

**„Mechanismen zur Suppression der experimentellen
akuten Graft-versus-Host Disease“**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Corinna Lupp

geboren am 06.März 1981 in Wiesbaden

Mainz, 2010

Aus dem
Institut für Immunologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Mai 2011

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	7
1.1	Allogene Stammzelltransplantation und Graft-versus-Host Disease	7
1.2	Die Funktionen des Immunsystems.....	8
1.2.1	Rezeptoren des angeborenen Immunsystems	10
1.2.2	Dendritische Zellen	12
1.2.3	Der „major histocompatibility complex“ (MHC)	16
1.2.4	Das adaptive Immunsystem	17
1.2.5	Mechanismen Treg-vermittelter Suppression	23
1.3	Zielsetzung	27
2.	Materialien, Methoden und Mäuse	28
2.1	Mäuse.....	28
2.2	Material.....	29
2.2.1	Verbrauchsmaterialien.....	29
2.2.2	Geräte.....	29
2.2.3	Chemikalien und sonstige Substanzen.....	30
2.2.4	Puffer und Lösungen	33
2.2.5	Medien für die Zellkultur	35
2.2.6	Antikörper	36
2.3	Methoden	39
2.3.1	Methoden der Zellkultur	39
2.3.1.1	Bestimmung der Lebendzellzahl.....	39
2.3.1.2	Anreinigung von T-Zell-Populationen <i>ex vivo</i>	39
2.3.1.3	Voraktivierung von Tregs.....	43
2.3.1.4	Anreinigung von Dendritischen Zellen aus der Milz.....	44
2.3.1.5	Differenzierung von „bone marrow-derived dendritic cells“ (BMDCs).....	45
2.3.1.6	Färbung von T-Zellen mit Calcein.....	45
2.3.1.7	Färbung von T-Zellen mit CF(DA)SE.....	46
2.3.1.8	Intrazelluläre Färbung von FoxP3 in Tregs.....	46
2.3.1.9	Färbung von Zellen mit spezifischen Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern für die FACS Analyse	47

2.3.1.10	Kultur von Hybridomzellen zur Gewinnung des anti-NK1.1 Antikörpers (PK136)	47
2.3.2	Allgemeine Methoden	48
2.3.2.1	Antikörperfällung mit 60 % Ammoniumsulfat	48
2.3.2.2	Aufreinigung des Antikörpers über das ÄKTA-Purifier System	48
2.3.2.3	Konzentrieren und Entsalzen des aufgereinigten Antikörpers	49
2.3.2.4	Kopplung von Antikörpern an Epoxybeads M-450.....	49
2.3.2.5	Analysen mit dem FACS.....	49
2.3.3	Gemischte Lymphozyten/Leukozyten Reaktion <i>in vitro</i> (MLR = „Mixed Leukocyte Reaction“).....	50
2.3.3.1	CFSE-Proliferationstest <i>in vitro</i>	51
2.3.3.2	Calcein-Transfer <i>in vitro</i>	52
2.3.3.3	Untersuchung des Phänotyps Dendritischer Zellen	53
2.3.3.4	Untersuchung der Proliferation von alloreaktiven T-Zellen <i>via</i> ³ [H]-Thymidin-Inkorporation	54
2.3.4	Tierexperimentelle Methoden	55
2.3.4.1	Immunisierung von Versuchsmäusen mit Milzzellen	55
2.3.4.2	<i>In vivo</i> Zytotoxizitätstest.....	55
2.3.4.3	Blutentnahme	56
2.3.4.4	Milzentnahme	56
2.3.4.5	Injektion von Antikörpern zur Depletion von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) <i>in vivo</i>	57
2.3.4.6	Injektion von Rolipram	57
2.3.4.7	Bestrahlung der Versuchsmäuse.....	57
2.3.4.8	Allogene Transplantation	58
2.3.4.9	Beurteilung der Versuchsmäuse nach allogener Transplantation zur Erfassung des Schweregrads der akuten GvHD-Symptome	60
2.3.4.10	<i>In vivo</i> Proliferationstest.....	61
2.3.5	Statistik	61
3.	Ergebnisse	62
3.1	Etablierung eines Mausmodells für die Untersuchung von Mechanismen zur Suppression der akuten GvHD.....	62

3.1.1	Die Transplantation allogener Knochenmark- und Thy1.2 ⁺ TZ führt zu einer akuten GvHD in den Empfängern	63
3.2	Die Bedeutung von TLR-Signalen für die Entstehung einer akuten Graft-versus-Host Disease	64
3.2.1	APCs aus MyD88 ^{-/-} Mäusen aktivieren allogene TZ <i>in vitro</i>	64
3.2.2	Lyse allogener Zielzellen in Mäusen, die zuvor mit Zellen aus MyD88 ^{-/-} Tieren immunisiert wurden	66
3.2.3	Letale Graft-versus-Host Disease in subletal bestrahlten MyD88 ^{-/-} Empfängern eines allogenen T-Zell-Transplantats	67
3.2.4	Letal bestrahlte MyD88 ^{-/-} Empfängertiere zeigen nach syngener Knochenmark- und TZ-Transplantation keine gesundheitlichen Beeinträchtigungen.....	69
3.3	Die Bedeutung CD4 ⁺ CD25 ⁺ natürlich vorkommender Tregs für die Manipulation der akuten GvHD	71
3.3.1	Voraktivierte CD4 ⁺ CD25 ⁺ Tregs hemmen alloreaktive CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen <i>in vitro</i>	71
3.3.2	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Tregs hemmen alloreaktive CD4 ⁺ und CD8 ⁺ TZ <i>in vitro</i>	72
3.3.3	Voraktivierte CD4 ⁺ CD25 ⁺ Tregs hemmen alloreaktive CD8 ⁺ TZ <i>in vivo</i> und folglich auch die Entstehung einer akuten GvHD.....	73
3.3.4	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Tregs hemmen die Entstehung einer akuten GvHD	76
3.4	Mechanismen der CD4 ⁺ CD25 ⁺ Treg-vermittelten Suppression der akuten Graft-versus-Host Disease	78
3.4.1	Die preTreg-vermittelte Suppression alloreaktiver T-Zellen <i>in vitro</i> scheint teilweise IL-10 abhängig zu sein	79
3.4.2	Die Suppression alloreaktiver T-Zellen <i>in vitro</i> durch CD4 ⁺ CD25 ⁺ Tregs ist kaum IL-10-abhängig	80
3.4.3	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Tregs bewirken unabhängig von IL-10 eine reduzierte Anzahl alloreaktiver CD8 ⁺ T-Zellen in den Milzen der Transplantatempfänger.....	82
3.4.4	Bei der Abschwächung der akuten GvHD durch CD4 ⁺ CD25 ⁺ Tregs <i>in vivo</i> spielt IL-10 eine untergeordnete Rolle.....	83
3.4.5	Interleukin-10 ^{-/-} Empfängermäuse entwickeln aggressivere GvHD als der Wildtyp.....	85
3.4.6	CD4 ⁺ CD25 ⁺ preTregs hemmen IL-10-unabhängig die GvHD in IL-10 ^{-/-} Empfängern	86
3.4.7	Die Proliferation alloreaktiver T-Zellen kann durch die Verwendung von db-cAMP <i>in vitro</i> gehemmt werden.....	88

3.4.8	Der Phosphodiesterase-Inhibitor Rolipram hemmt die Proliferation alloreaktiver T-Zellen <i>in vitro</i>	89
3.4.9	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Tregs kommunizieren über direkten Zellkontakt mit allogenen DCs	91
3.4.10	CD4 ⁺ CD25 ⁺ preTregs hemmen allogene DCs <i>in vitro</i>	93
3.4.11	Der Phosphodiesterase-Inhibitor Rolipram kann die CD4 ⁺ CD25 ⁺ preTreg-vermittelte Hemmung der akuten GvHD <i>in vivo</i> verbessern.	94
3.5	Die Rolle von MHC-Klasse-II bei der Entstehung und der Hemmung einer akuten GvHD	97
3.5.1	Entstehung einer GvHD trotz fehlender Aktivierung von CD4 ⁺ TZ in MHC-II-defizienten Mäusen nach subletaler Bestrahlung und allogener Transplantation	97
3.5.2	Voraktivierte CD4 ⁺ CD25 ⁺ Tregs hemmen die Proliferation alloreaktiver T-Zellen <i>in vitro</i> MHC-II-unabhängig.....	100
3.5.3	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Tregs hemmen alloreaktive CD8 ⁺ T-Zellen <i>in vitro</i> unabhängig von MHC-Klasse-II.....	101
3.5.4	Die MHC-II-unabhängige letale GvHD kann durch CD4 ⁺ CD25 ⁺ preTregs gehemmt werden.....	103
3.5.5	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Tregs bewirken MHC-II-unabhängig eine Abschwächung der akuten GvHD	105
4.	Diskussion.....	107
4.1	MyD88- und TRIF-abhängige TLR-Signale sind für die Entstehung einer akuten GvHD nach allogener Transplantation im Mausmodell nicht essentiell	108
4.2	Tregs können alloreaktive T-Zellen unter Beteiligung zellkontaktabhängiger und zellkontaktunabhängiger Mechanismen deutlich supprimieren	110
4.3	Tregs können die GvHD in einer MHC-II-unabhängigen Weise hemmen .	117
5.	Zusammenfassung	121
6.	Abkürzungsverzeichnis.....	123
7.	Literaturverzeichnis.....	126
	Publikationen	136
	Lebenslauf	137

1. Einleitung

1.1 Allogene Stammzelltransplantation und Graft-versus-Host Disease

Die Transplantation von hämatopoetischen^a Stammzellen beziehungsweise Knochenmark stellt für viele Patienten mit hämatologischen Erkrankungen, wie beispielsweise akuter Leukämie, die einzige kurative Therapieoption dar. Bei „autologen“ Stammzelltransplantationen sind Spender und Empfänger dieselbe Person. Bei der „allogenen“ Transplantation handelt es sich bei Spender und Empfänger um zwei verschiedene Individuen, die dementsprechend unterschiedliche Gewebemerkmale besitzen. Vor der Transplantation der gesunden Spenderzellen werden die kranken Zellen des Empfängers durch Chemotherapie und/oder Bestrahlung vernichtet. Diese Vorbereitung wird als „Konditionierung“ bezeichnet. Je nach Intensität der Konditionierung können nahezu alle blutbildenden Zellen eliminiert werden. Nach einer intravenösen Infusion gesunder hämatopoetischer Stammzellen aus dem Spender wird das Knochenmark des Empfängers von den neuen Stammzellen besiedelt. Aus diesen entwickeln sich durch Zellteilungen und zunehmende Differenzierung neue Blutzellen, wie zum Beispiel Leukozyten^b. Der Empfänger bekommt also im Prinzip ein neues, von einem gesunden Spender stammendes, Immunsystem übertragen. Das kurative Prinzip der allogenen Stammzelltransplantation beruht auf „Graft-versus-Tumor“ oder „Graft-versus-Leukemia“ Reaktionen, wobei Immunzellen, genauer gesagt T-Lymphozyten, des Spenders die gegebenenfalls noch verbliebenen Leukämie- oder Tumorzellen des Empfängers erkennen und zerstören [1]. Je unterschiedlicher die Gewebemerkmale, die sogenannten „HLA-Typen“, von Spender und Empfänger sind, desto größer ist jedoch das Risiko für den Empfänger, an einer sogenannten „Graft-versus-Host Disease“ (GvHD)^c zu erkranken. Die GvHD ist charakterisiert durch Immunreaktionen

^a Von Hämatopoese (= Blutbildung) abgeleitet.

^b Zu den Leukozyten, den weißen Blutzellen, zählen die Lymphozyten (T- und B-Zellen), Granulozyten und Monozyten.

^c Auf Deutsch: Transplantat-gegen-Wirt Reaktion

der Spender-T-Lymphozyten, die gegen gesundes Körpergewebe des Empfängers gerichtet sind, und trägt wesentlich zur Morbidität und Mortalität nach allogenen Stammzelltransplantationen bei [2]. Typische Zielorgane der Graft-versus-Host (GvH)-Reaktionen sind vor allem der Gastrointestinaltrakt, die Leber, Haut und Lunge. Eine auffällige Gemeinsamkeit von zumindest Lunge, Haut und Gastrointestinaltrakt besteht in dem engen Kontakt zu Mikroorganismen und deren Produkten durch die Epidermis beziehungsweise das Lungenepithel oder die intestinale Mucosa. Zum Einen stehen die genannten Gewebe mit der Außenwelt und somit zahlreichen, teilweise pathogenen, Mikroorganismen in Kontakt. Zum Anderen werden sie im Normalfall von einer großen Anzahl Keimen besiedelt, die die sogenannte „kommensale Flora“^d bilden. Nachfolgend werden die allgemeinen Funktionen des Immunsystems näher erläutert.

1.2 Die Funktionen des Immunsystems

In unserer Umwelt findet sich eine Vielzahl an pathogenen Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten, sowie toxischen und allergenen Substanzen, die über die Haut oder Schleimhäute in den Organismus eintreten und teilweise lebensbedrohliche Infektionen hervorrufen können. Die eigentliche Aufgabe des Immunsystems besteht darin, Krankheitserreger zu erkennen und zu eliminieren. Dabei muss das Immunsystem zwischen körpereigenen und fremden Antigenen^e unterscheiden können. Fremdantigene müssen jedoch nicht ausschließlich von Viren, Bakterien oder anderen Pathogenen stammen um eine Immunreaktion auszulösen. Auch als fremd angesehene Gewebemerkmale in Empfängern eines allogenen Stammzelltransplantats sind Auslöser mitunter starker Immunreaktionen. Das Immunsystem wird allgemein in das angeborene und das adaptive Immunsystem unterteilt. Die erste Barriere für Krankheitserreger sind die Haut und Schleimhäute. Durch das Vorhandensein antimikrobieller Substanzen stellen diese sowohl eine physikalische, wie auch eine chemische Barriere dar. Durchbrechen Krankheitserreger diese und dringen in den Organismus ein, treffen sie auf eine

^d Diese in der Regel harmlosen Mikroorganismen sind dem Körper nützlich, da sie die Besiedlung mit pathogenen Mikroorganismen verhindern.

^e Antigene sind Strukturen, die eine Immunreaktion auslösen können.

zweite Abwehrfront des angeborenen Immunsystems. Diese umfasst lösliche Proteine und bioaktive Moleküle, welche entweder stetig anwesend sind (wie Proteine des Komplementsystems, Defensine, Ficoline) oder von Zellen nach deren Aktivierung sezerniert werden (Zytokine^f zur Regulation der Funktion anderer Zellen, Chemokine zur Anlockung inflammatorischer^g Leukozyten, Lipidmediatoren von Entzündungsreaktionen, reaktive freie Radikale und bioaktive Amine und Enzyme, die ebenfalls in Entzündungsprozesse involviert sind). Freßzellen (Phagozyten), wie Monozyten und Makrophagen, natürliche Killerzellen, Granulozyten (neutrophile, eosinophile, basophile) und Mastzellen, stellen zelluläre Komponenten des angeborenen Immunsystems dar. Phagozyten (wie Makrophagen) spielen eine Schlüsselrolle bei der Einleitung adaptiver Immunantworten, indem sie mikrobielle Antigene aufnehmen, proteolytisch in Peptidfragmente prozessieren und den Zellen des adaptiven Immunsystems präsentieren. Zu diesen sogenannten „antigenpräsentierenden Zellen“ zählen außerdem Langerhans Zellen in der Haut, Kupffer Zellen in der Leber und Mikrogliazellen im zentralen Nervensystem. Die potentesten antigenpräsentierenden Zellen (APCs) sind die sogenannten „Dendritischen Zellen“ [3].

Da die Moleküle des angeborenen Immunsystems zur Erkennung fremder und pathogener Strukturen auf einer großen Anzahl an Zellen verbreitet sind, greifen die Abwehrmechanismen relativ schnell nach Eindringen eines Pathogens in den Organismus und erweisen sich damit bei der Bekämpfung vieler Krankheitserreger als sehr wirkungsvoll. Die Spezifität des angeborenen Immunsystems ist durch die Erkennung stark konservierter Muster auf Pathogenen über keimbahnkodierte Rezeptoren jedoch begrenzt. Um der enorm hohen Anzahl an Pathogenen, die sich selbst verändern können und Strategien entwickeln, um der Erkennung durch das Immunsystem zu entgehen, effizient begegnen zu können, sind noch weitere Abwehrmechanismen nötig. Hier greift das „adaptive Immunsystem“, welches einen

^f Es existieren verschiedene Gruppen an sogenannten „Zytokinen“, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren, Interleukine, Chemokine und weitere. Solche, die eine regulierende Funktion auf die Differenzierung und das Wachstum von Zellen ausüben, zählen zu den Wachstumsfaktoren. Manche Zytokine (Interleukine) dienen der Kommunikation der Immunzellen untereinander. Chemokine locken Zellen, welche die passenden Chemokinrezeptoren tragen, an.

^g Von Inflammation abgeleitet. Der Begriff Inflammation steht für die Entzündungsreaktion, welche dazu dient, Pathogene zu beseitigen und deren Ausbreitung zu verhindern.

humoralen, sowie einen zellulären Zweig umfasst. Die Immunantworten des adaptiven Immunsystems werden von den T- und B-Lymphozyten^h getragen, deren Funktionen später noch genauer erläutert werden. Obwohl dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem funktionell unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen, ist eine Synergie beider essentiell für eine intakte und effektive Immunantwort. Während die erste, schnelle Abwehrreaktion auf den Mechanismen des angeborenen Immunsystems basiert, greift die adaptive Immunantwort einige Tage später, stellt dafür aber Zellen mit Rezeptoren unterschiedlicher Spezifitäten für eine sehr große Anzahl verschiedenster Antigene bereit [3].

1.2.1 Rezeptoren des angeborenen Immunsystems

Die Zellen des angeborenen Immunsystems exprimieren verschiedene „Muster-erkennende“ Rezeptoren, sogenannte „pattern recognition receptors“ (PRRs). Über diese Rezeptoren können konservierte molekulare Strukturen, die „pathogen associated molecular patterns“ (PAMPs), die in und auf Mikroorganismen vorkommen, erkannt werden [4]. Einige dieser Rezeptoren stimulieren die Phagozytose von Pathogenen. Weitere Rezeptoren des angeborenen Immunsystems spielen eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung der Immunantworten, die für lokale Entzündungen verantwortlich sind, sowie bei der Mobilisierung neuer Effektorzellen, der Eindämmung von lokalen Infektionen und beim Auslösen von adaptiven Immunantworten. Die Übertragung solcher Signale kann durch eine Familie von signalgebenden Rezeptoren erfolgen, die man als „Toll-like Rezeptoren“ (TLRs) bezeichnet. Diese Keimbahn-kodierten Transmembranrezeptoren werden von verschiedenen Immunzellen des angeborenen Immunsystems, wie Makrophagen, Monozyten, Mastzellen, NK-Zellen, Neutrophilen Granulozyten und Dendritischen Zellen exprimiert [5;6]. Auch auf B- und T-Zellen [7], sowie epithelialen Zellen [8-10] wurden TLRs gefunden. Jeder der bisher identifizierten TLRs erkennt ein bestimmtes PAMP. Der TLR 4 zum Beispiel erkennt, mit Hilfe des LPS-bindenden Proteins LBP und der Korezeptoren CD14ⁱ und MD2, Lipopolysaccharide (LPS) auf der Oberfläche Gram-negativer Bakterien und zählt zu

^h Die Zellen werden oft auch vereinfacht als T- und B-Zellen bezeichnet.

ⁱ CD = cluster of differentiation; bezeichnet immunphänotypische Oberflächenmerkmale von Zellen.

den Toll-like Rezeptoren, welche auf der Oberfläche von Zellen exprimiert werden. Dazu gehören weiterhin die TLRs 1,2,5,6 und 10, welche vor allem, aber nicht ausschließlich, bakterielle Komponenten erkennen. Diejenigen TLRs, welche primär im Zellinneren lokalisiert sind (TLR 3,7,8 und 9), sind hingegen primär auf die Erkennung von Nukleinsäuren und viralen Bestandteilen spezialisiert [6]. TLR 3 zum Beispiel erkennt doppelsträngige Ribonukleinsäure (RNA), wie sie bei Viren vorkommt [11]. Die Erkennung von Pathogenen durch TLRs setzt eine Signalkaskade in Gang, welche in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie dem „nuclear factor κ B“ (NF- κ B) und dem „interferon regulatory factor“ (IRF), führt. Deren Aktivierung führt zum Einen in Dendritischen Zellen und anderen APCs zu deren Reifung, charakterisiert durch die verstärkte Expression sogenannter kostimulatorischer Moleküle und die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine [12] und daneben zur Produktion von Typ I Interferonen, welche bei der Bekämpfung von Viren eine Rolle spielen. MyD88 und TRIF sind zyttoplasmatische Adaptormoleküle, welche von den TLRs zur Signalübertragung in die Zelle genutzt werden. Die TLRs 1, 2, 5, 7, 8 und 9 nutzen MyD88 als alleiniges Adaptormolekül. Somit ist MyD88 für die meisten TLRs essentiell. TLR 3 ist auf TRIF angewiesen und unabhängig von MyD88. Der TLR 4 ist mit MyD88- und TRIF-abhängigen Signalwegen assoziiert [13]. Goldstein und Kollegen konnten zeigen, dass MyD88 eine entscheidende Rolle im Zusammenhang mit der Abstoßung allogener Hauttransplantate spielt. Sie konnten demonstrieren, dass TLRs nicht nur durch Infektionen, sondern auch im Rahmen allogener Transplantationen aktiviert werden können. Die Autoren stellten einen Zusammenhang zwischen fehlenden MyD88-vermittelten Signalen und einer reduzierten Transplantatabstoßung her [14].

TLR-Signale und GvHD

Auch die Rolle von TLR-vermittelten Signalen im Rahmen der Entstehung einer GvHD wird in der Literatur bereits diskutiert. Es existieren Publikationen, die auf eine Relevanz TLR-abhängiger Signale bei der Entstehung einer GvHD nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation hindeuten [15;16]. Die Rolle des TLR 9 im Rahmen der akuten GvHD wurde von Calcaterra und Kollegen untersucht. Es wurde beschrieben, dass TLR-9-defiziente Mäuse, die ein allogenes Stammzelltransplantat erhielten, eine im Vergleich zu Wildtypmäusen schwächere

GvHD entwickelten [17]. Auch die Rolle des TLR 4 im Rahmen der GvHD ist Gegenstand einiger Studien. Der TLR 4 Ligand LPS ist Bestandteil der normalen Darmflora. Es wurde beschrieben, dass eine Entfernung der Gram-negativen Bakterien aus dem Darm mit einer abgeschwächten GvHD in Zusammenhang steht [18;19].

Die Aktivierung von APCs kann allerdings auch über TLR-unabhängige Mechanismen erfolgen. Auch RIG-I-like Rezeptoren, C-type Lectin Rezeptoren (CLRs) und NOD-like Rezeptoren (NLRs) werden zu den mustererkennenden Rezeptoren des angeborenen Immunsystems gezählt [20]. Penack und Kollegen ziehen aus ihren durchgeführten Experimenten den Schluss, dass „Nucleotide-binding oligomerization domain 2“ (NOD-2), ein Vertreter der NLRs, die Entstehung der GvHD nach allogener Stammzelltransplantation reguliert, indem er einen inhibitorischen Effekt auf die APCs der Empfänger ausübt [21]. Da im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit die Rolle von TLR-Signalen bei der Entstehung einer akuten GvHD untersucht wurde, wird auf die anderen Rezeptortypen nicht näher eingegangen.

1.2.2 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DCs) als sogenannte professionelle APCs sind als eine Art Bindeglied zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem anzusehen [22]. Zur Identifizierung der DCs bei durchflusszytometrischen Analysen von -DCs und T-Zellen (TZ) enthaltenden- Kokulturen eignet sich der auf der Oberfläche der Zellen exprimierte Rezeptor CD11c. Es gibt verschiedene Subpopulationen von DCs, die jedoch alle die gleiche Hauptfunktion besitzen: DCs sind darauf spezialisiert, Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und den Lymphozyten zur Erkennung zu präsentieren. Unreife DCs wandern nach ihrer Bildung im Knochenmark über das Blut in das Gewebe. Die Zellen verhalten sich makropinozytisch, indem sie große Mengen der umgebenden extrazellulären Flüssigkeit aufnehmen. Darüber hinaus nehmen unreife DCs Antigene über Phagozytose und Rezeptor-vermittelte Endozytose auf. Nehmen die DCs dabei ein Pathogen auf, erhalten sie proinflammatorische Signale und wandern zu den Lymphknoten oder der Milz. Dort reifen sie und präsentieren prozessierte Antigene

den naiven T-Zellen, auf die sie treffen [23]. Nach der Antigenaufnahme werden diese zunächst proteolytisch in Peptidfragmente, bestehend aus 12-25 Aminosäuren prozessiert, welche auf sogenannte MHC-II-Moleküle geladen und später an der Oberfläche der DC den CD4⁺ T-Zellen präsentiert werden [24]. Die Reifung von DCs kann auf verschiedenen Wegen gefördert werden. Eine Möglichkeit ist die Interaktion zwischen CD40 und dem CD40 Ligand (CD40L). DCs, aber auch B-Zellen und Monozyten beispielsweise, exprimieren CD40 auf ihrer Oberfläche, während der CD40L hauptsächlich von aktivierten CD4⁺ T-Zellen exprimiert wird [25]. Die Ligation von CD40 und CD40L fördert die Reifung der DCs [26], was entscheidend für das Einleiten effizienter T-Zell-Antworten ist [27]. Im sogenannten „licence to kill“ Modell [28;29] induzieren T-Helferzellen die Reifung von DCs, wodurch diese die Fähigkeit erlangen, CD8⁺ T-Zellen direkt zu aktivieren. Neben der Interaktion mit T-Helferzellen können bei der Reifung von DCs auch inflammatorische Zytokine (Tumornekrosefaktor- α oder Interleukin-1) oder TLR-Signale, sowie Antigen-Antikörper-Komplexe eine Rolle spielen. Die Reifung der DCs geht mit einer reduzierten Kapazität, neue Antigene aufzunehmen, und gleichzeitig einer verstärkten Expression von MHC- und kostimulatorischen Molekülen (z.B. CD40, CD80, CD86, OX40L, CD70) auf ihrer Oberfläche einher, welche wiederum für die Aktivierung von T-Zellen nötig sind. Aktivierte DCs sezernieren Zytokine wie z.B. Interleukin-12 (IL-12), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1, Interleukin-6 und Typ I Interferon [23], wodurch weitere Zellen angelockt und die induzierten T-Zell-Antworten moduliert werden.

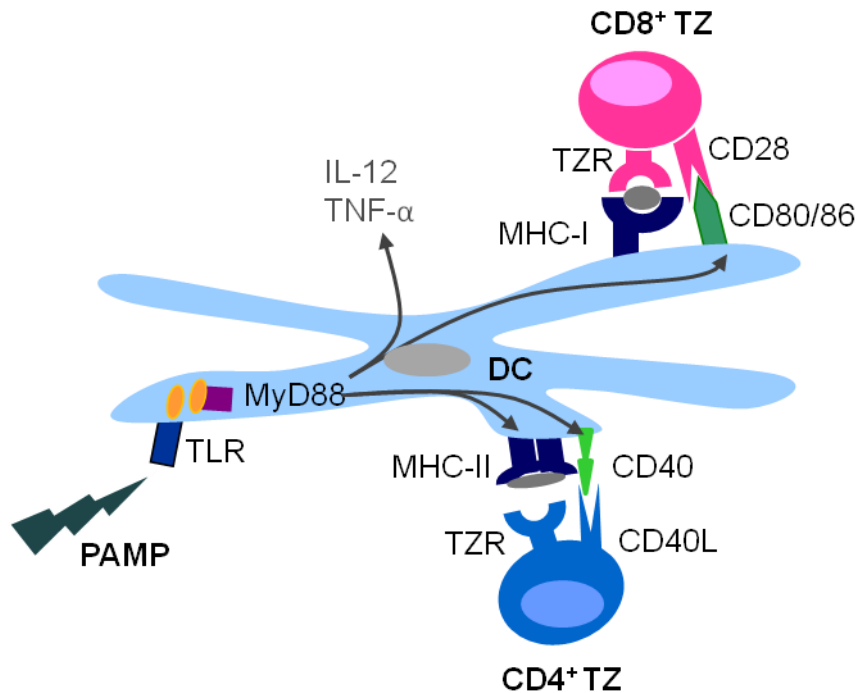


Abb. 1.2.2a: Vereinfachtes Schema der Interaktionen zwischen einer DC und T-Zellen

Die DC kann durch die Erkennung von „pathogen associated molecular patterns“ (PAMPs) mit Hilfe von Toll-like Rezeptoren (TLRs) aktiviert werden. Die aktivierte DC kann IL-12 und TNF- α sezernieren und die Expression von MHC- und kostimulatorischen Molekülen wie z.B. CD40, CD80 und CD86 hochregulieren. DCs können prozessierte Antigenpeptide den TZ präsentieren. CD8⁺ TZ können Antigenpeptide, die mittels MHC-I-Molekülen und CD4⁺ TZ können Antigenpeptide, die mittels MHC-II-Molekülen präsentiert werden, erkennen. Für ihre Aktivierung müssen die TZ neben dem T-Zellrezeptor (TZR)-vermittelten Signal zusätzlich ein kostimulatorisches Signal über CD28 z.B. erhalten. Durch die Ligation von CD40 und dem CD40-Ligand (CD40L) wird zudem die Reifung der DC gefördert.

DCs können nicht nur Immunreaktionen gegen Antigene auslösen, sondern auch eine Toleranz gegenüber Antigenen induzieren. So wird unter anderem sichergestellt, dass körpereigene Antigene toleriert und Autoimmunkrankheiten verhindert werden. Unreife DCs können effizient apoptotische Zellen aufnehmen und körpereigene Antigene den T-Zellen präsentieren [30-32]. Bei DCs, welche apoptotische Zellen aufgenommen haben, tritt keine Reifung ein. Erkennen T-Zellen Eigenpeptid-MHC-Komplexe auf unreifen DCs, wird eine Toleranz gegenüber dem Antigen induziert. Die T-Zellen empfangen keine kostimulatorischen Signale von unreifen DCs, welche sie zu ihrer Aktivierung benötigen würden. T-Zellen, die nur eine Primärstimulation über die Interaktion ihres T-Zellrezeptors mit dem MHC-

Peptid-Komplex auf der DC ohne eine zusätzliche Kostimulation erfahren, bleiben nicht nur inaktiv, sondern verfallen in den Zustand der Anergie („Immunologie“, Janeway, 5. Auflage). Eine anergische T-Zelle spricht auch später nicht mehr auf ihr spezifisches Antigen an, selbst wenn ihr dieses dann in Kombination mit kostimulatorischen Signalen präsentiert wird. Es existieren noch weitere Mechanismen der Toleranzinduktion gegenüber Autoantigenen. Unter anderem können unreife DCs Toleranz induzieren, indem sie naive T-Zellen dazu veranlassen, sich zu Interleukin-10-produzierenden regulatorischen T-Zellen zu differenzieren [33].

DCs und GvHD

APCs, und als solche auch DCs, spielen bei der Auslösung einer GvHD eine ganz wesentliche Rolle. Die Pathophysiologie der GvHD kann grob in drei ineinandergreifende Phasen unterteilt werden. Durch die Konditionierung (Bestrahlung und/oder Chemotherapie) wird das Gewebe des Empfängers geschädigt, wodurch inflammatorische Zytokine gebildet werden, die eine frühe Aktivierung der Empfänger APCs fördern [34]. Außerdem kann beispielsweise LPS aus kommensalen Mikroorganismen ins Gewebe gelangen, was zu einer zusätzlichen Stimulation des angeborenen Immunsystems führt. Daraufhin sind die aktivierten Empfänger-APCs in der Lage, naive Spender-T-Zellen zu aktivieren, welche die Fremdartigene (= Alloantigene) des Empfängers erkennen, die von den APCs präsentiert werden. In der 3.Phase findet eine Schädigung des Empfängergewebes durch zytotoxische CD8⁺ TZ, sowie durch Zytokin-vermittelte Immunreaktionen statt [35]. Während für das Auslösen einer GvHD die APCs des Empfängers entscheidend zu sein scheinen [36;37], kann eine bereits eingeleitete GvH-Reaktion durch APCs, die vom Spender übertragen wurden, offensichtlich noch verstärkt werden [38].

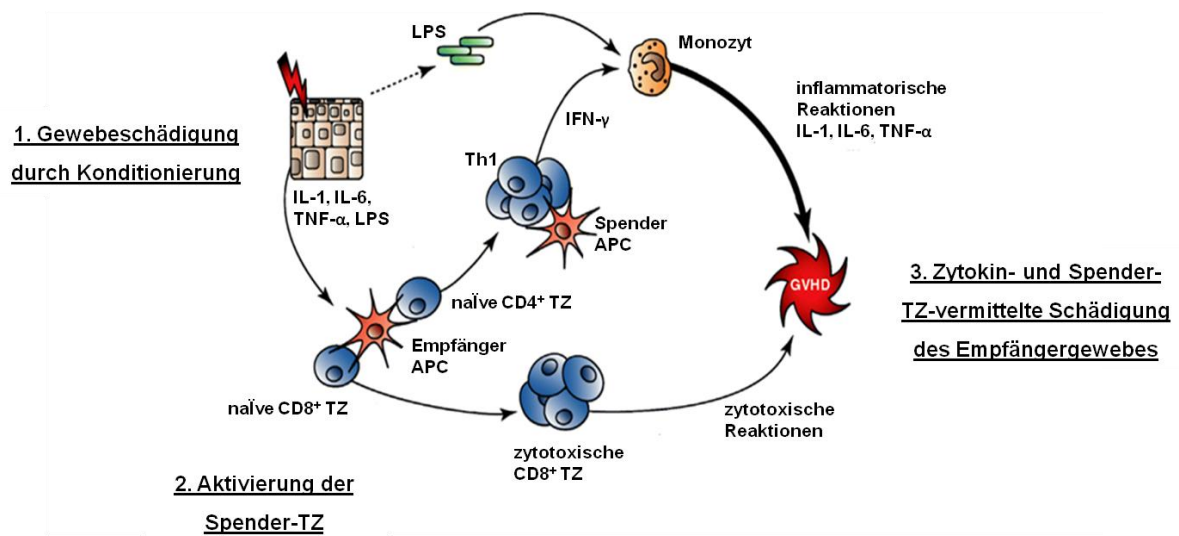


Abb. 1.2.2b: Pathophysiologie der akuten GvHD, schematische Darstellung verändert nach Morris, E.S. und Hill, G.R. (2007), „Advances in the understanding of acute graft-versus-host disease“, British Journal of Haematology

Die Schädigung des Gewebes u.a. als Folge der Konditionierung bewirkt die Bildung inflammatorischer Zytokine, welche zu einer frühen Aktivierung der Empfänger-APCs beitragen. Auch die mit kommensalen Mikroorganismen assoziierten PAMPs können zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems beitragen und eine inflammatorische Zytokinkaskade fördern. Die aktivierten Empfänger-APCs (z.B. DCs) können die transplantierten Spender-T-Zellen aktivieren, was schließlich in einer GvHD resultiert. Auch Spender-APCs, die Antigene des Empfängers präsentieren, können an der Aktivierung von alloreaktiven CD4⁺ TZ beteiligt sein.

1.2.3 Der „major histocompatibility complex“ (MHC)

Der MHC stellt eine Gruppe von Genen dar, die für MHC-Moleküle der Klassen I und II kodieren. MHC-Moleküle sind Glykoproteine, welche der Präsentation von Autoantigenen und Fremdartigen dienen. Mit Hilfe von MHC-I-Molekülen werden prozessierte Peptide aus dem Zytosol und mit MHC-Klasse-II-Molekülen prozessierte Peptide aus intrazellulären Vesikeln präsentiert. Während MHC-I-Moleküle auf fast allen kernhaltigen Zellen zu finden sind, werden MHC-II-Moleküle vor allem von professionellen APCs (z.B. DCs) exprimiert. Die MHC-Gene werden beim Menschen als „Human Leukocyte Antigen“ oder HLA-Gene bezeichnet und bei der Maus als H-2-Gene. Der MHC ist polygen, es gibt mehrere MHC-I- und MHC-II-Gene, sodass jedes Individuum über eine Gruppe von MHC-Molekülen mit unterschiedlichen

Peptidbindungsspezifitäten verfügt. Desweiteren ist der MHC polymorph. Es gibt für jedes Gen innerhalb der Population mehrere Allele („Immunologie“, Janeway, 5. Ausgabe).

Der MHC und GvHD

Eine GvHD entwickelt sich, wenn T-Zellen des Spenders auf Proteine des Empfängers, die sie als „fremd“ erkennen, reagieren. Die relevantesten dieser Proteine sind die HLAs [39] beziehungsweise MHC-Moleküle, welche in Kombination mit präsentierten Empfänger-Antigenen die alloreaktiven Spender-T-Zellen aktivieren können. Einige Patienten entwickeln jedoch auch nach der Transplantation eines Transplantats von einem HLA-identischen Spender eine GvHD. Diese basiert in diesem Fall auf der Erkennung von Proteinen, die als Minor Histokompatibilitätsantigene bezeichnet werden [2]. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde ein Mausmodell für die Untersuchung von Mechanismen zur Abschwächung der akuten GvHD nach allogener Stammzelltransplantation etabliert, das auf der Verwendung von MHC-inkompatiblen Mausstämmen basiert.

1.2.4 Das adaptive Immunsystem

T- und B-Zellen stellen die Zellen des adaptiven Immunsystems dar. B-Zellen können Antikörper (Immunglobuline) sezernieren, welche an extrazelluläre Antigene binden und diese neutralisieren oder für andere Zellen markieren, welche sie dann schließlich eliminieren. Somit sind B-Zellen für die humorale Immunität verantwortlich. In der hier vorliegenden Arbeit wurde unter anderem die Interaktion zwischen DCs und T-Zellen (TZ), speziell regulatorischen T-Zellen untersucht. Daher werden primär die TZ im Folgenden detaillierter beschrieben. TZ sind auf Wechselwirkungen zwischen Zellen spezialisiert. Zytotoxische TZ ($CD8^+$) töten Zellen, die mit intrazellulären Pathogenen infiziert sind, während T-Helferzellen ($CD4^+$) mit APCs interagieren, die ein fremdes Antigen aufgenommen haben und es auf ihrer Oberfläche präsentieren. Die Antigenrezeptoren auf B-Zellen (BZ) und TZ sind in ihrer Antigenpezifität äußerst variabel („Immunologie“, Janeway, 5. Ausgabe). Laut Arstila und Kollegen umfasst das humane Repertoire an T-Zellrezeptoren (TZR) ungefähr 25×10^6 verschiedene Spezifitäten [40]. Man geht

außerdem davon aus, dass TZR eine Kreuzreaktivität aufweisen, was bedeutet, dass ein TZR also jeweils mehrere Antigenpeptide erkennen kann [41]. Durch das riesige Repertoire an Antigenrezeptoren können Immunantworten gegen ein breites Spektrum an Pathogenen entwickelt werden, mit denen ein Individuum im Laufe seines Lebens konfrontiert wird. Das adaptive Immunsystem weist eine begrenzte Zahl an Zellen mit Spezifitäten für viele verschiedene Pathogene auf. Folglich müssen diejenigen Zellen, welche auf das Antigen treffen, für das sie den spezifischen Rezeptor tragen, proliferieren. Dadurch wird eine adäquate Anzahl an Zellen gebildet, die daraufhin eine effektive Immunantwort bewirken können. Eine Schlüsselfunktion des adaptiven Immunsystems ist, dass es langlebige Gedächtniszellen bilden kann. Wird der Organismus ein weiteres Mal mit demselben Antigen konfrontiert, können die Gedächtniszellen wieder Effektorfunktionen erlangen und eine schnellere und effektivere Immunantwort auslösen.

Die Funktionen der T-Zellen

TZ entwickeln sich aus Vorläuferzellen, die aus dem Knochenmark in den Thymus eingewandert sind. Auf der Oberfläche der TZ befinden sich die TZR, welche der Erkennung von Antigenen dienen. Der TZR ist ein Protein, das bei den meisten TZ aus einer α und einer β Kette besteht. Eine Minderheit der TZ trägt TZR, die aus γ und δ Ketten bestehen. TZ erkennen das Antigen, für welches sie den spezifischen Rezeptor tragen, nur, wenn es als Peptid-MHC-Komplex präsentiert wird. Die Antigenpezifität eines einzelnen Lymphozyten wird in einem frühen Stadium seiner Differenzierung festgelegt, wenn ein DNA-Rearrangement der Gensequenzen erfolgt, die in den BZ die variablen Immunglobulinregionen und in den TZ die TZR kodieren. Nach der Expression eines Antigenrezeptors auf der Zelloberfläche wird dieser auf seine Antigenerkennungseigenschaften hin überprüft. TZ müssen Antigenrezeptoren exprimieren, welche mit einer schwachen Affinität^j mit Eigenpeptid-MHC-Komplexen interagieren. Der TZR muss demnach sogar eine schwache Affinität für körpereigene Antigene aufweisen, erst dann wird die TZ positiv selektioniert und kann später den Thymus als potentielle Effektorzelle verlassen. TZ, die keine MHC-Moleküle binden

^j Die Affinität ist ein Maß für die Bindungsstärke zwischen einem TZR und einem Peptid-MHC-Komplex.

können und gar keine Affinität für körpereigene Antigene aufweisen, werden deletiert („Immunologie“, Janeway, 5. Auflage). Durch die positive Selektion an Eigenpeptiden sind alle TZ, die den Thymus verlassen, potentiell autoaggressiv. Bei einer Interaktion der TZ mit DCs und Thymus-Epithelzellen erfahren diejenigen TZ, deren Rezeptoren eine starke Affinität für körpereigene Antigene aufweisen, im Rahmen der zentralen Toleranzinduktion eine negative Selektion und werden deletiert, noch bevor sie völlig ausgereift sind [42]. TZR müssen somit eine höhere Affinität für Fremdpeptid-MHC-Komplexe aufweisen als für Eigenpeptid-MHC-Komplexe. Weniger als 5% der sich entwickelnden TZ überstehen die positive und negative Selektion und werden aus dem Thymus in die Peripherie entlassen.

