

---

Vergleichende Untersuchungen  
zur funktionellen Wechselwirkung von  
T-Helferzellen,  
regulatorischen T-Zellen und  
dendritischen Zellen

---

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Mario Hubo  
Geboren am 13. April 1980 in Bremerhaven

Mainz, Februar 2012

Aus der  
Hautklinik der Universitätsmedizin Mainz

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 13. April 2012

## **Vergleichende Untersuchungen zur funktionellen Wechselwirkung von T-Helferzellen, regulatorischen T-Zellen und dendritischen Zellen**

Dissertation von Mario Hubo

Dendritische Zellen (DC) verbinden angeborene und adaptive Immunität. Abhängig vom Aktivierungsgrad vermitteln sie Toleranz oder Immunität. Hier wurden konventionelle DC (kDC) und plasmazytoide DC (pDC) hinsichtlich ihrer T-Zellstimulation in An- und Abwesenheit regulatorischer T-Zellen (Treg) verglichen. Als starke T-Zellstimulatoren induzieren aktivierte kDC Treg-Proliferation. Proliferierende Treg sind nicht suppressiv, weshalb T-Effektorzellen nach kDC-Stimulation in Treg-Anwesenheit proliferieren. Demgegenüber vermitteln aktivierte pDC nur schwache T-Zellstimulation, die aber ausreicht T-Effektorzellproliferation auszulösen. Aktivierte pDC brechen aber nicht die Anergie von Treg und induzieren daher nicht ihre Proliferation. Trotz der geringen T-Zellstimulation sind pDC in der Lage Proliferation und Expansion von T-Effektorzellen in Treg-Gegenwart zu bewirken. Dies konnte auf ein insuffizientes pDC-vermitteltes T-Zellrezeptorsignal für Treg zurückgeführt werden, das keine funktionelle pDC-vermittelte Treg-Aktivierung bewirkt.

Unter homöostatischen Bedingung vermitteln DC Toleranz, so induzieren unreife kDC Treg in der Peripherie. Hierbei ist eine ICOS-vermittelte Kostimulation essentiell für die Induktion des IL-10-Rezeptors auf T-Zellen. Ein gleichzeitiges starkes CD28-Signal überkommt den ICOS-vermittelten Effekt und wirkt der IL-10R-Expression entgegen. Daher führt nur die Stimulation mit unreifen kDC zu IL-10-sensitiven T-Zellen in denen dann ein anergischer Phänotyp etabliert wird, der Teil des Differenzierungsprozesses zur induzierten Treg ist. Die ICOS/ICOS-L-Interaktion ist somit zentral für die Aufrechterhaltung peripherer Toleranz.

## **Functional analysis of the interaction of dendritic cells, T helper cells and regulatory T cells**

Dissertation of Mario Hubo

Dendritic cells (DC) act as sentinels of immunity. Depending on their maturation status DC mediate tolerance or immunity.

Here, conventional DC (cDC) and plasmacytoid DC (pDC) have been compared according to their T cell stimulatory potential in absence or presence of regulatory T cells (Treg). As efficient T cell stimulators, mature cDC induce Treg-proliferation. These proliferating Treg are non-suppressive, therefore T effector cells (Teff) can proliferate in coculture with Treg after cDC-stimulation. In contrast, activated pDC are weak T cell stimulators. Nevertheless, they induce Teff-proliferation but not Treg-proliferation. Here we show that Treg receive only inadequate TCR-signals through pDC-stimulation. This prevents functionally Treg-activation leading to Teff-proliferation also in presence of Treg after pDC-stimulation.

Under homeostatic conditions, immature DC mediate tolerance by inducing Treg in the periphery. This process depends on ICOS-L-mediated costimulation which is essential for expression of IL-10R on T cells. Strong CD28-signals overcome this effect. Therefore, only stimulation with immature cDC, mediating weak CD28-costimulation, induce IL-10-sensitive T cells in which an anergic phenotype is established. This phenotype is an essential step in the differentiation process towards an induced Treg. Thus, ICOS/ICOS-L-interaction is crucial for maintenance of peripheral tolerance.

## **Eigene Publikationen**

**Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:**

***The Role of ICOS in Directing T Cell Responses: ICOS-Dependent Induction of T Cell Anergy by Tolerogenic Dendritic Cells***

Andrea Tüttenberg\*, Eva Hüter\*, **Mario Hubo**\*, Julia Horn, Jürgen Knop, Bodo Grimbacher, Richard A. Kroczeck, Sabine Stoll, und Helmut Jonuleit

\*Erstautoren

The Journal of Immunology, 2009, 182: 3349–3356.

***Plasmacytoid dendritic cells are inefficient in activation of human regulatory T cells***

**Mario Hubo**, Helmut Jonuleit

PLoS One, eingereicht

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methode</b> .....	<b>13</b>
2.1	Laborgeräte .....	13
2.2	Plastikwaren .....	13
2.3	Kulturmedien.....	14
2.4	Puffer, Lösungen und Reagenzien .....	15
2.5	Zytokine .....	16
2.6	Antikörper .....	17
2.7	Methoden.....	22
2.7.1	Methoden der Zellkultur.....	22
2.7.2	Durchflusszytometrische Untersuchungen .....	29
2.7.3	Quantifizierung von IFN- $\alpha$ in Kulturüberständen dendritischer Zellen .....	32
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>34</b>
3.1	Durchflusszytometrische Charakterisierung dendritischer Zellen des peripheren Blutes.....	35
3.2	Aktivierete plasmazytoide DC sind konventionellen DC im T-Zell-stimulatorischen Potential unterlegen 37	
3.3	Funktionelle Testung isolierter CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen.....	39
3.4	Abwesenheit von Treg-vermittelter Inhibition nach Stimulation mit dendritischen Zellen.....	41
3.5	Plasmazytoide dendritische Zellen durchbrechen nicht die Anergie regulatorischer T-Zellen .....	43
3.6	Die Erhöhung der Frequenz regulatorischer T-Zellen führte nicht zur Wiederherstellung der Suppression in pDC-stimulierten Kokulturen.....	45
3.7	Die Blockade pro-inflammatorischer Zytokine in pDC-stimulierten Kokulturen führte nicht zur Induktion Treg-vermittelter Suppression .....	46
3.8	Analyse des Zytokinprofils regulatorischer T-Zellen nach Stimulation mit dendritischen Zellen .....	47
3.9	Regulatorische T-Zellen zeigen einen geringen Aktivierungsgrad nach Stimulation mit plasmazytoiden dendritischen Zellen .....	50
3.10	Die Erhöhung des T-Zellrezeptorsignals in pDC-stimulierten Kokulturen führte zu einer partiellen Wiederherstellung Treg-vermittelter Suppression .....	52
3.11	Die Rolle von ICOS bei der DC-vermittelten Induktion regulatorischer T-Zellen.....	53
3.12	Analyse der ICOS-L-Expression auf konventionellen dendritischen Zellen .....	54
3.13	Analyse der Proliferation distinkter T-Zellpopulationen nach Stimulation mit unreifen und reifen konventionellen dendritischen Zellen .....	56
3.14	Die Interaktion von ICOS und ICOS-L beeinflusst die Proliferationsfähigkeit stimulierter T-Zellen.....	60
3.15	Die Interaktion von ICOS und ICOS-L ist beteiligt an der Differenzierung zu induzierten regulatorischen T-Zellen durch unreife konventionelle DC.....	62
3.16	In Abwesenheit starker CD28-Signale steigert ICOS-Kostimulation die Expression des IL-10- Rezeptors.....	64
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>66</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>80</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>81</b>
<b>7</b>	<b>Referenzen</b> .....	<b>83</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>90</b>
<b>9</b>	<b>Anhänge</b> .....	<b>91</b>

# 1 Einleitung

Ausgehend von Einzellern, die toxische Peptide gegen eindringende pathogene Mikroorganismen nutzbar machten, begann ein Evolutionsprozess, der zum komplexen Immunsystem rezenter Lebewesen führte <sup>[1]</sup>.

Die Entstehung mehrzelliger Organismen ermöglichte die Spezialisierung einzelner Zellen, zum Beispiel zur Aufnahme pathogener Bakterien und Viren, was diesen Mehrzellern Selektionsvorteile verschaffte. Diese Form der Pathogenabwehr entwickelte sich weiter zum heutigen angeborenen Immunsystem, das noch immer grundlegende Züge der frühen Abwehrmechanismen trägt. Es umfasst spezialisierte Zellen (zelluläre Komponente; z.B. Makrophagen und dendritische Zellen) und Moleküle (lösliche Komponente; z.B. Komplementfaktoren), die Erreger erkennen und beseitigen können <sup>[1]</sup>. Die Pathogenerkennung durch das angeborene Immunsystem basiert auf der Expression keimbahncodierter Rezeptoren<sup>1</sup>, unter denen die Toll-like Rezeptoren eine zentrale Rolle einnehmen. Diese Rezeptoren, beispielsweise exprimiert auf dendritischen Zellen und Makrophagen, erkennen konservierte Strukturen, etwa Bestandteile bakterieller Zellwände oder unverwechselbare DNA-Sequenzen eines Virus und bewirken so die Aktivierung der Zellen <sup>[2]</sup>. Die Ursprünglichkeit dieses Abwehrmechanismus wird durch die Tatsache ersichtlich, dass vom hohen Vertebraten bis zu Invertebraten wie Schwämmen, Toll-like Rezeptoren exprimiert werden <sup>[3]</sup>.

Vor ca. 450 Millionen Jahren entstand das adaptive Immunsystem, dessen T- und B-Lymphozyten über ihre Antigen-Rezeptoren klonal selektioniert und nach spezifischer Adressierung des Pathogens, als immunologisches Gedächtnis im Organismus bewahrt werden. Erst durch diese Gedächtniszellen des adaptiven Immunsystems ist es dem Organismus möglich, schützende Immunität gegen bereits bezwungene Erreger zu entwickeln. Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem werden die Rezeptoren der T- und B-Lymphozyten nicht in der Keimbahn codiert,

---

<sup>1</sup> Gruppieren werden diese Rezeptoren unter der Rubrik „pathogen recognition receptors“ (Pathogenerkennungs-Rezeptoren; PRR), die zusammenfassend „pathogen associated molecular patterns“ (Pathogen-assoziierte molekulare Muster; PAMPs) erkennen

sondern durch einen komplexen Prozess, der VDJ-Rekombination<sup>2</sup>, aus zahlreichen Gensegmenten generiert. Zwei nur in T- und B-Lymphozyten exprimierte Rekombinasen (Rag1 und Rag2) initiieren den Rekombinationsvorgang durch Bindung an konservierte DNA-Sequenzen in den Gensegmenten. Einzelne Gensegmente werden daraufhin geschnitten und ligiert, so dass eine komplette Immunglobulin- oder T-Zellrezeptor-kodierende Gensequenz entsteht [4:5]. Die Ursache für die immense Diversität der Antigenrezeptorspezifitäten liegt zum einen in der randomisierten Ligation von Gensegmenten, zum anderen an gezielt induzierten Punktmutationen während der Ligation [6].

Genau wie das angeborene Immunsystem, besitzt auch die adaptive Immunität eine zelluläre (T- und B-Lymphozyten) und eine lösliche Komponente. Letztere wird durch B-Zellen vermittelt, die nach Aktivierung Antikörper (lösliche B-Zellrezeptoren bzw. Immunglobuline) produzieren [7].

Die praktisch unbegrenzte Zahl generierbarer Rezeptorspezifitäten birgt ein großes Gefahrenpotential. Bedingt durch den Mechanismus der VDJ-Rekombination können nun potentiell auch körpereigene Antigene erkannt werden. Wird aufgrund dessen eine autoreaktive T-Zelle in der Peripherie aktiviert, können verschiedenste Autoimmunerkrankungen die Folge sein.

Aus diesem Grund entstanden unterschiedliche Mechanismen zur Aufrechterhaltung der Toleranz, die direkt mit der Entwicklung der Lymphozyten gekoppelt sind. Die Entwicklung der T-Zellen nimmt ihren Ursprung im Knochenmark, von dem aus Vorläuferzellen in den Thymus wandern. Hier findet der weitere Entwicklungsprozess der Thymozyten zur T-Zelle statt, der auch die Deletion von Thymozyten mit ungeeignetem T-Zellrezeptor umfasst [8]. Die zufällige Rekombination eines T-Zellrezeptors ist nicht immer erfolgreich, so dass eine große Anzahl nicht funktioneller Rezeptoren entsteht. Thymozyten mit derartigen T-Zellrezeptoren werden im ersten Schritt, der sogenannten Positivselektion, entfernt. Die grundsätzliche Fähigkeit zur Erkennung von Peptid-MHC-Komplexen<sup>3</sup> wird

---

<sup>2</sup> V, D und J sind Abkürzungen für die Keimbahn-codierten „variable“- , „diversity“- und „joining“-Gensegmente

<sup>3</sup> Der Haupthistokompatibilitätskomplex („major histocompatibility complex“; MHC) wird von Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert. Über ihn werden zu Peptiden prozessierte Antigene präsentiert, so dass T-Zellen spezifisch aktiviert werden können.

sichergestellt, indem der T-Zellrezeptor Komplexe aus MHC-Molekül und Eigenpeptid im Kortex erkennen muss. Ist dies nicht möglich, wird der Vorläufer der T-Zelle deletiert. Alle verbleibenden Thymozyten sind nun auf die MHC-Moleküle des eigenen Körpers restringiert <sup>[9]</sup>. In der Medulla des Thymus findet anschließend die Negativselektion durch die „klonale Deletion“, dem Hauptmechanismus dieses Selektionsschrittes, statt. Thymozyten, deren T-Zellrezeptoren eine zu hohe Avidität gegenüber Eigenpeptid-MHC-Komplexen aufweisen, werden in diesem Schritt eliminiert. Unter diese Zellen fallen auch potentiell autoreaktive Thymozyten, so dass vor allem die Negativselektion ein essentieller Schritt für die Aufrechterhaltung peripherer Toleranz ist. Ein weiterer Mechanismus der Negativselektion ist die Anergisierung, die funktionelle Ruhigstellung autoreaktiver Thymozyten <sup>[9]</sup>.

Auch B-Lymphozyten unterliegen während ihrer Entwicklung verschiedenen Mechanismen der zentralen Toleranz. Das sogenannte „receptor-editing“ induziert eine sekundäre Arrangierung der Gensequenz für einen B-Zellrezeptor mit zu hoher Affinität für körpereigene Antigene <sup>4[10]</sup>. Da für eine funktionelle B-Zellaktivierung die Hilfe von T-Zellen notwendig ist, werden potentiell autoreaktive B-Zellen auch durch die zentralen Toleranzmechanismen für T-Zellen reguliert. Dieser Mechanismus wird auch als „linked recognition“ bezeichnet und vermittelt, zumindest für Thymus-abhängige Antigene <sup>5</sup>, ein hohes Maß an Sicherheit zur Wahrung der Selbsttoleranz <sup>[11]</sup>. Die genannten Selektionsvorgänge werden unter dem Begriff der zentralen Toleranz zusammengefasst und durch Mechanismen der peripheren Toleranz ergänzt. Diese Ergänzung ist deshalb notwendig, weil nicht alle autoreaktiven Lymphozyten durch Prozesse der zentralen Toleranz aus dem System entfernt werden <sup>[12]</sup>.

Einen essentiellen Anteil der peripheren Toleranz bilden natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen (Treg) <sup>[13-15]</sup>. Die Untergruppe von CD4<sup>+</sup> T-Zellen macht einen Anteil von circa 1-2% peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC) eines gesunden Spenders aus und ist unerlässlich für die Bewahrung des Gleichgewichtes zwischen Toleranz und Immunität in der Peripherie. Ihre Bedeutung wird bei Defekten deutlich,

---

<sup>4</sup> Inwieweit auch T-Zellen zum „receptor-editing“ befähigt sind, ist nicht klar beschrieben

<sup>5</sup> B-Zellen können zudem durch Thymus-unabhängige Antigene ohne T-Zellhilfe aktiviert werden. Hierzu gehören LPS oder andere hochrepetitive Strukturen, die B-Zellrezeptoren quervernetzen und so zur B-Zellaktivierung führen.

die eine Treg-Entwicklung verhindern. Ein solcher Defekt liegt beispielsweise dann vor, wenn es zu einer Mutation im Gen für den Transkriptionsfaktor Foxp3 kommt. Dieser Transkriptionsfaktor ist von zentraler Wichtigkeit für die Entwicklung von Treg im Thymus, wobei zur Zeit unklar ist, ob die Foxp3-Expression direkt die Differenzierung zur Treg induziert oder ob Foxp3 vielmehr die Funktionen von Treg stabilisiert, sobald die Differenzierung zur Treg festgelegt ist<sup>[16;17]</sup>. Im Menschen führt ein Defekt im FOXP3-Gen zum vollständigen Verlust natürlich vorkommender Foxp3<sup>+</sup> Treg<sup>6</sup> und letztlich zur Ausbildung des IPEX („Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance“) Syndroms, einer systemischen Autoimmunität mit zahlreichen betroffenen Organen<sup>[18]</sup>.

In Mäusen ist der Transkriptionsfaktor Foxp3 der einzige spezifische Molekularmarker<sup>[19]</sup>. Zusammen mit der konstitutiven Expression der alpha-Kette des Interleukin (IL)-2-Rezeptors (CD25) können murine Treg in Abwesenheit von Inflammation so eindeutig identifiziert werden. Auch humane Treg exprimieren sowohl Foxp3 als auch CD25<sup>[13]</sup>. Bedingt durch die aktivierungsabhängige Hochregulation von Foxp3 und CD25 in humanen T-Helferzellen, ist die alleinige Expression von Foxp3 jedoch kein eindeutiges Indiz für humane Treg<sup>[20]</sup>. Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe demonstrierten die spezifische Expression des intrazellulären Moleküls Galectin-10 in humanen Treg. Interessanterweise wird das Lectin weder in ruhenden noch in aktivierten T-Helferzellen exprimiert. Der siRNA-vermittelte Knockdown von Galectin-10 in Treg zeigte außerdem, dass die Expression des Moleküls für die Suppressorfunktion von Relevanz ist. Aus Ermangelung eines extrazellulären Treg-spezifischen Moleküls muss bis heute für Treg-Charakterisierungen im Menschen auf Kombinationen verschiedener Treg-assoziiierter Moleküle zurückgegriffen werden<sup>[21]</sup>.

Nach Aktivierung erlangen Treg die Fähigkeit zur Suppression umgebener Immunzellen: so können beispielsweise T-Zellproliferation oder Ausreifung dendritischer Zellen direkt inhibiert werden<sup>[13]</sup>. Der Mechanismus, dem diese Suppression unterliegt ist nicht genau verstanden. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der Proliferation von T-Zellen in zellkontaktabhängiger Weise erfolgt<sup>[22]</sup>. Arbeiten von Bopp et al. zeigten eine Beteiligung des sekundären

---

<sup>6</sup> Ein analoges Krankheitsbild zeigt die sogenannte „scurfy-Maus“, die durch einen Knockout von Foxp3 ebenfalls keine natürlich vorkommenden Treg ausbildet und somit an starker Autoimmunität leidet.

Botenstoffes cAMP<sup>7</sup> an der Suppressorfunktion. Die erhöhte intrazelluläre Konzentration von cAMP in Treg wird nach Aktivierung weiter gesteigert, während T-Helferzellen nur geringe Mengen zytosolischen cAMPs aufweisen. Bopp et al. zeigten, dass durch Ausbildung von „gap junctions“<sup>8</sup> zwischen Treg und T-Helferzelle, cAMP in die Helferzelle transportiert wird, wo es dann durch Blockade der IL-2-Produktion die T-Zellproliferation inhibiert [23]. Zudem wurden verschiedene Moleküle beschrieben (z.B. CTLA-4 [24], CD39 [25], GITR [26]) die mit der suppressorischen Treg-Funktion korrelieren [13;15].

Neben natürlich vorkommenden Treg aus dem Thymus, sind verschiedene, in der Peripherie induzierbare Treg-Subpopulationen beschrieben, die nach Stimulation von T-Zellen in Abhängigkeit des umgebenden Zytokinmilieus entstehen. Man unterscheidet hierbei IL-10-sezernierende Tr1-Zellen [27] und TGF- $\beta$ - („Transforming growth factor- $\beta$ “) produzierende TH3-Zellen [28]. Verschiedene *in vitro*-Stimulationsprotokolle können ebenfalls suppressive Funktionen in naiven T-Zellen induzieren. So vermittelt die Stimulation naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen über ihren T-Zellrezeptor zusammen mit TGF- $\beta$ , die Differenzierung zu induzierten Treg [29].

Arbeiten von Haribhai et al. zeigten, dass *in vivo* die Synergie natürlich vorkommender und induzierter Treg für die Regulation von Autoimmunität notwendig ist. So waren adoptiv transferierte, natürlich vorkommende Treg zwar in der Lage das Überleben von Foxp3-defizienten Mäusen zu sichern. Verbleibende Symptome von Autoimmunität, wie Splenomegalie, wurden aber erst dann vollständig unterdrückt, wenn eine Kombination beider Treg-Populationen adoptiv transferiert wurde [30].

Eine weitere Möglichkeit zur Induktion von Treg bildet der Kontakt mit tolerogenen dendritischen Zellen [31], dieser Differenzierungsprozess soll im nächsten Abschnitt behandelt werden.

---

<sup>7</sup> cAMP: zyklisches Adenosin-Monophosphat ist ein sekundärer Botenstoff, der an zahlreichen zellulären Signalwegen beteiligt ist.

<sup>8</sup> Gap junctions stellen eine Möglichkeit der interzellulären Kommunikation dar. Proteine (z.B. Connexine) der Membranen beider interagierender Zellen, treten in Kontakt miteinander und formen Kanalstrukturen, die gap junctions. Über diese können Botenstoffe zwischen beiden Zellen ausgetauscht werden.

Dendritische Zellen (DC) sind die professionellen Antigen-präsentierenden Zellen des angeborenen Immunsystems und können als einzige naive T-Zellen zur Proliferation bringen<sup>[32]</sup>. Sie sind strategisch an den äußersten Körpergrenzen, sowie in nahezu allen Organen und Geweben lokalisiert, wo sie als dichtes Netzwerk eine erste Linie zur Abwehr von eindringenden Pathogenen bilden. Durch ihre Fähigkeit zur Migration und Aktivierung naiver T-Zellen, bilden sie das zentrale Bindeglied zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem und sind effiziente Initiatoren adaptiver Immunantworten<sup>[32]</sup>.

Die DC-Funktion ist stark abhängig von dem jeweiligen Reifungsgrad, zudem unterscheiden sich die Funktionen zwischen einzelnen DC-Subpopulationen. Allen DC-Populationen gemeinsam, ist die Fähigkeit im ruhenden Zustand Antigene durch Phagozytose, Endozytose und Makropinozytose aufzunehmen. Die daraufhin prozessierten Peptide werden im Komplex mit MHC-Klasse II-Molekülen auf der DC-Oberfläche präsentiert. Demgegenüber stehen endogene Antigene, deren Peptide nach Prozessierung über MHC-Klasse I-Moleküle präsentiert werden<sup>[32]</sup>.

Dendritische Zellen sind mit einer großen Palette von Rezeptoren ausgestattet, die das Erkennen eindringender Pathogene ermöglichen und die Maturierung der DC auslösen (z.B. Toll-like Rezeptoren). Zusätzlich zu der direkten Erkennung von Pathogenen, können DC auch auf entzündungsbedingte Änderungen des Zytokinmilieus der Peripherie reagieren. So wird die terminale Differenzierung von DC beispielsweise auch allein durch pro-inflammatorische Zytokine induziert<sup>[33]</sup>, die von verschiedenen Zellen lokal am Entzündungsort sezerniert werden. Der Maturierungsprozess leitet die terminale Differenzierung der DC ein und zeichnet sich durch eine starke Hochregulation von MHC- und kostimulatorischen Molekülen aus. Terminal differenzierte DC beginnen mit der Migration zum nächsten drainierenden Lymphknoten und stellen die Aufnahme und Prozessierung weiterer Antigene komplett ein<sup>[32]</sup>. Mit der Maturierung geht außerdem ein drastischer Wandel in der Morphologie einher: die DC bilden zytoplasmatische Ausläufer, die sogenannten Dendriten<sup>9</sup> und erhöhen die Expression von Adhäsionsmolekülen, wodurch der Kontakt zu T-Zellen optimiert wird. Die genannten Eigenschaften

---

<sup>9</sup> Gewebeständige DC wie beispielsweise Langerhans Zellen in der Haut bilden in Bezug auf die Morphologie eine Ausnahme, da sie bereits im ruhenden Zustand einen stark verzweigten Zellkörper besitzen und so ein dichtes Netzwerk in der Haut schaffen.

terminal differenzierter DC bewirken, dass dem T-Zellrepertoire im Lymphknoten ein Abbild der in der Peripherie vorhandenen pathogenen Antigene präsentiert wird.

Bindet eine T-Zelle über ihren T-Zellrezeptor spezifisch an den Peptid-MHC-Komplex auf der maturierten DC, erfolgt die funktionelle Aktivierung dieser T-Zelle. Hierfür sind insgesamt zwei Signale nötig, die allesamt von der DC vermittelt werden <sup>[34]</sup>. Signal eins besteht in der spezifischen Bindung von T-Zellrezeptor an den Peptid-MHC-Komplex. Die DC-vermittelte Kostimulation bildet das Signal zwei und komplettiert die Aktivierung der T-Zelle, die nunmehr beginnt frühe Effektorzytokine wie IL-2 zu produzieren. Hinzu kommen T-Zell-polarisierende Zytokine, welche die Differenzierung zu einer bestimmten T-Zelllinie bewirken (oftmals als „Signal drei“ bezeichnet) <sup>[35]</sup>.

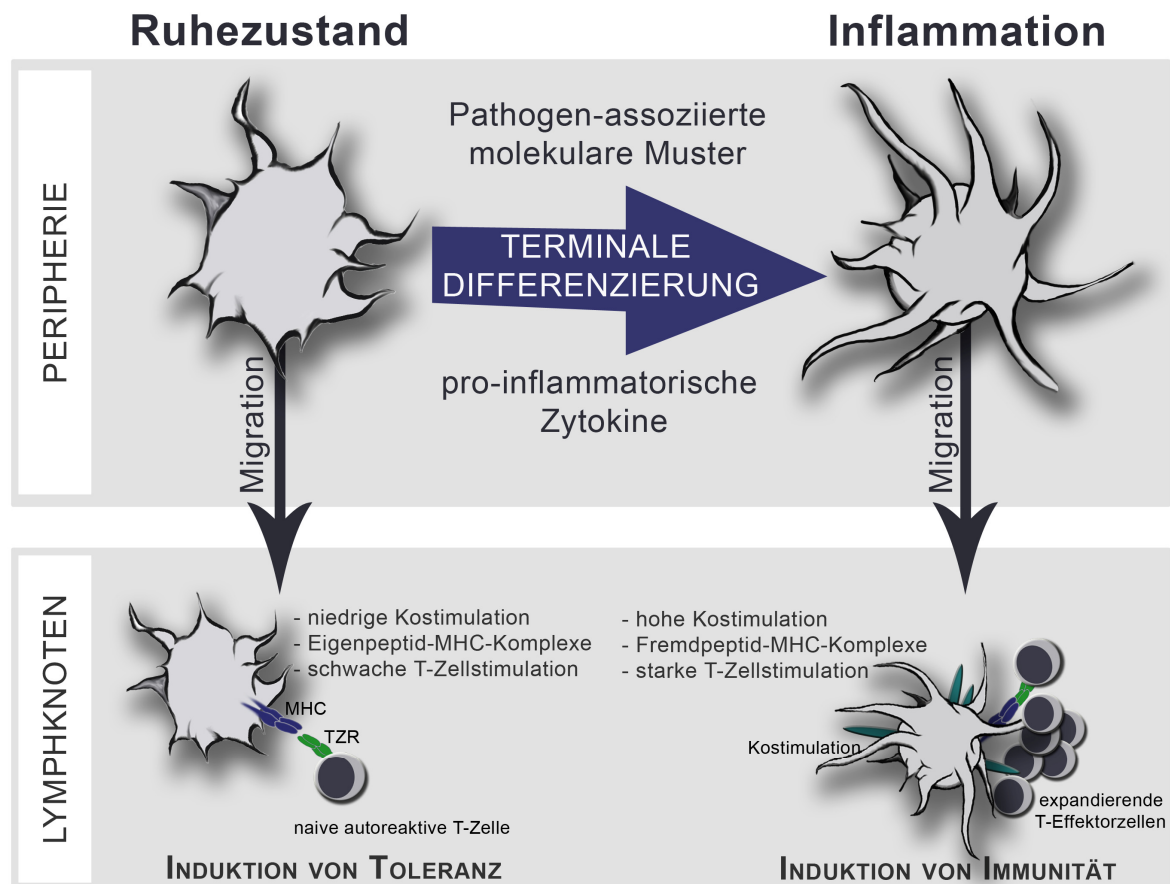
Auch in Abwesenheit von Pathogenen werden Peptide über MHC-Moleküle auf der DC-Oberfläche präsentiert. Unter diesen Bedingungen entstammen die Peptide überwiegend dem körpereigenen Repertoire<sup>10</sup> und werden ohne Kostimulation im Lymphknoten präsentiert. Durch Ab- oder Anwesenheit von Kostimulation kodieren DC somit die Präsentation körpereigener bzw. pathogener Antigenpeptide.

Die Kreuzvernetzung von T-Zellrezeptoren naiver T-Zellen durch Bindung von (Eigen-)Peptid-MHC-Komplexen ohne kostimulatorisches Signal, stellt die betroffene T-Zelle ruhig. Des Weiteren kann so zum Beispiel auch Apoptose induziert werden, wodurch die T-Zelle deletiert und somit direkt aus dem System entfernt wird <sup>[36]</sup>. Eine weitere Funktion ruhender DC beschreibt das Konzept der tolerogenen DC. So werden potentiell autoreaktive T-Zellen anergisiert, wenn sie über den T-Zellrezeptor in Abwesenheit von Kostimulation stimuliert werden. Diese Antigen-spezifische funktionelle Ruhigstellung naiver T-Zellen, ist der erste und essentielle Schritt der Differenzierung zu IL-10-produzierenden, suppressiven Treg.

In Abhängigkeit ihres Reifungsgrades vermitteln DC also gegensätzliche Funktionen: während DC in Abwesenheit eines inflammatorischen Reizes Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen oder ungefährlichen Fremdanitigenen (zum Beispiel Lebensmittel-Antigene) vermitteln, initiieren sie unter inflammatorischen Bedingungen mit hoher Effizienz adaptive Immunantworten (Abbildung 1.1).

---

<sup>10</sup> Ausnahmen bilden hierbei DC-Populationen der Lunge oder des Darms. Diese nehmen auch nicht-pathogene Antigene der Umgebung auf (Pollen, Nahrungsmittelproteine etc.), prozessieren und präsentieren die entstehenden Peptide.



