

**AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR CHIRURGIE**

**DIREKTOR: PROF. DR. MED. HANS JÜRGEN SCHLITT**

**LEITER EXPERIMENTELLE CHIRURGIE: PROF. EDWARD K. GEISSLER, PHD**

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**EVALUIERUNG CHARAKTERISTISCHER EXPRESSIONSMUSTER  
IFN- $\gamma$  INDUZIERTER MONOZYTÄRER ZELLEN**

**Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg**

vorgelegt von  
Manuel Alexander Weber

2011

**Dekan:**

**1. Berichterstatter:**

**2. Berichterstatter:**

**Tag der mündlichen Prüfung:**

**Prof. Dr. Dr. Torsten Reichert**

**Prof. Edward Geissler, PhD**

**Prof. Dr. Marina Kreutz**

**5. Dezember 2011**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
1.1	DAS IMMUNSYSTEM IM ZENTRUM DES KLINISCHEN INTERESSES	5
1.2	MAKROPHAGEN UND IHRE STELLUNG IM IMMUNSYSTEM	7
1.3	STIC ZELLEN	14
1.4	REGULATORISCHE T-ZELLEN	15
1.4.1	<i>Selbsttoleranz im Immunsystem</i>	15
1.4.2	<i>Charakterisierung und Isolierung von <math>T_{reg}</math> Zellen</i>	16
1.4.3	<i>Naturally occurring und induced <math>T_{reg}</math> Zellen</i>	17
1.5	ZYTOKINE	18
<b>2</b>	<b>FRAGESTELLUNG</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>20</b>
3.1	ZELLKULTUR	20
3.1.1	<i>Präparation und Kultur der STIC Zellen</i>	20
3.1.2	<i>Cokultur mit Splenozyten</i>	22
3.1.3	<i>CFSE Färbung</i>	24
3.1.4	<i>MACS</i>	25
3.1.5	<i>Bestimmung der Splenozytenzahl</i>	27
3.1.6	<i>FACS / Durchflusszytometrie</i>	28
3.2	ELISA	29
3.2.1	<i>Durchführung des IL-10 ELISA</i>	31
3.2.2	<i>Durchführung des IL-4 ELISA</i>	34
3.2.3	<i>Durchführung des IL-12 ELISA</i>	36
3.2.4	<i>Durchführung des IFN-<math>\gamma</math> ELISA</i>	38
3.2.5	<i>Durchführung des TGF-<math>\beta</math> ELISA</i>	40
3.3	DNA/RNA MICROARRAY	42
3.4	STATISTIK	44
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>44</b>
4.1	ZELLZÄHLUNG UND DURCHFLUSSZYTOMETRIE DER STIC ZELLKULTUR	46
4.2	ZYTOKINE IN DER STIC ZELLKULTUR (ELISA)	52
4.3	BEDEUTUNG DES ZYTOKINS IL-10	66
4.4	VERÄNDERUNG DER GENTRANSKRPTION BEI STIC ZELLEN	71
4.5	OBERFLÄCHENMARKER DER STIC ZELLEN	76
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>77</b>
5.1	CHARAKTERISIERUNG DER STIC ZELLEN	77
5.2	LYMPHOZYTEN ZELLZAHLEN	78
5.3	REGULATORISCHE T-ZELLEN	80
5.3.1	<i>Wirkung der <math>T_{reg}</math> Zellen</i>	81
5.3.2	<i>Wechselwirkungen zwischen STICs und <math>T_{reg}</math> Zellen</i>	82
5.4	ZYTOKINE	83
5.4.1	<i>IL-4</i>	84
5.4.2	<i>IL-12</i>	84
5.4.3	<i>IL-2</i>	85
5.4.4	<i>IL-10</i>	87
5.4.5	<i>TGF-<math>\beta</math></i>	90
5.4.6	<i>M-CSF</i>	93
5.4.7	<i>Interferon-<math>\gamma</math></i>	95
5.5	MICROARRAY	96
5.5.1	<i>NGP</i>	97
5.5.2	<i>S100a8 und S100a9</i>	98
5.5.3	<i>MGL1 und MGL 2</i>	99
5.5.4	<i>PD-1, PD-2, PD-L1 und PD-L2</i>	100

5.5.5	<i>Granzyme</i> .....	101
5.5.6	<i>GITRL</i> .....	102
5.5.7	<i>OX40L</i> .....	103
5.5.8	<i>Herunterregulierte Genexpressionen</i> .....	104
<b>6</b>	<b>WERTUNG UND AUSBLICK</b> .....	<b>106</b>
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>108</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>109</b>
<b>9</b>	<b>LEBENS LAUF</b> .....	<b>110</b>
<b>10</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>111</b>
<b>11</b>	<b>CHEMIKALIEN- UND GERÄTEVERZEICHNIS</b> .....	<b>112</b>
<b>12</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>115</b>

# **1 Einleitung**

## **1.1 Das Immunsystem im Zentrum des klinischen Interesses**

Seit 1954 erstmals eine Niere erfolgreich transplantiert wurde, hat die Transplantationschirurgie zunehmend an Bedeutung gewonnen [4]. So wurde 1963 erstmals eine Leber und 1967 von Christiaan Barnard erstmals ein Herz beim Menschen transplantiert [4]. Die chirurgischen Operationstechniken konnten in den letzten Jahrzehnten verbessert und standardisiert werden, sodass inzwischen Transplantationen von Herz, Leber und Niere mit vertretbarem Operationsrisiko möglich sind und regelmäßig durchgeführt werden. Langzeiterfolge sind aber nur bei Beherrschung der mit einer Organtransplantation einhergehenden immunologischen Schwierigkeiten möglich.

Durch die Fortschritte in der Transplantationsmedizin werden heute für Patienten in fast jedem Lebensalter neue therapeutische Möglichkeiten eröffnet. So wurde im Oktober 2008 unter Leitung von Professor Schlitt am Universitätsklinikum Regensburg die erste Lebertransplantation bei einem Neugeborenen in Bayern durchgeführt [5]. Vor kurzem konnten unter Leitung von Professor Biemer in München sogar zwei Arme erfolgreich transplantiert werden [6]. Dies ist sowohl operationstechnisch, als auch immunologisch aufgrund der großen Hautanteile und der damit verbundenen starken Neigung zu Abstoßungsreaktionen eine besondere Herausforderung.

Um Abstoßungsreaktionen zu vermeiden, wurden in den letzten Jahrzehnten unterschiedliche Behandlungsschemata entwickelt, wobei in der Regel eine lebenslange immunsuppressive Therapie erforderlich ist. Ein wesentlicher Meilenstein für die Transplantationschirurgie war die Entdeckung der immunsuppressiven Wirkung von Cyclosporin A im Jahre 1976 [7]. Durch die klinische Einführung dieser Substanz im Dezember 1980 konnte ein längerfristiges Überleben vieler transplantierten Organe erreicht werden [8]. Neben Tacrolimus ist Cyclosporin A der wichtigste Vertreter der Calcineurin Inhibitoren, die bis heute bei der Behandlung von organtransplantierten Patienten eine wichtige Rolle spielen [7]. Daneben kommen viele weitere Substanzklassen zum Einsatz, die immunsuppressive Potenz zeigen. Dies sind neben Steroiden auch Antimetabolite wie Methotrexat, mTOR Inhibitoren wie Rapamycin, Antikörper und Small molecules

[7]. Durch diese Substanzen können hyperakute oder akute Abstoßungsreaktionen meist gut beherrscht werden. Weniger erfolgreich sind diese Therapiemaßnahmen bei der Eindämmung der chronischen Abstoßungsreaktion, welche oft begrenzend auf die Langzeitfunktion von Transplantaten wirkt. Weiterhin wird der Langzeiterfolg von Organtransplantationen durch die oft erheblichen Nebenwirkungen der meist lebenslang zu verabreichenden immunsuppressiven Medikation bestimmt [7]. In diesem Zusammenhang ist die Nephrotoxizität von Calcineurin Inhibitoren, das Auftreten von Diabetes und Osteoporose durch Steroidgabe, sowie die durch einige Immunsuppressiva begünstigte HCV Reinfektion von transplantierten Lebern zu nennen [7]. Außerdem ist eine erhöhte Rate von Infektionskrankheiten [9] und Malignomen [10] bei Transplantatpatienten bekannt.

Wie bei Organtransplantaten findet sich auch bei Autoimmunerkrankungen eine für den Patienten schädliche Form der Immunreaktion. Während bei der Organtransplantation das transplantierte Gewebe vom Immunsystem korrekterweise als „fremd“ erkannt und bekämpft wird, kommt es bei Autoimmunerkrankungen dazu, dass körpereigene Gewebeanteile nicht als „eigen“ akzeptiert werden und ebenfalls einer immunologischen Zerstörung zum Opfer fallen. In ihrer Konsequenz sind beide Reaktionen für den Patienten negativ und können beide durch immunsuppressive Medikamente behandelt werden. Da dadurch auch die gewünschte Immunreaktion gegen Pathogene unterdrückt wird, kann eine vollständige Suppression der pathologischen Immunreaktion nur selten erreicht werden. Um die Prognose beider Patientengruppen verbessern zu können, muss zum einen Grundlagenforschung durchgeführt werden, um die Physiologie und die Pathophysiologie des Immunsystems besser zu verstehen. Zum anderen muss nach neuen immunsuppressiven oder immunmodulatorischen Therapien gesucht werden, die gezielt nur den pathologischen Anteil der Immunreaktion unterdrücken und somit weniger Nebenwirkungen im klinischen Einsatz zeigen. Das Ziel dieser Bemühungen ist ein Verzicht auf eine lebenslange Medikamentengabe durch eine „Reprogrammierung“ des Immunsystems. Dadurch könnten neben der Verbesserung der Lebensqualität der Patienten auch Kosten im Gesundheitssystem eingespart werden und die Transplantationsmedizin könnte größeren Teilen der Weltbevölkerung zugänglich gemacht werden.

Ein vielversprechender immunmodulatorischer Ansatz ist die zelluläre Immuntherapie. Hutchinson et al. konnten in Zusammenarbeit mit Geissler et al. zeigen, dass durch die Transfusion von speziell differenzierten Makrophagen die erforderliche Menge an Immunsuppressiva bei allogenen nierentransplantierten Patienten deutlich reduziert werden kann [11, 12]. In ersten klinischen Pilotstudien wurden aus der Milz von hirntoten Organspendern beziehungsweise aus dem Blut von Lebendspendern monozytäre Zellen isoliert. Die so gewonnenen Zellen wurden anschließend *in vitro* kultiviert und dann den Organempfängern, in einer Studie vor, in der anderen nach erfolgter Transplantation injiziert. Die Verträglichkeit dieses Therapieansatzes konnte *in vivo* nachgewiesen werden. Weiterhin konnte bei den meisten Patienten der beiden Studien eine Reduktion der immunsuppressiven Therapie durchgeführt werden, ohne dass es zunächst zu Abstoßungsreaktionen kam [11, 12]. Allerdings handelte es sich hier um ein sehr kleines Patientenkollektiv und auch der Mechanismus der beobachteten Reaktion blieb weitgehend unbekannt.

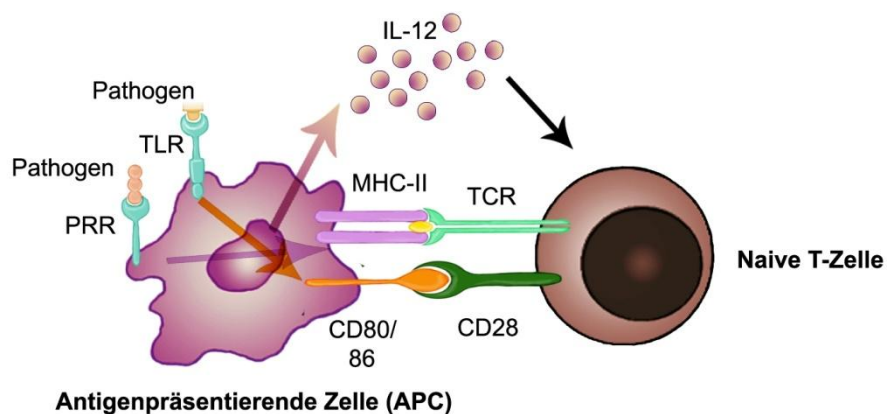
Daher ermutigen diese Ergebnisse auf dem Gebiet der zellulären Immuntherapie, weitere Forschungen durchzuführen, um die beteiligten Mechanismen zu verstehen und neue Therapien für den klinischen Alltag etablieren zu können.

In der vorliegenden Arbeit sollen daher die von Fändrich, Hutchinson und Geissler differenzierten monozytären Zellen genauer charakterisiert werden. Zunächst soll im Rahmen einer Kultur aus murinen Zellen die Wirkungsweise dieser von der Arbeitsgruppe als self tolerance inducing cells (STIC) bezeichneten Zellen genauer untersucht werden. Es sollen Mechanismen identifiziert werden, mit deren Hilfe diese Zellen ihre Effekte vermitteln, wobei besonderes Augenmerk auf die produzierten Zytokine gelegt wird. Weiterhin soll auf m-RNA-Ebene nach immunologisch relevanten Änderungen der Genexpression der STIC Zellen gesucht werden.

## **1.2 Makrophagen und ihre Stellung im Immunsystem**

Bei den oben beschriebenen STIC Zellen handelt es sich um eine besondere Art von Makrophagen [13]. Deswegen ist es erforderlich, sich mit den verschiedenen bekannten Makrophagenpopulationen und deren Abgrenzung zu den STIC Zellen zu beschäftigen.

Nach funktionellen Gesichtspunkten lässt sich das Immunsystem in das *angeborene* und das *erworbene* Immunsystem einteilen [1, 14, 15]. Bei der Verknüpfung dieser beiden Systeme haben Makrophagen eine Schlüsselstellung. Sie nehmen bei ihrer Funktion, Pathogene zu phagozytieren und mit Hilfe von Enzymen und toxischen Chemikalien wie  $H_2O_2$  abzutöten, eine wichtige Rolle im angeborenen Immunsystem wahr [1]. Außerdem sind sie, ebenso wie Dendritische Zellen, dazu in der Lage, verschiedene Epitope von phagozytierten Antigenen über MHC Klasse II Moleküle zu präsentieren und so naive T-Zellen zu aktivieren (Abbildung 1) [1, 16].



**Abbildung 1: Immunologische Synapse**

Makrophagen und Dendritische Zellen (DC) gehören zur Gruppe der antigenpräsentierenden Zellen (APC). Dargestellt ist die Interaktion einer APC mit einer naiven T-Zelle. Der Kontakt mit einem Pathogen führt zur Aktivierung der APC über toll like Rezeptoren (TLR) und pattern recognition Rezeptoren (PRR). Es kommt zur Phagozytose und Prozessierung des Pathogens und schließlich zur Präsentation von Oberflächenstrukturen des Pathogens über major histocompatibility complex II (MHC-II) Rezeptoren. Eine naive T-Zelle mit einem zu der präsentierten Oberflächenstruktur passenden T-Zell Rezeptor (TCR) kann nun an den MHC-II Rezeptor binden. Zur optimalen Aktivierung der T-Zelle sind neben der Stimulation über MHC-II auch die costimulatorischen Rezeptoren CD 80/86 sowie aktivierende Zytokine, wie etwa IL-12 notwendig. Die Verbindung aus APC und T-Zelle wird auch als immunologische Synapse bezeichnet und ist eine wichtige Schnittstelle zwischen der angeborenem und der erworbenen Immunantwort. Verändert nach [2].

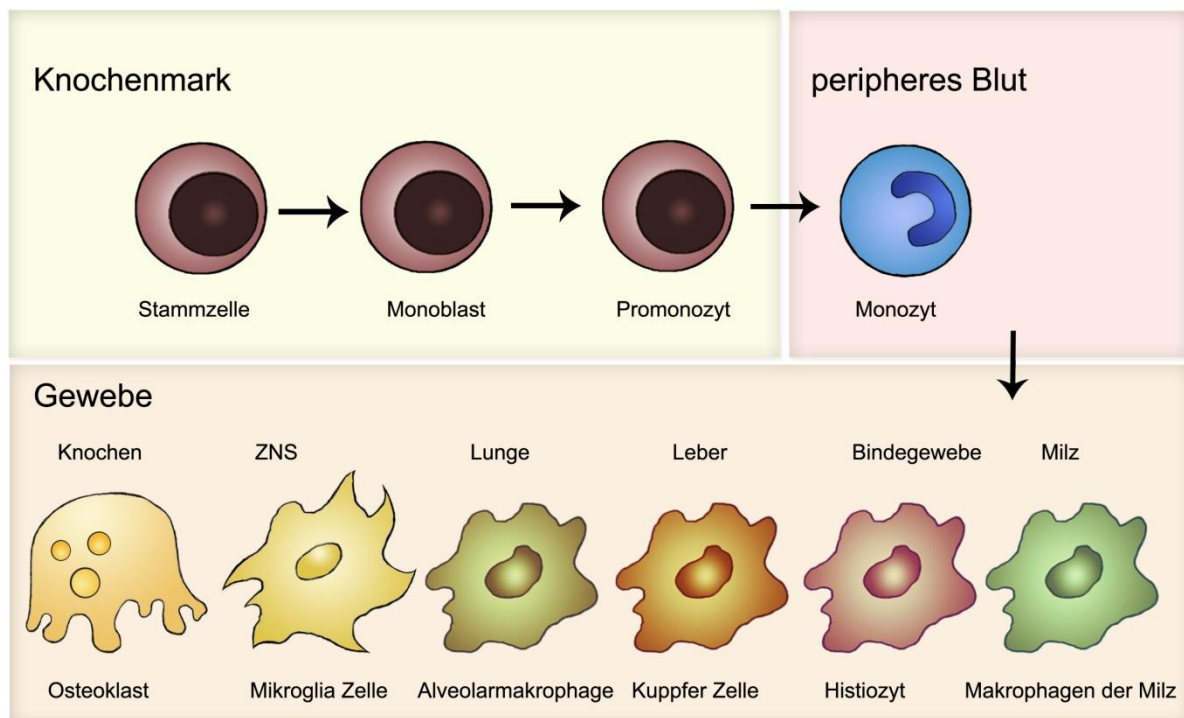
Die Gesamtheit aus Makrophagen, Monozyten und Dendritischen Zellen wird als „mononukleäres Phagozytensystem“ (MPS) bezeichnet [2]. Diese Zellen machen in manchen Organen bis zu 15 % der gesamten Zellpopulation aus [17]. Das MPS nimmt im Gefüge des Immunsystems eine bedeutende Stellung ein. Als Teil des angeborenen Immunsystems ist es für die Phagozytose von Mikroorganismen bedeutsam, dagegen gehören Funktionen, wie die Sekretion von Entzündungsmediatoren und die Ausbildung einer antigenspezifischen Immunantwort durch die Aktivierung von Zellen, wie  $CD4^+$  T-Lymphozyten, zum erworbenen Immunsystem. Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Antigenpräsentation und Aktivierung von T-Zellen werden die Zellen des MPS zu den antigenpräsentierenden Zellen (APC) gezählt. Durch die Schlüsselrolle in der Verbindung der angeborenen

mit der erworbenen Immunantwort kommt den mononukleären Phagozyten aber auch eine wichtige Bedeutung dabei zu, das Ausmaß der Immunantwort, die Gewichtung zwischen  $T_{H1}$  und  $T_{H2}$  Reaktion sowie die Beendigung der Immunreaktion zu regulieren. Diese immunregulatorische Bedeutung des MPS ist weit weniger genau verstanden als dessen proinflammatorische Wirkungen [2]. Die von uns untersuchten STIC Zellen könnten als Teil des MPS für dessen immunregulatorische Fähigkeiten von Bedeutung sein.

Die Funktionsweise von Dendritischen Zellen ist in der Literatur sehr umfangreich und detailliert beschrieben [18-20], während vor allem die immunregulatorischen Funktionen von Makrophagen nur unzureichend erforscht sind [13]. Die grundlegenden Aufgaben von Makrophagen und Dendritischen Zellen im Bezug auf Phagozytose und T-Zell Aktivierung unterscheiden sich nicht wesentlich voneinander. In der Literatur wird trotzdem häufig zwischen Makrophagen und Dendritischen Zellen unterschieden. Daneben existieren auch Quellen, die eine zu strenge Unterscheidung dieser Zelltypen nicht für sinnvoll halten und es vorziehen, von einem einheitlichen „mononukleären Phagozytensystem“ zu sprechen, in dem lediglich unterschiedlich differenzierte Zellen der gleichen Linie zusammengefasst sind [17]. Hierfür spricht vor allem, dass sowohl Monozyten, Makrophagen als auch Dendritische Zellen die Fähigkeit zur Phagozytose, zur Antigenpräsentation und zur Aktivierung von T-Zellen besitzen [17, 20].

Monozyten entstehen aus Promonozyten des Knochenmarkes und machen etwa 1-6% der Leukozyten des peripheren Blutes aus (Abbildung 2). Sie verweilen etwa 1 bis 4 Tage im Blut und wandern dann ins Gewebe ein, wo sie sich zu den verschiedenen Typen von Makrophagen differenzieren und ganz unterschiedliche Aufgaben wahrnehmen [2]. So stammen zum Beispiel Kupffer Zellen der Leber oder Osteoklasten im Knochen von monozytären Vorläuferzellen ab (Abbildung 2) [2]. Lokale Mediatoren im Gewebe beeinflussen in hohem Maße den Phänotyp wie auch die Funktion von Makrophagen. Wichtige Wachstumsfaktoren sind zum Beispiel der Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF) und das Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), die zur Aktivierung der Makrophagen beitragen. Interleukin-10 (IL-10) hat dagegen vor allem supprimierende Wirkungen [2]. Makrophagen sind aber auch selbst hochaktiv im

Sezernieren von biologisch aktiven Mediatoren, mit denen sie auf große Teile des angeborenen und erworbenen Immunsystems Einfluss nehmen [2].



**Abbildung 2: Verschiedene Makrophagen und ihre Vorstufen**

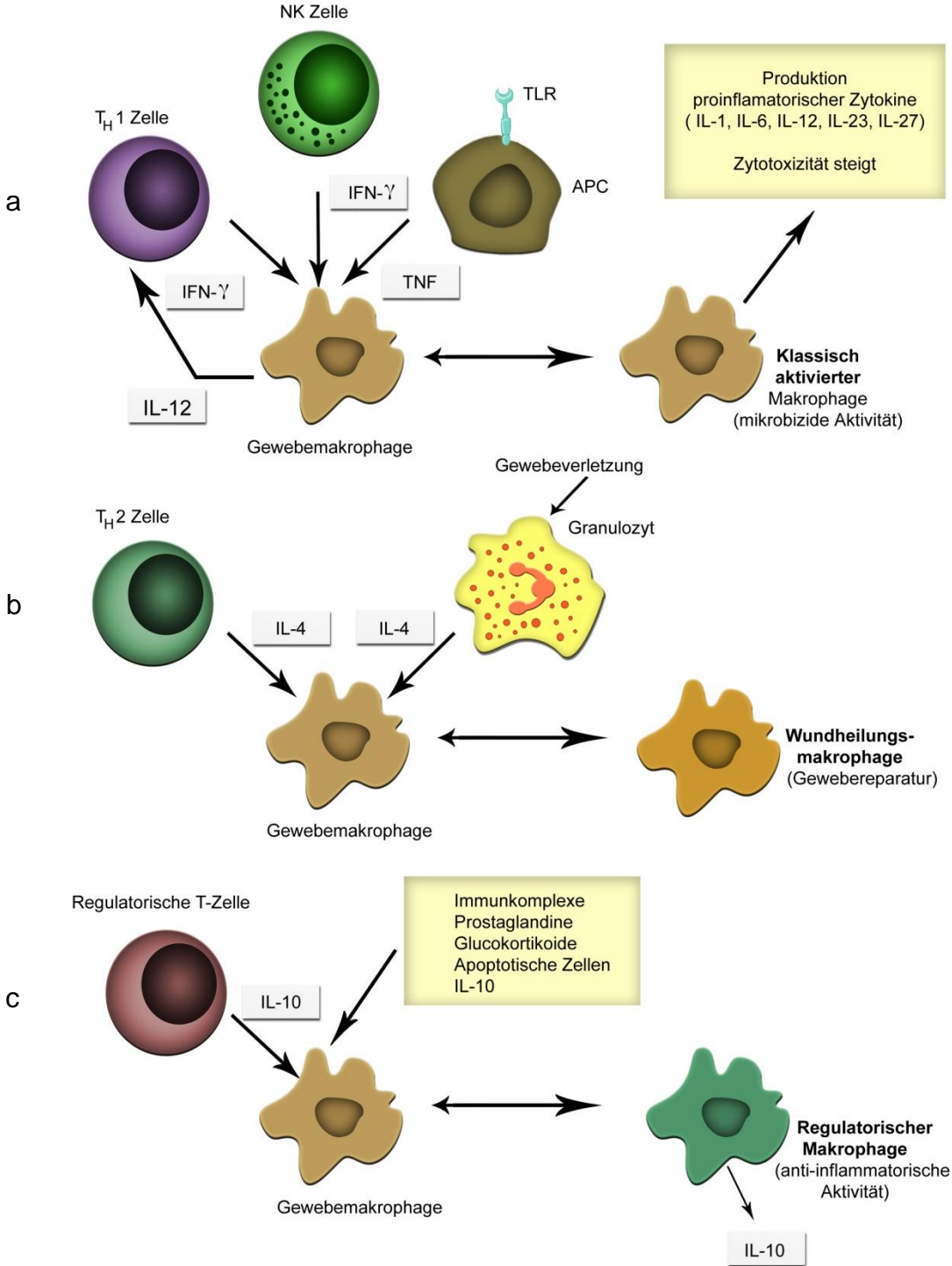
In der oberen Hälfte der Abbildung ist die Bildung von Monozyten des peripheren Blutes aus ihren Vorstufen im Knochenmark dargestellt. Wandern die Monozyten aus dem Blut ins Gewebe ein, so werden sie als Makrophagen bezeichnet. Die untere Hälfte der Abbildung zeigt eine Auswahl verschiedener Gewebemakrophagen mit ihren Eigennamen.

