

Untersuchung der Modulation adaptiver Immunantworten in Abhängigkeit der Reifung dendritischer Zellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

im Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

Melanie Faßbender

Geboren am 16. Juli 1979
in Mainz

Mainz, September 2008

I EINLEITUNG	- 4 -
1 Das Immunsystem	- 1 -
2 Das angeborene Immunsystem	- 3 -
2.1 Die Zellen des angeborenen Immunsystems	- 3 -
2.2 Dendritische Zellen	- 3 -
2.3 Rezeptoren des angeborenen Immunsystems (Pattern Recognition Receptors (PRR))	- 5 -
2.4 Signalweiterleitung durch PRR	- 7 -
2.5 Signalübertragung durch Toll-like Rezeptoren	- 8 -
2.6 Weitere Toll-Signalwege	- 11 -
2.7 Antigen-Prozessierung und -Präsentation	- 12 -
2.8 Dendritic Cell Aggresome-like Induced Structures (DALIS)	- 15 -
2.9 Interaktion zwischen dendritischen Zellen und T-Zellen	- 16 -
3 Das adaptive Immunsystem	- 20 -
3.1 Die Zellen des adaptiven Immunsystems	- 20 -
3.2 T-Zellen	- 20 -
3.3 Entwicklung von T-Zellen	- 21 -
3.4 T-Zell-Arten	- 23 -
3.5 Regulatorische T-Zellen	- 24 -
II MATERIAL UND METHODEN	- 28 -
1 Material	- 28 -
1.1 Tiere	- 28 -
1.2 Kulturmedien und Puffer	- 29 -
1.3 ELISA-Reagenzien	- 31 -
1.4 Reagenzien Durchflusszytometrie	- 31 -
1.5 Reagenzien MACS (magnetic associated cell sorting)	- 33 -
1.6 Antigene, Adjuvantien, Peptide	- 34 -
1.7 Inhibitoren und sonstige Substanzen	- 35 -
1.8 Verbrauchsmaterialien	- 35 -
1.9 Laborgeräte	- 36 -
1.10 PCR	- 37 -
2 Methoden	- 39 -
2.1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	- 39 -
2.2 Durchflusszytometrie	- 40 -
2.3 Generierung von dendritischen Zellen aus Knochenmark (BMDC)	- 41 -
2.4 Isolation von natürlich vorkommenden regulatorischen T-Zellen	- 42 -
2.5 Bestimmung der Lebendzellzahl	- 43 -
2.6 CFSE-Markierung	- 44 -
2.7 Präparation von Milzzellen und MACS	- 44 -
2.8 Fluoreszenz-Mikroskopie	- 45 -
2.9 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	- 46 -
2.9.1 Gewinnung der RNA aus Zell-Proben	- 46 -
2.9.2 Reverse Transkription der mRNA in cDNA	- 46 -
2.9.3 Amplifikation der cDNA durch Real-Time PCR (Polymerase-Chain-Reaktion)	- 47 -
ABKÜRZUNGS-VERZEICHNIS	- 48 -
ZIELSETZUNG DER ARBEIT	- 50 -

III ERGEBNISSE - 51 -

1 Veränderung adaptiver Immunantworten durch die Beeinflussung der Antigen-Prozessierung und -Präsentation in dendritischen Zellen	51 -
1.1 Charakterisierung der verwendeten BMDC	51 -
1.2. Veränderung des Oberflächen- und Zytokin-Profiles von dendritischen Zellen durch Aktivierung mit TLR-Liganden	52 -
1.3 Bildung von transienten polyubiquitylierten Protein-Aggregaten während der Aktivierung dendritischer Zellen (DALIS)	54 -
1.4 DALIS-Bildung in BMDC nach Aktivierung mit verschiedenen TLR-Liganden	56 -
1.5 Inhibierung der Caspasen in BMDC während der Aktivierung durch LPS	57 -
1.6 Beteiligung von Hitzeschockproteinen an der DALIS-Bildung	59 -
1.7 Rolle der PI3-Kinase bei der DALIS-Bildung	63 -
1.8 mTOR als Signalmolekül während der BMDC-Aktivierung	66 -
2 Veränderung adaptiver Immunantworten durch die Beeinflussung der Maturation dendritischer Zellen durch natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen	72 -
2.1 Maturation von BMDC in der Gegenwart von nTregs	72 -
2.1.1 Veränderung des Oberflächen- und Zytokin-Profiles der BMDC	72 -
2.1.2 Aktivierung der BMDC mit verschiedenen TLR-Liganden vor der Suppression durch nTregs	75 -
2.1.3 Inhibierung der BMDC-Aktivierung nach kurzer Kokultur mit nTregs	77 -
2.1.4 Hochregulierung von antiinflammatorischen Molekülen auf den BMDC und T-Zell-Aktivierung durch supprimierte BMDC	78 -
2.1.5 Antigen-Aufnahme und -Prozessierung in supprimierten BMDC	83 -
2.2 Mechanismen der Suppression von BMDC durch nTregs	86 -
2.2.1 Zell-Kontakt abhängige Mechanismen der Suppression von BMDC durch nTregs	86 -
2.2.1.1 Untersuchung der schnellen Veränderung des Expressions-Musters auf der BMDC-Oberfläche	86 -
2.2.1.2 Suppression der BMDC durch nTregs ist Zell-Kontakt abhängig	88 -
2.2.1.3 Zell-Kontakt über Gap Junction Intercellular Communication (GJIC)	90 -
2.2.1.4 Blockierung der Gap Junctions in einer Kokultur aus BMDC und nTregs	92 -
2.2.1.5 Die Funktionalität der Gap Junctions lässt sich durch die Übertragung von einem Farbstoff von Zelle zu Zelle nachweisen	96 -
2.2.1.6 zyklisches Adenosin-Monophosphat (cAMP) als Mediator der nTreg-vermittelten Suppression der BMDC-Reifung	99 -
2.2.1.7 Bestimmung der cAMP-Konzentration in nTregs und BMDC	99 -
2.2.1.8 Die Rolle von cAMP während der Suppression der BMDC-Aktivierung	101 -
2.2.1.9 Untersuchungen zur Quelle des erhöhten cAMP-Gehaltes in BMDC	103 -
2.2.1.9.1 Inhibierung der Adenylat-Zyklasen in BMDC	103 -
2.2.1.9.2 Verstärkung der BMDC-Suppression durch Inhibierung der Phosphodiesterasen	105 -
2.2.1.10 Blockierung des cAMP-Signals in BMDC durch einen Antagonisten	106 -
2.2.2 Lösliche Faktoren während der Suppression von BMDC durch nTregs	111 -
2.2.2.1 Synthese von IL-10 während der Kokultur aus dendritischen Zellen und regulatorischen T-Zellen	111 -
2.2.2.2 Bestimmung der IL-10-Quelle in der Kokultur aus BMDC und nTregs	113 -
2.2.2.3 Verminderte nTreg-vermittelte Suppression der BMDC durch Blockieren des IL-10 Rezeptors mit einem Antikörper	115 -
2.2.2.4 Wiederherstellung der Proliferation TCR-transgener T-Zellen durch nTreg-supprimierte BMDC durch Blockierung des IL-10 Rezeptors	118 -
2.2.2.5 BMDC-Suppression durch nTregs aus IL-10 knock out Mäusen	120 -
2.2.2.6 Wiederherstellung der Proliferation TCR-transgener T-Zellen nach BMDC-Suppression durch nTregs aus IL-10 knock out Mäusen	123 -

IV DISKUSSION	- 126 -
1 Veränderung adaptiver Immunantworten durch die Beeinflussung der Antigen-Prozessierung und -Präsentation in dendritischen Zellen	- 127 -
1.1 Veränderung der Antigen-Präsentation durch die Formierung polyubiquitinylierter Protein-Aggregate (DALIS) in aktivierten BMDC	- 127 -
1.2 Beteiligung von Chaperonen in die DALIS-Bildung bzw. deren Abbau	- 128 -
1.3 Signalwege, die zur Bildung von DALIS führen	- 129 -
Zusammenfassung Teil1	- 131 -
2 Veränderung adaptiver Immunantworten durch die Beeinflussung der Maturation dendritischer Zellen durch natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen	- 132 -
2.1 Maturation von BMDC in der Gegenwart von regulatorischen T-Zellen	- 132 -
2.2 Mechanismen der Suppression von BMDC durch nTregs	- 134 -
2.2.1 Zell-Kontakt abhängige Mechanismen der Suppression von BMDC durch nTregs -	134 -
2.2.1.1 Vermittlung der schnellen Veränderung auf den BMDC durch nTregs	- 134 -
2.2.1.2 Interaktion zwischen BMDC und nTregs	- 135 -
2.2.1.3 Wirkung von zyklischem Adenosin-Monophosphat (cAMP) während der Suppression von BMDC durch nTregs	- 137 -
2.2.2 Lösliche Faktoren in der Suppression von BMDC durch nTregs	- 140 -
2.2.2.1 Die Wirkung von IL-10 während der Suppression von BMDC durch nTregs ..	- 140 -
Zusammenfassung Teil2	- 142 -
LEBENS LAUF	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
REFERENZ-LISTE	-144-

I Einleitung

1 Das Immunsystem

Da der menschliche Körper ständig einer Vielzahl potenzieller Pathogene ausgesetzt ist, hat er diverse Strategien entwickelt, sich gegen diese zu schützen. Die Haut und die Schleimhäute stellen die primären Schranken des Körpers dar. Überwinden Erreger diese ersten Barrieren, wird im Körper eine Abwehrreaktion induziert. Man unterscheidet hierbei die nicht adaptive (angeborene) von der adaptiven (erworbenen) Immunantwort.

Die nicht adaptive Immunantwort stellt eine schnelle Reaktion dar. Bei den hier beteiligten Zellen handelt es sich vor allem um Makrophagen, dendritische Zellen, natürliche Killerzellen, Mastzellen und Granulozyten. Dendritische Zellen, Makrophagen und Granulozyten gehören zu den Antigen Präsentierenden Zellen (APC) und bilden die Verbindung zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem (Akira et al., 2001). Zu ihren Aufgaben gehört es, körperfremde Stoffe (Antigene) aufzunehmen, diese im Inneren in kleine Fragmente (Peptide) zu zerlegen und auf der Oberfläche in Kombination mit MHC-Molekülen T-Zellen zu präsentieren und somit eine adaptive Immunantwort auszulösen. Zusätzlich zu den verschiedenen Zelltypen sind bei der angeborenen Immunantwort lösliche Faktoren, wie die Proteine des Komplementsystems involviert. Dieses besteht aus einer komplexen Reihe von Enzymen, die sich gegenseitig kaskadenartig aktivieren und so zur Opsonisierung und Neutralisation von Antigenen führen können. Ziel der angeborenen Immunantwort ist es, ein möglichst breites Spektrum an Erregern schnell zu erkennen und zu zerstören. Zu diesem Zweck exprimieren die Zellen des angeborenen Immunsystems verschiedene Rezeptoren, die in und auf Pathogenen vielfach vorkommende Strukturen erkennen (*Pathogen-Associated Molecular Pattern, PAMP*). Zu diesen Rezeptoren zählen die Toll-like Rezeptoren, wie zum Beispiel TLR-4, welcher das Lipopolysaccharid aus der Zellmembran gram-negativer Bakterien erkennen kann.

Das adaptive Immunsystem kann im Vergleich zum angeborenen eine sehr viel speziellere Immunantwort auslösen. Man unterscheidet hier weiterhin zwischen zellulärer und humoraler ([lat.] Humor: Flüssigkeit) Antwort. Die zelluläre Immunantwort wird von T-Zellen vermittelt, wobei die Verbindung von angeborener und adaptiver Immunantwort durch Antigen Präsentierende Zellen entsteht. Die APC

präsentiert hierbei Teile der aufgenommenen Pathogene auf ihrer Oberfläche, die T-Zellen erkennen können und dadurch im Folgenden aktiviert werden. Es gibt CD4 positive und CD8 positive T-Zellen, die sich in ihrer Reaktion auf ein präsentiertes Antigen unterscheiden. Während die CD4 positiven T-Zellen Zytokine produzieren und ausschütten um weitere Zellen anzulocken, können CD8 positive T-Zellen durch ausschütten lytischer Granula aus ihrem Inneren infizierte Zellen direkt angreifen und diese zerstören. Bei der humoralen Immunantwort werden von B-Zellen große Mengen an Antikörpern gebildet. Die B-Zelle benötigt dabei Hilfe von CD4 positiven T-Zellen (T-Helfer-Zellen). Antikörper können sowohl in gebundener Form, also auf der Oberfläche von B-Zellen, als auch frei wirken.

Die Rezeptoren, die bei der adaptiven Immunantwort eine Rolle spielen befinden sich auf T- und B-Zellen. Diese Zellen besitzen, im Kontrast zu den Zellen des angeborenen Immunsystems, nur Rezeptoren einer Spezifität, die auf jeder Zelle unterschiedlich ist. Das bedeutet, dass alle T-Zell-Rezeptoren bzw. B-Zell-Rezeptoren einer Zelle die gleiche Spezifität aufweisen. Um eine starke Antwort auszulösen, müssen diese Zellen sich erst durch klonale Expansion vermehren, was zeitaufwendig ist. Nach Ende der Immunantwort bleibt nur ein kleiner Teil der neu gebildeten Zellen für ein immunologisches Gedächtnis erhalten, die restlichen Zellen werden eliminiert. Durch das Gedächtnis kann eine erneute Antwort auf dasselbe Pathogen schneller anlaufen.

Einfache Immunsysteme finden sich schon bei Insekten und sind in Wirbeltieren zu komplexen Systemen aus vielen Faktoren ausgereift, die funktionell ineinandergreifen und es in ihrer Redundanz nicht einfach machen einzelne Reaktionswege zu verfolgen oder zu verändern.

2 Das angeborene Immunsystem

2.1 Die Zellen des angeborenen Immunsystems

Bei einer Immunantwort sind viele verschiedene Zelltypen beteiligt. Sie lassen sich aufgrund ihrer Funktionen und ihrer Herkunft einteilen. Die Zellen des Immunsystems stammen von pluripotenten hämatopoetischen Zellen aus dem Knochenmark ab. Diese teilen sich und differenzieren in zwei Typen von spezialisierten Stammzellen, die myeloiden und die lymphoiden Stammzellen. Aus lymphoiden Stammzellen können sowohl T- oder B-Zellen, sowie natürliche Killerzellen und auch dendritische Zellen differenzieren. Aus den myeloiden Vorläuferzellen können alle anderen Blutzellen entstehen. Dazu gehören Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten (basophile, eosinophile, neutrophile), Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen. Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems gehören dendritische Zellen, Makrophagen, Monozyten, Mastzellen, natürliche Killerzellen (NK) und Granulozyten. Diese Zellen sind entweder in der Lage, Zytokine oder andere Mediatoren zu bilden und auszuschütten oder es handelt sich um phagozytierende Zellen, die Antigene aufnehmen können. Da in dieser Arbeit mit dendritischen Zellen gearbeitet wurde, sollen diese Zellen im Speziellen vorgestellt werden.

2.2 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DC) gehören zusammen mit den B-Zellen und Makrophagen zu den Antigen Präsentierenden Zellen (APC). Ihren Namen erhielten sie aufgrund ihres mikroskopischen Erscheinungsbildes ([griech.] dendros = Baum). Trotz ihrer Namensverwandtschaft gehören sie nicht zu den Nervenzellen. Erstmals beschrieben wurden sie von Paul Langerhans (Langerhans-Zellen), der sie schon 1868 in der Haut identifizieren konnte. Sehr viel später erst wurden DC in der Milz von Mäusen nachgewiesen (Steinman et al., 1975). Heute weiß man, dass es viele verschiedene Subpopulationen von DC gibt und dass man z.B. in Lymphknoten bis zu fünf Arten von DC finden kann. Die Hauptfunktion ist allerdings bei allen DC gleich: die Antigen-Aufnahme und -Präsentation.

DC gehören keinem Gewebeverband an, sondern sind frei bewegliche Zellen, die im Körper durch Blut und Lymphe zirkulieren. Unreife DC finden sich gewöhnlich in peripheren nicht lymphatischen Geweben. Hier sind die DC noch klein und rundlich und exprimieren nur wenige der kostimulatorischen Moleküle (z.B.: B7-Moleküle), die für die T-Zell-Aktivierung essentiell sind. MHC-Moleküle sind zwar schon in

ausreichender Zahl auf ihrer Oberfläche vorhanden, doch diese sind noch mit körpereigenen Peptiden beladen. Dies geschieht entweder, wenn das Antigen schon in der Zelle ist, wie beispielsweise in Virus-infizierten Zellen. In diesem Fall produziert die Zelle die Antigen-Peptide selbst. Diese Peptide werden anschließend auf MHC-I-Moleküle geladen und dienen an der Zell-Oberfläche der T-Zell-Aktivierung. Im zweiten Szenario treffen unreife DC auf ein Antigen, nehmen dieses durch Makropinozytose, Phagozytose oder rezeptorvermittelte Endozytose (z.B.: DEC205, Mannose-Rezeptor,...) in sich auf und prozessieren es (Janeway and Medzhitov, 2002). Die Peptid-Fragmente, die aus diesem endosomalen Verdau resultieren, werden anschließend auf neu synthetisierte MHC-II Moleküle geladen und können an der Zell-Oberfläche T-Zellen präsentiert und so eine adaptive Immunantwort initiiert werden. Während der der Zeitspanne der Antigen-Aufnahme und der Antigen-Präsentation verändert sich die DC. Zunächst verliert sie die Fähigkeit noch weitere Antigene aufzunehmen. Dann wird die Expression von Oberflächen-Molekülen, die zur T-Zell-Aktivierung beitragen, verstärkt. Neben den B.7-Molekülen CD80 und CD86 (CD: Cluster of Differentiation) werden auch die Expression von CD70, ICOS-L, Ox40L und CD40 hochreguliert. Zusätzlich wird eine Vielzahl von Zytokinen (IL-6, IL-12) und Chemokinen (MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES) sezerniert, was zur Folge hat, dass weitere Zellen angelockt werden, die ebenfalls Antigen internalisieren können. Während dem Prozess der Reifung benötigt die DC selbst auch Zytokine wie TNF- α , GM-CSF und beim Menschen IL-4.

Sobald eine DC ein Antigen aufgenommen hat und beginnt dieses zu prozessieren, migriert die Zelle zu einem drainierenden Lymphknoten. Dabei spielen Chemokine und deren Rezeptoren eine entscheidende Rolle. Hierbei sind der Chemokin-Rezeptor CCR7 und seine Liganden CCL19 und CCL21 im Besonderen zu nennen. Experimente mit CCR7 knock out Mäusen haben gezeigt, dass die Migration der DC sehr stark von dessen Expression abhängt (Ohl et al., 2004). Zusätzlich zu den aktivierten DC, die ein Antigen aufgenommen haben, wandern auch unreife DC zu den Lymphknoten. Diesen Zellen fehlen die kostimulatorischen Moleküle zur T-Zell-Aktivierung, außerdem tragen sie auf ihren MHC-Molekülen körpereigene Peptide. Ihre Aufgabe ist die Induktion von Toleranz (periphere Toleranz). Treffen diese DC im Lymphknoten auf T-Zellen, die einen spezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR) für ihren MHC-Peptid-Komplex tragen, werden die T-Zellen nicht aktiviert, da das zweite kostimulatorische Signal der DC fehlt. Die T-Zelle wird darauf hin anerg, was

bedeutet, dass die Zelle in einen passiven Zustand fällt, in dem eine Aktivierung der Zelle nicht möglich ist.

Die reifen DC in den sekundären lymphatischen Organen sezernieren proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-12, IL-18 und IL-23 (Banchereau and Steinman, 1998). Die Funktion dieser Zytokine ist das Anlocken von weiteren Zellen. Wenn eine aktivierte DC auf die T-Zelle mit dem passenden TCR für ihren MHC-Peptid-Komplex trifft, führt dies zur Aktivierung der T-Zelle. Reife DC wirken als stärkste Stimulatoren der T-Zell-Aktivierung.

Heute spielen DC eine wichtige Rolle in der Immuntherapie von Tumoren (Schnurr et al., 2002). Die Vorläufer-Zellen (Monozyten) können einfach aus menschlichem Blut gewonnen werden und mithilfe von z.B.: TLR-Liganden maturiert werden. Zusätzlich setzt man sie aufbereitetem Tumor-Material aus, das die Zellen aufnehmen und prozessieren. Bringt man anschließend diese Zellen wieder in den Körper, sind sie in der Lage T-Zellen zu aktivieren, die dann ihrerseits den Tumor angreifen können. Diese Therapie ist im Gegensatz zu den etablierten nebenwirkungsarm, kann diese jedoch aktuell noch nicht ersetzen, sondern allenfalls unterstützen.

2.3 Rezeptoren des angeborenen Immunsystems (Pattern Recognition Receptors (PRR))

Das angeborene Immunsystem besitzt einen höheren Grad an Spezifität als zunächst angenommen wurde. Verantwortlich dafür ist unter anderem eine konservierte Rezeptorfamilie, die IL-1R/TLR-Superfamilie (Kaisho and Akira, 2001). Zur Familie der PRR gehören die Toll-like Rezeptoren. Toll wurde ursprünglich in *Drosophila* identifiziert, wo es wichtig für die dorso-ventrale Polarisierung während der Ontogenese ist. Des Weiteren ist Toll in der Lage, die Fliege vor Infektionen zu schützen, da es für antimikrobielle Peptide kodiert. Janeway und Medzhitov (Medzhitov et al., 1997) identifizierten später den ersten humanen Toll-like Rezeptor (TLR), TLR4, der Lipopolysaccharide (LPS) auf der Oberfläche von Gram-negativen Bakterien erkennt. Zurzeit sind für den Menschen 10 und für die Maus 13 Toll-like Rezeptoren definiert, wobei die Zahl in den letzten Jahren stetig gestiegen ist. Die Komponenten der Mikroorganismen, die über TLR und andere PRR erkannt werden, können in Lipide (LPS), Proteine (Flagellin) und Nukleinsäuren (dsRNA, ssRNA) eingeteilt werden. Einige von ihnen erkennen ihre Liganden direkt, wie zum Beispiel TLR3 und TLR5. Andere benötigen zusätzliche Proteine und weitere Rezeptoren zur

Erkennung ihrer Liganden, wie der TLR4 (CD14, MD2, LBP). Alle Mitglieder der IL-1R/TLR-Superfamilie sind Transmembran-Proteine und lassen sich in zwei Subklassen unterteilen, die IL-1R-Familie und die TLR-Familie. Die Rezeptoren der TLR-Familie können Homo- und Heterodimere bilden und enthalten auf der extrazellulären Seite ein Leucinreiches Motiv (Leucin-Rich Repeats, LRR) (Gay et al., 1991), das die Erkennung des Liganden gewährleistet. Zur IL-1R/TLR-Superfamilie gehören neben den Toll-like Rezeptoren natürlich Toll selbst, sowie einige zytosolische Proteine aus Pflanzen, die an der Abwehr fungaler Infektionen beteiligt sind (Lemaitre et al., 1996).

Fast alle Mitglieder der IL-1R/TLR-Superfamilie besitzen auf der zytoplasmatischen Seite eine TIR-Domäne (Toll-IL-1R-Domäne). Sie bewirkt über Protein-Protein-Wechselwirkung die Signalweiterleitung ins Zellinnere. Über diese Domäne ist es möglich mit anderen Proteinen, die auch eine solche TIR-Domäne tragen zu interagieren. Hierzu enthält sie 3 konservierte Sequenzmotive (Box1, 2, 3) und weist eine Länge von circa 200 Aminosäuren auf (Bowie and O'Neill, 2000).

Einige der Toll-like Rezeptoren sind auf der Zelloberfläche lokalisiert (TLR1, 2, 4, 5, 6). Nach Aktivierung durch ihren spezifischen Liganden, werden sie in Phagosomen aufgenommen und ins Zellinnere geschleust. Im Gegensatz dazu werden andere TLR in Endosomen exprimiert. Zu ihnen gehören die Rezeptoren, die für das Erkennen von genetischem Material, das bei der Replikation von Viren/Bakterien auftritt, verantwortlich sind (TLR3, 7, 8, 9). Nicht alle TLR werden auf bzw. in allen DC-Populationen exprimiert. In pDC (plasmazytoiden DC) werden nur TLR7/8 und 9 exprimiert. Das macht diese Zellpopulation zu Spezialisten in der Virus-Abwehr. Nach der Ligation der TLR synthetisieren pDC große Mengen an Typ 1 Interferonen (IFN- α , IFN- β). Im Nachfolgenden werden einige für diese Arbeit relevante TLR mit den zugehörigen Liganden aufgeführt.

Rezeptor	Ligand	Herkunft des Liganden
TLR2	Lipoproteine	Verschiedene Pathogene
	Peptidoglykane	Gram positive Bakterien
	Lipoteichonsäuren	
	Glykoinositolphospholipide	<i>Trypanosoma cruzi</i>
	Glykolipide	<i>Treponema maltophilum</i>
	Porine	<i>Neisseria</i>
	Zyimosan (Heterodimer aus TLR2/6)	Hefe (<i>S. cerevisiae</i>)

	Lipopeptide wie: Pam3Cys (3*Palmitoyl an Cystein-Serin-Lysin-Lysin-Lysin-Lysin, (-SKKKK))	Wirt (host)
TLR3	Doppelsträngige RNA, Poly(I:C) (poly-Inosin-poly-Cytosin-Säure)	Viren
TLR4	Lipopolysaccharide (LPS) Hsp60, Hsp70, Hsp90	Gram-negative Bakterien Host
TLR5	Flagellin	Geißel verschiedener Bakterien
TLR6	Lipoteichonsäuren Zymosan (Heterodimer aus TLR2/6)	Gram-positive Bakterien Hefe (<i>S. cerevisiae</i>)
TLR7	Imidazoquinoline (R848, Resiquimod; R837, Imiquimod) Loxoribine, Bropirimine Einzelstrang-RNA	Synthetische Moleküle Viren
TLR8	Imidazoquinoline Einzelstrang-RNA	Synthetische Moleküle Viren
TLR9	CpG enthaltende DNA-Sequenzen	Bakterien und Viren

2.4 Signalweiterleitung durch PRR

Allgemein gesehen, kann man PRR nach ihrer Arbeitsweise unterscheiden. Oft werden Pathogene oder schädliche Moleküle, wie Toxine von Bakterien, mit opsonisierenden Molekülen (Komplement, C-reaktives Protein) beladen, um den APC das Signal zur Phagozytose zu übermitteln. Rezeptoren wie der scavenger-Rezeptor oder der Mannose-Rezeptor binden die Moleküle/Pathogene und werden anschließend internalisiert und abgebaut. Dabei sind die Rezeptoren nicht direkt an der Signalweiterleitung beteiligt. Andere PRR besitzen besondere Domänen, über die sie direkt mit anderen Proteinen interagieren können und somit ein Signal ins Zellinnere leiten können. Außer den Toll-like Rezeptoren gehören zu diesen Signal gebenden PRR auch Nod-Moleküle, RIG-I und Mda-5. Die Nod-Moleküle (Nucleotide-binding oligomerization domains, auch: Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors, NLR), Nod1 und Nod2 sind zytoplasmatische Proteine, die wie die TLR Leucinreiche Motive aufweisen, über die sie Peptidoglykane, die in der Zellwand Gram-positiver Bakterien vorkommen, erkennen und durch CARDs (Caspase recruitment Domains) weiterleiten. Weitere Nod-Moleküle sind bekannt. Sie alle können sowohl MAP-Kinasen (Mitogen Associated Protein Kinases) als auch den Transkriptionsfaktor NF κ -B und somit die Zelle aktivieren. RIG-I (Retinoic acid Inducible Gene-I) und Mda-5 (Melanoma

differentiation-associated gene 5) sind ebenfalls zytoplasmatische Proteine, die doppelsträngige RNA (dsRNA) erkennen, wie auch der TLR3. dsRNA entsteht bei der Replikation von Viren als Zwischenprodukt. RIG-I und Mda-5 besitzen eine Helikase-Domäne, die der Erkennung der dsRNA und zwei CARDs, die das Signal übermitteln. Das wichtigste Adaptor-Molekül im Signalweg der beiden PRR, der zur Aktivierung von NF κ B und IRF-3 (Interferon Regulatory Factor-3) führt, ist IPS-1 (Interferon Promotor Stimulator-1). Nach der Erkennung von viralen Bestandteilen synthetisiert die Zelle große Mengen an Interferon Typ 1 (IFN- α , IFN- β) und anderen proinflammatorischen Zytokinen. Kato und Kollegen konnten kürzlich zeigen, dass RIG-I und Mda5 die RNA unterschiedlicher Viren erkennen. Somit sind sie nicht redundant, jedes Molekül besitzt seine eigenen Aufgaben. Mda5 kann, wie der TLR3, Poly(I:C) erkennen und die RNA einiger Viren, RIG-I besitzt eine andere Spezifität (Kato et al., 2006). Die Sequenzen der Bindungsstellen sind derzeit noch nicht vollständig aufgeklärt.

2.5 Signalübertragung durch Toll-like Rezeptoren

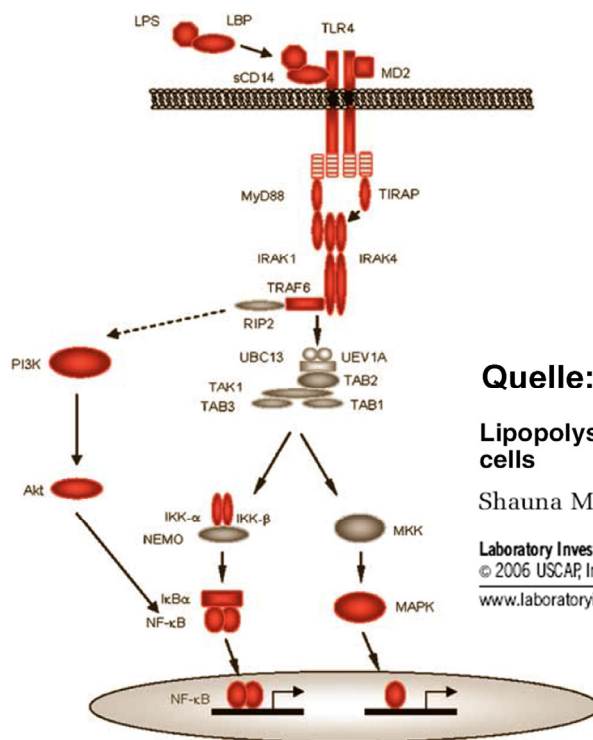
Nach der Bindung eines Liganden an seinen TLR, laufen in der Zelle stark konservierte Signalwege ab. Hier soll das Beispiel LPS-TLR4 beschrieben werden. Dabei bindet LPS zunächst an LBP (LPS Binding Protein), welches frei außerhalb der Zelle vorkommt (akute Phase Protein) und die Aufgabe hat, das LPS als Monomer zur Zelle zu transportieren. Dieser Komplex bindet anschließend an CD14, einen Rezeptor, der auf der APC exprimiert wird. Die Aktivierung von TLR4 ist ohne CD14 nicht möglich, da dieses Molekül die Übertragung von LPS auf den TLR erst ermöglicht. Sowohl CD14 als auch LBP weisen Leucinreiche Motive auf, die das LPS erkennen. Der Komplex (LPS-LBP-CD14) bindet an den Toll-like Rezeptor, welcher daraufhin dimerisiert. Ein weiteres Molekül ist für diese Bindung essentiell. MD2, ein Glykoprotein, das von der Zelle sezerniert wird, bindet an den extrazellulären Teil des TLR und ermöglicht dessen Bindung an das Lipid A des LPS. Experimente mit MD2 knock out Mäusen haben gezeigt, dass ohne dieses Molekül die Aktivierung von TLR-4 durch Lipid A nicht möglich ist. (Nagai et al., 2002).

Zur Signalweiterleitung bindet die TIR-Domäne auf der zytoplasmatischen Seite des TLR an die TIR-Domäne eines Adaptor-Moleküls. Im Fall von TLR4 handelt es sich hierbei um MyD88 (Myeloid Differentiation primary-response protein 88). Neben diesem Molekül stehen in der Zelle noch weitere TIR-Domäne enthaltende Proteine

zur Verfügung. MyD88 spielt aber bei den meisten TLR (außer TLR3) die entscheidende Rolle. N-terminal trägt es eine Signal-Sequenz, die sogenannte Todes-Domäne (Death Domain, DD), die homotypisch mit der Todes-Domäne der Serin/Threonin-Proteinkinase IRAK4 (IL-1R Associated Kinase 4) interagiert, wodurch eine Assoziation mit IRAK1 (über die DD) möglich wird. Zwei weitere IRAK-Moleküle sind definiert (IRAK2, IRAK-M), wobei man für diese lange Zeit keine Kinase-Aktivität nachweisen konnte. Kürzlich konnte jedoch eine direkte Beteiligung von IRAK-2 gezeigt werden (Kawagoe et al., 2008), wobei das Molekül nicht für das initiale Signal mit verantwortlich ist, sondern während der späteren Phase der Aktivierung der Zelle das Signal des TLR aufrecht erhält. Die Mitglieder der IRAK-Familie sind in der Signalkaskade von TLR2 und TLR4 an Tollip (Toll interacting protein) gebunden, das als Inhibitor wirkt und durch MyD88 verdrängt werden kann. Dadurch wird der IRAK-Komplex phosphoryliert und somit aktiviert. Nach der Phosphorylierung der IRAK-Moleküle durch MyD88 dissoziieren diese wieder vom Komplex weg und treten mit TRAF6 (Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor-6) in Verbindung. TRAF6 verlässt anschließend mit IRAK1 den Rezeptorkomplex und bindet an der Plasmamembran TAK1 (Transforming growth factor- β -Activated Kinase 1), TAB1 (TAK1-Binding protein 1) und TAB2. In diesem Komplex kann TAK1 durch TAB1 aktiviert werden und TAB2 vermittelt die Bindung des aktivierten TAK1 an TRAF6. IRAK1 wird an dieser Stelle abgespalten und der Rest des Komplexes wandert ins Zytosol. Es wurde ein weiteres TAB-Molekül identifiziert (TAB3), das auch mit TAK1 interagiert und zur Aktivierung von NF κ B führt (Cheung et al., 2004). Der TAK1-TAB-TRAF-6-Komplex bindet im Zytoplasma an TRIKA (TRAF-6-regulated IKK Activator), ein dimeres Ubiquitin-konjugierendes Enzym, das aus den Ubiquitin-Ligasen UBC13 (Ubiquitin Conjugating enzyme 13) und UBE1A (Ubiquitin conjugating Enzyme E2 variant 1) besteht. Diese beiden Moleküle verlinken TRAF6 mit einer Poly-Ubiquitin-Kette am Lysin 63 (K63). Ubiquitin ist ein kleines Protein (8,5 kDa, 76 Aminosäuren), das zur Markierung von Proteinen benutzt wird. Ubiquitin bindet an Lysin, je nachdem, ob es an Lysin48 oder Lysin63 gebunden wird, werden die markierten Proteine vor einem Verdau durch das Proteasom geschützt (K48) oder nicht (K63). Das ubiquitinylierte TRAF6 kann anschließend TAK1 aktivieren (Deng et al., 2000). Das aktivierte TAK1 ist nun in der Lage verschiedene Signalwege aktivieren. Zu diesen gehören einerseits MAP-Kinasen (Mitogen-Assoziierte Protein Kinasen) und andererseits NF- κ B. NF- κ B ist ein

Transkriptionsfaktor, aus einer Familie von 5 Mitgliedern (p65 (REL-A), REL-B, cytoplasmic REL, p50 und p52). Sie wirken als Homo- und Heterodimere (p50 und p65) und sind für die Regulation vieler Gene verantwortlich, wurden aber ursprünglich als Faktor für die Expression der leichten Antikörperkette Kappa in B-Zellen identifiziert. Es sind zytoplasmatische Proteine, die durch Bindung an I κ B in inaktivem Zustand gehalten werden. I κ B kann durch einen inhibitorischen Komplex, den IKK-Komplex (I κ B-Kinase-Komplex) phosphoryliert und damit abgespalten werden. IKK besteht aus zwei katalytischen Untereinheiten IKK α , IKK β und der regulatorischen Untereinheit IKK γ (NF- κ B Essential Modulator, NEMO). Das freie NF- κ B transloziert anschließend in den Zellkern und bewirkt hier die Transkription von proinflammatorischen Zytokinen. Zusätzlich induziert es auch eine Neusynthese von I κ B. Dadurch begrenzt das Molekül seine eigene Wirkung.

TAK1 kann nicht nur NF- κ B sondern auch MAP-Kinasen aktivieren. Zu dieser Familie gehören JNK (c-Jun NH2-terminal Kinase), p38 und ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase). Über den MAP-Kinasen-Signalweg werden andere Transkriptionsfaktoren aktiviert. Zu ihnen gehört AP-1, ein Dimer aus Jun, Fos, ATF oder Mitglieder der Maf-Familie. Diese veranlassen im Nukleus das Ablesen und somit die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6, IL-12 und TNF- α sowie kostimulatorischer Oberflächen-Moleküle wie CD80, CD86.



Quelle:

Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells

Shauna M Dauphinee^{1,2} and Aly Karsan^{1,2,3,4}

Laboratory Investigation (2006) 86, 9–22
 © 2006 USCAP, Inc All rights reserved 0023-6837/06 \$30.00
www.laboratoryinvestigation.org



Abb. A: Signalübertragung über LPS und TLR-4.

2.6 Weitere Toll-Signalwege

Außer dem hier beschriebenen MyD88-abhängigen Signalweg wurde noch eine andere Möglichkeit der Signalübertragung definiert. In MyD88 defizienten Mäusen wurde festgestellt, dass die Antwort auf TLR2, 4, 5, 7, und 9 ausbleibt. Die Mäuse synthetisierten weder TNF- α noch IL-6 nach Administration der entsprechenden Stimuli. Das ließ darauf schließen, dass MyD88 ein essentielles Protein in der Signalkaskade darstellt. Nach Stimulation mit Poly(I:C), das über den TLR3 erkannt wird, zeigten die Tiere eine normale Antwort. Dieser Signalweg beinhaltet das alternative Adaptor-Molekül TRIF (TIR-containing adaptor inducing IFN- β , auch: TICAM1 oder TIRAP1) (Yamamoto et al., 2002). Der dazu gehörende Signalweg führt auch zur Aktivierung von NF- κ B, hat aber zusätzlich die Aufgabe, den Promotor für Interferon- β zu aktivieren. Hier sind unter anderem Interferon regulierende Faktoren (IRF) beteiligt, wobei IRF-3 eine besondere Stellung einnimmt. Die Aktivierung von IRF3 erfolgt dadurch, dass TRIF an IKK ϵ (IKKi) und TBK1 (TRAF family member-Associated NF- κ B activator, (TANK) Binding Kinase 1) bindet.

Studien haben gezeigt, dass verschiedene TLR-Liganden kombinierbar sind. So erreicht man eine stärkere Aktivierung der Zelle, wenn diese über mehrere Signalwege gleichzeitig stimuliert wird. Dabei stellte sich heraus, dass sich die Kombination aus dem TLR3-Ligand (Poly(I:C)) und dem TLR7-Ligand (R848, R837) am besten eignet. Hierbei wird sowohl der MyD88 abhängige als auch der TRIF abhängige Weg angesprochen (Warger et al., 2006) (Bohnenkamp et al., 2007).

TIR-Domäne tragende Proteine sind in der Natur weit verbreitet. Außer bei Mensch und Maus kommen sie auch in weiteren Säugetieren, Einzellern, Insekten und Amphibien vor (O'Neill and Bowie, 2007). Die meisten von ihnen sind an der Abwehr von Pathogenen beteiligt. Außer MyD88 und TRIF sind noch weitere TIR-Domäne enthaltenden Adaptor-Proteine bekannt. TIRAP (TIR domain-containing Adaptor Protein) / MAL (MyD88 Adaptor-Like) spielt eine wichtige Rolle während des MyD88-abhängigen Signalweges für TLR2 und TLR4. Ein viertes Molekül TRAM (TICAM-2, TIRAP-2) wurde beschrieben. Es ist am TRIF abhängigen TLR4 Signalweg beteiligt. MAL/TIRAP und TRAM sind nicht frei im Zytoplasma wie TRIF oder MyD88, sondern an der Plasmamembran verankert. Das letzte Molekül, SARM (Sterile α - and Amardillo-Motif containing protein) besitzt 2 SAM (Sterile α -Motifs). Es ist ein stark konserviertes Molekül, dessen Ursprung in *Caenorhabditis elegans* nachgewiesen werden konnte. Es induziert im Gegensatz zu den anderen TIR-Domäne tragenden

Proteinen nicht die Aktivierung von NF- κ B und scheint den TLR Signalweg eher zu inhibieren als zu aktivieren (O'Neill and Bowie, 2007). In knock down Experimenten konnte eine verstärkte Aktivierung der Zellen nach TLR-Stimulation gezeigt werden. Um eine Zelle zu aktivieren, gibt es viele Möglichkeiten, wobei die meisten Signalwege vielfach miteinander verzweigt sind. Das macht die Identifizierung und Aufklärung solcher Wege schwierig. An den Toll-like Rezeptoren und ihrer Signalgebung wird das sehr deutlich. Es ist von außerordentlicher Wichtigkeit für die Zelle viele Moleküle in ihre Aktivierung, aber auch in Beendung der Aktivierung zu involvieren. Durch dieses Zusammenspiel ist es möglich die Zelle nicht nur „an“ bzw. „aus“ zuschalten, sondern genau auf die gegebenen Parameter einzugehen und entsprechend zu reagieren.

2.7 Antigen-Prozessierung und -Präsentation

Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten, Fremd-Antigene T-Zellen zu präsentieren. Exogene, also von außen aufgenommene Antigene werden auf MHCII-Molekülen und endogene Antigene, wie zum Beispiel Fragmente von Viren innerhalb der Zellen werden auf MHCI-Molekülen präsentiert.

Alle MHC-Moleküle werden im Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex, MHC) kodiert. Er wird auch als HLA (Human Leukocyte Antigen; Maus: H2) bezeichnet. Diese Proteine und die für sie kodierenden Gene wurden entdeckt, als man Abstoßungs-Reaktionen bei Organtransplantationen untersuchte. Die MHC-Moleküle lassen sich in zwei große Klassen unterteilen, MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II, wobei es je mehrere Hauptgene für MHCI (Mensch: HLA-A, -B, -C; Maus: H-2K, D, L) und MHCII (Mensch: HLA-DR, -DP, -DQ; Maus: H-2A - H-2E) gibt. Der MHC ist aber nicht nur polygen, sondern auch polymorph. Manche der Gene haben bis zu 200 Allele, nur der DR- α -Lokus ist monomorph (Maus: E α). Der MHC-Polymorphismus entsteht durch verschiedene genetische Vorgänge wie Punktmutationen, genetische Rekombination und Genkonversion. Die Expression der MHC-Gene ist kodominant, jeder Mensch kann also bis zu 6 verschiedene MHCI-Moleküle und 6 verschiedene MHCII-Moleküle exprimieren. Die Expression der MHC-Moleküle wird durch Zytokine reguliert, so wird MHCI von IFN- γ reguliert.

Der MHCI-Peptid-Komplex wird durch CD8 positive und der MHCII-Peptid-Komplex durch CD4 positive T-Zellen erkannt. Das MHCI-Molekül besteht aus einer α -Kette,

die drei Domänen aufweist ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$) und einem β_2 -Mikroglobulin, das nicht im MHC kodiert wird. Die Bindung zwischen den beiden ist nicht kovalent. $\alpha 1$ und $\alpha 2$ bilden eine geschlossene Peptid-Bindungstasche, wobei der obere Teil aus zwei α -Helices und der untere Teil aus zwei β -Faltblättern besteht. Die Peptide, die in die Bindungs-Tasche passen haben eine Größe von 8 bis 10 Aminosäuren. $\alpha 3$ besitzt eine Transmembran-Domäne, mit der das MHC-Molekül in der Zellmembran verankert ist. Wie bereits erwähnt, präsentieren MHCI-Moleküle Peptide von zytosolischen Pathogenen. Sie werden auf allen kernhaltigen Zellen des Körpers exprimiert. Es kann vorkommen, dass auch exogene Antigene auf MHCI-Molekülen präsentiert werden. Dieses Phänomen bezeichnet man als Cross-Präsentation (Singh-Jasuja et al., 1999).

MHCII-Moleküle sind ebenfalls Heterodimere und bestehen aus einer α - und einer β -Kette. Sie werden beide im MHC kodiert und besitzen je eine Transmembran-Domäne zur Verankerung in der Membran. Beide Ketten bestehen aus zwei Untereinheiten ($\alpha 1$, $\alpha 2$; $\beta 1$, $\beta 2$). Auch die Ketten des MHCII sind nicht kovalent verbunden. Die Peptidbindungsfurche wird aus $\alpha 1$ und $\beta 1$ geformt. Diese bildet im Gegensatz zu MHCI keine geschlossene Tasche, sondern ist an beiden Seiten offen, so dass in ihr größere Peptid-Fragmente präsentiert werden können, da sie an beiden Seiten überlappen können (mindestens 13 Aminosäuren). MHCII-Moleküle kommen vorwiegend auf APC vor und präsentieren Peptide, die im endosomalen Protein-Abbau aus exogenen Antigenen entstehen.

Für die Präsentation auf dem MHCII-Molekül muss das Antigen nach seiner Aufnahme durch die APC im Zellinneren in kurze Peptid-Fragmente zerlegt werden. Das Antigen wird zu diesem Zweck in ein Vesikel aufgenommen, dem Phagosom. Darin wird es ins Zellinnere transportiert. Dort fusioniert das Phagosom mit einem Lysosom zum Phagolysosom. Die im Lysosom enthaltenen sauren Proteasen (Cathepsin-S und -L) sind in der Lage das Antigen in kleine Teile zu spalten (Villadangos et al., 1999). Das Phagolysosom wandert unterdessen im Zytoplasma zum endosomalen Kompartiment. Auch neu synthetisierte MHCII-Moleküle werden dorthin transportiert. Solange die MHCII-Moleküle noch nicht mit Peptiden beladen sind, muss die Peptid-Tasche blockiert werden. Dies wird durch die invariante Kette (Ii) gewährleistet. Hierbei lagern sich 3 α - und 3 β -Ketten zusammen und bilden mit 3 Ii einen Komplex, in dem jede einzelne Komponente an Calnexin gebunden ist. Die Ii dient nicht nur der Blockierung und Stabilität des MHC-Moleküls, sondern ist auch für

den Transport von MHCII zum endosomalen Kompartiment, wo die Beladung mit dem Peptid erfolgt, wichtig. Dort angekommen wird die invariante Kette abgespalten. Es bleibt nur noch ein kleiner Rest, das so genannte CLIP (Class II-associated Invariant-chain Peptide), welches die Peptid-Bindungsstelle vor Beladung schützt. Das CLIP wird letztendlich mit Hilfe von M-Molekülen (Maus: H-2M, Mensch: HLA-DM) entfernt. Diese stabilisieren das leere MHCII-Molekül und sorgen für die Beladung mit einem geeigneten Peptid. Die Bindung zwischen Peptid und MHC-Molekül wird durch Wasserstoffbrücken stabilisiert. Die fertigen MHC-Peptid-Komplexe werden anschließend an die Zelloberfläche transportiert und können dort der Präsentation dienen. Die so aufgenommenen und verarbeiteten Antigene werden zu den nächst gelegenen Lymphknoten oder der Milz transportiert und dort naiven T-Zellen präsentiert.

Auf MHCI-Molekülen werden, im Gegensatz zu MHCII, Peptide präsentiert, die die Zelle selbst synthetisiert hat. Diese Peptide stammen von Proteinen und müssen von einem Enzym-Komplex, dem Proteasom verdaut werden, bevor sie auf die MHCI-Moleküle geladen werden können. Hier unterscheidet man das Immuno-Proteasom und das konstitutive Proteasom. Beide sind zylindrische Komplexe, die in ihrer Spezifität unterschieden werden können. Das Immuno-Proteasom besteht aus 28 Untereinheiten, die in 4 Ringen übereinander gelagert sind. Der Komplex besitzt 3 aktive Proteasen, LMP-2, LMP-7 und MECL-1, welche konstitutive Untereinheiten ersetzen. Ihre Expression verändert also die Spezifität des Proteasoms. Das konstitutive Proteasom besitzt ebenfalls 3 aktive Proteasen: delta, M β 1 und Z. Die im Zytosol entstandenen Peptide werden über bestimmte Transport-Proteine, so genannte TAP-Transporter (Transporter Associated with Antigen Processing) in das endoplasmatische Retikulum (ER) gebracht. Bei dieser Art von Transport-System handelt es sich um einen ABC-Transporter, welcher einen ATP-abhängigen Transport von Zuckern, Ionen, Aminosäuren und Peptiden durch Membranen gewährleistet (retrograder Transport). Die TAP-Transporter bestehen aus zwei Untereinheiten, TAP-1 und TAP-2, wobei jede Untereinheit wiederum aus zwei Domänen besteht, der hydrophoben Transmembran-Domäne sowie einer ATP-bindenden Kassette. Die TAP-Gene werden durch IFN- γ induziert (Tanaka, 1994). Die neu synthetisierten MHCI-Moleküle werden ins ER transportiert und dort gefaltet. Da MHC-Moleküle ohne gebundenes Peptid instabil sind, werden neu synthetisierte MHCI- α -Ketten im ER an Calnexin, einem Chaperon, dass auch bei der Faltung von

TCR, Immunglobulinen und MHCII eine Rolle spielt, gebunden. Dieses hält das Molekül in einem partiell gefalteten Zustand, bis das β_2 -Mikroglobulin angefügt wird. Dieses neu entstandene Heterodimer lagert sich dann an einen Proteinkomplex an, der aus Calreticulin (ein Chaperon), Tapasin (TAP-associated protein) und Erp57 (ein Chaperon) besteht. Erst nach Bindung eines Peptids an das MHC-Molekül löst sich dieses von dem Proteinkomplex ab und wird als vollständig gefaltetes MHCI-Molekül über Golgi-Vesikel an die Zelloberfläche transportiert und dort präsentiert. Die MHCI-Peptid-Komplexe dienen der spezifischen Erkennung durch zytotoxische T-Zellen. Sie liefern das entscheidende Signal, wenn eine Zelle infiziert ist, oder sich zu einer Tumorzelle verändert hat.

2.8 Dendritic Cell Aggresome-like Induced Structures (DALIS)

Während der Aktivierung dendritischer Zellen verändern sich die Zellen. In den Stunden nach der Antigen-Aufnahme wird die Expression von kostimulatorischen Oberflächen-Molekülen verstärkt. Zusätzlich werden Zytokine synthetisiert und ausgeschüttet, um weitere Zellen anzulocken. Die dendritische Zelle beginnt mit ihrer Migration zum Lymphknoten, um das aufgenommene Antigen naiven T-Zellen zu präsentieren und diese zu aktivieren. Im Unterschied zu z.B.: Fibroblasten, die auch naive T-Zellen aktivieren können, benötigen Professionelle Antigen Präsentierende Zellen viel mehr Zeit (bis zu 30 Stunden) bis sie in der Lage sind, Peptide des aufgenommenen Antigens zu präsentieren. Während dieser Reifung entstehen im Zytosol große Aggregate aus polyubiquitylierten Proteinen. Erstmals wurde dieses Phänomen durch Hugues Lelouard und dessen Kollegen 2002 beschrieben. Sie markierten die DALIS mit einem Antikörper gegen Poly- und Monoubiquitin und konnten diese so im Fluoreszenz-Mikroskop sichtbar machen. Diese Aggregate entstehen auch während der Reifung von Makrophagen (Canadien et al., 2005), nicht aber in Fibroblasten.

Das Vorkommen von DALIS während der Reifung der Zellen ist transient. Der früheste Zeitpunkt ihres Erscheinens ist circa 6 Stunden nach Stimulation mit z.B.: LPS. Zu diesem Zeitpunkt treten in der Zelle verstreut viele kleine Aggregate auf. Nach einigen Stunden wandern diese im Zytoplasma aufeinander zu und fusionieren miteinander, bis sie nach circa 24-30 Stunden wieder verschwinden. Ihre genaue Aufgabe ist bisher nicht bekannt, jedoch wird angenommen, dass sie in die Antigen Präsentation involviert sind (Herter et al., 2005). Dabei ist die Hauptthese, dass sie

Depots für die Peptide darstellen, die zu einem späteren Zeitpunkt auf MHC-Moleküle geladen werden und der Antigen-Präsentation dienen. Diese Theorie konnte allerdings noch nicht experimentell belegt werden. Interessanterweise zeigten erste Experimente, dass vermutlich nur Peptide, die von der Zelle selbst synthetisiert wurden, in DALIS eingebaut werden können. Dies konnte durch Experimente mit FITC-markiertem Ovalbumin gezeigt werden (Lelouard et al., 2002).

Bei der Synthese von Proteinen werden an Ribosomen mRNAs translatiert und in Aminosäureketten umgeschrieben. Dabei entstehen viele nicht funktionelle Peptide, die durch das Proteasom wieder abgebaut werden. Diesen DRIPs (Defective Ribosomal Products) kommt eine besondere Bedeutung bei der Induktion von Toleranz zu. Auf der Oberfläche von APC werden während der gesamten Lebenszeit MHC-Moleküle exprimiert. Da diese ohne Peptid nicht stabil sind, werden sie, falls die Zelle aktuell keine fremden Antigene zu präsentieren hat, mit körpereigenen Peptiden beladen. Diese stammen unter anderen aus DRIPs (Yewdell, 2007). Für DRIP-Peptide konnte gezeigt werden, dass sie in DALIS eingebaut werden, was ihre Lebenszeit um ein vielfaches verlängert (Lelouard et al., 2002).

Welche Moleküle bei der Formation von DALIS beteiligt sind, ist bisher nicht bekannt. Experimente von DeFillipo (DeFillipo et al., 2004) weisen darauf hin, dass unter anderem Hitzeschock-Proteine darin involviert sein könnten. Sie zeigten, dass die DALIS-Bildung auch nach extremen Temperaturunterschieden hervorgerufen werden kann. Grundsätzlich geht die DALIS-Bildung immer mit der Aktivierung der Zelle einher.

2.9 Interaktion zwischen dendritischen Zellen und T-Zellen

Trifft eine naive T-Zelle auf eine APC, findet eine kurze Interaktion statt, um zu prüfen ob die APC das spezifische Antigen für den TCR der T-Zelle trägt. Ist dies nicht der Fall, wird die Bindung wieder gelöst und beide Zellen suchen weiter (Guermontez et al., 2002). Passt der MHC-Peptid-Komplex zum TCR wird die Bindung intensiviert. Dabei spielen zuerst vor allem die Korezeptoren eine wichtige Rolle. Nur wenn diese auch zum MHC der APC passen, kann der Kontakt zur Aktivierung führen. Dabei bindet CD8 ausschließlich an MHCI und CD4 an MHCII (MHC-Restriktion). Um einen stabilen Kontakt zwischen den Zellen herstellen zu können, bedarf es einer Vielzahl an Molekülen (Adhäsionsmoleküle). Die wichtigsten Gruppen sind Selektine, Integrine, Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie sowie

einige Mucin-artige Oberflächen-Moleküle. Integrine sind die wichtigsten Adhäsionsmoleküle beim Kontakt zwischen APC und naiven T-Zellen. Sie bilden α : β -Heterodimere, wobei die beiden Ketten nicht kovalent verknüpft sind. Es gibt verschiedene Klassen von Integrinen, die nach ihrer β -Kette definiert werden. Alle T-Zellen exprimieren ein bestimmtes Integrin mit einer β_2 -Kette, das LFA-1 (Lymphocyte Function-associated Antigen-1). Das Molekül bindet an ICAM-Moleküle (Interzelluläre Adhäsionsmoleküle) auf der APC (Bierer and Burakoff, 1988). ICAM gehört allerdings nicht zu den Integrinen, sondern zur Immunglobulin-Superfamilie. Ihr zugeordnet werden noch eine Reihe Moleküle wie der TCR, der BCR, die Korezeptoren CD4 und CD8 und die konstanten Domänen der MHC-Moleküle. Ein weiteres Oberflächen-Molekül auf der APC ist DC-SIGN (CD209), ein Lektin, das an ICAM-3 auf der T-Zelle bindet. DC-SIGN vermittelt auch den Kontakt zu Epithelzellen und steuert durch Bindung an ICAM-2 die Migration der DC (Geijtenbeek et al., 2000).

