS-stimulierte I $\kappa$ B $\alpha$ -DCs ebenfalls eine jeweils im Vergleich zu LV-DCs reduzierte allogene sowie syngene T-Zell-Stimulierungsfähigkeit nachgewiesen, die unter anderem vermutlich auf der eingeschränkten Fähigkeit zur Antigenpräsentation sowie der erhöhten mRNA-Expression toleranzassoziierter Moleküle basiert. Unterstützt wird diese Annahme durch den in dieser Arbeit erbrachten Nachweis, dass eine transgenvermittelte Überexpression von Fc $\gamma$ RIIB das allogene T-Zell-Aktivierungspotential stimulierter DCs herabsetzt. Da stimulierte I $\kappa$ B $\alpha$ -DCs verminderte Mengen IL-10 sekretieren, scheint dieses relevante antiinflammatorische Zytokin nicht zum tolerogenen Potential von I $\kappa$ B $\alpha$ -DCs beizutragen.

Im Rahmen von DC/T-Zell-Kokulturen zeigte sich weiterhin, dass I $\kappa$ B $\alpha$ -DCs nicht nur eine im Vergleich zu LV-DCs veränderte T-Zell-Stimulierungskapazität aufweisen, sondern dass diese Transduktanden auch veränderte T-Zell-Zytokinmuster in Kokulturen mit allogenen bzw. syngenen T-Zellen induzieren. In Kokulturen unstimulierter I $\kappa$ B $\alpha$ -DCs mit allogenen T-Zellen wurde das T<sub>H</sub>2-Markerzytokin IL-5, im Gegensatz zu Kokulturen mit LV-DCs, nicht detektiert, wobei die Konzentration des T<sub>H</sub>1-Markerzytokins IFN- $\gamma$  unverändert blieb. In syngenen I $\kappa$ B $\alpha$ -DC/T-Zell-Kokulturen findet eine ähnliche Veränderung statt; die Konzentration von IL-5 und des T<sub>H</sub>2/Treg-Markerzytokins IL-10 ist reduziert, während die Konzentration von IFN- $\gamma$  vergleichbar zu Kokulturen mit LV-DCs ist. Abweichend davon wurde in Kokulturen stimulierter I $\kappa$ B $\alpha$ -DCs und allogener T-Zellen eine zu den entsprechenden Kontrollansätzen erhöhte Menge IFN- $\gamma$  sowie eine verminderte IL-10 Sekretion nachgewiesen. In den entsprechenden syngenen Kokulturen ist analog zu diesem Befund die Menge an IL-10 und IL-5 (nicht statistisch signifikant) im Überstand reduziert. Diese Verstärkung einer T<sub>H</sub>1-Antwort wird eventuell durch eine auf mRNA-Ebene nachgewiesene erhöhte Expression des T<sub>H</sub>1-Induktors IL-12b in LPS-stimulierten I $\kappa$ B $\alpha$ -DCs gefördert. Bislang wurde der Einfluss von I $\kappa$ B $\alpha$ -überexprimierenden DCs auf die Zytokinproduktion kokultivierter T-Zellen, soweit bekannt, nur in einer einzigen humanen Studie untersucht<sup>259</sup>. In der genannten Studie wurde gezeigt, dass mature antigenbeladene DCs in autologen T-Zellen eine verringerte Produktion der Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-4 und IL-10 induzieren. Weitere adäquate *in vitro*-Studien, vor allem im murinen allogenen System, liegen bislang nicht vor.

Die Regulation der Aktivität von MAP-Kinasen (MAP-K), die an der Integration von externen Stimuli wie Stress oder mikrobiellen Infektionen beteiligt sind<sup>261,811</sup>, erfolgt mittels einer Dephosphorylierung der regulatorischen Serin- und Threoninreste, die von dual-spezifischen MAP-Kinase Phosphatasen (MKP) katalysiert wird<sup>270,812</sup>. Die am intensivsten untersuchte MKP-1, die mit Hilfe ihrer N-terminalen Struktur im Nukleus lokalisiert ist<sup>813</sup>, dephosphoryliert

vorzugsweise aktivierte p38- und JNK-Kinasen<sup>814</sup>. Eine Behandlung humaner DCs mit dem p38 MAP-K-spezifischen Inhibitor SB203580 resultiert in einer blockierten Aufregulation der Oberflächenexpression von CD40, CD80, CD86 und HLA-DR in Reaktion auf eine Stimulierung mit LPS<sup>815,816</sup>. Auch die maturierungsassoziierte Steigerung der Sekretion inflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-12 und TNF- $\alpha$  findet in diesen Zellen nicht statt<sup>817</sup>. In Übereinstimmung mit ihrem Phänotyp induzieren LPS-stimulierte SB203580-behandelte DCs eine gegenüber Kontroll-DCs stark reduzierte Proliferation allogener T-Zellen<sup>816,817</sup>. In unstimulierten sowie LPS-stimulierten Zellen der murinen DC-Linie BC1 wirkt sich eine Blockade der p38-Aktivität negativ auf die durch eine CD40-Ligation vermittelte IL-6 und IL-12 Produktion aus<sup>818</sup>. Die spezifische Inhibition von JNK durch SP600125 reduziert in humanen DCs ebenfalls die LPS-induzierte Aufregulation der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 sowie die Sekretion der Zytokine IL-12 und TNF- $\alpha$ <sup>817</sup>. Die allogene T-Zell-Aktivierungskapazität humaner maturaer DCs wird durch eine Inhibition von JNK jedoch nicht moduliert. In stimulierten BM-DCs resultiert ein *Knock out* von MKP-1 in einer verstärkten Sekretion von IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-10 sowie in einer verminderten Produktion von IL-12<sup>273</sup>. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde auf Basis der transgenvermittelten Expression in entsprechend transduzierten unstimulierten und LPS-stimulierten DCs eine gegenüber LV-DCs erhöhte MKP-1 Gesamt-mRNA-Menge detektiert, obwohl stimulierte MKP1-DCs eine im Vergleich zu LV-DCs verminderte endogene MKP-1 mRNA-Expression aufwiesen. Diese Reduktion der endogenen MKP-1 Expression basiert vermutlich auf einer Aktivität verschiedener Regulationsmechanismen, wie sie in Abschnitt 1.4.1 dargestellt sind. In Übereinstimmung damit weist die MKP-1 mRNA beispielsweise mehrere, evolutionär konservierte, putative AREs in ihrem 3'UTR auf<sup>819,820</sup>, die potentielle Bindungsstellen für RNA-BPs wie TTP und HuR darstellen<sup>821,822</sup>. Die Bindung von RNA-BPs an AREs in einer mRNA-Sequenz führt oft zu einer Stabilisierung des jeweiligen Transkripts. In murinen Makrophagen ist die Expression sowie die Phosphorylierung von TTP abhängig von der Aktivität der MAP-K p38<sup>823</sup>. Somit könnte eine transgenvermittelte exogene MKP-1 Expression in DCs die p38-Aktivität reduzieren, was in einer eingeschränkten Expression sowie Phosphorylierung von TTP und somit in einer Destabilisierung der endogenen MKP-1 mRNA resultieren würde. Darüber hinaus haben Hu und Mitarbeiter<sup>824</sup> durch eine SB203580- bzw. RNA-Interferenz- (RNAi) vermittelte p38-Blockade gezeigt, dass die Expression von MKP-1 in LPS-stimulierten Makrophagen p38-abhängig ist und somit eine negative Feedback-Kontrolle zwischen der p38-Aktivität, die unter anderem durch MKP-1 kontrolliert wird, und der Expression von MKP-1 besteht. Eine (adenoviral-vermittelte) Überexpression von MKP-1 auf Proteinebene wurde bisher nur in der humanen Monozyten-Zelllinie THP-1 durchgeführt<sup>271</sup>.

Soweit bekannt, wurde der Einfluss einer Inhibition der MAP-Ks p38, JNK und ERK auf den Phänotyp unstimulierter DCs bislang nicht untersucht, weshalb die in dieser Arbeit für unstimulierte MKP1-DCs ermittelten Daten nur bedingt mit den Ergebnissen anderer Studien für LPS-stimulierte DCs verglichen werden können. Eventuell beeinflusst jedoch der mit der lentiviralen Transduktion assoziierte physikalische Stress differentiell die Aktivität der MAP-Ks p38, JNK und ERK, sodass in unstimulierten MKP1-DCs ähnliche phänotypische Veränderungen auftreten könnten. Unstimulierte MKP1-DCs weisen eine im Vergleich zu LV-DCs runterregulierte mRNA-Expression für die kostimulatorischen Rezeptoren CD40, OX40L und SLAM auf. Dieser Befund stimmt insoweit mit den vorgehend genannten Daten überein, als dass eine Blockade der p38-Aktivität<sup>815,816</sup> sowie der JNK-Aktivität<sup>817</sup> die Expression kostimulatorischer Moleküle auf der Oberfläche stimulierter humaner DCs inhibiert. Da MKP-1 die Aktivität beider Kinasen negativ reguliert, könnten in unstimulierten MKP1-DCs neben CD40 durchaus weitere kostimulatorische Moleküle, in diesem Fall beispielsweise SLAM, auf transkriptionaler Ebene von dieser Blockade betroffen sein. Weiterhin ist in unstimulierten MKP1-DCs die Transkription der Maturierungsmarker Fascin1 und CCR7 und sowie des toleranzassoziierten Moleküls IL-1RA verringert. In Übereinstimmung mit diesen Daten haben Ardeshna und Mitarbeiter<sup>825</sup> unter Verwendung des p38-Inhibitors SB203580 gezeigt, dass die maturierungsassoziierte Aufregulation des Chemokinrezeptors CCR7 in humanen DCs von der p38-Aktivität abhängig ist. Eine positive Regulation der mRNA-Expression in unstimulierten MKP1-DCs wurde in dieser Arbeit für die proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-6 sowie das antiinflammatorische Zytokin IL-10 detektiert. Vor allem die verstärkte mRNA-Expression von IL-6 und IL-10 fügt sich nicht in den Kontext der vorhergenannten Studien humaner DCs, in denen die p38-Aktivität blockiert wurde<sup>817</sup> und muriner DCs, die aus MKP-1 *Knock out* Mäusen isoliert wurden<sup>273</sup>. Ein wesentlicher Unterschied zwischen der vorliegenden Arbeit und allen anderen Studien liegt jedoch in der Analyse der Zytokin-Expression auf mRNA- und nicht auf Proteinebene. Wie in Abschnitt 4.4.1 beschrieben, existieren verschiedene posttranskriptionale Regulationsmechanismen, so dass eine erhöhte mRNA-Menge nicht zwangsläufig mit einer erhöhten Proteinmenge gleichzusetzen ist. So gibt es, wie im Abschnitt der Diskussion des Genexpressionsprofils von I $\kappa$ Ba-DCs dargelegt, mehrere Hinweise darauf, dass die Expression von IL-10<sup>809,810</sup> sowie von IL-6<sup>806,807</sup> posttranskriptional reguliert wird. Da, soweit bekannt, keine adäquaten murinen Studien vorliegen, erfolgt hier ein Vergleich zu humanen DCs, in denen selektiv p38 inhibiert wurde. MKP-1 inhibiert jedoch in unterschiedlicher Stärke p38, JNK und ERK. Außerdem variieren die Ergebnisse eventuell auf Grund von Speziesunterschieden zwischen humanen und murinen DCs. Weiterhin sind unstimulierte MKP1-DCs nach der lentiviralen Transduktion zwar partiell aktiviert, unterscheiden sich jedoch phänotypisch und funktionell stark von LPS-stimulierten transduzierten DCs.



In Reaktion auf eine Stimulation findet hier in MKP1-DCs im Gegensatz zu LV-DCs keine signifikante maturierungsassoziierte Aufregulation der Genexpression von CD86, IL-10, Fascin1 und IDO statt. In humanen DCs wird die maturierungsassoziierte Aufregulation der CD86-Expression durch eine p38-Blockade ebenfalls inhibiert<sup>815,816</sup>. Zhao und Mitarbeiter<sup>273</sup> haben gezeigt, dass MKP1<sup>-/-</sup> DCs drastisch erhöhte Mengen IL-10 sekretieren. Im Kontext mit diesem Befund wurde in verschiedenen Studien nachgewiesen, dass die Aktivität von p38 entscheidend für die IL-10 Produktion im Rahmen einer Stimulierung mit LPS ist<sup>826,827</sup>. Darüber hinaus reguliert eine p38-Blockade in THP-1 Zellen<sup>828</sup> sowie eine JNK-Blockade in murinen DCs<sup>829</sup> die LPS-abhängige Aufregulation der IDO-Expression negativ. Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit in stimulierten MKP1-DCs eine signifikant verminderte mRNA-Transkription für die Moleküle OX40L und CCR7 detektiert, die bereits im Detail im Abschnitt der Genexpressionsanalyse in unstimulierten MKP1-DCs diskutiert wurde. Eine positive Regulation der Genexpression in stimulierten MKP1-DCs im Vergleich zu LV-DCs wurde für das Zytokin IL-6 und den inhibitorischen Rezeptor FcγRIIB detektiert. Die im Gegensatz zu anderen Studien erhöhte IL-6 mRNA-Expression in stimulierten MKP1-DCs basiert vermutlich im Wesentlichen auf den zuvor im Kontext der phänotypischen Analyse unstimulierter MKP1-DCs genannten Gründen. Bemerkenswerterweise weisen stimulierte MKP1-DCs, verglichen mit LV-DCs, drastisch gesteigerte mRNA-Mengen des an der T<sub>H</sub>1-Induktion beteiligten Zytokins IL-1β auf, wobei gleichzeitig auch das mRNA-Niveau des IL-1β-Antagonisten IL-1RA deutlich erhöht ist.

Auf Proteinebene zeigen unstimulierte und stimulierte MKP1-DCs eine jeweils zu LV-DCs vergleichbare Sekretion des antiinflammatorischen Mediators IL-10, obwohl stimulierte MKP1-DCs auf mRNA-Ebene eine eingeschränkte Expression dieses Zytokins aufweisen. An dieser Stelle sei ebenfalls auf die bereits mehrfach erwähnten möglichen posttranskriptionalen Regulationsmechanismen verwiesen, die in einem vom Genexpressionsprofil abweichendem Proteinprofil resultieren können.

In der vorliegenden Arbeit wurde der inhibitorische Effekt der transgenvermittelten MKP1-Expression auf den Aktivitätsstatus der verschiedenen MAP-Kinasen nicht untersucht. Eine Analyse der induzierten Blockade auf Proteinebene wäre für eine präzise phänotypische und funktionelle Charakterisierung von MKP1-DCs sowie für nachfolgende Studien von großem Interesse.

Auf funktionaler Ebene induzieren unstimulierte MKP1-DCs in dieser Arbeit eine jeweils mit LV-DCs vergleichbare proliferative Antwort kokultivierter allogener sowie syngener T-Zellen, obwohl diese Transduktanden laut Genexpressionsprofil vermutlich einen geringeren Aktivitätsstatus aufweisen als LV-DCs, da sie den Maturierungsmarker Fascin1 vermindert transkribieren. In verschiedenen Studien wurde demonstriert, dass eine beeinträchtigte Fascin-Expression in DCs das T-Zell-Aktivierungspotential dieser Zellen reduziert<sup>830,831</sup>.

Soweit bekannt, wurde der Einfluss einer Inhibition einer oder mehrerer MAP-Kinasen auf die APC-Funktion von DCs bislang nicht unter basalen Bedingungen untersucht, so dass keine zu dieser Arbeit vergleichbaren Daten vorliegenden. Analog zu den Ergebnissen einer Blockade der p38-Aktivität in humanen DCs<sup>816,817</sup> wurde in der vorliegenden Arbeit für LPS-stimulierte MKP1-DCs ebenfalls eine im Vergleich zu LV-DCs reduzierte allogene sowie syngene T-Zell-Stimulierungsfähigkeit nachgewiesen, die eventuell auf der limitierten Aufregulation der mRNA-Expression kostimulatorischer Moleküle wie CD86 und OX40L und einer stark erhöhten Transkription des inhibitorischen Rezeptors FcγRIIB basieren könnte. Wie im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen wurde, kann eine transgenvermittelte Überexpression von FcγRIIB auf mRNA-Ebene das allogene T-Zell-Aktivierungspotential stimulierter DCs herabsetzen. Eine detaillierte Analyse der Oberflächenexpression kostimulatorischer sowie inhibitorischer Rezeptoren in stimulierten MKP1-DCs auf Proteinebene würde vermutlich einen entscheidenden Beitrag für die Begründung der detektierten reduzierten T-Zell-Stimulierungskapazität liefern, da MAP-Kinasen essentiell an einer LPS-vermittelte Aufregulation der genannten Moleküle in DCs beteiligt sind<sup>815-817</sup>. Da stimulierte MKP1-DCs eine zu LV-DCs unveränderte IL-10 Sekretion aufweisen, scheint dieses Zytokin hier, wie schon zuvor für stimulierte IκBa-DCs postuliert, nicht zur tolerogenen Funktion von MKP1-DCs beizutragen.

Ähnlich wie für unstimulierte IκBa-DCs gezeigt, ist in einer Kokultur unstimulierter MKP1-DCs und allogener T-Zellen, im Gegensatz zu Kontrollansätzen mit LV-DCs, das T<sub>H</sub>2-Markerzytokin IL-5 nicht detektierbar. Weiterhin wurden verminderte Mengen des T<sub>H</sub>2/Treg-Markerzytokins IL-10 bei einer unveränderten Konzentration des T<sub>H</sub>1-Markerzytokins IFN-γ nachgewiesen. In syngen Kokulturen treten in Abweichung davon im Vergleich zu LV-DCs eine Zunahme der IL-5 (nicht statistisch signifikant) sowie eine Abnahme der IL-10 Konzentration auf. In Kokulturen stimulierter MKP1-DCs und allogener T-Zellen zeichnet sich hingegen, wie zuvor auch für stimulierte IκBa-DCs gezeigt, eher eine Verstärkung der T-Zell-Polarisation in Richtung T<sub>H</sub>1 ab, da in diesen Kokulturen erhöhte Mengen IFN-γ bei einer gleichzeitig reduzierten IL-5 Konzentration und einer im Vergleich zu LV-DCs unveränderten IL-10 Konzentration detektiert wurden. Dagegen ist in den entsprechenden syngen Kokulturen die IFN-γ Menge gegenüber Kontrollansätzen mit LV-DCs deutlich vermindert. Bisher wurden nur die Auswirkungen einer JNK-Blockade auf die syngen T-Zell-polarisierenden Eigenschaften stimulierter humaner DCs untersucht, wobei in dem speziellen Fall die T-Zell-Antwort in Richtung T<sub>H</sub>2 verschoben wird<sup>817</sup>. Soweit bekannt, wurden in dieser Arbeit erstmals Analysen zur Untersuchung des T-Zell-Zytokinmusters infolge einer Kokultivierung mit MKP1-überexprimierender DCs durchgeführt. Auch der Einfluss einer chemischen Blockade der MAP-Ks p38 und ERK in DCs auf das Zytokinprofil kokultivierter

syngener sowie allogener T-Zellen wurde bislang nicht analysiert, so dass keine zur vorliegenden Arbeit vergleichbaren Studien existieren.

Der TF STAT3, der infolge spezifischer Stimuli durch aktivierte Mitglieder der Familie der Janus-Kinasen (JAK) phosphoryliert wird <sup>276,277</sup>, ist an der negativen Regulation inflammatorischer Immunantworten beteiligt. Eine Blockade der JAK2/STAT3-Signaltransduktion durch den spezifischen Inhibitor JSI-124 resultiert in einer massiven Aktivierung immaturer muriner DCs, die sich in einer Aufregulation der Oberflächenexpression von MHCII, CD40 und CD86 manifestiert <sup>832</sup>. Diese DCs weisen darüber hinaus eine erhöhte allogene sowie syngene T-Zell-Aktivierungskapazität auf. Eine ähnliche Erhöhung der antigenspezifischen T-Zell-Stimulierungsfähigkeit wurde auch nach einer Behandlung mit dem JAK-Inhibitor AG490 <sup>833</sup> und in konditionalen STAT3 *Knock out* Mäusen <sup>834,835</sup> detektiert. STAT3<sup>-/-</sup> DCs, die aus tumortragenden Mäusen isoliert wurden, weisen eine Aufregulation der Expression von MHCII, CD80 sowie CD86 auf ihrer Zelloberfläche auf, sekretieren in Reaktion auf eine Stimulation mit LPS erhöhte Mengen IL-12 und induzieren eine stärkere proliferative Antwort antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen <sup>836</sup>. Eine durch Tumor-abgeleitete (*tumor derived*, TD) Faktoren gesteigerte STAT3-Aktivität in murinen DCs wirkt sich negativ auf die Oberflächenexpression von MHCII, CD40 und C86 aus, was vermutlich auch der Grund für die verminderte allogene T-Zell-Stimulierungsfähigkeit dieser Zellen ist <sup>284</sup>.

Für STAT3 wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit weder in unstimulierten noch in stimulierten STAT3-DCs ein höheres Gesamt-mRNA-Niveau als in LV-DCs detektiert. Dieses Resultat ist konform mit dem Befund, dass eine exogene STAT3 Expression die endogene Transkription dieses Moleküls in beiden DC-Aktivierungszuständen negativ reguliert. Soweit bekannt, wurde bisher kein negativer Feedback-Mechanismus identifiziert, innerhalb dessen der TF STAT3 seine eigene mRNA-Expression kontrolliert. Da auch keine Sequenzanalysen des STAT3-Promotors vorliegen, ist eine Identifizierung von Bindestellen für TFs und RNA-BPs, die essentiell in translationale bzw. posttranskriptionale Regulationsmechanismen involviert sind, nicht möglich. Darüber hinaus wurde eine spezifische Überexpression von STAT3 in DCs oder Makrophagen, soweit bekannt, bisher nicht in der Literatur beschrieben. Der Einfluss einer transgenvermittelten STAT3 Expression auf das Genexpressionsprofil muriner DCs wurde bisher nicht untersucht. Da es sich bei diesem TF aber um eine essentielle Komponente diverser Signaltransduktionskaskaden handelt, die in das Überleben, die Proliferation, die Differenzierung und die Apoptose von Zellen involviert sind <sup>278</sup>, könnten spezifische Modifikationen auf mRNA-Ebene in STAT3-DCs auftreten. Tatsächlich wurde hier in unstimulierten STAT3-DCs eine im Vergleich zu LV-DCs reduzierte mRNA-Expression der kostimulatorischen Rezeptoren CD86, 4-1BBL und SLAM sowie der

toleranzassoziierten Moleküle IL1-RA, FcγRIIB und IDO nachgewiesen. Eine reduzierte CD86-Expression auf Proteinebene in Reaktion auf eine gesteigerte STAT3-Aktivität in unstimulierten DCs wurde auch von Nefedova und Mitarbeiter<sup>284</sup> detektiert. Inwieweit auch andere kostimulatorische Oberflächenmoleküle wie 4-1BBL in diesen DCs von einer negativen Regulation betroffen sind, wurde bislang nicht untersucht.

Bei einer Stimulation mit LPS findet in STAT3-DCs keine signifikante maturierungsassoziierte Aufregulation der CD80 mRNA-Expression statt und die Transkription der Moleküle CD40, SLAM, IL10 und IL-1R2 ist im Vergleich zu LV-DCs reduziert. Die nicht stattfindende Aufregulation der CD80 mRNA-Expression in Reaktion auf eine Aktivierung mit LPS fügt sich in den Kontext der Analysen von STAT3<sup>-/-</sup> DCs ein, die auf Proteinebene eine erhöhte CD80-Oberflächenexpression zeigen<sup>836</sup>. Nefedova und Mitarbeiter zeigten, dass sich eine Inhibition der STAT3-Aktivität<sup>832</sup> positiv und eine Steigerung der STAT3-Aktivität<sup>284</sup> negativ auf die CD40-Proteinexpression auswirkt. Darüber hinaus wurden in der vorliegenden Arbeit in stimulierten STAT3-DCs erhöhte mRNA-Mengen für IL-1β, FcγRIIB und IDO detektiert. In diesem Zusammenhang wurde in Makrophagen nachgewiesen, dass eine spezifische Blockade von STAT3 durch einen Inhibitor bzw. durch siRNA zu einer verminderten Aufregulation der LPS-vermittelten IL-1β Produktion auf mRNA- und Proteinebene führt<sup>837</sup>. In einer aktuellen Studie von Sun und Mitarbeitern<sup>838</sup> wurde gezeigt, dass eine Inhibition der Histon-Deazetylase HDAC in einer gesteigerten STAT3-Aktivität resultiert, die wiederum die IDO-Transkription in DCs positiv beeinflusst. Ein Einfluss des TF STAT3 auf die Expression der anderen hier als reguliert identifizierten Gene in DCs wurde, soweit bekannt, bisher nicht untersucht.

Analog zu der auf mRNA-Ebene nachgewiesenen eingeschränkten IL-10 mRNA-Transkription weisen stimulierte STAT3-DCs auf Proteinebene eine im Vergleich zu LV-DCs reduzierte Sekretion dieses antiinflammatorischen Zytokins auf. Dieses Resultat weicht von dem Befund ab, dass eine gewebespezifische Zerstörung des STAT3-Gens *in vivo* zu einer verminderten IL-10 Produktion in Reaktion auf eine Stimulierung mit LPS führt<sup>283</sup>. Außerdem haben Benkhart und Mitarbeiter<sup>839</sup> im humanen IL-10-Promotor eine STAT3-Bindestelle identifiziert und demonstriert, dass eine Bindung von aktiviertem STAT3 an den IL-10-Promotor eine effiziente Expression des IL-10 Gens induziert. Da STAT3 in der hier vorliegenden Arbeit nicht effektiv auf mRNA-Ebene in DCs überexprimiert wurde, ist nicht zwangsläufig eine analog zu diesen beiden Untersuchungen gesteigerte IL-10 Produktion in den entsprechend transduzierten DC-Populationen zu erwarten. In allen anderen zuvor genannten Studien wurde der Einfluss des STAT3-Aktivitätszustands auf die IL-10 Produktion von DCs nicht untersucht. Ebenfalls in Übereinstimmung mit ihrem Genexpressionsprofil ist auch die CD86-Oberflächenexpression unstimulierter STAT3-DCs im Vergleich zu LV-DCs geringer (nicht statistisch signifikant). Darüber hinaus wurde für

unstimulierte und stimulierte STAT3-DCs eine jeweils verminderte Menge an MHCII-Molekülen auf der Zelloberfläche detektiert. Diese Ergebnisse auf Proteinebene stimmen mit den Befunden überein, dass STAT3<sup>-/-</sup> DCs erhöhte Mengen an MHCII und CD86 auf ihrer Oberfläche exprimieren, während unstimulierte und stimulierte murine DCs infolge einer durch TD-Faktoren erhöhten STAT3-Aktivität eine reduzierte Expression der beiden genannten Moleküle aufweisen<sup>284</sup>. Obwohl eine transgenvermittelte Überexpression von STAT3 auf mRNA-Ebene in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden konnte, zeigen STAT3-DCs phänotypische Veränderungen, die auch bei DCs auftreten, die eine durch TD-Faktoren induzierte gesteigerte STAT3-Aktivität aufweisen. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass diese Faktoren, zu denen unter anderem Zytokine wie IL-6 und IL-10 sowie Wachstumsfaktoren wie VEGF zählen, nicht nur spezifisch die STAT3-Aktivität modulieren, sondern vermutlich auch andere essentielle Signaltransduktionswege in DCs beeinflussen<sup>617,618</sup>.

Unter basalen Bedingungen induzieren STAT3-DCs in dieser Arbeit, ähnlich wie IκBα- und MKP1-DCs, eine im Vergleich zu LV-DCs vergleichbare Proliferation allogener T-Zellen. Im Gegensatz dazu zeigen immature DCs, deren STAT3-Aktivität durch TD-Faktoren erhöht wurde, eine verminderte allogene T-Zell-Stimulierungskapazität<sup>284</sup>. Dies kann zum einen auf der Verwendung unterschiedlicher experimenteller Systeme beruhen, da im Rahmen der genannten Studie in der MLR CD11c<sup>+</sup> BALB/c DCs mit C57BL/6 Lymphknotenzellen kokultiviert wurden, während hier C57BL/6 DCs mit Nylonwolle-angereicherten BALB/c T-Zellen in einer MLR eingesetzt wurden. Auf der anderen Seite könnten TD-Faktoren, wie schon im vorhergehenden Abschnitt erwähnt, neben STAT3 noch weitere zentrale Faktoren in DCs modulieren. In Übereinstimmung mit Studien, die demonstrieren, dass eine verminderte STAT3-Aktivität in DCs deren allogene sowie syngene T-Zell-Stimulierungskapazität erhöht<sup>284,836</sup> und eine gesteigerte STAT3-Aktivität in DCs diese herabsetzt<sup>832</sup>, weisen stimulierte STAT3-DCs in der vorliegenden Arbeit eine gegenüber LV-DCs reduzierte Fähigkeit zur Induktion einer allogener proliferativen T-Zell-Antwort auf.

Die transgenvermittelte STAT3-Expression in DCs resultiert hier weiterhin in einer Modulation der Zytokinantwort kokultivierter T-Zellen. In Kokulturen unstimulierter STAT3-DCs und allogener T-Zellen ist die Konzentration des T<sub>H</sub>2/Treg-Markerzytokins IL-10 im Vergleich zu Kokulturen mit LV-DCs vermindert. Die Menge an IFN-γ und IL-5 ist hingegen vergleichbar zu Kontrollansätzen mit unstimulierten LV-DCs. LPS-stimulierte STAT3-DCs induzieren demgegenüber in allogeneren Kokulturen tendenziell eine Verstärkung der T-Zell-Antwort in Richtung T<sub>H</sub>1, da in den entsprechenden Überständen erhöhte Mengen des T<sub>H</sub>1-Markerzytokins IFN-γ bei unveränderten IL-5 sowie IL-10 Konzentrationen detektiert wurden. Soweit bekannt, wurde der Einfluss einer veränderten STAT3-Expression in DCs auf deren T-Zell-polarisierende Eigenschaften bisher nicht untersucht.

SOCS-1 spielt in DCs und anderen Immunzellen eine zentrale Rolle bei der Regulation von Immunantworten, die durch Zytokine wie IL-2, IL-6, IL-12 oder IFN- $\gamma$  induziert werden<sup>840,841</sup>. In DCs ist SOCS-1 darüber hinaus an der negativen Regulation der LPS-vermittelten Aktivierung beteiligt. Murine SOCS-1-defiziente DCs zeigen in Reaktion auf eine Stimulierung mit LPS oder CpG eine gesteigerte Sekretion der Zytokine IL-6, IL-12 und TNF- $\alpha$ <sup>294,842,843</sup>, während die Oberflächenexpression von MHCII und kostimulatorischen Molekülen wie CD80, CD86, CD40 nur geringfügig verändert ist<sup>843,844</sup>. Shen und Mitarbeiter<sup>844</sup> haben demonstriert, dass eine Inhibition von SOCS-1 durch siRNA die Antigenpräsentation von DCs erhöht, was in einer verbesserten antigenspezifischen Antitumor-Immunität resultiert. Die adenoviral-vermittelte Überexpression von SOCS-1 in murinen DCs minimiert die LPS-induzierte Aufregulation der Oberflächenexpression von MHCII, CD80 und CD40 sowie die Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IL-12<sup>845</sup>. In Übereinstimmung mit ihrem tolerogenen Phänotyp weisen diese DCs eine verminderte T-Zell-Stimulierungskapazität auf und induzieren *in vitro* in kokultivierten allogenen T-Zellen einen hyporesponsiven Status.

In dieser Arbeit ist die Gesamt-mRNA-Menge an SOCS-1 infolge einer transgenvermittelten Expression in entsprechend transduzierten unstimulierten und LPS-stimulierten DCs deutlich gegenüber LV-DCs erhöht. SOCS-1 wurde ebenfalls bereits mittels eines adenoviralen Transfers entsprechender Expressionsvektoren effektiv auf mRNA- und Proteinebene in der Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7<sup>846</sup> und ganz aktuell in murinen BM-DCs<sup>845</sup> überexprimiert.

Im Gegensatz zu I $\kappa$ B $\alpha$ -, MKP1- und STAT3-DCs wird in unstimulierten SOCS1-DCs die mRNA-Expression kostimulatorischer Moleküle hier nicht moduliert. Die transgenvermittelte SOCS-1 Expression resultiert in unstimulierten SOCS1-DCs, verglichen mit LV-DCs, in einer Aufregulation der mRNA-Transkription von IL-1 $\beta$  und dessen Antagonisten IL-1RA sowie von IL-12b. Im Gegensatz dazu zeigen verschiedene Studien, dass SOCS-1-defiziente DCs, unabhängig von ihrem Aktivierungszustand, eine erhöhte<sup>842,843</sup> und SOCS-1-überexprimierende DCs eine verminderte IL-12 Sekretion<sup>845</sup> aufweisen. Da, wie in Abschnitt 4.4.1 dargestellt, verschiedene transkriptionale und posttranskriptionale Regulationsmechanismen in DCs existieren, müssen das Genexpressionsprofil und die Proteinmenge eines bestimmten Moleküls nicht zwangsläufig konsistent sein. Wie bereits im Abschnitt des Genexpressionsprofils von I $\kappa$ B $\alpha$ -DCs erwähnt, gibt es Hinweise auf eine Regulation der IL-12 Expression durch RNA-BPs<sup>807</sup>. Eine signifikante negative Regulation auf mRNA-Ebene wurde in SOCS1-DCs für IL-6 und das toleranzassoziierte Molekül MKP-1 detektiert. Im Einklang mit der vorliegenden Arbeit haben Kimura und Mitarbeiter<sup>847</sup> in Makrophagen infolge einer SOCS-1-Überexpression eine spezifische Inhibition der LPS-induzierten IL-6 Produktion auf mRNA- und Proteinebene demonstriert. Stimulierte SOCS-1<sup>-/-</sup>

-DCs weisen in Übereinstimmung damit eine reduzierte IL-6 Sekretion auf<sup>842</sup>. Eine aktuelle Untersuchung zeigt, dass die negative regulatorische Funktion von SOCS-1 nicht ausschließlich auf den JAK/STAT-Signaltransduktionsweg beschränkt ist<sup>848</sup>. SOCS-1 kann ebenfalls mit dem Glucocorticoidrezeptor (GR) interagieren und so die Transkription des GR-regulierten Gens MKP-1 negativ beeinflussen<sup>848</sup>.

In LPS-stimulierten SOCS1-DCs findet im Vergleich zu LV-DCs keine maturierungsassoziierte Aufregulation der mRNA-Transkription von CD40, CD80, CD86, 4-1BBL sowie SLAM statt. Fu und Mitarbeiter<sup>845</sup> haben ebenfalls eine eingeschränkte LPS-induzierte Aufregulation der CD40- und CD80-Expression auf Proteinebene in SOCS-1-überexprimierenden DCs detektiert. Darüber hinaus sind in der vorliegenden Arbeit auch die mRNA-Mengen des Maturierungsmarkers CCR7 sowie von IL-10 und IL-12b in stimulierten SOCS1-DCs vermindert. Analog zu diesem Ergebnis wurde für stimulierte SOCS1-DCs im Vergleich zu LV-DCs eine reduzierte Sekretion von IL-10 auf Proteinebene detektiert. Im Gegensatz zu unstimulierten SOCS1-DCs befindet sich die Expression von IL-12b in LPS-stimulierten SOCS1-DCs im Einklang mit anderen Studien, in denen der Phänotyp SOCS-1-defizienter<sup>842,843</sup> sowie SOCS-1-überexprimierender DCs<sup>845</sup> analysiert wurde. Letztere weisen allerdings in Abweichung von der vorliegenden Arbeit eine erhöhte IL-10 Sekretion auf, was, wie bereits zuvor mehrfach erwähnt, auf der Aktivität posttranskriptionaler Regulationsmechanismen basieren könnte. Im Einklang mit dem in dieser Arbeit ermittelten Genexpressionsprofil stimulierter SOCS1-DCs führt ein *Knock out* von SOCS-1 in DCs zu einer Erhöhung der CCR7 mRNA-Expression<sup>842</sup>. Von den analysierten toleranzassoziierten Markermolekülen wirdIDO in stimulierten SOCS1-DCs auf mRNA-Ebene stärker exprimiert als in LV-DCs. Der Einfluss von SOCS-1 auf die IDO mRNA-Expression in murinen DCs wurde, soweit bekannt, bisher nicht analysiert.

Abweichend zu I $\kappa$ Ba-, MKP1- und STAT3-DCs induzieren unstimulierte SOCS1-DCs eine signifikant geringere proliferative Antwort allogener T-Zellen als LV-DCs, obwohl sie als einzige Transduktanden-Population keine verminderte mRNA-Expression kostimulatorischer Rezeptoren und keine gesteigerte Expression inhibitorischer Moleküle aufweisen. Da auch die Sekretion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 in unstimulierten SOCS1-DCs nicht erhöht ist, scheint die verminderte T-Zell-Stimulierungskapazität dieser DCs auf in dieser Arbeit nicht identifizierten Faktoren zu basieren. Eine Bestimmung der Oberflächenexpression kostimulatorischer und inhibitorischer Rezeptoren auf Proteinebene würde einen präziseren Aufschluss über den Phänotyp dieser Zellen zulassen. Eine adenoviral-vermittelte Überexpression von SOCS-1 in murinen DCs resultiert ebenfalls in einem reduzierten T-Zell-Stimulierungspotential unstimulierter und stimulierter DCs<sup>845</sup>. Entsprechend der zuvor genannten Studie induzieren auch stimulierte SOCS1-DCs in der vorliegenden Arbeit eine geringere allogene T-Zell-Proliferation als LV-DCs, die eventuell auf

der verminderten maturierungsassoziierten Aufregulation der mRNA-Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-12b sowie kostimulatorischer Moleküle basiert.