Es gibt verschiedene Untergruppen an TZ. Man kann die TZ grob in zwei Hauptklassen unterteilen, $CD4^+$ und $CD8^+$ TZ. T-Helferzellen, welche den Korezeptor CD4 exprimieren, interagieren mit MHC-Klasse-II-Molekülen und können Zytokine produzieren um weitere Zellen anzulocken und zu aktivieren und die Immunreaktion gegen den Krankheitserreger zu koordinieren. Dabei können $CD4^+$ TZ, die wiederum in weitere Untergruppen unterteilt werden, humorale Immunantworten (B-Zell-Hilfe) und zelluläre Antworten anregen [3]. Ruhende naïve $CD4^+$ TZ sezernieren kaum Zytokine. Kurz nach ihrer Stimulation produzieren die Zellen den autokrinen T-Zell-Wachstumsfaktor Interleukin-2. Das während der Aktivierung der TZ vorherrschende Zytokinmilieu in der Umgebung entscheidet darüber, zu welcher Untergruppe von T-Helferzellen sich die aktivierten $CD4^+$ TZ differenzieren. Interleukin-12 (IL-12), von Makrophagen [43] oder NK-Zellen produziert, trägt zu einer Differenzierung der $CD4^+$ TZ zu Th_1 -Zellen bei, welche selbst Interferon- γ und proinflammatorische Zytokine produzieren, zellvermittelte Immunantworten fördern und damit an der Kontrolle intrazellulärer Pathogene beteiligt sind [3]. Interferon- γ stimuliert die phagozytotische Aktivität von Makrophagen und die Zerstörung der Mikroorganismen, die sie aufgenommen haben [44]. Übermäßig starke proinflammatorische Aktivitäten von Th_1 Zellen verursachen Gewebeschäden und rufen unerwünschte Entzündungsreaktionen, wie entzündliche Darmerkrankungen [45] hervor oder Autoimmunerkrankungen, wie insulinabhängige Diabetes mellitus [46] und rheumatoide Arthritis [47]. Th_1 Immunreaktionen respektive eine verstärkte Interferon- γ Produktion sollen laut Literatur auch für GvH-Reaktionen mitverantwortlich sein [48].

Th₂ Zellen produzieren IL-4, IL-5 (beides B-Zell-Wachstumsfaktoren), IL-9, IL-10 und IL-13. Th₂ Immunantworten stehen in Zusammenhang mit der humoralen Immunantwort durch BZ, welche sie aktivieren, und sind für die Bekämpfung extrazellulärer Pathogene wichtig. Für die Differenzierung von CD4⁺ TZ zu Th₂ Zellen ist die Anwesenheit von IL-4 essentiell [49]. Das IL-4 kann von unter anderem basophilen Granulozyten, Mastzellen oder den sogenannten NKT-Zellen, die eine spezialisierte Untergruppe von CD4⁺ TZ sind, stammen. Eine überschießende Th₂ Immunantwort kann zu chronisch entzündlichen Atemwegserkrankungen wie atopischem Asthma und Allergien führen [50;51]. Rus und Kollegen beschrieben 1995 mit Hilfe eines GvHD-Mausmodells, dass sie in den ersten Tagen einer sich entwickelnden GvHD verstärkt Th₂ Zytokine, wie zum Beispiel IL-4, und die Aktivierung von BZ detektierten. Ab ca. Tag 5 stellten sie eine Expansion von Spender-CD8⁺-TZ und eine verstärkte Interferon- γ Produktion durch Spender-CD4⁺- und Spender-CD8⁺ TZ fest [52].

Neben den vorangehend beschriebenen T-Helferzellen wird in der Literatur noch die Existenz weiterer Untergruppen beschrieben, welche als Th₉ und Th₁₇ Zellen bezeichnet werden [53]. Zumindest Th₁₇ Zellen werden von Iclozan et al. mit der Entwicklung einer GvHD in Zusammenhang gebracht. Die Autoren beschreiben, dass Th₁₇ Zellen zwar ausreichend, aber nicht unbedingt erforderlich sind um eine GvHD auszulösen [54]. Th₁₇ produzieren proinflammatorische Zytokine und sind normalerweise unter anderem an der Bekämpfung von Gram-negativen Bakterien und Pilzen beteiligt [55].

Die andere große Hauptgruppe der TZ, welche auf ihrer Oberfläche statt CD4 den Korezeptor CD8 exprimiert, interagiert mit Peptid-MHC-I-Komplexen. MHC-I-Moleküle sind auf fast allen kernhaltigen Zellen zu finden. Die Funktion aktivierter CD8⁺ TZ besteht darin, virusinfizierte oder krankhaft veränderte Zellen durch die Auslösung des programmierten Zelltodes (Apoptose) direkt abzutöten. Dabei setzen die auch als zytotoxische T-Zellen bezeichneten CD8⁺ TZ Granzyme und Perforine aus ihren lytischen Granula frei. Perforin verursacht Löcher in der Zellmembran der Zielzellen. Granzyme sind Proteasen, die zur Auslösung der Apoptose in den Zielzellen beitragen. Ein wichtiges membranständiges Molekül, welches von aktivierten zytotoxischen TZ exprimiert wird, stellt der sogenannte „Fas-Ligand“ (= CD95L) dar. Es kann in Zellen, die den Rezeptor Fas (= CD95) besitzen, den

programmierten Zelltod auslösen. Auch aktivierte Th₁ Zellen exprimieren den Fas-Liganden und sind in der Lage, Fas-tragende Zellen abzutöten. Der auf diese Weise ausgelöste Zelltod scheint für die Eliminierung aktivierter Lymphozyten, die Fas tragen, und somit für die Regulierung von Immunreaktionen wichtig zu sein („Immunologie“, Janeway, 5. Ausgabe).

Die alleinige Interaktion von TZ über ihren TZR bewirkt, wie bereits angedeutet, noch keine Aktivierung der Zellen. Die TZ müssen zusätzliche kostimulatorische Signale über den auf ihrer Oberfläche exprimierten Rezeptor CD28 erfahren. CD28 kann mit den B7-Molekülen B7.1 und B7.2 (die auch als CD80 und CD86 bezeichnet werden) interagieren, welche auf der Oberfläche von APCs zu finden sind [56]. Ist eine naive TZ einmal aktiviert, exprimiert sie eine Vielzahl an Proteinen, die das kostimulierende Signal erhalten oder modifizieren, welches für die klonale Vermehrung und Differenzierung sorgt. Ein solches Molekül ist der bereits erwähnte CD40L, der an das Molekül CD40 auf der Oberfläche von APCs bindet. Diese Interaktion bewirkt nicht nur die Aktivierung der APC, die TZ erhält im Gegenzug ebenfalls Aktivierungssignale. Neben Molekülen, die zur Stimulation der TZ beitragen, werden auf aktivierten TZ auch Moleküle exprimiert, welche die kostimulierenden Signale bei der Entwicklung der T-Zell-Antwort abwandeln. Eines dieser Proteine ist CTLA-4 (CD152), ein weiterer Rezeptor für CD80 und CD86. CTLA-4 ist ein Protein, welches in seiner Sequenz stark dem CD28 ähnelt. Allerdings hat CTLA-4 eine ungefähr 20-mal höhere Bindungsavidität^k für CD80/CD86 als CD28. Im Gegensatz zu CD28 sendet CTLA-4 der aktivierten TZ ein inhibitorisches Signal. Die Bindung der B7-Moleküle an CTLA-4 trägt somit dazu bei, dass die Proliferation der aktivierten T-Zellen als Reaktion auf Antigene begrenzt und damit eine überschießende Immunantwort verhindert wird („Immunologie“, Janeway, 5. Auflage). Neben den beschriebenen T-Zell-Typen existiert noch eine Gruppe an TZ mit suppressiven Eigenschaften. Diese Zellen werden als regulatorische TZ bezeichnet und nachfolgend näher beschrieben.

^k Unter Avidität versteht man die Summe der Affinitäten der vorhandenen Bindungsstellen oder Rezeptoren.

Regulatorische T-Zellen

Regulatorische TZ können allgemein in zwei Subtypen unterteilt werden: „Induzierte“ regulatorische TZ, die sich aus konventionellen CD4⁺ TZ ableiten und in der Peripherie induziert werden (iTregs) und die „natürlich vorkommenden“ CD4⁺CD25⁺ regulatorischen TZ [57].

Die Entwicklung der iTregs aus konventionellen CD4⁺ TZ in der Peripherie wurde bereits vor einiger Zeit beschrieben. Man vermutete in diesem Zusammenhang, dass TZ mit regulatorischer Aktivität eine Art „suppressives Netzwerk“ aufbauen indem sie die Fähigkeit, andere TZ zu supprimieren, auf die von ihnen selbst supprimierten konventionellen CD4⁺ TZ übertragen. Dieser Prozess wurde allgemein als „infectious tolerance“ bezeichnet. Es wurde gezeigt, dass die supprimierten konventionellen CD4⁺ TZ selbst über zellkontaktunabhängige Mechanismen andere konventionelle CD4⁺ TZ supprimieren konnten, etwa über die Produktion suppressiver Zytokine [58-60]. Es ist bekannt, dass die Entwicklung von iTregs aus konventionellen CD4⁺ TZ durch die Anwesenheit immunosuppressiver Zytokine wie TGF-β [61] oder IL-10 forciert wird. Levings und Kollegen beschrieben 2005, dass sogenannte T regulatory type 1 (Tr₁) Zellen auch in Abwesenheit anderer TZ mit regulatorischen Fähigkeiten generiert werden können. Sie beschrieben, dass von unreifen allogenen DCs produziertes IL-10 und eine von ihnen ausgehende chronische suboptimale Aktivierung die Differenzierung naiver peripherer CD4⁺ TZ zu Tr₁ Zellen bewirken kann. Die auf diese Weise generierten Tr₁ Zellen waren anschließend selbst fähig, andere TZ in einer IL-10 und TGF-β abhängigen Weise zu supprimieren [62].

Die natürlich vorkommenden CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen (die im Folgenden kurz als „Tregs“ bezeichnet werden) entstehen im Thymus und wandern als reife, voll funktionelle TZ mit suppressivem Phänotyp in die Peripherie aus. Die Gruppe der Tregs umfasst ca. 5-10% der CD4⁺ TZ in den lymphoiden Organen [63]. Tregs exprimieren konstitutiv CD25¹ (α-Kette des IL-2-Rezeptors) auf ihrer Oberfläche, was bislang als nützlicher Oberflächenmarker für diese Zellen in naiven Mäusen gilt [63;64]. Dennoch ist CD25 kein exklusiver Marker für Tregs, da konventionelle CD4⁺

¹ Der hochaffine Rezeptor für Interleukin-2 (IL-2 = autokriner TZ-Wachstumsfaktor) besteht aus einer α-Kette (CD25), einer β-Kette (CD122) und einer γ-Kette (CD132).

TZ nach ihrer Aktivierung CD25 ebenfalls exprimieren. Experimente mit Mäusen haben gezeigt, dass die Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 (forkhead box P3) charakteristisch für Tregs und wichtig für deren Entwicklung und Funktion ist [65] und somit einen besseren Marker für die Identifizierung dieser Zellen bietet.

Für die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden natürlich vorkommende CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Tregs (Tregs) verwendet. Für einige Experimente wurden diese Tregs *in vitro* voraktiviert und folglich als preTregs (preactivated = voraktiviert) oder voraktivierte Tregs bezeichnet.

1.2.5 Mechanismen Treg-vermittelter Suppression

Das suppressive Potential von Tregs wurde in der Literatur bereits in verschiedenen Zusammenhängen beschrieben. Unter Verwendung diverser Mausmodelle konnte gezeigt werden, dass Tregs die Entstehung experimenteller Autoimmunreaktionen, wie beispielsweise Diabetes, verhindern können [66-69]. Tregs regulieren ebenfalls die homöostatische Proliferation konventioneller TZ in der Peripherie [70] und sind wichtig für die Aufrechterhaltung der immunologischen Selbsttoleranz, indem sie autoaggressive TZ kontrollieren [63]. Immunreaktionen im Zusammenhang mit Transplantatabstoßung oder Allergien [71;72] können durch Tregs offensichtlich ebenfalls supprimiert werden. Des Weiteren weisen unter anderem Hoffmann und Kollegen auf das Potential dieser speziellen T-Zell-Population hin, alloreaktive Spender-TZ nach einer Stammzelltransplantation beziehungsweise die Entstehung einer GvHD deutlich hemmen zu können. So konnten sie mehr als 90% der verwendeten Empfängermäuse in Transplantationsexperimenten, in denen sie allogene CD4⁺ TZ aus MHC-inkompatiblen Spendermäusen injizierten, durch eine Koinjektion frisch angereinigter Tregs vor einer letalen GvHD bewahren [73].

Zahlreiche Studien weisen darauf hin, dass sich Tregs einer Vielzahl von Mechanismen bedienen können, um Immunantworten zu supprimieren. Thornton und Shevach zeigten, dass Tregs andere TZ hemmen, indem sie die Herstellung von IL-2 mRNA in ihren Zielzellen verhindern [74].

Eine Studie von Pandiyan et al. weist auf die Möglichkeit hin, dass Tregs mit konventionellen TZ um exogenes IL-2 konkurrieren, es verbrauchen und damit die Proliferation der konventionellen TZ unterdrücken [75].

Neben der Bedeutung suppressiver Zytokine wie IL-10 oder TGF- β wird auch die Rolle des inhibitorischen Zytokins IL-35 diskutiert. Collison und Kollegen interpretieren ihre Daten dahingehend, dass das Zytokin offenbar ebenfalls zur Treg-vermittelten Suppression beiträgt [76].

Ein weiteres sezerniertes Molekül, welches potentiell eine Rolle bei der Interaktion zwischen Tregs und DCs oder zwischen Tregs und konventionellen TZ spielen kann, ist Galectin-1, ein Mitglied der Familie der β -Galactosidase-bindenden Proteine [77]. Galectin-1 wird vorzugsweise von Tregs exprimiert, wobei die Expression nach deren TZR-Stimulation hochreguliert wird. Es konnte gezeigt werden, dass die Blockierung des Galectin-1 die inhibitorische Wirkung humaner und muriner Tregs reduzierte. Daneben schienen Tregs aus Galectin-1-defizienten Mäusen ein vermindertes suppressives Potential zu zeigen. Kubach et al. beschrieben, dass humane Tregs ein weiteres Mitglied der Galectin-Familie, das Galectin-10, intrazellulär exprimieren [78]. Die Autoren weisen auf die Bedeutung des Galectin-10 für den anergischen Phänotyp und die suppressive Funktion der regulatorischen TZ hin.

Daneben wurde in der Literatur außerdem beschrieben, dass Tregs konstitutiv das Molekül CTLA-4 exprimieren. Es existieren Studien, welche darauf hindeuten, dass durch die Interaktion zwischen Tregs und DCs *in vitro* die Expression der kostimulatorischen Moleküle auf den DCs in einer CTLA-4-abhängigen Weise herunterreguliert werden kann [79]. Tregs aus CTLA-4-defizienten Mäusen zeigen im Vergleich zu Tregs aus Wildtypmäusen eine mangelhafte Fähigkeit, die durch Antigen-spezifische Effektor-TZ induzierte verstärkte CD80/CD86 Expression auf den DCs zu unterdrücken. Außerdem konnte in einer Kokultur von Wildtyp-Tregs und DCs durch ein Blockieren von CTLA-4 auf den Tregs die Suppression der CD80/CD86 Expression auf den DCs teilweise aufgehoben werden [80].

Eine weitere Komponente im Rahmen der suppressiven Wirkmechanismen von Tregs ist laut Deaglio und Kollegen die Koexpression der beiden Ektonukleotidasen CD39 und CD73, die mit einer perizellulären Generierung von Adenosin assoziiert ist [81]. Das Ektoenzym CD39 hydrolysiert ATP und ADP zu AMP^m. CD73 wiederum baut AMP zu Adenosin ab. Adenosin stellt unter anderem laut Huang et al. einen potenten Inhibitor von T-Zell-Antworten dar [82].

^m AMP = Adenosinmonophosphat; ADP = Adenosindiphosphat; ATP = Adenosintriphosphat

Einen weiteren prinzipiellen Mechanismus regulatorischer T-Zellen zur Suppression ihrer Zielzellen stellt, neben den bereits genannten, der Transfer des auch als „second messenger Molekül“ bekannten cAMP dar. Dabei wird cAMP über direkten Zellkontakt via gap junctions ausgehend von den Tregs, die relativ hohe cAMP-Konzentrationen aufweisen, auf andere TZ übertragen [83]. Gap junctions werden aus mehreren Protein-Untereinheiten, den Konnexinen, aufgebaut. Durch eine Zusammenlagerung von 6 Konnexinen entsteht eine flüssigkeitsgefüllte Pore, das Konnexon. Durch enge räumliche Anordnung von Zellen entstehen Kontaktstellen, so dass Konnexone benachbarter Zellen durch eine feste Bindung aneinander gap junctions bilden können [84]. Neben diversen anderen Funktionen, ist cAMP ein potenter Inhibitor von T-Zell-Wachstum, Differenzierung und Proliferation [85]. Will man in Experimenten gezielt die cAMP-Konzentration in Zellen erhöhen, um die daraus resultierenden Effekte zu untersuchen, stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Die Inkubation der Zellen mit Inhibitoren, welche das cAMP-abbauende Enzym Phosphodiesterase (PDE) hemmen, stellt dabei eine Option dar. Rolipram ist ein Inhibitor der PDE4 und wurde in den für die hier vorliegende Arbeit durchgeführten Experimenten verwendet.

Tregs sind in der Lage, neben anderen TZ auch die Aktivierung von DCs zu hemmen. In Vorarbeiten von Fassbender et al. konnte experimentell belegt werden, dass preTregs cAMP und IL-10 in Kombination einsetzen um syngene DCs zu supprimieren. Dabei scheint der Transfer von cAMP zu einem frühen Zeitpunkt der Interaktion für ein reduziertes kostimulatorisches Potential der DCs verantwortlich zu sein, gekennzeichnet durch die reduzierte Expression von CD80 und CD86 auf ihrer Oberfläche. Gleichzeitig wurde eine verstärkte Expression des inhibitorischen Oberflächenmoleküls B7-H3 auf den DCs detektiert. Die frühe und cAMP-vermittelte Suppression der DCs wird offensichtlich durch eine zu einem späteren Zeitpunkt greifende IL-10-vermittelte Suppression ergänzt. Das von den Tregs sezernierte IL-10 konnte die IL-6 und IL-12 Produktion der DCs deutlich inhibieren [86].

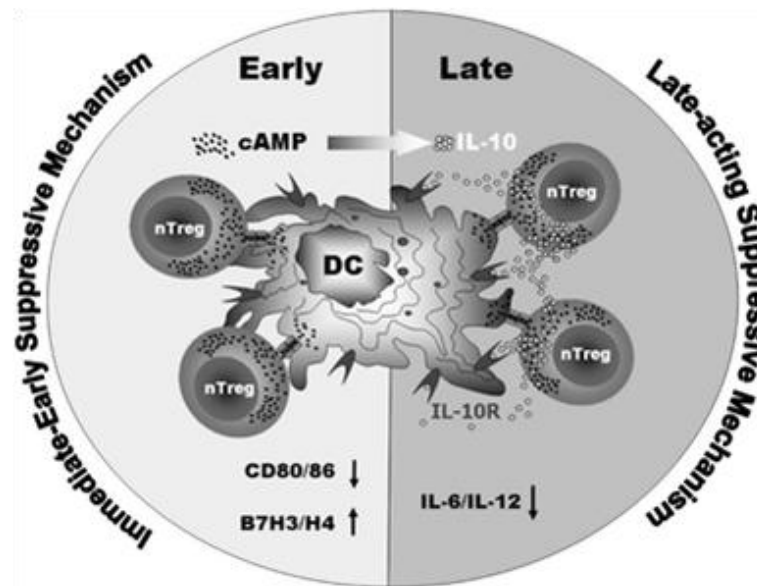


Abb. 1.2.5: Bi-phasisches Modell der Treg-vermittelten Suppression von DCs, nach Bopp et al. (2010), "New strategies for the manipulation of adaptive immune responses", Cancer Immunology, Immunotherapy

Tregs nutzen verschiedene Suppressionsmechanismen um syngene DCs zu hemmen. Diese werden in sofort wirksame und zeitlich verzögert greifende Mechanismen unterteilt. Der Transfer von cAMP von den Tregs auf ihre Zielzellen über direkten Zellkontakt stellt einen früh wirksamen Mechanismus dar und bewirkt die reduzierte Expression kostimulatorischer Moleküle, sowie eine verstärkte Expression inhibitorischer Moleküle auf den DCs. Daneben können Tregs das suppressive Zytokin IL-10 ausschütten und damit die Produktion von IL-6 und IL-12 durch die DC abschwächen. Letztgenannter Mechanismus wird als später greifender Mechanismen eingestuft.

Tregs und GvHD

Hoffmann und Kollegen haben beschrieben, dass IL-10 aus Tregs teilweise für einen protektiven Effekt bei einer durch alloreaktive CD4⁺ TZ ausgelösten GvHD verantwortlich ist [73]. Daten von Mausexperimenten, in denen O'Shaughnessy und Kollegen eine CD4⁺ TZ-vermittelte GvHD untersuchten, weisen darauf hin, dass cAMP auch zur Suppression alloreaktiver CD4⁺ TZ beitragen kann [87]. Die prinzipielle Fähigkeit regulatorischer T-Zellen, Alloreaktivität und somit GvH-Reaktionen zu hemmen, ist in der Literatur insgesamt gut dokumentiert [88-90]. Die zentralen Mechanismen sind allerdings komplex und noch nicht ausreichend geklärt. Um Tregs gezielt für die Manipulation von Immunreaktionen nach allogenen Stammzelltransplantationen einsetzen zu können, müssen die zugrundeliegenden Mechanismen der Treg-vermittelten Suppression zunächst besser verstanden werden.

1.3 Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte zunächst ein Mausmodell zur Untersuchung der akuten GvHD, basierend auf einer MHC-Inkompatibilität zwischen Spender- und Empfängertieren, etabliert werden. Anschließend sollten potentielle Mechanismen zur Hemmung alloreaktiver CD4⁺ und CD8⁺ TZ und damit zur Unterdrückung oder Abschwächung der GvHD nach allogener Knochenmark- und TZ-Transplantation (CD4⁺ und CD8⁺) untersucht werden. Hierbei wurden drei Fragestellungen verfolgt:

Vor dem Hintergrund, dass alloreaktive Spender-TZ ihre initiale Aktivierung an APCs des Empfängers erfahren [36;37], sollte erstens analysiert werden, ob das Fehlen von MyD88- oder TRIF-vermittelten TLR-Signalen in den Zellen des Empfängers in einer abgeschwächten Form der GvHD resultiert.

Zweitens sollten die Mechanismen der Treg-vermittelten Abschwächung der GvHD näher betrachtet werden. Dabei sollte untersucht werden, mit welchen Zellen die Spender-Tregs interagieren und welche Rolle zellkontaktabhängige und zellkontaktunabhängige Mechanismen bei der Suppression alloreaktiver TZ spielen.

Als Drittes sollte untersucht werden, welche Auswirkungen es auf die Entstehung und Manipulation der akuten GvHD hat, wenn die Zellen (somit auch die APCs) der Empfänger MHC-II-defizient sind.

2. Materialien, Methoden und Mäuse

2.1 Mäuse

A-alpha ^{-/-}	genetischer Hintergrund C57BL/6, MHC-II-Knock-Out, Köntgen et al. 1993 [91], ursprünglich von Prof. Wagner TU München, selbst weitergezüchtet
BALB/c	Wildtypstamm, H-2K ^d , ZVTE Uni Mainz
BALB/c-IL-10 ^{-/-}	genetischer Hintergrund BALB/c, Interleukin-10-defizient
BALB/c-OVA tg-Thy1.1	genetischer Hintergrund BALB/c, das Antigen Thy 1 ist auf allen TZ exprimiert, dieser Stamm trägt das Allel Thy1.1 (= CD90.1), welches als Marker in Transferexperimenten diene
C57BL/6	Wildtypstamm, H-2K ^b , ZVTE Uni Mainz
C57BL/6-IL-10 ^{-/-}	genetischer Hintergrund C57BL/6, Interleukin-10-defizient
C57BL/6-Ly5.1	genetischer Hintergrund C57BL/6, der Stamm trägt das Antigen Ly5.1 (= CD45.1), er ist nicht gentechnisch verändert, das Ly5.1 Antigen diene als Marker in Transferexperimenten
MyD88 ^{-/-}	genetischer Hintergrund C57BL/6, MyD88-Knock-Out, Import aus Tübingen (Inst. f. Immunologie, Prof. Rammensee), selbst weitergezüchtet
MyD88 ^{-/-} x TRIF ^{-/-}	MyD88 ^{-/-} x TRIF ^{-/-} Kreuzung, Eigenzucht

TRIF^{-/-} genetischer Hintergrund C57BL/6, mutiertes Allel Ticam1^{LPS2}, ursprünglich vom Paul-Ehrlich-Institut, Division of Immunology in Langen, selbst weitergezüchtet

2.2 Material

2.2.1 Verbrauchsmaterialien

Abdeckplatten	Greiner
FACS-Röhrchen 5 ml	Falcon, BD
FACS-Röhrchen 300 µl	Greiner
Kanülen	BD + Braun
6-Kavitätenplatten	Greiner
24-Kavitätenplatten	Greiner
96-Kavitätenplatten (U-, V-Form)	Greiner
MACS-Säulen LS	Miltenyi
Petrischalen	Greiner
Pipettenspitzen	StarLab
Plastikröhrchen mit Schraubverschluss (15 ml + 50 ml)	Greiner
Skalpelle	Paragon
Spritzen	Omnifix
Sterilfilter (0,2µm) Millex-GP	Millipore
Zellkulturflaschen	Greiner
Zellsiebe (40 + 70 µm)	Falcon, BD

2.2.2 Geräte

ÄKTA Purifier	Amersham Biosciences
Analysenwaage AE100	Mettler
β-Szintillationszähler	LKB
Brutschrank CO ₂ -Inkubator Modell MCO-20AIC	SANYO
Cell counter system (Neubauer Improved)	Assistent

Cell-Harvester LKB 1295-001	LKB
Durchflusszytometer (FACS-Geräte) FACSCanto und LSR II	Becton Dickinson
Feinwaage PM2000	Mettler
HiTrap Protein G HP	GE Healthcare
Kleintierbestrahlungsanlage OB 58-BA, zwei ^{137}Cs Quellen	Buchler
Lichtmikroskop	Leica
Magnet	DYNAL
MIDI-MACS-Magnet	Miltenyi
Maus-Halterung	Kent Scientific
Mehrkanal-Pipette	Eppendorf
Mykroliter-Pipetten	Gilson
pH-Meter	Knick
Pipetboy Comfort	IBS INTEGRA Biosciences
Rüttelgerät KS 250basic	IKA Labortechnik
Sterilbank MSC-ADVANTAGE	Thermo Scientific
Wasserbad	memmert
Zellbestrahlungsanlage Gammacell 2000, eine ^{137}Cs Quelle	Mølsgaard Medical
Zentrifugen HERAEUS Multifuge 3L-R und Varifuge 20 RS	Thermo Scientific

2.2.3 Chemikalien und sonstige Substanzen

Ammoniumsulfat

Fa. Roth

Calcein, Acetoxymethyl Ester

Fa. Invitrogen, Molecular Probes; C1430; Lot: 513375

CD90.2 Microbeads

Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Art.Nr. 130-049-101; LOT 5100226035)

CFDASE (CFSE)

5-(und-6)-Carboxyfluorescein Diacetat, Succinimidyl Ester (5(6)-CFDASE; CFSE),
Molecular Probes Europe BV, Niederlande (C-1157)

Dynabeads

Alle folgenden Dynabeads wurden von der Firma DYNAL bezogen:

Dynabeads Maus pan B (B220)

2 ml Stammlösung ~ 4×10^8 Beads/ml, Prod.No.: 114.01 LOT:E82100

Dynabeads Maus CD8 (Lyt2)

2 ml Stammlösung ~ 4×10^8 Beads/ml, Prod.No.: 114.07 LOT:E81500

Dynabeads M-450 Epoxy

2 ml ~ 4×10^8 Beads/ml Prod.No.: 140.01 LOT: FO8310

EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (Titrierkomplex III)

Fa. Roth Art. Nr. 8043.2

GAP 27

Fa. Tocris bioscience, Art.Nr. 1476

L(+)-Glutamin puriss.

C₅H₁₀N₂O₃ Art.Nr.: 3772.1 Fa. Roth

1-Heptanol

Fa. Sigma Aldrich, Art.Nr. 72954

Kollagenase Typ 2

Aus Clostridium histolyticum, Fa. Worthington Biochemical Corporation, code: CLS-2,
In [1x] HBSS gelöst, Stammlösung 20 mg/ml

Lipopolysaccharid (LPS)

Zur Stimulation von DCs; aus *S. typhimurium*, Fa. Sigma-Aldrich

MEM

eagle modified, w/Eagle's salts w/L-Glutamin, W/o NEAA, w/o Na Bicarbonate
Cat. No.: P0451 Batch No.: MO3786P0451 Fa. Vitromex

Natriumazid reinst (NaN_3)

Fa. Merck, Art.Nr.: 2668730

2-Propanol reinst

Fa. Merck Art.Nr.: 100995

Propidium-Iodid (PI)

Färbt tote Zellen, zum Ausschluss toter Zellen bei der Durchflusszytometrie (FACS) verwendet, Endkonzentration: 0,5 µg/ml; Fa. Sigma

Rolipram, R6520

Fa. Sigma Aldrich, Art.Nr. 61413-54-5

Sa (Streptavidin)-Beads

Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (Art.Nr. 130-048-101; LOT 5100617123)

Serva Pyruvic acid Na-salt

research grade/ $\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_3\text{Na}$ Art.nr. 15220 Fa. Serva

Szintillationsflüssigkeit

Rotiszint eco Roth

Tritium-markierte $^3\text{[H]}$ Thymidin-Desoxyribose

Fa. MP Biomedicals

Tween

Fa. Sigma

2.2.4 Puffer und Lösungen

ACK-Puffer

150 mM NH₄CL; 1 mM KHCO₃; 0,1 mM EDTA; pH 7,3

Wurde zur Erythrozyten-Lyse in Blut und Milzzellsuspensionen verwendet.

Blut-Puffer

30 mM EDTA; 0,01 % NaN₃ in [1x] PBS

Fötiales Kälberserum (FCS):

Das verwendete FCS stammte von der Firma GIBCO (Charge 50G9993X). Es wurde zur Inaktivierung der Komplementkomponenten 45 Min. bei 56°C im Wasserbad erhitzt und dabei alle 15 Min. kurz geschüttelt. FCS wurde anschließend in 100 ml Aliquoten bei 4°C bis zum Gebrauch aufbewahrt. Vor Gebrauch wurde das FCS 20 Min. bei 600 x g abzentrifugiert und nur der Überstand weiter verwendet.

Gey's Lysepuffer

Zur Lyse von Erythrozyten durch osmotischen Schock wurde eine Lösung folgender Zusammensetzung verwendet:

8,29 g/l NH₄Cl (p.a., Fa. Fluka AG)

1 g/l KHCO₃ (Fa. Merck)

0,037 g/l EDTA

in VE-Wasser; pH 7,4; sterilfiltriert (0,2 µm)

Glutamin (Gln)

Stammlösung 200 mM, Fa. Roth (Art. 3772)

7,3 g/250 ml,

14,615 g/500 ml in [1x] PBS ansetzen, sterilfiltrieren (0,2 µm)

GM-CSF

Kulturüberstände, Institut für Immunologie

Großer-MACS-Puffer (GM-Puffer)

Der GM-Puffer diente zur Anreicherung verschiedener T-Zell-Populationen *ex vivo* über das von Miltenyi patentierte MACS-System.

0,5 % BSA

5 mM EDTA

0,01 % NaN₃

in [1x] PBS

HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)

Ref. 14185-045; LOT: 549433 , Fa. Gibco, aus der 10-fach konzentrierten Stammlösung wurde durch Verdünnung in VE-Wasser eine [1x] Arbeitslösung hergestellt und sterilfiltriert (0,2 µm)

Natrium-Pyruvat (0,2 µm sterilfiltriert)

0,1 M in VE-Wasser

11 g/l

PBS (phosphate buffered saline):

Es wurde eine 10-fach konzentrierte Stammlösung in VE-Wasser hergestellt:

1,4 M NaCl (81,8 g/l)

0,1 M NaH₂PO₄ (Fa. Roth) (15,6 g/l)

Der pH-Wert wurde mit 10N NaOH auf 6,6 eingestellt. Der gebrauchsfertige Puffer [1x] wurde durch Verdünnung (1:10) dieser Stammlösung in H₂O dest. hergestellt, der pH-Wert betrug dann 7,2.

[1x] PBS/ 0,5 % BSA wurde nach der Reinigung der MACS-Separationssäulen zur Entfernung des Isopropanol (2-Propanol) benutzt.

[1x] PBS/ 10 % FCS wurde zum Abstoppen der Depletion von B220 Zellen, CD8⁺ TZ und Makrophagen im Rahmen der Treg-Anreicherung verwendet.

[1x] PBS + 1 % FCS

Physiologische Trypanblaulösung

Trypanblau ist ein so genannter Vitalfarbstoff. Tote Zellen werden angefärbt, während lebende Zellen mit intakter Membran den Farbstoff nicht aufnehmen. Mit diesem Farbstoff wurde die Lebendzellzahl in Zellsuspensionen bestimmt. Zu seiner Herstellung wurden die folgenden Lösungen A und B im Verhältnis 5:1 gemischt:

Lösung A: 0,2 % Trypanblau (Fa. Roth, Karlsruhe) in VE-Wasser, sterilfiltriert (0,2 μm)

Lösung B: 4,25 % NaCl (Fa. Roth) in VE-Wasser, sterilfiltriert (0,2 μm)

Rinderserumalbumin (BSA), (Fraktion V), Fa. Biowest

wurde mit PBS [1x] als 10 %ige Lösung angesetzt, sterilfiltriert (0,2 μm) und bei 4°C aufbewahrt

2.2.5 Medien für die Zellkultur

Die Medien wurden als Trockensubstanz von der Firma Gibco (Grand Island, USA) bezogen. Alle Medien und Puffer wurden mit voll entsalztem (Millipore-Entmineralisierungsanlage, Millipore, Molsheim, Deutschland) und durch Aktivkohle gereinigtem Wasser (VE-Wasser) angesetzt, sterilfiltriert (0,2 μm Sterilfilter) und bei 4°C aufbewahrt.

IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium):

17,67 g/l IMDM Trockenpulver

3,02 g/l NaHCO_3

1 % Penicillin/Streptomycinlösung

5×10^{-5} M 2-Mercaptoethanol (Serva, Heidelberg, Nr. 28625)

Phenolrot als Indikator

MEM (minimal essential medium):

10,58 g/l MEM-Trockenpulver

4,77 g/l HEPES

MEM + 2 % FCS

Testmedium

IMDM

5 % fötales Kälberserum (FCS)

1 % Natrium-Pyruvatlösung

1 % Glutaminlösung

Treg-Medium

Testmedium +100 ng/ml mrlL-2 (von Prof. E. Schmitt, Institut für Immunologie, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz zur Verfügung gestellt)

BMDC-Medium

Testmedium + 1,5 % GM-CSF (für C57BL/6)

Testmedium + 2 % GM-CSF (für BALB/c)

2.2.6 Antikörper

Antikörper zur Depletion von NK-Zellen (natural killer cells) *in vivo*

Der Antikörper PK136 (monoklonal, Maus IgG2a, anti-NK1.1) wurde aus Hybridom-Kulturüberständen selbst aufgereinigt. Die Hybridomzellen wurden von Prof. E. Schmitt zur Verfügung gestellt (Institut für Immunologie, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz). Der Antikörper wurde für die Depletion von NK1.1⁺ NK-Zellen in C57BL/6 Mäusen verwendet.

Antikörper zur Depletion von MHC-Klasse II⁺ Zellen *ex vivo*

Der Antikörper M5/114.15.2 (monoklonal, Ratte IgG2b, anti-MHC-II IA+IE) wurde ebenfalls von Prof. E. Schmitt zur Verfügung gestellt und selbst an Dynabeads M-450 Epoxy gekoppelt. Die Kopplung erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll der Fa.

Invitrogen (DYNAL). Der an die beads gekoppelte Antikörper wurde für die Depletion von verunreinigenden MHC-II⁺ Zellen aus Thy1.2⁺ TZ-Populationen verwendet.

Antikörper zur Depletion von CD25⁺ T-Zellen *ex vivo*

Der PC61 (monoklonal, Ratte IgG1, anti-Maus-CD25, anti-IL-2R-alpha) wurde von Prof. E. Schmitt (Institut für Immunologie, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz) zur Verfügung gestellt und selbst an Dynabeads M-450 Epoxy gekoppelt um anschließend für die Depletion von CD25⁺ T-Zellen (Tregs) aus Thy1.2⁺ TZ-Populationen eingesetzt zu werden.

Antikörper zur Anreinigung muriner Treg-Zellpopulationen *ex vivo*

Der biotinylierte Antikörper 7D4 (monoklonal, Ratte IgM, anti-Maus-CD25, anti-IL2R alpha-Kette) zur Anreinigung von CD25⁺ TZ wurde von der Firma BD Pharmingen bezogen.

Antikörper zur Depletion von Makrophagen *ex vivo*

Der anti-MAC-1 Antikörper (Klon M1/70.15.11.5, Ratte IgG2b, monoklonal) wurde von Prof. E. Schmitt (Institut für Immunologie, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz) zur Verfügung gestellt und wurde zur Entfernung verunreinigender Makrophagen aus den angereinigten Treg-Populationen verwendet. Dafür wurde er zuvor an Dynabeads M-450 Epoxy gekoppelt.

Antikörper zur Stimulation von T-Zellen *ex vivo*

Der Klon 37.51 (monoklonal, Hamster IgG, anti-Maus-CD28) wurde von Dr. J.P. Allison durch Dr. G. Leclerq (Universität Gent, Belgien) zur Verfügung gestellt. Die Kulturüberstände wurden mit (NH₄)₂SO₄ gefällt. Der Antikörper wurde Protein G gereinigt.

Der Klon 145-2C11 (monoklonal, Armenian Hamster IgG, anti-Maus-CD3 ϵ) wurde von Dr. J. A. Bluestone (Ben May Institute, Department of Pathology, Chicago, IL, USA) zur Verfügung gestellt.

Antikörper und Streptavidin für die FACS (Fluorescence Associated Cell Scan)-Analyse

Antigen	Klon	Markierung	Hersteller
B220	RA3-6B2	FITC	eBioscience
CD3 ϵ	145-2C11	APC	BD
CD4	RM4-5	PE-Cy7	BD
CD11c	N418	PE-Cy7/APC-Cy7	eBioscience
CD8	53-6.7	APC/APC-Cy7	eBioscience
CD16/CD32	93		eBioscience
CD45.1	A20	APC	eBioscience
CD80	16-10A1	PE	BD
CD86	GL-1	APC	eBioscience
CD90.1	OX-7	PerCP	BD
CD90.2	53-2.1	APC	BD
FoxP ₃	FJK-16s	APC/PE	eBioscience
H2K ^b	AF6-88.5	PE	BD
H-2K ^b	Y3	biotinyliert	N. Akkad
H-2K ^d	SF1-1.1	biotinyliert/FITC	BD
MHC-II	M5/114.15.2	FITC/PE	eBioscience
NK1.1	PK136	biotinyliert	eBioscience
Streptavidin		APC/APC-Cy7/PerCP	eBioscience

2.3 Methoden

2.3.1 Methoden der Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden an einer sterilen Werkbank (Vertikalflow) und mit sterilen Glas-, bzw. Plastikmaterialien und Geräten durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem CO₂-Inkubator (Brutschrank) bei 37°C und 5 % CO₂-Gehalt. Zellen wurden bei 1700 Upm für 5-10 Minuten zentrifugiert. Inkubationen, die in kühler Umgebung erfolgen mussten, wurden im Kühlschrank bei 4°C durchgeführt.

2.3.1.1 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit physiologischer Trypanblau-Lösung verdünnt. Dabei färben sich die toten Zellen blau an, während lebende Zellen den Farbstoff aufgrund ihrer intakten Membran nicht aufnehmen. Mittels einer Neubauerzählkammer wurde die Zahl der lebenden Zellen bestimmt. Nach Auszählen von 16 Einzelquadraten ergibt die ermittelte Zahl (N) durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor (V) und dem Kammerfaktor (10^4) die Anzahl der lebenden Zellen pro Milliliter ($N \times V \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$).

2.3.1.2 Anreinigung von T-Zell-Populationen *ex vivo*

Alle verwendeten TZ-Populationen wurden aus naïven Mäusen mit dem genetischen Hintergrund C57BL/6 oder BALB/c isoliert. Die Reinheit der Zellpopulationen wurde regelmäßig durchflusszytometrisch überprüft.