Neben dem Antigen braucht die naive T-Zelle zur Aktivierung ein kostimulatorisches Signal, das von derselben APC ausgehen muss, die das Antigen präsentiert. Die T-Zelle kann sonst nicht aktiviert werden und fällt in einen Zustand, den man Anergie nennt (Brennan et al., 2003). Die Bedingung, dass dieselbe Zelle sowohl das antigenspezifische als auch das kostimulatorische Signal aussenden muss, spielt also eine wesentliche Rolle bei der Vermeidung von Immunreaktionen gegen körpereigene Antigene.

Zu den Molekülen, die das zweite Signal auslösen können gehören die B7-Moleküle (B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86)). Diese Glykoproteine bilden Homodimere und sind Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie. Man findet sie ausschließlich auf der Oberfläche von Zellen, die die Aktivierung von T-Zellen anregen können, also auch auf dendritischen Zellen. Der Rezeptor für B7 auf der T-Zelle ist CD28, das ebenfalls der Immunglobulin-Superfamilie angehört. Auch dieses Molekül bildet Homodimere, welche durch eine Disulfidbrücke verknüpft sind. Nachdem die T-Zelle aktiviert ist, exprimiert sie Proteine, die das kostimulatorische Signal erhalten oder modifizieren können. Zu diesen Molekülen gehört auch der CD40-Ligand (CD40L oder CD154), ein auf der T-Zelle vorkommendes Molekül, das an CD40 auf der APC bindet (Cella et al., 1996). Beide stammen aus der TNF-Familie (Tumor Necrosis Factor). Zu dieser Familie gehören auch die Moleküle Ox40 auf der T-Zelle und Ox40-Ligand auf der APC. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Ox40 mit seinem Ligand

während der Entwicklung von T_H2 -Antworten und der Produktion von T_H2 -Zytokinen essentiell ist (Akiba et al., 2000). Die Bindung der oben genannten Proteine übermitteln der T-Zelle Aktivierungssignale und veranlasst die APC dazu, weitere B7-Moleküle zu exprimieren (Lane and McConnell, 2001).

An die B7-Moleküle kann auch CTLA-4 (CTL Activation associated protein-4, CD152) binden. Es ähnelt in seiner Struktur stark CD28, bindet aber 20-mal stärker an B7 und sendet durch zytoplasmatische ITIM-Strukturen (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs) ein inhibitorisches Signal an die aktivierte T-Zelle, kann also für die Begrenzung der Aktivierung der T Zelle sorgen (Brunet et al., 1987). Ein weiteres Rezeptor-Ligand-Paar sind CD137 (4-1BB) auf der T-Zelle und sein Ligand CD137-Ligand (4-1BBL) auf der APC. Von diesen gehen aktivierende Signale sowohl für die T-Zelle als auch für die APC aus.

Weitere Moleküle, die an der Kostimulation beteiligt sind, sind CD70, welches auf aktivierten T-Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen vorkommt und ICOS (B7RP-1). Dieses Molekül wird von T-Zellen exprimiert und bindet an ICOS-Ligand (L-ICOS, B7-H2), auf aktivierten dendritischen Zellen. Es ist verwandt mit CD28, induziert aber im Gegensatz zu diesem kein IL-2, sondern die Sekretion von IL-10 (Wang et al., 2000). Es findet also zwischen der T-Zelle und der APC ein ausgefeilter Dialog statt. Den Bereich, über den die APC und die T-Zelle miteinander zur Interaktion verbunden sind, bezeichnet man als immunologische Synapse (Grakoui et al., 1999).

Zellen besitzen, neben den beschriebenen Oberflächen-Molekülen, weitere Möglichkeiten miteinander zu interagieren. Dazu zählt der Einfluss sezernierter Zytokine, aber auch die Verbindung zweier Zellen über Kanäle. Diese als Gap Junctions bezeichneten Röhren sind in fast allen Geweben zu finden. Ein Beispiel hierfür ist die Verbindung zwischen Herzzellen. Gap Junctions bestehen aus zwei Hemi-Kanälen (Konnexone), die aus sechs Konnexinen aufgebaut sind (Hexamere), die kreisförmig angeordnet sind. Jedes Konnexin besitzt 4 α -Helices mit denen sie in der Plasmamembran verankert sind. Ein Konnexon weist folglich 24 α -Helices auf (Yeager and Harris, 2007). Es gibt circa 45 verschiedene Konnexine, die sich zu Heteromeren oder Homomeren zusammen lagern können. Die Verbindung der beiden Hemi-Kanäle zweier Zellen erfolgt nicht kovalent. Die Bereiche, in denen Zellen über Gap Junctions kommunizieren werden Plaques genannt. Hier kommt es zur Ausbildung hunderter dieser Kanäle, die die Zytosole der beiden Zellen

miteinander verbinden. Die Moleküle, die durch Gap Junctions übertragen werden, können eine Größe bis zu 1 kDa aufweisen (1 Kilodalton; 1 Dalton = 1 Gramm pro Mol). Auch für die Aktivierung von dendritischen Zellen spielen Gap Junctions eine wichtige Rolle. So zeigten Experimente mit dendritischen Zellen, bei denen einzelne oder mehrere Konnexine blockiert wurden, dass die Aktivierung in diesen Zellen stark beeinträchtigt war (Matsue et al., 2006).

3 Das adaptive Immunsystem

3.1 Die Zellen des adaptiven Immunsystems

Die adaptive Immunantwort ist ein sehr spezieller Teil des Immunsystems. Im Gegensatz zur angeborenen Immunantwort braucht die adaptive Immunantwort mehr Zeit ihre Wirkung zu entfalten. Die Zellen die dabei involviert sind, stammen von lymphoiden Stammzellen aus dem Knochenmark ab. Aus diesen Stammzellen können entweder T-Lymphozyten oder B-Lymphozyten entstehen. Die adaptive Immunantwort kann in zwei Bereiche unterteilt werden. Einen zellvermittelten Teil, der durch CD8 positive zytotoxische T-Zellen ausgeführt wird und einen antikörpervermittelten Teil. Bei letzterem produzieren B-Zellen große Mengen an Antikörper und sezernieren diese. Dazu benötigen sie die Hilfe von CD4 positiven T-Helferzellen. Bei den Antikörpern oder auch Immunglobulinen, die durch B-Zellen gebildet werden können, können verschiedene Klassen unterschieden werden: IgG, IgM, IgE, IgA und IgD, die sich in ihrer Struktur und Anordnung unterscheiden. Da in dieser Arbeit mit regulatorischen T-Zellen gearbeitet wurde, sollen die T-Zellen im Folgenden näher beschrieben werden.

3.2 T-Zellen

Auch T-Zellen entstehen aus Vorläufer-Zellen im Knochenmark. Es wurden mehrere Untergruppen dieser Zellen beschrieben. Zu ihnen zählen CD4 positive T-Helferzellen (T_{H1} und T_{H2}), CD8 positive T-Zellen (zytotoxische T-Zellen) und verschiedene Arten von regulatorischen T-Zellen (T_r1 , nTregs, T_{H3}). Die Hauptfunktion aller T-Zellen ist die Erkennung von Molekülen, die körperfremd sind. Allerdings müssen die Moleküle in Kombination mit einem körpereigenen MHC-Molekül auftreten. Um diese zu erkennen, tragen sie einen spezifischen Rezeptor, den T-Zell-Rezeptor.

Zu den Aufgaben der T-Helferzellen gehört es, große Mengen an Zytokinen auszuschütten, um weitere Zellen des Immunsystems anzulocken und diese zu aktivieren. Die zytotoxischen T-Zellen besitzen die Fähigkeit, selbständig virusinfizierte Zellen anzugreifen. Im Gegensatz zu T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen wirken regulatorische T-Zellen nicht aktivierend während einer Immunreaktion. Diese Zellen sind für die Eingrenzung der Aktivierung anderer Zellen verantwortlich. Im Folgenden werden einige T-Zellen und deren Entwicklung näher beschrieben.

3.3 Entwicklung von T-Zellen

T-Zellen wandern vor ihrer Entwicklung aus dem Knochenmark in den Thymus, wo ihre Reifung stattfindet. Der Thymus zählt mit dem Knochenmark zu den primären lymphatischen Organen und liegt hinter dem Brustbein direkt neben dem Herzen. Er besteht aus einzelnen Läppchen (Loboli), die sich wiederum je in Kortex (Rinde) und Medulla (Mark) aufteilen. Dazwischen liegt die kortiko-medulläre Verbindung, eine Zone in der Blutgefäße einmünden. Hier kommen die aus dem Knochenmark stammenden Zellen an. Da sie in diesem Zustand weder CD4- noch CD8-Moleküle (Korezeptoren für TCR) auf ihrer Oberfläche tragen, werden sie als doppelt negativ (DN) bezeichnet. Die Zellen werden in ein epitheliales Maschenwerk eingebettet, das Thymus-Stroma, welches ein besonderes Mikromilieu aufweist. Hier kommen sie in Kontakt mit spezialisierten Epithel-Zellen, den cTEC (cortical Thymus Epithelial Cells), die ihre Entwicklung steuern. Über die Expression verschiedener Oberflächen-Moleküle konnten mehrere Entwicklungs-Stadien der sich entwickelnden T-Zellen bestimmt werden. Die neu angekommenen DN Zellen weisen das Expressions-Muster $CD25^-CD44^{hi}$ (DN1) auf. Im nächsten Stadium werden sie $CD25^+CD44^{hi}$ (DN2). Anschließend entwickeln sie sich zu DN3- ($CD25^{hi}CD44^{low}$) und schließlich zu DN4-Zellen, die negativ für CD25 und CD44 sind. Im nächsten Schritt der Entwicklung werden die doppelt negativen Zellen zu doppelt positiven (DP). Sie exprimieren dann CD4 und CD8. Werden diese Zellen auch noch positiv für CD69, können sie die kortikale Region des Thymus verlassen und in die medulläre Region des Thymus einwandern, um dort mit den mTEC (medullar Thymus Epithelial Cells) zu interagieren. Hier werden die Zellen einfach positiv (single positive, SP) und exprimieren in diesem Stadium zusätzlich $CD24^{hi}$. Bis die Zellen den Thymus verlassen, geht die Expression von CD24 und CD69 allerdings wieder zurück. Einzig CD62L wird auf den naiven T-Zellen, die den Thymus verlassen exprimiert (Ciofani and Zuniga-Pflucker, 2007). Bei der Wanderung der sich entwickelnden T-Zellen im Thymus spielt CCR7 eine Rolle, da dieser Chemokin-Rezeptor nicht nur die DC-Migration sondern auch die T-Zell-Wanderung entscheidend prägt.

Während der Reifung wird in den Zellen der T-Zell-Rezeptor (TCR) gebildet. Dabei teilen sich die T-Zellen in zwei T-Zelllinien auf: die $\alpha:\beta$ -T-Zellen und die $\gamma:\delta$ -T-Zellen. Sie unterscheiden sich in der Expression des TCR. Die genauen Aufgaben und der $\gamma:\delta$ T-Zellen sind bisher nicht ausreichend geklärt, allerdings weiß man, dass sie ihre Liganden direkt (ohne MHC) erkennen können. Sie weisen auch keine Korezeptoren

(CD4, CD8) auf. Da sie vermehrt in der Haut und im Darm auftreten, wird vermutet, dass dort auch ihr Wirkungsort ist. Wie die $\alpha:\beta$ T-Zellen schütten auch aktivierte $\gamma:\delta$ T-Zellen Zytokine, im Speziellen IFN- γ aus, welches die Aktivierung weiterer T-Zellen fördert.

Für die Expression eines funktionellen TCR werden zunächst die Gene dafür umgelagert (rekombiniert). Im menschlichen Genom sind 3 große Gensegmente für den TCR festgelegt (D, J und V). Der fertige TCR ist ein Komplex und besteht aus einer β - und einer α -Kette, die über eine Disulfid-Brücke miteinander verbunden sind, zwei CD3-Dimeren (ϵ - δ , ϵ - γ), zwei zeta-Ketten und dem entsprechenden Korezeptor. Die Gensegmente für die β -Kette werden zuerst umgelagert (D, J, V), wobei die Zelle noch doppelt negativ ist (DN2). Hat dies erfolgreich stattgefunden, wird die β -Kette synthetisiert und zunächst mit einer Ersatz- α -Kette und CD3 zu einem vorläufigen Rezeptor (prä-TCR) zusammen gesetzt und auf der Zelloberfläche exprimiert. Falls keine funktionsfähige β -Kette gebildet werden konnte, geht die Zelle zugrunde. Anschließend beginnt die Expression der Korezeptoren (CD4, CD8, DP). Dann folgen mehrere Zellteilungen, bevor auch die Gensegmente für die α -Kette (J, V) umgelagert werden. Im Gegensatz zur β -Kette, kann es bei der α -Kette viele Umlagerungsversuche geben, ohne dass die Zelle stirbt. Ist auch hier eine funktionsfähige Kette entstanden, wird der vollständige TCR zusammengesetzt und an der Zelloberfläche exprimiert. Wenn der fertige TCR körpereigene MHC-Moleküle erkennen kann wird die Zelle positiv selektioniert. Hat er diese Fähigkeit nicht, wird die Zelle durch induzierte Apoptose eliminiert. Die positive Selektion wird von cTEC vermittelt. Übersteht die Zelle den ersten Selektionsschritt, werden große Mengen des entsprechenden TCR synthetisiert und exprimiert. Die Expression eines der beiden Korezeptoren wird zu diesem Zeitpunkt beendet, die Zellen sind dann einfach positiv (SP). Anschließend erfolgt ein zweiter Selektionsschritt, die negative Selektion. Dabei werden Zellen, die auf körpereigene Antigene (Auto-Antigene) mit hoher Affinität reagieren eliminiert. Dieser Schritt wird von Makrophagen, DC und mTEC durchgeführt, die als APC den neuen T-Zellen körpereigene Peptide in Kombination mit MHC-Molekülen präsentieren können. Durch beide Selektionsschritte gehen bis zu 98 % der gebildeten T-Zellen zugrunde. Der Prozess der Reifung dauert ungefähr drei Wochen. Danach wandern die reifen, naiven T-Zellen aus dem Thymus aus und zirkulieren in Blut und Lymphe bis sie auf ihr

spezifisches Antigen in Verbindung mit dem körpereigenen MHC stoßen (Starr et al., 2003).

3.4 T-Zell-Arten

Wie bereits erwähnt können die T-Zellen in mehrere Untergruppen unterschieden werden. Durch die unterschiedlichen Korezeptoren kann man im Wesentlichen zwei T-Zell-Populationen unterscheiden (CD4 positiven und CD8 positive T-Zellen). Die CD4 positiven T-Helferzellen können in drei weitere Subpopulationen unterteilt werden, T_H1 und T_H2 und T_H3 . Die Hauptaufgabe dieser Zellgruppen besteht in der Produktion von Zytokinen, die weitere Zellen anlocken bzw. aktivieren können. Die T-Helferzellen sind so in der Lage andere Zell-Typen wie B-Zellen bei deren Aktivierung zu helfen. Man unterscheidet bei T_H1 und T_H2 Zellen sowohl das unterschiedliche Zytokin-Profil als auch die Aufgaben. Durch APC aktivierte T_H1 -Zellen sezernieren vor allem $IFN-\gamma$, aber auch IL-2 und $TNF-\alpha$. Sie sind hauptsächlich an einer zellvermittelten Immunantwort beteiligt. Durch die sezernierten Zytokine werden weitere Makrophagen und dendritische Zellen angelockt, die wiederum Antigene aufnehmen können. Dadurch wird eine starke lokale Reaktion ausgelöst, die auch umliegende Epithel-Zellen einschließt, da sie durch die Expression und Sekretion weiterer Entzündungs-Mediatoren die Antwort beeinflussen können. Das T_H2 Zytokin Repertoire besteht aus IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13. Diese Zellen sind für die Produktion von Antikörpern durch B-Zellen, also dem humoralen Zweig einer Immunantwort, von größter Bedeutung. Die typischen Zytokine von T_H1 und T_H2 hemmen sich zusätzlich gegenseitig, um die jeweils benötigte Antwort zu unterstützen. Die Entscheidung, ob sich eine naive CD4 positive T-Zellen (T_H0 -Zelle) zu einer T_H1 oder T_H2 T-Zelle entwickelt ist noch nicht im Detail geklärt. Vermutlich spielen dabei der Aktivierungs-Zustand der APC, die präsentierte Antigen-Menge sowie das Pathogen, dass die Immun-Reaktion auslöst, selbst eine Rolle.

Bei der Nahrungsaufnahme wird dem Körper ständig eine Vielzahl von Antigenen zugeführt, auf die er in den meisten Fällen nicht mit einer Immunantwort reagiert. Diese Antigene werden toleriert (orale Toleranz). Die hierfür wichtigsten Zellen sind die T_H3 -Zellen. Sie sezernieren Zytokine wie IL-4, IL-10 und $TGF-\beta$ (Transforming Growth Factor-beta), welche aktiv andere Immunzellen, z.B.: Makrophagen, hemmen

können. Diese T-Zellen werden in den Peyer'schen Plaques einzig für diese Aufgabe generiert.

Eine weitere Gruppe der T-Zellen stellen die CD8 positiven T-Zellen dar. Diese zeichnen sich durch intrazelluläre Granula aus. Sie enthalten Granzym und Perforin, deren Funktion es ist, virusinfizierte und krankhaft veränderte körpereigene Zellen zu lysieren. Durch die Aktivierung der CTL wird diese dazu veranlasst, ihre Granula nach außen auszuschütten, sodass die Enzyme direkt auf die Zielzelle wirken können und so einen programmierten Zelltod auslösen.

Weiter gehören die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) zu der Gruppe der Zellen, die sich aus lymphoiden Vorläuferzellen im Knochenmark entwickeln. Sie besitzen intrazelluläre Granula zur Zerstörung infizierter Zielzellen. Allerdings tragen sie keinerlei Antigen-erkennende Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, gehören also zum angeborenen Immunsystem. Sie sind in der Lage, infizierte, mit Antikörper beladene Zielzellen mit einem Rezeptor (FcγRIII, CD16) zu erkennen und diese durch Freisetzung ihrer Granula zu zerstören (ADCC, Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity). NK-Zellen können durch verschiedene Mediatoren wie IL-12, IFN-α, IFN-β aktiviert werden, doch sind sie auch in der Lage, ohne vorherige Aktivierung Zielzellen zu zerstören.

Im Folgenden soll auf eine besondere T-Zellart näher eingegangen werden: die regulatorischen T-Zellen.

3.5 Regulatorische T-Zellen

Der Körper muss sich nicht nur gegen Feinde von außen, sondern auch gegen autoaggressive eigene Zellen wehren können. Die meisten dieser Zellen, z.B.: T-Zellen, die körpereigene Peptide mit ihrem TCR mit starker Affinität erkennen und so eine Immunantwort bzw. eine Autoimmun-Erkrankung auslösen könnten, werden bereits während ihrer Reifung im Thymus vernichtet (negative Selektion). Man spricht hier auch von zentraler Toleranz. Da die Anzahl der potenziellen Antigene viel größer als das mögliche T-Zell-Rezeptor-Repertoire ist, ist es risikoärmer für den Körper einige T-Zellen mehr zur Verfügung zu haben, die auch schwach an eigene Peptide binden, dafür aber stark an körperfremde (Kreuzreaktivität des TCR) (Doherty et al., 1998). Aus diesem Grund benötigt das Immunsystem Mechanismen, um diese Zellen unter Kontrolle zu halten. Diese fasst man unter dem Begriff der peripheren Toleranz zusammen. Sie umfasst sowohl passive als auch aktive Vorgänge. Zu den passiven

Toleranz-Mechanismen gehören Anergie und Ignoranz. Da die T-Zellen, die körpereigene Peptide erkennen, nur mit schwacher Affinität an diese binden, führt diese Erkennung meist nicht zu einer Aktivierung der T-Zelle (Ignoranz). Falls das Peptid in ausreichender Stärke erkannt wird, fehlen auf der entsprechenden APC die zur T-Zell-Aktivierung notwendigen kostimulatorischen Moleküle (das zweite Signal). Die T-Zelle wird daraufhin anerg, was bedeutet, dass sie nicht mehr aktiv an einer Immunantwort beteiligt sein kann (Brennan et al., 2003). Zu den aktiven Mechanismen der peripheren Toleranz gehören Apoptose und Suppression. Bei der Apoptose handelt es sich um einen Vorgang der auch als AICD (Activation Induced Cell Death) bezeichnet wird. Hierbei kommt es unter anderem zur Ligation zweier Oberflächen-Moleküle (Fas auf der T-Zelle, Fas-Ligand auf der APC), die den programmierten Zelltod der T-Zelle auslösen. Die bei der Suppression beteiligten Zellen werden nach ihrer Hauptfunktion regulatorische T-Zellen (Tregs, früher T-Suppressor-Zellen) genannt. Man kennt heute mehrere Gruppen von Tregs, zu denen neben natürlich vorkommenden auch induzierbare Tregs gehören. Allen Gruppen gemeinsam ist eine starke Expression der α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25). Zu der Gruppe der induzierbaren Tregs zählen T_H3 -Zellen (orale Toleranz) und Tr1-Zellen. Wichtiges Merkmal ist bei den induzierten Tregs die Möglichkeit, lösliche Faktoren auszuschütten. T_H3 -Zellen sezernieren wie schon erwähnt, große Mengen TGF- β , Tr1-Zellen dagegen synthetisieren IL-10. Beides sind stark antiinflammatorische Zytokine, die Aktivierung und Proliferation anderer Zellen unterdrücken können. Diese beiden Zelltypen werden in der Peripherie aus naiven CD4 positiven T-Zellen generiert.

Die natürlich vorkommenden Tregs entstehen im Thymus, stellen eine eigene CD4 positive T-Zelllinie dar und zeichnen sich im Besonderen durch die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 (Forkhead Box Protein 3) aus. Außerdem exprimieren diese Zellen konstitutiv GITR (Glucocorticoid Induced TNF Receptor) und CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4) (McHugh et al., 2002) (Shimizu et al., 2002). Diese nTregs vermitteln ihre Suppression in einer Zell-Kontakt abhängigen Weise. Erstmals beschrieben wurden nTregs 1970 von Gershon et al. die eine Gruppe von T-Zellen identifizieren konnten (Gershon and Kondo, 1970), die die Proliferation und Aktivierung anderer Zellen aktiv verhindern konnte und dass diese supprimierende Eigenschaft an andere Zellen weitergegeben werden konnte (infectious tolerance) (Gershon and Kondo, 1971). Dieser Publikation gingen Experimente von einer

anderen Arbeitsgruppe voraus, die entdeckten, dass sich in Mäusen, denen kurz nach der Geburt der Thymus entfernt wurde (Thymektomie) schwere multiple Autoimmun-Erkrankungen entwickelten (Nishizuka and Sakakura, 1969). Daher wurde postuliert, dass eine Zell-Population aus dem Thymus in der Lage sein musste, dies im nicht thymektomierten Tier abzuwenden. In den darauffolgenden Jahren ließ man die Idee der T-Suppressor-Zellen wieder fallen, da es Missverständnisse und Fehlinterpretationen in Bezug auf die Wirkungsweise dieser Zellen gab (Moller, 1988). 1995 konnten die Studien zu diesen Zellen wieder aufgenommen werden, dank der Experimente von Sakaguchi et al. die die Population der regulatorischen T-Zellen klar durch die konstitutive Expression von CD25 abgrenzen konnten (Sakaguchi et al., 1995).

Die Mechanismen der Suppression durch regulatorische T-Zellen sind bis heute nur teilweise geklärt. Zwar kann man die Tregs durch eine Kombination von mehreren Molekülen (CD4, CD25, GITR, CTLA-4, FoxP3) identifizieren, die meisten von ihnen sind jedoch auch auf anderen Zellen zu finden. Es gibt viele Studien, die einzelne Moleküle hervorheben und ihnen Sonderstellungen bei der Suppression der T-Zell-Aktivierung zusprechen (CTLA-4 (Read et al., 2000), GITR (McHugh et al., 2002) (Shimizu et al., 2002), TGF- β (Read et al., 2000), LAG-3 (lymphocyte associated antigen-3) (Strickland et al., 2006), Ox40 (Takeda et al., 2004), CD40 (Smook et al., 2005), IL-10 (ASSEMAN et al., 2000) B7H-Moleküle (Mahnke et al., 2007a)). Diese Diversität lässt die Vermutung von Redundanz während der Tregs vermittelten Suppression zu. Charakteristisch für die Inhibierung durch nTregs ist aber vor allem der notwendige Zellkontakt mit der Zielzelle. Es gibt erste Studien die eine Involvierung von Gap Junctions (verbindende Kanäle) während der Suppression für möglich halten und somit eine Übertragung von kleinen Molekülen, wie Kalzium oder zyklisches Adenosin-Monophosphat (cAMP), zwischen den Zellen stattfinden könnte (Bopp et al., 2007).

Neben den beschriebenen regulatorischen T-Zellen, T_H1 und T_H2 T-Zellen richtete sich das Interesse in den letzten Jahren verstärkt einer neu beschriebenen T-Zellart: T_H17 Zellen. Diese Zellen konnten durch die Identifizierung eines Zytokins (IL-23) charakterisiert werden (Hunter, 2005). IL-23 ist ein Heterodimer und gehört zur IL-12 Zytokin-Familie. Es wird von APC, insbesondere DC gebildet und besteht aus einer p40 und einer p19 Untereinheit. IL-23 ist für das Überleben der T_H17 Zellen wichtig, für ihre Differenzierung ist es jedoch verzichtbar. Es konnte gezeigt werden, dass

sich T_H17 Zellen aus naiven CD4 positiven T-Zelle (T_H0) Vorläufer-Zellen bilden und dass hierbei der Transkriptionsfaktor ROR- γ t (Retinoid-related Orphan Receptor) von entscheidender Bedeutung ist (Ivanov et al., 2006). Weiter sind sowohl TGF- β als auch IL-6 essentiell für die Differenzierung von T_H17 Zellen. Charakteristisch für T_H17 Zellen ist die Sekretion von IL-17, wodurch sie auch ihren Namen erhielten. IL-17 kann in mehreren Autoimmun-Modellen während der akuten Phase nachgewiesen werden. Mäuse, die aufgrund genetischer Veränderung kein IL-17 bilden können, sind resistent gegen die Induktion von EAE (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis) and CIA (Collagen-Induced Arthritis) (Nakae et al., 2003).

II Material und Methoden

1 Material

1.1 Tiere

Bei den verwendeten Tieren handelte es sich um Mäuse (*mus musculus*). Viele Experimente wurden mit Männchen oder Weibchen der Stämme BALB/c oder C57/BL6 benutzt. Dabei handelt es sich um Wildtyp-Stämme, die genetisch nicht verändert sind. Zusätzlich wurden in einzelnen Experimenten Mäuse mit genetischen Veränderungen benutzt. Hierbei handelte es sich um folgende Stämme:

DO11.10-Mäuse

Der Transgenstamm Tg-Ova (alternative Bezeichnung DO11.10) exprimiert einen funktionellen heterodimeren TCR α/β Komplex mit Spezifität für das Ovalbumin-Epitop 323-339 (OT-2, Sequenz: SQAVHAAHAEINEAGR). Dabei unterliegt der murine TCR einer MHC-II und H-2d (I-Ad) Restriktion. Der genetische Hintergrund der des BALB Tg-Ova Stamms ist BALB/c.

Literatur:

Murphy KM: Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCR^{lo} thymocytes in vivo. (Murphy et al., 1990)

BALB/c IL-10ko

Beim Knock-out Stamm IL-10 wurde ein 500 bp großes genomisches Fragment, das die Kodone 5-55 des IL-10 Locus umfasst, durch eine Linkersequenz ersetzt, die aus einem Stop-Codon sowie einer Neomycin-Resistenzkassette besteht. Zudem wurde in Exon 3 ein Stop-Codon integriert. Der Stamm wurde kommerziell bei The Jackson Laboratory akquiriert (offizielle Stammbezeichnung: C.129P2(B6)-II10tm1Cgn/J; Stock No 4333). Der genetische Hintergrund ist BALB/c.

Literatur:

Kühn R: Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*. (Kühn et al., 1993)

Zum Zeitpunkt der Experimente waren die Tiere jeweils 4 bis maximal 10 Wochen alt und stammten aus der zentralen Versuchstier-Einrichtung (ZVTE) der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz bzw. aus Eigenzucht.

1.2 Kulturmedien und Puffer

Die Medien wurden als Pulver von der Firma GIBCO bzw. Invitromex bezogen. Vor Gebrauch wurden alle Medien, sowie PBS (phosphate buffered saline) und FCS (Fetal Calf Serum) einer Sterilfiltration (0,2 µm) sowie einer Sterilkontrolle unterzogen und anschließend bei 4°C gelagert bzw. bei -20 oder -80°C eingefroren.

Bezugsliste: Medien und Zusätze

Medium / Zusatz	Quelle
Iscove's Medium	Invitromex
Penicillin / Streptomycin	Serva
β-Mercaptoethanol	Roth
Natrium-Pyruvat	Seromed
GM-CSF	Wird im Labor aus Zellkultur-Überständen gewonnen
Glutamin	Roth
FCS	Vitromex
MEM	GIBCO
αMEM	GIBCO
Kalzium freies MEM	PAA
HBSS	PAA
IL-2 (Klon: K22)	Wird im Labor gewonnen

Differenzierungsmedium (DC-Medium)

Iscove's Medium , 1% Penicillin / Streptomycin (10⁴ U/ml / 10 mg/ml), 50 µM β-Mercaptoethanol, 1% Natrium-Pyruvat, 2% GM-CSF (wird im Labor hergestellt), 1% L-Glutamin , 5% FCS (vor Gebrauch 10 min bei 3500 rpm zentrifugiert)

Testmedium (TM5)

Iscove's Medium (DMEM), 1% Penicillin / Streptomycin, 50 µM β-Mercaptoethanol, 1% Natrium-Pyruvat, 1% L-Glutamin, 5% FCS

Treg-Medium

Iscove's Medium (DMEM), 1% Penicillin / Streptomycin, 50 µM β-Mercaptoethanol, 1% Natrium-Pyruvat, 1% L-Glutamin, 5% FCS, 200 ng/ml IL-2

MEM (Minimal Essential Medium)

1% Penicillin / Streptomycin, 50 μ M β -Mercaptoethanol

T-Zell-Medium

α -MEM, 50 μ M β -Mercaptoethanol, 1% Penicillin / Streptomycin, 1% Natrium-Pyruvat, 1% L-Glutamin, 10% FCS

Bezugsliste: Chemikalien

Zusatz / Chemikalie	Quelle
NaCl (Natrium-Chlorid)	Roth
NaH ₂ PO ₄ (Natrium-Hydrogen-Phosphat)	Roth
H ₂ O(dest)	Millipore Super-Q (Ionentauscher)
EDTA	Sigma
NH ₄ Cl (Ammonium-Chlorid)	Roth
KHCO ₃ (Kalium-Hydrogen-Carbonat)	Sigma
Tween	Sigma
BSA	Roth
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)	Sigma
H ₂ SO ₄ (Schwefelsäure)	Fluka
NaN ₃ (Natrium-Azid)	Sigma
PFA (Paraformaldehyd)	Merck
Saponin B	Sigma
Cytofix/Cytoperm	BD Pharmingen
Trypanblau (Bestimmung der Lebendzellzahl, 0,05%)	Roth
Szintillationsflüssigkeit (Proliferationstest)	Rotiszint eco Roth
Tritium-markierte Thymidin-Desoxyribose (³ [H]-Tdr), Stock: 1 mCi/ml	MP Biomedicals
Propidium-Iodid (PI, 50 mg/ml)	Sigma

PBS (Phosphate buffered saline)

1,4 M NaCl (81,8 g/L), 0,1 M NaH₂PO₄ (15,6 g/L)

Wasser-Aufbereitung, H₂O(dest): Millipore Super-Q, Ionentauscher

ACK-Puffer

0,1 mM EDTA, 150 mM NH₄Cl, 1 mM KHCO₃, pH 7,3

1.3 ELISA-Reagenzien

Wasch-Puffer

0,1% Tween-20, 1x PBS

Binde-Puffer

0,1 M Na₂HPO₄, (oder NaHCO₃), pH 9,1-9,5

Blockierungs-Puffer

1x PBS, 1% BSA (Bovines Serum Albumin), 0,05% Tween-20

2 M H₂SO₄ (Schwefelsäure)

268,28 ml H₂SO₄ (30%), 231,72 ml H₂O dest.

ELISA-Antikörper

Spezifität	Capture-Antikörper	Biotin-Antikörper	Standard
IL-6	BD Pharmingen Klon: MP5-20F3 Katalog-Nr: 554400	BD Pharmingen Klon: MP5-32C11 Katalog-Nr: 554402	BD Pharmingen Rek. Maus IL-6 Katalog-Nr: 554582
IL-12p40/70	BD Pharmingen Klon: C15.6 Katalog-Nr: 551219	BD Pharmingen Klon: C17.8 Katalog-Nr: 554476	BD Pharmingen Rek. Maus IL-12 Katalog-Nr: 554594
IL-10	R&D Klon: JES5-2A5 Katalog-Nr: MAB417	R&D Klon: JES5-16E3 Katalog-Nr: BAF417	R&D Rek. Maus IL-10 Katalog-Nr: 417-ML

cAMP-ELISA direkt Kit

assay designs

HRP-Streptavidin gekoppelter Antikörper

BD Pharmingen

1.4 Reagenzien Durchflusszytometrie

FACS-Puffer

0,1% BSA, 0,01% NaN₃, 1x PBS, 1 mM EDTA

PFA (Paraformaldehyd)

2%ige Lösung, Lösung im Labor hergestellt, schwer löslich in Wasser

Saponin-Puffer0,1% Saponin B, 0,5% BSA, 0,01% NaN₃, 1xPBS**Sonstiges Durchflusszytometrie**

Cytotfix/Cytoperm

BD

Accutase

eBioscience

Kompensationsbeads (α -Ratte, α -Hamster)

BD

DC-Antikörper

Spezifität	Fluorochrom	Quelle	Klon
CD11c	APC-Cy7	eBiosciences	N418
CD40	APC	eBioscience	1C10
CD70	PE	BD Pharmingen	FR70
CD80	PE	BD Pharmingen	16-10A1
CD86	APC	eBioscience	GL1
CD86	FITC	BD Pharmingen	GL1
Ox40-Ligand	PE	eBioscience	RM134L
ICOS-Ligand	PE	eBioscience	HK5.3
MHCII	PE-Cy7	BD	M5/114.15.2
B7H3	PE	eBioscience	M3.2D7
B7H4	PE	eBioscience	9
IL-10-Rezeptor blockierender Antikörper	Purified	Wird im Labor gewonnen	1B1.2
IL-10	APC	eBioscience	JES5-16E3
IL-10 Rezeptor	PE	BD	1B1.3a

T-Zell-Antikörper

Spezifität	Fluorochrom	Quelle	Klon
CD25	APC-Cy7	BD Pharmingen	PC61
CD25	PE	eBioscience	PC61.5
CD44	PE	eBioscience	IM7
CD90.2	APC	BD Pharmingen	53-2.1
CD90.2	FITC	eBioscience	53-2.1
FoxP3	APC	eBioscience	FJK-16s

Isotypen

Spezifität	Fluorochrom	Donor-Tier	Quelle	Klon
IgG2a, κ	FITC	Ratte (anti KLH)	BD Pharmingen	R35-95
IgG2b, κ	PE	Ratte	BD Pharmingen	A95-1
IgG1, κ	PE	Ratte	PharMingen	R3-34
IgG1, κ	FITC	Ratte	PharMingen	R3-34
IgG2, λ	FITC	Hamster	BD Pharmingen	Ha4/8

Antikörper für Fluoreszenz-Mikroskopie

Spezifität	Fluorochrom	Quelle	Klon
CD11c	Biotin	eBioscience	N418
Anti-Maus	Alexa594	Invitrogen	goat α-mouse IgG (H+L)
Anti-Hase	Alexa594	Invitrogen	goat α-rabbit IgG (H+L)
Anti-Biotin	Streptavidin-Alexa594	Invitrogen	-
CD11c	FITC	eBioscience	N418
MHCII	Biotin	Im Labor hergestellt	M5/114.15.2
CD90.2	Biotin	BD Pharmingen	30-H12
Mono- und Poly-Ubiquitin	Biotin	Biomol	FK2
Anti-Hsp90	-	Jörg Höfeld	E296
Anti-Hsp70/Hsc70	-	Jörg Höfeld	BB70
Anti-Konnexin43	-	Zymed	-

Weitere Farbstoffe zur Zellmarkierung und Fluoreszenz-Mikroskopie

DAPI

(Zellkern-Marker, 4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid)

Roche

Calcein (Farbstoff frei im Zytoplasma)

BD

CFSE (Carboxy-Fluoresceindiacetate-Succinimidyl-Ester)

Invitrogen

Alcian Blue 8GX

Sigma

1.5 Reagenzien MACS (magnetic associated cell sorting)**MACS-Puffer**1xPBS, 0,1% NaN₃, 1% BSA, 1 mM EDTA**MEM+FCS**

MEM, 50 µl β-Mercaptoethanol, 1% Penicillin / Streptomycin, 10% FCS

PBS+BSA

1xPBS, 1% BSA

PBS+FCS

1xPBS, 10% FCS

MACS-Antikörper und Beads

Spezifität	Fluorochrom	Klon	Quelle
CD25	Biotin	7D4	BD Pharmingen
Biotin	PE (Streptavidin-PE)	-	Dianova
CD4	Biotin	H129.19	Eigene Herstellung
CD90.2	Biotin	30-H12	BD Pharmingen
Mac-1	Beads	-	Im Labor hergestellt
B220	Beads	-	Milteniy Biotec
CD8	Beads	-	Milteniy Biotec
Anti-PE	Beads	-	Milteniy Biotec
Biotin	Streptavidin-Beads	-	Milteniy Biotec

1.6 Antigene, Adjuvantien, Peptide

Substanz	Stock-Lösungen	Quelle
Lipopolysaccharide (LPS, aus <i>S. typhimurium</i>)	100 µg/ml	Sigma-Aldrich
Pam ₃ Cys (3*Palmitoyl an Cystein-Serin- Lysin-Lysin-Lysin-Lysin, (-SKKKK))	1 mg/ml	Emc microcollections
Poly(I:C) (poly-Inosin-poly-Cytosin- Säure)	2 mg/ml	Amersham Biosciences
R848 (Resiquimod)	1 mg/ml	InvivoGen
R837 (Imiquimod)	5 mg/ml	InvivoGen
Rekombinantes IL-10	100 µg/ml	eBioscience
DQ-Ovalbumin	1 mg/ml	Invitrogen
CpG ODN 1668 Thioat Sequenz: 5-TCCATGACGTTCCCT GATGCT- 3	500 nM	TIB Molbiol
OT-2 Peptid (Peptid aus OVA, Aminosäure-Sequenz: SQAVHAAHAEINEAGR)	20 mg/ml	Stefan Stefanovic, Universität Tübingen

Aufgeführt ist die jeweilige Ausgangskonzentration der verwendeten Substanzen.

1.7 Inhibitoren und sonstige Substanzen

Inhibitoren, Antagonisten

Bezeichnung	inhibiertes Molekül	Quelle	eingesetzte Konzentration
Ly294002	PI3-Kinase	Calbiochem	30 µM
Wortmannin	PI3-Kinase	Calbiochem	1 µM
BOC-D-FMK	Caspasen	Calbiochem	250 nM, 500 nM
Rapamycin	mTOR (mamalien target of Rapamycin)	Calbiochem	100 µM
GM6001	MMP-Inhibitor	Calbiochem	100 µM
FK506	FKBP12	Sigma-Aldrich	50 nM
CyclosporinA	Calcineurin	Calbiochem	100 ng/ml
Geldanamycin	Hsp90 (Hitzeschockproteine mit 90 kDa Größe)	Invivogen	100 nM
Rolipram	Phosphodiesterase 4	Calbiochem	1 µM
RpcAMPS	Proteinkinase A		4 mM
Heptanol	Gap Junction Inhibitor	Fluka	1 mM
Gap27 Sequenz: SRPTEKTIFII	Gap Junction Inhibitor	PSL	300 µM
Gap27 scrambled control Sequenz: SITIRFTPEKI	Kontrolle für Gap Junction Inhibitor	PSL	300 µM
Sate	Adenylat-Zyklase Inhibitor	Sigma	1 µM

dbcAMP

Calbiochem

cAMP-erhöhende Substanzen

Prostaglandin E₂ (PGE₂)

Cayman

Forskolin

Calbiochem

1.8 Verbrauchsmaterialien

Spritzen (2 ml, 5 ml)

Omnifix

Sterilfilter (2 µm)

Millex™-GP

Abdeckplatten (steril)

Greiner

FACS-Röhrchen 5 ml

BD Pharmingen

300 µl

Greiner

Platten	6-Kavitäten-Platten (Suspensionens-Zellen)	Greiner
	12- Kavitäten -Platten	Costar
	24- Kavitäten -Platten	Costar
	96- Kavitäten -Platten(U-Form, V-Form, Flachboden-Platten)	Greiner
	96-Kavitäten-Platten (Maxisorb, für ELISA)	Nunc
Plastikröhrchen mit Schraubverschluss (15 ml, 50 ml)		Greiner
Reagent reservoir (Schiffchen)		Corning incorporated
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)		Eppendorf,
Cell Strainer (Zellsiebe) 0,7 µm		BD
Präparierbesteck (Scheren, Pinzetten)		Roth
Pipettenspitzen (0,1-10 µl, 10-200 µl, 10-1000 µl)		StarLab
Entsorgungsbeutel		Roth
Nescofilm		Roth
Serologische Glaspipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)		Hirschmann®EM Techcolor Germany
Objektträger		Roth
Glas-Deckgläser (rund), Durchmesser 15 mm		VWR

1.9 Laborgeräte

Inkubatoren:	Hera cell 150	Heraeus
	CO2-Inkubator	Sanyo
Photometer	Spectra Fluor Plus	Tecan
Durchflusszytometer	FACSCanto	BD
Sterilbänke:	Clean Air	SLEE Schrader
	Hera safe	Hereaus
Zentrifugen:	Tischzentrifuge, Biofuge pico	Kendro/Heraeus
	Multifuge 3L-R	Hereaus
	Labofuge 400	Hereaus
	Omnifuge 2.0 RS	Kendro
Fluoreszenz-Mikroskop:	IX81	Olympus
Waagen:	Feinwaage PM2000	Mettler
	Analysenwaage AE100	Mettler
Pipetboy		IBS Integra Biosciences

Mykroliter-Pipetten	(0,2-2 µl, 0,1-10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Gilson
Eppendorf-Mehrkanal-Pipetten		Eppendorf
Laborwecker		TFA
Vortex		Bender&Hobein AG
		Plabin
Waschapparatur für ELISA	Nunc Immuno™ Wash-12	Nunc
Heiz-/Magnetplatte		Labotec
		Heidolph MR 3000
iCycler		Biorad

1.10 PCR

Diese verwendeten Primer stammen von ABgene.

Konnexine:

Cx31.for: TCG TTC CTC CTC TGC TGT GG	Cx31.rev: TCG GCA GCC ACC ACA TAC AC
Cx37.for: AGA GAG GCC CTG GAA ACA TG	Cx37.rev: CAT AGC AGA CGT TGG TGC AG
Cx43.for: TAC CAC GCC ACC ACT GGC	Cx43.rev: AAT CTC CAG GTC ATC AGG
Cx45.for: AAA GAG CAG AGC CAA CCA AA	Cx45.rev: GTC CCA AAC CCT AAG TGA AGC
Cx46.for: GGA AAG GCC ACA GGG TTT CCT GG	Cx46.rev: GGG TCC AGG AGG ACC AAC GG
Cx32.for: GAA GAG GTA AAG AGA CAC AAG G	Cx32.rev: ACG TTG AGG ATA ATG CAG ATG
Cx31.1 .for: CCA AGC CCT CCG AGA AAA AC	Cx31.1 .rev: TCC GAG CCC AGA AAG ATG AG
Cx50.for: AAG ACA GCA CCA GTT TCT CC	Cx50.rev: GAC AGT GGA GTG CTC ATT CA
Cx47.for: TTT CCA GCC TGG AGA AGG TC	Cx47.rev: AAG ACC ACC AGC ACA GTG AG
Cx30.3.for: GAC CCA AGA AGG AAG GAA AG	Cx30.3.rev: CTC ATC ATA GCA GAC CTT GG
Cx30.for: TGC AGT GAC TCT TGA GCT GG	Cx30.rev: CAT GTC TGT AGT AGG CCA CG
Cx26.for: CAA CGC TGC ACG CTC CTC CC	Cx26.rev: GCC AGG CTG GAG CGT GTT GC

Diese verwendeten Primer stammen von Metabion.

Zytokine:

mIL-10.for: 5'-GGGGTACCGCCGCCATCATGCCTGGCTCAGCA-3'
mIL-10.rev: 5'-GGGGTACCTTAGCCTTTTCATTTTGATCATCA-3'
mIL-6.for: 5'-GCCAGAGTCCTTCAGAGAGATAC-3'
mIL-6.rev: 5'-CCCAACGATTCATATTGTCAG-3'
mTNFalpha.for: 5'-GTAGCCCACGTCGTAGCAAACC-3'
mTNFalpha.rev: 5'-GGTATATGGGCTCATACCAGGG-3'
mICERgesamt.for: 5'-ATGGCTGTAAGTGGAGATGAA-3'
mICERgesamt.rev: 5'-AGCAAATGTCTTTCAAACCTTTCAA-3'

Materialien für PCR

5x Buffer for M-MuLV RT	Fermentas
Revert Aid™ M-MuLV RT 200U/μl	Fermentas
PCR-Puffer, MgCl ₂ und der Polymerase	ABgene
Platten: Thermo-Fast®96, Semi-Skirted	ABgene,
Ultra Clear Cap Strips	ABgene,
SYBR Green Fluorescein	ABsolute
Ultra Clear Cap Strips	ABgene

2 Methoden

2.1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA ist eine quantitative analytische Methode zur Konzentrationsbestimmung von löslichen Proteinen, wie zum Beispiel Zytokinen und Antikörpern. Bei der hier verwendeten Methode handelt es sich um einen Sandwich-ELISA. Dabei lässt man einen spezifischen Binde-Antikörper (purified capture antibody) in 50 µl Bindepuffer (entspricht: 1 µg/ml) auf der Oberfläche von speziellen 96 Kavitäten-Maxisorb-Platten (Nunc) über Nacht binden. Am nächsten Tag wird die Antikörperlösung verworfen und 200 µl Blockierungs-Puffer in die Kavitäten der Platte gegeben. Dieser enthält Bovines Serum Albumin (BSA), ein Protein, das an die freien Bindestellen der Platte bindet und somit verhindert, dass ein Protein aus der zu bestimmenden Probe an die Platte selbst binden kann. Der Blockierungs-Puffer wird 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach mehrmaligem Waschen mit Wasch-Puffer können 100 µl der Probe (z.B.: Kulturüberstände) in Triplikaten oder Titrations-Reihen aufgetragen werden. Das spezifische Antigen, kann nun an den, in der Platte vorhandenen Antikörper binden. Zusätzlich zur Probe wird immer ein Standard mitgeführt. Dieser besteht aus dem gesuchten Protein und wird in 12 Schritten je 1/2 verdünnt. Dabei beträgt die höchste Konzentration 4 ng/ml, außerdem wird immer ein Leerwert benötigt. Der Standard wird in Duplikaten aufgetragen. Probe und Standard werden 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit werden beide verworfen und die Platte wird 3-mal mit Wasch-Puffer gewaschen.

Die Detektion und Quantifizierung geschieht über einen zweiten Antikörper. Auch dieser ist für das gesuchte Antigen spezifisch und trägt zusätzlich ein Biotin. Er wird in Blockierungs-Puffer verdünnt (1 µg/ml) und 100 µl davon werden für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf der Platte inkubiert. Nach anschließendem 3-maligem Wasch-Schritt wird eine Streptavidin gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase, HRP, 1 µg/ml) in 100 µl Blockierungs-Puffer auf die Platte gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Streptavidin bindet dabei an das Biotin des Zweit-Antikörpers.

Um die Bindung des gesuchten Proteins sichtbar zu machen, bedient man sich einer Farbreaktion. Dazu wird das farblose Substrat Tetramethylbenzidin (TMB, 80 µl) zugegeben, welches von der HRP zu einem blauen Endprodukt umgesetzt wird.

Nachdem die Farbreaktion statt gefunden hat, was anhand des Standards zu überprüfen ist, wird diese mit 80 µl 2 M H₂SO₄ abgestoppt. Dabei schlägt die Farbe bei niedrigem pH von blau (630 nm) nach gelb (450 nm) um. Gemessen wird die Konzentration des umgeschlagenen Farbstoffes in einem Photometer. Dazu wurde ein Tecan Fluo Spectra Plus benutzt. Die benötigte Wellenlänge beträgt 450 nm. Die Auswertung erfolgte in Excel. Dabei erstellt man mithilfe der gemessenen OD (optische Dichte) des Standards eine Standard-Gerade. Über deren Steigung und Achsenabschnitt lässt sich die Konzentration der eingemessenen Probe, unter Berücksichtigung der Verdünnung, bestimmen.

2.2 Durchflusszytometrie

Zellen unterscheiden sich sowohl in Größe und Granularität, als auch in der Expression verschiedener Oberflächenproteine. Um Zellen nach diesen Kriterien analysieren zu können, bedient man sich meist der Durchflusszytometrie. Das für diese Arbeit verwendete Gerät ist ein FACS-Canto von BD.

Mögliche Flurochrome:

Flurochrom	Abkürzung	Emission (Max.)	Extinktion (Max.)
Phycoerytrin	PE	578	496, 546
Allophycocyanin	APC	660	650
Fluorescein- isothiocyanat	FITC	519	494
Peridinin-Chlorophyll- Protein-Complex	Per-CP	678	482
Konjugat aus APC und einem Cyan-Farbstoff (Cy7)	APC-Cy7	785	650
Konjugat aus Pe und einem Cyan-Farbstoff (Cy7)	PE-Cy7	785	496, 546

Für eine Messung wird eine Probe (in FACS-Puffer) von ungefähr 1×10^5 Zellen benötigt. Diese wird mit einer Antikörperlösung inkubiert, wobei jeder Antikörper spezifisch an ein bestimmtes Oberflächen-Molekül bindet und ein Flurochrom trägt. In der Antikörperlösung können alle für das Durchflusszytometer möglichen Flurochrome gleichzeitig vorhanden sein. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten

wird die Probe 2-mal mit FACS-Puffer gewaschen und anschließend in 100 µl FACS-Puffer in FACS-Röhrchen überführt und möglichst sofort gemessen.

Dabei wird die Probe so durch eine Kapillare gesaugt, dass die Zellen einzeln von einem Laser bestrahlt werden können. Dieser Mechanismus wird hydrodynamische Fokussierung genannt. Dabei verursachen die Zellen eine Lichtstreuung. Sind Farbstoffmoleküle an die Zellen gebunden, werden diese zur Fluoreszenz angeregt. Durch Photodetektoren werden sowohl die Lichtstreuung als auch die Fluoreszenz gemessen. Informationen zu Größe und Granularität der Zellen liefert die Lichtstreuung. Die Fluoreszenz der angeregten Fluorochrome an den Antikörpern gibt über die Expression der gesuchten Oberflächenmoleküle Auskunft.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin intrazelluläre Moleküle, wie zum Beispiel Zytokine, nachzuweisen. Durch Zugabe von BrefeldinA (Golgi-Stop) werden die Transportprozesse in der Zelle blockiert, dadurch akkumulieren die meisten der in der Zelle gebildeten Zytokine im Golgi-Komplex. Dann werden die Zellwände mit Cytofix/Cytoperm permeabilisiert. Die anschließende Färbung mit dem entsprechenden Antikörper erfolgt in einem speziellen Puffer, der Saponin enthält. Dies ist ein Detergenz, das die Löcher in der Zellwand offen hält. Die Zytokine können durch Färbung mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper also innerhalb der Zelle nachgewiesen werden.

Die Auswertung erfolgte im BD-eigenen Programm, FACS-Diva. Die Zellen können hier in Histogrammen oder Dot Blots dargestellt werden. In Histogrammen richtet man sich nach der MFI (mean fluorescence intensity). Diese gibt den Mittelwert der Fluoreszenz für einen Kanal (ein Fluorochrom) der gesamten, angezeigten Zell-Population an. Dabei werden Zellen, die abweichen, nicht berücksichtigt. In einem Dot Blot entspricht jeder Punkt einer gemessenen Zelle. Dabei können zwei Fluorochrome gegeneinander aufgetragen werden und so z.B.: die Anzahl der doppelt positiven Zellen in Prozent bestimmt werden.

2.3 Generierung von dendritischen Zellen aus Knochenmark (BMDC)

Alle Arbeiten wurden unter einer Sterilbank ausgeführt. Zur Generierung von bone marrow-derived dendritic cells (BMDC) wird eine Maus durch CO₂ oder cervicale Dislokation getötet und die Knochen beider Hinterbeine (Femor und Tibia) herauspräpariert. Nachdem die Knochen von allen Sehnen, Muskeln und Bindegewebe gesäubert sind, werden sie in einem Gefäß mit PBS aufgefangen.

Anschließend werden beide Enden eines Knochens mit einer sterilen Schere abgetrennt und das Knochenmark mit einer Spritze mit warmem (auf 37°C erwärmt) Testmedium (TM5) ausgespült. Die Knochenmarkstränge werden dann zu einer homogenen Zellsuspension suspendiert. Von den aufgenommenen Zellen wird anschließend in einer Zählkammer die Lebendzellzahl bestimmt. Anschließend stellt man die Zellen in Differenzierungsmedium ein. Dann können die Zellen auf 6-Kavitäten-Platten verteilt werden. Meist wird eine Zellzahl von 3 Millionen Zellen pro Kavität in einem Volumen von 4 ml Differenzierungsmedium ausgesät (Tag 0).

An Tag 3 nimmt man das Medium ab und spült damit 1-mal vorsichtig über die adhärennten Zellen. Anschließend werden 3 ml des Mediums mit den nicht adhärennten Zellen verworfen. Auf die adhärennten Zellen werden 3 ml frisches, aufgewärmtes Differenzierungsmedium vorsichtig gegeben. An Tag 5 erhalten die Zellen noch einmal frisches Medium, hierbei wird allerdings nicht gespült, sondern ausschließlich ersetzt. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich die Zellen in einem halb-reifen Zustand und könnten beim Spülen mit abgenommen werden, da sie sich bereits leicht vom Boden der Kavität lösen.

Für die Experimente wurden die Zellen an Tag 7 aus den 6-Kavitäten-Platten der Anzucht geerntet, in Testmedium überführt und mit 200.000 Zellen pro Kavität, in 96-Kavitäten-Rundbodenplatten in 200 µl Volumen Testmedium mit den gewünschten Stimuli ausplattiert. Die Platte wurde anschließend je nach Experiment 18-20 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Überstände abgenommen und zur Detektion von sezernierten Zytokinen in einem ELISA (siehe 2.1) analysiert. Durch die Aktivierung der Zellen sezernieren diese große Mengen an proinflammatorischen Zytokinen (IL-6, IL-12p40). Die Zellen selbst wurden mit einer Antikörper-Lösung inkubiert und die Expression der Oberflächen-Moleküle im Durchflusszytometer untersucht (siehe 2.2).

2.4 Isolation von natürlich vorkommenden regulatorischen T-Zellen

Für die Experimente mit BMDC und regulatorischen T-Zellen (nTregs) wurden natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen aus Milzen von Mäusen isoliert. Für die Präparation der Milz, ACK-Lyse und MACS. Die Zellen werden auf 1×10^8 /ml in MACS-Puffer eingestellt.

In drei Schritten werden die Zellen mit Antikörpern markiert. Da die Tregs die beta-Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) auf ihrer Oberfläche konstitutiv hoch exprimieren,

wird dieser für die Aufreinigung markiert. Hierfür verwendet man im ersten Schritt einen biotinylierten α CD25 Antikörper (Klon: 7D4). Nach einer halben Stunde Inkubationszeit bei 4°C, werden die Zellen mit MACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert. Anschließend werden die Zellen mit einem Phycoerythrin (PE)-tragender Streptavidin-Antikörper (Dianova) inkubiert. Dabei bindet das Streptavidin an das Biotin des CD25 Antikörpers. Nach 30 Minuten Inkubationszeit bei 4°C wird auch hier mit MACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert. Im letzten Schritt werden die CD25-PE-Komplexe mit para-magnetischen Beads, die einen α PE Antikörper, gebunden. Hiefür werden die Zellen auf einem Schüttler 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Zellsuspension mit erwärmtem MACS-Puffer aufgefüllt und die gesuchten Zellen können mittels MACS (siehe 2.7) aus der Milzzell-Suspension isoliert werden. Da die so gewonnenen Zellen noch circa 30% Verunreinigung mit anderen Zellen (B-Zellen, Makrophagen, CD8 positive T-Zellen) aufweisen, werden diese im darauffolgenden Schritt mit Dynal-Beads (α B220, α CD8, α Mac-1) entfernt. Dafür werden die Zellen gezählt und dann in 1 ml PBS+BSA aufgenommen. Die frisch isolierten Zellen werden danach in mit α CD3 und α CD28 gecoateten 24 Kavitäten-Platten mit 1 Mio Zellen pro Kavität ausplattiert und mit IL-2 (200 ng/ml) drei Tage voraktiviert. An Tag 3 werden die Zellen aus den gecoateten Kavitäten geerntet 1:2 gesplittet und für 2 weitere Tage mit IL-2 kultiviert. Die auf diese Art voraktivierten regulatorischen T Zellen zeigen eine stärkere Aktivität in Bezug auf die Suppression anderer Zellen als frisch isolierte nTregs.