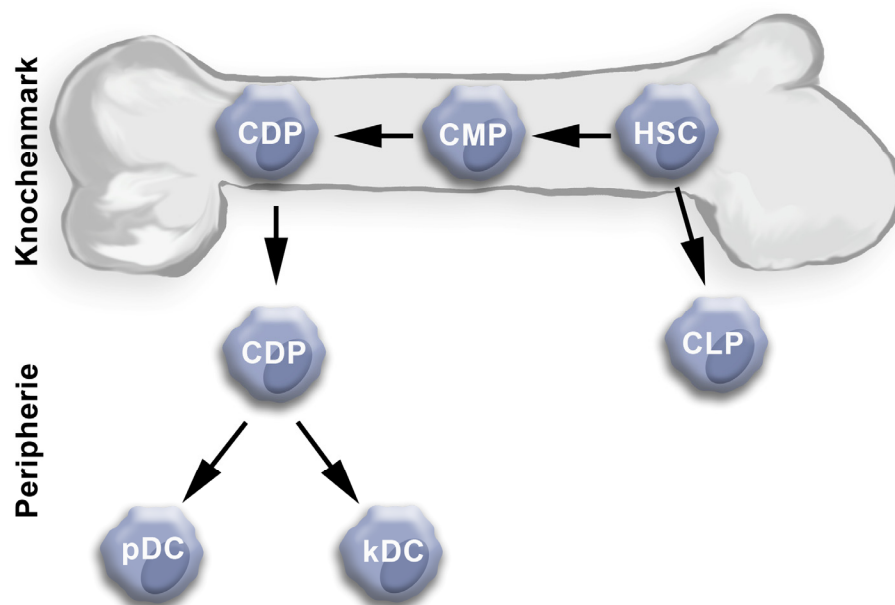
**Abbildung 1.1: Allgemeine Funktionen dendritischer Zellen**

Die Aufgaben von DC stehen in direkter Abhängigkeit ihres Reifungsgrades. In Abwesenheit von Inflammation sammeln ruhende DC in der Peripherie körpereigene Antigene oder harmlose Fremdanigene und wandern zum drainierenden Lymphknoten. Die prozessierten Peptide werden im Lymphknoten ohne kostimulatorisches Signal präsentiert und Toleranzmechanismen werden initiiert. Durch Pathogenkontakt oder pro-inflammatorische Zytokine setzt die terminale Differenzierung der DC ein. Die DC exprimiert daraufhin große Mengen kostimulatorischer Moleküle und stellt eine weitere Antigenaufnahme ein. Pathogenpeptide werden im Kontext von Kostimulation präsentiert und T-Zellen effektiv aktiviert. Die Abbildung vernachlässigt Abweichungen zwischen unterschiedlichen DC-Subpopulationen.

Dendritische Zellen stellen eine heterogene Zellfamilie dar, die in verschiedene Subpopulationen unterteilt werden kann. Die einzelnen Untergruppen unterscheiden sich in Lokalisation, Funktion und Phänotyp. Die unterschiedliche Funktionalität beider DC-Gruppen ist beispielsweise bedingt durch das jeweilige Expressionsprofil Pathogen-erkennender Rezeptoren, mit dem eine Spezialisierung auf bestimmte Pathogen-Gruppen einhergeht <sup>[37]</sup>.

Grundlegend können zwei DC-Hauptgruppen im humanen peripheren Blut unterschieden werden: CD11c<sup>+</sup> konventionelle DC (kDC) und CD11c<sup>-</sup> plasmazytoide

DC (pDC). Eine Reihe unterschiedlicher Arbeiten der letzten Jahre haben dazu beigetragen die DC-Entwicklung genauer zu beschreiben. Sah man anfangs den Ursprung der Ontogenese von pDC und kDC in separaten lymphoiden bzw. myeloiden Vorläuferzellen <sup>[38]</sup>, weiß man heute dass pDC und kDC aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle entstehen können <sup>[39]</sup>. Aus der hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark gehen die Vorläufer für Lymphozyten (Abbildung 1.2, CLP; „common lymphoid progenitor“) und die gesamte myeloide Zelllinie (CMP; „common myeloid progenitor“) hervor. Ausgehend von der Vorläuferzelle für DC (CDP, „common DC progenitor“) entwickeln sich dann sowohl pDC als auch kDC, wobei sich letztere in weitere Untergruppen verzweigen <sup>[39]</sup>. Der Wachstumsfaktor Flt3-Ligand stellt den Hauptfaktor der DC-Ontogenese dar und wird über den gesamten Zeitraum hin von den sich differenzierenden DC benötigt. Die Entwicklung der pDC ist abhängig von der Expression des Transkriptionsfaktors E2-2 <sup>[40]</sup>. Fehlt die E2-2-Expression oder wird sie in pDC blockiert, konvertieren pDC zu kDC, wodurch deutlich wird wie nah verwandt die beiden DC-Subpopulationen sind <sup>[41]</sup>.



**Abbildung 1.2: Ontogenese dendritischer Zellen des peripheren Blutes**

Im Knochenmark entsteht aus der  $CD34^+$  hämatopoetischen Stammzelle (HSC) der Vorläufer der DC (CDP; common DC progenitor). In der Peripherie differenzieren aus dieser Vorläuferzelle sowohl pDC, als auch kDC.

HSC: hämatopoetische Stammzelle, CMP: common myeloid progenitor, CLP: common lymphoid progenitor, CDP: common DC progenitor

Plasmazytoide DC wurden erst sehr spät im Jahre 1999 beschrieben <sup>[42;43]</sup>. Sie bilden mit 0,1-1% aller humanen PBMC die kleinste DC-Subpopulation <sup>[44]</sup> und können innerhalb der PBMC durch spezifische Marker wie CD303 und CD304 identifiziert werden. Charakteristisch ist auch die hohe Expression der alpha-Kette des IL-3-Rezeptors (CD123) <sup>[45]</sup>. Im ruhenden Zustand ist die Morphologie von pDC vergleichbar mit der von Lymphozyten: sie sind klein, rundlich und entwickeln erst nach Aktivierung erkennbare Dendriten <sup>[42]</sup>.

Bedingt durch die Expression von TLR- 7 und TLR-9, ist die Gruppe der pDC zur Initiation anti-viraler Immunantworten spezialisiert <sup>[46]</sup>. Als einzige Zellen verfügen pDC zudem über eine konstitutive Expression von IRF7, einem intrazellulären Faktor, der notwendig für die Induktion von Typ-I Interferonen ist. Aufgrund dieser Tatsache sind pDC in der Lage sehr schnell große Mengen von Interferon (IFN)- $\alpha$  und IFN- $\beta$  zu produzieren, was ihre zentrale Rolle in der Bekämpfung von Viren weiter festigt <sup>[47]</sup>.

Die Gruppe der CD11c<sup>+</sup> konventionellen DC ist größer als die der pDC und macht ungefähr 1-2% der peripheren Blutzellen aus. Konventionelle DC exprimieren eine große Bandbreite von Toll-like Rezeptoren, von TLR-1 bis TLR-8 sind in der kDC-Familie alle mit Ausnahme des TLR-9 vertreten, der exklusiv in pDC exprimiert wird <sup>[37]</sup>. Durch die Expression von Oberflächenmarkern lassen sich weitere Subtypen von kDC unterscheiden. Grob kann man die kDC bereits aufgrund ihrer Lokalisation in gewebebeständige kDC und im Blut zirkulierende kDC unterteilen. In der humanen Haut residieren zwei DC-Typen: epidermale Langerhans-Zellen, die ein dicht verzweigtes Netzwerk in der Haut bilden und so eine erste Barriere gegen eindringende Erreger aufbauen. In der darunter gelegenen Dermis sind die sogenannten dermalen DC lokalisiert <sup>[48]</sup>.

Auch innerhalb der kDC des peripheren Blutes lassen sich mindestens drei Gruppen unterscheiden. Die höchste Frequenz weisen CD16<sup>+</sup> kDC auf, zu denen auch die kürzlich beschriebenen SlatDC gehören <sup>[49]</sup>. Die nächstgrößte Untergruppe bilden die CD1c<sup>+</sup> kDC. Die kleinste Gruppe bilden CD141<sup>+</sup> kDC, die aufgrund ihrer erst

kürzlich demonstrierten Fähigkeit zur Cross-Präsentation<sup>11</sup> als das lang gesuchte Äquivalent zu murinen CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DC beschrieben wurden [50].

Eine weitere Quelle für kDC stellen Monozyten dar. Während einer bakteriellen Infektion induziert LPS gramnegativer Bakterien die Differenzierung von Monozyten in DC. Diese migrieren in die T-Zellareale der Lymphknoten, wo sie als potente Antigen-präsentierende Zellen fungieren. Monozyten ergänzen somit das Reservoir konventioneller DC im Falle bakterieller Infektionen [51].

---

<sup>11</sup> Cross-Präsentation: Präsentation extrazellulärer Antigene über den MHC-Klasse I-Weg (statt MHC-Klasse II). Ermöglicht die Reaktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf extrazelluläre Antigene, ohne direkte Infektion einer DC.

**Zielsetzung der Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit sollte der Mechanismus der DC-vermittelten Toleranzinduktion näher beleuchtet werden. In diesem Zusammenhang sollte geklärt werden, inwieweit die Interaktion von ICOS auf T-Zellen und ICOS-Ligand auf unreifen kDC notwendig für die Induktion anergischer, IL-10-produzierender und suppressiver T-Zellen ist. Zum anderen wurde das T-Zell-stimulatorische Potential aktivierter pDC im tolerogenen Milieu mit dem von aktivierten kDC verglichen.

## 2 Material und Methode

### 2.1 Laborgeräte

Beta-Szintillationszähler	Betaplate© 1205 (Perkin Elmer Wallac GmbH, Freiburg, Deutschland)
Bestrahlungsgerät	Gammacell 2000 (Isgaard medical, Ris, Dänemark)
Brutschrank	Hera Cell 240 (Heraeus, Hanau) Plastikwaren
Depletionsmagnet	DYNAL MPC-6 (Dynal Oslo, Norwegen) Dynal MPC- 50 (Dynal) jetzt Invitrogen, Deutschland
ELISA-Fotometer	Immunoreader NJ-2000 (Intermed, Nunc, Wiesbaden, Deutschland)
Durchflusszytometer:	FACSCalibur, BD Biosciences LSRII, BD Biosciences
Laborwaage	Scout Pro SPU601 (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)
Mikroskope	Labormikroskop Leitz SM-LUX Labormikroskop Axiovert 135 (Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland)
Kamerasystem für Mikroskop	Spot insight Camera (Model #3.1.0; Diagnostic Instruments Inc., Sterling Heights, USA)
Magnetischer Zellseparator	VarioMACS-Separator MACS Separation Columns (beide Milteny-Biotech, Deutschland)
Schüttler	Polymax 2040 (Heidolph, Schwabach, Deutschland)
Zählkammer	Neubauer Zählkammer improved (VWR, Darmstadt, Deutschland)
Zellerntegerät	Semiautomatic Cell Harvester (Skatron AS, N-3401, Norwegen)
Zentrifugen	Sorvall RT 6000D (Heraeus, Deutschland) Multifuge 3L-R (Heraeus) Biofuge primo R (Heraeus) Sorvall RC5C Plus (Du Pont Instruments, Deutschland)

### 2.2 Plastikwaren

Alle Plastikwaren wurden steril bezogen.

## 2.3 Kulturmedien

---

Alle selbst angesetzte Medien wurden mit destilliertem Wasser angesetzt, sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt.

### **X-VIVO 15**

X-VIVO 15 (Bio\*Whittaker Europe, Verviers, Belgien, #BE04-418Q)

### **MEM** (minimal essential medium)

(Ansatz für 5 Liter Medium)

1 Packung RPMI 1640 Trockenpulver (Gibco, Grand Island, USA)

4,77 g/l HEPES (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

2,2 g/l Natriumhydrogencarbonat (Merk, Darmstadt, Deutschland)

3,6 ml/l Mecaptoethanol (Serva, Heidelberg, Deutschland, #28625)

### **RPMI 1640** (Roswell Park Memorial Institute Medium)

(Ansatz für 10 Liter Medium)

1 Packung RPMI 1640 Trockenpulver (Gibco)

3,6 g/l HEPES (Biochrom AG)

10 ml/l Penicillin-Streptomycin (Biochrom AG)

10 ml/l Sodium Pyroval (Biochrom AG)

2 g/l Natriumhydrogencarbonat (Merk)

10 ml/l Nicht-Essentielle Aminosäuren (Biochrom AG)

3,5 ml/l Mecaptoethanol (Serva)

100 µl/l IndomethacinPuffer, Lösungen und Reagenzien

### **Einfriermedium**

HSA (humanes Serum Albumin) (OCTAPHARMA, Langenfeld, Deutschland)

10% DMSO (Dimethylsulfoxid) (Sigma, Deisenhofen)

## 2.4 Puffer, Lösungen und Reagenzien

---

### **PBS** (phosphate buffered saline)

Stammlösung = 10-fach konzentriert

80,4 g/l NaCl (Roth)

15,6 g/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O (Merk)

mit 10N NaOH auf pH-Wert 6,6 einstellen, anschließend autoklavieren

### **PBS/EDTA**

1 x PBS

1 mM EDTA (GEBRU Biotechnik, Gailsberg, Deutschland)

### **PBS/EDTA/Heparin**

1 x PBS

1 mM EDTA (GEBRU Biotechnik)

0,2% Heparin (Roche)

### **MACS-Puffer**

1 x PBS

0,5% HSA (OCTAPHARMA)

3 mM EDTA (GEBRU Biotechnik)

### **FACS-Puffer**

1 x PBS

0,5% HSA

1 mM EDTA

10 µg/ml Sandoglobin (Biotest Pharma GmbH, Dreieich, Deutschland)

### **Ficoll (Biocoll Separating Solution)**

Biocoll Separating Solution Dichte: 1.077 (Biochrome, #L-6115) LSM Separation Medium; Dichte: 1,077 (PAA, Pasching, Deutschland, #J15-004)

**FCS (Fötales Kälberserum)**

FCS ChargeA01129-377 (PAA Laboratories #A15-649). Das Serum wurde zur Inaktivierung der Komplementkomponenten für 30min. bei 56°C im Wasserbad erhitzt und anschließend in 100ml Aliquots bei -20°C bis zum Gebrauch gelagert.

**Physiologische Trypanblaulösung**

Trypanblau ist ein sogenannter Vitalfarbstoff. Tote Zellen werden angefärbt, während lebende Zellen mit intakter Membran den Farbstoff nicht aufnehmen. Mit diesem Farbstoff wurde die Lebendzellzahl in Zellsuspension ermittelt.

Trypan blue solution (0,4%) (Sigma #T8154)

**Szintillationsflüssigkeit**

Um die radioaktiven Emissionen der <sup>3</sup>H-Thymidin enthaltenen DNA in für den Beta-Szintillationszähler messbaren Lichtemissionen umzuwandeln, wurden die Glasfaserfilter mit der geernteten DNA in Plastikbeutel eingeschweißt, welche zuvor mit Szintillationsflüssigkeit befüllt wurden.

Szintillationsflüssigkeit: Rotizint© eco (Roth, #9500.2)

**Tritium-markierte Thymidin-Desoxyribose (<sup>3</sup>H-Thymidin)**

Für die Proliferationstests wurde <sup>3</sup>H-Thymidin mit einer Aktivität von 1µCi/ml eingesetzt. Die Aktivität der Stammlösung betrug 35µCi/ml (MPBiomedicals, Eschede, Deutschland)

**2.5 Zytokine**

Rekombinantes humanes GM-CSF	Leukine, sargramostim Berlex, USA
Rekombinantes humanes IL-1β	Strathmann Biotec AG, Hamburg
Rekombinantes humanes IL-2	Proleukin; #AI-96E0816 (Chiron-Behring, Deutschland)
Rekombinantes humanes IL-3	R&D Systems Deutschland
Rekombinantes humanes IL-4	CellGenix, Freiburg, Deutschland
Rekombinantes humanes IL-6	Strathmann Biotec AG, Hamburg

Rekombinantes humanes IL-10	CellGenix, Freiburg, Deutschland
Rekombinantes humanes TNF- $\alpha$	Genzyme Corp, MA, USA
Rekombinantes humanes Prostaglandin E2	Cayman Chemical Comp, MI, USA

## 2.6 Antikörper

### Neutralisierende und blockierende Antikörper

anti-IL-1 $\beta$	Maus-anti-human IL-1 $\beta$ monoklonal, Isotyp IgG1 Klon: 8516:311 Firma: R&D Systems
anti-IL-6	Maus-anti-human IL-6 monoklonal, Isotyp IgG1 Klon: 6708.11 Firma: R&D Systems
anti-TNF- $\alpha$	Ziege-anti-human TNF- $\alpha$ monoklonal, Isotyp IgG Firma: R&D Systems
anti-IFN- $\alpha$	Schaf-anti-human IFN- $\alpha$ polyklonal Firma: PBL Interferon Source
anti-ICOS-L	Maus-anti-human ICOS-L Monoklonal, Isotyp IgG1 ( $\kappa$ ) Klon: HIL131 Zur Verfügung gestellt von R. Kroczek

### Antikörper für Durchflusszytometrie

anti-CD3	Maus-anti-human CD3 FITC/APC/PE/PE-Cy5-konjugiert monoklonal, Isotyp: IgG1 Firma: BD Pharmingen
anti-CD4	Maus-anti-human CD4 FITC/PE/PE-Cy5-konjugiert monoklonal, Isotyp: IgG1 Klon: RPA-T4 BD Pharmingen
anti-CD11c	Maus-anti-human CD11c APC-konjugiert monoklonal, Isotyp: IgG1 Klon: B-ly6 Firma: BD Pharmingen
anti-CD14	Maus-anti-human CD14 FITC-konjugiert

	monoklonal, Isotyp IgG2a Klon: 8G3 Firma: Diaclone
anti-CD19	Maus-anti-human CD19 FITC-konjugiert monoklonal, Isotyp IgG1 Klon: B-C3 Firma: Diaclone
anti-CD25	Maus-anti-human CD25 PE-Cy5-konjugiert monoklonal, Isotyp IgG1 Klon: M-A251 Firma: BD Pharmingen
anti-CD40 unkonjugiert	Maus-anti-human CD40 unkonjugiert monoklonal, Isotyp: IgG1 Klon: 5C3 Firma: BD Pharmingen
anti-CD58	Maus-anti-human CD58 unkonjugiert monoklonal, Isotyp: IgG2a Klon: AICD85 Firma: Immunotech
anti-CD69	Maus-anti-human CD69 FITC-konjugiert monoklonal, Isotyp IgG1 Klon: FN50 Firma: BD Pharmingen
anti-CD80	Maus-anti-human CD80 unkonjugiert monoklonal, Isotyp: IgG1 Klon: MAB104 Firma: Beckman Coulter
anti-CD86	Maus-anti-human CD86 unkonjugiert monoklonal, Isotyp: IgG1 Klon: BU63 Firma: Serotec
anti-CD123	Maus-anti-human CD123 PE-Cy5-konjugiert monoklonal, Isotyp: IgG1 Klon: 9F5 Firma: BD Pharmingen
anti-CD303	Maus-anti-human CD303 PE-konjugiert monoklonal, Isotyp IgG1 Klon: AC144 Firma: Miltenyi Biotech
anti-CTLA-4	Maus-anti-human-CTLA-4 PE-konjugiert monoklonal, Isotyp: IgG2a

	Klon: BNI3 Firma: BD Pharmingen
anti-Foxp3	Maus-anti-human Foxp3 PE/AlexaFluor647-konjugiert monoklonal, Isotyp: IgG1 Klon: 259D Firma: Biolegend
anti-GARP	Ratte-anti-human GARP monoklonal, Isotyp IgG2a Klon: G14D9 Firma: eBioscience
anti-HLA-DR	Maus-anti-human HLA-DR PE-Cy5-konjugiert monoklonal, Isotyp: IgG2a Klon: G46-6 Firma: BD Pharmingen
	Ratte-anti-human HLA-DR unkonjugiert monoklonal, Isotyp IgG2a Klon: YD1/63.4.10 Firma: Serotec
anti-ICOS	Maus-anti-human ICOS PE-konjugiert Monoklonal, Isotyp IgG1 (κ) Klon: F44 Zur Verfügung gestellt von R. Kroczeck
anti-ICOS-L-PE	Maus-anti-human ICOS-L PE-konjugiert Monoklonal, Isotyp IgG1 (κ) Klon: HIL131 Zur Verfügung gestellt von R. Kroczeck
anti-IL-2-PE	Maus-anti-human IL-2 PE-konjugiert monoklonal, Isotyp: IgG1 Klon: 5344.111 Firma: BD Biosciences
anti-IL-4-PE	Maus-anti-human IL-4 PE-konjugiert monoklonal, Isotyp: IgG1 Klon: 8D4-8 Firma: BD Biosciences
anti-IL-10-PE	Ratte-anti-human IL-10 PE-konjugiert monoklonal, Isotyp: IgG2a Klon: JES3-19F1 Firma: BD Biosciences
anti-IL-17-PE	Maus-anti-human IL-17 monoklonal, Isotyp: IgG1 Klon: eBio64CAP17 Firma: eBioscience

anti-IFN- $\gamma$ -FITC	Maus-anti-human IFN- $\gamma$ FITC-konjugiert monoklonal, Isotyp: IgG1 Klon: 4S.B3 Firma: BD Biosciences
anti-mouse-IgG-PE	Ziege-anti-Maus IgG PE-konjugiert Isotyp: Ziege IgG Jackson ImmunoResearch
anti-rat-IgG-FITC	Affe-anti-Ratte IgG FITC-konjugiert Isotyp: Affe IgG Jackson ImmunoResearch

### Antikörper für Zellstimulation

anti-CD3	Maus-anti-human-CD3 monoklonal, Isotyp IgG1( $\kappa$ ) Klon: OKT-3
anti-CD28	Maus-anti-human CD28 monoklonal, Isotyp IgG1( $\kappa$ ) Klon: CD28.2 (Pharmigen #555725)
anti-ICOS	Maus-anti-human ICOS Monoklonal, Isotyp IgG1 ( $\kappa$ ) Klon: F44 Zur Verfügung gestellt von R. Kroczek

### Antikörper für Zellseparation

CD4-MicroBeads	Maus-anti-human-CD4 Leu <sup>TM</sup> -3a monoklonal, Isotyp IgG1 Klon: SK3 Firma: Miltenyi Biotech, Deutschland
CD8-MicroBeads	Maus-anti-human-CD8 monoklonal, Isotyp IgG1 Firma: Miltenyi Biotech, Deutschland
CD25-MicroBeads	Maus-anti-human-CD25 monoklonal, Isotyp IgG1 Firma: Miltenyi Biotech, Deutschland
CD304-MicroBeads	Maus-anti-human CD304 monoklonal, Isotyp IgG1 Firma: Miltenyi Biotech
CD8-DynaBeads	Maus-anti-human-CD8 monoklonal, Isotyp IgG1 Firma: Invitrogen, Deutschland
CD14-DynaBeads	Maus-anti-human-CD14) monoklonal, Isotyp IgG2a, Klon: RMO-52 Firma: Invitrogen, Deutschland
CD19-DynaBeads	Maus-anti-human-CD19 Firma: Invitrogen, Deutschland

---

CD25-DynaBeads

Maus-anti-human-CD25)  
monoklonal, Isotyp IgM,  
Klon: MEM-140  
Firma: Invitrogen, Deutschland

---

## 2.7 Methoden

---

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden an einer sterilen Werkbank und mit sterilen Reagenzien durchgeführt. Die Kultivierung von Zellen erfolgte in Inkubatoren bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt in gesättigter Wasserdampf-atmosphäre. Unter diesen Bedingungen bleibt der physiologische pH-Wert der CO<sub>2</sub>/Bicarbonat gepufferten Medien konstant.

### 2.7.1 Methoden der Zellkultur

#### 2.7.1.1 Isolation humaner PBMC aus Buffy coats

Ausgangsmaterial für die Gewinnung von humanen PBMC (engl. peripheral blood derived mononuclear cells) waren Buffy coats, die von der Transfusionszentrale der Universitätsmedizin Mainz bezogen wurden.

Vor der Isolierung wurde der Buffy coat (ca. 80ml) mit PBS/EDTA/Heparin auf 120 ml gefüllt. Mittels Dichtegradienten-Zentrifugation wurden dann die PBMC von plasmatischen Bestandteilen, Erythrozyten und Granulozyten getrennt. Als Gradientenmedium diente hierbei Ficoll (Biocoll).

Bei der Dichtegradienten-Zentrifugation bewirkt die gleichbleibende Zentrifugalkraft und konstante Viskosität des Gradientenmediums, dass die Sedimentationsrate der Partikel der Dichte des umgebenden Mediums direkt proportional ist. Ficoll ist eine isotonische Lösung mit einer mittleren Dichte von  $1,077 \pm 0,001$  g/ml (bei 20°C). Sowohl Dichte als auch Osmolarität dieser Lösung sind zur Isolierung von Leukozyten optimiert. Je 15 ml Ficoll wurden in einem 50 ml Laborröhrchen mit 30 ml Buffy coat-Verdünnung überschichtet und bei Raumtemperatur für 30 min ohne Bremse zentrifugiert (300 x g).

Die gebildeten Phasen setzen sich wie folgt zusammen (von oben nach unten):

1. Phase: Plasma
2. Phase/Interphase: Leukozyten
3. Phase: Ficoll
4. unterste Phase: Erythrozyten und Granulozyten

Die Interphase wurde vollständig in ein zweites 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, in das zuvor ca. 10 ml PBS/EDTA vorgelegt wurden. Um die Zellen von Plasma-, Ficoll-Resten und Thrombozyten zu reinigen, wurden diese 3-4-mal durch Auffüllen des Röhrchens mit 1 x PBS/EDTA und anschließender Zentrifugation (300 x g, 6 min, 4°C) gewaschen.

#### **2.7.1.2 Gewinnung von Nabelschnurblut und Isolation von PBMC**

Unmittelbar nach Durchführung eines Kaiserschnittes, wurde das in Venen der Nabelschnur und Plazenta verbleibende umbilikale Blut entnommen und mit PBS/EDTA/Heparin verdünnt. Die Isolation der PBMC erfolgte, wie bei einem Buffy coat, mittels Dichtegradientenzentrifugation.

#### **2.7.1.3 Aufarbeitung von Leukapherisaten und Isolation von PBMC**

Erforderte das Experiment große Mengen von kleinen Zellpopulationen (regulatorische T-Zellen, plasmazytoide DC) oder die wiederholte Restimulation von T-Zellen über lange Zeiträume (Generierung alloreaktiver T-Zelllinien), wurden für diese Anforderungen Leukapherisate gesunder Spender entnommen. Dies führte zu ausreichend großen Ausgangszahlen von PBMC ( $>6 \times 10^9$ ) eines Spenders. Bei der Leukapherese wird dem Spender Blut entnommen und einem sterilen, geschlossenen System zugeführt. Hier werden die PBMC direkt von den restlichen Bestandteilen des Blutes getrennt und isoliert. Die verbleibenden Bestandteile werden dem Spender wieder zugeführt.

Das entstandene Leukapherisat wurde anschließend in eine sterile 500 ml Kulturflasche überführt und mit PBS/ACD-A auf 480 ml aufgefüllt. Anschließend wurden 24 50 ml-Röhrchen mit jeweils 20 ml Ficoll befüllt und mit je 20 ml der Verdünnung überschichtet. Nach 30 min Zentrifugation bei 24°C und 300 x g (ohne Bremse) wurde die PBMC-Interphase entnommen und in PBS/EDTA gewaschen.

#### **2.7.1.4 Ermittlung der Lebendzellzahl**

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden die Zellen mit einer physiologischen Trypanblau-Lösung verdünnt. Mit einer Neubauer-Zählkammer erfolgte anschließend die Bestimmung der Zahl lebender Zellen. Nach Auszählen zweier Großquadrate (á 16 Einzelquadraten) wurde der Mittelwert gebildet und die Lebendzellzahl mit folgender Formel errechnet:

Mittelwert x Verdünnungsfaktor x Volumen x  $10^4$  (Kammerfaktor) = Zellzahl

#### **2.7.1.5 Kryokonservierung und Reaktivierung von Zellen**

Die wiederholte Restimulation von T-Zellen machte es notwendig verwendete Antigen-präsentierende Zellen zu konservieren. Dies geschah durch die Lagerung der Zellen (PBMC oder isolierte plasmazytoide DC) in flüssigem Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$ . Hierfür wurden die Zellen gewaschen und in Einfriermedium (HSA + 10% DMSO) aufgenommen und in Aliquots von ca.  $150 \times 10^6$  PBMC (bzw. ca.  $10^6$  plasmazytoide DC) in Kryoröhrchen überführt. Nach 24-stündiger Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  erfolgte die endgültige Lagerung in flüssigem Stickstoff. Zur Reaktivierung wurden die Zellen im Wasserbad  $37^{\circ}\text{C}$  angetaut, in 50ml-Röhrchen (15 ml-Röhrchen für das Auftauen von plasmazytoiden DC) überführt und mit kaltem RPMI + 5% HSA für 6 min bei  $200 \times g$  zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in geeignetem Medium resuspendiert.

#### **2.7.1.6 Isolation humaner T-Zellpopulationen aus PBMC**

Die in dieser Arbeit verwendeten T-Zellpopulationen wurden aus PBMC mit Hilfe von Konjugaten aus monoklonalen Antikörpern und superparamagnetischer Partikel (MicroBeads, Miltenyi Biotech, Deutschland) isoliert. Markierte Zellen können so im magnetischen Feld der Zellseparator-Säule festgehalten und isoliert werden, während unmarkierte Zellen durch die Zwischenräume der Säule passieren. In dieser Arbeit wurde ausschließlich das Positivselektionsverfahren verwendet. Hierbei werden die PBMC mit Zellpopulation-spezifischen MicroBeads inkubiert und anschließend magnetisch isoliert.

#### **2.7.1.7 Anreicherung von $\text{CD4}^+$ und $\text{CD8}^+$ T-Zellen aus PBMC**

Die Isolation der  $\text{CD4}^+$  und  $\text{CD8}^+$  T-Zellen aus PBMC erfolgte mit Hilfe des MACS®-Trennsystems nach direkter magnetischer Markierung von  $\text{CD4}$ - bzw.  $\text{CD8}$ -Moleküle.  $10^7$  PBMC wurden mit  $1\mu\text{l}$  anti- $\text{CD4}$  oder anti- $\text{CD8}$  MicroBeads und zehnfacher Menge MACS-Puffer für 15 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  taumelnd inkubiert. Zur Entfernung überschüssiger MicroBeads wurden die PBMC ad 50 ml mit MACS-Puffer aufgefüllt und für 6 min bei  $300 g$  zentrifugiert.  $10^8$  PBMC wurden dann in 1 ml MACS-Puffer

resuspendiert, auf Zellseparatorsäulen (MS-Columns, Miltenyi Biotech, Deutschland) gegeben und die Positivselektion nach Herstellerprotokoll durchgeführt.