2.3.1.2.1 Anreinigung von CD4⁺CD25⁺ Tregs

Vorbereitung der Separationssäulen für die Präparation von CD4⁺CD25⁺ Tregs

mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe:

1. Separationssäulen mit 20 ml [1x] PBS +1/1000 Tween 20 spülen
2. Separationssäulen mit 20 ml [1x] PBS spülen

3. Separationssäulen mit 20 ml Isopropanol spülen
4. Separationssäulen in der Werkbank mit sterilem Stempel und Isopropanol spülen, auf 14 ml Röhrchen setzen und mit 5 ml [1x] PBS/ 0,5 % BSA spülen

Milzzellpräparation und Herstellung einer Suspension von Zellen aus der Milz

1. Zentrifuge auf 4°C kühlen
2. Maus/Mäuse durch CO₂-Begasung abtöten
3. Vorlegen von x ml (je nach Anzahl der Milzen verschieden) gekühltem MEM + 2 % FCS
4. Milz entnehmen und in Milzsieb + Petrischale (94 mm) geben
5. Milz vorsichtig mit dem Stempel einer Einmalspritze (1,0 ml) in dem Milzsieb zerreiben
6. mit gestopfter Pasteurpipette (150 mm) gut resuspendieren, Milzsieb gut spülen und Zellsuspension in 50 ml Greinerröhrchen überführen, Petrischale mit ca. 2 ml MEM + 2 % FCS spülen und ebenfalls in 50 ml Greinerröhrchen überführen
7. 10 – 12 Min. Inkubation um Bindegewebsstücke absetzen zu lassen
8. nach der Inkubationszeit Überführen des Überstandes in ein neues 50 ml Röhrchen, Zentrifugation
9. Vorbereiten eines 50 ml Greiner Röhrchens mit einem Zellsieb, vorbenetzen des Zellsiebs mit 1,0 ml MEM + 2 % FCS
10. Absaugen des Überstandes mit Hilfe einer ungestopften Pasteurpipette
11. Zugabe von 1 ml 37°C vorgewärmten Gey's Lysepuffer/Milz
12. Inkubation für 2 Min.
13. Abstoppen durch Zugabe von MEM + 2% FCS
14. Aufgeben der Milzzellsuspension über Zellsieb, Spülen des Röhrchens mit MEM + 2 % FCS und ebenfalls über Zellsieb geben, Zellsieb mit MEM + 2 % FCS spülen
15. Zellzahl bestimmen
16. Zentrifugation und abschließendes Absaugen des Überstandes
17. Einstellen der Milzzellen mit GM-Puffer auf 1×10^8 Zellen/ml

Markierung und Anreinigung der CD4⁺CD25⁺ Tregs

1. Zugabe von 7D4bio 1:400 verdünnt zu den Zellen in 4°C kaltem GM-Puffer, Resuspension
2. Inkubation im Kühlschrank für 20 Min.
3. Wegwaschen des nichtgebundenen 7D4bio durch Zugabe von mindestens doppeltem Volumen kalten (4°C) GM-Puffers, resuspendieren
4. Zentrifugation und abschließendes Absaugen des Überstandes
5. wiederholtes Waschen der Milzzellen: resuspendieren in GM-Puffer, Zentrifugation und abschließendes Absaugen des Überstandes
6. Zugabe von Sa-Beads 1:40 verdünnt, resuspendieren
7. Inkubation im Kühlschrank für 20 Min.
8. in der Zwischenzeit Vorbereitung der LS-Separationssäulen
9. Zugabe von GM-Puffer (je nach Säulenanzahl) Endvolumen: 5 ml pro Säule/max 5×10^8 Zellen/Säule
10. Zellsuspension durch ein 40 µm Zellsieb führen
11. Aufgeben der markierten Zellen (ml-weise) über LS-Separationssäulen der Fa.Miltenyi (max. 5×10^8 Zellen/Säule/5 ml)
12. Spülen des Zellröhrchens mit 2 ml GM-Puffer RT (RT = Raumtemperatur)
13. Spülen der Separationssäulen mit 3 ml RT GM-Puffer 2x
14. Säule aus Magnetfeld nehmen und auf ein 14ml Röhrchen setzen
15. Aufgeben von 5 ml GM-Puffer und Elution der gebundenen Zellen mit einem sterilen Stempel, Eluate vereinigen und erneut über neue Säulen geben (s. 16. – 20.)
16. Zellzahl bestimmen

Entfernen der CD8⁺ TZ, BZ und Makrophagen mit Hilfe von Dynalbeads

1. Die Zellzahl wurde bestimmt, davon waren ca. 30 % Verunreinigung. Von diesen 30 % waren ca. 50 % B-Zellen. Die 8-fache Menge dieser Zahl wurde an anti-B200-Beads eingesetzt (pro Zelle 8 Beads). Die Hälfte des Volumens der anti B220-Beads (in µl) wurde an anti-MAC-1-Beads zugesetzt und von diesem Volumen die 1,5-fache Menge an CD8-Beads. Die Markierung erfolgte

in einem Endvolumen von 0,5 ml [1x] PBS/ 0,5 % BSA in einem 50 ml Greinerröhrchen.

2. 20 Min. auf Rüttler
3. Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 5 ml [1x]PBS/ 10 % FCS
4. Röhrchen in Magneten stellen und 2 Min. warten
5. vorsichtiges Abziehen der sauberen CD25⁺ mit steriler Pasteurpipette und in neues 15 ml Röhrchen überführen
6. Röhrchen erneut mit 5 ml [1x] PBS/10 % FCS füllen und resuspendieren
7. Röhrchen in Magneten stellen und 2 Min. warten
8. vorsichtiges Abziehen der sauberen CD25⁺ mit steriler Pasteurpipette
9. Zentrifugation und abschließendes Absaugen des Überstandes
10. Zugabe von Testmedium (abhängig von Zellzahl), resuspendieren
11. Zellzahlbestimmung
12. Zentrifugation
13. Je nach weiterer Verwendung Zellzahl in TM/ 5 % FCS einstellen

2.3.1.2.2 Anreinigung von Thy1.2⁺ (= CD90.2⁺) TZ

Die Anreinigung der Thy1.2⁺ T-Zellen wurde über das MACS-System der Fa. Miltenyi durchgeführt (s. Protokoll der Treg-Anreinigung). Abweichungen vom Treg-Protokoll:

1. Statt des 7D4bio und der SA-Beads wurden hier CD90.2 Microbeads zur Anreinigung verwendet
2. 55 µl CD90.2 Microbeads pro 1x10⁸ Zellen
3. 15 Min. Inkubation bei 4°C
4. Zentrifugation und anschließendes Waschen des Zellpellets
5. 40 µm Zellsieb
6. es wurde nur 1 Separationsvorgang über Separationssäulen durchgeführt
7. die separierten Zellen wurden anschließend direkt verwendet oder zwecks Erreichens einer höheren Reinheit wie folgt weiterbehandelt:

Depletion verunreinigender MHC-II⁺-Zellen

Für *in vitro* Proliferationstests mit A-alpha^{-/-} DCs sollten die verwendeten T-Zellen möglichst frei von MHC-II⁺ Zellen (vor allem BZ-Verunreinigungen) sein. Laut FACS-Analyse befanden sich in Thy1.2⁺ TZ-Präparationen ca. 5 % BZ. Es wurde für die Depletion mit 7 % Verunreinigung bezogen auf die Thy1.2⁺-Zellzahl gerechnet und 8 Beads pro Zielzelle eingesetzt. Für die Depletion wurde der selbst an Dynabeads M-450 Epoxy gekoppelte Antikörper M5/114.15.2 benutzt. Die Depletion erfolgte in PBS für 30 Minuten auf einem Rüttelgerät bei Raumtemperatur. Nach der Inkubationszeit wurde das Röhrchen in einem Dynalmagneten platziert. Nach 2-minütiger Wartezeit wurden die sauberen Zellen mit Hilfe einer Pasteurpipette entnommen und in ein frisches Röhrchen überführt.

Depletion von Tregs aus Thy1.2⁺ TZ-Präparationen

Bei allogenen Transplantationen mit relativ niedrigen transplantierten Thy1.2⁺ TZ-Zahlen war zu befürchten, dass die Induktion einer akuten GvHD durch die in der Thy1.2-Präparation befindlichen Tregs möglicherweise gehemmt werden könnte. Daher wurden die Tregs mit Hilfe des selbst an Dynabeads M450-Epoxy gekoppelten PC 61 Antikörpers vorher depletiert. Es wurde von 2% Treg-Verunreinigung ausgegangen und mit 8 Beads pro Zielzelle depletiert. Die Depletion erfolgte in PBS auf einem Rüttelgerät für 25-30 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die verunreinigenden Zellen mit Hilfe eines Dynalmagneten entfernt und die sauberen Zellen in ein neues Röhrchen überführt.

2.3.1.3 Voraktivierung von Tregs

Je $1-1,5 \times 10^6$ Zellen pro ml wurden in einer mit anti-CD3 und anti-CD28 beschichteten 24-Kavitäten-Platte in einem Gesamtvolumen von 1 ml/Kavität Treg-Medium stimuliert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂. Über eine Quervernetzung der TZR-assoziierten CD3-Komplexe können TZ mit Hilfe des anti-CD3 Antikörpers primär stimuliert werden. Der Antikörper gegen CD28 diente dabei der Kostimulation der Tregs. Nach 2-3 Tagen wurden die Tregs entweder direkt verwendet oder an Tag

3 mit frischem Treg-Medium 1:2 verdünnt und für weitere ein bis zwei Tage in eine unbeschichtete Platte überführt und im Brutschrank inkubiert. Während der 2 letzten Tage proliferierten die Zellen. Auf diese Weise konnte man die Zellzahlen mehr als verdoppeln. Das Beschichten der 24-Kavitäten-Platten wurde wie folgt durchgeführt: 500 µl/Kavität anti-CD3 [3 µg/ml] in [1x] PBS, Inkubation 30 Min. Brutschrank (37°C, 5 % CO₂), vorsichtiges Absaugen mit ungestopfter Pasteurpipette 1 ml [1x] PBS/Kavität zugeben und kurz danach absaugen, 500 µl/Kavität anti-CD28 [5 µg/ml] in [1x] PBS, 30 Min. Brutschrank, absaugen, kurz 1 ml [1x] PBS/Kavität, absaugen. Im Folgenden werden voraktivierte natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen kurz als „preTregs“ bezeichnet.

2.3.1.4 Anreinigung von Dendritischen Zellen aus der Milz

Nachdem die Mäuse durch CO₂-Begasung abgetötet worden waren, wurden ihnen die Milzen entnommen und je in eine Kavität einer 6-Kavitäten-Platte in je 4 ml [1x] HBSS überführt. Pro Kavität wurden 40 µl Kollagenase aus einer 20 mg/ml Stammlösung zugesetzt. Mit Hilfe einer 1 ml Spritze wurde die Mischung aus HBSS und Kollagenase mehrfach in die Milzen gespritzt. Es folgte eine 25-minütige Inkubation im Brutschrank. Anschließend wurden die Milzen mit zwei Kanülen gründlich in kleine Teile zerzupft und für weitere 25 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurden 80 µl EDTA aus einer 0,5 M Stammlösung pro Kavität zugefügt. Nach einer weiteren 5-minütigen Inkubation im Brutschrank wurden die Suspensionen durch je ein 70 µm Zellsieb geführt und in einem 50 ml Röhrchen aufgefangen. Die Zellsiebe wurden mit PBS + 1 % FCS gespült, die Flüssigkeit wurde ebenfalls aufgefangen und die Zellen anschließend abzentrifugiert. Die weitere Anreinigung der DCs erfolgte mittels Dichtegradienten-Zentrifugation und wurde gemäß dem im Internet unter:

<http://www.axis-shield-density-gradient-media.com/CD2009/cells/C20.pdf>

zu findenden Protokoll (Application Sheet C20; 5th edition, November 2008) von der Firma „Axis-Shield PoC AS“ ab dem Punkt 3b durchgeführt.

2.3.1.5 Differenzierung von „bone marrow-derived dendritic cells“ (BMDCs)

Die BMDCs wurden *in vitro* im Rahmen eines mehrtägigen Reifungsprozesses aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks generiert. Hierzu wurden Stammzellen aus den Ober- und Unterschenkelknochen der Hinterbeine der Mäuse entnommen und mit GM-CSF in Testmedium ausdifferenziert. Nach 7 Tagen konnten unreife BMDCs geerntet werden. Unerwünschte Zellen wurden während der Reifung durch Abspülen nicht-adhärenter Zellen am 3. Tag entfernt. Stark adhärenente Zellen, wie beispielsweise Makrophagen, blieben bei der Ernte an Tag 7 auf dem Boden des Kulturgefäßes zurück. Nach diesem Protokoll wurden zu ca. 85-95 % reine BMDCs gewonnen.

Vor Entnahme der Knochen wurden die Mäuse durch CO₂-Begasung getötet. Die Knochen wurden von Sehnen, Muskeln und Bindegewebsresten gesäubert. Anschließend wurden die beiden Enden der Knochen mit einer Schere abgetrennt und das Knochenmark mit PBS + 1 % FCS mittels einer Spritze und Kanüle ausgespült und resuspendiert. Es erfolgte eine Lyse der Erythrozyten mit Gey's Lysepuffer für 2 Min. Nach Abstoppen der Reaktion mit PBS + 1 % FCS und Abzentrifugation der Zellen wurden diese gezählt und auf 3×10^6 /ml in BMDC-Medium eingestellt. Es wurde je 1 ml der Zellsuspension pro Kavität in eine 6-Kavitätenplatte ausgesät und mit je 3 ml BMDC-Medium aufgefüllt. Nach 3 Tagen wurden die nicht-adhärenenten Zellen vorsichtig mit 3 ml des überstehenden Mediums resuspendiert und entfernt. Den adhärenenten Zellen wurden wieder je 3 ml frisches Medium zugesetzt. An Tag 5 wurden vorsichtig 3 ml des Mediums ohne Resuspension entfernt und durch frisches Medium ersetzt. An Tag 7 konnten die ausdifferenzierten BMDCs durch vorsichtiges Spülen der Kavitäten geerntet werden.

2.3.1.6 Färbung von T-Zellen mit Calcein

Für den Nachweis eines Calcein-Farbstofftransfers, der eine zellkontaktabhängige Interaktion zwischen den verschiedenen Zelltypen anzeigt, von Tregs auf DCs und konventionelle TZ wurden die Tregs mit Calcein beladen. Die Färbung erfolgte in TM für 30 Min. bei 37°C im Brutschrank mit einer Calceinendkonzentration von 0,5 µg/ml.

Nach der Färbung wurden die Zellen 2x in TM/ 5 % FCS gewaschen, anschließend gezählt und auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

2.3.1.7 Färbung von T-Zellen mit CF(DA)SE

Um die Proliferation durch Abnahme des Vitalfarbstoff CFSE im FACS zu bestimmen wurden Thy1.2⁺ TZ nach folgendem Protokoll mit CF(DA)SE gefärbt:

1. Zellen 2x in [1x] PBS, pH 7,4 waschen
2. Bestimmung der Zellzahl
3. 2×10^7 Zellen pro ml in [1x] PBS, pH 7,4 aufnehmen
4. CFSE (Stocklösung 10 mM) auf 1 μ M in [1x] PBS, pH 7,4 einstellen
5. die CFSE-Arbeitslösung 1:1 mit den Zellen in [1x] PBS, pH 7,4 mischen (Endkonzentration CFSE: 0,5 μ M)
6. 4 Min. 37°C, 5 % CO₂ (Brutschrank)
7. mit mindestens 2-fachem Volumen TM/ 10 % FCS abstoppen/ resuspendieren
8. 2x waschen der Zellen in TM/ 10 % FCS (Zentrifugation)
9. 1x waschen der Zellen mit TM/ 5 % FCS (Zentrifugation)
10. Bestimmung der Zellzahl

2.3.1.8 Intrazelluläre Färbung von FoxP3 in Tregs

Die FoxP3-Färbung wurde hauptsächlich zur routinemäßigen FACS-Kontrolle der Reinheit angereinigter Treg-Populationen durchgeführt. Die Durchführung der Färbung erfolgte gemäß der Anleitung von eBioscience (Färbeset, Cat.Nr. 77-5775). Abweichung von der Anleitung: Punkt 9 wurde nicht durchgeführt. Die Färbung erfolgte in einer 96-Kavitäten-Spitzbodenplatte. Der FoxP3-Antikörper wurde 1:200 verdünnt eingesetzt.

2.3.1.9 Färbung von Zellen mit spezifischen Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern für die FACS Analyse

Die Zellen wurden in GM-Puffer in einer 96-Kavitäten-Spitzbodenplatte gefärbt. Die Zellen wurden zunächst in GM-Puffer gewaschen, d.h. resuspendiert und anschließend abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet erneut in GM-Puffer aufgenommen, welchem zuvor die spezifische Antikörpermischung zugefügt wurde. Die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte bei 4°C für 15-20 Min. Die Zellen wurden wiederum gewaschen und zur Analyse in FACS-Röhrchen überführt.

2.3.1.10 Kultur von Hybridomzellen zur Gewinnung des anti-NK1.1 Antikörpers (PK136)

Hybridomzellen stellen das Ergebnis einer Fusion von Myelomzellen und B-Lymphoblasten aus einem mit einem speziellen Antigen immunisierten Wirt dar. Die Zellen besitzen somit die Fähigkeit, sich beliebig oft zu teilen und monoklonale Antikörper zu sezernieren. Der hier verwendete Antikörper bindet spezifisch an NK1.1 auf NK-Zellen (Klon PK136). Eine Injektion des Antikörpers in Mäuse und die Bindung an NK1.1-Zellen *in vivo* resultiert in der Eliminierung dieser Zellen durch Makrophagen. Die Zellen wurden über mehrere Wochen in Zellkulturflaschen kultiviert und dreimal wöchentlich, je nach Dichte, expandiert. Während der ersten 2-3 Tage wurden die Zellen in Testmedium + 10 % FCS + mL-6 [50 U/ml] kultiviert. Danach wurde die mL-6 (von Prof. E. Schmitt, Institut für Immunologie, Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz zur Verfügung gestellt) Konzentration auf 25 U/ml reduziert. Nach ca. 1 Woche wurden die Zellen in Testmedium kultiviert. Die Zellen in dicht bewachsenen Zellkulturflaschen wurden zuletzt ca. 1 Woche nicht mehr expandiert. Die Hybridomzellen wurden durch Zentrifugation von den Kulturüberständen getrennt und verworfen. Die Anreinigung des Antikörpers aus den Kulturüberständen erfolgte nach dem Protokoll 2.3.2.1 bis 2.3.2.3.

2.3.2 Allgemeine Methoden

2.3.2.1 Antikörperfällung mit 60 % Ammoniumsulfat

- schubweise Zugabe des Salzes
- unter Rühren lösen und nach kompletter Salzzugabe noch 1 Std.iterrühren lassen
- anschließend über Nacht im Kühlraum stehen lassen oder 1 Std. auf Eisiterrühren lassen
- Abzentrifugation des gefällten Kulturüberstands (KÜS), 6500 UpM, ca. 7800x g, 20 Min. RT (Varifuge 20RS)
- KÜS nach Zentrifugation sammeln und später im entsprechenden sheep-anti-mouse ELISA testen, ob der gesamte Antikörper (= AK) gefällt wurde, oder noch nachgefällt werden muss
- auf das Pellet immer weiter gefällten KÜS geben und abzentrifugieren
- gesamtes Pellet waschen in 0,1 M NaHCO₃ pH 8,3 + 60% Ammoniumsulfat
- gut resuspendieren, bei 7800x g 30 Min. bei RT abzentrifugieren
- Pellet in 0,1 M NaHCO₃ pH 8,3 aufnehmen
- Zentrifugation 7800x g, 30 Min., RT
- der Antikörper geht jetzt in Lösung
- partikelfrei filtrieren 0,2 µm oder 0,45 µm
- Zentrifugation 7000 UpM, 20 Min.

2.3.2.2 Aufreinigung des Antikörpers über das ÄKTA-Purifier System

Der Antikörper wurde mittels Säulenchromatographie an einer Protein G Säule aufgereinigt. Die Bindung des Fc-Teils des Antikörpers an Protein G ist reversibel und kann durch Senken des pH-Wertes wieder gelöst werden.

- Säulen anschließen (2x 1 ml HiTrap Protein G HP hintereinander geschaltet)
- Säulen spülen mit je 20 ml:
 - PBS

- Elutionspuffer
- PBS
- PBS + 1/1000 Triton X
- PBS
- Säulen beladen, insgesamt 4 Läufe mit je ca. 40 ml AK- Lösung, den Durchlauf also noch 3x über die Säule pumpen, zwischendurch eluieren und spülen
- AK in Bindepuffer = NaHCO_3 pH 8,3
- mit 20 ml PBS spülen
- Elution (bis der Schreiber zur Basislinie zurückkehrt) mit ca. 5-8 ml Elutionspuffer (= 0,1 M glycine-HCl, pH 2,7); Eluat zwecks Neutralisation in 1 M Tris-HCl pH 9 auffangen

2.3.2.3 Konzentrieren und Entsalzen des aufgereinigten Antikörpers

- poolen der neutralisierten Eluate
- nochmals Fällung des Antikörpers mit selber Salzkonzentration wie zu Beginn (60 % Ammoniumsulfat)
- Dialyse mit PD-10 Desalting Column (Fa. Amersham Biosciences) lt. Herstellerprotokoll
- AK sterilfiltrieren (0,2 μm), Konzentration bestimmen

2.3.2.4 Kopplung von Antikörpern an Epoxybeads M-450

Die Kopplung von Antikörpern (z.B PC61) an Epoxybeads erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers der Beads (Fa. DYNAL).

2.3.2.5 Analysen mit dem FACS

Die allgemeine Bezeichnung des Verfahrens lautet Durchflusszytometrie. Das Prinzip der Untersuchung beruht auf der Emission von optischen Signalen seitens der Zelle, wenn diese einen Laserstrahl passiert. Hierbei werden in einer Lösung befindliche Zellen durch eine Kapillare gesaugt und passieren im Sensormodul einzeln einen

Laserstrahl. Die Zelle emittiert dabei Streulicht und wenn Fluorochrom-gekoppelte Antikörper gebunden sind Fluoreszenzimpulse, woraus man unterschiedliche Eigenschaften der Zelle ableiten kann. Das Streulicht wird durch Zellgröße, die Struktur der Zellmembran sowie intrazelluläre Bestandteile beeinflusst. Die Zellen können damit in unterschiedliche Fraktionen sortiert und gezählt werden. Hierzu dienen 2 Parameter: Das Vorwärtsstreulicht FSC (Forward Scatter) wird durch Beugung des Lichts hervorgerufen und dient als Maß für die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht SSC (Side Scatter) wird durch Brechung des Lichts hervorgerufen und dient als Maß für die Granularität. Zudem kann die Probe vorher mit Antikörpern, die gegen bestimmte Merkmale gerichtet sind und die mit verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen (Fluorochromen) gekoppelt sind, inkubiert werden. Nach Markierung kann die Sortierung nach diesen Merkmalen erfolgen.

Zu folgenden Zwecken wurden FACS-Analysen durchgeführt:

- Vorversuche unter anderem zur Austitration von Antikörpern und zum Test deren Reaktivität
- Überprüfung der Reinheit isolierter Zellpopulationen (Tregs, DCs, Thy1.2⁺ TZ)
- Analyse von Zellen hinsichtlich ihres Aktivierungsstatus und ihrer Proliferation im Rahmen der durchgeführten *in vitro* und *in vivo* Experimente
- Calceintransfer-Experimente zum Nachweis von einer Kommunikation über gap junctions
- Analysen von Blut oder Milzen der Empfängermäuse in Transplantationsexperimenten, um nachzuweisen, dass keine Abstoßung der transplantierten Zellen durch die Empfängerorganismen stattgefunden hat

2.3.3 Gemischte Lymphozyten/Leukozyten Reaktion *in vitro* (MLR = „Mixed Leukocyte Reaction“)

Alle *in vitro* Experimente mit Zellen wurden in Testmedium durchgeführt. Die Ansätze wurden bei 37°C und 5 % CO₂ in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre im Inkubator (Brutschrank) inkubiert. Das Prinzip der MLR besteht darin, dass APCs (wie DCs) mit TZ aus einem genetisch fremden, allogenen, Mausstamm inkubiert werden. Die alloreaktiven TZ werden von den APCs aktiviert und fangen an zu proliferieren. In

Ansätzen, welche der Untersuchung der Treg-vermittelten Suppression alloreaktiver TZ dienen sollten, wurden Tregs zugesetzt, welche aus demselben Mausstamm stammten wie die Effektor-TZ (syngen). Die MLR stellt eine praktische, leicht durchzuführende Methode dar, mit welcher im Prinzip die *in vivo* Situation nach einer allogenen Stammzell- bzw. T-Zell-Transplantation *in vitro* imitiert wird. Als stimulatorische APCs wurden BMDCs oder Milz-DCs verwendet. Die allogenen Effektor-TZ wurden mit CD90.2 (= Thy1.2) Microbeads aus Milzellsuspensionen angereinigt und werden im Folgenden als Thy1.2⁺ TZ oder kurz TZ bezeichnet. Thy1.2 wird auf allen TZ-Typen exprimiert, weshalb die eingesetzten Thy1.2⁺ TZ, sofern nicht gezielt z.B. Tregs depletiert wurden, eine Mischung aus allen TZ (CD4⁺, CD8⁺, CD25⁺) darstellten. In wenigen Experimenten wurden Milzzellen aus genetisch verschiedenen Mausstämmen für die MLR eingesetzt. Eine der Milzellsuspension wurde mit 1x 20 Gy bestrahlt, so dass die enthaltenen Zellen (z.B. TZ) nicht mehr proliferierten und die enthaltenen APCs zur Stimulation der allogenen TZ aus der anderen Milzellsuspension dienten.

2.3.3.1 CFSE-Proliferationstest *in vitro*

Um die Proliferation alloreaktiver TZ *in vitro* mittels FACS-Analyse zu untersuchen, wurden diese mit CFSE gefärbt bevor sie in die Kultur zu den anderen Zellen gegeben wurden. Mit CFSE lassen sich die Zellen langanhaltend markieren (Färbeprotokoll siehe oben). Der Farbstoff passiert als Diacetat (Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDASE)) die Zellmembran und wird in der Zelle durch Abspaltung der zwei Acetatgruppen zu Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) umgewandelt, welches grün fluoresziert. Proliferieren die Zellen, geben sie den Farbstoff anteilig an die Tochterzellen weiter, deren Fluoreszenzintensität damit um den Faktor 2 geringer ausfällt als die der „Mutterzelle“. Trägt man bei der durchflusszytometrischen Analyse die CFSE-Fluoreszenzintensität auf der x-Achse gegen die Zellzahl auf der y-Achse auf, zeigt sich bei frisch gefärbten und unmittelbar analysierten Zellen ein peak im Bereich starker Fluoreszenzintensität. Durch die Proliferation der Zellen entstehen zunehmend peaks im Bereich niedrigerer Fluoreszenzintensität.

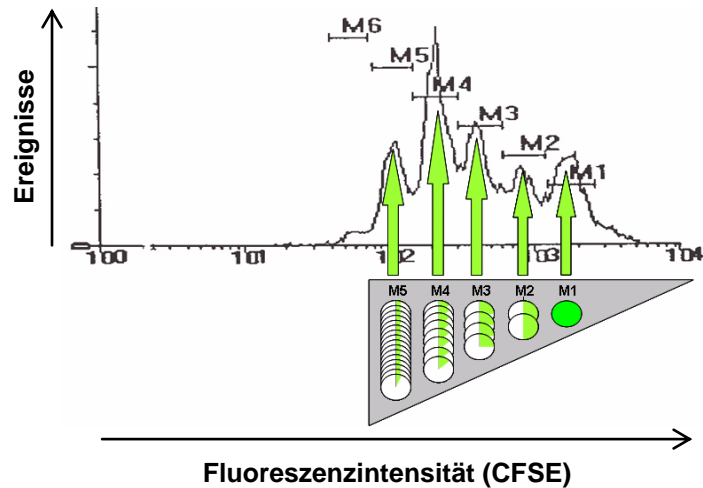


Abb. 2.3.3.1 : Schematische Darstellung des Prinzips des CFSE-Proliferationstests

Es ist das CFSE-Signal proliferierender Zellen dargestellt. CFSE wird gleichmäßig auf die jeweiligen Tochterzellen verteilt. Die Proliferation korreliert daher mit einer schrittweisen Abschwächung des CFSE-Signals.

Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die Zellen vor der FACS-Analyse noch zusätzlich mit spezifischen Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert werden können und dadurch die Proliferation der $CD8^+$ von der Proliferation der $CD4^+$ TZ unterschieden werden kann. Darüber hinaus kann zusätzlich z.B. die veränderte Expression von Aktivierungsmarkern auf den Zellen nachgewiesen werden. Sofern nicht anders angegeben, wird in den Abbildungen der prozentuale Anteil CFSE-schwacher und somit proliferierter TZ dargestellt. Es werden alle Tochterpopulationen zusammengefasst und nur die ursprüngliche und somit nicht proliferierte Population mit der höchsten CFSE-Intensität ausgegrenzt.

2.3.3.2 Calcein-Transfer *in vitro*

Zum Nachweis der zellkontaktabhängigen Interaktion zwischen Tregs und TZ oder DCs wurden die Tregs mit Calcein markiert, bevor sie in die MLR gegeben wurden (Färbeprotokoll s.o.). Der Calcein-AM (AM = Acetoxymethylester) kann durch die Zellmembran in die lebenden Zellen eintreten. Im Zellinneren wird die Acetoxymethyl-Gruppe durch Esterasen abgespalten und Calcein-AM in Calcein umgewandelt. Das Calcein kann Kalziumionen innerhalb der Zellen komplexieren, was in einer grünen Fluoreszenz resultiert. Dieser Komplex kann die Zellmembran nicht mehr passieren,

ist jedoch klein genug, um über gap junctions auf andere Zellen übertragen zu werden [92] und kann durchflusszytometrisch gemessen werden. Für die MLR wurden DCs mit allogenen Thy1.2⁺ TZ und Tregs in je einer Kavität einer 96-Kavitäten-Platte (Rundboden) im Brutschrank inkubiert. Bevor die Zellen nach ca. 17 bis 20 Stunden für die durchflusszytometrische Analyse geerntet wurden, wurde EDTA in jede Kavität pipettiert und resuspendiert (Endkonzentration 10 mM) um Zellaggregate aufzulösen. Es sollte die Messung von aneinanderhängenden Zellen vermieden werden, da dies zu fälschlich positiven Calceinwerten hätte führen können. Aus demselben Grund wurden bei der FACS-Messung außerdem der FSC-H (Height) gegen den FSC-A (Area) in einem Dot Blot dargestellt und nur Zellen analysiert, welche sich auf der Diagonalen befanden. Damit sollte sichergestellt werden, dass nur einzelne Zellen gemessen werden. In einigen Experimenten wurde GAP27 eingesetzt. Es sollte bewiesen werden, dass ein zellkontaktabhängiger Calcein-Transfer zwischen den Zellen stattfindet, der über gap junctions bewerkstelligt wird. Der gap junction Inhibitor GAP27 wurde in einer Endkonzentration von 300 µM eingesetzt. Die Tregs wurden mit dem GAP27 für 60 Minuten präinkubiert, anschließend wurden die Zellen in Testmedium gewaschen, abzentrifugiert und in die MLR-Kultur gegeben. Als zusätzlicher Nachweis dafür, dass bei der durchflusszytometrischen Messung keine Zellaggregate gemessen wurden, wurden Parallelansätze mit CFSE statt Calcein durchgeführt. CFSE ist ebenfalls grün fluoreszent, kann aber nur in höchstens sehr geringen Mengen über gap junctions übertragen werden. Die Tregs wurden vor der MLR mit CFSE gefärbt und es wurde gezeigt, dass nach der Inkubation mit den anderen Zellen nach wie vor nur die Tregs eine grüne Fluoreszenz zeigten.

2.3.3.3 Untersuchung des Phänotyps Dendritischer Zellen

Um eine Veränderung des Phänotyps Dendritischer Zellen als Folge einer Interaktion der Zellen mit allogenen Tregs und Effektor-TZ zu untersuchen, wurden 3×10^4 BMDCs mit 1×10^5 Thy1.2⁺ TZ und $1,5 \times 10^5$ preTregs pro Kavität einer 96-Kavitäten-Rundbodenplatte ausgesät. Als Kontrolle wurde eine Kultur ohne preTregs angesetzt. Nach einer vierstündigen Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ wurden die Zellen einer FACS-Analyse unterzogen. Hierbei wurde der Aktivierungszustand der

BMDCs, gemessen an der Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf der Oberfläche der Zellen, analysiert. Es ist bekannt, dass CD80/CD86 bei einer Aktivierung von BMDCs verstärkt exprimiert werden. Bevor die Zellen aus der Kultur einer Färbung mit spezifischen Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern unterzogen wurden, wurde ein so genannter Fc-Block durchgeführt. Auf der Oberfläche von unter anderem DCs befinden sich sogenannte Fc-Rezeptoren (CD16, CD32), welche unspezifisch FACS-Antikörper binden könnten. Um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern, wurden die Zellen vor der eigentlichen Antikörperinkubation für 10 Minuten bei 4°C mit anti-CD16/anti-CD32 präinkubiert. Anschließend wurden die spezifischen Antikörper zugefügt und die Zellen nach einer weiteren 15-minütigen Inkubation bei 4°C und einem abschließenden Waschschrift *via* FACS analysiert.

2.3.3.4 Untersuchung der Proliferation von alloreaktiven T-Zellen *via* ³[H]-Thymidin-Inkorporation

Um die Hemmung der Proliferation alloreaktiver TZ durch preTregs oder Substanzen wie Rolipram oder db-cAMP zu untersuchen, wurden die Zellen in einer 96-Kavitäten-Platte (Rundboden) über 4 Tage in einem Gesamtvolumen von 200µl Testmedium inkubiert. Die Proliferation wurde direkt über den Einbau von radioaktivem ³[H]-Thymidin in die Desoxyribonukleinsäure (DNA) der sich teilenden Zellen bestimmt. Dazu wurden die Zellen in den letzten 18 - 24 Stunden der Stimulation mit 0,52 µCi [³H]-Thymidin/Kavität inkubiert. Anschließend wurde die 96-Kavitäten-Platte bei -20°C eingefroren, um einen weiteren Einbau von ³[H]-Thymidin zu verhindern. Zum Messen der Proliferationsrate wurden die Platten wieder aufgetaut und der Inhalt der einzelnen Kavitäten mit Hilfe eines speziellen Erntegerätes (Cell Harvester 1295-001, LKB, Freiburg) durch einen Glasfaserfilter gesaugt, wobei die DNA auf dem Filter zurückgehalten wurde. Der Glasfaserfilter wurde 2 Min. in einer Mikrowelle (850 W) getrocknet und zusammen mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit in einem Plastikbeutel eingeschweißt. Die Messung der Radioaktivität erfolgte in einem beta-Szintillationszähler. Dabei wurde die vom radioaktiven Präparat ausgesandte beta-Strahlung über die Anregung von Lösungsmittelmolekülen auf einen primären Szintillator übertragen, der die Energie in Form von elektromagnetischer Strahlung

freigibt. Diese wiederum wird vom Szintillationszähler über eine Photozelle elektrisch als Lichtimpuls verarbeitet und als Impulse pro Minute (CPM) angegeben.

2.3.4 Tierexperimentelle Methoden

Die Behandlungen der Tiere wurden stets in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz durchgeführt. Es wurden in der Regel Mäuse in einem Alter von 6 bis 11 Wochen verwendet.

2.3.4.1 Immunisierung von Versuchsmäusen mit Milzzellen

Zur Immunisierung der Versuchstiere gegen allogene Zellen aus Tieren mit einem anderen genetischen Hintergrund wurden den Versuchsmäusen 2×10^7 allogene Milzzellen in einem Volumen von 100 μ l PBS intraperitoneal (ip) injiziert. Eine Woche später wurde ein *in vivo* Zytotoxizitätstest durchgeführt.

2.3.4.2 *In vivo* Zytotoxizitätstest

Der *in vivo* Zytotoxizitätstest ermöglicht die Analyse der lytischen Funktion zytotoxischer TZ ($CD8^+$) direkt im Versuchstier. Die Versuchsmäuse wurden zunächst durch Injektion von Milzzellen aus Mäusen eines Stammes mit einem anderen genetischen Hintergrund immunisiert. 7 Tage nach Immunisierung der Versuchstiere wurden 1×10^7 Milzzellen aus den Mäusen, gegen deren Haplotyp immunisiert wurde, intravenös in die Versuchstiere injiziert. Die Zellen sollten, sofern im Vorfeld eine erfolgreiche Immunisierung stattgefunden hat, lysiert werden. Parallel wurden syngene Milzzellen injiziert, welche normalerweise nicht lysiert werden. Die beiden Zellpopulationen wurden zahlenmäßig im Verhältnis 1:1 injiziert und konnten durch Markierung mit unterschiedlichen CFSE-Konzentrationen (0,4 μ M und 4 μ M) bei der FACS-Analyse unterschieden werden. Kommt es zur Lyse der Zielzellen, verändert sich das Verhältnis der beiden Zellpopulationen zueinander. Zur Bestimmung des genauen Ausgangsverhältnisses der beiden injizierten Zellpopulationen, wurden diese in nicht-immunisierte Mäuse gespritzt. Nach einer Inkubationszeit von circa 18 - 20 Stunden wurden den Versuchstieren entweder

Blutproben oder die Milzen entnommen und jeweils zur durchflusszytometrischen Untersuchung aufgearbeitet. Es wurde eine definierte Zahl CFSE-positiver Zellen pro Messprobe gemessen und das Verhältnis der beiden unterschiedlich stark CFSE-markierten Populationen zueinander ermittelt. Die spezifische Lyse der Zielzellen wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Spezifische Lyse (\%)} = 100 \times \frac{(N_{\text{neg}} - N_{\text{imm}})}{N_{\text{neg}}}$$

N_{neg} = Anteil der Zielzellen in nicht immunisierter Kontrollmaus

N_{imm} = Anteil der Zielzellen in immunisierter Maus

2.3.4.3 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte durch einen kleinen Einschnitt in eine der Schwanzvenen. 2 bis 3 dicke Tropfen Blut wurden in 1 ml Blutpuffer aufgefangen. Zur Lyse der Erythrozyten wurde jede Probe mit 5 ml ACK-Puffer gemischt und ca. 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert und in FACS-Puffer aufgenommen um nachfolgend mit spezifischen Fluorochromgekoppelten FACS-Antikörpern markiert zu werden.

2.3.4.4 Milzentnahme

Vor der Organentnahme wurden die Tiere durch CO₂-Begasung abgetötet. Die Milz wurde entnommen und zunächst mit einem Stempel einer 1ml Spritze durch ein 40 µm Nylonsieb gedrückt. Die Zellen wurden mit PBS in 50 ml Röhrchen gespült und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml ACK-Puffer resuspendiert und für 10 Minuten bei Raumtempwratur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, in FACS-Puffer aufgenommen und je nach Bedarf mit spezifischen Antikörpern inkubiert.

2.3.4.5 Injektion von Antikörpern zur Depletion von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) *in vivo*

NK1.1, ein Mitglied der NKRPI Familie der Oberflächenrezeptoren, wird auf NK-Zellen und einigen Thymozyten und peripheren TZ bestimmter Mausstämme (z.B. C57BL/6) exprimiert. Eigene Vorarbeiten und Literaturangaben [93-95] lieferten Hinweise darauf, dass NK-Zellen des Empfängers bei der Abstoßung allogener Transplantate eine Rolle spielen können. Somit bekamen die C57BL/6 Mäuse den NK-Zellen-depletierenden Antikörper als Vorbereitung auf die allogene Transplantation injiziert. Jede charge des selbst gewonnenen und aufgereinigten anti-NK1.1 Antikörpers wurde vor ihrer Verwendung auf Funktionalität getestet. Hierzu wurden zunächst je 250 oder 500 µg des Antikörpers ip in Mäuse injiziert. Nach 2 Tagen wurde den Mäusen Blut entnommen und mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich der Depletion der NK-Zellen analysiert. Als Referenz wurde das Blut einer unbehandelten Maus analysiert. Entsprechend bekamen später die Versuchstiere 250 oder 500 µg des selbst aufgereinigten Antikörpers in einem Volumen von 100 µl PBS 2 Tage vor der folgenden allogenen Transplantation ip injiziert.

2.3.4.6 Injektion von Rolipram

Einige der Empfängertiere bekamen vom Tag der allogenen Transplantation an bis einschließlich 4 Tage nach der Transplantation täglich Rolipram in einer Konzentration von 0,3 mg pro kg Körpergewicht in einem Volumen von 100 µl PBS ip injiziert.

2.3.4.7 Bestrahlung der Versuchsmäuse

Aufgrund der konstitutiv hohen Teilungsrate der meisten myeloischen Zellen reagiert das hämatopoetische System sehr sensitiv auf Schädigungen der DNA und des Replikationsapparates. Da durch radioaktive Bestrahlung mit einer letalen Dosis nahezu das gesamte hämatopoetische System zerstört wird, muss anschließend eine Rekonstitution mit syngenen oder allogenen Knochenmark erfolgen, da die Tiere sonst innerhalb einiger Tage versterben würden. Die Mäuse, welche einer

allogenen Transplantation unterzogen werden sollten, wurden in einer Kleintierbestrahlungsanlage mit zwei Cäsium-137-Quellen bestrahlt.

BALB/c Mäuse: 1x 8 Gy (letale Dosis)

C57BL/6 Mäuse: 1x 6,5 Gy (subletale Dosis)

2x 5,5 Gy (letale Dosis) im Abstand von mindestens 4 Stunden, um die Darmtoxizität möglichst gering zu halten.

2.3.4.8 Allogene Transplantation

Transplantation mit BALB/c Mäusen als Empfänger:

Die Empfängertiere wurden 4 - 24 Stunden vor der Transplantation letal bestrahlt. Ab diesem Zeitpunkt bekamen die Tiere autoklaviertes Trinkwasser mit Borgalzusatz (Antibiotikum) um eventuelle Infektionen zu vermeiden. Es wurden Knochenmarkzellen, sowie Thy1.2⁺ TZ und bei einigen Mäusen preTregs oder nicht-voraktivierte Tregs (alles aus allogenen C57BL/6 Spendern) in den jeweils angegebenen Zellzahlen durch intravenöse Injektion in eine der lateralen Schwanzvenen transplantiert.