2.5 Bestimmung der Lebendzellzahl

Hierzu wird ein Aliquot der zu untersuchenden Zellsuspension mit einer Trypanblau-Lösung versetzt (Verdünnung je nach Bedarf). Dieser Farbstoff dringt in tote Zellen ein, sodass diese im Lichtmikroskop blau erscheinen. Die lebenden Zellen sind nicht gefärbt und heben sich hell vom Hintergrund ab. Gezählt werden, wenn möglich alle 4 Großquadrate (4 x 4 Kleinquadrate) einer Neubauer Zählkammer, um anschließend einen Durchschnittswert zu erhalten.

Um die Zellzahl pro Milliliter zu bestimmen, muss mit dem Verdünnungsfaktor, dem Kammerfaktor (10^4) und dem aktuellen Volumen der Zellsuspension multipliziert werden.

$$\text{Zellzahl} = \text{gezählte Zellen pro Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \\ \times 10^4 \text{ (Kammerfaktor)} \times \text{Volumen in ml}$$

2.6 CFSE-Markierung

Mit CFSE (5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) lassen sich Zellen lang anhaltend markieren. Das CFSE liegt zunächst farblos und als Ester vor und kann so die Zellmembran passieren. Im Zytosol wird die Estergruppe durch Esterasen verseift, so dass der Farbstoff die Zelle nicht mehr verlassen kann. Er bindet kovalent an Lysin-Reste und andere freie Amin-Gruppen intrazellulärer Proteine. Da das CFSE bei Zellteilungen zu gleichen Teilen an die Tochterzellen weitergegeben wird, lässt sich die Proliferation einer Zellpopulation anhand verringerter CFSE-Markierung im Durchflusszytometer verfolgen. Dies ist nach einer *in vitro* aber auch *in vivo* möglich. Der Vorteil dieser Methode liegt in der genauen Auflösung des Proliferations-Profiles der Zellen. Hierbei kann man einzelne Zellpopulationen bei der Teilung verfolgen und auch feststellen, wie viele Teilungsschritte sie durchlaufen haben. Es ist zudem möglich, in derselben Probe, sowohl die Proliferation als auch den Aktivierungsstatus der Zellen zu untersuchen, indem Oberflächenmoleküle, die bei aktivierten Zellen verstärkt gebildet werden, mit Antikörpern markiert werden. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass sehr viele Zellen benötigt werden.

Für die Experimente wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend auf 2×10^7 /ml eingestellt. Die CFSE-Verdünnung (Konzentration: 5 μ M) wurde ebenfalls in PBS hergestellt und mit dem gleichen Volumen wie die Zellsuspension hergestellt. Beide Lösungen wurden miteinander vermischt (Konzentration 2,5 μ M) und anschließend im Wasserbad bei 37°C für 4 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 20 ml FCS zugegeben um das restliche CFSE zu binden. Nach zwei Waschschritten mit T-Zell-Medium wurden die Zellen erneut gezählt und dann für das jeweilige Experiment verwendet.

2.7 Präparation von Milzzellen und MACS

Mäuse werden durch CO₂ oder cervicale Dislokation getötet. Die anschließende Organentnahme, sowie alle weiteren Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Milz liegt im linken oberen Bauchbereich und ist meist leicht zu finden, nachdem Fell und die Bauchhaut entfernt wurden. Das Organ wird mit einer Schere und einer Pinzette vorsichtig entnommen und mithilfe eines Spritzenstempels durch ein feinmaschiges Sieb (Cell Strainer), welches vorher mit PBS befeuchtet wurde, über einem 50 ml Röhrchen zerrieben. Die Zellen werden mit 10 ml PBS

durch das Sieb in das Röhrchen gespült und zentrifugiert (1700 rpm, 3 min). Das Pellet wird in 5 ml kaltem Gey's Lysepuffer resuspendiert und für 4 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Da dieser Puffer hypoton ist, nehmen die Zellen Wasser aus der Umgebung auf, um ihre im Gegensatz zur Umgebung höhere Salzkonzentration auszugleichen. Dies hat zur Folge, dass die Zellen irgendwann platzen. In diesem Schritt werden die in der Suspension vorhandenen Erythrozyten zerstört. Die Zellen werden anschließend zentrifugiert, einmal mit 10 ml T-Zell-Medium gewaschen und dann in 10 ml T-Zell-Medium aufgenommen und gezählt. Um aus dieser Zell-Suspension eine bestimmte Zellart zu isolieren markiert man ein für diese Zell-Population typisches Oberflächen-Molekül mit einem Antikörper an. Dann inkubiert man die Zell-Suspension mit para-magnetischen Beads, die an den ersten Antikörper binden. Anschließend gibt man die Zellsuspension über eine Säule, die man in ein magnetisches Feld bringt. In diesen Säulen befindet sich Stahlwolle, die im Magnet-Feld magnetisiert wird. Daran bleiben markierten Zellen hängen. Wenn man anschließend die Säule aus dem magnetischen Feld nimmt, kann man die markierten Zellen wieder aus dieser eluieren. Dieses Verfahren bezeichnet man als Magnetic Associated Cell Sorting (MACS).

2.8 Fluoreszenz-Mikroskopie

Die Färbung von Zellen mit fluoreszenz-markierten Antikörpern stellt eine weitere Möglichkeit dar, Zellen zu charakterisieren. Anders als beim FACS ist hier eine genaue Untersuchung einzelner Zellen möglich. Hierfür wurden die zu untersuchenden Zellen in 12-Kavitäten-Platten auf gläsernen Deckgläsern kultiviert. Dendritische Zellen haften von sich aus an den Deckgläsern. Es war möglich, die Zellen auf den Deckgläsern zu stimulieren. Alternativ konnten die Zellen auch in Platten stimuliert werden. Nach der Inkubationszeit wurden sie dann geerntet und auf mit Alcian Blau vorbehandelten Deckgläsern adhärirt. Nach der Stimulationszeit wurden die Zellen auf den Deckgläsern 2-mal mit PBS gewaschen und anschließend mit Cytofix/Cytoperm für 20 Minuten permeabilisiert und fixiert. Nach einem Waschschrift mit Saponin-Puffer erfolgt die anschließende Färbung nach demselben Prinzip wie die intrazelluläre FACS-Färbung, wobei die Antikörper in Saponin-Puffer auf/in die Zellen gebracht werden. Nach der Färbung wurden die Zellen ein letztes Mal mit PBS gewaschen und anschließend mit Mounting-Medium eingedeckelt. Das Fluoreszenz-Mikroskop, welches für diese Arbeit benutzt wurde ist ein IX81 von

Olympus. Es ist ein invers-Mikroskop und kann durch die eingebauten Filter verschiedene Fluochrome zum strahlen anregen. Die messbaren Fluoreszenzen beinhalten FITC (Wellenlänge 488nm), Texas Red bzw. Alexa594 (495nm) und Fura/Dapi (350nm).

2.9 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

2.9.1 Gewinnung der RNA aus Zell-Proben

Für einige Experimente sollte die mRNA Expression von Zellen bestimmt werden. Dafür wurden die Zellen zunächst wie gewünscht stimuliert, anschließend geerntet und die Zellen in TRI-Reagenz homogenisiert (1 ml auf 200.000 Zellen). Nach diesem Schritt kann die Suspension bei -80°C eingefroren werden. Für die RNA-Extraktion wurde dem Zell-Lysat 0,2 ml Chloroform zugegeben und nach 5 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur bei 12.000 xg und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Die RNA befindet sich anschließend in der wässrigen Phase während sich die gesamte DNA der Zellen in der Interphase vorliegt. Die wässrige Phase wurde abgenommen, mit 1,5 µl Glykogen (20 µg/ml) versetzt und bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Die RNA präzipitiert in dieser Zeit mit dem Glykogen. Anschließend wurde die Probe mit 0,5 ml Isopropanol versetzt und nach 10 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur für 10 Minuten bei 12.000 xg bei 4°C abzentrifugiert. Danach wurde das Pellet 2-mal mit kaltem Ethanol (75%) gewaschen, bei 7.500 xg für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert und konnte anschließend bei -80°C eingefroren werden bzw. direkt für die reverse Transkription eingesetzt werden.

2.9.2 Reverse Transkription der mRNA in cDNA

Zunächst wurde die präparierte RNA-Probe zentrifugiert und der Ethanol verworfen. Die Probe wurde bei Raumtemperatur für 10 Minuten getrocknet, anschließend mit 19 µl RT Transkriptionslösung versetzt und für 10 Minuten bei 55°C im Wasserbad inkubiert. Die RT Transkriptionslösung besteht aus einer Mischung aus Oligo(dT)_n-Primern (100 µg/ml) und p(dN)₆-Primern (20 ng/ml), verdünnt mit DEPC-Wasser. Dabei bindet der Oligo(dT)_n-Primer an den Poly(A)-Schwanz der mRNA, so dass die Synthese am 3'-Ende beginnt. Die Effizienz der Synthese nimmt dabei mit der Entfernung vom 3'-Ende hin ab. Der p(dN)₆-Primer hingegen kann theoretisch an jede denkbare Sequenzfolge binden. Dabei sinkt jedoch die Zahl der vollständigen

Kopien, da die Bindung nicht immer direkt am 3'-Ende erfolgen muss. Die Mischung der beiden Primer jedoch garantiert eine gute Ausbeute bezüglich der Kopienzahl. Nach den 10 Minuten Inkubationszeit im Wasserbad wurde den Proben 1 µl reverse Transkriptase (Revert Aid Reverse Transkriptase, M-Mul-V, RTase) zugesetzt und die Proben anschließend im Wasserbad bei 42°C für 1 Stunde inkubiert. Während dieser Zeit synthetisiert die RTase aus der mRNA cDNA. Die so hergestellten cDNA-Proben wurden mit sterilem Wasser verdünnt und anschließend als Templates in einer Real-Time PCR verwendet.

2.9.3 Amplifikation der cDNA durch Real-Time PCR (Polymerase-Chain-Reaktion)

Um die relative mRNA-Expression bestimmter Cytokine in Zell-Lysaten feststellen zu können, wurden die in der RT gebildeten cDNAs in eine Real-Time PCR eingesetzt. Die PCR erfolgte mit Hilfe eines RealTime-PCR-Gerätes (iCycler, Fa. BioRad). Die Amplifikation der spezifischen cDNA kann durch Einlagerung eines Fluoreszenz-Farbstoffes (SYBR-Green) erfolgen. Dieser lagert sich in die kleinen Furchen der doppelsträngigen (ds) DNA an und fluoresziert nach Anregung mit der entsprechenden Wellenlänge, wobei die Fluoreszenz-Intensität proportional zur Menge an dsDNA ist. Jeder PCR-Ansatz wurde in spezielle 96well-PCR-Platten (ABgene) pipettiert und mit Ultra Clear Cap Strips (ABgene) verschlossen.

Das PCR-Programm umfasste 40 Zyklen und war wie folgt aufgebaut:

RealTime-PCR-Programm:

95°C	15min	Aktivierung der Polymerase
95°C	30s	Denaturierung, Trennung der beiden Stränge
57°C	30s	Annealing, Hybridisierung der Primer
72°C	1min	Elongation, Verlängerung der Primer, bis dsDNA vorliegt
25°C	∞	

anschließend Aufnahme der Schmelzkurve:

alle 10s -0,5°C-Schritte beginnend von 95°C (bis 60°C)

Abkürzungs-Verzeichnis

α	anti
AG	Antigen
APC	Antigen Präsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin
APC-Cy7	Allophycocyanin-Cychrome7
BMDC (DC)	Bone Marrow-derived Dendritic Cell (Dendritic Cell)
BSA	Bovines Serum Albumin
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
CD	Cluster of Differentiation
CFSE	Carboxy-Fluoresceindiacetate- Succinimidyl-Ester
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluorescein-Iso-Thio-Cyanat
IFN	Interferon
IKK	I κ B-Kinase-Komplex
IL	Interleukin
IRAK	IL-1R associated kinase 4
IRF	Interferon Regulatory Factor
LBP	LPS Binding Protein
LPS	Lipopolysaccharid
MAL	MyD88 Adaptor-Like
MAPK	Mitogen-Associated Protein Kinase
MEM	Modified Eagles Medium
MFI	Mean Fluorescence Intensity (Mittlere Fluoreszenz Intensität)
ml	Milliliter
MyD88	Myeloid Differentiation Factor 88
MZ	Milzzelle
NF κ B	Nuclear Factor kappa B

nTreg	natürlich vorkommende regulatorische T-Zelle
OVA	Ovalbumin (Protein aus Eiklar)
OT-2	OVA-Peptid, OVA ₃₂₃₋₃₃₉ Sequenz: SQAVHAAHAEINEAGR
Pam ₃ Cys	3*Palmitylan an Cystein-Serin-Lysin-Lysin-Lysin-Lysin, (-SKKKK)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cychrome7
PI	Propidium-Iodid
PRR	Pattern Recognition Receptor
Poly(I:C)	Poly-Inoson-Poly-Cytosin-Säure
R848, R837	Resiquimod, Imiquimod
TZ	T-Zelle
T _H 1-Zelle	T-Helfer Zelle Typ 1
T _H 2-Zelle	T-Helfer Zelle Typ 2
T _H 3-Zelle	T-Helfer Zelle Typ 3
TCR	T-Zell-Rezeptor (T Cell Receptor)
TGF- β	Transforming Growth Factor-beta
TIRAP	TIR domain-containing Adaptor Protein
TLR	Toll-like Rezeptor
Tollip	Toll interacting protein
TRAF	transforming growth factor- β -activated kinase 1
TRIF	TIR-containing adaptor inducing IFN- β

Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit wurde die Aktivierung von dendritischen Zellen (DC) im Zusammenhang zwei verschiedener Fragestellungen bearbeitet.

Zum Einen wurde das Phänomen der DALIS-Bildung während der Aktivierung von dendritischen Zellen näher untersucht. Über die Entstehung dieser poly-ubiquitinylierten Protein-Aggregate ist noch nicht viel bekannt, daher sollte hier die Signal-Gebung, die zum Erscheinen der DALIS führt, näher untersucht werden.

Die zweite Aufgabenstellung beinhaltete die Aktivierung von DC in der Gegenwart von natürlich vorkommenden regulatorischen T-Zellen (nTregs). Hierbei ist es von besonderem Interesse, ob und wie sich das Aktivierungs-Profil der DC verändert. Da diese Zellen zu den APC gehören und die Antigen-Prozessierung, sowie die anschließende Aktivierung naiver T-Zellen zu deren Hauptaufgabe gehören, sollte auch dieser Aspekt der DC-Aktivierung nach Kontakt mit nTregs untersucht werden.

Im ersten Projekt wurde die Auslösung einer adaptiven Immunantwort aufgrund vorheriger Antigen-Prozessierung und -Präsentation, im zweiten Projekt wurde die Veränderung der gesamten DC-Aktivierung untersucht.

III Ergebnisse

1 Veränderung adaptiver Immunantworten durch die Beeinflussung der Antigen-Prozessierung und -Präsentation in dendritischen Zellen

1.1 Charakterisierung der verwendeten BMDC

Bei der Arbeit mit dendritischen Zellen aus dem Knochenmark (Bone Marrow-derived Dendritic Cells, BMDC) ist die genaue Einhaltung des Protokolls zur Anzucht dieser Zellen von entscheidender Bedeutung. Da BMDC besonders empfindlich sind, können schon geringe Abweichungen im Protokoll zu einer Aktivierung der Zellen führen. Aufgrund dessen ist es sinnvoll, vor den Experimenten Kontroll-Proben im Durchflusszytometer zu analysieren, um den Aktivierungsgrad der Zellen zu bestimmen. Dabei wird sowohl auf die Expression von kostimulatorischen Oberflächen-Molekülen (CD80, CD86), als auch auf die Expression von CD11c geachtet. Die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 werden durch die Aktivierung der Zelle verstärkt gebildet und dienen der T-Zell-Aktivierung, daher ist es wichtig, dass deren Expressionsstärke vor Beginn des Experiments so niedrig wie möglich ist. CD11c ist ein Integrin, das auf allen BMDC exprimiert wird. Es besteht aus einer α - und einer β -Kette. Besondere Aufmerksamkeit gilt bei CD11c jedoch nicht der Expressionsstärke, sondern der Zahl der CD11c positiven Zellen in Prozent. In jedem Fall sollten in der Population zwischen 80% und 95% der Zellen CD11c positiv sein. Die größten Verunreinigungen entstehen hierbei durch Monozyten, Granulozyten oder Makrophagen. Jede dieser Zellpopulationen tritt bei der Differenzierung von Knochenmarkszellen auf, diese Zellen würden jedoch in einem Experiment falsche bzw. veränderte Ergebnisse erzeugen. Um zu zeigen, dass die BMDC auch nach der Stimulation noch vital sind, wurde grundsätzlich bei der Analyse im Durchflusszytometer mit Propidium-Iodid (PI) gearbeitet. Dieser Farbstoff bindet im Zellkern an die DNA. Da PI nicht membrangängig ist, kann es nur binden, wenn die Zellwand Löcher aufweist, durch die das PI in die Zelle gelangen kann. Somit weist die Bindung von PI darauf hin, dass die Zelle bereits tot ist. Für die Analyse im Durchflusszytometer wurden ausschließlich Zellen in die Auswertung aufgenommen, die PI negativ und CD11c positiv waren. So wurde sichergestellt, dass nur die lebenden BMDC untersucht wurden.

1.2. Veränderung des Oberflächen- und Zytokin-Profiles von dendritischen Zellen durch Aktivierung mit TLR-Liganden

Aufgrund der extra- und intrazellulären Expression von Toll-like Rezeptoren und anderen PRR (Pattern Recognition Receptors) gibt es viele verschiedene Möglichkeiten, BMDC zu aktivieren. In dieser Arbeit wurden TLR-Liganden verwendet, meistens der TLR4-Ligand LPS (Lipopolysaccharid), durch welches die Zellen ein starkes Aktivierungssignal erhalten. Das verwendete LPS stammt von *Salmonella typhimurium*. Für die Experimente wurden die Zellen wie in Material und Methoden beschrieben ausplattiert und analysiert und auf die Expression der kostimulatorischen Oberflächen-Moleküle im Durchflusszytometer untersucht. Einige dieser Moleküle werden durch die Aktivierung vermehrt exprimiert. Im Folgenden werden die wichtigsten dieser Oberflächen-Moleküle der BMDC kurz aufgeführt.

In Abbildung 1 ist die Aktivierung der BMDC bezüglich der Expression ihrer Oberflächen-Moleküle dargestellt. Deutlich ist die Hochregulation der B7-Moleküle CD80 und CD86 erkennbar. Auch weitere kostimulatorische Moleküle wie CD70, CD40 und Ox40L werden nach der Aktivierung mit LPS vermehrt exprimiert. Die Expression der MHCII-Moleküle bleibt unterdessen unverändert. Um die Expressionsstärke der verschiedenen Moleküle zu bestimmen, wurde die Mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) der Durchflusszytometrie-Daten von der Population der CD11c positiven Zellen für die Auswertung gewählt. Da sich dendritische Zellen aus dem Knochenmark nicht für jeden Versuch identisch verhalten und sowohl die Grundexpression als auch die Hochregulierung mancher kostimulatorischer Oberflächen-Moleküle abweichen können, wurde der Kontroll-Wert (Medium) der unstimulierten BMDC für jedes einzelne Molekül gleich eins gesetzt (normalisiert) und mit diesem die Veränderung durch LPS bestimmt. Dazu wurden die LPS-Werte durch den Medium-Wert dividiert und als X-fache Induktion dargestellt.

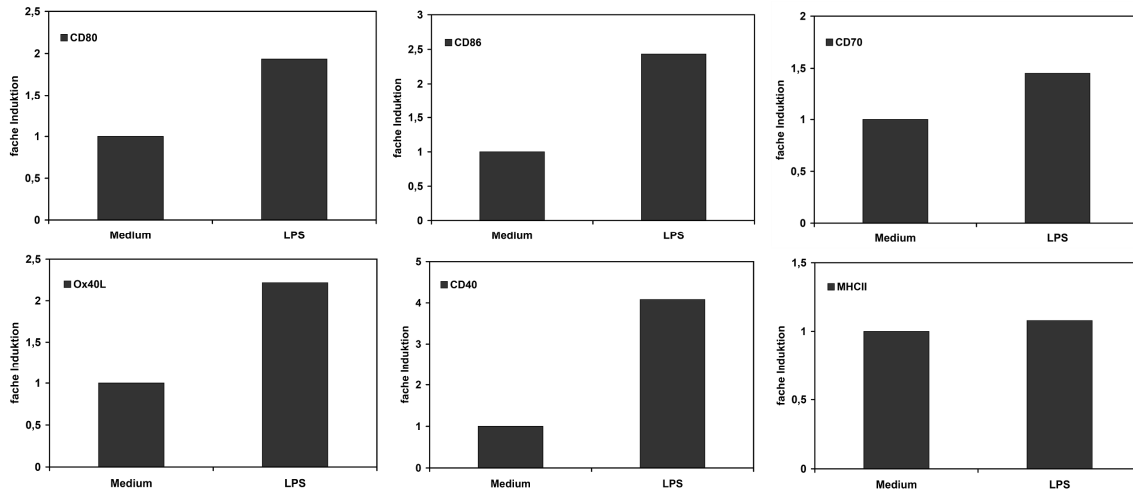


Abb.1: Expression verschiedener Moleküle auf der Oberfläche von unstimulierten und stimulierten BMDC. Die Aktivierung erfolgte in 96-Kavitäten-Rundbodenplatten. Ausgesät wurden je 200.000 Zellen in 200 µl Testmedium ohne (Medium), bzw. mit LPS (100 ng/ml). Die Zellen wurden nach 20 Stunden mit einer Antikörperlösung inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist die Expression von CD80, CD86, CD40, CD70, Ox40L und MHCII. Die Graphen zeigen Expression der PI negativen und CD11c positiven Zellen der Population. Der Medium-Wert wurde auf 1 normalisiert, die Induktion des Oberflächen-Moleküls wurde durch Division des jeweiligen Medium-Wertes berechnet. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 3-5 gleichwertige Experimente.

Eine weitere wichtige Funktion von BMDC ist die Ausschüttung von Zytokinen nach ihrer Aktivierung. Durch diese sezernierten Faktoren werden weitere Zellen zum Infektionsort gelockt, die somit die Immunantwort verstärken können. Abbildung 2 zeigt die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-12p40. Da BMDC, im Gegensatz zu Zelllinien, primäre Zellen sind, also direkt aus einem Tier stammen, kann der Grad der Aktivierung variieren. Aus diesem Grund wurde bei der gesamten Arbeit für jedes Experiment sowohl eine Negativ-Kontrolle (Medium-Wert) als auch eine Positiv-Kontrolle (LPS) mitgeführt, die zur Orientierung dienen sollen.

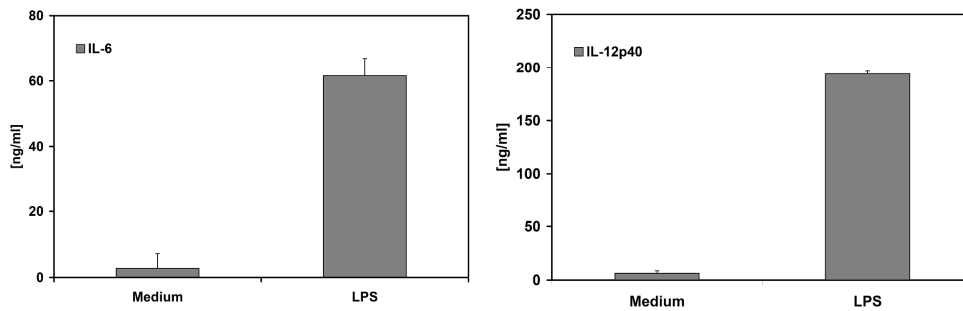


Abb.2: Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen durch BMDC nach LPS-Aktivierung. BMDC wurden in 96-Kavitäten-Rundbodenplatten ausgesät und ohne (Medium), bzw. mit LPS (100 ng/ml) kultiviert. Nach 20 Stunden wurden die Überstände abgenommen und mithilfe eines ELISAs auf sezernierte Zytokine untersucht. Die ermittelten Zytokin-Konzentrationen werden in ng/ml angegeben. Die Standardabweichung (Fehlerbalken) wurde aus 3 Werten berechnet.

1.3 Bildung von transienten polyubiquitinylierten Protein-Aggregaten während der Aktivierung dendritischer Zellen (DALIS)

Dendritische Zellen sind bei der Initiierung von Immunantworten von essentieller Bedeutung. Durch ihre Fähigkeit, Antigene aufzunehmen, diese zu prozessieren und auf ihrer Oberfläche zu präsentieren, sind sie in der Lage, naive zytotoxische T-Zellen zu aktivieren (Mellman and Steinman, 2001). Gleichzeitig werden kostimulatorische Oberflächen-Moleküle verstärkt gebildet und Zytokine werden sezerniert. Die BMDC benötigt allerdings Zeit, um diesen aktivierten Phänotyp zu erreichen. Die Aufnahme eines Antigens, wie z.B.: das Influenza Virus, und die Herstellung Virus-eigener Peptide ist dagegen ein Prozess, der sehr viel schneller abläuft, als die phänotypische Aktivierung der BMDC (Guermontprez et al., 2002). Während dieses Zeitfensters der Antigen-Aufnahme bis zur voll aktivierten BMDC, bilden sich im Zytosol der Zelle Aggregate aus polyubiquitinylierten Proteinen. Dieses Phänomen wurde erstmals von Hugues Lelouard 2002 beschrieben und definiert (DALIS, Dendritic Cell Aggresome-Like Induced Structures). Die Bildung von DALIS tritt circa 4-6 Stunden nach der Stimulation auf. Zu diesem Zeitpunkt sind sie als kleine Aggregate im Zytosol erkennbar. In den folgenden Stunden wandern sie durch das Zytosol und fusionieren miteinander. Nach ungefähr 12-15 Stunden sind sie am größten, um anschließend wieder kleiner zu werden und nach 24-30 Stunden ganz zu verschwinden (Abbildung 3). Da die Zelle nach diesem Zeitraum voll aktiviert ist und ihre MHC-Moleküle die neu synthetisierten viralen Peptide tragen, kann jetzt die virusspezifische T-Zell-Aktivierung erfolgen.

Aus den dargestellten Zusammenhängen wurde eine Hypothese erstellt, in der DALIS als Antigen-Depot dienen, aus dem Peptide zur Beladung der MHC-Moleküle entnommen werden können. Ein direkter Zusammenhang konnte bereits mithilfe eines Peptids aus dem Influenza-Virus (Stamm: A/PR/8/34) aufgezeigt werden. Nach einer Infektion mit diesem Virus kann dieses Peptid, das auf der Zelloberfläche der BMDC präsentiert wird, vorher in DALIS kolokalisiert werden (Herter et al., 2005).

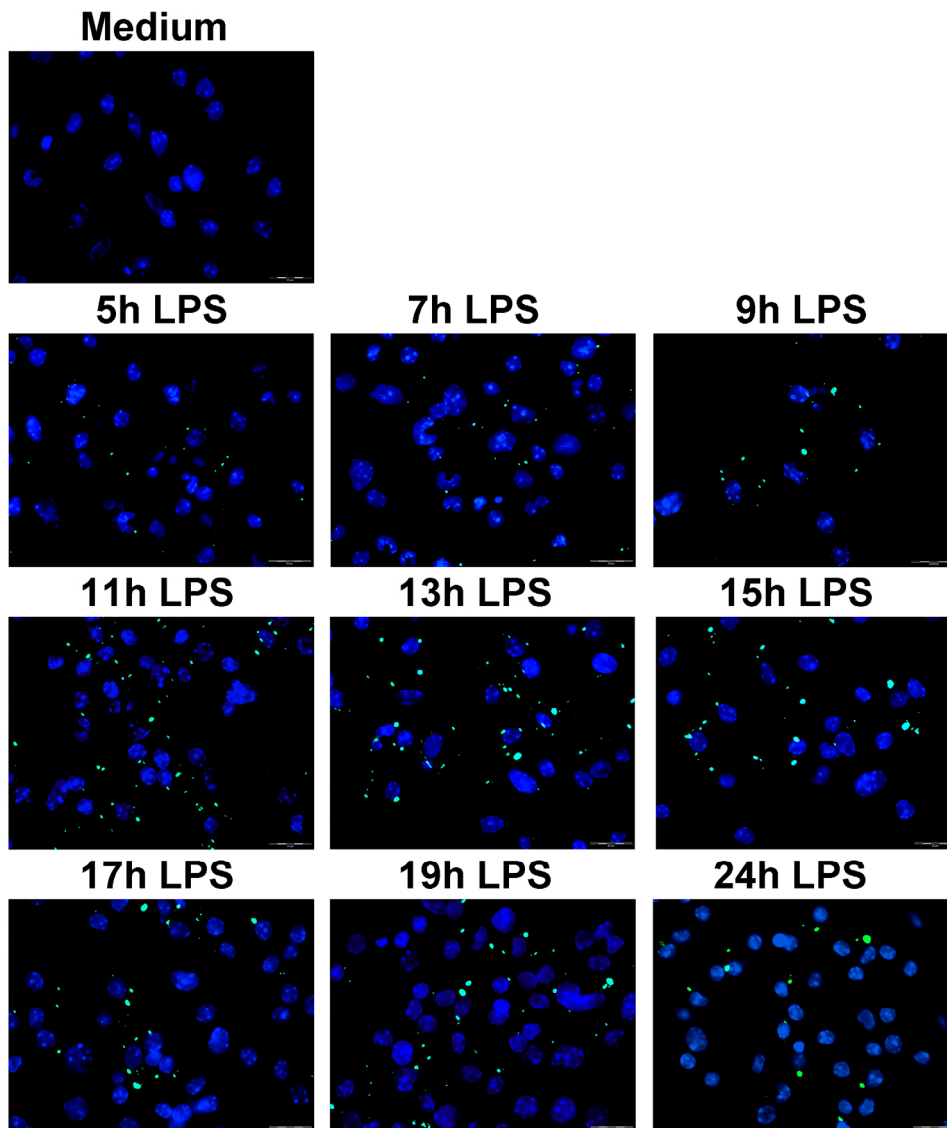


Abb.3: Kinetik der DALIS-Formierung in BMDC nach LPS-Aktivierung. BMDC wurden in 12-Kavitäten-Platten auf Deckgläsern ohne (Medium), bzw. mit LPS (100 ng/ml) kultiviert und anschließend zu verschiedenen Zeitpunkten (5 Stunden bis 24 Stunden) mit einem Antikörper gegen poly- und monoubiquitinylierte Proteine (FK2-biotinyliert) und einem sekundären Streptavidin-FITC Antikörper markiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Das FITC-Signal wird in grün das von DAPI in blau dargestellt. Die Skalierungsbalken betragen 20 µm.

1.4 DALIS-Bildung in BMDC nach Aktivierung mit verschiedenen TLR-Liganden

Da die DALIS-Bildung mit der Aktivierung der Zelle einher geht, sollte zunächst untersucht werden, ob sich eine Veränderung der DALIS mit unterschiedlichen Stimuli ergeben würde. Dafür wurden BMDC mit verschiedenen TLR-Liganden und Kombinationen aus diesen aktiviert und auf ihre DALIS-Formierung untersucht. Es ist bereits bekannt, dass BMDC durch die Kombination von TLR-Liganden stärker aktiviert werden können. Das ist darauf begründet, dass die verschiedenen Stimuli jeweils andere Signalwege ansprechen können. Die Kombination aus Poly(I:C) und R848 (bzw. R837) ist wohl am Besten charakterisiert (Warger et al., 2006). Sie aktiviert sowohl den TRIF-abhängigen (Poly(I:C)), als auch den MyD88-abhängigen (R848, R837) Signalweg. Auch Poly(I:C) und CpG sind in der Lage beide Signalwege zu aktivieren. Durch LPS und R848 (oder R837) wird in beiden Fällen der MyD88-abhängige Weg angesprochen. Vielleicht kommt es hier dadurch zur verstärkten Aktivierung, dass der Weg von zwei räumlich verschiedenen Kompartimenten aktiviert wird, von der Zelloberfläche her durch LPS und vom Endosom her durch R848 (R837).

In Abbildung 4 ist die DALIS-Bildung nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Liganden und Kombinationen aus diesen dargestellt. Es ist zu erkennen, dass eine stärkere Zellaktivierung auch eine verstärkte DALIS-Bildung verursacht. Die Kombinationen bewirken in jedem Fall eine größere Anzahl, sowie eine gesteigerte Größe der DALIS. Demnach ist die DALIS-Bildung direkt mit der Zellaktivierung verbunden. Nach Stimulation mit den untersuchten Kombinationen ist der Aktivierungsgrad der BMDC höher als mit den Einzelstimuli, was sich sowohl in der Expression der Oberflächen-Moleküle als auch in der Sekretion der Zytokine zeigt (Warger et al., 2006).

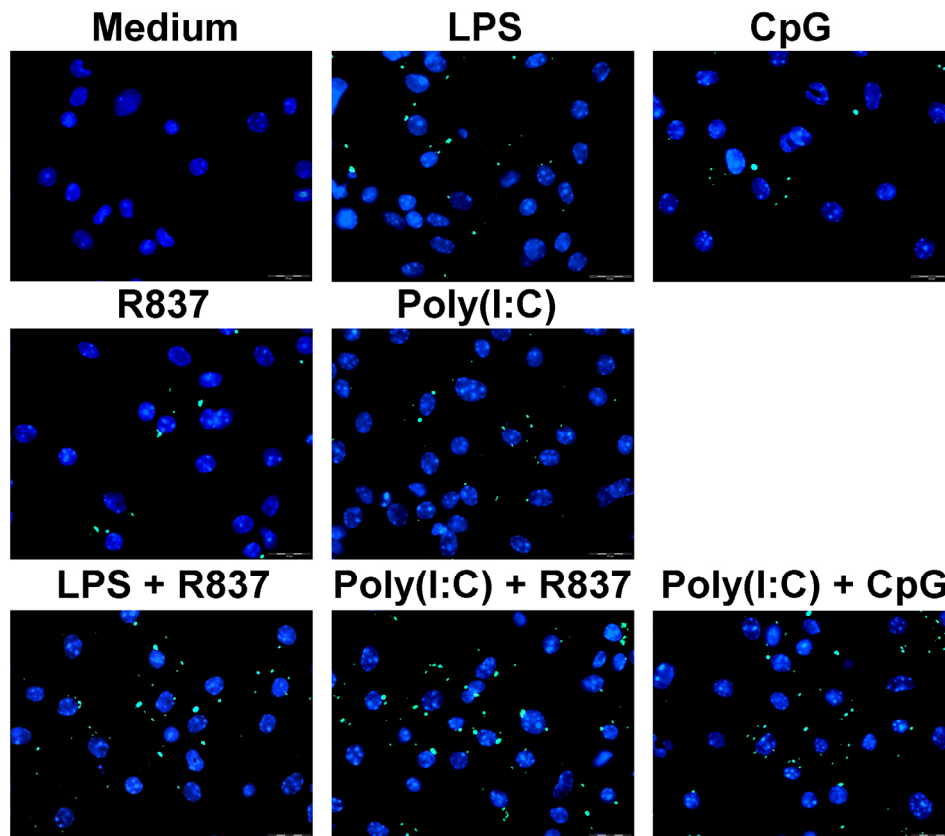


Abb.4: DALIS-Bildung in BMDC nach Aktivierung mit verschiedenen TLR-Liganden. BMDC wurden in 12-Kavitäten-Platten auf Deckgläsern mit LPS (100 ng/ml), CpG (100 nM), R837 (1 µg/ml) oder Poly(I:C) (50 µg/ml) und aus Kombinationen von diesen für 15 Stunden stimuliert. Eine unstimulierte Probe dient als Medium-Kontrolle. Anschließend wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen poly- und monoubiquitinylierte Proteine (FK2-biotinyliert) und einem sekundären Streptavidin-FITC Antikörper markiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Das FITC-Signal wird in grün das von DAPI in blau dargestellt. Die Skalierungsbalken betragen 20 µm. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 2 Experimente.

1.5 Inhibierung der Caspasen in BMDC während der Aktivierung durch LPS

Durch die Aktivierung von Zellen, kann es passieren, dass diese überstimuliert und apoptotisch werden. In diesem Zustand sind die Aktivierungs-Moleküle auf der Oberfläche oft erhöht und die Zytokin-Sekretion verstärkt. Es gibt immer wieder die Vermutung, dass die DALIS-Bildung in BMDC nur stattfindet, da die Zellen zu diesem Zeitpunkt zugrunde gehen. Um zu untersuchen, ob die DALIS-Bildung abhängig von der Vitalität der Zellen ist, wurde ein Inhibitor verwendet (BOC-D-FMK). Dieser hemmt die Gesamtheit der Caspasen in der Zelle (Lin et al., 2002). Caspasen sind wichtige Enzyme bei der Induktion von Apoptose. Es sind Proteasen, in deren aktiven Zentrum sich ein Cystein befindet. Caspasen sind in der Lage, Proteine nach einem Aspartat schneiden, woher auch der Name stammt: Cysteinyl-Aspartarte

Specific Proteases oder Cysteiny-Aspartasen. Abbildung 5 zeigt die Auswirkung des Caspase-Inhibitors auf die LPS-induzierte BMDC-Aktivierung bezüglich der Oberflächen-Moleküle CD80 und CD86 und der Produktion von IL-6. Die Sekretion von IL-6 ist in Gegenwart des Inhibitors erhöht, was in Kombination mit LPS noch verstärkt wird. Dies könnte darauf hinweisen, dass in unstimulierten BMDC bestimmte Caspasen oder deren Vorläufer an der Regulierung von IL-6 beteiligt sind. Die Expression der untersuchten Oberflächen-Moleküle ist in Gegenwart des Inhibitors nicht erhöht, auch die Kombination aus Inhibitor und LPS führt nicht zur Verstärkung der BMDC-Aktivierung. Auf die Expression von kostimulatorischen Oberflächen-Molekülen haben Caspasen also keinen Einfluss.

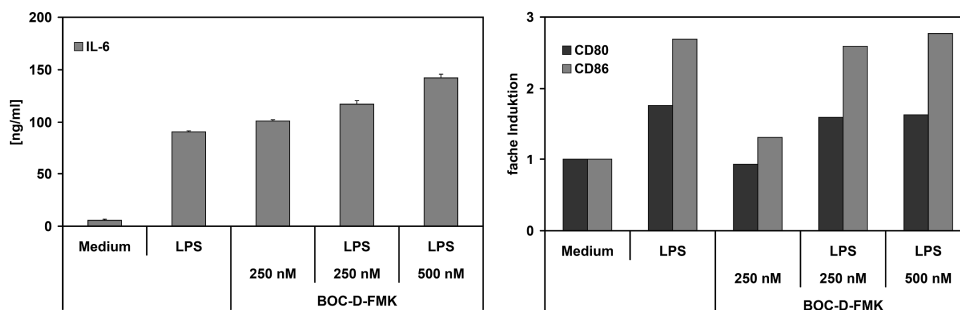


Abb.5: Inhibition der Caspasen während der Aktivierung von BMDC. Die Zellen wurden in 96-Kavitäten-Rundbodenplatten ausgesät und mit LPS (100 ng/ml) stimuliert oder unstimuliert belassen (Medium). Zusätzlich wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des Caspase-Inhibitors (BOC-D-FMK) mit und ohne LPS behandelt. Die Zellkultur-Überstände wurden nach 20 Stunden abgenommen und auf IL-6 untersucht. Die ermittelten Konzentrationen sind in ng/ml dargestellt, die Standardabweichung wurde aus 3 Werten berechnet. Die Zellen wurden nach 20 Stunden mit einer Antikörperlösung inkubiert und im Durchflusszytometer auf die Expression von CD80 und CD86 analysiert. Der Medium-Wert wurde auf 1 normalisiert. Dargestellt sind die PI negativen und CD11c positiven Zellen der Population. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 2-3 Experimente.

Entsprechend wurde die Bildung von DALIS in Gegenwart des Caspase-Inhibitors untersucht (Abbildung 6). Die BMDC wurden dafür auf Deckgläsern inkubiert und mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors vorbehandelt. Die Zellen, die ausschließlich mit dem Inhibitor behandelt wurden, zeigten keine DALIS, genauso wie die unstimulierten Zellen. Die Zellen, die mit einer Kombination aus LPS und dem Inhibitor behandelt wurden, verhielten sich gleich denen, die nur mit LPS aktiviert wurden. Die DALIS-Formierung wurde durch die Inhibierung der Caspasen in der Zelle also nicht beeinflusst. Wenn die DALIS-Bildung in direktem Zusammenhang mit dem Caspase-induzierten Zelltod stehen würde, hätte der Inhibitor die Bildung

unterbunden. Somit kann ausgeschlossen werden, dass die Zellen weil sie zugrunde gehen, die Mehrheit ihrer Peptide polyubiquitinylieren und im Zytosol aggregieren. Die Zellen sind auch nach der Aktivierung noch vital.

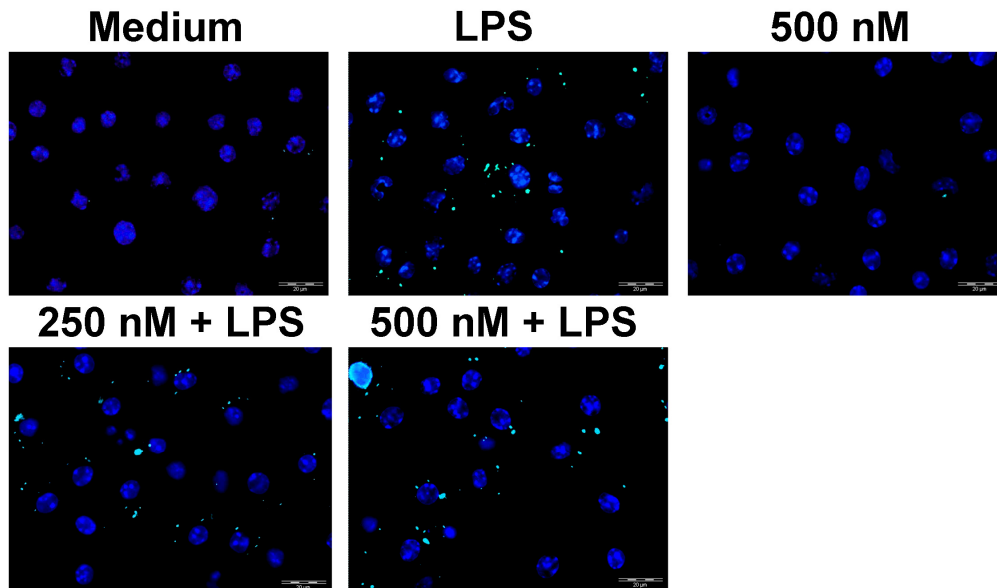


Abb.6: DALIS-Formierung in BMDC nach Inhibierung der Caspasen der Zelle. BMDC wurden in 12-Kavitäten-Platten auf Deckgläsern mit LPS (100 ng/ml), Caspase-Inhibitor BOC-D-FMK (500 nM) und Kombinationen mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors mit LPS für 15 Stunden stimuliert. Eine unstimulierte Probe dient als Medium-Kontrolle. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen poly- und monoubiquitinylierte Proteine (FK2-biotinyliert) und einem sekundären Streptavidin-FITC Antikörper markiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Das FITC-Signal wird in grün das von DAPI in blau dargestellt. Die Skalierungsbalken betragen 20 µm. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 2 Experimente.

1.6 Beteiligung von Hitzeschockproteinen an der DALIS-Bildung

Zellen synthetisieren ständig neue Proteine. Dabei entstehen durch fehlerhafte Transkription oder Translation oft nicht funktionelle Proteine, welche wieder abgebaut werden müssen. Diese als DRiPs (Defective Ribosomal Products) bezeichneten Peptide können in DALIS eingebaut werden (Lelouard et al., 2004). Ein weiterer Grund zur Entstehung von DRiPs sind Fehler in der Proteinfaltung. (Yewdell et al., 1996) Chaperone sind bei diesem Vorgang essentiell, da sie neu synthetisierten Polypeptidketten helfen, ihre funktionelle Faltung (Konformation) zu erlangen und diese auch später noch überprüfen können (Srivastava, 2002). Dies geschieht unter ATP-Verbrauch, ist also Energie aufwendig. Chaperone, oder auch Hitzeschockproteine (Hsp) werden von Zellen in Stress-Situationen (Temperatur-Schwankungen, Alkohole,...) vermehrt gebildet. Sie haben die Aufgabe, die Stabilität

von Proteinen der Zelle zu sichern, damit diese in ihrer funktionellen Konformation bleiben können. Man unterscheidet bei den Chaperonen nach ihrer Größe mehrere Familien (Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90, Hsp100 und die kleinen Hitzeschockproteine (sHsp)). Von ihnen haben die Vertreter der Familien Hsp60, Hsp70, Hsp90 eine Hilfs-Funktion bei der Proteinfaltung. Bei der Hsp40-Familie handelt es sich um Kochaperone, die den drei Hauptchaperon-Familien assistieren. Die Kochaperone können ATP spalten und so die Energie zur Verfügung stellen, die die Chaperone zur Proteinfaltung benötigen. Der Hsp100-Familie wird eine Funktion beim Abbau von bereits entstandenen Protein-Aggregaten zugeschrieben.

Da in DALIS auch DRiPs eingelagert werden können, lag die Vermutung nahe, dass Chaperone direkt oder indirekt in die DALIS-Bildung bzw. ihrem Abbau involviert sein könnten. Mithilfe von Antikörpern, mit denen Chaperone markiert werden können, wurden Kolokalisations-Färbungen in LPS-stimulierten BMDC durchgeführt. Aus der Vielzahl an Chaperonen wurden einige aus den verschiedenen Familien ausgewählt, um sie auf Kolokalisation mit den DALIS im Zytosol zu untersuchen. Dazu gehörten BAG1, CHIP, Hsc70, E1, HspBP1, UBCH5, Gp96, Hsp70, Hsp90 und Hsp70/Hsc70. Bei BAG1 (Bcl2-Associated Anthanogene) und CHIP (Carboxyl terminus of the Hsc70-Interacting Protein) handelt es sich um Kochaperone. Es wurde postuliert, dass diese beiden in Verbindung mit Hsc70 am Abbau bereits vorhandener Protein-Aggregate beteiligt sein könnten (Nollen et al., 2001) (Connell et al., 2001). Für diese drei Moleküle konnte allerdings keine Kolokalisation festgestellt werden (nicht gezeigt). CHIP und BAG1 sind aber in ihrer Interaktion nicht nur auf Hsc70 beschränkt, sondern können auch mit anderen Chaperonen, wie Hsp70/Hsc70, Komplexe bilden. Hsp70 und Hsc70 können sowohl selbständig vorkommen und agieren, als auch in Kombination. Hier wurden die beiden Chaperone als Heterodimer untersucht. Als solches kann Hsp70/Hsc70 entfaltete Proteine wieder in ihre richtige Konformation bringen. Wie in Abbildung 7 zu erkennen ist, kann Hsp70/Hsc70 mit DALIS kolokalisiert werden. Die genaue Funktion, die es dabei einnimmt, kann aktuell noch nicht beschrieben werden und sollte im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt werden. Möglich wäre, dass Hsp70/Hsc70 fehlgefaltete Proteine im Zytosol erkennt und sie vor der Einlagerung in die DALIS bewahrt, indem die Faltung wieder korrigiert wird.

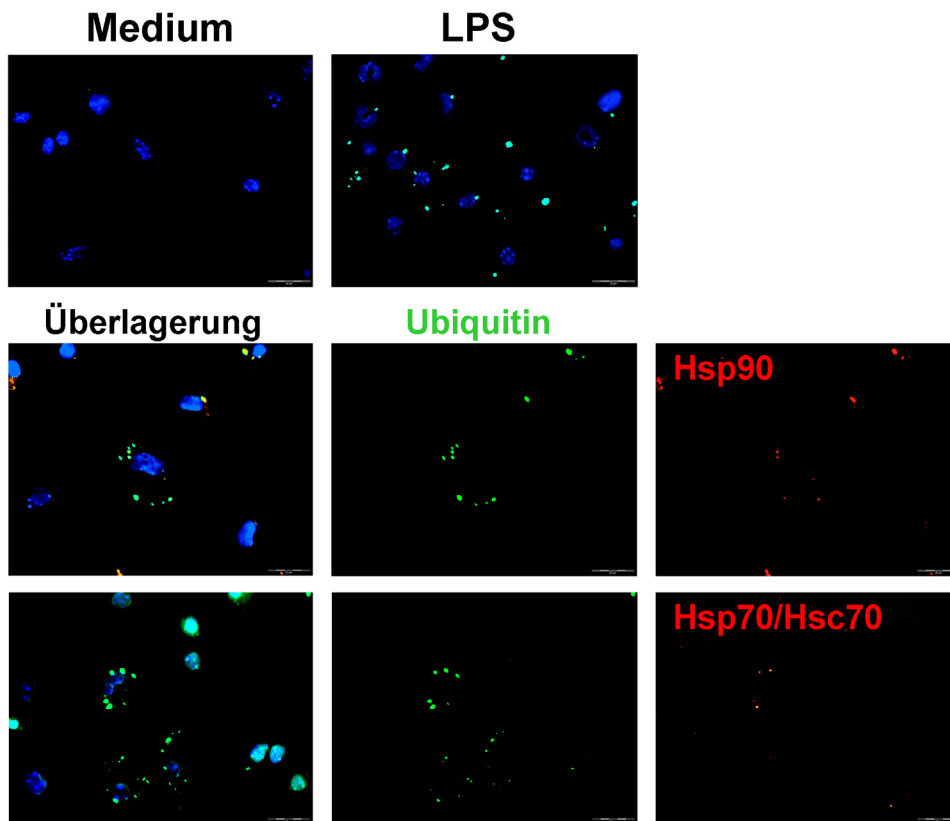


Abb.7: Kolokalisation von Chaperonen und DALIS. BMDC wurden in 12-Kavitäten-Platten auf Deckgläsern mit (100 ng/ml) bzw. ohne LPS (Medium) für 15 Stunden stimuliert. Dann erfolgte zunächst die DALIS-Färbung, mit dem Antikörper gegen poly- und monoubiquitinylierte Proteine (FK2-biotinyliert) und dem sekundären Streptavidin-FITC Antikörper. Anschließend wurde mit dem entsprechenden Antikörper Hsp90, bzw. Hsp70/Hsc70 markiert und mit einem sekundären Alexa594 Antikörper diese Markierung sichtbar gemacht. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Die unteren Bilder zeigen sowohl die dreifarbigen Aufnahmen, als auch die Einzelfärbungen. Das FITC-Signal wird in grün, das von DAPI in blau und das Signal von Alexa594 wird in rot dargestellt. Die Skalierungsbalken betragen 20 μm .

Die Mitglieder der Hsp90-Familie weisen eigene ATPase Aktivität auf und benötigen daher weniger Kochaperone als die anderen Hsp-Familien. Sie treten als Dimere auf und machen in ihrer Gesamtheit circa 1-2% der Proteine in der Zelle aus. Für Eukaryoten sind die Hsp90 Chaperone essentiell für die Faltung von sehr großen Proteinen (Srivastava, 2002). Auch für diese Chaperone konnte eine Kolokalisation mit DALIS festgestellt werden (Abbildung 7). Für die restlichen oben aufgeführten Chaperone, konnte keine Kolokalisation mit DALIS gezeigt werden.

Zu den Proteinen, die durch Hsp90 gefaltet werden, gehören viele, die bei der Entwicklung von verschiedenen Tumoren eine Rolle spielen. In diesen veränderten Zellen wird Hsp90 oft sehr stark exprimiert. In verschiedenen Arbeiten konnte die

Verwendung von Geldanamycin, einem Inhibitor für Hsp90, das Wachstum von Tumor-Zellen kontrollieren. Geldanamycin konkurriert mit ATP um die ATP-Bindestelle an Hsp90 und unterbindet so die Aktivität des Chaperons (Basu and Srivastava, 2003). Mit diesem kommerziell erhältlichen Inhibitor sollte untersucht werden, ob Hsp90 aktiv an der DALIS-Bildung beteiligt ist. Zunächst aber wurde untersucht, ob sich Geldanamycin auf die BMDC-Aktivierung auswirkt.

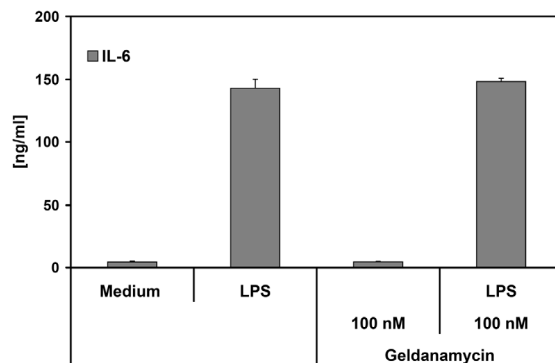


Abb.8: Wirkung von Geldanamycin auf die IL-6 Sekretion. BMDC wurden in 96-Kavitäten-Rundbodenplatten ausgesät und ohne (Medium), bzw. mit LPS (100 ng/ml) und 100 nM (wie publiziert) des Hsp90-Inhibitors Geldanamycin mit und ohne LPS behandelt. Die Zellkultur-Überstände wurden nach 20 Stunden abgenommen und mithilfe eines ELISAs auf IL-6 untersucht. Die ermittelten Zytokin-Mengen werden in ng/ml angegeben. Die Standardabweichungen wurden aus Triplikaten berechnet. Das Ergebnis ist repräsentativ für 2 Experimente.

Stellvertretend für die BMDC-Aktivierung ist in Abbildung 8 die Sekretion von IL-6 aufgeführt. Es ist zu erkennen, dass die unstimulierten Zellen (Medium) nur marginale Mengen IL-6 sezernieren, die Inhibierung der unstimulierten Zellen führt auch nicht zu der Sekretion von IL-6. Nach LPS-Aktivierung wird die Synthese von diesem Zytokin um ein vielfaches gesteigert, was sich durch die vorherige Inhibierung von Hsp90 mit dem Inhibitor nicht verändert. Durch die Inhibierung von Hsp90 wird die BMDC-Aktivierung also nicht verändert.

Im Anschluss daran sollte untersucht werden, ob die Inhibierung von Hsp90 einen Einfluss auf die DALIS-Bildung hat. In Abbildung 9 ist die DALIS-Bildung in Ab- und Anwesenheit mit Geldanamycin dargestellt. Die Zellen, die mit LPS stimuliert wurden, zeigen deutlich eine Formierung von DALIS, die unstimulierten Zellen weisen dagegen keine DALIS auf. Zellen, die ausschließlich mit dem Inhibitor behandelt wurden, verhielten sich im Experiment wie die unstimulierten Zellen. Weiter ist zu erkennen, dass sich die DALIS auch in Anwesenheit des Inhibitors, in einem

normalen Umfang bilden. Daher kann ausgeschlossen werden, dass Hsp90 aktiv in die DALIS-Bildung beteiligt ist. Die Funktion, die Hsp90 in diesem Zusammenhang ausübt, kann also noch nicht beschrieben werden und sollte im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt werden.