Verändert nach [3].

In den meisten Quellen wird zwischen zwei funktionellen Differenzierungen von Makrophagen unterschieden. M1 polarisierte oder „klassisch aktivierte“ Makrophagen werden durch IFN- $\gamma$  und mikrobielle Stimuli wie Lipopolysaccharide (LPS) induziert [21]. Sie sezernieren proinflammatorische Zytokine, töten Mikroorganismen ab und sind somit wichtig für die Einleitung einer Entzündungsreaktion [22]. Dagegen bildet sich die heterogenere Gruppe der M2 polarisierten, „alternativ aktivierten“ Makrophagen unter dem Einfluss von IL-4, IL-13 und dem transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) [21]. Die M2 Makrophagen produzieren antiinflammatorische Mediatoren und sind somit für die Begrenzung der Entzündungsreaktion verantwortlich [22].

Da ständig neue Vertreter der Gruppe der M2 Makrophagen beschrieben wurden, die sich in ihren biochemischen und physiologischen Eigenschaften zum Teil sehr deutlich unterscheiden, schlagen Mosser und Edwards eine Einteilung in drei Gruppen vor (Abbildung 3), entsprechend der grundlegenden Aufgaben, welche die Makrophagen in der Gewebemöostase wahrnehmen [3]. So werden neben den

klassisch aktivierten M1 Makrophagen die Wundheilungsmakrophagen und die Regulatorischen Makrophagen unterschieden. Die beiden letztgenannten entsprechen den M2 Makrophagen. Die drei beschriebenen Gruppen sind aber nicht als völlig voneinander getrennte Zellpopulationen zu verstehen, sondern als Extremformen eines kontinuierlichen Differenzierungsspektrums [3].



**Abbildung 3: Einteilung der Makrophagen in drei Gruppen**  
 Die Abbildung zeigt die Einteilung der bis jetzt charakterisierten Makrophagen in drei Gruppen nach Mosser und Edwards [3]. Dargestellt ist, welche anderen Zellen durch verschiedene Signale zur Bildung der jeweiligen Makrophagentypen führen. Ferner sind verschiedene Effektorzytokine der jeweiligen Makrophagen aufgezeigt.  
 APC: antigenpräsentierende Zelle; TLR: toll like receptor; NK Zelle: natürliche Killerzelle, TNF: Tumor Nekrose Faktoren  
 Verändert nach [3].

Für die Bildung von Klassisch Aktivierten Makrophagen (Abb. 3a) aus ruhenden Gewebemakrophagen ist die Wirkung der Zytokine Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Tumornekrose Faktor (TNF) erforderlich. IFN- $\gamma$  wird zu Beginn der Immunreaktion vor allem von Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Natürlichen Killerzellen (NK Zellen), sezerniert. Später ist die IFN- $\gamma$  Produktion von Zellen des erworbenen Immunsystems, wie etwa von T<sub>H</sub>1 differenzierten T-Helferzellen erforderlich, um die Aktivität der klassisch aktivierten Makrophagen aufrecht zu erhalten [3].

TNF, das zweite wichtige Zytokin für die klassische Aktivierung von Makrophagen wird vor allem von Makrophagen selbst in auto- und parakriner Weise bereitgestellt. Durch mikrobielle Stimuli, wie zum Beispiel LPS, wird über Toll-like Rezeptoren (TLR) der APCs die Transkription von TNF Genen induziert. Zusätzlich kann durch die TLR Aktivierung die Bildung von Interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) eingeleitet werden. Dieses kann die Wirkung von IFN- $\gamma$  ersetzen und die Makrophagenpopulation somit von der Zytokinproduktion durch T- und NK-Zellen unabhängig machen [3].

Klassisch aktivierte Makrophagen sezernieren eine große Menge proinflammatorischer Zytokine und Mediatoren wie IL-1, IL-6 und IL-23. Daneben wird IL-12 freigesetzt, was die Polarisierung von T-Helferzellen in Richtung T<sub>H</sub>1 verschiebt, welche ihrerseits wiederum die Differenzierung von Makrophagen zu klassisch aktivierten Makrophagen fördern. Außerdem steigern die klassisch aktivierten Makrophagen ihre Fähigkeit, Mikroorganismen oder Tumorzellen abzutöten, indem sie mehr radikale Sauerstoff- und Stickstoff-Metaboliten produzieren. Klassisch aktivierte Makrophagen sind also wichtige Effektoren der zellulär vermittelten Immunität. Eine übersteigerte Produktion ihrer proinflammatorischen Mediatoren kann jedoch auch zu vielfältigen Autoimmunerkrankungen führen [3].

Eine zweite Gruppe von Makrophagen sind die Wundheilungsmakrophagen (Abb. 3b), welche wichtige Aufgaben bei der Geweberegeneration erfüllen und unter anderem zur Produktion von Extrazellulärer Matrix beitragen. Sie bilden sich unter dem Einfluss des Zytokins IL-4 aus Gewebemakrophagen. *In vivo* gibt es zwei bedeutende Quellen für IL-4. Es wird zum einen von Basophilen Granulozyten und Mastzellen bei Gewebeverletzungen oder durch Exposition mit Chitin freigesetzt. Zum anderen führen vor allem die T<sub>H</sub>2 polarisierten T-Zellen während der adaptiven Immunantwort zur Freisetzung von IL-4 [3].

Wundheilungsmakrophagen tragen nicht zur Immunabwehr im klassischen Sinne bei. Bei *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass Wundheilungsmakrophagen kaum proinflammatorische Zytokine produzieren, keine Antigenpräsentation an T-Zellen zeigen und aufgenommene Pathogene nicht effizient verdauen können [3, 23]. Dafür haben sie eine wichtige Aufgabe bei der Reparatur von verletztem Gewebe und der Gewebehomöostase. Ihre Fähigkeit, zum Aufbau der extrazellulären Matrix beizutragen, kann aber auch negative Folgen für den Organismus haben. So können diese Makrophagen bei überschießender Aktivität zur Gewebefibrose führen, was bei Mäusen mit experimentell induziertem Asthma gezeigt werden konnte [3].

Zur Induktion der dritten bekannten Makrophagenpopulation, den Regulatorischen Makrophagen (Abb. 3c), sind verschiedene Stimuli nötig, wie zum Beispiel Glukokortikoide, Immunkomplexe, Prostaglandine, apoptotische Zellen oder das immunsuppressiv wirkende Zytokin IL-10. Für eine effektive Differenzierung in Regulatorische Makrophagen sind aber zwei der genannten Stimuli gleichzeitig erforderlich. Physiologischerweise kommt es im späteren Verlauf der adaptiven Immunantwort zum Anstieg von Regulatorischen Makrophagen. Sie führen hier vor allem zu einer Dämpfung der Immunantwort und zur Begrenzung der Entzündungsreaktion [3].

Regulatorische Makrophagen bilden hohe Spiegel des Zytokins IL-10, welches die Produktion vieler proinflammatorischer Zytokine blockiert und somit immunsuppressiv wirkt. Die IL-10 Produktion ist die wichtigste Eigenschaft der Regulatorischen Makrophagen. Außerdem zeigen sie eine stark reduzierte IL-12 Produktion [3].

Die genaue Abgrenzung der in dieser Arbeit untersuchten STIC Makrophagen von den drei vorgestellten Gruppen ist Gegenstand der aktuellen Untersuchungen. Die Analyse der Oberflächenmarker sowie der funktionellen Eigenschaften führen zu der Hypothese, dass sich die STIC Zellen nicht in eine der drei oben beschriebenen Gruppen einordnen lassen, sondern dass es sich dabei um einen zuvor nicht beschriebenen Makrophagentyp handelt [13]. So entsprechen die STIC Zellen keinen klassisch aktivierten bzw. M1 polarisierten Makrophagen, obwohl sie unter ähnlichen Bedingungen generiert werden. Da die STIC Zellen nicht unter Zugabe von IL-4 oder IL-13 erzeugt werden und sich auch von ihrem Oberflächenmarker Profil von M2

Makrophagen unterscheiden, kann man STIC Zellen auch nicht in die Gruppe der M2 Makrophagen einordnen [13]. Hinzu kommt die Fähigkeit der STIC Zellen, in Cokulturen mit Lymphozyten zu einer Anreicherung an regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ) zu führen. Auch diese funktionelle Eigenschaft unterscheidet sie von anderen Makrophagen [13].

### 1.3 STIC Zellen

Diese von uns untersuchten Interferon- $\gamma$ -stimulated monocyte-derived cells (IFN $\gamma$ -MdC) werden in unserer Arbeit als self tolerance inducing cells (STIC) bezeichnet. Daneben wird auch die Bezeichnung transplant acceptance inducing cell (TAIC) und entsprechend der Erzeugung der Zellen IFN $\gamma$ -MdC in Publikationen verwendet.

STIC Zellen sind Makrophagen in einem speziellen Aktivitätsstatus und können, wie oben beschrieben, anhand ihrer biologischen Funktion, ihrer Oberflächenmarker und ihrer Herstellungsweise von den bekannten M1 und M2 differenzierten Makrophagen abgegrenzt werden. STIC Zellen können in Anwesenheit von  $CD4^+$  T-Zellen, M-CSF und IFN- $\gamma$  aus monozytären Zellen von Milz, Blut und Knochenmark *in vitro* differenziert werden. In Cokultur mit Lymphozyten führen sie zu einer Zerstörung von aktivierten T-Zellen und zu einer Anreicherung von  $CD4^+$   $CD25^+$   $Foxp3^+$  regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$  Zellen) [13]. Diese Effekte werden für die immunmodulatorischen und immunsuppressiven Eigenschaften der STIC Zellen verantwortlich gemacht. So konnte in Untersuchungen an Tieren, wie auch an Menschen gezeigt werden, dass die Zellen therapeutisches Potential für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen sowie für die zelluläre Immunsuppression bei Organtransplantationen haben [11, 13]. Neben den eingangs beschriebenen Studien am Menschen [11, 12] konnte die Arbeitsgruppe von Professor Geissler zeigen, dass eine experimentell induzierte Colitis bei Mäusen durch die i.v. Applikation von STIC Zellen klinisch und histologisch deutlich gemildert werden konnte [13].

Um das Potential dieser zellulären Immuntherapie besser nutzen zu können, soll die vorliegende Arbeit dazu beitragen, die Rolle der STIC Zellen im Gefüge des Immunsystems weiter zu charakterisieren und es wird versucht, die Mechanismen zu identifizieren, mit deren Hilfe die Zellen ihre Wirkungen vermitteln. Dabei soll im

Besonderen nach hierbei beteiligten Zytokinen gesucht werden. Da, wie oben beschrieben, die regulatorischen T-Zellen bei der Wirkung der STIC Zellen von Bedeutung sind, sollen weiterhin die Zusammenhänge zwischen STIC Zellen und T<sub>reg</sub> Zellen näher untersucht werden.

## **1.4 Regulatorische T-Zellen**

### **1.4.1 Selbsttoleranz im Immunsystem**

Eine ganz entscheidende Eigenschaft des Immunsystems ist seine Fähigkeit, zwischen „selbst“ und „fremd“ zu unterscheiden und so den Körper vor Pathogenen zu schützen, ohne aber seine eigenen Strukturen anzugreifen. Die Selbst-Toleranz ist gestört bei Autoimmunerkrankungen wie Colitis, bei denen es zu Immunreaktionen gegen körpereigene Strukturen kommt. Weiterhin werden transplantierte Organe physiologischerweise als „fremd“ erkannt, obwohl hier die Immunreaktion für den Organismus nicht sinnvoll ist.

Die immunologische Selbst-Toleranz wird beim Menschen durch die negative Selektion autoreaktiver T-Lymphozyten im Thymus erreicht [24]. Epithelzellen im Mark des Thymus exprimieren mit Hilfe des Transkriptionsfaktors Autoimmune Regulator (AIRE) verschiedenste Proteine der peripheren Gewebe [25, 26]. Unterschiedliche Epitope dieser Proteine werden den T-Lymphozyten über MHC Moleküle präsentiert [26]. Lymphozyten, die auf diese reagieren, können somit erkannt und ausgeschaltet werden. Der beschriebene Mechanismus wird als zentrale Toleranz bezeichnet. Es gibt aber immer Lymphozyten, die dieser negativen Selektion entkommen und so werden bei jedem Individuum autoreaktive T-Lymphozyten in der Peripherie gefunden. Da offensichtlich aber nicht jeder unter Autoimmunerkrankungen leidet, muss es auch periphere Toleranzmechanismen geben, die diese autoreaktiven Zellen unter Kontrolle halten. Ein wichtiger Mechanismus hierfür ist die T-Zell Anergie. Zur Aktivierung einer naiven T-Zelle durch eine APC sind zusätzlich zur Stimulation über den T-Zell Rezeptor (TCR) weitere, sogenannte costimulatorische Signale erforderlich. Der bedeutendste costimulatorische Ligand ist CD 80/86, der den CD 28 Rezeptor von T-Zellen aktiviert [27]. Kommt es bei fehlender Costimulation zur Aktivierung des TCR, geht die T-Zelle

in einen inaktiven Zustand über, der als Anergie bezeichnet wird [28]. Durch diesen Mechanismus wird verhindert, dass T-Zellen, durch Selbstantigene aktiviert werden. Auch den regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ) kommt eine Schlüsselrolle bei der Induktion der Selbsttoleranz zu [24].  $T_{regs}$  haben verschiedene immunmodulatorische Aufgaben. Sie verhindern eine überschießende Immunantwort und sind durch ihren Beitrag bei der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz auch bei der Eindämmung chronisch entzündlicher Krankheiten, wie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED), maßgeblich beteiligt [29]. Bei allogenen Organtransplantaten kann durch die Wirkung der  $T_{reg}$  Zellen die Abstoßungsreaktion reduziert werden [2]. Neben diesen für den Organismus wünschenswerten Effekten können  $T_{reg}$  Zellen aber auch negative Prozesse, wie etwa die Suppression von anti-Tumor Immunität oder die Verhinderung der totalen Eradikation eines Pathogens bewirken [29]. Eine denkbare therapeutische Beeinflussung dieser Wirkungen von  $T_{reg}$  Zellen könnte zu völlig neuen Behandlungsmöglichkeiten verschiedener Immunpathologien führen. Diese Perspektive erklärt das gegenwärtig große wissenschaftliche Interesse an diesem Zelltyp. So führen die von uns untersuchten STIC Zellen *in vitro* zu einer Anreicherung von  $T_{reg}$  Zellen, was eine mögliche Erklärung für ihre immunsuppressiven Wirkungen ist [13].

#### **1.4.2 Charakterisierung und Isolierung von $T_{reg}$ Zellen**

Es steht schon lange im Fokus des immunologischen Interesses, Oberflächenmarker zu identifizieren, mit denen sich  $T_{reg}$  Zellen in hoher Reinheit isolieren lassen [29]. Bei Mäusen sind diese Bemühungen mit der Identifikation der Oberflächenmarker CD4 und CD25, sowie dem Transkriptionsfaktor forkhead box P3 (Foxp3) erfolgreich gewesen. Beim Menschen sind diese Marker allerdings nicht hinreichend zur Identifikation aller  $T_{reg}$  Zellen. Da unsere Untersuchungen sich auf murine Zellen beziehen, können wir  $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$  Zellen als  $T_{reg}$  Zellen bezeichnen [29]. Außerdem exprimieren  $T_{reg}$  Zellen den Oberflächenmarker cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) [29] und zeigen im Vergleich zu nicht regulatorischen  $CD25^+$  Effektor T-Zellen eine reduzierte Expression des Interleukin 7 Rezeptors (CD127) [30].

Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors Foxp3 für die Funktion der T<sub>reg</sub> Zellen wird durch die seltene Immunkrankheit „Immundysregulations, Polyendokrinopathie und Enteropathie X-linked Syndrom“ (IPEX) aufgezeigt. Dabei kommt es aufgrund von Mutationen im Foxp3 Gen und konsekutiver T<sub>reg</sub> Zeldysfunktion zu weitreichenden Pathologien. Dies sind etwa Dermatitis, Diarrhö, Kachexie, Typ 1 Diabetes, Thyreoiditis und viele weitere [31]. Die Krankheit konnte auch im Mausmodell an Foxp3 knock out Mäusen untersucht werden. Diese, als „scurfy mice“ bezeichneten Versuchstiere, zeigen ähnliche Krankheitszeichen und haben eine beschränkte Lebenserwartung von nur 0-4 Wochen [29, 31, 32].

### 1.4.3 Naturally occurring and induced T<sub>reg</sub> Zellen

Nach heutigem Kenntnisstand können zwei verschiedene Typen von T<sub>reg</sub> Zellen unterschieden werden. Naturally occurring T<sub>reg</sub> Zellen (nT<sub>reg</sub>) (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>) entwickeln sich im Thymus und haben eine besondere T-Zell Rezeptor (TCR) Ausstattung, welche im Gegensatz zu gewöhnlichen TCRs spezifisch Selbst-Antigene erkennt [29, 33]. Für ihre Bildung sind zwei Signale entscheidend. Zum einen die Stimulation ihrer TCR über hoch affin bindende „Selbst-Peptide“, zum anderen eine starke Costimulation über CD28 [34]. Bei der Maus konnte gezeigt werden, dass die nT<sub>reg</sub> Zellen kurz nach der Geburt aus dem Thymus in die Peripherie übertreten. Eine drei Tage nach der Geburt durchgeführte Thymektomie führt so zu schweren Autoimmunerkrankungen [24].

Neben diesen naturally occurring T<sub>reg</sub> Zellen kommen auch „adaptive“ oder „induced“ T<sub>reg</sub> Zellen (iT<sub>reg</sub>) vor, die sich während einer Entzündungsreaktion im peripheren Gewebe aus CD25<sup>-</sup> Effektor T-Zellen bilden können [24, 29, 35]. Die Gruppe der iT<sub>reg</sub> Zellen ist heterogen und besteht aus CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> sowie NK T-Zellen. Für die immunologische Homeostase sind vor allem diejenigen, welche den Transkriptionsfaktor Foxp3 ausbilden, von Bedeutung [34]. Die bisher am besten untersuchten CD4<sup>+</sup> iT<sub>reg</sub> Zellen entstehen in den peripheren lymphatischen Organen unter dem Einfluss der Zytokine IL-2 und TGF-β aus naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Im Gegensatz zu den starken Signalen, die für die Bildung der nT<sub>reg</sub> Zellen erforderlich sind, ist für die Bildung von CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> iT<sub>reg</sub> Zellen aus CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> Vorläuferzellen eine suboptimale Stimulation des TCR notwendig [34]. Zusätzlich ist

eine Costimulation durch den inhibitorischen Rezeptor cytotoxic T-Lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) essentiell erforderlich [34, 36]. CTLA-4 interagiert wie CD28 mit den Liganden CD80 und CD86 der antigenpräsentierenden Zellen. Trotz struktureller Ähnlichkeiten von CD28 und CTLA-4 ist ihre Funktion beinahe entgegengesetzt. Während ersterer für die Aktivierung von Effektor T-Zellen wichtig ist, werden letzterem vor allem inhibitorische Wirkungen zugeschrieben [36]. Zusätzlich ist zur Bildung von  $T_{reg}$  Zellen die Anwesenheit der Zytokine IL-2 und TGF- $\beta$  erforderlich. Mäuse, die einen Defekt im IL-2 oder TGF- $\beta$  Gen haben, entwickeln schwere Autoimmunkrankheiten. Während bei ihnen  $nT_{reg}$  Zellen nachweisbar sind, können sie durch den Mangel an den genannten Zytokinen keine  $Foxp3^+$   $iT_{reg}$  Zellen erzeugen [34].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sowohl die nonredundante Wirkung von IL-2 und TGF- $\beta$  als auch die Costimulation über CTLA-4 zusammen mit einem suboptimal zum TCR passenden Antigen für die Erzeugung von  $iT_{reg}$  Zellen im peripheren lymphatischen Gewebe erforderlich sind. Welche weiteren Faktoren bei der Induktion von  $T_{reg}$  Zellen eine Rolle spielen und inwieweit diese in vitro Ergebnisse auf die Situation in vivo übertragbar sind, müssen weitere Untersuchungen zeigen [34]. Wie Brem-Exner et al. zeigen konnten, führen die von uns untersuchten STIC Zellen bei einer Cokultur mit Lymphozyten zu einer Anreicherung an  $CD4^+$   $CD25^+$   $Foxp3^+$   $T_{reg}$  Zellen [13]. Die Identifikation der daran beteiligten Zytokine soll Gegenstand der vorliegenden Arbeit sein.

## 1.5 Zytokine

Zytokine sind Proteine, die von vielen Zellen – aber besonders von Zellen des Immunsystems – gebildet werden. Sie können in autokriner Weise auf die sezernierende Zelle selbst oder in parakriner Weise auch auf räumlich benachbarte Zellen wirken. Einige Zytokine sind auch in der Lage, in die Zirkulation einzutreten und endokrin auch auf weit entfernte Zellen einzuwirken [1]. Es ist bekannt, dass viele immunologische Vorgänge durch Zytokine reguliert werden. So ist auch die Bildung von regulatorischen T-Zellen abhängig von der Wirkung bestimmter Zytokine [34]. Andererseits sind die verschiedenen Subtypen von T-Zellen neben APCs auch eine wichtige Quelle von Zytokinen. Naive  $CD4^+$  T-Zellen können sich zu einer Reihe

von Effektorzellen mit unterschiedlichen Funktionen differenzieren. Dies sind neben den oben beschriebenen  $T_{reg}$  Zellen  $T_H1$ ,  $T_H2$  und  $T_H17$  Zellen [1].  $T_H1$  Zellen sezernieren Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Granulozyten-Monozyten Kolonie stimulierenden Faktor (GM-CSF) und Tumornekrosefaktor- $\beta$  (TNF- $\beta$ ), was zur Aktivierung von Makrophagen führt und die Immunreaktion somit in die Richtung einer zellulären Immunreaktion polarisiert.  $T_H2$  Zellen sezernieren vor allem IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, was zur Aktivierung von B-Zellen führt und damit die humorale Immunreaktion fördert. Außerdem produzieren  $T_H2$  Zellen IL-10, was einer Aktivierung von Makrophagen entgegenwirkt [1].  $T_H17$  Zellen sezernieren die Zytokine IL-17 und IL-6 welche neutrophile Granulozyten anlocken und aktivieren. Somit sind  $T_H17$  Zellen wichtig für die Immunreaktion gegen extrazelluläre Bakterien [1].

Durch unsere Experimente sollen diejenigen Zytokine identifiziert werden, die die Anreicherung von  $T_{reg}$  Zellen in den Cokulturen mit den STIC Zellen erklären können. Außerdem sollen die Zellkulturen auf diejenigen Zytokine untersucht werden, die selbst immunsuppressive Wirkungen zeigen. Deswegen haben wir uns für die Untersuchung der Zytokine IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, TGF- $\beta$  und IFN- $\gamma$  entschieden [1, 2, 29, 32, 34, 37].

## **2 Fragestellung**

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob die beobachteten Wirkungen der STIC Zellen durch von diesen Zellen gebildete Zytokine erklärt werden können. Dazu soll die STIC Zellkultur zu verschiedenen Zeitpunkten auf die Anwesenheit von immunregulatorisch relevanten Zytokinen untersucht werden. Dabei soll besonders nach Zytokinen gesucht werden, welche die beobachtete Anreicherung an  $T_{reg}$  Zellen in den STIC Zellkulturen erklären können.

Zusätzlich wird analysiert, ob sich im Profil der m-RNA Expression der STIC Zellen weitere Hinweise auf immunologisch wichtige Proteine finden. Außerdem sollen die Ergebnisse auf Proteinebene mit denen auf Ebene der Genexpression korreliert werden.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Zellkultur**

#### **3.1.1 Präparation und Kultur der STIC Zellen**

##### **Präparation der STIC Zellen am Tag d0**

Für die Präparation der STIC Zellen werden Mäuse der Stämme BALB/c und C57BL/6 verwendet (Charles River, Sulzfeld). Die Tiere werden mittels CO<sub>2</sub> Inhalation getötet. Danach wird ihnen das Blut mit Hilfe einer mit Heparin benetzten Spritze aus der Vena cava inferior entnommen. Die Milz, sowie Ober- und Unterschenkelknochen werden entfernt und in HBSS (PAA, Pasching, Österreich) asserviert. Alle anschließenden Arbeitsschritte werden unter einer Sterilbank durchgeführt.