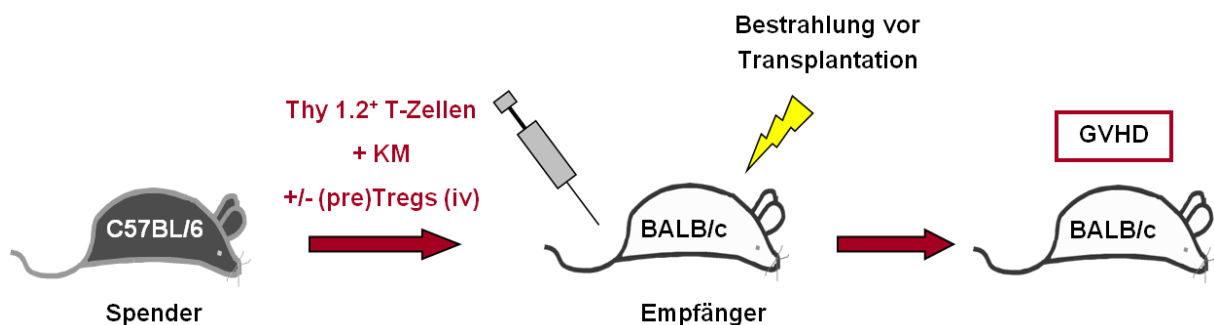


Abb. 2.3.4.8a: Schematische Darstellung einer allogenen Transplantation mit BALB/c Empfängerermäusen und C57BL/6 Spendermäusen

Einige Stunden nach der Bestrahlung der Empfänger bekamen diese Thy1.2⁺ TZ und Knochenmarkzellen aus C57BL/6 Spendern intravenös injiziert. Einige Tiere bekamen ergänzend Tregs oder preTregs ebenfalls intravenös verabreicht. Anschließend wurden die Empfänger in einem Zeitraum von ca. 30-45 Tagen regelmäßig auf akute GvHD-Symptome untersucht.

Transplantation mit C57BL/6 Mäusen als Empfänger:

In den C57BL/6 Mäusen wurde 2 Tage vor der Transplantation eine Depletion der NK-Zellen durchgeführt, um das Risiko einer Transplantatabstoßung zusätzlich zu reduzieren. Von diesem Zeitpunkt an bekamen die Tiere autoklaviertes Trinkwasser mit Borgal gereicht. Die Mäuse wurden 4 - 24 Stunden vor der Transplantation entweder subletal oder mit einer letalen Dosis bestrahlt. Nach subletaler Bestrahlung wurden Thy1.2⁺ TZ aus BALB/c Spendermäusen transplantiert. Nach einer letalen Bestrahlung wurden den Tieren zusätzlich Knochenmarkzellen (BALB/c) transplantiert. Einige Tiere erhielten außerdem Tregs oder preTregs (BALB/c). Die Injektion der Zellen in der jeweils angegebenen Anzahl erfolgte iv.

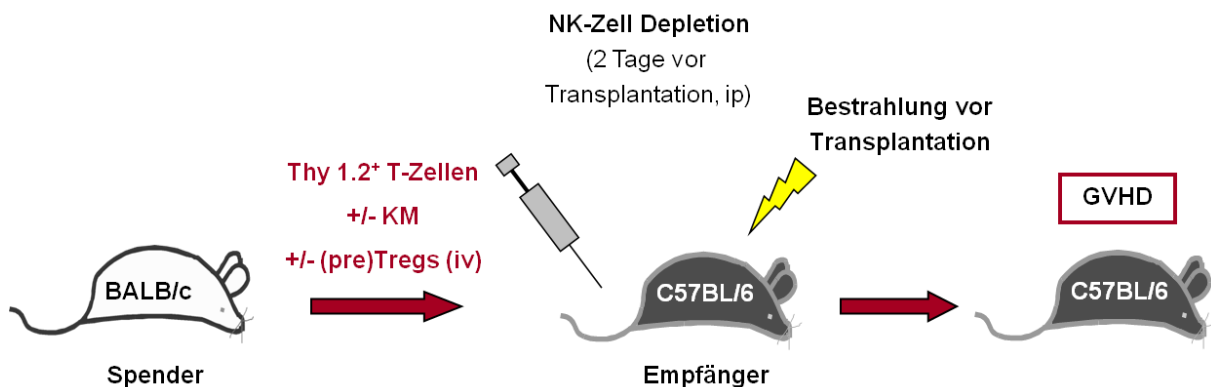


Abb. 2.3.4.8b: Schematische Darstellung einer allogenen Transplantation mit C57BL/6 Empfängermäusen und BALB/c Spendermäusen

Zwei Tage nachdem den Empfängermäusen ein NK-depletierender Antikörper (PK136) intraperitoneal verabreicht wurde, erfolgte die Bestrahlung der Mäuse. Einige Stunden später bekamen die Tiere Thy1.2⁺ TZ und zumindest nach einer letalen Bestrahlung zusätzlich Knochenmarkzellen aus BALB/c Spendern intavenös injiziert. Einige Empfängermäuse bekamen ergänzend Tregs oder preTregs ebenfalls intavenös verabreicht. Anschließend wurden die Empfänger in einem Zeitraum von insgesamt ca. 30-45 Tagen regelmäßig auf akute GvHD-Symptome untersucht.

2.3.4.9 Beurteilung der Versuchsmäuse nach allogener Transplantation zur Erfassung des Schweregrads der akuten GvHD-Symptome

Vom Tag der Transplantation an wurden die Versuchstiere in einem Zeitraum von in der Regel ungefähr 30 bis 45 Tagen regelmäßig äußerlich auf akute GvHD-Symptome untersucht und gemäß den folgenden Kriterien in Anlehnung an eine Veröffentlichung von Beyersdorf und Kollegen beurteilt [96]:

Gewichtsverlust

- 0 < 10%
- 1 10 % - 25%
- 2 > 25%

Aktivität

- 1 leicht bis mittelstark eingeschränkt
- 2 ruhend, außer wenn die Maus animiert wird

Haltung

- 1 Krümmung im Ruhestand erkennbar
- 2 starke Krümmung, beeinträchtigt Bewegung

Fellbeschaffenheit

- 1 leicht bis mittelmäßig struppig
- 2 stark struppig/ kaum geputzt

Hautintaktheit

- 1 Schuppen an Pfoten/ Schwanz, Spuren beginnenden Haarausfalls
- 2 deutliche haarlose Stellen, Hautläsionen

Die Summe der Punkte, die jeder Maus für alle Kriterien insgesamt zugeteilt wurden, ergab den klinischen GvHD Index. Der Index spiegelt somit den Schweregrad der GvHD Symptome der Mäuse wider. In den im Ergebnisteil gezeigten Abbildungen wird der Mittelwert der GvHD-Indizes aller Mäuse der jeweiligen Empfängergruppe dargestellt. Neben den GvHD-Symptomen wurde außerdem das Überleben der Tiere dokumentiert. Tiere, deren Gewichtsverlust über mindestens drei Tage anhaltend mehr als 30 % betrug, die lethargisch wurden und die Futteraufnahme einstellten oder ab dem 10. Tag nach der Transplantation einen GvHD-Index von mindestens 6 hatten wurden euthanasiert. Den Empfängermäusen wurde routinemäßig 6 - 8 Tage nach der Transplantation Blut entnommen und durchflusszytometrisch analysiert um sicherzustellen, dass die transplantierten Zellen nicht von den Empfängerorganismen

abgestoßen worden waren. Es wurden jeweils H-2K^b und H-2K^d mit Fluorochromgekoppelten Antikörpern markiert. Als Kontrolle dafür, dass die Antikörper spezifisch gebunden haben, wurde jeweils das Blut einer unbehandelten C57BL/6 und einer BALB/c Maus untersucht. Die Daten werden im Ergebnisteil nicht gezeigt, die Kontrolle wurde dennoch nach jeder Transplantation durchgeführt. Sobald die Tiere erste Krankheitsanzeichen zeigten, bekamen sie bei jeder Untersuchung aufgeweichtes Futter (in autoklaviertem Wasser + Borgal) in den Käfig gelegt, damit die geschwächten Mäuse ohne große Anstrengung Nahrung aufnehmen konnten.

2.3.4.10 *In vivo* Proliferationstest

Sofern die Aktivierung und Proliferation transplantierte allogener TZ in den Empfängertieren verfolgt werden sollte, wurden diese vor der Transplantation mit CFSE (Endkonzentration beim Färben 0,5 - 2,5 µM) markiert. 5 bis 6 Tage nach der Transplantation wurden den Versuchsmäusen die Milzen oder Blut entnommen und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Auf diese Weise konnte mit Hilfe der CFSE-Markierung, analog zum *in vitro* Proliferationstest, die Aktivierung/Proliferation der alloreaktiven TZ in den Tieren nachgewiesen werden.

2.3.5 Statistik

Es wurden, wie in den Abbildungen (Abb.) des Ergebnisteils angegeben, bei einigen Experimenten beziehungsweise innerhalb der Experimente für einige relevante Vergleichswerte statistische Analysen durchgeführt. Bei *in vitro* Experimenten und den GvHD-Indizes wurde der studentische t-Test (2-seitig, Typ 2), für die Überlebensraten der Log-rank (Mantel Cox) Test angewandt. Unterschiede wurden als signifikant eingestuft wenn $p < 0,05$ war.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung eines Mausmodells für die Untersuchung von Mechanismen zur Suppression der akuten GvHD

Die GvHD stellt eine schwerwiegende Komplikation dar, die häufig nach Fremdspender-Knochenmarktransplantationen auftritt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte zunächst ein Mausmodell etabliert werden, mit dessen Hilfe anschließend die Entstehung einer akuten GvHD und potentielle Mechanismen zu ihrer Unterdrückung oder Abschwächung untersucht werden sollten. Als Spender und Empfänger wurden Mäuse aus MHC-inkompatiblen Mausstämmen (BALB/c: H-2K^d und C57BL/6: H-2K^b) gewählt. In einigen Versuchen sollte mit speziellen Knock-Out Mäusen als Empfänger gearbeitet werden, deren genetischer Hintergrund C57BL/6 festlegte, dass zunächst ein Modell mit C57BL/6-Empfängermäusen etabliert werden musste. In Versuchen, bei denen ausschließlich mit Wildtypmäusen gearbeitet wurde, wurde das Modell mit BALB/c Empfängern verwendet. Der Vorteil dieses Modells liegt darin, dass wesentlich niedrigere Zellzahlen eingesetzt werden können um eine akute GvHD in den Tieren auszulösen. Die folgenden Abbildungen zeigen Mäuse der Wildtypstämme C57BL/6 (dunkles Fell) und BALB/c (weißes Fell). Auf der linken Seite sind gesunde Tiere abgebildet, auf der rechten Seite zum Vergleich Tiere, die unter einer akuten GvHD als Folge einer allogenen Knochenmark- und TZ-Transplantation litten.

3.1.1 Die Transplantation allogener Knochenmark- und Thy1.2⁺ TZ führt zu einer akuten GvHD in den Empfängern

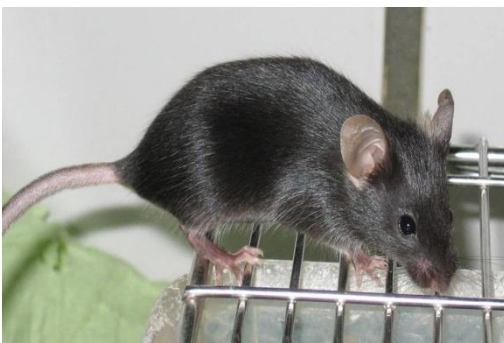


Abb. 3.1.1: Äußeres Erscheinungsbild von gesunden BALB/c und C57BL/6 Mäusen im Vergleich zu Mäusen mit einer akuten GvHD

Es sind Mäuse mit einer akuten GvHD (rechts) und gesunde Tiere (links) abgebildet. Um eine akute GvHD in den Mäusen auszulösen wurden sie wie folgt behandelt: Die gezeigte BALB/c Maus wurde mit 1×8 Gy bestrahlt und erhielt einige Stunden später 5×10^6 Knochenmarkszellen und 5×10^5 Thy1.2⁺ TZ aus C57BL/6 Spendern iv injiziert. Das Bild wurde 30 Tage nach der Transplantation aufgenommen. In der C57BL/6 Maus wurden 2 Tage vor der Transplantation die NK-Zellen depletiert. Das Tier wurde mit $2 \times 5,5$ Gy bestrahlt und erhielt ein BALB/c Knochenmark- und Thy1.2⁺ TZ-Transplantat bestehend aus je 1×10^7 Zellen. Die Fotografie wurde 26 Tage nach der Transplantation aufgenommen. Die Tiere auf der linken Seite waren unbehandelt.

Bei den kranken Mäusen sind sehr deutlich die typisch gekrümmte Körperhaltung und der Fellverlust in Kombination mit Hautläsionen zu erkennen.

Nach Etablierung der GvHD Mausmodelle sollten diese anschließend angewendet werden um zunächst die Rolle von MyD88-vermittelten Toll-like Rezeptor (TLR)-Signalen für die Entstehung einer akuten GvHD zu untersuchen.

3.2 Die Bedeutung von TLR-Signalen für die Entstehung einer akuten Graft-versus-Host Disease

Basierend auf Ergebnissen von Goldstein et al. [14], welche zeigen, dass das TLR-Adaptermolekül MyD88 bei der akuten Transplantatabstoßung eine Rolle zu spielen scheint, sollte geklärt werden, ob MyD88/TRIF-abhängige Signale im umgedrehten Sinne für die Entstehung der akuten GvHD ebenfalls von Bedeutung sind. Außerdem deuteten bereits Daten anderer Wissenschaftler auf die Relevanz von TLR-Signalen im Rahmen der Entstehung einer GvHD hin [17]. Bevor aufwendige *in vivo* Transplantationen durchgeführt wurden, sollten zunächst *in vitro* Experimente Hinweise darauf liefern, ob APCs aus MyD88-defizienten Tieren allogene TZ aktivieren können.

3.2.1 APCs aus MyD88^{-/-} Mäusen aktivieren allogene TZ *in vitro*

DCs aus MyD88^{-/-} und im Kontrollansatz aus C57BL/6 Wildtypmäusen (WT)ⁿ wurden als stimulatorische Zellen mit Milzzellen aus BALB/c Mäusen in eine Kokultur überführt. Nach 5 Tagen wurde die Proliferation der allogenen, in den BALB/c Milzzellen enthaltenen CD4⁺ und CD8⁺ TZ analysiert.

ⁿ Die jeweils entsprechende Wildtypkontrolle wird in den folgenden Versuchen kurz als WT bezeichnet.

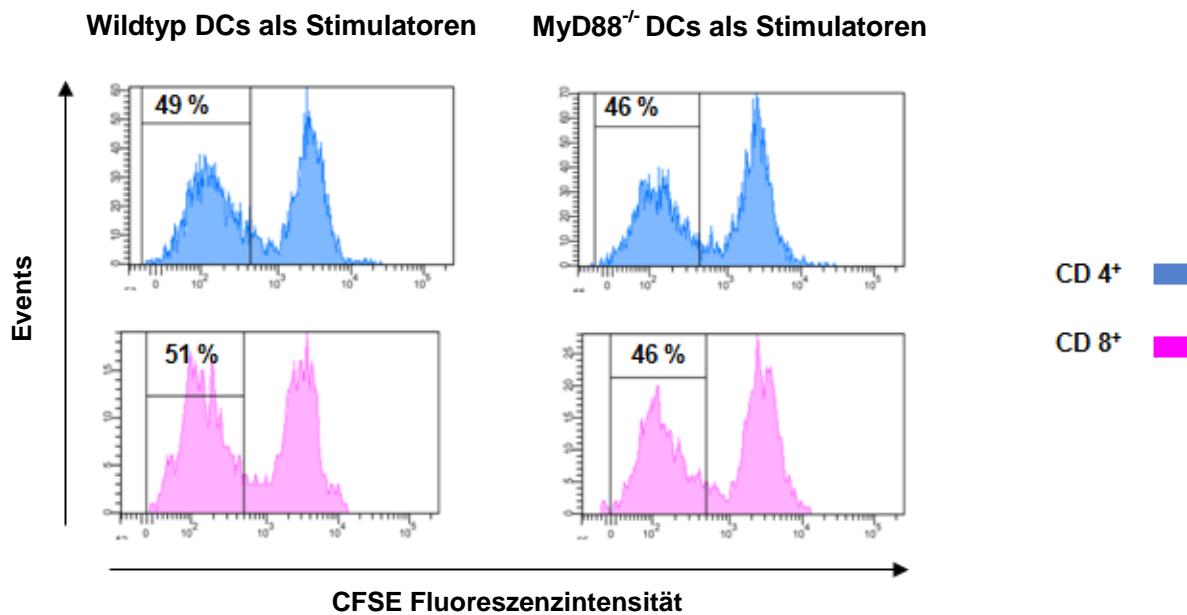


Abb. 3.2.1: Proliferation alloreaktiver CD4⁺ und CD8⁺ TZ nach Stimulation mit MyD88^{-/-} DCs im Vergleich zu WT DCs

1,2x10⁶ CFSE-gefärbte BALB/c Milzzellen (MZ) wurden mit je 4x10⁴ BMDCs aus MyD88^{-/-} oder WT-Mäusen für 5 Tage in einer 24-Kavitäten Platte im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einer Färbung mit FACS-Antikörpern unterzogen und durchflusszytometrisch analysiert. Es ist der Anteil proliferierter CD4⁺ und CD8⁺ TZ in Prozent angegeben.

Die Prozentzahlen in den Ausschnitten im Bereich niedriger CFSE-Fluoreszenzintensität geben den prozentualen Anteil proliferierter CD4⁺ (blau) und CD8⁺ (pink) TZ an. Der peak rechts außerhalb des Ausschnittes steht für die nicht proliferierten Zellen, welche noch die ursprüngliche CFSE-Konzentration tragen. Aus Abbildung 3.2.1 wird ersichtlich, dass sowohl die MyD88^{-/-} DCs als auch die DCs aus Wildtypmäusen in der Lage waren, alloreaktive TZ *in vitro* zu aktivieren. Sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ TZ proliferierten in beiden Ansätzen mit einer vergleichbaren Intensität. Als Nächstes wurde ein *in vivo* Zytotoxizitätstest durchgeführt. Dabei sollte festgestellt werden, ob alloreaktive CD8⁺ TZ in BALB/c Tieren durch eine Immunisierung mit MyD88^{-/-} Zellen genauso gut aktiviert werden wie durch eine Immunisierung mit Wildtypzellen.

3.2.2 Lyse allogener Zielzellen in Mäusen, die zuvor mit Zellen aus MyD88^{-/-} Tieren immunisiert wurden

Eine Woche nach der Immunisierung der Mäuse mit MyD88^{-/-} oder WT Milzzellen wurden den immunisierten Mäusen syngene BALB/c und allogene C57BL/6 Zielzellen im Verhältnis 1:1 injiziert. Die beiden Zellpopulationen wurden zuvor mit unterschiedlichen CFSE-Konzentrationen gefärbt, dabei wurden die C57BL/6 Zielzellen mit der niedrigeren CFSE-Konzentration gefärbt und befinden sich in den Histogrammen jeweils links. Als Kontrolle wurden die beiden Zellpopulationen in nicht-immunisierte Tiere injiziert.

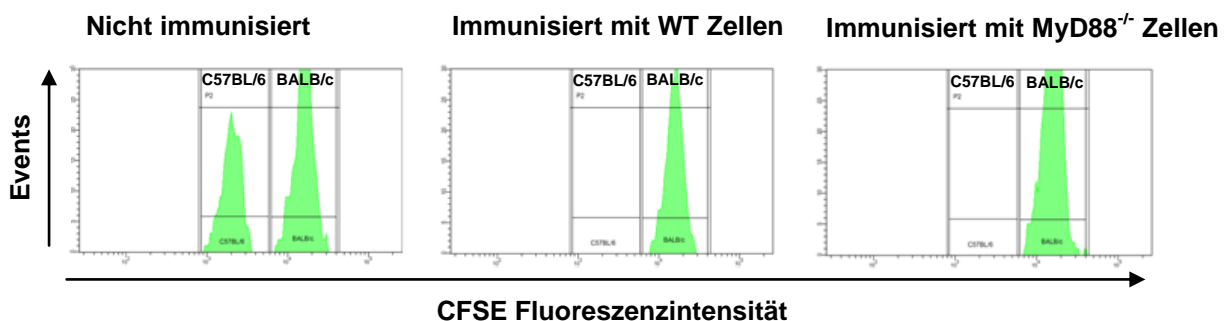


Abb. 3.2.2: *In vivo* Zytotoxizitätstest in Mäusen nach Immunisierung gegen allogene C57BL/6 Zielzellen (MyD88^{-/-} versus WT)

Den BALB/c Mäusen wurden zur Immunisierung 2×10^7 allogene Milzzellen aus MyD88^{-/-} Mäusen oder dem WT ip injiziert. Es wurden 3 Mäuse mit WT Zellen, 4 mit MyD88^{-/-} Zellen und 4 Tiere nicht immunisiert. Nach einer Woche wurden syngene BALB/c und allogene C57BL/6 Zellen nach vorheriger Färbung mit CFSE in unterschiedlichen Konzentrationen iv injiziert. Nach ca. 20 Stunden wurde den Tieren Blut entnommen und mittels Durchflusszytometrie die spezifische Lyse der C57BL/6 Zielzellen ermittelt.

Es fand in allen immunisierten Mäusen eine spezifische Lyse der allogenen C57BL/6 Zielzellen statt. Sowohl in Tieren, die zuvor mit MyD88^{-/-} Zellen, als auch in Tieren, welche zuvor mit Zellen aus dem WT immunisiert worden waren. Das gemessene Zellzahlverhältnis der beiden injizierten Zellpopulationen in den nicht-immunisierten Tieren wurde als Referenz verwendet um die spezifische Lyse der Zielpopulation in den immunisierten Tieren zu berechnen. Die allogenen Zielzellen wurden durchschnittlich zu 75 % in den mit Wildtyp-Zellen immunisierten und zu 67 % in den mit MyD88^{-/-} Zellen immunisierten Mäusen lysiert.

Die vorangegangenen Experimente deuteten darauf hin, dass MyD88-vermittelte TLR-Signale für die Fähigkeit von APCs, allogene T-Zellen zu aktivieren, nicht essentiell zu sein scheinen. Im Folgenden sollten die Daten durch Transplantationsexperimente verifiziert werden. Es sollte untersucht werden, ob ein Fehlen von MyD88 in den Empfängern eines allogenen Transplantats zu einer abgeschwächten GvHD führt.

3.2.3 Letale Graft-versus-Host Disease in subletal bestrahlten MyD88^{-/-} Empfängern eines allogenen T-Zell-Transplantats

Es wurden MyD88^{-/-} und eine MyD88^{-/-} x TRIF^{-/-} Kreuzung im Vergleich zu Wildtypmäusen als Empfängertiere in den allogenen Transplantationsexperimenten verwendet. Da die zur Verfügung stehenden MyD88^{-/-} und TRIF^{-/-} Mäuse den genetischen Hintergrund C57BL/6 besitzen, wurde für die Versuche entsprechend ein GvHD Modell mit C57BL/6 Mäusen als Empfänger verwendet. Nach einer Depletion der NK-Zellen in den Empfängertieren wurden diese 2 Tage später subletal bestrahlt und empfangen einige Stunden später ein Thy1.2⁺ TZ-Transplantat aus BALB/c Spendertieren. In der folgenden Abbildung sind der klinische GvHD-Index und die Überlebensrate der Tiere dargestellt.

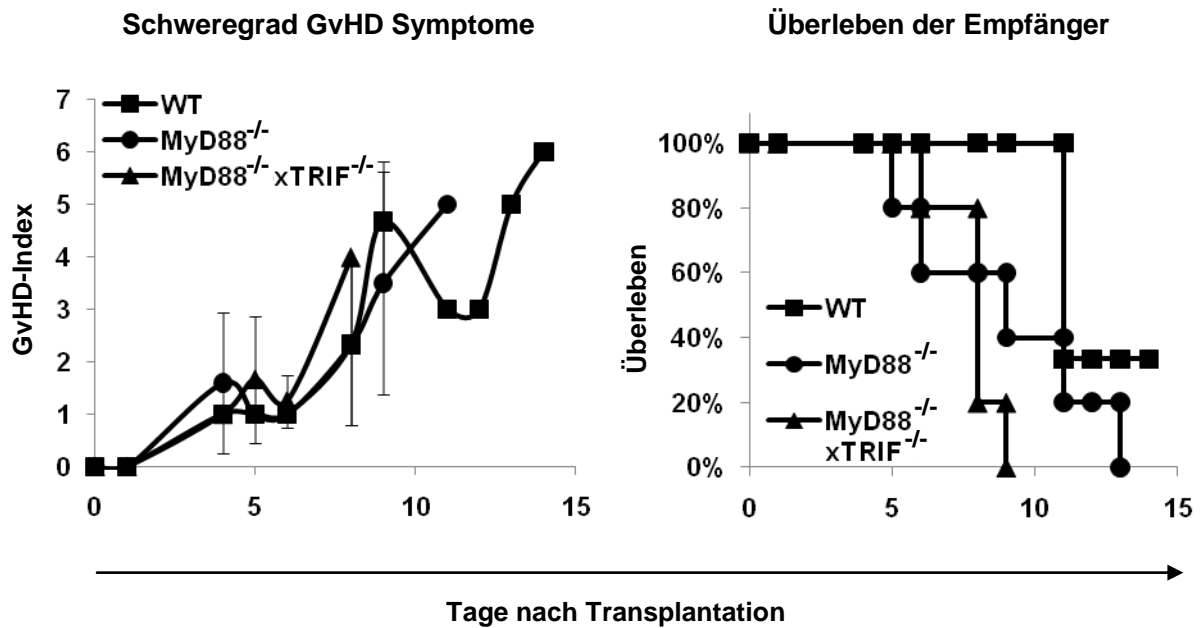


Abb. 3.2.3: Allogene Transplantation mit MyD88^{-/-}, MyD88^{-/-} x TRIF^{-/-} und Wildtyp-Empfängern

3 WT, 5 MyD88^{-/-} und 6 MyD88^{-/-} x TRIF^{-/-} Mäuse wurden NK-depletiert. Nach 2 Tagen wurden die Tiere mit 1x 6,5 Gy bestrahlt und bekamen einige Stunden später 2x10⁷ Thy1.2⁺ TZ (BALB/c) iv injiziert. Es wurden der klinische GvHD-Index und das Überleben dokumentiert.

Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass neben den Wildtyptieren auch die MyD88^{-/-} und die MyD88^{-/-} x TRIF^{-/-} Tiere akute GvHD-Symptome entwickelt haben, was letztendlich bei den meisten Mäusen in einer letal verlaufenden GvHD resultierte. Da das Transplantationsmodell, welches eine subletale Bestrahlung und den Transfer relativ hoher TZ-Zahlen umfasst, stets einen sehr aggressiven Verlauf zeigte, wurde anschließend ein Modell mit milderem Verlauf angewandt. Dabei wurde untersucht, ob MyD88^{-/-} Tiere auch in diesem Modell eine akute GvHD entwickeln. Zu diesem Zweck wurden die NK-Zellen der Empfänger depletiert, zwei Tage später wurden die Mäuse letal bestrahlt und erhielten jeweils nur 1x10⁷ allogene Knochenmark- und Thy1.2⁺ TZ. Auch unter diesen experimentellen Bedingungen entwickelten sowohl die WT-, als auch die MyD88^{-/-} Tiere eine akute GvHD (Daten nicht gezeigt).

Eine letale Ganzkörperbestrahlung stellt jedoch ebenfalls einen aggressiven Eingriff für die Tiere dar. Die Immunabwehr ist zunächst fast zerstört und es besteht die Gefahr ungewollter Infektionen. Äußerlich wären die Symptome teilweise nur schwer von denen einer GvHD zu unterscheiden. Es sollte sichergestellt werden, dass die

Tiere nicht aufgrund irgendwelcher Infektionen Krankheitssymptome zeigten, sondern ausschließlich aufgrund der ausgelösten GvHD. Daher wurde, zusätzlich zu den routinemäßigen Blutuntersuchungen^o, eine syngene Kontrolltransplantation durchgeführt.

3.2.4 Letal bestrahlte MyD88^{-/-} Empfängertiere zeigen nach syngener Knochenmark- und TZ-Transplantation keine gesundheitlichen Beeinträchtigungen

Es sollte ausgeschlossen werden, dass die MyD88^{-/-} oder WT Empfängertiere schon alleine durch die Folgen der hohen Bestrahlungsdosis oder mögliche nachfolgende Infektionen gesundheitliche Probleme erleiden oder sogar versterben. Daher wurden den Tieren nach NK-Depletion und letaler Bestrahlung syngene Knochenmark- und Thy1.2⁺ TZ injiziert.

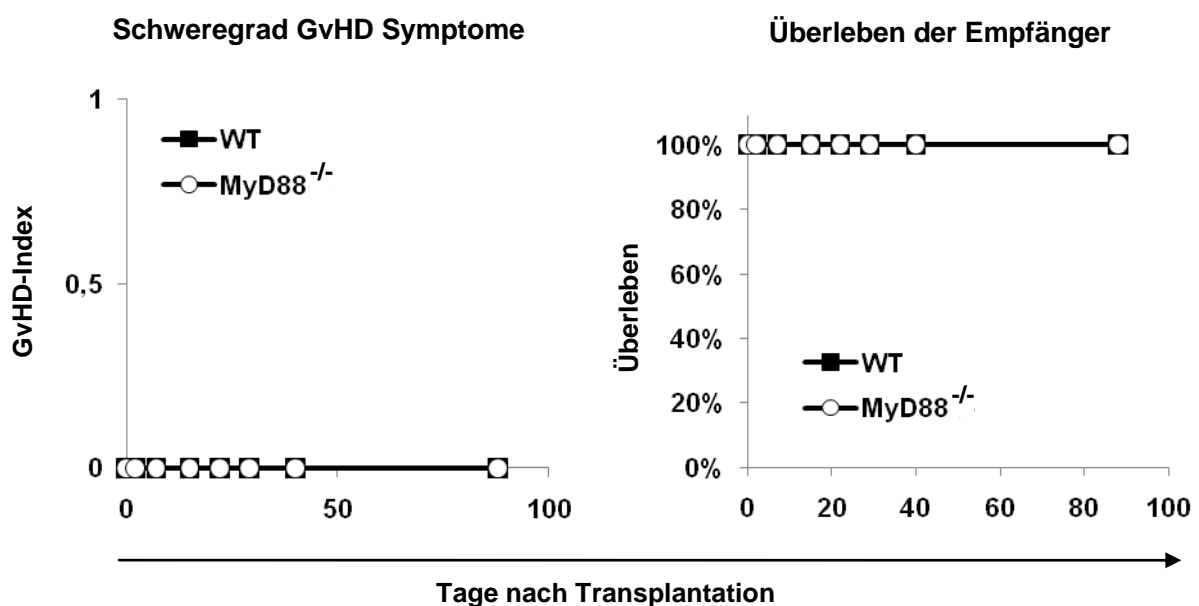


Abb. 3.2.4: Syngene Transplantation nach letaler Bestrahlung der MyD88^{-/-} und WT-Empfänger

Es wurde eine NK-Depletion in den Empfängern durchgeführt, 2 Tage später wurden die Mäuse mit 2x 5,5 Gy bestrahlt und empfangen ein syngenes Knochenmark- und Thy1.2⁺ TZ-Transplantat zu je 1x10⁷ Zellen aus C57BL/6 Spendern. Als Empfänger wurden 3 Wildtypmäuse, sowie 4 MyD88^{-/-} Mäuse eingesetzt. GvHD-Index und Überlebensrate sind dargestellt.

^o Ca. 1 Woche nach jeder Transplantation wurde stets allen Mäusen Blut entnommen um sicherzustellen, dass die transplantierten Zellen nicht abgestoßen worden waren.

Weder die MyD88^{-/-} noch die WT Mäuse (beide mit dem genetischen Hintergrund C57BL/6) zeigten zu irgendeinem Zeitpunkt äußerlich erkennbare Krankheitssymptome. Das in Abb. 3.2.4 dargestellte Ergebnis macht deutlich, dass die Tiere die Prozedur ausnahmslos überlebten. Die Empfängertiere wurden durch die aggressive letale Bestrahlung und den anschließenden Transfer von syngenen Knochenmark- und T-Zellen nicht wesentlich beeinträchtigt.

Die vorangegangenen Ergebnisse im Zusammenhang mit der Fragestellung, ob MyD88-vermittelte TLR-Signale für die Entstehung einer akuten GvHD entscheidend sind, zeigten alle eine ähnliche Tendenz. Das Fehlen von MyD88-vermittelten TLR-Signalen in den Empfängertieren führte zu keiner Abschwächung der Aktivierung alloreaktiver TZ und der akuten GvHD. Nachfolgend wird auf den zweiten Teil dieser Arbeit eingegangen, welcher sich mit dem Einfluss regulatorischer T-Zellen auf die Entstehung der akuten GvHD befasst.

3.3 Die Bedeutung CD4⁺CD25⁺ natürlich vorkommender Tregs für die Manipulation der akuten GvHD

Einige Hinweise aus der Literatur weisen bereits darauf hin, dass Tregs kompetente Suppressoren der GvHD darstellen können [73;89;90]. Zunächst sollte durch eigene Versuche das suppressive Potential dieser Zellen bezüglich der Alloreaktivität konventioneller T-Effektorzellen *in vitro*, sowie im Rahmen des eigens etablierten allogenen Transplantationsmodells bestätigt werden.

3.3.1 Voraktivierte CD4⁺CD25⁺ Tregs hemmen alloreaktive CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen *in vitro*

In einer MLR, zusammengesetzt aus DCs und allogenen Thy1.2⁺ TZ, kann nach 4-tägiger Inkubation eine deutliche Proliferation alloreaktiver CD4⁺ und CD8⁺ TZ beobachtet werden. Die nachfolgende Grafik zeigt, dass voraktivierte Tregs (preTregs) die Aktivierung und somit die Proliferation von alloreaktiven CD4⁺ und CD8⁺ TZ sehr effektiv hemmen können.

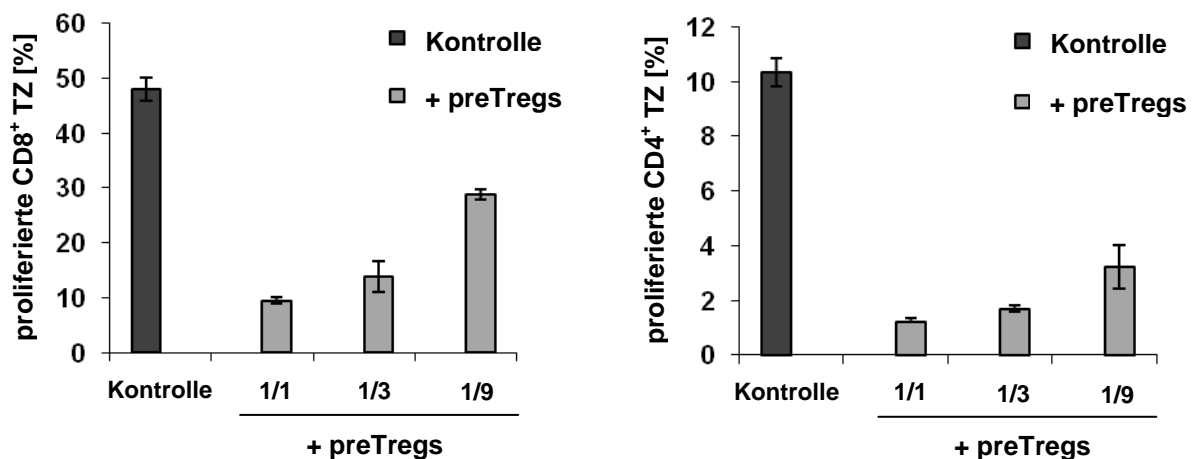


Abb. 3.3.1: Proliferation alloreaktiver T-Zellen in An- oder Abwesenheit von preTregs *in vitro*

3x10³ Milz-DCs (BALB/c) wurden mit 1x10⁵ CFSE-gefärbten Thy1.2⁺ TZ (C57BL/6-Ly5.1) in An- oder Abwesenheit von preTregs (C57BL/6) für 4 Tage in einer 96-Kavitätenplatte mit Rundboden im Brutschrank inkubiert. Die preTregs wurden von 1x10⁵ Zellen ausgehend in 1:3 Titrationsschritten abwärts titriert. Die Proliferation der CD4⁺ und CD8⁺ TZ (beide Ly5.1⁺ = CD45.1⁺) wurde durchflusszytometrisch analysiert. Es ist der Anteil proliferierter TZ in Prozent gezeigt. Die Standardabweichungen wurden aus je 3 gleich behandelten Proben berechnet.

In der „mixed leokocyte reaction“ (MLR) war der prozentuale Anteil proliferierter $CD8^+$ TZ höher als der der $CD4^+$ TZ. Allerdings ließ sich die Proliferation beider Zellpopulationen durch die Zugabe von preTregs drastisch hemmen. Je weiter die Anzahl der preTregs reduziert wurde, desto schwächer fiel die Hemmung aus.

3.3.2 $CD4^+CD25^+$ Tregs hemmen alloreaktive $CD4^+$ und $CD8^+$ TZ *in vitro*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass preTregs die Proliferation alloreaktiver $CD4^+$ und $CD8^+$ TZ *in vitro* stark hemmen können, sollte als Nächstes geprüft werden, wie groß das suppressive Potential von Tregs ist, wenn diese erst in der MLR aktiviert werden müssen. Zu einem späteren Zeitpunkt sollen die Mechanismen der Treg-vermittelten Suppression alloreaktiver TZ näher analysiert werden. Dabei soll auch untersucht werden, ob voraktivierte und nicht-voraktivierte Tregs unterschiedliche Mechanismen zur Hemmung anwenden. Daher sollte zunächst nachgewiesen werden, ob sowohl preTregs als auch Tregs alloreaktive TZ und die Entstehung einer akuten GvHD prinzipiell hemmen können.

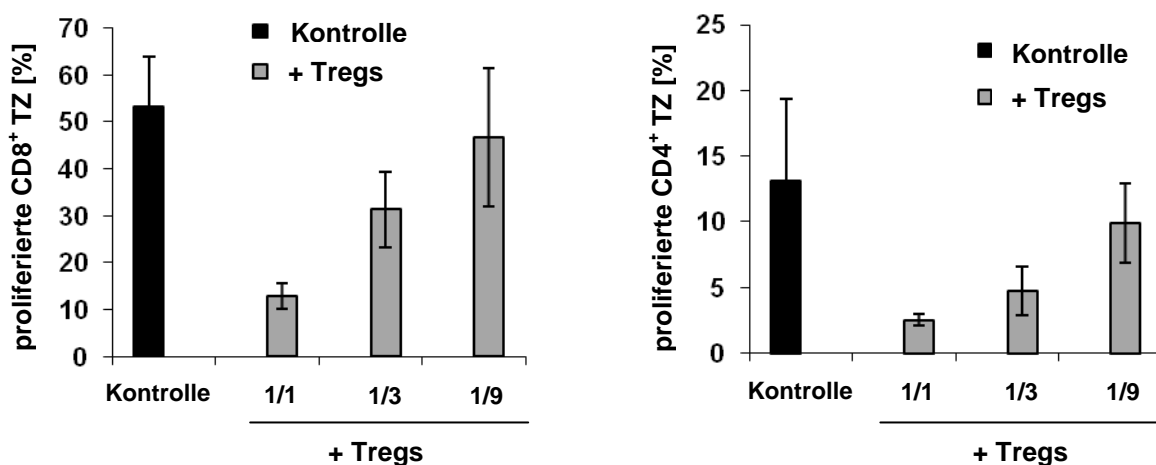


Abb. 3.3.2: Proliferation alloreaktiver T-Zellen in An- oder Abwesenheit von Tregs *in vitro*

1×10^3 Milz-DCs (BALB/c) wurden mit 1×10^5 CFSE-gefärbten Thy1.2⁺ TZ (C57BL/6-Ly5.1) in An- oder Abwesenheit frisch angereinigter Tregs (C57BL/6) für 4 Tage in einer 96-Kavitätenplatte mit Rundboden im Brutschrank inkubiert. Die Tregs wurden von 1×10^5 Zellen ausgehend in 1:3 Titrationsschritten abwärts titriert. Es erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse der Proliferation der $CD4^+$ und $CD8^+$ TZ (beide Ly5.1⁺). Die Standardabweichungen wurden aus je 3 gleich behandelten Proben berechnet. Die Daten sind repräsentativ für 3 Experimente.

Anhand von Abb. 3.3.2 ist deutlich zu erkennen, dass auch Tregs, die ohne vorherige Aktivierung in die MLR gegeben wurden, die Proliferation alloreaktiver TZ effektiv supprimieren konnten. Je mehr Tregs in die MLR gegeben wurden, desto geringer war der prozentuale Anteil alloreaktiver proliferierter CD8⁺ und CD4⁺ TZ.

Die durchgeführten *in vitro* Versuche zeigen eindeutig, dass natürlich vorkommende (pre)Tregs die Proliferation sowohl alloreaktiver CD4⁺ als auch CD8⁺ TZ stark hemmen können. Folglich sollte in darauf folgenden *in vivo* Experimenten das suppressive Potential der regulatorischen T-Zellen ebenfalls nachgewiesen werden. Laut Literaturangaben besteht die Möglichkeit, durch den Einsatz von Tregs eine CD4⁺ TZ-vermittelte GvHD abzuschwächen [73]. Es sollte nun gezeigt werden, ob die Zellen eine akute GvHD auch in dem hier verwendeten allogenen Transplantationsmodell^P verhindern oder zumindest abschwächen können.

3.3.3 Voraktivierte CD4⁺CD25⁺ Tregs hemmen alloreaktive CD8⁺ TZ *in vivo* und folglich auch die Entstehung einer akuten GvHD

Die C57BL/6 Empfänger wurden einer NK-Zell-Depletion unterzogen und 2 Tage später letal bestrahlt. Noch am selben Tag wurden allogene Knochenmark- und Thy1.2⁺ TZ transplantiert (BALB/c). Es wurden 3 Gruppen gebildet. Eine Gruppe Mäuse erhielt keine zusätzlichen Tregs, eine Gruppe erhielt zusätzlich preTregs (BALB/c), die letzte Gruppe Mäuse erhielt zur Kontrolle nur preTregs und Knochenmark aber keine Thy1.2⁺ TZ. Wie in allen Transplantationsexperimenten üblich, wurde den Tieren 6 Tage nach Transplantation Blut entnommen. Es wurde zunächst analysiert, wie hoch der Anteil an aktivierten alloreaktiven zytotoxischen T-Zellen (CD8⁺ TZ) im Blut der Tiere war, welche nur Thy1.2⁺ TZ oder Thy1.2⁺ TZ + preTregs bekommen hatten. Als Aktivierungsmarker diente CD25.