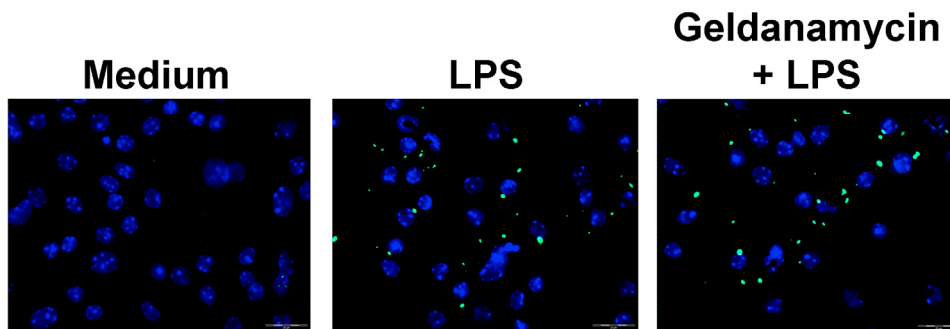


Abb.9: DALIS-Bildung in BMDC nach Inhibierung von Hsp90. BMDC wurden in 12-Kavitäten-Platten auf Deckgläsern mit LPS (100 ng/ml) bzw. ohne LPS (Medium) für 15 Stunden stimuliert. Zusätzlich wurden Zellen 30 Minuten vor der LPS-Aktivierung mit Geldanamycin (100 nM) inhibiert. Dann erfolgte die DALIS-Färbung, mit dem biotinylierten FK2-Antikörper und die Gegenfärbung mit sekundärem Streptavidin-FITC. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Die Skalierungsbalken betragen 20 µm. Das FITC-Signal wird in grün, das von DAPI in blau dargestellt. Das Ergebnis konnte in 2 weiteren Experimenten bestätigt werden.

1.7 Rolle der PI3-Kinase bei der DALIS-Bildung

Über die Mechanismen der DALIS-Bildung ist bisher nur wenig bekannt. Dennoch ist ihre Bildung eng mit der Aktivierung der Zelle verknüpft. Aus diesem Grund wurden die Signalkaskaden, die zur Aktivierung der BMDC führen genauer untersucht. Eine zentrale Rolle dabei spielt die PI3-K (Phosphatidylinositol 3-Kinase). Diese Lipid-Kinase ist in allen eukaryotischen Zellen zu finden. Sie spielt sowohl eine Rolle bei der Proliferation und Differenzierung als auch bei der Migration und dem Überleben der Zelle. Die Hauptfunktion der PI3-K besteht darin, die sekundären Signalmoleküle PIP3 (Phosphatidyl-Inositol-3,-4,-5-Trisphosphat) und PIP2 (Phosphatidyl-Inositol-3,-4,-Bisphosphat) zu bilden, die die Aufgabe haben, ihre Phosphatgruppen an Signalmoleküle weiterzugeben und diese damit zu aktivieren. Viele der Signalkaskaden in der Zelle werden durch die Übertragung von Phosphatgruppen gesteuert. Durch die Arbeit von Dr. Sylvia Herter konnte bereits gezeigt werden, dass sich die Inhibierung der PI3-K mit dem Inhibitor Ly294002 auf die BMDC-Aktivierung auswirkt. Zur Bestätigung dieser Daten wurden BMDC aktiviert und die Synthese von IL-6 und IL-12p40 mit und ohne Inhibierung der PI3-K untersucht (Abbildung 10).

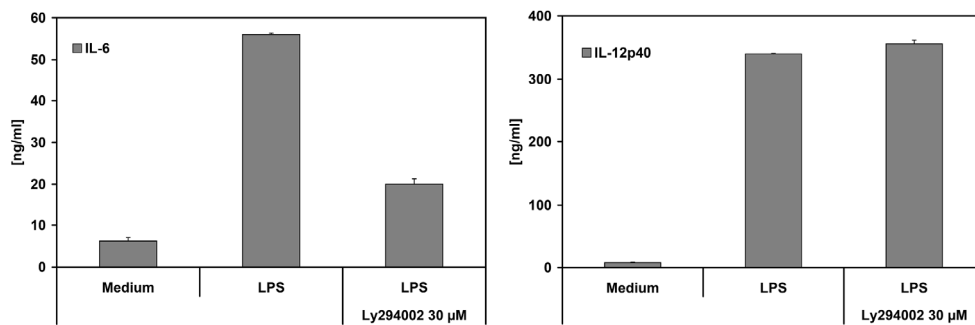


Abb.10: Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen nach Inhibierung der PI3-K. BMDC wurden in 96-Kavitäten-Rundbodenplatten ausgesät und ohne (Medium), mit LPS (100 ng/ml) oder mit 30 µM des PI3-K-Inhibitors Ly294002 (Konzentration von Dr. S. Herter ermittelt) plus LPS behandelt. Die Zellkultur-Überstände wurden nach 20 Stunden abgenommen und auf IL-6 bzw. IL-12p40 im ELISA untersucht. Die ermittelten Werte sind in ng/ml dargestellt. Die Standardabweichungen wurden aus Triplikaten berechnet. Das Ergebnis ist repräsentativ für 3-4 Experimente.

Durch die LPS-Aktivierung wird in den Zellen IL-6 synthetisiert, im Gegensatz zu den unstimulierten Zellen. Nach vorheriger Inhibierung der PI3-K wird die produzierte Zytokin-Menge verringert. Die Sekretion von IL-12p40 ist dagegen durch die Inhibierung der PI3-K nicht betroffen. Hier wird trotz des anwesenden Inhibitors die gleiche Zytokin-Menge synthetisiert wie durch LPS. Vermutlich ist die Induktion der beiden Zytokine nicht miteinander verbunden und daher werden sie unabhängig voneinander gebildet. IL-12p40 wird also durch einen anderen Signalweg induziert. Die Inhibierung von unstimulierten Zellen führte in keinem Fall zu einer Produktion von IL-6 oder IL-12p40 (nicht gezeigt).

Um die Beteiligung der PI3-K an der DALIS-Bildung zu untersuchen, wurden BMDC, wie zuvor beschrieben auf Deckgläsern kultiviert und mit LPS aktiviert, bzw. vor der Aktivierung eine halbe Stunde mit dem Inhibitor behandelt. Abbildung 11 zeigt, neben Negativ- und Positiv-Kontrolle (Medium, LPS), die DALIS-Bildung der inhibierten Zellen. Es konnte eine deutliche Inhibierung der DALIS-Bildung in BMDC gezeigt werden, wenn die PI3-K inhibiert wurde.

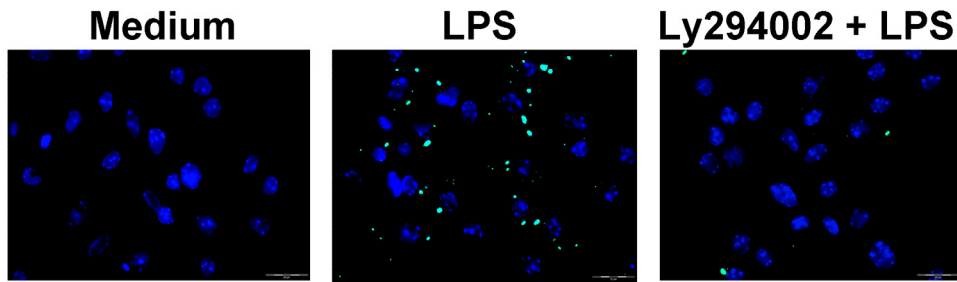


Abb.11: Verringerte DALIS-Bildung nach Inhibierung der PI3-K. BMDC wurden in 12-Kavitäten-Platten auf Deckgläsern mit LPS (100 ng/ml) stimuliert bzw. unstimuliert belassen (Medium). Zusätzlich wurden Zellen vor der LPS-Aktivierung mit dem PI3-K-Inhibitor Ly294002 (30 µM) inhibiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 Stunden erfolgte die DALIS-Färbung, mit dem biotinylierten FK2-Antikörper und die Gegenfärbung mit sekundärem Streptavidin-FITC. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Die Skalierungsbalken betragen 20µm. Das FITC-Signal wird in grün, das von DAPI in blau dargestellt. Das Ergebnis konnte in 4 weiteren Experimenten bestätigt werden.

Durch Experimente mit einem zweiten Inhibitor sollte geklärt werden, ob die Veränderung der BMDC-Aktivierung und DALIS-Bildung sich auf diesem Weg bestätigen lassen. Wortmannin ist ebenfalls ein Inhibitor für die PI3-K (Philpott et al., 2004) und wurde hier benutzt, um die Wirkung von Ly294002 zu evaluieren. In Abbildung 12 ist die DALIS-Bildung mit und ohne Wortmannin dargestellt. Deutlich ist die DALIS-Bildung in der Positiv-Kontrolle (LPS) zu erkennen. Die unstimulierten Zellen bilden keine DALIS. Weiter konnte auch hier gezeigt werden, dass die DALIS-Bildung durch die Inhibierung der PI3-Kinase durch Wortmannin unterbunden werden kann.

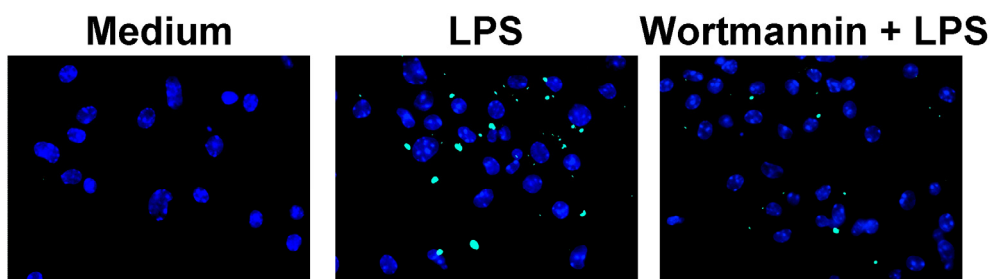


Abb.12: Wortmannin inhibiert die Formierung von DALIS. BMDC wurden in 12-Kavitäten-Platten auf Deckgläsern mit LPS (100 ng/ml) für 15 Stunden stimuliert bzw. unstimuliert belassen (Medium). Zusätzlich wurden Zellen vor der LPS-Aktivierung mit dem PI3-K-Inhibitor Wortmannin (1 µM) inhibiert. Dann erfolgte die DALIS-Färbung, mit dem biotinylierten FK2-Antikörper und die Gegenfärbung mit sekundärem Streptavidin-FITC. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Die Skalierungsbalken betragen 20 µm. Das FITC-Signal wird in grün, das von DAPI in blau dargestellt. Das Ergebnis konnte in 3 weiteren Experimenten bestätigt werden.

Durch die Inhibierung der PI3-Kinase und der damit verbundenen Verhinderung der DALIS-Bildung musste darüber nachgedacht werden, ob dies die Antigen-Präsentation verändert. Da der Hypothese nach DALIS als Antigen-Depots dienen und den Grund dafür darstellen, dass die Antigen-Präsentation an der Zelloberfläche erst nach Stunden erfolgt, wurde von Sylvia Herter mithilfe von Chrom-Release-Assays untersucht, ob die Inhibierung der PI3-Kinase die T-Zell-Aktivierung durch die inhibierten BMDC verändert. Tatsächlich konnte in diesen Versuchen gezeigt werden, dass die BMDC, in denen die PI3-Kinase inhibiert wurden, früher von den in diesen Versuchen verwendeten T-Zellen erkannt und lysiert werden. Das zeigte, dass die Antigen-Präsentation an der Zelloberfläche der inhibierten BMDC schneller erfolgt ist als auf den nicht inhibierten Zellen.

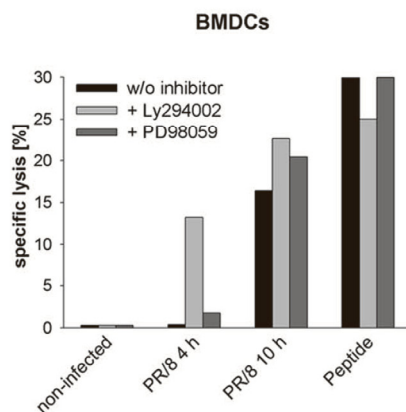


Bild 1: Spezifische Lyse verschieden behandelter BMDC. Quelle: Sylvia Herter.

1.8 mTOR als Signalmolekül während der BMDC-Aktivierung

Eine weitere Kinase wurde im Zusammenhang mit der BMDC-Aktivierung und DALIS-Bildung untersucht. mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) gehört auch zur Familie der Phosphatidylinositol 3-Kinasen. Dieses Molekül ist entscheidend in die Initiation der Translation involviert, außerdem ist es an Proliferation und Differenzierung der Zelle beteiligt. Der spezifische Inhibitor für mTOR ist Rapamycin, das auch als Sirolimus bekannt ist. Es ist ein Makrolid-Antibiotikum und wird aus Streptomyceten gewonnen. Da Rapamycin die Zellteilung verhindert, wird es vor allem in Krebstherapie eingesetzt, da es diese schnell proliferierenden Zellen im Besonderen hemmt. Es wird auch nach Nierentransplantationen eingesetzt, weil seine immunsupprimierenden Eigenschaften die Abstoßungs-Reaktion unterdrücken. Weiter ist bekannt, dass es sowohl auf T-Zellen wirkt (Morice et al., 1993) als auch

die endozytotischen Eigenschaften von dendritischen Zellen unterdrückt (Hackstein et al., 2002). In der Zelle bindet Rapamycin an eine spezialisierte Familie von Immunophilinen, die FKBP (FK506 Binding Proteins), die die Synthese von Proteinen beeinflussen, welche für Ribosomen wichtig sind. Durch Rapamycin wird die Bindung der FKBP an mTOR unterbrochen. Durch die Blockade wird die gesamte Protein-Synthese außer Kraft gesetzt. In diesem Zusammenhang sollte die Bedeutung von Rapamycin auf die BMDC-Aktivierung und DALIS-Bildung untersucht werden. Abbildung 13 zeigt zunächst die Auswirkung des Inhibitors auf die BMDC-Aktivierung. Die Zellen wurden wie beschrieben ausgesät und mit bzw. ohne Rapamycin behandelt. Nach der Inkubationszeit wurden die Überstände der Proben abgenommen und im ELISA auf die Konzentration von IL-6 und IL-12p40 untersucht. Wie in Abbildung 13 zu erkennen ist, produzieren die Zellen nach Stimulation mit LPS IL-6 und IL-12p40, die unstimulierten Zellen sezernieren keines der beiden Zytokine. Durch vorherige Inhibierung von mTOR wird die LPS-induzierte Synthese von IL-6 verringert, nicht aber die Produktion von IL-12p40. Dieses Zytokin wird sogar verstärkt sezerniert. Werden die Zellen mit Rapamycin allein inkubiert tritt allerdings keine Sekretion von IL-12p40 oder IL-6 auf (nicht gezeigt). So kann ausgeschlossen werden, dass Rapamycin mit Endotoxin kontaminiert ist. In diesem Fall würde die Behandlung mit dem Inhibitor allein schon die Produktion des Zytokins auslösen. Die Expression der kostimulatorischen Oberflächen-Moleküle bleibt nach Inhibierung von mTOR unverändert. Diese Ergebnisse gleichen denen des PI3-K-Inhibitors Ly294002.

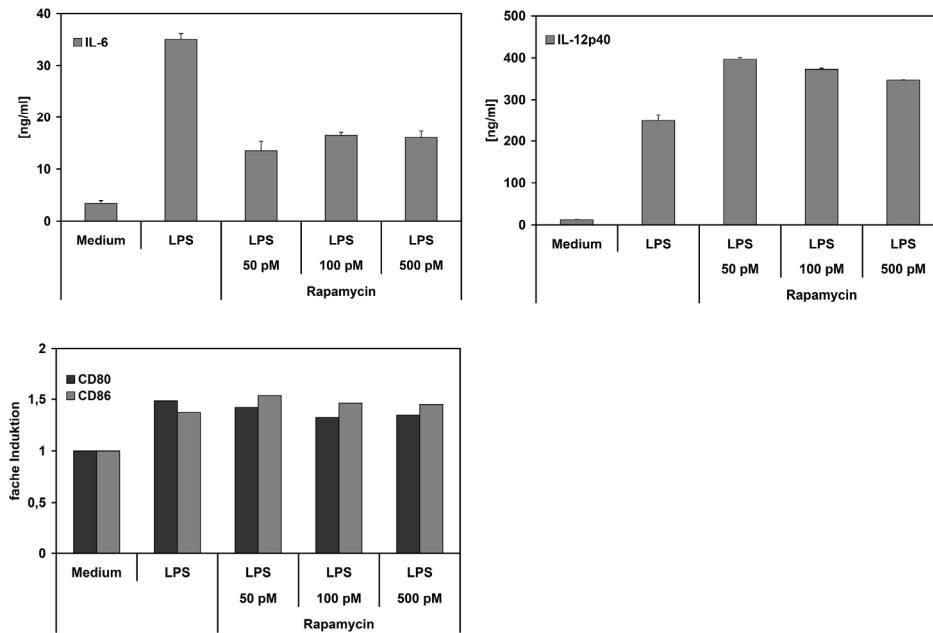


Abb.13: Veränderung der BMDC-Aktivierung in Gegenwart von Rapamycin. Die Zellen wurden in 96-Kavitäten-Rundbodenplatten ausgesät und ohne (Medium), mit LPS (100 ng/ml) und verschiedenen Konzentrationen des mTOR-Inhibitors plus LPS behandelt. Die Zellkultur-Überstände wurden nach 20 Stunden abgenommen und auf IL-6 und IL-12p40 untersucht. Die Werte werden in ng/ml dargestellt. Die Standardabweichungen wurden aus 3 Werten berechnet. Die Zellen wurden nach 20 Stunden mit einer Antikörperlösung inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Gezeigt sind die Expression von CD80 und CD86 in der Population der CD11c positiven Zellen. Der Medium-Wert wurde jeweils auf 1 normalisiert. Die Ergebnisse konnten in 3 weiteren Experimenten bestätigt werden.

Außer Rapamycin gibt ein weiteres Molekül, das an das gleiche Immunophilin bindet, FK506 (Duperrier et al., 2005). Dieses auch als Tacrolimus bekannte Makrolid-Antibiotikum, wird von einer anderen Streptomyzeten-Art produziert als Rapamycin. Tacrolimus sollte hier benutzt werden, um den Effekt von Rapamycin zu evaluieren. Zunächst wurde untersucht, wie Tacrolimus auf die BMDC-Aktivierung wirkt. Dabei stellte sich heraus, dass es ähnlich wie Rapamycin wirkt. Die LPS-induzierte Hochregulierung der Oberflächen-Moleküle verändert sich durch die Gegenwart von FK506 nicht. Auch die Verringerung der IL-6 Produktion kann gezeigt werden, allerdings ist diese nicht so stark, wie mit Rapamycin (Abbildung 14).

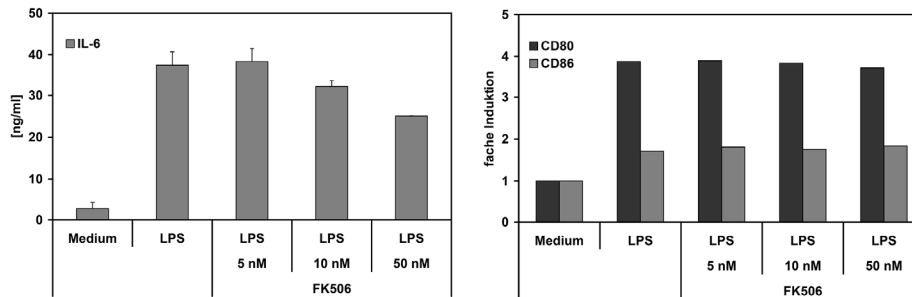


Abb.14: BMDC-Aktivierung in Gegenwart von FK506. BMDC wurden in 96-Kavitäten-Rundbodenplatten ausgesät und ohne (Medium), mit LPS (100 ng/ml) und verschiedenen Konzentrationen FK506 plus LPS behandelt. Die Zellkultur-Überstände wurden nach 20 Stunden abgenommen und im ELISA auf IL-6 untersucht. Die Ergebnisse sind in ng/ml dargestellt. Die Standardabweichungen wurden aus 3 Werten berechnet. Die Zellen wurden nach 20 Stunden mit einer Antikörperlösung inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Gezeigt ist die Expression von CD80 und CD86 in der Population der CD11c positiven Zellen. Der Medium-Wert wurde jeweils auf 1 normalisiert. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 2 gleichwertige Experimente.

Wie bereits erwähnt, werden Rapamycin und FK506 in der Klinik eingesetzt, um Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen zu verhindern. In diesem Zusammenhang ist ein weiteres Molekül bekannt. CyclosporinA ist ein Gift aus einem Pilz (*Tolypocladium inflatum*) und wird gleichwertig wie FK506 nach Transplantationen eingesetzt. Beide Moleküle hemmen über die Bindung an Immunophilin Calcineurin, eine Phosphatase, die in der Zelle die Aufgabe hat, Transkriptionsfaktoren zu dephosphorylieren und diese so zu aktivieren. Da Tacrolimus und CyclosporinA ähnlich wie Rapamycin wirken, jedoch einen anderen Wirkmechanismus haben, wurden sie hier benutzt, um die Wirkung von Rapamycin auf die DALIS-Bildung nachzuvollziehen. In Abbildung 15 ist die BMDC-Aktivierung in Gegenwart von CyclosporinA gezeigt. Die Inhibierung der BMDC durch CyclosporinA zeigt ähnliche Ergebnisse wie schon Rapamycin und FK506. Die Inhibierung der LPS-induzierten IL-6 Sekretion ist auch durch CyclosporinA aufzeigbar. Allerdings ist die Wirkung hier stärker als die von Rapamycin oder FK506. In Anwesenheit von CyclosporinA ist fast kein IL-6 mehr nachweisbar. Auch auf die Expression der Oberflächen-Moleküle wirkt CyclosporinA inhibierend. In Abbildung 15 ist die CD86 Expression dargestellt. Es ist zu erkennen, dass in Gegenwart von CyclosporinA die Hochregulierung von CD86 etwas verringert wird.

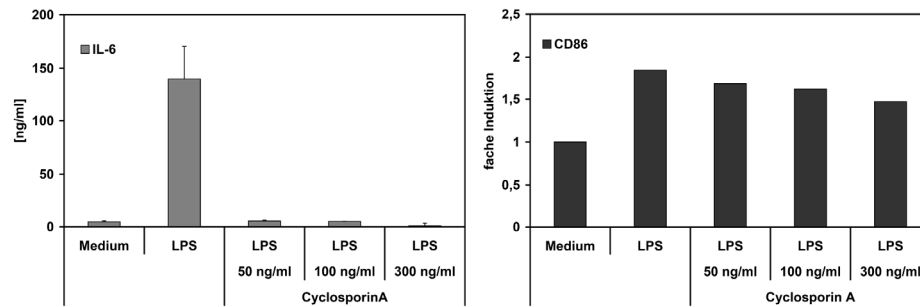


Abb.15: Wirkung von CyclosporinA auf die BMDC-Aktivierung. BMDC wurden in 96-Kavitäten-Rundbodenplatten ausgesät und ohne (Medium), mit LPS (100 ng/ml) und verschiedenen Konzentrationen CyclosporinA, mit LPS behandelt. Die Zellkultur-Überstände wurden nach 20 Stunden abgenommen und mithilfe eines ELISAs auf IL-6 untersucht. Die Standardabweichungen wurden aus 3 Werten berechnet. Die Ergebnisse sind in ng/ml dargestellt. Die Zellen wurden nach 20 Stunden mit einer Antikörperlösung inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist die Expression von CD86 in der Population der CD11c positiven Zellen. Der Medium-Wert wurde auf 1 normalisiert. Die Ergebnisse wurden in 2 weiteren Experimenten bestätigt.

Anschließend sollte die Auswirkung der drei Inhibitoren Rapamycin, FK506 und CyclosporinA in Bezug auf die DALIS-Bildung untersucht werden. Dazu wurden BMDC, wie zuvor beschrieben auf Deckgläsern kultiviert und mit den Inhibitoren vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen mit LPS stimuliert. In Abbildung 16 wird die DALIS-Bildung von BMDC in An- und Abwesenheit der drei Substanzen gezeigt. Durch vorherige Behandlung mit Rapamycin kann die DALIS-Bildung vollständig unterbunden werden. Dies war auch in sehr geringen Konzentrationen (10 pM) noch möglich (nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu konnte keine der beiden anderen Substanzen die DALIS-Bildung beeinflussen. Das bedeutet, dass der Effekt von Rapamycin auf die Zellen sehr spezifisch ist.

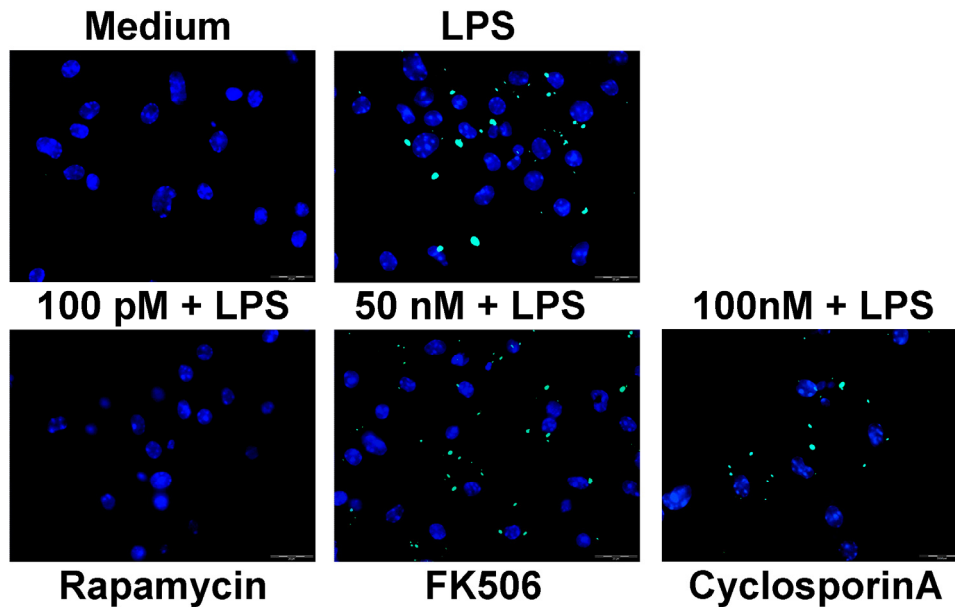


Abb.16: Einfluss von FK506, Rapamycin und CyclosporinA auf die DALIS-Bildung. BMDC wurden in 12-Kavitäten-Platten auf Deckgläsern mit LPS (100 ng/ml) stimuliert bzw. unstimuliert belassen (Medium). Zusätzlich wurden Zellen vor der LPS-Aktivierung mit FK506 (50 nM), Rapamycin (100 pM) oder CyclosporinA (100 ng/ml) inhibiert. Nach 15 Stunden Inkubation erfolgte die DALIS-Färbung, mit biotinylierten FK2-Antikörper und die Gegenfärbung mit sekundärem Streptavidin-FITC. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Das FITC-Signal wird in grün, das von DAPI in blau dargestellt. Das Ergebnis konnte in 3 weiteren Experimenten bestätigt werden. Die Skalierungsbalken betragen 20 μm .

Eine der Aufgaben von mTOR ist die Aktivierung von Translationsfaktoren (Lelouard et al., 2007). Zu diesen, die Translation einleitenden Molekülen, gehört unter anderen eIF4E (eukaryotic Initiation Factor 4E). Dieses Molekül wird in der ruhenden Zelle durch 4E-BP-1,-2,-3 (eukaryotic initiation factor 4E-Binding Proteins-1,-2,-3) gehemmt. Das aktivierte mTOR ist in der Lage, diese inhibitorischen Moleküle zu hemmen und so kann eIF4E an die Ribosomen binden und die Translation einleiten. Für diese weiteren Signalmoleküle wurden bisher keine Substanzen beschrieben, die deren Aktivierung oder Expression verändern. Interessant wäre die Möglichkeit, die Repressoren von eIF4E zu inaktivieren, um zu überprüfen, ob die Zelle auch ohne zusätzliche Aktivierung die Proteinsynthese und Antigenpräsentation startet. Durch eine dann auftretende DALIS-Bildung, wäre ein direkter Zusammenhang mit der Antigenpräsentation aufzeigbar.

2 Veränderung adaptiver Immunantworten durch die Beeinflussung der Maturation dendritischer Zellen durch natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen

2.1 Maturation von BMDC in der Gegenwart von nTregs

2.1.1 Veränderung des Oberflächen- und Zytokin-Profiles der BMDC

Durch die Stimulation von dendritischen Zellen, sind diese in der Lage naive T-Zellen zu aktivieren und so eine Immunantwort auszulösen. In vitro, also außerhalb des lebenden Organismus, erreichen BMDC einen aktivierten Zustand, indem sie mit verschiedenen Stimuli, wie z.B.: Toll-like Rezeptor-Liganden inkubiert werden. Für die meisten hier aufgeführten Experimente wurde das Lipopolysaccharid (LPS) von *Salmonella typhimurium* in einer Konzentration von 100 ng/ml verwendet. Wie schon in Abbildung 1 und 2 gezeigt wurde, induziert LPS die Hochregulierung von vielen Oberflächen-Molekülen sowie die Synthese und Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist es möglich die Aktivierung und Proliferation naiver T-Zellen zu unterdrücken, indem diese mit natürlich vorkommenden regulatorischen T-Zellen (nTregs) kultiviert. Die nTregs verhindern hierbei Zell-Kontakt abhängig die Sekretion von IL-2, einem Wachstumsfaktor, der für die Proliferation von T-Zellen essentiell ist. Es konnten in diesem Zusammenhang schon einige Details zum Wirkmechanismus der nTregs aufgedeckt werden (Bopp et al., 2007). Weiter gibt es bereits Untersuchungen, die zeigen, dass nTregs die Aktivierung von BMDC unterdrücken (Veldhoen et al., 2006). Dabei ist bisher nicht bekannt, wie diese Inhibierung abläuft und was die genauen Auswirkungen auf die BMDC sind.

Hier sollte zunächst geklärt werden, ob es für nTregs möglich ist, die Aktivierung der verwendeten BMDC zu unterbinden. Dafür wurden natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen aus den Milzen von unbehandelten Wildtyp Mäusen (Stamm: BALB/c) isoliert und 5 Tage in Gegenwart von IL-2 kultiviert. Zusätzlich wurden die Zellen 3 der 5 Tage mit Beads behandelt, die α -CD3 Antikörper und α -CD28 Antikörper tragen. Diese Kombination imitiert die Aktivierung der T-Zelle durch eine Antigen Präsentierende Zelle, wobei α -CD3 den TCR anspricht und α -CD28 das zweite kostimulatorische Signal übermittelt. Die so isolierten nTregs wurden mit

unstimulierten BMDC kultiviert, um zu überprüfen ob die nTregs in der Lage sind, die Aktivierung der BMDC zu unterdrücken.

Zunächst wurden einige Experimente mit verschiedenen Zellzahlen durchgeführt, um das geeignete Verhältnis zwischen BMDC und nTregs zu ermitteln. Dabei stellte sich heraus, dass die nTregs ab einem Verhältnis von 1:5 (100.000 BMDC zu 500.000 nTregs in 200 µl pro Kavität einer 96-Kavitäten-Rundbodenplatte) die BMDC-Aktivierung inhibieren. In den Experimenten konnten die nTregs zusätzlich noch weiter aktiviert werden, indem der α -CD3 Antikörper, der schon zur Voraktivierung benutzt wurde, zu der Kokultur dazu gegeben wurde (- α CD3, + α CD3, Abb.17).

Wie bereits zuvor wurden die MFI-Werte der Durchflusszytometrie-Daten in X-fache Induktion umgerechnet. Dafür wurden die BMDC in der Zellpopulation sowohl als CD11c-positive Zellen bestimmt, als auch zusätzlich mit einem CD90.2 (auch: Thy1.2) Antikörper markiert. Dieses Molekül befindet sich auf allen T-Zellen. Die Zellen, die für die Auswertung im Durchflusszytometer gewählt wurden, mussten sowohl CD11c positiv, als auch CD90.2 negativ sein, um auszuschließen, dass die ermittelten Daten Werte der falschen Zellpopulation aufweisen könnten.

In Abbildung 17 ist die Hochregulierung der Aktivierungs-Moleküle der BMDC auf ihrer Zelloberfläche dargestellt. Durch die Stimulation mit LPS wurde in den BMDC die Expression der Moleküle verstärkt. Für die Auswertung wurde der Medium-Wert der BMDC-Kontrolle, wie bereits beschrieben auf eins normalisiert und die entsprechende Induktion des jeweiligen Moleküls durch Division des Medium-Wertes berechnet. Sind nTregs in derselben Probe anwesend, wird die Hochregulierung der Oberflächen-Moleküle der BMDC nach LPS-Aktivierung inhibiert. Weiter konnte festgestellt werden, dass auch die Grundexpression (Medium-Wert) vieler Moleküle auf der Oberfläche der BMDC durch nTregs verringert wird. Dies wird bei der Betrachtung der Medium-Werte mit bzw. ohne nTregs deutlich. Durch die zusätzliche Aktivierung der nTregs mit α -CD3, kann die Suppression der BMDC-Aktivierung in allen Fällen noch verstärkt werden. Um diese stärkere Wirkung der nTregs für die Experimente zu nutzen, wurden die Zellen daher in folgenden Experimenten meistens zusätzlich mit α CD3 aktiviert. Da die Beobachtung aller in Abbildung 17 aufgeführten Moleküle im Verlauf dieser Arbeit zu weit führen würde, sollten lediglich einige wenige dieser Aktivierungs-Marker verfolgt werden. Ausgewählt wurden dafür CD80 und CD86, da diese beiden die wichtigsten kostimulatorischen Moleküle der T-Zell-Aktivierung darstellen.

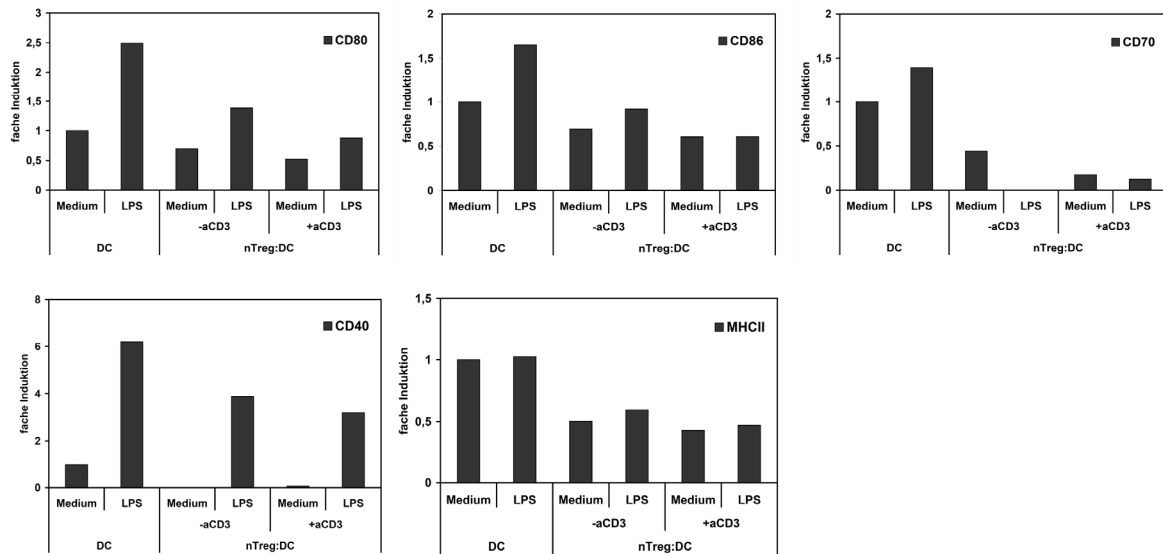


Abb.17: BMDC-Aktivierung in Gegenwart von nTregs. BMDC wurden in 96-Kavitäten-Rundbodenplatten ausgesät und mit bzw. ohne nTregs für 20 Stunden kultiviert. Dabei wurden die Zellen mit LPS (100 ng/ml) stimuliert oder unstimuliert belassen. Für die zusätzliche Stimulation der nTregs wurde ein löslicher α -CD3 Antikörper (3 μ g/ml) zu den Zellen hinzu gegeben. Die Zellen wurden nach 20 Stunden mit einer Antikörperlösung inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Gezeigt wird die Expression von CD80, CD86, CD70, CD40 und MHCII der CD11c positiven, CD90.2 negativen Zellen. Der jeweilige Medium-Wert wurde auf 1 normalisiert. Die Ergebnisse konnten vielfach reproduziert werden.

Zu den wichtigsten Indikatoren der Aktivierung von BMDC zählt die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, die für die Initiierung einer Immunantwort essentiell ist. Daher wurde im Folgenden die Sekretion von IL-6 und IL-12p40 in Gegenwart von nTregs untersucht. Dazu wurden die Zellen für 20 Stunden mit LPS stimuliert. Wie in Abbildung 18 zu sehen ist, sezernieren BMDC IL-6 und IL-12p40 nach LPS-Aktivierung. Analog zur Detektion der Aktivierungs-Marker zeigte sich auch hier, dass nTregs den Aktivierungszustand der BMDC beeinflussen. Entsprechend ließ sich beobachten, dass nTregs die Produktion der beiden Zytokine teilweise unterdrücken. Dabei war es auffällig, dass der Effekt bei IL-6 ohne zusätzliche Aktivierung der nTregs eher schwach ausgeprägt war. Die sezernierte Zytokin-Menge ist durch die Anwesenheit der nTregs für dieses Zytokin nur wenig verändert. Durch die zusätzliche Aktivierung der nTregs mit α -CD3 konnte jedoch eine starke Inhibierung beider Zytokine nachgewiesen werden.

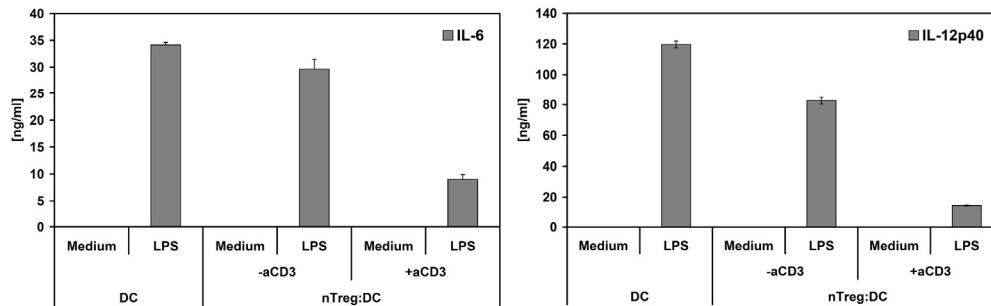


Abb.18: Sekretion von Zytokinen durch BMDC in Anwesenheit von nTregs. BMDC wurden in 96-Kavitäten-Rundbodenplatten ausgesät und mit bzw. ohne nTregs für 20 Stunden kultiviert. Dabei wurden die Zellen mit LPS (100 ng/ml) stimuliert oder unstimuliert belassen. Für die zusätzliche Stimulation der nTregs wurde ein löslicher α -CD3 Antikörper (3 μ g/ml) zu den Zellen hinzu gegeben. Nach 20 Stunden wurden die Zellkultur-Überstände abgenommen und mithilfe eines ELISAs auf IL-6 und IL-12p40 untersucht. Die Werte sind in ng/ml dargestellt, die Standardabweichungen wurden aus Triplikaten berechnet.

2.1.2 Aktivierung der BMDC mit verschiedenen TLR-Liganden vor der Suppression durch nTregs

Wie bereits aufgeführt, können BMDC durch eine Vielzahl an TLR-Liganden stimuliert werden, wobei auch mehrere Liganden kombiniert werden können. Die Kombination führt dabei meist zu einer stärkeren Aktivierung der Zelle (Warger et al., 2006), aber auch mit verschiedenen Einzel-Stimuli können unterschiedliche Aktivierungsgrade erreicht werden. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob mit anderen TLR-Liganden oder einer Kombination aus diesen die Inhibierung durch die nTregs verringert oder aufgehoben werden kann. Für diese Experimente wurden CpG, Poly(I:C), R848 und eine Kombination aus Poly(I:C) und R848 ausgewählt, die die Toll-like Rezeptoren 9, 3 und 7/8 ansprechen. Eine unstimulierte Probe, sowie LPS wurden bei diesen Experimenten als Kontrollen mitgeführt.

CpG ist ein Dinukleotid (Cytosin-Phosphatidyl-Guanosin), das in der DNA vorkommt. Das hier verwendete CpG weist nicht die Methylierung auf, wie humane DNA-Bestandteile sie tragen und wird dadurch von TLR9 im Säugetier erkannt. Da es sich hier um murine BMDC handelt, wurde ein CpG-Motiv ausgewählt, das vom murinen TLR9 erkannt wird (CpG 1668). Um TLR3 zu aktivieren, wurde doppelsträngige RNA (dsRNA, Poly(I:C)) benutzt. Poly(I:C) ist ein Zwischenprodukt der Replikation von Viren. Wie bereits ausführlich beschrieben aktiviert es die Zelle über das Adaptor-Molekül TRIF (Medzhitov et al., 1997). Für die Stimulation von TLR7/8 wurde R848

ausgewählt. Dabei handelt es sich um ein Guanosin-Nukleotid-Analogon, welches ebenfalls während der Vermehrung von Viren entsteht.

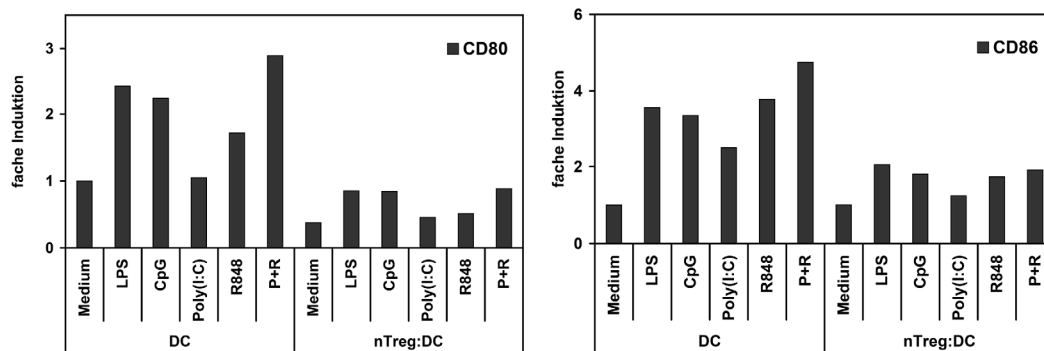


Abb.19: Suppression der BMDC-Aktivierung durch verschiedene TLR-Liganden. BMDC wurden in 96-Kavitäten-Rundbodenplatten ausgesät und mit bzw. ohne nTregs für 20 Stunden kultiviert. Dabei wurden die Zellen mit LPS (100 ng/ml), Poly(I:C) (50 µg/ml), CpG (100 nM), R848 (1 µg/ml), oder einer Kombination aus Poly(I:C) (50 µg/ml) und R837 (1 µg/ml) (P+R) stimuliert oder unstimuliert belassen. Für die zusätzliche Stimulation der nTregs wurde ein löslicher α -CD3 Antikörper (3 µg/ml) zu den Zellen hinzu gegeben. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit einer Antikörperlösung inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist die Expression von CD80 und CD86 der CD11c positiven, CD90.2 negativen Zellen. Der jeweilige Medium-Wert wurde auf 1 normalisiert.

Abbildung 19 zeigt die Expression von CD80 und CD86 auf den BMDC nach 20 Stunden Stimulation mit den TLR-Liganden. Eine Aktivierung der BMDC konnte durch alle Stimuli beobachtet werden. In Gegenwart der mit α -CD3 aktivierten nTregs wurde diese stark unterdrückt. Selbst die Stimulation mit der Kombination der beiden TLR-Liganden Poly(I:C) und R848, die eine deutlich verstärkte Aktivierung der Zellen auslösen, konnte durch die regulatorischen T-Zellen verhindert werden. Zusätzlich wurden die Zellkultur-Überstände nach 20 Stunden abgenommen und auf die Synthese von IL-6 und IL-12p40 untersucht. Die ermittelten Daten stimmen mit der Expression von CD80 und CD86 überein. Die Produktion beider Zytokine wurde durch die nTregs blockiert, selbst nach der starken Stimulation des kombinierten TLR-Liganden-Paares (nicht gezeigt). Durch diese Daten wird das Potential der verwendeten nTregs noch weiter verdeutlicht.

2.1.3 Inhibierung der BMDC-Aktivierung nach kurzer Kokultur mit nTregs

Zur Aktivierung einer T-Zelle muss die BMDC vollständig aktiviert sein. Somit ist der Zeitpunkt, zu dem die BMDC eine T-Zelle trifft besonders wichtig. Es kann passieren, dass eine BMDC in semi-aktivierten Zustand auf eine T-Zelle trifft, was unter Umständen ein verändertes Aktivierungs-Signal oder Anergie in der T-Zelle auslöst. Aus diesem Grund ist die Zeitspanne der Inhibierung einer dendritischen Zelle durch eine regulatorische T-Zelle auch von besonderer Wichtigkeit. Hier sollte nun festgestellt werden, zu welchem Zeitpunkt die Suppression der nTregs auf die BMDC einsetzt. In Experimenten, bei denen die Zellen über verschiedene Zeitpunkte zusammen inkubiert wurden, konnte festgestellt werden, dass die nTreg-vermittelte Suppression direkt mit dem Zell-Kontakt einsetzt. Abbildung 20 zeigt die Expression von CD80 und CD86 nach 1, 2 und 3 Stunden Kokultur mit nTregs. Hier lässt sich deutlich erkennen, dass bereits eine kurze Inkubationsdauer mit regulatorischen T-Zellen diese starke Veränderung im Oberflächen-Profil der BMDC auslöst. Weiter konnte festgestellt werden, dass die Inhibierung der untersuchten Oberflächen-Moleküle auf den BMDC nach der kürzesten Inkubationszeit (hier: 1 Stunde) mit nTregs am stärksten war.

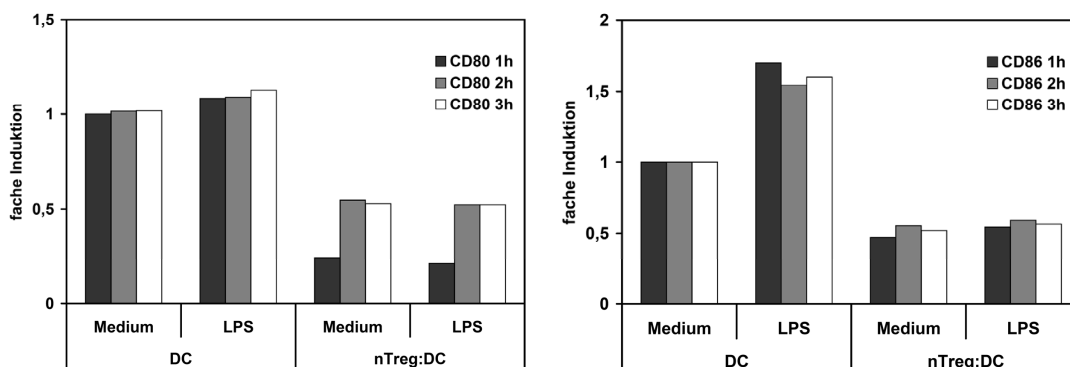


Abb.20: Kurz-Kinetik der BMDC-nTreg-Kokultur. BMDC wurden in 96-Kavitäten-Rundbodenplatten ausgesät und mit bzw. ohne nTregs für 1, 2 oder 3 Stunden kultiviert. Dabei wurden die Zellen mit LPS (100 ng/ml) stimuliert oder unstimuliert belassen. Für die Aktivierung der nTregs wurde ein löslicher α -CD3 Antikörper (3 μ g/ml) zu den Zellen hinzu gegeben. Die Zellen wurden nach 1, 2 und 3 h mit einer Antikörperlösung inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist die Expression von CD80 und CD86 der CD11c positiven und CD90.2 negativen Zellen. Der jeweilige Medium-Wert wurde auf 1 normalisiert. Das Ergebnis ist repräsentativ für 3 Experimente.

Für die folgenden Experimente wurden daraufhin immer zwei Inkubationszeiten gewählt. Eine kurze von circa 2-4 Stunden für die Analyse der direkten

Veränderungen durch die nTregs und eine längere von 20 Stunden zur Untersuchung der Produktion von Zytokinen und der Veränderung der Oberflächen-Moleküle CD80 und CD86.

2.1.4 Hochregulierung von antiinflammatorischen Molekülen auf den BMDC und T-Zell-Aktivierung durch supprimierte BMDC

Durch die beschriebenen Beobachtungen konnte gezeigt werden, dass die anwesenden nTregs den gesamten Ablauf der Aktivierung der BMDC verändern. Allerdings wird nicht die Expression aller Oberflächen-Moleküle der BMDC durch nTregs unterdrückt. Unter den vielen Molekülen, deren Synthese bei der Aktivierung von BMDC verändert werden, sind auch solche zu finden, die die T-Zell-Aktivierung inhibieren. Zu Ihnen zählen die B7H-Moleküle. Aktuell sind 4 verschiedene Moleküle aus dieser Familie beschrieben. B7H1, -H2, -H3 und -H4. Da durch die anwesenden nTregs das Aktivierungs-Profil der BMDC verändert wurde, stellte sich die Frage, ob sie noch in der Lage sind T-Zellen zu aktivieren. Im Folgenden wurde zunächst überprüft, ob die BMDC in Gegenwart der nTregs die beschriebenen antiinflammatorischen B7H-Moleküle hoch regulieren. In Abbildung 21 ist die Expression von B7H3 und B7H4 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass BMDC diese Moleküle sowohl im stimulierten als auch im unstimulierten Zustand nur sehr schwach exprimieren. Durch die Anwesenheit der nTregs konnte jedoch eine starke Induktion der beiden Moleküle festgestellt werden. Dabei konnte diese, je nach Experiment, unterschiedlich stark ausgeprägt sein. Ähnliche Ergebnisse konnten auch von Mahnke und Kollegen gezeigt werden (Mahnke et al., 2007b). Diese Arbeitsgruppe wies die Induktion von B7H3 auf BMDC durch natürlich vorkommende regulatorischen T-Zellen nach. Anders als bei den hier aufgeführten Experimenten setzte diese Arbeitsgruppe die isolierten nTregs direkt ein bzw. stimulierten sie über Nacht mit α -CD3 und α -CD28. In Übereinstimmung mit diesen Daten mussten die nTregs in dieser Arbeit nicht zusätzlich mit α -CD3 stimuliert werden, um die B7H-Moleküle auf den BMDC zu induzieren. Die in Abbildung 21 gezeigten Daten beziehen sich auf eine vierstündige Kokultur zwischen BMDC und nTregs. Nach längerer Kokultur (20 Stunden) war die Induktion von den B7H-Molekülen zwar noch nachweisbar, aber oft nicht mehr so stark ausgeprägt wie nach der kurzen Inkubationszeit.

Da die Stimulation der nTregs zum Beispiel zur Unterdrückung der Produktion der proinflammatorischen Zytokine durch BMDC notwendig ist, deutet das auf einen Wirkmechanismus, der über mehrere Signale umgesetzt wird. Dies wird im späteren Teil der Arbeit genauer untersucht.

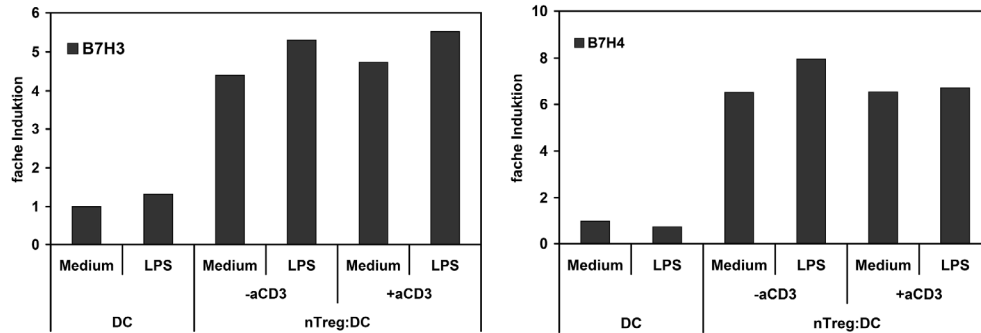


Abb.21: Induktion von B7H-Molekülen auf BMDC durch die Präsenz von nTregs. BMDC wurden in 96-Kavitäten-Rundbodenplatten ausgesät und mit bzw. ohne nTregs kultiviert. Dabei wurden die Zellen mit LPS (100 ng/ml) stimuliert oder unstimuliert belassen. Für die zusätzliche Stimulation der nTregs wurde ein löslicher α -CD3 Antikörper (3 μ g/ml) zu den Zellen hinzu gegeben. Die Zellen wurden nach der Inkubationszeit von 4 Stunden mit einer Antikörperlösung inkubiert und im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt sind die Expression von B7H3 und B7H4 der CD11c positiven und CD90.2 negativen Zellen. Der jeweilige Medium-Wert wurde auf 1 normalisiert. Die Ergebnisse konnten vielfach bestätigt werden.

Nachdem die Veränderungen der BMDC sich auch auf die Expression der B7H-Moleküle bezieht, sollte im Anschluss daran untersucht werden, ob die supprimierten BMDC noch in der Lage sind, T-Zellen zu aktivieren. Dafür mussten die BMDC nach der Kokultur wieder von den nTregs getrennt werden, um direkte Effekte der mit übertragenen nTregs auf die T-Zellen auszuschließen. Nachdem mehrere Methoden zur Trennung der beiden Zelltypen evaluiert wurden, stellte sich heraus, dass dies über eine MACS-Säule am Besten gelingt. Dabei werden die Zellen mit einem biotinylierten α -CD90.2 Antikörper markiert, der nur auf den nTregs bindet. Anschließend werden Streptavidin-Beads an den Antikörper gebunden. Diese Beads sind paramagnetisch, das heißt sie werden magnetisiert, sobald sie in ein Magnetfeld gebracht werden. Die Zellen werden anschließend über eine MACS-Säule in einem magnetischen Feld gegeben. Dabei bleiben die nTregs, an die der Antikörper und die Beads gebunden haben, dort zurück, während die BMDC die Säule passieren und aufgefangen werden können. Danach werden die BMDC mit einem Peptid beladen und mit T-Zellen kultiviert. Diese T-Zellen sind TCR-transgen, das bedeutet, sie

exprimieren einen TCR, der spezifisch für das eingesetzte Peptid ist und dieses in Kombination mit dem MHCII der BMDC erkennt. Das in diesem Fall verwendete Peptid ist das aus dem Ovalbumin stammende OT-2 Peptid. Sind die BMDC aktiviert und tragen zusätzlich das Peptid auf ihren MHCII-Molekülen sind sie in der Lage, die TCR-transgenen T-Zellen zu aktivieren. Diese erhalten von den BMDC sowohl das Aktivierungssignal über ihren TCR als auch das zweite kostimulatorische Signal, das von CD80 und CD86 ausgeht. Die Aktivierung und Proliferation der TCR-transgenen T-Zellen kann anschließend über mehrere Tage im Durchflusszytometer verfolgt werden.

An Tag 2 dieser Kokultur können auf der Oberfläche der TCR-transgenen T-Zellen verschiedene Aktivierungs-Moleküle angefärbt werden, um zu überprüfen, ob die T-Zellen durch die BMDC aktiviert wurden. Abbildung 22 zeigt die Aktivierungs-Moleküle CD25 und CD44 auf der Oberfläche der TCR-transgenen T-Zellen in der Kokultur. Dabei stellen die ersten 4 Balken lediglich Kontrollen dar, mit denen überprüft wurde, dass die T-Zellen sowohl das kostimulatorische Signal der aktivierten BMDC benötigen, als auch das MHCII-Molekül mit dem OT-2 Peptid. Ist nur eines der zwei Signale vorhanden, kommt es nicht zu einer Hochregulierung der Aktivierungs-Moleküle auf den T-Zellen. Sind auf den BMDC die kostimulatorischen Moleküle und der MHCII-Peptid-Komplex vorhanden, führt dies zu einer Aktivierung der T-Zellen. In der T-Zell-Population sind über 60% der Zellen sowohl CD25 als auch CD44 positiv. Wurden die BMDC vor der Kultur jedoch mit nTregs kultiviert (Pfeil), konnte eine deutliche Verringerung der Aktivierungs-Moleküle auf den TCR-transgenen T-Zellen nachgewiesen werden. Die Vorkultur mit nTregs verändert also nicht nur das Oberflächen- und Zytokin-Profil der BMDC, auch auf die folgende T-Zell-Aktivierung hat die Suppression der BMDC Einfluss.