#### **2.7.1.8 Anreicherung CD25<sup>+</sup>CD8/CD14/CD19<sup>-</sup> regulatorischer T-Zellen**

Natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen wurden mittels Positivselektion über ihre konstitutive Expression von CD25 ( $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors) isoliert. Hierfür wurden  $10^7$  PBMC mit limitierenden Mengen von anti-CD25 MicroBeads und zehnfacher Menge MACS-Puffer für 15 min bei 4°C inkubiert. Nach Waschen mit MACS-Puffer zur Entfernung überschüssiger MicroBeads wurde die Positivselektion nach Herstellerprotokoll (MS-Columns, Miltenyi Biotech, Deutschland) durchgeführt. Zur Entfernung von kontaminierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen, Monozyten und B-Zellen wurden die isolierten CD25<sup>+</sup>-Zellen in 3ml MEM + 2% HSA (Octapharma) resuspendiert und mit anti-CD8- (2 Beads/Zelle), anti-CD14- (1 Bead/Zelle) bzw. anti-CD19-DynaBeads (2 Beads/Zelle) rotierend bei 4°C inkubiert (DynaBeads, Invitrogen, Deutschland). Nach 20 min Inkubation wurden weitere 5 ml MEM + 2% HSA hinzugegeben und nochmals 10 min inkubiert. Die Depletion der Kontaminatoren erfolgte anschließend im Depletionsmagneten (Invitrogen, Deutschland) nach Herstellerprotokoll.

#### **2.7.1.9 Aufreinigung von CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen aus PBMC**

Subpopulationen von CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit Hilfe des MultiSort-MACS®-Verfahren (Miltenyi Biotech, Deutschland) isoliert. Die paramagnetischen Partikel sind hierbei über eine enzymatisch spaltbare Brücke an monoklonale Antikörper gebunden, so dass die Partikel nach Positivselektion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen entfernt werden und eine erneute positive Anreicherung erfolgen kann.

$10^7$  PBMC wurden mit 2,5  $\mu$ l anti-CD4 MultiSortbeads und zehnfacher Menge MACS-Puffer für 15 min bei 4°C taumelnd inkubiert. Nach Waschen der PBMC mit MACS-Puffer wurden die PBMC auf Separationssäulen (MS-Column, Miltenyi Biotech, Deutschland) aufgetragen und nach Herstellerprotokoll positiv isoliert. Die enzymatische Abspaltung der paramagnetischen Partikel auf den isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen erfolgte nach Herstellerprotokoll.

Zur Isolation der CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen wurden  $10^7$  CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit 5  $\mu$ l anti-CD45RA MicroBeads und zehnfacher Menge MACS-Puffer für 15 min bei 4°C taumelnd

inkubiert. Nach Waschen erfolgte die Positivselektion über die Trennungssäulen (MS-Columns, Miltenyi Biotech, Deutschland). Die durchlaufenden CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> T-Zellen wurden aufgefangen und als CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen verwendet. War diese Population nicht rein genug, wurden die CD45RO<sup>+</sup> T-Zellen positiv angereichert (1 µl pro 10<sup>7</sup> CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> T-Zellen).

#### **2.7.1.10 Isolation naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Nabelschnurblut-PBMC**

10<sup>7</sup> PBMC aus Nabelschnurblut wurden mit 3 µl anti-CD4 MicroBeads und zehnfacher Menge MACS-Puffer für 15 min bei 4°C taumelnd inkubiert. Die Isolation naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen erfolgte nach Waschen der PBMC mit MACS-Puffer dem Herstellerprotokoll entsprechend.

#### **2.7.1.11 *In vitro* Stimulation von T-Zellen zur Proliferationsanalyse**

Zur Untersuchung der T-Zellproliferation wurden 10<sup>5</sup> T-Zellen in 96-Well Flachbodenplatten (Costar/Corning, Deutschland) stimuliert. Waren die Zahlen dendritischer Zellen limitierend (z.B. bei der Stimulation mit plasmazytoiden DC), wurden 96-Well Flachbodenplatten mit halber Oberfläche (Costar/Corning, Deutschland) verwendet. Die Platten ermöglichten die Reduktion der eingesetzten Zellzahlen um die Hälfte.

Die T-Zellstimulation erfolgte entweder polyklonal mit 0,5 µg/ml anti-CD3 und bestrahlten PBMC oder mit dendritischen Zellen in X-VIVO 15 (Lonza, Belgien). Hierbei wurden aktivierte pDC im Verhältnis 1:5, kDC im Verhältnis 1:10 (DC:T-Zelle) eingesetzt. Der Proliferationstest wurde über einen Zeitraum von vier Tagen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

#### **2.7.1.12 Analyse der T-Zellproliferation mittels <sup>3</sup>H-Thymidin-Inkorporation**

Die Messung der T-Zellproliferation erfolgte unter anderem indirekt über den Einbau von <sup>3</sup>H-Thymidin in die DNA der proliferierenden Zellen. Am Tag 4 nach Stimulation, wurde den Kulturen <sup>3</sup>H-Thymidin mit einer Aktivität von 37 kBq/Well zugesetzt. Daraufhin wurden die Tests für weitere 16h im Brutschrank inkubiert, um den Einbau des Isotops zu ermöglichen. Erfolgte die Messung nicht am gleichen Tag, wurden die Kulturplatten bei -20°C gelagert, um einen weiteren Einbau von <sup>3</sup>H-Thymidin zu verhindern.

Zur Auswertung wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellerntegerätes (Semiautomatic Cell Harvester; Skatron AS, N-3401, Norwegen) auf Glasfaserfilter gespült, wobei Zellen und markierte DNA auf dem Filter zurückgehalten und überschüssiges  $^3\text{H}$ -Thymidin ausgewaschen wurde. Der Filter wurde anschließend bei  $100^\circ\text{C}$  für 30 min im Wärmeschrank getrocknet und anschließend mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotizint© eco, Roth) in eine Plastikfolie eingeschweißt. Im Anschluss erfolgte durch Flüssigszintillationszählung die indirekte Bestimmung des  $^3\text{H}$ -Thymidin-Gehalts in einem  $\beta$ -Szintillationszähler in Form von gezählten Impulsen (cpm; „counts per minute“). Als Maß für die Proliferation wurde jeweils das arithmetische Mittel der cpm-Werte dreier identischer und parallel angesetzter Proben angegeben.

#### **2.7.1.13 Testung der suppressorischen Funktion regulatorischer T-Zellen**

Zur Validierung der suppressorischen Kapazität isolierter  $\text{CD}25^+$  Treg, wurden  $10^5$   $\text{CD}4^+$  T-Zellen in 96-Well Flachbodenplatten gegeben und mit sinkenden Treg-Zahlen (Treg-Titration von 1:1 bis 1:16) kokultiviert. Einzelkulturen von  $10^5$   $\text{CD}4^+$  T-Zellen oder Treg dienten als Kontrolle. Zur Stimulation wurden  $0,5 \mu\text{g/ml}$  anti-CD3 mAk und  $3 \times 10^5$  mit 90 Gy bestrahlte PBMC (oder  $3 \times 10^5$  mit 30 Gy bestrahlte T-Zell-depletierte PBMC) hinzugegeben. In einigen Experimenten wurden DC-Population zur Stimulation der Einzel- und Kokulturen verwendet. Hierbei wurden aktivierte pDC im Verhältnis 1:5 oder terminal differenzierte kDC im Verhältnis 1:10 (DC:T-Zelle) eingesetzt. Im Falle der Stimulation mit dendritischen Zellen, stammten sowohl Treg als auch  $\text{CD}4^+$  T-Effektorzelle vom gleichen Spender. Die Markierung der Proliferationstests mit  $^3\text{H}$ -Thymidin erfolgte am Tag 4 der Kultur.

#### **2.7.1.14 Bestrahlung von PBMC**

T-Zellen benötigen zur vollständigen Aktivierung neben dem T-Zellrezeptorsignal einen adäquaten Kostimulus. In Proliferationstests wurde dieser Kostimulus unter anderem durch Antigen-präsentierende Zellen (Dendritische Zellen, B-Zellen, Makrophagen, Monozyten) innerhalb der PBMC geliefert. Um zu verhindern, dass die Proliferation von B- und T-Zellen eine zu hohe Hintergrundproliferation bilden, wurden die vollständigen PBMC oder T-Zell-depletierte PBMC bei 90 Gy bzw. 30 Gy mit Röntgenstrahlen bestrahlt. Die so entstehenden Einzelstrangbrüche in der DNA der Zellen verhindert die Proliferation der Zellen.

**2.7.1.15      Aufreinigung humaner CD304<sup>+</sup> plasmazytoider DC aus PBMC**

Die DC-Subpopulation plasmazytoider DC wurde mittels MACS®-Technik aus PBMC isoliert. 10<sup>7</sup> PBMC wurden hierfür mit 1 µl anti-CD304 MicroBeads und fünffacher Menge MACS-Puffer für 20 min bei 4°C taumelnd inkubiert. Die PBMC wurden mit 50 ml MACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert und in 100 µl MACS-Puffer resuspendiert. Die Positivselektion erfolgte anschließend nach Herstellerprotokoll mit einer Trennsäule mittlerer Größe (MS-Column). Die isolierten CD304<sup>+</sup> pDC wurden anschließend zentrifugiert und in 500 µl MACS-Puffer erneut über eine kleine Trennsäule (LS-Column) geführt. Der zweite Säulengang hatte eine erhebliche Verbesserung der Reinheit isolierter pDC zur Folge.

**2.7.1.16      Aktivierung und Kultur plasmazytoider DC**

10<sup>5</sup> isolierte CD304<sup>+</sup> pDC wurden in X-VIVO 15 aufgenommen und in 96-Well Flachboden kultiviert. Dem Medium wurde rekombinantes humanes IL-3 (10 ng/ml; R&D Systems) als Wachstumsfaktor zugegeben. Die funktionelle Aktivierung erfolgte mit dem Toll-like Rezeptor-9 Liganden CpG-B (1µM; ODN 2006). Nach 24-stündiger Inkubation wurden die pDC geerntet, gewaschen und für funktionelle Testungen eingesetzt.

**2.7.1.17      Differenzierung konventioneller DC aus Monozyten**

Konventionelle dendritische Zellen (kDC) wurden aus Monozyten differenziert. Hierfür wurden ca. 15x10<sup>6</sup> PBMC aus Buffy coats oder Leukapherisaten (frisch oder rekultiviert nach Stickstofflagerung) pro Well einer 6-Well Kulturplatte (Costar/Corning, Deutschland) in 2 ml RPMI + 1,5% hitzeinaktiviertes Plasma gegeben. Die Zellen wurden für 30 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit bildeten die Monozyten innerhalb der PBMC eine extrazelluläre Matrix aus, über die sie an die Kunststoffoberfläche der Kulturplatte adhärten. Aufgrund dieser Plastikadhärenz ließen sich Monozyten durch Waschen mit warmen 1xPBS von den restlichen nichtadhärenten Lymphozyten trennen. Zu den isolierten Monozyten wurden 3 ml/Well X-Vivo 15 mit 400 U/ml GM-CSF (Wachstumsfaktor) und 1000 U/ml IL-4 (verhindert die dominante Differenzierung zu Makrophagen) gegeben. Jeden zweiten Tag wurde 1 ml des Mediums aus den Wells

entnommen und durch frisches X-VIVO 15 mit 800 U/ml GM-CSF und 1000 U/ml IL-4 ersetzt. Nach 6 Tagen hatten die Zellen überwiegend den Phänotyp unreifer kDC.

#### **2.7.1.18 Terminale Differenzierung unreifer konventioneller DC**

Zur terminalen Differenzierung unreifer kDC wurden diese an Tag 6 geerntet und mit einem Cocktail pro-inflammatorischer Zytokine stimuliert. Ca.  $8 \times 10^5$  unreife kDC wurden hierfür pro Well einer neuen 6-Well Kulturplatte gegeben und in 3 ml X-VIVO 15 + 2% Plasma zusammen mit GM-CSF (400 U/ml), IL-1 $\beta$  (10 ng/ml), IL-4 (1000 U/ml), IL-6 (1000 U/ml), TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) und PGE2 (1  $\mu$ g/ml) kultiviert.

Nach 48 Stunden war die terminale Differenzierung erreicht. Die reifen kDC zeigten nun keine starke Adhärenz mehr und wiesen die typische Morphologie reifer DC auf. Waren unreife Kontroll-DC für das Experiment notwendig, wurde ein Teil der kDC in X-VIVO 15 + 1% Plasma zusammen mit GM-CSF und IL-4 weiterkultiviert.

#### **2.7.1.19 Generierung alloreaktiver T-Zelllinien**

Isolierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen, CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> oder naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden im Verhältnis 1:10 (DC:T-Zelle) mit unreifen oder terminal differenzierten kDC oder aktivierten pDC primärstimuliert. In einigen Experimenten wurden in der Primärstimulation blockierende monoklonale Antikörper gegen ICOS-L (10  $\mu$ g/ml) oder IL-10 (10  $\mu$ g/ml) eingesetzt oder rekombinantes humanes IL-10 (20 ng/ml) zugegeben. Den expandierenden alloreaktiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde ab Tag 7 50 IU/ml IL-2 zugegeben. An Tag 14 wurden die T-Zellen geerntet, gezählt und mit unreifen kDC, terminal differenzierten kDC oder aktivierten pDC des gleichen Spenders restimuliert. Die Kulturen wurden am Tag 3 nach Restimulation mit IL-2 versetzt und im wöchentlichen Rhythmus repetitiv restimuliert.

Zum Zeitpunkt der Restimulationen wurde die proliferative Kapazität der T-Zellen bestimmt, indem  $10^5$  T-Zellen pro Well einer 96Well-Flachbodenplatte mit terminal differenzierten kDC restimuliert wurden. Hierbei wurde die Zahl der verwendeten DC in einer Titrationsreihe reduziert.

#### **2.7.2 Durchflusszytometrische Untersuchungen**

Im Durchflusszytometer wird ein Strom einzelner Zellen durch einen Laserstrahl geleitet. Der von den Zellen reflektierte Laserstrahl wird durch Photodetektoren gemessen und ermöglicht die Definition der einzelnen Zelle über zwei Parameter: ihre

relative Größe und ihre Granulierung. Die relative Zellgröße wird über die Unterbrechung des Laserstrahls beim Passieren der Zelle vom so genannten Forward Scatter (FSC) ermittelt. Die Granulierung entspricht dem Streulicht des Lasers, das durch Brechen des Laserstrahls an intrazellulären Strukturen der Zelle entsteht und mit dem Side Scatter (SSC) gemessen wird.

Werden Zellen mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern markiert, können diese Fluorochrome durch den Laserstrahl zur Fluoreszenz angeregt werden. Hierbei werden Elektronen des Fluorochroms auf ein höheres Energieniveau gebracht. Kehren die Elektronen aus diesem instabilen Zustand höherer Energie zurück in den Grundzustand, wird die Energiedifferenz in Form von Photonen emittiert. Die Emission erfolgt hierbei in einer Wellenlänge, die spezifisch für jedes Fluorochrom ist. Die Emission wird in einem Photomultiplier auf ein messbares Lichtsignal verstärkt und kann anschließend mit Photodetektoren gemessen werden.

Die Verwendung unterschiedlicher Laser mit entsprechenden Anregungswellenlängen (blauer Argonlaser (488nm), roter Helium-Neonlaser (633nm), violetter Laser (405 nm), UV-Laser (355 nm)) und Detektionsfilter ermöglicht die Kombination verschiedener Fluorochrome.

Zur Ermittlung der Expressionsraten verschiedener Moleküle erfolgte eine fluoreszenzserologische Untersuchung der Zellen im Durchflusszytometer, bei der die hier werden die Fluoreszenzfarbstoffe mit einem Laserstrahl angeregt und das emittierte Licht gemessen wird. Im Durchflusszytometer wird der relative Anteil fluoreszierender Zellen in der Zellsuspension berechnet. Zudem wird als Maß der relativen Dichte (Expressionshöhe) der gefärbten Moleküle die mittlere Fluoreszenzintensität der Zellen angegeben. Alle Messungen der Durchflusszytometrie wurden am LSRII oder am FACS-Calibur (beide Becton-Dickinson, Mountain View, Ca, USA) durchgeführt und mit DIVA (BD Biosciences) bzw. CellQuestPro™ (V3.3 1994-1999) ausgewertet.

#### **2.7.2.1 Färbung von Oberflächenmolekülen zur Durchflusszytometrie**

Für durchflusszytometrischen Untersuchung der Expression von Oberflächenmolekülen, wurden pro Probe ca.  $1 \times 10^5$  Zellen in FACS-Puffer aufgenommen, in 96-Well Rundbodenplatten überführt und zentrifugiert.

Anschließend wurde das Zellsediment in der jeweiligen Lösung des Fluorochrom-markierten Antikörpers (Endkonzentration 5 µg/ml) resuspendiert und für 30 min bei 4°C inkubiert. Zum Entfernen überschüssiger, ungebundener Antikörper wurden die Zellen mit kaltem FACS-Puffer gewaschen und anschließend in 70-100 µl FACS-Puffer aufgenommen. Nach Überführung der Proben in Rundboden-Röhrchen, erfolgte die Messung im Durchflusszytometer.

Zur Einstellung der Laserverstärkung und Kompensation der Fluorochrome, wurden Kontrollfärbungen mitgeführt. Diese Kontrollfärbungen umfassten ungefärbte Zellen, isotypen-gefärbte Zellen und Einzelfärbungen der verwendeten Fluorochrome.

Bei indirekten Färbungen erfolgte zunächst die Markierung des Oberflächenmoleküls mit unkonjugierten monoklonalen Antikörpern. Nach Waschen der Zellen, inkubierten die Zellen mit einem Fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörper (5 µg/ml Endkonzentration). Der Sekundärantikörper erkennt spezifisch den Isotypen des Primärantikörpers und ermöglicht so die Detektion des Oberflächenmoleküls.

### **2.7.2.2 Durchflusszytometrische Analyse intrazellulärer Proteine**

Die Analyse intrazellulär exprimierter Proteine (beispielsweise Zytokine oder Transkriptionsfaktoren) erforderte die Permeabilisierung der zu untersuchenden Zellen. Zur intrazellulären Detektion von Zytokinen in T-Zellen wurden diese zunächst mit 2,4 µg/ml Phytohaemagglutinin (PHA) und 1 ng/ml Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) für fünf Stunden stimuliert. PHA führt zur Quervernetzung des T-Zellrezeptors und generiert so ein starkes T-Zellrezeptorsignal, während PMA als Calciumionophor zu einem starken Calcium-Influx führt und die Zelle maximal aktiviert. Die Zellstimulation erfolgte in Gegenwart von Monsenin, das den intrazellulären Transport von Proteinen blockiert und so zu einer Akkumulation der Zytokine im Zytosol führt. Die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt (Cytofix/Cytoperm™ Kit, BD Biosciences).

Die intrazelluläre Expression des Transkriptionsfaktor Foxp3 erforderte zusätzlich zur Permeabilisierung der Zellmembran auch eine Permeabilisierung der Kernmembran. Hierfür wurde nach Herstellerprotokoll vorgegangen (Transcriptionfactor Staining Buffer Set, eBioscience).

Anschließend erfolgte die Färbung der Proteine mit Fluorochrom-markierten monoklonalen Antikörpern und die Detektion im Durchflusszytometer.

### **2.7.2.3 Analyse der IL-10-Rezeptor-Expression**

Die Expression von Zytokinrezeptoren auf Zellen ist sehr schwach und umfasst meistens nur wenige Tausend Rezeptoren. Daher beinhalten die Färbungen einen Amplifikationsschritt, der die durchgeführte Färbung verstärkt und die Detektion eines deutlicheren Signals ermöglicht.

Die IL-10 Rezeptor-Expression wurde mit Hilfe von rekombinantem IL-10 dargestellt, das mit Biotin konjugiert war. In einem zweiten Schritt, dem Amplifikationsschritt, werden die markierten Zellen mit FITC-konjugiertem Streptavidin konjugiert. Die Durchführung der IL-10-Rezeptor Färbung erfolgte nach Herstellerprotokoll (Fluorokine, R&D Systems).

### **2.7.2.4 Analyse von T-Zellproliferation mittels Durchflusszytometrie**

Zur Darstellung der Proliferation von Zellen im Durchflusszytometer wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit dem Vitalfarbstoff eFluor®670 markiert. Die zu markierenden Zellen wurden zunächst in warmen 1xPBS in einem 15 ml Röhrchen gewaschen. Nach Zentrifugation der Zellen bei Raumtemperatur für 6 min bei 300 x g wurden die Zellen in 1 ml warmen PBS resuspendiert. Zur Färbung wurde 1ml 2µM eFluor®670 (in PBS) hinzugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Zum Abbrechen der Färbereaktion wurde das Röhrchen mit warmen X-VIVO 15 + 10% HSA aufgefüllt und bei Raumtemperatur für 6 min bei 300 x g zentrifugiert. Die Zellen wurden daraufhin in warmen X-VIVO 15 aufgenommen. Die Zellen ruhten nach der Färbung 30 min im Brutschrank und wurden dann in den Experimenten eingesetzt.

### **2.7.3 Quantifizierung von IFN- $\alpha$ in Kulturüberständen dendritischer Zellen**

Der quantitative Nachweis von IFN- $\alpha$  in Kulturüberständen von pDC oder kDC erfolgte mittels ELISA („enzyme linked immunosorbent assay“). Der ELISA wurde nach der indirekten Methode (sogenanntes „Sandwich-Prinzip“) durchgeführt. Hierbei ist ein monoklonaler anti-IFN- $\alpha$  Antikörper (Primärantikörper) an den Boden einer 96-Well Flachbodenplatte gebunden. Während der Inkubation von Kulturüberständen bindet IFN- $\alpha$  an den Primärantikörper. In einem weiteren Schritt wird ein zweiter IFN- $\alpha$ -spezifischer monoklonaler Antikörper (Sekundärantikörper) hinzugegeben, der ein zweites IFN- $\alpha$ -Epitop bindet. Der Sekundärantikörper ist mit Meerrettichperoxidase konjugiert, die nach Substrat-Zugabe eine enzymatisch katalysierte Farbreaktion auslöst. Die Veränderungen der optischen Dichte wurde

photometrisch bestimmt und kann durch eine Eichgerade mit der IFN- $\alpha$ -Konzentration korreliert werden. Bei der Durchführung wurde nach Herstellerprotokoll (human IFN- $\alpha$  ELISA, Diaclone) verfahren.

### 3 Ergebnisse

Die Initiierung von Immunantworten und die Aufrechterhaltung peripherer Toleranz sind zwei Aufgaben dendritischer Zellen (DC), die ihre Rolle als zentrale Schlüsselfigur im Immunsystem verdeutlichen <sup>[32;52]</sup>. Im Fokus dieser Arbeit stand zunächst die DC-vermittelte Immunantwort im tolerogenen Milieu. Das Durchbrechen bestehender Toleranz ist vor allem in Hinblick auf Therapieansätze gegen Krebserkrankungen wichtig. So konnten Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, dass die Progression von Melanomerkrankungen mit einem Anstieg regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut einhergeht. Es manifestiert sich so eine tolerogene Umgebung in der gegen den Tumor gerichtete Immunantworten nur schwer generiert werden können. Die suppressive Situation in Patienten später Krankheitsstadien wird beispielsweise durch den Zuwachs regulatorischer T-Zellen und die damit korrelierende Senkung von T-Zellreaktivitäten gegen sogenannte „Recall“-Antigene<sup>12</sup> wie Tetanustoxoid erkennbar <sup>[53]</sup>. Aus diesem Grund sollten unterschiedliche DC-Subpopulationen des peripheren Blutes auf ihr immunstimulatorisches Potential in Gegenwart regulatorischer T-Zellen hin untersucht und miteinander verglichen werden. Im zweiten Teil der Arbeit wird dann auf das Potential von DC eingegangen, aktiv Toleranz in der Peripherie zu vermitteln.

---

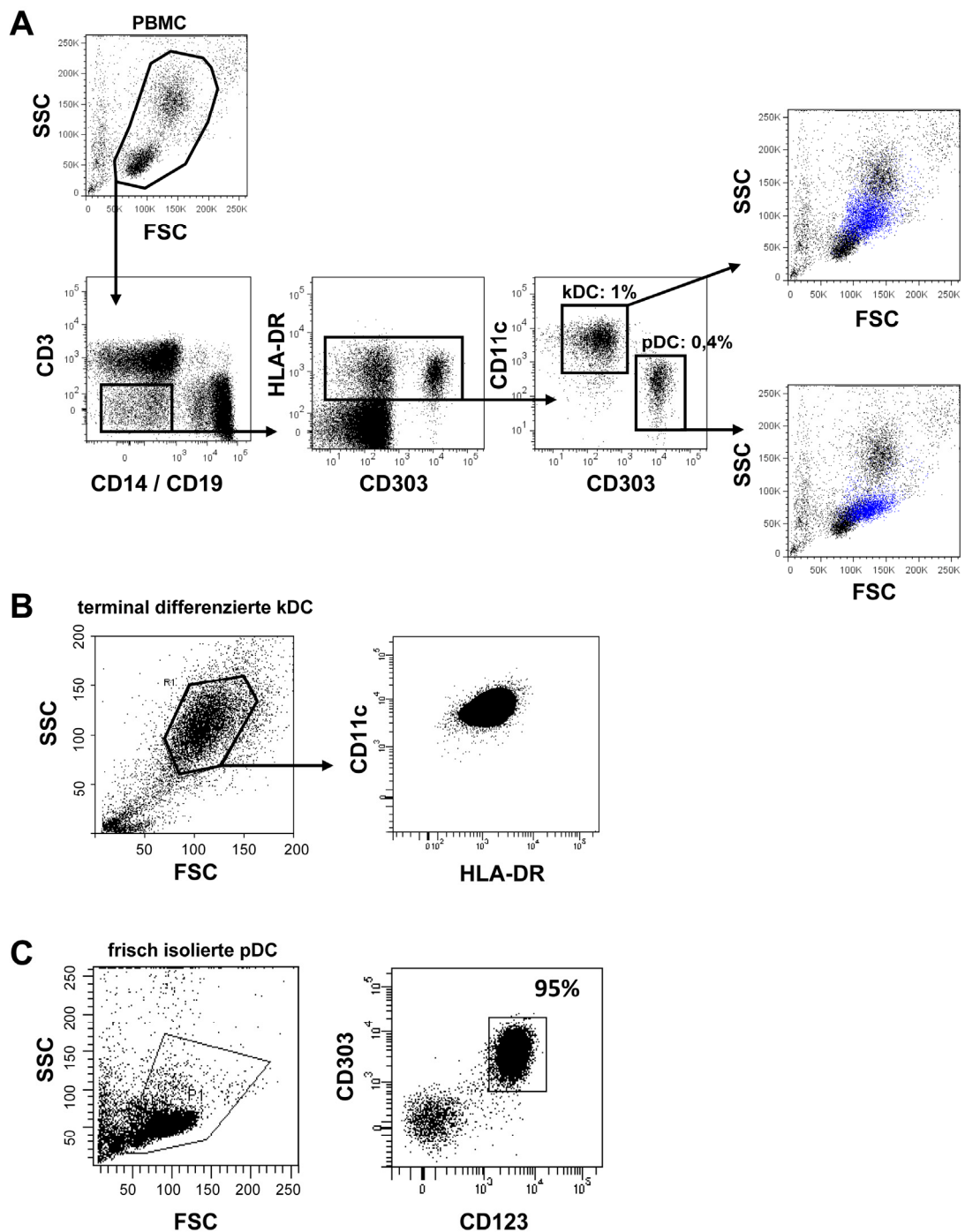
<sup>12</sup> Die T-Zellreaktivität auf sogenannte „Recall“-Antigene beruht auf der Tatsache, dass das betroffene Individuum bereits gegen dieses Antigen sensibilisiert wurde. Dies kann (wie im Fall von Tetanustoxid) beispielsweise im Rahmen einer Impfung geschehen sein.

### 3.1 Durchflusszytometrische Charakterisierung dendritischer Zellen des peripheren Blutes

---

Im humanen peripheren Blut können zwei DC-Subpopulationen voneinander unterschieden werden: konventionelle DC (kDC) und plasmazytoide DC (pDC). Beide Subpopulationen lassen sich über die differentielle Expression spezifischer Oberflächenmarker durchflusszytometrisch charakterisieren<sup>[37]</sup>. In Abbildung 3.1 sind periphere mononukleäre Zellen des Blutes (PBMC) dargestellt. Durch die Exklusion Zelllinien-spezifischer Oberflächenmoleküle (in diesem Fall CD3 für T-Zellen, CD14 für Monozyten und CD19 für B-Zellen) und Zuhilfenahme DC-spezifischer Marker, ließen sich die DC-Populationen des peripheren Blutes darstellen. Zur Identifizierung von pDC wurde die Abwesenheit von CD11c zusammen mit der Expression von CD303 gewählt. Zudem ließen sich pDC durch die hohe Expression der alpha-Kette des IL-3-Rezeptors (CD123) und des spezifischen Oberflächenmoleküls CD304 identifizieren (Abbildung 3.1). Wie gezeigt, sind kDC CD11c-positiv und exprimieren, wie auch pDC, das MHC-Klasse II-Molekül HLA-DR auf ihrer Oberfläche. Innerhalb der PBMC bilden kDC und pDC jeweils nur einen geringen prozentualen Anteil: kDC machen ca. 1-2% der PBMC aus, die pDC bilden mit ca. 0,2-1% die kleinste DC-Population. In der vorliegenden Arbeit wurden terminal differenzierte, von Monozyten abgeleitete DC als Goldstandard konventioneller DC verwendet (im Weiteren als kDC bezeichnet).

Wie aus Abbildung 3.1B ersichtlich wird, zeigen kDC eine homogene Expression der Oberflächenmoleküle CD11c und HLA-DR. Für vergleichende Analysen von pDC und kDC wurden pDC mit Hilfe der MACS®-Technologie über das von ihnen spezifisch exprimierte Oberflächenmolekül CD304 aus PMBC isoliert. Diese Methode der Anreicherung führte routinemäßig zu Reinheiten von >95% (Abbildung 3.1C) CD303- und CD123-positiver pDC.



### Abbildung 3.1: Vergleichende Phänotypisierung von DC-Subpopulationen

(A) Frisch isolierte PBMC wurden mit Fluorochrom-konjugierten mAk gefärbt. Innerhalb CD3/CD14/CD19-negativer, HLA-DR-positiver Zellen wurden kDC als CD11c-positive Zellen, pDC als CD11c-negative, CD303-positive Zellen dargestellt.

(B) Dargestellt ist die durchflusszytometrische Analyse von Monozyten abgeleiteter kDC nach Färbung mit Fluorochrom-konjugierten mAk.

(C) Ruhende pDC wurden mit CD304-Microbeads magnetisch isoliert und zur Überprüfung der Reinheit mit anti-CD303 und anti-CD123 mAk gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

### 3.2 Aktivierte plasmazytoide DC sind konventionellen DC im T-Zell-stimulatorischen Potential unterlegen

---

Beide in dieser Arbeit verwendeten DC-Populationen sollten zunächst in ihren funktionellen Eigenschaften verglichen und charakterisiert werden. Hierzu gehörte der Vergleich des T-Zell-stimulatorischen Potentials beider DC-Typen.