In der vorgenannten Studie von Fu und Mitarbeitern<sup>845</sup> wurden in Kokulturen unstimulierter und stimulierter SOCS-1-überexprimierender DCs und allogener CD4<sup>+</sup> T-Zellen jeweils verminderte Mengen IFN- $\gamma$  sowie eine erhöhte Sekretion von IL-10 nachgewiesen. Dementsprechend induzieren SOCS-1-defiziente DCs *in vitro* und *in vivo* verstärkte T<sub>H</sub>1-artige Immunantworten<sup>295</sup>. Abweichend von den vorgenannten Studien wurde in dieser Arbeit in Kokulturen unstimulierte SOCS1-DCs und allogener T-Zellen das T<sub>H</sub>2-Markerzytokin IL-5 nicht nachgewiesen und die Konzentration von IL10 war im Vergleich zu Kokulturen mit LV-DCs erniedrigt. Diese funktionale Eigenschaft unstimulierter SOCS1-DCs deckt sich mit der auf mRNA-Ebene erhöhten Expression des T<sub>H</sub>1-Induktors IL-12 bei gleichzeitig herunterregulierter Expression des T<sub>H</sub>2-Induktors IL-6<sup>49</sup> in diesen Zellen. Ebenfalls gegensätzlich zu anderen Studien weicht das Zytokinprofil in Kokulturen stimulierter SOCS1-DCs und allogener T-Zellen nicht von dem in Kokulturen mit LV-DCs ab. Mögliche Unterschiede zwischen der Studie von Fu und Mitarbeitern<sup>845</sup> und der vorliegenden Arbeit sind zum einen die voneinander abweichenden viralen Transfersysteme, da infolge einer adenoviralen Transduktion eine Ausreifung von DCs induziert wird, die mit einer erhöhten Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs einhergeht<sup>387-389</sup>. Außerdem wurden in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten Nylonwolle-angereicherte Gesamt-T-Zellen verwendet und nicht MACS-aufgereinigte CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Zusammengefasst resultiert die transgenvermittelte Expression intrazellulärer Regulatorproteine jeweils in einer verminderten T-Zell-Stimulierungskapazität stimulierter muriner DCs. Unter basalen Bedingungen zeigen lediglich SOCS1-DCs eine gegenüber LV-DCs verminderte Induktion der allogegenen T-Zell-Proliferation. In LPS-stimulierten DCs wird die effektivste Reduktion des allostimulatorischen Potentials durch eine exogene Expression von I $\kappa$ B $\alpha$  erreicht, gefolgt von MKP-1 sowie STAT3 und SOCS-1. Obwohl die transgenvermittelte Expression intrazellulärer Proteine in DCs in einer autoregulativen Modifikation der jeweiligen endogenen mRNA-Expression resultiert, sind diese Moleküle im Hinblick auf eine Herabsetzung des allogegenen T-Zell-Aktivierungspotentials effizienter, als eine exogene Expression potentiell inhibitorischer Oberflächenmoleküle. Die spezifische Veränderung des Phänotyps von DCs durch die transgenvermittelte Expression intrazellulärer Regulatorproteine manifestiert sich weiterhin in einer jeweils charakteristischen Variation des Zytokinprofils kokultivierter T-Zellen, die eine Applikation dieser DCs in verschiedenen Krankheitsmodellen interessant erscheinen lassen.



#### **4.4.3 Transgenvermittelte Überexpression der sekretierten Zytokine TGF- $\beta$ 1, IL-1RA, IL-10 und IL-21 in DCs**

Die komparative Analyse unterschiedlicher Molekülgruppen belegt eindeutig, dass die transgenvermittelte Expression sekretierter Zytokine, im Vergleich zu Oberflächenrezeptoren und intrazellulären Regulatorproteinen, das allogene T-Zell-Aktivierungspotential von DCs am stärksten limitiert. Die außerordentliche Effizienz dieser genetischen Modifikationen basiert auf den dualen Wirkmechanismen der im Rahmen dieser Arbeit ausgewählten Faktoren: Auf der einen Seite wird infolge der exogenen Expression die Menge des jeweiligen Zytokins in der Zelle erhöht, wodurch eine jeweils spezifische Adaption der Transduktanden, in die vermutlich diverse intrazelluläre Prozesse involviert sind, an die neuen Bedingungen erfolgt. Darüber hinaus verfügen DCs über Rezeptoren für TGF- $\beta$ 1, IL-1RA, IL-10 und IL-21, weshalb diese Zytokine nach ihrer Sezernierung nicht nur parakrin auf andere, in der Nähe befindliche Zellen, sondern auch autokrin auf die Produzentenzelle selbst wirken. Somit addieren sich in TGF $\beta$ 1-, IL1RA-, IL10- und IL21-DCs zwei Effekte, die zu einer massiven Veränderung des Phänotyps und der APC-Funktion dieser Zellen beitragen.

Im Einklang mit den Ergebnissen der transgenvermittelte Expression von Oberflächenrezeptoren und intrazellulären Regulatorproteinen in DCs wurde mit Hilfe spezifischer Primer gleichermaßen eine effektive exogene Transgenexpression auf mRNA-Ebene für die sekretierten Zytokine TGF- $\beta$ 1, IL-1RA, IL-10 sowie IL-21 nachgewiesen. Ähnlich den Resultaten, die für I $\kappa$ B $\alpha$ , MKP-1 und STAT3 beschrieben wurden, resultiert die transgenvermittelte exogene Expression von TGF- $\beta$ 1 und IL-10 in einer Autoregulation des entsprechenden endogenen Transkriptionsstatus. In unstimulierten und verstärkt in LPS-stimulierten TGF $\beta$ 1-DCs wird die endogene TGF- $\beta$ 1 mRNA-Expression gegenüber LV-DCs durch eine zusätzliche exogene Expression dieses Moleküls herunterreguliert. Für IL10-DCs wurde in beiden Aktivierungszuständen infolge der Transgenexpression eine gesteigerte endogene mRNA-Transkriptionsrate detektiert. In Übereinstimmung mit diesem Befund haben Staples und Mitarbeiter <sup>849</sup> in humanen Monozyten-abgeleiteten Makrophagen demonstriert, dass eine Behandlung mit IL-10 via STAT3 die IL-10 mRNA-Expression positiv reguliert. Ausschließlich IL1RA-DCs zeigen in Reaktion auf eine transgenvermittelte exogene Expression keine Adaption des entsprechenden endogenen mRNA-Expressionsniveaus. Inwieweit eine Transgenexpression sekretierter Zytokine in DCs in einer Veränderung der entsprechenden endogenen mRNA-Expression resultiert, wurde, soweit bekannt, bisher in keiner anderen Studie analysiert.

In verschiedenen Studien wurde bereits gezeigt, dass das antiinflammatorische Zytokin TGF- $\beta$ 1 *in vitro* die Aktivierung und Maturierung von DCs inhibiert<sup>368,369,850</sup>. Eine Behandlung humaner<sup>851,852</sup> und muriner<sup>153</sup> DCs mit diesem Zytokin resultiert unter basalen Bedingungen in einer verminderten Oberflächenexpression von HLA-DR, CD40, CD80 und CD86. Darüber hinaus verhindert TGF- $\beta$ 1 in DCs die Aufregulation der Expression kostimulatorischer Rezeptoren<sup>153,853</sup> sowie die Produktion der Zytokine IL-12 und IL-10<sup>850,851</sup> in Reaktion auf eine Stimulierung. Bedingt durch diese phänotypischen Veränderungen resultiert die Behandlung mit TGF- $\beta$ 1 in einer Reduktion der allostimulatorischen Funktion unstimulierter und stimulierter DCs<sup>153,367,850,852</sup>. Murine myeloide DCs, die TGF- $\beta$ 1 infolge einer retroviralen Transduktion überexprimieren, weisen eine unveränderte Oberflächenexpression von CD40, CD80 und CD86 auf, zeigen *in vitro* aber trotzdem eine eingeschränkte allostimulatorische Aktivität<sup>854</sup>. Monozyten-abgeleiteten DCs aus Rhesusaffen, die TGF- $\beta$ 1 überexprimieren, weisen ebenfalls einen muren Phänotyp und eine deutliche Expression kostimulatorischer Rezeptoren auf, induzieren jedoch nur eine sehr geringe proliferative Antwort in allogenen T-Zellen<sup>855</sup>.

In der vorliegenden Arbeit ist die Gesamtmenge an TGF- $\beta$ 1 mRNA in unstimulierten TGF $\beta$ 1-DCs, vermutlich auf Grund der reduzierten endogenen TGF- $\beta$ 1 Expression, im Vergleich zu LV-DCs vermindert. In stimulierten TGF $\beta$ 1-DCs wurde eine im Vergleich zu LV-DCs (nicht signifikant) verstärkte TGF- $\beta$ 1 Gesamt-mRNA-Expression detektiert, obwohl sich die exogene TGF- $\beta$ 1 Expression in stimulierten DCs negativ auf die entsprechende endogene Transkription auswirkt. Im Gegensatz zu den Resultaten auf mRNA-Ebene wird TGF- $\beta$ 1 infolge einer transgenvermittelten exogenen Expression von unstimulierten und stimulierten TGF $\beta$ 1-DCs in geringeren Mengen produziert als von LV-DCs. Über die transkriptionale Kontrolle der TGF- $\beta$ 1 Expression ist bislang sehr wenig bekannt. In der humanen TGF- $\beta$ 1 Promotorsequenz wurden jedoch zwei Bindestellen für den TF AP-1 identifiziert<sup>856</sup>. An diese binden die AP-1 Familienmitglieder c-jun und c-fos, die durch TGF- $\beta$ 1 selbst induziert werden und autoinduzierte die TGF- $\beta$ 1 Produktion steigern<sup>857,858</sup>. In Fibroblasten hingegen inhibieren die AP-1 Aktivatoren JNK1 und JNK2 die TGF- $\beta$ 1 Expression<sup>859</sup>, was eine duale Rolle von AP-1 in der Regulation der TGF- $\beta$ 1 Transkription vermuten lässt. Da JNKs auch als *stress-activated phospho-kinases* bezeichnet werden, die insbesondere an der Integration von Stresssignalen beteiligt sind, könnte der mit der lentiviralen Transduktion assoziierte physikalische Stress in einer partiellen Induktion von JNKs und somit bei zusätzlicher exogener TGF- $\beta$ 1 Expression in einer verminderten TGF- $\beta$ 1 Gesamt-mRNA-Expression in DC-Transduktanden resultieren. In vielen Zelllinien korrelierte die Menge an TGF- $\beta$ 1 mRNA nicht mit der Menge an sekretiertem Protein, was auf eine Beteiligung posttranskriptionaler und -translationaler Regulationsmechanismen an der TGF- $\beta$ 1 Expression schließen lässt<sup>860</sup>. Tatsächlich befindet sich im 5'UTR der TGF- $\beta$ 1 mRNA eine

Sequenz, die die Ausbildung einer stabilen *Stemloop* Sekundärstruktur ermöglicht und so die Translation dieses Zytokins negativ reguliert. Allison und Mitarbeiter<sup>861</sup> haben darüber hinaus im 5'UTR Hinweise auf potentielle Bindestelle für cis-inhibitorische Elemente in ihrer Studie gefunden. Eventuell resultiert eine vermehrte Bindung inhibitorischer Faktoren an die TGF- $\beta$ 1 mRNA in TGF $\beta$ 1-DCs in einer gegenüber LV-DCs verminderten Sekretion dieses Zytokins. Eine erfolgreiche Überexpression von TGF- $\beta$ 1 in murinen DCs auf Proteinebene infolge eines retroviralen Transfers des entsprechenden Expressionsvektors wurde von Takayama und Mitarbeitern<sup>854</sup> beschrieben.

Soweit bekannt, wurde der Einfluss einer transgenvermittelten TGF- $\beta$ 1 Expression auf das Genexpressionsprofil muriner DCs bisher nicht untersucht. In Übereinstimmung mit einer Studie von Mou und Mitarbeitern<sup>153</sup>, in der murine BM-DCs in Gegenwart von TGF- $\beta$ 1 kultiviert wurden, weisen unstimulierte TGF $\beta$ 1-DCs hier eine gegenüber LV-DCs verminderte mRNA-Expression für den kostimulatorischen Rezeptor CD40 auf. In murinen DCs, die mit einem TGF- $\beta$ 1-Expressionskonstrukt transduziert wurden, wurde unter basalen Bedingungen hingegen keine veränderte CD40-Expression auf Proteinebene detektiert<sup>854</sup>. Darüber hinaus ist in unstimulierten TGF $\beta$ 1-DCs die Transkription von 4-1BBL, OX40L und SLAM sowie der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-12b signifikant reduziert. In verschiedenen Studien wurde nachgewiesen, dass eine selektive Blockade der MAP-Kinase p38 die maturierungsassoziierte Steigerung der IL-6 Sekretion in DCs inhibiert<sup>818</sup>. Da Ohtani und Mitarbeiter in einer aktuellen Studie<sup>853</sup> demonstrierten, dass TGF- $\beta$ 1 in humanen Monozyten-abgeleiteten DCs die p38-Aktivität negativ reguliert, könnte die in der vorliegenden Arbeit in unstimulierten TGF $\beta$ 1-DCs reduzierte IL-6 mRNA-Transkription auf einer Modulation des Aktivitätszustands von MAP-Kinasen durch eine transgenvermittelte exogene TGF- $\beta$ 1 Expression basieren. Weiterhin wurden in dieser DC-Population reduzierte mRNA-Mengen für die beiden DC-Maturierungsmarker Fascin1 und CCR7 detektiert.

Ähnlich den Studien TGF- $\beta$ 1-behandelter DCs *in vitro*<sup>153,853</sup> findet hier in TGF $\beta$ 1-DCs im Gegensatz zu LV-DCs in Reaktion auf eine Stimulation mit LPS keine maturierungsassoziierte Aufregulation der Genexpression von CD80 und CD86 statt. Auch der in LV-DCs statt findende LPS-induzierte Anstieg der Transkription von 4-1BBL, Fascin1, CCR7 sowie IL-10 wurde in stimulierten TGF $\beta$ 1-DCs nicht detektiert. Der Befund der verminderten IL-10 Expression wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ebenfalls auf Proteinebene bestätigt und fügt sich somit in den Kontext der zuvor genannten Studien, in denen eine Analyse TGF- $\beta$ 1-behandelter DCs erfolgte<sup>850,851</sup>. Ogata und Mitarbeiter<sup>862</sup> haben im Einklang mit der vorliegenden Arbeit eine Inhibition der CCR7 mRNA-Expression durch TGF- $\beta$ 1 in murinen DCs und DC-Vorläufern nachgewiesen. Weiterhin wurde in den hier generierten, stimulierten TGF $\beta$ 1-DCs eine verminderte mRNA-Transkription von IL-12b und dem Toleranzmarker IDO detektiert. Eine eingeschränkte IL-12 Sekretion wurde ebenfalls in

TGF- $\beta$ 1-behandelten stimulierten humanen DCs detektiert <sup>153,850,851</sup>, obwohl Fogel-Petrovic und Mitarbeiter eher eine posttranskriptionale Inhibition der IL-12 Expression durch TGF- $\beta$ 1 postulieren, da sie keine TGF- $\beta$ 1-abhängig variierenden mRNA-Mengen für IL-12p40 (IL-12b) und IL-12p35 detektiert haben. Ein Einfluss von TGF- $\beta$ 1 auf die Genexpression von IDO in DCs wurde, soweit bekannt, bislang nicht analysiert.

Auf funktionaler Ebene induzieren unstimulierte TGF $\beta$ 1-DCs in dieser Arbeit eine mit LV-DCs vergleichbare Proliferation allogener T-Zellen, obwohl diese Transduktanden laut Genexpressionsprofil die kostimulatorischen Rezeptoren CD40, 4-1BBL, OX40L und SLAM sowie die proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-12b in reduziertem Maße transkribieren. Im Gegensatz dazu weisen TGF- $\beta$ 1-behandelte unstimulierte humane <sup>852</sup> und murine <sup>153</sup> DCs sowie unstimulierte retroviral transduzierte TGF- $\beta$ 1-überexprimierende DCs <sup>854</sup> eine verminderte allogene T-Zell-Stimulierungskapazität auf. Fogel-Petrovic und Mitarbeiter <sup>850</sup> haben in Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit ebenfalls keine Veränderung der allostimulatorischen Aktivität unstimulierter DCs infolge einer Kultivierung in Gegenwart von TGF- $\beta$ 1 detektiert. Die größte Abweichung zu den beiden zuerst genannten Studien basiert auf der Tatsache, dass im Rahmen dieser Arbeit die transgenvermittelte exogene TGF- $\beta$ 1 Expression nur in stimulierten DCs in einem leichten Anstieg der TGF- $\beta$ 1 Gesamt-mRNA-Menge resultierte und das Transgen weder im Überstand stimulierter noch unstimulierter TGF $\beta$ 1-DCs in erhöhten Mengen detektiert wurde. Somit unterscheidet sich die Situation für TGF $\beta$ 1-DCs in der vorliegenden Arbeit physiologisch grundsätzlich von den Bedingungen in den beiden zitierten Studien. In der Studie von Takayama und Mitarbeitern <sup>854</sup> wurde infolge einer retroviralen-vermittelten Überexpression eine gesteigerte TGF- $\beta$ 1 Sekretion in den entsprechenden DC-Populationen detektiert. Ebenfalls in Abweichung von der vorliegenden Arbeit wurden diese nicht wie hier mit allogenen BALB/c sondern mit allogenen C3H T-Zellen im Rahmen der MLR kokultiviert. Darüber hinaus wurden in der Studie von Mou und Mitarbeitern <sup>153</sup> murine DCs in Gegenwart von GM-CSF und IL-4 generiert, wobei verschiedene Studien gezeigt haben, dass dieses Zytokin in unstimulierten BM-DCs die Oberflächenexpression von MHCII, CD40, CD80 und CD86 drastisch aufreguliert <sup>722-724</sup>. Eventuell ist der Effekt von TGF- $\beta$ 1 im murinen System auf das allogene T-Zell-Aktivierungspotential derart voraktivierter DCs stärker als auf DCs, die einzig in Gegenwart von GM-CSF kultiviert und lentiviral transduziert wurden. In Übereinstimmungen mit Studien, in denen DCs in Gegenwart von TGF- $\beta$ 1 kultiviert wurden <sup>153,850</sup> wurde in der vorliegenden Arbeit für LPS-stimulierte TGF $\beta$ 1-DCs eine im Vergleich zu LV-DCs reduzierte allogene T-Zell-Stimulierungsfähigkeit nachgewiesen, die unter anderem auf der verminderten mRNA-Expression kostimulatorischer Rezeptoren sowie des proinflammatorischen Zytokins IL-12b basieren könnte. Da stimulierte TGF $\beta$ 1-DCs eine, verglichen mit LV-DCs, verminderte IL-10 Sekretion aufweisen, scheint dieses relevante immunmodulatorische Zytokin nicht zur

tolerogenen Funktion dieser DC-Population beizutragen. Eine weitere Ursache für die phänotypische Veränderung und die eingeschränkte APC-Funktion stimulierter TGF $\beta$ 1-DCs könnte auch eine herunterregulierte TLR4-Expression sein, wie sie in TGF- $\beta$ 1-behandelten murinen DCs nachgewiesen wurde<sup>153</sup>. Somit wäre eine effektive LPS-Antwort von DCs, die eine Aufregulation der Expression kostimulatorischer Moleküle sowie proinflammatorischer Zytokine beinhaltet, auf Grund der reduzierten Menge dieses Rezeptors nur eingeschränkt möglich. Soweit bekannt, wurde bisher in keiner Studie analysiert, inwieweit eine transgenvermittelte exogene TGF- $\beta$ 1 Expression die allostimulatorische Kapazität LPS-stimulierter DCs variiert.

Neben dem T-Zell-Stimulierungspotential von TGF $\beta$ 1-DCs wurde auch das durch diese Transduktanden in T-Zellen induzierte Zytokinmuster bestimmt. In Kokulturen unstimulierter TGF $\beta$ 1-DCs mit allogenen T-Zellen wurde für die drei getesteten Markerzytokine IFN- $\gamma$  (T<sub>H</sub>1), IL-5 (T<sub>H</sub>2) und IL-10 (T<sub>H</sub>2/Treg) eine im Vergleich mit Kontrollansätzen jeweils erhöhte Konzentration detektiert. Stimulierte TGF $\beta$ 1-DCs beeinflussen ebenfalls das Zytokinprofil kokultivierter T-Zellen, da in den entsprechenden Kokulturüberständen erhöhte Mengen IFN- $\gamma$  bei unveränderten IL-5 sowie IL-10 Konzentrationen nachgewiesen wurden. Soweit bekannt, wurde der Einfluss einer TGF- $\beta$ 1-Behandlung auf die T-Zell-polarisierenden Eigenschaften von DCs *in vitro* nur in einer einzigen Studie untersucht<sup>850</sup>. Im humanen System induzieren stimulierte TGF- $\beta$ 1-behandelte DCs eine gesteigerte IL-5 Sekretion in kokultivierten allogenen T-Zellen, während die IFN- $\gamma$  Konzentration nicht beeinflusst wird. Wie bereits zuvor erwähnt, besteht jedoch ein großer Unterschied zwischen TGF- $\beta$ 1-behandelte DCs und den TGF $\beta$ 1-DCs in dieser Arbeit. Ein weiterer Grund könnte auch ein Speziesunterschied zwischen humanen und murinen DCs bzw. T-Zellen sein.

Das Zytokin IL-1RA ist ein natürlich vorkommender kompetitiver IL-1 Antagonist, der analog zu IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  an TypI und TypII IL-1 Rezeptoren bindet, jedoch keinerlei agonistische Wirkung zeigt<sup>863,864</sup>. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass IL-1RA den Effekt von IL-1 *in vitro* und *in vivo* inhibieren kann und den Schweregrad verschiedener inflammatorischer Erkrankungen im Tiermodell reduziert<sup>865,866</sup>. In klinischen Studien wurde die Applikation von IL-1RA effizient zur Behandlung rheumatoider Arthritis<sup>710</sup>, allergischer Reaktionen<sup>711</sup> sowie zur Verlängerung des Überlebens von Allotransplantaten<sup>712</sup> eingesetzt. Die Integration von IL-1-vermittelten Stimuli erfolgt über eine Aktivierung der Signaltransduktionswege NF- $\kappa$ B, JNK/AP-1 und p38. In Übereinstimmung damit ist die nukleare Translokation von NF- $\kappa$ B p65 in IL-1RA-defizienten Mäusen deutlich erhöht und verlängert<sup>867</sup>. Somit könnte eine Überexpression von IL-1RA zum tolerogenen Status von DCs beitragen, indem es zur Restriktion der IL-1-vermittelten Ausreifung von DCs<sup>706,707</sup> beiträgt. IL-1 $\beta$  wird dabei in großen Mengen von stimulierten DCs produziert und trägt so autokrin zur Stimulierung von

DCs bei. Im Einklang mit dieser Hypothese wurde eine erhöhte IL-1RA mRNA-Expression von Bros und Mitarbeitern<sup>157</sup> für tolerogene stimulierte SP37A3-Zellen und im Rahmen der vorliegenden Arbeit für tolerogene LPS-stimulierte DEX-APCs nachgewiesen. Bisher wurde der Effekt von IL-1RA auf den Phänotyp und die Funktion von DCs, soweit bekannt, weder im Rahmen einer IL-1RA-Behandlung noch nach einer Überexpression dieses Zytokins untersucht.

In der vorliegenden Arbeit resultiert die zusätzliche transgenvermittelte exogene IL-1RA Expression in einer im Vergleich zu LV-DCs verstärkten Gesamt-mRNA-Transkription von IL-1RA in unstimulierten und LPS-stimulierten DCs. Eine Überexpression von IL-1RA auf Proteinebene wurde unter anderem *in vitro* in synovialen Fibroblasten<sup>868</sup> und Langerhans-Inseln<sup>359</sup> sowie *in vivo* nach einer Injektion der entsprechenden Viren in das Kniegelenk von Kaninchen in der Gelenksflüssigkeit<sup>869</sup> nachgewiesen. Soweit bekannt, wurde dieses Zytokin bislang nicht in DCs oder Makrophagen exogen überexprimiert. Die Analyse der Proteinproduktion von IL-1RA durch IL1RA-DCs erfolgte im Rahmen dieser Arbeit nicht, sollte aber für ergänzende Studien nachgeholt werden.

In Übereinstimmung mit der Annahme, dass eine exogene IL-1RA Expression eventuell die Aktivierung von DCs inhibiert, weisen hier generierte, unstimulierte IL1RA-DCs im Vergleich zu LV-DCs eine reduzierte mRNA-Expression für die kostimulatorischen Rezeptoren CD40, CD86, 4-1BBL und OX40L auf. Da in IL-1RA-defizienten Mäusen die NF-κB-Aktivität deutlich erhöht ist<sup>867</sup>, könnte eine erhöhte IL-1RA Expression in Übereinstimmung damit die Aktivität dieses TFs vermindern, was in einer eingeschränkten Expression von kostimulatorischen Molekülen resultieren würde<sup>258,798,802</sup>. Unterstützt wird die Annahme einer verringerten NF-κB-Aktivität durch eine Studie von Garat und Arend<sup>870</sup>, in der gezeigt wurde, dass eine Überexpression von icIL-1Ra1 (eine der vier alternativen Spleißvarianten des IL-1RA Genprodukts<sup>871</sup>) in der intestinalen Epithelzelllinie Caco-2 die nukleare Translokation von NF-κB inhibiert. Darüber hinaus wird in der vorliegenden Arbeit in unstimulierten IL1RA-DCs die Transkription der Maturierungsmarker Fascin1 und CCR7 sowie der toleranzassoziierten Moleküle IL-1R2 und FcγRIIB negativ reguliert. In diesen Transduktanden wurde für IL-10 eine positive Regulation der mRNA-Expression detektiert, die sich ebenfalls auf Proteinebene bestätigte.

Stimulierte IL1RA-DCs sind in dieser Arbeit im Vergleich zu LV-DCs durch eine eingeschränkte mRNA-Expression der Moleküle CD80, CD86, OX40-L, IL-1R2 sowie Fascin1 gekennzeichnet. Wie bereits zuvor diskutiert, könnte die verminderte Expression kostimulatorischer Moleküle in stimulierten IL1RA-DCs auf einer eingeschränkten NF-κB-Aktivität basieren. Ein weiterer Faktor, der an der Aufregulation der Expression dieser Rezeptoren in Reaktion auf eine Stimulierung beteiligt ist, ist die MAP-Kinase p38<sup>815,816</sup>. Die durch die Bindung von IL-1 induzierten Signale werden unter anderem durch eine

Aktivierung von p38 integriert. Somit könnte eine Blockade des IL-1 Rezeptors durch IL-1RA in einer Reduktion der p38-Aktivität resultieren. Dementsprechend haben Garat und Arend<sup>870</sup> demonstriert, dass die antiinflammatorische Aktivität von icIL-1Ra1 unter anderem auf einer Inhibition von p38 beruht. Damit übereinstimmend wurde hier in stimulierten IL1RA-DCs eine im Vergleich zu LV-DCs erhöhte Expression der toleranzassoziierten inhibitorischen MAP-Kinase Phosphatase MKP-1 detektiert, welche vorzugsweise aktivierte p38- und JNK-Kinasen dephosphoryliert<sup>814</sup>. Darüber hinaus findet in stimulierten IL1RA-DCs eine Aufregulation der Transkription weiterer toleranzassoziiertes Moleküle wie FcγRIIB undIDO statt. Interessanterweise resultiert die transgenvermittelte exogene IL-1RA-Expression in unstimulierten sowie LPS-stimulierten IL1RA-DCs auch in einer verstärkten Transkription von IL-1β, dessen biologischer Antagonist IL-1RA ist. Dieses Phänomen wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls in unstimulierten und stimulierten MKP1-DCs nachgewiesen und könnte unter Umständen auch in IL1RA-DCs auf einer verminderten p38-Aktivität beruhen.

Auf funktionaler Ebene induzieren in dieser Arbeit generierte, unstimulierte IL-1RA-DCs eine im Vergleich zu LV-DCs verringerte proliferative Antwort in kokultivierten syngenen sowie allogenen T-Zellen, was eventuell auf der auf mRNA-Ebene detektierten verminderten Expression kostimulatorischer Rezeptoren sowie der erhöhten Sekretion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 basiert. Auch in stimulierten DCs resultiert die transgenvermittelte exogene IL-1RA Expression in einer im Vergleich zu LV-DCs reduzierten allogenen sowie syngenen T-Zell-Stimulierungsfähigkeit. Diese eingeschränkte APC-Funktion stimulierter IL1RA-DCs könnte somit auf der verminderten mRNA-Expression kostimulatorischer Rezeptoren bei gleichzeitiger Aufregulation der Transkription toleranzassoziiertes Moleküle basieren, wie sie im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch im Genexpressionsprofil von DEX-APCs nachgewiesen wurde. Außerdem weisen unstimulierte und stimulierte IL1RA-DCs jeweils eine im Vergleich zu LV-DCs verminderte mRNA-Transkription des DC-Maturierungsmarkers Fascin1 auf. In verschiedenen Studien wurde demonstriert, dass eine beeinträchtigte Fascin-Expression in DCs das T-Zell-Aktivierungspotential dieser Zellen reduziert<sup>830,831</sup>. Insgesamt bestätigen diese Ergebnisse die Hypothese, dass eine Überexpression von IL-1RA (hier auf mRNA-Ebene nachgewiesen) in DCs die Aktivierung dieser Zellen partiell inhibiert. Der Einfluss einer wie auch immer gestalteten IL-1RA-Behandlung auf die APC-Funktion von DCs wurde ebenfalls bislang nicht in anderen Studien untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde weiterhin mittels DC/T-Zell-Kokulturen gezeigt, dass IL1RA-DCs die Zytokinantwort kokultivierter T-Zellen im Vergleich zu LV-DCs modulieren. In Kokulturen unstimulierter IL1RA-DCs und allogener T-Zellen wurden im Vergleich zu Kontrollansätzen mit LV-DCs erhöhte Mengen des T<sub>H</sub>2-Markerzytokins IL-5 sowie des T<sub>H</sub>2/Treg-Markerzytokins IL-10 bei unveränderter IFN-γ Konzentration detektiert. In

syngen IL1RA-DC/T-Zell-Kokulturen ist die IL-10 Konzentration erniedrigt, während die Konzentration von IFN- $\gamma$  und IL-5 jeweils vergleichbar zu Kokulturen mit LV-DCs ist. Kokulturen stimulierter IL1RA-DCs und allogener T-Zellen weisen, verglichen mit den Kontrollansätzen, gesteigerte Mengen an IFN- $\gamma$  und IL-5 sowie reduzierte Mengen IL-10 auf. In auffälligem Kontrast dazu ist in den entsprechenden syngen Kokulturen die Sekretion von IFN- $\gamma$  im Vergleich zu Kokulturen mit LV-DCs deutlich verringert. Bislang liegen, soweit bekannt, keine adäquaten *in vitro*-Studien vor, in denen ein Einfluss von IL-1RA auf die T-Zell-polarisierenden Eigenschaften von DCs untersucht wurde.

Obwohl inzwischen in diversen Studien die Rolle von IL-21 im Kontext der Immunregulation von Entzündungsreaktionen sowie Tumor-Immuntherapien<sup>335,872,873</sup> untersucht wurde, wird es im Allgemeinen als T<sub>H</sub>17-polarisierendes Zytokin betrachtet<sup>334</sup>. Interessanterweise werden alle anderen Zytokine (IL-1, IL-6, IL-12), die in Gegenwart von TGF- $\beta$ 1 die Differenzierung von T<sub>H</sub>17-Zellen induzieren, von aktivierten APCs sekretiert und sind infolgedessen schon in den frühen Stadien des T-Zell-Primings präsent<sup>874</sup>. Im Gegensatz dazu wird IL-21 vornehmlich von aktivierten T-Zellen generiert<sup>335</sup>. Dementsprechend wird angenommen, dass T<sub>H</sub>17-Zellen zunächst durch eine Kombination APC-abgeleiteter Zytokine und TGF- $\beta$ 1 induziert werden und anschließend IL-21 sekretieren, um die T<sub>H</sub>17-Polarisierung zu verstärken. Da jedoch in verschiedenen Studien gezeigt wurde, dass IL-21 die APC-Aktivität von DCs inhibiert<sup>325,326</sup>, könnte IL-21 auch eine Komponente eines negativen Rückkopplungsmechanismus darstellen, der die Stärke und die Dauer von Immunantworten kontrolliert. Murine DCs, die in Gegenwart von IL-21 kultiviert wurden, exprimieren reduzierte Mengen an MHCII und CD86 auf der Zelloberfläche<sup>325</sup>. In Reaktion auf eine Stimulierung mit LPS wird in diesen DCs die Expression von MHCII, CD80 und CD86 sowie die Sekretion von IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-12 nicht bzw. lediglich geringfügig verstärkt. Auch in humanen Monozyten-abgeleiteten DCs wird die maturierungsassoziierte Aufregulation der Oberflächenexpression von HLA-DR und CD86 sowie der Sekretion von IL-12 durch IL-21 inhibiert<sup>875</sup>. Murine IL-21-behandelte DCs induzieren in Übereinstimmung mit ihrem protolerogenen Phänotyp eine verminderte proliferative Antwort in proteinantigenspezifischen CD4<sup>+</sup><sup>325</sup> und CD8<sup>+</sup><sup>326</sup> T-Zellen, jedoch nicht in allogenen Gesamt-T-Zellen.

Da DCs ursprünglich kein IL-21 exprimieren, ist in der vorliegenden Arbeit die Gesamtmenge an IL-21-mRNA in IL-21-Transduktanden *de facto* gegenüber LV-DCs erhöht. In Übereinstimmung mit den Resultaten auf mRNA-Ebene wurde IL-21 im Vergleich zu LV-DCs in deutlich erhöhten Mengen im Kulturüberstand entsprechend transduzierter unstimulierter und stimulierter DCs detektiert. Eine spezifische Überexpression von IL-21 in DCs oder Makrophagen wurde bisher nicht in der Literatur beschrieben und konnte somit erstmals



erfolgreich im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden. In verschiedenen Studien wurde dieses Zytokin unter anderem in murinen TS/A Brust-Adenokarzinom-Zellen<sup>876</sup>, humanen AsPC-1 Pankreaskarzinom-Zellen<sup>877</sup> sowie in den murinen Kolonkarzinom-Zellen Colon 26<sup>878</sup> auf mRNA- bzw. Proteinebene überexprimiert.

Soweit bekannt, wurde der Einfluss von IL-21 auf das Genexpressionsprofil muriner DCs bisher nicht untersucht. Da IL-21 Signale mittels einer Aktivierung der Januskinasen JAK1 und JAK3<sup>879,880</sup> und nachgeschaltet von TFs der STAT-Familie<sup>323,881-883</sup> integriert werden, könnten Genexpressionsänderungen in IL21-DCs auftreten. Tatsächlich wird das Genexpressionsprofil unstimulierter DCs in der vorliegenden Arbeit durch eine Überexpression von IL-21, im Vergleich zu allen anderen analysierten Molekülen, in Bezug auf die Anzahl der modulierten Gene am massivsten verändert. In Übereinstimmung mit den Analysen IL-21-behandelter muriner<sup>325</sup> und humaner<sup>875</sup> DCs wurde hier in unstimulierten IL21-DCs eine im Vergleich zu LV-DCs reduzierte mRNA-Expression der kostimulatorischen Rezeptoren CD80 und CD86 nachgewiesen. Darüber hinaus findet in dieser DC-Population eine verminderte Transkription der Moleküle CD40, 4-1BBL und OX40L sowie der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-12b statt. Eventuell basiert das veränderte Genexpressionsprofil kostimulatorischer Rezeptoren in IL21-DCs auch auf einer erhöhten Aktivität des TF STAT3, wie sie durch die Bindung von IL-21 an seinen Rezeptor induziert wird<sup>881,882</sup>. In murinen DCs wurde übereinstimmend damit infolge einer gesteigerten STAT3-Aktivität eine verminderte Oberflächenexpression von CD40 und CD86 detektiert<sup>284</sup>. Weiterhin wurde von Strengell und Mitarbeitern<sup>875</sup> gezeigt, dass IL-21 in humanen DCs die Expression von SOCS-1 und -3 steigert. SOCS-1 könnte somit in IL21-DCs an der negativen Regulation der IL-6 und IL-12b mRNA-Expression beteiligt sein, da eine Überexpression von SOCS-1 in DCs die Sekretion von IL-12<sup>845</sup> und in Makrophagen die mRNA-Expression von IL-6<sup>847</sup> inhibiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde in unstimulierten SOCS1-DCs ebenfalls eine reduzierte IL-6 mRNA-Expression detektiert. Auch die Transkription der DC-Maturierungsmarker Fascin1 und CCR7 sowie des Toleranzmarkers IDO findet in unstimulierten IL21-DCs, verglichen mit LV-DCs, auf niedrigerem Niveau statt. Brandt und Mitarbeiter<sup>325</sup> haben in IL21-behandelten unstimulierten DCs ebenfalls eine verminderte CCR7 mRNA-Expression nachgewiesen. Eine positive Regulation der mRNA-Expression in unstimulierten IL21-DCs wurde in der vorliegenden Arbeit für IL-1 $\beta$  und dessen Antagonisten IL-1RA sowie für IL-10 detektiert. Die erhöhte IL-10 mRNA-Expression könnte auf der bereits erwähnten, gesteigerten STAT3-Aktivität basieren, da Benkhart und Mitarbeiter<sup>839</sup> im humanen IL-10 Promotor eine STAT3-Bindestelle identifiziert haben und zeigen konnten, dass eine Bindung von aktiviertem STAT3 eine effiziente Expression des IL-10 Gens induziert. Auf Proteinebene ist die IL-10 Produktion in unstimulierten IL21-DCs allerdings gegenüber LV-DCs nicht erhöht. Diese Diskrepanz basiert, wie bereits zuvor im Abschnitt

von I $\kappa$ B $\alpha$ -DCs detailliert ausgeführt, wahrscheinlich auf der Aktivität posttranskriptionaler Regulationsmechanismen. Ein Einfluss von IL-21 auf die Expression der toleranzassoziierten Moleküle IDO und IL-1RA in DCs wurde, soweit bekannt, bisher in keiner anderen Studie aufgezeigt.