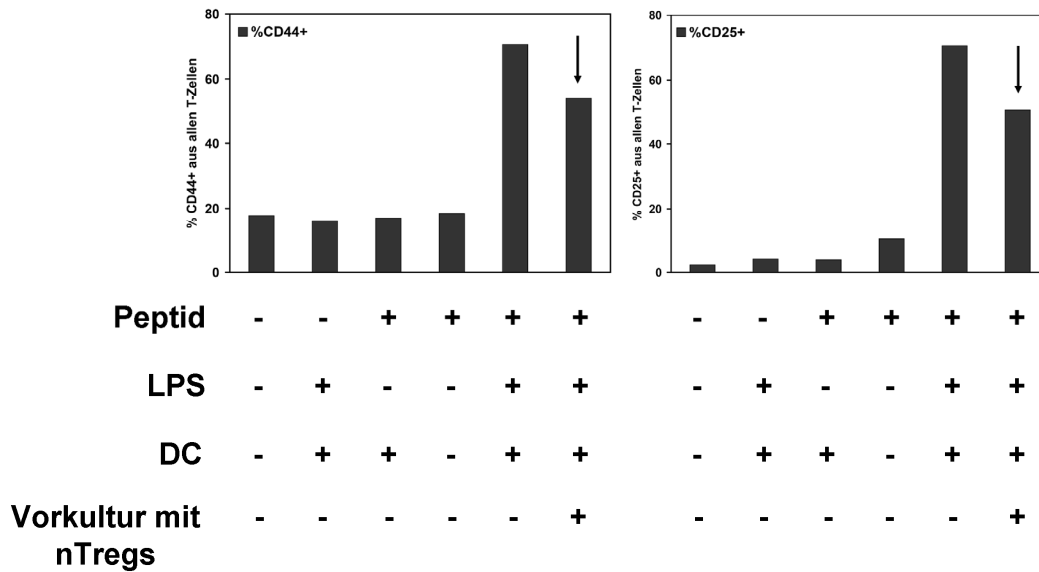


Abb.22: Aktivierung von transgenen T-Zellen mit supprimierten BMDC. BMDC wurden in 96-Kavitäten-Rundbodenplatten ausgesät und mit bzw. ohne nTregs kultiviert. Dabei wurden die BMDC mit LPS (100 ng/ml) und die nTregs mit einem löslichen α -CD3 Antikörper (3 μ g/ml) stimuliert. Nach der Inkubationszeit von 4 Stunden wurden die Zellen mit einem biotinylierten CD90.2-erkennenden Antikörper inkubiert und anschließend mit Streptavidin-Beads behandelt. Danach können die Zellen über eine MACS-Säule getrennt werden.

Für die zweite Kokultur wurden getrennte, frische und LPS-aktivierte BMDC mit einem Peptid beladen (100 nM, OT-2-Peptid) und mit vorher isolierten CD4-positiven T-Zellen kultiviert. Diese T-Zellen sind transgen für dieses Peptid aus dem Ovalbumin, das bedeutet, dass ihr TCR das Peptid in Kombination mit dem MHCII-Molekül auf der BMDC erkennt. Das Verhältnis von T-Zellen zu BMDC betrug dabei 10:1. An Tag 2 wurde die Kokultur mit einer Antikörperlösung inkubiert und im Durchflusszytometer analysiert. Dabei wurde die Prozentzahl der CD25-, bzw. CD44-exprimierenden TCR-transgenen T-Zellen ermittelt. Die Zellen, die für die Auswertung gewählt wurden, sind CD11c negativ und CD90.2 positiv. In der mit einem Pfeil markierten Probe wurden die BMDC mit nTregs vorkultiviert und anschließend wieder separiert. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 3 Experimente.

Im Folgenden sollte die Proliferation der TCR-transgenen T-Zellen in Anwesenheit der supprimierten BMDC genauer untersucht werden. Durch die Markierung mit CFSE ist es möglich genaue Aussagen über die Proliferation von T-Zellen zu machen. Dafür werden Zellen mit zunächst farblosem CFSE inkubiert. In der Zelle wird dieses durch einen Verseifungsschritt fluoreszent. Danach kann das Molekül die Zelle nicht mehr verlassen. Bei einer Proliferation wird es zu gleichen Teilen auf die Tochterzellen übertragen, so sind die einzelnen Teilungsschritte im Durchflusszytometer nachzuvollziehen. Für die Experimente wurden die BMDC mit nTregs kultiviert und wieder separiert, wie für Abbildung 22 bereits beschrieben. Die

TCR-transgenen T-Zellen wurden vor der Kokultur mit den BMDC mit CFSE (2,5 μ M) gefärbt. In Abbildung 23 wird die Proliferation der TCR-transgenen T-Zellen anhand von Histogrammen gezeigt. Darin ist zu erkennen, dass wie in Abbildung 22 die T-Zellen mit nur einem Signal von der BMDC nicht proliferieren können (rechts, und Mitte rechts in Abb. 23). In beiden Histogrammen bleibt das CFSE-Signal hoch, das bedeutet, die Zellen haben sich nicht geteilt. Wenn die T-Zellen beide Signale durch die BMDC erhalten, teilen sie sich, wobei die einzelnen Peaks je einen Teilungsschritt darstellen (linkes Histogramm). Wurden die BMDC vor der Kokultur mit den TCR-transgenen T-Zellen für 4 Stunden mit regulatorischen T-Zellen inkubiert, ist die Proliferation der TCR-transgenen T-Zellen verringert (Mitte links in Abb. 23).

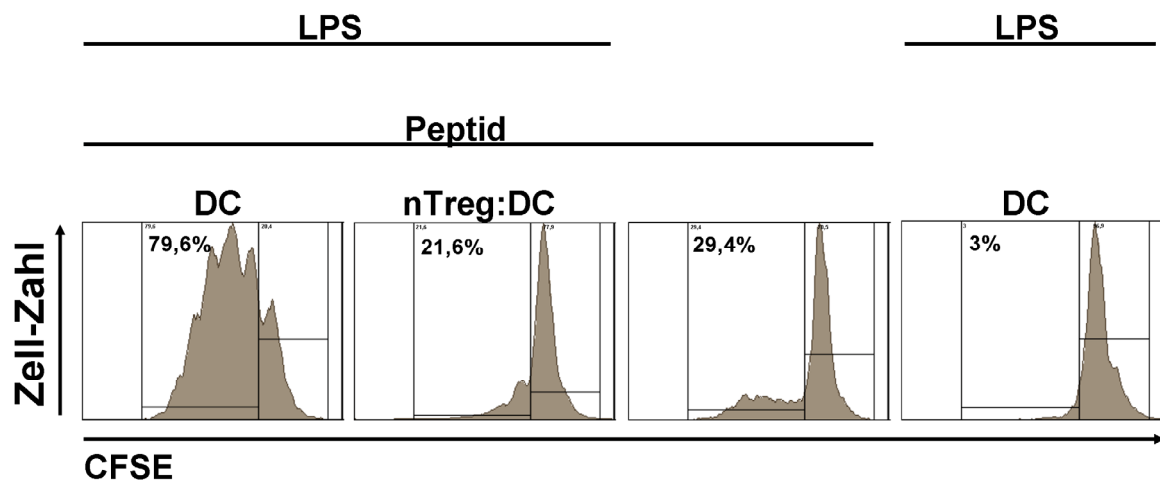


Abb.23: Proliferation TCR-transgener T-Zellen durch stimulierte und supprimierte BMDC. BMDC wurden in 96-Kavitäten-Rundbodenplatten ausgesät und mit bzw. ohne nTregs kultiviert. Dabei wurden die BMDC mit LPS (100 ng/ml) und die nTregs mit einem löslichen α -CD3 Antikörper (3 μ g/ml) stimuliert. Nach der Inkubationszeit von 4 Stunden wurden die Zellen mit einem biotinylierten CD90.2-erkennenden Antikörper inkubiert und anschließend mit Streptavidin-Beads behandelt. Danach können die Zellen über eine MACS-Säule getrennt werden.

Für die zweite Kokultur wurden getrennte und LPS-aktivierte BMDC mit einem Peptid beladen (100 nM, OT-2-Peptid) und mit vorher isolierten, CFSE-markierten (2,5 μ M), CD4-positiven T-Zellen, die einen transgenen TCR für dieses Peptid aus dem Ovalbumin tragen, kultiviert. Das Verhältnis von T-Zellen zu BMDC betrug dabei 10:1. An Tag 3 wurde die Proliferation der Kokultur im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist das CFSE-Signal der T-Zellen, dabei sinkt die Intensität des Signals mit zunehmender Proliferation. Die Signalstärke sinkt von rechts nach links.

Das stimmt mit den Daten von Oderup (Oderup et al., 2006) überein, die auch eine verringerte T-Zell-Proliferation durch supprimierte BMDC zeigen konnten. Allerdings

wurden bei dieser Arbeit die BMDC nach der Separation von den nTregs mit Paraformaldehyd fixiert und anschließend die TCR-transgenen T-Zellen dazu gegeben. Hier wurden die BMDC ausschließlich von den nTregs separiert um sicher zu stellen, dass die BMDC vital und voll funktionsfähig waren.

2.1.5 Antigen-Aufnahme und -Prozessierung in supprimierten BMDC

Als professionelle Antigen Präsentierende Zellen besitzen BMDC die Fähigkeit Antigen aufzunehmen, zu prozessieren und es auf der Oberfläche in MHC-Peptid-Komplexen zu präsentieren. Zur Untersuchung der Antigen-Aufnahme, wurde ein mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiertes Protein (FITC-Ovalbumin) auf die Zellen gegeben. Ovalbumin ist ein Protein aus dem Eiklar, es kann von BMDC aufgenommen und prozessiert werden. Die Aufnahme kann anschließend im Durchflusszytometer detektiert werden. Für die Versuche wurden BMDC mit nTregs 2 Stunden kultiviert. Die nTregs wurden dabei mit α -CD3 stimuliert. Für die BMDC erfolgte keine Stimulation, da die Zellen im unaktivierten Zustand das Antigen viel besser aufnehmen können. Nach der Inkubationszeit von 2 Stunden wurden die unstimulierten BMDC bzw. BMDC und nTregs mit FITC-Ovalbumin für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Es kann sehr gut verfolgt werden, dass unstimulierte dendritische Zellen das FITC-markierte Ovalbumin aufnehmen (Abbildung 24).

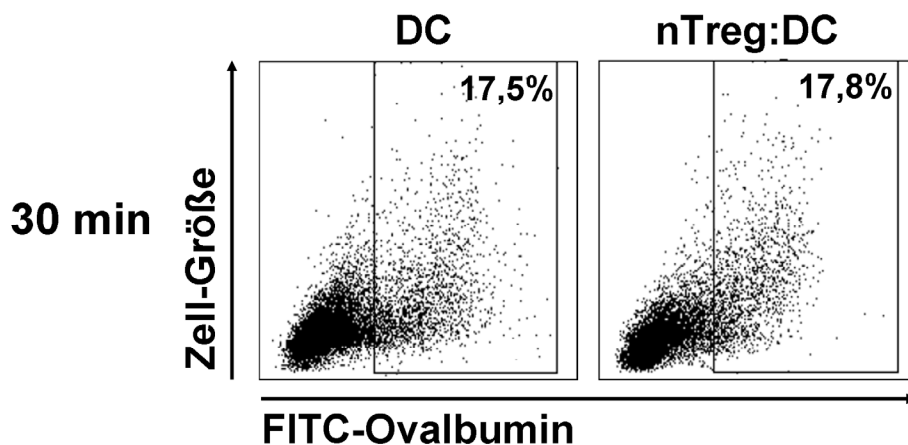


Abb.24: Antigen-Aufnahme der supprimierten BMDC. BMDC wurden in 96-Kavitäten-Rundbodenplatten ausgesät und mit bzw. ohne nTregs kultiviert. Die nTregs wurden zusätzlich mit einem löslichen α -CD3 Antikörper (3 μ g/ml) stimuliert. Nach der Inkubationszeit von 2 Stunden wurden die Zellen mit FITC-markiertem Ovalbumin (50 μ g/ml) für 30 Minuten inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer dessen Aufnahme überprüft. Dargestellt sind die CD11c positiven und CD90.2 negativen Zellen der Zellpopulation. Das FITC-Signal ist auf der X-Achse dargestellt und nimmt nach rechts zu. Das Ergebnis konnte in einem weiteren Experiment bestätigt werden.

Bei der Untersuchung der BMDC in Gegenwart von nTregs stellte sich heraus, dass die Antigen-Aufnahme der BMDC durch die regulatorischen T-Zellen nicht beeinträchtigt wird.

Um auszuschließen, dass das Protein lediglich außen an den Zellen anhaftet anstatt in die Zelle aufgenommen zu werden, wurden Experimente mit fixierten BMDC durchgeführt. Durch die Fixierung mit 2% Paraformaldehyd sind die Zellen nicht mehr vital, bleiben aber in dem Zustand vor der Fixierung erhalten. Die fixierten Zellen können kein Antigen mehr aufnehmen, es wäre aber noch möglich, dass das Protein außen an der Zell-Membran haftet, was in diesem Fall zu einem positiven Ergebnis führen würde. Durch die Experimente mit den fixierten Zellen, konnte gezeigt werden, dass die Antigen-Aufnahme der BMDC und der mit nTregs vorinkubierten BMDC spezifisch ist, da die fixierten Zellen nicht positiv im FITC-Kanal detektierbar sind (Abbildung 25). So kann davon ausgegangen werden, dass die nTregs die Fähigkeit der BMDC Antigene aufzunehmen nicht inhibieren.

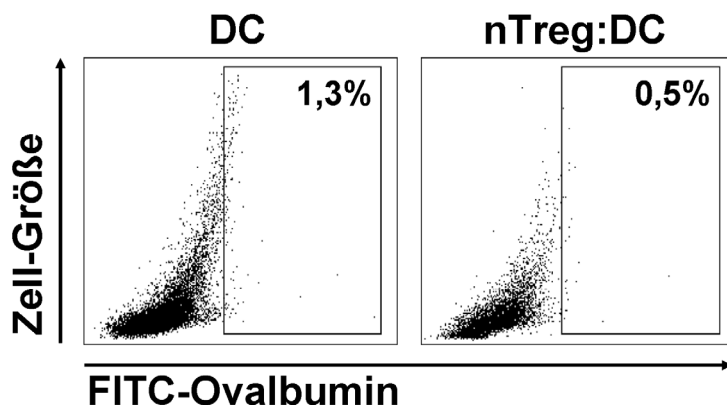


Abb.25: Antigen-Aufnahme in fixierten, supprimierten BMDC. BMDC wurden in 96-Kavitäten-Rundbodenplatten ausgesät und mit bzw. ohne nTregs kultiviert. Die nTregs wurden zusätzlich mit einem löslichen α -CD3 Antikörper (3 μ g/ml) stimuliert. Nach der Inkubationszeit von 2 Stunden wurden die Zellen die Zellen mit 2%iger Paraformaldehyd-Lösung für 10 Minuten fixiert und anschließend mit FITC-markiertem Ovalbumin (50 μ g/ml) für 30 Minuten inkubiert. Die Aufnahme des FITC-Ovalbumins wurde anschließend im Durchflusszytometer überprüft. Dargestellt sind die CD11c positiven und CD90.2 negativen Zellen der Zellpopulation. Das FITC-Signal ist auf der X-Achse dargestellt und nimmt nach rechts zu. Das Ergebnis konnte in einem weiteren Experiment bestätigt werden.

Um die Antigen-Prozessierung näher zu untersuchen, wurde ein weiteres Model verwendet, in dem Ovalbumin eingesetzt wird. DQ-Ovalbumin trägt den Farbstoff Bodipy. Dabei sind so viele Moleküle des Farbstoffes an das Ovalbumin gebunden, dass sich die Fluoreszenzen der Bodipy-Moleküle gegenseitig überlagern und damit

nicht strahlen (Quenching). Wird das DQ-Ovalbumin in die Zelle aufgenommen und prozessiert, entstehen einzelne Bodipy-markierte Peptide. Ohne diese Überlagerung ist der Farbstoff im FITC-Kanal des Durchflusszytometers messbar. Für die Experimente wurde DQ-Ovalbumin für 10 Minuten mit den Zellen bei 37°C inkubiert und anschließend kinetisch im Durchflusszytometer verfolgt. In Abbildung 26 ist die Prozessierung von Ovalbumin in der BMDC dargestellt. Dabei ist zu beobachten, dass der FITC-Wert in den unstimulierten BMDC kontinuierlich steigt (obere Reihe). Das lässt auf einen schnellen Angriff auf das Ovalbumin im Zytosol schließen. Die BMDC, die mit nTregs kultiviert wurden, zeigten dagegen nur ein sehr geringes FITC-Signal. Diese Zellen waren in ihrer Prozessierung gehemmt (untere Reihe). Die nTregs unterdrücken, neben der Expression der kostimulatorischen Moleküle, also ebenfalls die Antigenprozessierung und greifen somit in beide, für die Aktivierung der T-Zellen kritischen Prozesse ein.

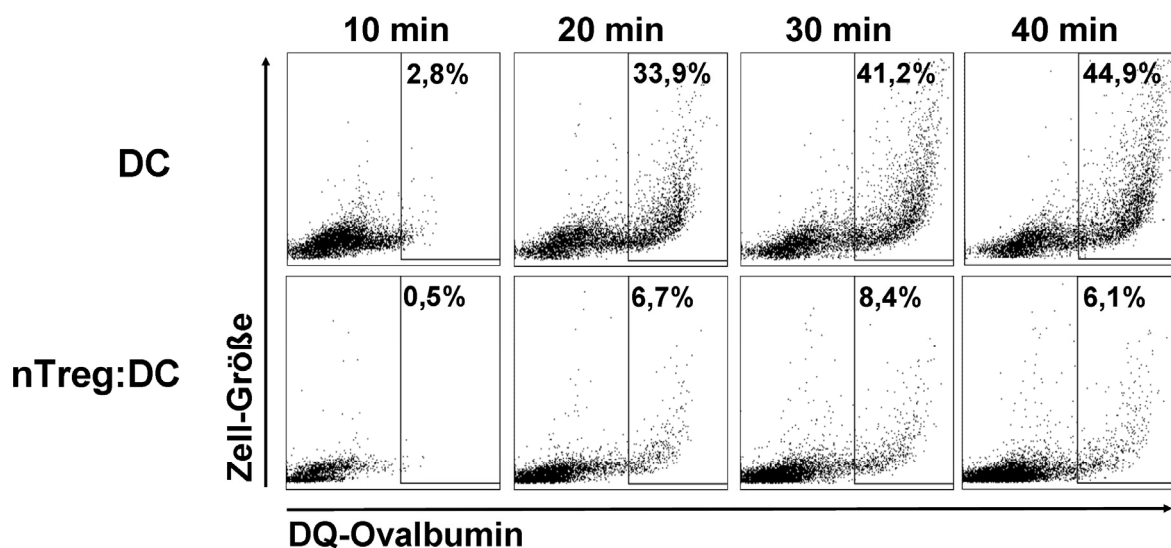


Abb.26: Antigen-Prozessierung in unstimulierten und supprimierten BMDC. Vor der Kultur wurden die BMDC mit einem α -CD11c Antikörper und die nTregs mit einem α -CD90.2 Antikörper markiert. Anschließend wurden die Zellen 96-Kavitäten-Rundbodenplatten in einem Verhältnis von 1 zu 5 ausgesät und für 2 Stunden miteinander kultiviert. Für die Aktivierung der nTregs wurde ein löslicher α -CD3 Antikörper (3 μ g/ml) zu den Zellen hinzu gegeben. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen, in frisches Testmedium aufgenommen und mit 10 μ g/ml DQ-Ovalbumin für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3-mal mit kaltem PBS gewaschen und dann kinetisch im Durchflusszytometer untersucht. Prozessiertes DQ-Ovalbumin ist im FITC-Kanal des Durchflusszytometers messbar. Dargestellt ist das FITC-Signal der CD11c positiven, CD90.2 negativen BMDC in der Kokultur. Die Prozentzahlen geben die Zellen an, die Ovalbumin prozessiert haben. Das Ergebnis konnte mehrfach bestätigt werden.

2.2 Mechanismen der Suppression von BMDC durch nTregs

2.2.1 Zell-Kontakt abhängige Mechanismen der Suppression von BMDC durch nTregs

2.2.1.1 Untersuchung der schnellen Veränderung des Expressions-Musters auf der BMDC-Oberfläche

Aufgrund der Geschwindigkeit, mit der sich die Oberfläche der BMDC in Anwesenheit der nTregs verändert, sollte im Anschluss untersucht werden, auf welche Weise diese starke Reduktion der Moleküle möglich ist. Dafür sind mehrere Möglichkeiten denkbar. Zum Einen könnte durch die nTregs die Endozytose-Fähigkeit der BMDC gesteigert werden, sodass sie ihre Oberflächen-Moleküle ins Zytosol aufnehmen könnten um diese dort abzubauen. Um das näher zu untersuchen, wurde wie bereits beschrieben eine Kokultur aus BMDC und nTregs hergestellt. Nach zwei Stunden Inkubationszeit wurden die Zellen mit Antikörpern markiert und im Durchflusszytometer analysiert. Dabei wurden sowohl die Zelloberfläche (s, surface) als auch das Zellinnere (ic, intracellular) mit einer Antikörper-Lösung markiert. Zu erwähnen ist hierbei, dass die Intrazellulär-Färbung sowohl die Moleküle auf der Oberfläche, als auch die im Zellinneren markiert. Sollten die Oberflächen-Moleküle nach Kontakt mit nTregs in das Zellinnere der BMDC aufgenommen werden, könnte das anhand einer verstärkten Intrazellulär-Färbung festgestellt werden.

In Abbildung 27 ist zu erkennen, dass das Signal der kostimulatorischen Moleküle beider Färbungen auf BMDC ungefähr gleich ist (Medium-Werte). Durch die Stimulation mit LPS nehmen beide Signale leicht zu. Es wurden also neue CD80- und CD86-Moleküle gebildet und auch an die Zelloberfläche gebracht. In Gegenwart der nTregs sinken die Expressionen auf der Zelloberfläche und im Zellinneren. Damit kann ausgeschlossen werden, dass die kostimulatorischen Moleküle durch den Kontakt mit nTregs in die BMDC internalisiert werden, denn in diesem Fall wäre das Signal der Intrazellulär-Färbung stark erhöht.

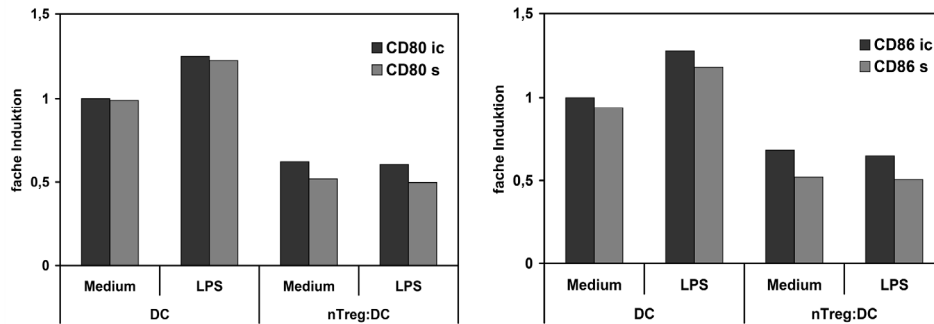


Abb.27: Vergleich der Expression von Oberflächen-Molekülen auf und in der BMDC nach Suppression durch nTregs. BMDC wurden in 96-Kavitäten-Rundbodenplatten ausgesät und mit bzw. ohne nTregs für 2 Stunden kultiviert. Dabei wurden die Zellen mit LPS (100 ng/ml) stimuliert oder unstimuliert belassen. Für die Aktivierung der nTregs wurde ein löslicher α -CD3 Antikörper (3 μ g/ml) zu den Zellen hinzu gegeben. Für die Oberflächen-Färbung (s, surface) wurden die Zellen mit einer Antikörper-Lösung inkubiert, bzw. für die Intrazellulär-Färbung (ic, intracellular) mit Zytotfix/Zytoperm fixiert und permeabilisiert und anschließend mit einer Antikörper-Lösung in Saponin-Puffer markiert. Dargestellt ist CD80 und CD86 in und auf den CD11c positiven, CD90.2 negativen Zellen. Der jeweilige Medium-Wert wurde auf 1 normalisiert. Die Ergebnisse wurden in 2 weiteren Experimenten bestätigt.

Die endozytotische Aufnahme der kostimulatorischen Moleküle von der BMDC-Oberfläche durch nTregs konnte somit also ausgeschlossen werden. Für die weiteren Untersuchungen wurde eine andere Theorie in Betracht gezogen. Diese beinhaltet den Verdau der Moleküle direkt von der Oberfläche der BMDC durch Matrix-Metalloproteinasen (MMPs). Diese zinkabhängigen Endopeptidasen sind am Abbau extrazellulärer Matrix-Proteine beteiligt. Dabei können die MMPs sowohl Moleküle auf der eigenen Zelloberfläche, als auch auf der anderer Zellen schneiden. So wäre es möglich, dass nTregs MMPs sezernieren, die auf der BMDC-Oberfläche die kostimulatorischen Moleküle entfernen. Alternativ könnten die nTregs die BMDC dazu veranlassen, selbst MMPs zu bilden, die die eigenen Moleküle degradieren. Zur Überprüfung dieser Theorie wurde ein Inhibitor heran gezogen, der verschiedene MMPs in und auf Zellen hemmt. Dieser Inhibitor, GM6001, kann die Aktivität von MMP-1, -2, -3, -8 und -9 hemmen (Zozulya et al., 2007). Diese MMPs werden von dendritischen Zellen synthetisiert und sind dort unter anderem während der Migration von Bedeutung (Yen et al., 2008) (Mahnke et al., 2007). Es ist bekannt, dass auch T-Zellen MMPs sezernieren, wie beispielsweise MMP-2, -3 und -9. Diese dienen dem Abbau von Molekülen auf anderen Zellen (Oviedo-Orta et al., 2008). Durch die Vorbehandlung der Zellen mit GM6001 sollte untersucht werden, ob MMPs an der

starken Verringerung der kostimulatorischen Moleküle auf den BMDC durch die Anwesenheit von nTregs verantwortlich ist. Für die Experimente wurden die BMDC mit dem Inhibitor vorbehandelt und anschließend die nTregs zugegeben, wobei der Inhibitor weiter in der Kultur verblieb. In Abbildung 28 ist die Expression von CD80 und CD86 auf den BMDC in An- und Abwesenheit von nTregs dargestellt. Durch Zugabe des MMP-Inhibitors konnte die Verringerung der Oberflächen-Moleküle durch die nTregs nicht verändert werden.

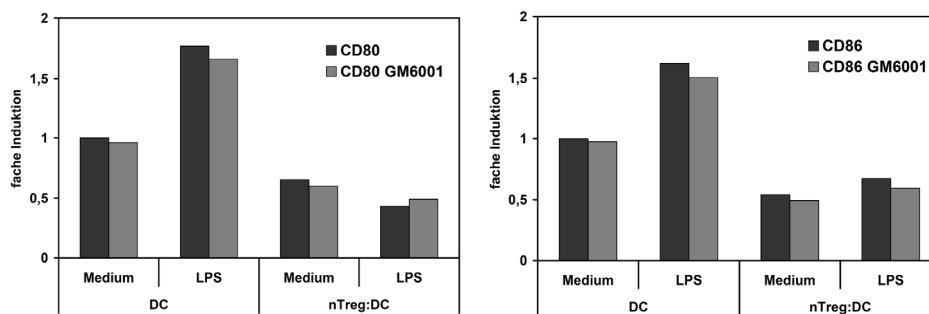


Abb.28: Durch Inhibierung der Matrix-Metalloproteinasen verändert sich die nTreg-vermittelte Suppression nicht. BMDC wurden in 96-Kavitäten-Rundbodenplatten ausgesät und mit bzw. ohne nTregs für 2 Stunden kultiviert. Die Matrix-Metalloproteinasen wurden dabei mit GM6001 (100 µM, bereits mit dieser Konz. publiziert) inhibiert. Zusätzlich wurden die Zellen mit LPS (100 ng/ml) stimuliert oder unstimuliert belassen. Für die Aktivierung der nTregs wurde ein löslicher α-CD3 Antikörper (3 µg/ml) zu den Zellen hinzu gegeben. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit einer Antikörperlösung inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer auf die Expression von CD80 und CD86 untersucht. Die Zellen wurden als CD11c positiv und CD90.2 negativ aus der Gesamtpopulation ausgewählt. Der jeweilige Medium-Wert wurde auf 1 normalisiert. Das Ergebnis ist repräsentativ für 2 gleichwertige Experimente.

Die Suppression durch nTregs konnte durch die Inhibierung mit GM6001 nicht aufgehoben werden. Dabei ist zu beachten, dass der Inhibitor nur die Funktion einiger der MMPs hemmt. Es ist daher möglich, dass andere MMPs an der Verringerung der Oberflächen-Moleküle auf den BMDC verantwortlich sind. Weitere Experimente sollten im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht durchgeführt werden.

2.2.1.2 Suppression der BMDC durch nTregs ist Zell-Kontakt abhängig

Um die Mechanismen zu untersuchen, durch die nTregs die Aktivierung der BMDC verhindern können, wurden mehrere Möglichkeiten in Betracht gezogen. Eine beinhaltet die Produktion von Mediatoren (z.B.: antiinflammatorische Zytokine), eine andere den Kontakt über Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Da die Suppression der

BMDC schon nach sehr kurzer Inkubationszeit mit den nTregs auftritt, sollte untersucht werden, ob dazu direkter Zell-Kontakt notwendig ist. Dafür wurden die beiden Zelltypen in einem Verhältnis von fünf nTregs zu einer BMDC in einem Transwell Experiment untersucht. Hierbei sind beide Zellpopulationen durch feinmaschige Gaze getrennt. Somit konnten die Zellen keinen direkten Kontakt herstellen, die Möglichkeit, Mediatoren auszuschütten bleibt allerdings weiter vorhanden. Die so kultivierten BMDC zeigen in Gegenwart von LPS und bezogen auf die Expression der untersuchten Oberflächen-Moleküle eine vergleichbare Aktivierung zu den BMDC, die ohne nTregs kultiviert wurden. Auch durch die zusätzliche Aktivierung mit α -CD3 konnten die nTregs die BMDC nicht inhibieren (nicht gezeigt). Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurde im folgenden Versuch wieder eine Kokultur aus BMDC und nTregs hergestellt. Nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden wurden die Überstände dieser Kokultur abgenommen und auf neue unstimulierte BMDC gegeben. Dabei wurde auf die neuen BMDC kein zusätzliches LPS mehr gegeben, da dies schon in den Überständen der ersten Kultur vorhanden war. Abbildung 29 zeigt das Ergebnis der BMDC-Aktivierung mit den Überständen einer Kokultur. Die Bild-Unterschrift bezieht sich dabei auf die erste Kultur, in der zweiten befanden sich ausschließlich dendritische Zellen. Dargestellt sind die Expression von CD80 und CD86 der CD11c positiven BMDC.

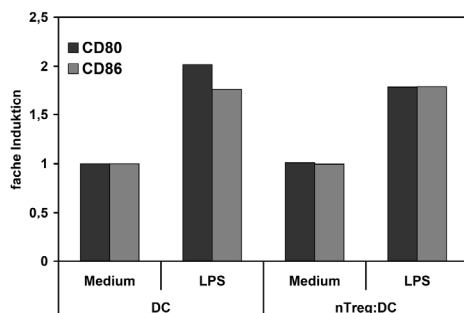


Abb.29: BMDC-Aktivierung mit Überständen einer Kokultur aus nTregs und BMDC. BMDC wurden in 96-Kavitäten-Platten mit nTregs in einem Verhältnis von 5 nTregs zu 1 BMDC kultiviert. Dabei wurden die BMDC mit LPS (100 ng/ml) aktiviert oder unstimuliert belassen. Die nTregs wurden mit einem löslichen α -CD3 Antikörper (3 μ g/ml) aktiviert. Nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden wurden die Überstände abgenommen.

Diese wurden auf eine neue Kultur aus BMDC gegeben, die auch in 96-Kavitäten-Platten hergestellt wurde. In die zweite Kultur wurde kein weiteres LPS mehr zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden wurden die Zellen mit einer Antikörperlösung inkubiert und im Durchflusszytometer auf die Expression von CD80 und CD86 untersucht. Dargestellt sind die CD11c positiven Zellen der Population. Der jeweilige Medium-Wert wurde gleich 1 gesetzt.

Wie zu erkennen ist, wird die BMDC-Aktivierung durch die Überstände der ersten Kultur nicht unterdrückt. Zusätzlich wurden von dieser zweiten Kultur die Überstände abgenommen und im ELISA auf die Sekretion der proinflammatorischen Zytokinen IL-6 und IL-12p40 untersucht. Auch diese wird durch die Überstände aus der ersten Kultur nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Dadurch kann die Produktion von Mediatoren durch die nTregs zu diesem frühen Zeitpunkt der Suppression ausgeschlossen werden. Die Zellen benötigen also unbedingt den Kontakt zueinander, damit die Aktivierung der BMDC inhibiert werden kann.

2.2.1.3 Zell-Kontakt über Gap Junction Intercellular Communication (GJIC)

Es ist für Zellen möglich, direkt miteinander zu kommunizieren. Neben den vielen Rezeptoren auf der Zell-Oberfläche gibt es eine Art der direkten Verbindung, bei der die Zellen auch über ihre Zytosole interagieren können. Dies ist die Kommunikation über Gap Junctions (Gap Junction Intercellular Communication, GJIC) (Segretain and Falk, 2004). Gap Junctions sind Kanäle, die Zellen miteinander verbinden und durch die ein aktiver Austausch von Ionen, Aminosäuren oder anderen kleinen Molekülen stattfinden kann (Eppig et al., 2005) (Kanaporis et al., 2008). Gap Junctions bestehen aus Konnexinen (Cx), die sich in der Zellmembran zu sechst (Hexamere) im Kreis anlagern und so einen Hemi-Kanal (Konnexon) bilden (Laird, 2006). Dabei können Konnexone aus gleichen Konnexinen (Homomere), oder aus verschiedenen Konnexinen (Heteromere) aufgebaut sein. Bei einem direkten Zell-Kontakt werden zwei Hemi-Kanäle aufeinander gelegt und bilden eine offene Verbindung zwischen den beiden Zellen. Durch diese Öffnung können verschiedene Moleküle passieren, die Größe kann jedoch maximal 1 kDa betragen (Lane and Swales, 1979).

Um zunächst die Möglichkeit dieser Zell-Zell-Verbindung zu untersuchen, wurden in beiden Zelltypen die Expression von Konnexinen überprüft. Hierzu wurden BMDC und nTregs getrennt voneinander aktiviert und mithilfe einer PCR untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass beide Zelltypen verschiedene Konnexine exprimieren, deren Bildung durch die Aktivierung noch verstärkt wird (Abbildung 30).

Konnexin	unstimuliert		aktiviert	
	DC	nTreg	DC	nTreg
Cx26	-	-	-	-
Cx30	-	-	-	-
Cx30.3	-	-	-	-
Cx31	-	-	-	-
Cx31.1	+	+	++	++
Cx32	+	+	++	++
Cx37	-	-	-	-
Cx40	-	-	-	-
Cx43	+	+	++	++
Cx45	-	+	-	++
Cx46	-	+	-	++
Cx50	-	-	-	-

Abb.30: Untersuchung der Expression von Konnexin mRNA in unstimulierten und stimulierten BMDC und nTregs. BMDC wurden in 6-Kavitäten-Platten für 4 Stunden mit LPS (100 ng/ml) stimuliert oder unstimuliert belassen. nTregs wurden in 24-Kavitäten-Platten für 4 Stunden mit α -CD3 (3 μ g/ml) stimuliert oder unstimuliert belassen. Beide Zellarten wurden nach der Inkubationszeit geerntet, gewaschen und TRI-Reagenz homogenisiert. Zur RNA-Extraktion wurde die Suspension mit Chloroform versetzt und zentrifugiert. Danach wurde die flüssige Phase abgenommen und mit Isopropanol gemischt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das RNA-Pellet 2-mal mit Ethanol gewaschen. Die so aufbereitete RNA wurde anschließend mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Um die relative mRNA der Konnexine zu bestimmen, wurden die Proben in einer real-time PCR quantifiziert. Für die Darstellung wurden die Ergebnisse der Proben miteinander verglichen und entsprechend ihrer Expression der mRNAs als negativ (-), leichte Induktion (+) und positiv (++) bewertet.

Um die Expression der Konnexine zu verifizieren, wurde aus BMDC und nTregs eine Kokultur hergestellt. Dazu wurden die Zellen in 12-Kavitäten-Platten auf Deckgläsern kultiviert und anschließend verschiedene Konnexine angefärbt. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenz-Mikroskop. Um die Zellen voneinander zu unterscheiden, wurde CD11c auf der Oberfläche der BMDC mit einem α -CD11c-FITC Antikörper markiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Unter den zur Verfügung stehenden Antikörpern, wurden α -Cx-26, -32 und -43 ausgewählt. Andere Arbeitsgruppen konnten bereits nachweisen, dass diese Konnexine auf den beiden Zelltypen vorkommen und für deren Funktion von Bedeutung sind (Bermudez-Fajardo et al., 2007) (Neijssen et al., 2007).

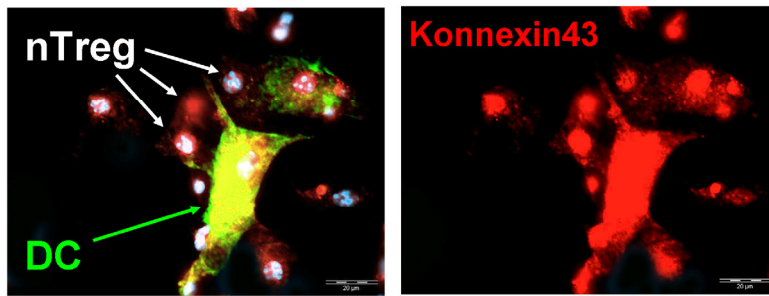


Abb.31: Connexin-43 Färbung auf BMDC und nTregs in einer Kokultur. BMDC und nTregs wurden in einem Verhältnis von 1 zu 5 in 12-Kavitäten-Platten auf Deckgläsern für 2 Stunden inkubiert. Die nTregs wurden mit einem α -CD3 Antikörper (3 μ g/ml), die BMDC mit LPS (100 ng/ml) stimuliert. Nach der Inkubationszeit wurde CD11c auf der Oberfläche der BMDC mit einem FITC-markierten Antikörper gefärbt. Cx-43 wurde mit einem Kaninchen- α -Cx-43 und anschließend mit α -Kaninchen-Alexa594 markiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Das FITC-Signal wird in grün, das von DAPI in blau und das Signal des Alexa594 Antikörpers in rot dargestellt. Die Skalierungsbalken betragen 20 μ m.

Abbildung 31 zeigt die Expression von Cx-43 in einer Kokultur aus nTregs und BMDC. Deutlich ist zu erkennen, dass dieses Connexin von beiden Zellen stark exprimiert wird. Die Stellen, an denen die Zellen aufeinander treffen, sind ebenfalls Cx-43 positiv. Im Gegensatz dazu konnte Cx-26 auf keiner der Zellen, Cx32 nur auf den nTregs nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Zusammen mit den PCR-Daten weisen die Färbungen also die Möglichkeit auf, dass dendritische Zellen und regulatorische T-Zellen über Gap Junctions miteinander kommunizieren. So könnte die früh auftretende Suppression der BMDC durch nTregs erklärt werden.

2.2.1.4 Blockierung der Gap Junctions in einer Kokultur aus BMDC und nTregs

Um zu überprüfen, ob die frühe nTreg-vermittelte Suppression der BMDC tatsächlich abhängig von Gap Junctions ist, wurde im Folgenden mit einem Inhibitor gearbeitet. Heptanol unterbindet die Verbindung zwischen den Connexonen, somit ist eine Kommunikation der Zellen über Gap Junctions nicht mehr möglich (Bukauskas et al., 2001). Für die Experimente wurden die BMDC mit 2 mM Heptanol vorbehandelt und anschließend die nTregs zugegeben, wobei das Heptanol weiter in der Kultur verblieb. Nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden, wurden die Zellen im Durchflusszytometer untersucht. In Abbildung 32 ist die Expression von CD80, CD86, CD40 und B7H3 zu sehen. Durch die Stimulation der BMDC mit LPS wird eine Hochregulierung von CD80, CD86 und CD40 induziert. In Gegenwart der nTregs ist

die Expression dieser Moleküle stark verringert. Durch die Inhibierung der Formierung der Gap Junctions konnte die Aktivierung der BMDC wieder hergestellt werden. Dabei wurde die Expression von CD80 und CD86 fast vollständig auf das Niveau der BMDC-Aktivierung ohne nTregs angehoben. Für CD40 ist dieser Effekt etwas schwächer. Betrachtet man die Expression von B7H3, so ist zu erkennen, dass dieses Molekül durch die nTregs, wie schon in vorherigen Experimenten, auf den BMDC induziert wird. Verhindert man die Bildung der Gap Junctions, so konnte die Induktion dieses antiinflammatorischen Moleküls teilweise unterbunden werden. Dadurch kann also gezeigt werden, dass die sofortige, Zell-Kontakt-abhängige Suppression der BMDC durch nTregs wahrscheinlich durch Gap Junctions vermittelt wird.

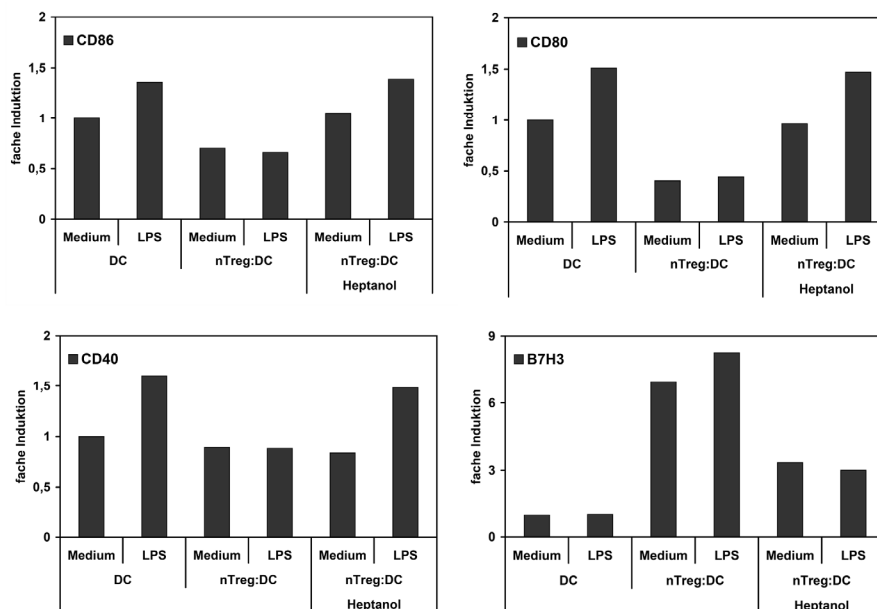


Abb.32: Verringerung der Suppression durch Inhibierung der Gap Junctions mit Heptanol. Die Zellen wurden in 96-Kavitäten-Platten in einem Verhältnis von 5 nTregs zu 1 BMDC für 4 Stunden kultiviert. Aktiviert wurden die BMDC mit LPS (100 ng/ml) und die nTregs mit α -CD3 (3 μ g/ml). Die Blockierung der Gap Junctions erfolgte mit Heptanol (2 mM). Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit einer Antikörperlösung inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Untersucht wurde die Expression von CD80 und CD86 (oben) und CD40 und B7H3 (unten) der CD11c positiven und CD90.2 negativen Zellen. Der jeweilige Medium-Wert wurde gleich 1 gesetzt.

Ein weiteres Molekül zur Blockierung von Gap Junctions ist Gap27. Dies ist ein Peptid, das sich dem Konnexon außen anlagern kann. Es kann an die extrazelluläre Domäne von Cx37, Cx40 oder Cx43 binden und verhindert so die Bindung des zweiten Hemi-Kanals an diese Konnexine (mimetic peptide) (Ilvesaro et al., 2001)

(Figiel et al., 2007). Abbildung 33 zeigt die Auswirkung von Gap27 auf die BMDC-Aktivierung in Gegenwart von nTregs. Für diesen Versuch wurden BMDC und nTregs 4 Stunden zusammen kultiviert. In einige Proben wurde zusätzlich das Gap27-Peptid gegeben. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit einer Antikörperlösung inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert.

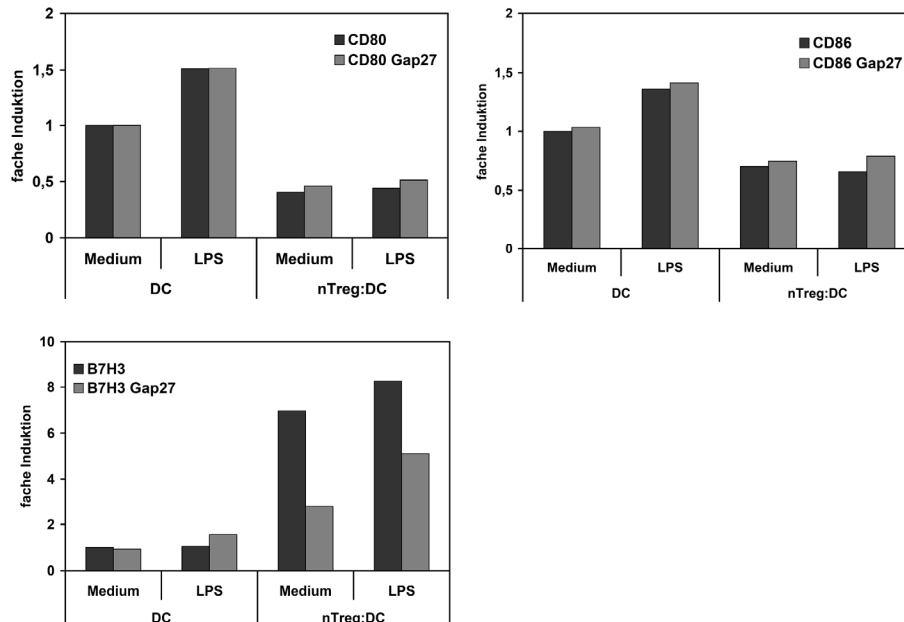


Abb.33: Einfluss von Gap27 auf die Suppression der BMDC. Die Zellen wurden in 96-Kavitäten-Platten in einem Verhältnis von 5 nTregs zu 1 BMDC für 4 Stunden kultiviert (dunkle Balken). Aktiviert wurden die BMDC mit LPS (100 ng/ml) und die nTregs mit α -CD3 (3 μ g/ml). Die Blockierung der Gap Junctions erfolgte mit Gap27 (300 μ M) (helle Balken). Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit einer Antikörperlösung behandelt und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Untersucht wurde die Expression von CD80, CD86 und B7H3 der CD11c positiven, CD90.2 negativen Zellen in der Population. Der Medium-Wert der nicht inhibierten BMDC wurde gleich 1 gesetzt.

Wie in den vorigen Experimenten wird die Expression von CD80 und CD86 durch die nTregs stark verringert. In Anwesenheit von Gap27 wird dies lediglich leicht verändert. Die Expression von B7H3 wird durch die anwesenden nTregs erhöht. Durch Gap27 kann die Erhöhung von B7H3 etwas verringert werden. Die unterschiedlichen Effekte, der beiden Gap Junction blockierenden Substanzen weisen darauf hin, dass an der GJIC zwischen BMDC und nTregs weitere Konnexine beteiligt sein könnten, die Gap27 durch seine Wirkung nicht blockieren kann. Durch die Experimente mit Heptanol und Gap27 konnte gezeigt werden, dass die schnelle Veränderung des Oberflächen-Profiles auf BMDC durch nTregs wahrscheinlich durch Gap Junctions vermittelt wird. Keins der beiden Moleküle war jedoch in der Lage, den

nTreg-vermittelten Effekt vollständig aufzuheben. Das weist auf einen Mechanismus hin, in den noch weitere Signale involviert sind.

Zur Überprüfung der Zell-Kontakt-Theorie wurde Gap27 auch in Experimenten mit längerer Inkubationszeit (20 Stunden) verwendet. Abbildung 34 zeigt die Produktion von IL-12p40. Es ist zu erkennen, dass Gap27 in der BMDC-Kultur die Sekretion dieses Zytokins nach LPS-Aktivierung stark verringert. Für eine vollständige Aktivierung der BMDC ist es also nötig, dass die Zellen auch untereinander Kontakt über Gap Junctions haben. Die Gruppe um (Neijssen et al., 2005) konnte bereits zeigen, dass dendritische Zellen durch Zell-Kontakt stärker aktiviert werden können. Im Experiment zeigte sich durch die gleichzeitige Anwesenheit von Gap27 und nTregs keine Erhöhung von IL-12p40. Bei der Untersuchung der Sekretion von IL-6 konnten die gleichen Ergebnisse beobachtet werden (nicht gezeigt). In Bezug auf die Expression der kostimulatorischen Moleküle auf den BMDC konnte zu diesem Zeitpunkt der Kultur (20 Stunden) ebenfalls keine Verminderung der Suppression durch Gap27 festgestellt werden.

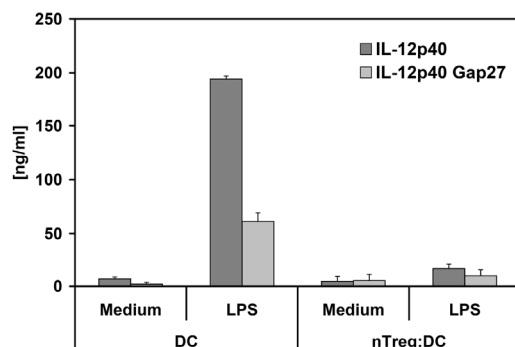


Abb.34: Inhibierung von IL-12p40 durch Gap27. BMDC wurden in 96-Kavitäten-Platten mit bzw. ohne nTregs für 20 Stunden kultiviert. Aktiviert wurden die BMDC mit LPS (100 ng/ml) und die nTregs mit α -CD3 (3 μ g/ml) (dunkle Balken). Die Blockierung der Gap Junctions erfolgte mit 300 μ M Gap27 (helle Balken). Nach der Inkubationszeit wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und auf die Produktion von IL-12p40 im ELISA untersucht. Die Werte sind in ng/ml dargestellt. Die Standardabweichungen wurden aus 3 Werten berechnet. Das Ergebnis konnte in einem weiteren Experiment bestätigt werden.

Die Experimente mit den beiden Inhibitoren Gap27 und Heptanol zeigten, dass die frühe Inhibierung der T-Zell-Aktivierung vermutlich durch Gap Junctions vermittelt wird. Für die späten Effekte der nTregs auf die BMDC, im Besonderen auf die Produktion der proinflammatorischen Zytokine muss ein anderer Wirkmechanismus in Betracht gezogen werden. Dies wird später in dieser Arbeit genauer untersucht.

2.2.1.5 Die Funktionalität der Gap Junctions lässt sich durch die Übertragung von einem Farbstoff von Zelle zu Zelle nachweisen

Hier stellte sich die Frage, ob die BMDC tatsächlich mit nTregs über Gap Junctions kommunizieren. Entsprechend sollte die Funktionalität der Kanäle getestet werden. Dafür wurde ein Farbstoff (Calcein) benutzt, der klein genug ist, um über Gap Junctions übertragen zu werden (Juul et al., 2000). Dieser trägt zunächst eine Acetoxymethyl-Gruppe (Calcein-AM) und ist farblos. Durch die AM-Gruppe ist das Molekül membrangängig und wird so in die Zelle aufgenommen. Im Zytosol wird die Acetoxymethyl-Gruppe durch Esterasen abgespalten. Dadurch ist es möglich, dass sich Kalzium-Ionen an das Calcein anlagern, wodurch ein grüner Fluoreszenz-Farbstoff entsteht der im Durchflusszytometer messbar ist. So kann das Calcein die Zelle nicht mehr verlassen. Allerdings ist es klein genug, um über Gap Junctions in eine andere Zelle transportiert zu werden.

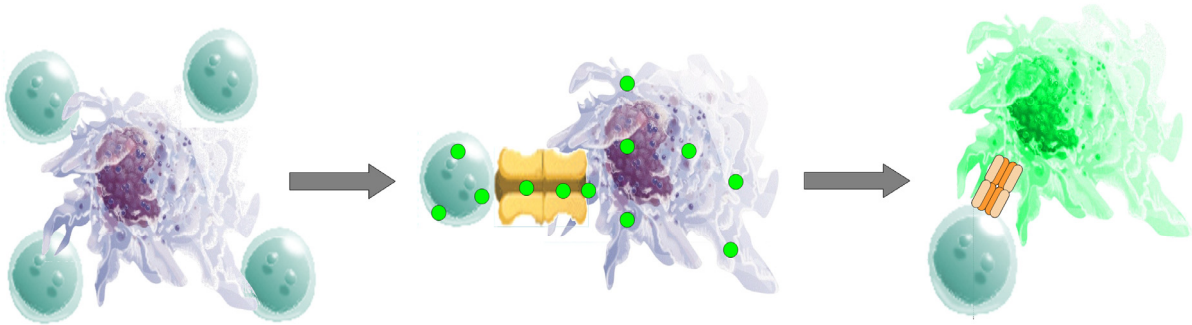


Abb.35: Schaubild zur Übertragung von Calcein von nTregs auf BMDC. Regulatorische T-Zellen wurden vor Beginn der Experimente mit 0,5 µg/ml Calcein gefärbt. Dabei trägt das Calcein zunächst eine Acetoxymethyl-Gruppe (Calcein-AM), die es dem Molekül ermöglicht, die Zellmembran der nTregs zu passieren. Im Zytoplasma wird die AM-Gruppe durch Esterasen abgespalten. Dadurch kann das Calcein an Kalzium-Ionen binden und erlangt seine Fluoreszenz. So kann das Calcein die Zelle nicht mehr verlassen. Nach der Färbung wurden die nTregs mit BMDC kultiviert. Durch die Verbindung über Gap Junctions ist es möglich, dass dieses Fluorochrom von einer Zelle auf eine andere übertragen wird. Findet zwischen nTregs und BMDC eine Kommunikation über Gap Junctions statt, finden sich am Ende des Experiments Calcein positive BMDC in der Kultur.

Für die folgenden Versuche wurden nTregs mit Calcein gefärbt (0,5 µg/ml) und dann mit BMDC kultiviert. Im Durchflusszytometer wurde anschließend überprüft, ob die BMDC Calcein positiv geworden waren. Zur Untersuchung der Zellen wurde nach der Inkubationszeit Accutase in die Kokultur gegeben. Dies ist eine Mischung aus mehreren Enzymen, die Proteine und Kollagene auf der extrazellulären Matrix spaltet

und so imstande ist, die enge Verbindung der beiden Zelltypen zu lösen, ohne sie zu beschädigen. So konnte sicher gestellt werden, dass die Zellen im FACS einzeln untersucht werden konnten. Die Accutase muss allerdings 45 Minuten bei 37°C auf die Zellen wirken können, daher war es nicht möglich, sehr frühe Zeitpunkte der Kokultur zu untersuchen. Für Abbildung 36 wurden BMDC und nTregs 18 Stunden miteinander kultiviert und anschließend für 45 Minuten mit Accutase behandelt. Dargestellt ist ein Histogramm der Durchflusszytometer-Analyse. Die Abbildung zeigt neben den Einzelkulturen (Calcein gefärbte nTregs links, ungefärbte BMDC Mitte) die CD11c positiven und CD90.2 negativen BMDC der Kokultur (rechts). Es ist deutlich zu erkennen, dass einige der BMDC Calcein positiv geworden sind. Das zeigt deutlich, dass die Zellen über Gap Junctions miteinander kommuniziert haben.

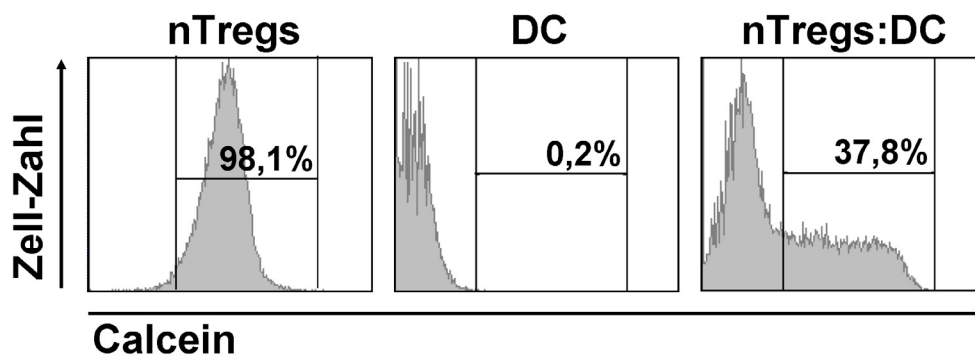


Abb.36: Calcein-Übertragung von nTregs auf BMDC in einer Kokultur. nTregs wurden mit 0,5 µg/ml Calcein-AM gefärbt und anschließend für 18 Stunden mit BMDC kultiviert. Dabei war das Verhältnis zwischen nTregs zu BMDC 5 zu 1. Die Aktivierung der nTregs wurde mit α-CD3 (3 µg/ml) gewährleistet. Nach der Inkubationszeit wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und mit Accutase ersetzt. Nach 45 Minuten wurden die Zellen mit einer Antikörperlösung markiert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt sind die Calcein gefärbten, CD90.2 positiven nTregs (erstes Bild) und ungefärbte CD11c positive BMDC (zweites Bild), beide Bilder stellen Einzel-Kulturen dar. Im dritten Bild sind die BMDC aus einer Kokultur zu sehen. Sie wurden als CD11c positive und CD90.2 negative Zellen bestimmt. Auf der X-Achse wurde das Calcein-Signal im FITC-Kanal aufgetragen. Der eingerahmte Bildausschnitt zeigt die jeweilige Prozentzahl der Calcein positiven Zellen. Das Ergebnis konnte reproduziert werden.