^P Im hier verwendeten Transplantationsmodell werden Thy1.2⁺ TZ transferiert, welche nicht nur allogene CD4⁺ sondern zusätzlich allogene CD8⁺ TZ umfassen.

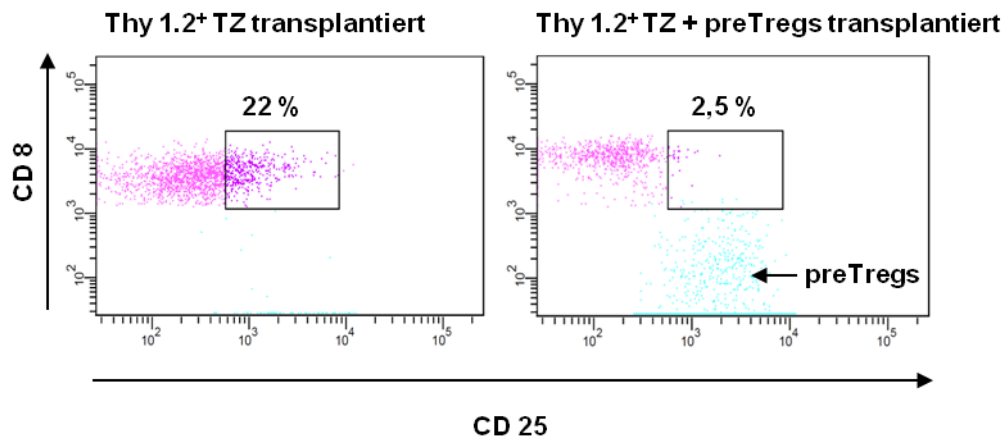


Abb. 3.3.3a: Aktivierungsgrad der alloreaktiven CD8⁺ Spender-TZ im Blut der Empfänger 6 Tage nach Transplantation

In den C57BL/6 Empfängern wurden die NK-Zellen depletiert. Nach 2 Tagen wurden die Mäuse mit 2x 5,5 Gy bestrahlt und empfangen je 1×10^7 Knochenmark- und Thy1.2⁺ TZ (BALB/c). Einer Gruppe wurden zusätzlich 8×10^6 preTregs (BALB/c) injiziert. 6 Tage nach der Transplantation wurde den Mäusen Blut entnommen. Vor der Markierung der zu analysierenden Zellpopulationen mit Hilfe von Fluorochrom-gekoppelten FACS-Antikörpern wurde für 10 Minuten eine Erythrozyten-Lyse mit ACK-Puffer bei Raumtemperatur mit den Blutproben durchgeführt. Danach wurden H-2K^d, H-2K^b, CD4, CD8, CD25 und Foxp3 markiert. Es wurde der Anteil aktivierter Spender-CD8⁺ TZ (H-2K^{d+}H-2K^{b-}CD4⁻CD8⁺FoxP3⁻) durchflusszytometrisch ermittelt.

Grafik 3.3.3a zeigt 2 Zellpopulationen. Beide sind H-2K^{d+} und stammen somit von den BALB/c Spendertieren. Es sind die preTregs (hellblau) und die Spender-CD8⁺ TZ (pink) zu sehen. Die linke Abbildung zeigt beispielhaft die Messung einer Maus, welche keine preTregs transplantiert bekam (Maus 1). Die rechte Abbildung zeigt die Messung einer Maus, der zusätzlich preTregs transplantiert wurden (Maus 2). Bezogen auf die Anzahl aufgenommener H-2K^{d+} Zellen (in beiden Mäusen ca. 5000) war die Zahl der CD8⁺ Spenderzellen in Maus 1 mit 28 % deutlich größer als in Maus 2 mit 6 % (Daten nicht gezeigt). Anhand obenstehender Abbildung wird deutlich, dass in Maus 1 von den Spender-CD8⁺ TZ 22 % CD25⁺ waren und in Maus 2 lediglich 2,5 %. CD25 diente in diesem Experiment als TZ-Aktivierungsmarker. Es wurde pro Gruppe das Blut von 5 Mäusen analysiert. In beiden Gruppen zeigte sich jeweils in allen Mäusen dieselbe Tendenz. Die Versuchstiere wurden in den folgenden Wochen regelmäßig mit Fokus auf auftretende, äußerlich erkennbare, akute GvHD-Symptome beurteilt.

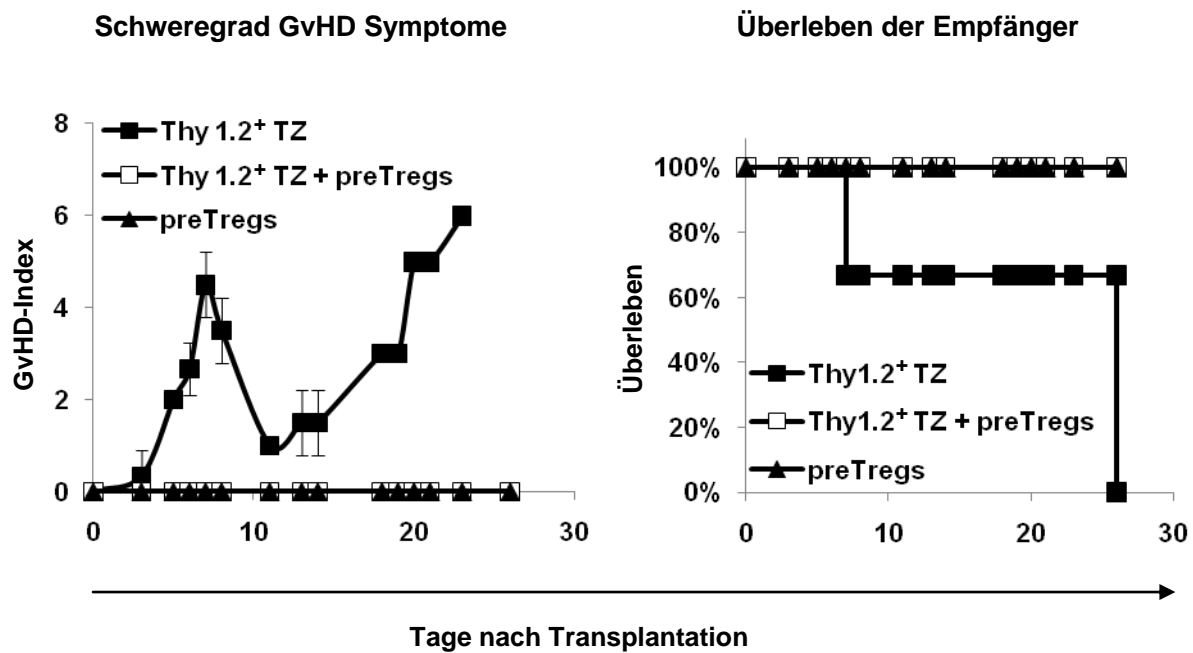


Abb. 3.3.3b: Allogene Transplantation +/- preTregs nach letaler Bestrahlung

In den C57BL/6 Empfängern (3 pro Gruppe) wurden zunächst die NK-Zellen depletiert. Nach 2 Tagen wurden die Mäuse mit 2x 5,5 Gy bestrahlt und empfangen je 1×10^7 Knochenmark- und Thy1.2⁺ TZ (BALB/c). Einer Gruppe wurden zusätzlich 8×10^6 preTregs (BALB/c) injiziert. 2 weitere Mäuse erhielten zur Kontrolle nur preTregs und Knochenmark. Es sind der GvHD-Index und die Überlebensrate der Tiere gezeigt.

Innerhalb von 30 Tagen nach Transplantation entwickelten die Mäuse, welche keine preTregs erhalten hatten, akute GvHD-Symptome. Die Mäuse, denen zusätzlich preTregs injiziert wurden, entwickelten keinerlei äußere Anzeichen einer Erkrankung. Die beiden Mäuse, welche ausschließlich preTregs und Knochenmark transplantiert bekommen hatten, verhielten sich ebenfalls komplett unauffällig. Nachdem erfolgreich gezeigt werden konnte, dass preTregs alloreaktive CD8⁺ TZ und die akute GvHD erfolgreich hemmen können, wurde in den folgenden Experimenten getestet, wie effizient nicht-voraktivierte Tregs die akute GvHD nach der Transplantation allogener CD4⁺ und CD8⁺ TZ supprimieren.

3.3.4 CD4⁺CD25⁺ Tregs hemmen die Entstehung einer akuten GvHD

Es bestand die Vermutung, dass die suppressive Wirkung der nicht-voraktivierten Tregs geringer ausfallen könnte als die der preTregs. Daher sollte untersucht werden, ob man diesem vermutlich schwächeren Effekt durch einen zeitlichen Vorsprung der Tregs entgegenwirken kann. Es wurden 3 Gruppen Empfänger gebildet. Alle erhielten Knochenmarkszellen wie üblich an Tag 0 und Thy1.2⁺ TZ ausnahmsweise einen Tag später (Tag 1). Eine der Gruppen erhielt an Tag 0 zusätzlich Tregs, während eine Gruppe erst an Tag 1 Tregs und die letzte Gruppe gar keine Tregs transplantiert bekam. Aufgrund der geringeren Anzahl verfügbarer nicht-voraktivierter Tregs wurde ein Modell gewählt, in welchem die Empfänger nur 5×10^6 Thy1.2⁺ TZ transplantiert bekamen und mit $1,9 \times 10^6$ Zellen auch entsprechend wenige Tregs. Damit das Modell aggressiv genug blieb und die Tiere noch eine entsprechend gut diagnostizierbare GvHD entwickelten, wurden aus dem Thy1.2⁺ TZ-Transplantat die darin enthaltenen natürlich vorkommenden Tregs entfernt.

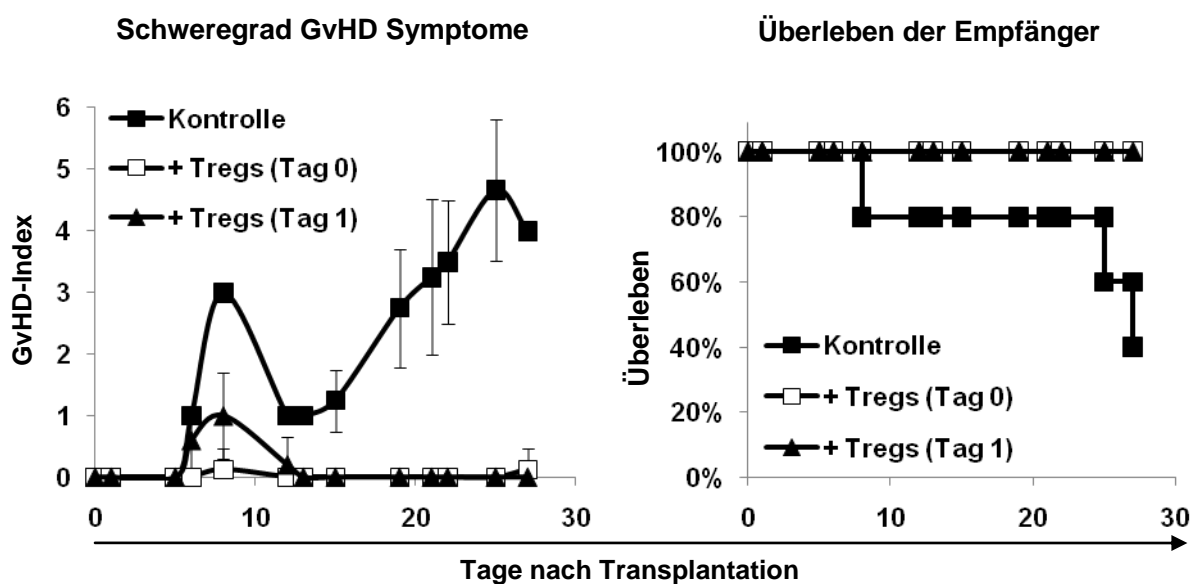


Abb. 3.3.4: Allogene Transplantation +/- Tregs nach letaler Bestrahlung

Zwei Tage nach der NK-Depletion in den C57BL/6 Empfängern wurden diese mit $2 \times 5,5$ Gy bestrahlt. Alle Tiere empfingen noch am selben Tag (Tag 0) 1×10^7 Knochenmarkszellen (BALB/c). Eine Gruppe von 8 Mäusen erhielt am selben Tag zusätzlich $1,9 \times 10^6$ Tregs (BALB/c). Eine weitere Gruppe von 5 Mäusen erhielt dieselbe Anzahl an Tregs erst einen Tag später (Tag 1), zu diesem Zeitpunkt erhielten alle Mäuse 5×10^6 Thy1.2⁺ TZ (CD25⁺ depletiert; BALB/c). Eine aus 5 Mäusen bestehende Gruppe (Kontrolle) erhielt gar keine Tregs. GvHD-Index und Überleben wurden dokumentiert.

Während aus der Gruppe, welche keine zusätzlichen Tregs transplantiert bekam 60% der Mäuse an der akuten GvHD verstarben bzw. gemäß der definierten Abbruchkriterien geopfert werden mussten, überlebten alle Tiere aus den Gruppen, denen zusätzlich Tregs transplantiert worden waren. Die Tiere, welche an Tag 0 Tregs transplantiert bekommen hatten, zeigten während der gesamten Zeit der Versuchsdokumentation außer einem minimalen Gewichtsverlust (Daten nicht gezeigt) während der ersten Tage nach der Transplantation keine äußeren Anzeichen einer GvHD. In diesem Zeitraum zeigte sich im GvHD-Index ein kaum nennenswerter Unterschied zur Gruppe, die erst einen Tag später Tregs bekam. Circa 2 Wochen nach der Transplantation waren zwischen den beiden Gruppen keine Unterschiede mehr detektierbar. Die Tiere zeigten fortan keine äußeren Anzeichen einer GvHD mehr. Die Beobachtung, dass natürlich vorkommende Tregs auch ohne vorherige *in vitro*-Aktivierung als effektive Suppressoren der akuten GvHD nach allogener Transplantation fungieren können, wurde in einem weiteren unabhängig durchgeführten Experiment bestätigt (Daten nicht gezeigt).

In weiterführenden Experimenten sollte nun der Fokus auf die zentralen Mechanismen der (pre)Treg-vermittelten Suppression alloreaktiver TZ gerichtet werden.

3.4 Mechanismen der CD4⁺CD25⁺ Treg-vermittelten Suppression der akuten Graft-versus-Host Disease

Basierend auf Arbeiten von Hoffmann et al. [73] und Bopp, sowie Fassbender und Kollegen [83;86], sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Mechanismen, welche eine Rolle bei der Suppression der akuten GvHD durch Tregs spielen, näher untersucht werden. Hoffmann et al. lieferten bereits einen Hinweis auf eine Beteiligung des antiinflammatorischen Zytokins Interleukin-10 (IL-10) an der Suppression zumindest alloreaktiver CD4⁺ TZ.

Bopp beziehungsweise Fassbender und Kollegen konnten zeigen, dass Tregs nicht nur mit konventionellen TZ, sondern auch mit DCs interagieren und diese hemmen können. Bei dieser Interaktion scheint mitunter ein direkter Zellkontakt über gap junctions und der Transfer des Moleküls cAMP von Bedeutung zu sein. Allerdings wurden in diesem Zusammenhang lediglich Interaktionen zwischen syngenen Zellen beschrieben.

Im ersten Teil dieses Kapitels wird die Rolle von IL-10 bei der (pre)Treg-vermittelten Suppression alloreaktiver CD4⁺ und CD8⁺ TZ und der Abschwächung einer akuten GvHD genauer betrachtet.

Im Anschluss daran werden Untersuchungen bezüglich der zellkontaktabhängigen Interaktion über gap junctions zwischen Tregs und konventionellen TZ, sowie allogenen DCs, im Kontext mit der akuten GvHD vorgestellt. In diesem Zusammenhang wurde auch die Rolle von cAMP bei der Hemmung alloreaktiver TZ untersucht.

3.4.1 Die preTreg-vermittelte Suppression alloreaktiver T-Zellen *in vitro* scheint teilweise IL-10 abhängig zu sein

Es wurden BALB/c DCs mit Thy1.2⁺ TZ aus C57BL/6-Ly5.1 Mäusen in An- oder Abwesenheit von preTregs inkubiert. Die preTregs stammten aus C57BL/6 Wildtypmäusen oder IL-10^{-/-} Tieren und wurden in unterschiedlicher Zellzahl eingesetzt.

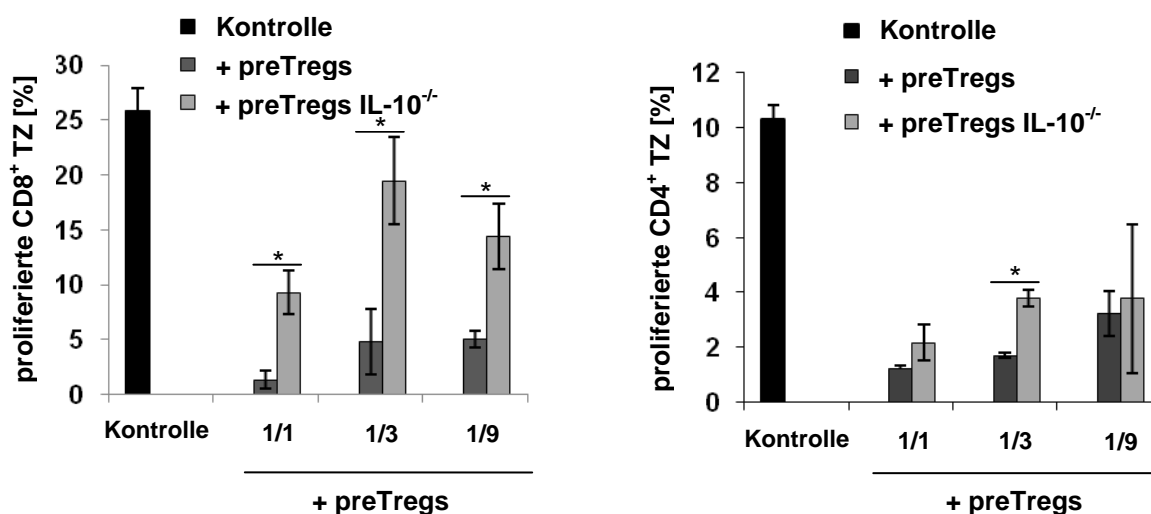


Abb. 3.4.1: Proliferation alloreaktiver CD4⁺ und CD8⁺ TZ in An- und Abwesenheit von IL-10^{-/-} oder Wildtyp preTregs *in vitro*

1x10³ (linke Abb.) bzw. 3x10³ (rechte Abb.) Milz-DCs (BALB/c) wurden mit 1x10⁵ CFSE-gefärbten Thy1.2⁺ TZ (C57BL/6-Ly5.1) in An- oder Abwesenheit von preTregs (C57BL/6 WT oder IL-10^{-/-}) für 4 Tage in einer 96-Kavitätenplatte mit Rundboden im Brutschrank inkubiert. Die preTregs wurden von 1x10⁵ ausgehend (Verhältnis 1:1 zu den Thy1.2⁺ TZ) über 2 Stufen abwärts jeweils 1:3 titriert. Nach der 4-tägigen Inkubation wurde die Proliferation der CD4⁺ und CD8⁺ TZ (beide Ly5.1⁺) durchflusszytometrisch analysiert. Es ist der Anteil proliferierter TZ in Prozent dargestellt. Die Standardabweichung wurde aus je 3 gleich behandelten Proben ermittelt. Es wurde eine statistische Analyse mittels studentischem t-Test durchgeführt. * zeigt signifikanten Unterschied mit p < 0,05 an.

Obenstehende Abbildung zeigt, dass die preTregs in Abhängigkeit von ihrer Zellzahl die Proliferation der alloreaktiven CD4⁺ und CD8⁺ TZ entsprechend gut hemmen konnten. Wurden preTregs aus IL-10^{-/-} Tieren eingesetzt, so fiel die Hemmung im Falle der CD8⁺ TZ deutlich schwächer aus. Wurden für das gleiche Experiment 3x10³ DCs statt 1x10³ eingesetzt, zeigte sich in Bezug auf die Hemmung der CD8⁺ TZ ein

vergleichbares Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Die CD4⁺ TZ schienen sich zumindest teilweise durch IL-10^{-/-}preTregs ebenfalls schlechter hemmen zu lassen als durch WT preTregs. Als Nächstes wurden nicht-voraktivierte Tregs in den *in vitro* Proliferationstests eingesetzt.

3.4.2 Die Suppression alloreaktiver T-Zellen *in vitro* durch CD4⁺CD25⁺ Tregs ist kaum IL-10-abhängig

Für den hier gezeigten Versuch wurden statt preTregs frisch angereinigte Tregs verwendet. Es sollte geklärt werden, ob IL-10 für die Hemmung der Proliferation alloreaktiver TZ durch die nicht-voraktivierten Tregs wichtig oder ob in diesem Fall ein anderer Suppressionsmechanismus vorrangig ist. Es wäre denkbar, dass bei der Hemmung durch preTregs, die schon über einen längeren Zeitraum voraktiviert wurden, eher Zytokin-vermittelte Mechanismen zum Tragen kommen als bei nicht-voraktivierten Tregs. Bei Tregs, die erst in der MLR aktiviert werden müssen, könnte hingegen ein zellkontaktabhängiger und womöglich schneller greifender Suppressionsmechanismus im Vordergrund stehen.

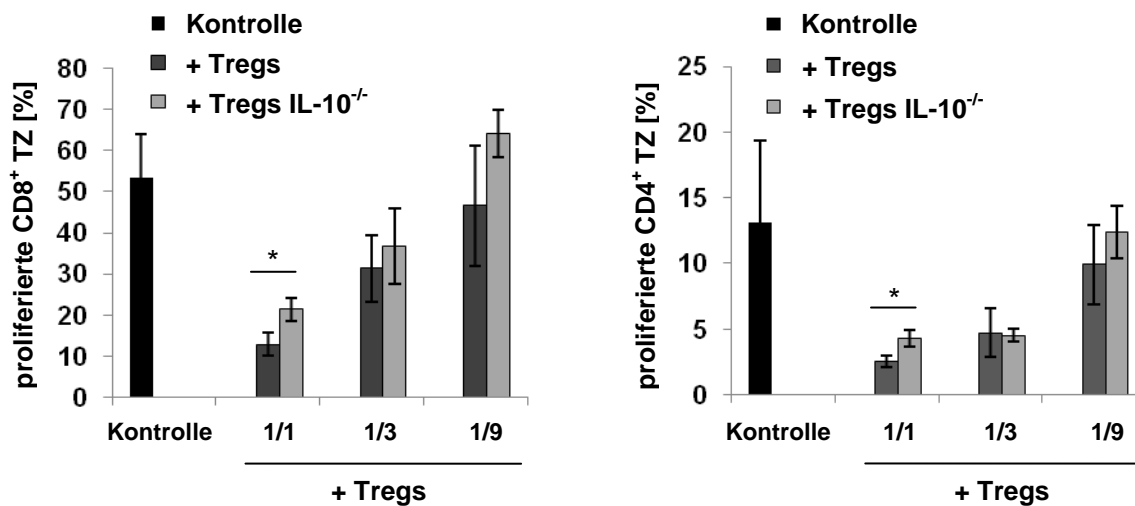


Abb. 3.4.2: Proliferation alloreaktiver CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in An- und Abwesenheit von IL-10^{-/-}- oder Wildtyp Tregs *in vitro*

1x10³ Milz-DCs (BALB/c) wurden mit 1x10⁵ CFSE-gefärbten Thy1.2⁺ TZ (C57BL/6-Ly5.1) in An- oder Abwesenheit von Tregs (C57BL/6 WT oder IL-10^{-/-}) für 4 Tage in einer 96-Kavitätenplatte mit Rundboden im Brutschrank inkubiert. Die Tregs wurden von 1x10⁵ ausgehend (Verhältnis 1:1 zu den Thy1.2⁺ TZ) über 2 Stufen abwärts jeweils 1:3 titriert. Nach der 4-tägigen Inkubation wurde die Proliferation alloreaktiver CD4⁺ und CD8⁺ TZ (beide Ly5.1⁺) durchflusszytometrisch analysiert. Es ist der Anteil proliferierter TZ in Prozent dargestellt. Die Standardabweichung wurde aus je 3 gleich behandelten Proben ermittelt. Es wurde eine statistische Analyse mittels studentischem t-Test durchgeführt. * zeigt signifikanten Unterschied mit p < 0,05 an.

Auch Tregs, die als nicht-voraktivierte Zellen in die Kultur gegeben wurden, konnten die Proliferation der allogenen CD4⁺ und CD8⁺ TZ hemmen. Allerdings zeigte sich hier kein so großer Unterschied zwischen der Suppression durch Wildtyp- und durch IL-10^{-/-} Tregs wie bei der Verwendung von preTregs. Beide Zellpopulationen bewirkten eine deutliche Hemmung, deren Ausmaß abhängig von der Anzahl der eingesetzten Tregs war. Lediglich in einem Ansatz – mit dem Verhältnis 1:1 von Thy1.2⁺ TZ zu Tregs- zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Hemmung durch die Wildtyp- und der Hemmung durch die IL-10^{-/-} Tregs. Hier konnten die Wildtyp Tregs die CD4⁺ und CD8⁺ TZ besser hemmen. Es wurde parallel ein Versuch mit 3x10³ Milz-DCs durchgeführt, dessen Ergebnis die gleiche Tendenz zeigte (Daten nicht gezeigt).

3.4.3 CD4⁺CD25⁺ Tregs bewirken unabhängig von IL-10 eine reduzierte Anzahl alloreaktiver CD8⁺ T-Zellen in den Milzen der Transplantatempfänger

Neben den beschriebenen *in vitro* Studien wurden auch Untersuchungen *in vivo* durchgeführt um zu klären, welchen Stellenwert das suppressive Zytokin IL-10 hier im Zusammenhang mit der Treg-vermittelten Suppression alloreaktiver TZ hat. BALB/c Empfängertiere wurden letal bestrahlt und erhielten ein Knochenmark- und Thy1.2⁺ TZ-Transplantat aus C57BL/6 Spendern. Eine Gruppe Mäuse erhielt keine zusätzlichen Tregs, während eine andere Gruppe C57BL/6 WT Tregs injiziert bekam und eine weitere Tregs aus C57BL/6-IL-10^{-/-} Spendern.

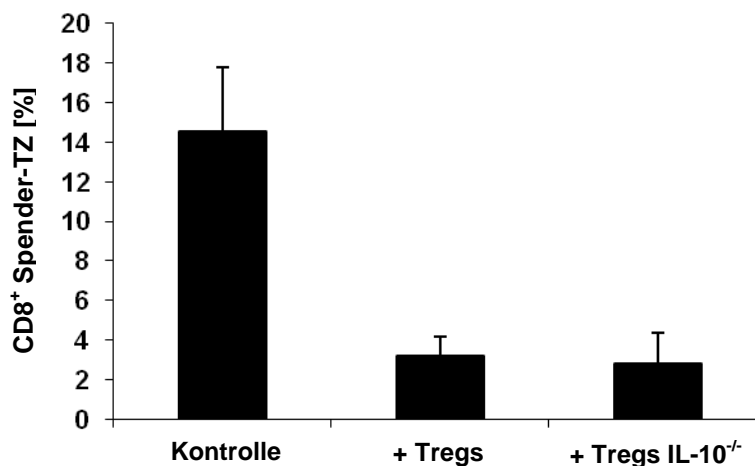


Abb. 3.4.3: Anteil CD8⁺ Spender-TZ in den Milzen der Empfänger 6 Tage nach allogener Transplantation +/- Wildtyp- oder IL-10^{-/-} Tregs

Die BALB/c Mäuse wurden mit 1x 8 Gy letal bestrahlt und erhielten einige Stunden später 2x10⁶ Thy1.2⁺ TZ und 5x10⁶ Knochenmarkzellen (beides C57BL/6) iv injiziert. Ein Teil der Mäuse erhielt zusätzlich 1x10⁶ Tregs aus C57BL/6 Wildtyp- oder IL-10^{-/-} Spendern. Die Standardabweichung wurde aus je 3 gleich behandelten Mäusen ermittelt.

In Abb. 3.4.3 ist der prozentuale Anteil CD8⁺ TZ bezogen auf die Anzahl der detektierten H-2K^{b+} Spenderzellen (im Durchschnitt 38 %) in den Empfängermilzen dargestellt. In den Milzen der Tiere, welche kein Treg-Transplantat erhalten hatten, waren 6 Tage nach der Transplantation ca. 14-15 % allogene CD8⁺ TZ detektierbar. In den Milzen der Tiere, denen zusätzlich Tregs transplantiert wurden, fanden sich

nur ca. 3 % CD8⁺ Spender-TZ. Hierbei zeigten sich keine Unterschiede zwischen Mäusen, die Tregs aus Wildtypspendern und denjenigen, die Tregs aus IL-10^{-/-} Spendern erhalten hatten.

3.4.4 Bei der Abschwächung der akuten GvHD durch CD4⁺CD25⁺ Tregs *in vivo* spielt IL-10 eine untergeordnete Rolle

Im nächsten Schritt wurden wiederum Transplantationen durchgeführt, in denen Tregs aus WT- und IL-10^{-/-} Spendern zum Einsatz kamen. Es sollte untersucht werden, ob die Treg-vermittelte Hemmung der akuten GvHD von der IL-10-Produktion der Tregs abhängig ist. Nach letaler Bestrahlung der BALB/c Empfängertiere wurden Knochenmark- und T-Zellen aus C57BL/6 Spendern transplantiert. Eine Gruppe Mäuse erhielt kein zusätzliches Treg-Transplantat, während eine weitere Gruppe Tregs aus C57BL/6 Wildtypmäusen und eine andere Gruppe Tregs aus IL-10^{-/-} Spendern erhielt. Nachdem, wie für alle Transplantationsexperimente üblich, den Mäusen ca. 1 Woche nach der Transplantation Blut entnommen worden war um sicherzustellen, dass das Transplantat nicht abgestoßen wurde, wurden die Tiere in den folgenden Wochen hinsichtlich einer sich entwickelnden akuten GvHD beobachtet. Der prozentuale Anteil an H-2K^{b+} Spenderzellen im Blut der Tiere lag 1 Woche nach der Transplantation bei 87 bis 95 % (Daten nicht gezeigt).

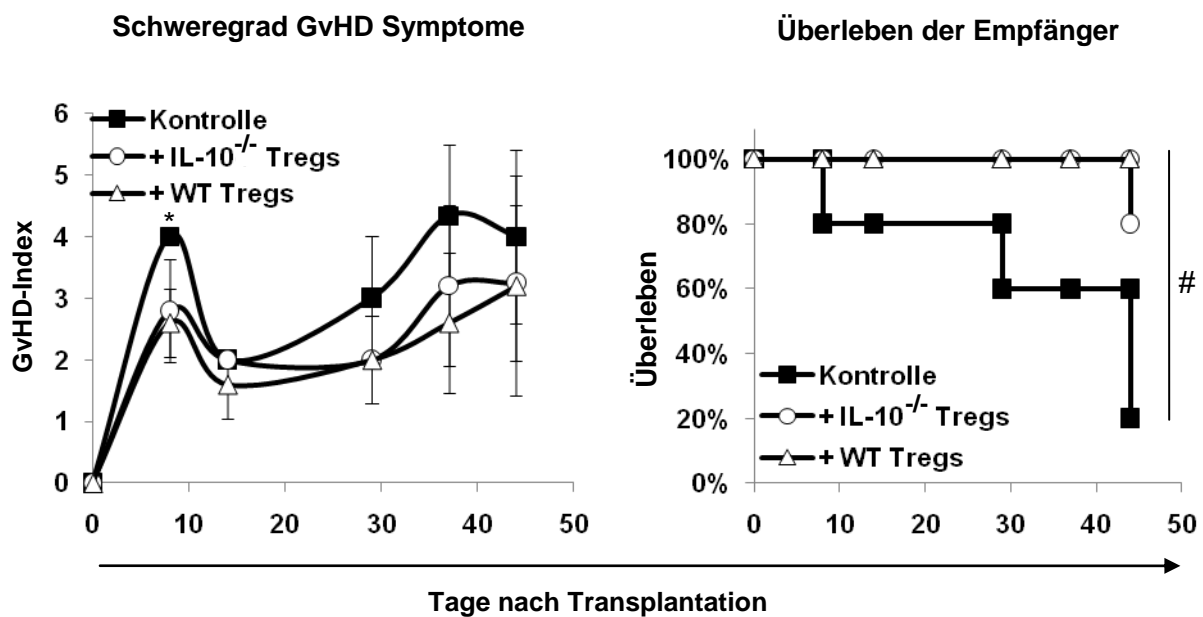


Abb 3.4.4: Allogene Transplantation nach letaler Bestrahlung +/- Tregs aus Wildtyp- oder IL-10^{-/-} Spendern

Die Empfänger (BALB/c) wurden mit 1x 8 Gy bestrahlt und erhielten 5×10^6 Knochenmark- und 5×10^5 Thy1.2⁺ TZ (CD25⁺ depletiert) aus C57BL/6 Spendern. Es wurden 3 Gruppen gebildet, die aus je 5 Mäusen bestanden. Eine Gruppe erhielt zusätzlich 5×10^5 Tregs aus WT (C57BL/6), eine Gruppe erhielt dieselbe Zahl Tregs aus IL-10^{-/-} Spendern (C57BL/6-IL-10^{-/-}) und eine Gruppe erhielt keine Tregs (Kontrolle). Der klinische GvHD-Index und das Überleben der Tiere wurden dokumentiert. * zeigt signifikanten Unterschied lt. studentischem t-Test mit $p < 0,05$ zwischen der Kontrolle und beiden anderen Gruppen an. # zeigt signifikanten Unterschied mit $p < 0,05$ lt. Log-rank (Mantel Cox) Test zwischen der Kontrolle und der Gruppe mit WT Tregs an.

Die Gruppe ohne Tregs entwickelte nur geringfügig stärker äußerlich erkennbare GvHD-Symptome als die beiden anderen Empfängergruppen. Auch die beiden Gruppen, denen Tregs transplantiert wurden, entwickelten eine leichte GvHD. Zwischen den beiden Gruppen, die Tregs aus Wildtyp- oder IL-10^{-/-} Spendern injiziert bekommen hatten, war am Ende nur ein leichter Unterschied erkennbar. Für 80 % der Tiere, welche keine Tregs transplantiert bekommen hatten war die akute GvHD bis 44 Tage nach der Transplantation letal. Die WT Tregs verbesserten die Überlebensrate signifikant. Auch die IL-10^{-/-} Tregs bewirkten eine höhere Überlebensrate (statistisch nicht signifikant). Aus dieser Gruppe verstarb bis zum Versuchsende nur eine Maus.

3.4.5 Interleukin-10^{-/-} Empfängermäuse entwickeln aggressivere GvHD als der Wildtyp

Als Nächstes wurden BALB/c Wildtypmäuse im Vergleich zu IL-10^{-/-} Tieren als Empfänger eines allogenen Knochenmark- und Thy1.2⁺ TZ-Transplantats verwendet. Auf diese Weise sollte analysiert werden, ob es Auswirkungen es auf die Entstehung der GvHD hat, wenn die Zellen (und somit auch die APCs) der Empfängertiere selbst kein IL-10 synthetisieren können.

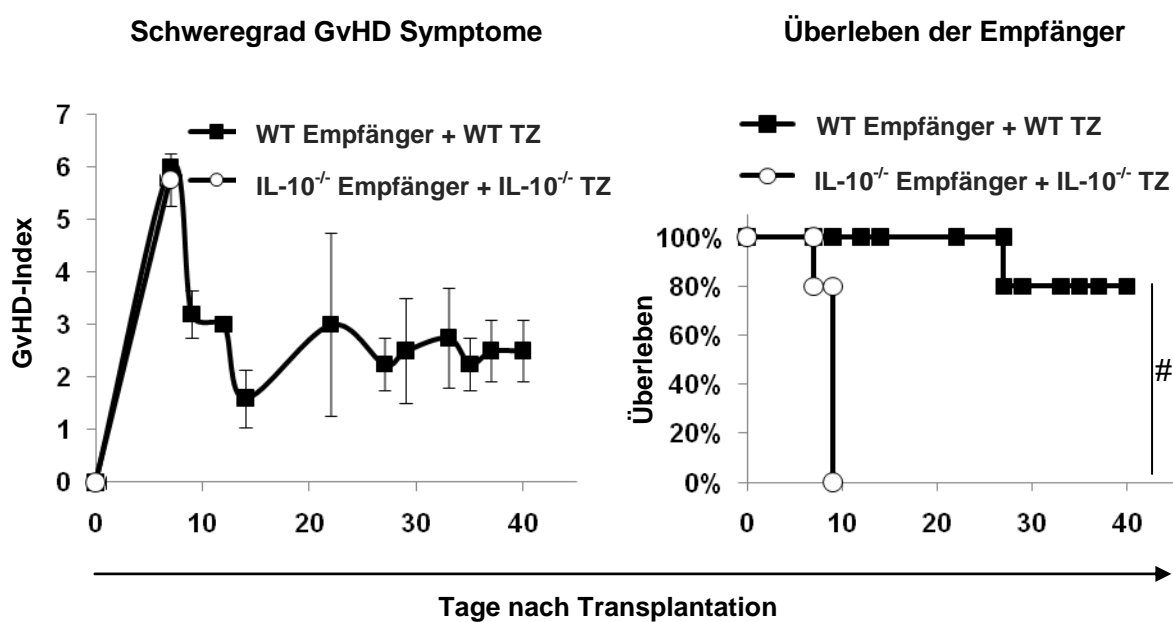


Abb. 3.4.5: Allogene Transplantation nach letaler Bestrahlung der WT- und IL-10^{-/-} Empfänger

Nach letaler Bestrahlung (1x 8 Gy) der WT- (BALB/c) und IL-10^{-/-} Empfänger (BALB/c-IL-10^{-/-}) wurden 5x10⁶ Knochenmark- und 5x10⁵ Thy1.2⁺ TZ (TZ) transplantiert. Das Knochenmark wurde zuvor mit CD90.2-Microbeads TZ-depletiert und stammte aus C57BL/6 WT Spendern. Die Thy1.2⁺ TZ stammten im Falle der WT Empfänger aus WT Spendern (C57BL/6) und aus IL-10^{-/-} Spendern (C57BL/6-IL-10^{-/-}) im Falle der IL-10^{-/-} Empfänger. Es wurden 5 Mäuse pro Gruppe eingesetzt. Es sind der klinische GvHD-Index und das Überleben der Empfänger dargestellt. # zeigt signifikanten Unterschied lt. Log-rank (Mantel Cox) Test mit p < 0,05 an.

Die IL-10^{-/-} Empfängertiere starben bereits wenige Tage nach der allogenen Transplantation. Die Wildtypmäuse wiesen eine wesentlich höhere Überlebensrate auf und zeigten nach einem hohen GvHD-Index in den ersten Tagen nach der Transplantation in den darauffolgenden Wochen nur relativ leichte GvHD Symptome.

3.4.6 CD4⁺CD25⁺ preTregs hemmen IL-10-unabhängig die GvHD in IL-10^{-/-} Empfängern

Neben den beiden in Abb. 3.4.5 gezeigten Empfängergruppen wurden zwei weitere Gruppen mit IL-10^{-/-} Empfängern gebildet. Eine erhielt Thy1.2⁺ TZ und preTregs je aus WT Spendern, die andere erhielt beide Zellpopulationen aus IL-10^{-/-} Spendern.

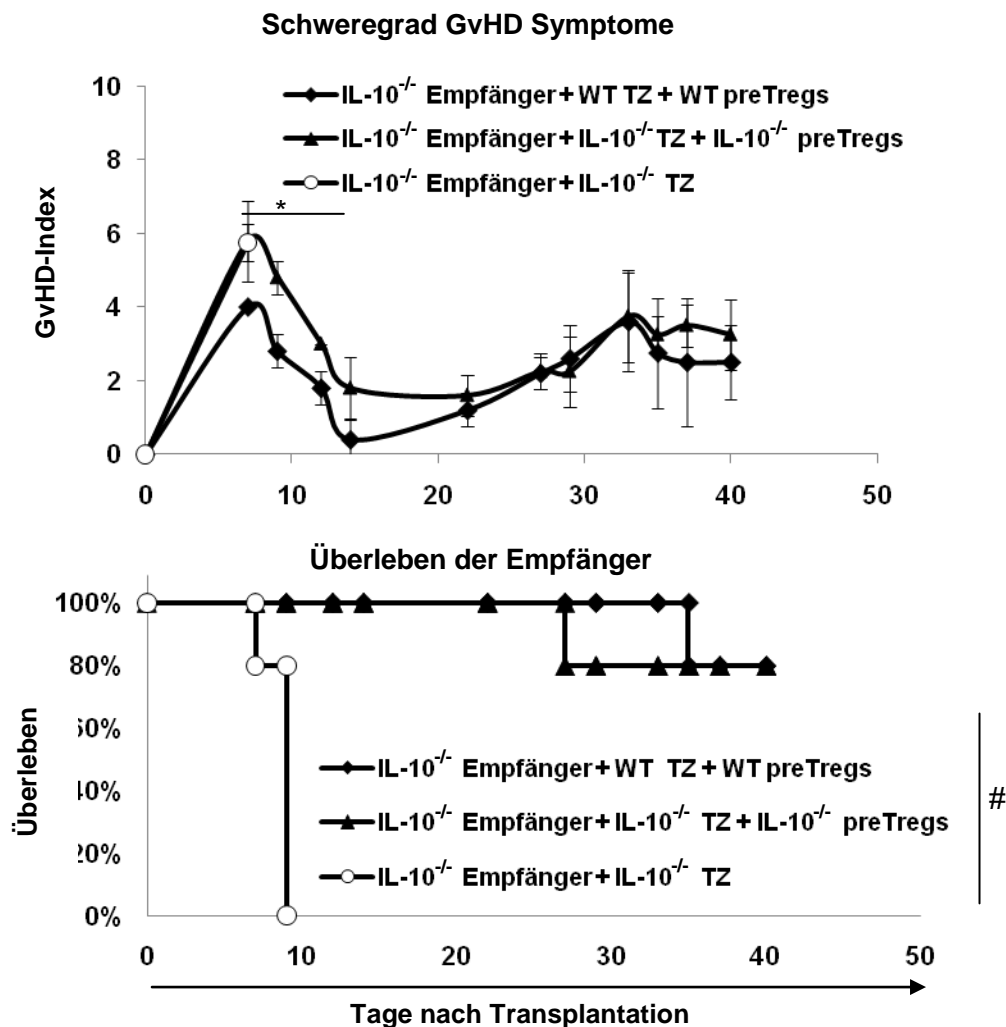


Abb. 3.4.6: Allogene Transplantation nach letaler Bestrahlung der IL-10^{-/-} Empfänger +/- preTregs aus WT- oder IL-10^{-/-} Spendern

Bestrahlung und Knochenmarktransplantation wie in Abb. 3.4.5 beschrieben. IL-10^{-/-} Empfänger erhielten entweder nur IL-10^{-/-} Thy1.2⁺ TZ, Thy1.2⁺ TZ + preTregs aus IL-10^{-/-} Spendern oder Thy1.2⁺ TZ + preTregs aus dem C57BL/6 WT. Es wurden je 5×10^5 Thy1.2⁺ TZ und 4×10^5 preTregs iv injiziert. GvHD-Index und Überleben der Empfänger (5 pro Gruppe) sind dargestellt. * zeigt signifikanten Unterschied mit $p < 0,05$ laut studentischem t-Test an. # zeigt signifikanten Unterschied mit $p < 0,05$ laut Log-rank (Mantel Cox) Test zwischen der Kontrollgruppe ohne preTregs und beiden Gruppen, die preTregs bekamen an.