Konventionelle und plasmazytoide DC bedürfen unterschiedlicher Stimulationsbedingungen für eine optimale Aktivierung. Der Grund hierfür ist unter anderem das Profil exprimierter Toll-like Rezeptoren (TLR). Die Gruppe der TLR gehört zu den sogenannten „pattern recognition receptors“, Rezeptoren die konservierte Muster in pathogenen Organismen erkennen und binden <sup>[2]</sup>. Mit der Expression bestimmter TLR geht die funktionelle Spezialisierung auf bestimmte Pathogene einher. Die pDC und kDC bilden so zwei Lager innerhalb der angeborenen Immunität: pDC exprimieren die intrazellulären TLR-7 und TLR-9, die virale Produkte, beziehungsweise RNA/DNA/Immunkomplexe erkennen, was die Gruppe der pDC zu effektiven Mediatoren anti-viraler Immunantworten macht. Ihre Effizienz wird weiter ausgebaut durch die Fähigkeit nach Aktivierung große Mengen von Typ-I Interferonen zu produzieren <sup>[54]</sup>.

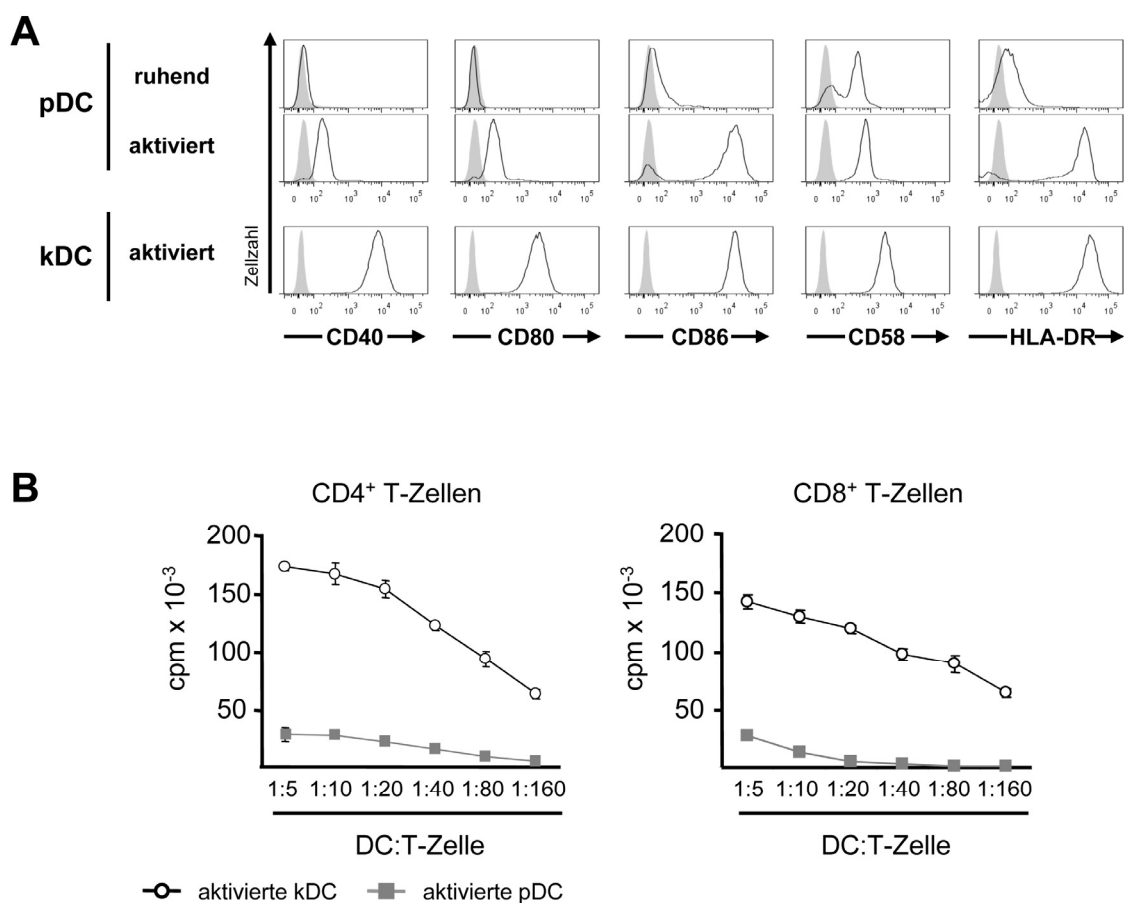
Die maximale Aktivierung frisch isolierter ruhender pDC erfolgte in dieser Arbeit durch Zugabe des TLR-9-Liganden CpG-B<sup>13</sup> zusammen mit rekombinantem humanen IL-3. Die optimale Aktivierung von kDC wurde durch Zugabe eines Cocktails der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  zusammen mit dem Prostaglandin E2 erreicht. Aus der Abbildung 3.2A wird ersichtlich, dass ruhende pDC alle betrachteten kostimulatorischen Moleküle lediglich schwach exprimieren. Eine Ausnahme bildete CD58: ruhende pDC lassen sich über dessen Expression in zwei Untergruppen gliedern, wie es bereits von Schwab et al. beschrieben wurde <sup>[55]</sup>.

Die Stimulation führte in beiden DC-Gruppen zu einer Hochregulation der analysierten kostimulatorischen Moleküle CD40, CD58, CD80 und CD86. Vergleicht man die Expressionshöhe der Moleküle auf aktivierten kDC und pDC, so wurde ein deutlicher qualitativer Unterscheid in der Stärke der Kostimulation ersichtlich.

---

<sup>13</sup> Unmethylierte Cytosin-Phosphatidyl-Guanin Dinukleotide in mikrobieller DNA werden vom Immunsystem über den TLR-9 als pathogener Bestandteil erkannt.

Aktivierte kDC weisen einen höheren Expressionsgrad aller betrachteten kostimulatorischen Molekülen auf. Es ließ sich somit vermuten, dass aktivierte pDC hinsichtlich ihrer T-Zell-stimulatorischen Kapazität aktivierten kDC unterlegen sind. Zur Überprüfung dieser These wurden aktivierte pDC und kDC als Stimulatoren allogener  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen eingesetzt, um nach drei Tagen die resultierende T-Zellproliferation zu analysieren. Abbildung 3.2B zeigt, dass aktivierte pDC tatsächlich ein geringeres Potential zur Induktion von T-Zellproliferation besitzen als aktivierte kDC. Verglichen mit aktivierten kDC, ist die generelle Kapazität zur T-Zellstimulation aktivierter pDC somit wesentlich geringer.



**Abbildung 3.2: T-Zell-stimulatorisches Potential aktivierter plasmazytoider und konventioneller DC**

(A) Isolierte pDC wurden entweder ruhend oder nach CpG-Stimulation mit Fluorochrom-konjugierten mAk gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Als Vergleich dienten terminal differenzierte kDC. (B)  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen wurden mit allogenen aktivierten pDC und kDC in den angegebenen Verhältnissen stimuliert. An Tag 3 der Kultur wurde jeweils 37 kBq  $^3H$ -Thymidin zugegeben. Nach weiteren 16 Stunden erfolgte die Bestimmung der Proliferation im  $\beta$ -Szintillationszähler.

---

### 3.3 Funktionelle Testung isolierter CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen

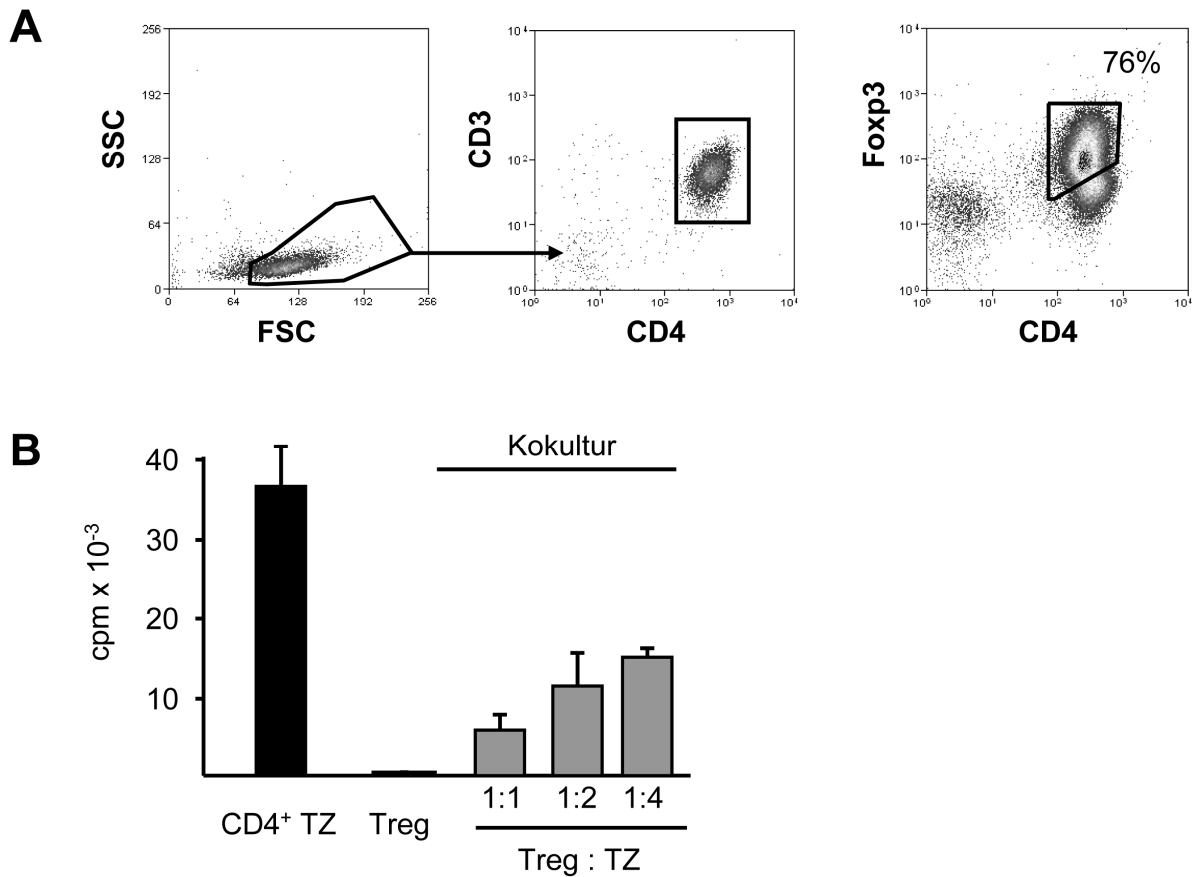
---

Natürlich vorkommende CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen (Treg) bilden eine kleine Subpopulation innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellen und machen einen Gesamtanteil von ca. 1-2% innerhalb der PBMC gesunder Spender aus <sup>[13]</sup>. Ihnen kommt eine wichtige Rolle in der Homöostase des Immunsystems zu, so führt ihr Fehlen zur Entstehung gravierender autoimmuner Erkrankungen <sup>[18]</sup>.

Im Gegensatz zu konventionellen CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen exprimieren Treg konstitutiv die  $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25). In T-Helferzellen wird die CD25-Expression erst nach Aktivierung induziert, so dass in gesunden Spendern Treg über die Expression von CD25 isoliert werden können <sup>[22]</sup>. Hierbei wurden limitierende Mengen von anti-CD25 Microbeads verwendet und schließlich kontaminierende CD8<sup>+</sup> T-Zellen, CD14<sup>+</sup> Monozyten und CD19<sup>+</sup> B-Zellen depletiert. Aus Abbildung 3.3A wird ersichtlich, dass diese Methode die Isolation von CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Treg mit hoher Reinheit ermöglicht <sup>[22]</sup>.

Die Funktion von Treg wurde im Suppressionstest analysiert. Hierbei wurden Einzel- und Kokulturen von T-Zellen und Treg polyklonal aktiviert und anschließend die Proliferation in diesen Kulturen gemessen. Erst Stimulation und Kostimulation aktivieren die suppressorische Treg-Funktion, die dann in Antigen-unspezifischer Weise erfolgt <sup>[56]</sup>. Abbildung 3.3B zeigt, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach polyklonaler Stimulation mit anti-CD3 mAk und bestrahlten PBMC als Kostimulatoren effektiv zur Proliferation gebracht wurden, während Treg gemäß ihres anergischen Phänotyps unter diesen Bedingungen nicht proliferieren. In Kokultur mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde die suppressorische Funktion der Treg deutlich: in Zellkontakt-abhängiger Weise inhibieren sie die Proliferation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Der so durchgeführte Suppressionstest diente in allen folgenden Experimenten als Validierung der Funktionalität eingesetzter Treg.

Zur Bewertung der T-Zell-stimulatorischen Eigenschaften von DC-Subpopulationen im tolerogenen Umfeld, wurden aktivierte pDC und kDC in Suppressionstests als Stimulatoren eingesetzt.



**Abbildung 3.3: Phänotyp und Funktion humaner CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen**

(A) Isolierte Treg wurden mit den mAk anti-CD3, anti-CD4 und anti-Foxp3 (Klon PCH101) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. (B) 10<sup>5</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden im angegebenen Verhältnis mit isolierten Treg oder allein mit 0,5 µg/ml anti-CD3 mAk und 3x10<sup>5</sup> bestrahlten (90Gy) PBMC stimuliert. Nach drei Tagen wurde der Kultur für 16 Stunden <sup>3</sup>H-Thymidin zugegeben, um dann die Proliferation im β-Szintillationszähler zu bestimmen.

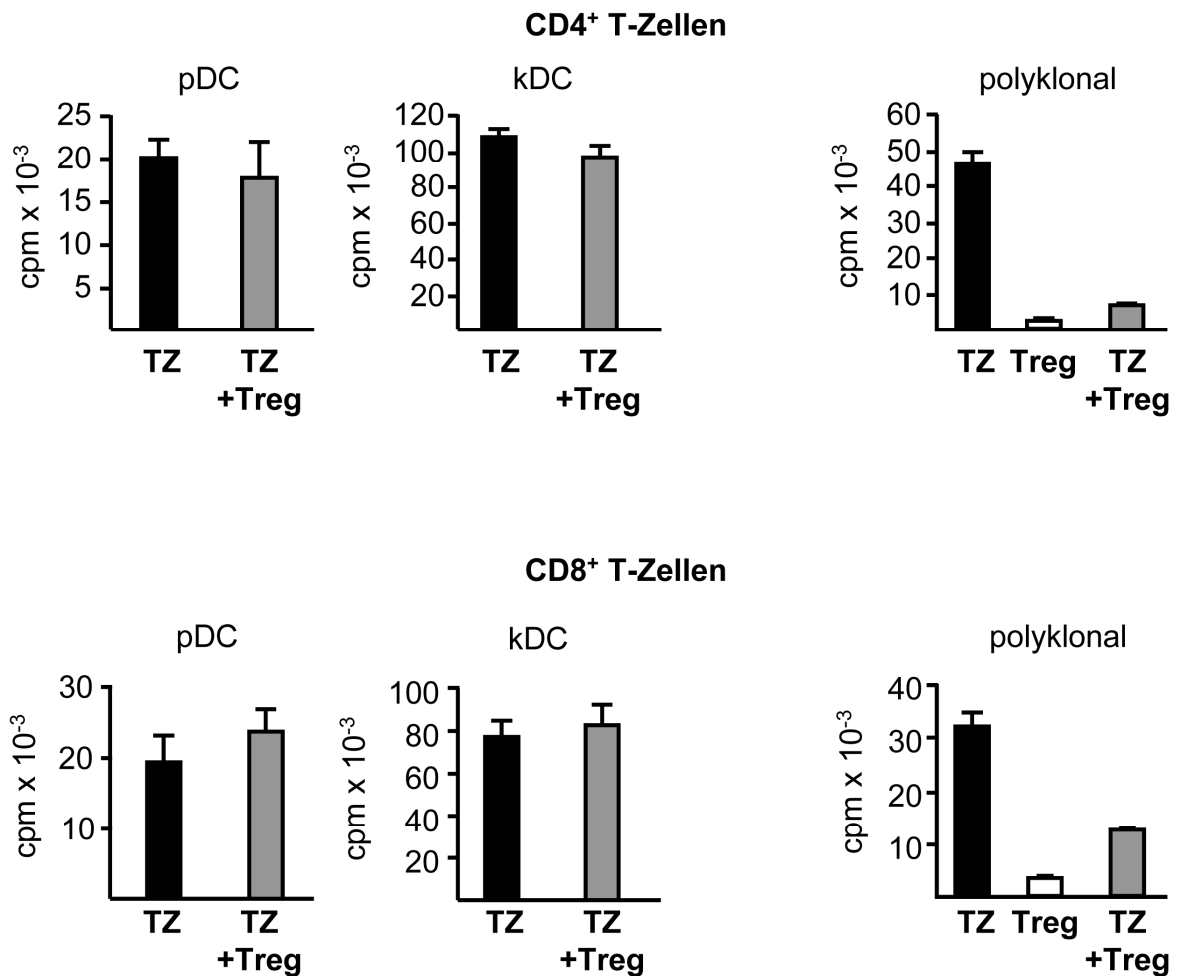
### 3.4 Abwesenheit von Treg-vermittelter Inhibition nach Stimulation mit dendritischen Zellen

---

Wie bereits von Tarbell et al. beschrieben, sind kDC nach terminaler Differenzierung in der Lage eine Treg-vermittelte Suppression zu durchbrechen und so T-Zellen in Anwesenheit von Treg zur Proliferation zu bringen. Ob ebenfalls pDC befähigt sind die Treg-vermittelte Suppression zu durchbrechen, sollte im Folgenden untersucht werden. Für vergleichende Analysen mit kDC wurden pDC aus PBMC gesunder Spender isoliert, mit CpG aktiviert und als Stimulatoren von CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen in An- oder Abwesenheit von Treg eingesetzt. Am Tag vier dieser Kulturen wurde die T-Zellproliferation bestimmt. Entsprechend publizierter Daten <sup>[57-59]</sup>, zeigt Abbildung 3.4 dass terminal differenzierte kDC durch ihre hohe T-Zell-stimulatorische Kapazität in der Lage waren, Treg-vermittelte Suppression zu überkommen. Sie induzierten auch dann die Proliferation von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, wenn Treg kokultiviert wurden.

Aktiviert pDC besitzen selbst nach optimaler Aktivierung, verglichen mit aktivierten kDC, nur ein geringes Potential zur Induktion von T-Zellproliferation (siehe Abbildung 3.2B). Umso überraschender war die Beobachtung, dass auch pDC-stimulierte Kokulturen von T-Zellen und Treg eine deutliche Proliferation zeigten (Abbildung 3.4). Hierbei war es egal, ob CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Kokultur mit Treg stimuliert wurden, aktivierte pDC waren in der Lage beide T-Zellpopulation in Gegenwart von Treg zur Proliferation zu bringen.

Die Funktionalität der eingesetzten Treg wurde in einem polyklonal stimulierten Suppressionstest validiert. Der <sup>3</sup>H-Thymidin-Proliferationstest bestimmt die Gesamtproliferation im Reaktionsgefäß, es konnte daher nicht unterschieden werden, ob ausschließlich CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen proliferierten oder ob zusätzlich auch der anergische Zustand der Treg durch Stimulation mit aktivierten kDC oder pDC gebrochen wurde.



**Abbildung 3.4: Keine Suppressoraktivität in DC-stimulierten T-Zellkulturen**

$5 \times 10^4$  CD4<sup>+</sup> (oben) oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen (unten) wurden allein oder in Kokultur mit  $5 \times 10^4$  Treg, mit aktivierten pDC oder kDC stimuliert (Verhältnis T-Zellen zu DC 5:1). Polyklonale Stimulation (rechts) mit 0,5 µg/ml anti-CD3 mAk und  $1,5 \times 10^5$  bestrahlten PBMC (90 Gy) diente als Kontrolle. An Tag drei wurden 37 kBq/well <sup>3</sup>H-Thymidin zugegeben und nach 16 Stunden die T-Zellproliferation im β-Szintillationszähler ermittelt.

---

### 3.5 Plasmazytoide dendritische Zellen durchbrechen nicht die Anergie regulatorischer T-Zellen

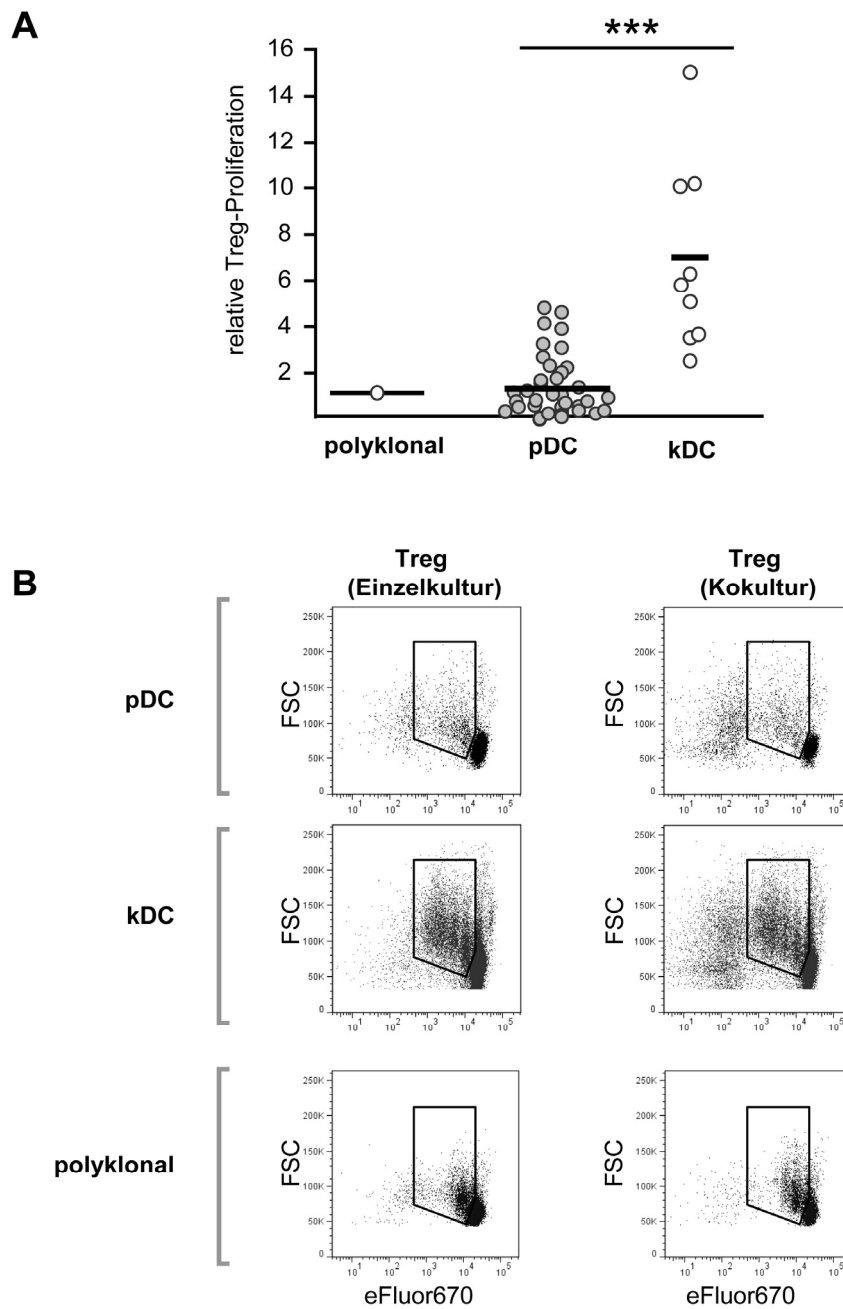
---

Eine grundlegende Eigenschaft von Treg ist ihr anergischer Zustand, das heißt sie proliferieren nach Stimulation nicht. Unter bestimmten Bedingungen, beispielsweise durch Stimulation mit terminal differenzierten kDC, kann dieser anergische Zustand jedoch wieder aufgehoben werden <sup>[57-59]</sup>. Inwieweit auch pDC in der Lage sind Treg-Anergie zu durchbrechen, sollte durch die Stimulation von Treg-Einzelkulturen mit aktivierten pDC untersucht werden. Aus Abbildung 3.5A wird ersichtlich, dass aktivierte kDC in der Lage sind Treg effizient zur Proliferation zu bringen. Im Gegensatz dazu zeigte die Stimulation mit aktivierten pDC, dass diese DC-Population die Anergie von Treg nicht durchbrechen kann (Abbildung 3.5A).

An dieser Stelle konnte weiterhin keine Aussage über die Proliferation von Treg in DC-stimulierten Kokulturen mit T-Effektorzellen<sup>14</sup> gemacht werden. Aus diesem Grund wurden Treg mit dem Farbstoff eFluor®670 gefärbt und zusammen mit CD4<sup>+</sup> T-Effektorzellen durch kDC oder pDC stimuliert. Der Farbstoff eFluor®670 bindet im Zytosol der Zelle und wird bei einer Zellteilung zu jeweils 50% auf die Tochterzellen übertragen. Die Verdünnung des Farbstoffes korreliert hierbei direkt mit der erfolgten Zellproliferation. Auf diese Weise konnte eine Treg-Proliferation durchflusszytometrisch analysiert und von T-Effektorzellproliferation unterschieden werden. Die Durchflusszytometrie an Tag vier nach Stimulation (Abbildung 3.5B) zeigte, dass aktivierte kDC Treg sowohl in Einzel- als auch in Kokultur mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen effektiv zur Proliferation bringen. Demgegenüber bleiben Treg, die mit aktivierten pDC stimuliert werden, nicht nur in der Einzel-, sondern auch in Kokultur mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen anergisch. Ebenso verhält es sich mit polyklonal stimulierten Treg, die auch in Anwesenheit proliferierender T-Zellen anergisch sind.

---

<sup>14</sup> Unter T-Effektorzellen versteht man T-Zellen, die bereits T-Zellrezeptor-vermittelten Antigenkontakt hatten. T-Effektorzellen weisen daher einen höheren Differenzierungsgrad auf als beispielsweise naive T-Zellen, die bisher noch keine Antigenkontakt aufgenommen haben.

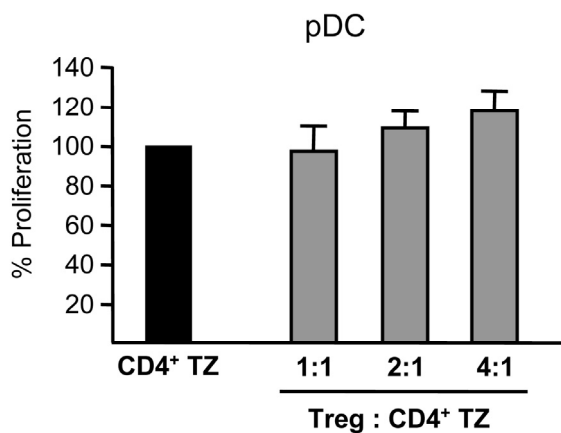


**Abbildung 3.5: Analyse der Treg-Proliferation nach Stimulation mit aktivierten DC-Populationen**  
 (A)  $5 \times 10^4$  Treg wurden polyklonal ( $0,5 \mu\text{g/ml}$  anti-CD3 und  $15 \times 10^4$  bestrahlte ( $90 \text{ Gy}$ ) PBMC) oder mit allogenen kDC oder pDC stimuliert (Verhältnis T-Zelle zu DC: 5:1). Nach drei Tagen wurde die Proliferation mittels Einbau von  $^3\text{H}$ -Thymidin ( $37 \text{ kBq/Well}$ ) im  $\beta$ -Szintillationszähler gemessen. Die Treg-Proliferation nach pDC- oder kDC-Stimulation wurde auf die polyklonalen Stimulation normiert, die als 1 definiert wurde.

(B)  $2 \times 10^4$  allogene aktivierte kDC oder pDC dienten als Stimulus für  $10^5$  eFluor®670-gefärbte Treg. Die Proliferation wurde an Tag 4 anhand der eFluor®670-Verdünnung im Durchflusszytometer analysiert. Ein polyklonaler Stimulus ( $0,5 \mu\text{g/ml}$  anti-CD3 und bestrahlte ( $90 \text{ Gy}$ ) T-Zell-depletierte PBMC) diente als Kontrolle.

### 3.6 Die Erhöhung der Frequenz regulatorischer T-Zellen führte nicht zur Wiederherstellung der Suppression in pDC-stimulierten Kokulturen

In dem verwendeten System zur Testung der Treg-Funktion, ist die detektierbare Suppression abhängig von dem Verhältnis aktivierter T-Effektorzellen zu aktivierten Treg. Eine erhöhte Treg-Zahl in der Kokultur mit  $CD4^+$  T-Zellen steigerte hierbei das suppressorische Potential (siehe Abbildung 3.3B), erkennbar an der verringerten T-Zellproliferation in Gegenwart hoher Treg-Frequenzen. Um auszuschließen, dass eine zu geringe Anzahl aktivierter Treg das Messen der Suppression verhinderte, wurde die Treg-Frequenz in pDC-stimulierten Kokulturen erhöht. In Abbildung 3.6 ist eine Zusammenfassung dreier unabhängig durchgeführter Experimente dargestellt. Erkennbar ist, dass auch eine erhöhte Treg-Zahl die Suppression in pDC-stimulierten Kokulturen nicht wiederherstellen konnte.



**Abbildung 3.6: Erhöhung von Treg-Zahlen in pDC-stimulierten Kokulturen**

$5 \times 10^4$  isolierte  $CD4^+$  T-Zellen wurden allein oder mit Treg in den angegebenen Verhältnissen kultiviert und mit  $1 \times 10^4$  aktivierten allogenen pDC stimuliert. Die Proliferation wurde an Tag 3 mittels  $^3H$ -Thymidin-Inkorporation im  $\beta$ -Szintillationszähler gemessen. Die Proliferation der Kokultur aus drei unabhängigen Experimenten wurde jeweils auf die Proliferation von  $CD4^+$  T-Zellen normiert und gemittelt. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert mit Standardabweichung.

### 3.7 Die Blockade pro-inflammatorischer Zytokine in pDC-stimulierten Kokulturen führte nicht zur Induktion Treg-vermittelter Suppression

Konventionellen DC wurden bereits durch Arbeiten von Medzhitov et al. die Fähigkeit zugeschrieben, nach Stimulation mit LPS<sup>15</sup> die suppressive Kapazität von Treg durch die Produktion löslicher Mediatoren zu überkommen. Sie zeigten, dass DC nach LPS-Stimulation das pro-inflammatorische Zytokin IL-6 bilden, welches in der Kokultur mit Treg und T-Effektorzellen die Suppression überkommt und T-Effektorzellen zur Proliferation bringt<sup>[60]</sup>. Auch Zytokinen wie Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  und Interferon (IFN)- $\alpha$  wurden immunmodulierende Eigenschaften zugewiesen<sup>[61-63]</sup>. Da diese auch von pDC produziert werden<sup>[44]</sup>, sollte ihr Einfluss auf die Treg-Effektorfunktion in pDC-stimulierten Kokulturen untersucht werden.

Das Typ-I Interferon IFN- $\alpha$  ist eines der wesentlichen Effektorzytokine von pDC. Werden ruhende pDC mit dem TLR-9 Liganden CpG stimuliert, kommt es, neben der Hochregulation kostimulatorischer Moleküle, auch zu einer schnellen Produktion von IFN- $\alpha$ <sup>[47]</sup>. Wie in der Abbildung 3.7A dargestellt, waren nur aktivierte pDC in der Lage IFN- $\alpha$  zu produzieren. Konventionelle DC exprimieren keinen TLR-9 und waren daher insensitiv gegenüber der Stimulation mit CpG (nicht gezeigt), jedoch auch die terminale Differenzierung durch den Cocktail pro-inflammatorischer Zytokine befähigte kDC nicht zur IFN- $\alpha$ -Produktion.