Um die Übertragung von Calcein auf die BMDC auch nach kurzen Zeitpunkten zu zeigen, wurde eine Kokultur aus Calcein gefärbten nTregs und BMDC hergestellt und diese im Fluoreszenz-Mikroskop untersucht. Die Zellen wurden dafür auf Deckgläsern in 12-Kavitäten-Platten für 2 Stunden kultiviert. Um die BMDC im Mikroskop von den nTregs unterscheiden zu können, wurde auf den BMDC MHCII

angefärbt (rot). Abbildung 37 zeigt die Calcein-Übertragung von nTregs auf BMDC. Das erste Bild zeigt nur das Calcein in den Zellen, das zweite die MHCII-Färbung der BMDC. Im zweiten Bild lässt sich also genau bestimmen, wo die BMDC angeordnet sind. Wenn damit das erste Bild verglichen wird, ist deutlich zu erkennen, dass sich Calcein im Zytosol der BMDC befindet (Pfeile). Das dritte Bild enthält alle drei Fluorochrome übereinander gelegt. Hier sind noch die Zellkerne, die mit DAPI markiert wurden, gezeigt.

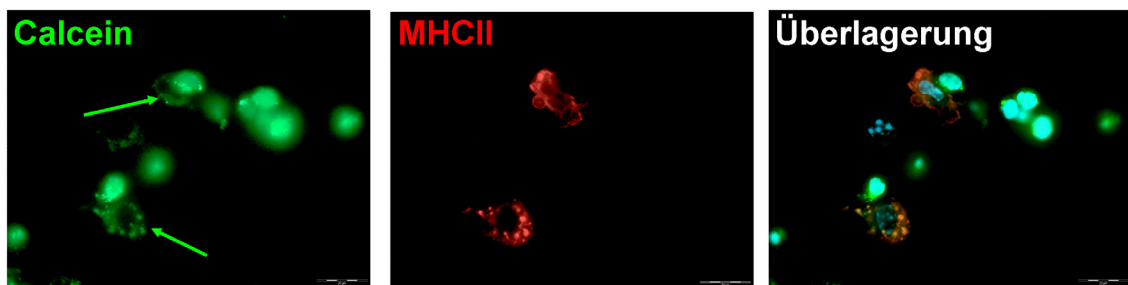


Abb.37: Mikroskopische Aufnahme der Calcein-Übertragung von Zelle zu Zelle. nTregs wurden mit 0,5 µg/ml Calcein-AM gefärbt und anschließend für 2 Stunden mit BMDC auf Deckgläsern kultiviert. Die Aktivierung der nTregs wurde mit α -CD3 (3 µg/ml) gewährleistet. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit biotinylierten α -MHCII Antikörper (10 µg/ml) und einem sekundären Streptavidin Alexa594 Antikörper markiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Das Calcein-Signal ist in grün, das von DAPI in blau und das Signal des Alexa594 Antikörpers ist in rot dargestellt. Der Skalierungsbalken beträgt 20 µm.

Durch die Ergebnisse, die in diesem Teil der Arbeit gezeigt wurden, lässt sich mit großer Wahrscheinlichkeit sagen, dass BMDC und nTregs über Gap Junctions miteinander kommunizieren. Dies konnte anhand von blockierenden Substanzen für Gap Junctions festgestellt werden. Weiter konnte der direkte Kontakt durch eine Übertragung von Calcein dargestellt werden. Dieser Kontakt über Gap Junctions tritt schon nach kurzer Zeit der Kultur auf und ist zu diesem Zeitpunkt essentiell für die Suppression der BMDC durch nTregs. Jedoch schließt der Effekt der Suppression durch Zell-Kontakt einen weiteren Wirkmechanismus nicht aus. Nach längerer Kultur scheint die Suppression der BMDC auf andere Weise übermittelt zu werden, da die Inhibierung der Gap Junctions zu diesem Zeitpunkt keine Verminderung der BMDC-Inhibierung mehr aufweist.

2.2.1.6 zyklisches Adenosin-Monophosphat (cAMP) als Mediator der nTreg-vermittelten Suppression der BMDC-Reifung

Nachdem die Kommunikation zwischen nTregs und BMDC über Gap Junctions nachgewiesen werden konnte, sollte im Anschluss daran untersucht werden, welche Botenstoffe über diese Kanäle ausgetauscht werden könnten. Aufgrund des geringen Durchmessers der Gap Junctions kamen dafür nur sehr kleine Moleküle, die eine Größe von 1 kDa nicht überschreiten durften, in Frage. Hierzu zählten vor allem Ionen wie Kalzium, aber auch das sekundäre Signal-Molekül zyklisches Adenosin-Monophosphat (cAMP). Dieses Molekül aktiviert unter anderem die Proteinkinase A (PKA), öffnet Ionenkanäle und aktiviert Transkriptionsfaktoren wie CREB (cAMP Response Element Binding Protein). Dr. Tobias Bopp und Kollegen konnten durch ihre Arbeit bereits zeigen, dass cAMP eine entscheidende Rolle in der nTreg-vermittelten Suppression von CD4 positiven T-Zellen spielen. Weiter konnte gezeigt werden, dass nTregs große Mengen cAMP im Zytosol speichern. Durch den Kontakt mit CD4 positiven, naiven T-Zellen können nTregs cAMP auf diese naiven T-Zellen übertragen und so die Proliferation der T-Zellen verhindern (Bopp et al., 2007). Auch in diese Suppression ist der Zellkontakt über Gap Junctions involviert. Aufgrund dieser Beobachtungen sollte hier untersucht werden, inwiefern cAMP auch an der Suppression der BMDC durch nTregs beteiligt ist.

2.2.1.7 Bestimmung der cAMP-Konzentration in nTregs und BMDC

Zunächst wurde untersucht, ob es möglich ist, dass die nTregs cAMP an BMDC übertragen. Der cAMP-Spiegel in Zellen kann mittels ELISA bestimmt werden. Dafür wurden die Zellen wie schon beschrieben in einer Kokultur zusammen gebracht. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden, wurden die Zellen wieder voneinander getrennt. Hierfür eignet sich die Trennung über eine MACS-Säule am Besten. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit einem biotinylierten α -CD90.2 Antikörper markiert, der ausschließlich auf den nTregs, jedoch nicht auf den BMDC bindet. Anschließend wurden die Zellen mit Streptavidin-Beads behandelt. Die Zellsuspension wurde anschließend über eine MACS-Säule gegeben, die in einem magnetischen Feld stand. Die BMDC, an die weder der Antikörper noch die Beads gebunden haben (negative Selektion), konnten die Säule frei passieren und wurden darunter wieder aufgefangen. Die Zellen wurden anschließend auf ihre Reinheit im Durchflusszytometer überprüft. Durch das Verfahren konnte eine Reinheit von über

90% erhalten werden. Die so getrennten BMDC wurden mit Salzsäure lysiert und ein cAMP-ELISA zur Untersuchung des cAMP-Gehaltes heran gezogen. Da die Reinheit nie mit 99 oder 100% für die getrennten BMDC ermittelt werden konnte, wurde eine Kontroll-Probe mitgeführt. Diese bestand aus BMDC und der Prozentzahl an nTregs, die durch das MACSen nicht entfernt werden konnte. In Abbildung 38 ist das Ergebnis eines cAMP-ELISAs dargestellt. Es ist zu sehen, dass die nTregs große Menge an cAMP aufweisen, diese Beobachtung deckt sich mit den bereits erwähnten Arbeiten. BMDC allein dagegen weisen nur einen sehr geringen cAMP-Gehalt auf. Nachdem die beiden Zelltypen 2 Stunden kokultiviert und wieder getrennt wurden (BMDC+nTreg), ist der cAMP-Gehalt in den BMDC um ein vielfaches erhöht. Die Kontroll-Probe zeigt den cAMP-Wert, der von den separierten BMDC abgezogen werden muss. Er unterscheidet sich nur marginal von dem der BMDC allein.

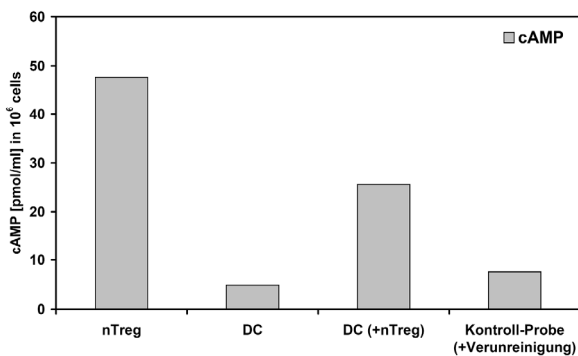


Abb.38: cAMP-ELISA zur Untersuchung der cAMP-Konzentration in nTregs und BMDC. BMDC und nTregs wurden in 96-Kavitäten-Platten in einem Verhältnis von 1 zu 5 mit α -CD3 (3 μ g/ml) kultiviert. Nach zwei Stunden wurden die Zellen zunächst mit einem biotinylierten α -CD90.2 Antikörper und anschließend mit Streptavidin-Beads (4 Beads pro Zelle) behandelt. Dann wurden die Zellen über eine LS-MACS-Säule gegeben, die in ein magnetisches Feld gebracht wurde. Da die BMDC nicht mit Antikörper und Beads markiert waren, konnten sie die Säule passieren und darunter aufgefangen werden. Die Reinheit der BMDC wurde im Durchflusszytometer bestimmt. Als Kontrollen dienen Proben mit nTregs, BMDC und eine Kontroll-Probe. Für diese Kontroll-Probe wurden unbehandelte BMDC mit dem Prozentsatz an nTregs gemischt, der bei der Reinheitskontrolle im Durchflusszytometer ermittelt wurde. Für jede Probe wurden 1×10^6 Zellen in Salzsäure lysiert und in einem cAMP-ELISA analysiert. Die Ergebnisse sind in pmol/ml angegeben und wurden vielfach bestätigt.

So konnte also gezeigt werden, dass der cAMP-Gehalt in den BMDC nach Interaktion mit nTregs deutlich erhöht ist. Eine direkte Übertragung ist also wahrscheinlich.

2.2.1.8 Die Rolle von cAMP während der Suppression der BMDC-Aktivierung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass cAMP von den nTregs auf die BMDC übertragen werden kann, sollte als nächstes geklärt werden, ob cAMP überhaupt in der Lage ist, die starke Inhibierung zu verursachen, die in Anwesenheit der nTregs mit der BMDC-Aktivierung vor sich geht. Durch eine künstliche Erhöhung des cAMP-Gehaltes sollte untersucht werden, wie die Reaktion der BMDC darauf ist. Dazu wurden BMDC mit cAMP inkubiert. Das verwendete cAMP trägt eine Dibutyryl-Gruppe (db-cAMP), die es dem Molekül ermöglicht, die Zell-Membran zu passieren. Im Zellinneren wird die Dibutyryl-Gruppe abgespalten und somit der cAMP-Spiegel in der Zelle erhöht (Galgani et al., 2004).

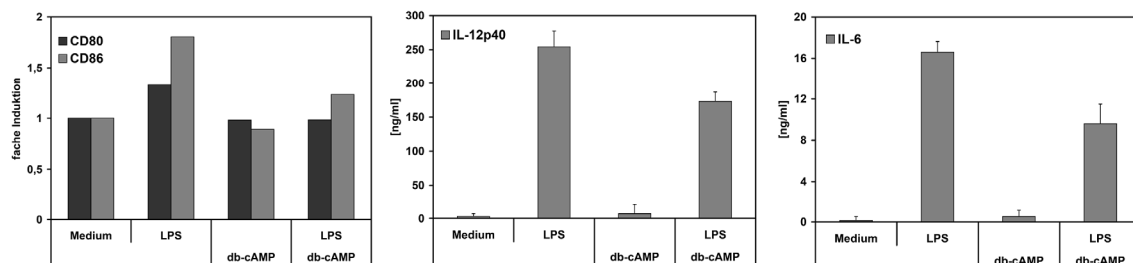


Abb.39: Veränderung der BMDC-Aktivierung durch künstlich erhöhte cAMP-Konzentration.

BMDC wurden in 96-Kavitäten-Platten mit (100 ng/ml) und ohne LPS kultiviert. Vor der Stimulation wurden die Zellen 30 Minuten mit 100 μ M Dibutyryl-cAMP (db-cAMP) vorbehandelt. Die anschließende Stimulation erfolgte für 20 Stunden. Nach der Inkubationszeit wurden die Überstände abgenommen und mithilfe eines ELISAs auf die Produktion von IL-12p40 und IL-6 untersucht. Die Darstellung erfolgt in ng/ml. Die Standardabweichung wurde aus 3 Einzelwerten berechnet. Die Zellen selbst wurden nach der Inkubationszeit mit einer Antikörperlösung inkubiert und im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist die Expression von CD80 und CD86, der Medium-Wert wurde jeweils auf 1 normalisiert. Die Ergebnisse konnten in 2 weiteren Experimenten bestätigt werden.

In Abbildung 39 ist die BMDC-Aktivierung mit und ohne db-cAMP dargestellt. Es ist zu erkennen, dass db-cAMP die Hochregulierung der Oberflächen-Moleküle durch LPS verringert. Ohne Stimulation der BMDC durch LPS führte die Anwesenheit von db-cAMP zu einer leichten Verringerung der Oberflächen-Moleküle. Auch die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine durch LPS wurde durch die erhöhte cAMP-Konzentration inhibiert. Die gezeigten Daten wurden nach einer Stimulationszeit von 20 Stunden erhoben. Die Erhöhung der cAMP-Konzentration in

den BMDC ruft also eine Reaktion hervor, die mit der durch nTregs induzierten Reaktion vergleichbar ist.

Die cAMP-Konzentration kann auch auf andere Weise in der BMDC erhöht werden. Dabei produzieren die BMDC das cAMP durch die Stimulation bestimmter Enzyme selbst. Prostaglandin E2 ist ein Hormon, das mit der Zelle über Rezeptoren auf der Außenseite (EP1-EP4) interagiert (Steinbrink et al., 2000) (Scandella et al., 2004). Diese Rezeptoren sind in der Lage, über intrazelluläre G-Proteine Enzyme zu aktivieren, die ATP zu cAMP umsetzen können (Harizi et al., 2003). Diese integralen Membran-Proteine sind Adenylat-Zyklasen. Es sind zurzeit neun Isoformen dieser Enzyme bekannt, die in verschiedenen Zellen und Geweben exprimiert werden. Außer PGE2 sind weitere Substanzen bekannt, die durch die Aktivierung der Adenylat-Zyklasen die cAMP-Konzentration in der Zelle erhöhen können. Zu Ihnen zählt Forskolin, aber auch Toxine wie das Cholera Toxin und das Pertussis Toxin. In diesem Fall stellt die BMDC also das cAMP selbst her. Abbildung 40 zeigt die veränderte BMDC-Aktivierung in Gegenwart von Prostaglandin E2. Für die Experimente wurden BMDC mit PGE2 vorbehandelt und anschließend mit LPS 20 Stunden aktiviert. In Gegenwart von PGE2 verändert sich die Expression der B7-Moleküle nur wenig. Es konnte nur für CD86 eine leichte Verringerung in Gegenwart von PGE2 festgestellt werden. Auch nach kürzerer Inkubationszeit konnte der Effekt von PGE2 auf die LPS-Aktivierung bestätigt werden (nicht gezeigt). Wurde Prostaglandin E2 ohne Stimulation auf die Zellen gegeben, konnte nur eine leichte Verringerung der Oberflächen-Moleküle festgestellt werden. Auch die Produktion der proinflammatorischen Zytokine wurde in Anwesenheit von PGE2 untersucht. Es zeigte sich, dass die Zellen durch die erhöhte cAMP-Konzentration im Inneren nur noch sehr wenig der beiden Zytokine sezernieren. Dieser Effekt ist deutlicher als der von db-cAMP. Die beiden Substanzen unterscheiden sich also in ihrer Wirkung. Während db-cAMP einen stärkeren Einfluss auf die Expression der kostimulatorischen Moleküle zeigte, konnte für PGE2 eine stärkere Wirkung auf die Produktion der proinflammatorischen Zytokine festgestellt werden. Trotzdem gleichen sich die Ergebnisse, denn durch beide Substanzen konnte die BMDC-Aktivierung inhibiert werden. Anhand dieser Daten konnte gezeigt werden, dass cAMP ein möglicher Faktor in der nTreg-vermittelten Suppression der BMDC ist.

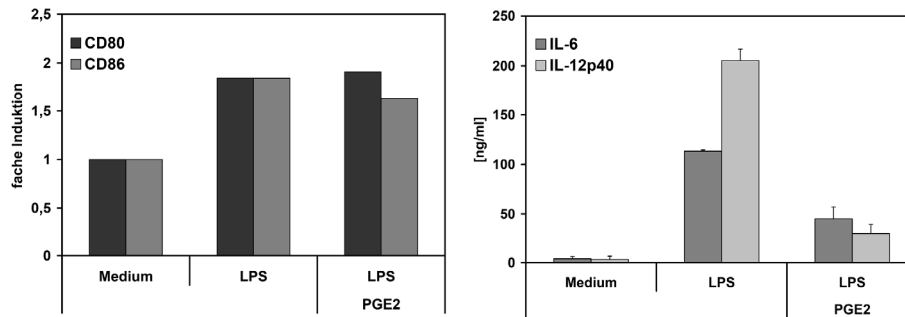


Abb.40: Verringerung der BMDC-Aktivierung in Gegenwart von Prostaglandin E2. BMDC wurden in 96-Kavitäten-Platten mit (100 ng/ml) und ohne LPS (Medium) kultiviert. Vor der Stimulation wurden die Zellen 30 Minuten mit 10 µg/ml Prostaglandin E2 vorbehandelt. Die anschließende Stimulation erfolgte für 20 Stunden. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellkultur-Überstände abgenommen und mithilfe eines ELISAs auf die Produktion von IL-12p40 und IL-6 untersucht. Die Darstellung erfolgt in ng/ml. Die Standardabweichung wurde aus 3 Einzelwerten berechnet. Die Zellen wurden nach der Inkubationszeit mit einer Antikörperlösung inkubiert und im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist die Expression von CD80 und CD86, der Medium-Wert wurde jeweils auf 1 normalisiert. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 2 gleichwertige Experimente.

2.2.1.9 Untersuchungen zur Quelle des erhöhten cAMP-Gehaltes in BMDC

2.2.1.9.1 Inhibierung der Adenylat-Zyklasten in BMDC

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass sowohl von außen zugeführtes cAMP als auch dessen Synthese innerhalb der dendritischen Zellen dazu führte, dass die Aktivierung der Zellen verhindert wurde. Als nächstes stellte sich die Frage, woher das cAMP stammt, das nach der Kokultur mit nTregs in den BMDC nachgewiesen werden kann. Um zu unterscheiden, ob das cAMP von den nTregs gebildet und anschließend auf die BMDC übertragen wurde oder ob das cAMP in den BMDC gebildet wurde, sollten hier zunächst die Adenylat-Zyklasten inhibiert werden und somit die Bildung des cAMPs unterbunden werden. Es gibt eine Vielfalt an inhibitorischen Molekülen, die die Aktivität von diesen Enzymen hemmen. nTregs können allerdings nicht mit ihnen behandelt werden, da sie toxisch für diese Zellen sind. Dennoch kann mit diesen Inhibitoren gearbeitet werden, um die Herkunft des cAMPs zu überprüfen. Dafür wurden die BMDC mit einem Adenylat-Zyklase-Inhibitor vorbehandelt und anschließend, nachdem der Inhibitor wieder entfernt wurde, mit nTregs inkubiert. Wenn die BMDC das cAMP selbst produzieren würden, wäre in diesem Fall die nTreg-vermittelte Suppression vermindert. Zunächst musste jedoch die Funktionalität des Inhibitors getestet werden. Dafür wurden BMDC vor der Stimulation mit LPS mit Forskolin behandelt. Forskolin ist, wie Prostaglandin E2,

ebenfalls ein Adenylat-Zyklase stimulierendes Molekül. Auch mit Forskolin lässt sich die Aktivierung der BMDC inhibieren (Kambayashi et al., 2001). Um die Wirkung von Forskolin wieder aufzuheben, wurden die Zellen zusätzlich mit dem Adenylat-Zyklase-Inhibitor Sate (2`5`-dd3`-AMP-bis-(Bu-SATE), hier mit Sate abgekürzt) behandelt. Abbildung 41 zeigt die BMDC-Aktivierung durch LPS bezüglich der Expression von CD80 und der Sekretion von IL-6. In beiden Abbildungen ist die Forskolin-induzierte Inhibierung der BMDC-Aktivierung zu sehen. Durch den Adenylat-Zyklase-Inhibitor kann diese Inhibierung wieder aufgehoben werden. So konnte nachgewiesen werden, dass der Adenylat-Zyklase-Inhibitor funktional ist.

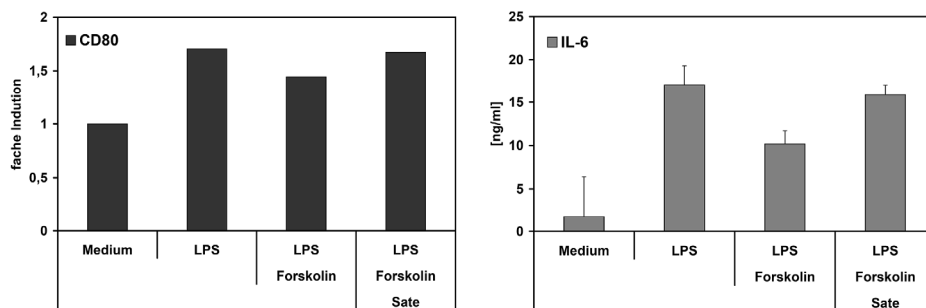


Abb.41: Funktionalitätstest für den Adenylat-Zyklase-Inhibitor Sate. BMDC wurden in 96-Kavitäten-Platten mit (100 ng/ml) und ohne LPS (Medium) kultiviert. Vor der Stimulation wurden die Zellen 30 Minuten mit 50 μ M Forskolin vorbehandelt bzw. unbehandelt belassen. Zusätzlich wurde eine Probe mit Adenylat-Zyklase-Inhibitor (1 μ M) behandelt. Die anschließende Inkubationszeit erfolgte für 20 Stunden. Danach wurden die Zellkultur-Überstände abgenommen und mithilfe eines ELISAs auf die Produktion von IL-6 untersucht. Die Darstellung erfolgt in ng/ml. Die Standardabweichung wurde aus Triplikaten berechnet. Die Zellen wurden nach der Inkubationszeit mit einer Antikörperlösung inkubiert und im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist die Expression von CD80, der Medium-Wert wurde auf 1 normalisiert. Das Ergebnis konnte in 2 weiteren Experimenten bestätigt werden.

Nachdem sicher gestellt war, dass der Adenylat-Zyklase-Inhibitor funktional ist, wurde Sate in den folgenden Experimenten verwendet, um die BMDC vor der Kokultur mit nTregs zu inhibieren. Wie in Abbildung 42 zu sehen ist, veränderte sich die Suppression der BMDC nicht, wenn die Adenylat-Zyklasen in den BMDC inhibiert wurden. Die Kokultur wurde hier für 4 Stunden inkubiert. Auch längere Inkubationszeiten änderten die Inhibierung der BMDC-Aktivierung nicht (nicht gezeigt). Das bedeutet, dass das cAMP, das in den BMDC nach der Kokultur gemessen werden kann, nicht von der BMDC selbst synthetisiert wird. Es wird

demnach von den nTregs gebildet und scheint anschließend auf die BMDC übertragen zu werden.

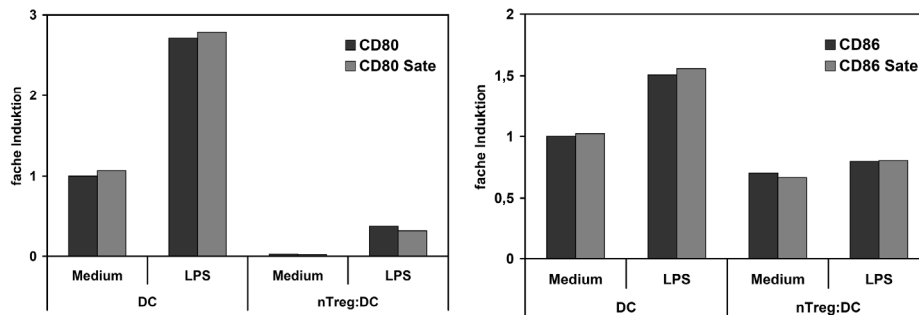


Abb.42: Wirkung eines Adenylat-Zyklase-Inhibitors auf die Suppression von BMDC durch nTregs. BMDC und nTregs wurden in einem Verhältnis von 1 zu 5 in 96-Kavitäten-Platten mit LPS (100 ng/ml) bzw. ohne (Medium) kultiviert (dunkle Balken). Vor der Stimulation wurden die BMDC 30 Minuten mit einem Adenylat-Zyklase-Inhibitor (Sate, 1 μ M, helle Balken) behandelt. Die anschließende Inkubationszeit mit nTregs erfolgte für 4 Stunden. Die Zellen wurden danach mit einer Antikörperlösung inkubiert und im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist die Expression von CD80 und CD86, der Medium-Wert wurde jeweils auf 1 normalisiert. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 3 gleichwertige Experimente.

2.2.1.9.2 Verstärkung der BMDC-Suppression durch Inhibierung der Phosphodiesterasen

In der Zelle gibt es neben den Adenylat-Zyklasen, die cAMP aus ATP generieren können, auch Enzyme, die cAMP zu AMP (Adenosin-Monophosphat) abbauen. Von diesen Phosphodiesterasen (PDE) sind aktuell 5 verschiedene Subtypen bekannt, die in verschiedenen Zellen und Organen exprimiert werden. Für PDEs ist eine Vielzahl an Inhibitoren beschrieben. Diese verhindern die Spaltung von cAMP in der Zelle und erhöhen somit den cAMP-Spiegel. Einige der Inhibitoren hemmen die Gesamtheit der PDEs in der Zelle, wie z.B.: 3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin (IBMX). Es gibt allerdings auch spezielle PDE-Inhibitoren. Zu ihnen gehört der PDE4-Inhibitor Rolipram. Dieses Molekül wird in der Klinik bereits eingesetzt. In verschiedenen Ansätzen wird aktuell getestet, ob seine immunsupprimierende Wirkung bei Krankheiten eingesetzt werden kann, die chronische Entzündungen hervorrufen (MS, MC). Bei diesen Krankheiten werden verstärkt proinflammatorische Zytokine wie TNF- α gebildet. Dies könnte durch die Gabe von Rolipram vermindert werden (Sommer et al., 1995). Rolipram wurde hier eingesetzt, um zu überprüfen, wie sich die nTreg-vermittelte Suppression der BMDC verändert, wenn die PDE4 in den

Zellen inhibiert wurde und der cAMP-Gehalt in den Zellen somit noch weiter erhöht ist. Es wurde bereits beschrieben, dass dendritische Zellen diese Phosphodiesterase exprimieren (Heystek et al., 2003). nTregs und BMDC wurden wie zuvor beschrieben zusammen kultiviert. Vor dem Experiment wurden die dendritischen Zellen mit Rolipram inkubiert. Anschließend wurden die nTregs dazu gegeben, ohne das Rolipram zu entfernen. Nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden wurden die Zellen im Durchflusszytometer auf die Expression der kostimulatorischen Oberflächen-Moleküle auf den BMDC untersucht. Abbildung 43 zeigt, dass durch die Inhibierung von PDE4 die Expression von CD80 und CD86 auf den BMDC durch die nTregs noch weiter verringert wird. Phosphodiesterasen spielen demnach bei der Regulierung des cAMP-Spiegels in den BMDC eine Rolle und wirken dementsprechend der Suppression durch die nTregs entgegen. Durch die Experimente mit Adenylat-Zyklase-Inhibitor und Phosphodiesterase-Inhibitor lässt sich zusammenfassend also zeigen, dass cAMP eine entscheidende Rolle während der Suppression der BMDC durch nTregs spielt.

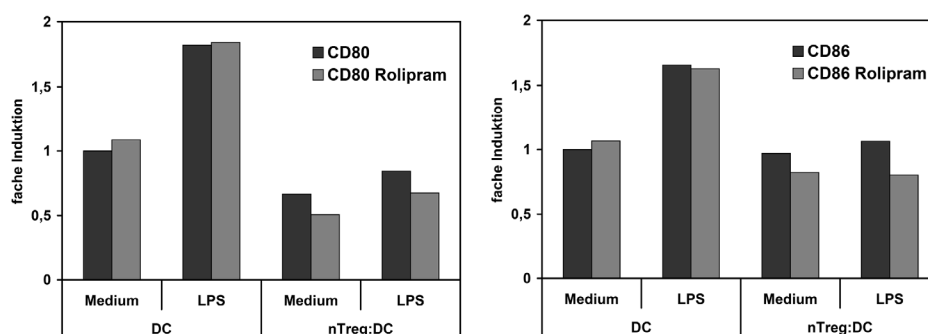


Abb.43: Verstärkung der Suppression auf den BMDC durch Inhibierung der Phosphodiesterase4 durch Rolipram. BMDC und nTregs wurden in einem Verhältnis von 1 zu 5 in 96-Kavitäten-Platten mit LPS (100 ng/ml) bzw. ohne (Medium) kultiviert (dunkle Balken). Vor der Stimulation wurden die BMDC 30 Minuten mit Rolipram (1 μ M) behandelt (helle Balken). Die anschließende Inkubationszeit erfolgte für 4 Stunden. Die Zellen wurden anschließend mit einer Antikörperlösung inkubiert und im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist die Expression von CD80 und CD86, der Medium-Wert wurde jeweils auf 1 normalisiert. Die Ergebnisse konnten in 2 weiteren Experimenten bestätigt werden.

2.2.1.10 Blockierung des cAMP-Signals in BMDC durch einen Antagonisten

Die Hauptaufgabe von cAMP in der Zelle ist die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). Diese besteht aus 4 Untereinheiten, 2 katalytischen und 2 regulatorischen. Die regulatorischen Untereinheiten haben die Aufgabe, die katalytischen

Untereinheiten zu blockieren. Bindet cAMP an diese blockierenden Untereinheiten, kommt es zu einer Konformationsänderung, dies wiederum führt zu einer Freisetzung der katalytischen Untereinheiten. Diese können anschließend Transkriptionsfaktoren aktivieren, was zu einer Veränderung des Protein-Profiles in der Zelle führt. Durch einen Antagonisten, also ein Molekül, das anstelle des cAMP an die regulatorischen Untereinheiten der PKA bindet, jedoch keine Konformationsänderung in den blockierenden Untereinheiten induziert, kann die Signalgebung von cAMP unterbrochen werden (GHOSH, 2003). Für die im Folgenden beschriebenen Experimente wurde Adenosine 3',5'-cyclic Monophosphorothioate, Rp-Isomer, Triethylammonium Salt (RpcAMPS) als cAMP-Antagonist verwendet. RpcAMPS ist stabil für den Angriff durch Phosphodiesterasen und bleibt somit über längere Zeiträume in der Zelle erhalten.

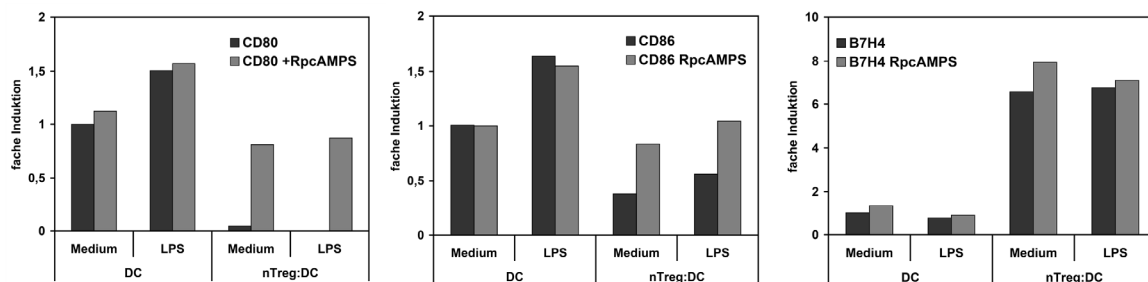


Abb.44: Blockierung des cAMP-Signals durch den cAMP-Antagonisten, RpcAMPS. BMDC und nTregs wurden in einem Verhältnis von 1 zu 5 in 96-Kavitäten-Platten mit LPS (100 ng/ml) bzw. ohne (Medium) kultiviert (dunkle Balken). Vor der Kokultur wurden die BMDC 30 Minuten mit RpcAMPS (4 mM, helle Balken) behandelt. Die Inkubationszeit erfolgte für 4 Stunden. Die Zellen wurden anschließend mit einer Antikörperlösung inkubiert und im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist die Expression von CD80, CD86 und B7H4, der Medium-Wert wurde jeweils auf 1 normalisiert. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 4 gleichwertige Experimente.

In Abbildung 44 ist die Wirkung von RpcAMPS auf die Kokultur aus nTregs und BMDC zu sehen. Für das Experiment wurden die BMDC mit RpcAMPS 30 Minuten vorinkubiert. Anschließend wurden die nTregs dazu gegeben. Die Analyse erfolgte nach 4 Stunden am Durchflusszytometer. Deutlich ist zu erkennen, dass die starke Verringerung von CD80 und CD86 teilweise aufgehoben werden kann. Nicht verändert wird dagegen die hohe Expression der B7H-Moleküle (B7H4 und B7H3, nicht gezeigt) und die stark verringerte Expression von MHCII (nicht gezeigt).

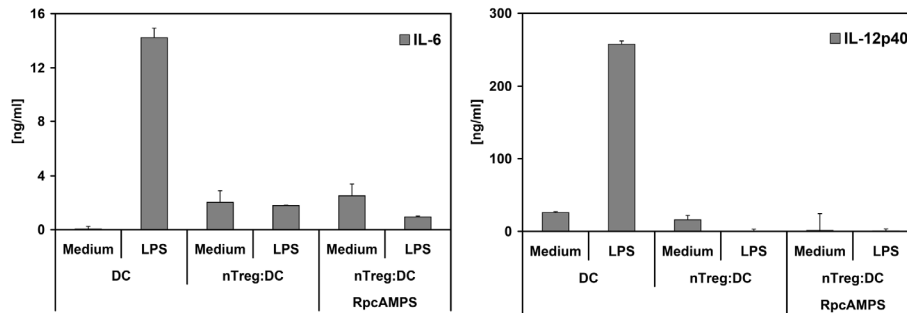


Abb.45: Wirkung von RpcAMPS auf die inhibierte Produktion der proinflammatorischen Zytokine der BMDC-Aktivierung. BMDC und nTregs wurden in einem Verhältnis von 1 zu 5 in 96-Kavitäten-Platten mit LPS (100 ng/ml) stimuliert bzw. unstimuliert belassen (Medium). Vor der Stimulation wurden die BMDC 30 Minuten mit RpcAMPS (4 mM) behandelt oder unbehandelt belassen. Die anschließende Inkubationszeit erfolgte für 20 Stunden. Die Überstände der Kokultur wurden nach der Inkubationszeit abgenommen und auf die Produktion von IL-6 und IL-12p40 untersucht. Die Ergebnisse sind in ng/ml angegeben. Die Standardabweichung wurde aus 3 Einzelwerten berechnet. Die Ergebnisse konnten in 3-4 weiteren Experimenten bestätigt werden.

Betrachtet man anschließend die BMDC-Aktivierung in der Kokultur nach einer längeren Inkubationszeit (20 Stunden) mit nTregs, ist die Wirkung von RpcAMPS auf die Expression von CD80 und CD86 fast nicht mehr nachweisbar (nicht gezeigt). Zusätzlich wurden die Überstände der Kokultur auf die Sekretion von IL-6 und IL-12p40 untersucht. Wie in Abbildung 45 zu sehen ist, kann die Produktion der beiden proinflammatorischen Zytokine in Gegenwart von RpcAMPS nicht wieder hergestellt werden. Es kann also nur ein früher Effekt mit dem cAMP-Antagonist aufgezeigt werden. Dies könnte dafür sprechen, dass der Wirkmechanismus der nTregs auf die BMDC einen weiteren Mediator beinhaltet, der erst zu einem späteren Zeitpunkt in die Suppression eingreift. Darauf soll hier zunächst noch nicht eingegangen werden, auf diese Möglichkeit wird im letzten Teil der Arbeit eingegangen.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die supprimierten BMDC durch die Blockierung des cAMP-Signals wieder in der Lage sind, Antigen zu prozessieren. Dafür wurde wieder DQ-Ovalbumin verwendet. Für die Experimente wurde eine Kokultur aus nTregs und BMDC hergestellt und diese für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Kokultur mit DQ-Ovalbumin für 10 Minuten inkubiert und kinetisch dessen Prozessierung verfolgt (Abbildung 46). Als Kontrolle dienen unstimulierte BMDC. Wie bereits gezeigt, ist auch hier zu sehen, dass die Prozessierung der BMDC in Anwesenheit der nTregs verringert ist. Durch das Blockieren des cAMP-Signals mit RpcAMPS kann die Prozessierung von DQ-

Ovalbumin allerdings nicht wieder hergestellt werden. Die Verringerung der Antigen-Prozessierung hängt demnach nicht mit der Übertragung von cAMP zusammen. Eventuell muss im Zusammenhang der Suppression durch nTregs nach kurzem Zellkontakt noch ein weiterer Mediator in Betracht gezogen werden.

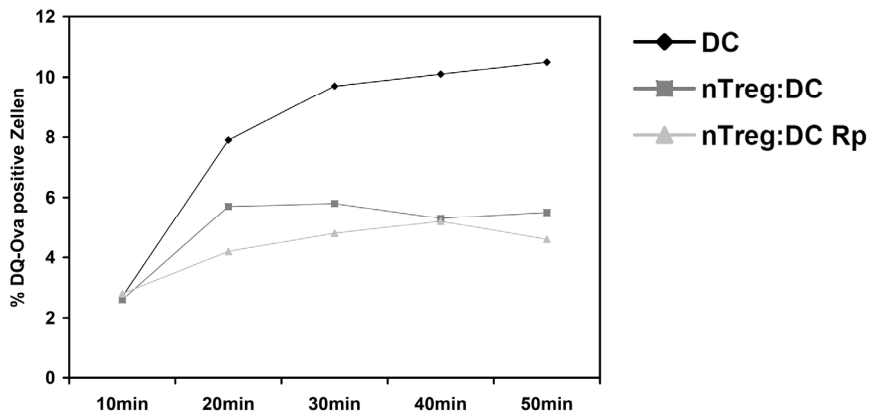


Abb.46: Antigen-Prozessierung mit und ohne RpcAMPS in supprimierten BMDC. Die Zellen wurden in 96-Kavitäten-Rundbodenplatten ausgesät und mit (Quadrate) bzw. ohne nTregs (Karas) kultiviert. Die nTregs wurden zusätzlich mit einem löslichen α -CD3 Antikörper (3 μ g/ml) stimuliert. In einer Probe wurden die BMDC vor der Kokultur mit nTregs mit RpcAMPS (4 mM, Dreiecke) inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen, in frisches Testmedium aufgenommen und mit 10 μ g/ml DQ-Ovalbumin für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3-mal mit kaltem PBS gewaschen, in Testmedium überführt und dann kinetisch die Prozessierung von Ovalbumin im Durchflusszytometer untersucht. Das Signal des prozessierten DQ-Ovalbumins kann im FITC-Kanal des Durchflusszytometers detektiert werden. Dargestellt ist die Zahl der prozessierenden Zellen in Prozent. Das Ergebnis ist repräsentativ für 3 Experimente.

Durch die Untersuchungen mit RpcAMPS zeigte sich, dass cAMP für die Verringerung der kostimulatorischen Oberflächen-Moleküle auf den BMDC mitverantwortlich ist. Die Expression der B7H-Moleküle blieb davon allerdings unverändert. Weiter konnte die Verringerung von MHCII auf der Oberfläche der BMDC durch RpcAMPS nicht aufgehoben werden. Auch für die verringerte Antigen-Prozessierung ist cAMP wahrscheinlich nicht essentiell, da diese in Gegenwart des Antagonisten nicht wieder hergestellt werden konnte. Um im Anschluss daran zu untersuchen, ob das Potential der BMDC zur T-Zell-Aktivierung, das durch die nTregs stark verringert wird, durch RpcAMPS wieder verstärkt werden kann, wurde eine Kokultur aus nTregs und BMDC mit und ohne RpcAMPS hergestellt. Aktivierte

BMDC dienen als Kontrolle. Um eine direkte Wirkung der nTregs auf die T-Zellen auszuschließen, wurden die BMDC nach der Inkubationszeit wieder aus der Kokultur separiert. Dazu wurden die Zellen mit einem biotinylierten α -CD90.2 Antikörper und anschließend mit Streptavidin-Beads inkubiert. Die so behandelten Zellen wurden über eine MACS-Säule getrennt, wobei die BMDC aus der Kultur wieder separiert wurden. Die BMDC wurden anschließend mit einem Peptid (OT-2) beladen und mit TCR-transgenen CD4 positiven T-Zellen kultiviert. Diese tragen einen spezifischen TCR, der das Peptid in Kombination mit dem MHCII der BMDC erkennt. Nach einer Inkubationszeit von 2 Tagen, kann die Aktivierung der T-Zellen im Durchflusszytometer aufgrund der erhöhten Expression von Aktivierungsmarkern nachvollzogen werden.

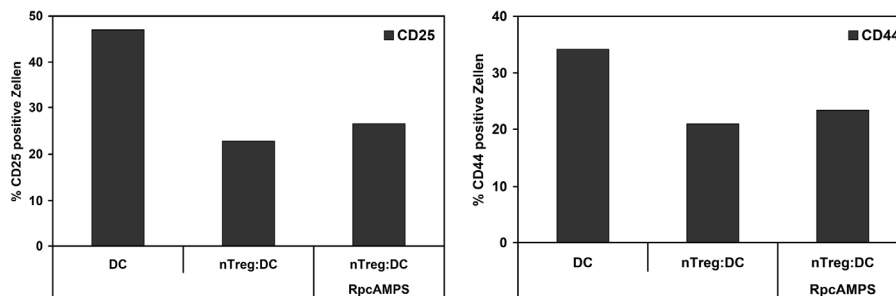


Abb.47: Aktivierung von TCR-transgenen T-Zellen mit supprimierten BMDC. BMDC wurden in 96-Kavitäten-Rundbodenplatten ausgesät und mit bzw. ohne nTregs kultiviert. Dabei wurden die BMDC mit LPS (100 ng/ml) und die nTregs mit einem löslichen α -CD3 Antikörper (3 μ g/ml) stimuliert. Nach der Inkubationszeit von 4 Stunden wurden die Zellen mit einem biotinylierten α -CD90.2 Antikörper inkubiert und anschließend mit Streptavidin-Beads behandelt. Danach wurden die Zellen über eine MACS-Säule getrennt. In der Abbildung ist diese erste Kultur in der Legende unterhalb des Graphen aufgeführt.

Für die zweite Kokultur wurden separierte und LPS-aktivierte BMDC mit OT-2-Peptid beladen (100 nM) und mit vorher isolierten CD4 positiven T-Zellen, deren TCR transgen für dieses Peptid aus dem Ovalbumin sind, kultiviert. Das Verhältnis von T-Zellen zu BMDC betrug dabei 10:1. An Tag 2 wurden die Zellen mit einer Antikörperlösung inkubiert und im Durchflusszytometer analysiert. Bestimmt wurde dabei die Prozentzahl der CD25 und CD44 positiven TCR-transgenen T-Zellen. Das Ergebnis konnte bestätigt werden.

Abbildung 47 zeigt die Prozentzahl der CD25 und CD44 positiven T-Zellen in der Kultur. Es ist zu erkennen, dass beide Aktivierungs-Moleküle durch die Stimulation mit supprimierten BMDC deutlich weniger hoch reguliert werden im Vergleich zur Inkubation mit nicht supprimierten BMDC. Durch die Vorbehandlung mit RpcAMPS

kann eine leichte Erhöhung von CD25 und CD44 auf den T-Zellen erreicht werden. In weiteren Experimenten wurde mithilfe von CFSE die Proliferation dieser TCR-transgenen T-Zellen untersucht. Diese wurde, wie bereits gezeigt, durch die supprimierten BMDC stark unterdrückt. Allerdings konnte die verringerte Proliferation der TCR-transgenen T-Zellen nicht wieder verbessert werden, wenn die BMDC vor der Suppression mit nTregs mit RpcAMPS behandelt wurden (nicht gezeigt).

2.2.2 Lösliche Faktoren während der Suppression von BMDC durch nTregs

2.2.2.1 Synthese von IL-10 während der Kokultur aus dendritischen Zellen und regulatorischen T-Zellen

Wie bereits beschrieben, ist es wahrscheinlich, dass cAMP bei der nTreg-vermittelten Suppression von BMDC eine entscheidende Rolle spielt. Es kann in hoher Konzentration in nTregs und auch in den supprimierten BMDC nachgewiesen werden. Durch die Behandlung mit verschiedenen Substanzen, wie Adenylat-Zyklase-Inhibitoren oder Phosphodiesterase-Inhibitoren konnte die zentrale Rolle dieses Moleküls während der Suppression von BMDC durch nTregs weiter verifiziert werden. Die Blockierung des cAMP-Signals durch RpcAMPS konnte die Aktivierung der BMDC teilweise wieder herstellen. Diese Beobachtungen machten gleichzeitig deutlich, dass cAMP nicht allein für die Suppression der BMDC verantwortlich sein kann. Der durch RpcAMPS erreichte Effekt konnte nur nach kurzer Kokultur (4 Stunden) nachgewiesen werden. Betrachtet man die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine der BMDC nach 20 Stunden Kokultur mit nTregs (Abb.45), ist der Effekt von RpcAMPS nicht mehr nachweisbar. Das bedeutet, dass außer cAMP wahrscheinlich weitere Moleküle an der Suppression der BMDC beteiligt sind.

Ein antiinflammatorischer Faktor, der im Zusammenhang mit regulatorischen T-Zellen häufig auftaucht, ist IL-10. Dieses antiinflammatorische Zytokin kann von T_H2 Zellen, regulatorischen T-Zellen (Tr1), aber auch von Monozyten und dendritischen Zellen gebildet werden. Seine Wirkung kann sowohl parakrin als auch autokrin erfolgen. In jedem Fall kann IL-10 die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-6, TNF- α und IFN- γ , verhindern und so einem Entzündungsprozess entgegen wirken (Moore et al., 1993). IL-10 bindet an einen spezifischen IL-10 Rezeptor (IL-10R), der aus 2 Untereinheiten besteht (IL-10R1, IL-10R2) (Moore et al., 2001). Durch die Bindung werden in der Zelle Signalkaskaden ausgelöst, die zu

einer Inhibierung von NF κ B führen. Wie wichtig IL-10 wirklich für den normalen Ablauf im Körper ist, zeigt sich an IL-10 knock out Mäusen (IL-10 ko), die dazu neigen spontan an Colitis zu erkranken (chronische Darmentzündung) (K³hn et al., 1993).

IL-10 wird häufig im Zusammenhang mit der Wirkung von regulatorischen T-Zellen beschrieben. Allerdings handelt es sich hierbei um induzierte Tregs (Tr1), die in der Peripherie aus CD4 positiven T-Zellen entstehen. Bei den in dieser Arbeit verwendeten natürlich vorkommenden regulatorischen T-Zellen ist die Wirkung durch IL-10 noch nicht im Detail beschrieben (O'Garra et al., 2004). Entsprechend sollte hier untersucht werden, ob IL-10 eine Rolle während der Suppression von BMDC durch nTregs spielt. Dazu wurden BMDC und nTregs in einem Verhältnis von 1 zu 5 für 20 Stunden kultiviert. Nach der Inkubationszeit wurden die Überstände der Kultur abgenommen und in einem ELISA auf IL-10 untersucht. Abbildung 48 zeigt die IL-10 Sekretion in der Kokultur.

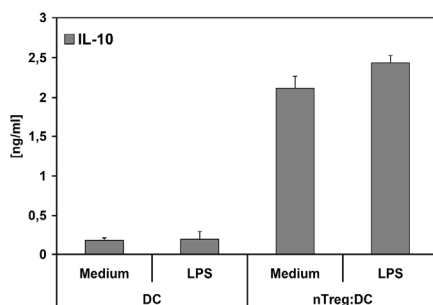


Abb.48: Produktion von IL-10 in einer Kokultur aus BMDC und nTregs. BMDC und nTregs wurden in einem Verhältnis von 1 zu 5 in 96-Kavitäten-Platten mit LPS (100 ng/ml) stimuliert bzw. unstimuliert belassen (Medium). Für die Aktivierung der nTregs wurde ein löslicher α -CD3 Antikörper (3 μ g/ml) zugegeben. Die anschließende Inkubationszeit erfolgte für 20 Stunden. Die Überstände der Kokultur wurden nach der Inkubationszeit abgenommen und im ELISA auf die Produktion von IL-10 untersucht. Die Ergebnisse sind in ng/ml angegeben. Die Standardabweichung wurde aus 3 Einzelwerten berechnet. Das Ergebnis konnte in 3 weiteren Experimenten bestätigt werden.

In den BMDC-Überständen war nach LPS-Aktivierung eine kleine Menge IL-10 nachweisbar. Dies wurde schon von anderen Arbeitsgruppen beschrieben [Boonstra 2006]. Bei der ersten Betrachtung wirkt die IL-10 Produktion während der Aktivierung der BMDC contra produktiv. Das gebildete IL-10 hat jedoch die Aufgabe, die eigene Aktivierung zu kontrollieren und zu begrenzen.

In den Proben der nTreg:BMDC-Überstände, nach einer Kokultur von 20 Stunden, war die Produktion von IL-10 um ein vielfaches erhöht. Im Gegensatz dazu ließ sich nach einer kürzeren Kokultur (4 Stunden) noch kein IL-10 nachweisen (nicht gezeigt). Dieses Ergebnis ließ auf eine Beteiligung von IL-10 an der Suppression der BMDC durch nTregs schließen, da IL-10 die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-12p40 unterdrücken kann. Zunächst war hierbei nicht sicher, ob nTregs überhaupt in der Lage sind, Zytokine zu bilden. Daher stellte sich die Frage, ob es möglich ist, dass die BMDC durch die anwesenden nTregs veranlasst werden, diese großen Mengen IL-10 zu produzieren und damit sich selbst zu inhibieren, oder ob die nTregs in der Kultur das IL-10 selbst sezernieren.

2.2.2.2 Bestimmung der IL-10-Quelle in der Kokultur aus BMDC und nTregs

Um zu untersuchen, von welchen Zellen der Kokultur das IL-10 gebildet wird, wurden Zellen aus IL-10 knock out Mäuse (IL-10 ko) verwendet (Abbildung 49). Die Zellen dieser Mäuse produzieren kein IL-10, trotzdem wird der IL-10 Rezeptor in den entsprechenden Geweben exprimiert. Für die Experimente wurden verschiedene Kokulturen angesetzt.

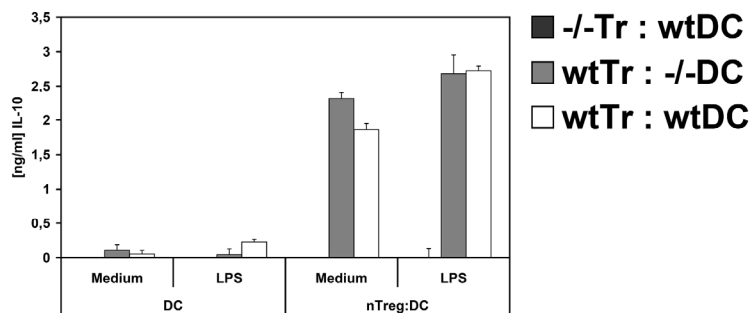


Abb.49: Quelle des IL-10 in der Kokultur aus nTregs und BMDC. BMDC und nTregs wurden in einem Verhältnis von 1 zu 5 in 96-Kavitäten-Platten mit LPS (100 ng/ml) stimuliert bzw. unstimuliert belassen (Medium). Für die Aktivierung der nTregs wurde ein löslicher α -CD3 Antikörper (3 μ g/ml) zugegeben. Die Zellen wurden aus Wildtyp (wt) oder IL-10 ko (-/-) Mäusen isoliert. Gemeinsam kultiviert wurden wt BMDC und wt nTregs (weiße Balken), IL-10 ko BMDC und wt nTregs (hellgraue Balken) und wt BMDC und IL-10 ko nTregs (dunkelgraue Balken). Die Überstände der Kokultur wurden nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden abgenommen und auf die Produktion von IL-10 untersucht. Die Ergebnisse sind in ng/ml angegeben und konnten mehrfach bestätigt werden. Die Standardabweichung wurde aus 3 Einzelwerten berechnet.

Als Kontrolle wurden BMDC und nTregs aus Wildtyp Mäusen (wt) isoliert und gemeinsam kultiviert. In diesen Zellkultur-Überständen war IL-10 nachweisbar. In den Überständen der Kultur aus IL-10 ko BMDC und wt nTregs konnten mit der Doppel-Wildtyp Kultur vergleichbare Mengen an IL-10 detektiert werden. Alleine die Überstände der Kultur aus wt BMDC und IL-10 ko nTregs enthielten kein IL-10 mehr. Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass die regulatorischen T-Zellen die Quelle des IL-10 in der Kokultur darstellen. In diesem Zusammenhang war es interessant zu untersuchen, unter welchen Umständen natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen IL-10 produzieren. Die Zellen wurden aus Milzen von unbehandelten Tieren isoliert und anschließend 5 Tage in Gegenwart von IL-2 aktiviert. Zusätzlich wurden sie die ersten 3 Tage mit α -CD3 und α -CD28 stimuliert. Die Zellen haben in diesen 5 Tagen 3-5 Proliferationsschritte durchlaufen. Die so voraktivierten Zellen wurden in allen hier beschriebenen Experimenten verwendet. Um die Zellen weiter zu aktivieren wurde jedem Experiment ein löslicher α -CD3 Antikörper zugesetzt.

Für das folgende Experiment wurden voraktivierte nTregs ohne weitere Stimulation (Medium), sowie mit α -CD3 oder α -CD28 bzw. mit einer Kombination der beiden Antikörper für 20 Stunden kultiviert. Nach der Inkubationszeit wurden die Überstände abgenommen und auf die Produktion von IL-10 überprüft.

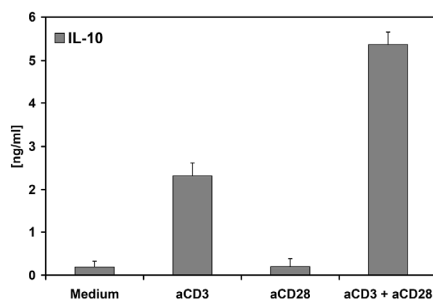


Abb.50: Produktion von IL-10 durch verschieden aktivierte nTregs. nTregs wurden in 96-Kavitäten-Platten mit in der Platte gebundenem (pb) α -CD3 (3 μ g/ml), pb α -CD28 (10 μ g/ml) oder einer Kombination aus beiden Antikörpern stimuliert bzw. unstimuliert belassen (Medium). Die unstimulierte Probe besteht hierbei aus voraktivierten nTregs. Die Überstände der Kokultur wurden nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden abgenommen und im ELISA auf die Produktion von IL-10 untersucht. Die Ergebnisse sind in ng/ml angegeben und konnten in 2-3 gleichwertigen Experimenten bestätigt werden. Die Standardabweichung wurde aus 3 Einzelwerten berechnet.

In Abbildung 50 ist zu erkennen, dass die voraktivierten regulatorischen T-Zellen nur geringe Mengen IL-10 produzieren. Erst die Restimulation mit einem der Antikörper führt zu einer Synthese des antiinflammatorischen Zytokins. Durch die Kombination der beiden Antikörper wird diese Synthese noch verstärkt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass diese Doppelstimulation der natürlichen Aktivierung der T-Zelle entspricht. α -CD28 imitiert dabei das kostimulatorische Signal der APC und α -CD3 aktiviert den T-Zell-Rezeptor. Die nTregs sind also in der Lage, nach Stimulation IL-10 zu produzieren. Für die maximale Bildung von IL-10 durch die nTregs sind allerdings beide Aktivierungssignale wichtig, weitere Faktoren wie Zytokine sind dafür nicht notwendig.