Entsprechend IL-21-behandelten murinen<sup>325</sup> sowie humanen<sup>875</sup> DCs weisen LPS-stimulierte IL21-DCs hier, im Gegensatz zu LV-DCs, keine maturierungsassoziierte Aufregulation der mRNA-Transkription von CD86 sowie eine deutlich verminderte Expression von CD80 und IL-12b auf. Darüber hinaus werden in IL21-DCs nach einer Stimulierung mit LPS auch die Moleküle OX40L, Fascin1 und CCR7 nicht verstärkt exprimiert. Weiterhin wird die Transkription des kostimulatorischen Rezeptors 4-1BBL im Vergleich zu LV-DCs in geringerem Ausmaß gesteigert. Als Einziges der analysierten toleranzassoziierten Moleküle wird in dieser DC-Population die Transkription von IL-1RA aufreguliert. Obwohl auf mRNA-Ebene keine negative Modulation der IL-10-Expression stattfindet, sekretieren stimulierte IL21-DCs, verglichen mit LV-DCs, deutlich reduzierte Mengen dieses wichtigen antiinflammatorischen Mediators. Demgegenüber haben Brandt und Mitarbeiter<sup>325</sup> in LPS-stimulierten IL-21-behandelten murinen DCs keine veränderte IL-10 Sekretion detektiert. Allerdings erfolgte die IL-21-Behandlung in der genannten Studie nur für 24 h, während DCs in der vorliegenden Arbeit an Tag 5 und 6 der Kultur transduziert und erst an Tag 9 in die entsprechenden Experimente eingesetzt wurden. Basieren könnte die verminderte IL-10 Sekretion stimulierter IL21-DCs auf einer erhöhten JAK3-Aktivität, die durch die Bindung von IL-21 an seinen Rezeptor induziert wird<sup>879,880</sup>. Entsprechend dieser Annahme weisen JAK3-defiziente BM-DCs eine drastisch erhöhte IL-10 Sekretion auf<sup>884</sup>. Generell würde eine Analyse der durch IL-21 veränderten Expression bzw. Aktivierung von STAT3, SOCS-1, SOCS-3 sowie JAK3 in IL21-DCs eine präzisere phänotypische und funktionelle Analyse dieser DC-Population erlauben.

In Übereinstimmung mit ihrem Genexpressionsprofil und der vorgenannten Studie von Brandt und Mitarbeitern<sup>325</sup> weisen unstimulierte IL21-DCs hier, verglichen mit LV-DCs, reduzierte Proteinmengen an MHCII, CD40, CD80 sowie CD86 auf der Zelloberfläche auf. In Reaktion auf eine Stimulierung mit LPS regulieren IL21-DCs, anders als LV-DCs, die Expression von MHCII, CD40 (in Abweichung vom mRNA-Profil) und CD80 nicht hoch, was sich mit Resultaten bei Kultivierung von DCs in Gegenwart von IL-21 deckt<sup>325,875</sup>. Obwohl stimulierte IL21-DCs auf mRNA-Ebene, verglichen mit LV-DCs, eine verminderte CD86-Expression aufweisen, wurde das Protein in beiden DC-Populationen in vergleichbaren Mengen detektiert. In Abweichung von der vorliegenden Arbeit zeigen IL-21-behandelte DCs eine Inhibition der maturierungsassoziierten Aufregulation von CD86<sup>325,875</sup>. Diese Abweichung beruht wahrscheinlich auf den unterschiedlichen experimentellen Systemen, da

hier eine lentiviral-vermittelte Überexpression von IL-21 in der Zelle stattfindet und das Zytokin nicht exogen dem Kulturmedium zugefügt wurde.

Unter basalen Bedingungen weisen IL21-DCs in dieser Arbeit, ähnlich wie IL1RA-DCs, ein im Vergleich zu LV-DCs reduziertes allogenenes T-Zell-Aktivierungspotential auf, was unter anderem vermutlich auf der reduzierten Oberflächenexpression von MHCII und kostimulatorischen Molekülen basiert. Im Gegensatz dazu wird die syngene 2D2-T-Zell-Stimulierungsfähigkeit unstimulierter DCs durch eine Überexpression von IL-21 nicht moduliert. Bemerkenswerterweise induzieren unstimulierte IL-21-behandelte DCs eine verminderte Proliferation transgener T-Zellen, deren TCR spezifisch für Ovalbumin-abgeleitete Peptidantigene ist <sup>325,326</sup>, während die allostimulatorische Kapazität unverändert ist. Diese Abweichung beruht nicht auf dem Effekt unterschiedlicher IL-21 Konzentrationen in der DC-Kultur, da hier in Kulturüberständen von IL21-DCs vergleichbare Mengen IL-21 nachgewiesen wurden, wie sie von Brandt und Mitarbeitern in der DC-Kultur eingesetzt wurden. Außerdem weisen beide DC-Populationen einen größtenteils übereinstimmenden protolerogenen Phänotyp auf. Allerdings unterscheiden sich eine lentivirale Überexpression eines Zytokins und eine exogene Zugabe alleine in ihrem physikalischen Prozess stark voneinander und könnten somit auch zu unterschiedlichen Resultaten führen. Eventuell reicht aber auch der durch IL-21 induzierte protolerogene DC-Phänotyp nicht aus, um einen hypoproliferativen Status in allogenen T-Zellen zu induzieren, sondern das Zytokin selbst muss zu Beginn des T-Zell-Primings anwesend sein. Eine ähnliche Beobachtung wurde auch von Brandt und Mitarbeitern <sup>326</sup> im Rahmen syngener Kokulturrexperimente mit IL-21-behandelten DCs beschrieben, in denen zur Neutralisierung der Effekte von T-Zell-sekretiertem IL-21 anti-IL-21 Antikörper eingesetzt wurden. Im Gegensatz zu einer exogenen Behandlung sekretieren IL21-DCs dieses Zytokin vermutlich noch in geringen Mengen nach der Bestrahlung in der allogenen Kokultur. In Unterstützung dieser Annahme hat die Zugabe von IL-21 zu Kokulturen unstimulierter bzw. stimulierter DCs und allogener T-Zellen keinen Einfluss auf die Proliferation allogener T-Zellen (persönliche Mitteilung von Herrn Dr. Matthias Bros). Somit ist die bloße Anwesenheit von IL-21 nicht ausreichend, um die T-Zell-Proliferation zu limitieren, sondern es ist gleichzeitig die Präsenz protolerogener DCs als Stimulatoren notwendig. Eine weitere Abweichung zu der genannten Studie von Brandt und Mitarbeitern <sup>325</sup> ist die Verwendung MOG-reaktiver 2D2 T-Zellen statt OVA-spezifischer OTI und OTII T-Zellen im syngenen System, weshalb ein Unterschied in der Reaktivität der TCR-transgenen T-Zellen, der in divergierenden Ergebnissen resultiert, nicht ausgeschlossen werden kann. Beispielsweise könnten die beiden transgenen TCRs in ihrer Affinität bzw. Avidität für das jeweils spezifische Peptid variieren.

In Übereinstimmung mit ihrem primär maturierungsresistenten protolerogenen Phänotyp weisen stimulierte IL21-DCs in der vorliegenden Arbeit eine gegenüber LV-DCs reduzierte

Fähigkeit zur Induktion einer alloge­nen proliferativen T-Zell-Antwort auf. Im Vergleich zu allen anderen DC-Populationen inhibiert im Rahmen dieser Arbeit nur eine Überexpression des äußerst wirkungsvollen antiinflammatorischen Zytokins IL-10 noch effektiver die allostimulatorische Kapazität LPS-stimulierter muriner DCs. Der Einfluss von IL-21 auf das allo­gene T-Zell-Aktivierungspotential stimulierter BM-DCs wurde, soweit bekannt, bisher in keiner anderen Studie nachgewiesen. Bemerkenswerterweise zeigen auch stimulierte IL21-DCs trotz ihres deutlich protolerogenen Phänotyps eine zu LV-DCs nahezu deckungsgleiche syngene T-Zell-Aktivierungskapazität.

Somit hat die Überexpression von IL-21 in dieser Arbeit, im Gegensatz zum allo­genen System, keinen Einfluss auf die syngene APC-Funktion unstimulierter und stimulierter DCs. Es scheint in beiden Aktivierungszuständen also ein von IL21-DCs generierter Faktor vorhanden zu sein, der die Proliferation syngener 2D2 T-Zellen auf ein Niveau anhebt, wie es durch LV-DCs vermittelt wird. Im einfachsten Fall könnte es sich bei diesem Faktor um IL-21 selbst handeln, wobei für IL-21 bisher primär T-Zell-polarisierende Wirkungen beschrieben wurden<sup>885</sup>. Außerdem limitiert IL-21 unter homöostatischen Bedingungen die Größe des CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zell-Pools, wie Studien in IL-21-Rezeptor-defizienten Mäusen gezeigt haben<sup>331</sup>. Darüber hinaus ist zu berücksichtigen, dass im syngenen System ein einzelner TCR-Klon, im allo­genen System jedoch eine Summe von TCR-Spezifitäten für eine Interaktion mit Antigenen zur Verfügung steht.

Eine transgenvermittelte IL-21-Expression verändert in der hier durchgeführten Studie nicht nur die allo­gene T-Zell-Stimulierungskapazität von DCs, sondern auch die durch diese DCs vermittelten Zytokinmuster in allo­genen und syngenen DC/T-Zell-Kokulturen. Soweit bekannt, wurde der Einfluss von IL-21 auf die T-Zell-polarisierenden Eigenschaften von DCs bisher nicht untersucht, weshalb keine zur vorliegenden Arbeit adäquaten *in vitro*-Studien vorliegen. In Kokulturen unstimulierter IL21-DCs und allo­gener T-Zellen wurde das T<sub>H</sub>2/Treg-Markerzytokin IL-10, im Gegensatz zu Kokulturen mit LV-DCs, nicht detektiert. In ähnlicher Form ist auch das Zytokinprofil entsprechender syngener Kokulturen verändert; im Vergleich zu den Kontrollansätzen sind die Mengen des T<sub>H</sub>2-Markerzytokins IL-5 sowie von IL-10 in diesen Kulturüberständen deutlich vermindert. Eine stärkere Veränderung findet in Kokulturen stimulierter IL21-DCs und allo­gener T-Zellen statt. In diesem Fall wurde eine reduzierte Sekretion von IL-5 sowie IL-10 bei einer zu Kokulturen mit LV-DCs vergleichbaren IFN- $\gamma$  Sekretion detektiert. Ähnlich zu den Befunden im allo­genen System, tritt in Kokulturen unstimulierter IL21-DCs mit syngenen T-Zellen gegenüber den LV-DC-Ansätzen eine Reduktion der IL-5 und IL-10 Konzentration auf. In Kulturen polyklonal stimulierter T-Zellen resultiert exogenes IL-21 in einer Verlagerung der T-Zell-Polarisierung in Richtung T<sub>H</sub>2, indem in der initialen Primingphase die Differenzierung von T<sub>H</sub>-Vorläuferzellen in IFN- $\gamma$ -produzierende T<sub>H</sub>1-Zellen inhibiert wird<sup>318</sup>. Ein ähnlicher Effekt wurde hier in Kokulturen mit

stimulierten IL21-DCs und syngenen T-Zellen detektiert. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass in dem äußerst eingeschränkten experimentellen System von Wurster und Mitarbeitern die polyklonale Stimulierung ein nicht-physiologisches Signal darstellt und APC-abhängige Effekte, die die T-Zell-Polarisierung essentiell beeinflussen (z.B. kostimulatorische Moleküle, sekretierte Zytokine) <sup>788,789</sup>, nicht reflektiert. Somit ist ein direkter Vergleich auf Grund der unterschiedlichen experimentellen Systeme nur sehr eingeschränkt möglich. Eine weitere Option der T-Zell-Polarisation durch IL21-DCs ist auch eine verstärkte Induktion von T<sub>H</sub>17-Zellen, da verschiedene Studien zeigen, dass IL-21, in Kombination mit TGF-β1, die Differenzierung von T<sub>H</sub>17-Zellen fördert <sup>321,334</sup>. Diese Möglichkeit kann für das in der vorliegenden Arbeit verwendete experimentelle allogene System ausgeschlossen werden, da IL21-DCs in beiden Aktivierungszuständen eine jeweils mit LV-DCs vergleichbare IL-17 Sekretion in allogenen T-Zellen induzierten. Generell zeigen diese Analysen, dass IL21-DCs zwar nicht die Proliferation syngener 2D2 T-Zellen beeinflussen, aber im Vergleich zu LV-DCs im unstimulierten und stimulierten Zustand deren Zytokinproduktion reduzieren.

Eine Besonderheit des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 ist, dass es die Maturierung und die Funktion von DCs autokrin und parakrin inhibieren kann <sup>149,886,887</sup>. IL10-behandelte murine und humane DCs zeichnen sich durch eine reduzierte Oberflächenexpression von MHCI, MHCII und kostimulatorischen Molekülen aus <sup>147,306,888</sup>. Zusätzlich wird auch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1β, IL-6, TNF-α und vor allem IL-12 durch IL-10 limitiert <sup>310,519</sup>. In Übereinstimmung mit ihrem tolerogenen Phänotyp weisen IL-10-behandelte DCs eine deutlich verminderte T-Zell-Aktivierungskapazität auf <sup>305,889,890</sup>. Eine Transduktion humaner <sup>311</sup> oder muriner DCs <sup>312,891,892</sup> mit IL-10-Expressionskonstrukten resultiert in einer vergleichbaren phänotypischen und funktionellen Veränderung, wie eine Kultivierung der Zellen in Gegenwart dieses Zytokins. Auf Grund der zahlreichen Studien, die den tolerogenen Charakter IL-10-behandelter DCs belegen, wurden IL10-DCs im Rahmen der vorliegenden als eine Art „Goldstandard“ in allen komparativen Analysen mitgeführt.

Infolge der zusätzlichen transgenvermittelten exogenen IL-10 Expression wurde im Rahmen dieser Arbeit in entsprechend transduzierten unstimulierten und LPS-stimulierten DCs eine im Vergleich zu LV-DCs verstärkte Gesamt-mRNA-Transkription von IL-10 detektiert. In Übereinstimmung mit den Resultaten auf mRNA-Ebene wurde dieses Zytokin im Vergleich zu LV-DCs in deutlich erhöhten Mengen im Kulturüberstand unstimulierter und LPS-stimulierter IL10-DCs nachgewiesen. Eine Überexpression von IL-10 in DCs wurde bereits in verschiedenen Studien auf Proteinebene demonstriert <sup>312,891,893</sup>.

Die Überexpression von IL-10 resultiert in den hier generierten, unstimulierten IL10-DCs, verglichen mit LV-DCs, in einer negativen Regulation der mRNA-Transkription von CD40, OX40L, IL-12b, Fascin1 sowie CCR7. In Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit wurde

in IL-10-behandelten<sup>894</sup> und IL-10-überexprimierenden<sup>311</sup> unstimulierten murinen DCs eine verminderte CD40 Oberflächenexpression auf Proteinebene detektiert. Takayama und Mitarbeiter<sup>895</sup> demonstrierten, dass eine Kultivierung von BM-DCs in Gegenwart von murinem oder viralem IL-10 unter basalen Bedingungen die mRNA-Expression von CCR7 reduziert. Eine infolge einer IL-10-Behandlung verminderte IL-12 Sekretion unstimulierter BM-DCs wurde auch von Yanagawa und Mitarbeitern<sup>896</sup> detektiert. Außerdem werden hier in unstimulierten IL10-DCs das proinflammatorische Zytokin IL-1 $\beta$  sowie dessen Antagonist IL-1RA verstärkt exprimiert. Die verstärkte mRNA-Expression von IL-1RA kann auf zwei verschiedenen Signalwegen basieren. Durch IL-10 induzierte Signale werden mittels einer Aktivierung von JAK1 und nachgeschaltet des TF STAT3 integriert<sup>897-899</sup>. Da sich im proximalen IL-1RA Promotor eine funktionale STAT3-Bindestelle befindet<sup>839,900</sup>, könnte eine durch IL-10 erhöhte STAT3-Aktivität in einer verstärkten Expression dieses Zytokins resultieren. In Unterstützung dieser Annahme haben Carl und Mitarbeiter<sup>900</sup> demonstriert, dass LPS-stimulierte IL-10-behandelte RAW 264.7 Zellen eine über Aktivierung von STAT3 stark erhöhte IL-1RA mRNA-Expression aufweisen. Unter basalen Bedingungen war die IL-1RA Expression in Gegenwart von IL-10 jedoch unverändert. Abweichend von der vorgenannten Studie könnte in dieser Arbeit auch in unstimulierten IL10-DCs eine durch IL-10 induzierte Regulation der IL-1RA mRNA-Expression auftreten, da IL10-DCs höhere Mengen des Zytokins sekretieren, als für die Behandlung von RAW 264.7 Zellen eingesetzt wurden. Somit könnte die STAT3-Aktivität in unstimulierten IL10-DCs tendenziell stärker als in unstimulierten RAW 264.7 Zellen sein. Eine weitere Möglichkeit ist eine durch IL-10 verstärkte Expression von SOCS-3, wie sie in IL-10-behandelten humanen Monozyten<sup>901</sup> und Neutrophilen<sup>902</sup> detektiert wurde. In der murinen Makrophagen-Zelllinie J774 resultiert eine konstitutive SOCS-3 Expression in einer erhöhten IL-1RA mRNA-Expression<sup>903</sup>. Die verstärkte mRNA-Expression von IL-1 $\beta$  könnte ebenfalls auf einer gesteigerten STAT3-Aktivität basieren, da in Makrophagen eine spezifische STAT3-Blockade in einer verminderten LPS-vermittelten Aufregulation der IL-1 $\beta$  Produktion auf mRNA- und Proteinebene resultiert<sup>837</sup>.

In LPS-stimulierten IL10-DCs findet, im Gegensatz zu LV-DCs und in Übereinstimmung mit den Resultaten anderen Studien, die auf Proteinebene durchgeführt wurden, keine maturierungsassoziierte Aufregulation der mRNA-Expression der kostimulatorischen Rezeptoren CD80, CD86<sup>147,306,904</sup>, 4-1BBL sowie OX40L statt. Auch die DC-Maturierungsmarker Fascin1 und CCR7 sowie IL-12b werden in dieser DC-Population infolge einer LPS-Stimulierung nicht verstärkt exprimiert. Eine verminderte maturierungsassoziierte Aufregulation der Expression von CCR7<sup>895,905,906</sup> und IL-12<sup>156,893,894</sup> durch eine IL-10-Behandlung oder -Überexpression wurde bereits in vorhergehenden Studien beschrieben. Darüber hinaus sind stimulierte IL10-DCs in der hier durchgeführten

Studie durch eine gesteigerte Expression des Oberflächenrezeptors SLAM sowie der toleranzassoziierten Moleküle IL-1RA, FcγRIIB undIDO gekennzeichnet. Eine erhöhte SLAM-Expression auf mRNA- und Proteinebene wurde ebenfalls von McBride und Mitarbeitern<sup>306</sup> in LPS-stimulierten IL-10-behandelten humanen DCs detektiert. Ein Einfluss von IL-10 auf die mRNA- und Proteinexpression des Toleranzmarkers IDO wurde von Raftery und Mitarbeitern<sup>907</sup> nachgewiesen. LPS-stimulierte humane DCs zeigen infolge einer Kultivierung in Gegenwart von IL-10 eine deutlich verstärkte IDO-Expression. Auch die erhöhte IL-1RA mRNA-Expression deckt sich, wie bereits für das Genexpressionsprofil unstimulierter IL10-DCs diskutiert wurde, mit den Ergebnissen anderer Studien<sup>900,903</sup>.

Unter basalen Bedingungen ist die Proteinmenge an MHCII, CD40, CD80 und CD86 auf der Oberfläche der hier generierten, unstimulierten IL10-DCs, verglichen mit LV-DCs, deutlich vermindert. Ähnliche Resultate wurden auch in anderen Studien infolge einer Behandlung mit IL-10<sup>894</sup> bzw. einer IL-10 Überexpression<sup>312,314</sup> für unstimulierte DCs beschrieben. Im Rahmen der Genexpressionsanalyse wurde lediglich eine verminderte CD40 mRNA-Expression detektiert. Infolge einer Stimulierung mit LPS steigt hier die Oberflächenexpression der genannten Rezeptoren entweder gar nicht (MHCII, CD40, CD86) oder nur moderat (CD80) an. Für CD80 und CD86 zeichnete sich dieses Expressionsprofil bereits auf mRNA-Ebene ab. Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Modulationen der Oberflächenexpression stimulierter IL10-DCs decken sich mit den Befunden vorhergehender Analysen<sup>156,893,904</sup>.

Entsprechend ihres tolerogenen, maturierungsresistenten Phänotyps wird die geringste proliferative Antwort allogener T-Zellen im Vergleich zu LV-DCs und allen analysierten transgenexprimierenden DC-Populationen, unter basalen Bedingungen sowie nach einer Stimulierung mit LPS, durch IL10-DCs induziert. Dabei ist die APC-Funktion von stimulierten IL10-DCs hier so stark vermindert, dass diese Transduktanden eine mit unstimulierten LV-DCs vergleichbar moderate T-Zell-Proliferation vermitteln. Ähnliche Effekte von IL-10 auf die allostimulatorische Kapazität unstimulierter und stimulierter DCs wurden bereits in früheren Studien nachgewiesen<sup>147,314,891,894</sup>. In Abweichung davon stellt sich die tolerogene Kapazität von IL10-DCs im Kontext syngener Kokulturen in der vorliegenden Arbeit nicht so prägnant dar. Zwar ist das syngene T-Zell-Aktivierungspotential stimulierter IL10-DCs gegenüber LV-DCs deutlich reduziert, jedoch induzieren unstimulierte IL10-DCs eine mit LV-DCs vergleichbar starke Proliferation kokultivierter T-Zellen. In anderen Studien wurde sowohl für unstimulierte<sup>156,312</sup> als auch für stimulierte<sup>306</sup> IL-10-behandelte bzw. IL-10-überexprimierende DCs *in vitro* ein reduziertes syngenes T-Zell-Stimulierungspotential beschrieben. Wie bereits für IL21-DCs diskutiert, wurden abweichend von den vorgenannten Studien im Rahmen dieser Arbeit MOG-reaktive 2D2 T-Zellen in syngenen Kokulturen

eingesetzt, weshalb ein Unterschied in der Reaktivität der TCR-transgenen T-Zellen nicht ausgeschlossen werden kann.

Die transgenvermittelte Überexpression von IL-10 verändert in dieser Arbeit neben der T-Zell-Stimulierungskapazität auch die durch die entsprechenden Transduktanden induzierten Zytokinantworten kokultivierter T-Zellen. In den Kokulturen unstimulierter IL10-DCs und allogener T-Zellen wurde im Vergleich zu Kontrollansätzen mit LV-DCs eine erhöhte Menge des T<sub>H</sub>2-Markerzytokins IL-5 bei einer unveränderten Konzentration des T<sub>H</sub>1-Markerzytokins IFN- $\gamma$  nachgewiesen. Das T<sub>H</sub>2/Treg-Markerzytokin IL-10 wurde in den IL10-DC-haltigen Kokulturen nicht detektiert. In den entsprechenden syngen Kokulturen findet im Gegensatz dazu eine abweichende Veränderung des Zytokinprofils statt, da in den jeweiligen Überständen verminderte Mengen an IL-5 und IL-10 bei einer unveränderten IFN- $\gamma$  Konzentration detektiert wurden. In Kokulturen stimulierter IL10-DCs und allogener T-Zellen wurde hingegen im Vergleich zu Kokulturen mit LV-DCs eine gesteigerte Produktion von IFN- $\gamma$  aber vergleichbare Konzentrationen an IL-5 und IL-10 detektiert. Eine Kokultivierung stimulierter IL10-DCs mit syngen 2D2 T-Zellen resultiert dagegen im Vergleich zu Kontrollansätzen mit LV-DCs in einer reduzierten IL-10 Konzentration. Allgemein ist IL-10 als Antagonist von T<sub>H</sub>1-basierten Immunantworten bekannt und inhibiert die Produktion von IFN- $\gamma$ <sup>304,908</sup>. Dementsprechend wurde auch in Kokulturen mit IL-10-behandelten<sup>306</sup> bzw. IL-10-überexprimierenden<sup>312</sup> DCs eine reduzierte IFN- $\gamma$  Produktion nachgewiesen. Die abweichenden T-Zell-polarisierenden Eigenschaften der im Rahmen dieser Arbeit generierten IL10-DCs beruht eventuell auf einer differentiell modulierten Expression intrazellulärer Regulatorproteine. Beispielsweise induziert IL-10 eine Aktivierung des TF STAT3<sup>897-899</sup> und inhibiert die nukleare Translokation von NF- $\kappa$ B<sup>904</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass eine transgenvermittelte exogene Expression von STAT3 bzw. I $\kappa$ B $\alpha$ , einem NF- $\kappa$ B-Inhibitor, in allogenen Kokulturen mit den entsprechend transduzierten stimulierten DCs in einer Reduktion der IL-10 Produktion bzw. einer Steigerung der IFN- $\gamma$  Sekretion resultiert. Generell würde eine Analyse der durch IL-10 veränderten Expression bzw. Aktivierung von STAT3, SOCS-3 sowie NF- $\kappa$ B in IL10-DCs eine präzisere phänotypische und funktionelle Analyse dieser DC-Population erlauben.

Insgesamt zeigt die komparative Analyse verschiedener Transduktandenpopulationen, dass die effizienteste Reduktion der allostimulatorischen Kapazität unstimulierter und stimulierter DCs durch eine exogene Expression sekretierter Zytokine erzielt wird. Unter basalen Bedingungen sowie nach einer Stimulierung mit LPS wurden die deutlichsten Effekte infolge einer exogenen Expression von IL-10 detektiert, gefolgt von IL-21 und IL-1RA. Im Gegensatz dazu ist die exogene Expression von TGF- $\beta$ 1 in stimulierten DCs weniger erfolgreich und beeinflusst auch nicht das T-Zell-Aktivierungspotential unstimulierter DCs.



Entsprechend den in dieser Arbeit durchgeführten Analysen sind IL10- und IL21-DCs vergleichbar ineffiziente allogene T-Zell-Stimulatoren, die einen ausgeprägten tolerogenen, maturierungsresistenten Phänotyp zeigen. Ähnliche phänotypische und funktionelle Charakteristika weisen auch immature BM-DCs und DEX-APCs auf, für die im Rahmen dieser Arbeit (vergleiche Abschnitt 4.1) sowie anderer Studien<sup>157,439,626</sup> die Fähigkeit zur Induktion von Tregs nachgewiesen wurde. Ebenfalls bekannt ist, dass unstimulierte IL-10-behandelte<sup>147,441</sup> bzw. IL-10-überexprimierende<sup>312</sup> DCs einen anergen und regulatorischen Status in kokultivierten T-Zellen induzieren können.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass durch IL-21-überexprimierende DCs vorstimulierte alloreaktive T-Zellen ähnlich refraktär gegenüber einer Restimulation sind, wie durch LV-DCs oder IL10-DCs vorstimulierte T-Zellen. Alle drei unterschiedlich vorstimulierten T-Zell-Populationen zeigten außerdem ein deutliches suppressives Potential, indem sie die Proliferation kokultivierter naiver T-Zellen inhibierten. Somit handelt es sich bei allen drei DC-Populationen nachweislich um tolerogene DCs.

Ähnlich wie in ihrem regulatorischen Status konvergieren die durch die drei verschiedenen APC-Populationen (LV-, IL21-, IL10-DCs) vorstimulierten T-Zell-Populationen in dieser Arbeit tendenziell auch in ihrem Genexpressionsprofil. Sie zeigen jeweils eine gegenüber naiven T-Zellen verminderte mRNA-Expression der  $T_H1$ -Markermoleküle T-bet und IFN- $\gamma$  (für durch IL10-DCs vorstimulierte T-Zellen nicht statistisch signifikant), der  $T_H2$ -Markermoleküle GATA-3 und IL-4 sowie des  $T_H2$ /Treg-Markermoleküls IL-10. Ebenfalls einheitlich werden von allen drei unterschiedlich vorstimulierten T-Zell-Populationen der Treg-Marker Foxp3 (in keinem Fall statistisch signifikant) und das  $T_H17$ -Markermolekül IL-17 verstärkt transkribiert (für durch IL21-DCs vorstimulierte T-Zellen nicht statistisch signifikant). Somit induzieren LV-, IL10- und IL21-DCs in alloreaktiven T-Zellen generell eine negative Regulation von T-Effektorzell-Markern, während die Expression des Treg-Markers Foxp3 tendenziell aufreguliert wird. Einzigartig für Foxp3 ist seine Beteiligung an der Entwicklung und der Vermittlung der suppressiven Funktion von Tregs im murinen System<sup>109-111</sup>. Außerdem legt dieser Marker die regulatorische Aktivität von Tregs fest, indem er in die Anergie und die damit assoziierte Unfähigkeit zur Sekretion von IL-2 und anderer essentieller Zytokine involviert ist<sup>473-476</sup>. Insgesamt korrelieren die phänotypischen Analysen der verschiedenen vorgenannten T-Zell-Populationen mit den auf funktioneller Ebene detektierten anergen sowie suppressiven Eigenschaften. Eine Analyse der jeweiligen Foxp3-Expression auf Proteinebene sollte zur präziseren Charakterisierung der induzierten Tregs durchgeführt werden.

Neben einer Induktion von Tregs könnte im Rahmen von DC/T-Zell-Kokulturen auch eine Modulation der T-Zell-Apoptose stattfinden. In Übereinstimmung mit dieser Annahme wurde sowohl für IL-10<sup>605</sup>, als auch für IL-21<sup>606</sup> gezeigt, dass sie die Apoptose von T-Zellen

fördern. In allen drei unterschiedlich vorstimulierten T-Zell-Populationen findet in der hier durchgeführten Studie im Vergleich zu naiven T-Zellen eine verstärkte mRNA-Expression der proapoptischen Moleküle Bax (für durch IL10-DCs vorstimulierte T-Zellen nicht statistisch signifikant) und Bid statt. Eine durch IL-10 gesteigerte Bax-Expression in alloreaktiven T-Zellen wurde auch von Tung und Mitarbeitern<sup>909</sup> detektiert. IL-21 steigert die Bax-Expression in folliculären Lymphomazellen<sup>910</sup> und fördert die Aktivierung von Bid in CLL (*chronic lymphocytic leukemia*) B-Zellen<sup>911</sup>. Das antiapoptische Molekül Bcl-2 wird hier von naiven T-Zellen deutlich stärker transkribiert als von den drei vorstimulierten T-Zell-Populationen. Dabei ist die mRNA-Menge in durch IL10- oder IL21-DCs vorstimulierten T-Zellen geringer, als in durch LV-DCs vorstimulierten T-Zellen. Die mRNA-Expression von Bcl-xL, ebenfalls ein antiapoptischer Marker, wird nur in durch IL10- oder IL21-DCs vorstimulierten T-Zellen im Vergleich zu naiven T-Zellen herunterreguliert. In verschiedenen Studien wurde in Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit demonstriert, dass IL-21 die Apoptose durch negative Regulation der Expression von Bcl-2<sup>607,910</sup> und Bcl-xL<sup>912</sup> fördert. Ähnlich wie für IL-21 wurde auch für IL-10 in vorhergehenden Studien gezeigt, dass es die Transkription der beiden vorgenannten antiapoptischen Moleküle inhibieren kann<sup>909,913</sup>. Die erhöhte mRNA-Expression proapoptischer Moleküle bei gleichzeitig verminderter Transkription antiapoptischer Marker in durch IL10- oder IL21-DCs vorstimulierten T-Zellen könnte ein Hinweis darauf sein, dass die genannten DC-Populationen in allogenen T-Zellen nicht nur Tregs induzieren, sondern gleichzeitig auch die T-Zell-Apoptose steigern. Ein Nachweis dieser Hypothese auf Proteinebene durch entsprechende Apoptose-Analysen zur weiteren Charakterisierung der verschiedenen T-Zell-Populationen wäre für nachfolgende Studien empfehlenswert.

Eine weitere charakteristische Eigenschaft von IL-21 ist seine essentielle Partizipation an der Induktion CD4<sup>+</sup> folliculärer T-Helferzellen (T<sub>FH</sub>)<sup>319</sup>, die wesentlich zur Ausbildung von Keimzentren beitragen<sup>332,333</sup>. Die hier durchgeführte Analyse des Genexpressionsprofils zeigte jedoch, dass durch LV-, IL-10 oder IL-21-DCs vorstimulierte T-Zellen die vier T<sub>FH</sub>-Markermoleküle Bcl-6, CXCR5, IL-6ST sowie IL-6R in jeweils vergleichbarer Stärke auf mRNA-Ebene exprimieren. In dem vorliegenden experimentellen System resultiert eine Überexpression von IL-21 in DCs somit nicht in einer spezifischen Induktion von T<sub>FH</sub>-Zellen. Obwohl durch LV-DCs, IL10-DCs oder IL21-DCs vorstimulierte T-Zellen einen vergleichbaren regulatorischen Status und ein ähnlich moduliertes Genexpressionsprofil aufweisen, zeigen sie in dieser Arbeit in Reaktion auf eine allogene Restimulation unterschiedliche Zytokinmuster. T-Zellen, die durch LV-DCs oder IL21-DCs vorstimuliert wurden, sekretieren im Vergleich zu naiven T-Zellen deutlich verminderte Mengen an IFN- $\gamma$  und IL-5, aber vergleichbare Mengen an IL-10. Abweichend von diesem Profil ist in T-Zellen, die mit IL10-DCs kokultiviert wurden, die Produktion von IL-10 massiv reduziert, während die

Konzentrationen an IFN- $\gamma$  und IL-5 vergleichbar zu den Kontrollansätzen sind. Sowohl mit IL21-DCs, als auch vor allem mit IL10-DCs vorstimulierte T-Zellen weisen infolge einer Restimulation eine deutlich erhöhte Sekretion des T<sub>H</sub>17-Markerzytokins IL-17 auf. Somit deckt sich das Zytokinprofil der unterschiedlich vorstimulierten T-Zell-Populationen nach einer allogenen Restimulation teilweise mit dem ermittelten Genexpressionsprofilen vor einer Restimulation.

Der Einfluss der drei unterschiedlich vorstimulierten T-Zell-Populationen auf die Zytokinsekretion kokultivierter naiver T-Zellen ist ebenfalls variabel. T-Zellen, die durch LV-DCs vorstimuliert wurden, hemmen massiv die IFN- $\gamma$  Produktion naiver kokultivierter T-Zellen. Im Gegensatz dazu regulieren durch IL10-DCs vorstimulierte T-Zellen die IL-5 und vor allem die IL-10 Sekretion negativ. T-Zellen, die durch IL21-DCs vorstimuliert wurden, supprimieren deutlich die Sekretion von IFN- $\gamma$  und unterbinden vollständig die IL-5 Produktion in kokultivierten naiven T-Zellen. Bemerkenswerterweise produzieren durch IL21-DCs vorstimulierte T-Zellen infolge einer allogenen Restimulation hohe Mengen an IL-10, inhibieren jedoch vollständig die IL-10 Produktion naiver T-Zellen in parallelen Suppressionsansätzen. Somit scheint IL-10 im Kontext mit IL21-DCs eine wichtige Rolle zu spielen, die in weiterführenden Studien intensiver analysiert werden sollte. Mit IL10- oder IL21-DCs vorstimulierte T-Zellen produzieren nicht nur nach einer Restimulation erhöhte Mengen an IL-17, sie können die Sekretion dieses Zytokins auch nicht in parallelen Suppressionsansätzen supprimieren. Somit unterstützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit den für IL-21 postulierten T<sub>H</sub>17-polarisierenden Charakter vorhergehender Studien<sup>321,334</sup>. Allerdings ist IL-21 nicht notwendigerweise ein stärkerer T<sub>H</sub>17-Induktor als andere Zytokine, wie hier für IL-10 gezeigt wurde. Soweit bekannt, wurde IL-10 bisher nicht mit der Induktion von T<sub>H</sub>17-Zellen in Verbindung gebracht. Insgesamt zeigen die Analysen, dass durch IL21-DCs vorstimulierte T-Zellen im Vergleich zu den beiden anderen T-Zell-Populationen am potentesten die Sekretion von T<sub>H</sub>2-Markerzytokinen durch naive T-Zellen supprimieren.