Zur Untersuchung der Fragestellung, inwieweit die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine an pDC-induzierter T-Zellproliferation in Gegenwart von Treg beteiligt war, wurden neutralisierende Antikörper gegen die Zytokine Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  und IFN- $\alpha$  in pDC-stimulierten Kokulturen eingesetzt.

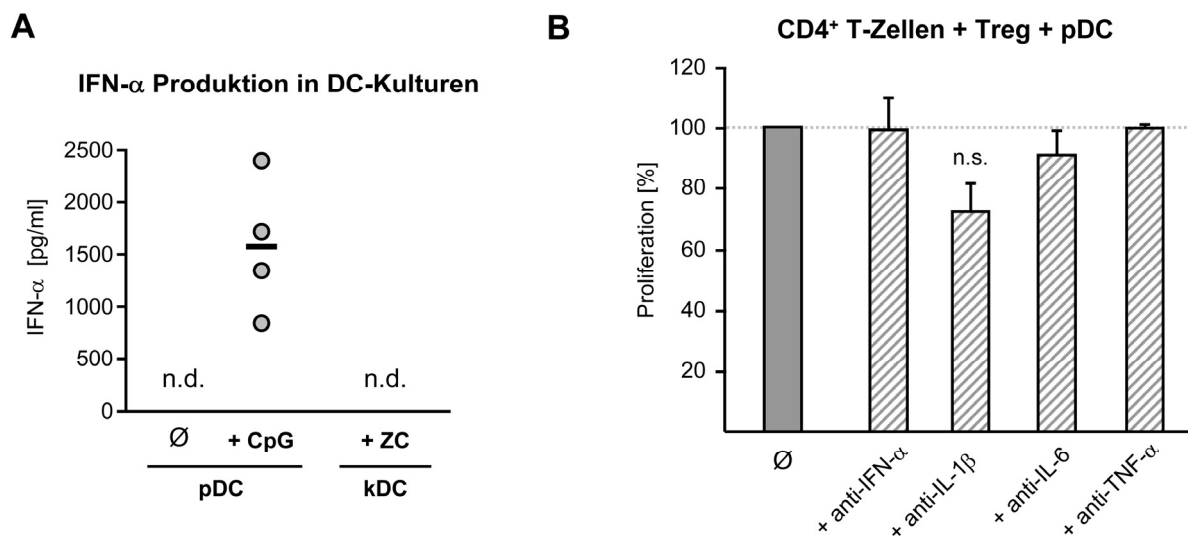
Abbildung 3.7B zeigt, dass die Neutralisation des produzierten IFN- $\alpha$  in pDC-stimulierten Kokulturen keine Wiederherstellung der Treg-vermittelten Suppression bewirkte. Ebenso wenig konnte die Zugabe blockierender Antikörper gegen IL-6 oder TNF- $\alpha$  die Inhibition der CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation rekonstituieren. Ein minimaler Effekt konnte nach Blockade von IL-1 $\beta$  beobachtet werden. Hierbei kam es

---

<sup>15</sup> Lipopolysaccharid: Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien, der von TLR-4 auf dendritischen Zellen erkannt wird und so zur Aktivierung der dendritischen Zelle führt.

zu einer partiellen Wiederherstellung suppressorischer Wirkung von Treg in der Kultur, die jedoch nicht signifikant war.

Die Zugabe der verwendeten Antikörper zu pDC-stimulierten Einzelkulturen von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und Treg schloss einen direkten Einfluss auf die T-Zellproliferation aus (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.7: Blockade pro-inflammatorischer Zytokine in pDC-stimulierten Kokulturen**

(A)  $10^5$  pDC wurden für 12 Stunden mit 1  $\mu$ M CpG stimuliert oder unbehandelt belassen. Die Überstände beider Kulturen wurden dann im ELISA getestet. Kulturüberstände terminal differenzierter kDC dienen als Kontrolle. (ZC: Zytokincocktail; n.d.: nicht detektierbar)

(B)  $10^4$  aktivierte pDC wurden zur Stimulation von  $5 \times 10^4$  allogeen CD4<sup>+</sup> T-Zellen in An- oder Abwesenheit gleicher Treg-Zahlen verwendet. Den Kulturen wurden neutralisierende Antikörper gegen IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  oder IFN- $\alpha$  (jeweils 10  $\mu$ g/ml) zugesetzt. Nach drei Tagen wurde den Kulturen 37 kBq/Well <sup>3</sup>H-Thymidin für 16 Stunden zugegeben, dann folgte die Ermittlung der Proliferation im  $\beta$ -Szintillationszähler. Die Proliferation in der Kokultur dreier unabhängiger Experimente wurde jeweils auf die Proliferation in Einzelkulturen von CD4<sup>+</sup> T-Zellen normiert und gemittelt. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert mit Standardabweichung.

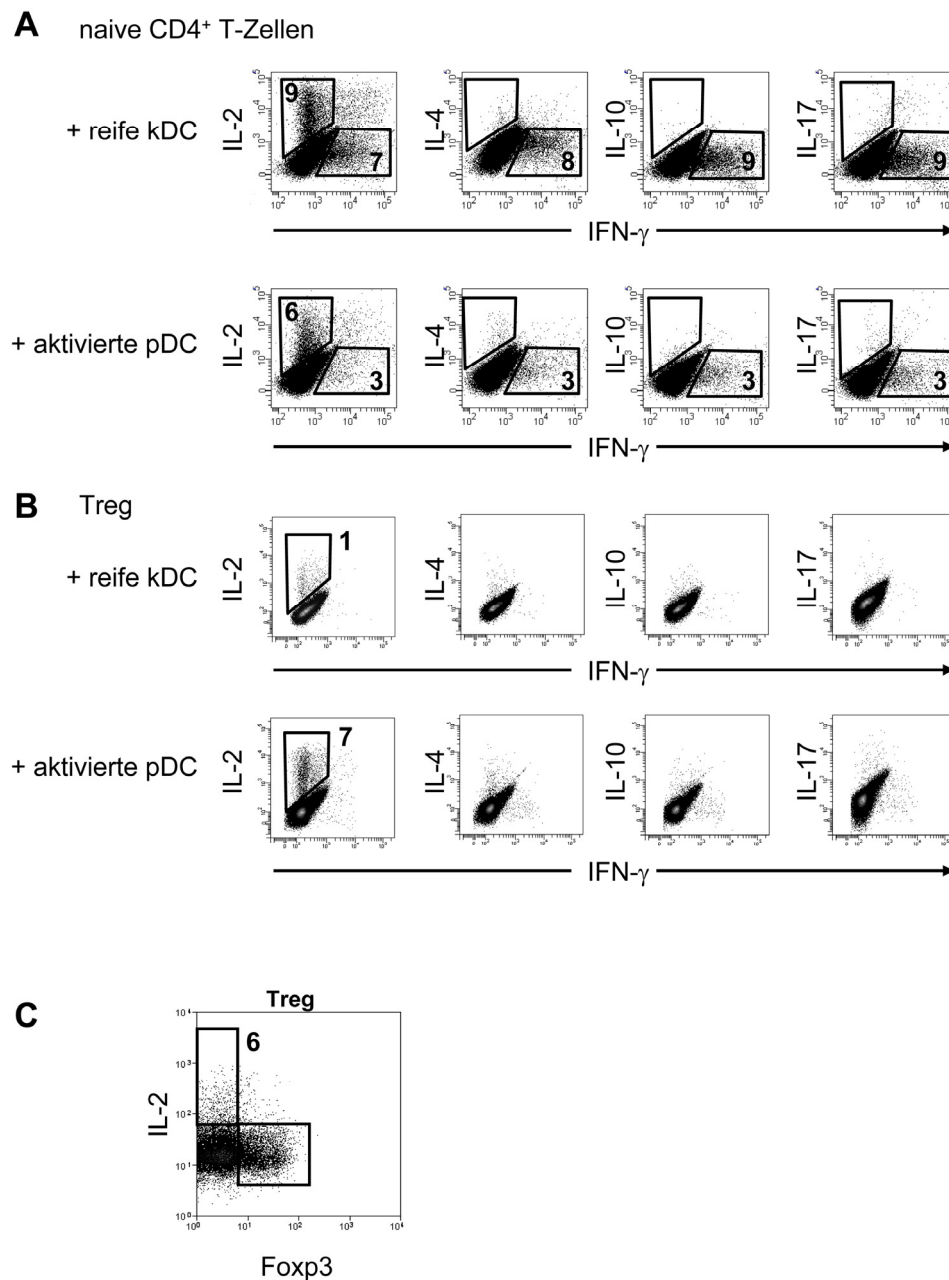
### 3.8 Analyse des Zytokinprofils regulatorischer T-Zellen nach Stimulation mit dendritischen Zellen

Wurde die T-Zelldifferenzierung anfänglich als eindimensionaler Entwicklungsweg mit definiertem Anfang und Ende gesehen, betrachtet man den Prozess heute als komplexes, dynamisches Netz. Der Differenzierungsprozess beinhaltet viele Zwischen- und Vorstufen, die Ursprung anderer T-Zelllinien sein können [64;65].

Regulatorische T-Zellen gelten heute als eine plastische Population, die unter bestimmten Bedingungen dedifferenzieren und im Zuge dessen andere Eigenschaften erlangen kann. Eine einsetzende Treg-Dedifferenzierung, hervorgerufen durch die Stimulation mit aktivierten pDC, könnte von dem Verlust inhibitorischer Kapazität begleitet werden und so die Abwesenheit Treg-vermittelter Suppression in pDC-stimulierten Kokulturen erklären.

Vor der Analyse pDC-abhängiger Treg-Differenzierung wurde zunächst das generelle Potential aktivierter pDC zur Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen untersucht. CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden hierfür mit pDC kultiviert, nach sieben Tagen maximal restimuliert und das Zytokinprofil durchflusszytometrisch untersucht. Als Vergleich diente die Stimulation der T-Zellen mit terminal differenzierten kDC, die zur Ausbildung großer Mengen an IFN- $\gamma$ - und IL-2 führte. Zum Zeitpunkt der ersten Restimulation konnte in kDC-stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen keine Produktion von IL-4, IL-10 und IL-17 detektiert werden (Abbildung 3.8). Im Einklang mit der schwachen T-Zell-stimulatorischen Kapazität aktivierter pDC, produzierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit pDC und maximaler Restimulation geringere IL-2-Mengen als es nach kDC-Stimulation der Fall war. Eine Produktion von IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 und IL-17 war nicht detektierbar.

Abbildung 3.8B zeigt, dass die Restimulation von Treg an Tag sieben nach kDC-Stimulation zur Produktion geringer IL-2-Mengen führt, während die Produktion von IL-4, IL-10, IL-17 und IFN- $\gamma$  nicht detektierbar ist. Erfolgte die Primärstimulation hingegen mit aktivierten pDC, war eine deutliche IL-2-Produktion in Treg detektierbar. Weitere untersuchte Zytokine konnten nicht gemessen werden. Wichtig war die Beobachtung, dass sich die IL-2-Produktion auf eine Population Foxp3-negativer T-Zellen beschränkt (Abbildung 3.8C). Das Fehlen eines Treg-spezifischen Markers macht eine Interpretation dieser Ergebnisse schwierig, da die Produktion von IL-2 durch kontaminierende T-Helferzellen nicht ausgeschlossen werden kann.



**Abbildung 3.8: Zytokinprofil regulatorischer T-Zellen nach Primärstimulation mit unterschiedlichen Subpopulationen dendritischer Zellen**

Isolierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen (A) oder Treg (B) wurden mit aktivierten kDC oder pDC stimuliert. An Tag 7 erfolgte die Restimulation mit PHA und PMA in Gegenwart von Monensin. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen konnten produzierte Zytokine intrazellulär gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert werden. (C) PHA/PMA restimulierte Treg an Tag 7 nach Primärstimulation mit pDC wurden fixiert und permeabilisiert. Dargestellt ist eine durchflusszytometrische Analyse von intrazellulärem IL-2 und des Transkriptionsfaktors Foxp3, in CD3<sup>+</sup> T-Zellen.

### 3.9 Regulatorische T-Zellen zeigen einen geringen Aktivierungsgrad nach Stimulation mit plasmazytoiden dendritischen Zellen

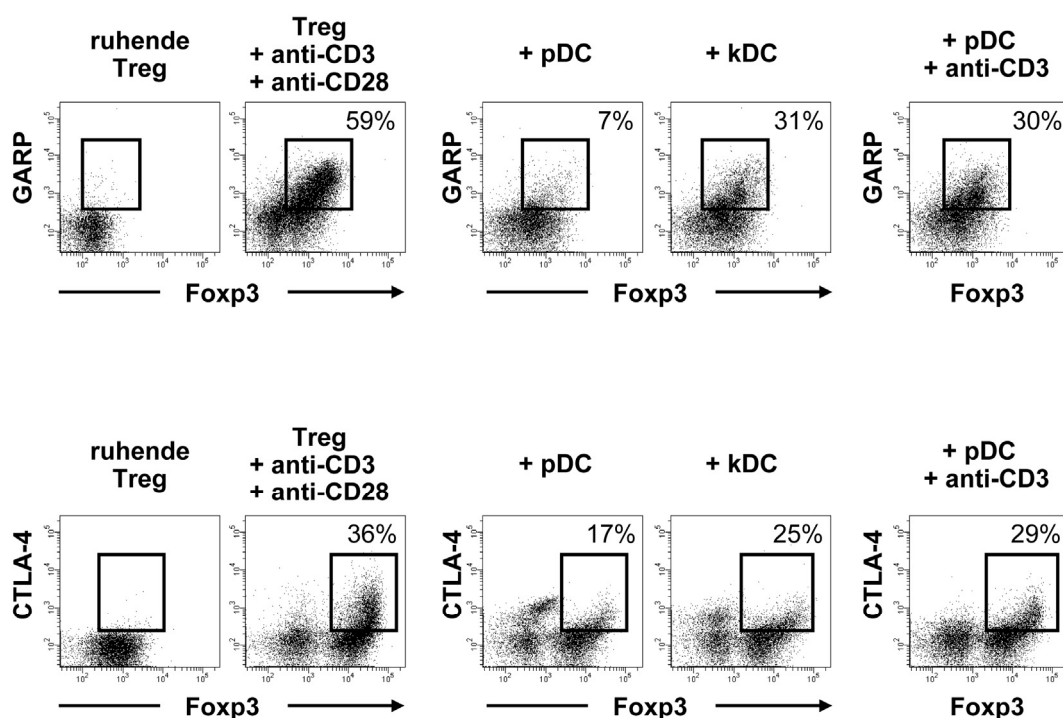
Die Funktionalität von Treg ist direkt abhängig von der Aktivierung über den T-Zellrezeptorkomplex, zusammen mit adäquater Kostimulation. Erst danach kann die Antigen-unspezifische, zellkontaktabhängige Suppression benachbarter Immunzellen erfolgen <sup>[15]</sup>. Im Zuge der Aktivierung von Treg, kommt es zur Expression verschiedener Treg-assoziiierter Oberflächenmoleküle. Hierzu gehört beispielsweise das Molekül GARP (Glycoprotein A repetitions predominant), dessen Expression nach T-Zellrezeptor-vermittelter Aktivierung auf Treg induziert wird und auch in die Treg-Funktionalität involviert ist <sup>[66]</sup>. Das Molekül CTLA-4 (Cytotoxic T lymphocyte antigen-4) liegt in ruhenden Treg konstitutiv in intrazellulären Kompartimenten vor und wird von dort nach Aktivierung auf die Zelloberfläche transportiert <sup>[22;24;67]</sup>. In den durchgeführten Analysen dienten die Expressionshöhen beider Moleküle zur Determination des Aktivierungsgrades stimulierter Treg.

Abbildung 3.9 zeigt, dass beide Moleküle, wie beschrieben, nicht auf der Oberfläche ruhender Treg detektierbar sind. Ein starker polyklonaler T-Zellrezeptor-Stimulus durch anti-CD3 mAk zusammen mit Kostimulation in Form von anti-CD28 mAk induzierte die maximale Expression von GARP auf ca. 60% der Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen und CTLA-4 auf ca. 36% der Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen und spiegelte so die Treg-Aktivierung wider. Auch der Transkriptionsfaktor Foxp3 wurde aktivierungsabhängig in seiner Expression erhöht. Die potente T-Zellstimulation durch aktivierte kDC führte ebenfalls zu einer hohen GARP- und CTLA-4-Expression auf Treg, die aber erwartungsgemäß nicht den Grad nach polyklonaler Stimulation erreichte. Ebenso wurde die Foxp3-Expression hochreguliert. Ein additiver T-Zellrezeptorstimulus (5 µg/ml anti-CD3 mAk) verbesserte das ohnehin starke T-Zell-stimulatorische Potential der kDC nur marginal, auch ein erhöhter Kostimulus (1 µg/ml anti-CD28 mAk) bewirkte nur geringe Veränderungen in der Expressionserhöhungen von GARP und CTLA-4 (Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz dazu, führte die Verwendung aktivierter pDC als Treg-Stimulatoren zu sehr geringen Mengen von GARP (7% der Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen) und CTLA-4 (17% Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen), was den geringen Aktivierungsgrad so stimulierter Treg repräsentierte. Der Zusatz von anti-CD3 mAk steigerte den Aktivierungsgrad der

Treg deutlich: GARP wurde nun auf der Oberfläche von 31%, CTLA-4 von 25% aller Fopx3<sup>+</sup> T-Zellen detektiert. Demgegenüber führte ein erhöhter Kostimulus durch Zugabe von anti-CD28 mAk zu kaum gesteigerter GARP- und CTLA-4-Expression (nicht gezeigt).

Der pDC-abhängige Kostimulus scheint somit nicht der limitierende Faktor zur Aktivierung von Treg zu sein, weshalb in weiteren Analysen der Fokus auf dem pDC-vermittelten T-Zellrezeptorsignal lag. Ob ein erhöhter T-Zellrezeptorstimulus nicht nur den Treg-Aktivierungsgrad ändert, sondern auch die Suppressor-Fähigkeit moduliert, sollte in funktionellen Ansätzen geklärt werden.



**Abbildung 3.9: Analyse des Aktivierungsgrades regulatorischer T-Zellen nach Stimulation mit unterschiedlichen Subpopulationen dendritischer Zellen.**

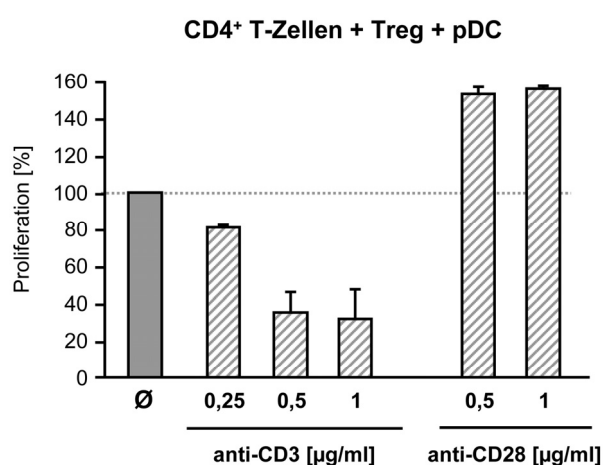
$2 \times 10^5$  Treg wurden mit allogenen aktivierten pDC oder kDC im Verhältnis 5:1 stimuliert, zur Erhöhung des T-Zellrezeptorsignals wurden  $5 \mu\text{g/ml}$  anti-CD3 mAk zugegeben. Polyklonale Stimulation mit  $5 \mu\text{g/ml}$  anti-CD3 mAk und  $1 \mu\text{g/ml}$  anti-CD28 mAk diente als Kontrolle. Frisch isolierte und 48h stimulierte Treg wurden mit 7-Aminoactinomycin-D und den Fluorochrom-konjugierten mAk anti-CD3, anti-GARP oder anti-CTLA-4 gefärbt. Zur Darstellung von Fopx3 wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert, mit anti-Fopx3 mAk gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Verwendung des Avitalfarbstoffs 7-Aminoactinomycin (7-AAD) ermöglichte den Ausschluss toter Zellen. Dargestellt sind CD3<sup>+</sup> T-Zellen, die Zahlen stellen den prozentualen Anteil der Aktivierungsmarker in CD3<sup>+</sup> Fopx3<sup>+</sup> T-Zellen dar.

### 3.10 Die Erhöhung des T-Zellrezeptorsignals in pDC-stimulierten Kokulturen führte zu einer partiellen Wiederherstellung Treg-vermittelter Suppression

Die Beobachtung, dass ein erhöhter T-Zellrezeptorstimulus bei Stimulation von Treg mit pDC einen gesteigerten Treg-Aktivierungsgrad bewirkte, führte zu der These, dass pDC kein ausreichend starkes Signal zur funktionellen Aktivierung von Treg liefern. Dies könnte in nicht-funktionellen Treg resultieren und kokultivierten T-Effektorzellen die Proliferation in ihrer Gegenwart erlauben.

Zur Testung dieser These wurden pDC-stimulierten Kokulturen von  $CD4^+$  T-Zellen und Treg unterschiedliche Konzentrationen von anti-CD3 mAk zugesetzt. Wie in Abbildung 3.10 dargestellt, führte die Erhöhung des T-Zellrezeptorstimulus in diesen Kulturen tatsächlich zur partiellen Wiederherstellung der Suppression der  $CD4^+$  T-Zellproliferation. Dieser Effekt war dosisabhängig, das heißt ein starker T-Zellrezeptorstimulus korrelierte mit starker Suppression.

Im Einklang mit dem Ergebnis der durchflusszytometrischen Analyse des Aktivierungsgrades von Treg, stellte die Erhöhung des kostimulatorischen Signals keine Suppression in pDC-stimulierten Kokulturen her. Im Gegenteil, die zusätzliche Kostimulation durch anti-CD28 mAk erhöhte die Proliferation in den Kokulturen.



**Abbildung 3.10: Die Erhöhung des T-Zellrezeptorsignals in pDC-stimulierten Kokulturen führt zu einer partiellen Wiederherstellung Treg-vermittelter Suppression**

Jeweils  $5 \times 10^4$   $CD4^+$  T-Zellen und Treg wurden mit aktivierten pDC im Verhältnis 5:1 stimuliert. Einigen Kulturen wurden steigende Konzentrationen der mAk anti-CD3 oder anti-CD28 zugegeben. Die in den Kokulturen gemessene Proliferation aus drei unabhängigen Experimenten wurde jeweils auf die Proliferation der Einzelkultur von  $CD4^+$  T-Zellen normiert und gemittelt. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert mit Standardabweichung.

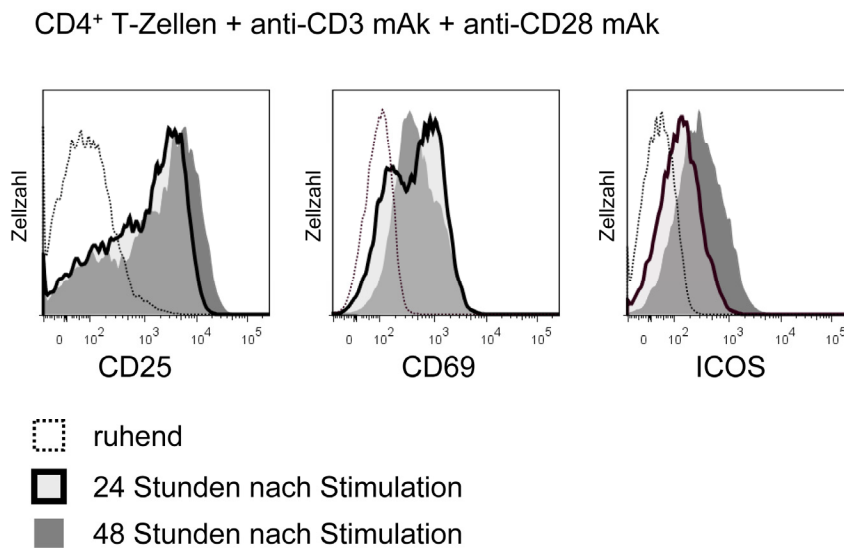
Zusammenfassend lassen die Daten darauf schließen, dass aktivierte pDC ausreichend starkes T-Zellrezeptorsignal zur funktionellen Aktivierung von Treg liefern. Ihr stimulatorisches Potential reicht jedoch aus, um kokultivierte T-Zellen zur Proliferation zu bringen.

### **3.11 Die Rolle von ICOS bei der DC-vermittelten Induktion regulatorischer T-Zellen**

In Abwesenheit eines inflammatorischen Milieus präsentieren unreife DC Peptide von Selbstantigenen über MHC-Moleküle auf ihrer Oberfläche, die sie aus der Peripherie in sekundäre lymphatische Organe transportieren. Der initiale Kontakt autoreaktiver T-Zellen mit unreifen kDC führt zur Autoantigen-spezifischen funktionellen Ruhigstellung dieser T-Zellen, sie werden anergisch. Zudem setzt in den T-Zellen die Differenzierung zu induzierten Treg ein, die hohe Mengen des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 produzieren und suppressiv sind. Durch ihre Fähigkeit zur Treg-Induktion, stellen unreife DC einen zentralen Punkt in der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz dar <sup>[31]</sup>.

Der genaue Mechanismus, der die Differenzierung zur induzierten Treg bedingt, war bislang nicht klar beschrieben. Ein entscheidendes Kriterium ist hierbei allerdings die Kostimulation der T-Zelle. Insbesondere das kostimulatorische Molekül CD28 nimmt eine zentrale Rolle ein. CD28 wird konstitutiv und exklusiv auf T-Zellen exprimiert und komplementiert, zusammen mit einem T-Zellrezeptor-Stimulus, die T-Zellaktivierung. Weiter verstärkt CD28 die T-Zellproliferation und steigert die Produktion von IL-2 <sup>[68]</sup>. Strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten mit CD28 weist das kostimulatorische Molekül ICOS (inducible costimulator) auf <sup>[69]</sup>. Anders als CD28, muss ICOS jedoch erst durch eine T-Zellrezeptor-vermittelte Stimulation auf der T-Zelle induziert werden (Abbildung 3.11). Die ICOS-Expression hängt daher mit der Expression von Aktivierungsmarkern für T-Zellen wie CD25 und CD69 zusammen (Abbildung 3.11). Auch ICOS-Kostimulation verstärkt die Proliferation von T-Zellen, hat aber keinen Einfluss auf die Produktion von IL-2. Im Gegensatz zu CD28, steigert es jedoch drastisch die IL-10-Produktion [69;70], das für den Differenzierungsprozess zur induzierten Treg von Bedeutung zu sein scheint <sup>[71]</sup>. Im Weiteren sollten die beiden

Klassen kostimulatorischer Moleküle hinsichtlich ihrer Beteiligung an der Toleranzinduktion durch unreife kDC untersucht werden.



**Abbildung 3.11: Durchflusszytometrische Expressionsanalyse von ICOS auf ruhenden und aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

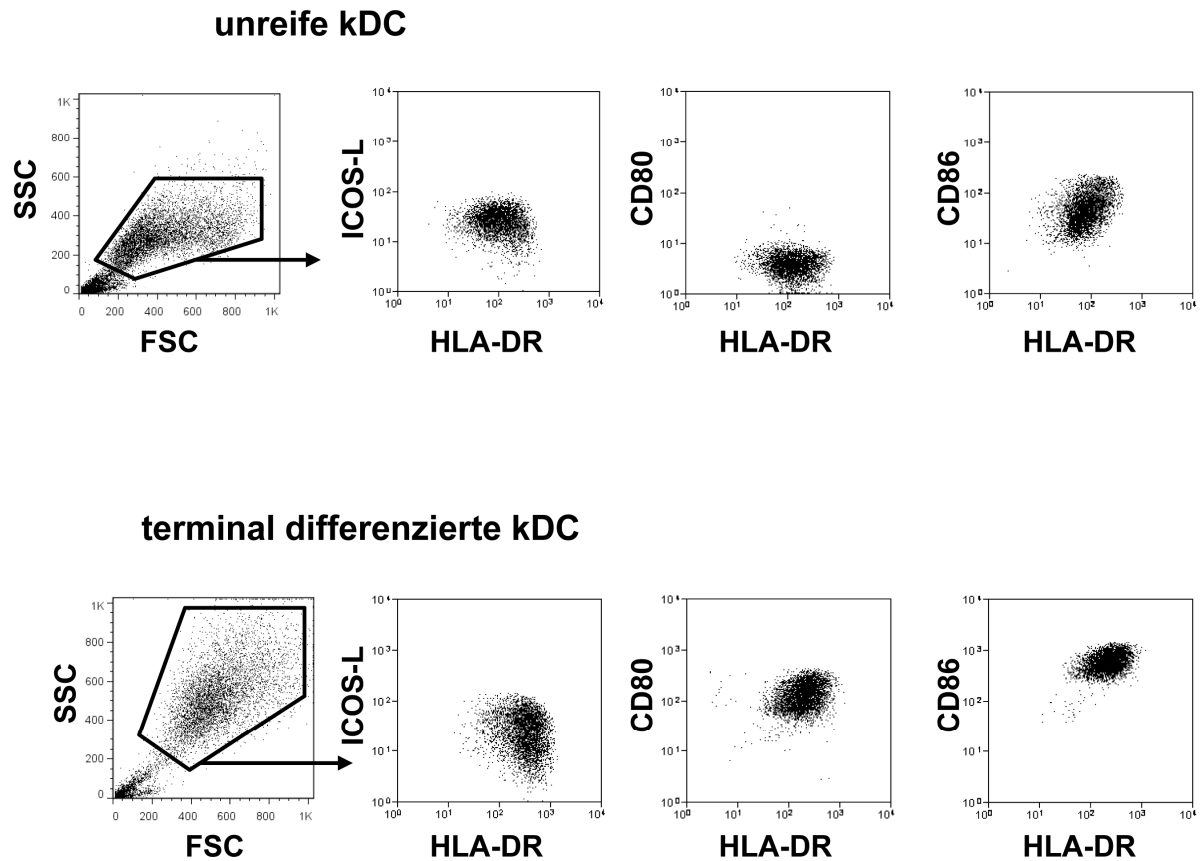
Isolierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden polyklonal mit 0,5 µg/ml anti-CD3 mAk und 1 µg/ml anti-CD28 mAk stimuliert. Ruhend, 24 oder 48 Stunden nach Stimulation wurden die Zellen mit Fluorochrom-konjugierten mAk gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Gepunktetes Histogramm: Expression auf ruhenden CD3<sup>+</sup> T-Zellen; Histogramm mit dicker schwarzer Linie: Expression nach 24h Stimulation; grau hinterlegtes Histogramm: Expression nach 48h Stimulation.