Anhand von Abb. 3.4.6 ist klar erkennbar, dass sich durch die Verabreichung von preTregs ein protektiver Effekt bezüglich der Entstehung einer akuten GvHD manifestierte. Die beiden Gruppen, denen preTregs aus den unterschiedlichen Spendern transplantiert wurden, zeigten zwar kurz nach der Transplantation einen relativ hohen GvHD-Index, erholten sich allerdings wieder und hatten insgesamt bis 40 Tage nach der Transplantation nur noch relativ leichte GvHD Symptome. In den ersten 14 Tagen nach der Transplantation war der GvHD-Index in der Gruppe, die IL-10^{-/-} preTregs bekam im Durchschnitt höher als in der Gruppe, der WT preTregs injiziert wurden. Im nachfolgenden Zeitraum bis zum Ende der Dokumentation war allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen mehr erkennbar. Die Gruppen, denen zusätzlich preTregs transplantiert wurden, zeigten eine signifikant höhere Überlebensrate als die Tiere der Kontrollgruppe, die keine preTregs bekommen hatte. Während die Kontrollgruppe zu 100% verstarb, musste aus den Gruppen welche preTregs bekommen haben nur jeweils 1 Maus von 5 abgetötet werden.

Die Rolle zellkontaktabhängiger Mechanismen im Rahmen der CD4⁺CD25⁺ Treg-vermittelten Suppression alloreaktiver T-Zellen

Als Nächstes sollte die Relevanz der zellkontaktabhängigen Interaktionen zwischen Tregs und CD4⁺-, CD8⁺ TZ, sowie DCs für die Hemmung der akuten GvHD beschrieben werden. O'Shaughnessy und Kollegen konnten bereits zeigen, dass alloreaktive CD4⁺ TZ durch eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehalts in ihrer Proliferation gehemmt werden können [87]. Auch konnten sie darstellen, dass solche supprimierten CD4⁺ TZ ein reduziertes Potential bezüglich des Auslösens einer GvHD aufweisen. Dass alloreaktive CD8⁺ TZ auf dieselbe Weise supprimiert werden können haben die Autoren in diesem Zusammenhang allerdings nicht beschrieben. Es sollte im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit folglich die Frage geklärt werden, ob eine Erhöhung des cAMP-Gehalts in alloreaktiven CD8⁺ TZ ebenfalls in einer Suppression dieser Zellen resultiert. In einem noch folgenden Kapitel dieser Arbeit wird gezeigt werden, dass die Aktivierung allogener CD8⁺ TZ in Abwesenheit von CD4⁺ TZ ausreichend ist, um eine letale GvHD in den Empfängermausen eines TZ-Transplantats auszulösen. Somit scheint es nahe liegend, dass die alleinige

Suppression alloreaktiver CD4⁺ TZ im Rahmen allogener Transplantationen möglicherweise nicht ausreichend ist, um eine letale GvHD erfolgreich zu verhindern.

3.4.7 Die Proliferation alloreaktiver T-Zellen kann durch die Verwendung von db-cAMP *in vitro* gehemmt werden

In eigenen Vorversuchen sollte zunächst die Theorie von O'Shaughnessy und Kollegen, dass eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehalts in allogenen TZ in einer gemischten Leukozytenreaktion *in vitro* zu deren Suppression führt, bestätigt werden. Es wurden bestrahlte C57BL/6 Milzzellen^q alternativ zu DCs zur Stimulation der alloreaktiven TZ, die sich in den verwendeten BALB/c Milzzellen befanden, verwendet. Die Inkubation der Zellen erfolgte in An- oder Abwesenheit unterschiedlicher db-cAMP-Konzentrationen^r. Es wurde die Proliferation der Zellen mittels eines ³[H]-Thymidin-Inkorporationstests gemessen.

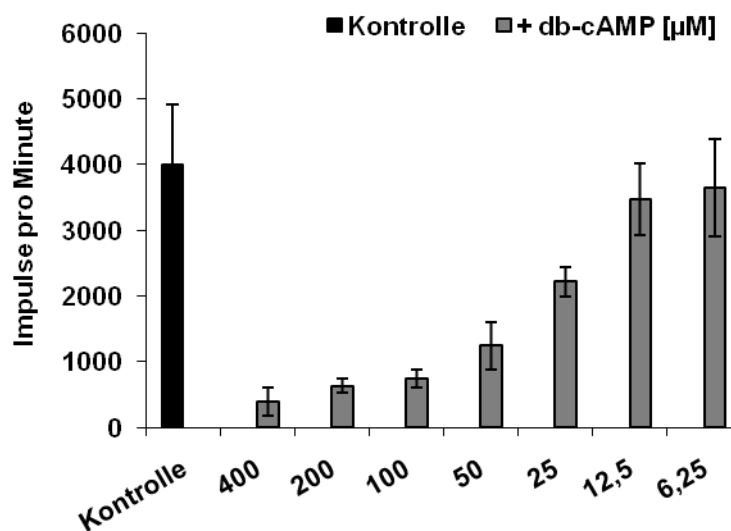


Abb. 3.4.7: Hemmung der Proliferation alloreaktiver Zellen durch db-cAMP *in vitro*

4x10⁵ mit 1x 20 Gy bestrahlte C57BL/6 Milzzellen wurden mit 4x10⁵ BALB/c MZ in einer 96-Kavitätenplatte mit Rundboden in An- oder Abwesenheit unterschiedlicher db-cAMP-Konzentrationen (400 µM bis 6,25 µM titriert) für 4 Tage im Brutschrank inkubiert. Es wurde die Proliferation der Zellen *via* ³[H]-Thymidin-Inkorporation gemessen. Die Standardabweichung wurde aus je 3 gleich behandelten Proben berechnet. Die Messwerte sind als Impulse pro Minute angegeben.

^q Die Milzzellen wurden mit 20 Gy bestrahlt, damit keine Zellproliferation (von z.B. enthaltenen TZ) mehr stattfand.

^r db- (= Dibutyl) cAMP = cAMP Analogon, für welches Zellen permeabel sind

Ohne den Zusatz von db-cAMP zur Kultur (Kontrolle) zeigten die Zellen eine deutliche Proliferationsrate. Durch die Zugabe des db-cAMP zu den Kulturen konnte die Proliferation in Abhängigkeit der eingesetzten db-cAMP-Konzentration drastisch gehemmt werden.

Auch der Phosphodiesterase-Hemmer Rolipram hemmt die Proliferation allogener TZ *in vitro* (Daten nicht gezeigt). Im Rahmen der durchgeführten ^3H -Thymidin-Proliferationstests konnten jedoch die Proliferationsraten von CD4⁺ und CD8⁺ TZ nicht separat analysiert werden. Daher wurden anschließend CFSE-Proliferationstests durchgeführt, in denen die CD4⁺ und CD8⁺ TZ-Populationen getrennt betrachtet werden konnten.

3.4.8 Der Phosphodiesterase-Inhibitor Rolipram hemmt die Proliferation alloreaktiver T-Zellen *in vitro*

Durch die Hemmung von Phosphodiesterasen kann der cAMP-Gehalt in Zellen indirekt, durch eine Hemmung des cAMP-Abbaus, erhöht werden. Der PDE-Inhibitor Rolipram wurde zu einer MLR, bestehend aus CFSE-markierten BALB/c Milzzellen und bestrahlten C57BL/6 Milzzellen gegeben. Die Inkubation des Kontrollansatzes erfolgte in Medium ohne Rolipram-Zusatz. Nach einer 6-tägigen Inkubation im Brutschrank wurde durchflusszytometrisch analysiert, ob die Proliferation der CD4⁺ und CD8⁺ TZ (BALB/c) durch die Rolipram Zugabe beeinflusst wurde.

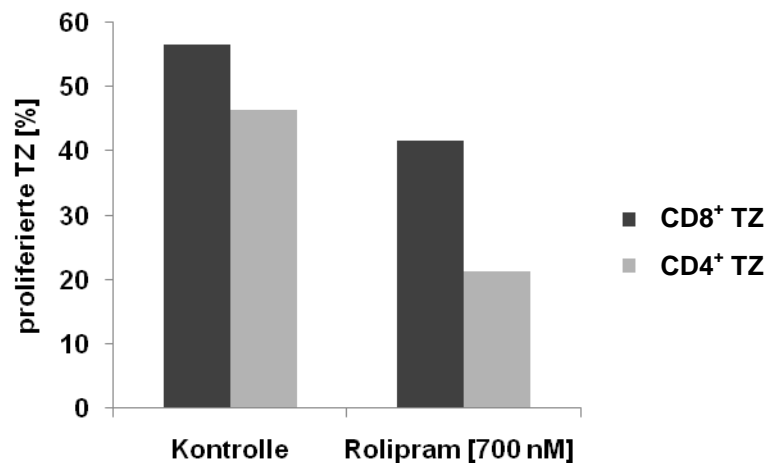


Abb. 3.4.8: Hemmung der Proliferation alloreaktiver CD8⁺ und CD4⁺ TZ durch Rolipram *in vitro*

Die BALB/c und C57BL/6 Milzzellen wurden im Verhältnis 1:1 in An- oder Abwesenheit von Rolipram (700 nM) für 6 Tage im Brutschrank inkubiert. Die BALB/c Milzzellen waren zuvor mit CFSE gefärbt worden und die C57BL/6 Milzzellen mit 1x 20 Gy bestrahlt. Nach der Inkubationszeit wurde der Anteil proliferierter und folglich CFSE-schwacher BALB/c CD8⁺ und CD4⁺ TZ durchflusszytometrisch ermittelt. Es ist der prozentuale Anteil proliferierter TZ dargestellt. Die Daten sind repräsentativ für 2 unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Offensichtlich fand in der Kultur eine deutliche Hemmung der Proliferation der allogenen CD4⁺ TZ durch Rolipram statt. Es waren 25 % weniger proliferierte CD4⁺ TZ detektierbar. Auch die Proliferation allogener CD8⁺ TZ konnte durch die Zugabe von Rolipram gehemmt werden. Allerdings fiel die Hemmung hier schwächer aus. Durch die Rolipram-Zugabe verringerte sich der Anteil proliferierter CD8⁺ TZ um 15 %. Niedrigere Rolipram Konzentrationen bewirkten eine schwächere Hemmung der Proliferation (Daten nicht gezeigt). Ein ähnliches Ergebnis wurde unter Verwendung des unspezifischen PDE-Inhibitors IBMX^s erzielt (Daten nicht gezeigt).

^s IBMX (= 3-Isobutyl-1-methylxanthine) ist ein unspezifischer PDE-Inhibitor, während Rolipram speziell die PDE4 inhibiert.

3.4.9 CD4⁺CD25⁺ Tregs kommunizieren über direkten Zellkontakt mit allogenen DCs

T-Zellen, auch Tregs, exprimieren Konnexine, aus denen gap junctions gebildet werden können. Die Expression der Konnexine, u.a. des Konnexins 43, wird nach Aktivierung der TZ noch verstärkt. Tregs, welche generell einen hohen cAMP-Gehalt aufweisen, sind deshalb in der Lage, cAMP über gap junctions auf ihre Zielzellen zu übertragen^t. Dr. M. Faßbender konnte im Rahmen ihrer Doktorarbeit zeigen, dass auch DCs Konnexine exprimieren^u. In der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass nach einer allogenen Stammzelltransplantation die Spender-TZ durch die APCs des Empfängers aktiviert werden [36]. Darauf basiert die Problematik, dass die TZ zumeist eine GvHD in den Empfängern auslösen.

Es sollte als Nächstes untersucht werden, mit welchen Zellen die Tregs über direkten Zellkontakt kommunizieren, wenn sie einerseits auf syngene TZ und darüber hinaus auf allogene DCs treffen. Zu diesem Zweck wurden Calcein-Transfer-Experimente *in vitro* durchgeführt. Der Farbstoff Calcein diente dabei als Indikator für eine zellkontaktabhängige Interaktion zwischen den Tregs, die für die Versuche mit Calcein beladen wurden, und ihren Zielzellen. Nach der Inkubation von BALB/c DCs mit C57BL/6 Tregs und Thy1.2⁺ TZ aus C57BL/6-Ly5.1 Tieren wurde die Calcein-Fluoreszenzintensität (Median) der CD4⁺ und CD8⁺ TZ, sowie der DCs durchflusszytometrisch ermittelt. Die CD4⁺ TZ konnten dabei wie üblich über den kongenen Marker CD45.1 (= Ly5.1) von den eingesetzten Tregs unterschieden werden. In den durchgeführten Experimenten wurde ebenfalls untersucht, ob der gap junction-Inhibitor GAP27 den Calceintransfer unterbinden kann.

^t Eigene Diplomarbeit, Titel: „Identifizierung von cAMP als essentiellm Suppressorfaktor regulatorischer T- Zellen“, Mainz, Dezember 2006

^u Dissertation von Dr. Melanie Faßbender, Titel: „Untersuchung der Modulation adaptiver Immunantworten in Abhängigkeit der Reifung dendritischer Zellen“, Mainz, September 2008

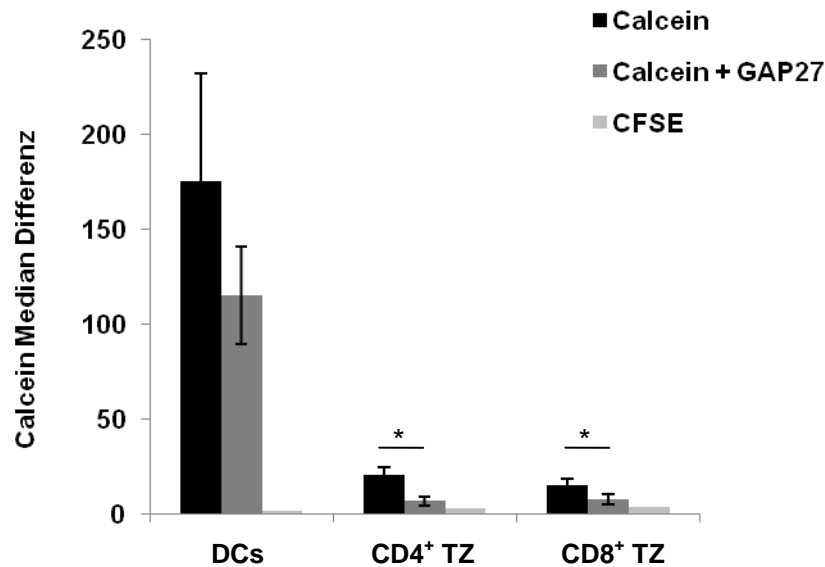


Abb. 3.4.9: Calcein-Fluoreszenzintensitäten der DCs, CD4⁺ und CD8⁺ TZ nach deren Inkubation mit Calcein-gefärbten Tregs

3×10^4 BMDCs (BALB/c) wurden mit je 1×10^5 Thy1.2⁺ TZ (C57BL/6-Ly5.1) und Calcein⁺ Tregs (C57BL/6) in 96-Kavitätenplatten mit Rundboden für 20 Stunden inkubiert. Für einen Parallelansatz wurden die Tregs vor der Kultur für 60 Min. mit 300 μ M GAP27 präinkubiert. Für einen weiteren Parallelansatz wurden die Tregs mit CFSE statt Calcein markiert. Es ist der Calcein Median der BMDCs, der CD4⁺ und CD8⁺ TZ dargestellt, nachdem der entsprechende Median aus einer BMDC/Thy1.2⁺ TZ Kultur (ohne Tregs) subtrahiert wurde (Median Differenz). Die Standardabweichung wurde aus je 4 Messwerten aus insgesamt zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ermittelt. * zeigt einen signifikanten Unterschied laut studentischem t-Test mit $p < 0,05$ an.

Offenbar fand ein Transfer des Calceins von den Tregs auf die allogenen DCs statt, welche nach der Inkubationszeit mit den Calcein-markierten Tregs deutlich Calcein-positiv waren. Die CD4⁺ und CD8⁺ TZ waren bei der Analyse schwach Calcein-positiv. Durch den Einsatz des gap junction Inhibitors GAP27 konnte der Calceintransfer auf die Zielzellen teilweise gehemmt werden. Nach der Inkubation der DCs und TZ mit den CFSE-gefärbten Tregs waren so gut wie keine CFSE-positiven DCs und TZ detektierbar. Der Ansatz diente als Kontrolle um auszuschließen, dass bei der Messung Duplikate, bestehend aus den zu analysierenden Zellen und daran hängenden Tregs, aufgenommen wurden. CFSE kann im Gegensatz zu Calcein nur in verschwindend geringen Mengen über gap junctions übertragen werden. Es konnte somit gezeigt werden, dass Tregs mit allogenen DCs über direkten Zellkontakt kommunizieren. Ein ähnlich durchgeführter

Versuch mit preTregs zeigte ein ähnliches Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Als Konsequenz folgte die Annahme, dass Tregs/preTregs die allogenen DCs supprimieren können. Um diese Vermutung zu verifizieren, wurde der Phänotyp der DCs, die mit allogenen preTregs und TZ in einer MLR inkubiert wurden, analysiert. Als Marker für den Aktivierungszustand der DCs wurde die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 gemessen.

3.4.10 CD4⁺CD25⁺ preTregs hemmen allogene DCs *in vitro*

Die DCs wurden mit allogenen Thy1.2⁺ TZ in einer MLR inkubiert. Teilweise wurden zusätzlich preTregs in die Kultur gegeben um zu verfolgen, ob diese einen Einfluss auf die CD80/CD86 Expression der DCs haben. Zur zusätzlichen Stimulation der DCs wurde den Kulturen LPS zugesetzt.

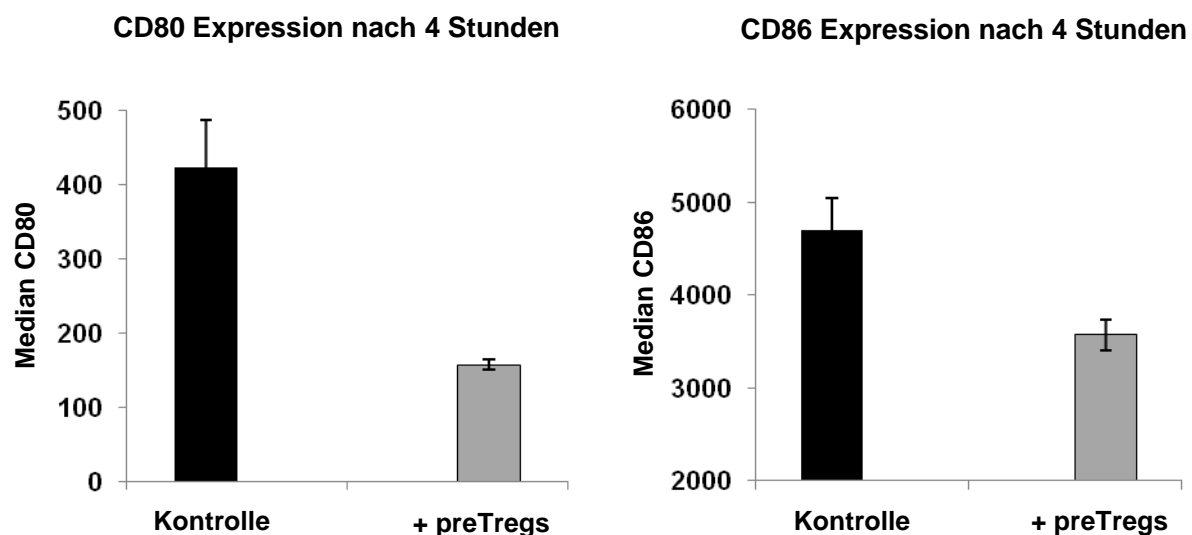


Abb. 3.4.10: Expression kostimulatorischer Moleküle auf DCs in einer MLR +/- preTregs

BALB/c BMDCs (3×10^4 /Kavität) wurden mit Thy1.2⁺ TZ (1×10^5 , C57BL/6) in An- oder Abwesenheit von preTregs ($1,5 \times 10^5$; C57BL/6) für 4 Stunden in einer 96-Kavitätenplatte mit Rundboden im Brutschrank inkubiert. Zur Stimulation der DCs wurde den Kulturen LPS zugesetzt [100 ng/ml]. Vor der Färbung mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern für die durchflusszytometrische Analyse wurde ein 10-minütiger Fc-Block durchgeführt. Die Standardabweichung wurde aus je 3 gemessenen Proben berechnet. Es sind der CD80 und der CD86 Median der BMDCs dargestellt.

Aus Abb. 3.4.10 wird ersichtlich, dass die voraktivierten Tregs die CD80/CD86 Expression und somit die Aktivierung der allogenen DCs innerhalb einer 4-stündigen Kultivierung *in vitro* deutlich gehemmt haben.

Zusammenfassend liefern die *in vitro* Experimenten einen Hinweis darauf, dass zellkontaktabhängige Mechanismen bei der Treg-vermittelten Suppression allogener Zellen eine Rolle spielen können. Alloreaktive TZ konnten außerdem durch eine Erhöhung ihres cAMP-Gehalts supprimiert werden.

3.4.11 Der Phosphodiesterase-Inhibitor Rolipram kann die CD4⁺CD25⁺ preTreg-vermittelte Hemmung der akuten GvHD *in vivo* verbessern

Basierend auf den vorangegangenen Ergebnissen sollte nun im Rahmen allogener Transplantationen geprüft werden, ob die Erhöhung des cAMP-Gehalts in Kombination mit der Injektion von preTregs zu einer verbesserten Hemmung der akuten GvHD in den Empfängermäusen führt. Die Empfängertiere wurden letal bestrahlt und erhielten einige Stunden später ein allogenes Knochenmark- und Thy1.2⁺ TZ-Transplantat. Es wurden vier Gruppen gebildet: Gruppe 1 erhielt nur Knochenmark (KM) und TZ, Gruppe 2 erhielt zusätzlich preTregs, Gruppe 3 bekam KM, TZ und Rolipram injiziert und Gruppe 4 erhielt neben dem KM und den TZ noch zusätzlich preTregs und Rolipram.

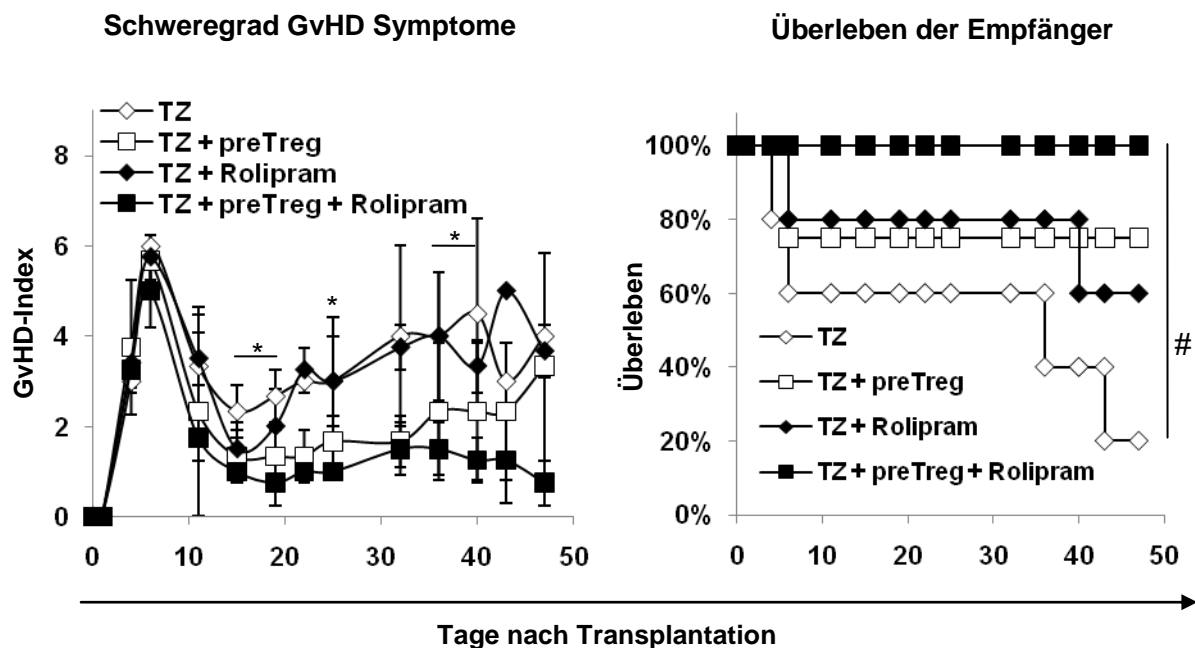


Abb. 3.4.11: Allogene Transplantation +/- preTregs +/- Rolipram nach letaler Bestrahlung

Die Empfänger (BALB/c) wurden mit $1 \times 8 \text{ Gy}$ bestrahlt und erhielten alle 5×10^6 Knochenmarkzellen (KM) und 5×10^5 Thy1.2⁺ TZ (TZ) (beides C57BL/6). Gruppe 1 (5 Mäuse) erhielt KM und TZ; Gruppe 2 (4 Mäuse) erhielt zusätzlich preTregs; Gruppe 3 (5 Mäuse) bekam KM, TZ und Rolipram; Gruppe 4 (4 Mäuse) erhielt KM, TZ, preTregs und Rolipram. Die Zahl der preTregs (C57BL/6) betrug 4×10^5 . Die injizierte Rolipram-Konzentration betrug $0,3 \text{ mg/kg}$ Körpergewicht und wurde am Transplantationstag und den 4 folgenden Tagen ip injiziert. Der GvHD-Index und das Überleben der Tiere wurden dokumentiert. * zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen Gruppe 1 (TZ) und Gruppe 4 (TZ + preTreg + Rolipram) laut studentischem t-Test mit $p < 0,05$ an. Zwischen Gruppe 1 und Gruppe 2 war beim GvHD-Index nur an den Tagen 19 und 22 ein signifikanter Unterschied festzustellen. # zeigt signifikanten Unterschied mit $p < 0,05$ lt. Log-rank (Mantel Cox) Test zwischen Gruppe 1 (TZ) und Gruppe 4 (TZ + preTregs + Rolipram) an.

Wie an der Überlebensgrafik erkennbar ist, verstarben aus allen Gruppen Empfängertiere außer aus Gruppe 4, welche preTregs in Kombination mit Rolipram verabreicht bekommen hatte. Die niedrigste Überlebensrate zeigte Gruppe 1, die nur KM + TZ transplantiert bekam. Die zusätzliche Transplantation von preTregs bewirkte eine höhere Überlebensrate, auch die Injektion von Rolipram. Der klinische GvHD-Index der Tiere zeigt ebenfalls, dass zumindest durch die Verabreichung von preTregs eine Verbesserung der GvHD-Symptomatik erzielt werden konnte. Jedoch bewirkte nur die kombinierte Gabe von preTregs und Rolipram im Vergleich zur

Kontrollgruppe (Gruppe1) eine drastische Abschwächung der GvHD, was in einer Überlebensrate von 100% resultierte.

3.5 Die Rolle von MHC-Klasse-II bei der Entstehung und der Hemmung einer akuten GvHD

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollten –nach der Etablierung entsprechender Mausmodelle- potentielle Mechanismen zur Unterdrückung oder Abschwächung der akuten GvHD untersucht werden. Es wurde gezeigt, dass voraktivierte und nicht-voraktivierte $CD4^+CD25^+$ regulatorische T-Zellen potente Suppressoren der GvHD im hier verwendeten Transplantationsmodell darstellen. Auch die Mechanismen der (pre)Treg-vermittelten Suppression wurden bereits näher betrachtet.

Abgesehen von der Hemmung einer GvHD durch die Injektion von (pre)Tregs sollte außerdem untersucht werden, welche Rolle die Aktivierung konventioneller alloreaktiver Spender- $CD4^+$ TZ in Bezug auf die Entstehung der akuten GvHD spielt. Es stellte sich zunächst die Frage, ob eine fehlende Aktivierung der Spender- $CD4^+$ TZ in den Empfängern nach allogener Transplantation dazu führt, dass keine oder nur eine schwächere GvHD ausgelöst wird.

3.5.1 Entstehung einer GvHD trotz fehlender Aktivierung von $CD4^+$ TZ in MHC-II-defizienten Mäusen nach subletaler Bestrahlung und allogener Transplantation

Zunächst sollte bewiesen werden, dass in den zur Verfügung stehenden A-alpha^{-/-} Mäusen^v, welche MHC-Klasse-II-defizient sind (Daten nicht gezeigt), tatsächlich keine Aktivierung alloreaktiver $CD4^+$ TZ stattfindet. Zu diesem Zweck wurden die allogenen Thy1.2⁺ TZ mit CFSE gefärbt, um die Proliferation, und damit die Aktivierung, der TZ durchflusszytometrisch messen zu können. Für die ersten Versuche wurde das Transplantationsmodell mit subletaler Bestrahlung gewählt, um zu zeigen, ob die MHC-II-defizienten Empfängertiere überhaupt eine GvHD entwickeln. Zur Kontrolle wurden parallel C57BL/6 Wildtypmäuse als Empfänger eingesetzt. Zwei Tage nach der Depletion der Empfänger-NK-Zellen wurden die

^v Der genetische Hintergrund der A-alpha^{-/-} Mäuse ist C57BL/6.

Tiere subletal bestrahlt und bekamen CFSE-markierte Thy1.2⁺ TZ aus allogenen BALB/c Spendern transplantiert. Fünf Tage nach der Transplantation wurde den Tieren Blut entnommen und die Proliferation der CD4⁺ und CD8⁺ Spender-TZ gemessen.

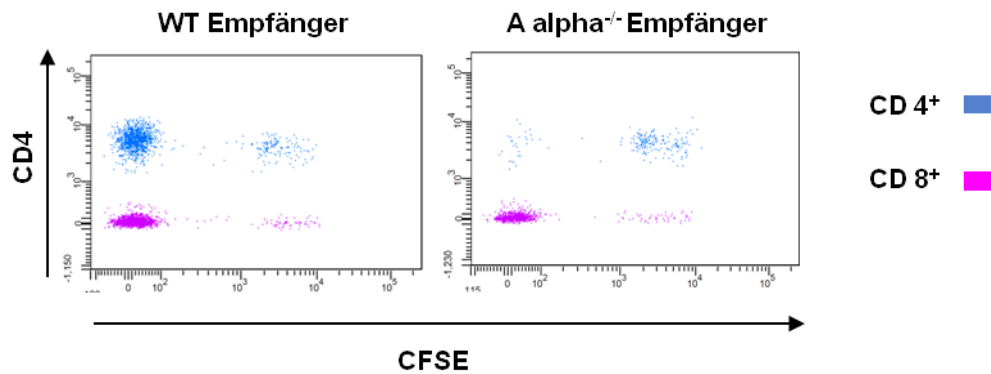


Abb. 3.5.1a: Proliferation alloreaktiver CD4⁺ und CD8⁺ TZ in A-alpha^{-/-} und WT Empfängern 5 Tage nach subletaler Bestrahlung und allogener Transplantation

Es wurde eine Depletion der Empfänger-NK-Zellen in den A-alpha^{-/-} und den C57BL/6 WT Empfängern durchgeführt, die Tiere wurden 2 Tage später mit 1x 6,5 Gy bestrahlt und bekamen 2x10⁷ CFSE-markierte Thy1.2⁺ TZ (BALB/c) transplantiert. Es wurden 9 A-alpha^{-/-} und 5 WT Mäuse eingesetzt. 5 Tage nach Transplantation wurde den Mäusen Blut entnommen und durchflusszytometrisch analysiert. Es sind beispielhaft aus je einer repräsentativen Maus pro Gruppe die CD4⁺ und CD8⁺ Spender-TZ dargestellt^w.

Die wenigen Zellen im Bereich hoher CFSE-Fluoreszenzintensität zeigen die ursprüngliche CFSE-Intensität der Zellen direkt nach der Färbung an. Vor der Injektion der Zellen in die Empfängermäuse waren alle Thy1.2⁺ TZ stark CFSE-positiv (Daten nicht gezeigt). Im Blut der Wildtypmäuse zeigten sich 5 Tage nach der Transplantation jeweils hohe Anzahlen CFSE-schwacher allogener CD4⁺ und CD8⁺ TZ, wodurch auf eine starke Proliferation beider Populationen geschlossen werden konnte. Die Zellen müssen sich schon vielfach geteilt haben, da die CFSE-Konzentration in den Tochterzellen nur noch extrem gering war. Im Blut der MHC-II-defizienten A-alpha^{-/-} Mäuse konnten lediglich zahlreiche CFSE-schwache allogene CD8⁺ TZ aber kaum CD4⁺ TZ detektiert werden. Offensichtlich fand demnach in den

^w Die Daten werden hier nicht in einem Histogramm dargestellt, sondern in einem Dot Blot um die Proliferation CD4⁺ und CD8⁺ TZ zusammen in einer Grafik zeigen zu können. Das Prinzip ist dasselbe. Proliferieren die Zellen, findet man zunehmend Populationen im Bereich niedrigerer Fluoreszenzintensität.

WT Empfängern eine starke Proliferation allogener CD4⁺ und CD8⁺ Spender-TZ statt aber in den MHC-II-defizienten A-alpha^{-/-} Empfängern nur eine starke Proliferation der allogenen CD8⁺ TZ. In der nächsten Abbildung sind die Überlebensrate und der GvHD-Index der Empfänger nach der Transplantation dargestellt.

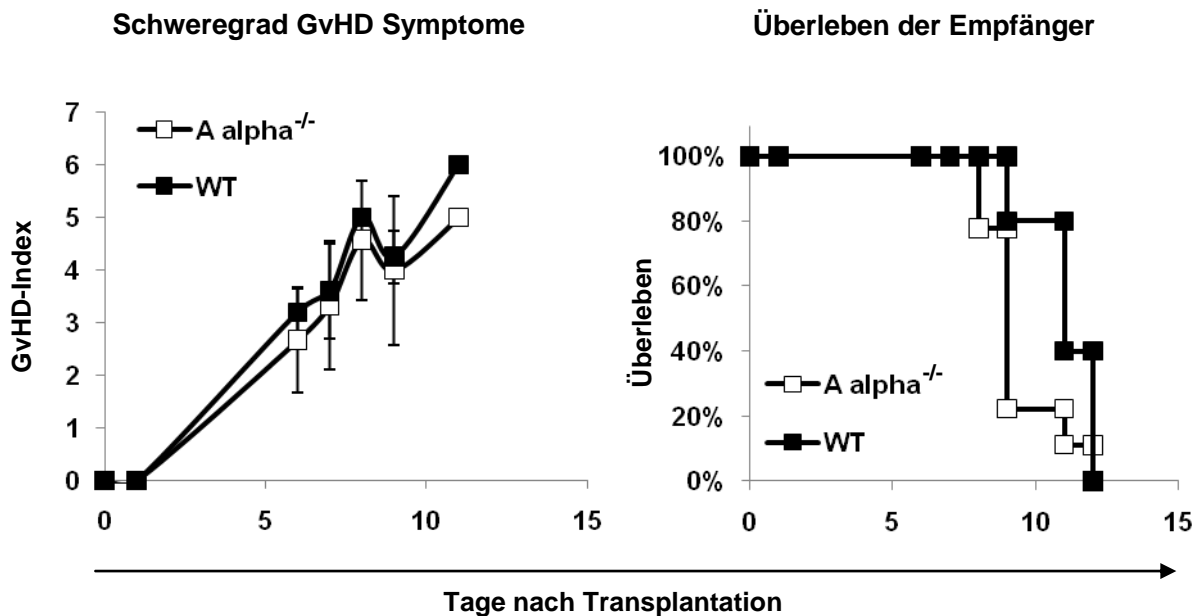


Abb. 3.5.1b: Allogene Transplantation der A-alpha^{-/-} und WT Empfänger nach subletaler Bestrahlung

Es sind der GvHD-Index und die Überlebensrate dargestellt. Versuchsdetails siehe Abb. 3.5.1a.

Wie bei dieser Art Transplantationsmodell zu erwarten war, zeigte die akute GvHD bei den Wildtypempfängern einen sehr aggressiven Verlauf. Die Tiere verloren rapide an Körpergewicht (Daten nicht gezeigt) und entwickelten innerhalb von 12 Tagen eine letale GvHD. Es stellte sich heraus, dass auch die A-alpha^{-/-} Empfänger eine letale GvHD entwickelten. Zwischen den beiden Empfängergruppen war bezüglich des Krankheitsverlaufs kein wesentlicher Unterschied erkennbar. Ein Wiederholungsversuch zeigte das gleiche Ergebnis. Da sich herausgestellt hatte, dass auch die MHC-II-defizienten Empfänger trotz Abwesenheit einer deutlichen detektierbaren Population aktivierter Spender-CD4⁺ TZ im Rahmen des relativ aggressiven Transplantationsmodells eine GvHD entwickelten, sollte folglich auch mit dem weniger aggressiven Modell untersucht werden, ob sich diese Beobachtung bestätigen lässt. Für die nächsten Experimente wurde das weniger aggressive Transplantationsmodell mit letaler Bestrahlung und der Transplantation einer

niedrigeren TZ-Zahl gewählt. Auch unter Verwendung dieses Modells entwickelten neben den Wildtypmäusen auch die A-alpha^{-/-} Mäuse eine akute GvHD (Daten nicht gezeigt). Es stellte sich daraufhin die Frage, ob durch eine ergänzende Transplantation regulatorischer T-Zellen die GvHD auch in diesem System abgeschwächt werden kann. Die Frage erschien vor dem Hintergrund, dass bei den Versuchen der vorliegenden Arbeit mit CD4⁺CD25⁺ Tregs gearbeitet wurde (Daten nicht gezeigt), umso interessanter. Normalerweise werden CD4⁺ TZ durch Antigenpeptide aktiviert, die mit Hilfe von MHC-II-Molekülen präsentiert werden.

3.5.2 Voraktivierte CD4⁺CD25⁺ Tregs hemmen die Proliferation alloreaktiver T-Zellen *in vitro* MHC-II-unabhängig

Als Erstes wurde mit Hilfe eines Proliferationstests unter Verwendung von A-alpha^{-/-} und WT DCs zur Stimulation untersucht, ob preTregs die Proliferation alloreaktiver TZ in diesem System *in vitro* hemmen können.

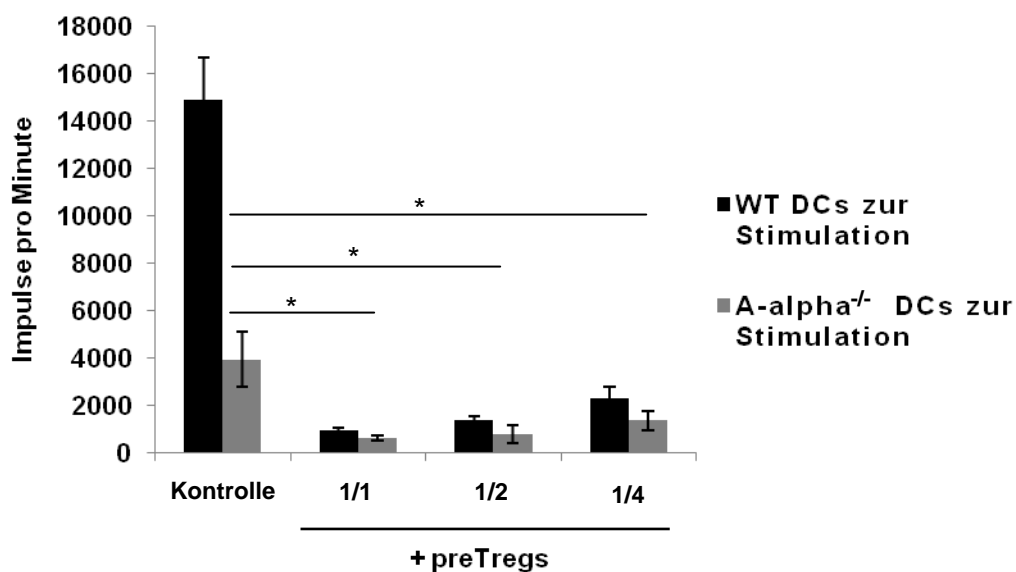


Abb. 3.5.2: Proliferation alloreaktiver TZ *in vitro* nach Stimulation mit WT oder A-alpha^{-/-} DCs +/- preTregs

BALB/c Thy1.2⁺ TZ (5×10^4) wurden mit 3×10^3 BMDCs aus A-alpha^{-/-} oder Wildtypmäusen (C57BL/6) in An- oder Abwesenheit von preTregs (BALB/c) in einer 96-Kavitätenplatte mit Rundboden inkubiert. Die preTregs wurden von 5×10^4 in 1:2 Titrationsschritten abwärts titriert. Es wurde die Proliferationsrate der Zellen *via* ³[H]-Thymidin-Inkorporation gemessen. Die Standardabweichung wurde aus je 3 gleich behandelten Proben berechnet. Die Messwerte sind als Impulse pro Minute angegeben. Mit den Werten der Zellen, die mit A-alpha^{-/-} DCs stimuliert wurden wurde eine statistische Analyse mittels studentischem t-Test durchgeführt. * zeigt signifikanten Unterschied mit $p < 0,05$ an.