Eine der Hauptintensionen der vorliegenden Arbeit galt der Identifizierung von Molekülen, die in DCs einen protolerogenen sowie maturierungsresistenten Phänotyp induzieren und somit geeignete Kandidatenmoleküle für eine therapeutische *in vivo*-Applikation in verschiedenen Krankheitsmodellen darstellen. Von allen analysierten Molekülen besitzt IL-21 (neben dem potentesten antiinflammatorischen Zytokin IL-10) das stärkste Potential für eine Inhibition allogener T-Zell-Antworten. Auf Grund der Ergebnisse der komparativen *in vitro*-Analysen wurde das kurative Potential von IL10- und IL21-DCs nachfolgend im murinen Krankheitsmodell der haptenermittelten Kontaktallergie untersucht.

## 4.5 Untersuchungen zur tolerogenen Aktivität IL10- und IL21-DCs *in vivo* im murinen Modell der Kontaktallergie

IL10- und IL21-DCs weisen nicht nur den am stärksten ausgeprägten protolerogenen, maturierungsresistenten Phänotyp auf, sondern induzieren *in vitro* in kokultivierten allogenen T-Zellen außerdem einen anergen sowie suppressiven Status. In vorgehenden Studien wurde demonstriert, dass IL-10-<sup>914</sup> oder IL-21-behandelte<sup>326</sup>, haptengepulste BM-DCs, die vor einer Sensibilisierung in Mäuse injiziert wurden, die Ohrschwellung im Krankheitsmodell der haptenermittelten Kontaktallergie (CHS) nach der Provokation verhindern. Somit bestätigen die in dieser Arbeit durchgeführten komparativen Analysen das DC-tolerogenisierende Potential der Zytokine IL-10 und IL-21. Erweitert wurden diese Befunde durch eine Evaluierung der tolerogenen Aktivität von IL10- und IL21-DCs im Rahmen der CHS, wobei ein therapeutischer Ansatz gewählt wurde. Im Gegensatz zu LV-DCs inhibieren haptengepulste IL10- und IL21-DCs deutlich die Ohrschwellung von entsprechend behandelten Mäusen in Reaktion auf eine Provokation.

Diese Abweichung im tolerogenen Potential von LV-DCs gegenüber IL10- und IL21-DCs *in vivo* ist auffällig, da alle drei APC-Populationen *in vitro* einen regulatorischen Status in kokultivierten allogenen T-Zellen induzieren. Einer der Gründe ist vermutlich der im Vergleich zu LV-DCs stärker ausgeprägte protolerogene Phänotyp von IL10- und IL21-DCs. Diese Annahme wird durch den Befund bekräftigt, dass Lymphknotenzellen aus Mäusen der IL10-DC- oder IL21-DC-Gruppe eine im Vergleich zu Zellen aus der LV-DC-Gruppe gesteigerte mRNA-Expression des Treg-Markers Foxp3 (nicht statistisch signifikant) aufweisen. Somit könnte die tolerogene Aktivität der jeweiligen Zytokin-überexprimierenden DC-Population teilweise über eine Expansion Foxp3<sup>+</sup> Tregs vermittelt werden, wie es auch für IL-10-überexprimierende BM-DCs im murinen experimentellen Asthmodell demonstriert wurde<sup>893</sup>. Außerdem reduziert eine Blockade von IL-21 in Foxp3-EGFP Reporter-mäusen die Anzahl von nTregs und verhindert deren suppressive Aktivität im EAE-Modell<sup>339</sup>. Da das potente antiinflammatorische Zytokin TGF- $\beta$ 1 von allen Lymphknotenzell-Populationen auf mRNA-Ebene in vergleichbarer Menge exprimiert wird, scheint das tolerogene Potential von IL10- und IL21-DCs *in vivo* nicht auf der Induktion TGF- $\beta$ 1-sekretierender T-Zellen zu basieren. Die im Vergleich zu einer Applikation von LV-DCs durch IL10- oder IL21-DCs inhibierte Ohrschwellung beruht wahrscheinlich nicht auf einer verstärkten Induktion von T-Zell-Apoptose im Lymphknotenkompartiment, da alle drei Zellpopulationen die proapoptischen Marker Bax und Bid vergleichbar stark exprimieren. Zwar wird das antiapoptische Molekül Bcl-2 in Zellen der IL10- und IL21-DC-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe vermindert transkribiert, aber gleichzeitig wird die mRNA-Expression des

zweiten antiapoptotischen Markers Bcl-xL in den beiden erstgenannten Zellpopulationen aufreguliert.

Im Gegensatz zu den Genexpressionssignaturen der verschiedenen Lymphknotenzellpopulationen wird Foxp3 von Milzzellen der LV-, IL10- und IL21-DC-Gruppe in jeweils vergleichbarer Stärke auf mRNA-Ebene exprimiert. Die Transkription von TGF- $\beta$ 1 findet ebenfalls in allen drei analysierten Zell-Populationen auf ähnlichem Niveau statt. Auch im Milzzellenkompartiment tritt in Mäusen, denen IL10- oder IL21-DCs injiziert wurden, keine im Vergleich zur Kontrollgruppe verstärkte mRNA-Expression proapoptotischer oder verminderte Transkription antiapoptotischer Markermoleküle auf.

In Unterstützung der Annahme einer stärker ausgeprägten tolerogenen Aktivität in IL10- und IL21-DCs als in LV-DCs, produzieren Lymphknotenzellen aus Mäusen der IL10-DC- oder IL21-DC-Gruppe eine im Vergleich zu Zellen aus der LV-DC-Gruppe geringere Menge des T<sub>H</sub>1-Markerzytokins IFN- $\gamma$  in Reaktion auf eine haptenspezifische Restimulation. Diese Resultate belegen, dass IL10- und IL21-DCs eine CHS-Reaktion kongruent über eine Reduktion der Expansion IFN- $\gamma$ -produzierender CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Effektorzellen, die essentiell an inflammatorischen Antworten im CHS-Modell beteiligt sind<sup>915</sup>, inhibieren. Darüber hinaus wurde für Lymphknotenzellen IL10-DC-injizierter Mäuse eine, verglichen zur Kontrollgruppe, reduzierte Sekretion von IL-5 und IL-10 (nicht statistisch signifikant) detektiert. Es wird angenommen, dass IL-17 einen verstärkenden Einfluss auf CHS-Reaktionen ausübt, da IL-17-defiziente Mäuse eine verminderte IFN- $\gamma$  Produktion und Ohrschwellung aufweisen<sup>916</sup>. In dem vorliegenden experimentellen System scheint dieses Zytokin jedoch eine untergeordnete Rolle zu spielen, da Lymphknotenzellen der LV-DC- und IL21-DC-Gruppe vergleichbare Mengen IL-17 sekretieren und in Überständen von Zellen der IL10-DC-Gruppe die höchste Konzentration an IL-17 detektiert wurde.

Ähnlich zu den Befunden im Lymphknotenkompartiment sekretieren Milzzellen der IL10-DC-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich verminderte Mengen an IFN- $\gamma$  in Reaktion auf eine haptenspezifische Restimulation. In Milzzellen der IL21-DC-Gruppe ist demgegenüber die Produktion des T<sub>H</sub>2-Markerzytokins IL-5 aufreguliert, was eine Polarisierung der T-Zell-Antwort in Richtung T<sub>H</sub>2 vermuten lässt, die ebenfalls zu einer Gegenregulation der CHS-Reaktion beitragen könnte. Im Gegensatz zu Milzzellen der IL10- und IL21-DC-Gruppe produzieren Milzzellen der LV-DC-Gruppe infolge einer Restimulation kein IL-17. Diese Befunde unterstreichen die Annahme, dass IL-17 in dem vorliegenden CHS-System keinen wesentlichen Einfluss auf den Verlauf der inflammatorischen Reaktion hat.

Neben den teilweise überlappenden tolerogenen Mechanismen zeigen IL10- und IL21-DCs auch deutlich voneinander abweichende Aktivitäten, da Lymphknotenzellen der IL10-DC-Gruppe, wie vorstehend beschrieben, nicht nur ein von der IL21-Gruppe abweichendes

Zytokinprofil, sondern auch eine hypoproliferative Antwort in Reaktion auf eine haptenspezifische Restimulation aufweisen. Anders als im Lymphknotenkompartiment wurde sowohl für Milzzellen aus der IL10-DC-Gruppe, als auch für Zellen aus der IL21-DC-Gruppe infolge einer Restimulation eine im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich reduzierte proliferative T-Zell-Antwort detektiert. Somit basiert die tolerogene Aktivität von IL10-DCs vermutlich teilweise auch auf einer Inhibition der Lymphozytenproliferation und einer Reduktion der IFN- $\gamma$  Produktion haptenspezifischer T-Zellen.

Generell ist zu erwähnen, dass die Isolierung der Lymphknoten- und Milzzellen an Tag 7 nach der Provokation erfolgte; also zu einem Zeitpunkt, an dem die CHS-Reaktion bereits vollständig abgelaufen war. Zu diesem Zeitpunkt sind die durch die verschiedenen DC-Populationen induzierten tolerogenen Aktivitäten vermutlich vollständig etabliert. Eine weitere Analyse der durch die jeweilige DC-Population induzierten potentiellen Toleranzabläufe wäre möglich, wenn eine Isolation der Zellen im Höhepunkt des Krankheitsverlaufs (beispielsweise 48 Stunden nach der Provokation) erfolgen würde. Zusätzlich wäre eine positive Anreicherung CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus den beiden genannten lymphatischen Organen sinnvoll, da bei Verwendung der heterogenen Gesamtzellen die Möglichkeit nicht eindeutiger Resultate erhöht ist.

### 4.6 Ausblick

Insgesamt bietet die komparative Analyse der phänotypischen und funktionalen Eigenschaften unterschiedlich transduzierter DCs eine reelle Basis für Entscheidungen bezüglich einer Eignung dieser DCs in therapeutischen Ansätzen. Bisher liegen für zahlreiche der hier analysierten Moleküle, wie beispielsweise IL-21, keine vergleichbaren Studien vor. Darüber hinaus gibt es keine komparativen Studien, die die Wirkungsweise verschiedener immunmodulatorischer Moleküle auf DC-Funktionen zeigen. Eine Meta-Analyse der publizierten Arbeiten zur Charakterisierung einzelner Moleküle in Bezug auf ihre DC-modulierenden Eigenschaften ist insbesondere auf Grund methodischer Unterschiede kaum möglich.

Wie hier für IL-21 und IL-10 gezeigt wurde, weisen entsprechend transduzierte DCs eine therapeutische Effizienz in einem murinen Kontaktallergiemodell auf. In nachfolgenden Arbeiten könnte in diesem Modell die kurative Wirkung weiterer DC-Transduktanden untersucht werden, die *in vitro* ebenfalls eine geringe APC-Aktivität aufweisen, wie beispielsweise IL1RA-DCs.

Auf Grund des ausgeprägten Interesses am immuntherapeutischen Einsatz genetisch modifizierter DCs <sup>378</sup> zur Therapie von Autoimmunerkrankungen und der Toleranzinduktion

gegenüber Transplantaten, sollte die kurative Wirkung von DC-Transduktanden in weiteren murinen Krankheitsmodellen, wie beispielsweise der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) als Modell für rheumatoide Arthritis, untersucht werden. Generell sind für solche Applikationen auch DC-Transduktanden von Interesse, die die Ausprägung krankheitsassoziiertes T-Zell-Antworten modulieren können. Entsprechend dieser Annahme wurde im Modell der CIA, bei der die Entzündungsreaktion vor allem durch T<sub>H</sub>1-Zellen getragen wird<sup>917</sup>, mittels einer Injektion IL-4-exprimierender DCs eine kurative Wirkung durch eine Verschiebung der T-Zell-Polarisierung in Richtung einer T<sub>H</sub>2-Antwort erzielt<sup>918</sup>.

Weiterhin könnten lentivirale Partikel, die in entsprechend transduzierten DCs einen therapeutisch effektiven Status induziert haben, direkt *in vivo* appliziert werden<sup>399</sup>. Zur Sicherstellung einer DC-spezifischen Transgenexpression sollte die Expression dann unter der Kontrolle eines DC-spezifischen Promotors stehen. Innerhalb der Arbeitsgruppe wurden unter diesem Aspekt die Promotoren des murinen<sup>376</sup> und humanen<sup>416</sup> Fascin-Gens charakterisiert und funktional validiert. In dieser Arbeit wurde die grundsätzliche Eignung des murinen Fascin-Promotors gezeigt, nach einem lentiviralen Transfer in DCs eine effektive Transgenexpression zu vermitteln.

Der kritischste Schritt für die Etablierung genetisch modifizierter DCs zur Immuntherapie im Menschen ist der Transfer muriner Studien auf humane *in vivo*-Modelle. Hierbei stellt derzeit die sogenannte humanisierte Maus, die selbst immundefizient ist, und in der nach einer Rekonstitution mit humanen CD34<sup>+</sup> pluripotenten Blutstammzellen alle relevanten humanen Leukozytenpopulationen ausdifferenzieren, das bislang am besten geeignete humanimmunologische Modellsystem dar<sup>919</sup>. In diesem Modell könnte die Effizienz *in vitro* lentiviral transduzierter Monozyten-abgeleiteter humaner DCs in verschiedenen Krankheitsmodellen getestet werden. Daneben kann im Rahmen einer anzustrebenden Etablierung des humanen Fascin-Promotors für ein transkriptionales *Targeting* humaner DCs *in vivo* die Effizienz und DC-Spezifität entsprechender lentiviraler Partikel getestet werden.

## 5 Zusammenfassung

Dendritische Zellen (DCs) stellen ein attraktives Ziel für immuntherapeutische Strategien dar, weil sie die Fähigkeit besitzen, im immaturren und semi-maturren Status Toleranz und infolge einer Aktivierung starke Immunantworten zu induzieren. Eine Modifizierung von DCs *in vitro* erfolgt meist durch eine Behandlung mit Mediatoren, die den Aktivierungszustand sowie die T-Zell-polarisierenden Eigenschaften verändern. Vor allem tolerogenerisierende Agenzien haben jedoch pleiotrope Effekte, die sich vielfach negativ auf die Lebensfähigkeit, die Migration und die chemotaktische Aktivität von DCs auswirken. Damit derartige negative Einflüsse umgangen werden können, steht die Identifizierung und spezifische Überexpression tolerogener Schlüssel-moleküle in DCs im Fokus aktueller Studien.

Der erste Abschnitt der vorliegenden Studie konzentrierte sich auf die Identifikation potentiell protolerogener Moleküle in DCs. Als Modell für tolerogene APCs wurden murine Knochenmarkszellen unter DC-differenzierenden Bedingungen in Anwesenheit des Glucocorticoids Dexamethason (DEX) kultiviert. Die generierten DEX-APCs waren größtenteils refraktär gegenüber einer Stimulierung mit LPS und induzierten in einer Population CD25<sup>+</sup> depletierter T-Zellen *de novo* CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen (iTreg). DEX-APCs zeigten einen protolerogenen Phänotyp, der unter anderem durch eine gesteigerte mRNA-Expression toleranzassoziierter Moleküle (IL-1RA, IL-10, HO-1, FcγRIIB, GILZ, MKP-1) charakterisiert war. Basierend auf diesen Ergebnissen und Literaturstudien wurden distinkte Transgene mit immunmodulatorischer Funktion (siehe unten) für eine Überexpression in DCs selektiert.

DCs sind non-viral kaum transfizierbar, weshalb zahlreiche Transduktionsprotokolle entwickelt wurden. Trotz der höheren Effizienzen ist vielfach eine positive Anreicherung von Transduktanden für nachfolgende Analysen notwendig. Damit dieser Schritt entfällt, wurde hier die lentivirale Transduktion von DCs so optimiert, dass Effizienzen von rund 95 % erreicht wurden. In diesem Kontext wurde festgestellt, dass der mit dem Prozess der Transduktion assoziierte physikalische Stress in einer partiellen Aktivierung von DCs resultiert. Trotzdem zeigten BM-DCs, die die immunmodulatorischen Zytokine IL-10 oder IL-21 überexprimieren, einen protolerogenen Phänotyp und induzierten *in vitro* Tregs. Darüber hinaus reduzierten beide DC-Populationen in einem therapeutischen Ansatz im murinen Krankheitsmodell der haptensvermittelten Kontaktallergie haptenspezifisch die Ohrschwellung in Reaktion auf eine Provokation. DCs, die andere Zytokine (IL-1RA, TGF-β1), intrazelluläre Regulatorproteine (IκBα, MKP-1, STAT3, SOCS-1) oder Oberflächenrezeptoren (PD-L1, B7-H2, B7-H3, FcγRIIB, PirB) transgenvermittelt exprimierten, wiesen eine jeweils spezifische Modulation der Genexpressionssignatur auf. Die meisten dieser transduzierten DC-Populationen waren durch eine verminderte



allostimulatorische Kapazität gekennzeichnet und induzierten jeweils variierende Zytokinmuster in kokultivierten T-Zellen.

## 6 Abstract

Dendritic cells (DCs) constitute an attractive target for immunotherapeutic strategies due to their ability to induce tolerance in an immature to semi-mature state, and to induce strong immune responses upon activation. Conventionally, DCs are modified *in vitro* by applying mediators which affect their activation state and T cell polarizing capacities. However, especially in the case of tolerizing agents due to their pleiotropic effects most often the viability, migratory and chemotactic activity of DCs are hampered. To circumvent these problems, current studies focus on the identification and specific overexpression of tolerizing key molecules in DCs.

This study focussed in its first part on the identification of potential protolerogenic molecules in DCs. We applied the synthetic glucocorticoid dexamethasone (DEX) to cultures of murine bone marrow-derived progenitors, which were kept under DC-differentiating conditions. The derived DEX-APCs were largely refractory to stimulation with LPS and induced from CD25-depleted T cell populations *de novo* regulatory T cells (iTreg) of both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> phenotype. DEX-APCs were characterized by a protolerogenic phenotype (elevated mRNA expression of IL-1RA, IL-10, HO-1, FcγRIIB, GILZ, MKP-1). Based on these studies and other reports a panel of transgenes with immunomodulatory function (see below) was selected for overexpression in DCs.

With regard to the low DNA transfection efficiency of DCs, several transduction protocols have been adopted. Although rather high transduction efficiencies are obtained, for downstream applications laborious enrichment of transductants is required in many cases. To avoid this step, in this study a lentiviral transduction procedure was optimized for BM-DCs, which yielded a very high efficiency up to 95%. In the course of these studies it was noted that the physical stress of DCs subjected to lentiviral transduction resulted in their partial activation. Nonetheless, BM-DCs forced to overexpress the antiinflammatory cytokine IL-10 or the immunomodulatory cytokine IL-21 displayed a protolerogenic phenotype and induced Tregs *in vitro*. Moreover, in a murine model of contact hypersensitivity, when injected after sensitization, either hapten-pulsed transduced DC population reduced ear swelling responses after challenge in a hapten-specific manner. BM-DCs transduced with lentivirus encoding other cytokines (IL-1RA, TGF-β1), intracellular regulators (IκB-α, MKP-1, STAT-3, SOCS-1) or surface receptors (PD-L1, B7-H2, B7-H3, FcγRIIB, PirB) displayed altered gene expression signatures in a transgene-dependent manner. Most of these transduced DC populations displayed an impaired acquisition of potent primary T cell stimulatory potency and altered the cytokine milieu of DC/T cell cocultures with respect to Th1/Th2 markers.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Medzhitov, R. & Janeway, C., Jr. Innate immunity. *N. Engl. J. Med.* **343**, 338-344 (2000).
2. O'Garra, A. & Vieira, P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat. Med.* **10**, 801-805 (2004).
3. Perl, A. Pathogenesis and spectrum of autoimmunity. *Methods Mol. Med.* **102**, 1-8 (2004).
4. Flores-Romo, L. In vivo maturation and migration of dendritic cells. *Immunology* **102**, 255-262 (2001).
5. Werling, D. & Jungi, T. W. TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **91**, 1-12 (2003).
6. Basset, C., Holton, J., O'Mahony, R. & Roitt, I. Innate immunity and pathogen-host interaction. *Vaccine* **21 Suppl 2**, S12-S23 (2003).
7. Pasare, C. & Medzhitov, R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Microbes. Infect.* **6**, 1382-1387 (2004).
8. Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* **5**, 987-995 (2004).
9. Janeway C.A., Travers P., Walport M. & Shlomchik M. *Immunobiology: the immune system in health and disease; 6th edition*. Garland Science Publishing; ISBN: 0-8153-4101-6, (2005).
10. Steinman, R. M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* **9**, 271-296 (1991).
11. Hackstein, H. & Thomson, A. W. Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 24-34 (2004).
12. Banchereau, J. *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 767-811 (2000).
13. Liu, Y. & Janeway, C. A., Jr. Cells that present both specific ligand and costimulatory activity are the most efficient inducers of clonal expansion of normal CD4 T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 3845-3849 (1992).
14. Azuma, M., Cayabyab, M., Buck, D., Phillips, J. H. & Lanier, L. L. CD28 interaction with B7 costimulates primary allogeneic proliferative responses and cytotoxicity mediated by small, resting T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **175**, 353-360 (1992).
15. Lenschow, D. J., Walunas, T. L. & Bluestone, J. A. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 233-258 (1996).
16. Grakoui, A. *et al.* The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* **285**, 221-227 (1999).
17. Minami, Y., Kono, T., Miyazaki, T. & Taniguchi, T. The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annu. Rev. Immunol.* **11**, 245-268 (1993).
18. Janeway, C. A., Jr. How the immune system protects the host from infection. *Microbes. Infect.* **3**, 1167-1171 (2001).
19. DiJulio, J. Hematopoiesis: an overview. *Oncol. Nurs. Forum* **18**, 3-6 (1991).

20. Kondo, M. *et al.* Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 759-806 (2003).
21. Uston, P. I. & Lee, C. M. Characterization and function of the multifaceted peripheral blood basophil. *Cell Mol. Biol. (Noisy. -le-grand)* **49**, 1125-1135 (2003).
22. Buhning, H. J., Streble, A. & Valent, P. The basophil-specific ectoenzyme E-NPP3 (CD203c) as a marker for cell activation and allergy diagnosis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **133**, 317-329 (2004).
23. Lampinen, M., Carlson, M., Hakansson, L. D. & Venge, P. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. *Allergy* **59**, 793-805 (2004).
24. Rosales C. & Brown E.J. *The natural immune response*. Abramson J.S. & Wheeler J.G. (eds.), pp. 24-62 (IRL Press, New York,1993).
25. Quinn, M. T. & Gauss, K. A. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *J. Leukoc. Biol.* **76**, 760-781 (2004).
26. Marone, G., Triggiani, M. & De, P. A. Mast cells and basophils: friends as well as foes in bronchial asthma? *Trends Immunol.* **26**, 25-31 (2005).
27. Inaba, K. *et al.* Granulocytes, macrophages, and dendritic cells arise from a common major histocompatibility complex class II-negative progenitor in mouse bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 3038-3042 (1993).
28. Randolph, G. J., Beaulieu, S., Lebecque, S., Steinman, R. M. & Muller, W. A. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* **282**, 480-483 (1998).
29. Randolph, G. J., Inaba, K., Robbiani, D. F., Steinman, R. M. & Muller, W. A. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity*. **11**, 753-761 (1999).
30. Burg, N. D. & Pillinger, M. H. The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. *Clin. Immunol.* **99**, 7-17 (2001).
31. Reid, S. D., Penna, G. & Adorini, L. The control of T cell responses by dendritic cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* **12**, 114-121 (2000).
32. Satthaporn, S. & Eremin, O. Dendritic cells (I): Biological functions. *J. R. Coll. Surg. Edinb.* **46**, 9-19 (2001).
33. Moll, H. Antigen delivery by dendritic cells. *Int. J. Med. Microbiol.* **294**, 337-344 (2004).
34. Cumano, A. *et al.* Development of B lymphocytes from lymphoid committed and uncommitted progenitors. *Immunol. Rev.* **137**, 5-33 (1994).
35. Shortman, K., Egerton, M., Spangrude, G. J. & Scollay, R. The generation and fate of thymocytes. *Semin. Immunol.* **2**, 3-12 (1990).
36. Gogolak, P., Rethi, B., Hajas, G. & Rajnavolgyi, E. Targeting dendritic cells for priming cellular immune responses. *J. Mol. Recognit.* **16**, 299-317 (2003).
37. McLellan, A. D. & Kampgen, E. Functions of myeloid and lymphoid dendritic cells. *Immunol. Lett.* **72**, 101-105 (2000).
38. Parker, D. C. T cell-dependent B cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* **11**, 331-360 (1993).

39. Banchereau, J. *et al.* The CD40 antigen and its ligand. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 881-922 (1994).
40. Ollila, J. & Vihinen, M. B cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37**, 518-523 (2005).
41. Anderson, G., Moore, N. C., Owen, J. J. & Jenkinson, E. J. Cellular interactions in thymocyte development. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 73-99 (1996).
42. Liu, C. C., Joag, S. V., Kwon, B. S. & Young, J. D. Induction of perforin and serine esterases in a murine cytotoxic T lymphocyte clone. *J. Immunol.* **144**, 1196-1201 (1990).
43. Henkart, P. A., Berrebi, G. A., Takayama, H., Munger, W. E. & Sitkovsky, M. V. Biochemical and functional properties of serine esterases in acidic cytoplasmic granules of cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* **139**, 2398-2405 (1987).
44. Goedegebuure, P. S. *et al.* Simultaneous production of T helper-1-like cytokines and cytolytic activity by tumor-specific T cells in ovarian and breast cancer. *Cell Immunol.* **175**, 150-156 (1997).
45. Constant, S. L. & Bottomly, K. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 297-322 (1997).
46. O'Garra, A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity.* **8**, 275-283 (1998).
47. Lane, P. Role of OX40 signals in coordinating CD4 T cell selection, migration, and cytokine differentiation in T helper (Th)1 and Th2 cells. *J. Exp. Med.* **191**, 201-206 (2000).
48. Sperling, A. I. & Bluestone, J. A. ICOS costimulation: It's not just for TH2 cells anymore. *Nat. Immunol.* **2**, 573-574 (2001).
49. Diehl, S. & Rincon, M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol. Immunol.* **39**, 531-536 (2002).
50. Liew, F. Y. T(H)1 and T(H)2 cells: a historical perspective. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 55-60 (2002).
51. Murphy, K. M. & Reiner, S. L. The lineage decisions of helper T cells. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 933-944 (2002).
52. Biron, C. A. Interferons alpha and beta as immune regulators--a new look. *Immunity.* **14**, 661-664 (2001).
53. Hsieh, C. S. *et al.* Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* **260**, 547-549 (1993).
54. Murphy, K. M. *et al.* Signaling and transcription in T helper development. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 451-494 (2000).
55. Mackey, M. F., Barth, R. J., Jr. & Noelle, R. J. The role of CD40/CD154 interactions in the priming, differentiation, and effector function of helper and cytotoxic T cells. *J. Leukoc. Biol.* **63**, 418-428 (1998).
56. O'Garra, A. & Arai, N. The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends Cell Biol.* **10**, 542-550 (2000).
57. Paul, W. E. & Seder, R. A. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* **76**, 241-251 (1994).
58. Middleton, D., Curran, M. & Maxwell, L. Natural killer cells and their receptors. *Transpl. Immunol.* **10**, 147-164 (2002).

59. Medzhitov, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* **449**, 819-826 (2007).
60. Morelli, A. E. & Thomson, A. W. Dendritic cells: regulators of alloimmunity and opportunities for tolerance induction. *Immunol. Rev.* **196**, 125-146 (2003).
61. Mathis, D. & Benoist, C. Back to central tolerance. *Immunity*. **20**, 509-516 (2004).
62. Goodnow, C. C. *et al.* Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* **334**, 676-682 (1988).
63. Hogquist, K. A., Gavin, M. A. & Bevan, M. J. Positive selection of CD8+ T cells induced by major histocompatibility complex binding peptides in fetal thymic organ culture. *J. Exp. Med.* **177**, 1469-1473 (1993).
64. Barton, G. M. & Rudensky, A. Y. Requirement for diverse, low-abundance peptides in positive selection of T cells. *Science* **283**, 67-70 (1999).
65. Merckenschlager, M., Benoist, C. & Mathis, D. Evidence for a single-niche model of positive selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 11694-11698 (1994).
66. Laufer, T. M., DeKoning, J., Markowitz, J. S., Lo, D. & Glimcher, L. H. Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex. *Nature* **383**, 81-85 (1996).
67. Nossal, G. J. Negative selection of lymphocytes. *Cell* **76**, 229-239 (1994).
68. Fehervari, Z. & Sakaguchi, S. CD4+ Tregs and immune control. *J. Clin. Invest* **114**, 1209-1217 (2004).
69. Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B. & Klein, L. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat. Immunol.* **2**, 1032-1039 (2001).
70. Palmer, E. Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 383-391 (2003).
71. Gotter, J., Brors, B., Hergenahn, M. & Kyewski, B. Medullary epithelial cells of the human thymus express a highly diverse selection of tissue-specific genes colocalized in chromosomal clusters. *J. Exp. Med.* **199**, 155-166 (2004).
72. Anderson, M. S. *et al.* Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* **298**, 1395-1401 (2002).
73. Gallegos, A. M. & Bevan, M. J. Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *J. Exp. Med.* **200**, 1039-1049 (2004).
74. Bonasio, R. *et al.* Clonal deletion of thymocytes by circulating dendritic cells homing to the thymus. *Nat. Immunol.* **7**, 1092-1100 (2006).
75. Nedjic, J., Aichinger, M., Emmerich, J., Mizushima, N. & Klein, L. Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance. *Nature* **455**, 396-400 (2008).
76. Henell, F., Berkenstam, A., Ahlberg, J. & Glaumann, H. Degradation of short- and long-lived proteins in perfused liver and in isolated autophagic vacuoles--lysosomes. *Exp. Mol. Pathol.* **46**, 1-14 (1987).

77. Schmid, D., Pypaert, M. & Munz, C. Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes. *Immunity*. **26**, 79-92 (2007).
78. Buckner, J. H. & Ziegler, S. F. Regulating the immune system: the induction of regulatory T cells in the periphery. *Arthritis Res. Ther.* **6**, 215-222 (2004).
79. Kurts, C., Miller, J. F., Subramaniam, R. M., Carbone, F. R. & Heath, W. R. Major histocompatibility complex class I-restricted cross-presentation is biased towards high dose antigens and those released during cellular destruction. *J. Exp. Med.* **188**, 409-414 (1998).
80. Kurts, C. *et al.* CD8 T cell ignorance or tolerance to islet antigens depends on antigen dose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 12703-12707 (1999).
81. Zinkernagel, R. M. Immunology taught by viruses. *Science* **271**, 173-178 (1996).
82. Alferink, J. *et al.* Control of neonatal tolerance to tissue antigens by peripheral T cell trafficking. *Science* **282**, 1338-1341 (1998).
83. Kabelitz, D. & Janssen, O. Antigen-induced death of T-lymphocytes. *Front Biosci.* **2**, d61-d77 (1997).
84. Green, D. R., Droin, N. & Pinkoski, M. Activation-induced cell death in T cells. *Immunol. Rev.* **193**, 70-81 (2003).
85. Alderson, M. R. *et al.* Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **181**, 71-77 (1995).
86. Varadhachary, A. S., Perdow, S. N., Hu, C., Ramanarayanan, M. & Salgame, P. Differential ability of T cell subsets to undergo activation-induced cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 5778-5783 (1997).
87. Zhang, J. *et al.* Regulation of fas ligand expression during activation-induced cell death in T cells by p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH2-terminal kinase. *J. Exp. Med.* **191**, 1017-1030 (2000).
88. Macian, F., Im, S. H., Garcia-Cozar, F. J. & Rao, A. T-cell anergy. *Curr. Opin. Immunol.* **16**, 209-216 (2004).
89. Lutz, M. B. & Schuler, G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* **23**, 445-449 (2002).
90. Cools, N., Ponsaerts, P., Van, T., V & Berneman, Z. N. Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. *J. Leukoc. Biol.* **82**, 1365-1374 (2007).
91. Bach, J. F. Regulatory T cells under scrutiny. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 189-198 (2003).
92. Suci-Foca, N. *et al.* Molecular characterization of allospecific T suppressor and tolerogenic dendritic cells: review. *Int. Immunopharmacol.* **5**, 7-11 (2005).
93. Miyara, M. & Sakaguchi, S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol. Med.* **13**, 108-116 (2007).
94. McHugh, R. S. & Shevach, E. M. The role of suppressor T cells in regulation of immune responses. *J. Allergy Clin. Immunol.* **110**, 693-702 (2002).
95. Thompson, C. & Powrie, F. Regulatory T cells. *Curr. Opin. Pharmacol.* **4**, 408-414 (2004).

96. Jiang, H. & Chess, L. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J. Clin. Invest* **114**, 1198-1208 (2004).
97. Jonuleit, H. & Schmitt, E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J. Immunol.* **171**, 6323-6327 (2003).
98. Akbari, O. & Umetsu, D. T. Role of regulatory dendritic cells in allergy and asthma. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **4**, 533-538 (2004).
99. Rutella, S. & Lemoli, R. M. Regulatory T cells and tolerogenic dendritic cells: from basic biology to clinical applications. *Immunol. Lett.* **94**, 11-26 (2004).
100. Sakaguchi, S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 531-562 (2004).
101. Harrison, L. C., mpsey-Collier, M., Kramer, D. R. & Takahashi, K. Aerosol insulin induces regulatory CD8 gamma delta T cells that prevent murine insulin-dependent diabetes. *J. Exp. Med.* **184**, 2167-2174 (1996).
102. Zhang, Z. X., Yang, L., Young, K. J., DuTemple, B. & Zhang, L. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat. Med.* **6**, 782-789 (2000).
103. Zhang, Z. X. *et al.* Double-negative T cells, activated by xenoantigen, lyse autologous B and T cells using a perforin/granzyme-dependent, Fas-Fas ligand-independent pathway. *J. Immunol.* **177**, 6920-6929 (2006).
104. Vukmanovic-Stejic, M., Thomas, M. J., Noble, A. & Kemeny, D. M. Specificity, restriction and effector mechanisms of immunoregulatory CD8 T cells. *Immunology* **102**, 115-122 (2001).
105. Godfrey, D. I. & Kronenberg, M. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J. Clin. Invest* **114**, 1379-1388 (2004).
106. Cosmi, L. *et al.* Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes. *Blood* **102**, 4107-4114 (2003).
107. von, B. H. Peptide-based instruction of suppressor commitment in naive T cells and dynamics of immunosuppression in vivo. *Scand. J. Immunol.* **62 Suppl 1**, 49-54 (2005).
108. Brunkow, M. E. *et al.* Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* **27**, 68-73 (2001).
109. Khattri, R., Cox, T., Yasayko, S. A. & Ramsdell, F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat. Immunol.* **4**, 337-342 (2003).
110. Fontenot, J. D., Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **4**, 330-336 (2003).
111. Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**, 1057-1061 (2003).
112. Salomon, B. & Bluestone, J. A. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 225-252 (2001).
113. Thornton, A. M. & Shevach, E. M. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J. Exp. Med.* **188**, 287-296 (1998).