2.2.2.3 Verminderte nTreg-vermittelte Suppression der BMDC durch Blockieren des IL-10 Rezeptors mit einem Antikörper

Um die tatsächliche Auswirkung von IL-10 auf die Suppression der BMDC festzustellen, sollte im nächsten Schritt das IL-10 Signal in der BMDC blockiert werden. Aus diesem Grund wurde für die folgenden Experimente ein Antikörper benutzt, der den IL-10 Rezeptor (IL-10R1) blockiert, so dass vorhandenes IL-10 nicht mehr daran binden kann (Castro et al., 2000).

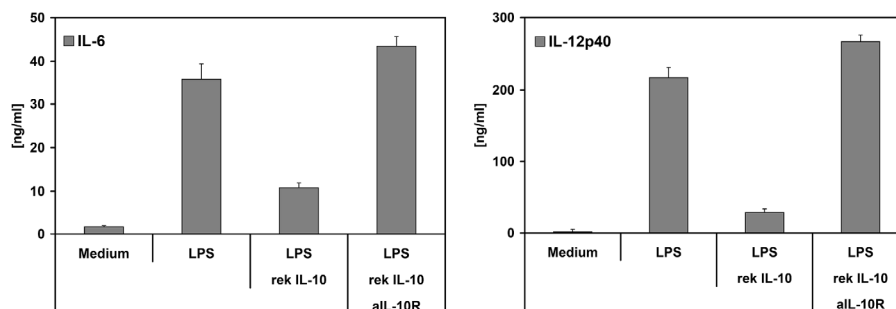


Abb.51: Funktionalitätstest des blockierenden α -IL-10 Rezeptor Antikörpers. BMDC wurden in 96-Kavitäten-Platten mit LPS (100 ng/ml), LPS plus rekombinatem IL-10 (100 ng/ml) stimuliert, bzw. unstimuliert belassen. Einer Probe wurde vor der Behandlung mit IL-10 der blockierende IL-10 Rezeptor Antikörper (aIL-10R, 1 μ g/ml) zugesetzt. Eine unstimulierte Probe dient als Medium-Kontrolle. Die anschließende Inkubationszeit erfolgte für 20 Stunden. Die Überstände der Kokultur wurden nach der Inkubationszeit abgenommen und auf die Produktion von IL-6 und IL-12p40 im ELISA untersucht. Die Ergebnisse sind in ng/ml angegeben und konnten mehrfach bestätigt werden. Die Standardabweichung wurde aus 3 Einzelwerten berechnet.

Zunächst erfolgte hierfür eine Kontrolle der Funktionalität des α -IL-10 Rezeptor Antikörpers (α IL-10R). Dafür wurden BMDC mit und ohne rekombinantem IL-10 kultiviert. Durch die Anwesenheit dieses antiinflammatorischen Zytokins wird die BMDC-Aktivierung unterbunden. Dies zeigte sich in einer verminderten Expression der kostimulatorischen Oberflächen-Moleküle (nicht gezeigt) und in der Verringerung der Sekretion der proinflammatorischen Zytokine. In Abbildung 51 ist die Produktion von IL-6 und IL-12p40 in einer BMDC-Kultur mit und ohne rekombinantem IL-10 dargestellt. Darin ist deutlich der inhibitorische Effekt von IL-10 auf die Aktivierung zu sehen. Einer Probe wurde jeweils vor der IL-10 Inkubation der blockierende α -IL-10 Rezeptor Antikörper zugesetzt. Durch die Blockierung des IL-10-Signals in den BMDC kann die Sekretion der Zytokine wieder hergestellt werden. Gleichzeitig konnte beobachtet werden, dass die Erhöhung der Oberflächen-Moleküle wieder erfolgte (nicht gezeigt).

Im Test konnte somit die Funktionalität des Antikörpers nachgewiesen werden. Im Anschluss daran konnte dieser in einer Kokultur aus BMDC und nTregs eingesetzt werden. Dafür wurden die Zellen wie zuvor beschrieben miteinander kultiviert. Die BMDC wurden mit LPS stimuliert oder unstimuliert belassen, die Aktivierung der nTregs erfolgte mit einem löslichen α -CD3 Antikörper.

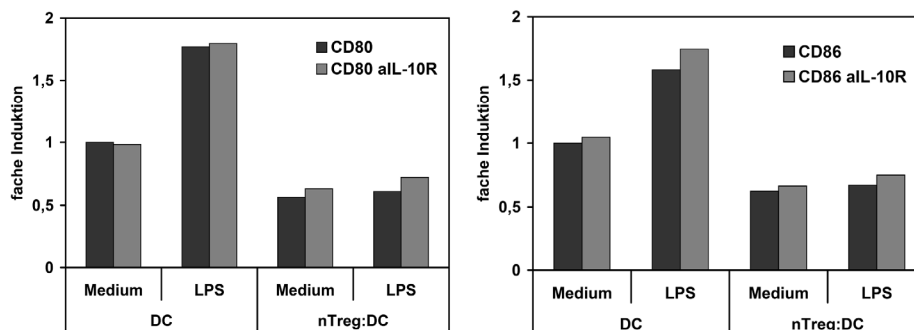


Abb.52: Veränderung der Suppression der BMDC durch Blockieren des IL-10 Rezeptors. BMDC und nTregs wurden in einem Verhältnis von 1 zu 5 in 96-Kavitäten-Platten für 4 Stunden kultiviert. Die BMDC-Aktivierung erfolgte mit LPS (100 ng/ml), die der nTregs mit α -CD3 (3 μ g/ml) (dunkle Balken). Die hellen Balken stellen die Proben dar, die mit dem blockierenden IL-10 Rezeptor Antikörper (α IL-10R, 1 μ g/ml) behandelt wurden. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit einer Antikörperlösung inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist die Expression von CD80 und CD86 der CD11c positiven und CD90.2 negativen Zellen der Kokultur. Der Medium-Wert der nicht inhibierten Proben wurde auf 1 normalisiert. Die Ergebnisse konnten in 3 gleichwertigen Experimenten bestätigt werden.

In Abbildung 52 ist die Veränderung der Suppression in Anwesenheit des blockierenden α IL-10R Antikörpers nach 4 Stunden Kokultur dargestellt. Da nach dieser kurzen Inkubationszeit mit den nTregs noch kein IL-10 nachweisbar war, konnte erwartet werden, dass die Suppression der BMDC nicht verändert wird. Tatsächlich zeigte sich, dass die BMDC-Aktivierung zu diesem Zeitpunkt durch den Antikörper nicht wieder hergestellt werden konnte.

Die IL-10 Produktion der nTregs konnte erst nach längerer Aktivierung nachgewiesen werden. Daher sollte im Folgenden untersucht werden, ob es möglich ist, die BMDC-Aktivierung durch das Blockieren des IL-10 Rezeptors in einer längeren Kokultur mit nTregs wieder zu verstärken. Dafür wurden die Zellen, wie zuvor beschrieben, miteinander für 20 Stunden kultiviert und mit dem blockierenden Antikörper behandelt. In Abbildung 53 ist die BMDC-Aktivierung nach 20 Stunden Kokultur mit und ohne α IL-10R Antikörper zu sehen. Es zeigte sich, dass die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf den BMDC durch Inhibierung des IL-10 Signals erhöht werden konnte. Beide Moleküle werden verstärkt exprimiert, wenn das IL-10-Signal unterbunden ist. Die Expression der MHCII-Moleküle konnte allerdings durch die Inhibierung des IL-10 Rezeptors nicht wieder hergestellt werden (nicht gezeigt). Auch die Expression der B7H-Moleküle ist trotz der Blockierung des IL-10 Rezeptors unverändert stark (nicht gezeigt). Die Analyse der Sekretion der proinflammatorischen Zytokine zeigte, dass diese durch das Blockieren des IL-10 Rezeptors wieder hergestellt werden konnte.

Das bedeutet, IL-10 spielt während der frühen Phase (4 Stunden) der nTreg-vermittelten Suppression keine Rolle. Für die späte Phase (20 Stunden) ist IL-10 wichtig. Es verhindert nicht nur die Produktion der proinflammatorischen Zytokine, sondern verhindert auch die Hochregulierung der kostimulatorischen Moleküle auf den BMDC.

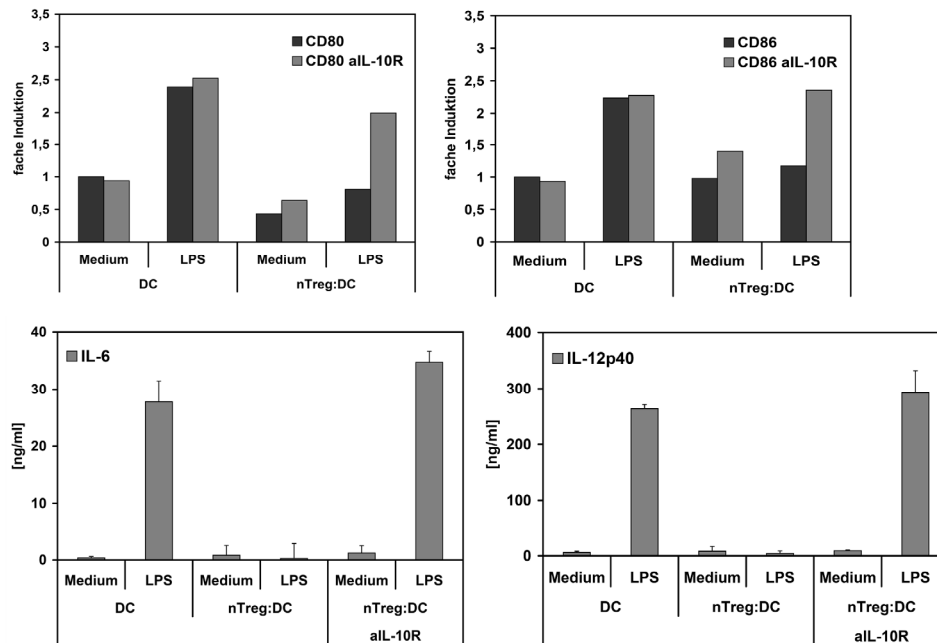


Abb.53: Veränderung der Suppression der BMDC durch Blockieren des IL-10 Rezeptors. BMDC und nTregs wurden in einem Verhältnis von 1 zu 5 in 96-Kavitäten-Platten für 20 Stunden kultiviert. Die BMDC-Aktivierung erfolgte mit LPS (100 ng/ml), die der nTregs mit α -CD3 (3 μ g/ml) (dunkle Balken, obere Reihe). Die hellen Balken der oberen Reihe stellen die Proben dar, die mit dem blockierenden α IL-10 Rezeptor Antikörper (α IL-10R, 1 μ g/ml) behandelt wurden. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit einer Antikörperlösung inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt sind die Expression von CD80 und CD86 der CD11c positiven und CD90.2 negativen Zellen der Kokultur. Der Medium-Wert der nicht inhibierten Proben wurde auf 1 normalisiert. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 3 gleichwertige Experimente.

Die Überstände der Kokultur wurden nach der Inkubationszeit abgenommen und auf die Produktion von IL-6 und IL-12p40 im ELISA untersucht (untere Reihe). Die Ergebnisse sind in ng/ml dargestellt. Die Standardabweichung wurde aus 3 Werten berechnet. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 2-3 gleichwertige Experimente.

2.2.2.4 Wiederherstellung der Proliferation TCR-transgener T-Zellen durch nTreg-supprimierte BMDC durch Blockierung des IL-10 Rezeptors

Wie schon gezeigt wurde, kann das Potential der BMDC zur T-Zell-Aktivierung durch eine Vorkultur mit nTregs unterbunden werden (Abb.23). Daher stellte sich die Frage, ob die BMDC durch das Blockieren des IL-10-Signals wieder in der Lage ist, T-Zellen zu aktivieren. Dafür wurden BMDC mit nTregs kultiviert. In einer Probe wurde der IL-10 Rezeptor der Zellen mit dem α IL-10R Antikörper blockiert. Nach 20 Stunden Kokultur wurden die Zellen, wie bereits beschrieben, mit einem biotinylierten CD90.2-erkennenden Antikörper und anschließend mit Streptavidin-Beads behandelt und über eine MACS-Säule voneinander getrennt. Die so gewonnenen BMDC wurden mit

einem Peptid (OT-2-Peptid) beladen und in zweite Kokultur mit TCR-transgenen T-Zellen gegeben, die für dieses Peptid spezifisch sind. In Abbildung 23 konnte bereits gezeigt werden, dass das Potential der BMDC T-Zellen zu aktivieren durch eine Vorkultur mit nTregs verhindert ist. Auch hier wurde die Kultur nach zwei Tagen im Durchflusszytometer auf die Aktivierung der T-Zellen untersucht. In Abbildung 54 ist die Proliferation der T-Zellen in der Kultur dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die TCR-transgenen T-Zellen in Anwesenheit von LPS-aktivierten BMDC, die mit dem spezifischen Peptid beladen sind, stark proliferieren. Wurden die BMDC zuvor mit nTregs kultiviert, konnte eine Verminderung der Proliferation der TCR-transgenen T-Zellen festgestellt werden. Durch die Blockierung des IL-10 Rezeptors in der Kultur der BMDC mit den nTregs konnte die Proliferation der TCR-transgenen T-Zellen in der zweiten Kultur wieder hergestellt werden. Für die Suppression der BMDC-spezifischen Aktivierung von T-Zellen ist demnach allein das IL-10 der nTregs verantwortlich.

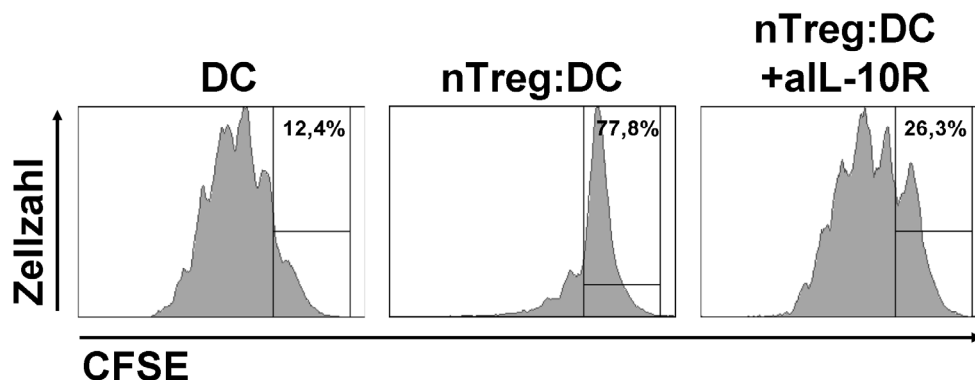


Abb.54: Proliferation transgener T-Zellen durch stimulierte und supprimierte BMDC nach Blockierung des IL-10 Rezeptors. BMDC wurden in 96-Kavitäten-Rundbodenplatten ausgesät und mit bzw. ohne nTregs kultiviert. Dabei wurden die BMDC mit LPS (100 ng/ml) und die nTregs mit einem löslichen α -CD3 Antikörper (3 μ g/ml) stimuliert. In einer Probe wurde der IL-10 Rezeptor der Zellen mit einem Antikörper blockiert (aIL-10R, 1 μ g/ml). Nach der Inkubationszeit von 20 Stunden wurden die Zellen mit einem biotinylierten CD90.2-erkennenden Antikörper inkubiert und anschließend mit Streptavidin-Beads behandelt. Danach können die Zellen über eine MACS-Säule getrennt werden. Für die zweite Kokultur wurden die drei verschiedenen BMDC-Proben (LPS-aktivierte BMDC, getrennte BMDC und getrennte BMDC bei denen der IL-10 Rezeptor blockiert wurde) mit einem Peptid beladen (100 nM, OT-2-Peptid) und mit vorher isolierten, CFSE-markierten (2,5 μ M), CD4-positiven TCR-transgenen T-Zellen, kultiviert. Das Verhältnis von T-Zellen zu BMDC betrug dabei 10:1. An Tag 3 wurde die Proliferation der Kokultur im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist das CFSE-Signal der TCR-transgenen T-Zellen, dabei sinkt die Intensität des Signals mit zunehmender Proliferation. Die Signalstärke sinkt von rechts nach links.

2.2.2.5 BMDC-Suppression durch nTregs aus IL-10 knock out Mäusen

Da gezeigt werden konnte, dass IL-10 während der Suppression der BMDC eine wichtige Rolle spielt, sollten diese Ergebnisse im Anschluss daran bestätigt werden. Dafür wurden wieder IL-10 knock out (IL-10 ko) Mäuse verwendet. Aus diesen und aus Wildtyp-Tieren (wt) wurden nTregs isoliert und für 5 Tage voraktiviert. Danach wurden die Zellen mit BMDC aus Wildtyp-Tieren kultiviert und nach 4 Stunden bzw. 20 Stunden untersucht. Abbildung 55 zeigt die Expression der kostimulatorischen Oberflächen-Moleküle der dendritischen Zellen nach 4 Stunden Kokultur.

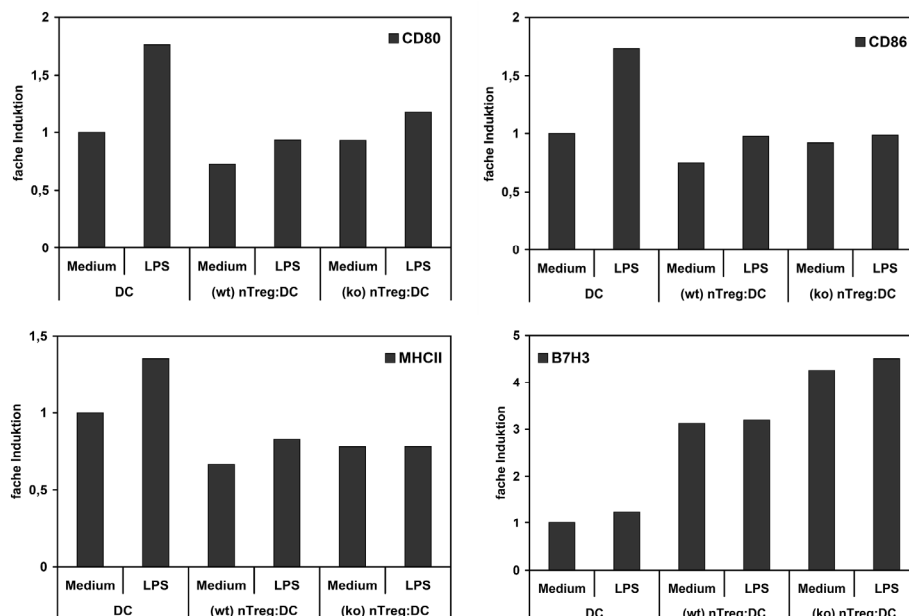


Abb.55: Veränderung der BMDC-Aktivierung mit IL-10 knock out nTregs nach einer Kokultur von 20 Stunden. BMDC und wurden mit Wildtyp (wt) nTregs bzw. IL-10 knock out (ko) nTregs in einem Verhältnis von 1 zu 5 in 96-Kavitäten-Platten für 4 Stunden kultiviert. Die BMDC-Aktivierung erfolgte mit LPS (100 ng/ml), die der nTregs mit einem löslichen α -CD3 Antikörper (3 μ g/ml). Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit einer Antikörperlösung inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt sind die Expression von CD80, CD86, B7H3 und MHCII der CD11c positiven, CD90.2 negativen Zellen aus der Kokultur. Der Medium-Wert wurde jeweils auf 1 normalisiert. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 2-3 gleichwertige Experimente.

Es ist zu erkennen, dass CD80 und CD86 in Gegenwart der nTregs stark verringert sind. Dies trifft auch in den Proben zu, in denen die nTregs kein IL-10 produzieren konnten. Lediglich für die Expression von CD80 konnte festgestellt werden, dass diese nach 4 Stunden Kokultur mit IL-10 ko nTregs leicht höher ist, als mit wt nTregs. Das könnte darauf hinweisen, dass die Produktion von IL-10 in Wildtyp-Zellen zu

diesem Zeitpunkt schon einsetzt und die supprimierenden Eigenschaften der nTregs vermittelt. Durch das Fehlen von IL-10 könnte die Aktivierung der BMDC in diesem Experiment schon nach wenigen Stunden der Kokultur mit den IL-10 ko nTregs wieder einsetzen. Die Expression der MHCII-Moleküle auf der BMDC-Oberfläche dagegen blieb in den Experimenten unverändert stark inhibiert, auch wenn die nTregs kein IL-10 sezernieren konnten. Weiter konnte festgestellt werden, dass die Expression der B7H-Moleküle im Gegensatz zur Suppression mit wt nTregs sogar noch verstärkt wird, wenn die BMDC mit IL-10 ko nTregs kultiviert wurden.

Zur Untersuchung der Spät-Wirkung der IL-10 ko nTregs wurden die Zellen mit wt BMDC für 20 Stunden kultiviert und mit Proben verglichen, in denen die BMDC von wt nTregs supprimiert wurden. Dabei konnte eine ähnliche Wirkung erzielt werden, wie sie schon durch das Blockieren des IL-10 Rezeptors gezeigt werden konnte (Abb.52, 53). Durch die fehlende Wirkung von IL-10 war es für die dendritischen Zellen trotz der Anwesenheit von nTregs wieder möglich, proinflammatorische Zytokine zu sezernieren (Abbildung 56). Die Unterdrückung dieser Mediatoren scheint vollständig von der Anwesenheit von IL-10 abhängig zu sein. Bezüglich der Expression der Moleküle auf der Oberfläche der BMDC konnte festgestellt werden, dass ohne IL-10 in der Kokultur die BMDC auch wieder höhere Mengen der kostimulatorischen Oberflächen-Moleküle exprimierten. Weiter konnte festgestellt werden, dass die höhere Expression der B7H-Moleküle nur nach kurzer Kokultur nachweisbar ist. Nach 20 Stunden verhalten sich die BMDC bezüglich dieser Moleküle gleich denen, die mit wt nTregs kultiviert wurden (nicht gezeigt). Auch bei der Expression der MHCII-Moleküle kann für die längere Inkubationszeit keine Verbesserung zu den BMDC, die mit wt nTregs kultiviert wurden, festgestellt werden.

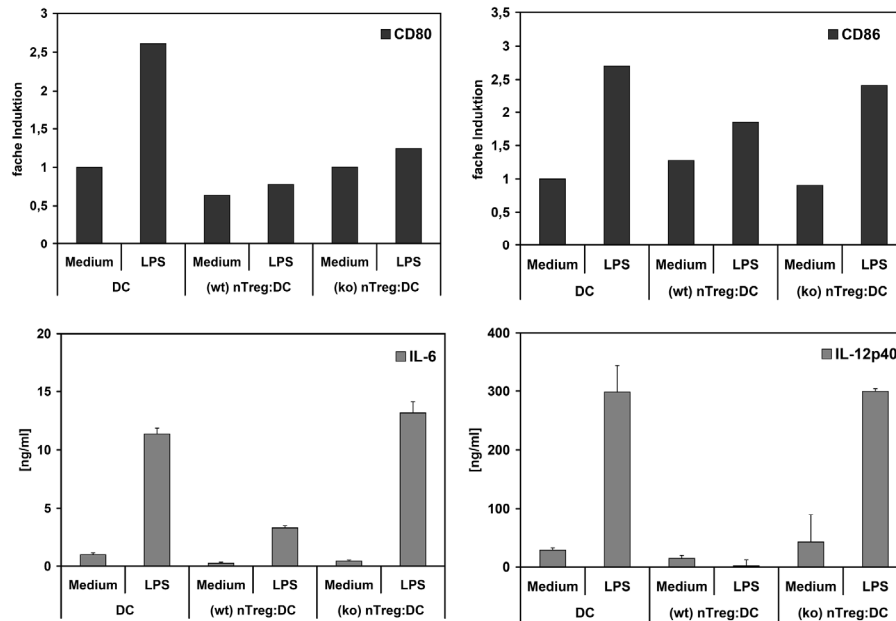


Abb.56: Veränderung der BMDC-Aktivierung mit IL-10 knock out nTregs nach einer Kokultur von 20 Stunden. BMDC und wurden mit Wildtyp (wt) nTregs bzw. IL-10 knock out (ko) nTregs in einem Verhältnis von 1 zu 5 in 96-Kavitäten-Platten für 20 Stunden kultiviert. Die BMDC-Aktivierung erfolgte mit LPS (100 ng/ml), die der nTregs mit α -CD3 (3 μ g/ml). Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit einer Antikörperlösung inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt sind die Expression von CD80 und CD86 der CD11c positiven und CD90.2 negativen Zellen aus der Kokultur (obere Reihe). Der Medium-Wert wurde jeweils auf 1 normalisiert. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 2-3 gleichwertige Experimente. Nach der Inkubationszeit wurden die Überstände der Kokultur abgenommen und auf die Produktion von IL-6 und IL-12p40 untersucht (untere Reihe). Die Ergebnisse sind in ng/ml angegeben, die Standardabweichung wurde aus 3 Werten berechnet. Die Ergebnisse konnten mehrfach bestätigt werden.

Somit konnte also gezeigt werden, dass das Vorhandensein von IL-10 wichtig für die nTreg-vermittelte Suppression von BMDC ist. Nach kurzer Inkubationszeit ist dies nicht nachweisbar, da IL-10 erst später gebildet wird. Daher wird die Expression der Oberflächen-Moleküle nach kurzer Inkubationszeit mit IL-10 ko nTregs nicht verändert, im Vergleich zur Inkubation mit wt nTregs. Wurde die Expression der Oberflächen-Moleküle nach 20 Stunden Kokultur betrachtet, zeigte sich, dass deren starke Unterdrückung durch wt nTregs im Vergleich dazu mit IL-10 ko nTregs nicht so stark ausgeprägt war. Im Besonderen zeigte sich die Beeinflussung durch IL-10 bei der Sekretion der proinflammatorischen Zytokine, die in Abwesenheit von IL-10 in der Kokultur mit IL-10 ko nTregs wieder synthetisiert werden können.

2.2.2.6 Wiederherstellung der Proliferation TCR-transgener T-Zellen nach BMDC-Suppression durch nTregs aus IL-10 knock out Mäusen

Um erneut das Potential der supprimierten BMDC während der T-Zell-Aktivierung zu testen, wurden wieder Ova-transgene Mäuse (DO11.10) heran gezogen, deren T-Zellen einen transgenen TCR für das OT-2 Peptid aus dem Ovalbumin tragen. Die Proliferation dieser TCR-transgenen T-Zellen konnte in vorausgegangenen Experimenten durch nTreg-supprimierte BMDC verringert werden (Abb.23). Durch die Experimente mit dem blockierenden IL-10 Rezeptor Antikörper konnte gezeigt werden, dass IL-10 eine entscheidende Rolle bei der Inhibierung der BMDC spielt. Ohne das inhibitorische Signal von IL-10 in den BMDC konnte die Fähigkeit der T-Zell-Aktivierung der BMDC wieder hergestellt werden. Für die folgenden Experimente wurden nTregs aus Wildtyp-Mäusen und aus IL-10 ko Mäusen gewonnen und für 20 Stunden mit BMDC kultiviert. Nach der Inkubationszeit, wurden die BMDC wie bereits beschrieben, über eine MACS-Säule wieder von den nTregs getrennt. Die so isolierten BMDC wurden mit CD4 positiven TCR-transgenen T-Zellen in einer zweiten Kokultur inkubiert.

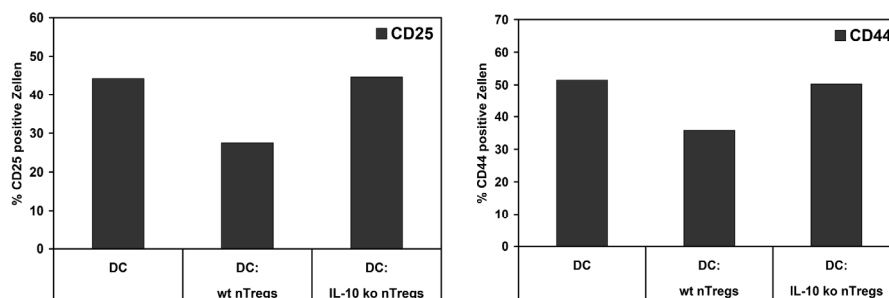


Abb. 57: Aktivierungs-Moleküle auf TCR-transgenen T-Zellen nach Kultur mit unterschiedlich supprimierten BMDC. BMDC wurden in 96-Kavitäten-Rundbodenplatten ausgesät und mit bzw. ohne nTregs aus wt-Mäusen bzw. IL-10 ko-Mäusen kultiviert. Dabei wurden die BMDC mit LPS (100 ng/ml) und die nTregs mit einem löslichen α -CD3 Antikörper (3 μ g/ml) stimuliert. Nach der Inkubationszeit von 20 Stunden wurden die Zellen mit einem biotinylierten α -CD90.2 Antikörper inkubiert und anschließend mit Streptavidin-Beads behandelt. Danach wurden die Zellen über eine MACS-Säule getrennt. In der Abbildung ist diese erste Kultur in der Legende unterhalb des Graphen aufgeführt. Für die zweite Kokultur wurden separierte und LPS-aktivierte BMDC mit OT-2-Peptid beladen (100 nM) und mit vorher isolierten CD4 positiven T-Zellen, deren TCR transgen für dieses Peptid aus dem Ovalbumin sind, kultiviert. Das Verhältnis von T-Zellen zu BMDC betrug dabei 10:1. An Tag 2 wurden die Zellen mit einer Antikörperlösung inkubiert und im Durchflusszytometer analysiert. Bestimmt wurde dabei die Prozentzahl der CD25 und CD44 positiven transgenen T-Zellen in der Population der CD90.2 positiven, PI negativen Zellen.

Nach 48 Stunden wurde die Oberfläche der TCR-transgenen T-Zellen mittels Durchflusszytometrie auf die Expression von Aktivierungs-Molekülen untersucht. In Abbildung 57 ist die Anzahl der CD25 und der CD44 positiven T-Zellen in der Kultur dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die TCR-transgenen T-Zellen in Gegenwart von aktivierten, Peptid-beladenen BMDC beide Aktivierungs-Moleküle stark exprimieren. In den Proben, in denen die BMDC mit nTregs aus Wildtyp-Mäusen vorinkubiert wurden, zeigte sich wie schon in vorherigen Experimenten, eine stark verringerte Expression der beiden Moleküle. Sind die BMDC dagegen mit nTregs aus IL-10 ko Mäusen vorkultiviert worden, konnte die T-Zell-Aktivierung der TCR-transgenen T-Zellen wieder hergestellt werden.

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde anschließend die Proliferation der TCR-transgenen T-Zellen in Anwesenheit von unterschiedlich supprimierten BMDC untersucht. Dafür wurden die BMDC und nTregs wie schon zuvor beschrieben kultiviert und anschließend wieder getrennt. Die TCR-transgenen T-Zellen wurden für die zweite Kultur mit CFSE markiert und mit den separierten BMDC kultiviert. In Abbildung 58 ist die Proliferation der TCR-transgenen T-Zellen an Tag 3 dargestellt.

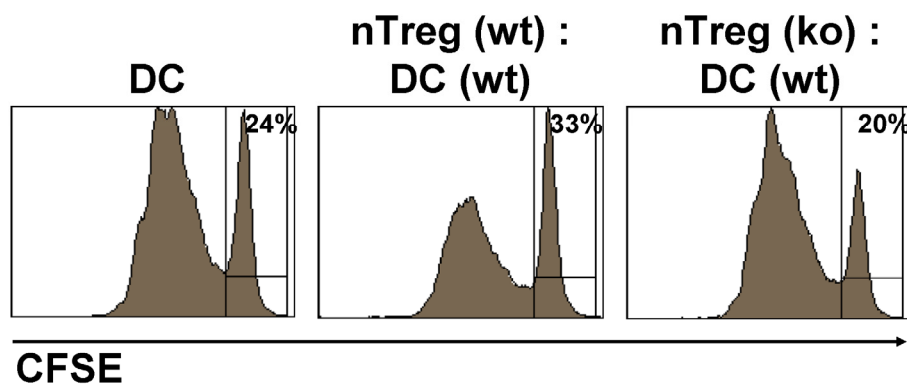


Abb.58: T-Zell-Proliferation durch verschieden suppressierte BMDC. BMDC wurden in 96-Kavitäten-Rundbodenplatten ausgesät und mit bzw. ohne nTregs aus Wildtyp bzw. IL-10 knock out Mäusen kultiviert. Dabei wurden die DC mit LPS (100 ng/ml) und die nTregs mit einem löslichen α -CD3 Antikörper (3 μ g/ml) stimuliert. Nach der Inkubationszeit von 20 Stunden wurden die Zellen mit einem biotinylierten CD90.2-erkennenden Antikörper inkubiert und anschließend mit Streptavidin-Beads behandelt. Danach können die Zellen über eine MACS-Säule getrennt werden.

Für die zweite Kokultur wurden getrennte und LPS-aktivierte DC mit einem Peptid beladen (100 nM, OT-2-Peptid) und mit vorher isolierten, CFSE-markierten (2,5 μ M), CD4-positiven T-Zellen, die transgen für dieses Peptid aus dem Ovalbumin sind, kultiviert. Das Verhältnis von T-Zellen zu DC betrug dabei 1:10. An Tag 3 wurde die Proliferation der Kokultur im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist das CFSE-Signal der T-Zellen, dabei sinkt die Intensität des Signals mit zunehmender Proliferation. Die Signalstärke sinkt von rechts nach links.

Werden die TCR-transgenen T-Zellen mit aktivierten, Peptid-beladenen BMDC kultiviert, teilen sich die Zellen bis zu 5-mal. In den Proben, in denen die BMDC mit Wildtyp-nTregs vorinkubiert wurden konnte, wie schon in früheren Experimenten, eine stark verringerte Proliferation der TCR-transgenen T-Zellen festgestellt werden. Im Gegensatz dazu proliferieren die TCR-transgenen T-Zellen in Anwesenheit von BMDC, die mit IL-10 ko nTregs kultiviert wurden, wieder. Zusammen fassend konnte also gezeigt werden, dass die Fähigkeit von BMDC naive T-Zellen zu aktivieren von nTregs verhindert werden kann. Diese Veränderung des T-Zell-Aktivierungspotentials ist abhängig von IL-10, welches durch die nTregs gebildet wird.

IV Diskussion

Für einen Organismus ist es wichtig, sich gegen Pathogene und andere Fremd-Antigene, wie zum Beispiel Toxine, verteidigen zu können. Zu diesem Zweck verfügt der menschliche Körper über ein ausgereiftes System aus Zellen und Mediatoren, die das Antigen angreifen und vernichten. Teil dieses System sind die dendritischen Zellen, die die Funktion der Fremderkennung und -präsentation einnehmen. Durch deren Aktivierung kann eine adaptive Immunantwort ausgelöst werden. Dabei sind zwei Facetten dieser Aktivierung von besonderem Interesse: der Umgang mit dem Antigen selbst und dessen Präsentation zum einen, sowie der Grad der Aktivierung der dendritischen Zelle zum anderen. Durch die Veränderung bzw. Inhibierung einer dieser beiden Teile der Funktion dendritischer Zellen, kann die Auslösung adaptiver Immunantworten beeinflusst oder sogar verhindert werden. Daher ist eine genaue Charakterisierung dieser Zellen so wichtig. In dieser Arbeit wurden sowohl die Aktivierung und Inhibierung dendritischer Zellen, als auch die Antigenprozessierung und -präsentation untersucht.

Ziel dieser Arbeit war es bestimmte Aspekte der DC-Aktivierung genauer zu untersuchen. Bei den verwendeten DC handelte es sich um in vitro aus Knochenmarksstammzellen generierte, Bone Marrow-derived Dendritic Cells (BMDC). Diese Zellen können durch verschiedene Stimuli, wie zum Beispiel Toll-like Rezeptor Liganden aktiviert werden. Der für diese Arbeit am Häufigsten verwendete Stimulus ist das LPS von *Salmonella typhimurium*. Durch die Inkubation der BMDC mit LPS wurde eine Aktivierung dieser Zellen induziert. Dies konnte anhand der hoch regulierten kostimulatorischen Oberflächen-Moleküle auf den BMDC, sowie an der Sekretion von Zytokinen festgestellt werden (Abb. 1 und 2).

1 Veränderung adaptiver Immunantworten durch die Beeinflussung der Antigen-Prozessierung und -Präsentation in dendritischen Zellen

1.1 Veränderung der Antigen-Präsentation durch die Formierung polyubiquitinylierter Protein-Aggregate (DALIS) in aktivierten BMDC

Während der Maturation dendritischer Zellen bilden sich im Zytosol Aggregate aus polyubiquitinylierten Proteinen. Die Formierung dieser DALIS (Dendritic Cell Aggresome-like Induced Structures), die transient während der Aktivierung von BMDC auftritt, wurde von Hugues Lelouard 2002 beschrieben. Da weder die Funktion noch die Bildung dieser Aggregate bis heute genau bekannt ist, wurden im Verlauf dieser Arbeit einige Aspekte der DALIS-Bildung untersucht.

Zunächst wurde hier überprüft, wie eng die DALIS-Bildung mit dem Aktivierungssignal der BMDC zusammenhängt. Dafür wurden die Zellen mit verschiedenen TLR-Liganden und Kombinationen aus diesen stimuliert. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Größe als auch die Anzahl der DALIS mit einer Kombination aus zwei TLR-Liganden, die eine stärkere Aktivierung der Zellen verursachen, erhöht werden konnte (Abb. 4). So ist es wahrscheinlich, dass die Menge des vorhandenen Antigens im Organismus für die Aktivierung dendritischer Zellen essentiell ist und vermutlich auch die DALIS-Bildung in vivo beeinflusst.

Da die DALIS-Bildung auch durch einen extremen Temperatur-Schock, bzw. durch pH-Änderungen oder durch erhöhte Alkohol-Konzentrationen verursacht werden kann (Szeto et al., 2006), wäre es in diesem Zusammenhang interessant, ob sich die Stärke dieser Reize ebenfalls mit Größe und Auftreten von DALIS korrelieren lässt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass durch einen stärkeren Aktivierungsreiz, wie zum Beispiel die Kombination aus mehreren TLR-Liganden die Aktivierung der Zellen verstärkt werden kann. Die Produktion der proinflammatorischen Zytokine setzt in den so stimulierten Zellen schneller ein und das Potential zur T-Zell-Aktivierung ist ebenfalls verstärkt (Warger et al., 2006). In diesem Zusammenhang könnte eine kinetische Untersuchung der DALIS-Bildung Aufschluss darüber geben, ob sich diese mit dem veränderten Aktivierungsprofil der stärker stimulierten Zellen korrelieren lässt. So wäre es zum Beispiel möglich, dass sich in stärker stimulierten Zellen die DALIS bereits früher bilden und so eine früher einsetzende T-Zell-Aktivierung ausgelöst werden könnte.

1.2 Beteiligung von Chaperonen in die DALIS-Bildung bzw. deren Abbau

Die DALIS-Bildung kann durch verschiedene Stimuli wie LPS, aber auch durch Umwelt-Reize (Temperatur, Alkohol, pH) ausgelöst werden. Bei diesen Umwelt-Reizen spielt in den meisten Fällen eine Protein-Gruppe eine entscheidende Rolle, die Hitzeschockproteine (oder auch Chaperone). Die vielfältigen Aufgaben der Chaperone reichen von der Hilfe beim Falten von Proteinen, über das Stabilisieren von Proteinen bis hin zum Abbau von Protein-Aggregaten (Srivastava, 2002). Hier wurde untersucht, welche Chaperone direkt in die DALIS-Bildung bzw. deren Abbau involviert sind. Dabei konnten durch Kolokalisations-Färbungen zwei Chaperone identifiziert werden, die unmittelbar mit den DALIS interagieren. Hsp70/Hsc70 ist ein Heterodimer, das bei der Rückfaltung von Proteinen eine Rolle spielt (Nollen et al., 2001) (Connell et al., 2001). In einem Zellkultur-Modell (oculopharyngeal muscular dystrophy) konnte an HeLa-Zellen bereits gezeigt werden, dass Hsp70/Hsc70 eine Rolle beim Abbau von Protein-Aggregaten spielt (Wang et al., 2005). Demnach wäre es möglich, dass Hsp70/Hsc70 während dem Abbau der DALIS eine Rolle spielt. Wenn davon ausgegangen wird, dass die Peptide aus den DALIS dazu dienen, MHC-Moleküle zu beladen, die an der Zelloberfläche der Antigen-Präsentation dienen, ist es möglich, dass die Bildung und der Abbau der DALIS aktiv vonstatten geht und damit den Zeitpunkt der Antigen-Präsentation steuert. Dafür könnten eine oder mehrere Chaperon-Familien verantwortlich sein.

Für Hsp90 konnte ebenfalls eine Kolokalisation mit DALIS nachgewiesen werden. Dieses Chaperon ist bei der Faltung von größeren Proteinen involviert. In aktuellen Arbeiten konnte zudem gezeigt werden, dass Hsp90 eine entscheidende Rolle während der Crosspräsentation von Antigenen spielt (Kurotaki et al., 2007). Dabei werden exogene Antigene, auf MHCI-Moleküle geladen und präsentiert. Hugues Lelouard konnte mit FITC-markiertem Ovalbumin zeigen, dass exogene Antigene nicht in DALIS eingebaut werden. Hsp90 könnte in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen, indem es die Einlagerung von exogenen Antigenen in die DALIS verhindert. Für Zelleigene, große Proteine ist Hsp90 wichtig für die korrekte Faltung. So kann Hsp90 Einfluss auf die Halbwertszeit von Proteinen haben. Durch den direkten Kontakt mit DALIS könnten falsch gefaltete Proteine sofort in diese eingelagert werden. Durch die Inhibierung von Hsp90 durch Geldanamycin konnte keine Veränderung der DALIS-Bildung festgestellt werden. Das spricht gegen eine Rolle von Hsp90 während der Bildung der DALIS.

Für weitere Experimente sollten die beiden Chaperone (Hsp90, Hsp70/Hsc70) kinetisch während der Bildung und dem Abbau der DALIS beobachtet werden. So kann ein Eindruck darüber gewonnen werden, welche Chaperone zu welchem Zeitpunkt mit den DALIS kolokalisieren. Durch die Verwendung von spezifischen siRNAs gegen diese Chaperone, oder Experimente in denen die Chaperone überexprimiert werden, könnte die Funktion dieser Proteine während der DALIS-Bildung genauer untersucht werden. Durch eine Identifizierung der an der DALIS-Bildung beteiligten Proteine wäre es möglich, die Bildung dieser Aggregate zu kontrollieren. Durch den gezielten Eingriff in die Bildung und den Abbau der DALIS könnte deren genaue Funktion während einer Immunantwort ermittelt werden. Die Zeit, die dendritische Zellen benötigen, um ein Antigen zu präsentieren stellt den ersten limitierenden Faktor während einer Immunantwort dar. Durch eine Kontrolle der DALIS-Bildung, wäre es möglich die Zeit, die eine adaptive Immunantwort benötigt um vollständig anzulaufen, zu verkürzen.

1.3 Signalwege, die zur Bildung von DALIS führen

Weiter wurde in dieser Arbeit untersucht, welche Signalwege bei der Bildung von DALIS eine Rolle spielen. Es ist bereits bekannt, dass die PI3-Kinase bei der DC-Aktivierung eine wichtige Rolle spielt. Diese Lipid-Kinase ist für die Hochregulation der kostimulatorischen Oberflächen-Moleküle, sowie für die Produktion von IL-6 von entscheidender Bedeutung (Abb.10). Im Gegensatz dazu scheint die PI3-Kinase bei der Produktion von IL-12p40 keine Rolle zu spielen. Durch die Arbeiten von Sylvia Herter und Hugues Lelouard wurde die Bedeutung der PI3-Kinase bei der Bildung von DALIS bereits erkannt. Dies konnte hier mit einem weiteren PI3-Kinase Inhibitor (Wortmannin) bestätigt und damit die Bedeutung der PI3-Kinase für die DALIS-Bildung untermauert werden.

Da die Signal-Weiterleitung in der Zelle über verschiedene Wege anlaufen kann, wurden im Lauf dieser Arbeit weitere Signal-Moleküle auf ihre Wirkung bei der DALIS-Bildung untersucht. Unter Berücksichtigung der von Sylvia Herter gemachten Beobachtungen konnte ausgeschlossen werden, dass die MAP-Kinasen p38, Jnk, ERK und MEK in die DALIS-Bildung involviert sind. Stattdessen wurde der Signal-Weg der PI3-Kinase genauer betrachtet. Durch die sekundären Messenger-Moleküle PIP2 und PIP3, die von der PI3-Kinase gebildet werden, können weitere Moleküle, wie Akt, aktiviert werden. Durch die Arbeit von Sylvia Herter konnte gezeigt werden,

dass durch die Inhibierung von Akt (Protein-Kinase B) eine leichte Inhibierung der DALIS-Bildung erfolgte. Akt hat unter anderem die Aufgabe mTOR zu aktivieren. Durch Experimente mit Rapamycin, einem spezifischen Inhibitor für mTOR konnte hier gezeigt werden, dass die Inhibierung dieses Moleküls die Formierung der DALIS unterbindet (Abb.16). Rapamycin verhindert durch die Inhibierung von mTOR und den Translationsfaktoren eIF2G und eIF4E die Protein-Synthese. Dadurch werden die Proteine, die in die DALIS eingelagert würden nicht hergestellt. Die DALIS-Bildung ist also eng mit der Neusynthese von Proteinen verknüpft und DALIS bestehen dementsprechend zu einem großen Anteil aus diesen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass DRiPs (Defective Ribosomal Products), die bei der Protein-Synthese häufig entstehen in DALIS eingelagert werden können (Lelouard et al., 2004). Exogene Antigene dagegen können nicht in DALIS eingebaut werden. Hugues Lelouard konnte das anhand von FITC-markiertem Ovalbumin, das sie auf BMDC gegeben hat, ausschließen. Allerdings konnte in ihrer Arbeit nicht geklärt werden, ob durch eine Prozessierung das FITC vom Ovalbumin abgespalten wird und somit das Ovalbumin in der Zelle gar nicht bis zum Einbau in die DALIS verfolgt werden kann. Dies könnte mit weiteren Model-Antigenen untersucht werden, die entweder mit zusätzlichen Fluorochromen markiert sind, oder durch Antikörper-Bindung bzw. eine radioaktive Markierung in der Zelle verfolgt werden können.

Um zu untersuchen, welche Proteine tatsächlich in die DALIS eingebaut werden, ist es notwendig, diese getrennt von der Zelle zu analysieren. Erste Versuche konnten zeigen, dass DALIS bei einer Lyse von BMDC in einer Detergenz-unlöslichen Fraktion gesammelt werden können (Sylvia Herter). Durch die Aufreinigung von DALIS könnten diese in einem Massenspektrometer auf ihre Bestandteile untersucht werden. Diese Aufreinigung kann durch eine Immunpräzipitation (IP) erfolgen, wobei alle ubiquitinylierten Proteine und Peptide aus einer Probe aufgereinigt werden könnten. Da innerhalb von Zellen allerdings auch eine Vielzahl an Proteinen und Peptiden ubiquitinyliert wird, ohne dass diese in DALIS eingebaut werden, müsste ein zweiter Parameter in die IP aufgenommen werden. Da in Influenza-infizierten BMDC das Nukleoprotein des Virus in den DALIS kolokalisiert werden kann, wäre es möglich eine Ko-IP von Ubiquitin und Nukleoprotein durchzuführen. Eine weitere Möglichkeit der DALIS-Aufreinigung besteht darin, die Makrophagen-Linie RAW309, die im Labor bereits so verändert wurde, dass das Ubiquitin in den Zellen ein grünes Fluoreszenz-Protein (eGFP) trägt, für diesen Zweck einzusetzen. Da in diesen Zellen

die Notwendigkeit der DALIS-Färbung wegfällt, könnten die Zellen nach der entsprechenden Stimulationszeit lysiert werden und anschließend die eGFP-positiven DALIS in einem „Cell Sorter“ (FACS, Fluorescence Associated Cell Sorter) aufgetrennt werden.

Zusammenfassung Teil1

Zusammenfassend konnten während diesem Teil der Arbeit einige Details zur Bildung von DALIS geklärt werden. So konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der DALIS-Bildung und der Stärke der BMDC-Aktivierung festgestellt werden. Einige Proteine der Hitzeschock-Proteinfamilie konnten durch Kollokalisations-Färbungen in direkten Zusammenhang mit der Bildung der DALIS gebracht werden. Um die genauen Aufgaben der einzelnen Proteine zu klären, bedarf es allerdings weiterer Versuche. Bei der Signalgebung während der DALIS-Bildung konnte ein weiteres Molekül bestimmt werden, welches direkt in die Bildung der DALIS involviert ist. Um auf diesem Signal-Weg von der PI3-Kinase über Akt und mTOR weiter zu arbeiten, sollten als nächstes die einzelnen Translationsfaktoren genauer untersucht werden. Die Erkenntnisse dieser Arbeit zur der Bildung von DALIS während der BMDC-Aktivierung können das Verständnis der Entstehung einer Immunantwort verbessern. Wenn es gelingt, die DALIS-Bildung in direkten Zusammenhang mit der Antigen-Präsentation zu bringen, wäre es möglich diese zu beeinflussen oder zu verändern. Das kann dazu beitragen, Krankheiten, bei deren Verlauf dendritische Zellen eine Rolle spielen, besser zu verstehen und eventuell den Verlauf zu beeinflussen.

2 Veränderung adaptiver Immunantworten durch die Beeinflussung der Maturation dendritischer Zellen durch natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen

2.1 Maturation von BMDC in der Gegenwart von regulatorischen T-Zellen

Natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen (nTregs) haben die Aufgabe die Selbsttoleranz des Immunsystems zu erhalten. Durch die Kultivierung von nTregs mit naiven CD4 positiven T-Zellen ist es möglich, die Aktivierung der naiven T-Zellen zu inhibieren. Die nTregs verhindern hierbei Zell-Kontakt abhängig die Sekretion von IL-2, einem Wachstumsfaktor, der für die Proliferation von T-Zellen essentiell ist. Es konnten in diesem Zusammenhang schon einige Details zum Wirkmechanismus der nTregs bei der Suppression von CD4 positiven, naiven T-Zellen aufgedeckt werden (Bopp et al., 2007) (Strauss et al., 2007) (Pakravan et al., 2007) (Liston and Rudensky, 2007). Weiter gibt es bereits Untersuchungen, die zeigen, dass nTregs die Aktivierung von BMDC unterdrücken (Veldhoen et al., 2006) (Jarnicki et al., 2008) (Pasare and Medzhitov, 2003). Dabei ist bisher nicht bekannt, wie diese Inhibierung abläuft und was die genauen Auswirkungen auf die BMDC sind. Die regulatorischen Aufgaben der nTregs richten sich also nicht nur gegen T-Zellen, sondern sind auch bei der Unterdrückung von Antigen Präsentierenden Zellen wichtig.

Hier wurde durch Kokultur-Experimente mit nTregs und BMDC untersucht, wie die nTregs die Aktivierung der BMDC verändern. Die erhaltenen Resultate zeigten, dass die nTregs nicht nur die Aktivierung der BMDC blockierten, sondern auch die Grund-Expression aller untersuchten Moleküle auf der BMDC-Oberfläche verringerten. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass es für BMDC in Gegenwart von nTregs nicht mehr möglich war, proinflammatorische Zytokine zu produzieren. Das stimmt mit den Ergebnissen von anderen Arbeitsgruppen überein (Mahnke et al., 2007a),(Onishi et al., 2008). Dabei wurde die Aktivierung durch einzelne Stimuli und auch durch Kombination mehrerer TLR-Liganden durch nTregs aufgehoben (Abb.19). In Kinetik-Experimenten konnte anschließend gezeigt werden, dass die rapide Verringerung der kostimulatorischen Moleküle auf den BMDC direkt nach dem Kontakt der beiden Zellarten nachweisbar war (Abb.20). Das bedeutet, dass der Mechanismus der Suppression durch nTregs seine direkte Wirkung durch einen Faktor vermittelt, der sich zu diesem Zeitpunkt schon in bzw. auf den nTregs befindet. Um eine Immunantwort zu unterdrücken, verfügen nTregs demnach über ein inhibitorisches

Potential, das sofort bei Kontakt mit den zu inhibierenden Zellen auftritt. Regulatorische T-Zellen unterdrücken aber nicht nur die Aktivierung ihrer Zielzellen und damit eine Immunantwort, sondern verändern zudem den Grundzustand von dendritischen Zellen. Die Expressionslevel aller untersuchten Oberflächen-Moleküle auf den BMDC wurden in Anwesenheit der nTregs stark verringert. Im Organismus bedeutet der Kontakt zwischen dendritischen Zellen und regulatorischen T-Zellen also nicht nur das Dämpfen einer akuten Immunantwort, sondern auch eine generelle „Ruhigstellung“ der DC.

Weiter konnte gezeigt werden, dass die BMDC in Anwesenheit von nTregs beginnen Moleküle zu exprimieren, die die T-Zell-Aktivierung verhindern (B7H3, B7H4, Abb.21). Für die BMDC ist es nach einer Kultur mit nTregs nicht mehr möglich, naive T-Zellen zu aktivieren (Abb.22, 23). Dieses Ergebnis zeigt, dass die dendritischen Zellen, die mit regulatorischen T-Zellen in Kontakt gekommen sind, nicht nur nicht mehr aktiviert werden können, sondern auch die Fähigkeit T-Zellen zu aktivieren verlieren bzw. aktiv zur Inhibierung der T-Zellen angeregt werden.

Für eine starke T-Zell-Aktivierung durch BMDC ist es neben dem aktivierten Phänotyp ebenfalls notwendig, dass die Antigen Präsentierenden Zellen auch in der Lage sind, Antigen aufzunehmen und dieses zu prozessieren. Als Model für die Antigen-Aufnahme wurde FITC-markiertes Ovalbumin verwendet. Durch diese Versuche konnte gezeigt werden, dass die Endozytose der BMDC nicht durch nTregs gestört wird (Abb.24, 25). Das deutet darauf hin, dass die Funktion der für die Endozytose zuständigen Rezeptoren der BMDC nicht durch nTregs beeinflusst wird. Auch die Antigen-Prozessierung der BMDC wurde in Gegenwart von nTregs untersucht. Hierbei wurde wieder Ovalbumin (DQ-Ovalbumin) als Model-Protein verwendet. Im Gegensatz zur Antigen-Aufnahme, konnte die Prozessierung des DQ-Ovalbumins in den BMDC durch die nTregs verhindert werden. Da der Mechanismus der Prozessierung sehr komplex ist, bietet er den nTregs eine Vielzahl an Möglichkeiten in diesen einzugreifen. Was genau während der Inhibierung der Prozessierung passiert, konnte im Verlauf dieser Arbeit nicht geklärt werden und bedarf weiterer Experimente. Vorstellbar wären in diesem Zusammenhang Experimente, die die Aktivität von verschiedenen Proteasen prüfen. Weiter könnte auch eine Veränderung während der Fusion der Phagosomen mit den Lysosomen, die saure Proteasen enthalten, in Betracht gezogen werden. Durch die Fusion verändert sich der pH in diesen Vesikeln, wodurch der Verdau der Proteine

ermöglicht wird. Die Funktionalität der Phagolysosomen kann durch Substanzen, die Ihre Farbe je nach pH-Wert ändern, durchflusszytometrisch oder mikroskopisch untersucht werden.

2.2 Mechanismen der Suppression von BMDC durch nTregs

2.2.1 Zell-Kontakt abhängige Mechanismen der Suppression von BMDC durch nTregs

2.2.1.1 Vermittlung der schnellen Veränderung auf den BMDC durch nTregs

Die Wirkung von nTregs auf BMDC betrifft sowohl die Regulation der kostimulatorischen Oberflächen-Moleküle und die proinflammatorischen Zytokine, als auch die Antigen-Prozessierung und die Möglichkeit der BMDC, T-Zellen zu aktivieren. Wenn diese Zellen im Organismus aufeinander treffen, nimmt dies also starken Einfluss auf die Auslösung adaptiver Immunantworten. Da regulatorische T-Zellen bei vielen Krankheiten ein therapeutisches Potential besitzen können, ist es essentiell, den Mechanismus der nTregs während der Regulation anderer Zellen genauer zu untersuchen, um in diese entsprechend eingreifen zu können. Dementsprechend sollte hier der Mechanismus der Suppression der BMDC durch nTregs genau untersucht werden.