Zunächst werden die Milzen homogenisiert und in HBSS aufgenommen. Dabei werden sie mit einer Schere zerkleinert und mit dem Stempel einer Spritze durch ein Metallsieb gedrückt. Unter Verwendung einer 27G Kanüle wird das Knochenmark durch Ausspülen von Femur und Tibia der Tiere mit HBSS entnommen und ebenfalls in diesem Medium aufgenommen. Die Zellsuspensionen aus Milz und Knochenmark werden mit einem Falcon Cell Strainer 100µm (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) gefiltert. Das Blut wird mindestens im Verhältnis 1:2 mit PBS (PAA, Pasching, Österreich) verdünnt. Die gewonnenen Zellsuspensionen werden auf mehrere mit je 20 ml Biocoll (Biochrom AG, Berlin) gefüllte 50 ml Falcon Tubes aufgeschichtet und für 20 Minuten bei 2400 Umdrehungen pro Minute (rpm) und Raumtemperatur (RT) in einer Megafuge 1.0R (Heraeus Instruments, Hanau) zentrifugiert (mit deaktivierter Bremse). Die Zellschichten werden abpipettiert und in 50 ml PBS resuspendiert. Die Suspensionen werden für 8 min bei 1300 rpm und RT zentrifugiert, wodurch sich die Zellen am Boden der Tubes ansammeln. Nach Absaugen des Überstandes werden die Zellpellets von Milz, Knochenmark und Blut in insgesamt 50 ml PBS gelöst. Nach erneuter Zentrifugation für 8 min bei 1300 rpm und RT kann das Zellpellet im 37°C warmen Kulturmedium 1 (GIBCO RPMI + 10% FCS + 1% Penicillin – Streptomycin + 1% L-Glutamin + 0,5 µg/ml M-CSF) resuspendiert werden. Dabei werden für die Zellen von vier Mäusen 5 ml Kulturmedium 1 verwendet. Die Zellen werden nun in eine 100 mm Petrischale ausplattiert. Die Schale wird danach im Brutschrank (37°C,

5% CO<sub>2</sub>, 90% Luftfeuchtigkeit) unter sterilen Standardbedingungen kultiviert (O-Schalen). Der Tag, an dem diese Kulturen angesetzt werden, soll als Tag d0 bezeichnet werden. Aus der Kultur wird eine Probe genommen, diese mit Trypitanblau gefärbt und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer unter einem inversen Mikroskop die Zellzahl bestimmt um eine erfolgreiche Zellpräparation nachzuweisen.

### **STIC Zellkultur d1 – d5**

Am nächsten Tag (**d1**) sollen nicht adhärente Zellen auf eine neue Platte übertragen werden. Um eine Probe von zellfreiem Kulturmedium entnehmen zu können, ist ein Zwischenschritt notwendig. Dazu wird das Kulturmedium der O-Schalen in ein Falcon Tube pipettiert und dieses wird dann für 8 min bei 1300 rpm und RT zentrifugiert. Von dem zellfreien Überstand kann nun 1 ml in ein Eppendorf Cup pipettiert und tiefgefroren werden. In dieser Probe können später die zu untersuchenden Zytokine mittels ELISA nachgewiesen werden. Das Zellpellet im Falcon Tube wird in frisches Kulturmedium 1 resuspendiert und auf eine neue Petrischale pipettiert (Ü-Schalen). O- und Ü-Schalen werden mit frischem Medium 1 wieder auf 5 ml aufgefüllt und erneut im Brutschrank für 2 Tage inkubiert.

Am Tag **d3** wird mit den Ü-Schalen der gleiche Zwischenschritt durchgeführt wie für die O-Schalen am Tag d1 beschrieben. Eine Probe des Überstands der Ü-Platten wird gefroren und mit der restlichen Suspension werden analog zum oben beschriebenen Vorgehen die ÜÜ-Platten erstellt. Außerdem wird eine Probe des Kulturmediums der O-Platten entnommen und nach vorherigem Zentrifugieren eingefroren. Daraufhin wird das Medium der O-Platten gewechselt. O-, Ü-, und ÜÜ-Schalen werden erneut für einen Tag im Brutschrank inkubiert.

Am Tag **d4** wird das Medium der ÜÜ-Schalen gewechselt. Dabei wird wie oben beschrieben verfahren und eine Probe des zellfreien Überstandes entnommen und eingefroren. Der restliche Überstand und das Zellpellet können verworfen werden. Die ÜÜ-Schalen werden anschließend mit frischem Medium 1 aufgefüllt. Danach wird allen Schalen 12,5 µl IFN-γ (Merck Millipore, Billerica, USA) in der Konzentration 10 µg/ml zugegeben und sie werden für einen weiteren Tag im Brutschrank inkubiert.

Am Tag **d5** werden die Zellen der STIC Zellkultur „geerntet“. Das Medium aller Schalen wird dazu entnommen und wie oben beschrieben zentrifugiert. Eine zellfreie Probe wird jeweils zur späteren Analyse eingefroren. Das restliche Medium kann verworfen werden. Mit einem Zellschaber werden die adhärennten Zellen vom Boden

der Petrischalen gelöst und in 50 ml PBS suspendiert. Danach werden die Zellen von O-, Ü- und ÜÜ-Schalen eines Mausstamms in einem Falcon Tube vermischt. Das Tube wird für 8 min bei 1300 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 0,5 ml Kulturmedium 2 (GIBCO RPMI + 10% FCS + 1% Penicillin – Streptomycin + 1% L-Glutamin) resuspendiert und die Zellzahl wie oben beschrieben bestimmt. Die Suspension wird jetzt bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gestellt.

Nochmals erwähnt sei, dass sich in dieser Suspension die ehemals an den Schalen adhärenen Zellen befinden. Die Eigenschaften dieser als STICs bezeichneten Zellen sollen im Folgenden untersucht werden.

### **3.1.2 Cokultur mit Splenozyten**

Zur Cokultur mit den STICs werden aus genetisch identischen Mäusen Splenozyten und Monozyten isoliert. Am Tag d5 der Zellkultur werden zu diesem Zweck Milz und Knochenmark, wie im Kapitel 3.1.1 beschrieben, den Tieren entnommen.

#### **Präparation der Splenozyten**

Zur Präparation der Splenozyten werden die Milzen wie beschrieben homogenisiert und dann die Zellen in HBSS suspendiert. Die Lösung wird gefiltert und dann für 5 min bei 1500 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wird in 1 ml NH<sub>4</sub>Cl-Lysis-Puffer (Lonza AG, Basel, Schweiz) resuspendiert und darin für 1-2 min inkubiert. Daraufhin wird die Lösung mit 20 ml HBSS aufgefüllt und für 5 min bei 1500 rpm und 4°C zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wird jetzt in 10 ml HBSS resuspendiert und die Lösung daraufhin durch einen 100µm Filter (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) in ein neues Falcon Tube überführt. Es wird erneut für 5 min bei 1500 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10 ml HBSS resuspendiert. Wie oben beschrieben, wird jetzt die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Lösung wird daraufhin auf 2 Tubes aufgeteilt; 3 ml der Lösung werden in ihrem Zustand belassen (Splenos normal), während die anderen 7 ml einer CFSE Färbung unterzogen werden. Beide Tubes werden nun für 5 min bei 1500 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand

wiederum verworfen. Die „Splenos normal“ werden in 1 ml Kulturmedium 2 resuspendiert und auf Eis gestellt. Die Zellzahl wird erneut bestimmt.

Mit dem anderen Tube wird die CFSE Färbung durchgeführt. Die Methode wird im Kapitel 3.1.3 im Detail dargestellt. Zunächst wird auf das Zellpellet pro  $1 \times 10^6$  Zellen 0,5µl CFSE Färbelösung und 50µl 37°C warmes PBS gegeben und dieses resuspendiert. Die Lösung wird jetzt für 5 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird mit 2 ml FCS (Biochrom AG, Berlin) abgestoppt und für 1 min inkubiert. Daraufhin werden die Zellen zweimal mit je 15 ml Kulturmedium 2 gewaschen; dabei wird jeweils für 5 min bei 1500 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird nun in 5 ml Kulturmedium 2 resuspendiert und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen werden noch einmal wie oben beschrieben in 15 ml Kulturmedium 2 gewaschen. Das Zellpellet wird daraufhin in 2 ml Kulturmedium 2 resuspendiert und die Zellzahl, wie oben beschrieben, bestimmt. Die Zellen können nun bis zu ihrer weiteren Verwendung auf Eis gestellt werden.

### **Präparation der Monozyten**

Die Monozyten werden aus dem Knochenmark der Tiere isoliert. Das Knochenmark wird dazu, wie im Kapitel 3.1.1 beschrieben, entnommen und in HBSS suspendiert. Die Lösung wird gefiltert und für 5 min bei 1500 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wird nun in 1 ml  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Lysepuffer resuspendiert und für etwa 4 min inkubiert. Danach werden 20 ml HBSS hinzugegeben und erneut für 5 min bei 1500 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird in 10 ml HBSS gelöst und anschließend wird die Suspension nochmals gefiltert. Die Zellzahl der erhaltenen Lösung wird bestimmt. Daraufhin wird die Lösung für 5 min bei 1500 rpm und 4°C zentrifugiert und das Zellpellet in 4°C kaltem MACS-Puffer (195 ml PBS + 5 ml Humanes Albumin (20%) + 0,8 ml EDTA (0,5M)) zusammen mit CD11b MicroBeads (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) resuspendiert. Dabei werden pro  $1 \times 10^6$  Zellen 9 µl MACS-Puffer und 1 µl CD11b MicroBeads verwendet. Die Methode wird im Abschnitt 3.1.4 im Detail dargestellt. Die Lösung wird bei 4°C für 15 min inkubiert und dann mit MACS-Puffer auf 25 ml aufgefüllt. Das Tube wird nun, wie oben beschrieben, zentrifugiert und das Pellet in 3 ml MACS-Puffer aufgenommen. Die Zellsuspension läuft nun durch MACS Säulen (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach) in entsprechenden Midi MACS Magneten (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach). Dabei werden die CD11b positiven Monozyten und Makrophagen in den Säulen

durch magnetische Kräfte festgehalten. CD11b negative Zellen durchlaufen die Säulen und werden verworfen. Die Säulen werden dann vom Magneten getrennt und die CD11b<sup>+</sup> Zellen mit 5 ml MACS-Puffer ausgespült (Abb. 4). Die Lösung wird auf 15 ml mit MACS-Puffer aufgefüllt und für 5 min bei 1500 rpm und 4°C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wird in PBS resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Nun wird das Zellpellet in 1 ml Kulturmedium 2 aufgenommen und auf Eis gestellt. Die Zellzahl wird, wie oben beschrieben, bestimmt.

### **Ansetzen der Cokulturen**

Für die Cokultur der STIC Zellen mit den Splenozyten werden für jeden Mausstamm zwei verschiedene Kulturreihen angelegt. Zum einen werden Kulturen für die Zellzählung (Counts) angelegt, zum anderen Kulturen für die durchflusszytometrischen Untersuchungen (FACS). Für beide Untersuchungsreihen werden jeweils folgende Versuchsansätze gemacht:

- Splenozyten
- Splenozyten + Monozyten
- Splenozyten + STICs
- STICs

Bei den Counts Kulturen werden von jeder Zellpopulation  $3,0 \times 10^5$  Zellen in einem Gesamtvolumen von jeweils 1 ml Kulturmedium 2 gelöst und in 24-well Platten (Corning Inc., New York, USA) inkubiert; es werden ausschließlich die CFSE gefärbten Splenozyten verwendet. Die FACS Kulturen erhalten je  $7,5 \times 10^5$  Zellen in 2,5 ml Kulturmedium 2 gelöst und werden in 12-well Platten inkubiert (Corning Inc., New York, USA); hier werden ungefärbte Splenozyten verwendet. Die Platten werden im Brutschrank bis zum Tag d7 (Counts) bzw. d8 (FACS) inkubiert.

### **3.1.3 CFSE Färbung**

Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester (CFDA SE) ist ein Farbstoff, mit dem lebende Zellen markiert werden können. Das zunächst farblose und nicht fluoreszierende CFDA SE diffundiert passiv in die zu färbenden Zellen. Im Zytoplasma spalten zelleigene Esterasen die beiden Acetat-Gruppen des CFDA SE ab, wodurch das aktive Molekül Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE)

entsteht. Das stark fluoreszierende CFSE geht mit freien Amino-Gruppen intrazellulärer Proteine kovalente Bindungen ein und kann somit die markierten Zellen nicht mehr verlassen. Die gefärbten Zellen können für einen Zeitraum von bis zu mehreren Wochen mittels Fluoreszenzmikroskopie oder im Durchflusszytometer nachgewiesen werden. Auch die nach einer Mitose entstehenden Tochterzellen enthalten den CFSE Farbstoff. In unseren Versuchen wird die beschriebene Methode zur Markierung von Splenozyten verwendet. Wir verwenden dazu das Vybrant CFSE Cell Tracer Kit der Marke Invitrogen, Molecular Probes, Carlsbad, USA. Nach Cokultur mit den STIC Zellen oder Monozyten werden die überlebenden Zellen, wie oben beschreiben, mit Hilfe der Fluoreszenz Mikroskopie (Axiotech II, Zeiss, Göttingen) ausgezählt.

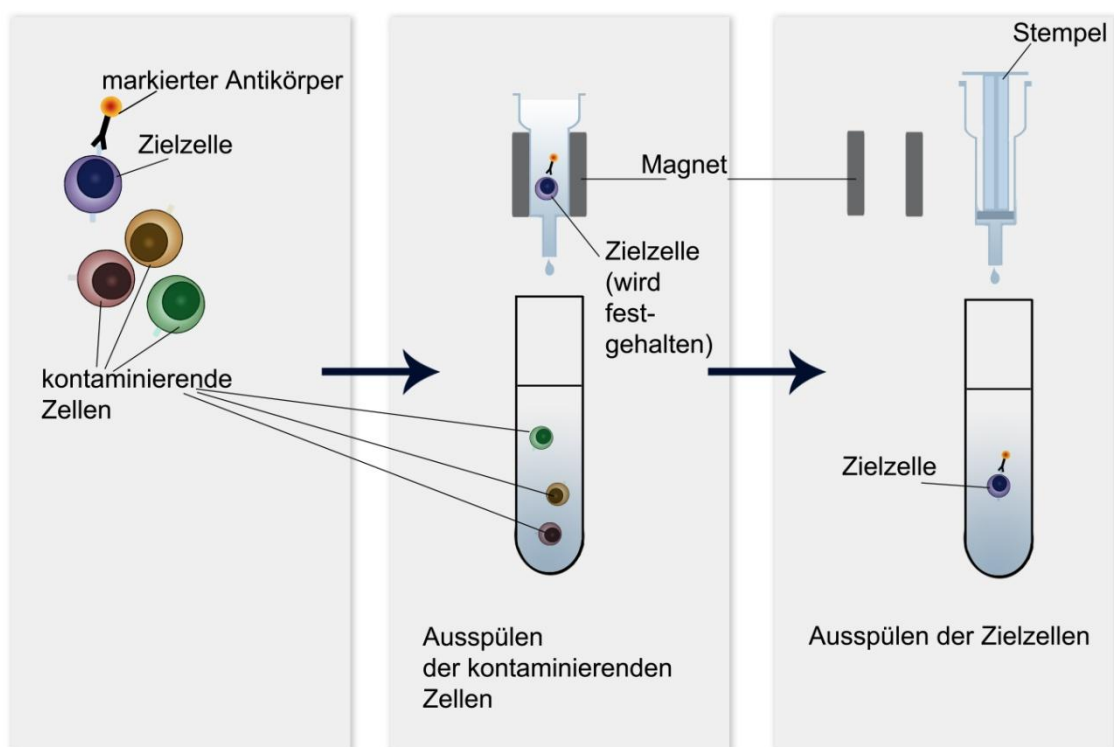
Zur Herstellung der CFDA SE Färbelösung sind folgende Schritte notwendig. Zunächst wird jeweils ein Cup des CFDA SE Pulver (Component A) und der Dimethylsulfoxid (Component B) Lösung (DMSO) aufgetaut. Die 500 µg des Pulvers werden nun in 90 µl des organischen Lösungsmittels DMSO gelöst. Die so hergestellte 10 mM CFSE Stock Solution wird nun je nach Charge nach Angabe des Herstellers mit PBS verdünnt um die CFDA SE Färbelösung zu erhalten.

### **3.1.4 MACS**

Das Magnetic Cell Sorting (MACS) ist eine Standardmethode zur Isolierung spezifischer Zellpopulationen. Sie basiert auf der Verwendung von MACS MicroBeads, MACS Säulen und MACS Magneten. Bei unseren Versuchen werden Säulen vom Typ LS und die Magneten Midi MACS und Quadro MACS verwendet. MACS MicroBeads sind etwa 50nm große magnetische Partikel, die für unsere Zwecke mit Anti CD11b Antikörpern gekoppelt sind. Die CD11b MicroBeads werden von der Firma Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach bezogen. Sie binden an ein Epitop des CD11b/CD18 Heterodimers an der Oberfläche von Zellen. Dieses Antigen kommt in hoher Dichte auf Monozyten und Makrophagen der Maus vor.

Wir verwenden die Methode des „Direct magnetic cell labeling“ und führen eine positive Selektion von CD11b<sup>+</sup> Zellen durch. Dazu werden, wie oben beschrieben, die CD11b MicroBeads auf die in MACS Puffer gelöste Suspension von Knochenmarkzellen gegeben. Die MicroBeads binden dann an die CD11b<sup>+</sup> Zellen.

Die gesamte Suspension läuft danach durch eine im MACS Magneten platzierte MACS Säule. Durch die magnetischen Wechselwirkungen zwischen MicroBeads und dem großen MACS Magneten werden die magnetisch markierten CD11b<sup>+</sup> Zellen in der Säule zurückgehalten, während alle anderen Zellen die Säule ungehindert passieren können. Nach Entfernung der Säule vom MACS Magneten können die zu isolierenden Zellen aus der Säule ausgespült werden. Die experimentelle Anordnung des MACS Sortings ist aus Abbildung 4 zu entnehmen.



**Abbildung 4: Magnetic Cell Sorting (MACS)**

Schematisch dargestellt ist der Ablauf des Magnetic Cell Sorting zum Trennen von Mischkulturen. Nachdem ein magnetisch markierter Antikörper an Oberflächenstrukturen der Zielzelle gebunden hat, lässt man die Zellsuspension durch ein Magnetfeld fließen. Die magnetisch markierten Zielzellen werden festgehalten, während kontaminierende Zellen ausgespült werden. Schließlich können nach Entfernung des Magneten die Zielzellen ausgespült werden. Verändert nach Manuals der Firma Miltenyi Biotec.

Die CD11b MicroBeads verändern laut Herstellerangaben weder Struktur noch Funktion und Aktivitätsstatus der markierten Zellen. Außerdem bestehen die MicroBeads aus einer biologisch abbaubaren Matrix aus Eisenoxid und Polysacchariden, so dass sie in der Zellkultur nach einigen Tagen nicht mehr nachweisbar sind. Es können also sofort nach Beendigung des MACS Cell Sortings weitere Experimente mit den isolierten Zellen durchgeführt werden.

### 3.1.5 Bestimmung der Splenozytenzahl

Die Zellzählung der „Counts“-Kulturen wird am Kulturtag d7 durchgeführt. Dazu werden zunächst die am Kulturtag d5 angelegten 24-well Platten aus dem Wärmeschrank entnommen. Folgende Cokulturen werden bei der anschließenden Zellzählung untersucht:

- Splenozyten (CFSE gefärbt)
- Splenozyten (CFSE gefärbt) + Monozyten
- Splenozyten (CFSE gefärbt) + STICs

Die am Boden der Wells adhärennten Zellen werden mit Kunststoffspateln gelöst und der Inhalt der einzelnen Wells in 15 ml Falcon Tubes gegeben. Die Tubes werden für 8 min bei 1300 rpm und RT zentrifugiert. Vom Überstand werden jeweils 700 µl in Eppendorf Cups für die spätere Zytokinbestimmung eingefroren. Der restliche Überstand wird bis auf etwa 350 µl, die im Tube verbleiben, abgesaugt und verworfen. Nun wird das Zellpellet in den Tubes mit Hilfe einer Pipette resuspendiert, mit der auch das exakte Volumen in den Falcon Tubes gemessen wird. Anschließend wird eine Probe aus jedem Tube auf eine Brightline Neubauer Zählkammer gegeben. Die Neubauer Zählkammer ist eine etwa 3 mal 8 cm große Glasplatte, auf deren Mitte quadratische Felder von definierter Größe aufgezeichnet sind (Zählfläche). Durch seitliche Auflagen wird ein Deckglas in bekannter Höhe über der Zählfläche gehalten. Wird nun die Zellsuspension zwischen Zählkammer und Deckglas gegeben, befindet sich in jedem quadratischen Feld ein definiertes Volumen.

Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes (Axiotech II, Zeiss, Göttingen) werden nun die zuvor CFSE gefärbten Splenozyten in der Zählkammer ausgezählt. Aus der Anzahl der fluoreszierenden Zellen pro Feld kann dann die Splenozyten Zellzahl pro Volumeneinheit errechnet werden. In den Proben, die Splenozyten alleine enthalten, werden auch morphologisch veränderte Zellen mitgezählt. Bei den Kulturen von Splenozyten zusammen mit Monozyten oder STIC Zellen werden nur Splenozyten, die keinen direkten Kontakt zu den ungefärbten Monozyten bzw. STIC Zellen haben, bei der Zählung berücksichtigt. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe einer Tabelle in Microsoft Excel.

### 3.1.6 FACS / Durchflusszytometrie

Am Kulturtag d8 erfolgt die durchflusszytometrische Analyse der Zellkulturen zum Nachweis von regulatorischen T-Zellen mit Hilfe des fluorescence activated cell sorting (FACS). Diese Untersuchungen wurden von Frau Dr. Kronenberg und den MTAs der Abteilung durchgeführt. An dieser Stelle möchte ich nochmals für die zur Verfügung Stellung dieser Daten danken.

Die Durchflusszytometrie (FACS) ermöglicht die quantitative Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen sowie von Nukleinsäuren. Das Grundprinzip ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit für definierte Zellstrukturen spezifischen Antikörpern durchgeführt wird [1, 38].

Es werden i. d. R. fluoreszenzmarkierte Antikörper benutzt, um an für bestimmte Zellpopulationen spezifische Zellstrukturen, bei Immunzellen häufig Oberflächenmarker, zu binden. Die so markierten Zellen werden über Laser detektiert. Wenn die Zellen den Laser passieren, wird ein Teil des Lichtes gestreut. Der Anteil des gestreuten Lichtes korreliert mit der Größe und mit der Granularität der Zellen. So streuen homogene Zellen wie Lymphozyten deutlich weniger Licht als Zellen wie Granulozyten, die zahlreiche Vesikel enthalten. Dadurch können die Zellen voneinander unterschieden werden. Das Vorwärtsstreulicht (FSC, forward scatter) ist ein Maß für die Beugung des Lichtes im flachen Winkel und abhängig vom Zellvolumen. Das Seitwärtsstreulicht (SSC, sideward scatter) ist ein Maß für die Brechung des Lichtes im rechten Winkel, welche von der Granularität der Zelle und von Größe und Struktur ihres Zellkerns abhängt. FSC und SSC von analysierten Zellen können in Form eines Dot-Plots dargestellt werden. Dabei entspricht jeder Punkt auf dem Plot einer analysierten Zelle. Die Position der Punkte auf der x- bzw. der y-Achse im Dot-Plot entspricht den gemessenen FSC und SSC Werten [1, 38].

Neben der Streuung des eingestrahnten Lichtes wird zusätzlich die Fluoreszenz der an die Antikörper gekoppelten Farbstoffe gemessen. Dabei entspricht die Stärke des Fluoreszenzsignals der Menge an gebundenem Antikörper. Somit ist eine quantitative Aussage über die Expression verschiedener Marker möglich. Durch die Verwendung mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe und Laser kann die Expression mehrerer Marker pro Zelle gleichzeitig analysiert werden [38]. Bei unseren Experimenten wurden Antikörper für die Oberflächenmarker CD4 und CD25 sowie den intrazellulären Transkriptionsfaktor Foxp3 verwendet. Zellen, die für alle drei

Marker positiv sind, werden per Definition als regulatorische T-Zellen bezeichnet. Analog zur Darstellung der FSC und SSC Werte wird die Expression der Marker CD4 und CD25 auf der x- und y-Achse von Dot-Plots dargestellt. Die Expression des Markers Foxp3 der verschiedenen Zellpopulationen ist in Form von Histogrammen dargestellt.