114. Jonuleit, H. *et al.* Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J. Exp. Med.* **193**, 1285-1294 (2001).
115. Kapsenberg, M. L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 984-993 (2003).
116. Banchereau, J. & Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252 (1998).
117. Tang, Q. & Bluestone, J. A. Plasmacytoid DCs and T(reg) cells: casual acquaintance or monogamous relationship? *Nat. Immunol.* **7**, 551-553 (2006).
118. Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. & Lanzavecchia, A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* **182**, 389-400 (1995).
119. Tang, Q. & Bluestone, J. A. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat. Immunol.* **9**, 239-244 (2008).
120. Borrás, F. E., Matthews, N. C., Lowdell, M. W. & Navarrete, C. V. Identification of both myeloid CD11c+ and lymphoid CD11c- dendritic cell subsets in cord blood. *Br. J. Haematol.* **113**, 925-931 (2001).
121. Panoskaltsis, N., Reid, C. D. & Knight, S. C. Immune modulation with dendritic cells. *Transfus. Med.* **14**, 81-96 (2004).
122. Suto, A. *et al.* Murine plasmacytoid dendritic cells produce IFN-gamma upon IL-4 stimulation. *J. Immunol.* **175**, 5681-5689 (2005).
123. Wu, L. & Liu, Y. J. Development of dendritic-cell lineages. *Immunity.* **26**, 741-750 (2007).
124. Jiang, W. *et al.* The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* **375**, 151-155 (1995).
125. Kleijmeer, M. J., Morkowski, S., Griffith, J. M., Rudensky, A. Y. & Geuze, H. J. Major histocompatibility complex class II compartments in human and mouse B lymphoblasts represent conventional endocytic compartments. *J. Cell Biol.* **139**, 639-649 (1997).
126. Rock, K. L. & Goldberg, A. L. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 739-779 (1999).
127. Schuurhuis, D. H., Fu, N., Ossendorp, F. & Melief, C. J. Ins and outs of dendritic cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **140**, 53-72 (2006).
128. Akbari, O., DeKruyff, R. H. & Umetsu, D. T. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat. Immunol.* **2**, 725-731 (2001).
129. Granucci, F., Vizzardelli, C., Virzi, E., Rescigno, M. & Ricciardi-Castagnoli, P. Transcriptional reprogramming of dendritic cells by differentiation stimuli. *Eur. J. Immunol.* **31**, 2539-2546 (2001).
130. Steinman, R. M. & Nussenzweig, M. C. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 351-358 (2002).

131. Bennett, S. R. *et al.* Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* **393**, 478-480 (1998).
132. Teunissen, M. B. *et al.* Human epidermal Langerhans cells undergo profound morphologic and phenotypical changes during in vitro culture. *J. Invest Dermatol.* **94**, 166-173 (1990).
133. Stossel, H. *et al.* Disappearance of certain acidic organelles (endosomes and Langerhans cell granules) accompanies loss of antigen processing capacity upon culture of epidermal Langerhans cells. *J. Exp. Med.* **172**, 1471-1482 (1990).
134. Becker, D., Reske-Kunz, A. B., Knop, J. & Reske, K. Biochemical properties of MHC class II molecules endogenously synthesized and expressed by mouse Langerhans cells. *Eur. J. Immunol.* **21**, 1213-1220 (1991).
135. Mosialos, G. *et al.* Circulating human dendritic cells differentially express high levels of a 55-kd actin-bundling protein. *Am. J. Pathol.* **148**, 593-600 (1996).
136. Ross, R., Ross, X. L., Schwing, J., Langin, T. & Reske-Kunz, A. B. The actin-bundling protein fascin is involved in the formation of dendritic processes in maturing epidermal Langerhans cells. *J. Immunol.* **160**, 3776-3782 (1998).
137. Sonderbye, L., Magerstadt, R., Blatman, R. N., Preffer, F. I. & Langhoff, E. Selective expression of human fascin (p55) by dendritic leukocytes. *Adv. Exp. Med. Biol.* **417**, 41-46 (1997).
138. Ross, R. *et al.* Expression of the actin-bundling protein fascin in cultured human dendritic cells correlates with dendritic morphology and cell differentiation. *J. Invest Dermatol.* **115**, 658-663 (2000).
139. Smits, H. H., de Jong, E. C., Wierenga, E. A. & Kapsenberg, M. L. Different faces of regulatory DCs in homeostasis and immunity. *Trends Immunol.* **26**, 123-129 (2005).
140. Cella, M. *et al.* Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J. Exp. Med.* **184**, 747-752 (1996).
141. Adams, S., O'Neill, D. W. & Bhardwaj, N. Recent advances in dendritic cell biology. *J. Clin. Immunol.* **25**, 87-98 (2005).
142. Xiao, B. G., Huang, Y. M. & Link, H. Tolerogenic dendritic cells: the ins and outs of outcome. *J. Immunother.* **29**, 465-471 (2006).
143. Groux, H., Fournier, N. & Cottrez, F. Role of dendritic cells in the generation of regulatory T cells. *Semin. Immunol.* **16**, 99-106 (2004).
144. Rutella, S., Danese, S. & Leone, G. Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood* **108**, 1435-1440 (2006).
145. Adorini, L., Giarratana, N. & Penna, G. Pharmacological induction of tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells. *Semin. Immunol.* **16**, 127-134 (2004).
146. Vlad, G., Cortesini, R. & Suci-Foca, N. License to heal: bidirectional interaction of antigen-specific regulatory T cells and tolerogenic APC. *J. Immunol.* **174**, 5907-5914 (2005).
147. Steinbrink, K., Wolfl, M., Jonuleit, H., Knop, J. & Enk, A. H. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J. Immunol.* **159**, 4772-4780 (1997).

148. Adler, H. S. & Steinbrink, K. Tolerogenic dendritic cells in health and disease: friend and foe! *Eur. J. Dermatol.* **17**, 476-491 (2007).
149. De, S. T. *et al.* Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur. J. Immunol.* **27**, 1229-1235 (1997).
150. Wakkach, A. *et al.* Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity.* **18**, 605-617 (2003).
151. O'Garra, A., Barrat, F. J., Castro, A. G., Vicari, A. & Hawrylowicz, C. Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. *Immunol. Rev.* **223**, 114-131 (2008).
152. Yamaguchi, Y. [Function, molecular structure and gene expression regulation of transforming growth factor-beta (TGF-beta)]. *Nippon Rinsho* **50**, 1932-1938 (1992).
153. Mou, H. B., Lin, M. F., Cen, H., Yu, J. & Meng, X. J. TGF-beta1 treated murine dendritic cells are maturation resistant and down-regulate Toll-like receptor 4 expression. *J. Zhejiang Univ. Sci.* **5**, 1239-1244 (2004).
154. Strobl, H. & Knapp, W. TGF-beta1 regulation of dendritic cells. *Microbes. Infect.* **1**, 1283-1290 (1999).
155. Zhang, Y. *et al.* Transforming growth factor-beta1 polarizes murine hematopoietic progenitor cells to generate Langerhans cell-like dendritic cells through a monocyte/macrophage differentiation pathway. *Blood* **93**, 1208-1220 (1999).
156. Bellinghausen, I. *et al.* Inhibition of human allergic T-cell responses by IL-10-treated dendritic cells: differences from hydrocortisone-treated dendritic cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* **108**, 242-249 (2001).
157. Bros, M. *et al.* 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 (2007).
158. Unger, W. W., Laban, S., Kleijwegt, F. S., van der Slik, A. R. & Roep, B. O. Induction of Treg by monocyte-derived DC modulated by vitamin D(3) or dexamethasone: Differential role for PD-L1. *Eur. J. Immunol.* **39**, 3147-3159 (2009).
159. Vosters, O. *et al.* Dendritic cells exposed to nystatin are refractory to maturation and promote the emergence of alloreactive regulatory T cells. *Transplantation* **75**, 383-389 (2003).
160. Webster, J. I., Tonelli, L. & Sternberg, E. M. Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 125-163 (2002).
161. Sternberg, E. M., Chrousos, G. P., Wilder, R. L. & Gold, P. W. The stress response and the regulation of inflammatory disease. *Ann. Intern. Med.* **117**, 854-866 (1992).
162. Smoak, K. A. & Cidlowski, J. A. Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech. Ageing Dev.* **125**, 697-706 (2004).
163. Herrlich, P. Cross-talk between glucocorticoid receptor and AP-1. *Oncogene* **20**, 2465-2475 (2001).
164. Beato, M., Chalepakis, G., Schauer, M. & Slater, E. P. DNA regulatory elements for steroid hormones. *J. Steroid Biochem.* **32**, 737-747 (1989).

165. Cato, A. C., Konig, H., Ponta, H. & Herrlich, P. Steroids and growth promoting factors in the regulation of expression of genes and gene networks. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **43**, 63-68 (1992).
166. Almawi, W. Y. & Melemedjian, O. K. Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. *J. Leukoc. Biol.* **71**, 9-15 (2002).
167. Barnes, P. J. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin. Sci. (Lond)* **94**, 557-572 (1998).
168. Kassel, O. *et al.* Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1. *EMBO J.* **20**, 7108-7116 (2001).
169. Piemonti, L. *et al.* Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *J. Immunol.* **162**, 6473-6481 (1999).
170. Moser, M. *et al.* Glucocorticoids down-regulate dendritic cell function in vitro and in vivo. *Eur. J. Immunol.* **25**, 2818-2824 (1995).
171. Neumann, M. *et al.* Differential expression of Rel/NF-kappaB and octamer factors is a hallmark of the generation and maturation of dendritic cells. *Blood* **95**, 277-285 (2000).
172. Hacker, H. Signal transduction pathways activated by CpG-DNA. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **247**, 77-92 (2000).
173. Pan, J. *et al.* Dexamethasone inhibits the antigen presentation of dendritic cells in MHC class II pathway. *Immunol. Lett.* **76**, 153-161 (2001).
174. Coyle, A. J. & Gutierrez-Ramos, J. C. The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. *Nat. Immunol.* **2**, 203-209 (2001).
175. Chen, L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 336-347 (2004).
176. Greenwald, R. J., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. The B7 family revisited. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 515-548 (2005).
177. Rodig, N. *et al.* Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8+ T cell activation and cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* **33**, 3117-3126 (2003).
178. Yamazaki, T. *et al.* Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *J. Immunol.* **169**, 5538-5545 (2002).
179. Dong, H. *et al.* Costimulating aberrant T cell responses by B7-H1 autoantibodies in rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest* **111**, 363-370 (2003).
180. Carter, L. *et al.* PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur. J. Immunol.* **32**, 634-643 (2002).
181. Carreno, B. M. & Collins, M. The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 29-53 (2002).
182. Greenwald, R. J., Latchman, Y. E. & Sharpe, A. H. Negative co-receptors on lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 391-396 (2002).
183. Butte, M. J., Keir, M. E., Phamduy, T. B., Sharpe, A. H. & Freeman, G. J. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity.* **27**, 111-122 (2007).

184. Dong, H. *et al.* Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat. Med.* **8**, 793-800 (2002).
185. Dong, H. *et al.* B7-H1 determines accumulation and deletion of intrahepatic CD8(+) T lymphocytes. *Immunity.* **20**, 327-336 (2004).
186. Petrovas, C. *et al.* PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. *J. Exp. Med.* **203**, 2281-2292 (2006).
187. Barber, D. L. *et al.* Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* **439**, 682-687 (2006).
188. Ansari, M. J. *et al.* The programmed death-1 (PD-1) pathway regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *J. Exp. Med.* **198**, 63-69 (2003).
189. Brown, J. A. *et al.* Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J. Immunol.* **170**, 1257-1266 (2003).
190. Latchman, Y. E. *et al.* PD-L1-deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 10691-10696 (2004).
191. Wang, S. *et al.* Molecular modeling and functional mapping of B7-H1 and B7-DC uncouple costimulatory function from PD-1 interaction. *J. Exp. Med.* **197**, 1083-1091 (2003).
192. Yoshinaga, S. K. *et al.* T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* **402**, 827-832 (1999).
193. Brodie, D. *et al.* LICOS, a primordial costimulatory ligand? *Curr. Biol.* **10**, 333-336 (2000).
194. Wang, S. *et al.* Costimulation of T cells by B7-H2, a B7-like molecule that binds ICOS. *Blood* **96**, 2808-2813 (2000).
195. Hutloff, A. *et al.* ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* **397**, 263-266 (1999).
196. Beier, K. C. *et al.* Induction, binding specificity and function of human ICOS. *Eur. J. Immunol.* **30**, 3707-3717 (2000).
197. Coyle, A. J. *et al.* The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. *Immunity.* **13**, 95-105 (2000).
198. McAdam, A. J. *et al.* Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4+ T cells. *J. Immunol.* **165**, 5035-5040 (2000).
199. Aicher, A. *et al.* Characterization of human inducible costimulator ligand expression and function. *J. Immunol.* **164**, 4689-4696 (2000).
200. Dong, C. *et al.* ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature* **409**, 97-101 (2001).
201. McAdam, A. J. *et al.* ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature* **409**, 102-105 (2001).
202. Tafuri, A. *et al.* ICOS is essential for effective T-helper-cell responses. *Nature* **409**, 105-109 (2001).
203. Tuettenberg, A. *et al.* 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 (2009).

204. Ferlazzo, G. *et al.* T lymphocytes express B7 family molecules following interaction with dendritic cells and acquire bystander costimulatory properties. *Eur. J. Immunol.* **32**, 3092-3101 (2002).
205. Prasad, D. V. *et al.* Murine B7-H3 is a negative regulator of T cells. *J. Immunol.* **173**, 2500-2506 (2004).
206. Steinberger, P. *et al.* Molecular characterization of human 4Ig-B7-H3, a member of the B7 family with four Ig-like domains. *J. Immunol.* **172**, 2352-2359 (2004).
207. Chapoval, A. I. *et al.* B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production. *Nat. Immunol.* **2**, 269-274 (2001).
208. Ling, V. *et al.* Duplication of primate and rodent B7-H3 immunoglobulin V- and C-like domains: divergent history of functional redundancy and exon loss. *Genomics* **82**, 365-377 (2003).
209. Suh, W. K. *et al.* The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses. *Nat. Immunol.* **4**, 899-906 (2003).
210. Hayami, K. *et al.* Molecular cloning of a novel murine cell-surface glycoprotein homologous to killer cell inhibitory receptors. *J. Biol. Chem.* **272**, 7320-7327 (1997).
211. Kubagawa, H., Burrows, P. D. & Cooper, M. D. A novel pair of immunoglobulin-like receptors expressed by B cells and myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 5261-5266 (1997).
212. Kubagawa, H. *et al.* Biochemical nature and cellular distribution of the paired immunoglobulin-like receptors, PIR-A and PIR-B. *J. Exp. Med.* **189**, 309-318 (1999).
213. Yamashita, Y., Ono, M. & Takai, T. Inhibitory and stimulatory functions of paired Ig-like receptor (PIR) family in RBL-2H3 cells. *J. Immunol.* **161**, 4042-4047 (1998).
214. Blery, M. *et al.* The paired Ig-like receptor PIR-B is an inhibitory receptor that recruits the protein-tyrosine phosphatase SHP-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 2446-2451 (1998).
215. Maeda, A. *et al.* Paired immunoglobulin-like receptor B (PIR-B) inhibits BCR-induced activation of Syk and Btk by SHP-1. *Oncogene* **18**, 2291-2297 (1999).
216. Maeda, A., Kurosaki, M., Ono, M., Takai, T. & Kurosaki, T. Requirement of SH2-containing protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 for paired immunoglobulin-like receptor B (PIR-B)-mediated inhibitory signal. *J. Exp. Med.* **187**, 1355-1360 (1998).
217. Masuda, A., Nakamura, A., Maeda, T., Sakamoto, Y. & Takai, T. Cis binding between inhibitory receptors and MHC class I can regulate mast cell activation. *J. Exp. Med.* **204**, 907-920 (2007).
218. Endo, S., Sakamoto, Y., Kobayashi, E., Nakamura, A. & Takai, T. Regulation of cytotoxic T lymphocyte triggering by PIR-B on dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**, 14515-14520 (2008).
219. Tridandapani, S. *et al.* Regulated expression and inhibitory function of FcγRIIb in human monocytic cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 5082-5089 (2002).
220. Amigorena, S. *et al.* Cytoplasmic domain heterogeneity and functions of IgG Fc receptors in B lymphocytes. *Science* **256**, 1808-1812 (1992).

221. Muta, T. *et al.* A 13-amino-acid motif in the cytoplasmic domain of Fc gamma RIIb modulates B-cell receptor signalling. *Nature* **368**, 70-73 (1994).
222. Ono, M., Bolland, S., Tempst, P. & Ravetch, J. V. Role of the inositol phosphatase SHIP in negative regulation of the immune system by the receptor Fc(gamma)RIIB. *Nature* **383**, 263-266 (1996).
223. Gupta, N. *et al.* Negative signaling pathways of the killer cell inhibitory receptor and Fc gamma RIIb1 require distinct phosphatases. *J. Exp. Med.* **186**, 473-478 (1997).
224. Nadler, M. J., Chen, B., Anderson, J. S., Wortis, H. H. & Neel, B. G. Protein-tyrosine phosphatase SHP-1 is dispensable for FcgammaRIIB-mediated inhibition of B cell antigen receptor activation. *J. Biol. Chem.* **272**, 20038-20043 (1997).
225. Ravetch, J. V. & Bolland, S. IgG Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 275-290 (2001).
226. Yuasa, T. *et al.* Deletion of fcgamma receptor IIB renders H-2(b) mice susceptible to collagen-induced arthritis. *J. Exp. Med.* **189**, 187-194 (1999).
227. Bolland, S. & Ravetch, J. V. Spontaneous autoimmune disease in Fc(gamma)RIIB-deficient mice results from strain-specific epistasis. *Immunity*. **13**, 277-285 (2000).
228. Nakamura, A. *et al.* Fcgamma receptor IIB-deficient mice develop Goodpasture's syndrome upon immunization with type IV collagen: a novel murine model for autoimmune glomerular basement membrane disease. *J. Exp. Med.* **191**, 899-906 (2000).
229. Chen, F., Castranova, V., Shi, X. & Demers, L. M. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin. Chem.* **45**, 7-17 (1999).
230. Pahl, H. L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* **18**, 6853-6866 (1999).
231. Aderem, A. & Ulevitch, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406**, 782-787 (2000).
232. Li, Q. & Verma, I. M. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 725-734 (2002).
233. Beinke, S. & Ley, S. C. Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem. J.* **382**, 393-409 (2004).
234. Luque, I. & Gelinas, C. Rel/NF-kappa B and I kappa B factors in oncogenesis. *Semin. Cancer Biol.* **8**, 103-111 (1997).
235. Karin, M., Cao, Y., Greten, F. R. & Li, Z. W. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 301-310 (2002).
236. Barnes, P. J. & Karin, M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.* **336**, 1066-1071 (1997).
237. Baldwin, A. S., Jr. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J. Clin. Invest* **107**, 3-6 (2001).
238. Sonenshein, G. E. Rel/NF-kappa B transcription factors and the control of apoptosis. *Semin. Cancer Biol.* **8**, 113-119 (1997).
239. Karin, M. & Ben-Neriah, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 621-663 (2000).

240. Nolan, G. P., Ghosh, S., Liou, H. C., Tempst, P. & Baltimore, D. DNA binding and I kappa B inhibition of the cloned p65 subunit of NF-kappa B, a rel-related polypeptide. *Cell* **64**, 961-969 (1991).
241. Ruben, S. M. *et al.* Isolation of a rel-related human cDNA that potentially encodes the 65-kD subunit of NF-kappa B. *Science* **251**, 1490-1493 (1991).
242. Ryseck, R. P. *et al.* RelB, a new Rel family transcription activator that can interact with p50-NF-kappa B. *Mol. Cell Biol.* **12**, 674-684 (1992).
243. Wilhelmsen, K. C., Eggleton, K. & Temin, H. M. Nucleic acid sequences of the oncogene v-rel in reticuloendotheliosis virus strain T and its cellular homolog, the proto-oncogene c-rel. *J. Virol.* **52**, 172-182 (1984).
244. Ghosh, S. *et al.* Cloning of the p50 DNA binding subunit of NF-kappa B: homology to rel and dorsal. *Cell* **62**, 1019-1029 (1990).
245. Kieran, M. *et al.* The DNA binding subunit of NF-kappa B is identical to factor KBF1 and homologous to the rel oncogene product. *Cell* **62**, 1007-1018 (1990).
246. Bours, V. *et al.* A novel mitogen-inducible gene product related to p50/p105-NF-kappa B participates in transactivation through a kappa B site. *Mol. Cell Biol.* **12**, 685-695 (1992).
247. Neri, A. *et al.* B cell lymphoma-associated chromosomal translocation involves candidate oncogene *lyt-10*, homologous to NF-kappa B p50. *Cell* **67**, 1075-1087 (1991).
248. Siebenlist, U., Franzoso, G. & Brown, K. Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu. Rev. Cell Biol.* **10**, 405-455 (1994).
249. Ghosh, S. & Karin, M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* **109 Suppl**, S81-S96 (2002).
250. Brown, K., Gerstberger, S., Carlson, L., Franzoso, G. & Siebenlist, U. Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science* **267**, 1485-1488 (1995).
251. Baldwin, A. S., Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 649-683 (1996).
252. Ghosh, S., May, M. J. & Kopp, E. B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 225-260 (1998).
253. Pettit, A. R. *et al.* Nuclear localization of RelB is associated with effective antigen-presenting cell function. *J. Immunol.* **159**, 3681-3691 (1997).
254. Lee, J. I. *et al.* Cyclosporine A inhibits the expression of costimulatory molecules on in vitro-generated dendritic cells: association with reduced nuclear translocation of nuclear factor kappa B. *Transplantation* **68**, 1255-1263 (1999).
255. Liu, S. F., Ye, X. & Malik, A. B. Inhibition of NF-kappaB activation by pyrrolidine dithiocarbamate prevents in vivo expression of proinflammatory genes. *Circulation* **100**, 1330-1337 (1999).
256. Giannoukakis, N. *et al.* Prolongation of cardiac allograft survival using dendritic cells treated with NF-kB decoy oligodeoxynucleotides. *Mol. Ther.* **1**, 430-437 (2000).
257. Makarov, S. S. NF-kappa B in rheumatoid arthritis: a pivotal regulator of inflammation, hyperplasia, and tissue destruction. *Arthritis Res.* **3**, 200-206 (2001).



258. Foxwell, B. M., Yoshimura, S., Bondeson, J., Brennan, F. M. & Feldmann, M. High efficiency gene transfer is an efficient way of defining therapeutic targets: a functional genomics approach. *Ann. Rheum. Dis.* **60 Suppl 3**, iii13-iii17 (2001).
259. Calder, V. L., Bondeson, J., Brennan, F. M., Foxwell, B. M. & Feldmann, M. Antigen-specific T-cell downregulation by human dendritic cells following blockade of NF-kappaB. *Scand. J. Immunol.* **57**, 261-270 (2003).
260. Yoshimura, S., Bondeson, J., Brennan, F. M., Foxwell, B. M. & Feldmann, M. Antigen presentation by murine dendritic cells is nuclear factor-kappa B dependent both in vitro and in vivo. *Scand. J. Immunol.* **58**, 165-172 (2003).
261. Dong, C., Davis, R. J. & Flavell, R. A. MAP kinases in the immune response. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 55-72 (2002).
262. Davis, R. J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**, 239-252 (2000).
263. Han, J. & Ulevitch, R. J. Emerging targets for anti-inflammatory therapy. *Nat. Cell Biol.* **1**, E39-E40 (1999).
264. Schaeffer, H. J. & Weber, M. J. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol. Cell Biol.* **19**, 2435-2444 (1999).
265. Lee, J. C. *et al.* A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* **372**, 739-746 (1994).
266. Lee, J. C. & Young, P. R. Role of CSB/p38/RK stress response kinase in LPS and cytokine signaling mechanisms. *J. Leukoc. Biol.* **59**, 152-157 (1996).
267. Beyaert, R. *et al.* The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor. *EMBO J.* **15**, 1914-1923 (1996).
268. Kyriakis, J. M. & Avruch, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev.* **81**, 807-869 (2001).
269. Whitmarsh, A. J. & Davis, R. J. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J. Mol. Med.* **74**, 589-607 (1996).
270. Farooq, A. & Zhou, M. M. Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cell Signal.* **16**, 769-779 (2004).
271. Nimah, M. *et al.* Contribution of MKP-1 regulation of p38 to endotoxin tolerance. *Shock* **23**, 80-87 (2005).
272. Zhao, Q. *et al.* The role of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in the response of alveolar macrophages to lipopolysaccharide: attenuation of proinflammatory cytokine biosynthesis via feedback control of p38. *J. Biol. Chem.* **280**, 8101-8108 (2005).
273. Zhao, Q. *et al.* MAP kinase phosphatase 1 controls innate immune responses and suppresses endotoxic shock. *J. Exp. Med.* **203**, 131-140 (2006).
274. Heim, M. H. The Jak-STAT pathway: cytokine signalling from the receptor to the nucleus. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* **19**, 75-120 (1999).
275. Imada, K. & Leonard, W. J. The Jak-STAT pathway. *Mol. Immunol.* **37**, 1-11 (2000).
276. Ihle, J. N. & Kerr, I. M. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet.* **11**, 69-74 (1995).

277. O'Shea, J. J., Gadina, M. & Schreiber, R. D. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* **109 Suppl**, S121-S131 (2002).
278. Rane, S. G. & Reddy, E. P. Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene* **19**, 5662-5679 (2000).
279. Takeda, K. & Akira, S. STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* **11**, 199-207 (2000).
280. Takeda, K. *et al.* Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 3801-3804 (1997).
281. Raz, R., Lee, C. K., Cannizzaro, L. A., d'Eustachio, P. & Levy, D. E. Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 2846-2851 (1999).
282. Matsuda, T. *et al.* STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J.* **18**, 4261-4269 (1999).
283. Takeda, K. *et al.* Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity.* **10**, 39-49 (1999).
284. Nefedova, Y. *et al.* Hyperactivation of STAT3 is involved in abnormal differentiation of dendritic cells in cancer. *J. Immunol.* **172**, 464-474 (2004).
285. Naka, T., Fujimoto, M. & Kishimoto, T. Negative regulation of cytokine signaling: STAT-induced STAT inhibitor. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 394-398 (1999).
286. Nicola, N. A. *et al.* Negative regulation of cytokine signaling by the SOCS proteins. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **64**, 397-404 (1999).
287. Chen, X. P., Losman, J. A. & Rothman, P. SOCS proteins, regulators of intracellular signaling. *Immunity.* **13**, 287-290 (2000).
288. Yasukawa, H. *et al.* The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *EMBO J.* **18**, 1309-1320 (1999).
289. Cohnen, S. J. *et al.* SOCS-3 is tyrosine phosphorylated in response to interleukin-2 and suppresses STAT5 phosphorylation and lymphocyte proliferation. *Mol. Cell Biol.* **19**, 4980-4988 (1999).
290. Stoiber, D. *et al.* Lipopolysaccharide induces in macrophages the synthesis of the suppressor of cytokine signaling 3 and suppresses signal transduction in response to the activating factor IFN-gamma. *J. Immunol.* **163**, 2640-2647 (1999).
291. Morita, Y. *et al.* Signals transducers and activators of transcription (STAT)-induced STAT inhibitor-1 (SSI-1)/suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1) suppresses tumor necrosis factor alpha-induced cell death in fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 5405-5410 (2000).
292. Kinjyo, I. *et al.* SOCS1/JAB is a negative regulator of LPS-induced macrophage activation. *Immunity.* **17**, 583-591 (2002).
293. Nakagawa, R. *et al.* SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses. *Immunity.* **17**, 677-687 (2002).
294. Hanada, T. *et al.* Suppressor of cytokine signaling-1 is essential for suppressing dendritic cell activation and systemic autoimmunity. *Immunity.* **19**, 437-450 (2003).

295. Hanada, T. *et al.* Induction of hyper Th1 cell-type immune responses by dendritic cells lacking the suppressor of cytokine signaling-1 gene. *J. Immunol.* **174**, 4325-4332 (2005).
296. Dalpke, A. H., Opper, S., Zimmermann, S. & Heeg, K. Suppressors of cytokine signaling (SOCS)-1 and SOCS-3 are induced by CpG-DNA and modulate cytokine responses in APCs. *J. Immunol.* **166**, 7082-7089 (2001).
297. Fiorentino, D. F., Bond, M. W. & Mosmann, T. R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.* **170**, 2081-2095 (1989).
298. O'Garra, A. *et al.* Production of cytokines by mouse B cells: B lymphomas and normal B cells produce interleukin 10. *Int. Immunol.* **2**, 821-832 (1990).
299. Boonstra, A. *et al.* Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF-dependent TLR signals, and TLR-independent signals. *J. Immunol.* **177**, 7551-7558 (2006).
300. Tanchot, C. *et al.* Modifications of CD8+ T cell function during in vivo memory or tolerance induction. *Immunity.* **8**, 581-590 (1998).
301. Maloy, K. J. *et al.* CD4+CD25+ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J. Exp. Med.* **197**, 111-119 (2003).
302. Maynard, C. L. *et al.* Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3+ and Foxp3- precursor cells in the absence of interleukin 10. *Nat. Immunol.* **8**, 931-941 (2007).
303. McGuirk, P., McCann, C. & Mills, K. H. Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*. *J. Exp. Med.* **195**, 221-231 (2002).
304. Moore, K. W., de Waal, M. R., Coffman, R. L. & O'Garra, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 683-765 (2001).
305. Steinbrink, K. *et al.* Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* **93**, 1634-1642 (1999).
306. McBride, J. M., Jung, T., de Vries, J. E. & Aversa, G. IL-10 alters DC function via modulation of cell surface molecules resulting in impaired T-cell responses. *Cell Immunol.* **215**, 162-172 (2002).
307. Enk, A. H., Saloga, J., Becker, D., Mohamadzadeh, M. & Knop, J. Induction of hapten-specific tolerance by interleukin 10 in vivo. *J. Exp. Med.* **179**, 1397-1402 (1994).
308. Koppelman, B., Neefjes, J. J., de Vries, J. E. & de Waal, M. R. Interleukin-10 down-regulates MHC class II alphabeta peptide complexes at the plasma membrane of monocytes by affecting arrival and recycling. *Immunity.* **7**, 861-871 (1997).
309. Fiebiger, E. *et al.* Cytokines regulate proteolysis in major histocompatibility complex class II-dependent antigen presentation by dendritic cells. *J. Exp. Med.* **193**, 881-892 (2001).
310. Buelens, C. *et al.* Human dendritic cell responses to lipopolysaccharide and CD40 ligation are differentially regulated by interleukin-10. *Eur. J. Immunol.* **27**, 1848-1852 (1997).

311. Coates, P. T., Krishnan, R., Kireta, S., Johnston, J. & Russ, G. R. 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 (2001).
312. Fu, C. L., Chuang, Y. H., Huang, H. Y. & Chiang, B. L. Induction of IL-10 producing CD4+ T cells with regulatory activities by stimulation with IL-10 gene-modified bone marrow derived dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.* **153**, 258-268 (2008).
313. Takayama, T. *et al.* Retroviral delivery of viral interleukin-10 into myeloid dendritic cells markedly inhibits their allostimulatory activity and promotes the induction of T-cell hyporesponsiveness. *Transplantation* **66**, 1567-1574 (1998).
314. Zhang, M. *et al.* Effective induction of immune tolerance by portal venous infusion with IL-10 gene-modified immature dendritic cells leading to prolongation of allograft survival. *J. Mol. Med.* **82**, 240-249 (2004).
315. Minter, R. M. *et al.* Adenoviral delivery of human and viral IL-10 in murine sepsis. *J. Immunol.* **167**, 1053-1059 (2001).
316. Dumoutier, L., Van, R. E., Colau, D. & Renauld, J. C. Human interleukin-10-related T cell-derived inducible factor: molecular cloning and functional characterization as an hepatocyte-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 10144-10149 (2000).
317. Dumoutier, L., Louahed, J. & Renauld, J. C. Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9. *J. Immunol.* **164**, 1814-1819 (2000).
318. Wurster, A. L. *et al.* Interleukin 21 is a T helper (Th) cell 2 cytokine that specifically inhibits the differentiation of naive Th cells into interferon gamma-producing Th1 cells. *J. Exp. Med.* **196**, 969-977 (2002).
319. Vinuesa, C. G. *et al.* A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity. *Nature* **435**, 452-458 (2005).
320. Harada, M. *et al.* IL-21-induced Bepsilon cell apoptosis mediated by natural killer T cells suppresses IgE responses. *J. Exp. Med.* **203**, 2929-2937 (2006).
321. Nurieva, R. *et al.* Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* **448**, 480-483 (2007).
322. Zhou, L. *et al.* IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat. Immunol.* **8**, 967-974 (2007).
323. Parrish-Novak, J. *et al.* Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* **408**, 57-63 (2000).
324. Spolski, R. & Leonard, W. J. Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 57-79 (2008).
325. Brandt, K., Bulfone-Paus, S., Foster, D. C. & Ruckert, R. Interleukin-21 inhibits dendritic cell activation and maturation. *Blood* **102**, 4090-4098 (2003).
326. Brandt, K. *et al.* Interleukin-21 inhibits dendritic cell-mediated T cell activation and induction of contact hypersensitivity in vivo. *J. Invest Dermatol.* **121**, 1379-1382 (2003).

327. Ruckert, R., Bulfone-Paus, S. & Brandt, K. Interleukin-21 stimulates antigen uptake, protease activity, survival and induction of CD4+ T cell proliferation by murine macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* **151**, 487-495 (2008).
328. Kasaian, M. T. *et al.* IL-21 limits NK cell responses and promotes antigen-specific T cell activation: a mediator of the transition from innate to adaptive immunity. *Immunity.* **16**, 559-569 (2002).
329. Brady, J., Hayakawa, Y., Smyth, M. J. & Nutt, S. L. IL-21 induces the functional maturation of murine NK cells. *J. Immunol.* **172**, 2048-2058 (2004).
330. Perez, S. A. *et al.* Effect of IL-21 on NK cells derived from different umbilical cord blood populations. *Int. Immunol.* **18**, 49-58 (2006).
331. Datta, S. & Sarvetnick, N. E. IL-21 limits peripheral lymphocyte numbers through T cell homeostatic mechanisms. *PLoS. One.* **3**, e3118 (2008).
332. Vogelzang, A. *et al.* A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells. *Immunity.* **29**, 127-137 (2008).
333. Nurieva, R. I. *et al.* Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity.* **29**, 138-149 (2008).
334. Korn, T. *et al.* IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* **448**, 484-487 (2007).
335. Brandt, K., Singh, P. B., Bulfone-Paus, S. & Ruckert, R. Interleukin-21: a new modulator of immunity, infection, and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* **18**, 223-232 (2007).
336. Young, D. A. *et al.* Blockade of the interleukin-21/interleukin-21 receptor pathway ameliorates disease in animal models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **56**, 1152-1163 (2007).
337. Clough, L. E. *et al.* Release from regulatory T cell-mediated suppression during the onset of tissue-specific autoimmunity is associated with elevated IL-21. *J. Immunol.* **180**, 5393-5401 (2008).
338. Coquet, J. M., Chakravarti, S., Smyth, M. J. & Godfrey, D. I. Cutting edge: IL-21 is not essential for Th17 differentiation or experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* **180**, 7097-7101 (2008).
339. Piao, W. H. *et al.* IL-21 modulates CD4+ CD25+ regulatory T-cell homeostasis in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Scand. J. Immunol.* **67**, 37-46 (2008).
340. Dripps, D. J., Brandhuber, B. J., Thompson, R. C. & Eisenberg, S. P. Interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist binds to the 80-kDa IL-1 receptor but does not initiate IL-1 signal transduction. *J. Biol. Chem.* **266**, 10331-10336 (1991).
341. Granowitz, E. V., Clark, B. D., Mancilla, J. & Dinarello, C. A. Interleukin-1 receptor antagonist competitively inhibits the binding of interleukin-1 to the type II interleukin-1 receptor. *J. Biol. Chem.* **266**, 14147-14150 (1991).
342. Seckinger, P., Lowenthal, J. W., Williamson, K., Dayer, J. M. & MacDonald, H. R. A urine inhibitor of interleukin 1 activity that blocks ligand binding. *J. Immunol.* **139**, 1546-1549 (1987).

343. Roux-Lombard, P., Modoux, C. & Dayer, J. M. Production of interleukin-1 (IL-1) and a specific IL-1 inhibitor during human monocyte-macrophage differentiation: influence of GM-CSF. *Cytokine* **1**, 45-51 (1989).
344. McColl, S. R., Paquin, R., Menard, C. & Beaulieu, A. D. Human neutrophils produce high levels of the interleukin 1 receptor antagonist in response to granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* **176**, 593-598 (1992).
345. Hagaman, D. D. *et al.* Secretion of interleukin-1 receptor antagonist from human mast cells after immunoglobulin E-mediated activation and after segmental antigen challenge. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **25**, 685-691 (2001).
346. Daig, R. *et al.* Human intestinal epithelial cells secrete interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-8 but not interleukin-1 or interleukin-6. *Gut* **46**, 350-358 (2000).
347. Gruaz-Chatellard, D., Baumberger, C., Saurat, J. H. & Dayer, J. M. Interleukin 1 receptor antagonist in human epidermis and cultured keratinocytes. *FEBS Lett.* **294**, 137-140 (1991).
348. Dewberry, R., Holden, H., Crossman, D. & Francis, S. Interleukin-1 receptor antagonist expression in human endothelial cells and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 2394-2400 (2000).
349. Palmer, G. *et al.* Production of interleukin-1 receptor antagonist by human articular chondrocytes. *Arthritis Res.* **4**, 226-231 (2002).
350. Gabay, C., Smith, M. F., Eidlen, D. & Arend, W. P. Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) is an acute-phase protein. *J. Clin. Invest* **99**, 2930-2940 (1997).
351. Juge-Aubry, C. E. *et al.* Regulatory effects of interleukin (IL)-1, interferon-beta, and IL-4 on the production of IL-1 receptor antagonist by human adipose tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **89**, 2652-2658 (2004).
352. Arend, W. P., Welgus, H. G., Thompson, R. C. & Eisenberg, S. P. Biological properties of recombinant human monocyte-derived interleukin 1 receptor antagonist. *J. Clin. Invest* **85**, 1694-1697 (1990).
353. Fukumoto, T., Matsukawa, A., Ohkawara, S., Takagi, K. & Yoshinaga, M. Administration of neutralizing antibody against rabbit IL-1 receptor antagonist exacerbates lipopolysaccharide-induced arthritis in rabbits. *Inflamm. Res.* **45**, 479-485 (1996).
354. Fujioka, N. *et al.* Preparation of specific antibodies against murine IL-1ra and the establishment of IL-1ra as an endogenous regulator of bacteria-induced fulminant hepatitis in mice. *J. Leukoc. Biol.* **58**, 90-98 (1995).
355. Bandara, G. *et al.* Intraarticular expression of biologically active interleukin 1-receptor-antagonist protein by ex vivo gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 10764-10768 (1993).
356. Hung, G. L. *et al.* Suppression of intra-articular responses to interleukin-1 by transfer of the interleukin-1 receptor antagonist gene to synovium. *Gene Ther.* **1**, 64-69 (1994).
357. Otani, K. *et al.* Suppression of antigen-induced arthritis in rabbits by ex vivo gene therapy. *J. Immunol.* **156**, 3558-3562 (1996).