### 3.12 Analyse der ICOS-L-Expression auf konventionellen dendritischen Zellen

DC-vermittelte Kostimulation bildet neben dem T-Zellrezeptor-Stimulus das zweite Signal, das für eine vollständige T-Zellaktivierung notwendig ist<sup>[34]</sup>. Betrachtet man das Expressionsprofil kostimulatorischer Moleküle auf Antigen-präsentierenden Zellen, geht die (Pathogen-induzierte) Aktivierung der Zellen meist mit der Induktion oder Erhöhung der Expression einher. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass T-Zellen nur im inflammatorischen Kontext aktiviert werden.

Abbildung 3.12 zeigt, dass ICOS-L bereits von unreifen kDC exprimiert wird. Demgegenüber wird CD80, ein Ligand für CD28, nicht exprimiert. Die Expression von CD86, dem zweiten CD28-Liganden, ist zwar bereits auf der Oberfläche unreifer kDC detektierbar, wird aber während der terminalen Differenzierung weiter erhöht.

Zudem exprimieren erst terminal differenzierte kDC hohe Mengen des Kostimulators CD80. Im Gegensatz dazu verändert sich die ICOS-L-Expression kaum (Abbildung 3.12).



**Abbildung 3.12: Durchflusszytometrische Analyse von ICOS-L auf der Oberfläche unreifer und terminal differenzierter kDC**

Monozyten wurden sechs Tage in Gegenwart von IL-4 und GM-CSF zu unreifen kDC differenziert, geerntet und weitere zwei Tage zusammen mit einem Cocktail pro-inflammatorischer Zytokine terminal differenziert oder in IL-4- und GM-CSF-haltigen Medium im unreifen Stadium belassen. Die zwei kDC-Populationen wurden geerntet und mit Fluorochrom-konjugierten mAk anti-HLA-DR, anti-ICOS-L, anti-CD80 und anti-CD86 zur durchflusszytometrischen Analyse gefärbt.

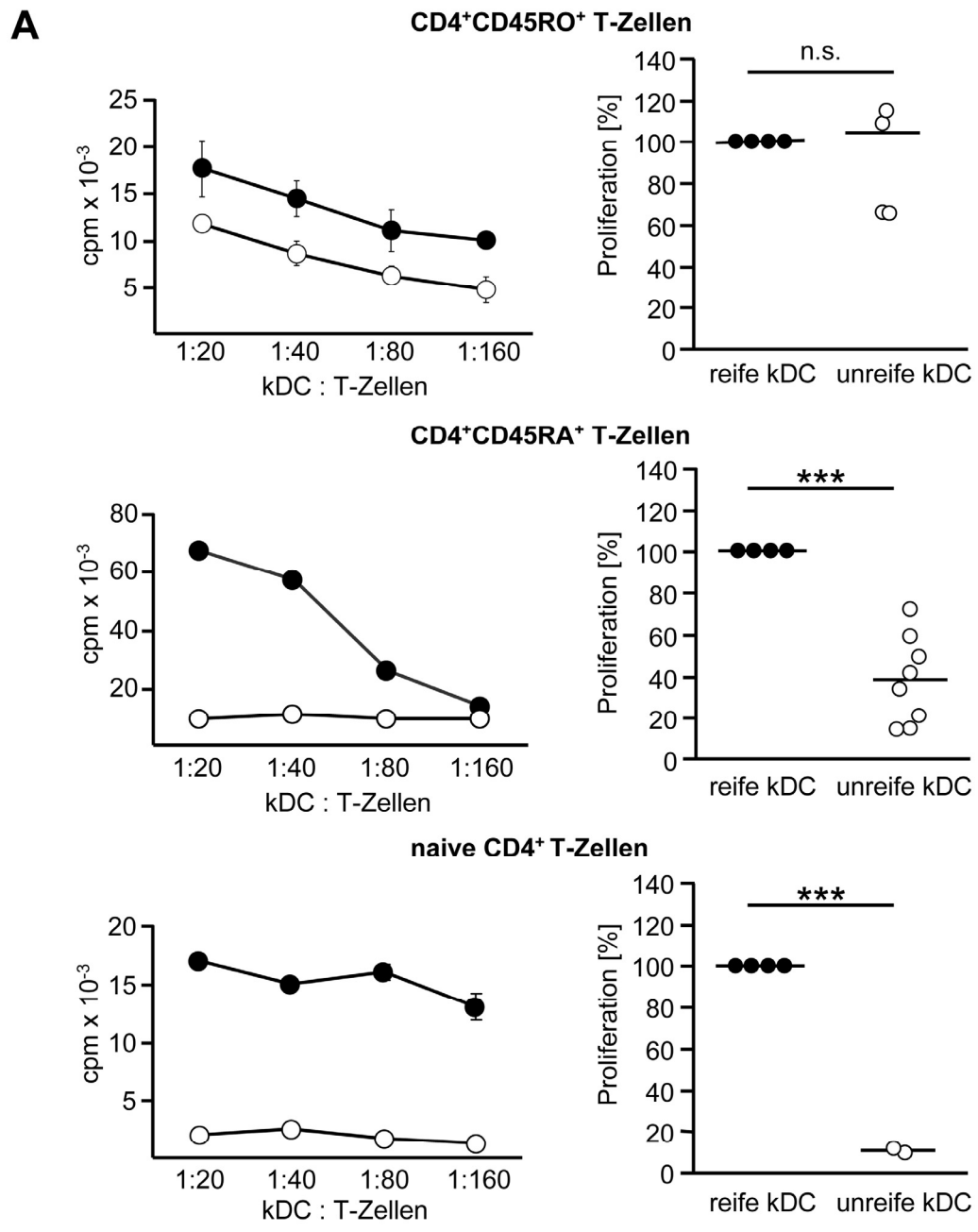
### 3.13 Analyse der Proliferation distinkter T-Zellpopulationen nach Stimulation mit unreifen und reifen konventionellen dendritischen Zellen

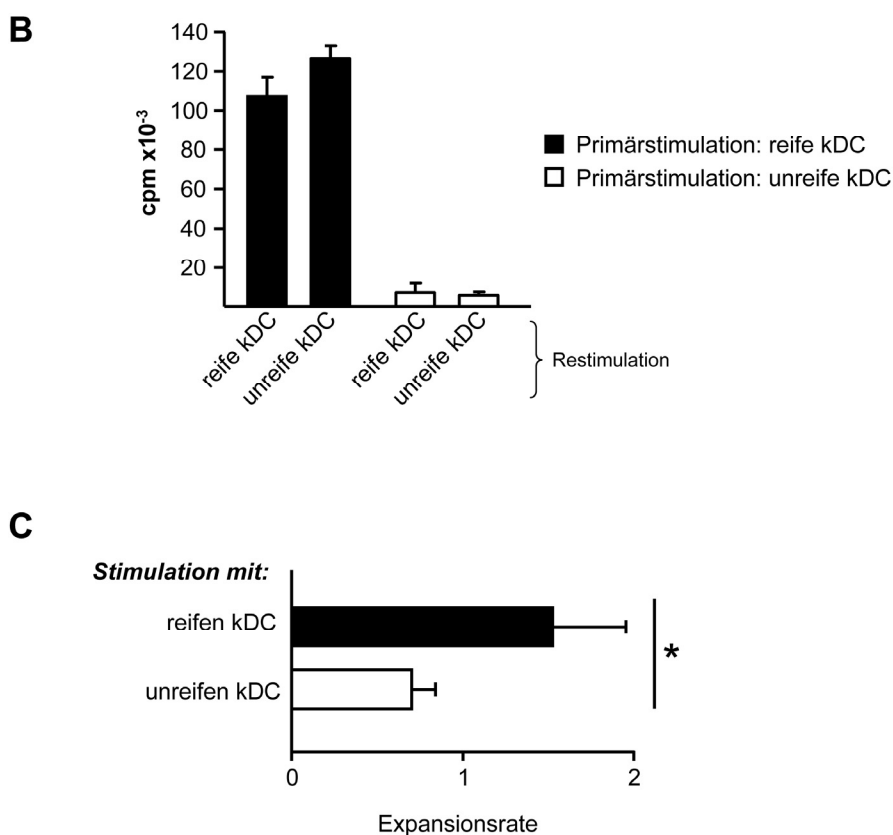
Dendritische Zellen nehmen als Wächterzellen des Immunsystems eine Schlüsselposition in der Initiierung adaptiver Immunantworten ein. Die DC-Funktion ist hierbei direkt an ihren jeweiligen Reifungsgrad gekoppelt. Die Frage, inwieweit die DC-vermittelte T-Zellantwort auch durch den Differenzierungsgrad der T-Zellen beeinflusst wird, sollte in den nächsten Experimenten adressiert werden. Daher wurden zunächst  $CD4^+CD45RO^+$  T-Effektorzellen und ruhende  $CD4^+CD45RA^+$  T-Zellen aus dem peripheren Blut und naive  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen aus Nabelschnurblut isoliert. Der Differenzierungsgrad der T-Zellen nimmt in dieser Reihenfolge stetig ab: bis hin zur naiven T-Zelle, die noch keinen Antigenkontakt erfahren hat.

Die drei T-Zellpopulationen wurden mit unreifen oder terminal differenzierten kDC stimuliert. Nach zwei Wochen erfolgte dann die Restimulation der T-Zellen mit den jeweiligen kDC-Populationen der Primärstimulation. Wie in Abbildung 3.13A zu erkennen ist, zeigen naive und ruhende  $CD4^+CD45RA^+$  T-Zellen die größten proliferativen Unterschiede nach Stimulation mit unreifen oder reifen kDC: die Stimulation mit reifen kDC führt zu hoher, die Stimulation mit unreifen kDC zu geringer Proliferation. Demgegenüber lassen sich T-Zellen mit höherem Differenzierungsgrad wie  $CD4^+CD45RO^+$  T-Effektorzellen, sowohl mit reifen als auch mit unreifen kDC effizient zur Proliferation bringen.

Erfolgte die Restimulation von naiven oder ruhenden T-Zellen, die mit unreifen kDC primärstimuliert wurden, mit reifen kDC, lässt sich selbst nach diesem optimalen Stimulus nur geringe Proliferation detektieren. Umgekehrt benötigen T-Zellen, die mit reifen kDC primärstimuliert wurden, keinen besonders starken Stimulus um zur Proliferation gebracht zu werden (Abbildung 3.13B). Ähnlich wie  $CD4^+CD45RO^+$  T-Effektorzellen, schien auch die Aktivierung dieser T-Effektorzellen weniger von Kostimulation als vom empfangenen T-Zellrezeptorsignal abhängig zu sein. Aus Abbildung 3.13C wird zudem ersichtlich, dass T-Zellen nach Stimulation mit terminal differenzierten kDC wesentlich stärker expandieren, als nach Stimulation mit unreifen kDC.

Der Einfluss des kDC-Reifungsgrades auf die T-Zellproliferation sank mit steigendem Differenzierungsgrad der T-Zellen. Differenzierte T-Effektorzellen lassen sich durch kDC-Stimulation weniger beeinflussen als naive oder ruhende T-Zellen. Letztere T-Zellpopulationen zeigen nach Primärstimulation mit unreifen kDC, selbst nach optimalem Stimulus eine verringerte Proliferation. Diese verringerte Proliferation, zusammen mit dem Verlust der Produktion von IL-2 und IFN- $\gamma$ , weist auf die Etablierung eines anergischen Zustands in T-Zellen hin. Die Ausbildung von Anergie nach wiederholter Stimulation mit unreifen kDC, ist Teil des Differenzierungsprozesses, der letztlich zu der Induktion von Treg führt<sup>[31]</sup>.





**Abbildung 3.13: Proliferation unterschiedlicher T-Zellpopulationen nach Stimulation mit unreifen oder reifen konventionellen DC**

(A) Naive  $CD4^+$  T-Zellen, ruhende  $CD4^+CD45RA^+$  T-Zellen oder  $CD4^+CD45RO^+$  T-Effektorzellen wurden mit unreifen oder reifen kDC primär stimuliert (T-Zellen : kDC 10:1). Nach 14 Tagen wurden die T-Zellpopulationen geerntet und mit unreifen bzw. reifen kDC restimuliert. Die Proliferation wurde am Tag drei mittels Inkorporation von  $^3H$ -Thymidin im  $\beta$ -Szintillationszähler gemessen. Die Proliferation von T-Zellen, die mit reifen kDC primär stimuliert wurden, ist als 100% dargestellt.

(B) Mit unreifen (weiß) oder reifen kDC (schwarz) stimulierte naive  $CD4^+$  T-Zellen wurden geerntet und jeweils mit unreifen oder reifen kDC im Verhältnis 10: 1 (T-Zellen : pDC) restimuliert. Die Proliferation wurde mittels Inkorporation von  $^3H$ -Thymidin an Tag drei nach Restimulation ermittelt. Dargestellt ist die Proliferation eines repräsentativen Experiments zur ersten Restimulation als arithmetischer Mittelwert, inklusive Standardabweichung aus Triplikat-Ansätzen.

(C) Dargestellt ist die Expansion naiver  $CD4^+$  T-Zellen zum Zeitpunkt der ersten Restimulation. Die Expansionsrate ergibt sich aus der ermittelten Lebendzellzahl zum Zeitpunkt der Restimulation geteilt durch die Eingangszellzahl.

---

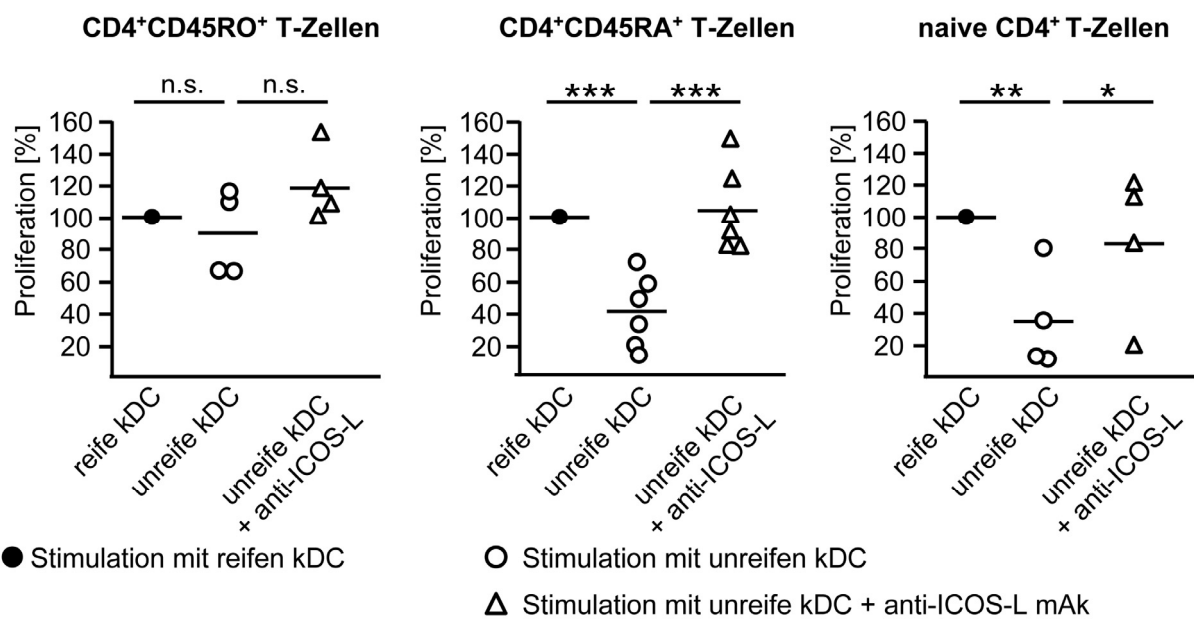
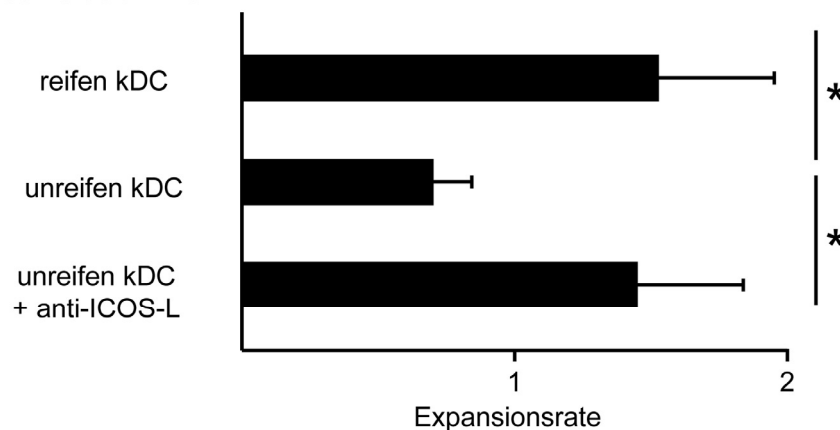
### 3.14 Die Interaktion von ICOS und ICOS-L beeinflusst die Proliferationsfähigkeit stimulierter T-Zellen

---

Im Verhältnis zu terminal differenzierten kDC, exprimieren unreife kDC nur sehr wenig CD28-Liganden. Im Gegensatz dazu zeigen unreife kDC jedoch eine hohe ICOS-L-Expression auf ihrer Oberfläche (Abbildung 3.12), weshalb dieses Molekül von besonderer Bedeutung für unreife kDC sein könnte. Zur Klärung der Frage, welchen Anteil ICOS-L an der kostimulatorischen Kapazität unreifer kDC hat, wurden T-Zellen in Gegenwart blockierender anti-ICOS-L mAk mit unreifen oder reifen kDC stimuliert.

Wurde der ICOS-Signalweg während der Stimulation mit reifen kDC, im Kontext starker CD28-Signale blockiert, mindert sich die starke T-Zell-stimulatorische Kapazität terminal differenzierter kDC nicht (Daten nicht gezeigt). Überraschenderweise bewirkte die weitere Reduktion des kostimulatorischen Potentials unreifer kDC durch ICOS-L-Blockade während der Stimulation, keine Verschlechterung der T-Zellproliferation. Vielmehr proliferierten naive und ruhende T-Zellen unter diesen Stimulationsbedingungen wesentlich stärker (Abbildung 3.14A). Da die Proliferation von  $CD4^+CD45RO^+$  T-Effektorzellen nicht von dem kostimulatorischen Potential der stimulierenden kDC abhing (Abbildung 3.13A), waren diese T-Zellen erwartungsgemäß insensitiv für die ICOS-L-Blockade.

Auch die Expansion der T-Zellen, die mit unreifen kDC stimuliert wurden, ist in Abwesenheit der Kostimulation durch ICOS-L wesentlich höher (Abbildung 3.14C). Zusammenfassend lässt sich somit eine Beteiligung der Interaktion von ICOS und ICOS-L an der funktionellen Ruhigstellung von T-Zellen durch unreife kDC vermuten.

**A****B****Stimulation mit:**

**Abbildung 3.14: Induktion von Anergie in T-Zellen durch unreife kDC bedarf der Interaktion von ICOS und ICOS-L**

(A) CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-Effektorzellen (links), ruhende CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen (Mitte) oder naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen (rechts) wurden mit reifen oder unreifen kDC primär stimuliert (T-Zellen:kDC 10:1). Zur Blockade der ICOS/ICOS-L Interaktion wurde einigen Primärstimulationen mit unreifen kDC 10 µg/ml anti-ICOS-L mAk zugegeben. An Tag 14 wurden die T-Zellen geerntet und mit reifen kDC restimuliert. An Tag drei wurden pro Reaktionsgefäß 37 kBq <sup>3</sup>H-Thymidin gegeben. Die Proliferation wurde nach 16h im β-Szintillationszähler gemessen. Die T-Zellproliferation nach Primärstimulation mit reifen kDC wurden als 100% dargestellt.

(B) Die Expansion naiver CD4<sup>+</sup>T-Zellen zum Zeitpunkt der ersten Restimulation wurde durch Division der ermittelten Lebendzellzahl zum Zeitpunkt der Restimulation durch die Eingangszellzahl bestimmt.

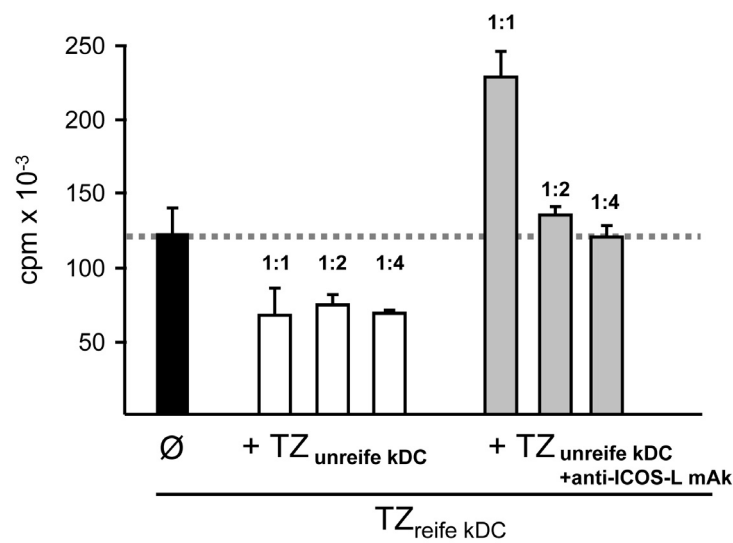
---

### 3.15 Die Interaktion von ICOS und ICOS-L ist beteiligt an der Differenzierung zu induzierten regulatorischen T-Zellen durch unreife konventionelle DC

---

Die wiederholte Restimulation von T-Zellen mit unreifen kDC induziert die Differenzierung zu Treg. Diese Differenzierung ist ein fortschreitender Prozess und geht einher mit der Induktion von Anergie, einem Zustand geringer Proliferationsfähigkeit und stark reduzierter IL-2- und IFN- $\gamma$ -Produktion. Zudem produzierten diese T-Zellen erhöhte Mengen von IL-10<sup>[31]</sup>. Die bisherigen Ergebnisse ließen vermuten, dass die Interaktion von ICOS auf T-Zellen und ICOS-L auf unreifen kDC, zumindest für die Etablierung eines hypoproliferativen Phänotyps in T-Zellen notwendig ist. Inwieweit fehlende ICOS-Kostimulation auch die Ausbildung suppressiver Kapazitäten betrifft, sollten folgende Experimente zeigen. Naive T-Zellen wurden hierfür mit unreifen kDC in An- oder Abwesenheit blockierender anti-ICOS-L mAk primärstimuliert. Nach der dritten Restimulation mit unreifen kDC wurden die T-Zellen geerntet und zur Überprüfung ihrer suppressiven Kapazität in Suppressionstests eingesetzt.

Erhielten naive T-Zellen während der initialen Stimulation mit unreifen kDC ein kostimulierendes ICOS-Signal, waren diese in der Lage kokultivierte T-Zellen zu supprimieren. Erfolgte die Stimulation jedoch mit Blockade der Interaktion von ICOS und ICOS-L, so bildeten diese T-Zellen kein suppressives Potential aus und inhibierten die Proliferation kokultivierter T-Zellen nicht (Abbildung 3.15). Die Blockade verhinderte somit die Differenzierung zu induzierten Treg.



**Abbildung 3.15: ICOS-L Blockade verhindert die Differenzierung naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu induzierten regulatorischen T-Zellen**

Naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit unreifen kDC in An- oder Abwesenheit blockierender anti-ICOS-L mAk primär- und restimuliert. Primär- und Restimulation naiver T-Zellen mit reifen kDC diente als Kontrolle. Nach der dritten Restimulation wurden die T-Zellen geerntet. Anschließend wurden TZ<sub>rDC</sub> allein oder in den angegebenen Verhältnissen mit TZ<sub>uDC</sub> oder TZ<sub>uDC/anti-ICOS-L</sub> durch reife kDC restimuliert. Durch Zugabe von <sup>3</sup>H-Thymidin an Tag drei der Kultur für 16 Stunden, konnte anschließend die Proliferation der T-Zellen im  $\beta$ -Szintillationszähler ermittelt werden.

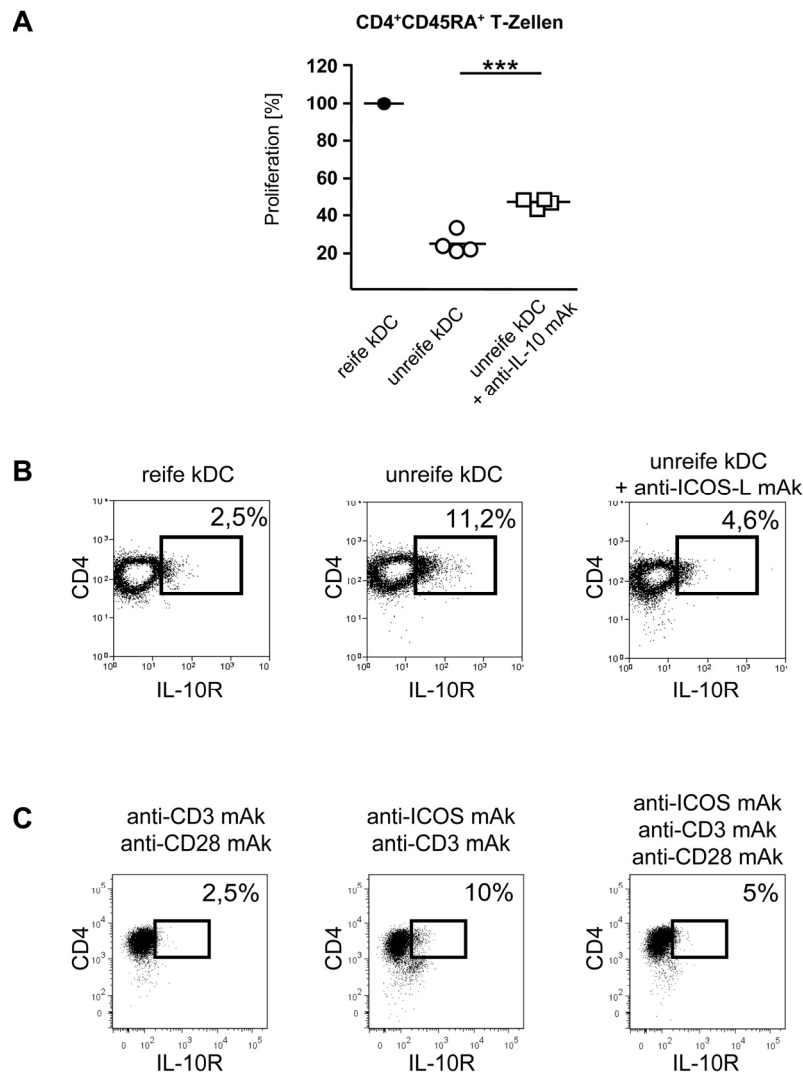
### 3.16 In Abwesenheit starker CD28-Signale steigert ICOS-Kostimulation die Expression des IL-10-Rezeptors

Die Anwesenheit des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 während der Differenzierungsphase von T-Zellen ist notwendig für die Ausbildung hyporeaktiver T-Zellen [71]. Die Neutralisation von IL-10 während der Primärstimulation von T-Zellen, zeigte daher erwartungsgemäß eine Verringerung der Hypoproliferation von T-Zellen, die mit unreifen kDC primär- und restimuliert wurden. (Abbildung 3.16A).

Sowohl ICOS als auch IL-10 sind somit zur Induktion der Hypoproliferation von T-Zellen nach wiederholter Stimulation mit unreifen kDC notwendig. Im Folgenden sollte daher untersucht werden, inwieweit ICOS die Expression des IL-10-Rezeptors (IL-10R) auf T-Zellen beeinflussen und so ihre IL-10-Sensitivität modulieren kann. Naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden daher mit unreifen oder reifen kDC stimuliert und nach fünf Tagen durchflusszytometrisch auf die IL-10R-Expression analysiert. Wie aus Abbildung 3.16B ersichtlich wird, war die höchste IL-10R-Expression nach Stimulation mit unreifen kDC detektierbar, während nach Stimulation mit reifen kDC nur noch geringe Mengen von IL-10R messbar waren. Wurde die ICOS-Kostimulation während der Stimulation mit unreifen kDC durch Zugabe von anti-ICOS-L mAk blockiert, so verringerte sich die IL-10R-Expression auf den T-Zellen um fast 60%.

Zur Verdeutlichung ICOS-abhängiger IL-10R-Expression, wurden naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen in einem System ohne Antigen-präsentierende Zellen stimuliert. Ein T-Zellrezeptor-Stimulus zusammen mit ICOS-Kostimulation bewirkte eine deutliche Expression von IL-10R auf den T-Zellen (Abbildung 3.16C, Mitte). Wurde der T-Zellrezeptor-Stimulus von einem starken CD28-Signal begleitet (Abbildung 3.16C, links), war nur eine geringe IL-10R-Expression messbar. Die zusätzliche Stimulation über ICOS durch anti-ICOS mAk (Abbildung 3.16C, rechts) erhöhte die IL-10R-Expression nicht weiter.

Der CD28-Stimulus verhinderte somit die Expressionserhöhung des IL-10R und dominierte den ICOS-vermittelten Effekt der erhöhten IL-10R-Expression. ICOS konnte seine Wirkung folglich nur in einem Kontext schwacher (bei unreifen kDC, Abbildung 3.16B, Mitte) oder abwesender Kostimulation über CD28 (Abbildung 3.16C, Mitte) entfalten.



**Abbildung 3.16: Durchflusszytometrische Analyse ICOS-abhängiger IL-10R-Expression auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen.**

(A) CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit unreifen kDC primär stimuliert (T-Zellen:DC 10:1). Produziertes IL-10 wurde mit 10 µg/ml anti-IL-10 mAk neutralisiert. Die Primärstimulation mit terminal differenzierten kDC diente als Kontrolle und wurde als 100% definiert. Dargestellt ist die Proliferation der T-Zellen in Prozent zum Zeitpunkt der ersten Restimulation mit terminal differenzierten kDC. Jeder Punkt repräsentiert einen gesunden Spender.

(B) Naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit unreifen kDC in An- oder Abwesenheit blockierender anti-ICOS-L mAk stimuliert. Die Stimulation mit reifen kDC diente als Kontrolle. Fünf Tage nach Stimulation wurden die T-Zellen geerntet und die IL-10R-Expression durchflusszytometrisch analysiert.

(C) Dargestellt ist die durchflusszytometrische Analyse der IL-10R-Expression auf T-Zellen. Naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden in den angegebenen Kombinationen mit 1 µg/ml anti-CD3 mAk, 10 µg/ml anti-ICOS mAk und 1 µg/ml anti-CD28 mAk stimuliert und an Tag fünf im Durchflusszytometer analysiert.