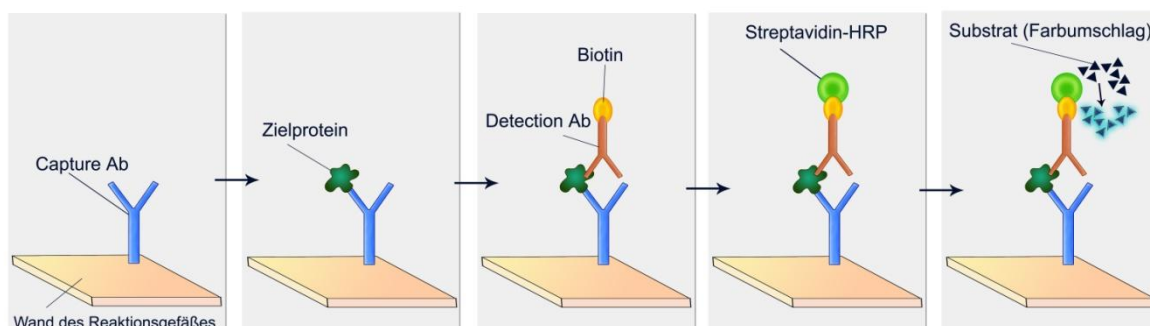
Neben dem Nachweis von regulatorischen T-Zellen in den Kulturen wurden die STIC Zellen mit Hilfe des FACS auf die Expression der im Microarray identifizierten Proteine GITRL, OX40L und CD301 untersucht. Dadurch sollte untersucht werden, ob die auf m-RNA-Ebene detektierte Hochregulation der Genexpression auch zur Proteinexpression in den entsprechenden Zellpopulationen führt.

## **3.2 ELISA**

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein molekularbiologisches Verfahren, das zum Nachweis von gelösten Proteinen in niedrigen Konzentrationen verwendet wird [39]. Dabei wird die Fähigkeit von Antikörpern genutzt, sich spezifisch an bestimmte Proteine binden zu können. Es ist möglich, an diese Antikörper ein Enzym zu koppeln, welches ein farbloses Substrat in ein farbiges Reaktionsprodukt umsetzen kann. Kommt es nach Zugabe des Substrates zu einer Farbänderung im Reaktionsgefäß, so kann daraus auf die Anwesenheit des nachzuweisenden gelösten Proteins geschlossen werden. Vergleicht man den Farbumschlag der Proben mit dem Farbumschlag einer definierten Verdünnungsreihe des nachzuweisenden Proteins, so ist auch ein quantitativer Nachweis, also eine Konzentrationsbestimmung des gesuchten Proteins möglich. Dieser Nachweis kann mit automatischen Photometern erfolgen [39].

Bei unseren Versuchen wird die Technik des direkten Sandwich-ELISA verwendet. Dabei wird auf eine Kunststoffplatte (Corning Inc., New York, USA), die 96 Vertiefungen enthält (96-well Platte), zunächst ein erster Antikörper (Coating Antibody) gegeben, der sich passiv an die Wände der Reaktionsgefäße – also der einzelnen wells – anlagert. Zwischen den einzelnen Schritten werden immer wieder Waschungen durchgeführt, um nicht gebundene Proteine zu entfernen. Als nächstes werden die zu untersuchenden Proben und Standard Verdünnungsreihen des gesuchten Proteins in die Reaktionsgefäße gegeben. Die Coating Antibodies binden

nun spezifisch das zu untersuchende Protein. Daraufhin wird ein zweiter Antikörper (Detection Antibody) hinzugegeben, an den ein Enzym gebunden ist. Auch dieser bindet an das nachzuweisende Protein – allerdings an ein anderes Epitop. Weil nun zwei Antikörper an das Protein gebunden sind, spricht man von einem Sandwich-ELISA. Gibt man nun das Substrat zu, kommt es je nach Menge des gebundenen Detection Antibodies und damit auch je nach Menge des nachzuweisenden Proteins zu einem unterschiedlich starken Farbumschlag. Dieser wird photometrisch gemessen [39]. Eine schematische Darstellung eines Sandwich-ELISAs zeigt Abbildung 5.



**Abbildung 5: Sandwich ELISA**

Schematisch dargestellt ist der Ablauf eines Sandwich ELISAs. Der an die Wand des Reaktionsgefäßes angelagerte Capture Antibody bindet an ein Epitop des Zielproteins. Ein anschließend zugegebener Detection Antibody bindet an ein anderes Epitop des Zielproteins. Das daraufhin hinzugefügte Enzym Streptavidin-HRP bindet an einen Biotin-Rest des Detection Antibodies. Streptavidin-HRP katalysiert die Umsetzung eines farblosen Substrates zu einem farbigen Reaktionsprodukt. Dieser Farbumschlag kann photometrisch detektiert werden. Verändert nach [1] und Manuals der Firma R&D.

Die Puffer, in denen die jeweils verwendeten Coating- oder Detection-Antibodies gelöst werden, haben die Aufgabe, die passive Adsorption an die im Assay vorhandenen Proteine zu verhindern, während eine immunologisch spezifische Bindung möglich sein muss [39]. Dies kann zum Einen durch andere Proteine erreicht werden, die dem Puffer in hoher Konzentration zugesetzt sind und so den Antikörper kompetitiv an einer unspezifischen Bindung mit der festen Phase hindern. Andererseits ist es möglich, ein Detergenz in einer niedrigen Konzentration zuzugeben, was einen vergleichbaren Effekt hat [39].

Bei den einzelnen von uns durchgeführten ELISAs wurde entsprechend der Protokolle der jeweiligen Hersteller verfahren. Das generelle Vorgehen wird im Folgenden beschrieben. Zu Beginn wird eine 96-well Kunststoffplatte (Corning Inc., New York, USA) über Nacht mit einem Capture Antibody inkubiert. Es kommt zur

passiven Anlagerung der in Puffer gelösten Antikörper an die Kunststoffoberfläche der 96-well Platte [39]. Nicht gebundene Antikörpermoleküle werden daraufhin durch Spülen mit einem Wash Buffer entfernt. Als nächstes wird ein Block Buffer hinzugegeben. Die darin enthaltenen Proteine binden an noch nicht mit Capture Antibodies gesättigte Strukturen der 96-well Platte. Somit wird sichergestellt, dass sich die nachzuweisenden Proteine nur spezifisch an die freien Enden der Capture Antibodies anlagern und nicht unspezifisch mit freiliegender Kunststoffoberfläche interagieren können. Nun werden die Überstände der zu untersuchenden Zellkulturen, sowie die Standard Verdünnungen der nachzuweisenden Zytokine auf die Platte pipettiert. Nach erneuter Inkubation und Waschung mit Wash Buffer zur Entfernung der ungebundenen Proteine kann der gelöste Detection Antibody hinzugegeben werden. Die verwendeten Detection Antibodies sind mit Biotin gekoppelt. Nach einem weiteren Inkubations- und Waschschrift wird das Streptavidin-HRP hinzugegeben (Abb. 5). Streptavidin ist ein aus vier identischen Untereinheiten bestehendes tetrameres Protein, das mit sehr hoher Affinität vier Biotinmoleküle binden kann [40]. Streptavidin ist mit dem Enzym Horseradisch Peroxidase verbunden, welches die Farbänderung des Substrates hervorruft. Nach einem letzten Inkubations- und Waschvorgang kann nun die TMB Substrate Solution Lösung (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) hinzugegeben werden. Durch Änderung des pH-Wertes des Systems (Zugabe von 50µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) wird die Reaktion nach einer definierten Zeit abgestoppt. Die 96-well Platte wird daraufhin in einem Emax precision microplate reader Photometer (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) ausgelesen. Die Daten werden abgespeichert und mit Hilfe der Photometer Software ausgewertet. In den Abschnitten 3.2.1 bis 3.2.5 wird das genaue Vorgehen bei den einzelnen ELISAs entsprechend der Vorgaben des Herstellers beschrieben.

### **3.2.1 Durchführung des IL-10 ELISA**

#### **Vorbereitungen**

Zunächst werden die benötigten Puffer und Lösungen angesetzt. Für den Coating Buffer werden 5,9 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 8,05 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 500 ml destilliertes Wasser gegeben. Durch Rühren werden die Salze gelöst. Die Lösung wird daraufhin steril filtriert. Zur Erstellung des Assay Diluent werden 50 ml FCS (Biochrom AG, Berlin) in

500 ml PBS gelöst. Die Lösung wird ebenfalls steril filtriert. Wie bei allen anderen verwendeten ELISA Kits wird auch hier als Wash Buffer eine Mischung aus 500 ml PBS und 250 µl Tween-20 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) verwendet. Diese wird zum Waschen der 96 Well Platten in eine Spritzflasche gefüllt. Als Stop Solution kommt 1 molare H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zum Einsatz.

<u>Coating Buffer (IL-10)</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 500 ml H<sub>2</sub>O (dest.)</li> <li>• 5,9 g Na<sub>2</sub> H PO<sub>4</sub></li> <li>• 8,05 g Na H<sub>2</sub> PO<sub>4</sub></li> </ul>	<u>Wash Buffer</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 500 ml PBS</li> <li>• 250 µl Tween-20</li> </ul>
<u>Assay Diluent (IL-4 / IL-10)</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 500 ml PBS</li> <li>• 50 ml FCS</li> </ul>	<u>Stop Solution</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></li> </ul>

*Tabelle 1: Puffer für IL-10 ELISA (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA)*

Zur Herstellung der erforderlichen Verdünnung des IL-10 Standards wird je nach Charge des Herstellers entsprechend der beiliegenden Anleitung verfahren. In dem verwendeten Produkt werden 175 ng des rekombinanten Maus-IL-10 in 1 ml destilliertem Wasser gelöst. Daraufhin werden je 20 µl dieser Lösung in Eppendorf Cups aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Die ebenfalls benötigten Capture- und Detection-Antikörper, sowie das Enzyme Reagent, welches das Streptavidin-HRP enthält, werden bereits in gelöster Form geliefert und im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Alle Puffer und Lösungen werden bei Bedarf unter der Sterilbank aus den Behältnissen entnommen.

### **Coating der Platte**

Zur Durchführung des ELISA werden zunächst 44 µl des Capture Antibody in 11 ml des Coating Buffers gelöst. Daraufhin werden je 100 µl dieser Lösung in alle Wells einer neuen 96-well Platte gegeben. Dazu wird, wie auch für die folgenden vergleichbaren Pipettierschritte eine automatische Pipette (Eppendorf, Hamburg) verwendet. Die Platte wird mit einer Klebefolie verschlossen und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert.

## Durchführung des ELISA

Nach Ende der Inkubationszeit wird die Lösung aus den Wells abgeschüttet und die Platte mit Wash Buffer gewaschen. Dabei wird eine Spritzflasche verwendet, um jedes einzelne Well vollständig mit Wash Buffer zu füllen. Danach wird der Wash Buffer wieder abgeschüttet. Dieser Waschvorgang wird dreimal wiederholt. Die 96-well Platte wird nun auf saugfähigem Papier ausgeklopft, um die Reste des Wash Buffers möglichst vollständig aus den Wells zu entfernen. Daraufhin werden in jedes Well 200 µl Assay Diluent pipettiert, die Platte wird wieder mit der Klebefolie verschlossen und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Während der Inkubationszeit werden die zu untersuchenden Proben bei Raumtemperatur aufgetaut und eine Verdünnungsreihe des IL-10 Standards erstellt. Dazu wird zunächst ein 20 µl Standard Aliquot aufgetaut. Daraufhin werden 12 µl des IL-10 Standards in 1 ml Assay Diluent gelöst. Diese Lösung enthält IL-10 in einer Konzentration von 2000 pg/ml und wird als S1 bezeichnet. Es wird eine Verdünnungsreihe im Verhältnis 1:2 mit 7 FACS Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) erstellt (S1 – S7). Somit enthält das S2 Röhrchen eine IL-10 Konzentration von 1000 pg/ml, das S7 Röhrchen noch eine Konzentration von 31,25 pg/ml. Das Röhrchen S8 wird nur mit 500 µl Assay Diluent gefüllt und dient später als Leerwert.

Bevor die aufgetauten Proben aus den Eppendorf Cups entnommen werden können, müssen sie zuerst mit einem Vortex Gerät durchmischt werden. Anschließend werden je 120 µl der zu untersuchenden Proben und der Standard Verdünnungsreihe (S1 – S8) auf eine separate 96-well Platte mit Rundboden pipettiert. Dieser Zwischenschritt wird durchgeführt, um die einzelnen Proben dann möglichst zeitgleich auf die definitive ELISA Platte pipettieren zu können. Um Messungengenauigkeiten zu minimieren, wird eine Dreifachbestimmung des Standards verwendet. Drei weitere Wells auf der Platte werden für die IL-10 Bestimmung im Kulturmedium 2, welches für die Zellkultur verwendet wurde, benutzt. Die hier ermittelten Ergebnisse müssen später von den Werten der Proben abgezogen werden.

Nach Ende der einstündigen Inkubationszeit wird die 96-well ELISA Platte, wie oben beschrieben, dreimal gewaschen. Daraufhin werden je 100 µl der Proben und des IL-10 Standards von der 96-well Rundbodenplatte auf die ELISA Platte pipettiert. Diese wird wieder mit der Folie verschlossen und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wird die 96-well Platte, wie oben beschrieben, fünfmal gewaschen. Daraufhin werden 44 µl Detection Antibody und 44 µl Enzyme Reagent in 11 ml Assay Diluent gelöst und die erhaltene Lösung vermischt. Vom so erhaltenen Working Detektor werden 100 µl / Well auf die ELISA Platte pipettiert. Die Platte wird verschlossen, eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und danach siebenmal, wie oben beschrieben, gewaschen. Als nächstes wird die Substrate Solution (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) vorbereitet, welche sich aus zwei Reagentien zusammensetzt. Dafür werden 6 ml des Reagenz A mit 6 ml des Reagenz B vermischt. Je 100 µl der fertig gemischten Substrate Solution werden in jedes Well der ELISA Platte pipettiert. Die Platte wird nun für 30 min ohne Abdeckung in Dunkelheit inkubiert. Dabei wird etwa alle 10 min der Farbumschlag beobachtet, um die Reaktion vorzeitig abstoppen zu können, falls sich eine zu intensive Färbung einstellt. Nach der Inkubationszeit wird die Färbungsreaktion mit 50 µl / Well Stop Solution (1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) abgestoppt. Die ELISA Platte wird mit einem Emax precision microplate reader bei 450 nm mit Wellenlängenkorrektur bei 540 nm ausgewertet. Die Daten werden mit einer Software erfasst und abgespeichert.

### 3.2.2 Durchführung des IL-4 ELISA

#### Vorbereitungen

Zunächst werden die benötigten Puffer und Lösungen angesetzt. Das Vorgehen ist analog zum IL-10 ELISA.

<u>Coating Buffer (IL-4)</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 500 ml H<sub>2</sub>O (dest.)</li> <li>• 4,2 g NaHCO<sub>3</sub></li> <li>• 1,8 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></li> <li>• pH 9,5</li> </ul>	<u>Wash Buffer</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 500 ml PBS</li> <li>• 250 µl Tween-20</li> </ul>
<u>Assay Diluent (IL-4 / IL-10)</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 500 ml PBS</li> <li>• 50 ml FCS</li> </ul>	<u>Stop Solution</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></li> </ul>

*Tabelle 2: Puffer für IL-4 ELISA (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA)*

Zur Herstellung der erforderlichen Verdünnung des IL-4 Standards wird, je nach Charge des Herstellers, entsprechend der beiliegenden Anleitung verfahren. In dem

verwendeten Produkt werden 125 ng des rekombinanten Maus-IL-4 in 1 ml destilliertem Wasser gelöst. Daraufhin werden je 25 µl dieser Lösung aliquotiert und eingefroren.

### **Coating und Durchführung des ELISA**

Zur Durchführung des ELISA werden zunächst 44 µl des Capture Antibody in 11 ml des Coating Buffers gelöst. Daraufhin werden je 100 µl dieser Lösung in alle Wells einer neuen 96-well Mikrotiter Platte gegeben. Die Platte wird mit einer Klebefolie verschlossen und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wird die Platte dreimal mit Wash Buffer gewaschen. Daraufhin werden in jedes Well 200 µl Assay Diluent pipettiert, die Platte wird wieder mit der Klebefolie verschlossen und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Während der Inkubationszeit werden die zu untersuchenden Proben bei Raumtemperatur aufgetaut und eine Verdünnungsreihe des IL-4 Standards erstellt. Dazu wird zunächst ein 25 µl Standard Aliquot aufgetaut. Daraufhin werden 20 µl des IL-4 Standards in 5 ml Assay Diluent gelöst. Diese Lösung enthält IL-4 in einer Konzentration von 500 pg/ml und wird als S1 bezeichnet. Es wird eine Verdünnungsreihe im Verhältnis 1:2 mit 7 FACS Röhrchen erstellt (S1 – S7). Somit enthält das S2 Röhrchen eine IL-4 Konzentration von 250 pg/ml. Das Röhrchen S8 wird nur mit 500 µl Assay Diluent gefüllt und dient später als Leerwert.

Bevor die aufgetauten Proben aus den Eppendorf Cups entnommen werden können, müssen sie zuerst mit einem Vortex Gerät durchmischt werden. Anschließend werden je 120 µl der zu untersuchenden Proben und der Standard Verdünnungsreihe (S1 – S8) auf eine separate 96-well Platte mit Rundboden pipettiert. Es wird eine Dreifachbestimmung des Standards verwendet. Drei weitere Wells auf der Platte werden für die IL-4 Bestimmung im Kulturmedium, welches für die Zellkultur verwendet wurde, benutzt. Die hier ermittelten Ergebnisse müssen später von den Werten der Proben abgezogen werden.

Nach Ende der Inkubationszeit wird die 96-well ELISA Platte dreimal gewaschen. Daraufhin werden je 100 µl der Proben und des IL-4 Standards von der 96-well Rundbodenplatte auf die ELISA Platte pipettiert. Diese wird wieder mit der Folie verschlossen und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird die 96-well Platte fünfmal gewaschen. Daraufhin werden 44 µl Detection Antibody und 44 µl

Enzyme Reagent in 11 ml Assay Diluent gelöst und die erhaltene Lösung vermischt. Vom so erhaltenen Working Detektor werden 100 µl / Well auf die ELISA Platte pipettiert. Die Platte wird verschlossen, eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und danach siebenmal gewaschen. Als nächstes wird die Substrate Solution vorbereitet, welche sich aus zwei Reagentien zusammensetzt. Dafür werden 6 ml des Reagenz A mit 6 ml des Reagenz B vermischt. Je 100 µl der fertig gemischten Substrate Solution werden in jedes Well der ELISA Platte pipettiert. Die Platte wird nun für 30 min ohne Abdeckung in Dunkelheit inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird die Färbungsreaktion mit 50 µl / Well Stop Solution (1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) abgestoppt. Die ELISA Platte wird mit einem Lesegerät bei 450 nm mit Wellenlängenkorrektur bei 540 nm ausgewertet. Die Daten werden mit einer Software erfasst und abgespeichert.

### 3.2.3 Durchführung des IL-12 ELISA

#### Vorbereitungen

Zunächst werden die benötigten Puffer und Lösungen angesetzt. Das Vorgehen ist analog zum IL-10 ELISA. Bei diesem ELISA System müssen, wie bei allen von uns verwendeten Produkten der Firma R&D, zunächst Standard, Capture- und Detection Antibody gelöst und aliquottiert werden.

<u>Standard (IL-12)</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fertiges Pulver</li> <li>• 0,5 ml Reagent Diluent (IL-12)</li> <li>• <i>Aliquottieren von je 42 µl</i></li> <li>• <i>Tiefgefrieren bei -80°C</i></li> </ul>	<u>Reagent Diluent (IL-12)</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 500 ml PBS</li> <li>• 5 g BSA</li> </ul>
<u>Capture Antibody (IL-12)</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fertiges Pulver</li> <li>• 1 ml PBS</li> <li>• <i>Aliquottieren von je 65 µl</i></li> <li>• <i>Tiefgefrieren bei -80°C</i></li> </ul>	<u>Wash Buffer</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 500 ml PBS</li> <li>• 250 µl Tween-20</li> </ul>
<u>Detection Antibody (IL-12)</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fertiges Pulver</li> <li>• 1 ml Reagent Diluent (IL-12)</li> <li>• <i>Aliquottieren von je 65 µl</i></li> <li>• <i>Tiefgefrieren bei -80°C</i></li> </ul>	<u>Stop Solution</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></li> </ul>

Tabelle 3: Reagentien und Puffer für IL-12 ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA)

## **Coating und Durchführung des ELISA**

Zur Durchführung des IL-12 ELISA werden zunächst 61 µl eines zuvor aufgetauten Capture Antibody Aliquotts in 11 ml des PBS gelöst. Daraufhin werden je 100 µl dieser Lösung in alle Wells einer neuen 96-well Mikrotiter Platte gegeben. Die Platte wird mit einer Klebefolie verschlossen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wird die Platte dreimal mit Wash Buffer gewaschen. Daraufhin werden in jedes Well 200 µl Reagent Diluent pipettiert, die Platte wird wieder mit der Klebefolie verschlossen und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit werden die zu untersuchenden Proben bei Raumtemperatur aufgetaut und eine Verdünnungsreihe des IL-12 Standards erstellt. Dazu wird zunächst ein 42 µl Standard Aliquot aufgetaut. Daraufhin werden 42 µl des IL-12 Standards zu 958 µl Reagent Diluent dazupipettiert. Diese Lösung enthält IL-12 in einer Konzentration von 2500 pg/ml und wird als S1 bezeichnet. Es wird eine Verdünnungsreihe im Verhältnis 1:2 mit 7 FACS Röhrchen erstellt (S1 – S7). Somit enthält das S2 Röhrchen eine IL-12 Konzentration von 1250 pg/ml. Das Röhrchen S8 wird nur mit 500 µl Assay Diluent gefüllt und dient später als Leerwert.

Bevor die aufgetauten Proben aus den Eppendorf Cups entnommen werden können, müssen sie zuerst mit einem Vortex Gerät durchmischt werden. Anschließend werden je 120 µl der zu untersuchenden Proben und der Standard Verdünnungsreihe (S1 – S8) auf eine separate 96-well Platte mit Rundboden pipettiert. Es wird eine Dreifachbestimmung des Standards verwendet. Drei weitere Wells auf der Platte werden für die IL-12 Bestimmung im Kulturmedium, welches für die Zellkultur verwendet wurde, benutzt. Die hier ermittelten Ergebnisse müssen später von den Werten der Proben abgezogen werden.

Nach Ende der Inkubationszeit wird die 96-well ELISA Platte dreimal gewaschen. Daraufhin werden je 100 µl der Proben und des IL-12 Standards von der 96-well Rundbodenplatte auf die ELISA Platte pipettiert. Diese wird wieder mit der Folie verschlossen und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird die 96-well Platte dreimal gewaschen. Daraufhin werden 61 µl Detection Antibody in 11 ml Reagent Diluent gelöst. Vom so erhaltenen Working Detektor werden 100 µl / Well auf die ELISA Platte pipettiert. Die Platte wird verschlossen, 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und danach dreimal gewaschen. Nun werden an einem sterilen Arbeitsplatz 55 µl der Streptavidin-HRP Lösung in 11 ml Reagent Diluent

gelöst. Von der so erhaltenen Lösung werden 100 µl / Well auf die ELISA Platte pipettiert. Die Platte wird nun für 20 min ohne Abdeckung in Dunkelheit inkubiert und nach Ende der Inkubationszeit dreimal gewaschen. Als nächstes wird die Substrate Solution vorbereitet, welche sich aus zwei Reagentien zusammensetzt. Dafür werden 6 ml des Reagenz A mit 6 ml des Reagenz B vermischt. Je 100 µl der fertig gemischten Substrate Solution werden in jedes Well der ELISA Platte pipettiert. Die Platte wird nun für weitere 20 min ohne Abdeckung in Dunkelheit inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird die Färbungsreaktion mit 50 µl / Well Stop Solution (1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) abgestoppt. Die ELISA Platte wird mit einem Lesegerät bei 450 nm mit Wellenlängenkorrektur bei 540 nm ausgewertet. Die Daten werden mit einer Software erfasst und abgespeichert.

### 3.2.4 Durchführung des IFN-γ ELISA

#### Vorbereitungen

Zunächst werden die benötigten Puffer und Lösungen angesetzt. Das Vorgehen ist analog zum IL-10 ELISA. Bei diesem ELISA System müssen, wie bei allen von uns verwendeten Produkten der Firma R&D, zunächst Standard, Capture- und Detection Antibody gelöst und aliquottiert werden.