358. Bakker, A. C. *et al.* Prevention of murine collagen-induced arthritis in the knee and ipsilateral paw by local expression of human interleukin-1 receptor antagonist protein in the knee. *Arthritis Rheum.* **40**, 893-900 (1997).
359. Giannoukakis, N. *et al.* Adenoviral gene transfer of the interleukin-1 receptor antagonist protein to human islets prevents IL-1beta-induced beta-cell impairment and activation of islet cell apoptosis in vitro. *Diabetes* **48**, 1730-1736 (1999).
360. Nakano, A. *et al.* Cytokine gene therapy for myocarditis by in vivo electroporation. *Hum. Gene Ther.* **12**, 1289-1297 (2001).
361. Li, M. O., Wan, Y. Y., Sanjabi, S., Robertson, A. K. & Flavell, R. A. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 99-146 (2006).
362. Fortunel, N. O., Hatzfeld, A. & Hatzfeld, J. A. Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood* **96**, 2022-2036 (2000).
363. Moustakas, A., Pardali, K., Gaal, A. & Heldin, C. H. Mechanisms of TGF-beta signaling in regulation of cell growth and differentiation. *Immunol. Lett.* **82**, 85-91 (2002).
364. Brown, T. L., Patil, S. & Howe, P. H. Analysis of TGF-beta-inducible apoptosis. *Methods Mol. Biol.* **142**, 149-167 (2000).
365. Letterio, J. J. & Roberts, A. B. Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 137-161 (1998).
366. Li, M. O., Sanjabi, S. & Flavell, R. A. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity.* **25**, 455-471 (2006).
367. Bonham, C. A. *et al.* TGF-beta 1 pretreatment impairs the allostimulatory function of human bone marrow-derived antigen-presenting cells for both naive and primed T cells. *Transpl. Immunol.* **4**, 186-191 (1996).
368. Yamaguchi, Y., Tsumura, H., Miwa, M. & Inaba, K. Contrasting effects of TGF-beta 1 and TNF-alpha on the development of dendritic cells from progenitors in mouse bone marrow. *Stem Cells* **15**, 144-153 (1997).
369. Lu, L. *et al.* Blockade of the CD40-CD40 ligand pathway potentiates the capacity of donor-derived dendritic cell progenitors to induce long-term cardiac allograft survival. *Transplantation* **64**, 1808-1815 (1997).
370. Kosiewicz, M. M. & Alard, P. Tolerogenic antigen-presenting cells: regulation of the immune response by TGF-beta-treated antigen-presenting cells. *Immunol. Res.* **30**, 155-170 (2004).
371. Duffer, C. *et al.* Suppression of T-cell alloreactivity by gene-therapeutic modulation of human dendritic stimulator cells with TGF-beta adenoviral vectors. *Transplant. Proc.* **33**, 190-191 (2001).
372. Schmitt, E. *et al.* T helper type 1 development of naive CD4+ T cells requires the coordinate action of interleukin-12 and interferon-gamma and is inhibited by transforming growth factor-beta. *Eur. J. Immunol.* **24**, 793-798 (1994).
373. Strober, W. *et al.* Reciprocal IFN-gamma and TGF-beta responses regulate the occurrence of mucosal inflammation. *Immunol. Today* **18**, 61-64 (1997).

374. Bettelli, E. *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **441**, 235-238 (2006).
375. Penna, G. & Adorini, L. 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J. Immunol.* **164**, 2405-2411 (2000).
376. Ross, R. *et al.* Transcriptional targeting of dendritic cells for gene therapy using the promoter of the cytoskeletal protein fascin. *Gene Ther.* **10**, 1035-1040 (2003).
377. Breckpot, K., Heirman, C., Neyns, B. & Thielemans, K. Exploiting dendritic cells for cancer immunotherapy: genetic modification of dendritic cells. *J. Gene Med.* **6**, 1175-1188 (2004).
378. Kikuchi, T. Genetically modified dendritic cells for therapeutic immunity. *Tohoku J. Exp. Med.* **208**, 1-8 (2006).
379. Condon, C., Watkins, S. C., Celluzzi, C. M., Thompson, K. & Falo, L. D., Jr. DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. *Nat. Med.* **2**, 1122-1128 (1996).
380. Liu, M. Transfected human dendritic cells as cancer vaccines. *Nat. Biotechnol.* **16**, 335-336 (1998).
381. Bros, M. *et al.* A novel plasmid DNA electroporation method allows transfection of murine DC. *J. Immunol. Methods* **343**, 13-20 (2009).
382. Rowe, H. M. *et al.* Immunization with a lentiviral vector stimulates both CD4 and CD8 T cell responses to an ovalbumin transgene. *Mol. Ther.* **13**, 310-319 (2006).
383. Mann, R., Mulligan, R. C. & Baltimore, D. Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell* **33**, 153-159 (1983).
384. Arthur, J. F. *et al.* A comparison of gene transfer methods in human dendritic cells. *Cancer Gene Ther.* **4**, 17-25 (1997).
385. Zhong, L., Granelli-Piperno, A., Choi, Y. & Steinman, R. M. Recombinant adenovirus is an efficient and non-perturbing genetic vector for human dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **29**, 964-972 (1999).
386. Pecher, G. *et al.* Mucin gene (MUC1) transfer into human dendritic cells by cationic liposomes and recombinant adenovirus. *Anticancer Res.* **21**, 2591-2596 (2001).
387. Morelli, A. E. *et al.* Recombinant adenovirus induces maturation of dendritic cells via an NF-kappaB-dependent pathway. *J. Virol.* **74**, 9617-9628 (2000).
388. Liu, Q. & Muruve, D. A. Molecular basis of the inflammatory response to adenovirus vectors. *Gene Ther.* **10**, 935-940 (2003).
389. Shayakhmetov, D. M., Li, Z. Y., Ni, S. & Lieber, A. Interference with the IL-1-signaling pathway improves the toxicity profile of systemically applied adenovirus vectors. *J. Immunol.* **174**, 7310-7319 (2005).
390. Iacobelli-Martinez, M. & Nemerow, G. R. Preferential activation of Toll-like receptor nine by CD46-utilizing adenoviruses. *J. Virol.* **81**, 1305-1312 (2007).
391. Tuettenberg, A. *et al.* Early adenoviral gene expression mediates immunosuppression by transduced dendritic cell (DC): implications for immunotherapy using genetically modified DC. *J. Immunol.* **172**, 1524-1530 (2004).



392. Andreadis, S. T., Brott, D., Fuller, A. O. & Palsson, B. O. Moloney murine leukemia virus-derived retroviral vectors decay intracellularly with a half-life in the range of 5.5 to 7.5 hours. *J. Virol.* **71**, 7541-7548 (1997).
393. Le Doux, J. M., Davis, H. E., Morgan, J. R. & Yarmush, M. L. Kinetics of retrovirus production and decay. *Biotechnol. Bioeng.* **63**, 654-662 (1999).
394. Roe, T., Reynolds, T. C., Yu, G. & Brown, P. O. Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO J.* **12**, 2099-2108 (1993).
395. Naldini, L. *et al.* In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**, 263-267 (1996).
396. Blomer, U. *et al.* Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. *J. Virol.* **71**, 6641-6649 (1997).
397. Naldini, L., Blomer, U., Gage, F. H., Trono, D. & Verma, I. M. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 11382-11388 (1996).
398. Esslinger, C. *et al.* In vivo administration of a lentiviral vaccine targets DCs and induces efficient CD8(+) T cell responses. *J. Clin. Invest* **111**, 1673-1681 (2003).
399. Breckpot, K., Aerts, J. L. & Thielemans, K. Lentiviral vectors for cancer immunotherapy: transforming infectious particles into therapeutics. *Gene Ther.* **14**, 847-862 (2007).
400. Follenzi, A. & Naldini, L. Generation of HIV-1 derived lentiviral vectors. *Methods Enzymol.* **346**, 454-465 (2002).
401. Dull, T. *et al.* A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J. Virol.* **72**, 8463-8471 (1998).
402. Burns, J. C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M. & Yee, J. K. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 8033-8037 (1993).
403. Hu, W. S. & Pathak, V. K. Design of retroviral vectors and helper cells for gene therapy. *Pharmacol. Rev.* **52**, 493-511 (2000).
404. Salmon, P. *et al.* High-level transgene expression in human hematopoietic progenitors and differentiated blood lineages after transduction with improved lentiviral vectors. *Blood* **96**, 3392-3398 (2000).
405. Oki, M. *et al.* Efficient lentiviral transduction of human cord blood CD34(+) cells followed by their expansion and differentiation into dendritic cells. *Exp. Hematol.* **29**, 1210-1217 (2001).
406. Firat, H. *et al.* Use of a lentiviral flap vector for induction of CTL immunity against melanoma. Perspectives for immunotherapy. *J. Gene Med.* **4**, 38-45 (2002).
407. Zarei, S., Leuba, F., Arrighi, J. F., Hauser, C. & Piguet, V. Transduction of dendritic cells by antigen-encoding lentiviral vectors permits antigen processing and MHC class I-dependent presentation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **109**, 988-994 (2002).
408. Breckpot, K. *et al.* Lentivirally transduced dendritic cells as a tool for cancer immunotherapy. *J. Gene Med.* **5**, 654-667 (2003).

409. Chinnasamy, D. *et al.* Lentiviral-mediated gene transfer into human lymphocytes: role of HIV-1 accessory proteins. *Blood* **96**, 1309-1316 (2000).
410. Rouas, R. *et al.* Lentiviral-mediated gene delivery in human monocyte-derived dendritic cells: optimized design and procedures for highly efficient transduction compatible with clinical constraints. *Cancer Gene Ther.* **9**, 715-724 (2002).
411. Metharom, P., Ellem, K. A., Schmidt, C. & Wei, M. Q. Lentiviral vector-mediated tyrosinase-related protein 2 gene transfer to dendritic cells for the therapy of melanoma. *Hum. Gene Ther.* **12**, 2203-2213 (2001).
412. Chang, L. J. & Gay, E. E. The molecular genetics of lentiviral vectors--current and future perspectives. *Curr. Gene Ther.* **1**, 237-251 (2001).
413. Schroers, R. *et al.* Transduction of human PBMC-derived dendritic cells and macrophages by an HIV-1-based lentiviral vector system. *Mol. Ther.* **1**, 171-179 (2000).
414. Gruber, A., Kan-Mitchell, J., Kuhlen, K. L., Mukai, T. & Wong-Staal, F. Dendritic cells transduced by multiply deleted HIV-1 vectors exhibit normal phenotypes and functions and elicit an HIV-specific cytotoxic T-lymphocyte response in vitro. *Blood* **96**, 1327-1333 (2000).
415. Dyall, J., Latouche, J. B., Schnell, S. & Sadelain, M. Lentivirus-transduced human monocyte-derived dendritic cells efficiently stimulate antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Blood* **97**, 114-121 (2001).
416. Bros, M., Ross, X. L., Pautz, A., Reske-Kunz, A. B. & Ross, R. The human fascin gene promoter is highly active in mature dendritic cells due to a stage-specific enhancer. *J. Immunol.* **171**, 1825-1834 (2003).
417. Kureishy, N., Sapountzi, V., Prag, S., Anilkumar, N. & Adams, J. C. Fascins, and their roles in cell structure and function. *Bioessays* **24**, 350-361 (2002).
418. Sudowe, S., Ludwig-Portugall, I., Montermann, E., Ross, R. & Reske-Kunz, A. B. Transcriptional targeting of dendritic cells in gene gun-mediated DNA immunization favors the induction of type 1 immune responses. *Mol. Ther.* **8**, 567-575 (2003).
419. Becker, D., Mohamadzadeh, M., Reske, K. & Knop, J. Increased level of intracellular MHC class II molecules in murine Langerhans cells following in vivo and in vitro administration of contact allergens. *J. Invest Dermatol.* **99**, 545-549 (1992).
420. Zal, T., Volkman, A. & Stockinger, B. Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. *J. Exp. Med.* **180**, 2089-2099 (1994).
421. Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **36**, 59-74 (1977).
422. Fairman, M. P. & Stillman, B. Cellular factors required for multiple stages of SV40 DNA replication in vitro. *EMBO J.* **7**, 1211-1218 (1988).
423. Bettelli, E. *et al.* Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J. Exp. Med.* **197**, 1073-1081 (2003).
424. Beuken, E., Vink, C. & Bruggeman, C. A. One-step procedure for screening recombinant plasmids by size. *Biotechniques* **24**, 748-750 (1998).

425. Lobban, P. E. & Kaiser, A. D. Enzymatic end-to end joining of DNA molecules. *J. Mol. Biol.* **78**, 453-471 (1973).
426. Mullis, K. B. & Faloona, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-350 (1987).
427. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **74**, 5463-5467 (1977).
428. Rougeon, F. & Mach, B. Stepwise biosynthesis in vitro of globin genes from globin mRNA by DNA polymerase of avian myeloblastosis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **73**, 3418-3422 (1976).
429. Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. & Williams, P. M. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* **6**, 986-994 (1996).
430. Lockey, C., Otto, E. & Long, Z. Real-time fluorescence detection of a single DNA molecule. *Biotechniques* **24**, 744-746 (1998).
431. Wigler, M. *et al.* Transfer of purified herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells. *Cell* **11**, 223-232 (1977).
432. Chen, C. & Okayama, H. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell Biol.* **7**, 2745-2752 (1987).
433. Loyter, A., Scangos, G., Juricek, D., Keene, D. & Ruddle, F. H. Mechanisms of DNA entry into mammalian cells. II. Phagocytosis of calcium phosphate DNA co-precipitate visualized by electron microscopy. *Exp. Cell Res.* **139**, 223-234 (1982).
434. Scheicher, C., Mehlig, M., Zecher, R. & Reske, K. 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 (1992).
435. Lutz, M. B. *et al.* An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Methods* **223**, 77-92 (1999).
436. Julius, M. H., Simpson, E. & Herzenberg, L. A. A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **3**, 645-649 (1973).
437. Steinman, R. M. & Witmer, M. D. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **75**, 5132-5136 (1978).
438. Rea, D. *et al.* Glucocorticoids transform CD40-triggering of dendritic cells into an alternative activation pathway resulting in antigen-presenting cells that secrete IL-10. *Blood* **95**, 3162-3167 (2000).
439. Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J. & Enk, A. H. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J. Exp. Med.* **192**, 1213-1222 (2000).
440. Lu, L., McCaslin, D., Starzl, T. E. & Thomson, A. W. Bone marrow-derived dendritic cell progenitors (NLDC 145+, MHC class II+, B7-1dim, B7-2-) induce alloantigen-specific hyporesponsiveness in murine T lymphocytes. *Transplantation* **60**, 1539-1545 (1995).

441. Steinbrink, K., Graulich, E., Kubsch, S., Knop, J. & Enk, A. H. CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood* **99**, 2468-2476 (2002).
442. Groux, H. *et al.* A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* **389**, 737-742 (1997).
443. Bach, J. F. Non-Th2 regulatory T-cell control of Th1 autoimmunity. *Scand. J. Immunol.* **54**, 21-29 (2001).
444. Roncarolo, M. G., Bacchetta, R., Bordignon, C., Narula, S. & Levings, M. K. Type 1 T regulatory cells. *Immunol. Rev.* **182**, 68-79 (2001).
445. Mantel, P. Y. *et al.* GATA3-driven Th2 responses inhibit TGF-beta1-induced FOXP3 expression and the formation of regulatory T cells. *PLoS. Biol.* **5**, e329 (2007).
446. Kishimoto, T., Akira, S., Narazaki, M. & Taga, T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* **86**, 1243-1254 (1995).
447. Harrington, L. E. *et al.* Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* **6**, 1123-1132 (2005).
448. Park, H. *et al.* A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.* **6**, 1133-1141 (2005).
449. Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M. & Stockinger, B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity.* **24**, 179-189 (2006).
450. Grabstein, K. H. *et al.* Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science* **264**, 965-968 (1994).
451. Giri, J. G. *et al.* Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO J.* **13**, 2822-2830 (1994).
452. Kanegane, H. & Tosato, G. Activation of naive and memory T cells by interleukin-15. *Blood* **88**, 230-235 (1996).
453. Wilkinson, P. C. & Liew, F. Y. Chemoattraction of human blood T lymphocytes by interleukin-15. *J. Exp. Med.* **181**, 1255-1259 (1995).
454. Jonuleit, H. *et al.* Induction of IL-15 messenger RNA and protein in human blood-derived dendritic cells: a role for IL-15 in attraction of T cells. *J. Immunol.* **158**, 2610-2615 (1997).
455. Valencia, X. *et al.* TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood* **108**, 253-261 (2006).
456. Krummel, M. F. & Allison, J. P. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J. Exp. Med.* **182**, 459-465 (1995).
457. Krummel, M. F. & Allison, J. P. CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J. Exp. Med.* **183**, 2533-2540 (1996).
458. Leach, D. R., Krummel, M. F. & Allison, J. P. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* **271**, 1734-1736 (1996).
459. van, E. A., Hurwitz, A. A. & Allison, J. P. Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces

- rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. *J. Exp. Med.* **190**, 355-366 (1999).
460. Peng, G. *et al.* Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4+ regulatory T cell function. *Science* **309**, 1380-1384 (2005).
461. Crellin, N. K. *et al.* Human CD4+ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T regulatory cells. *J. Immunol.* **175**, 8051-8059 (2005).
462. Liu, H., Komai-Koma, M., Xu, D. & Liew, F. Y. Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 7048-7053 (2006).
463. Huang, C. T. *et al.* Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity.* **21**, 503-513 (2004).
464. Liang, B. *et al.* Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J. Immunol.* **180**, 5916-5926 (2008).
465. Watanabe, N. *et al.* BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nat. Immunol.* **4**, 670-679 (2003).
466. Sedy, J. R. *et al.* B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nat. Immunol.* **6**, 90-98 (2005).
467. Gavrieli, M., Sedy, J., Nelson, C. A. & Murphy, K. M. BTLA and HVEM cross talk regulates inhibition and costimulation. *Adv. Immunol.* **92**, 157-185 (2006).
468. Read, S., Malmstrom, V. & Powrie, F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* **192**, 295-302 (2000).
469. Takahashi, T. *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.* **192**, 303-310 (2000).
470. Salomon, B. *et al.* B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity.* **12**, 431-440 (2000).
471. Carreno, B. M. *et al.* CTLA-4 (CD152) can inhibit T cell activation by two different mechanisms depending on its level of cell surface expression. *J. Immunol.* **165**, 1352-1356 (2000).
472. Chai, J. G., Vendetti, S., Amofah, E., Dyson, J. & Lechler, R. CD152 ligation by CD80 on T cells is required for the induction of unresponsiveness by costimulation-deficient antigen presentation. *J. Immunol.* **165**, 3037-3042 (2000).
473. Schubert, L. A., Jeffery, E., Zhang, Y., Ramsdell, F. & Ziegler, S. F. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J. Biol. Chem.* **276**, 37672-37679 (2001).
474. Coffey, P. J. & Burgering, B. M. Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 889-899 (2004).
475. Gavin, M. A. *et al.* Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* **445**, 771-775 (2007).

476. Williams, L. M. & Rudensky, A. Y. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat. Immunol.* **8**, 277-284 (2007).
477. Dohlman, H. G., Apaniesk, D., Chen, Y., Song, J. & Nusskern, D. Inhibition of G-protein signaling by dominant gain-of-function mutations in Sst2p, a pheromone desensitization factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **15**, 3635-3643 (1995).
478. Druey, K. M., Blumer, K. J., Kang, V. H. & Kehrl, J. H. Inhibition of G-protein-mediated MAP kinase activation by a new mammalian gene family. *Nature* **379**, 742-746 (1996).
479. Koelle, M. R. & Horvitz, H. R. EGL-10 regulates G protein signaling in the *C. elegans* nervous system and shares a conserved domain with many mammalian proteins. *Cell* **84**, 115-125 (1996).
480. Agenes, F., Bosco, N., Mascarell, L., Fritah, S. & Ceredig, R. Differential expression of regulator of G-protein signalling transcripts and in vivo migration of CD4+ naive and regulatory T cells. *Immunology* **115**, 179-188 (2005).
481. Baker, R. K. *et al.* In vitro preselection of gene-trapped embryonic stem cell clones for characterizing novel developmentally regulated genes in the mouse. *Dev. Biol.* **185**, 201-214 (1997).
482. Metcalfe, S. M. & De S Muthukumarana PA Transplantation tolerance: gene expression profiles comparing allotolerance vs. allorejection. *Int. Immunopharmacol.* **5**, 33-39 (2005).
483. Metcalfe, S. M., Watson, T. J., Shurey, S., Adams, E. & Green, C. J. Leukemia inhibitory factor is linked to regulatory transplantation tolerance. *Transplantation* **79**, 726-730 (2005).
484. Jonuleit, H. *et al.* Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J. Exp. Med.* **196**, 255-260 (2002).
485. Sakaguchi, S. *et al.* Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol. Rev.* **212**, 8-27 (2006).
486. Okazaki, T. & Honjo, T. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends Immunol.* **27**, 195-201 (2006).
487. Sharpe, A. H., Wherry, E. J., Ahmed, R. & Freeman, G. J. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat. Immunol.* **8**, 239-245 (2007).
488. Keir, M. E., Francisco, L. M. & Sharpe, A. H. PD-1 and its ligands in T-cell immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 309-314 (2007).
489. Scott-Browne, J. P. *et al.* Expansion and function of Foxp3-expressing T regulatory cells during tuberculosis. *J. Exp. Med.* **204**, 2159-2169 (2007).
490. Sharma, M. D. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest* **117**, 2570-2582 (2007).
491. Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N. & Honjo, T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*. **11**, 141-151 (1999).

492. Chen, Y. *et al.* Expression of B7-H1 in inflammatory renal tubular epithelial cells. *Nephron Exp. Nephrol.* **102**, e81-e92 (2006).
493. Probst, H. C., McCoy, K., Okazaki, T., Honjo, T. & van den, B. M. Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4. *Nat. Immunol.* **6**, 280-286 (2005).
494. Ito, T. *et al.* Analysis of the role of negative T cell costimulatory pathways in CD4 and CD8 T cell-mediated alloimmune responses in vivo. *J. Immunol.* **174**, 6648-6656 (2005).
495. Sandner, S. E. *et al.* Role of the programmed death-1 pathway in regulation of alloimmune responses in vivo. *J. Immunol.* **174**, 3408-3415 (2005).
496. Raimondi, G., Shufesky, W. J., Tokita, D., Morelli, A. E. & Thomson, A. W. Regulated compartmentalization of programmed cell death-1 discriminates CD4+CD25+ resting regulatory T cells from activated T cells. *J. Immunol.* **176**, 2808-2816 (2006).
497. Franceschini, D. *et al.* PD-L1 negatively regulates CD4+CD25+Foxp3+ Tregs by limiting STAT-5 phosphorylation in patients chronically infected with HCV. *J. Clin. Invest* **119**, 551-564 (2009).
498. Kolodkin, A. L. *et al.* Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* **90**, 753-762 (1997).
499. Neufeld, G. *et al.* The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis. *Trends Cardiovasc. Med.* **12**, 13-19 (2002).
500. Khan, A. A., Bose, C., Yam, L. S., Soloski, M. J. & Rupp, F. Physiological regulation of the immunological synapse by agrin. *Science* **292**, 1681-1686 (2001).
501. Bruder, D. *et al.* Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* **34**, 623-630 (2004).
502. Cato, A. C. & Wade, E. Molecular mechanisms of anti-inflammatory action of glucocorticoids. *Bioessays* **18**, 371-378 (1996).
503. Varga, G. *et al.* Glucocorticoids induce an activated, anti-inflammatory monocyte subset in mice that resembles myeloid-derived suppressor cells. *J. Leukoc. Biol.* **84**, 644-650 (2008).
504. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C. A., Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394-397 (1997).
505. Takeda, K., Kaisho, T. & Akira, S. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 335-376 (2003).
506. Poltorak, A. *et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**, 2085-2088 (1998).
507. Takeuchi, O. *et al.* Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity.* **11**, 443-451 (1999).
508. Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. & Flavell, R. A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732-738 (2001).
509. Lund, J. M. *et al.* Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 5598-5603 (2004).
510. Hemmi, H. *et al.* A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740-745 (2000).
511. Akira, S. Toll-like receptor signaling. *J. Biol. Chem.* **278**, 38105-38108 (2003).

512. Kopp, E. & Medzhitov, R. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **15**, 396-401 (2003).
513. Takeda, K. & Akira, S. TLR signaling pathways. *Semin. Immunol.* **16**, 3-9 (2004).
514. Hayden, M. S. & Ghosh, S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* **18**, 2195-2224 (2004).
515. Hofer, S. *et al.* Differential activation of NF-kappa B subunits in dendritic cells in response to Gram-negative bacteria and to lipopolysaccharide. *Microbes. Infect.* **3**, 259-265 (2001).
516. Egen, J. G., Kuhns, M. S. & Allison, J. P. CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. *Nat. Immunol.* **3**, 611-618 (2002).
517. Sharpe, A. H. & Abbas, A. K. T-cell costimulation--biology, therapeutic potential, and challenges. *N. Engl. J. Med.* **355**, 973-975 (2006).
518. Caux, C. *et al.* Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J. Exp. Med.* **180**, 1263-1272 (1994).
519. Koch, F. *et al.* High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J. Exp. Med.* **184**, 741-746 (1996).
520. Shuford, W. W. *et al.* 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses. *J. Exp. Med.* **186**, 47-55 (1997).
521. Cooper, D., Bansal-Pakala, P. & Croft, M. 4-1BB (CD137) controls the clonal expansion and survival of CD8 T cells in vivo but does not contribute to the development of cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* **32**, 521-529 (2002).
522. Maus, M. V. *et al.* Ex vivo expansion of polyclonal and antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by artificial APCs expressing ligands for the T-cell receptor, CD28 and 4-1BB. *Nat. Biotechnol.* **20**, 143-148 (2002).
523. Baum, P. R. *et al.* Molecular characterization of murine and human OX40/OX40 ligand systems: identification of a human OX40 ligand as the HTLV-1-regulated protein gp34. *EMBO J.* **13**, 3992-4001 (1994).
524. Godfrey, W. R., Fagnoni, F. F., Harara, M. A., Buck, D. & Engleman, E. G. Identification of a human OX-40 ligand, a costimulator of CD4+ T cells with homology to tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* **180**, 757-762 (1994).
525. Engel, P., Eck, M. J. & Terhorst, C. The SAP and SLAM families in immune responses and X-linked lymphoproliferative disease. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 813-821 (2003).
526. Veillette, A. & Latour, S. The SLAM family of immune-cell receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **15**, 277-285 (2003).
527. Wang, N. *et al.* The cell surface receptor SLAM controls T cell and macrophage functions. *J. Exp. Med.* **199**, 1255-1264 (2004).
528. Polacino, P. S., Pinchuk, L. M., Sidorenko, S. P. & Clark, E. A. Immunodeficiency virus cDNA synthesis in resting T lymphocytes is regulated by T cell activation signals and dendritic cells. *J. Med. Primatol.* **25**, 201-209 (1996).
529. Kruse, M. *et al.* Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on mature CD83+ dendritic cells and is up-regulated by IL-1 beta. *J. Immunol.* **167**, 1989-1995 (2001).



530. Bleharski, J. R., Niazi, K. R., Sieling, P. A., Cheng, G. & Modlin, R. L. Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on CD40 ligand-activated dendritic cells and directly augments production of inflammatory cytokines. *J. Immunol.* **167**, 3174-3181 (2001).
531. Rethi, B. *et al.* SLAMF8/SLAMF8 interactions inhibit CD40-induced production of inflammatory cytokines in monocyte-derived dendritic cells. *Blood* **107**, 2821-2829 (2006).
532. Kwon, B. S. *et al.* A newly identified member of the tumor necrosis factor receptor superfamily with a wide tissue distribution and involvement in lymphocyte activation. *J. Biol. Chem.* **272**, 14272-14276 (1997).
533. Harrop, J. A. *et al.* Antibodies to TR2 (herpesvirus entry mediator), a new member of the TNF receptor superfamily, block T cell proliferation, expression of activation markers, and production of cytokines. *J. Immunol.* **161**, 1786-1794 (1998).
534. Tamada, K. *et al.* LIGHT, a TNF-like molecule, costimulates T cell proliferation and is required for dendritic cell-mediated allogeneic T cell response. *J. Immunol.* **164**, 4105-4110 (2000).
535. Tamada, K. *et al.* Cutting edge: selective impairment of CD8+ T cell function in mice lacking the TNF superfamily member LIGHT. *J. Immunol.* **168**, 4832-4835 (2002).
536. Latchman, Y. *et al.* PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat. Immunol.* **2**, 261-268 (2001).
537. Dong, H., Zhu, G., Tamada, K. & Chen, L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat. Med.* **5**, 1365-1369 (1999).
538. Loke, P. & Allison, J. P. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 5336-5341 (2003).
539. Keir, M. E. *et al.* Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J. Exp. Med.* **203**, 883-895 (2006).
540. Zhang, Y. *et al.* Regulation of T cell activation and tolerance by PDL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 11695-11700 (2006).
541. Martin-Orozco, N., Wang, Y. H., Yagita, H. & Dong, C. Cutting Edge: Programmed death (PD) ligand-1/PD-1 interaction is required for CD8+ T cell tolerance to tissue antigens. *J. Immunol.* **177**, 8291-8295 (2006).
542. Trinchieri, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 133-146 (2003).
543. Manetti, R. *et al.* Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J. Exp. Med.* **177**, 1199-1204 (1993).
544. Uhlig, H. H. *et al.* Differential activity of IL-12 and IL-23 in mucosal and systemic innate immune pathology. *Immunity.* **25**, 309-318 (2006).
545. Pfeffer, K. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* **14**, 185-191 (2003).
546. Bazzoni, F. & Beutler, B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N. Engl. J. Med.* **334**, 1717-1725 (1996).

547. Dinarello, C. A. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int. Rev. Immunol.* **16**, 457-499 (1998).
548. Wesa, A. & Galy, A. Increased production of pro-inflammatory cytokines and enhanced T cell responses after activation of human dendritic cells with IL-1 and CD40 ligand. *BMC. Immunol.* **3**, 14 (2002).
549. Kehrl, J. H. *et al.* Transforming growth factor beta is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. *J. Immunol.* **137**, 3855-3860 (1986).
550. Kehrl, J. H. *et al.* Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J. Exp. Med.* **163**, 1037-1050 (1986).
551. Espevik, T. *et al.* Inhibition of cytokine production by cyclosporin A and transforming growth factor beta. *J. Exp. Med.* **166**, 571-576 (1987).
552. Chantry, D., Turner, M., Abney, E. & Feldmann, M. Modulation of cytokine production by transforming growth factor-beta. *J. Immunol.* **142**, 4295-4300 (1989).
553. de Waal, M. R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C. G. & de Vries, J. E. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.* **174**, 1209-1220 (1991).
554. Ralph, P. *et al.* IL-10, T lymphocyte inhibitor of human blood cell production of IL-1 and tumor necrosis factor. *J. Immunol.* **148**, 808-814 (1992).
555. Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Mosmann, T. R., Howard, M. & O'Garra, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J. Immunol.* **147**, 3815-3822 (1991).
556. D'Andrea, A. *et al.* Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J. Exp. Med.* **178**, 1041-1048 (1993).
557. de Waal, M. R. *et al.* Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J. Exp. Med.* **174**, 915-924 (1991).
558. Moore, K. W., O'Garra, A., de Waal, M. R., Vieira, P. & Mosmann, T. R. Interleukin-10. *Annu. Rev. Immunol.* **11**, 165-190 (1993).
559. Schandene, L. *et al.* B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10. *J. Immunol.* **152**, 4368-4374 (1994).
560. Zuckerman, L. A., Pullen, L. & Miller, J. Functional consequences of costimulation by ICAM-1 on IL-2 gene expression and T cell activation. *J. Immunol.* **160**, 3259-3268 (1998).
561. Sozzani, S. *et al.* Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J. Immunol.* **161**, 1083-1086 (1998).
562. Forster, R. *et al.* CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* **99**, 23-33 (1999).
563. Ohl, L. *et al.* CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. *Immunity.* **21**, 279-288 (2004).
564. Tenhunen, R., Marver, H. S. & Schmid, R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **61**, 748-755 (1968).

565. Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A. F., Glazer, A. N. & Ames, B. N. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* **235**, 1043-1046 (1987).
566. Sarady-Andrews, J. K. *et al.* Biliverdin administration protects against endotoxin-induced acute lung injury in rats. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* **289**, L1131-L1137 (2005).
567. Sarady, J. K., Otterbein, S. L., Liu, F., Otterbein, L. E. & Choi, A. M. Carbon monoxide modulates endotoxin-induced production of granulocyte macrophage colony-stimulating factor in macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **27**, 739-745 (2002).
568. Otterbein, L. E. *et al.* Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat. Med.* **6**, 422-428 (2000).
569. Fallarino, F. *et al.* Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **4**, 1206-1212 (2003).
570. Mellor, A. L. & Munn, D. H. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 762-774 (2004).
571. Flower, R. J. Eleventh Gaddum memorial lecture. Lipocortin and the mechanism of action of the glucocorticoids. *Br. J. Pharmacol.* **94**, 987-1015 (1988).
572. Perretti, M., Ahluwalia, A., Harris, J. G., Goulding, N. J. & Flower, R. J. Lipocortin-1 fragments inhibit neutrophil accumulation and neutrophil-dependent edema in the mouse. A qualitative comparison with an anti-CD11b monoclonal antibody. *J. Immunol.* **151**, 4306-4314 (1993).
573. Lim, L. H., Solito, E., Russo-Marie, F., Flower, R. J. & Perretti, M. Promoting detachment of neutrophils adherent to murine postcapillary venules to control inflammation: effect of lipocortin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 14535-14539 (1998).
574. Calandra, T. *et al.* MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature* **377**, 68-71 (1995).
575. Leech, M. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: evidence of proinflammatory function and regulation by glucocorticoids. *Arthritis Rheum.* **42**, 1601-1608 (1999).
576. Calandra, T. & Roger, T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 791-800 (2003).
577. Yasukawa, H., Sasaki, A. & Yoshimura, A. Negative regulation of cytokine signaling pathways. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 143-164 (2000).
578. Alexander, W. S. Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 410-416 (2002).
579. Ayroldi, E. *et al.* GILZ mediates the antiproliferative activity of glucocorticoids by negative regulation of Ras signaling. *J. Clin. Invest* **117**, 1605-1615 (2007).
580. Ayroldi, E. *et al.* Glucocorticoid-induced leucine zipper inhibits the Raf-extracellular signal-regulated kinase pathway by binding to Raf-1. *Mol. Cell Biol.* **22**, 7929-7941 (2002).
581. Chen, P. *et al.* Restraint of proinflammatory cytokine biosynthesis by mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J. Immunol.* **169**, 6408-6416 (2002).