## 4 Diskussion

Das periphere Blut umfasst zwei Populationen dendritischer Zellen (DC): plasmazytoide DC (pDC) und konventionellen DC (kDC) <sup>[37]</sup>. Die Funktionen der DC sind breit gefächert: als Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität sind sie nicht nur hocheffiziente Initiatoren von Immunantworten gegen eindringende Pathogene. Auch für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz bilden sie eine zentrale Schlüsselfigur, beispielsweise durch ihre Fähigkeit IL-10-produzierende T-Zellen mit suppressiver Kapazität zu generieren <sup>[31]</sup>. Diese beiden im Grunde gegensätzlichen DC-Funktionen (Immunität versus Toleranz) assoziieren immer mit dem individuellen Aktivierungs- und Reifungsgrad der DC, der wiederum durch inflammatorische Mediatoren im umgebenen Milieu beeinflusst wird. Nach Aktivierung mit adäquaten Stimuli, zeigen beide DC-Gruppen eine starke Hochregulierung der Expression kostimulatorischer Moleküle. Wie hier gezeigt, ist die finale Expressionshöhe kostimulatorischer Moleküle auf aktivierten pDC jedoch deutlich geringer als auf aktivierten kDC. Es war daher nicht überraschend, dass aktivierte pDC eine vergleichsweise schwache Proliferation allogener T-Zellen induzierten. Auch die Produktion der Effektorzytokine IL-2 und IFN- $\gamma$  von T-Zellen war nach Stimulation mit pDC geringer als mit kDC. Das T-Zell-stimulatorische Potential aktivierter pDC ist daher niedrig, korreliert mit der geringeren Expressionshöhe kostimulatorischer Moleküle und ist dem terminal differenzierter kDC unterlegen. Diese Beobachtungen stimmen mit Ergebnissen verschiedener Gruppen überein, die aktivierten pDC ebenfalls geringe T-Zell-stimulatorische Kapazitäten zuschreiben <sup>[43;72;73]</sup>.

Im Fokus dieser Arbeit standen Untersuchungen zur funktionellen Wechselwirkungen von DC, T-Zellen und regulatorischen T-Zellen (Treg). So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Stimulation von Kokulturen mit aktivierten pDC oder kDC in beiden Fällen zur Proliferation und Expansion der T-Effektorzellen führte. Diese Tatsache war zumindest für die Stimulation mit pDC überraschend, da diese DC-Subpopulation nur schwache T-Zellstimulatoren sind. Aus der Literatur war bereits bekannt, dass aktivierte kDC Treg-vermittelte Suppression brechen können. So zeigten Medzhitov et al., dass LPS-stimulierte kDC lösliche Mediatoren wie IL-6 produzieren, die eine Proliferation der T-Effektorzellen in Gegenwart von Treg

ermöglichen <sup>[74]</sup>. Arbeiten von Steinman et al. wiesen auf die Fähigkeit von kDC hin, auch Treg selbst zur Proliferation zu bringen. Die proliferativen Treg verloren transient ihre Suppressoraktivität und erlaubten die Proliferation kokultivierter T-Zellen <sup>[57-59]</sup>. Der in dieser Arbeit dargestellte Verlust Treg-vermittelter Suppression in kDC-stimulierten Kokulturen beruhte vermutlich auf der einsetzenden Proliferation beider T-Zellpopulationen, da sowohl T-Effektorzellen, als auch Treg proliferierten.

Im Falle pDC-stimulierter Treg, zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit jedoch interessanterweise, dass diese anergisch blieben. Durch Markierung mit einem intrazellulären Vitalfarbstoff, konnte belegt werden, dass sich in pDC-stimulierten Kokulturen die Proliferation lediglich auf T-Effektorzellen beschränkte. Im Gegensatz zu kDC, konnten aktivierte pDC somit nicht die Treg-Anergie durchbrechen.

Die T-Zellstimulation humaner pDC im tolerogenen Milieu war bisher nicht Gegenstand von Untersuchungen. Arbeiten in Ratten von Ouabed et al. zeigten, dass CpG-aktivierte pDC die Proliferation von Treg auslösen. Die pDC-induzierte Treg-Proliferation führte so zum Verlust der Treg-vermittelten Suppression <sup>[75]</sup>. Die bestehende Anergie pDC-stimulierter Treg in dieser Arbeit könnte durch unterschiedliche funktionelle pDC-Eigenschaften in Ratte und Mensch begründet sein.

Die hier gezeigten Daten sind insofern von Interesse, als das humane pDC immer wieder im Kontext autoimmuner Erkrankungen stehen <sup>[76;77]</sup>. Zahlreiche Arbeitsgruppen beschrieben, dass die Aktivierung humaner pDC ohne Vorhandensein einer Infektion, gefolgt von der Produktion von Typ-I Interferonen, eine zentrale Rolle in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen spielt. So zeigten Nestle et al. beispielsweise in einem xenogenen Transplantationsmodell für humane Psoriasis, dass pDC in die Haut der Psoriasis-Patienten wandern, wo sie nach Aktivierung IFN- $\alpha$  produzieren und den Verlauf der Krankheit verschlimmern <sup>[78]</sup>. Auch im Fall von Patienten mit systemischen Lupus erythrematosus korreliert das von aktivierten pDC produzierte IFN- $\alpha$  im Serum der Patienten mit der Stärke der Ausprägung dieser Autoimmunerkrankung <sup>[79;80]</sup>. Derartige Beobachtungen könnten dadurch erklärt werden, dass pDC eine Treg-vermittelte Suppression umgehen und so autoreaktive T-Zellen aktivieren und zur Expansion bringen.

Das Fehlen Treg-vermittelter Suppression durch Stimulation mit aktivierten pDC war nicht abhängig vom produzierten IFN- $\alpha$ . Durch die Blockade der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$  konnte auch die Beteiligung dieser

löslichen Mediatoren ausgeschlossen werden. In dieser Arbeit konnte nur ein minimaler, nicht signifikanter Effekt bei der Blockade von IL-1 $\beta$  ausgemacht werden, ein Zytokin welches nicht von pDC selbst produziert wird <sup>[44]</sup>. Der beobachtete Effekt schien daher T-Zell-intrinsisch und war aller Wahrscheinlichkeit nach nicht pDC-vermittelt.

Ein weiterer Ansatz für die Erklärung pDC-vermittelter Proliferation von T-Zellen in Gegenwart von Treg war eine Dedifferenzierung von Treg in T-Effektorzellen, die mit dem Verlust suppressiver Kapazität einhergeht. Die Differenzierung naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 oder Treg wurde lang als ein definitiver und terminaler Prozess angesehen. Zahlreiche Arbeiten widerlegten dieses Dogma jedoch nach und nach. Seit Yang et al. demonstrierten, dass „terminal differenzierte“ natürlich vorkommende Treg durch Stimulation mit IL-6 die Fähigkeit zur IL-17 Produktion erlangen und letztlich zu Th17-Zellen reprogrammiert werden können, entstand die Theorie der plastischen T-Zelldifferenzierung <sup>[81]</sup>. Die Stimulation von Treg mit aktivierten pDC, führte zu einer deutlichen Produktion von IL-2 zum Zeitpunkt der ersten Restimulation. Interessanterweise zeigten genauere Analysen, dass die IL-2-Produzenten kein Foxp3 exprimierten. Auch Yang et al. zeigten, dass die einsetzende IL-17-Produktion in den stimulierten Treg mit einer Verringerung der Foxp3-Expression korrelierte. Das Fehlen Treg-spezifischer Moleküle ließ eindeutige Aussagen über die Natur der IL-2-Produzenten jedoch nicht zu. Gerade weil die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass eine funktionelle Aktivierung von T-Effektorzellen in Gegenwart von Treg durch pDC vermittelt werden kann, konnte eine Kontaminierung durch IL-2-produzierende T-Effektorzellen nicht ausgeschlossen werden. Die Differenzierung von T-Zellen ist immer gekoppelt an ihre Proliferation. Bird et al. haben beschrieben, dass die Transkription epigenetisch blockierter Gene, die für eine T-Zelldifferenzierung notwendig ist, erst nach mehrfachen Zellteilungen erfolgen kann <sup>[82]</sup>. Da pDC keinerlei Proliferation in stimulierten Treg bewirkten, wurde die These der pDC-vermittelten Treg-Dedifferenzierung nicht weiter verfolgt.

Um ihre suppressive Funktion ausüben zu können, müssen Treg in spezifischer Weise aktiviert werden. Die initialen Vergleiche zur T-Zell-stimulatorischen Kapazität beider DC-Populationen ergaben, dass aktivierte pDC den kDC unterlegen sind. Diese Beobachtung führten letztlich zu der Hypothese, dass der pDC-vermittelte Stimulus für eine funktionelle Treg-Aktivierung zu schwach ist, so dass kokultivierte

T-Effektorzellen unter diesen Bedingungen proliferieren können. Die Aktivierung von Treg ist assoziiert mit der Expression verschiedener aktivierungsabhängiger Moleküle, wie beispielsweise CTLA-4 und GARP [20;24;66;67]. Treg, die durch ein starkes T-Zellrezeptorsignal und Kostimulation polyklonal aktiviert wurden, zeigten eine hohe Expression von GARP und CTLA-4. Auch nach der Stimulation mit terminal differenzierten kDC, die über ein hohes T-Zell-stimulatorisches Potential verfügen, konnten hohe Expressionsgrade von GARP und CTLA-4 detektiert werden. Die niedrige Expression beider Moleküle nach pDC-Stimulation spricht dagegen für eine geringe Treg-Aktivierung und unterstützt demnach die aufgestellte These.

Ein exogener T-Zellrezeptorstimulus durch Zugabe von anti-CD3 mAk zu pDC-stimulierten Treg, erhöhte das intrinsische T-Zellrezeptorsignal und führte zu einem Oberflächenphänotyp gesteigerter Aktivität. Interessant war, dass nur die Erhöhung des T-Zellrezeptorstimulus zu einem gesteigerten Aktivierungsgrad der Treg führte, ein erhöhter Kostimulus steigerte die Expression der Aktivierungsmarker nicht.

Wurde der T-Zellrezeptorstimulus in pDC-stimulierten Kokulturen aus Treg und T-Effektorzellen durch die Zugabe von anti-CD3 mAk erhöht, konnte zudem eine partielle Wiederherstellung Treg-vermittelter Suppression nachgewiesen werden. Auch in diesem Fall konnte ein erhöhter Kostimulus keine Treg-vermittelte Suppression induzieren. Hieraus lässt sich schließen, dass das pDC-vermittelte kostimulatorische Signal in Gegenwart eines starken T-Zellrezeptorstimulus zur funktionellen Treg-Aktivierung ausreicht.

Dies führte zu der Hypothese, dass der Verlust der Treg-vermittelten Suppression in pDC-stimulierten Kokulturen das Resultat eines insuffizienten T-Zellrezeptorsignals ist, das aktivierte pDC den Treg liefern. Eine aktive Inhibierung der Treg-Funktion durch pDC ist unwahrscheinlich, da ein zusätzlicher T-Zellrezeptorstimulus durch anti-CD3 mAk die Suppression wiederherstellt.

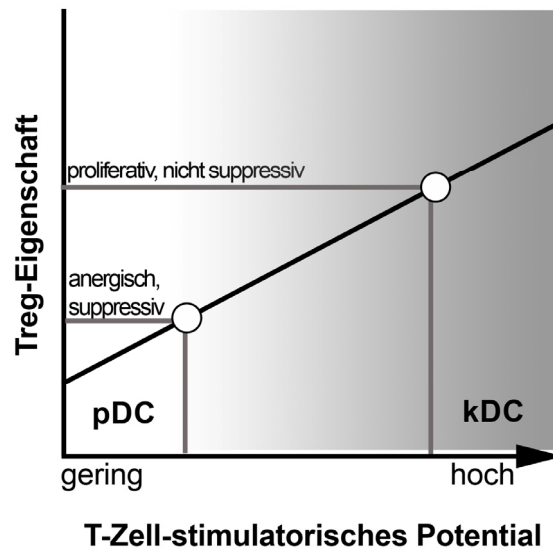
Die Aktivierung einer T-Zelle ist ein komplexer Prozess, der sich aus T-Zellrezeptor-abhängigen und -unabhängigen Signalen zusammensetzt [83]. Die erhobenen Daten lassen vermuten, dass die Gesamtheit der pDC-vermittelten aktivierenden Signale zu schwach sind um Treg zu funktionalisieren, andererseits reicht das selbe Signal aus, T-Effektorzellen zur Proliferation zu bringen. Hierdurch lassen sich auch die Beobachtungen der Arbeiten von Houot et al. erklären, die zeigten, dass Treg die Funktion von kDC, nicht aber die von pDC modulieren können [84]. In letzterer

Konstellation kommt es zu keiner adäquaten Aktivierung der Treg, so dass diese wiederum nicht in der Lage sind pDC in ihrer Funktion zu beeinflussen.

Postuliert man einen Schwellenwert in der Aktivierungsstärke, der zur Induktion suppressiver Treg-Funktion überschritten werden muss, so erreicht eine pDC-vermittelte Aktivierung diesen ersten Schwellenwert nicht (Abbildung 4.1). Auf der anderen Seite überschreitet die Stimulation mit kDC einen zweiten Schwellenwert, ab dem die Proliferation von Treg ausgelöst wird. Die Induktion der Treg-Proliferation geht einher mit dem Verlust ihrer suppressiven Kapazität. Zwischen diesen beiden Schwellenwerten befindet sich die optimale Stimulationsstärke für die funktionelle Treg-Aktivierung. Unter diesen Stimulationsbedingungen verbleibt die Treg anergisch und kann zellkontaktabhängig und antigen-unspezifisch die Suppression benachbarter Immunzellen vermitteln.

Ein ähnlicher Regulationsmechanismus wurde für die Entwicklung natürlich vorkommender Treg im Thymus postuliert <sup>[85;86]</sup>. Die T-Zellrezeptor-Avidität zu Komplexen aus MHC-Molekülen und körpereigenen Peptiden entscheidet darüber, ob T-Zellen positiv-selektioniert werden oder der klonalen Deletion unterliegen. Die Differenzierung zur Treg bedarf einer Avidität des T-Zellrezeptors, der in einem schmalen Bereich zwischen Positivselektion und Deletion liegt <sup>[15;87]</sup>.

In diesem Kontext ist auch das murine Modell von Moran et al. interessant, in welchem die empfangene T-Zellrezeptorstärke peripherer T-Zellen visualisiert wird. Die T-Zellen dieses Modells besitzen einen transgenen T-Zellrezeptor, der in Abhängigkeit der empfangenen Signalstärke die Expression von GFP induziert. Anhand der GFP-Expressionshöhe kann so auf die Stärke des T-Zellrezeptorsignals geschlossen werden. Moran et al. demonstrieren, dass Treg in der Peripherie größere Mengen von GFP exprimieren, als T-Effektorzellen. Treg empfangen somit stärkere T-Zellrezeptorsignale als konventionelle T-Zellen <sup>[88]</sup>, was den postulierten Bedarf höherer T-Zellrezeptor-Signale widerspiegeln könnte.



**Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des postulierten Zusammenhangs von Treg-Funktion und Stimulationsstärke**

Das Schema stellt den Zusammenhang der vermittelten Aktivierungsstärke auf der X-Achse und die Funktionszustände einer stimulierten Treg auf der Y-Achse dar. Die weißen Punkte symbolisieren den 1. Schwellenwert (Treg bleibt anergisch und wird ausreichend stimuliert, um Suppression zu vermitteln) und den 2. Schwellenwert (Treg-Anergie wird gebrochen, Treg-vermittelte Suppression geht verloren).

Die Daten dieser Arbeit beschreiben eine neue Funktion von pDC. Durch die Vermittlung aktivierender Signale, die stark genug für T-Effektorproliferation, nicht aber für die funktionelle Treg-Aktivierung sind, umgehen pDC die suppressive Aktivität humaner Treg. Diese Erkenntnisse könnten in zukünftige Ansätze zur Verbesserung von Anti-Tumortherapien fließen. So könnten beispielsweise mit Tumorantigenen-gepulste pDC die zelluläre Komponente einer Vakzinierungsbasierten Therapie gegen Tumore bilden. Die hier gezeigten Eigenschaften der pDC prädestinieren diese DC-Gruppe für eine derartige Anwendung. Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe zeigten, dass eine fortschreitende Metastasierung in Melanompatienten mit einer erhöhten Frequenz von Treg einhergeht. Die so erhöhte Tolerogenität bewirkte eine verringerte Immunantwort auf Recallantigene wie Tetanustoxoid <sup>[53]</sup>. Um eine erfolgreiche DC-Vakzinierung durchzuführen, sollten die verwendeten DC daher

1. Immunantworten in tolerogenen Situationen initiieren
2. erhöhte Treg-Frequenzen durch Treg-Expansion nicht weiter steigern

3. insensitiv gegenüber Treg-vermittelter Inhibierung von DC-Funktionen sein.

Eben diesen Ansprüchen werden aktivierte pDC gerecht: sie könnten potentiell immunogene Anti-Tumorantworten generieren, lassen Treg dabei unangetastet und werden überdies nicht durch Treg negativ in ihrem Potential zur T-Zellaktivierung beeinflusst <sup>[84]</sup>.

Tatsächlich initiieren murine pDC Tumorantigen-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellantworten <sup>[89]</sup>. Auch erste klinische Studien in Stadium-IV Melanompatienten zeigen, dass selbst kleine Zahlen Tumorantigen-beladener aktivierter pDC in der Lage sind, Antworten gegen das Tumorantigen zu induzieren <sup>[90]</sup>.

Neben immunogener Funktionen, verkörpern beide DC-Populationen auch eine zentrale Rolle in der Vermittlung von Toleranz. So wurde beispielsweise für humane pDC aus dem Thymus gezeigt, dass diese Subpopulation die Differenzierung naiver T-Zellen in natürlich vorkommende Foxp3<sup>+</sup> Treg bewirkt <sup>[91]</sup>. Zudem sind sowohl pDC <sup>[92]</sup> als auch kDC in der Lage Toleranz in der Peripherie zu vermitteln, indem sie beispielsweise die Differenzierung naiver T-Zellen in induzierte Treg einleiten <sup>[31]</sup>.

Die von Ito et al. beschriebenen tolerogenen Eigenschaften aktivierter pDC scheinen im Gegensatz zu den hier dargestellten Ergebnissen zu stehen <sup>[92]</sup>. Ito et al. testeten jedoch nicht die T-Zell-stimulatorische Kapazität der eingesetzten pDC in Gegenwart von Treg, sondern nutzten pDC über einen Zeitraum mehrerer Wochen für wiederholte Restimulationen naiver T-Zellen, die so zu IL-10-produzierenden induzierten Treg differenzierten. Die experimentellen Fragestellungen und Herangehensweisen waren somit von Grund auf verschieden und repräsentieren unterschiedliche Situationen während einer Immunantwort.

Der kritische Faktor für die Toleranzinduktion durch tolerogene kDC ist der Reifungsgrad der kDC <sup>[31]</sup>. Der genaue Mechanismus, der in T-Zellen die Differenzierung zu anergischen, IL-10-Produzenten mit suppressiver Kapazität induziert, war bisher nur unklar definiert. In dieser Arbeit sollte die funktionelle Rolle der ICOS-L- und der CD80/CD86-vermittelten Kostimulation in diesem Differenzierungsprozess untersucht und miteinander verglichen werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Blockade der ICOS/ICOS-L-Interaktion während der Primärstimulation naiver oder ruhender T-Zellen mit unreifen kDC, einen

essentiellen Schritt der Differenzierung zur suppressiven Treg verhindert: die Induktion von Anergie. Demgegenüber sind  $CD4^+CD45RO^+$  T-Effektorzellen weitaus weniger sensitiv gegenüber Kostimulation, da sowohl unreife als auch reife kDC gleichermaßen ihre Proliferation induzieren. Die reduzierte Abhängigkeit von DC-vermittelter Kostimulation, die T-Effektorzellen zur Aktivierung benötigen, wurde von Croft et al. belegt. Sie zeigten, dass die Aktivierung naiver T-Zellen ein T-Zellrezeptorsignal und gleichzeitiger Kostimulation bedarf, während die Restimulation einer Effektorzelle hauptsächlich von der Stimulation über den T-Zellrezeptor abhängt <sup>[34]</sup>. Aus diesem Grund unterscheidet sich die Proliferation von  $CD4^+CD45RO^+$  T-Effektorzellen nach Stimulation mit unreifen kDC nicht, wenn ICOS-L blockiert wird. Mit der reduzierten Sensitivität gegenüber Kostimulation korreliert auch der Verlust des ICOS-L-vermittelten Differenzierungsprozess zur induzierten Treg. In der vorliegenden Arbeit waren daher ausschließlich naive und ruhende T-Zellen in der Lage durch wiederholte Restimulation mit unreifen kDC, zu anergischen, IL-10-produzierenden induzierten Treg zu differenzieren.

Die Kostimulation über ICOS spielt somit eine wichtige Rolle in der funktionellen Ruhigstellung von T-Zellen durch tolerogene unreife kDC. Diese Beobachtung deckt sich nicht mit Ergebnissen von Dong et al., die für murine ICOS-defiziente T-Zellen eine Hyporeaktivität beschrieben <sup>[93]</sup>. Im Gegensatz dazu zeigten Burmeister et al., dass murine ICOS-defiziente T-Zellen keine veränderten proliferativen Eigenschaften im Vergleich zu wildtypischen T-Zellen aufwiesen <sup>[94]</sup>. In keiner der beiden Arbeiten wurde die T-Zellstimulation mit einem physiologischen Stimulus, wie dem durch reife oder unreife kDC durchgeführt: T-Zellen wurden hier stets polyklonal aktiviert. Dies könnte bedeuten, dass geringe Unterschiede in T-Zellreaktivitäten durch einen zu starken Stimulus überdeckt wurden. Hinzu kommt, dass die Funktion der ICOS-Kostimulation in der Maus von der im Menschen verschieden ist. Betrachtet man beispielsweise den Reifungsgrad von B-Zellen und die Höhe der IgM-Produktion in ICOS-defizienten Mäusen, findet man hierin keinen Unterschied zu wildtypischen Mäusen [95;96]. Dies ist im Gegensatz zu der humanen Situation, in der ein Verlust von ICOS einen drastischen Rückgang in der Zahl der B-Zellen bewirkt und überdies ihren Reifungsgrad und IgM-Sekretion reduziert <sup>[97]</sup>.

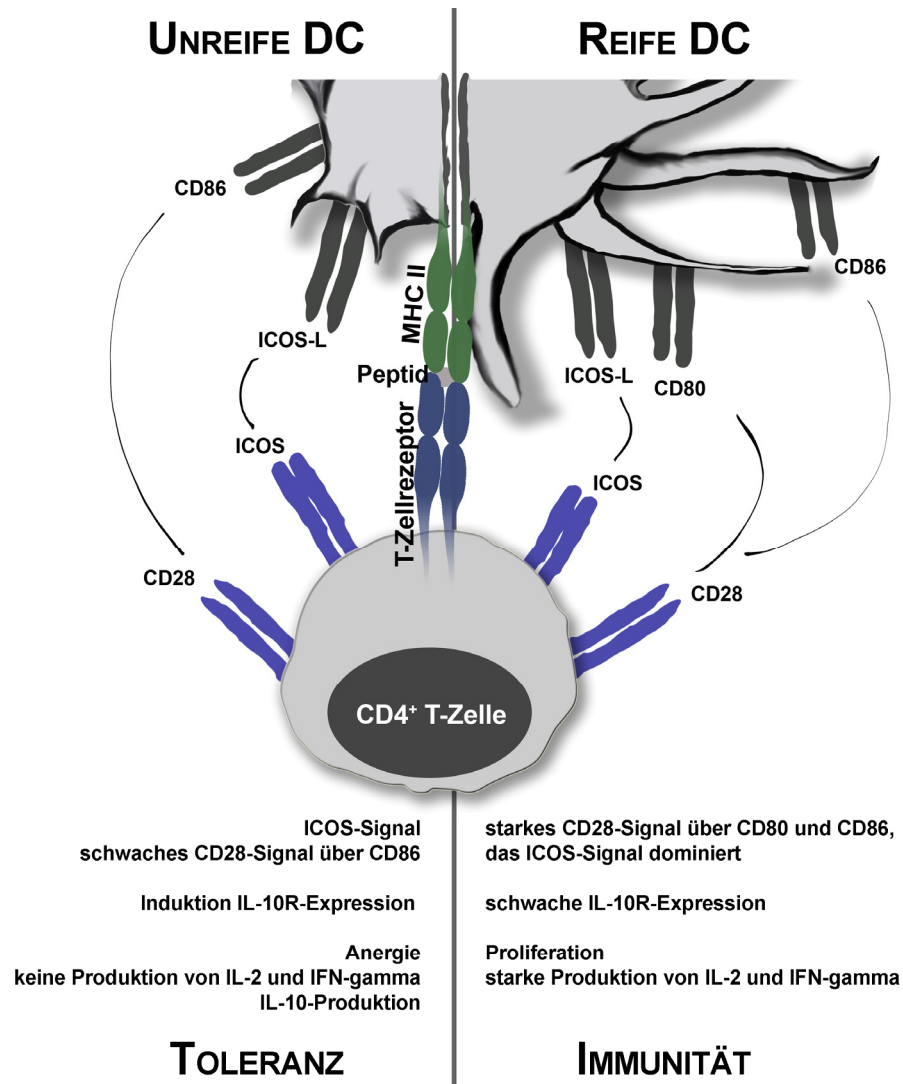
Wie wichtig die ICOS/ICOS-L-Interaktion für die Toleranzinduktion im Menschen ist, zeigten jedoch auch Ito et al. indem sie mit aktivierten pDC in ICOS-L-abhängiger Weise Anergie in naiven T-Zellen induzierten und so die Differenzierung zu IL-10-

Produzenten einleiteten, die letztlich suppressive Kapazität erlangten <sup>[92]</sup>. Im Gegensatz zu den hier vorgestellten Daten zu unreifen kDC, sind pDC somit in der Lage während inflammatorischer Situationen überschießende Immunantworten zu verhindern. Demgegenüber stehen tolerogene kDC, welche die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz im ruhenden Immunsystem realisieren. So wird zu jedem Zeitpunkt die Homöostase zwischen Immunität und Toleranz gewährleistet.

Arbeiten anderer Gruppen zeigten, dass die IL-10-Produktion von T-Zellen mit der Stimulation über ICOS korreliert <sup>[70]</sup>. Im Zusammenhang hierzu fanden Warnatz et al. eine verringerte IL-10-Sekretion durch ICOS-defiziente T-Zellen aus der Maus <sup>[98]</sup>. Diese Beobachtungen waren im Einklang mit Löhning et al., deren Arbeiten T-Zellen mit hoher ICOS-Expression als die stärksten IL-10-Produzenten darstellten. Die IL-10-Sekretion kann dann in autokriner Weise Anergie induzieren und so die weitere Differenzierung zur induzierten Treg einleiten oder vermitteln <sup>[99]</sup>. Vorangehende Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe zeigten jedoch, dass für eine IL-10-Produktion durch T-Zellen der ICOS-Signalweg nicht zwingend ist. So zeigten T-Zellen aus Patienten mit ICOS-Defizienz nach wiederholter Stimulation mit unreifen kDC eine mit gesunden Spendern vergleichbare IL-10 Produktion <sup>[100]</sup>. Diese Diskrepanz kann dadurch erklärt werden, dass die genannten Gruppen die T-Zellstimulation stets in polyklonaler Weise durchführten und nicht auf einen physiologischen Stimulus in Form Antigen-präsentierender Zellen zurückgriffen, wie es in dieser Arbeit getan wurde. Fehlendes IL-10 war in den hier vorgestellten Daten also nicht der ausschlaggebende Grund für den beobachteten Verlust der Anergieinduktion nach ICOS-L-Blockade. Zudem demonstrierten frühere Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe, dass die Substitution von IL-10 in Stimulationskulturen von T-Zellen aus Patienten mit ICOS-Defizienz keine Wiederherstellung der Anergie bewirkte. Andererseits bewirkte die Zugabe von IL-10 zur Primärstimulation von T-Zellen mit unreifen kDC ohne ICOS-L-Blockade eine Verstärkung der Anergieinduktion <sup>[100]</sup>. Die Tatsache, dass die Neutralisation von IL-10 in Kokulturen unreifer kDC und naiver T-Zellen die Proliferation der T-Zellen erhöht, ist im Einklang mit Arbeiten von Levings et al., welche ebenfalls die Notwendigkeit von IL-10 für die Induktion anergischer T-Zellen nachwiesen <sup>[71]</sup>.

Die Interaktion von ICOS und ICOS-L ist somit notwendig für eine IL-10-vermittelte Anergieinduktion (zusammengefasst in Abbildung 4.2). Wie die dargestellten Daten nahelegen, geschieht dies durch eine ICOS-L-abhängige Verstärkung der

Expression des IL-10 Rezeptors (IL-10R) auf aktivierten T-Zellen. So ist die höchste Expression des IL-10R auf T-Zellen zu detektieren, die durch unreife kDC stimuliert wurden. Interessanterweise wird diese hohe IL-10R Expression nicht durch die Stimulation mit terminal differenzierten kDC erreicht. Dies kann dahingehend interpretiert werden, dass ein ICOS-L-abhängiges Signal nur dann seine volle Wirkung entfalten kann, wenn dieses Signal ohne gleichzeitige starke CD28-Stimulation vermittelt wird. Diese Situation ist bei Stimulation mit unreifen kDC gegeben, die kein CD80 auf ihrer Oberfläche tragen, während die Expressionshöhe von ICOS-L der reifen kDC entspricht. Nur unter dieser Bedingung kann das ICOS-Signal dominieren, die Expression des IL-10R erhöhen und so die aktivierten T-Zellen für eine IL-10-Wirkung sensitivieren. Die Tatsache, dass unreife kDC bereits eine hohe CD86-Oberflächenexpression besitzen, die während der terminalen Differenzierung weiter gesteigert wird, lässt vermuten, dass für die IL-10R-Expression CD80 den relevanten CD28-Liganden darstellt. Im Kontext von Toleranzinduktion gibt es bislang keine Untersuchungen, die eine hierarchische Wirkungsweise von CD80- über CD86- und ICOS- vermittelter Kostimulation beschreiben. Interessant wäre hier beispielsweise die Frage, ob die Blockade der CD80-Kostimulation während der Stimulation naiver T-Zellen mit terminal differenzierten kDC eine ICOS-L-vermittelte Differenzierung zu induzierten Treg ermöglicht? Dass ein starkes CD28-Signal das ICOS-Signal überkommt, demonstriert die Stimulation mit terminal differenzierten kDC oder die Zugabe von anti-CD28 mAk zu anti-CD3/anti-ICOS mAK stimulierten T-Zellen. In beiden Fällen sind nur geringe Mengen von IL-10R auf den T-Zellen detektierbar. IL-10 kann unter diesen Bedingungen nicht wirken, die T-Zellen werden nicht anergisiert (Abbildung 4.2).



**Abbildung 4.2. Funktionelle Unterschiede dendritischer Zellen in Abhängigkeit ihres Reifungsgrades**

Die Funktion konventioneller dendritischer Zellen korreliert stark mit ihrem jeweiligen Reifungsgrad. Im unreifen Zustand (links) vermitteln kDC Toleranz, als reife DC (rechts) sind sie effektive Initiatoren von Immunität.

Welche Auswirkungen zeigt der Verlust der ICOS-Kostimulation in Patienten mit ICOS-Defizienz? Die ICOS-Defizienz gehört zu der Krankheitsgruppe der „Common variable immunodeficiency“ (CVID). Da bei dieser CVID-Form die Entwicklung von T-Zellen, inklusive der natürlich vorkommenden Treg, im Thymus nicht gestört ist, kommt es zu keiner systemischen Autoimmunität<sup>[97]</sup>. Besonders betroffen ist jedoch die Entwicklung und Funktion von B-Zellen. ICOS ist ein Schlüsselmolekül in der Interaktion zwischen T-Zellen und B-Zellen und in die Vermittlung von T-Zellhilfe involviert, welche die weitere Differenzierung von B-Zellen oder den Isotypenwechsel im Zuge der Antikörperproduktion beeinflusst<sup>[96]</sup>. Studien von Grimbacher et al. zeigten dementsprechend, dass der Verlust der ICOS/ICOS-L-Interaktion zu

reduzierten B-Zellzahlen in der Peripherie und drastisch verringerte Antikörpertiter im Serum von Patienten bewirkt <sup>[97]</sup>.