<u>Standard (IFN-γ)</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fertiges Pulver</li> <li>• 0,5 ml Reagent Diluent (IFN-γ)</li> <li>• <i>Aliquottieren von je 33 µl</i></li> <li>• <i>Tiefgefrieren bei -80°C</i></li> </ul>	<u>Reagent Diluent (IFN-γ)</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 500 ml Tris buffered saline</li> <li>• 0,5 g BSA</li> <li>• 250 µl Tween-20</li> <li>• <i>pH 7,33</i></li> </ul>
<u>Capture Antibody (IFN-γ)</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fertiges Pulver</li> <li>• 1 ml PBS</li> <li>• <i>Aliquottieren von je 65 µl</i></li> <li>• <i>Tiefgefrieren bei -80°C</i></li> </ul>	<u>Wash Buffer</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 500 ml PBS</li> <li>• 250 µl Tween-20</li> </ul>
<u>Detection Antibody (IFN-γ)</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fertiges Pulver</li> <li>• 1 ml Reagent Diluent (IFN-γ)</li> <li>• <i>Aliquottieren von je 65 µl</i></li> <li>• <i>Tiefgefrieren bei -80°C</i></li> </ul>	<u>Stop Solution</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></li> </ul>

Tabelle 4: Reagentien und Puffer für IFN-γ ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA)

## **Coating und Durchführung des ELISA**

Zur Durchführung des IFN- $\gamma$  ELISA werden zunächst 61  $\mu$ l eines zuvor aufgetauten Capture Antibody Aliquotts in 11 ml des PBS gelöst. Daraufhin werden je 100  $\mu$ l dieser Lösung in alle Wells einer neuen 96-well Mikrotiter Platte gegeben. Die Platte wird mit einer Klebefolie verschlossen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wird die Platte dreimal mit Wash Buffer gewaschen. Daraufhin werden in jedes Well 200  $\mu$ l Reagent Diluent pipettiert, die Platte wird wieder mit der Klebefolie verschlossen und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit werden die zu untersuchenden Proben bei Raumtemperatur aufgetaut und eine Verdünnungsreihe des IFN- $\gamma$  Standards erstellt. Dazu wird zunächst ein 33  $\mu$ l Standard Aliquot aufgetaut. Daraufhin werden 33  $\mu$ l des IFN- $\gamma$  Standards in 1 ml Reagent Diluent gelöst. Diese Lösung enthält IFN- $\gamma$  in einer Konzentration von 2000 pg/ml und wird als S1 bezeichnet. Es wird eine Verdünnungsreihe im Verhältnis 1:2 mit 7 FACS Röhrchen erstellt (S1 – S7). Somit enthält das S2 Röhrchen eine IFN- $\gamma$  Konzentration von 1000 pg/ml. Das Röhrchen S8 wird nur mit 500  $\mu$ l Assay Diluent gefüllt und dient später als Leerwert.

Bevor die aufgetauten Proben aus den Eppendorf Cups entnommen werden können, müssen sie zuerst mit einem Vortex Gerät durchmischt werden. Anschließend werden je 120  $\mu$ l der zu untersuchenden Proben und der Standard Verdünnungsreihe (S1 – S8) auf eine separate 96-well Platte mit Rundboden pipettiert. Es wird eine Dreifachbestimmung des Standards verwendet. Drei weitere Wells auf der Platte werden für die IFN- $\gamma$  Bestimmung im Kulturmedium, welches für die Zellkultur verwendet wurde, benutzt. Die hier ermittelten Ergebnisse müssen später von den Werten der Proben abgezogen werden.

Nach Ende der Inkubationszeit wird die 96-well ELISA Platte dreimal gewaschen. Daraufhin werden je 100  $\mu$ l der Proben und des IFN- $\gamma$  Standards von der 96-well Rundbodenplatte auf die ELISA Platte pipettiert. Diese wird wieder mit der Folie verschlossen und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird die 96-well Platte dreimal gewaschen. Daraufhin werden 61  $\mu$ l Detection Antibody in 11 ml Reagent Diluent gelöst. Vom so erhaltenen Working Detektor werden 100  $\mu$ l / Well auf die ELISA Platte pipettiert. Die Platte wird verschlossen, 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und danach dreimal gewaschen. Nun werden an einem sterilen Arbeitsplatz 55  $\mu$ l der Streptavidin-HRP Lösung in 11 ml Reagent Diluent

gelöst. Von der so erhaltenen Lösung werden 100 µl / Well auf die ELISA Platte pipettiert. Die Platte wird nun für 20 min ohne Abdeckung in Dunkelheit inkubiert und nach Ende der Inkubationszeit dreimal gewaschen. Als nächstes wird die Substrate Solution vorbereitet, welche sich aus zwei Reagentien zusammensetzt. Dafür werden 6 ml des Reagenz A mit 6 ml des Reagenz B vermischt. Je 100 µl der fertig gemischten Substrate Solution werden in jedes Well der ELISA Platte pipettiert. Die Platte wird nun für weitere 20 min ohne Abdeckung in Dunkelheit inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird die Färbungsreaktion mit 50 µl / Well Stop Solution (1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) abgestoppt. Die ELISA Platte wird mit einem Lesegerät bei 450 nm mit Wellenlängenkorrektur bei 540 nm ausgewertet. Die Daten werden mit einer Software erfasst und abgespeichert.

### 3.2.5 Durchführung des TGF-β ELISA

#### Vorbereitungen

Zunächst werden die benötigten Puffer und Lösungen angesetzt. Das Vorgehen ist analog zum IL-10 ELISA. Bei diesem ELISA System müssen, wie bei allen von uns verwendeten Produkten der Firma R&D, zunächst Standard, Capture- und Detection Antibody gelöst und aliquottiert werden.

<u>Standard (TGF-β)</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fertiges Pulver</li> <li>• 0,5 ml Reagent Diluent (TGF-β)</li> <li>• <i>Aliquottieren von je 25 µl</i></li> <li>• <i>Tiefgefrieren bei -80°C</i></li> </ul>	<u>Reagent Diluent (TGF-β)</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 500 ml PBS</li> <li>• 7 g delipized bovine serum</li> <li>• 250 µl Tween-20</li> <li>• <i>pH 7,3</i></li> </ul>
<u>Capture Antibody (TGF-β)</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fertiges Pulver</li> <li>• 1 ml PBS</li> <li>• <i>Aliquottieren von je 65 µl</i></li> <li>• <i>Tiefgefrieren bei -80°C</i></li> </ul>	<u>Block Buffer (TGF-β)</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 500 ml PBS</li> <li>• 25 ml Tween-20</li> <li>• 2,5 ml NaN<sub>3</sub> Lösung (10%)</li> </ul>
<u>Detection Antibody (TGF-β)</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fertiges Pulver</li> <li>• 1 ml Reagent Diluent (TGF-β)</li> <li>• <i>Aliquottieren von je 65 µl</i></li> <li>• <i>Tiefgefrieren bei -80°C</i></li> </ul>	<u>Wash Buffer</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 500 ml PBS</li> <li>• 250 µl Tween-20</li> </ul> <u>Stop Solution</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></li> </ul>

Tabelle 5: Reagentien und Puffer für TGF-β ELISA (R&D Systems, Minneapolis)

### **Aktivierung der Proben**

Das Zytokin TGF- $\beta$  hat die Besonderheit, dass es aufgrund seiner Bindung an das latency-associated peptide (LAP) in einer inaktiven Form von der Zelle freigesetzt wird (latentes TGF- $\beta$ ), in der es nicht an seinen Rezeptor binden kann und somit auch keinen biologischen Effekt zeigt [41]. Durch verschiedene Mechanismen, wie etwa durch Proteasen oder – wie bei unseren ELISAs – durch extreme pH Werte, kann latentes TGF- $\beta$  in seine aktive Form überführt werden, welche nur eine Halbwertszeit von etwa 3 Minuten hat [42]. Aus diesem Grund wird in unseren Versuchen das latente TGF- $\beta$  gemessen.

Um das latente TGF- $\beta$  in seine aktive Form zu überführen, ist bei dem von uns verwendeten ELISA Set eine Aktivierung der zu untersuchenden Proben erforderlich. Zunächst werden die Proben bei Raumtemperatur aufgetaut und mit einem Vortex Gerät durchmischt. Nun werden auf je 100  $\mu$ l Probe 20  $\mu$ l 1N HCl gegeben und 10 min inkubiert. Daraufhin wird zur Neutralisierung der Säure zu jeder Probe 20  $\mu$ l 1,2N NaOH gegeben. Bei der Berechnung der Konzentrationen muss somit später ein Verdünnungsfaktor von 1,4 berücksichtigt werden.

### **Coating und Durchführung des ELISA**

Zur Durchführung des TGF- $\beta$  ELISA werden zunächst 61  $\mu$ l eines zuvor aufgetauten Capture Antibody Aliquotts in 11 ml des PBS gelöst. Daraufhin werden je 100  $\mu$ l dieser Lösung in alle Wells einer neuen 96-well Mikrotiter Platte gegeben. Die Platte wird mit einer Klebefolie verschlossen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wird die Platte dreimal mit Wash Buffer gewaschen. Daraufhin werden in jedes Well 200  $\mu$ l Block Buffer pipettiert, die Platte wird wieder mit der Klebefolie verschlossen und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Während der Inkubationszeit wird eine Verdünnungsreihe des TGF- $\beta$  Standards erstellt. Dazu wird zunächst ein 25  $\mu$ l Standard Aliquot aufgetaut. Daraufhin werden 6,9  $\mu$ l des TGF- $\beta$  Standards in 1 ml Reagent Diluent gelöst. Diese Lösung enthält TGF- $\beta$  in einer Konzentration von 1000 pg/ml und wird als S1 bezeichnet. Es wird eine Verdünnungsreihe im Verhältnis 1:2 mit 7 FACS Röhrchen erstellt (S1 – S7). Somit enthält das S2 Röhrchen eine TGF- $\beta$  Konzentration von 500 pg/ml. Das Röhrchen S8 wird nur mit 500  $\mu$ l Assay Diluent gefüllt und dient später als Leerwert.

Anschließend werden je 120  $\mu$ l der zuvor aktivierten Proben und der Standard Verdünnungsreihe (S1 – S8) auf eine separate 96-well Platte mit Rundboden

pipettiert. Es wird eine Dreifachbestimmung des Standards verwendet. Drei weitere Wells auf der Platte werden für die TGF- $\beta$  Bestimmung im Kulturmedium, welches für die Zellkultur verwendet wurde, benutzt. Die hier ermittelten Ergebnisse müssen später von den Werten der Proben abgezogen werden.

Nach Ende der Inkubationszeit wird die 96-well ELISA Platte dreimal gewaschen. Daraufhin werden je 100  $\mu$ l der Proben und des TGF- $\beta$  Standards von der 96-well Rundbodenplatte auf die ELISA Platte pipettiert. Diese wird wieder mit der Folie verschlossen und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird die 96-well Platte dreimal gewaschen. Daraufhin werden 61  $\mu$ l Detection Antibody in 11 ml Reagent Diluent gelöst. Vom so erhaltenen Working Detektor werden 100  $\mu$ l / Well auf die ELISA Platte pipettiert. Die Platte wird verschlossen, 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und danach dreimal gewaschen. Nun werden an einem sterilen Arbeitsplatz 55  $\mu$ l der Streptavidin-HRP Lösung in 11 ml Reagent Diluent gelöst. Von der so erhaltenen Lösung werden 100  $\mu$ l / Well auf die ELISA Platte pipettiert. Die Platte wird nun für 20 min ohne Abdeckung in Dunkelheit inkubiert und nach Ende der Inkubationszeit dreimal gewaschen. Als nächstes wird die Substrate Solution vorbereitet, welche sich aus zwei Reagentien zusammensetzt. Dafür werden 6 ml des Reagenz A mit 6 ml des Reagenz B vermischt. Je 100  $\mu$ l der fertig gemischten Substrate Solution werden in jedes Well der ELISA Platte pipettiert. Die Platte wird nun für weitere 20 min ohne Abdeckung in Dunkelheit inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird die Färbungsreaktion mit 50  $\mu$ l / Well Stop Solution (1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) abgestoppt. Die ELISA Platte wird mit einem Lesegerät bei 450 nm mit Wellenlängenkorrektur bei 540 nm ausgewertet. Die Daten werden mit einer Software erfasst und abgespeichert.

### **3.3 DNA/RNA Microarray**

Seit der Einführung von DNA Microarrays vor etwa 15 Jahren konnte diese Technologie entscheidend weiterentwickelt werden. So sind standardisierte Arrays etwa für Genotypisierung, Analysen der Genexpression oder Comparative Genomische Hybridisierung (CGH) kommerziell erhältlich [43].

Das Grundprinzip eines Microarrays ähnelt dem eines ELISAs. An eine feste Phase sind „capture Moleküle“ gebunden, welche spezifisch an die einzelnen, in der Probe

nachzuweisenden Moleküle binden. Sind diese zum Beispiel mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert, können die gebundenen Moleküle nach einem Waschvorgang sichtbar gemacht werden. Die hohe Leistungsfähigkeit von Microarrays kommt dadurch zustande, dass auf einem einzelnen Array mehrere zehntausend „capture Moleküle“ in kleinen räumlichen Abständen untergebracht sein können. Dies ermöglicht zum einen, dass eine Probe gleichzeitig auf die Anwesenheit einer eben so hohen Zahl an Zielmolekülen untersucht werden kann. Zum anderen braucht die Probe nur kleine Mengen der nachzuweisenden Substanz zu enthalten, um ein positives Ergebnis zu erhalten [43].

Wendet man die Methode des Microarray zum Nachweis von Nukleinsäuren an, so lässt sich damit zum Beispiel das gesamte Transkriptom einer Zelle, also alle etwa 40.000 transkribierten m-RNA (messenger RNA) Moleküle einer Zelle, erfassen. Hierbei kommen als „capture Moleküle“ synthetisch erzeugte Oligonukleotide von 60 Basen Länge zum Einsatz. Die m-RNA wird aus den zu untersuchenden Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese wird quantitativ amplifiziert und mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert. Die Hybridisierung wird mit Hilfe einer zentrifugalen Durchmischung beschleunigt. Dadurch wird die Diffusion der cDNA Moleküle zu allen „capture Molekülen“ auf dem Array ermöglicht. Nachdem unspezifisch gebundene Moleküle durch Waschen entfernt worden sind, wird der Array elektronisch ausgelesen [43].

Die so in den Proben nachgewiesenen m-RNA Konzentrationen korrelieren häufig mit den Proteinkonzentrationen in der Zelle nach der Translation. Dies muss jedoch nicht immer so sein, da m-RNA Moleküle häufig vielfältigen posttranskriptionellen Modifikationen unterworfen sind. Diese Modifikationen werden mit einem DNA Microarray nicht erfasst. Da leistungsfähige Protein Microarrays noch nicht kommerziell erhältlich sind, werden zum Nachweis der funktionstüchtigen Proteine klassische Techniken wie Western Blot, ELISA oder Durchflusszytometrie angewendet [43].

In unseren Versuchen wurde zur Analyse der m-RNA Expression der STIC Zellen der Whole Mouse Genome Oligo Microarray der Firma Agilent Technologies verwendet. Er ermöglicht die simultane Analyse von etwa 21.000 m-RNA Expressionswerten. Der Assay wurde von Prof. Rehli aus der Klinik für Hämatologie und Onkologie der Universität Regensburg durchgeführt. Die Ergebnisse wurden uns zur weiteren Analyse auf einem Datenträger zur Verfügung gestellt.

### **3.4 Statistik**

Ergebnisse aus Experimenten sind als Mittelwerte mit Standardfehler (Standard error of the mean = SEM) angegeben. Statistische Analysen wurden unter Verwendung des t-Tests des Programms IBM SPSS Statistics Version 19 durchgeführt. Werte von  $P < 0,05$  werden als statistisch signifikant angesehen und sind mit \* gekennzeichnet, Werte von  $P \leq 0,001$  werden als hochsignifikant angesehen und mit \*\* gekennzeichnet.

## **4 Ergebnisse**

Die Arbeitsgruppen an den Universitäten Regensburg und Kiel [13, 44] konnten zeigen, dass die STIC Zellen immunsuppressive Eigenschaften aufweisen. Erste Ergebnisse über die zellulären Vorgänge, die dabei eine Rolle spielen, lieferten die Arbeiten von Brem-Exner et al. [13]. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Immunbotenstoffe zu identifizieren, welche die Wirkung der STIC Zellen erklären können.

Zunächst wurden im Rahmen einer Zellkultur Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe reproduziert, welche aufzeigen, dass die STIC Zellen bei einer Cokultur mit Lymphozyten zu einem Rückgang der Lymphozyten-Zellzahl führen. In dieser Kultur wurde außerdem die Zahl der regulatorischen T-Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie (von MTAs durchgeführt) bestimmt. Unsere Ergebnisse zeigen eine Anreicherung an regulatorischen T-Zellen in der Zellkultur der STIC Zellen. (Abschnitt 4.1) Diese wurde im weiteren Verlauf als Qualitätskontrolle unserer Zellkulturen benutzt.

Wir stellten die Arbeitshypothese auf, dass lösliche Immunbotenstoffe (Zytokine) bei den beobachteten Wirkungen der STIC Zellen eine Rolle spielen könnten. Deshalb wurden mit Hilfe von ELISAs die Konzentrationen von potentiell bedeutsamen Zytokinen im Zeitverlauf bestimmt. Da aufgrund der hohen Anzahl der bekannten Zytokine nicht alle zu bestimmen waren, haben wir uns auf diejenigen beschränkt, die immunsuppressive Eigenschaften haben. Die beschriebene Anreicherung von regulatorischen T-Zellen veranlasste uns außerdem, nach solchen Botenstoffen zu suchen, von denen bekannt ist, dass sie die Bildung von regulatorischen T-Zellen

induzieren können. In Anbetracht dieser Überlegungen wählten wir folgende Zytokine aus: IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  [1, 2, 29, 32, 34, 37].

Bei den Ergebnissen dieser Versuche (siehe Abschnitt 4.2) fiel uns der sehr deutliche Anstieg der IL-10 Konzentration in der Cokultur von STIC Zellen und Lymphozyten auf. Diese Ergebnisse in Verbindung mit der Tatsache, dass IL-10 eine Rolle bei der Bildung der iT<sub>reg</sub> Zellen spielt [45, 46], veranlasste uns zur Aufstellung der Arbeitshypothese, dass die von uns beobachtete Anreicherung der T<sub>reg</sub> Zellen durch die Wirkung des Zytokins IL-10 vermittelt sein könnte.

Zur Überprüfung dieser Hypothese, verwendeten wir kommerziell erhältliche IL-10 knockout Mäuse, um mit ihren Zellen die gleichen Kulturen durchzuführen wie mit den Wildtyp-Tieren. Durch die Beobachtung, dass bei den Zellkulturen der knockout Tiere eine vergleichbare Anreicherung von T<sub>reg</sub> Zellen stattfindet, konnten wir die Hypothese falsifizieren (Abschnitt 4.3).

Um nach weiteren Immunbotenstoffen und anderen potentiell bedeutsamen Genprodukten zu suchen, entschieden wir uns, eine Analyse des Genexpressionsmusters der STIC Zellen mit Hilfe eines Microarrays durchzuführen. Durch diese Methode konnten wir einen großen Teil des Transkriptoms der STIC Zellen darstellen und die Genexpressionen der STIC Zellen mit denen anderer Makrophagen vergleichen. Dies ermöglichte uns zum einen das Screening einer viel größeren Zahl an Zytokinen, wie dies bei Analysen auf Proteinebene möglich gewesen wäre. Zum anderen konnten wir auch nach Substanzen suchen, für die noch keine Antikörper kommerziell erhältlich sind oder nach solchen, die aufgrund ihres intrazellulären Vorkommens mittels Immunoassays und Durchflusszytometrie nur schwer nachzuweisen sind. Die Ergebnisse sind in Abschnitt 4.4 dargestellt.

Um die mittels Microarray gefundenen Änderungen in der Genexpression der STIC Zellen zu verifizieren, wurde auf Proteinebene nach einigen der zuvor identifizierten Genprodukte gescreent. Dazu wurden nochmals durchflusszytometrische Untersuchungen durchgeführt (von Frau Dr. Kronenberg und MTAs durchgeführt). Dabei konzentrierten wir uns bei den hochregulierten Proteinen der STIC Zellen auf solche, die auf der Zelloberfläche vorkommen und denen in der Literatur [47-53] immunregulatorische Eigenschaften zugeschrieben werden. Wir mussten uns dabei

auf Proteine beschränken, für die kommerziell für die Durchflusszytometrie geeignete Antikörper erhältlich sind. Die Ergebnisse sind im Abschnitt 4.5 dargestellt.

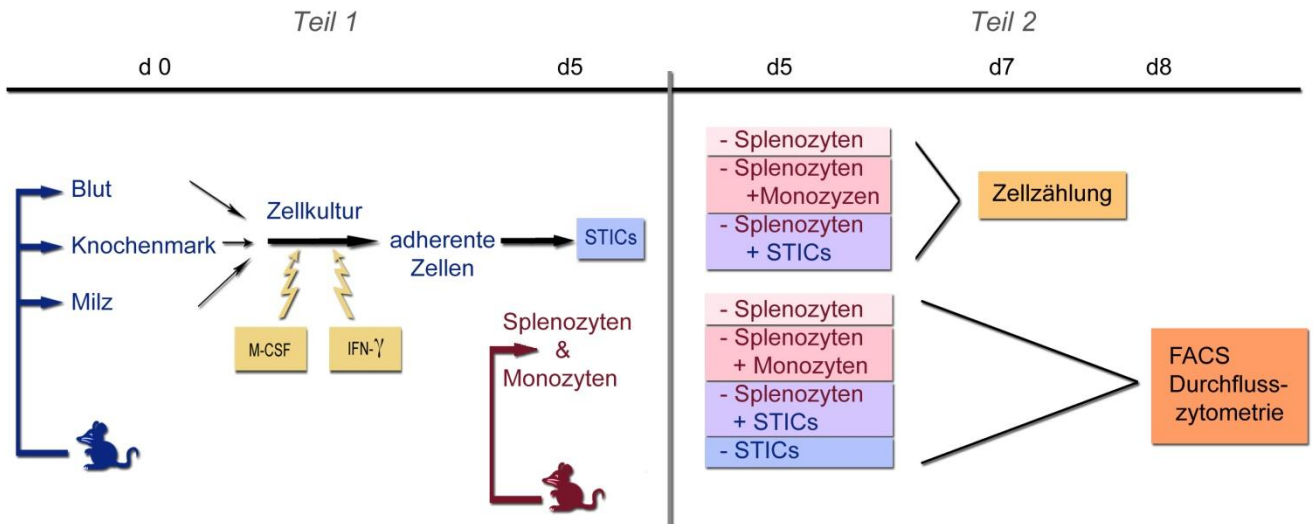
#### **4.1 Zellzählung und Durchflusszytometrie der STIC Zellkultur**

Der genaue Versuchsaufbau der Zellkultur zur Differenzierung der STIC Zellen ist in Abschnitt 3.1 dargestellt. STIC Zellen werden in einer Kultur von primären Mausleukozyten unter dem Einfluss von M-CSF und IFN- $\gamma$  generiert [13].

Nach der Gewinnung der an die Kulturschalen adhärenen Zellen am Kulturtag d5 (Abbildung 6) werden diese Zellen mit frisch isolierten Splenozyten aus neuen Mäusen des jeweils gleichen Stammes in Cokultur genommen. Die Präparation dieser Splenozyten enthält hauptsächlich Lymphozyten. Bei der Bestimmung der Splenozytenzahlen in den Kulturen werden, bedingt durch die Färbemethode, nur die Lymphozyten erfasst, während kokultivierte nicht lymphozytäre Zellen nicht mitgezählt werden. Deswegen werden die Splenozyten im Folgenden auch als Lymphozyten bezeichnet. Es ist zu beachten, dass das als „STICs“ bezeichnete Zellgemisch neben den eigentlichen makrophagenähnlichen STIC Zellen auch andere Zellpopulationen enthält. Dies liegt daran, dass aus der Kultur die monozytären Zellen nicht speziell separiert werden. Die der Zellkultur am Tag d5 zugesetzten Splenozyten werden am Kulturtag d7 ausgezählt. Die Zellzahlen werden mit einer Cokultur von Splenozyten und Monozyten sowie einer alleinigen Splenozytenkultur als Referenzgruppe verglichen.

Eine vereinfachte Übersicht der Zellkultur ist der Abbildung 6 zu entnehmen.