582. Shepherd, E. G. *et al.* The function of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in peptidoglycan-stimulated macrophages. *J. Biol. Chem.* **279**, 54023-54031 (2004).
583. He, Y., Zhang, J., Mi, Z., Robbins, P. & Faló, L. D., Jr. Immunization with lentiviral vector-transduced dendritic cells induces strong and long-lasting T cell responses and therapeutic immunity. *J. Immunol.* **174**, 3808-3817 (2005).
584. Gallucci, S., Lolkema, M. & Matzinger, P. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat. Med.* **5**, 1249-1255 (1999).
585. Haas, D. L., Case, S. S., Crooks, G. M. & Kohn, D. B. Critical factors influencing stable transduction of human CD34(+) cells with HIV-1-derived lentiviral vectors. *Mol. Ther.* **2**, 71-80 (2000).
586. Dullaers, M. *et al.* Side-by-side comparison of lentivirally transduced and mRNA-electroporated dendritic cells: implications for cancer immunotherapy protocols. *Mol. Ther.* **10**, 768-779 (2004).
587. Manganini, M. *et al.* A human immunodeficiency virus type 1 pol gene-derived sequence (cPPT/CTS) increases the efficiency of transduction of human nondividing monocytes and T lymphocytes by lentiviral vectors. *Hum. Gene Ther.* **13**, 1793-1807 (2002).
588. Neel, B. G. & Tonks, N. K. Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 193-204 (1997).
589. Zhang, J., Somani, A. K. & Siminovitch, K. A. Roles of the SHP-1 tyrosine phosphatase in the negative regulation of cell signalling. *Semin. Immunol.* **12**, 361-378 (2000).
590. Chtanova, T. *et al.* T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells. *J. Immunol.* **173**, 68-78 (2004).
591. Dhordain, P. *et al.* Corepressor SMRT binds the BTB/POZ repressing domain of the LAZ3/BCL6 oncoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 10762-10767 (1997).
592. Reljic, R., Wagner, S. D., Peakman, L. J. & Fearon, D. T. Suppression of signal transducer and activator of transcription 3-dependent B lymphocyte terminal differentiation by BCL-6. *J. Exp. Med.* **192**, 1841-1848 (2000).
593. Li, Z. *et al.* BCL-6 negatively regulates expression of the NF-kappaB1 p105/p50 subunit. *J. Immunol.* **174**, 205-214 (2005).
594. Vinuesa, C. G., Tangye, S. G., Moser, B. & Mackay, C. R. Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 853-865 (2005).
595. Taga, T. & Kishimoto, T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 797-819 (1997).
596. Szabo, S. J. *et al.* A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* **100**, 655-669 (2000).
597. Szabo, S. J. *et al.* Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science* **295**, 338-342 (2002).
598. Szabo, S. J., Sullivan, B. M., Peng, S. L. & Glimcher, L. H. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 713-758 (2003).

599. Zheng, W. & Flavell, R. A. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* **89**, 587-596 (1997).
600. Fort, M. M. *et al.* IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity*. **15**, 985-995 (2001).
601. Ivanov, I. I. *et al.* The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* **126**, 1121-1133 (2006).
602. Wan, Y. Y. & Flavell, R. A. Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 5126-5131 (2005).
603. Roncarolo, M. G. *et al.* Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol. Rev.* **212**, 28-50 (2006).
604. Weiner, H. L. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol. Rev.* **182**, 207-214 (2001).
605. Oshima, K. *et al.* Localized interleukin-10 gene transfer induces apoptosis of alloreactive T cells via FAS/FASL pathway, improves function, and prolongs survival of cardiac allograft. *Transplantation* **73**, 1019-1026 (2002).
606. Leonard, W. J. & Spolski, R. Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 688-698 (2005).
607. Barker, B. R. *et al.* IL-21 induces apoptosis of antigen-specific CD8+ T lymphocytes. *J. Immunol.* **179**, 3596-3603 (2007).
608. Reed, J. C. Bcl-2 family proteins: strategies for overcoming chemoresistance in cancer. *Adv. Pharmacol.* **41**, 501-532 (1997).
609. Reed, J. C., Jurgensmeier, J. M. & Matsuyama, S. Bcl-2 family proteins and mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1366**, 127-137 (1998).
610. Korsmeyer, S. J. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res.* **59**, 1693s-1700s (1999).
611. Enk, A. H., Angeloni, V. L., Udey, M. C. & Katz, S. I. Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10. A role for IL-10 in induction of tolerance. *J. Immunol.* **151**, 2390-2398 (1993).
612. Liu, Y. J. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* **106**, 259-262 (2001).
613. Morelli, A. E. & Thomson, A. W. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 610-621 (2007).
614. Reis e Sousa Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **16**, 21-25 (2004).
615. Thomson, A. W., Turnquist, H. R., Zahorchak, A. F. & Raimondi, G. Tolerogenic dendritic cell-regulatory T-cell interaction and the promotion of transplant tolerance. *Transplantation* **87**, S86-S90 (2009).
616. Simon, J. C., Tigelaar, R. E., Bergstresser, P. R., Edelbaum, D. & Cruz, P. D., Jr. Ultraviolet B radiation converts Langerhans cells from immunogenic to tolerogenic antigen-presenting cells. Induction of specific clonal anergy in CD4+ T helper 1 cells. *J. Immunol.* **146**, 485-491 (1991).

617. Kusmartsev, S. & Gabrilovich, D. I. Effect of tumor-derived cytokines and growth factors on differentiation and immune suppressive features of myeloid cells in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **25**, 323-331 (2006).
618. Gabrilovich, D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 941-952 (2004).
619. Rabinovich, G. A., Gabrilovich, D. & Sotomayor, E. M. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 267-296 (2007).
620. Kusmartsev, S. & Gabrilovich, D. I. Immature myeloid cells and cancer-associated immune suppression. *Cancer Immunol. Immunother.* **51**, 293-298 (2002).
621. Figdor, C. G., de, V., I, Lesterhuis, W. J. & Melief, C. J. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat. Med.* **10**, 475-480 (2004).
622. Woltman, A. M. *et al.* The effect of calcineurin inhibitors and corticosteroids on the differentiation of human dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **30**, 1807-1812 (2000).
623. Vieira, P. L., Kalinski, P., Wierenga, E. A., Kapsenberg, M. L. & de Jong, E. C. 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 (1998).
624. Xia, C. Q., Peng, R., Beato, F. & Clare-Salzler, M. J. Dexamethasone induces IL-10-producing monocyte-derived dendritic cells with durable immaturity. *Scand. J. Immunol.* **62**, 45-54 (2005).
625. Mirenda, V. *et al.* Modified dendritic cells coexpressing self and allogeneic major histocompatibility complex molecules: an efficient way to induce indirect pathway regulation. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 987-997 (2004).
626. Fazekasova, H. *et al.* Regulation of rat and human T-cell immune response by pharmacologically modified dendritic cells. *Transplantation* **87**, 1617-1628 (2009).
627. Roelen, D. L. *et al.* Prolongation of skin graft survival by modulation of the alloimmune response with alternatively activated dendritic cells. *Transplantation* **76**, 1608-1615 (2003).
628. Yamazaki, S. *et al.* Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J. Exp. Med.* **198**, 235-247 (2003).
629. Schwartz, R. H. Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism? *J. Exp. Med.* **184**, 1-8 (1996).
630. Jenkins, M. K. & Schwartz, R. H. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* **165**, 302-319 (1987).
631. Steinman, R. M., Turley, S., Mellman, I. & Inaba, K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J. Exp. Med.* **191**, 411-416 (2000).
632. Hawiger, D. *et al.* Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J. Exp. Med.* **194**, 769-779 (2001).
633. Fu, F. *et al.* Costimulatory molecule-deficient dendritic cell progenitors (MHC class II+, CD80dim, CD86-) prolong cardiac allograft survival in nonimmunosuppressed recipients. *Transplantation* **62**, 659-665 (1996).

634. Lutz, M. B. *et al.* Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo. *Eur. J. Immunol.* **30**, 1813-1822 (2000).
635. Dhodapkar, M. V., Steinman, R. M., Krasovsky, J., Munz, C. & Bhardwaj, N. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J. Exp. Med.* **193**, 233-238 (2001).
636. Levings, M. K. *et al.* Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. *Blood* **105**, 1162-1169 (2005).
637. Cools, N. *et al.* Immunosuppression induced by immature dendritic cells is mediated by TGF-beta/IL-10 double-positive CD4+ regulatory T cells. *J. Cell Mol. Med.* **12**, 690-700 (2008).
638. Annacker, O. *et al.* CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J. Immunol.* **166**, 3008-3018 (2001).
639. Satoguina, J. S., Weyand, E., Larbi, J. & Hoerauf, A. T regulatory-1 cells induce IgG4 production by B cells: role of IL-10. *J. Immunol.* **174**, 4718-4726 (2005).
640. Levings, M. K., Bacchetta, R., Schulz, U. & Roncarolo, M. G. The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **129**, 263-276 (2002).
641. Uhlig, H. H. *et al.* Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis. *J. Immunol.* **177**, 5852-5860 (2006).
642. Cottrez, F., Hurst, S. D., Coffman, R. L. & Groux, H. T regulatory cells 1 inhibit a Th2-specific response in vivo. *J. Immunol.* **165**, 4848-4853 (2000).
643. Wildbaum, G., Netzer, N. & Karin, N. Tr1 cell-dependent active tolerance blunts the pathogenic effects of determinant spreading. *J. Clin. Invest* **110**, 701-710 (2002).
644. Bacchetta, R. *et al.* High levels of interleukin 10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* **179**, 493-502 (1994).
645. Akasaki, Y. *et al.* Induction of a CD4+ T regulatory type 1 response by cyclooxygenase-2-overexpressing glioma. *J. Immunol.* **173**, 4352-4359 (2004).
646. Bergmann, C., Strauss, L., Zeidler, R., Lang, S. & Whiteside, T. L. Expansion of human T regulatory type 1 cells in the microenvironment of cyclooxygenase 2 overexpressing head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* **67**, 8865-8873 (2007).
647. Rouse, B. T. & Suvas, S. Regulatory T cells and immunity to pathogens. *Expert. Opin. Biol. Ther.* **7**, 1301-1309 (2007).
648. Oderda, G. *et al.* Increased interleukin-10 in Helicobacter pylori infection could be involved in the mechanism protecting from allergy. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **45**, 301-305 (2007).
649. Chen, Y., Kuchroo, V. K., Inobe, J., Hafler, D. A. & Weiner, H. L. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* **265**, 1237-1240 (1994).

650. Carrier, Y., Yuan, J., Kuchroo, V. K. & Weiner, H. L. Th3 cells in peripheral tolerance. II. TGF-beta-transgenic Th3 cells rescue IL-2-deficient mice from autoimmunity. *J. Immunol.* **178**, 172-178 (2007).
651. Carrier, Y., Yuan, J., Kuchroo, V. K. & Weiner, H. L. Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice. *J. Immunol.* **178**, 179-185 (2007).
652. Inobe, J. *et al.* IL-4 is a differentiation factor for transforming growth factor-beta secreting Th3 cells and oral administration of IL-4 enhances oral tolerance in experimental allergic encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* **28**, 2780-2790 (1998).
653. Seddon, B. & Mason, D. Regulatory T cells in the control of autoimmunity: the essential role of transforming growth factor beta and interleukin 4 in the prevention of autoimmune thyroiditis in rats by peripheral CD4(+)CD. *J. Exp. Med.* **189**, 279-288 (1999).
654. Josien, R. *et al.* A critical role for transforming growth factor-beta in donor transfusion-induced allograft tolerance. *J. Clin. Invest* **102**, 1920-1926 (1998).
655. Doetze, A. *et al.* Antigen-specific cellular hyporesponsiveness in a chronic human helminth infection is mediated by T(h)3/T(r)1-type cytokines IL-10 and transforming growth factor-beta but not by a T(h)1 to T(h)2 shift. *Int. Immunol.* **12**, 623-630 (2000).
656. Horwitz, D. A. *et al.* Regulatory T cells generated ex vivo as an approach for the therapy of autoimmune disease. *Semin. Immunol.* **16**, 135-143 (2004).
657. Fantini, M. C. *et al.* Transforming growth factor beta induced FoxP3+ regulatory T cells suppress Th1 mediated experimental colitis. *Gut* **55**, 671-680 (2006).
658. Ochando, J. C. *et al.* Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat. Immunol.* **7**, 652-662 (2006).
659. Chen, W. *et al.* Conversion of peripheral CD4+. *J. Exp. Med.* **198**, 1875-1886 (2003).
660. Kim, J. M. & Rudensky, A. The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells. *Immunol. Rev.* **212**, 86-98 (2006).
661. Benson, M. J., Pino-Lagos, K., Roseblatt, M. & Noelle, R. J. All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J. Exp. Med.* **204**, 1765-1774 (2007).
662. Zheng, S. G. *et al.* TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4+CD25+ regulatory cells. *J. Immunol.* **176**, 3321-3329 (2006).
663. Cobbold, S. P. *et al.* Induction of foxP3+ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants. *J. Immunol.* **172**, 6003-6010 (2004).
664. Karim, M., Kingsley, C. I., Bushell, A. R., Sawitzki, B. S. & Wood, K. J. Alloantigen-induced CD25+CD4+ regulatory T cells can develop in vivo from CD25-CD4+ precursors in a thymus-independent process. *J. Immunol.* **172**, 923-928 (2004).
665. Apostolou, I. & von, B. H. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J. Exp. Med.* **199**, 1401-1408 (2004).
666. Kretschmer, K. *et al.* Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat. Immunol.* **6**, 1219-1227 (2005).
667. Liang, S. *et al.* Conversion of CD4+. *J. Exp. Med.* **201**, 127-137 (2005).



668. Gershon, R. K. & Kondo, K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* **18**, 723-737 (1970).
669. Noble, A., Zhao, Z. S. & Cantor, H. Suppression of immune responses by CD8 cells. II. Qa-1 on activated B cells stimulates CD8 cell suppression of T helper 2 responses. *J. Immunol.* **160**, 566-571 (1998).
670. Holmes, B. J., MacAry, P. A., Noble, A. & Kemeny, D. M. Antigen-specific CD8+ T cells inhibit IgE responses and interleukin-4 production by CD4+ T cells. *Eur. J. Immunol.* **27**, 2657-2665 (1997).
671. Jiang, H., Zhang, S. I. & Pernis, B. Role of CD8+ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis. *Science* **256**, 1213-1215 (1992).
672. Florquin, S., Amraoui, Z., Abramowicz, D. & Goldman, M. Systemic release and protective role of IL-10 in staphylococcal enterotoxin B-induced shock in mice. *J. Immunol.* **153**, 2618-2623 (1994).
673. Sun, D., Qin, Y., Chluba, J., Epplen, J. T. & Wekerle, H. Suppression of experimentally induced autoimmune encephalomyelitis by cytolytic T-T cell interactions. *Nature* **332**, 843-845 (1988).
674. Zhang, J., Medaer, R., Stinissen, P., Hafler, D. & Raus, J. MHC-restricted depletion of human myelin basic protein-reactive T cells by T cell vaccination. *Science* **261**, 1451-1454 (1993).
675. Chan, S. Y., DeBruyne, L. A., Goodman, R. E., Eichwald, E. J. & Bishop, D. K. In vivo depletion of CD8+ T cells results in Th2 cytokine production and alternate mechanisms of allograft rejection. *Transplantation* **59**, 1155-1161 (1995).
676. Srikiatkachorn, A. & Braciale, T. J. Virus-specific CD8+ T lymphocytes downregulate T helper cell type 2 cytokine secretion and pulmonary eosinophilia during experimental murine respiratory syncytial virus infection. *J. Exp. Med.* **186**, 421-432 (1997).
677. Smith, T. R. & Kumar, V. Revival of CD8+ Treg-mediated suppression. *Trends Immunol.* **29**, 337-342 (2008).
678. Salgame, P. *et al.* Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science* **254**, 279-282 (1991).
679. Miller, A., Lider, O., Roberts, A. B., Sporn, M. B. & Weiner, H. L. Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 421-425 (1992).
680. Inoue, T. *et al.* Distinction of mouse CD8+ suppressor effector T cell clones from cytotoxic T cell clones by cytokine production and CD45 isoforms. *J. Immunol.* **150**, 2121-2128 (1993).
681. Walunas, T. L. *et al.* CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* **1**, 405-413 (1994).
682. Zheng, S. G., Gray, J. D., Ohtsuka, K., Yamagiwa, S. & Horwitz, D. A. Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4+CD25- precursors. *J. Immunol.* **169**, 4183-4189 (2002).

683. Dubois, P. M., Pihlgren, M., Tomkowiak, M., Van, M. M. & Marvel, J. Tolerant CD8 T cells induced by multiple injections of peptide antigen show impaired TCR signaling and altered proliferative responses in vitro and in vivo. *J. Immunol.* **161**, 5260-5267 (1998).
684. Blish, C. A., Dillon, S. R., Farr, A. G. & Fink, P. J. Anergic CD8+ T cells can persist and function in vivo. *J. Immunol.* **163**, 155-164 (1999).
685. Manavalan, J. S. *et al.* Alloantigen specific CD8+. *Int. Immunol.* **16**, 1055-1068 (2004).
686. Biennu, B. *et al.* Peripheral CD8+CD25+ T lymphocytes from MHC class II-deficient mice exhibit regulatory activity. *J. Immunol.* **175**, 246-253 (2005).
687. Xystrakis, E. *et al.* Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation. *Blood* **104**, 3294-3301 (2004).
688. Mertens, J. *et al.* Streptococcus pneumoniae serotype 1 capsular polysaccharide induces CD8CD28 regulatory T lymphocytes by TCR crosslinking. *PLoS. Pathog.* **5**, e1000596 (2009).
689. De, B. K., Vanden, B. W. & Haegeman, G. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr. Rev.* **24**, 488-522 (2003).
690. Scheinman, R. I., Cogswell, P. C., Lofquist, A. K. & Baldwin, A. S., Jr. Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* **270**, 283-286 (1995).
691. Auphan, N., DiDonato, J. A., Rosette, C., Helmborg, A. & Karin, M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* **270**, 286-290 (1995).
692. Thiele, K. *et al.* Cell specific effects of glucocorticoid treatment on the NF-kappaBp65/IkappaBalpha system in patients with Crohn's disease. *Gut* **45**, 693-704 (1999).
693. Mukaida, N. *et al.* Novel mechanism of glucocorticoid-mediated gene repression. Nuclear factor-kappa B is target for glucocorticoid-mediated interleukin 8 gene repression. *J. Biol. Chem.* **269**, 13289-13295 (1994).
694. Newton, R. *et al.* Effect of dexamethasone on interleukin-1beta-(IL-1beta)-induced nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) and kappaB-dependent transcription in epithelial cells. *Eur. J. Biochem.* **254**, 81-89 (1998).
695. McKay, L. I. & Cidlowski, J. A. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr. Rev.* **20**, 435-459 (1999).
696. De, B. K. *et al.* Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor-kappaB-dependent transcription involves direct interference with transactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 13504-13509 (1997).
697. Nissen, R. M. & Yamamoto, K. R. The glucocorticoid receptor inhibits NFkappaB by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev.* **14**, 2314-2329 (2000).
698. Schule, R. *et al.* Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell* **62**, 1217-1226 (1990).

699. Xing, N. *et al.* Distinctive dendritic cell modulation by vitamin D(3) and glucocorticoid pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **297**, 645-652 (2002).
700. Rozkova, D., Horvath, R., Bartunkova, J. & Spisek, R. Glucocorticoids severely impair differentiation and antigen presenting function of dendritic cells despite upregulation of Toll-like receptors. *Clin. Immunol.* **120**, 260-271 (2006).
701. Matyszak, M. K., Citterio, S., Rescigno, M. & Ricciardi-Castagnoli, P. Differential effects of corticosteroids during different stages of dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* **30**, 1233-1242 (2000).
702. Yanagihara, S., Komura, E., Nagafune, J., Watarai, H. & Yamaguchi, Y. EBI1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation. *J. Immunol.* **161**, 3096-3102 (1998).
703. Vizzardelli, C. *et al.* Effects of dexamethazone on LPS-induced activation and migration of mouse dendritic cells revealed by a genome-wide transcriptional analysis. *Eur. J. Immunol.* **36**, 1504-1515 (2006).
704. Woltman, A. M., van der Kooij, S. W., de Fijter, J. W. & Van, K. C. Maturation-resistant dendritic cells induce hyporesponsiveness in alloreactive CD45RA+ and CD45RO+ T-cell populations. *Am. J. Transplant.* **6**, 2580-2591 (2006).
705. Almawi, W. Y., Beyhum, H. N., Rahme, A. A. & Rieder, M. J. Regulation of cytokine and cytokine receptor expression by glucocorticoids. *J. Leukoc. Biol.* **60**, 563-572 (1996).
706. Heufler, C., Koch, F. & Schuler, G. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 1 mediate the maturation of murine epidermal Langerhans cells into potent immunostimulatory dendritic cells. *J. Exp. Med.* **167**, 700-705 (1988).
707. Dana, M. R., Dai, R., Zhu, S., Yamada, J. & Streilein, J. W. Interleukin-1 receptor antagonist suppresses Langerhans cell activity and promotes ocular immune privilege. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **39**, 70-77 (1998).
708. McKean, D. J. *et al.* The role of IL 1 in the antigen-specific activation of murine class II-restricted T lymphocyte clones. *J. Immunol.* **135**, 3205-3216 (1985).
709. Shibuya, K. *et al.* IL-1 alpha and TNF-alpha are required for IL-12-induced development of Th1 cells producing high levels of IFN-gamma in BALB/c but not C57BL/6 mice. *J. Immunol.* **160**, 1708-1716 (1998).
710. Furst, D. E. Anakinra: review of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of rheumatoid arthritis. *Clin. Ther.* **26**, 1960-1975 (2004).
711. Keane-Myers, A. M. *et al.* Prevention of allergic eye disease by treatment with IL-1 receptor antagonist. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**, 3041-3046 (1999).
712. Sandberg, J. O., Eizirik, D. L., Sandler, S., Tracey, D. E. & Andersson, A. Treatment with an interleukin-1 receptor antagonist protein prolongs mouse islet allograft survival. *Diabetes* **42**, 1845-1851 (1993).
713. Chamorro, S. *et al.* TLR triggering on tolerogenic dendritic cells results in TLR2 up-regulation and a reduced proinflammatory immune program. *J. Immunol.* **183**, 2984-2994 (2009).

714. Chauveau, C. *et al.* Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood* **106**, 1694-1702 (2005).
715. Samsom, J. N. *et al.* Fc gamma RIIB regulates nasal and oral tolerance: a role for dendritic cells. *J. Immunol.* **174**, 5279-5287 (2005).
716. Lasa, M., Abraham, S. M., Boucheron, C., Saklatvala, J. & Clark, A. R. Dexamethasone causes sustained expression of mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase 1 and phosphatase-mediated inhibition of MAPK p38. *Mol. Cell Biol.* **22**, 7802-7811 (2002).
717. Cohen, N. *et al.* GILZ expression in human dendritic cells redirects their maturation and prevents antigen-specific T lymphocyte response. *Blood* **107**, 2037-2044 (2006).
718. Hamdi, H. *et al.* Induction of antigen-specific regulatory T lymphocytes by human dendritic cells expressing the glucocorticoid-induced leucine zipper. *Blood* **110**, 211-219 (2007).
719. Ayroldi, E. *et al.* Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor via inhibition of nuclear factor kappaB. *Blood* **98**, 743-753 (2001).
720. Mittelstadt, P. R. & Ashwell, J. D. Inhibition of AP-1 by the glucocorticoid-inducible protein GILZ. *J. Biol. Chem.* **276**, 29603-29610 (2001).
721. Janmey, P. A. & McCulloch, C. A. Cell mechanics: integrating cell responses to mechanical stimuli. *Annu. Rev. Biomed. Eng* **9**, 1-34 (2007).
722. Fresnay, S. *et al.* Polybrene and interleukin-4: two opposing factors for retroviral transduction of bone-marrow-derived dendritic cells. *J. Gene Med.* **4**, 601-612 (2002).
723. Feili-Hariri, M., Falkner, D. H. & Morel, P. A. Polarization of naive T cells into Th1 or Th2 by distinct cytokine-driven murine dendritic cell populations: implications for immunotherapy. *J. Leukoc. Biol.* **78**, 656-664 (2005).
724. Maroof, A. *et al.* Interleukin-4 can induce interleukin-4 production in dendritic cells. *Immunology* **117**, 271-279 (2006).
725. Shearwin, K. E., Callen, B. P. & Egan, J. B. Transcriptional interference--a crash course. *Trends Genet.* **21**, 339-345 (2005).
726. Morita, A. *et al.* Development of a Langerhans cell-targeted gene therapy format using a dendritic cell-specific promoter. *Gene Ther.* **8**, 1729-1737 (2001).
727. Sambucetti, L. C., Cherrington, J. M., Wilkinson, G. W. & Mocarski, E. S. NF-kappa B activation of the cytomegalovirus enhancer is mediated by a viral transactivator and by T cell stimulation. *EMBO J.* **8**, 4251-4258 (1989).
728. Schwartz, R. H. Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* **71**, 1065-1068 (1992).
729. Mueller, D. L., Jenkins, M. K. & Schwartz, R. H. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu. Rev. Immunol.* **7**, 445-480 (1989).
730. Schwartz, R. H. T cell anergy. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 305-334 (2003).
731. Janeway, C. A., Jr. & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 197-216 (2002).
732. Shahinian, A. *et al.* Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* **261**, 609-612 (1993).

733. Borriello, F. *et al.* B7-1 and B7-2 have overlapping, critical roles in immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity*. **6**, 303-313 (1997).
734. Suresh, M. *et al.* Role of CD28-B7 interactions in generation and maintenance of CD8 T cell memory. *J. Immunol.* **167**, 5565-5573 (2001).
735. Chambers, C. A. & Allison, J. P. CTLA-4--the costimulatory molecule that doesn't: regulation of T-cell responses by inhibition. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **64**, 303-312 (1999).
736. Ito, C. Y., Kazantsev, A. G. & Baldwin, A. S., Jr. Three NF-kappa B sites in the I kappa B-alpha promoter are required for induction of gene expression by TNF alpha. *Nucleic Acids Res.* **22**, 3787-3792 (1994).
737. Kuipers, H. *et al.* Contribution of the PD-1 ligands/PD-1 signaling pathway to dendritic cell-mediated CD4+ T cell activation. *Eur. J. Immunol.* **36**, 2472-2482 (2006).
738. Kim, H. K. *et al.* High-level expression of B7-H1 molecules by dendritic cells suppresses the function of activated T cells and desensitizes allergen-primed animals. *J. Leukoc. Biol.* **79**, 686-695 (2006).
739. Xu, S. *et al.* Successive generation of antigen-presenting, dendritic cell lines from murine epidermis. *J. Immunol.* **154**, 2697-2705 (1995).
740. Orphanides, G. & Reinberg, D. A unified theory of gene expression. *Cell* **108**, 439-451 (2002).
741. Maniatis, T. & Reed, R. An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* **416**, 499-506 (2002).
742. Lin, C. J. & Tam, R. C. Transcriptional regulation of CD28 expression by CD28GR, a novel promoter element located in exon 1 of the CD28 gene. *J. Immunol.* **166**, 6134-6143 (2001).
743. Dreyfuss, G., Kim, V. N. & Kataoka, N. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 195-205 (2002).
744. Moore, M. J. From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science* **309**, 1514-1518 (2005).
745. Hastings, M. L. & Krainer, A. R. Pre-mRNA splicing in the new millennium. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 302-309 (2001).
746. Fairbrother, W. G., Yeh, R. F., Sharp, P. A. & Burge, C. B. Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes. *Science* **297**, 1007-1013 (2002).
747. Meisner, N. C. *et al.* mRNA openers and closers: modulating AU-rich element-controlled mRNA stability by a molecular switch in mRNA secondary structure. *Chembiochem.* **5**, 1432-1447 (2004).
748. Jansen, R. P. mRNA localization: message on the move. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 247-256 (2001).
749. Kozak, M. Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene* **361**, 13-37 (2005).
750. Meyer, I. M. & Miklos, I. Statistical evidence for conserved, local secondary structure in the coding regions of eukaryotic mRNAs and pre-mRNAs. *Nucleic Acids Res.* **33**, 6338-6348 (2005).

751. St, J. D. Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 363-375 (2005).
752. Gebauer, F. & Hentze, M. W. Molecular mechanisms of translational control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 827-835 (2004).
753. Parker, R. & Song, H. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 121-127 (2004).
754. Jensen, O. N. Interpreting the protein language using proteomics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 391-403 (2006).
755. Bi, Y., Liu, G. & Yang, R. MicroRNAs: novel regulators during the immune response. *J. Cell Physiol* **218**, 467-472 (2009).
756. Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281-297 (2004).
757. Engels, B. M. & Hutvagner, G. Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation. *Oncogene* **25**, 6163-6169 (2006).
758. O'Connell, R. M., Taganov, K. D., Boldin, M. P., Cheng, G. & Baltimore, D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**, 1604-1609 (2007).
759. Tili, E. *et al.* Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF- $\alpha$  stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J. Immunol.* **179**, 5082-5089 (2007).
760. Eberhardt, W., Doller, A., Akool, e. & Pfeilschifter, J. Modulation of mRNA stability as a novel therapeutic approach. *Pharmacol. Ther.* **114**, 56-73 (2007).
761. Chen, C. Y., Chen, T. M. & Shyu, A. B. Interplay of two functionally and structurally distinct domains of the c-fos AU-rich element specifies its mRNA-destabilizing function. *Mol. Cell Biol.* **14**, 416-426 (1994).
762. Zubiaga, A. M., Belasco, J. G. & Greenberg, M. E. The nonamer UUAUUUUAUU is the key AU-rich sequence motif that mediates mRNA degradation. *Mol. Cell Biol.* **15**, 2219-2230 (1995).
763. Carballo, E., Gilkeson, G. S. & Blackshear, P. J. Bone marrow transplantation reproduces the tristetraprolin-deficiency syndrome in recombination activating gene-2 (-/-) mice. Evidence that monocyte/macrophage progenitors may be responsible for TNF $\alpha$  overproduction. *J. Clin. Invest* **100**, 986-995 (1997).
764. Ogilvie, R. L. *et al.* Tristetraprolin down-regulates IL-2 gene expression through AU-rich element-mediated mRNA decay. *J. Immunol.* **174**, 953-961 (2005).
765. Sauer, I. *et al.* Interferons limit inflammatory responses by induction of tristetraprolin. *Blood* **107**, 4790-4797 (2006).
766. Chen, Y. L. *et al.* Differential regulation of ARE-mediated TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mRNA stability by lipopolysaccharide in RAW264.7 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **346**, 160-168 (2006).

767. Carballo, E., Lai, W. S. & Blakeshear, P. J. Evidence that tristetraprolin is a physiological regulator of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor messenger RNA deadenylation and stability. *Blood* **95**, 1891-1899 (2000).
768. Bros, M. *et al.* The RNA binding protein tristetraprolin influences the activation state of murine dendritic cells. *Mol. Immunol.* (2009).
769. Emmons, J. *et al.* Identification of TTP mRNA targets in human dendritic cells reveals TTP as a critical regulator of dendritic cell maturation. *RNA*. **14**, 888-902 (2008).
770. Morimoto, R. I. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science* **259**, 1409-1410 (1993).
771. Anderson, P. & Kedersha, N. Visibly stressed: the role of eIF2, TIA-1, and stress granules in protein translation. *Cell Stress. Chaperones*. **7**, 213-221 (2002).
772. Anderson, P. & Kedersha, N. RNA granules. *J. Cell Biol.* **172**, 803-808 (2006).
773. Rank, M. A. *et al.* IL-33-activated dendritic cells induce an atypical TH2-type response. *J. Allergy Clin. Immunol.* **123**, 1047-1054 (2009).
774. Contin, C. *et al.* Membrane-anchored CD40 is processed by the tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme. Implications for CD40 signaling. *J. Biol. Chem.* **278**, 32801-32809 (2003).
775. Logue, E. C., Bakkour, S., Murphy, M. M., Nolla, H. & Sha, W. C. ICOS-induced B7h shedding on B cells is inhibited by TLR7/8 and TLR9. *J. Immunol.* **177**, 2356-2364 (2006).
776. Mullberg, J. *et al.* The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur. J. Immunol.* **23**, 473-480 (1993).
777. Dri, P. *et al.* TNF-Induced shedding of TNF receptors in human polymorphonuclear leukocytes: role of the 55-kDa TNF receptor and involvement of a membrane-bound and non-matrix metalloproteinase. *J. Immunol.* **165**, 2165-2172 (2000).
778. Zhang, G. *et al.* Soluble CD276 (B7-H3) is released from monocytes, dendritic cells and activated T cells and is detectable in normal human serum. *Immunology* **123**, 538-546 (2008).
779. Xu, J. *et al.* 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 (2006).
780. de la, S. C. *et al.* Release of soluble Fc gamma RII/CD32 molecules by human Langerhans cells: a subtle balance between shedding and secretion? *J. Invest Dermatol.* **99**, 15S-17S (1992).
781. Astier, A. *et al.* Human epidermal Langerhans cells secrete a soluble receptor for IgG (Fc gamma RII/CD32) that inhibits the binding of immune complexes to Fc gamma R+ cells. *J. Immunol.* **152**, 201-212 (1994).
782. Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C. & Amigorena, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 621-667 (2002).

783. Cresswell, P., Ackerman, A. L., Giodini, A., Peaper, D. R. & Wearsch, P. A. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing and cross-presentation. *Immunol. Rev.* **207**, 145-157 (2005).
784. Liang, S., Baibakov, B. & Horuzsko, A. HLA-G inhibits the functions of murine dendritic cells via the PIR-B immune inhibitory receptor. *Eur. J. Immunol.* **32**, 2418-2426 (2002).
785. Luo, L. *et al.* B7-H3 enhances tumor immunity in vivo by costimulating rapid clonal expansion of antigen-specific CD8+ cytolytic T cells. *J. Immunol.* **173**, 5445-5450 (2004).
786. Luo, L. *et al.* Arsenic trioxide synergizes with B7H3-mediated immunotherapy to eradicate hepatocellular carcinomas. *Int. J. Cancer* **118**, 1823-1830 (2006).
787. Lupu, C. M. *et al.* An orthotopic colon cancer model for studying the B7-H3 antitumor effect in vivo. *J. Gastrointest. Surg.* **10**, 635-645 (2006).
788. de Saint-Vis, B. *et al.* The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. *J. Immunol.* **160**, 1666-1676 (1998).
789. Granucci, F. *et al.* Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat. Immunol.* **2**, 882-888 (2001).
790. Lohning, M. *et al.* Expression of ICOS in vivo defines CD4+ effector T cells with high inflammatory potential and a strong bias for secretion of interleukin 10. *J. Exp. Med.* **197**, 181-193 (2003).
791. Akbari, O. *et al.* Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat. Med.* **8**, 1024-1032 (2002).
792. Gotsman, I. *et al.* Impaired regulatory T-cell response and enhanced atherosclerosis in the absence of inducible costimulatory molecule. *Circulation* **114**, 2047-2055 (2006).
793. Rottman, J. B. *et al.* The costimulatory molecule ICOS plays an important role in the immunopathogenesis of EAE. *Nat. Immunol.* **2**, 605-611 (2001).
794. Herman, A. E., Freeman, G. J., Mathis, D. & Benoist, C. CD4+CD25+ T regulatory cells dependent on ICOS promote regulation of effector cells in the prediabetic lesion. *J. Exp. Med.* **199**, 1479-1489 (2004).
795. Tamura, H. *et al.* B7-H1 costimulation preferentially enhances CD28-independent T-helper cell function. *Blood* **97**, 1809-1816 (2001).
796. Tseng, S. Y. *et al.* B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J. Exp. Med.* **193**, 839-846 (2001).
797. Freeman, G. J. *et al.* Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* **192**, 1027-1034 (2000).
798. Yoshimura, S., Bondeson, J., Foxwell, B. M., Brennan, F. M. & Feldmann, M. Effective antigen presentation by dendritic cells is NF-kappaB dependent: coordinate regulation of MHC, co-stimulatory molecules and cytokines. *Int. Immunol.* **13**, 675-683 (2001).
799. Ardeschna, K. M., Pizzey, A. R., Devereux, S. & Khwaja, A. The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* **96**, 1039-1046 (2000).