Im Darm lokalisierte induzierte Treg (Th3-Zellen) vermitteln „orale Toleranz“<sup>16</sup> gegenüber harmlosen Fremdantigenen <sup>[28]</sup>. Interessanterweise zeigen klinische Studien, dass Patienten mit ICOS-Defizienz eine Prävalenz für Darm-assoziierte Autoimmunerkrankungen aufweisen <sup>[97]</sup>. Die Relevanz Darm-vermittelter Immunregulation zeigten auch zwei kürzlich veröffentlichte Arbeiten. Sie beschrieben den Darm als Ursprung und gleichzeitigen Ort der Regulation der Th17-Differenzierung <sup>[101;102]</sup>. Die Th17-Zelllinie ist eine Untergruppe der CD4<sup>+</sup> T-Zellen und wird unter anderem charakterisiert durch ihre hohe Produktion der Zytokine IL-17 und IL-22. Neben ihrer protektiven Rolle zu frühen Zeitpunkten in der Immunabwehr (z.B. gegen bakterielle Erreger) sind Th17-Zellen auch als Effektorzellen in der Pathologie von Autoimmunerkrankungen beschrieben <sup>[103]</sup>. Shaw et al. demonstrierten, dass die Darm-Mikrobiota die Entstehung von Th17-Vorläuferzellen im Dünndarm bewirkt <sup>[101]</sup>. Zum anderen werden im Dünndarm auch regulative Kontrollmechanismen initiiert, die pro-inflammatorischen Th17-Zellen entgegenwirken. Hierzu gehört die Induktion von regulatorischen Th17-Zellen, die immun-suppressive Funktionen besitzen <sup>[102]</sup>. Der Verlust ICOS-vermittelter Toleranzinduktion in Patienten mit ICOS-Defizienz, kann die Homöostase zwischen Immunität und Toleranz im Darm stören und somit Ursprung Darm-assoziiierter Autoimmunität sein. Aufgrund des starken Defekts in der B-Zellentwicklung in Patienten mit ICOS-Defizienz, kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass eher dieser Defekt verantwortlich für die Entstehung Darm-assoziiierter Autoimmunerkrankungen ist, als die fehlende ICOS-vermittelte Toleranzinduktion <sup>[95;98]</sup>.

Das Wissen um die Notwendigkeit der ICOS/ICOS-L-Interaktion zur Differenzierung von induzierten Treg bedeutet ein genaueres Verstehen der Prozesse, die letztlich zur Ausbildung peripherer Toleranz führen. Derartiges Detailwissen kann Quelle neuer Therapieansätze sein oder bestehende Behandlungen verbessern.

Mit Antigenen beladene unreife kDC könnten Patienten appliziert werden. Die Abwesenheit starker Kostimulation und Gegenwart adäquater ICOS-Stimulation würde Toleranz in T-Zellen induzieren. Garrovillo et al. zeigten in Ratten, dass die

---

<sup>16</sup> Als „orale Toleranz“ bezeichnet man den Prozess, bei dem die orale Administration von Proteinen zu einer systemischen Hyporeaktivität gegenüber diesem Protein führt. Dieser Mechanismus ist vor allem für die Tolerisierung gegenüber Nahrungsmittelantigenen zentral.

intravenöse Applikation unreifer kDC sieben Tage vor einer Herz-Transplantation zu einer signifikant längeren Überlebensrate des Transplantates führte <sup>[104]</sup>. Derartige Studien verdeutlichen welches Potential in der Verwendung tolerogener kDC zur Verhinderung von Transplantat-Abstoßungen steckt. Die Applikation unreifer kDC zur Induktion von Toleranz ist jedoch limitiert: ist die Toleranzinduktion im immunologisch ruhenden Individuum möglich, tritt das Potential unreifer kDC bei der Behandlung von Autoimmunität bereits an seine Grenzen. Da unreife kDC nicht terminal differenziert sind, bewirkt das während der Autoimmunität vorherrschende inflammatorische Milieu die Aktivierung der kDC, die letztlich keine Toleranz, sondern Immunität induzieren würde. Die Modulation der Ausreifung von kDC durch das Zytokin IL-10 bildet einen Typ tolerogener kDC (IL-10-DC) aus, der resistent gegen die aktivierende Wirkung inflammatorischer Mediatoren ist <sup>[105]</sup>. IL-10-DC haben den weiteren Vorteil, dass sie auch in T-Effektorzellen die Differenzierung zu induzierten Treg bewirken können, während unreife kDC dies lediglich in naiven und ruhenden T-Zellen können.

Die Erkenntnis, dass die ICOS-L-Blockade die Induktion von Treg in der Peripherie verhindert, könnte andererseits auch bestehenden Toleranzmechanismen entgegenwirken. Nützlich wäre dies beispielsweise in Patienten mit Melanomerkrankungen. In der eigenen Arbeitsgruppe durchgeführte klinische Studien zeigten, dass mit Tumorantigen beladene reife kDC in Patienten Tumorantigen-spezifische T-Zellreaktionen induzieren. Diese Antworten sind lang persistierend, wenn Patienten in frühen Stadien therapiert werden <sup>[106]</sup>. In Spätstadium-Patienten mit Metastasen sind diese Antworten nur transient <sup>[107]</sup>. Der potentielle Grund hierfür ist die Erhöhung der Treg-Frequenzen in Spätstadium-Patienten, die mit einer grundlegenden Verringerung der T-Zellreaktivität einher geht <sup>[53]</sup>. Die Behandlung dieser Patienten mit Reagenzien, die eine Interaktion von ICOS und ICOS-L blockieren, könnte die Neuentstehung induzierter Treg in der Peripherie verhindern. So könnte die Etablierung einer tolerogenen Situation in Melanompatienten verlangsamt oder unterbunden werden und Tumorantigen-spezifische T-Zellreaktionen ermöglichen.

Weiter könnte die Vakzinierungstherapie im Tumorpatienten mit Tumorantigen beladenen reifen kDC, um die Applikation aktivierter Tumorantigen beladener pDC direkt in betroffenes Tumorgewebe erweitert und um die Gabe ICOS/ICOS-L-blockierender Reagenzien ergänzt werden. Die Kombination unterschiedlicher

DC-Subtypen zur Behandlung vereint ihre unterschiedlichen Eigenschaften und kann so eventuell die Diskrepanzen einzelner DC-Subtypen kompensieren. Tumorfern applizierte reife kDC wären so in der Lage Tumorantigen-spezifische T-Effektorzellen zu induzieren, die dann zum Tumorgewebe migrieren und hier auf aktivierte pDC treffen. Die im Tumorgewebe residierenden Treg schaffen durch ihre erhöhte Frequenz ein tolerogenes Milieu, trotz dessen aktivierte pDC die emigrierenden T-Effektorzellen effektiv restimulieren. Im Gegensatz zu reifen kDC geschähe dies ohne die Expansion vorhandener Treg. Die Behandlung des Patienten mit Agenzien, die eine Interaktion von ICOS und ICOS-L verhindern, würde ein Ausweiten der Tumor-abhängigen Toleranz verringern und gegen den Tumor gerichtete Immunantworten weiter fördern und etablieren.

In dieser Arbeit wurde das T-Zell-stimulatorische Potential aktivierter kDC und pDC in Gegenwart von Treg miteinander verglichen. Aktivierte pDC vermitteln ein zu geringes T-Zellrezeptor-Signal für eine funktionelle Treg-Aktivierung, so dass T-Effektorzellen in ihrer Gegenwart proliferieren können. Durch die Induktion von Treg-Proliferation geht auch die Treg-vermittelte Suppression in kDC-stimulierten Kokulturen verloren. Im Gegensatz dazu, bleiben Treg nach Stimulation mit aktivierten pDC jedoch anergisch. Zudem wurde der Prozess der Toleranzinduktion durch unreife kDC näher beleuchtet und gezeigt, dass die Interaktion von ICOS und ICOS-L essentiell für den Prozess der Differenzierung zu induzierten Treg ist. Durch die ICOS-abhängige Erhöhung der IL-10R-Expression, kann IL-10 auf stimulierte T-Zellen wirken und so den ersten Schritt zur Differenzierung induzierter Treg, die Induktion von Anergie, bewirken.

## 5 Zusammenfassung

Dendritische Zellen (DC) bilden das Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität. In Abhängigkeit ihres Aktivierungsgrades sind sie Mediatoren von Toleranz oder hocheffiziente Initiatoren von Immunität.

Innerhalb dieser Arbeit wurden konventionelle DC (kDC) und plasmazytoide DC (pDC) hinsichtlich ihrer T-Zellstimulation in An- und Abwesenheit regulatorischer T-Zellen (Treg) verglichen. Aktivierte kDC sind starke T-Zellstimulatoren, die Treg-Proliferation induzieren. Die proliferierenden Treg verlieren ihre suppressorische Fähigkeit, weshalb T-Effektorzellen nach kDC-Stimulation in Treg-Anwesenheit proliferieren und expandieren. Im Gegensatz dazu vermitteln aktivierte pDC nur eine schwache T-Zellstimulation, die aber ausreicht um die Proliferation von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>T-Effektorzellen auszulösen. Aktivierte pDC sind allerdings nicht in der Lage die Anergie von Treg zu überkommen und ihre Proliferation zu induzieren. Trotz ihrer geringen T-Zell-stimulatorischen Kapazität sind pDC aber in der Lage die Proliferation und Expansion von T-Effektorzellen in Gegenwart von Treg zu bewirken. Diese Tatsache konnte auf das insuffiziente pDC-vermittelte T-Zellrezeptorsignal für Treg zurückgeführt werden, das eine funktionelle pDC-vermittelte Treg-Aktivierung nicht ermöglicht.

In Abwesenheit einer Entzündung vermitteln DC Toleranz. So sind unreife kDC in der Lage Treg in der Peripherie zu induzieren. Diese Arbeit zeigt, dass im Kontext der Stimulation mit unreifen kDC die ICOS-L-vermittelte Kostimulation essentiell für die IL-10-Rezeptor-Expression auf T-Zellen ist. Eine gleichzeitige starke CD28-Kostimulation überkommt die ICOS-vermittelten Effekte und wirkt der IL-10R-Expression entgegen. Daher kann nur nach Stimulation mit unreifen kDC IL-10 auf die aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen einwirken und so ein anergischer Phänotyp etabliert werden. Diese Anergieinduktion ist Teil des Differenzierungsprozesses zu IL-10-produzierenden, suppressiven Treg. Die Interaktion von ICOS und ICOS-L ist somit ein zentraler Mechanismus für die Aufrechterhaltung peripherer Toleranz.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

CD	„Cluster of Differentiation“ ; standardisierte Nomenklatur für Zelloberflächenstrukturen
CTLA	„Cytotoxic T-Lymphocyte-Antigen“
DC	„Dendritic cell“; dendritische Zelle(n)
DNA	„Deoxyribonucleic acid“; Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	„Enzyme-linked immunosorbent assay“
FACS	„Fluorescence-activated cell scanner“; Durchflusszytometer
FCS	„Fetal calf serum“; fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszein 5-isothiozyanat
FoxP3	FORKHEAD BOX PROTEIN 3
FSC	„Forward Scatter“
g	Erdbeschleunigung
GM-CSF	„Granulocytes-macrophages colony stimulating factor“
HLA	„Human leukocyte antigen“
HSC	„Hematopoetic stem cell“
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPEX	„Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance“
kDC	konventionelle dendritische Zelle
LPS	Lipopolysaccharide
mAK	monoklonaler Antikörper
MACS	„Magnetic activated cell sorter“
MEM	„Minimal essential medium“
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex; „Major histocompatibility complex“
min	Minute
PBMC	periphere mononukleare Blutzellen; „Peripheral blood mononuclear cell“
PBS	„Phosphate buffered saline“
pDC	plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerytrin
RNA	Ribonukleinsäure

SSC	“Sidewards Scatter”
TGF	„Transforming growth factor“
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Treg	regulatorische T-Zelle(n)
U	„Unit“ (internationale Einheit)

## 7 Referenzen

### Reference List

- [1] Travis J: Origins. On the origin of the immune system. *Science* 1-5-2009;324:580-582.
- [2] Kawai T, Akira S: The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010;11:373-384.
- [3] Wiens M, Korzhev M, Perovic-Ottstadt S, Luthringer B, Brandt D, Klein S, Muller WE: Toll-like receptors are part of the innate immune defense system of sponges (demospongiae: Porifera). *Mol Biol Evol* 2007;24:792-804.
- [4] Corcoran AE: Immunoglobulin locus silencing and allelic exclusion. *Semin Immunol* 2005;17:141-154.
- [5] Jung D, Alt FW: Unraveling V(D)J recombination; insights into gene regulation. *Cell* 23-1-2004;116:299-311.
- [6] Klein U, Goossens T, Fischer M, Kanzler H, Braeuninger A, Rajewsky K, Kuppers R: Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells. *Immunol Rev* 1998;162:261-280.
- [7] Lane P: Development of B-cell memory and effector function. *Curr Opin Immunol* 1996;8:331-335.
- [8] Sitnicka E: From the bone marrow to the thymus: the road map of early stages of T-cell development. *Crit Rev Immunol* 2009;29:487-530.
- [9] Kyewski B, Klein L: A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol* 2006;24:571-606.
- [10] Luning Prak ET, Monestier M, Eisenberg RA: B cell receptor editing in tolerance and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci* 2011;1217:96-121.
- [11] Parker DC: T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol* 1993;11:331-360.
- [12] Mueller DL: Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat Immunol* 2010;11:21-27.
- [13] Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA: FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 2010;10:490-500.
- [14] 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.
- [15] Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY: Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. *Annu Rev Immunol* 6-1-2012.
- [16] Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, Beavo JA, Rudensky AY: Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* 15-2-2007;445:771-775.
- [17] Lin W, Haribhai D, Relland LM, Truong N, Carlson MR, Williams CB, Chatila TA: Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3. *Nat Immunol* 2007;8:359-368.
- [18] Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD: The immune dysregulation, polyendocrinopathy,

- enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001;27:20-21.
- [19] Ziegler SF: FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol* 2006;24:209-226.
- [20] Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, Passerini L, Steiner TS, Bacchetta R, Roncarolo MG, Levings MK: Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol* 2007;19:345-354.
- [21] 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. *Blood* 1-9-2007;110:1550-1558.
- [22] Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH: Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 4-6-2001;193:1285-1294.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di MD, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, Hopner S, Centonze D, Bernardi G, Dell'Acqua ML, Rossini PM, Battistini L, Rotzschke O, Falk K: Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 15-8-2007;110:1225-1232.
- [26] McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, Byrne MC: CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002;16:311-323.
- [27] Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK: Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 2006;212:28-50.
- [28] Weiner HL: Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect* 2001;3:947-954.
- [29] Huter EN, Punkosdy GA, Glass DD, Cheng LI, Ward JM, Shevach EM: TGF-beta-induced Foxp3+ regulatory T cells rescue scurfy mice. *Eur J Immunol* 2008;38:1814-1821.
- [30] Haribhai D, Williams JB, Jia S, Nickerson D, Schmitt EG, Edwards B, Ziegelbauer J, Yassai M, Li SH, Relland LM, Wise PM, Chen A, Zheng YQ, Simpson PM, Gorski J, Salzman NH, Hessner MJ, Chatila TA, Williams CB: A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity. *Immunity* 22-7-2011;35:109-122.
- [31] 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.
- [32] Banchereau J, Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 19-3-1998;392:245-252.
- [33] Jonuleit H, Kuhn U, Muller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, Knop J, Enk AH: Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol* 1997;27:3135-3142.

- [34] Croft M: Activation of naive, memory and effector T cells. *Curr Opin Immunol* 1994;6:431-437.
- [35] Kalinski P, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML: T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* 1999;20:561-567.
- [36] Suss G, Shortman K: A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J Exp Med* 1-4-1996;183:1789-1796.
- [37] Ueno H, Klechevsky E, Morita R, Asford C, Cao T, Matsui T, Di PT, Connolly J, Fay JW, Pascual V, Palucka AK, Banchereau J: Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev* 2007;219:118-142.
- [38] Rossi M, Young JW: Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol* 1-8-2005;175:1373-1381.
- [39] Belz GT, Nutt SL: Transcriptional programming of the dendritic cell network. *Nat Rev Immunol* 2012;12:101-113.
- [40] Cisse B, Caton ML, Lehner M, Maeda T, Scheu S, Locksley R, Holmberg D, Zweier C, den Hollander NS, Kant SG, Holter W, Rauch A, Zhuang Y, Reizis B: Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development. *Cell* 3-10-2008;135:37-48.
- [41] Ghosh HS, Cisse B, Bunin A, Lewis KL, Reizis B: Continuous expression of the transcription factor e2-2 maintains the cell fate of mature plasmacytoid dendritic cells. *Immunity* 14-12-2010;33:905-916.
- [42] Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ: The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 11-6-1999;284:1835-1837.
- [43] Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, Colonna M: Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 1999;5:919-923.
- [44] Liu YJ: IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 2005;23:275-306.
- [45] Dzionek A, Inagaki Y, Okawa K, Nagafune J, Rock J, Sohma Y, Winkels G, Zysk M, Yamaguchi Y, Schmitz J: Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions. *Hum Immunol* 2002;63:1133-1148.
- [46] Krug A, Towarowski A, Britsch S, Rothenfusser S, Hornung V, Bals R, Giese T, Engelmann H, Endres S, Krieg AM, Hartmann G: Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol* 2001;31:3026-3037.
- [47] Izaguirre A, Barnes BJ, Amrute S, Yeow WS, Megjugorac N, Dai J, Feng D, Chung E, Pitha PM, Fitzgerald-Bocarsly P: Comparative analysis of IRF and IFN-alpha expression in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2003;74:1125-1138.
- [48] Romani N, Brunner PM, Stingl G: Changing Views of the Role of Langerhans Cells. *J Invest Dermatol* 5-1-2012.
- [49] Schakel K, von KM, Hansel A, Ebling A, Schulze L, Haase M, Semmler C, Sarfati M, Barclay AN, Randolph GJ, Meurer M, Rieber EP: Human 6-sulfo LacNAc-expressing dendritic cells are principal producers of early interleukin-12 and are controlled by erythrocytes. *Immunity* 2006;24:767-777.
- [50] Poulin LF, Salio M, Griessinger E, njos-Afonso F, Craciun L, Chen JL, Keller AM, Joffre O, Zelenay S, Nye E, Le MA, Faure F, Donckier V, Sancho D, Cerundolo V, Bonnet D, Reis e

- Sousa: Characterization of human DNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8alpha+ dendritic cells. *J Exp Med* 7-6-2010;207:1261-1271.
- [51] Cheong C, Matos I, Choi JH, Dandamudi DB, Shrestha E, Longhi MP, Jeffrey KL, Anthony RM, Kluger C, Nchinda G, Koh H, Rodriguez A, Idoyaga J, Pack M, Velinzon K, Park CG, Steinman RM: Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell* 29-10-2010;143:416-429.
- [52] 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.
- [53] Correll A, Tuettenberg A, Becker C, Jonuleit H: Increased regulatory T-cell frequencies in patients with advanced melanoma correlate with a generally impaired T-cell responsiveness and are restored after dendritic cell-based vaccination. *Exp Dermatol* 2010;19:e213-e221.
- [54] Coccia EM, Severa M, Giacomini E, Monneron D, Remoli ME, Julkunen I, Cella M, Lande R, Uze G: Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 2004;34:796-805.
- [55] Schwab N, Zozulya AL, Kieseier BC, Toyka KV, Wiendl H: An imbalance of two functionally and phenotypically different subsets of plasmacytoid dendritic cells characterizes the dysfunctional immune regulation in multiple sclerosis. *J Immunol* 1-5-2010;184:5368-5374.
- [56] Piccirillo CA, Letterio JJ, Thornton AM, McHugh RS, Mamura M, Mizuhara H, Shevach EM: CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J Exp Med* 15-7-2002;196:237-246.
- [57] Tarbell KV, Petit L, Zuo X, Toy P, Luo X, Mqadmi A, Yang H, Suthanthiran M, Mojsos S, Steinman RM: Dendritic cell-expanded, islet-specific CD4+ CD25+ CD62L+ regulatory T cells restore normoglycemia in diabetic NOD mice. *J Exp Med* 22-1-2007;204:191-201.
- [58] Yamazaki S, Patel M, Harper A, Bonito A, Fukuyama H, Pack M, Tarbell KV, Talmor M, Ravetch JV, Inaba K, Steinman RM: Effective expansion of alloantigen-specific Foxp3+ CD25+ CD4+ regulatory T cells by dendritic cells during the mixed leukocyte reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 21-2-2006;103:2758-2763.
- [59] Yamazaki S, Iyoda T, Tarbell K, Olson K, Velinzon K, Inaba K, Steinman RM: Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med* 21-7-2003;198:235-247.
- [60] Pasare C, Medzhitov R: Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 14-2-2003;299:1033-1036.
- [61] Housley WJ, Adams CO, Nichols FC, Puddington L, Lingenheld EG, Zhu L, Rajan TV, Clark RB: Natural but not inducible regulatory T cells require TNF-alpha signaling for in vivo function. *J Immunol* 15-6-2011;186:6779-6787.
- [62] Boschetti G, Nancey S, Sardi F, Roblin X, Flourie B, Kaiserlian D: Therapy with anti-TNFalpha antibody enhances number and function of Foxp3(+) regulatory T cells in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2011;17:160-170.
- [63] Bacher N, Graulich E, Jonuleit H, Grabbe S, Steinbrink K: Interferon-alpha abrogates tolerance induction by human tolerogenic dendritic cells. *PLoS One* 2011;6:e22763.
- [64] Zhu J, Paul WE: Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res* 2010;20:4-12.
- [65] Zhu J, Yamane H, Paul WE: Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annu Rev Immunol* 2010;28:445-489.

- [66] Wang R, Kozhaya L, Mercer F, Khaitan A, Fujii H, Unutmaz D: Expression of GARP selectively identifies activated human FOXP3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 11-8-2009;106:13439-13444.
- [67] Tang Q, Boden EK, Henriksen KJ, Bour-Jordan H, Bi M, Bluestone JA: Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol* 2004;34:2996-3005.
- [68] Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA: CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 1996;14:233-258.
- [69] Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, Kroczeck RA: ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 21-1-1999;397:263-266.
- [70] Witsch EJ, Peiser M, Hutloff A, Buchner K, Dorner BG, Jonuleit H, Mages HW, Kroczeck RA: ICOS and CD28 reversely regulate IL-10 on re-activation of human effector T cells with mature dendritic cells. *Eur J Immunol* 2002;32:2680-2686.
- [71] 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.
- [72] Boonstra A, Sselin-Paturel C, Gilliet M, Crain C, Trinchieri G, Liu YJ, O'Garra A: Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *J Exp Med* 6-1-2003;197:101-109.
- [73] Grouard G, Risoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ: The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 17-3-1997;185:1101-1111.
- [74] Pasare C, Medzhitov R: Toll-like receptors and acquired immunity. *Semin Immunol* 2004;16:23-26.
- [75] Ouabed A, Hubert FX, Chabannes D, Gautreau L, Heslan M, Josien R: Differential control of T regulatory cell proliferation and suppressive activity by mature plasmacytoid versus conventional spleen dendritic cells. *J Immunol* 1-5-2008;180:5862-5870.
- [76] Gilliet M, Cao W, Liu YJ: Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 2008;8:594-606.
- [77] Chen SC, de GM, Kinsley D, Laverty M, McClanahan T, Arreaza M, Gustafson EL, Teunissen MB, de Rie MA, Fine JS, Kraan M: Expression of chemokine receptor CXCR3 by lymphocytes and plasmacytoid dendritic cells in human psoriatic lesions. *Arch Dermatol Res* 2010;302:113-123.
- [78] Nestle FO, Conrad C, Tun-Kyi A, Homey B, Gombert M, Boyman O, Burg G, Liu YJ, Gilliet M: Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *J Exp Med* 4-7-2005;202:135-143.
- [79] Farkas L, Beiske K, Lund-Johansen F, Brandtzaeg P, Jahnsen FL: Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon- alpha/beta-producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions. *Am J Pathol* 2001;159:237-243.
- [80] Bennett L, Palucka AK, Arce E, Cantrell V, Borvak J, Banchereau J, Pascual V: Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med* 17-3-2003;197:711-723.
- [81] Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, Kang HS, Chung Y, Pappu BP, Shah B, Chang SH, Schluns KS, Watowich SS, Feng XH, Jetten AM, Dong C: Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity* 18-7-2008;29:44-56.

- [82] Bird JJ, Brown DR, Mullen AC, Moskowitz NH, Mahowald MA, Sider JR, Gajewski TF, Wang CR, Reiner SL: Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. *Immunity* 1998;9:229-237.
- [83] Noel G, Brinster C, Semana G, Bruniquel D: Modulation of the TCR stimulation strength can render human activated CD4+ T cells suppressive. *Int Immunol* 2009;21:1025-1036.
- [84] Houot R, Perrot I, Garcia E, Durand I, Lebecque S: Human CD4+CD25high regulatory T cells modulate myeloid but not plasmacytoid dendritic cells activation. *J Immunol* 1-5-2006;176:5293-5298.
- [85] Schwartz RH: Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nat Immunol* 2005;6:327-330.
- [86] Hsieh CS, Liang Y, Tyznik AJ, Self SG, Liggitt D, Rudensky AY: Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors. *Immunity* 2004;21:267-277.
- [87] Carter JD, Calabrese GM, Naganuma M, Lorenz U: Deficiency of the Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1 (SHP-1) causes enrichment of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 1-6-2005;174:6627-6638.
- [88] Moran AE, Holzappel KL, Xing Y, Cunningham NR, Maltzman JS, Punt J, Hogquist KA: T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse. *J Exp Med* 6-6-2011;208:1279-1289.
- [89] Lou Y, Liu C, Kim GJ, Liu YJ, Hwu P, Wang G: Plasmacytoid dendritic cells synergize with myeloid dendritic cells in the induction of antigen-specific antitumor immune responses. *J Immunol* 1-2-2007;178:1534-1541.
- [90] Schreibelt G, Tel J, Sliepen KH, Itez-Ribas D, Figdor CG, Adema GJ, de V, I: Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2010;59:1573-1582.
- [91] Hanabuchi S, Ito T, Park WR, Watanabe N, Shaw JL, Roman E, Arima K, Wang YH, Voo KS, Cao W, Liu YJ: Thymic stromal lymphopoietin-activated plasmacytoid dendritic cells induce the generation of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus. *J Immunol* 15-3-2010;184:2999-3007.
- [92] Ito T, Yang M, Wang YH, Lande R, Gregorio J, Perng OA, Qin XF, Liu YJ, Gilliet M: Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J Exp Med* 22-1-2007;204:105-115.
- [93] Dong C, Juedes AE, Temann UA, Shresta S, Allison JP, Ruddle NH, Flavell RA: ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature* 4-1-2001;409:97-101.
- [94] Burmeister Y, Lischke T, Dahler AC, Mages HW, Lam KP, Coyle AJ, Kroczeck RA, Hutloff A: ICOS controls the pool size of effector-memory and regulatory T cells. *J Immunol* 15-1-2008;180:774-782.
- [95] Tafuri A, Shahinian A, Bladt F, Yoshinaga SK, Jordana M, Wakeham A, Boucher LM, Bouchard D, Chan VS, Duncan G, Odermatt B, Ho A, Itie A, Horan T, Whoriskey JS, Pawson T, Penninger JM, Ohashi PS, Mak TW: ICOS is essential for effective T-helper-cell responses. *Nature* 4-1-2001;409:105-109.
- [96] McAdam AJ, Greenwald RJ, Levin MA, Chernova T, Malenkovich N, Ling V, Freeman GJ, Sharpe AH: ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature* 4-1-2001;409:102-105.
- [97] Grimbacher B, Hutloff A, Schlesier M, Glocker E, Warnatz K, Drager R, Eibel H, Fischer B, Schaffer AA, Mages HW, Kroczeck RA, Peter HH: Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat Immunol* 2003;4:261-268.

- [98] Warnatz K, Bossaller L, Salzer U, Skrabi-Baumgartner A, Schwinger W, van der BM, van Dongen JJ, Orłowska-Volk M, Knoth R, Durandy A, Draeger R, Schlesier M, Peter HH, Grimbacher B: Human ICOS deficiency abrogates the germinal center reaction and provides a monogenic model for common variable immunodeficiency. *Blood* 15-4-2006;107:3045-3052.
- [99] Lohning M, Hutloff A, Kallinich T, Mages HW, Bonhagen K, Radbruch A, Hamelmann E, Kroczeck RA: Expression of ICOS in vivo defines CD4<sup>+</sup> effector T cells with high inflammatory potential and a strong bias for secretion of interleukin 10. *J Exp Med* 20-1-2003;197:181-193.
- [100] Tuettenberg A, Huter E, Hubo M, Horn J, Knop J, Grimbacher B, Kroczeck RA, Stoll S, Jonuleit H: The role of ICOS in directing T cell responses: ICOS-dependent induction of T cell anergy by tolerogenic dendritic cells. *J Immunol* 15-3-2009;182:3349-3356.
- [101] Shaw MH, Kamada N, Kim YG, Nunez G: Microbiota-induced IL-1beta, but not IL-6, is critical for the development of steady-state TH17 cells in the intestine. *J Exp Med* 13-2-2012;209:251-258.
- [102] Esplugues E, Huber S, Gagliani N, Hauser AE, Town T, Wan YY, O'Connor W, Jr., Rongvaux A, Van RN, Haberman AM, Iwakura Y, Kuchroo VK, Kolls JK, Bluestone JA, Herold KC, Flavell RA: Control of TH17 cells occurs in the small intestine. *Nature* 28-7-2011;475:514-518.
- [103] Stockinger B, Veldhoen M: Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol* 2007;19:281-286.
- [104] Garrovillo M, Ali A, Depaz HA, Gopinathan R, Oluwole OO, Hardy MA, Oluwole SF: Induction of transplant tolerance with immunodominant allopeptide-pulsed host lymphoid and myeloid dendritic cells. *Am J Transplant* 2001;1:129-137.
- [105] Steinbrink K, Wolf M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH: Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* 15-11-1997;159:4772-4780.
- [106] Tuettenberg A, Becker C, Huter E, Knop J, Enk AH, Jonuleit H: Induction of strong and persistent MelanA/MART-1-specific immune responses by adjuvant dendritic cell-based vaccination of stage II melanoma patients. *Int J Cancer* 15-5-2006;118:2617-2627.
- [107] Jonuleit H, Giesecke-Tuettenberg A, Tuting T, Thurner-Schuler B, Stuge TB, Paragnik L, Kandemir A, Lee PP, Schuler G, Knop J, Enk AH: A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection. *Int J Cancer* 15-7-2001;93:243-251.

## **8 Lebenslauf**

---



## **9 Anhänge**

---