## STICS Zellkultur (Kurzfassung)



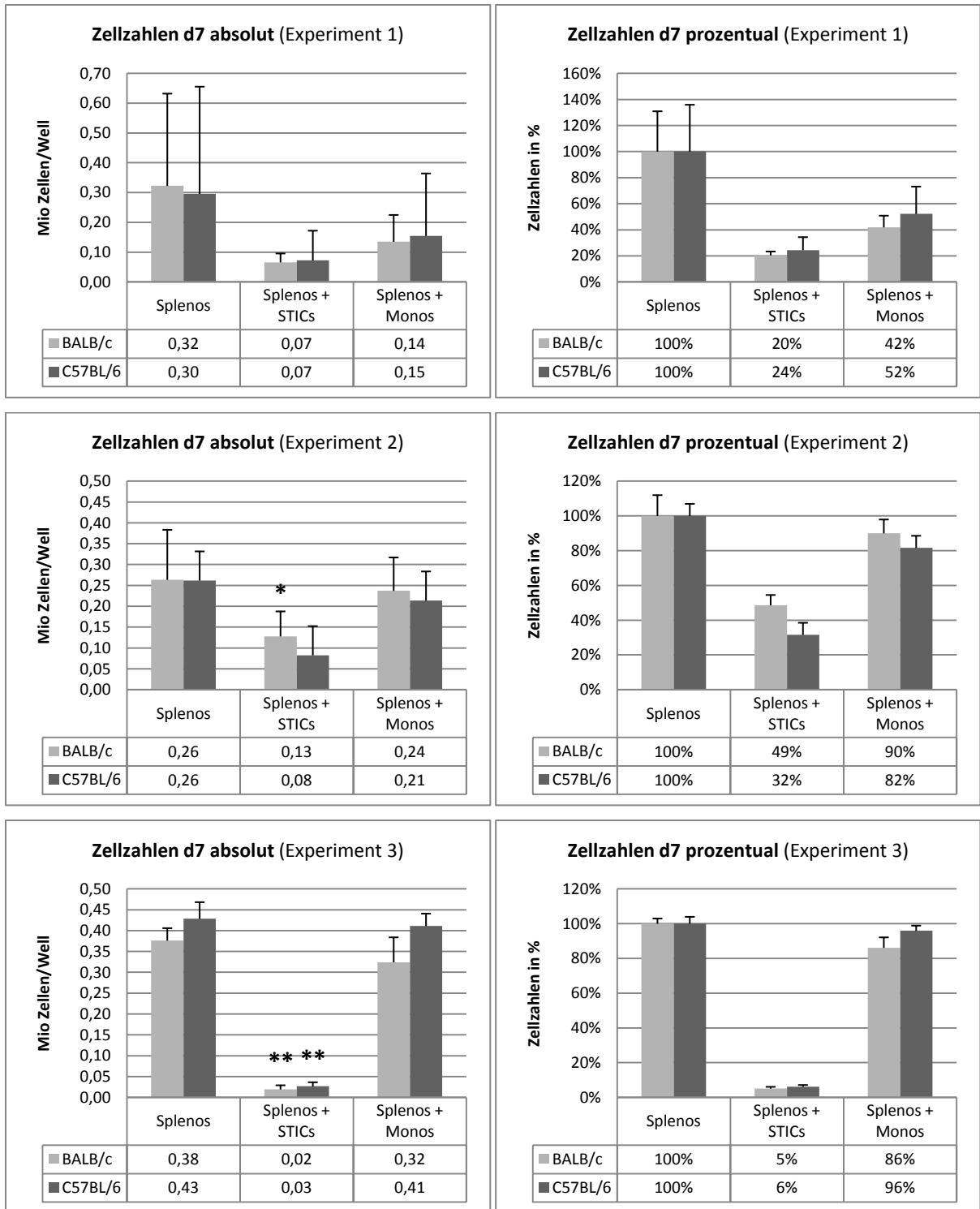
**Abbildung 6: Zeitlicher Ablauf der STIC Zellkultur**

Dargestellt ist eine vereinfachte Übersicht der von uns durchgeführten STIC Zellkultur. Von links nach rechts ist der zeitliche Verlauf in Tagen aufgezeigt. Die Kultur lässt sich in zwei Teile gliedern. Im ersten Teil werden die STIC Zellen aus Blut-, Knochenmark-, und Milzzellen von Mäusen differenziert, im Teil 2 werden die verschiedenen Koculturen durch Zellzählung und durchflusszytometrische Analyse weiter untersucht. Am Kulturtag d5 werden aus „neuen“ Mäusen Splenozyten und Monozyten isoliert. Am gleichen Tag werden diese Zellen mit den STIC Zellen in Kocultur genommen. Die Zuordnung der Zellen zu den am Tag d0 und den am Tag d5 getöteten Tieren ist farblich gekennzeichnet.

Bei unseren Experimenten werden Zellen aus den Mausstämmen BALB/c und C57BL/6 verwendet. Für die Verwendung dieser beiden Stämme haben wir uns entschieden, weil Brem-Exner et al. bereits erfolgreich nachweisen konnten, dass sich aus diesen STIC Zellen differenzieren lassen [13].

Die Auswertung der Zellzählungen hat ergeben, dass die Anwesenheit von STICs zu einem Rückgang der Splenozyten Zellzahl bei beiden Mausstämmen führt (Abb. 7). Die nachfolgende Grafik zeigt die Splenozytenzahlen nach der Durchführung von drei unabhängigen Experimenten am Kulturtag d7 der STIC Zellkultur.

Beim ersten Experiment enthält die Splenozytenkultur der BALB/c Zellen ohne kokultivierte STIC Zellen eine Zellzahl von  $0,32 \times 10^6$  pro Well (Standardfehler 0,55). Diese Splenozyten Zellzahl entspricht im Bezug auf die Zellzahlen der weiteren Koculturen 100%. Bei der Kocultur der Splenozyten mit STIC Zellen zeigt sich mit  $0,07 \times 10^6$  Zellen pro Well (Standardfehler 0,06), bzw. 20% der Zellzahl der Splenozyten Monokultur, eine deutlich niedrigere Splenozytenzahl. Durch den hohen Standardfehler wird das statistische Signifikanzniveau jedoch nicht erreicht. Die Zellzahl der Kocultur von Splenozyten und Monozyten liegt mit  $0,14 \times 10^6$  pro Well (Standardfehler 0,15), bzw. 42% der Zellzahl der Splenozyten Monokultur, höher. Die Werte für die C57BL/6 Zellen verhalten sich ähnlich und sind der Abbildung 7 zu entnehmen. Bei den weiteren in Abbildung 7 gezeigten Experimenten wird das statistische Signifikanzniveau zum Teil erreicht.



**Abbildung 7: Splenozytenzahlen am Kulturtag d7**

Dargestellt sind die Werte der Splenozyten Zellzahlen von 3 unabhängigen Experimenten am Kulturtag d7. Die beiden untersuchten Mausstämme BALB/c und C57BL/6 sind grafisch gekennzeichnet. Die jeweils linke Abbildung zeigt die absoluten Zellzahlen während die rechten Abbildungen die prozentualen Zellzahlen in den verschiedenen Cokulturen zeigen. Die Zellzahl der alleinigen Kultur von Splenozyten wird dabei als 100% festgelegt. Die Ausgangszellzahl am Kulturtag d5 betrug jeweils  $3 \times 10^5$ .

In der Cokultur mit STICs kommt es in allen drei Experimenten zum deutlichsten Rückgang der Splenozyten Zellzahl. Bei der Cokultur von Splenozyten mit Monozyten ändert sich die Zahl der Splenozyten dagegen nicht signifikant.

Die Fehlerindikatoren zeigen den Standardfehler. Bei Experiment 1 abweichende Skalierung.

\* Kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe „Splenos + Monos“ mit  $P < 0,05$ .

\*\* Kennzeichnet einen hochsignifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe „Splenos + Monos“ mit  $P \leq 0,001$ .

Die Ursachen für den beobachteten Rückgang der Lymphozyten in der Cokultur mit den STIC Zellen sind bisher nicht hinreichend bekannt. Es wäre denkbar, dass die STIC Zellen direkt Einfluss auf das Überleben der Lymphozyten nehmen. So spielt nach Brem-Exner et al. die Phagozytose dabei eine Rolle [13]. Daneben könnte man sich vorstellen, dass entweder lösliche Immunbotenstoffe oder auch Zell-Zell Kontakt vermittelte Signale – worauf Brem-Exner et al. ebenfalls Hinweise finden konnten – von Bedeutung sind. Weiterhin ist denkbar, dass die Zellen ihre Wirkungen nicht direkt, sondern mit Hilfe anderer Zellen ausüben. Brem-Exner et al. konnten zeigen, dass Lymphozytenpopulationen, die in Cokulturen mit STIC Zellen überleben, eine Anreicherung an regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ) aufweisen [13]. Deswegen soll im Weiteren auch nach Mediatoren gesucht werden, die zur Bildung von  $T_{reg}$  Zellen führen und somit die beschriebene Anreicherung an  $T_{reg}$  Zellen in der STIC Cokultur erklären könnten.

Um die oben genannten Ergebnisse von Brem-Exner et al. zu reproduzieren und um die Daten für die hier durchgeführten Experimente als Qualitätskontrolle zu verwenden, wurde am Kulturtag d8 von MTAs der Abteilung eine durchflusszytometrische Untersuchung zum Nachweis von  $T_{reg}$  Zellen durchgeführt. In Abbildung 8 ist exemplarisch ein repräsentatives Ergebnis einer solchen Durchflusszytometrie dargestellt. Abbildung 8a zeigt die Cokultur aus den am Kulturtag d5 gewonnenen STIC Zellen zusammen mit frisch isolierten Splenozyten. Bei Abbildung 8b handelt es sich um eine Kultur, die nur Zellen der STIC Zellkultur enthält, also nur aus seit dem Tag d0 in Kultur befindlichen Zellen besteht (siehe Abbildung 6).

Abbildung 8a (Splenos + STICs)

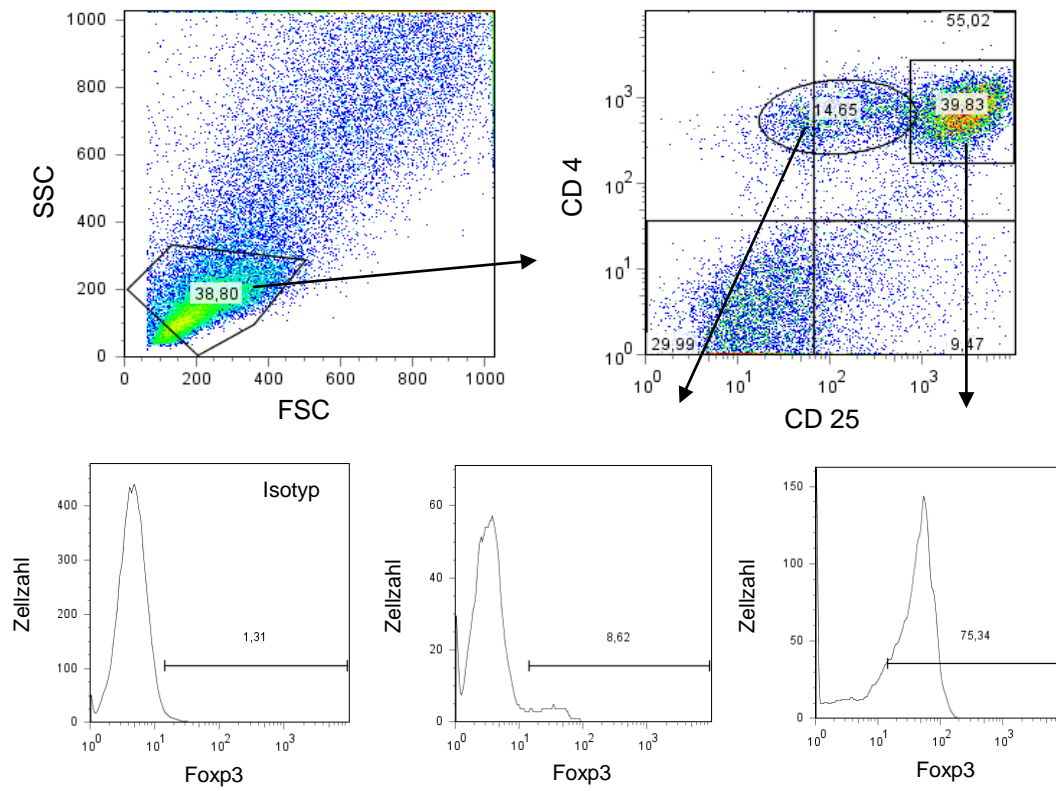
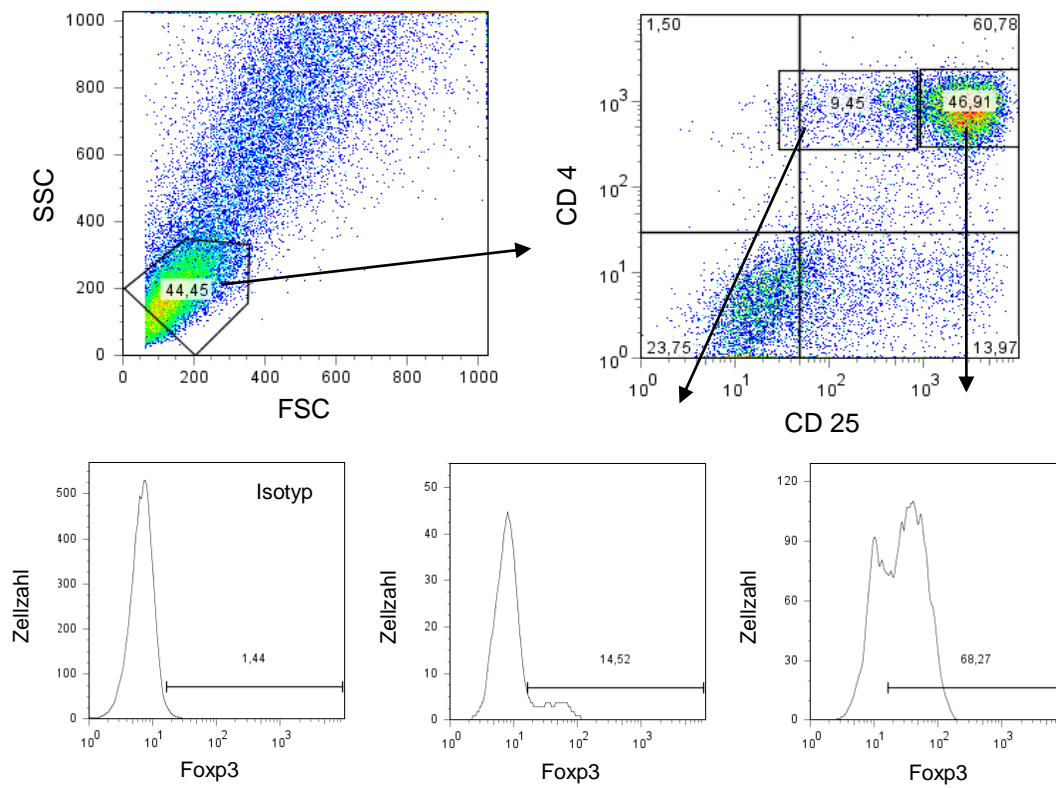


Abbildung 8b (STICs alleine)



### Abbildung 8: Nachweis von regulatorischen T-Zellen in der STIC Zellkultur

Am Tag 8 (d8) der Zellkultur wird eine durchflusszytometrische Untersuchung durchgeführt. Dargestellt sind hier die Ergebnisse der Zellen des BALB/c Stammes.

Abb. 8a zeigt die Cokultur von STICs und Splenozyten, Abb. 8b die alleinige STIC Kultur ohne dass am Kulturtag d5 Splenozyten hinzugegeben wurden.

Der jeweils linke Dot-Plot zeigt ein Gate (umrandetes Feld) der zu untersuchenden Zellen anhand von Größe und Granularität.

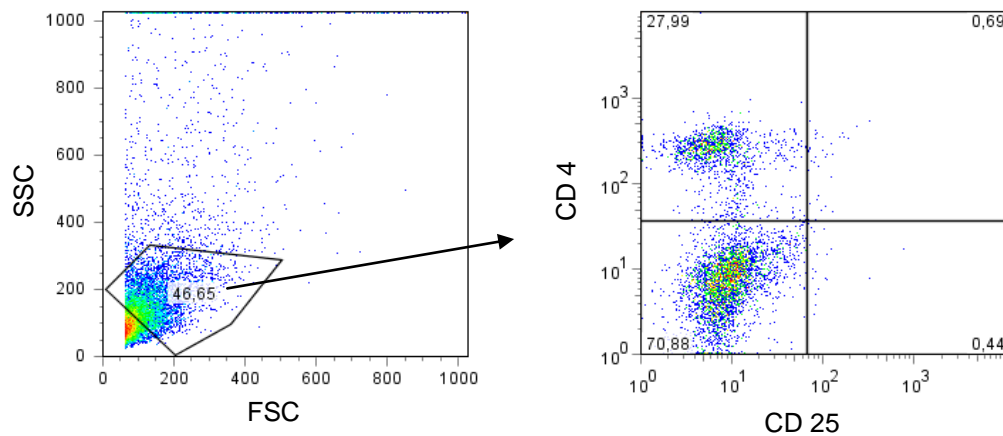
Der jeweils rechte Dot-Plot zeigt das Ergebnis der weiteren Analyse dieser Zellen. Auf der x-Achse ist die Expression von CD 25 und auf der y-Achse die Expression von CD 4 dargestellt. Dabei können CD4<sup>+</sup> CD25<sup>low</sup> Zellen (linkes gate) und CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> Zellen (rechtes gate) nachgewiesen werden.

Unterhalb der Dot-Plots ist jeweils die Expression von Foxp3 in Form von Histogrammen dargestellt. Dabei zeigt das erste Histogramm die für den Isotypen des verwendeten Antikörpers gemessene Signalintensität, welche als Negativkontrolle dient. Dementsprechend wird das Gate der als positiv betrachteten Signalwerte definiert. Das zweite Histogramm zeigt die Foxp3 Expressionswerte für CD4<sup>+</sup> CD25<sup>low</sup> Zellen und das dritte diejenigen für CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> Zellen. Dabei ist jeweils der Prozentsatz der als positiv eingestufteten Zellen angegeben.

Es zeigt sich, dass nur die CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> Zellen einen relevanten Anteil an Foxp3<sup>+</sup> Zellen aufweisen. Diese CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> Foxp3<sup>+</sup> Zellen können als regulatorische T-Zellen bezeichnet werden.

Im jeweils linken Dot-Plot ist ein Gate definiert, das aus der Gesamtheit der in der Zellkultur vorkommenden Zellen die Lymphozyten auswählt. Diese Lymphozyten werden dann auf die Expression von CD4 und CD25 untersucht. Bei diesen, im jeweils rechten Dot-Plot gezeigten Ergebnissen, ist vor allem das rechte Gate von Bedeutung. Die darin dargestellten CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> Zellpopulationen sind zu einem hohen Prozentsatz auch Foxp3 positiv. Wie in der Einleitung dargestellt, erfüllen diese CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> Foxp3<sup>+</sup> Zellen somit die Kriterien für regulatorische T-Zellen. Die CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> Zellen machen am Kulturtag d8 einen Anteil von 39,8% (Splenos + STICs) bzw. 46,9 % (STICs alleine) aller Lymphozyten aus. Der Anteil an Foxp3 positiven Zellen der CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> Zellpopulationen liegt bei 75,3% (Splenos + STICs) bzw. 68,3 % (STICs alleine). Ergebnisse von Frau Dr. Kronenberg haben gezeigt, dass am Kulturtag d0 der Anteil der T<sub>reg</sub> Zellen nur etwa 10 % beträgt (Persönliche Mitteilung), die T<sub>reg</sub> Zellen also im Laufe der Kultivierung gebildet werden, beziehungsweise sich anreichern.

Als Kontrolle wurden analoge durchflusszytometrische Untersuchungen mit einer Zellkultur der Splenozyten alleine durchgeführt (Abb. 9).



**Abbildung 9: Nachweis von regulatorischen T-Zellen in der Zellkultur (Splenos alleine)**

Am Tag 8 (d8) der Zellkultur wird eine durchflusszytometrische Untersuchung durchgeführt. Dargestellt sind hier die Ergebnisse der Zellen des BALB/c Stammes bei alleiniger Verwendung von an Kulturtag d5 gewonnenen Splenozyten.

Der linke Dot-Plot zeigt das Gate (umrandetes Feld) der zu untersuchenden Zellen anhand von Größe und Granularität.

Der rechte Dot-Plot zeigt das Ergebnis der weiteren Analyse dieser Zellen. Auf der x-Achse ist die Expression von CD 25 und auf der y-Achse die Expression von CD 4 dargestellt. Dabei können keine  $CD4^+ CD25^{high}$  T-Zellen nachgewiesen werden. (vgl. Abb. 8)

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Abbildung 8 zeigt sich in Abbildung 9, dass die alleinige Kultur der am Tag d5 frisch in Kultur genommenen Splenozyten keine nachweisbare Anzahl an  $CD4^+ CD25^+$  T-Zellen enthält. Diese Tatsache lässt vermuten, dass die in Abbildung 8 nachgewiesenen regulatorischen T-Zellen aus der am Kulturtag d0 angesetzten STIC Zellkultur stammen. Für diese Hypothese spricht außerdem, dass in der Kultur STICs + Splenozyten (Abb. 8a) ähnlich hohe Anteile an regulatorischen T-Zellen vorkommen wie in der alleinigen STIC Zellkultur (Abb. 8b).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass durch die Anwesenheit von STIC Zellen in der STIC Zellkultur de novo  $T_{reg}$  Zellen aus naiven T-Zellen entstehen. Außerdem wäre denkbar, dass von Anfang an in der Kultur vorhandene  $T_{reg}$  Zellen selektiv überleben, während andere T-Zellen durch die Wirkung der STIC Zellen abgetötet werden.

## 4.2 Zytokine in der STIC Zellkultur (ELISA)

Bisher ist nicht genau bekannt, über welche Wirkmechanismen die STIC Zellen ihren regulatorischen Effekt auf das Immunsystem ausüben. Es liegt daher nahe, in der STIC Zellkultur nach Botenstoffen zu suchen, die immunsuppressiv wirken. Außerdem lassen die oben gezeigten Ergebnisse auf eine mögliche Beteiligung von

regulatorischen T-Zellen an der Wirkung der STIC Zellen schließen. Deswegen erscheint es sinnvoll, auch nach Zytokinen zu suchen, die bei der Bildung von Treg Zellen eine Rolle spielen und somit die Anreicherung dieser Zellen in der Kultur erklären könnten. Aufgrund dieser Überlegungen haben wir uns, unter Berücksichtigung der Datenlage in der Literatur, für die Analyse der Zytokine IL-2, IL-4, IL-10, IL-12 und TGF- $\beta$  mittels ELISA Assays entschieden [1, 2, 29, 32, 34, 37]. Außerdem wurde die Konzentration von IFN- $\gamma$  gemessen, weil dieses Zytokin in unseren Versuchen für die Herstellung der STIC Zellen verwendet wurde. Sollten also die STIC Zellen IFN- $\gamma$  produzieren, wäre denkbar, dass sie selbst die Bildung weiterer STICs aus ruhenden Makrophagen induzieren können. Da am Tag d4 der STIC Zellkultur (Abbildung 14) IFN- $\gamma$  hinzugegeben wird und danach nicht mehr identifiziert werden kann, ob im ELISA nachgewiesenes IFN- $\gamma$  von den in der Kultur vorhandenen Zellen stammt, wurden nur Proben der Zellkultur vor dem Tag d4 auf IFN- $\gamma$  untersucht.

Bei jedem Mediumwechsel wurden Proben aus den Überständen der STIC Zellkultur entnommen und zur späteren Analyse eingefroren. Mit diesen Proben wurden ELISAs durchgeführt, um die Konzentrationen der genannten Zytokine zu messen. Bei den Zytokinen IL-2, IL-10 und TGF- $\beta$  zeigt sich deutlich, dass diese vor allem in Anwesenheit der STIC Zellen gebildet werden (Abbildungen 10 bis 13). Allerdings konnten in den Zellkulturen der beiden Mausstämme zu keinem untersuchten Zeitpunkt die Zytokine IL-4, IL-12 und IFN- $\gamma$  nachgewiesen werden (Tabelle 6). Somit kann festgestellt werden, dass die STIC Zellen weder IL-4 noch IL-12 oder IFN- $\gamma$  produzieren.

Expression der Zytokine IL-4, IL-12, IFN- $\gamma$		
	BALB/c	C57BL/6
<b>IL-4</b>	unter Nachweisgrenze	unter Nachweisgrenze
<b>IL-12</b>	unter Nachweisgrenze	unter Nachweisgrenze
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	unter Nachweisgrenze	unter Nachweisgrenze

**Tabelle 6: Keine Expressionen von IL-4, IL-12 und IFN- $\gamma$  nachweisbar**

Mit Hilfe von ELISAs werden die Zytokin-Konzentrationen in den Zellkulturen an verschiedenen Kulturtagen bestimmt. Eine Expression von IL-4, IL-12 und IFN- $\gamma$  konnte nicht nachgewiesen werden.