800. Ouaz, F., Arron, J., Zheng, Y., Choi, Y. & Beg, A. A. Dendritic cell development and survival require distinct NF-kappaB subunits. *Immunity*. **16**, 257-270 (2002).
801. Li, M. *et al.* Immune modulation and tolerance induction by RelB-silenced dendritic cells through RNA interference. *J. Immunol.* **178**, 5480-5487 (2007).
802. Zhou, L. F. *et al.* Effects of adenoviral gene transfer of mutated IkappaBalpha, a novel inhibitor of NF-kappaB, on human monocyte-derived dendritic cells. *Acta Pharmacol. Sin.* **27**, 609-616 (2006).
803. Rice, N. R. & Ernst, M. K. In vivo control of NF-kappa B activation by I kappa B alpha. *EMBO J.* **12**, 4685-4695 (1993).
804. Sun, S. C., Ganchi, P. A., Ballard, D. W. & Greene, W. C. NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science* **259**, 1912-1915 (1993).
805. Chiao, P. J., Miyamoto, S. & Verma, I. M. Autoregulation of I kappa B alpha activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 28-32 (1994).
806. Gealy, C. *et al.* Posttranscriptional suppression of interleukin-6 production by human cytomegalovirus. *J. Virol.* **79**, 472-485 (2005).
807. Jalonen, U., Nieminen, R., Vuolteenaho, K., Kankaanranta, H. & Moilanen, E. Down-regulation of tristetraprolin expression results in enhanced IL-12 and MIP-2 production and reduced MIP-3alpha synthesis in activated macrophages. *Mediators. Inflamm.* **2006**, 40691 (2006).
808. Tas, S. W. *et al.* Noncanonical NF-kappaB signaling in dendritic cells is required for indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) induction and immune regulation. *Blood* **110**, 1540-1549 (2007).
809. Tudor, C. *et al.* The p38 MAPK pathway inhibits tristetraprolin-directed decay of interleukin-10 and pro-inflammatory mediator mRNAs in murine macrophages. *FEBS Lett.* **583**, 1933-1938 (2009).
810. Sharma, A. *et al.* Posttranscriptional regulation of interleukin-10 expression by hsa-miR-106a. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **106**, 5761-5766 (2009).
811. Dong, C., Davis, R. J. & Flavell, R. A. Signaling by the JNK group of MAP kinases. c-jun N-terminal Kinase. *J. Clin. Immunol.* **21**, 253-257 (2001).
812. Keyse, S. M. Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 186-192 (2000).
813. Wu, J. J. & Bennett, A. M. Essential role for mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1 in stress-responsive MAP kinase and cell survival signaling. *J. Biol. Chem.* **280**, 16461-16466 (2005).
814. Franklin, C. C. & Kraft, A. S. Conditional expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase MKP-1 preferentially inhibits p38 MAPK and stress-activated protein kinase in U937 cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 16917-16923 (1997).
815. Sato, K., Nagayama, H., Tadokoro, K., Juji, T. & Takahashi, T. A. Extracellular signal-regulated kinase, stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase, and p38mapk are involved in IL-10-mediated selective repression of TNF-alpha-induced activation and

- maturation of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* **162**, 3865-3872 (1999).
816. Arrighi, J. F., Rebsamen, M., Rousset, F., Kindler, V. & Hauser, C. A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF-alpha, and contact sensitizers. *J. Immunol.* **166**, 3837-3845 (2001).
817. Nakahara, T. *et al.* Role of c-Jun N-terminal kinase on lipopolysaccharide induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Int. Immunol.* **16**, 1701-1709 (2004).
818. Yanagawa, Y. & Onoe, K. Distinct regulation of CD40-mediated interleukin-6 and interleukin-12 productions via mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kappaB-inducing kinase in mature dendritic cells. *Immunology* **117**, 526-535 (2006).
819. Charles, C. H., Abler, A. S. & Lau, L. F. cDNA sequence of a growth factor-inducible immediate early gene and characterization of its encoded protein. *Oncogene* **7**, 187-190 (1992).
820. Emslie, E. A., Jones, T. A., Sheer, D. & Keyse, S. M. The CL100 gene, which encodes a dual specificity (Tyr/Thr) MAP kinase phosphatase, is highly conserved and maps to human chromosome 5q34. *Hum. Genet.* **93**, 513-516 (1994).
821. Chen, C. Y. & Shyu, A. B. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 465-470 (1995).
822. Dean, J. L., Sully, G., Clark, A. R. & Saklatvala, J. The involvement of AU-rich element-binding proteins in p38 mitogen-activated protein kinase pathway-mediated mRNA stabilisation. *Cell Signal.* **16**, 1113-1121 (2004).
823. Mahtani, K. R. *et al.* Mitogen-activated protein kinase p38 controls the expression and posttranslational modification of tristetraprolin, a regulator of tumor necrosis factor alpha mRNA stability. *Mol. Cell Biol.* **21**, 6461-6469 (2001).
824. Hu, J. H. *et al.* Feedback control of MKP-1 expression by p38. *Cell Signal.* **19**, 393-400 (2007).
825. Ardeschna, K. M., Pizzey, A. R., Walker, S. J., Devereux, S. & Khwaja, A. The upregulation of CC chemokine receptor 7 and the increased migration of maturing dendritic cells to macrophage inflammatory protein 3beta and secondary lymphoid chemokine is mediated by the p38 stress-activated protein kinase pathway. *Br. J. Haematol.* **119**, 826-829 (2002).
826. Ma, W. *et al.* The p38 mitogen-activated kinase pathway regulates the human interleukin-10 promoter via the activation of Sp1 transcription factor in lipopolysaccharide-stimulated human macrophages. *J. Biol. Chem.* **276**, 13664-13674 (2001).
827. Guo, X., Gerl, R. E. & Schrader, J. W. Defining the involvement of p38alpha MAPK in the production of anti- and proinflammatory cytokines using an SB 203580-resistant form of the kinase. *J. Biol. Chem.* **278**, 22237-22242 (2003).
828. Fujigaki, H. *et al.* The signal transducer and activator of transcription 1alpha and interferon regulatory factor 1 are not essential for the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by lipopolysaccharide: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-

- kappaB pathways, and synergistic effect of several proinflammatory cytokines. *J. Biochem.* **139**, 655-662 (2006).
829. Jung, I. D. *et al.* Differential regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase by lipopolysaccharide and interferon gamma in murine bone marrow derived dendritic cells. *FEBS Lett.* **581**, 1449-1456 (2007).
830. Al-Alwan, M. M., Rowden, G., Lee, T. D. & West, K. A. Fascin is involved in the antigen presentation activity of mature dendritic cells. *J. Immunol.* **166**, 338-345 (2001).
831. Geyeregger, R. *et al.* Liver X receptors regulate dendritic cell phenotype and function through blocked induction of the actin-bundling protein fascin. *Blood* **109**, 4288-4295 (2007).
832. Nefedova, Y. *et al.* Activation of dendritic cells via inhibition of Jak2/STAT3 signaling. *J. Immunol.* **175**, 4338-4346 (2005).
833. Cheng, F. *et al.* A critical role for Stat3 signaling in immune tolerance. *Immunity.* **19**, 425-436 (2003).
834. Welte, T. *et al.* STAT3 deletion during hematopoiesis causes Crohn's disease-like pathogenesis and lethality: a critical role of STAT3 in innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 1879-1884 (2003).
835. Wang, T. *et al.* Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat. Med.* **10**, 48-54 (2004).
836. Kortylewski, M. *et al.* Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat. Med.* **11**, 1314-1321 (2005).
837. Samavati, L. *et al.* STAT3 tyrosine phosphorylation is critical for interleukin 1 beta and interleukin-6 production in response to lipopolysaccharide and live bacteria. *Mol. Immunol.* **46**, 1867-1877 (2009).
838. Sun, Y. *et al.* Cutting edge: Negative regulation of dendritic cells through acetylation of the nonhistone protein STAT-3. *J. Immunol.* **182**, 5899-5903 (2009).
839. Benkhart, E. M., Siedlar, M., Wedel, A., Werner, T. & Ziegler-Heitbrock, H. W. Role of Stat3 in lipopolysaccharide-induced IL-10 gene expression. *J. Immunol.* **165**, 1612-1617 (2000).
840. Kubo, M., Hanada, T. & Yoshimura, A. Suppressors of cytokine signaling and immunity. *Nat. Immunol.* **4**, 1169-1176 (2003).
841. Alexander, W. S. & Hilton, D. J. The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 503-529 (2004).
842. Tsukada, J. *et al.* The role of suppressor of cytokine signaling 1 as a negative regulator for aberrant expansion of CD8alpha+ dendritic cell subset. *Int. Immunol.* **17**, 1167-1178 (2005).
843. Evel-Kabler, K., Song, X. T., Aldrich, M., Huang, X. F. & Chen, S. Y. SOCS1 restricts dendritic cells' ability to break self tolerance and induce antitumor immunity by regulating IL-12 production and signaling. *J. Clin. Invest* **116**, 90-100 (2006).
844. Shen, L., Evel-Kabler, K., Strube, R. & Chen, S. Y. Silencing of SOCS1 enhances antigen presentation by dendritic cells and antigen-specific anti-tumor immunity. *Nat. Biotechnol.* **22**, 1546-1553 (2004).
845. Fu, H. *et al.* Dendritic cells transduced with SOCS1 gene exhibit regulatory DC properties and prolong allograft survival. *Cell Mol. Immunol.* **6**, 87-95 (2009).

846. Sakurai, H. *et al.* Adenoviral expression of suppressor of cytokine signaling-1 reduces adenovirus vector-induced innate immune responses. *J. Immunol.* **180**, 4931-4938 (2008).
847. Kimura, A. *et al.* Suppressor of cytokine signaling-1 selectively inhibits LPS-induced IL-6 production by regulating JAK-STAT. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 17089-17094 (2005).
848. Haffner, M. C. *et al.* Interaction and functional interference of glucocorticoid receptor and SOCS1. *J. Biol. Chem.* **283**, 22089-22096 (2008).
849. Staples, K. J. *et al.* IL-10 induces IL-10 in primary human monocyte-derived macrophages via the transcription factor Stat3. *J. Immunol.* **178**, 4779-4785 (2007).
850. Fogel-Petrovic, M. *et al.* Physiological concentrations of transforming growth factor beta1 selectively inhibit human dendritic cell function. *Int. Immunopharmacol.* **7**, 1924-1933 (2007).
851. Geissmann, F. *et al.* TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells. *J. Immunol.* **162**, 4567-4575 (1999).
852. Xiao, B. G., Zhu, W. H. & Lu, C. Z. The presence of GM-CSF and IL-4 interferes with effect of TGF-beta1 on antigen presenting cells in patients with multiple sclerosis and in rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol.* **249**, 30-36 (2007).
853. Ohtani, T. *et al.* TGF-beta1 dampens the susceptibility of dendritic cells to environmental stimulation, leading to the requirement for danger signals for activation. *Immunology* **126**, 485-499 (2009).
854. Takayama, T. *et al.* Retroviral delivery of transforming growth factor-beta1 to myeloid dendritic cells: inhibition of T-cell priming ability and influence on allograft survival. *Transplantation* **74**, 112-119 (2002).
855. Asiedu, C. *et al.* Rhesus monocyte-derived dendritic cells modified to over-express TGF-beta1 exhibit potent veto activity. *Transplantation* **74**, 629-637 (2002).
856. Kim, S. J., Jeang, K. T., Glick, A. B., Sporn, M. B. & Roberts, A. B. Promoter sequences of the human transforming growth factor-beta 1 gene responsive to transforming growth factor-beta 1 autoinduction. *J. Biol. Chem.* **264**, 7041-7045 (1989).
857. Van Obberghen-Schilling, E., Roche, N. S., Flanders, K. C., Sporn, M. B. & Roberts, A. B. Transforming growth factor beta 1 positively regulates its own expression in normal and transformed cells. *J. Biol. Chem.* **263**, 7741-7746 (1988).
858. Kim, S. J. *et al.* Autoinduction of transforming growth factor beta 1 is mediated by the AP-1 complex. *Mol. Cell Biol.* **10**, 1492-1497 (1990).
859. Ventura, J. J., Kennedy, N. J., Flavell, R. A. & Davis, R. J. JNK regulates autocrine expression of TGF-beta1. *Mol. Cell* **15**, 269-278 (2004).
860. Kim, S. J. *et al.* Post-transcriptional regulation of the human transforming growth factor-beta 1 gene. *J. Biol. Chem.* **267**, 13702-13707 (1992).
861. Allison, R. S., Mummy, M. L. & Wakefield, L. M. Translational control elements in the major human transforming growth factor-beta 1 mRNA. *Growth Factors* **16**, 89-100 (1998).

862. Ogata, M. *et al.* Chemotactic response toward chemokines and its regulation by transforming growth factor-beta1 of murine bone marrow hematopoietic progenitor cell-derived different subset of dendritic cells. *Blood* **93**, 3225-3232 (1999).
863. Hannum, C. H. *et al.* Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature* **343**, 336-340 (1990).
864. Eisenberg, S. P. *et al.* Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. *Nature* **343**, 341-346 (1990).
865. Cominelli, F. *et al.* Interleukin 1 (IL-1) gene expression, synthesis, and effect of specific IL-1 receptor blockade in rabbit immune complex colitis. *J. Clin. Invest* **86**, 972-980 (1990).
866. Wooley, P. H. *et al.* The effect of an interleukin-1 receptor antagonist protein on type II collagen-induced arthritis and antigen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheum.* **36**, 1305-1314 (1993).
867. Ishida, Y., Kondo, T., Kimura, A., Matsushima, K. & Mukaida, N. Absence of IL-1 receptor antagonist impaired wound healing along with aberrant NF-kappaB activation and a reciprocal suppression of TGF-beta signal pathway. *J. Immunol.* **176**, 5598-5606 (2006).
868. Neumann, E. *et al.* Inhibition of cartilage destruction by double gene transfer of IL-1Ra and IL-10 involves the activin pathway. *Gene Ther.* **9**, 1508-1519 (2002).
869. Wang, H. J. *et al.* Suppression of experimental osteoarthritis by adenovirus-mediated double gene transfer. *Chin Med. J. (Engl.)* **119**, 1365-1373 (2006).
870. Garat, C. & Arend, W. P. Intracellular IL-1Ra type 1 inhibits IL-1-induced IL-6 and IL-8 production in Caco-2 intestinal epithelial cells through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB pathways. *Cytokine* **23**, 31-40 (2003).
871. Arend, W. P., Malyak, M., Guthridge, C. J. & Gabay, C. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 27-55 (1998).
872. Pelletier, M., Bouchard, A. & Girard, D. In vivo and in vitro roles of IL-21 in inflammation. *J. Immunol.* **173**, 7521-7530 (2004).
873. di, C. E., de, T. D., Piazza, T., Fabbi, M. & Ferrini, S. Role of IL-21 in immune-regulation and tumor immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **56**, 1323-1334 (2007).
874. Mills, K. H. Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *Eur. J. Immunol.* **38**, 2636-2649 (2008).
875. Strengell, M., Lehtonen, A., Matikainen, S. & Julkunen, I. IL-21 enhances SOCS gene expression and inhibits LPS-induced cytokine production in human monocyte-derived dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* **79**, 1279-1285 (2006).
876. di, C. E. *et al.* IL-21 induces tumor rejection by specific CTL and IFN-gamma-dependent CXC chemokines in syngeneic mice. *J. Immunol.* **172**, 1540-1547 (2004).
877. Ugai, S. *et al.* Transduction of the IL-21 and IL-23 genes in human pancreatic carcinoma cells produces natural killer cell-dependent and -independent antitumor effects. *Cancer Gene Ther.* **10**, 771-778 (2003).
878. Ugai, S. *et al.* Expression of the interleukin-21 gene in murine colon carcinoma cells generates systemic immunity in the inoculated hosts. *Cancer Gene Ther.* **10**, 187-192 (2003).

879. Ozaki, K., Kikly, K., Michalovich, D., Young, P. R. & Leonard, W. J. Cloning of a type I cytokine receptor most related to the IL-2 receptor beta chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 11439-11444 (2000).
880. Habib, T., Senadheera, S., Weinberg, K. & Kaushansky, K. The common gamma chain (gamma c) is a required signaling component of the IL-21 receptor and supports IL-21-induced cell proliferation via JAK3. *Biochemistry* **41**, 8725-8731 (2002).
881. Asao, H. *et al.* Cutting edge: the common gamma-chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex. *J. Immunol.* **167**, 1-5 (2001).
882. Strengell, M., Sareneva, T., Foster, D., Julkunen, I. & Matikainen, S. IL-21 up-regulates the expression of genes associated with innate immunity and Th1 response. *J. Immunol.* **169**, 3600-3605 (2002).
883. Strengell, M. *et al.* IL-21 in synergy with IL-15 or IL-18 enhances IFN-gamma production in human NK and T cells. *J. Immunol.* **170**, 5464-5469 (2003).
884. Yamaoka, K., Min, B., Zhou, Y. J., Paul, W. E. & O'Shea, J. J. Jak3 negatively regulates dendritic-cell cytokine production and survival. *Blood* **106**, 3227-3233 (2005).
885. Rochman, Y., Spolski, R. & Leonard, W. J. New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 480-490 (2009).
886. Corinti, S., Albanesi, C., Ia, S. A., Pastore, S. & Girolomoni, G. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J. Immunol.* **166**, 4312-4318 (2001).
887. Koski, G. K., Lyakh, L. A. & Rice, N. R. Rapid lipopolysaccharide-induced differentiation of CD14(+) monocytes into CD83(+) dendritic cells is modulated under serum-free conditions by exogenously added IFN-gamma and endogenously produced IL-10. *Eur. J. Immunol.* **31**, 3773-3781 (2001).
888. Allavena, P. *et al.* IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. *Eur. J. Immunol.* **28**, 359-369 (1998).
889. Faulkner, L., Buchan, G. & Baird, M. Interleukin-10 does not affect phagocytosis of particulate antigen by bone marrow-derived dendritic cells but does impair antigen presentation. *Immunology* **99**, 523-531 (2000).
890. Haase, C., Jorgensen, T. N. & Michelsen, B. K. Both exogenous and endogenous interleukin-10 affects the maturation of bone-marrow-derived dendritic cells in vitro and strongly influences T-cell priming in vivo. *Immunology* **107**, 489-499 (2002).
891. Takayama, T., Tahara, H. & Thomson, A. W. Differential effects of myeloid dendritic cells retrovirally transduced to express mammalian or viral interleukin-10 on cytotoxic T lymphocyte and natural killer cell functions and resistance to tumor growth. *Transplantation* **71**, 1334-1340 (2001).
892. Oberholzer, A. *et al.* Functional modification of dendritic cells with recombinant adenovirus encoding interleukin 10 for the treatment of sepsis. *Shock* **23**, 507-515 (2005).
893. Henry, E. *et al.* Dendritic cells genetically engineered to express IL-10 induce long-lasting antigen-specific tolerance in experimental asthma. *J. Immunol.* **181**, 7230-7242 (2008).
894. Commeren, D. L. *et al.* Paradoxical effects of interleukin-10 on the maturation of murine myeloid dendritic cells. *Immunology* **110**, 188-196 (2003).

895. Takayama, T. *et al.* Mammalian and viral IL-10 enhance C-C chemokine receptor 5 but down-regulate C-C chemokine receptor 7 expression by myeloid dendritic cells: impact on chemotactic responses and in vivo homing ability. *J. Immunol.* **166**, 7136-7143 (2001).
896. Yanagawa, Y., Iwabuchi, K. & Onoe, K. Co-operative action of interleukin-10 and interferon-gamma to regulate dendritic cell functions. *Immunology* **127**, 345-353 (2009).
897. Finbloom, D. S. & Winestock, K. D. IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes. *J. Immunol.* **155**, 1079-1090 (1995).
898. Weber-Nordt, R. M. *et al.* Stat3 recruitment by two distinct ligand-induced, tyrosine-phosphorylated docking sites in the interleukin-10 receptor intracellular domain. *J. Biol. Chem.* **271**, 27954-27961 (1996).
899. Riley, J. K., Takeda, K., Akira, S. & Schreiber, R. D. Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action. *J. Biol. Chem.* **274**, 16513-16521 (1999).
900. Carl, V. S., Gautam, J. K., Comeau, L. D. & Smith, M. F., Jr. Role of endogenous IL-10 in LPS-induced STAT3 activation and IL-1 receptor antagonist gene expression. *J. Leukoc. Biol.* **76**, 735-742 (2004).
901. Ito, S. *et al.* Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma- induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1. *Blood* **93**, 1456-1463 (1999).
902. Cassatella, M. A. *et al.* Interleukin-10 (IL-10) selectively enhances CIS3/SOCS3 mRNA expression in human neutrophils: evidence for an IL-10-induced pathway that is independent of STAT protein activation. *Blood* **94**, 2880-2889 (1999).
903. Berlato, C. *et al.* Involvement of suppressor of cytokine signaling-3 as a mediator of the inhibitory effects of IL-10 on lipopolysaccharide-induced macrophage activation. *J. Immunol.* **168**, 6404-6411 (2002).
904. Bhattacharyya, S. *et al.* Immunoregulation of dendritic cells by IL-10 is mediated through suppression of the PI3K/Akt pathway and of I $\kappa$ B kinase activity. *Blood* **104**, 1100-1109 (2004).
905. D'Amico, G. *et al.* Uncoupling of inflammatory chemokine receptors by IL-10: generation of functional decoys. *Nat. Immunol.* **1**, 387-391 (2000).
906. Knodler, A. *et al.* Post-transcriptional regulation of adapter molecules by IL-10 inhibits TLR-mediated activation of antigen-presenting cells. *Leukemia* **23**, 535-544 (2009).
907. Raftery, M. J. *et al.* Shaping phenotype, function, and survival of dendritic cells by cytomegalovirus-encoded IL-10. *J. Immunol.* **173**, 3383-3391 (2004).
908. Couper, K. N., Blount, D. G. & Riley, E. M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J. Immunol.* **180**, 5771-5777 (2008).
909. Tung, T. C., Oshima, K., Cui, G., Laks, H. & Sen, L. Dual upregulation of Fas and Bax promotes alloreactive T cell apoptosis in IL-10 gene targeting of cardiac allografts. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **285**, H964-H973 (2003).

910. Akamatsu, N. *et al.* High IL-21 receptor expression and apoptosis induction by IL-21 in follicular lymphoma. *Cancer Lett.* **256**, 196-206 (2007).
911. de, T. D. *et al.* Interleukin-21 receptor (IL-21R) is up-regulated by CD40 triggering and mediates proapoptotic signals in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* **107**, 3708-3715 (2006).
912. Gelebart, P. *et al.* Interleukin-21 effectively induces apoptosis in mantle cell lymphoma through a STAT1-dependent mechanism. *Leukemia* **23**, 1836-1846 (2009).
913. Fluckiger, A. C., Durand, I. & Banchereau, J. Interleukin 10 induces apoptotic cell death of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *J. Exp. Med.* **179**, 91-99 (1994).
914. Dai, R. & Streilein, J. W. Ultraviolet B-exposed and soluble factor-pre-incubated epidermal Langerhans cells fail to induce contact hypersensitivity and promote DNP-specific tolerance. *J. Invest Dermatol.* **108**, 721-726 (1997).
915. Saint-Mezard, P., Berard, F., Dubois, B., Kaiserlian, D. & Nicolas, J. F. The role of CD4+ and CD8+ T cells in contact hypersensitivity and allergic contact dermatitis. *Eur. J. Dermatol.* **14**, 131-138 (2004).
916. Nakae, S. *et al.* Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity.* **17**, 375-387 (2002).
917. Brand, D. D., Kang, A. H. & Rosloniec, E. F. Immunopathogenesis of collagen arthritis. *Springer Semin. Immunopathol.* **25**, 3-18 (2003).
918. Kim, S. H. *et al.* Effective treatment of established murine collagen-induced arthritis by systemic administration of dendritic cells genetically modified to express IL-4. *J. Immunol.* **166**, 3499-3505 (2001).
919. Shultz, L. D., Ishikawa, F. & Greiner, D. L. Humanized mice in translational biomedical research. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 118-130 (2007).



## 8 Abkürzungsverzeichnis

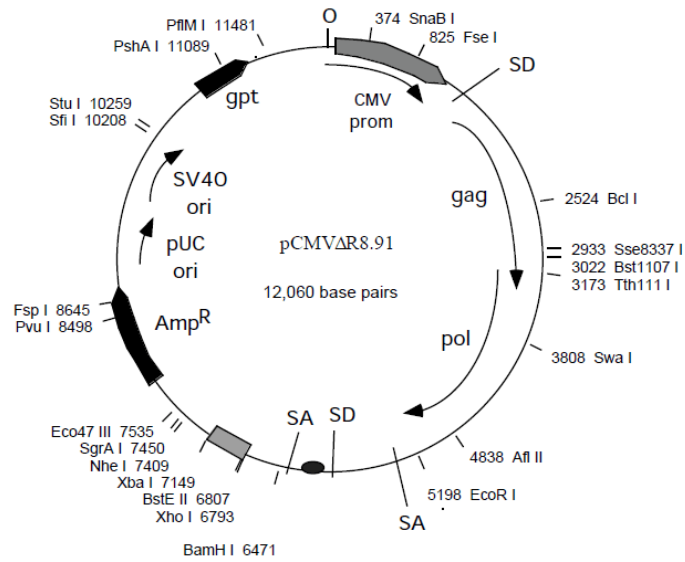
AMP	Ampicillin
AP-1	<i>activating protein</i>
APC	<i>antigen-presenting cell</i>
ARE	<i>AU-rich elements</i>
B7-H	B7-Homolog
BCR	<i>B cell receptor</i>
BM-DC	<i>bone marrow-derived dendritic cell</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
BTLA	<i>B and T lymphocyte attenuator</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHS	<i>contact hypersensitivity</i>
CMV	<i>human immediate early cytomegalovirus</i>
CO	Kohlenmonoxid
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
copGFP	<i>copepod green fluorescent protein</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
CTL	<i>cytotoxic T lymphocyte</i>
CTLA-4	<i>cytotoxic T lymphocyte antigen-4</i>
DC	Dexamethason
DEX	<i>dendritic cell</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DNBS	2,4-Dinitrobenzolsulfonsäure
DNFB	2,4-Dinitroflourbenzol
dNTP	Desoxyribonucleosid-triphosphat
DsRed	<i>red fluorescent protein</i>
EAE	<i>experimental autoimmune encephalomyelitis</i>
EF1	<i>human elongation factor 1 alpha</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
FSCN1	Fascin1
Foxp3	<i>forkhead box P3</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GC	Glucocorticoid
GILZ	<i>glucocorticoid-induced leucine zipper</i>

GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GR	Glucocorticoidrezeptor
GRE	<i>glucocorticoid response element</i>
H <sub>2</sub> O	Wasser
HBS	<i>heparin buffered saline</i>
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HLA	<i>human histocompatibility leukocyte antigen</i>
HO-1	Hämoxygenase-1
<sup>3</sup> HTdR	Trithium-markiertes Thymidin
ICOS	<i>inducible costimulator</i>
iDC	immature (DC)
IDO	Indolamin-2,3-dioxygenase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-1RA	IL-1 Rezeptor-Antagonist
IL-21R	IL-21 Rezeptor
IL-1R2	IL-1 Rezeptor Typ II
Ig	Immunoglobulin
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
ITIM	<i>immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
iTreg	induzierte bzw. adaptive regulatorische T-Zelle
JAK	<i>janus kinase</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
kb	Kilobasen
LAG3	<i>leukaemia inhibitory factor</i>
LIF	<i>lymphocyte activation gene-3</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LTR	<i>long terminal repeat</i>
LV	mit dem Vektor pCDH1-MCS1-EF1-copGFP lentiviral transduzierte (DC)
mDC	mature (DC)
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MAP-K	(MAP)-Kinase
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MFI	<i>mean fluorescent intensity</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
miRNA	microRNA
MKP-1	(MAP-K) Phosphatase
MLR	<i>Mixed leukocyte reaction</i>
MMLV	<i>molony murine leukaemia virus</i>
Mock-DC	<i>mock-transduced (DC)</i> , mit HEK 293T-Kulturüberstand pseudo-transduzierte (DC)
MOG	<i>myelin oligodendrocyte glycoprotein</i>

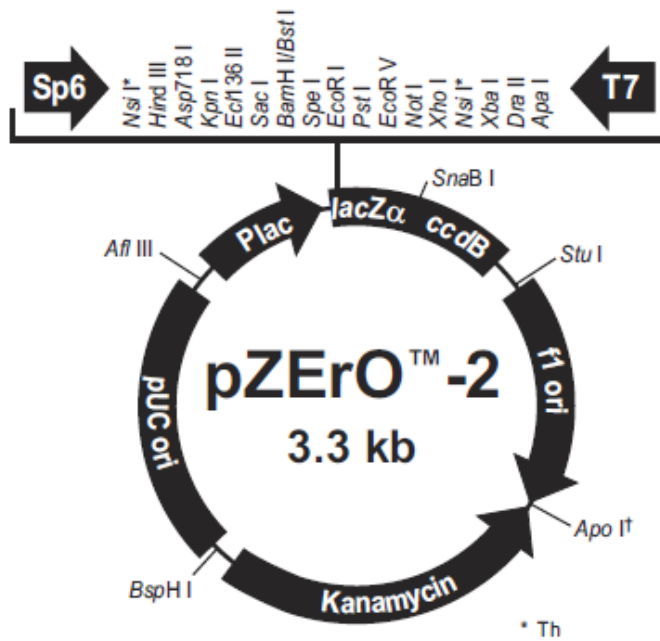
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NK	<i>natural killer</i>
NRP	Neutropilin
nTC	Naïve T-Zelle
ORF	<i>open reading frame</i>
PAMP	<i>pathogen associated molecular patterns</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PD-1	<i>programmed cell death</i>
PD-L1	<i>programmed death ligand-1</i>
PE	Phycoerythrin
Pen	Penicillin
PirB	<i>paired Ig-like receptor-B</i>
PRR	<i>pathogen recognition receptors</i>
pTC	<i>primed T-cell</i>
RGS	<i>regulator of G-protein signalling</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNA-BP	RNA-Bindeprotein
RT	Raumtemperatur
SGK-1	<i>serum- and glucocorticoid-regulated kinase-1</i>
SLAM	<i>signaling lymphocyte activation molecule</i>
SOCS	<i>suppressors of cytokine signaling</i>
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
Strep	Streptomycin
TCR	<i>T cell receptor</i>
TD	<i>tumor derived</i>
TF	Transkriptionsfaktor
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor <math>\beta</math></i>
T <sub>FH</sub>	follikulären T-Helferzelle
T <sub>H</sub>	T-Helferzelle
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF- $\alpha$	<i>tumor necrosis factor</i>
tNGFR	<i>truncated form of the nerve growth factor receptor</i>
Treg	regulatorischer T-Zelle
TSA	<i>tissue-specific antigen</i>
TTP	Tristetraprolin
UBC	Ubiquitin C
upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region

## 9 Anhang

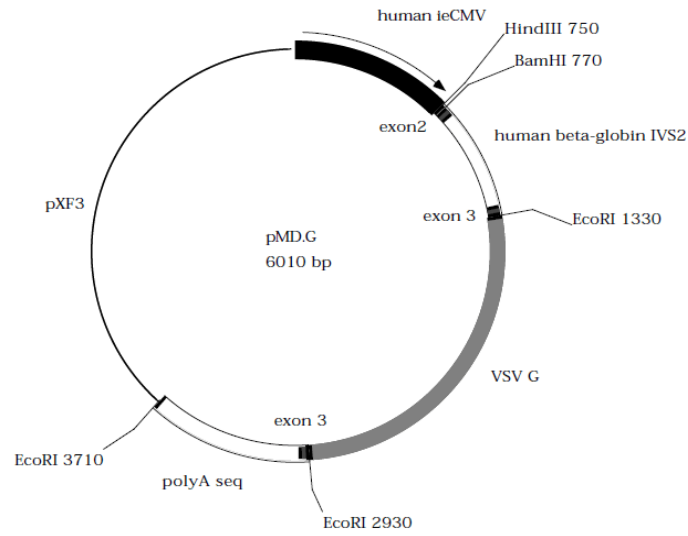
### 1. Schematische Darstellung des Vektors pCMVΔ8.91



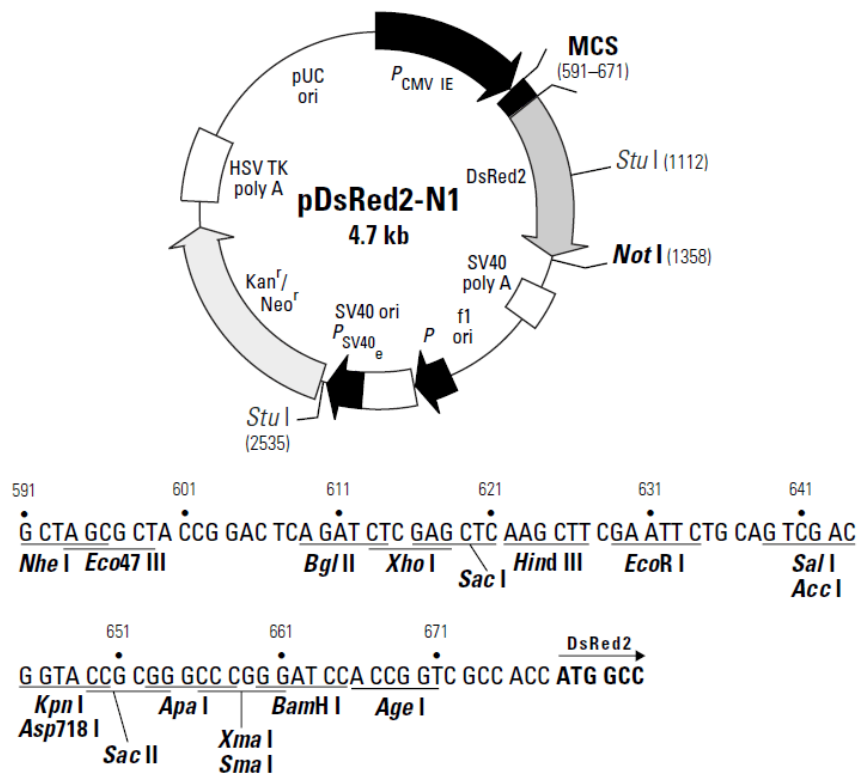
### 2. Schematische Darstellung des Vektors pZero-2



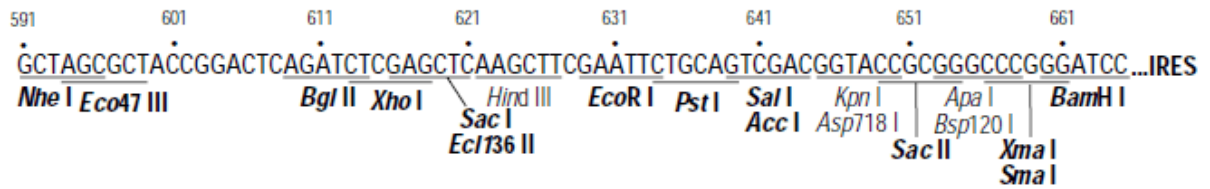
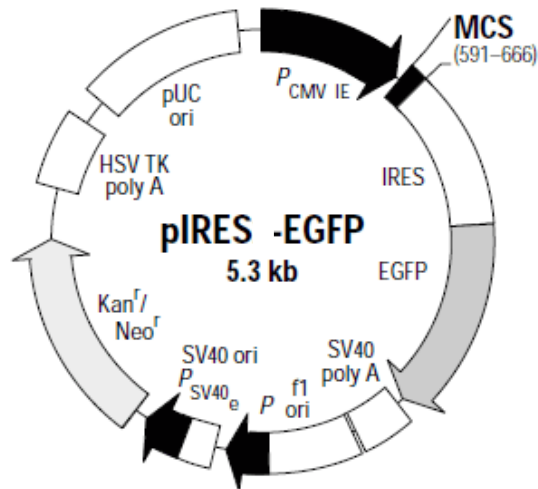
### 3. Schematische Darstellung des Vektors pMD.G



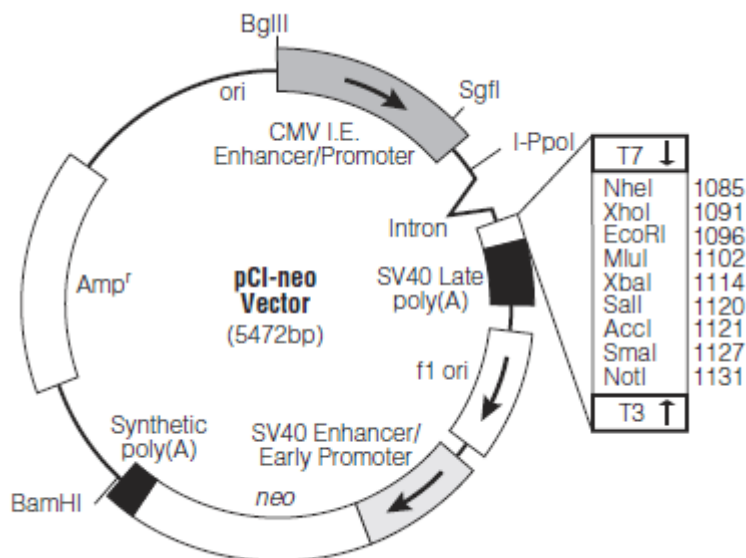
### 4. Schematische Darstellung des Vektors pDsRed2-N1



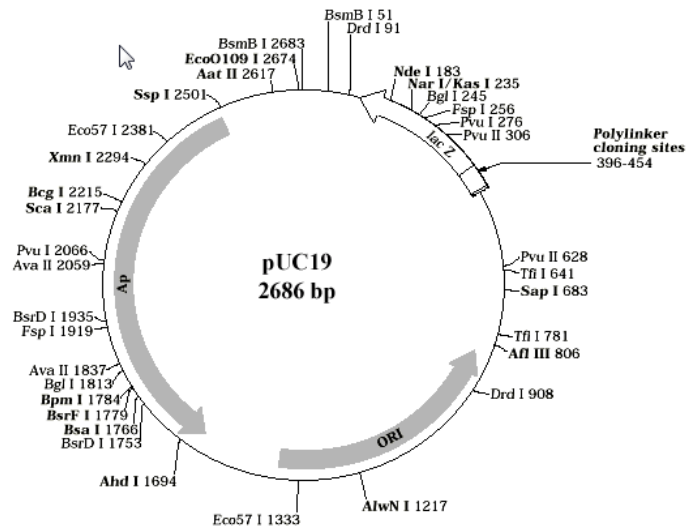
### 5. Schematische Darstellung des Vektors pIRES-EGFP



### 6. Schematische Darstellung des Vektors pCI



## 7. Schematische Darstellung des Vektors pUC19



## **10 Lebenslauf**



## 11 Eidesstattliche Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen der Klinischen Forschergruppe Allergie an der Hautklinik der Johannes Gutenberg Universität-Mainz erarbeitet.

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit und sämtliche Ergebnisse selbstständig verfasst und erarbeitet wurden und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet wurden.

Mainz, den

Verena Besche