Da die Suppression der BMDC durch nTregs innerhalb kurzer Zeit nachweisbar ist, wurde zunächst nach einem Mechanismus gesucht, der es möglich macht, dass sich das Expressionsmuster auf der Oberfläche der BMDC so schnell verändert. Dazu wurden zwei verschiedene Möglichkeiten in Betracht gezogen. Die Moleküle von der BMDC-Oberfläche könnten einerseits internalisiert, oder von der Oberfläche abgespalten werden. Die Internalisation der Moleküle konnte durch Vergleichsfärbungen der Oberfläche und des Zell-Inneren ausgeschlossen werden (Abb.27). Wenn die Moleküle von der Oberfläche abgespalten werden, könnten an diesem Vorgang Matrix-Metalloproteinasen (MMP) beteiligt sein. Mit einem Inhibitor für MMP-1, -2, -3, -8 und -9 (Zozulya et al., 2007) wurde untersucht, ob die kostimulatorischen Oberflächen-Moleküle auf den BMDC tatsächlich von MMPs abgespalten werden. Es stellte sich heraus, dass sich die Inhibierung dieser MMPs nicht auf die Expression der untersuchten Aktivierungs-Moleküle der BMDC auswirkte. Allerdings stellen die gezeigten Daten nur ein erstes Experiment zur Untersuchung der Wirkung von MMPs

während der Suppression der BMDC durch nTregs dar. Für weitere Experimente sollte zunächst geklärt werden, ob weitere MMPs, die nicht von dem verwendeten Inhibitor beeinflusst werden, von den hier verwendeten Zellen gebildet und sezerniert werden können. Anschließend könnten mit spezifischen Inhibitoren oder auch mit siRNAs die MMPs blockiert werden. Falls die Moleküle von der Oberfläche der BMDC tatsächlich abgespalten werden, könnte das auch mit einem ELISA festgestellt werden. Für freies CD80 etwa ist ein ELISA erhältlich. Es existieren zudem bereits Arbeiten, in denen beschrieben wird, dass APC an der Membran Vesikel abschnüren können, in denen sowohl MHC-Moleküle als auch B7-Moleküle vorhanden sind (Hwang et al., 2003). Auch das Abspalten von Molekülen auf der Oberfläche von APC wurde beschrieben. Hierbei handelte es sich um B7H-Moleküle, die durch proteosomale Spaltung von der Oberfläche von B-Zellen entfernt werden (Logue et al., 2006).

2.2.1.2 Interaktion zwischen BMDC und nTregs

Bei der Untersuchung der Interaktion der beiden Zelltypen stellte sich durch Transwell-Versuche heraus, dass die Inhibierung der BMDC durch nTregs Zell-Kontakt-abhängig ist. So konnte die starke Inhibierung der BMDC durch nTregs durch Rezeptoren auf der Zell-Oberfläche, oder durch Mediatoren, die erst bei Zell-Kontakt frei gesetzt werden, stattfinden. Eine Möglichkeit der Interaktion zwischen Zellen ist Verbindung über Gap Junctions (GJIC, Gap Junction Intercellular Communication). Durch Experimente, in denen die mRNA-Produktion in BMDC und nTregs untersucht wurde, konnte festgestellt werden, dass beide Zellen Konnexine exprimieren und somit eine Kommunikation zwischen den beiden Zelltypen über GJIC prinzipiell möglich ist. Durch Gap Junction-blockierende Substanzen konnte anschließend gezeigt werden, dass durch Unterbindung der Funktion der Gap Junctions die Suppression der BMDC durch nTregs verringert werden konnte. Die Zellen scheinen also tatsächlich über Gap Junctions zu kommunizieren. Diese Experimente werden allerdings durch die Beobachtung limitiert, dass die Gap Junction-blockierenden Substanzen bei längerer Inkubationszeit mit den BMDC deren Aktivierung durch LPS teilweise unterbinden. Auch für BMDC ist demnach der Kontakt der Zellen untereinander wichtig für eine vollständige Aktivierung. Dies wurde auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt (Matsue et al., 2006). In Experimenten zur Aufhebung der Suppression der BMDC durch nTregs überlagern

sich also die Effekte der verringerten Aktivierung der BMDC durch die Blockade der BMDC-BMDC Interaktion mit eventuell auftretenden Effekten der BMDC-nTreg Interaktion. Um die Wechselwirkung zwischen BMDC und nTregs nachzuweisen, musste die Funktionalität der Gap Junctions zwischen den Zellen in einem weiteren experimentellen Ansatz überprüft werden. Dafür wurde ein Gap Junction-gängiger Farbstoff (Calcein) verwendet. Mit Calcein konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Kanäle zwischen BMDC und nTregs funktional sind, da eine Übertragung von Calcein von nTregs auf die BMDC detektiert werden konnte. Somit konnte gezeigt werden, dass nTregs und BMDC über Gap Junctions kommunizieren und dass diese Kommunikation direkt mit der Inhibierung der BMDC durch die nTregs zusammen hängt. Die Kommunikation über Gap Junctions ist im Organismus weit verbreitet. Unter anderem wurde die Reizweiterleitung in Herzzellen und Nervenzellen auf Gap Junctions zurück geführt. Auch die Zellen der Haut nutzen diese Kanäle, um mit den Nachbarzellen in Kontakt zu treten. Dass Gap Junctions auch von Zellen, die nicht im Gewebeverband existieren benutzt werden, wie hier die BMDC und nTregs, ist relativ neu und eröffnet für die Beeinflussung von Immunantworten ganz neue Möglichkeiten. Durch die entsprechende Expression von Konnexinen könnten alle Zellen des Immunsystems miteinander interagieren und sich während der Aktivierung eventuell gegenseitig unterstützen. Dies könnte sowohl in den sekundären lymphatischen Organen bei einem T-Zell-Priming, als auch im Organismus am Ort einer lokalen Entzündung von Bedeutung sein. So könnten über die Interaktion durch Gap Junctions kleine Moleküle wie cAMP über den ganzen Körper verteilt werden und damit zum Beispiel die nTreg-vermittelte Suppression an dritte Zellen weiterleiten. Auch für die Crosspräsentation kann eine Übertragung von Peptiden über Gap Junctions interessant sein (Neijssen et al., 2007).

Natürlich stellt sich hier die Frage, ob die Verbindung über Gap Junctions zwischen BMDC und nTregs auch im lebenden Tier nachgewiesen werden kann. Hierfür wurden bereits einige Vorexperimente (nicht gezeigt) durchgeführt, bei denen Calcein gefärbte regulatorische T-Zellen mit CFA (complete Freund's adjuvant) subkutan in Mäuse injiziert wurden (Ohr oder Fuß). Die Zellen wandern dann zum drainierenden Lymphknoten. Einige Stunden zuvor wurden den Mäusen dendritische Zellen, die anhand eines spezifischen Markers wieder gefunden werden können, intravenös injiziert. Diese sollten ebenfalls in die Lymphknoten wandern und dort mit den eintreffenden gefärbten nTregs interagieren. Anschließend sollten die BMDC

wieder aus den Lymphknoten isoliert werden, um zu überprüfen, ob ein Farbaustausch stattgefunden hat. In den ersten Experimenten konnten die injizierten DC allerdings nicht wieder isoliert werden. Der Experiment-Aufbau muss hier noch weiter verfeinert werden und soll dann fortgesetzt werden. In diesem Zusammenhang wäre es zudem interessant zu überprüfen, wo im Körper die Kommunikation zwischen dendritischen Zellen und regulatorischen T-Zellen stattfindet.

2.2.1.3 Wirkung von zyklischem Adenosin-Monophosphat (cAMP) während der Suppression von BMDC durch nTregs

Nachdem gezeigt werden konnte, dass BMDC mit nTregs über Gap Junctions interagieren können, stellte sich die Frage, welche Moleküle über diese Kanäle übertragen werden könnten. Zu diesen zählen vor allem Ionen wie Kalzium, aber auch kleine sekundäre Messenger-Moleküle wie cGMP oder cAMP. Da bereits Arbeiten vorlagen, in denen gezeigt werden konnte, dass cAMP eine entscheidende Rolle bei der Suppression von CD4 positiven T-Zellen durch nTregs spielt (Bopp et al., 2007), rückte dieses sekundäre Messenger-Moleküle auch hier in den Mittelpunkt. Durch einen ELISA konnte die cAMP-Menge in BMDC vor und nach Kokultur mit nTregs bestimmt werden (Abb.38). Diese Daten zeigen, dass sich nach der Kokultur mit nTregs eine große Menge cAMP in den BMDC nachweisen lässt. Daraus konnte allerdings noch nicht geschlossen werden, dass das cAMP von den nTregs übertragen wurde. Eine Erhöhung des cAMP-Spiegels könnte auch durch die Aktivierung von Adenylat-Zyklasten oder einen weiteren Mechanismus in den BMDC verursacht werden. Durch Experimente mit Substanzen, die Adenylat-Zyklasten hemmen, konnte gezeigt werden, dass die BMDC das cAMP, das nach dem Kontakt mit nTregs in den Zellen nachweisbar war, nicht selbst herstellen (Abb.42). Trotz der Inhibierung der Adenylat-Zyklasten zeigten die BMDC in Gegenwart der nTregs einen stark supprimierten Phänotyp. Bei einer Produktion von cAMP innerhalb der BMDC wäre die Suppression durch die Inhibierung der Adenylat-Zyklasten verringert. Das bedeutet, die cAMP-Quelle befindet sich außerhalb der BMDC. Interessant wären in diesem Zusammenhang Experimente, in denen BMDC mit einem Adenylat-Zyklase-Inhibitor vorbehandelt, dann mit nTregs kultiviert und anschließend wieder separiert werden, um den cAMP-Gehalt in den BMDC zu bestimmen. Dieses sollte sich nicht von den Proben unterscheiden, in denen BMDC und nTregs zusammen ohne Adenylat-Zyklase-Inhibitor kultiviert wurden. Da das cAMP wahrscheinlich über Gap

Junctions von nTregs auf BMDC übertragen wird, sollten zudem weitere Experimente mit den Gap Junction-blockierenden Substanzen erfolgen, wobei auch hier die BMDC nach der Inkubation mit nTregs und Gap Junction-blockierender Substanz separiert und auf den Gehalt von cAMP untersucht werden sollten. Im Zusammenhang mit der Produktion von cAMP in nTregs soll hier noch erwähnt werden, dass es nicht möglich war, in den nTregs die Adenylat-Zyklasen zu inhibieren, um zu überprüfen, ob das inhibitorische Potential dieser Zellen so verringert werden kann. Durch den Zusatz von Adenylat-Zyklase-Inhibitoren wurden die nTregs sofort apoptotisch. Das lässt darauf schließen, dass die Produktion von cAMP und der hohe cAMP-Gehalt in den nTregs sowohl während der Inhibierung der Zielzellen eingesetzt, als auch für die eigene Vitalität benötigt wird.

Um zu untersuchen, welchen Anteil cAMP an der Suppression der BMDC hat, wurden Experimente mit Dibutyryl-cAMP und Prostaglandin E2 durchgeführt. Für beide Substanzen wurde bereits eine immunsupprimierende Wirkung beschrieben (Harizi et al., 2003). Mit diesen Substanzen konnten im Rahmen dieser Arbeit ähnliche Effekte wie durch nTregs während der BMDC-Aktivierung induziert werden (Abb.39, 40). Es wurde also davon ausgegangen, dass der erhöhte cAMP-Spiegel in den BMDC nach Kokultur mit nTregs von den nTregs stammt und seine inhibitorische Wirkung anschließend in den BMDC entfaltet. Um diese Wirkung aufzuheben wurde ein spezifischer cAMP-Antagonist (RpcAMPS) verwendet, der das cAMP-Signal in den BMDC unterbindet. Mit diesem konnte das Oberflächen-Profil der BMDC nach LPS-Aktivierung in Anwesenheit der nTregs partiell wieder hergestellt werden (Abb.44). Dieser Effekt war allerdings nur nach kurzen Inkubationszeiten von BMDC und nTregs mit RpcAMPS gegeben. Wurden die BMDC länger mit nTregs kultiviert, konnte RpcAMPS die Suppression der BMDC-Aktivierung nicht aufheben. Um den Effekt von RpcAMPS zu bestätigen, wurden sowohl die Antigen-Prozessierung als auch das Potential zur T-Zell-Aktivierung von BMDC nach einer Kokultur mit nTregs und RpcAMPS untersucht. Es zeigte sich, dass diese beiden Aspekte, die für die Auslösung einer adaptiven Immunantwort essentiell sind, nicht durch die Inhibierung des cAMP-Signals wieder hergestellt werden konnten. Der Effekt der durch cAMP vermittelt wird, ist demnach auf einen kurzen Zeitraum direkt nach Kontakt zwischen BMDC und nTregs begrenzt. cAMP könnte ein Mediator sein, der eine sofortige Inhibierung der BMDC umsetzt, da dieses Molekül schon vor Beginn der Experimente in den hier verwendeten, voraktivierten nTregs vorhanden ist.

Gleichzeitig bedeutet das aber auch, dass cAMP nicht allein die vollständige Suppression der nTregs umsetzen kann. Während der direkten Wirkung der nTregs auf die BMDC können nicht alle veränderten Aspekte der BMDC-Aktivierung auf cAMP zurück geführt werden und die Veränderung der BMDC nach längerer Kokultur mit nTregs können durch cAMP überhaupt nicht erklärt werden. Dementsprechend müssen noch weitere Moleküle an der Suppression der BMDC beteiligt sein.

Eine Vielzahl an Rezeptoren und Molekülen wurde in den letzten Jahren auf und in nTregs beschrieben, denen eine inhibitorische Wirkung zugeschrieben wird. Zu ihnen zählen Mitglieder der TNF-Rezeptor-Familie wie GITR (Glucocorticoid-induced Tumor necrosis factor Receptor) (Shimizu et al., 2002) oder Ox40 (CD134) (Takeda et al., 2004). Weiter ist im Zusammenhang mit nTregs und deren supprimierenden Eigenschaften CTLA-4 (CTL Activation associated protein-4, CD152) zu nennen (Read et al., 2000). Auch Chemokine und deren Rezeptoren werden auf und in nTregs exprimiert. Nennenswert sind die Chemokin-Rezeptoren CCR2, 4, 5, 6, 7 und 8 (Yi et al., 2006) (Luther and Cyster, 2001). Die Rolle von TGF- β wird bei der Suppression von nTregs immer wieder kontrovers diskutiert (Nakamura et al., 2001), (Piccirillo et al., 2002). Regulatorische T-Zellen bilden große Mengen an TGF- β , dass sie sowohl auf der Oberfläche als gebundenes, als auch als sezerniertes Molekül exprimieren. Weitere beschriebene Moleküle wie LAG (Lymphocyte Activation Gene-3) (Huang et al., 2004) könnten in die Suppression von BMDC durch nTregs involviert sein. Viele der beschriebenen Moleküle sind auf nTregs induzierbar oder werden dauerhaft auf bzw. in diesen exprimiert. Jedes einzelne besitzt inhibitorisches Potential und könnte an der Suppression von BMDC durch nTregs beteiligt sein. Eine nähere Untersuchung der einzelnen Moleküle war in dieser Arbeit allerdings nicht möglich. Durch die Identifizierung möglichst vieler Moleküle und Rezeptoren, die auf und in regulatorischen T-Zellen vorkommen, könnte die Funktion dieser Zellen besser verstanden und eventuell kontrolliert werden. Da diese Zellart in Verlauf von vielen Krankheiten eine wichtige Rolle spielt, kann ein besseres Verständnis von regulatorischen T-Zellen zu verbesserten Therapie-Möglichkeiten führen.

2.2.2 Lösliche Faktoren in der Suppression von BMDC durch nTregs

2.2.2.1 Die Wirkung von IL-10 während der Suppression von BMDC durch nTregs

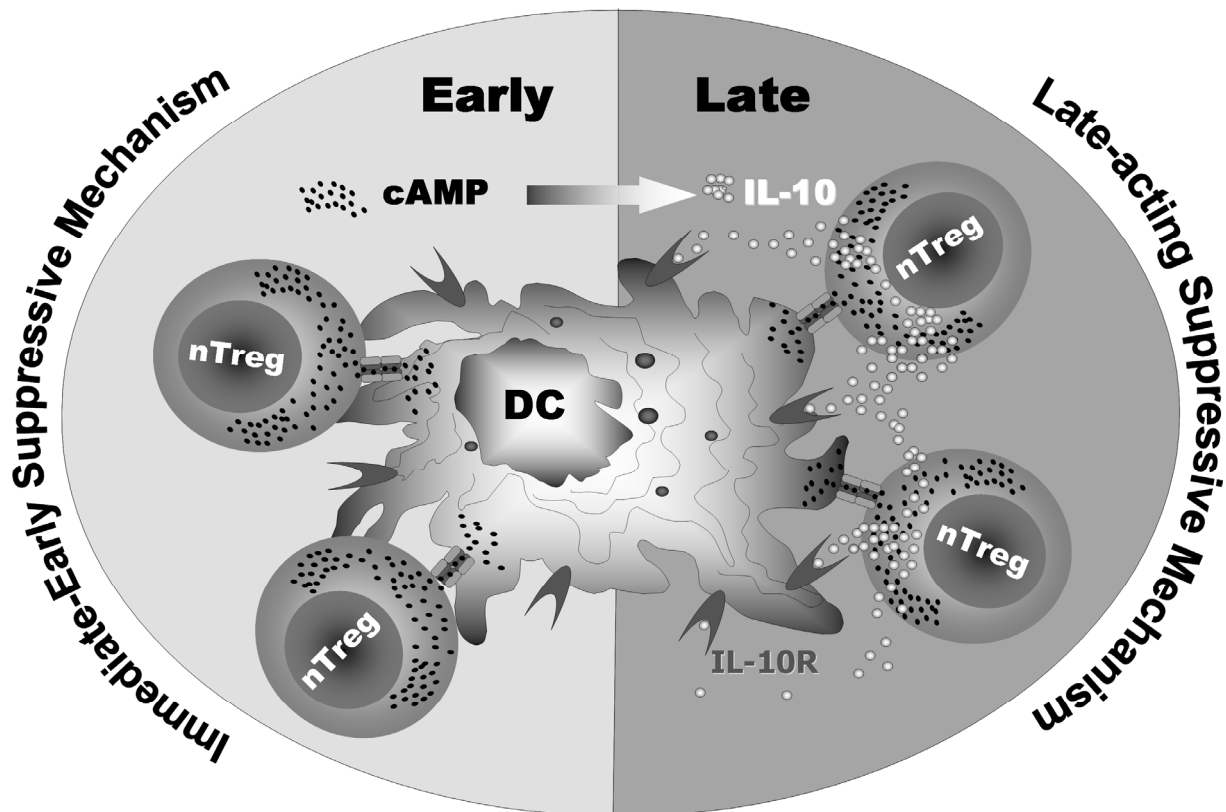
Es konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die direkte Wirkung von nTregs auf BMDC teilweise auf der Wirkung von cAMP beruht. Darüber hinaus musste nach einem weiteren inhibitorischen Molekül gesucht werden, dass die Wirkung der nTregs auf die BMDC auch nach einer längeren Kokultur noch vermittelt. Im Zusammenhang mit der Wirkung von regulatorischen T-Zellen wird häufig auf die Produktion von IL-10 verwiesen (ASSEMAN et al., 2000). Da IL-10 sehr starke antiinflammatorische Eigenschaften hat wurde es als mögliches weiteres Molekül genauer betrachtet, das bei der Suppression der BMDC beteiligt sein könnte. Dies wurde im letzten Teil der Arbeit untersucht.

Die Vermutung, dass IL-10 während der Suppression von BMDC durch nTregs eine Rolle spielt wurde zunächst mit einem IL-10-ELISA in den Kokultur-Überständen überprüft. Da in diesem Test eine große Menge IL-10 detektiert wurde, stellte sich die Frage, welche Zellen in der Kokultur aus BMDC und nTregs das IL-10 sezernierten. Mithilfe von IL-10 knock out Zellen konnte gezeigt werden, dass die nTregs in der Kokultur den größten Teil an IL-10 produzieren (Abb.50). Dies konnte auch in Einzelkulturen bestätigt werden, in denen nTregs und BMDC getrennt voneinander aktiviert wurden (Abb.51). Das bedeutet, dass für den Mechanismus der nTreg-vermittelten Suppression, zusätzlich zu einer Zell-Kontakt abhängigen Wirkweise durch Gap Junctions und cAMP, auch ein Mediator produziert wird, der Zell-Kontakt unabhängig eine Rolle bei der Suppression spielen kann. Das passt insofern in die Arbeits-Hypothese, da die Wirkung von cAMP zeitlich auf eine direkte Wirkung begrenzt ist und IL-10 in dieser direkten Zeitspanne noch nicht produziert wird. Daher ist zu vermuten, dass es sich bei der nTreg-vermittelten Suppression um einen biphasischen Mechanismus handelt.

Um die Wirkweise von IL-10 während der Suppression von BMDC weiter zu verifizieren, wurden Experimente mit einem Antikörper durchgeführt, der den Rezeptor, an den IL-10 bindet, blockiert. Durch diesen konnte das Aktivierungs-Profil der DC nach längerer Kokultur mit nTregs komplett wieder hergestellt und somit die supprimierende Wirkung der nTregs aufgehoben werden (Abb.54). Die BMDC waren zudem auch wieder in der Lage in einer sekundären Kultur T-Zellen zu aktivieren

(Abb.55). Diese Daten konnten mit Experimenten bestätigt werden, in denen die nTregs für die erste Kultur aus IL-10 knock out Mäusen stammten (Abb.59). So konnte IL-10 als wichtiger Mediator der nTregs während der späten Phase der Suppression von BMDC identifiziert werden. Durch die fehlende Expression von IL-10 konnten sowohl die Produktion der proinflammatorischen Zytokine und die Expression der kostimulatorischen Oberflächen-Moleküle, als auch die Fähigkeit T-Zellen zu aktivieren, trotz der Anwesenheit der nTregs wieder hergestellt werden. Durch die Experimente mit dem blockierenden IL-10 Rezeptor Antikörper und mit den IL-10 knock out nTregs konnte die Arbeits-Hypothese des biphasischen Wirk-Mechanismus bestätigt werden. Wurde in einer 4-stündigen Kokultur aus BMDC und nTregs der IL-10 Rezeptor blockiert, waren die BMDC wie in den Experimenten ohne den α -IL-10R-Antikörper supprimiert und konnten auch in einer zweiten Kultur keine T-Zellen aktivieren. Gleiches konnte mit IL-10 knock out nTregs festgestellt werden. Eine Auffälligkeit in den Experimenten mit den IL-10 knock out nTregs zeigte sich nach der Kokultur mit BMDC nach 4 Stunden. Die Expression der B7H-Moleküle auf den BMDC war hier noch weiter erhöht, im Vergleich zur Kultur mit Wildtyp nTregs (Abb.55). Dies könnte darauf hindeuten, dass die IL-10 ko nTregs aufgrund des Fehlens von IL-10 ein anderes inhibitorisches Merkmal verstärken. Ein Beispiel hierfür könnte die erhöhte Produktion von cAMP sein oder eine Verstärkung der Expression der Konnexine. Bereits beschrieben in IL-10 knock out Mäusen ist die Erhöhung von einigen Chemokinen in verschiedenen Geweben (Sheil et al., 2006). Ob diese allerdings von regulatorischen T-Zellen gebildet werden, ist noch nicht beschrieben. Falls sich im Zusammenhang mit der frühen Phase der Suppression außer cAMP ein weiteres Molekül bestimmen lässt, sollte auch dieses in IL-10 knock out nTregs untersucht werden. Unabhängig von weiteren Molekülen, die im Rahmen der nTreg-vermittelten Suppression ermittelt werden können, sollten die nTregs der IL-10 knock out Mäuse einer genauen Charakterisierung unterzogen werden. So könnte festgestellt werden, ob diese Zellen das Fehlen von IL-10 mit der verstärkten Expression eines anderen Faktors ausgleichen.

Zusammenfassung Teil2



Übersicht Ergebnisse, Quelle: Tobias Bopp

Abschließend lässt sich davon ausgehen, dass die Wirkung von nTregs auf BMDC, die dazu führt, dass diese Zellen ihre natürlichen Aufgaben der Antigen-Präsentation und der T-Zell-Aktivierung nicht mehr ausfüllen können, auf einem Mechanismus beruht, der sich aus mehreren Faktoren zusammensetzt. Für die direkte Wirkung ist es notwendig, dass die beiden Zellarten Zell-Kontakt herstellen können. Dieser erfolgt über Gap Junction Intercellular Communication. Als ein Molekül, welches durch den Kontakt beider Zellen übertragen werden und damit seine Wirkung sofort vermitteln kann, konnte cAMP identifiziert werden. Dieses kann allerdings nicht allein für die direkte Suppression der BMDC durch die nTregs verantwortlich sein. In diesem Zusammenhang müssen weitere Moleküle bzw. Rezeptoren untersucht werden. Für die spätere Wirkung der nTregs auf BMDC konnte IL-10 als Mediator bestimmt werden. Dabei ist es wahrscheinlich, dass IL-10 eine wichtige Rolle während der Spät-Wirkung der nTregs spielt. Eine genauere Untersuchung der IL-10 knock out Tregs sollte noch erfolgen, um das inhibitorische Potential dieser Zellen genau einschätzen zu können.

Referenz-Liste

Akiba,H, Y Miyahira, M Atsuta, K Takeda, C Nohara, T Futagawa, H Matsuda, T Aoki, H Yagita, K Okumura, 2000, Critical Contribution of OX40 Ligand to T Helper Cell Type 2 Differentiation in Experimental Leishmaniasis: *The Journal of Experimental Medicine*, v. 191, p. 375-380.
Ref ID: 56

Akira,S, K Takeda, T Kaisho, 2001, Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity: *Nat Immunol*, v. 2, p. 675-680.
Ref ID: 1

ASSEMAN,CHRY, S A N N FOWLER, F I O N POWRIE, 2000, Control of Experimental Inflammatory Bowel Disease by Regulatory T cells: *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 162, p. 185S-189.
Ref ID: 30

Banchereau,J, R M Steinman, 1998, Dendritic cells and the control of immunity: *Nature*, v. 392, p. 245.
Ref ID: 8

Basu,S, P K Srivastava, 2003, Fever-like temperature induces maturation of dendritic cells through induction of hsp90: *International Immunology*, v. 15, p. 1053-1061.
Ref ID: 73

Bermudez-Fajardo,A, M Yliharsila, W H Evans, A C Newby, E Oviedo-Orta, 2007, CD4+ T lymphocyte subsets express connexin 43 and establish gap junction channel communication with macrophages in vitro: *Journal of Leukocyte Biology*, v. 82, p. 608-612.
Ref ID: 81

Bierer,BE, S J Burakoff, 1988, T cell adhesion molecules: *The FASEB Journal*, v. 2, p. 2584-2590.
Ref ID: 32

Bohnenkamp,HR, K T Papazisis, J M Burchell, J Taylor-Papadimitriou, 2007, Synergism of Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by monocyte-derived dendritic cells is mediated through p38 MAPK and lowers the threshold of T-helper cell type 1 responses: *Cellular Immunology*, v. 247, p. 72-84.
Ref ID: 84

Bopp,T, C Becker, M Klein, S Klein-Hessling, A Palmetshofer, E Serfling, V Heib, M Becker, J Kubach, S Schmitt, S Stoll, H Schild, M S Staeger, M Stassen, H Jonuleit, E Schmitt, 2007, Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell mediated suppression: *The Journal of Experimental Medicine*, v. 204, p. 1303-1310.
Ref ID: 78

Bowie,A, L A O'Neill, 2000, The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products: *Journal of Leukocyte Biology*, v. 67, p. 508-514.
Ref ID: 52

Brennan,P, S Saouaf, M Greene, Y Shen, 2003, Anergy and suppression as coexistent mechanisms for the maintenance of peripheral T cell tolerance: *Immunologic Research*, v. 27, p. 295-302.
Ref ID: 19

Brunet,JF, F Denizot, M F Luciani, M Roux-Dosseto, M Suzan, M G Mattei, P Golstein, 1987, A new member of the immunoglobulin superfamily[mdash]CTLA-4: *Nature*, v. 328, p. 267-270.
Ref ID: 36

Bukauskas,FF, A Bukauskiene, M V L Bennett, V K Verselis, 2001, Gating Properties of Gap Junction Channels Assembled from Connexin43 and Connexin43 Fused with Green Fluorescent Protein: *Biophysical Journal*, v. 81, p. 137-152.
Ref ID: 117

Canadien,V, T Tan, R Zilber, J Szeto, A J Perrin, J H Brumell, 2005, Cutting Edge: Microbial Products Elicit Formation of Dendritic Cell Aggresome-Like Induced Structures in Macrophages: *The Journal of Immunology*, v. 174, p. 2471-2475.

Ref ID: 41

Castro,AG, M Neighbors, S D Hurst, F Zonin, R A Silva, E Murphy, Y J Liu, A O'Garra, 2000, Anti-interleukin 10 receptor monoclonal antibody is an adjuvant for T helper cell type 1 responses to soluble antigen only in the presence of lipopolysaccharide: *The Journal of Experimental Medicine*, v. 192, p. 1529-1534.

Ref ID: 129

Cella,M, D Scheidegger, K Palmer-Lehmann, P Lane, A Lanzavecchia, G Alber, 1996, 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: *The Journal of Experimental Medicine*, v. 184, p. 747-752.

Ref ID: 34

Cheung,PCF, A R Nebreda, P Cohen, 2004, TAB3, a new binding partner of the protein kinase TAK1: *Biochemical Journal*, v. 378, p. 27-34.

Ref ID: 60

Ciofani,M, J C Zuniga-Pflucker, 2007, The Thymus as an Inductive Site for T Lymphopoiesis: *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 23, p. 463-493.

Ref ID: 17

Connell,P, C A Ballinger, J Jiang, Y Wu, L J Thompson, J Hohfeld, C Patterson, 2001, The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins: *Nat Cell Biol*, v. 3, p. 93-96.

Ref ID: 72

DeFillipo,AM, J Dai, Z Li, 2004, Heat shock-induced dendritic cell maturation is coupled by transient aggregation of ubiquitinated proteins independently of heat shock factor 1 or inducible heat shock protein 70: *Molecular Immunology*, v. 41, p. 785-792.

Ref ID: 44

Deng,L, C Wang, E Spencer, L Yang, A Braun, J You, C Slaughter, C Pickart, Z J Chen, 2000, Activation of the I[κ]B Kinase Complex by TRAF6 Requires a Dimeric Ubiquitin-Conjugating Enzyme Complex and a Unique Polyubiquitin Chain: *Cell*, v. 103, p. 351-361.

Ref ID: 61

Doherty,DG, J E Penzotti, D M Koelle, W W Kwok, T P Lybrand, S Masewicz, G T Nepom, 1998, Structural Basis of Specificity and Degeneracy of T Cell Recognition: Pluriallelic Restriction of T Cell Responses to a Peptide Antigen Involves Both Specific and Promiscuous Interactions Between the T Cell Receptor, Peptide, and HLA-DR: *The Journal of Immunology*, v. 161, p. 3527-3535.

Ref ID: 18

Duperrier,K, F W Velten, J Bohlender, A Demory, P Metharom, S Goerdts, 2005, Immunosuppressive agents mediate reduced allostimulatory properties of myeloid-derived dendritic cells despite induction of divergent molecular phenotypes: *Molecular Immunology*, v. 42, p. 1531-1540.

Ref ID: 76

Eppig,JJ, F L Pendola, K Wigglesworth, J K Pendola, 2005, Mouse Oocytes Regulate Metabolic Cooperativity Between Granulosa Cells and Oocytes: Amino Acid Transport: *Biology of Reproduction*, v. 73, p. 351-357.

Ref ID: 113

Figiel,M, C Allritz, C Lehmann, J Engele, 2007, Gap junctional control of glial glutamate transporter expression: *Molecular and Cellular Neuroscience*, v. 35, p. 130-137.

Ref ID: 118

Galgani,M, V De Rosa, S De Simone, A Leonardi, U D'Oro, G Napolitani, A M Masci, S Zappacosta, L Racioppi, 2004, Cyclic AMP Modulates the Functional Plasticity of Immature Dendritic Cells by Inhibiting Src-like Kinases through Protein Kinase A-mediated Signaling: *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, p. 32507-32514.
Ref ID: 122

Gay,NJ, L C Packman, M A Weldon, J C J Barna, 1991, A leucine-rich repeat peptide derived from the *Drosophila* Toll receptor forms extended filaments with a [beta]-sheet structure: *FEBS Letters*, v. 291, p. 87-91.
Ref ID: 51

Geijtenbeek,TBH, D J E B Krooshoop, D A Bleijs, S J van Vliet, G C F van Duijnhoven, V Grabovsky, R Alon, C G Figdor, Y van Kooyk, 2000, DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking: *Nat Immunol*, v. 1, p. 353-357.
Ref ID: 33

Gershon,RK, K Kondo, 1970, Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes: *Immunology*, v. 18, p. 723-737.
Ref ID: 88

Gershon,RK, K Kondo, 1971, Infectious immunological tolerance: *Immunology*, v. 21, p. 903-914.
Ref ID: 89

GHOSH,AK, 2003, Regulation by Prostaglandin E2 and Histamine of Angiogenesis in Inflammatory Granulation Tissue: *YAKUGAKU ZASSHI*, v. 123, p. 295-303.
Ref ID: 125

Grakoui,A, S K Bromley, C Sumen, M M Davis, A S Shaw, P M Allen, M L Dustin, 1999, The Immunological Synapse: A Molecular Machine Controlling T Cell Activation: *Science*, v. 285, p. 221-227.
Ref ID: 38

Guermontez,P, J Valladeau, L Zitvogel, C Thery, S Amigorena, 2002, ANTIGEN PRESENTATION AND T CELL STIMULATION BY DENDRITIC CELLS: *Annual Review of Immunology*, v. 20, p. 621-667.
Ref ID: 7

Hackstein,H, T Taner, A J Logar, A W Thomson, 2002, Rapamycin inhibits macropinocytosis and mannose receptor-mediated endocytosis by bone marrow-derived dendritic cells: *Blood*, v. 100, p. 1084-1087.
Ref ID: 75

Harizi,H, C Grosset, N Gualde, 2003, Prostaglandin E2 modulates dendritic cell function via EP2 and EP4 receptor subtypes: *Journal of Leukocyte Biology*, v. 73, p. 756-763.
Ref ID: 90

Herter,S, P Osterloh, N Hilf, G Rechtsteiner, J Hohfeld, H G Rammensee, H Schild, 2005, Dendritic Cell Aggresome-Like-Induced Structure Formation and Delayed Antigen Presentation Coincide in Influenza Virus-Infected Dendritic Cells: *The Journal of Immunology*, v. 175, p. 891-898.
Ref ID: 40

Heystek,HC, A C Thierry, P Soulard, C Moulon, 2003, Phosphodiesterase 4 inhibitors reduce human dendritic cell inflammatory cytokine production and Th1-polarizing capacity: *International Immunology*, v. 15, p. 827-835.
Ref ID: 105

Huang,CT, C J Workman, D Flies, X Pan, A L Marson, G Zhou, E L Hipkiss, S Ravi, J Kowalski, H I Levitsky, J D Powell, D M Pardoll, C G Drake, D A A Vignali, 2004, Role of LAG-3 in Regulatory T Cells: *Immunity*, v. 21, p. 503-513.
Ref ID: 93

Hunter,CA, 2005, New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions: *Nat Rev Immunol*, v. 5, p. 521-531.

Ref ID: 102

Hwang,I, X Shen, J Sprent, 2003, Direct stimulation of na+»ve T cells by membrane vesicles from antigen-presenting cells: Distinct roles for CD54 and B7 molecules: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, p. 6670-6675.

Ref ID: 133

Ilvesaro,J, P Tavi, J Tuukkanen, 2001, Connexin-mimetic peptide Gap 27 decreases osteoclastic activity: *BMC Musculoskeletal Disorders*, v. 2, p. 10.

Ref ID: 116

Ivanov,II, B S McKenzie, L Zhou, C E Tadokoro, A Lepelley, J J Lafaille, D J Cua, D R Littman, 2006, The Orphan Nuclear Receptor ROR[gamma]t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells: *Cell*, v. 126, p. 1121-1133.

Ref ID: 101

Janeway,CA, R Medzhitov, 2002, INNATE IMMUNE RECOGNITION: *Annual Review of Immunology*, v. 20, p. 197-216.

Ref ID: 100

Jarnicki,AG, H Conroy, C Brereton, G Donnelly, D Toomey, K Walsh, C Sweeney, O Leavy, J Fletcher, E C Lavelle, P Dunne, K H G Mills, 2008, Attenuating Regulatory T Cell Induction by TLR Agonists through Inhibition of p38 MAPK Signaling in Dendritic Cells Enhances Their Efficacy as Vaccine Adjuvants and Cancer Immunotherapeutics: *The Journal of Immunology*, v. 180, p. 3797-3806.

Ref ID: 139

Juul,MH, E Rivedal, T Stokke, T Sanner, 2000, Quantitative determination of gap junction intercellular communication using flow cytometric measurement of fluorescent dye transfer: *Cell Adhes.Commun.*, v. 7, p. 501-512.

Ref ID: 120

Kaisho,T, S Akira, 2001, Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice: *Trends in Immunology*, v. 22, p. 78-83.

Ref ID: 50

Kambayashi,T, R P A Wallin, H G Ljunggren, 2001, cAMP-elevating agents suppress dendritic cell function: *Journal of Leukocyte Biology*, v. 70, p. 903-910.

Ref ID: 124

Kanaporis,G, G Mese, L Valiuniene, T W White, P R Brink, V Valiunas, 2008, Gap Junction Channels Exhibit Connexin-specific Permeability to Cyclic Nucleotides: *The Journal of General Physiology*, v. 131, p. 293-305.

Ref ID: 114

Kato,H, O Takeuchi, S Sato, M Yoneyama, M Yamamoto, K Matsui, S Uematsu, A Jung, T Kawai, K J Ishii, O Yamaguchi, K Otsu, T Tsujimura, C S Koh, C Reis e Sousa, Y Matsuura, T Fujita, S Akira, 2006, Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses: *Nature*, v. 441, p. 101-105.

Ref ID: 55

Kawagoe,T, S Sato, K Matsushita, H Kato, K Matsui, Y Kumagai, T Saitoh, T Kawai, O Takeuchi, S Akira, 2008, Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2: *Nat Immunol*, v. 9, p. 684-691.

Ref ID: 59

Kurotaki,T, Y Tamura, G Ueda, J Oura, G Kutomi, Y Hirohashi, H Sahara, T Torigoe, H Hiratsuka, H Sunakawa, K Hirata, N Sato, 2007, Efficient Cross-Presentation by Heat Shock Protein 90-Peptide

Complex-Loaded Dendritic Cells via an Endosomal Pathway: *The Journal of Immunology*, v. 179, p. 1803-1813.
Ref ID: 95

Kühn,R, J Löhler, D Rennick, K Rajewsky, W Müller, 1993, Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis: *Cell*, v. 75, p. 263-274.
Ref ID: 87

Laird,DW, 2006, Life cycle of connexins in health and disease: *Biochemical Journal*, v. 394, p. 527-543.
Ref ID: 112

Lane,NJ, L S Swales, 1979, Intercellular junctions and the development of the blood-brain barrier in *Manduca sexta*: *Brain Research*, v. 168, p. 227-245.
Ref ID: 115

Lane,PJL, F M McConnell, 2001, Dendritic cell subsets and costimulation for effector T-cell responses: *Current Opinion in Pharmacology*, v. 1, p. 409-416.
Ref ID: 35

Lelouard,H, V Ferrand, D Marguet, J Bania, V Camosseto, A David, E Gatti, P Pierre, 2004, Dendritic cell aggresome-like induced structures are dedicated areas for ubiquitination and storage of newly synthesized defective proteins: *The Journal of Cell Biology*, v. 164, p. 667-675.
Ref ID: 42

Lelouard,H, E Gatti, F Cappello, O Gresser, V Camosseto, P Pierre, 2002, Transient aggregation of ubiquitinated proteins during dendritic cell maturation: *Nature*, v. 417, p. 177-182.
Ref ID: 43

Lelouard,H, E K Schmidt, V Camosseto, G Clavarino, M Ceppi, H T Hsu, P Pierre, 2007, Regulation of translation is required for dendritic cell function and survival during activation: *The Journal of Cell Biology*, v. 179, p. 1427-1439.
Ref ID: 77

Lemaitre,B, E Nicolas, L Michaut, J M Reichhart, J A Hoffmann, 1996, The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle/Toll/cactus* Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults: *Cell*, v. 86, p. 973-983.
Ref ID: 53

Lin,C, R E Holland, J C Donofrio, M H McCoy, L R Tudor, T M Chambers, 2002, Caspase activation in equine influenza virus induced apoptotic cell death: *Veterinary Microbiology*, v. 84, p. 357-365.
Ref ID: 83

Liston,A, A Y Rudensky, 2007, Thymic development and peripheral homeostasis of regulatory T cells: *Curr.Opin.Immunol*, v. 19, p. 176-185.
Ref ID: 138

Logue,EC, S Bakkour, M M Murphy, H Nolla, W C Sha, 2006, ICOS-Induced B7h Shedding on B Cells Is Inhibited by TLR7/8 and TLR9: *The Journal of Immunology*, v. 177, p. 2356-2364.
Ref ID: 134

Luther,SA, J G Cyster, 2001, Chemokines as regulators of T cell differentiation: *Nat.Immunol*, v. 2, p. 102-107.
Ref ID: 98

Mahnke,K, S Ring, T S Johnson, S Schallenberg, K Schonfeld, V Storn, T Bedke, A H Enk, 2007a, Induction of immunosuppressive functions of dendritic cells in vivo by CD4+CD25+ regulatory T cells: role of B7-H3 expression and antigen presentation: *Eur.J Immunol*, v. 37, p. 2117-2126.
Ref ID: 106

Mahnke,K, T S Johnson, S Ring, A H Enk, 2007b, Tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells: A two-way relationship: *Journal of Dermatological Science*, v. 46, p. 159-167.
Ref ID: 31

Matsue,H, J Yao, K Matsue, A Nagasaka, H Sugiyama, R Aoki, M Kitamura, S Shimada, 2006, Gap Junction-Mediated Intercellular Communication between Dendritic Cells (DCs) Is Required for Effective Activation of DCs: *The Journal of Immunology*, v. 176, p. 181-190.
Ref ID: 39

McHugh,RS, M J Whitters, C A Piccirillo, D A Young, E M Shevach, M Collins, M C Byrne, 2002, CD4+CD25+ Immunoregulatory T Cells: Gene Expression Analysis Reveals a Functional Role for the Glucocorticoid-Induced TNF Receptor: *Immunity*, v. 16, p. 311-323.
Ref ID: 20

Medzhitov,R, P Preston-Hurlburt, C A Janeway, 1997, A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity: *Nature*, v. 388, p. 394-397.
Ref ID: 49

Mellman,I, R M Steinman, 2001, Dendritic Cells: Specialized and Regulated Antigen Processing Machines: *Cell*, v. 106, p. 255-258.
Ref ID: 68

Moller,G, 1988, Do Suppressor T Cells Exist?: *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 27, p. 247-250.
Ref ID: 23

Moore,KW, M R de Waal, R L Coffman, A O'Garra, 2001, Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor: *Annu.Rev.Immunol.*, v. 19, p. 683-765.
Ref ID: 127

Moore,KW, A O'Garra, M R de Waal, P Vieira, T R Mosmann, 1993, Interleukin-10: *Annu.Rev.Immunol.*, v. 11, p. 165-190.
Ref ID: 126

Morice,WG, G J Brunn, G Wiederrecht, J J Siekierka, R T Abraham, 1993, Rapamycin-induced inhibition of p34cdc2 kinase activation is associated with G1/S-phase growth arrest in T lymphocytes: *Journal of Biological Chemistry*, v. 268, p. 3734-3738.
Ref ID: 74

Murphy,KM, A B Heimberger, D Y Loh, 1990, Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCR α thymocytes in vivo: *Science*, v. 250, p. 1720-1723.
Ref ID: 86

Nagai,Y, S Akashi, M Nagafuku, M Ogata, Y Iwakura, S Akira, T Kitamura, A Kosugi, M Kimoto, K Miyake, 2002, Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution: *Nat Immunol*, v. 3, p. 667-672.
Ref ID: 57

Nakae,S, A Nambu, K Sudo, Y Iwakura, 2003, Suppression of Immune Induction of Collagen-Induced Arthritis in IL-17-Deficient Mice: *The Journal of Immunology*, v. 171, p. 6173-6177.
Ref ID: 85

Nakamura,K, A Kitani, W Strober, 2001, Cell Contact-dependent Immunosuppression by CD4+CD25+ Regulatory T Cells Is Mediated by Cell Surface-bound Transforming Growth Factor {beta}: *The Journal of Experimental Medicine*, v. 194, p. 629-644.
Ref ID: 91

Neijssen,J, C Herberths, J W Drijfhout, E Reits, L Janssen, J Neefjes, 2005, Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions: *Nature*, v. 434, p. 83-88.
Ref ID: 119

Neijssen,J, B Pang, J Neeffjes, 2007, Gap junction-mediated intercellular communication in the immune system: Progress in Biophysics and Molecular Biology, v. 94, p. 207-218.
Ref ID: 82

Nishizuka,Y, T Sakakura, 1969, Thymus and Reproduction: Sex-Linked Dysgenesis of the Gonad after Neonatal Thymectomy in Mice: Science, v. 166, p. 753-755.
Ref ID: 22

Nollen,EAA, A E Kabakov, J F Brunsting, B Kanon, J Hohfeld, H H Kampinga, 2001, Modulation of in Vivo HSP70 Chaperone Activity by Hip and Bag-1: Journal of Biological Chemistry, v. 276, p. 4677-4682.
Ref ID: 71

O'Garra,A, P L Vieira, P Vieira, A E Goldfeld, 2004, IL-10-producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage: J.Clin.Invest, v. 114, p. 1372-1378.
Ref ID: 128

O'Neill,LAJ, A G Bowie, 2007, The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling: Nat Rev Immunol, v. 7, p. 353-364.
Ref ID: 63

Oderup,C, L Cederbom, A Makowska, C M Cilio, F Ivars, 2006, Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression: Immunology, v. 118, p. 240-249.
Ref ID: 107

Ohl,L, M Mohaupt, N Czeloth, G Hintzen, Z Kiafard, J r Zwirner, T Blankenstein, G Henning, R F+rster, 2004, CCR7 Governs Skin Dendritic Cell Migration under Inflammatory and Steady-State Conditions: Immunity, v. 21, p. 279-288.
Ref ID: 65

Onishi,Y, Z Fehervari, T Yamaguchi, S Sakaguchi, 2008, Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation: Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, v. 105, p. 10113-10118.
Ref ID: 131

Oviedo-Orta,E, A Bermudez-Fajardo, S Karanam, U Benbow, A C Newby, 2008, Comparison of MMP-2 and MMP-9 secretion from T helper 0, 1 and 2 lymphocytes alone and in coculture with macrophages: Immunology, v. 124, p. 42-50.
Ref ID: 108

Pakravan,N, A T Hassan, Z M Hassan, 2007, Naturally occurring self-reactive CD4+CD25+ regulatory T cells: universal immune code: Cell Mol.Immunol, v. 4, p. 197-201.
Ref ID: 136

Pasare,C, R Medzhitov, 2003, Toll Pathway-Dependent Blockade of CD4+CD25+ T Cell-Mediated Suppression by Dendritic Cells: Science, v. 299, p. 1033-1036.
Ref ID: 140

Philpott,NJ, M Nociari, K B Elkon, E Falck-Pedersen, 2004, Adenovirus-induced maturation of dendritic cells through a PI3 kinase-mediated TNF-+} induction pathway: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 101, p. 6200-6205.
Ref ID: 104

Piccirillo,CA, J J Letterio, A M Thornton, R S McHugh, M Mamura, H Mizuhara, E M Shevach, 2002, CD4+CD25+ Regulatory T Cells Can Mediate Suppressor Function in the Absence of Transforming Growth Factor {beta}1 Production and Responsiveness: The Journal of Experimental Medicine, v. 196, p. 237-246.
Ref ID: 92

Read,S, V Malmstrom, F Powrie, 2000, Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen 4 Plays an Essential Role in the Function of CD25+CD4+ Regulatory Cells that Control Intestinal Inflammation: The Journal of Experimental Medicine, v. 192, p. 295-302.
Ref ID: 26

Sakaguchi,S, N Sakaguchi, M Asano, M Itoh, M Toda, 1995, Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases: The Journal of Immunology, v. 155, p. 1151-1164.
Ref ID: 25

Scandella,E, Y Men, D F Legler, S Gillessen, L Prikler, B Ludewig, M Groettrup, 2004, CCL19/CCL21-triggered signal transduction and migration of dendritic cells requires prostaglandin E2: Blood, v. 103, p. 1595-1601.
Ref ID: 123

Schnurr,M, P Galambos, C Scholz, M Dauer, A Krug, G Hartmann, A Eigler, S Endres, 2002, Dendritische Zellen û TrSger tumorgerichteter Immuntherapie: Dtsch Arztebl, v. 99, p. A-2408.
Ref ID: 6

Segretain,D, M M Falk, 2004, Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal: Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, v. 1662, p. 3-21.
Ref ID: 111

Sheil,B, J MacSharry, L O'Callaghan, A O'Riordan, A Waters, J Morgan, J K Collins, L O'Mahony, F Shanahan, 2006, Role of interleukin (IL-10) in probiotic-mediated immune modulation: an assessment in wild-type and IL-10 knock-out mice: Clin.Exp.Immunol, v. 144, p. 273-280.
Ref ID: 97

Shimizu,J, S Yamazaki, T Takahashi, Y Ishida, S Sakaguchi, 2002, Stimulation of CD25+CD4+ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance: Nat Immunol, v. 3, p. 135-142.
Ref ID: 21

Singh-Jasuja,H, R E M Toes, P Spee, C Munz, N Hilf, S P Schoenberger, P Ricciardi-Castagnoli, J Neefjes, H G Rammensee, D Arnold-Schild, H Schild, 1999, Cross-Presentation of Glycoprotein 96-associated Antigens on Major Histocompatibility Complex Class I Molecules Requires Receptor-mediated Endocytosis: The Journal of Experimental Medicine, v. 191, p. 1965-1974.
Ref ID: 46

Smook,MLF, P Heeringa, J G M C Damoiseaux, M J A P Daemen, M P J de Winther, M J J Gijbels, L Beckers, E Lutgens, J W Cohen Tervaert, 2005, Leukocyte CD40L deficiency affects the CD25+ CD4 T cell population but does not affect atherosclerosis: Atherosclerosis, v. 183, p. 275-282.
Ref ID: 29

Sommer,N, P A Loschmann, G H Northoff, M Weller, A Steinbrecher, J P Steinbach, R Lichtenfels, R Meyermann, A Riethmuller, A Fontana, ., 1995, The antidepressant rolipram suppresses cytokine production and prevents autoimmune encephalomyelitis: Nat.Med., v. 1, p. 244-248.
Ref ID: 109

Srivastava,P, 2002, INTERACTION OF HEAT SHOCK PROTEINS WITH PEPTIDES AND ANTIGEN PRESENTING CELLS: Chaperoning of the Innate and Adaptive Immune Responses: Annual Review of Immunology, v. 20, p. 395-425.
Ref ID: 70

Starr,TK, S C Jameson, K A Hogquist, 2003, POSITIVE AND NEGATIVE SELECTION OF T CELLS: Annual Review of Immunology, v. 21, p. 139-176.
Ref ID: 16

Steinbrink,K, L Paragnik, H Jonuleit, T Tuting, J Knop, A H Enk, 2000, Induction of dendritic cell maturation and modulation of dendritic cell-induced immune responses by prostaglandins: Arch.Dermatol.Res., v. 292, p. 437-445.

Ref ID: 121

Steinman, RM, J C Adams, Z A Cohn, 1975, Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen: *The Journal of Experimental Medicine*, v. 141, p. 804-820.

Ref ID: 4

Strauss, L, C Bergmann, M Szczepanski, W Gooding, J T Johnson, T L Whiteside, 2007, A Unique Subset of CD4+CD25^{high}Foxp3⁺ T Cells Secreting Interleukin-10 and Transforming Growth Factor- β 1 Mediates Suppression in the Tumor Microenvironment: *Clinical Cancer Research*, v. 13, p. 4345-4354.

Ref ID: 135

Strickland, DH, P A Stumbles, G R Zosky, L S Subrata, J A Thomas, D J Turner, P D Sly, P G Holt, 2006, Reversal of airway hyperresponsiveness by induction of airway mucosal CD4+CD25+ regulatory T cells: *The Journal of Experimental Medicine*, v. 203, p. 2649-2660.

Ref ID: 27

Szeto, J, N A Kaniuk, V Canadien, R Nisman, N Mizushima, T Yoshimori, D P Bazett-Jones, J H Brumell, 2006, ALIS are stress-induced protein storage compartments for substrates of the proteasome and autophagy: *Autophagy*, v. 2, p. 189-199.

Ref ID: 99

Takeda, I, S Ine, N Killeen, L C Ndhlovu, K Murata, S Satomi, K Sugamura, N Ishii, 2004, Distinct Roles for the OX40-OX40 Ligand Interaction in Regulatory and Nonregulatory T Cells: *The Journal of Immunology*, v. 172, p. 3580-3589.

Ref ID: 28

Tanaka, K, 1994, Role of proteasomes modified by interferon-gamma in antigen processing: *Journal of Leukocyte Biology*, v. 56, p. 571-575.

Ref ID: 47

Veldhoen, M, H Moncrieffe, R J Hocking, C J Atkins, B Stockinger, 2006, Modulation of Dendritic Cell Function by Naive and Regulatory CD4+ T Cells: *The Journal of Immunology*, v. 176, p. 6202-6210.

Ref ID: 79

Villadangos, JA, R A R Bryant, J Deussing, C Driessen, A M Lennon-Dumenil, R J Riese, W Roth, P Saftig, G P Shi, H A Chapman, C Peters, H L Ploegh, 1999, Proteases involved in MHC class II antigen presentation: *Immunological Reviews*, v. 172, p. 109-120.

Ref ID: 67

Wang, Q, D D Mosser, J Bag, 2005, Induction of HSP70 expression and recruitment of HSC70 and HSP70 in the nucleus reduce aggregation of a polyalanine expansion mutant of PABPN1 in HeLa cells: *Hum. Mol. Genet.*, v. 14, p. 3673-3684.

Ref ID: 130

Wang, S, G Zhu, A I Chapoval, H Dong, K Tamada, J Ni, L Chen, 2000, Costimulation of T cells by B7-H2, a B7-like molecule that binds ICOS: *Blood*, v. 96, p. 2808-2813.

Ref ID: 37

Warger, T, P Osterloh, G Rechtsteiner, M Fassbender, V Heib, B Schmid, E Schmitt, H Schild, M P Radsak, 2006, Synergistic activation of dendritic cells by combined Toll-like receptor ligation induces superior CTL responses in vivo: *Blood*, v. 108, p. 544-550.

Ref ID: 64

Yamamoto, M, S Sato, K Mori, K Hoshino, O Takeuchi, K Takeda, S Akira, 2002, Cutting Edge: A Novel Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adapter That Preferentially Activates the IFN- β Promoter in the Toll-Like Receptor Signaling: *The Journal of Immunology*, v. 169, p. 6668-6672.

Ref ID: 62

Yeager,M, A L Harris, 2007, Gap junction channel structure in the early 21st century: facts and fantasies: *Current Opinion in Cell Biology*, v. 19, p. 521-528.
Ref ID: 66

Yen,JH, T Khayrullina, D Ganea, 2008, PGE2-induced metalloproteinase-9 is essential for dendritic cell migration: *Blood*, v. 111, p. 260-270.
Ref ID: 80

Yewdell,JW, L C Anton, J R Bennink, 1996, Commentary: Defective ribosomal products (DRiPs): a major source of antigenic peptides for MHC class I molecules?: *The Journal of Immunology*, v. 157, p. 1823-1826.
Ref ID: 103

Yewdell,JW, 2007, Plumbing the sources of endogenous MHC class I peptide ligands: *Current Opinion in Immunology*, v. 19, p. 79-86.
Ref ID: 45

Yi,H, Y Zhen, L Jiang, J Zheng, Y Zhao, 2006, The phenotypic characterization of naturally occurring regulatory CD4+CD25+ T cells: *Cell Mol.Immunol*, v. 3, p. 189-195.
Ref ID: 96

Zozulya,AL, E Reinke, D C Baiu, J Karman, M Sandor, Z Fabry, 2007, Dendritic Cell Transmigration through Brain Microvessel Endothelium Is Regulated by MIP-1{alpha} Chemokine and Matrix Metalloproteinases: *The Journal of Immunology*, v. 178, p. 520-529.
Ref ID: 110