Abbildung 10a

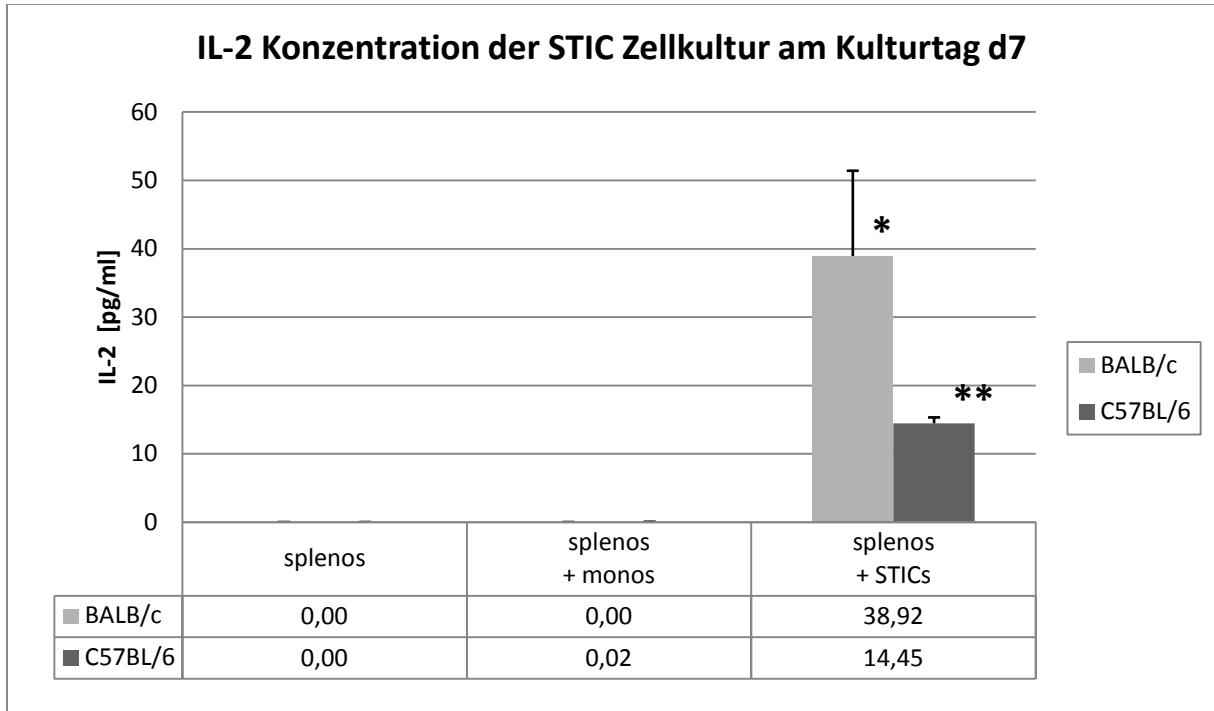
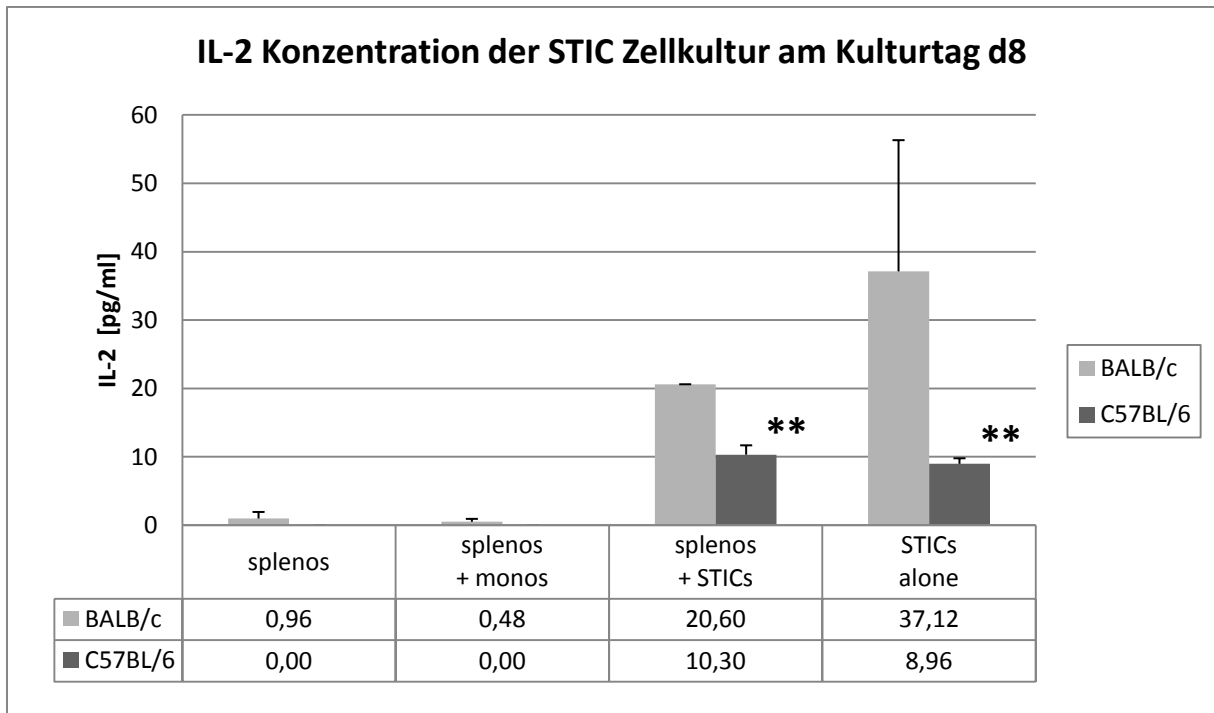


Abbildung 10b



**Abbildung 10: Ergebnisse des IL-2 ELISAs an den Tagen d7 und d8 der STIC Zellkultur**

Mit Hilfe von ELISA Assays werden die Zytokin-Konzentrationen in den Zellkulturen an den Kulturtagen d7 (Abb. 10a) und d8 (Abb. 10b) bestimmt. Im Gegensatz zu kaum nachweisbaren IL-2 Werten in der Kultur von Splenozyten bzw. von Splenozyten + Monozyten finden sich in Anwesenheit der STIC Zellen hohe IL-2 Werte. Auffällig ist die stärkere (Signifikanzanalyse wegen zu geringer Probenzahl n=3 nicht möglich) IL-2 Expression in der BALB/c Zellkultur. Die Daten für Abb. 10a bilden den Mittelwert aus 3 (BALB/c) bzw. 5 (C57BL/6), die Daten für Abb. 10b aus 3 (BALB/c) bzw. 6 (C57BL/6) unabhängigen Experimenten.

Die Fehlerindikatoren zeigen den Standardfehler.

\* Kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe „splenos“ mit  $P < 0,05$ .

\*\* Kennzeichnet einen hochsignifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe „splenos“ mit  $P \leq 0,001$ .

Abb. 10b: Zu geringe Fallzahl (n=3 Proben) bei BALB/c für Signifikanzanalyse.

Abbildung 11a

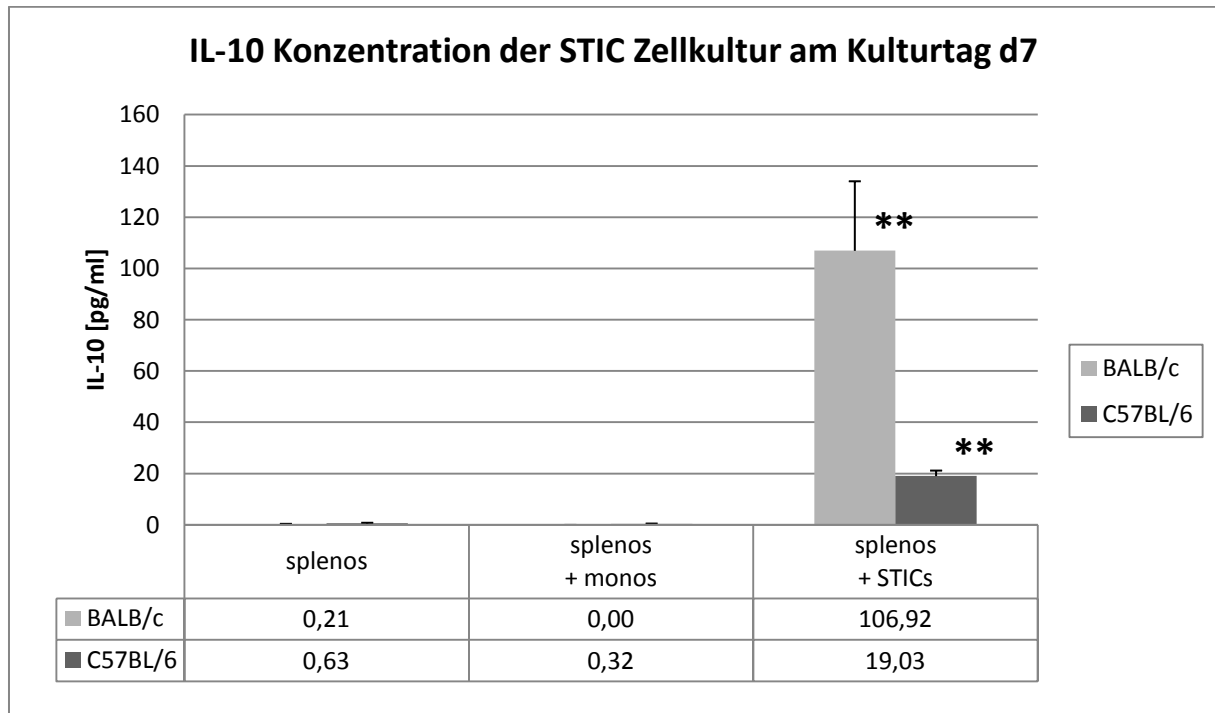
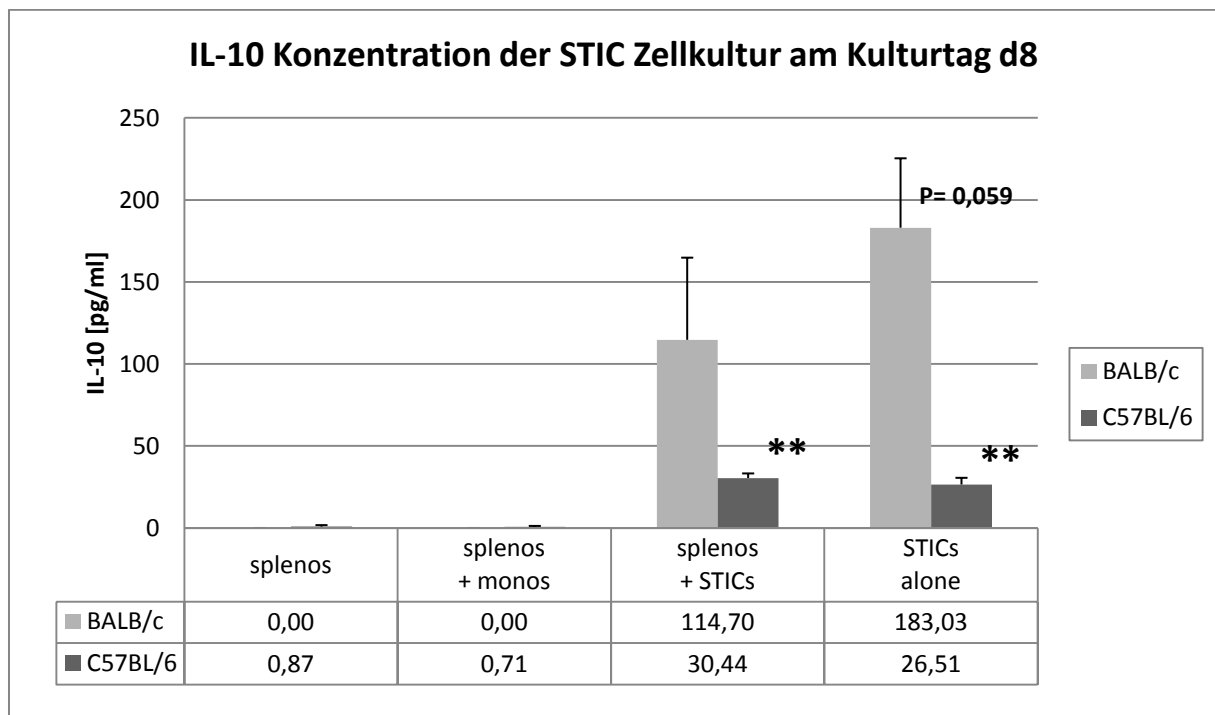


Abbildung 11b



**Abbildung 11: Ergebnisse des IL-10 ELISAs an den Tagen d7 und d8 der STIC Zellkultur**

Mit Hilfe von ELISA Assays werden die Zytokin-Konzentrationen in den Zellkulturen an den Kulturtagen d7 (Abb. 11a) und d8 (Abb. 11b) bestimmt. Im Gegensatz zu kaum nachweisbaren IL-10 Werten in der Kultur von Splenozyten bzw. von Splenozyten + Monozyten finden sich in Anwesenheit der STIC Zellen hohe IL-10 Werte. Auffällig ist die stärkere IL-10 Expression bei den BALB/c Tieren. Die Daten für Abb. 11a bilden den Mittelwert aus 7 (BALB/c) bzw. 3 (C57BL/6), die Daten für Abb. 11b aus 6 (BALB/c) bzw. 3 (C57BL/6) unabhängigen Experimenten.

Die Fehlerindikatoren zeigen den Standardfehler.

\* Kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe „splenos“ mit  $P < 0,05$

\*\* Kennzeichnet einen hochsignifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe „splenos“ mit  $P \leq 0,001$ .

Abbildung 12a

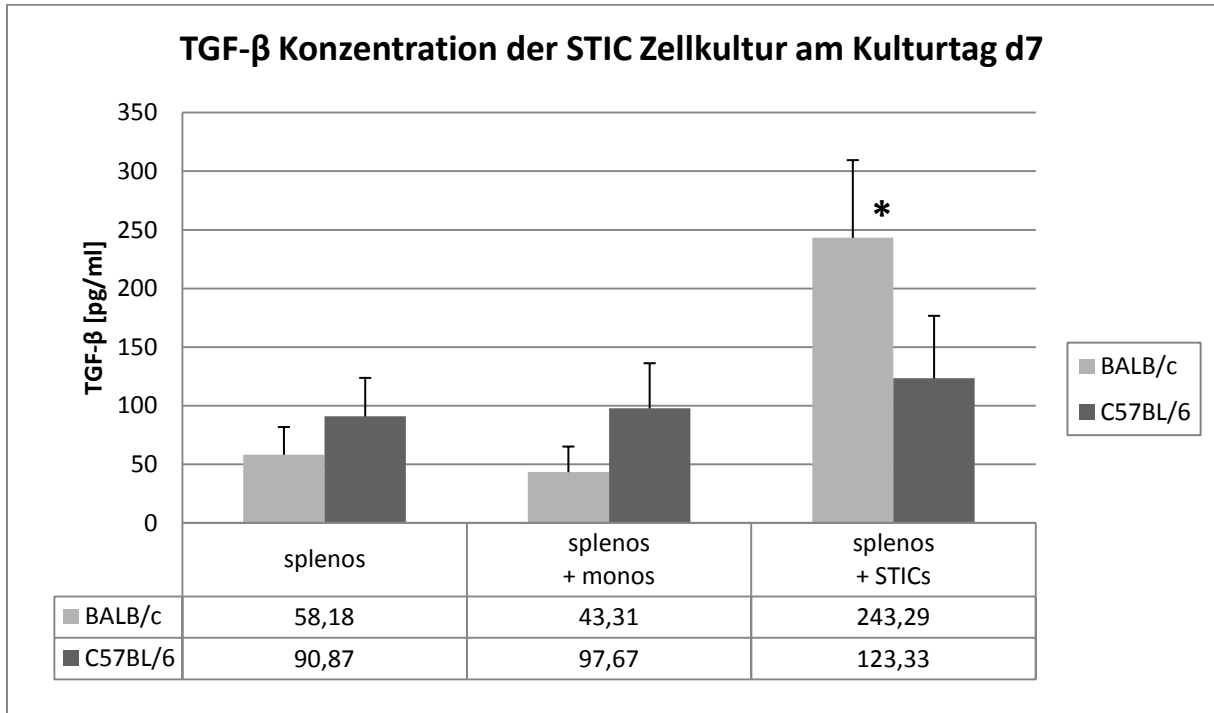
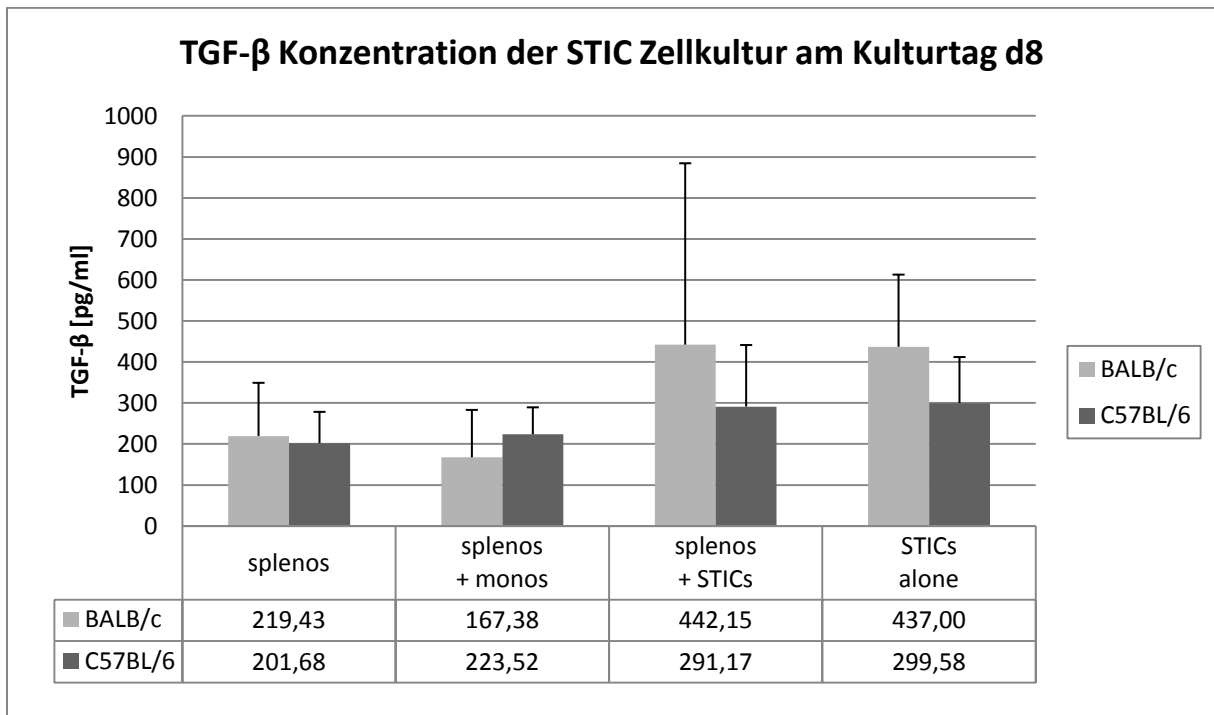


Abbildung 12b



**Abbildung 12: Ergebnisse des TGF- $\beta$  ELISAs an den Tagen d7 und d8 der STIC Zellkultur**

Mit Hilfe von ELISA Assays werden die Zytokin-Konzentrationen in den Zellkulturen an den Kulturtagen d7 (Abb. 12a) und d8 (Abb. 12b) bestimmt. In allen Cokulturen lässt sich TGF- $\beta$  nachweisen. Die höchsten Werte finden sich jedoch in Anwesenheit der STIC Zellen. Die Daten für Abb. 12a bilden den Mittelwert aus 4 (BALB/c) bzw. 3 (C57BL/6), die Daten für Abb. 12b aus 4 (BALB/c) bzw. 5 (C57BL/6) unabhängigen Experimenten.

Die Fehlerindikatoren zeigen den Standardfehler.

\* Kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe „splenos“ mit  $P < 0,05$

\*\* Kennzeichnet einen hochsignifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe „splenos“ mit  $P \leq 0,001$ .

Die Abbildungen 10 bis 12 zeigen die Ergebnisse der Konzentrationsbestimmungen der Zytokine IL-2, IL-10 und TGF- $\beta$  an den Kulturtagen d7 und d8. Am Tag d7 sind die Zytokinkonzentrationen für die Cokulturen „splenos“, „splenos + monos“ und „splenos + STICs“ für beide untersuchte Mausstämme dargestellt. Am Tag d8 werden zusätzlich die Werte für eine Monokultur der STIC Zellen („STICs alone“) dargestellt. Diese zusätzliche Kultur ist angesetzt worden, um bei den Durchflusszytometrischen Bestimmungen der T<sub>reg</sub> Zellen am Tag d8 einen Vergleich der Cokultur „splenos + STICs“ mit der Monokultur der STIC Zellen „STICs alone“ zu haben.

Bei der Bestimmung der **IL-2** Konzentrationen (Abbildung 10a) zeigt sich am Tag d7 in der Cokultur „splenos + STICs“ mit 38,9 pg/ml (SEM 12,5) bei den Balb/c Zellen bzw. 14,5 pg/ml (SEM 0,9) bei den B57BL/6 Zellen jeweils eine zur Kontrollgruppe „splenos“ signifikante Steigerung der IL-2 Konzentration. Die gemessenen IL-2 Konzentrationen der „splenos“ bzw. der „splenos + monos“ liegen bei beiden untersuchten Mausstämmen im Bereich der Nachweisgrenze. Am Tag d8 (Abbildung 10b) zeigt sich ein ähnliches Bild mit hohen IL-2 Konzentrationen in den Kulturen „splenos + STICs“ und „STICs alone“. Bei beiden Kulturen kommt es im Vergleich zu der Kontrollgruppe „splenos“ zu einem hochsignifikanten Konzentrationsanstieg bei den C57BL/6 Zellen. Bei den Balb/c Zellen lässt sich aufgrund der geringen Probenzahl (je eine Probe aus 3 unabhängigen Experimenten) keine Signifikanzanalyse durchführen.

Bei der Bestimmung der **IL-10** Konzentrationen zeigt sich ebenfalls, dass zur Kontrollgruppe „splenos“ signifikant gesteigerte Werte nur in Anwesenheit der STIC Zellen nachgewiesen werden können. So findet sich am Tag d7 (Abbildung 11a) in den Cokultur „splenos + STICs“ bei den Balb/c Zellen eine IL-10 Konzentration von 106,9 pg/ml (SEM 27,1) bzw. bei den C57BL/6 Zellen eine Konzentration von 19 pg/ml (SEM 2,2), was jeweils einer hochsignifikanten Steigerung zur Kontrollgruppe „splenos“ entspricht. Der Unterschied der IL-10 Werte in den Cokulturen „splenos + STICs“ zwischen den Balb/c und den C57BL/6 Zellen ist dabei hochsignifikant ( $P < 0,001$ ). In der Cokultur „splenos + monos“ finden sich IL-10 Werte im Bereich der Nachweisgrenze und damit keine signifikante Steigerung zur Kontrollgruppe „splenos“. Die IL-10 Konzentrationsbestimmungen am Tag d8 (Abbildung 11b) ergeben ein ähnliches Bild mit hohen Werten bei Anwesenheit der STIC Zellen. Dabei ergibt sich eine hochsignifikante Konzentrationssteigerung zur Kontrollgruppe

„splenos“ nur bei den C57BL/6 Zellen, während bei den Balb/c Zellen aufgrund schwankender Messwerte das statistische Signifikanzniveau nicht erreicht wird.

Bei den Bestimmungen der **TGF- $\beta$**  Konzentrationen zeigt sich am Tag d7 (Abbildung 12a) in der Cokultur „splenos + STICs“ bei den Balb/c Zellen mit 243,3 pg/ml (SEM 66,3) bzw. bei den C57BL/6 Zellen mit 123,3 pg/ml (SEM 53,4) der höchste Wert. Ein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe „splenos“ wird jedoch nur bei den Balb/c Zellen erreicht. Der Konzentrationsunterschied zwischen Balb/c und C57BL/6 Zellen ist statistisch nicht signifikant. Bei den Messungen am Tag d8 (Abbildung 12b) zeigen sich die höchsten TGF- $\beta$  Werte in Anwesenheit der STIC Zellen. Statistisches Signifikanzniveau wird jedoch nicht erreicht.

Im Gegensatz zu den beiden Zytokinen IL-2 und IL-10 zeigten die TGF- $\beta$  ELISAs also weniger deutliche Unterschiede der Konzentrationen des Zytokins zwischen den Cokulturen mit und ohne Anwesenheit der STIC Zellen (Abbildung 12). Um auszuschließen, dass diese Beobachtung durch Messfehler bei der Durchführung der ELISAs oder durch Lagerung und Auftauen der Proben zu erklären ist, wiederholten wir die TGF- $\beta$  Bestimmung mit Überständen aus neuen STIC Zellkulturen, wobei nur C57BL/6 Zellen verwendet wurden. Dabei wurde darauf geachtet, das Zeitintervall zwischen dem Einfrieren und Analysieren der Mediumproben so kurz wie möglich zu gestalten und die Proben nur einmal zum Messen aufzutauen. Auf diese Weise sollten durch Aktivitätsverlust bei der Lagerung entstandene Ungenauigkeiten minimiert werden. Die Ergebnisse dieser Analysen zeigt die Abbildung 13. Es zeigt sich, dass die Resultate der erneuten TGF- $\beta$  Messungen der C57BL/6 Kulturen vergleichbar mit denen der Abbildung 12 sind. Ungenauigkeiten in der Präparation und Messung können somit als Ursache für die fehlende Konzentrationssteigerung bei Anwesenheit der STIC Zellen weitgehend ausgeschlossen werden.

Abbildung 13a zeigt, dass am Tag d7 in der Cokultur „splenos + STICs“ mit 125,9 (SEM 15,5) bei den C57BL/6 Zellen die höchsten TGF- $\beta$  Konzentrationen erreicht werden. Dieser Wert ist zur Kontrollgruppe „splenos“ signifikant höher. Bei den Messungen am Tag d8 (Abbildung 13b) werden jedoch keine statistisch signifikanten Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen Gruppen gefunden, es zeigt sich aber eine Tendenz zu höheren TGF- $\beta$  Konzentrationen bei Anwesenheit der STIC Zellen.