Der ^3H -Thymidin-Proliferationstest zeigte eine starke Proliferation der Zellen, welche mit WT DCs stimuliert wurden. Die preTregs bewirkten im zahlenmäßigen Verhältnis von 1:1 zu den Thy1.2⁺ TZ eine drastische Hemmung der Proliferation. Die Hemmung fiel geringfügig schwächer aus, wenn die Anzahl der preTregs reduziert wurde. Selbst bei einem Verhältnis von 4:1 (Thy1.2⁺ TZ : preTreg) zeigte sich aber immernoch eine sehr deutliche Hemmung der Proliferation. Die Proliferation der Zellen, welche mit A-alpha^{-/-} DCs stimuliert wurden, war schwächer als die der mit Wildtyp DCs stimulierten Zellen. Allerdings konnte auch hier die Proliferation durch Zugabe von preTregs stark gehemmt werden. Die Hemmung fiel mit sinkender preTreg Anzahl ebenfalls entsprechend geringer aus.

3.5.3 CD4⁺CD25⁺ Tregs hemmen alloreaktive CD8⁺ T-Zellen *in vitro* unabhängig von MHC-Klasse-II

Die Proliferation alloreaktiver TZ, welche mit A-alpha^{-/-} DCs stimuliert wurden, konnte also *in vitro* durch preTregs offenbar MHC-II-unabhängig signifikant gehemmt werden. Es stellte sich daraufhin die Frage, ob auch nicht-voraktivierte natürlich vorkommende CD4⁺CD25⁺ Tregs eine Hemmung bewirken können, wenn die stimulierenden DCs aus MHC-II-defizienten Mäusen stammen und die Tregs in der MLR erst aktiviert werden müssen. Es sollte möglichst sichergestellt werden, dass in einem MHC-II-freien System gearbeitet wird. In den BALB/c Thy1.2⁺ TZ-Präparationen konnte die Zahl der MHC-II⁺-Zellen (überwiegend BZ), nach einer ergänzenden Depletion mittels an Dynabeads gekoppeltem anti-MHC-II-Antikörper, immerhin von ursprünglich ca. 5 % auf 0,2 - 0,3 % reduziert werden. Die BALB/c Tregs konnten mit einer sehr hohen Reinheit angereinigt werden, so dass sich in den Präparationen keine verunreinigenden MHC-II⁺-Zellen mehr befanden (Daten nicht gezeigt). Im folgenden Experiment wurden CFSE-gefärbte Thy1.2⁺ TZ in An- oder Abwesenheit von Tregs (beides BALB/c) entweder mit A-alpha^{-/-} oder mit WT DCs stimuliert. Nach 4 Tagen wurde die Proliferation der alloreaktiven CD4⁺ und CD8⁺ TZ durchflusszytometrisch gemessen.

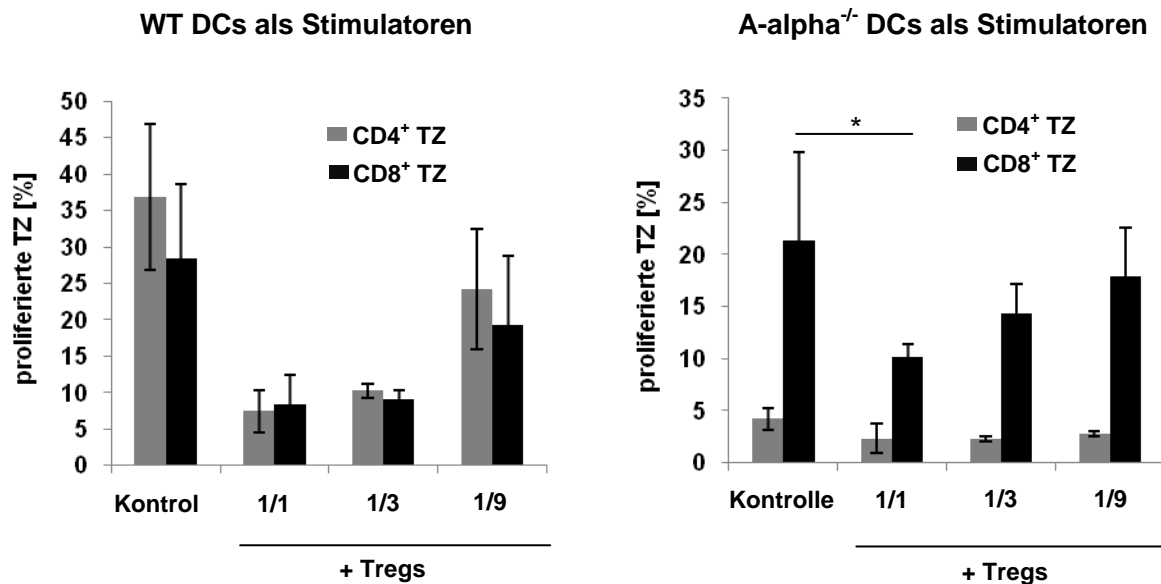


Abb. 3.5.3: Proliferation allogener CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in An- oder Abwesenheit von Tregs nach Stimulation mit A-alpha^{-/-} oder WT DCs

1x10⁵ CFSE⁺ Thy1.2⁺ TZ (BALB/c) wurden mit 1x10⁴ BMDCs (A-alpha^{-/-} oder WT) in An- oder Abwesenheit von BALB/c-Ova-tg-Thy1.1^x Tregs (ab 1x10⁵ in 2 weiteren 1:3 Verdünnungsschritten abwärts titriert) in einer 96-Kavitätenplatte mit Rundboden stimuliert. Nach 4-tägiger Inkubation im Brutschrank wurde die Proliferation der CD4⁺ und CD8⁺ TZ (beide CD90.1^{H-2K^d+}), gemessen an deren CFSE-Fluoreszenzintensität, ermittelt. Es ist der prozentuale Anteil proliferierter TZ dargestellt. Die Standardabweichung wurde aus mindestens 3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ermittelt. Um die Hemmung der mit A-alpha^{-/-} DCs stimulierten TZ auf Signifikanz zu überprüfen, wurde hier ein studentischer t-Test durchgeführt. * zeigt Signifikanz mit p < 0,05 an.

Wurden die allogenen TZ mit WT DCs stimuliert, bewirkte die Anwesenheit der Tregs, dass wesentlich weniger proliferierte alloreaktive CD4⁺ und CD8⁺ TZ detektiert wurden als im Kontrollansatz ohne Tregs. Je weniger Tregs eingesetzt wurden, desto schwächer fiel die Hemmung aus. In der höchsten Konzentration bewirkten die Tregs, dass nach der Stimulation mit WT DCs nur ca. 8 % proliferierte CD8⁺ TZ detektierbar waren im Vergleich zu 28 % im Kontrollansatz ohne Tregs. In Anwesenheit der Tregs wurde ebenfalls eine deutlich reduzierte Anzahl proliferierter CD4⁺ TZ gemessen. Die mit A-alpha^{-/-} DCs stimulierten CD8⁺ TZ konnten durch die höchste eingesetzte Treg-Konzentration signifikant gehemmt werden. Ohne Tregs in der Kultur wurden durchschnittlich 21 %, unter Anwesenheit der Tregs in der

^x Thy1.1 = CD90.1

höchsten Konzentration wurden nur 10 % proliferierte CD8⁺ TZ detektiert. Es wurden nach der Stimulation mit A-alpha^{-/-} DCs kaum proliferierte CD4⁺ TZ detektiert.

Experimente, bei denen zusätzlich der MHC-II-blockierende Antikörper M5/114.15.2 zur Kultur gegeben wurde, um die gegebenenfalls noch vorhandenen verunreinigenden MHC-II⁺-Zellen zu blockieren, brachten vergleichbare Ergebnisse hervor. Auch hier wurde die Zahl der proliferierten CD8⁺ TZ nach Stimulation mit A-alpha^{-/-} DCs durch den Einsatz von Tregs im Verhältnis 1:1 zu den eingesetzten Thy1.2⁺ TZ jeweils um circa die Hälfte reduziert (Daten nicht gezeigt). Es konnte demnach gezeigt werden, dass Tregs alloreaktive TZ *in vitro* unabhängig von MHC-II inhibieren können. Im nächsten Schritt wurden Transplantationsexperimente mit A-alpha^{-/-} Mäusen als Empfänger durchgeführt.

3.5.4 Die MHC-II-unabhängige letale GvHD kann durch CD4⁺CD25⁺ preTregs gehemmt werden

Es sollte nachgewiesen werden, ob (pre)Tregs die akute GvHD nach allogener Transplantation verhindern oder zumindest abschwächen können. Zu diesem Zweck wurde das Transplantationsmodell mit letaler Bestrahlung gewählt, da hier der Transfer niedrigerer Zellzahlen genügt um eine GvHD in den Empfängern auszulösen. Da nach einer letalen Bestrahlung der Empfänger zusätzlich Knochenmark transplantiert werden musste, wurde erneut kontrolliert, ob es in den Empfängertieren zu einer Proliferation von CD4⁺ TZ kommt. Die Tiere erhielten alle Knochenmark aus BALB/c Wildtypmäusen und es sollte ausgeschlossen werden, dass die Spender-CD4⁺ TZ womöglich doch durch Zellen aus dem Spender-Knochenmark aktiviert werden. Aus diesem Grund wurden die Spender-Thy1.2⁺ TZ vor der Transplantation wiederum mit CFSE markiert. Bei der FACS-Analyse des Blutes der Tiere 6 Tage nach Transplantation zeigte sich das gleiche Ergebnis wie in Abb. 3.5.1a dargestellt. Im Blut der WT Mäuse konnten zahlreiche proliferierte CD4⁺ und CD8⁺ Spender-TZ detektiert werden, im Blut der A-alpha^{-/-} zahlreiche proliferierte CD8⁺ TZ aber kaum CD4⁺ TZ (Daten nicht gezeigt). Ergänzend transplantierte preTregs wurden in diesem Zusammenhang nicht mit CFSE-markiert, da bei der Färbung mit CFSE stets ein hoher Zellverlust in Kauf genommen werden musste und die verfügbare Anzahl an (pre)Tregs für die *in vivo* Versuche ohnehin ein

limitierender Faktor war. Im nachfolgend dargestellten Experiment wurden zunächst voraktivierte Tregs (preTregs) verwendet um zu zeigen, ob diese einen hemmenden Einfluss auf die Entstehung einer akuten GvHD in A-alpha^{-/-} Tieren ausüben können. Nach letaler Bestrahlung erhielten die Mäuse allogenes Knochenmark und Thy1.2⁺ TZ. Eine Gruppe bekam zusätzlich allogene preTregs iv injiziert. Nachfolgend sind der GvHD-Index und die Überlebensrate der Empfänger gezeigt.

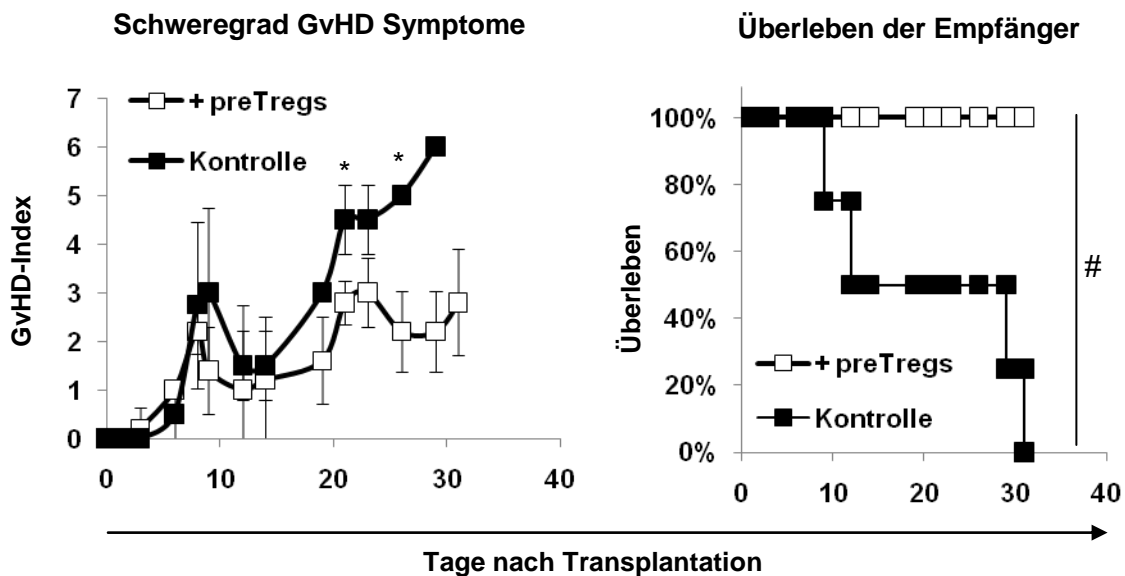


Abb. 3.5.4: Allogene Transplantation +/- preTregs nach letaler Bestrahlung der A-alpha^{-/-} Mäuse

Zwei Tage nach der NK-Depletion in den Empfängern wurden die Mäuse mit 2x 5,5 Gy bestrahlt. Es wurden je 1×10^7 Knochenmark- und Thy1.2⁺ TZ (beides BALB/c) iv injiziert. Die Kontrollgruppe enthielt 4 Tiere, die Gruppe, welche zusätzlich $5,8 \times 10^6$ preTregs bekam, 5 Tiere. GvHD-Index und Überlebensrate sind dargestellt. * zeigt signifikanten Unterschied lt. studentischem t-Test, # zeigt signifikanten Unterschied lt. Log-rank (Mantel Cox) Test mit jeweils $p < 0,05$ an.

Zwar verloren die Tiere der preTreg Gruppe auch etwas Gewicht (Daten nicht gezeigt), jedoch entwickelte die Gruppe ohne preTregs insgesamt stärkere GvHD-Symptome. Die Überlebensgrafik zeigt, dass die Tiere, welchen keine preTregs transplantiert worden waren, alle innerhalb von 30 Tagen nach der Transplantation verstarben. Aus der Gruppe, die zusätzlich preTregs bekommen hatte, ist währenddessen keine der Mäuse verstorben. Als Nächstes wurden Transplantationen mit frisch angereinigten Tregs durchgeführt, um zu untersuchen, ob diese ebenfalls unabhängig von MHC-II einen protektiven Effekt erzielen können.

3.5.5 CD4⁺CD25⁺ Tregs bewirken MHC-II-unabhängig eine Abschwächung der akuten GvHD

Es wurden zunächst dieselben Transplantationsbedingungen gewählt wie für das in Abb. 3.5.4 beschriebene Experiment. Der einzige Unterschied war, dass statt der preTregs nicht-voraktivierte Tregs zum Einsatz kamen. Es schien, als könnten auch diese eine hemmende Wirkung bezüglich der Entstehung der akuten GvHD ausüben. Allerdings war der suppressive Effekt schwächer (Daten nicht gezeigt). Da es technisch nicht möglich war, eine höhere Anzahl Tregs zu transplantieren um einen eventuell stärkeren Schutz vor der GvHD zu generieren, wurde das Transplantationsmodell etwas abgeschwächt. Das heißt, es wurden statt der 1×10^7 nur 6×10^6 allogene Thy1.2⁺ TZ transplantiert um ein etwas besseres Zellzahlverhältnis zugunsten der Tregs einzustellen.

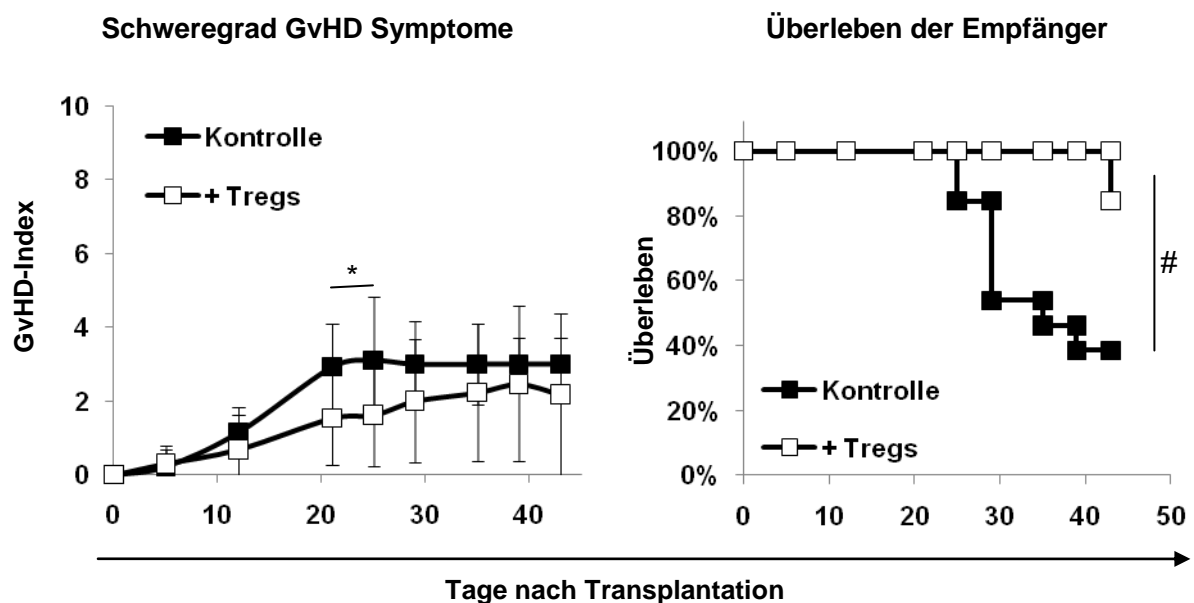


Abb. 3.5.5: Allogene Transplantation +/- Tregs nach letaler Bestrahlung der A-alpha^{-/-} Empfänger

Nach NK-Depletion und letaler Bestrahlung (2x 5,5 Gy) wurden 1×10^7 Knochenmark- und 6×10^6 Thy1.2⁺ TZ aus BALB/c Spendern transplantiert. Es wurden 2 Gruppen gebildet. Die Mäuse einer der Gruppen bekamen zusätzlich 4×10^6 Tregs (BALB/c) injiziert. GvHD-Index und Überlebensrate der Mäuse sind dargestellt. * zeigt signifikanten Unterschied gemäß studentischem t-Test, # zeigt signifikanten Unterschied lt. Log-rank (Mantel Cox) Test mit jeweils $p < 0,05$ an. Für die dargestellte Auswertung wurden die Daten aus 3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten mit insgesamt jeweils 13 Mäusen pro Gruppe zusammengefasst.

Durch die Transplantation der relativ geringen Anzahl allogener Thy1.2⁺ TZ zeigte die akute GvHD –zumindest dem GvHD-Index nach- auch in der Kontrollgruppe insgesamt einen eher milden Verlauf. Allerdings waren dennoch deutliche Unterschiede zwischen den beiden Empfängergruppen erkennbar. Bis Tag 43 nach der Transplantation waren aus der Kontrollgruppe 8 Tiere tot. Aus der Gruppe, die zusätzlich Tregs bekommen hatte mussten bis zu diesem Zeitpunkt nur 2 Mäuse gemäß den definierten Abbruchkriterien abgetötet werden. Demnach bewirkten auch die nicht-voraktivierten natürlich vorkommenden CD4⁺CD25⁺ Tregs eine signifikante Verbesserung der Überlebensrate der MHC-II-defizienten A-alpha^{-/-} Mäuse.

4. Diskussion

Allogene Knochenmark-beziehungsweise hämatopoetische Stammzelltransplantationen sind eine effektive Behandlungsmethode für zahlreiche hämatologische Erkrankungen. Allerdings wird der Erfolg dieser therapeutischen Maßnahme durch einige Nebenwirkungen, von denen die häufigste und schwerwiegendste die GvHD ist, stark eingeschränkt [97]. Ausgelöst wird die GvHD durch alloreaktive TZ des Spenders. Bei der Entstehung einer GvHD spielen die APCs des Empfängers eine entscheidende Rolle, da sie wahrscheinlich für die frühe Aktivierung der alloreaktiven Spender-TZ verantwortlich sind [35]. Die Aktivierung der APCs selbst kann unter anderem über TLR-Signale erfolgen. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob TLR-Signale für die Entstehung einer akuten GvHD essentiell sind und ob sich durch eine Blockierung dieser Signale eine Option zur Hemmung der GvHD bietet.

Daneben wurden noch weitere Mechanismen zur Suppression der akuten GvHD analysiert. Andere Arbeitsgruppen weisen mit ihren publizierten Daten bereits auf das Potential regulatorischer T-Zellen hin, die experimentelle GvHD in einigen Modellen hemmen zu können [73;88;98]. Die zentralen Mechanismen der Treg-vermittelten Suppression sind in diesem Zusammenhang allerdings noch nicht abschließend geklärt und wurden folglich in dieser Arbeit näher betrachtet.

Im letzten Kapitel wurde schließlich erläutert, welche Rolle MHC-II-Moleküle bei der Entstehung einer akuten GvHD und bei deren Suppression spielen.

4.1 MyD88- und TRIF-abhängige TLR-Signale sind für die Entstehung einer akuten GvHD nach allogener Transplantation im Mausmodell nicht essentiell

Durch die Konditionierung im Vorfeld einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation wird das Gewebe des Empfängers geschädigt, wodurch inflammatorische Zytokine gebildet werden, die eine frühe Aktivierung der Empfänger-APCs fördern [34]. Zudem kann z.B. LPS aus kommensalen Mikroorganismen durch geschädigte Epithelien ins Gewebe gelangen, was zu einer zusätzlichen Stimulation des angeborenen Immunsystems führt. Die aktivierten Empfänger-APCs können daraufhin allogene Spender-TZ aktivieren, welche die Fremdartigene des Empfängers erkennen, die von den APCs präsentiert werden.

Die gezielte Dekontamination des Darms, d. h. die Begrenzung oder das Entfernen der kommensalen Flora, scheint laut einigen Studien einen positiven Effekt auf die nach einer allogenen Knochenmarktransplantation entstehende GvHD auszuüben. Als Folge der vorherigen Dekontamination tritt die GvHD nur noch in einer abgeschwächten Form auf [18;99;100].

Die Interaktionen von TLRs mit ihren entsprechenden Liganden, den PAMPs (wie z.B. LPS), scheinen zumindest in einigen Modellen eine wichtige Rolle bei der Entstehung der GvHD zu spielen. Cooke und Kollegen weisen auf eine entscheidende Rolle des TLR4-Signalwegs im Rahmen der Pathophysiologie der GvHD hin [15]. Calcaterra und Kollegen untersuchten die Rolle der TLRs 4 und 9 in einem GvHD-Mausmodell und stellten fest, dass zwar TLR9-defiziente Empfängertiere eine schwächere akute GvHD entwickelten, während allerdings die TLR4-defizienten und die Wildtypiere alle eine schwere GvHD entwickelten [17]. Heimesaat et al. zeigten, dass der MyD88-abhängige TLR9-Signalweg essentiell für die Apoptose und Immunzellinfiltration im Rahmen der intestinalen GvHD im Darm ist [101].

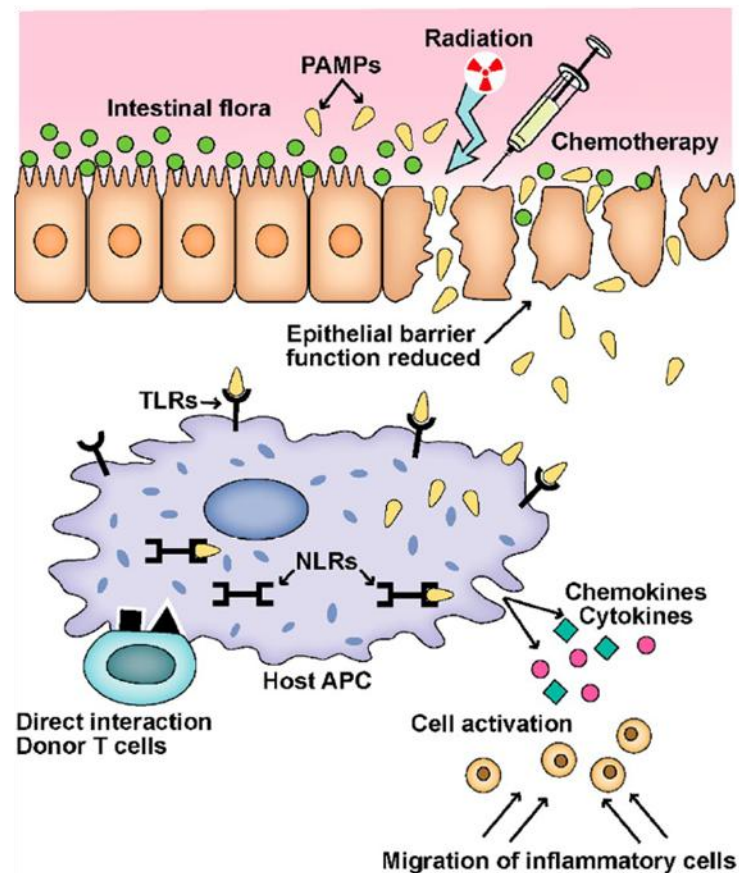


Abb. 4.1: Initiationsphase einer GvHD, schematische Darstellung nach Penack et al. (2010), „Graft-versus-host disease: regulation by microbe-associated molecules and innate immune receptors”, Blood

Penack und Kollegen beschreiben die Aktivierung von Empfänger-APCs durch die Bindung von PAMPs an z.B. TLRs und NLRs als Schlüsselevent bei der Entstehung der Entzündungsreaktion im Rahmen der GvHD. Die PAMPs als Bestandteile von kommensalen Mikroorganismen können durch Epithel, das durch Bestrahlung und/oder Chemotherapie geschädigt wurde ins Gewebe gelangen.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob das Fehlen von MyD88- und TRIF-abhängigen TLR-Signalen in einer abgeschwächten GvHD nach allogener Transplantation im MHC-inkompatiblen Mausmodell resultiert. Zunächst stellte sich heraus, dass sowohl DCs aus Wildtypmäusen, als auch DCs aus MyD88^{-/-} Tieren in der Lage sind, allogene CD4⁺ und CD8⁺ TZ effizient und mit einer vergleichbaren Intensität zu stimulieren (Abb. 3.2.1). Außerdem konnten BALB/c Mäuse unter Verwendung von MyD88^{-/-} Milzzellen erfolgreich immunisiert werden, was, wie auch in den Mäusen, welche mit WT Milzzellen immunisiert wurden, zu einer spezifischen Lyse der später injizierten allogenen Zielzellen führte (Abb. 3.2.2). Die anschließend durchgeführten Transplantationsexperimente zeigten eindeutig, dass sowohl WT

Empfänger, als auch MyD88^{-/-} und MyD88^{-/-} x TRIF^{-/-} Empfängertiere nach allogener TZ-Transplantation eine schwerwiegende GvHD entwickelten (Abb. 3.2.3). Die Transplantatempfänger erhielten alle das Antibiotikum Borgal schon 2 Tage vor der Transplantation und für die gesamte Dauer der jeweiligen Experimente. Eine syngene Transplantation verdeutlichte, dass die WT und die MyD88^{-/-} Empfänger durch die aggressive Bestrahlung selbst und die damit assoziierte Immunsuppression keine relevanten Schäden oder Infektionen erlitten (Abb. 3.2.4).

Insgesamt kann somit die Schlussfolgerung gezogen werden, dass TLR-Signale laut Literatur unter bestimmten Bedingungen offensichtlich zwar einen gewissen Beitrag zur Auslösung einer GvHD leisten können. Allerdings wurde in den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten festgestellt, dass MyD88- und TRIF-vermittelte TLR-Signale für die Entstehung einer akuten GvHD nach allogener Transplantation im hier verwendeten Mausmodell nicht nötig sind.

An der Aktivierung von APCs können neben den untersuchten noch andere Faktoren beteiligt sein. Außer den genannten Molekülen MyD88 und TRIF existieren weitere TLR-Adaptormoleküle. Davon abgesehen können für die Aktivierung der APCs auch andere, TLR-unabhängige Faktoren, wie beispielsweise NLRs, RIG-I-like Rezeptoren oder CLRs, relevant sein.

4.2 Tregs können alloreaktive T-Zellen unter Beteiligung zellkontaktabhängiger und zellkontaktunabhängiger Mechanismen deutlich supprimieren

Auf das Potential frisch isolierter oder *in vitro*-expandierter CD4⁺CD25⁺ Spender- aber auch Empfänger-Tregs unter verschiedenen experimentellen Bedingungen GvH-Reaktionen abzuschwächen, wurde bereits von einigen Arbeitsgruppen hingewiesen [73;90;98;102;103].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die suppressiven Eigenschaften von Tregs im Zusammenhang mit der GvHD näher untersucht und charakterisiert. Hierzu wurde mit GvHD-Mausmodellen gearbeitet, die auf dem Transfer allogener Knochenmark- und T-Zellen (CD4⁺ und CD8⁺) aus MHC-inkompatiblen Mausstämmen nach letaler Bestrahlung basieren. *In vitro* MLRs mit Zellen aus den entsprechenden Mausstämmen wurden ebenfalls durchgeführt. Sowohl voraktivierte

preTregs (Abb. 3.3.1), als auch frisch isolierte Tregs (Abb. 3.3.2) waren in der Lage, die Proliferation alloreaktiver CD4⁺ und CD8⁺ TZ *in vitro* deutlich zu supprimieren.

In einem Transplantationsexperiment konnte gezeigt werden, dass preTregs die Aktivierung alloreaktiver CD8⁺ TZ, gemessen an deren Expression des Aktivierungsmarkers CD25, auch *in vivo* drastisch hemmen konnten (Abb. 3.3.3a). Im weiteren Verlauf des Experiments zeigte sich, dass die Koinjektion der preTregs die Entstehung einer akuten GvHD in den Empfängertieren komplett verhinderte, während die Kontrollgruppe ohne zusätzlich injizierte preTregs eine schwere GvHD entwickelte (Abb. 3.3.3b). In den durchgeführten Transplantationsexperimenten, in denen einigen Mäusen Tregs statt preTregs injiziert wurden, war ebenfalls eindeutig ein Treg-vermittelter protektiver Effekt erkennbar. Einzig die Kontrollgruppe, welche keine zusätzliche Treg-Injektion erhielt, entwickelte eine deutliche, für einige Tiere letale, akute GvHD (Abb. 3.3.4).

Somit konnte die prinzipielle Fähigkeit von (pre)Tregs, alloreaktive Spender-TZ *in vitro* und *in vivo* inhibieren und die Entstehung einer GvHD hemmen zu können, anhand der durchgeführten Experimente eindeutig bestätigt werden.

Die Treg-vermittelte Suppression alloreaktiver TZ ist teilweise IL-10 abhängig

Wie in der Einleitung bereits beschrieben wurde, können Tregs auf eine Vielzahl an Mechanismen zurückgreifen, um in diversen Zusammenhängen eine hemmende Wirkung auf verschiedene Zelltypen auszuüben. Hoffman und Kollegen lieferten einen Hinweis darauf, dass das suppressive Zytokin IL-10 eine Rolle bei der Suppression einer durch alloreaktive CD4⁺ TZ ausgelösten GvHD spielen kann [73].

In eigenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass auch die Suppression alloreaktiver CD8⁺ TZ teilweise IL-10-abhängig ist. PreTregs aus WT Mäusen konnten alloreaktive CD8⁺ TZ wesentlich besser supprimieren als preTregs aus IL-10^{-/-} Mäusen (Abb. 3.4.1). Das in Abb. 3.4.1 dargestellte Experiment zeigte, dass die alloreaktiven CD4⁺ TZ zumindest teilweise durch WT preTregs stärker gehemmt werden konnten als durch IL-10^{-/-} preTregs. Die Hemmung der Proliferation sowohl alloreaktiver CD8⁺ als auch CD4⁺ TZ durch nicht-voraktivierte Tregs schien ebenfalls teilweise IL-10-abhängig zu sein (Abb. 3.4.2). Bei der Hemmung der CD8⁺ TZ durch WT oder IL-10^{-/-} Tregs waren die Unterschiede allerdings weniger groß als bei der

Verwendung von preTregs. Möglicherweise stehen bei der Suppression durch nicht-aktivierete Tregs eher IL-10-unabhängige Mechanismen im Vordergrund.

Tregs aus WT und aus IL-10^{-/-} Mäusen konnten *in vivo* unter den gewählten Versuchsbedingungen beide die Proliferation alloreaktiver CD8⁺ TZ stark hemmen (Abb. 3.4.3). In einem weiteren Transplantationsexperiment konnten Tregs sowohl aus WT, als auch IL-10^{-/-} Spendern die GvHD in den Empfängermäusen deutlich abschwächen (Abb. 3.4.4). Jedoch war der Unterschied in der Überlebensrate nur zwischen der Kontrollgruppe (ohne Tregs) und der Gruppe, die WT Tregs transplantiert bekommen hatte statistisch signifikant, da gegen Ende des Experiments eine Maus aus der Gruppe mit IL-10^{-/-} Tregs verstarb.

Für ein anderes Transplantationsexperiment wurden als Empfängertiere Wildtypmäuse und zum Vergleich IL-10^{-/-} Mäuse eingesetzt. Interessanterweise stellte sich heraus, dass die IL-10^{-/-} Empfänger offenbar eine viel stärkere GvHD entwickelten und innerhalb von zehn Tagen nach der Transplantation alle verstarben. Der Zustand der WT Empfänger hingegen verbesserte sich nach anfänglich schweren GvHD-Symptomen wieder und bis auf eine von fünf Mäusen verstarb keines der WT Empfängertiere innerhalb der dokumentierten 40 Tage nach der Transplantation (Abb. 3.4.5). Dieses Resultat deutet darauf hin, dass das IL-10, welches vom Empfänger produziert wird, möglicherweise ebenfalls eine Rolle bei der entstehenden GvHD spielen kann.

Anderson und Kollegen fanden bereits Hinweise darauf, dass auch Empfänger-Tregs einen regulierenden Einfluss auf die experimentell ausgelöste GvHD ausüben können. Die Gruppe zeigte, dass Lymphozyten-defiziente RAG2^{-/-} Empfänger schneller und stärkere GvHD-Symptome entwickelten als Mäuse vom Wildtyp und legten nahe, dass dieser Unterschied auf Empfänger-Tregs in den WT Mäusen zurückzuführen sei, welche die Konditionierung überlebten. Die Gabe von CD4⁺CD25⁺ Tregs (syngen zum Empfänger) konnte die GvHD in den RAG2^{-/-} Mäusen wiederum mildern [102].

Um zu zeigen, worauf die in dieser Arbeit festgestellte schwächere GvHD in den WT Empfängern verglichen mit der GvHD der IL-10^{-/-} Empfänger zurückzuführen ist, müssten noch weitere Experimente durchgeführt werden. Die IL-10^{-/-} Empfängertiere bekamen allogene IL-10^{-/-} Thy1.2⁺ TZ verabreicht und man könnte in weiteren Experimenten überprüfen, ob es einen Unterschied macht, wenn die IL-10^{-/-} Tiere

allogene WT Thy1.2⁺ TZ transplantiert bekommen. In den verwendeten Thy1.2⁺ TZ-Präparationen befanden sich auch einige Tregs, da diese ebenfalls Thy1.2-positiv sind und nicht aus dem Transplantat entfernt wurden. Möglicherweise waren diese (wenn auch zahlenmäßig wenigen) Tregs vom Spender für die schwächere GvHD in den WT Empfängern verantwortlich, welche allogene WT Thy1.2⁺ TZ transplantiert bekamen.

Es besteht auch die Möglichkeit, dass die schwächere GvHD in den WT Empfängermausen auf die Fähigkeit ihrer APCs, das suppressive Zytokin IL-10 herzustellen, zurückzuführen ist. Mittels *in vitro* MLRs könnte untersucht werden, welche Auswirkungen es hat, wenn die zur Stimulation der alloreaktiven TZ dienenden APCs IL-10-defizient sind.

Neben den beiden beschriebenen Empfängergruppen wurden im Rahmen desselben Experiments noch zwei weitere Gruppen gebildet. Hier zeigte sich, dass IL-10^{-/-} Empfängertiere insgesamt in den 40 Tagen nach der Transplantation eine sehr viel schwächere GvHD entwickelten, wenn ihnen zusätzlich preTregs transplantiert wurden (Abb. 3.4.6). Dabei machte es keinen wesentlichen Unterschied, ob die preTregs aus WT oder IL-10^{-/-} Spendern stammten. Lediglich in den ersten 14 Tagen nach der Transplantation war der GvHD-Index bei der WT preTreg-Gruppe niedriger als bei der IL-10^{-/-} preTreg-Gruppe. Im weiteren Verlauf war kein signifikanter Unterschied mehr zwischen beiden preTreg-Gruppen erkennbar. Dies könnte als Hinweis darauf angesehen werden, dass die schwere GvHD in den IL-10^{-/-} Empfängern (Abb. 3.4.6), die keine zusätzlichen preTregs bekommen hatten, eher auf die Tatsache zurückzuführen ist, dass die Empfänger-APCs kein IL-10 synthetisieren konnten. Parallel gesehen könnte entsprechend die schwächere GvHD in den WT Empfängern auf IL-10, das von Empfänger-APCs (z.B. DCs) hergestellt werden konnte, basieren.

Sato et al. generierten in einer Studie DCs, die einen inhibitorischen Effekt auf die GvHD in Mäusen hatten. Die sogenannten rDCs generierten sie, indem sie Knochenmarkzellen in Anwesenheit von murinem „granulocyte-macrophage colony stimulating factor“ (GM-CSF), murinem IL-10 und humanem TGF-β1 inkubierten und anschließend für zwei Tage mit LPS aktivierten [104]. Die DCs exprimierten zwar stark MHC-Moleküle aber nur schwach kostimulatorische Moleküle. Allerdings zeigten die Autoren nicht, ob die rDCs selbst IL-10 produzierten.

Die prinzipielle Fähigkeit von DCs, selbst IL-10 produzieren zu können, wurde bereits von anderen Autoren gezeigt [62]. In einer kürzlich erschienenen Publikation von Gregori und Kollegen beschreiben die Autoren, dass eine humane tolerogene DC-Subpopulation, sogenannte DC-10 Zellen, die aus peripherem Blut isoliert oder *in vitro* generiert wurden, in der Lage sind, Antigen-spezifische IL-10-produzierende Tr1 Zellen zu generieren. Die DC-10 Zellen stellen den Autoren nach selbst das IL-10 her, welches für die Generierung der Tr1 Zellen nötig ist [105]. Tr1 Zellen, wie bereits in der Einleitung erwähnt, können selbst Immunantworten supprimieren.

Neben Tregs und DCs sind allerdings noch andere Zelltypen in der Lage, IL-10 zu synthetisieren. Ursprünglich wurde das IL-10 von Mosmann und Kollegen identifiziert [106;107]. Einige wichtige Produzenten des Zytokins stellen unter anderem Monozyten [108] und Makrophagen [109] dar. Auch B-Zellen können IL-10 herstellen [110;111]. Rowe et al. beschrieben in einem Artikel, dass Empfänger-B-Zellen nach einer letalen Ganzkörperbestrahlung der Empfängermäuse IL-10 herstellen und die akute GvHD nach allogener Knochenmarktransplantation abschwächen können [112].

Die gezeigten Daten weisen insgesamt darauf hin, dass das von (pre)Tregs produzierte suppressive Zytokin IL-10 eine Rolle bei der Treg-vermittelten Suppression alloreaktiver CD4⁺ und CD8⁺ TZ spielen kann und stehen insofern ergänzend im Einklang mit der Literatur [73]. Allerdings wurde hierbei auch deutlich, dass noch andere Mechanismen beteiligt sein müssen, da auch IL-10^{-/-} Tregs alloreaktive TZ und die GvHD hemmen konnten. Es bleibt noch abschließend zu klären, inwiefern das von Empfänger-DCs möglicherweise gebildete IL-10 relevant für die Abschwächung einer akuten GvHD ist, beziehungsweise welche Zellen des Empfängers das IL-10 tatsächlich herstellen.

Tregs können Alloreaktivität über einen zellkontaktabhängigen Mechanismus supprimieren

Natürlich vorkommende Tregs weisen bekanntermaßen selbst hohe cAMP-Konzentrationen auf und wenden unter anderem zellkontaktabhängige Mechanismen an, um syngene TZ [83] und DCs [86] zu hemmen. Dabei bilden die Tregs, welche, wie auch konventionelle TZ und DCs, Konnexine exprimieren, gap junctions mit ihren Zielzellen aus. Der Transfer des cAMP von den Tregs auf ihre Zielzellen über gap junctions stellt offensichtlich einen zentralen Aspekt der Treg-vermittelten Suppression dar. In konventionellen CD4⁺ TZ bewirkt die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehalts eine verminderte Produktion des autokrinen T-Zell-Wachstumsfaktors IL-2 in den Zellen und hemmt somit deren Proliferation^y. Bei DCs scheint das von Tregs transferierte cAMP zu einer reduzierten Expression kostimulatorischer Moleküle auf den DCs zu führen.

O'Shaughnessy und Kollegen zeigten in einem Mausmodell mit subletaler Bestrahlung der Empfänger und der anschließenden Transplantation von CD4⁺ TZ, dass die Präinkubation der CD4⁺ TZ mit cAMP-erhöhenden Agenzien die Fähigkeit dieser Zellen, nach ihrer Transplantation eine GvHD auszulösen, reduzierte [87].

In eigenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass der Zusatz von db-cAMP zu MLRs die Proliferation alloreaktiver TZ in Abhängigkeit der eingesetzten db-cAMP-Konzentration inhibieren konnte (Abb. 3.4.7). Durch CFSE-Proliferationstests, bei deren durchflusszytometrischer Messung die Proliferation alloreaktiver CD4⁺ und CD8⁺ TZ getrennt betrachtet wurde zeigten, dass der cAMP-erhöhende PDE4-Inhibitor Rolipram nicht nur die Proliferation der CD4⁺ TZ deutlich, sondern auch die der CD8⁺ TZ leicht hemmen konnte (Abb. 3.4.8).

Bei der Durchführung von Calcein-Transfer-Experimenten stellte sich interessanterweise heraus, dass die Tregs *in vitro*, wenn sie auf syngene TZ einerseits und auf allogene DCs andererseits treffen, primär mit den DCs über gap junctions kommunizieren (Abb. 3.4.9).

^y Eigene Diplomarbeit, Titel: „Identifizierung von cAMP als essentiellm Suppressorfaktor regulatorischer T- Zellen“, Mainz, Dezember 2006

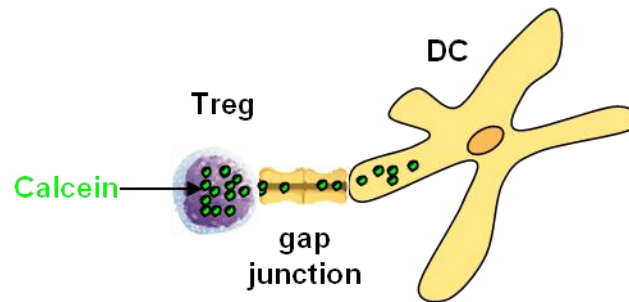


Abb. 4.2: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen Treg und DC über gap junctions und des Transfers von Calcein

Mit Calcein beladene Tregs können das Calcein über gap junctions auf DCs übertragen. Mit Hilfe von Calcein-Transfer-Experimenten können zellkontaktabhängige Interaktionen zwischen Zellen nachgewiesen werden.

Die DCs waren nach der Inkubation mit den Calcein-beladenen Tregs stark Calcein-positiv, wohingegen die konventionellen $CD4^+$ und $CD8^+$ TZ nur relativ leicht Calcein-positiv waren. Der leicht erhöhte Calcein-Wert der konventionellen TZ könnte entweder durch eine Interaktion der DCs, die zuvor mit den Tregs interagierten, bewirkt worden sein oder durch eine direkte Interaktion der Tregs mit den TZ. Der gap junction Inhibitor GAP27 konnte den Calcein-Transfer teilweise verhindern. Dass der Calcein-Transfer nicht komplett verhindert wurde könnte daran liegen, dass an der Kommunikation zwischen den Zellen Konnexine beteiligt waren, die GAP27 nicht blockieren kann.

In künftigen weiterführenden Experimenten kann versucht werden, einen Calcein-Transfer von Spender-Tregs auf Empfänger-APCs oder auch Spender-TZ im Versuchstier nach einer allogenen Knochenmark- und TZ-Transplantation nachzuweisen.

Nachdem bereits bewiesen wurde, dass Tregs mit allogenen DCs über direkten Zellkontakt kommunizieren, sollten die Auswirkungen der Interaktion zwischen den beiden Zelltypen untersucht werden. Die Analyse des Phänotyps der DCs, die mit allogenen $Thy1.2^+$ TZ und preTregs inkubiert wurden, machte deutlich, dass die Anwesenheit der preTregs eine reduzierte Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf den DCs zur Folge hatte (Abb. 3.4.10).

Es kann somit die Schlussfolgerung gezogen werden, dass regulatorische T-Zellen in der Lage sind, auch allogene DCs zu hemmen.

In vivo konnte die preTreg-vermittelte Suppression der akuten GvHD nach allogener Transplantation durch die zusätzliche Injektion von Rolipram deutlich verbessert werden (Abb. 3.4.11). Vermutlich ergänzen sich die preTregs und das Rolipram insofern nützlich, dass die preTregs über direkten Zellkontakt cAMP auf ihre Zielzellen übertragen und das Rolipram durch die Hemmung der Phosphodiesteraseaktivität den Abbau des cAMP verringert, wodurch der cAMP-Gehalt in den Zielzellen auf einem erhöhten Niveau gehalten wird. In der Praxis ist es meist eher schwierig, Tregs in großen Mengen zu isolieren oder *in vitro* zu expandieren. Die kombinierte Verabreichung von preTregs und Rolipram birgt daher den Vorteil, dass eine suboptimale Anzahl an preTregs, die alleine die GvHD nur leicht mildert, durch den zusätzlichen Effekt des Roliprams doch eine starke Verbesserung der GvHD-Symptomatik erzielen kann.

4.3 Tregs können die GvHD in einer MHC-II-unabhängigen Weise hemmen

Im letzten Abschnitt dieser Arbeit konnte dargestellt werden, dass die Aktivierung alloreaktiver CD8⁺ TZ ausreichend zu sein scheint, um eine schwere GvHD in MHC-II-defizienten Empfängerermäusen auszulösen. Im Blut der A-alpha^{-/-} Tiere waren einige Tage nach allogener Transplantation viele aktivierte CD8⁺ Spender-TZ aber kaum aktivierte CD4⁺ Spender-TZ detektierbar, während im Blut von WT Mäusen sowohl zahlreiche aktivierte CD8⁺, als auch aktivierte CD4⁺ Spender-TZ zu finden waren (Abb. 3.5.1a). Dennoch entwickelten beide Empfängergruppen eine schwere akute GvHD (Abb. 3.5.1b). Auch im Rahmen des weniger aggressiven Transplantationsmodells mit letaler Bestrahlung und dem Transfer von allogenen Knochenmark und einer niedrigeren TZ-Anzahl entwickelten die MHC-II-defizienten Tiere eine GvHD (siehe Kontrollgruppe in Abb. 3.5.5), obwohl wenige Tage nach der Transplantation kaum aktivierte CD4⁺ Spender-TZ im Blut detektierbar waren aber eine große Anzahl aktivierter CD8⁺ Spender-TZ (Daten nicht gezeigt).

Stammten die stimulatorischen Zellen (DCs) bei *in vitro* MLRs aus A-alpha^{-/-} Mäusen, war in der Kontrolle (ohne Tregs) ausschließlich eine starke Proliferation alloreaktiver CD8⁺ TZ detektierbar (Abb. 3.5.3). Die niedrigere Proliferationsrate in der mit A-alpha^{-/-} DCs stimulierten Kontrolle in Abb. 3.5.2 ist wahrscheinlich auf die fehlende Proliferation von CD4⁺ TZ zurückzuführen. CD4⁺CD25⁺ Tregs (voraktivierte und

nicht-voraktivierte) konnten in diesen Experimenten *in vitro* die Proliferation der alloreaktiven CD8⁺ TZ nach der Stimulation mit MHC-II-defizienten A-alpha^{-/-} DCs signifikant inhibieren (Abb. 3.5.2 und 3.5.3).

Auch *in vivo* schien die zusätzliche Transplantation voraktivierter aber auch nicht-aktivierter (CD4⁺CD25⁺) Tregs eine Abschwächung der akuten GvHD nach allogener Transplantation in den A-alpha^{-/-} Empfängern zu bewirken (Abb. 3.5.4 und 3.5.5).

Aufgrund der Vielzahl an Studien, die sich in der Vergangenheit mit natürlich vorkommenden CD4⁺CD25⁺ Tregs beschäftigten, ist diese Subpopulation die bisher am besten charakterisierte Zellpopulation mit regulatorischen Fähigkeiten. Mittlerweile wird in der Literatur allerdings auch über CD8⁺ TZ-Subpopulationen diskutiert, denen eine suppressive Wirkung zugeschrieben wird [113]. So beschrieben z.B. Bienvenu und Kollegen, dass es in MHC-II-defizienten Mäusen eine Population von peripheren CD8⁺ TZ gibt, die ebenfalls konstitutiv CD25 exprimieren und einige phenotypische und funktionelle Eigenschaften mit CD4⁺ CD25⁺ Tregs teilen. Den Autoren nach zeigten diese CD8⁺ TZ eine starke Expression von z.B. FoxP3 und konnten IL-10 produzieren. Außerdem konnten die Zellen *in vitro* stimulierte TZ-Antworten hemmen [114]. Man könnte die Vermutung anstellen, dass für die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Abschwächung der GvHD in MHC-II-defizienten Empfängermäusen möglicherweise CD8⁺ TZ mit regulatorischer Funktion verantwortlich zeichnen. Allerdings wurden den Tieren CD4⁺ CD25⁺ Tregs injiziert. Prinzipiell könnten auch CD8⁺ regulatorisch wirksame TZ des Empfängers für die Hemmung verantwortlich sein. Diese hätten dann allerdings die letale Bestrahlung überleben müssen. Es scheint laut Literatur Zellen zu geben, bei denen dies der Fall ist. Anderson et al. beschrieben zumindest, dass einige CD4⁺ regulatorische TZ ihrer verwendeten Empfängermäuse die letale Strahlendosis überlebten und später die untersuchte chronische GvHD hemmten [102]. Nichtsdestotrotz lässt sich die Beobachtung, dass die Koinjektion der CD4⁺CD25⁺ Tregs in den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Experimenten zu einer Abschwächung der GvHD in den A-alpha^{-/-} Mäusen führt nicht mit CD8⁺ Tregs des Empfängers erklären.

Eine andere Möglichkeit wäre, dass nicht die Empfänger-APCs, sondern Spender-APCs die Spender-Tregs aktivieren. Dies kann jedoch die Ergebnisse der *in vitro* Experimente nicht erklären. In den Versuchen wurden einerseits A-alpha^{-/-} DCs zur

Stimulation verwendet und zudem auch möglichst MHC-II-freie TZ-Populationen und teilweise noch ergänzend der MHC-II-blockierende Antikörper in die Kultur gegeben. Trotzdem war eine deutliche Hemmung alloreaktiver CD8⁺ TZ durch die CD4⁺CD25⁺ Tregs messbar. Außerdem weisen bereits einige Autoren darauf hin, dass für die Auslösung einer GvHD primär die Empfänger-APCs verantwortlich sind [34;36;37].

Eine weitere, wenn auch etwas gewagte, Vermutung ist, dass die CD4⁺CD25⁺ Spender-Tregs in einer MHC-II-unabhängigen Weise aktiviert wurden. Im Widerspruch dazu steht jedoch eine kürzlich erschienene Veröffentlichung von Tawara und Kollegen, in welcher beschrieben wird, dass die Interaktion zwischen Spender-Tregs und Empfänger-APCs über MHC-II für die Hemmung der GvHD essentiell sei [115].

Ein von Swee und Kollegen veröffentlichter Artikel jedoch untermauert die Vermutung, dass in den in der vorliegenden Arbeit verwendeten A-alpha^{-/-} Empfängern CD4⁺CD25⁺ Spender-Tregs womöglich unabhängig von MHC-II aktiviert werden können, um alloreaktive Effektor-TZ zu supprimieren. Swee et al. beschreiben in ihrer Studie, wie sie unter Verwendung von „Fms-like tyrosine kinase 3 ligand“ (FLT3L) eine DC-vermittelte Proliferation von Tregs auslösten, welche abhängig von IL-2 aber T-Zell-Rezeptor-unabhängig war. Die Autoren verweisen auf ein hierfür nötiges, kontaktabhängiges und von den DCs ausgehendes Signal, welches allerdings noch nicht indentifiziert werden konnte [116]. Interessanterweise konnten die Autoren u.a. zeigen, dass neben WT BMDCs auch MHC-II^{-/-} BMDCs in Anwesenheit von IL-2 die Proliferation von CD4⁺CD25⁺ Tregs bewirken konnten. Swee et al. ziehen insgesamt aus ihren Experimenten den Schluss, dass MHC-II-TZR-Interaktionen *in vitro* und *in vivo* für die DC-vermittelte Treg-Proliferation nicht essentiell sind.

Zusammengefasst kann demnach festgehalten werden, dass preTregs aber auch nicht-voraktivierte Tregs alloreaktive TZ und die akute GvHD scheinbar in einer MHC-II-unabhängigen Weise supprimieren können. Wie die nicht-voraktivierten CD4⁺CD25⁺ Tregs dabei selbst aktiviert werden ist noch unklar.

Ausblick:

Basierend auf der Entschlüsselung von Mechanismen zur gezielten Abschwächung alloreaktiver TZ-Antworten, die gegen gesundes Gewebe des Empfängerorganismus gerichtet sind, können in Zukunft präventive oder therapeutische Maßnahmen entwickelt werden, um die GvHD gezielter und effektiver behandeln zu können. Die größte Schwierigkeit dabei stellt sicherlich die Tatsache dar, dass diejenigen Zellen, deren Reaktivität es zu supprimieren gilt um einerseits die GvHD abzuschwächen, gleichzeitig auch diejenigen Zellen darstellen, welche den erwünschten GVL- oder GVT-Effekt erzielen sollen. Das gezielte Generieren einer Toleranz gegenüber Antigenen typischer GvHD-Zielorgane würde einen großen Fortschritt in der Medizin darstellen. Um jedoch gezielt in die Abläufe des Immunsystems eingreifen zu können, ohne dabei unerwünschte Nebenwirkungen auszulösen, müssen die zentralen Mechanismen auch in Zukunft weiterhin genau analysiert und verstanden werden.

5. Zusammenfassung

In der klinischen Praxis besteht die Hauptproblematik im Zusammenhang mit allogenen Knochenmarktransplantationen darin, einen geeigneten Spender zu finden, dessen Gewebemerkmale (HLAs) möglichst gut zu denen des Empfängers passen. In der vorliegenden Arbeit wurde mit einem murinen Transplantationsmodell gearbeitet, das auf dem Transfer allogener Knochenmark- und T-Zellen zwischen MHC-inkompatiblen Mausstämmen basiert. Wenn es gelingt, die GvHD zu supprimieren, die nach der Transplantation von MHC- bzw. HLA-inkompatiblen Zellen mit entsprechend höherer Wahrscheinlichkeit auftritt, könnte dies die Suche nach geeigneten Spendern künftig enorm erleichtern und kostbare Zeit sparen.

Die vorliegende Arbeit weist darauf hin, dass das Fehlen MyD88- und TRIF-vermittelter TLR-Signale zumindest im Rahmen des hier verwendeten Transplantationsmodells nicht zwingend zu einer Hemmung der akuten GvHD führt.

In einem weiteren Kapitel konnte nachgewiesen werden, dass CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen kompetente Suppressoren der durch alloreaktive CD4⁺ und CD8⁺ TZ ausgelösten akuten GvHD darstellen. In weiterführenden Experimenten ist gezeigt worden, dass die Tregs sich dabei verschiedener Mechanismen bedienen, um ihre Zielzellen zu inhibieren. Das suppressive Zytokin IL-10 kann als löslicher Mediator offenbar eine Rolle bei der Treg-vermittelten Suppression alloreaktiver TZ spielen. In künftigen Experimenten könnte darüber hinaus analysiert werden, inwiefern von Empfänger-APCs hergestelltes IL-10 an der Abschwächung der GvHD beteiligt ist. Es zeigte sich nämlich, dass IL-10^{-/-} Empfängermäuse eine stärkere GvHD entwickeln als Wildtypempfänger.

Eine weitere Möglichkeit, alloreaktive CD4⁺ und CD8⁺ TZ zu hemmen, stellt wahrscheinlich die Erhöhung ihres cAMP-Gehalts dar. Das cAMP-erhöhende Rolipram unter anderem konnte *in vitro* die Proliferation alloreaktiver CD4⁺ und CD8⁺ TZ hemmen. Daneben konnten Rolipram und transplantierte preTregs in Kombination die GvHD nach allogener Transplantation deutlicher hemmen als Rolipram oder die preTregs alleine.

Die Hemmung alloreaktiver TZ kann wahrscheinlich auch indirekt vermittelt werden, indem die Tregs mit APCs (wie DCs) des Empfängers interagieren und deren

Fähigkeit, alloreaktive TZ zu aktivieren, abschwächen. Es konnte ein direkter Zellkontakt zwischen Tregs und allogenen DCs nachgewiesen werden. Als Indikator diente der über gap junctions übertragbare Farbstoff Calcein, mit dem die Tregs beladen wurden, bevor sie in einer Kultur mit allogenen DCs und syngenen TZ inkubiert wurden. Die DCs zeigten als Reaktion auf den Kontakt zu allogenen Tregs einen supprimierten Phänotyp, gekennzeichnet durch eine verminderte Expression kostimulatorischer Moleküle auf ihrer Oberfläche. Die supprimierten DCs könnten als Folge die alloreaktiven TZ vermutlich nicht mehr gut aktivieren.

Im letzten Kapitel dieser Arbeit wurde beschrieben, dass die Aktivierung alloreaktiver CD8⁺ TZ alleine ausreichend ist, um eine akute GvHD auszulösen. In diesem Zusammenhang konnte nachgewiesen werden, dass CD4⁺CD25⁺ Tregs die akute GvHD offenbar auch in einer MHC-II-unabhängigen Weise hemmen können. Welche Signale die Tregs dabei selbst benötigen, um aktiviert zu werden, bleibt noch zu klären.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACK	Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat
APC(s)	Antigenpräsentierende Zelle(n)
APC	Allophycocyanin
B7.1	CD80
B7.2	CD86
BMDC(s)	bone marrow-derived dendritic cell(s)
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
BZ	B-Zelle(n)
cAMP	cyclic (zyklisches) Adenosinmonophosphat
CD	cluster of differentiation
(CD4 ⁺ CD25 ⁺) Treg(s)	natürlich vorkommende regulatorische T-Zelle(n)
CD4 ⁺ TZ	konventionelle CD4 ⁺ TZ
CD8 ⁺ TZ	konventionelle CD8 ⁺ TZ
CD40L	CD40 Ligand
CFDASE/CFSE	Carboxyfluoreszein (Diazetat) Succinimidyl Ester
CLR(s)	C-type lectin rezeptor(s)
CPM	counts per minute
CTLA-4	cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4
db-cAMP	dibutyryl-cAMP (= Zell-permeables cAMP Analogon)
DC(s)	dendritic cells = Dendritische Zelle(n)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	disodium ethylenediamine tetraacetic acid
et al.	Lateinisch: et alia = und andere
FACS	fluorescence activated cell sort/scan
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
FITC	fluorescein-5-isothiocyanat
FLT3L	Fms-like tyrosine kinase 3 ligand
FoxP3	forkhead box protein 3
FSC	forward scatter

g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GvHD	Graft-versus-Host Disease
GvL	Graft-versus-Leukemia
GvT	Graft-versus-Tumor
Gy	Gray = Einheit für die Strahlendosis
HBSS	Hank's balanced salt solution
HLA	human leukocyte antigen
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthine
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	Iscoe's modified Dulbecco's medium
ip	intraperitoneal
iv	intravenös
IRF	interferon regulatory factor
KM	Knochenmark
KÜS	Kulturüberstand
LBP	LPS-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
m	murin
M	Molar
MACS	magnetic activated cell sorter
MEM	minimal essential medium
MHC	major histocompatibility complex
Min	Minute
MLR	mixed leukocyte/lymphocyte reaction
mRNA	messenger RNA
MyD88	Myeloid Differentiation Factor 88
NF κ B	nuclear factor κ B
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NLR(s)	NOD-like receptor(s)
NOD-2	nucleotide-binding oligomerization domain 2

OX40L	OX40 Ligand
PAMP(s)	pathogen associated molecular pattern(s)
PBS	phosphate buffered saline
PDE	Phosphodiesterase
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
preTreg(s)	voraktivierte natürlich vorkommende regulatorische T-Zelle(n)
PRR(s)	pathogen recognition receptor(s)
RNA	ribonucleic acid
RT	Raumtemperatur
SA	Streptavidin
SSC	side scatter
TGF- β	transforming growth factor- β
Th	T-Helferzeller
(Thy1.2 ⁺) TZ	mit CD90.2 ⁺ (= Thy1.2 ⁺) microbeads angereinigte TZ; Mischung aus allen TZ, die in der Milz zu finden sind; enthält überwiegend konventionelle CD4 ⁺ und CD8 ⁺ TZ und, sofern nicht gezielt depletiert, geringe Anzahl Tregs
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRIF	TIR domain-containing adapter inducing IFN- β
TZ	T-Zelle(n)
TZR	T-Zell-Rezeptor(en)
UpM	Umdrehungen pro Minute
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
WT	Wildtyp

7. Literaturverzeichnis

- [1] Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W, Ljungman P, Ferrant A, Verdonck L, Niederwieser D, van RF, Mittermueller J, de WT, Holler E, Ansari H: Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood* 1-9-1995;86:2041-2050.
- [2] Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E: Graft-versus-host disease. *Lancet* 2-5-2009;373:1550-1561.
- [3] Chaplin DD: Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:S3-23.
- [4] Medzhitov R, Janeway CA, Jr.: Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 12-4-2002;296:298-300.
- [5] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O: Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 24-2-2006;124:783-801.
- [6] Parker LC, Prince LR, Sabroe I: Translational mini-review series on Toll-like receptors: networks regulated by Toll-like receptors mediate innate and adaptive immunity. *Clin Exp Immunol* 2007;147:199-207.
- [7] McGettrick AF, O'Neill LA: Toll-like receptors: key activators of leucocytes and regulator of haematopoiesis. *Br J Haematol* 2007;139:185-193.
- [8] Abreu MT, Fukata M, Arditi M: TLR signaling in the gut in health and disease. *J Immunol* 15-4-2005;174:4453-4460.
- [9] Pivarcsi A, Bodai L, Rethi B, Kenderessy-Szabo A, Koreck A, Szell M, Beer Z, Bata-Csorgoo Z, Magocsi M, Rajnavolgyi E, Dobozy A, Kemeny L: Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *Int Immunol* 2003;15:721-730.
- [10] Ritter M, Mennerich D, Weith A, Seither P: Characterization of Toll-like receptors in primary lung epithelial cells: strong impact of the TLR3 ligand poly(I:C) on the regulation of Toll-like receptors, adaptor proteins and inflammatory response. *J Inflamm (Lond)* 29-11-2005;2:16.
- [11] Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA: Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 18-10-2001;413:732-738.
- [12] Medzhitov R: Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001;1:135-145.

- [13] Akira S, Takeda K: Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004;4:499-511.
- [14] Goldstein DR, Tesar BM, Akira S, Lakkis FG: Critical role of the Toll-like receptor signal adaptor protein MyD88 in acute allograft rejection. *J Clin Invest* 2003;111:1571-1578.
- [15] Cooke KR, Gerbitz A, Crawford JM, Teshima T, Hill GR, Tesolin A, Rossignol DP, Ferrara JL: LPS antagonism reduces graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia activity after experimental bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 2001;107:1581-1589.
- [16] Garantziotis S, Palmer SM, Snyder LD, Ganous T, Chen BJ, Wang T, Cook DN, Schwartz DA: Alloimmune lung injury induced by local innate immune activation through inhaled lipopolysaccharide. *Transplantation* 27-10-2007;84:1012-1019.
- [17] Calcaterra C, Sfondrini L, Rossini A, Sommariva M, Rumio C, Menard S, Balsari A: Critical role of TLR9 in acute graft-versus-host disease. *J Immunol* 1-11-2008;181:6132-6139.
- [18] Beelen DW, Haralambie E, Brandt H, Linzenmeier G, Muller KD, Quabeck K, Sayer HG, Graeven U, Mahmoud HK, Schaefer UW: Evidence that sustained growth suppression of intestinal anaerobic bacteria reduces the risk of acute graft-versus-host disease after sibling marrow transplantation. *Blood* 15-11-1992;80:2668-2676.
- [19] Storb R, Prentice RL, Buckner CD, Clift RA, Appelbaum F, Deeg J, Doney K, Hansen JA, Mason M, Sanders JE, Singer J, Sullivan KM, Witherspoon RP, Thomas ED: Graft-versus-host disease and survival in patients with aplastic anemia treated by marrow grafts from HLA-identical siblings. Beneficial effect of a protective environment. *N Engl J Med* 10-2-1983;308:302-307.
- [20] Kumagai Y, Akira S: Identification and functions of pattern-recognition receptors. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:985-992.
- [21] Penack O, Smith OM, Cunningham-Bussel A, Liu X, Rao U, Yim N, Na IK, Holland AM, Ghosh A, Lu SX, Jenq RR, Liu C, Murphy GF, Brandl K, van den Brink MR: NOD2 regulates hematopoietic cell function during graft-versus-host disease. *J Exp Med* 28-9-2009;206:2101-2110.
- [22] Reid SD, Penna G, Adorini L: The control of T cell responses by dendritic cell subsets. *Curr Opin Immunol* 2000;12:114-121.
- [23] Banchereau J, Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 19-3-1998;392:245-252.
- [24] Rudensky AY, Preston-Hurlburt P, al-Ramadi BK, Rothbard J, Janeway CA, Jr.: Truncation variants of peptides isolated from MHC class II molecules suggest sequence motifs. *Nature* 1-10-1992;359:429-431.

- [25] Schuurhuis DH, Fu N, Ossendorp F, Melief CJ: Ins and outs of dendritic cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2006;140:53-72.
- [26] Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G: Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 1-8-1996;184:747-752.
- [27] Schuurhuis DH, Laban S, Toes RE, Ricciardi-Castagnoli P, Kleijmeer MJ, van d, V, Rea D, Offringa R, Geuze HJ, Melief CJ, Ossendorp F: Immature dendritic cells acquire CD8(+) cytotoxic T lymphocyte priming capacity upon activation by T helper cell-independent or -dependent stimuli. *J Exp Med* 3-7-2000;192:145-150.
- [28] Lanzavecchia A: Immunology. Licence to kill. *Nature* 4-6-1998;393:413-414.
- [29] Schoenberger SP, Toes RE, van d, V, Offringa R, Melief CJ: T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 4-6-1998;393:480-483.
- [30] Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K: The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 7-2-2000;191:411-416.
- [31] Steinman RM, Nussenzweig MC: Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 8-1-2002;99:351-358.
- [32] Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC: Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2003;21:685-711.
- [33] Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH: Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 6-11-2000;192:1213-1222.
- [34] Zhang Y, Louboutin JP, Zhu J, Rivera AJ, Emerson SG: Preterminal host dendritic cells in irradiated mice prime CD8+ T cell-mediated acute graft-versus-host disease. *J Clin Invest* 2002;109:1335-1344.
- [35] Morris ES, Hill GR: Advances in the understanding of acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol* 2007;137:3-19.
- [36] Duffner UA, Maeda Y, Cooke KR, Reddy P, Ordemann R, Liu C, Ferrara JL, Teshima T: Host dendritic cells alone are sufficient to initiate acute graft-versus-host disease. *J Immunol* 15-6-2004;172:7393-7398.
- [37] Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, McNiff J, Robert ME, Liu J, Shlomchik MJ, Emerson SG: Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* 16-7-1999;285:412-415.

- [38] Matte CC, Liu J, Cormier J, Anderson BE, Athanasiadis I, Jain D, McNiff J, Shlomchik WD: Donor APCs are required for maximal GVHD but not for GVL. *Nat Med* 2004;10:987-992.
- [39] Petersdorf EW, Longton GM, Anasetti C, Martin PJ, Mickelson EM, Smith AG, Hansen JA: The significance of HLA-DRB1 matching on clinical outcome after HLA-A, B, DR identical unrelated donor marrow transplantation. *Blood* 15-8-1995;86:1606-1613.
- [40] Arstila TP, Casrouge A, Baron V, Even J, Kanellopoulos J, Kourilsky P: A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science* 29-10-1999;286:958-961.
- [41] Frankild S, de Boer RJ, Lund O, Nielsen M, Kesmir C: Amino acid similarity accounts for T cell cross-reactivity and for "holes" in the T cell repertoire. *PLoS One* 2008;3:e1831.
- [42] Sprent J, Kishimoto H: The thymus and central tolerance
1. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 29-5-2001;356:609-616.
- [43] Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM: Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 23-4-1993;260:547-549.
- [44] Agnello D, Lankford CS, Bream J, Morinobu A, Gadina M, O'Shea JJ, Frucht DM: Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *J Clin Immunol* 2003;23:147-161.
- [45] Davidson NJ, Leach MW, Fort MM, Thompson-Snipes L, Kuhn R, Muller W, Berg DJ, Rennick DM: T helper cell 1-type CD4+ T cells, but not B cells, mediate colitis in interleukin 10-deficient mice. *J Exp Med* 1-7-1996;184:241-251.
- [46] Wang B, Andre I, Gonzalez A, Katz JD, Aguet M, Benoist C, Mathis D: Interferon-gamma impacts at multiple points during the progression of autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 9-12-1997;94:13844-13849.
- [47] Leung BP, McInnes IB, Esfandiari E, Wei XQ, Liew FY: Combined effects of IL-12 and IL-18 on the induction of collagen-induced arthritis. *J Immunol* 15-6-2000;164:6495-6502.
- [48] Hu HZ, Li GL, Lim YK, Chan SH, Yap EH: Kinetics of interferon-gamma secretion and its regulatory factors in the early phase of acute graft-versus-host disease. *Immunology* 1999;98:379-385.
- [49] Wan YY: Multi-tasking of helper T cells. *Immunology* 2010;130:166-171.
- [50] Parronchi P, Macchia D, Piccinni MP, Biswas P, Simonelli C, Maggi E, Ricci M, Ansari AA, Romagnani S: Allergen- and bacterial antigen-specific T-cell

- clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 15-5-1991;88:4538-4542.
- [51] Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tscopoulos A, Barkans J, Bentley AM, Corrigan C, Durham SR, Kay AB: Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 30-1-1992;326:298-304.
- [52] Rus V, Svetic A, Nguyen P, Gause WC, Via CS: Kinetics of Th1 and Th2 cytokine production during the early course of acute and chronic murine graft-versus-host disease. Regulatory role of donor CD8+ T cells. *J Immunol* 1-9-1995;155:2396-2406.
- [53] Nowak EC, Noelle RJ: Interleukin-9 as a T helper type 17 cytokine. *Immunology* 28-7-2010.
- [54] Iclozan C, Yu Y, Liu C, Liang Y, Yi T, Anasetti C, Yu XZ: T helper17 cells are sufficient but not necessary to induce acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;16:170-178.
- [55] Fietta P, Delsante G: The effector T helper cell triade. *Riv Biol* 2009;102:61-74.
- [56] Nurieva RI, Liu X, Dong C: Yin-Yang of costimulation: crucial controls of immune tolerance and function. *Immunol Rev* 2009;229:88-100.
- [57] Bluestone JA, Abbas AK: Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2003;3:253-257.
- [58] Cobbold S, Waldmann H: Infectious tolerance. *Curr Opin Immunol* 1998;10:518-524.
- [59] Dieckmann D, Bruett CH, Ploettner H, Lutz MB, Schuler G: Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]. *J Exp Med* 15-7-2002;196:247-253.
- [60] Jonuleit H, Schmitt E, Kakirman H, Stassen M, Knop J, Enk AH: Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J Exp Med* 15-7-2002;196:255-260.
- [61] Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM: Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 15-12-2003;198:1875-1886.
- [62] Levings MK, Gregori S, Tresoldi E, Cazzaniga S, Bonini C, Roncarolo MG: Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. *Blood* 1-2-2005;105:1162-1169.
- [63] Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M: Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-

- chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1-8-1995;155:1151-1164.
- [64] Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA: CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 1-8-2001;167:1245-1253.
- [65] Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY: Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:330-336.
- [66] Sakaguchi S: Animal models of autoimmunity and their relevance to human diseases. *Curr Opin Immunol* 2000;12:684-690.
- [67] Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, Bluestone JA: B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 2000;12:431-440.
- [68] Shevach EM, McHugh RS, Piccirillo CA, Thornton AM: Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. *Immunol Rev* 2001;182:58-67.
- [69] Singh B, Read S, Asseman C, Malmstrom V, Mottet C, Stephens LA, Stepankova R, Tlaskalova H, Powrie F: Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. *Immunol Rev* 2001;182:190-200.
- [70] Annacker O, Burlen-Defranoux O, Pimenta-Araujo R, Cumano A, Bandeira A: Regulatory CD4 T cells control the size of the peripheral activated/memory CD4 T cell compartment. *J Immunol* 1-4-2000;164:3573-3580.
- [71] Akbari O, Stock P, DeKruyff RH, Umetsu DT: Role of regulatory T cells in allergy and asthma. *Curr Opin Immunol* 2003;15:627-633.
- [72] Chai JG, Xue SA, Coe D, Addey C, Bartok I, Scott D, Simpson E, Stauss HJ, Hori S, Sakaguchi S, Dyson J: Regulatory T cells, derived from naive CD4+. *Transplantation* 27-5-2005;79:1310-1316.
- [73] Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S: Donor-type CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med* 5-8-2002;196:389-399.
- [74] Thornton AM, Shevach EM: CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 20-7-1998;188:287-296.
- [75] Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ: CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector

- CD4+ T cells
2. *Nat Immunol* 2007;8:1353-1362.
- [76] Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, Cross R, Sehy D, Blumberg RS, Vignali DA: The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function
4. *Nature* 22-11-2007;450:566-569.
- [77] Garin MI, Chu CC, Golshayan D, Cernuda-Morollon E, Wait R, Lechler RI: Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells.
Blood 1-3-2007;109:2058-2065.
- [78] Kubach J, Lutter P, Bopp T, Stoll S, Becker C, Huter E, Richter C, Weingarten P, Warger T, Knop J, Mullner S, Wijdenes J, Schild H, Schmitt E, Jonuleit H: Human CD4+CD25+ regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin-10 as a novel marker essential for their anergy and suppressive function
2. *Blood* 1-9-2007;110:1550-1558.
- [79] Oderup C, Cederbom L, Makowska A, Cilio CM, Ivars F: Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression
2. *Immunology* 2006;118:240-249.
- [80] Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, Nomura T, Sakaguchi S: CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 10-10-2008;322:271-275.
- [81] Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enjyoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC: Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression
5. *J Exp Med* 11-6-2007;204:1257-1265.
- [82] Huang S, Apasov S, Koshiba M, Sitkovsky M: Role of A2a extracellular adenosine receptor-mediated signaling in adenosine-mediated inhibition of T-cell activation and expansion. *Blood* 15-8-1997;90:1600-1610.
- [83] Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Hessling S, Palmetshofer A, Serfling E, Heib V, Becker M, Kubach J, Schmitt S, Stoll S, Schild H, Staeger MS, Stassen M, Jonuleit H, Schmitt E: Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med* 11-6-2007;204:1303-1310.
- [84] Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL: Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem* 1996;65:475-502.
- [85] Bodor J, Feigenbaum L, Bodorova J, Bare C, Reitz MS, Jr., Gress RE: Suppression of T-cell responsiveness by inducible cAMP early repressor

- (ICER)
1. J Leukoc Biol 2001;69:1053-1059.
- [86] Fassbender M, Gerlitzki B, Ullrich N, Lupp C, Klein M, Radsak MP, Schmitt E, Bopp T, Schild H: Cyclic adenosine monophosphate and IL-10 coordinately contribute to nTreg cell-mediated suppression of dendritic cell activation. *Cell Immunol* 24-7-2010.
- [87] O'Shaughnessy MJ, Chen ZM, Gramaglia I, Taylor PA, Panoskaltsis-Mortari A, Vogtenhuber C, Palmer E, Grader-Beck T, Boussiotis VA, Blazar BR: Elevation of intracellular cyclic AMP in alloreactive CD4(+) T Cells induces alloantigen-specific tolerance that can prevent GVHD lethality in vivo. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007;13:530-542.
- [88] Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, Drago K, Fathman CG, Strober S, Negrin RS: CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med* 2003;9:1144-1150.
- [89] Johnson BD, Konkol MC, Truitt RL: CD25+ immunoregulatory T-cells of donor origin suppress alloreactivity after BMT. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002;8:525-535.
- [90] Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR: The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* 15-5-2002;99:3493-3499.
- [91] Kontgen F, Suss G, Stewart C, Steinmetz M, Bluethmann H: Targeted disruption of the MHC class II Aa gene in C57BL/6 mice. *Int Immunol* 1993;5:957-964.
- [92] Juul MH, Rivedal E, Stokke T, Sanner T: Quantitative determination of gap junction intercellular communication using flow cytometric measurement of fluorescent dye transfer. *Cell Adhes Commun* 2000;7:501-512.
- [93] Ogasawara K, Benjamin J, Takaki R, Phillips JH, Lanier LL: Function of NKG2D in natural killer cell-mediated rejection of mouse bone marrow grafts. *Nat Immunol* 2005;6:938-945.
- [94] Lotzova E, Savary CA, Pollack SB: Prevention of rejection of allogeneic bone marrow transplants by NK 1.1 antiserum
3. *Transplantation* 1983;35:490-494.
- [95] Murphy WJ, Kumar V, Bennett M: Rejection of bone marrow allografts by mice with severe combined immune deficiency (SCID). Evidence that natural killer cells can mediate the specificity of marrow graft rejection
3. *J Exp Med* 1-4-1987;165:1212-1217.
- [96] Beyersdorf N, Ding X, Blank G, Dennehy KM, Kerkau T, Hunig T: Protection from graft-versus-host disease with a novel B7 binding site-specific mouse anti-mouse CD28 monoclonal antibody. *Blood* 15-11-2008;112:4328-4336.

- [97] Shlomchik WD: Graft-versus-host disease
11. *Nat Rev Immunol* 2007;7:340-352.
- [98] Cohen JL, Trenado A, Vasey D, Klatzmann D, Salomon BL: CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease. *J Exp Med* 5-8-2002;196:401-406.
- [99] Vossen JM, Heidt PJ, van den BH, Gerritsen EJ, Hermans J, Dooren LJ: Prevention of infection and graft-versus-host disease by suppression of intestinal microflora in children treated with allogeneic bone marrow transplantation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990;9:14-23.
- [100] Beelen DW, Elmaagacli A, Muller KD, Hirche H, Schaefer UW: Influence of intestinal bacterial decontamination using metronidazole and ciprofloxacin or ciprofloxacin alone on the development of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation in patients with hematologic malignancies: final results and long-term follow-up of an open-label prospective randomized trial 3. *Blood* 15-5-1999;93:3267-3275.
- [101] Heimesaat MM, Nogai A, Bereswill S, Plickert R, Fischer A, Loddenkemper C, Steinhoff U, Tchaptchet S, Thiel E, Freudenberg MA, Gobel UB, Uharek L: MyD88/TLR9 mediated immunopathology and gut microbiota dynamics in a novel murine model of intestinal graft-versus-host disease
1. *Gut* 2010;59:1079-1087.
- [102] Anderson BE, McNiff JM, Matte C, Athanasiadis I, Shlomchik WD, Shlomchik MJ: Recipient CD4+ T cells that survive irradiation regulate chronic graft-versus-host disease
7. *Blood* 1-9-2004;104:1565-1573.
- [103] Jones SC, Murphy GF, Korngold R: Post-hematopoietic cell transplantation control of graft-versus-host disease by donor CD425 T cells to allow an effective graft-versus-leukemia response
15. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003;9:243-256.
- [104] Sato K, Yamashita N, Yamashita N, Baba M, Matsuyama T: Regulatory dendritic cells protect mice from murine acute graft-versus-host disease and leukemia relapse. *Immunity* 2003;18:367-379.
- [105] Gregori S, Tomasoni D, Pacciani V, Scirpoli M, Battaglia M, Magnani CF, Hauben E, Roncarolo MG: Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood* 12-8-2010;116:935-944.
- [106] Moore KW, Vieira P, Fiorentino DF, Trounstein ML, Khan TA, Mosmann TR: Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science* 8-6-1990;248:1230-1234.
- [107] Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR: Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1-12-1989;170:2081-2095.

- [108] de Waal MR, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE: Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes
2. J Exp Med 1-11-1991;174:1209-1220.
- [109] Boonstra A, Rajsbaum R, Holman M, Marques R, Sselin-Paturel C, Pereira JP, Bates EE, Akira S, Vieira P, Liu YJ, Trinchieri G, O'Garra A: Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF-dependent TLR signals, and TLR-independent signals
3. J Immunol 1-12-2006;177:7551-7558.
- [110] Fillatreau S, Gray D, Anderton SM: Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology
5. Nat Rev Immunol 2008;8:391-397.
- [111] Yanaba K, Bouaziz JD, Matsushita T, Tsubata T, Tedder TF: The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals
6. J Immunol 15-6-2009;182:7459-7472.
- [112] Rowe V, Banovic T, Macdonald KP, Kuns R, Don AL, Morris ES, Burman AC, Bofinger HM, Clouston AD, Hill GR: Host B cells produce IL-10 following TBI and attenuate acute GVHD after allogeneic bone marrow transplantation
23. Blood 1-10-2006;108:2485-2492.
- [113] Pomie C, Menager-Marcq I, van Meerwijk JP: Murine CD8+ regulatory T lymphocytes: the new era
1. Hum Immunol 2008;69:708-714.
- [114] Bienvenu B, Martin B, Auffray C, Cordier C, Becourt C, Lucas B: Peripheral CD8+CD25+ T lymphocytes from MHC class II-deficient mice exhibit regulatory activity
3. J Immunol 1-7-2005;175:246-253.
- [115] Tawara I, Shlomchik WD, Jones A, Zou W, Nieves E, Liu C, Toubai T, Duran-Struuck R, Sun Y, Clouthier SG, Evers R, Lowler KP, Levy RB, Reddy P: A crucial role for host APCs in the induction of donor CD4+CD25+ regulatory T cell-mediated suppression of experimental graft-versus-host disease
1. J Immunol 1-10-2010;185:3866-3872.
- [116] Swee LK, Bosco N, Malissen B, Ceredig R, Rolink A: Expansion of peripheral naturally occurring T regulatory cells by Fms-like tyrosine kinase 3 ligand treatment
4. Blood 18-6-2009;113:6277-6287.

Publikationen

“Cyclic adenosine monophosphate and IL-10 coordinately contribute to nTreg cell-mediated suppression of dendritic cell activation”

Fassbender M, Gerlitzki B, Ullrich N, Lupp C, Klein M, Radsak MP, Schmitt E, Bopp T, Schild H

Cell Immunol 24-7-2010

„IL-10 and regulatory T cell mediated Mechanisms of Suppression of Experimental Graft-versus-Host Disease”

Corinna Lupp, Michael Weber, Pamela Stein, Tobias Bopp, Thomas C. Wehler, Edgar Schmitt, Hansjörg Schild and Markus P. Radsak

In Vorbereitung

Lebenslauf