Abbildung 13a

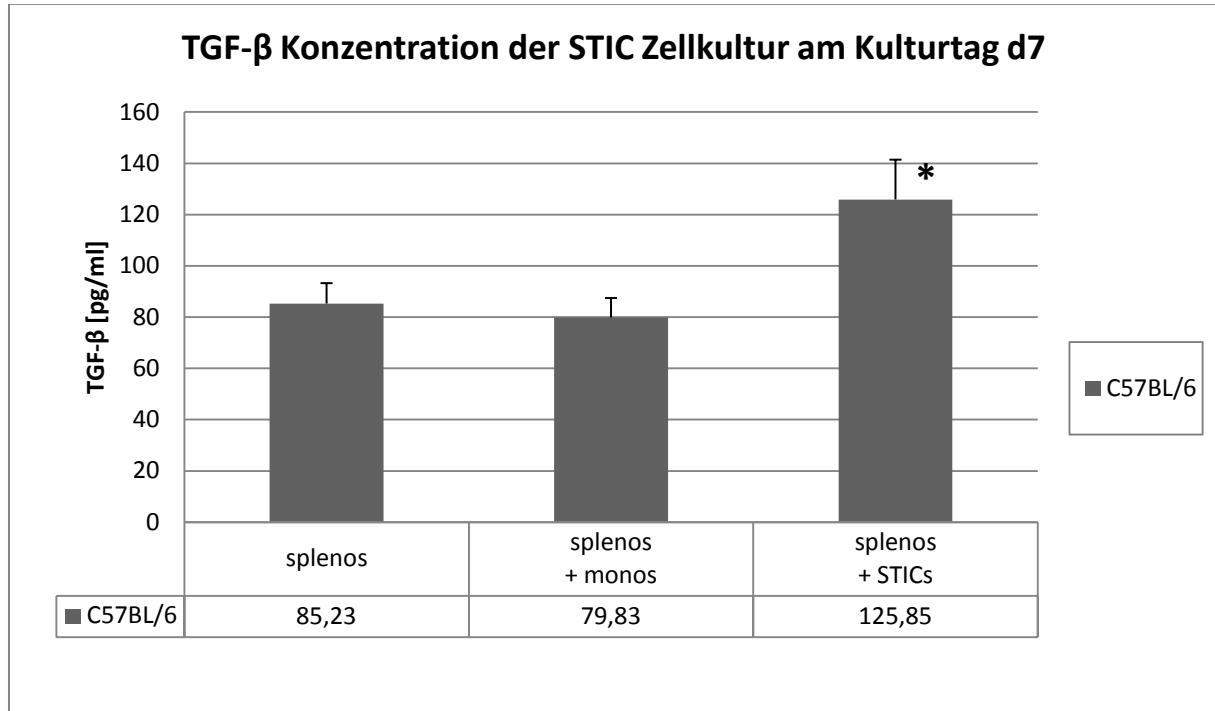
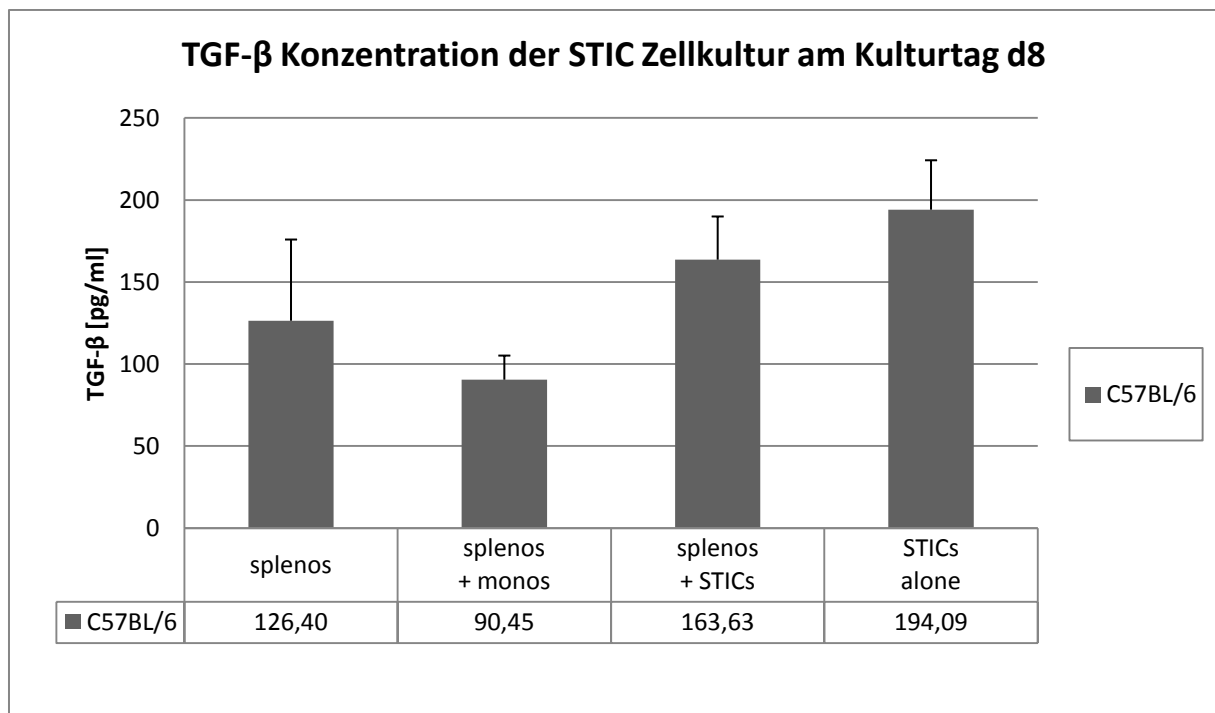


Abbildung 13b



**Abbildung 13: Ergebnisse des TGF- $\beta$  ELISAs an den Tagen d7 und d8 der STIC Zellkultur**

Mit Hilfe von ELISA Assays werden die Zytokin-Konzentrationen in den Zellkulturen an den Kulturtagen d7 (Abb. 13a) und d8 (Abb. 13b) bestimmt. In allen Cokulturen lässt sich TGF- $\beta$  nachweisen. Die höchsten Werte finden sich jedoch in Anwesenheit der STIC Zellen. Die Daten bilden den Mittelwert aus jeweils aus 4 unabhängigen Experimenten. Die Fehlerindikatoren zeigen den Standardfehler.

Die Fehlerindikatoren zeigen den Standardfehler.

\* Kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe „splenos“ mit  $P < 0,05$

\*\* Kennzeichnet einen hochsignifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe „splenos“ mit  $P \leq 0,001$ .

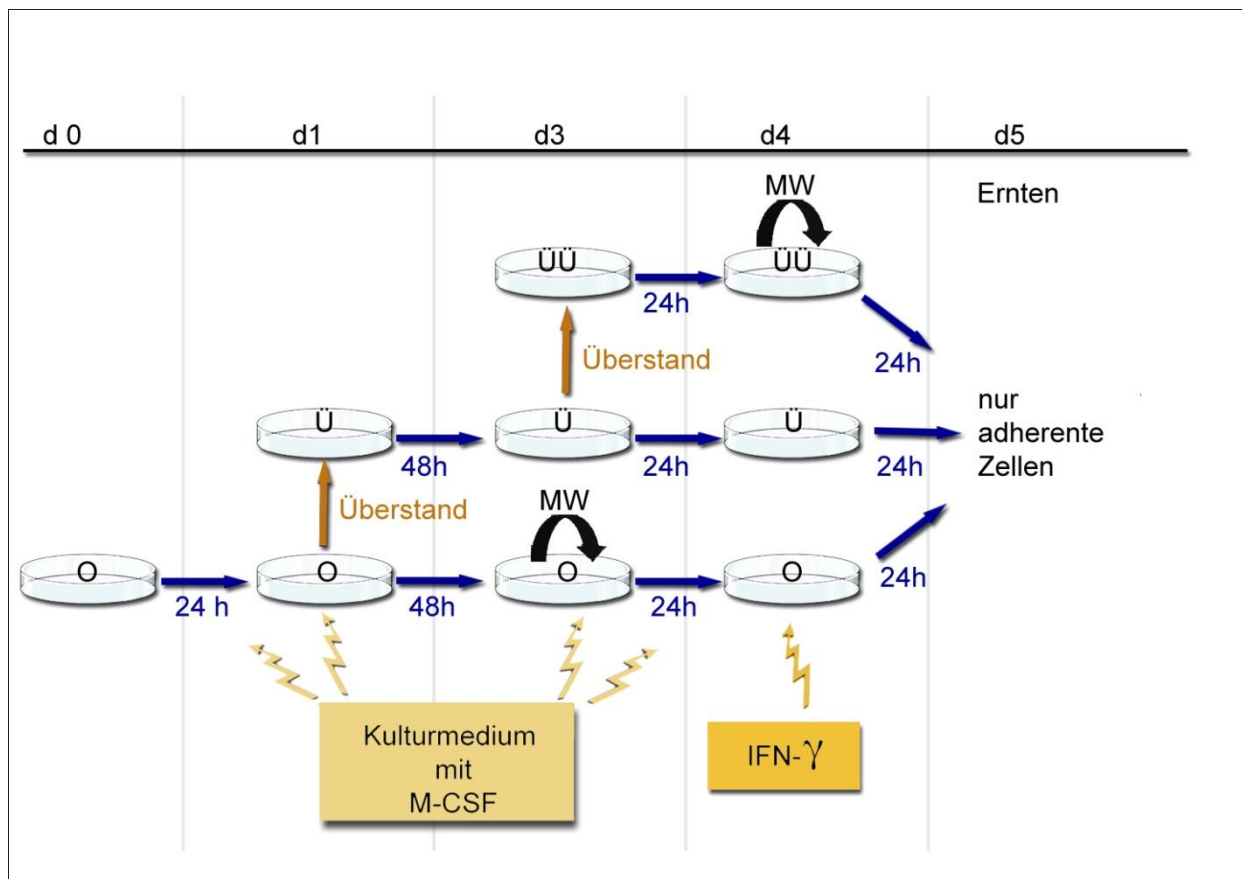
Die Abbildungen 10 und 11 zeigen, dass IL-2 und IL-10 praktisch nur in Anwesenheit der STIC Zellen sezerniert werden. Die Unterschiede sind in den meisten Messungen statistisch signifikant (\*) bzw. hochsignifikant (\*\*).

Dagegen wird TGF- $\beta$  auch in der alleinigen Kultur von Splenozyten bzw. der Cokultur von Splenozyten und Monozyten in nachweisbaren Konzentrationen gebildet (Abb. 12 und 13). Bei Anwesenheit der STIC Zellen wird der Wert allerdings erhöht, in den Abbildungen 12a und 13a wird wie oben ausgeführt die statistische Signifikanz  $P < 0,05$  erreicht.

Auffällig ist, dass alle Zytokinkonzentrationen bei den BALB/c Zellen meist höher liegen als bei den C57BL/6 Zellen. Statistisch signifikant ist jedoch nur der Konzentrationsunterschied bei IL-10.

Durch diese Experimente kann allerdings nicht sicher nachgewiesen werden, ob die gebildeten Zytokine auch tatsächlich von den STIC Zellen selbst stammen, oder von anderen Zellen, wie etwa den durch die STIC Zellen induzierten und in der Kultur angereicherten regulatorischen T-Zellen.

Die oben dargestellten Messungen der Zytokinkonzentrationen in den Cokulturen an den Kulturtagen d7 und d8 (Abb. 10 – 13) zeigen, dass die untersuchten Zytokine vor allem in Anwesenheit der STIC Zellen in hohen Konzentrationen gebildet werden. Deswegen wurde beschlossen, zusätzlich den Verlauf der Zytokinkonzentrationen während der Erzeugung der STIC Zellen an den Kulturtagen d1 bis d5 zu messen. Der detaillierte Ablauf dieser ersten Phase der STIC Zellkultur (d1 – d5) ist in Abbildung 14 dargestellt.



**Abbildung 14: Zeitlicher Ablauf der STIC Zellkultur d1 – d5**

Dargestellt ist eine Übersicht der Kulturstage d1 bis d5 der von uns durchgeführten STIC Zellkultur. Von links nach rechts ist der zeitliche Verlauf in Tagen aufgezeigt. Die als „O-Schale“ bezeichnete Kulturschale am Tag d0 enthält Blut-, Knochenmark-, und Milzzellen von Mäusen. Das Ansetzen der weiteren Kulturschalen (Ü und ÜÜ), die Mediumwechsel (MW) sowie die Inkubationszeiten sind dargestellt. Unter „Überstand“ ist die Übertragung nur der im Überstand gelösten Zellen zu verstehen. Das Kulturmedium wird dabei verworfen. Wird der Überstand einer Kulturschale auf eine neue Schale gegeben, so wird die ursprüngliche Schale wieder mit frischem Kulturmedium aufgefüllt. Bei jedem Mediumwechsel wird eine Probe für die spätere Zytokinbestimmung entnommen. Am Tag d4 wird dem Kulturmedium aller Schalen IFN- $\gamma$  zugesetzt. Die Gesamtübersicht über die STIC Zellkultur ist im Abschnitt 3.1 dargestellt.

Bei jedem Mediumwechsel, sowie beim Übertragen der im Überstand gelösten Zellen auf eine neue Kulturplatte wird eine Probe des Mediums zur Zytokinbestimmung eingefroren. Die Ergebnisse dieser Messungen für die Zytokine IL-2, IL-10 und TGF- $\beta$  sind in der folgenden Abbildung 15 aufgezeigt.

Abbildung 15a

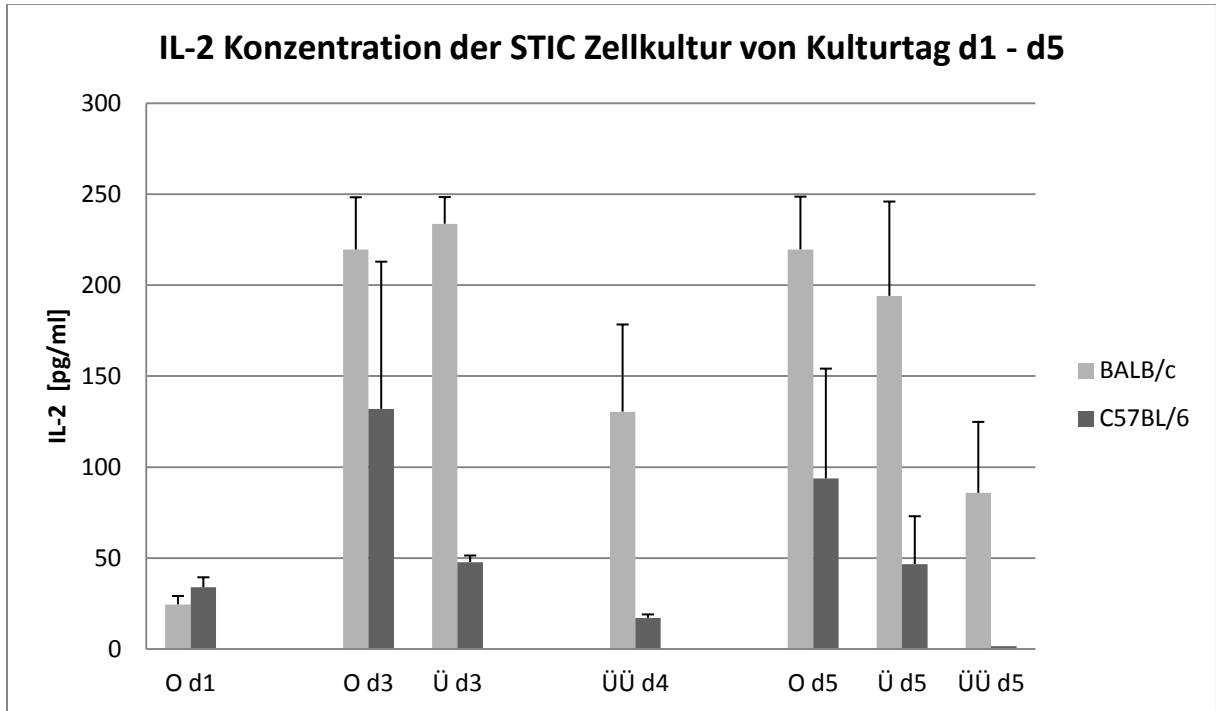


Abbildung 15b

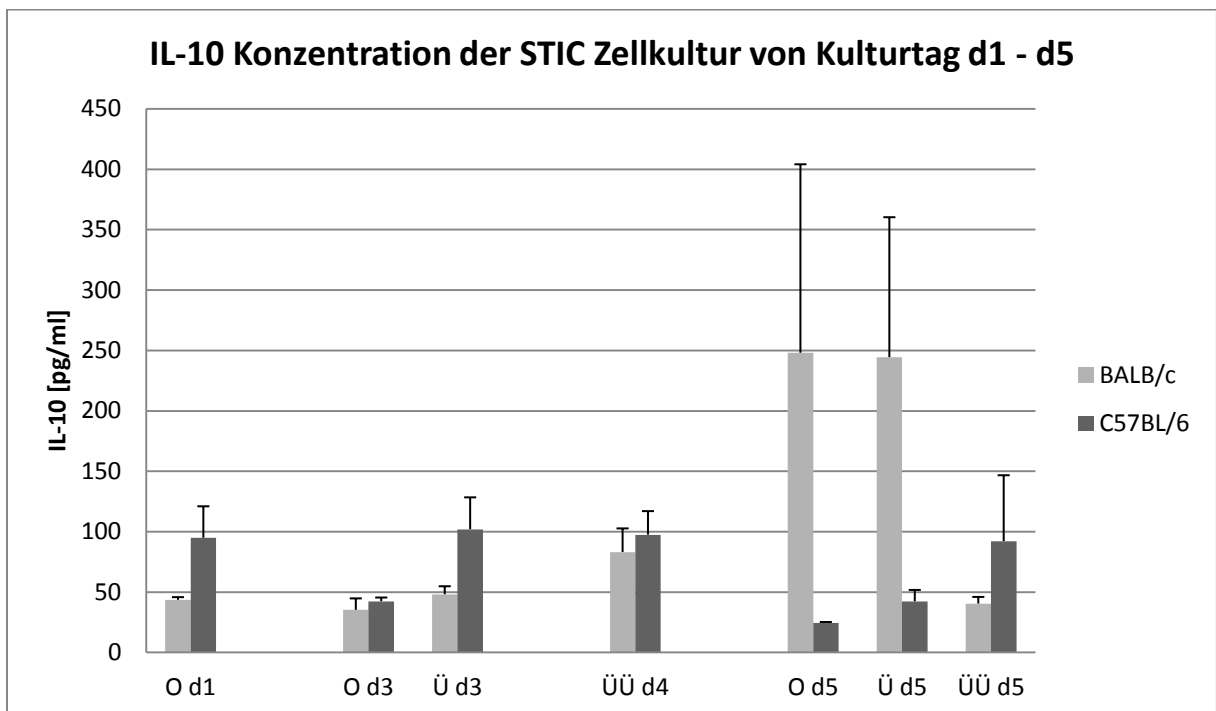
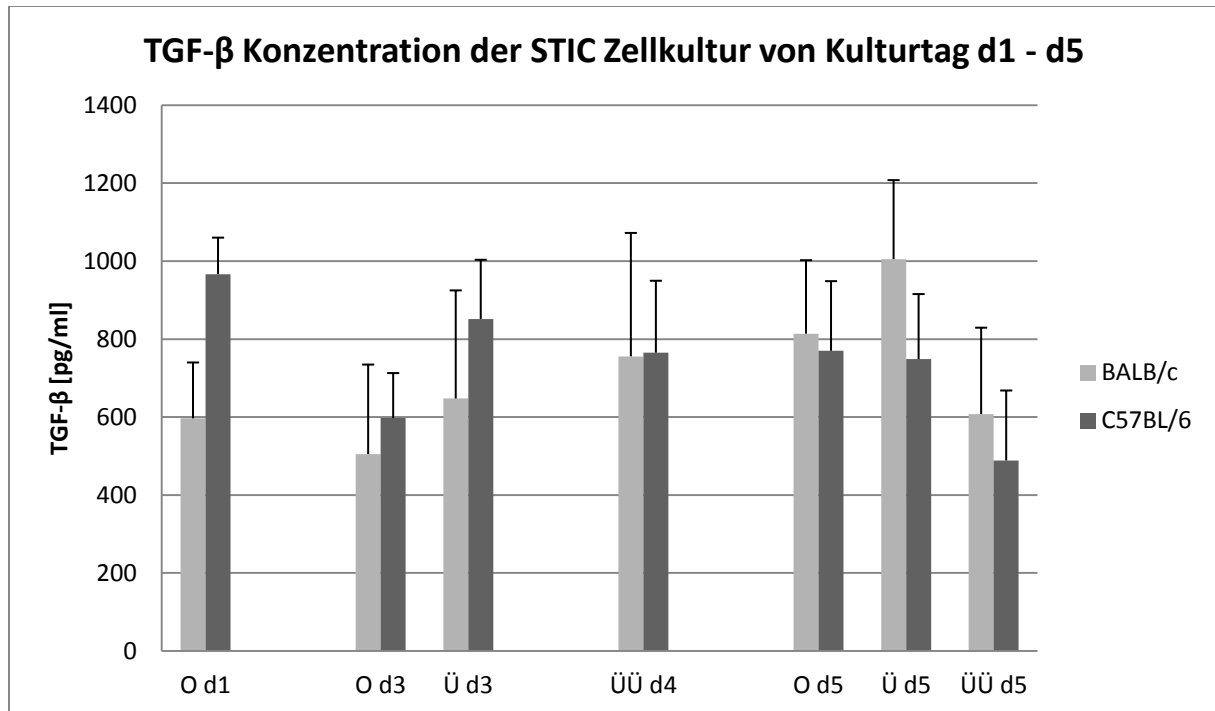


Abbildung 15c



**Abbildung 15: Zytokinkonzentrationen der STIC Zellkultur an den Tagen d1 bis d5**

Mit Hilfe von ELISA Assays werden die Zytokin-Konzentrationen in der STIC Zellkultur an den Kulturtagen d1, d3, d4 und d5 bestimmt. Dabei zeigt Abb. 15a die Werte für IL-2, Abb. 15b die für IL-10 und Abb. 15c die für TGF- $\beta$ .

Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler.

In Abb. 15a ist die letzte Säule (ÜÜ d5 C57BL/6) wegen des niedrigen Wertes nicht sichtbar.

Um die in Abbildung 15 gezeigten Zytokinkonzentrationen interpretieren zu können, muss man sich nochmals mit dem Verlauf der STIC Zellkultur auseinandersetzen. Die O-Schalen enthalten die am Tag d0 angesetzte STIC Zellkultur. Beim ersten Mediumwechsel und Erstellen der Ü-Schalen am Tag d1 werden die in Lösung befindlichen Zellen der O-Platten auf die Ü-Schalen übertragen. Die adhären Zellen verbleiben auf den O-Schalen und werden mit frischem Kulturmedium versorgt. Analog wird bei Erstellung der ÜÜ-Schalen mit Hilfe der löslichen Zellen der Ü-Schalen verfahren. Bei den an den Tagen d3 (O-Schalen) und d4 (ÜÜ-Schalen) durchgeführten Mediumwechseln werden die im Überstand befindlichen Zellen entfernt und nur noch die Adhären weiter kultiviert.

Bei den IL-2 Werten für die BALB/c Zellen zeigt sich, dass diese am Tag d1, also nach 24h Kultur sehr niedrig liegen. Die nächste Messung der O-Schalen am Tag d3 geschieht 48h nach dem letzten Mediumwechsel. Obwohl damit die Inkubationszeit nur doppelt so hoch liegt wie bei der Messung am Tag d1, zeigt sich ein vier-fach erhöhter IL-2 Wert (Abb. 15a). Eine Erklärung für diese Tatsache könnte sein, dass

die Zellen in der Kultur nach ihrer Gewinnung aus primären Mauszellen am Tag d0 erst nach einer gewissen Zeit ihre normale metabolische Tätigkeit wieder aufnehmen. Denkbar ist auch, dass in der Kultur eine Proliferation der IL-2 produzierenden Zellen stattfindet. Eine andere Hypothese ist, dass die Erzeugung der STIC Zellen in der Kultur – welche dann das Zytokin IL-2 produzieren – eine gewisse Zeit in Anspruch nimmt. Dafür spricht auch, dass die IL-2 Werte am Tag d3 von O- und von Ü-Schalen ähnlich hoch sind.

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass die untersuchten Zytokine in allen drei Kulturschalen (O, Ü und ÜÜ) zu allen untersuchten Zeitpunkten gebildet werden. Man kann also davon ausgehen dass in allen Kulturen relativ ähnliche Zellpopulationen vorhanden sind. Diese Tatsache rechtfertigt auch das Pooling der adhärennten Zellen aller drei Kulturschalen am Kulturtag d5.

Weiterhin wird in der Abbildung 16 der zeitliche Konzentrationsverlauf der Zytokine IL-2, IL-10 und TGF- $\beta$  in der ersten Phase der STIC Zellkultur dargestellt. Dabei sind die Werte der O-Schalen an den Kulturtagen d1, d3 und d5 aufgezeigt. Der erste Wert (d1) zeigt die Zytokinkonzentrationen 24h nach Ansetzen der Zellkultur. Zwischen den drei Messwerten (d1, d3 und d5) liegen jeweils 48h (vgl. Abb. 14).

Abbildung 16a (BALB/c)

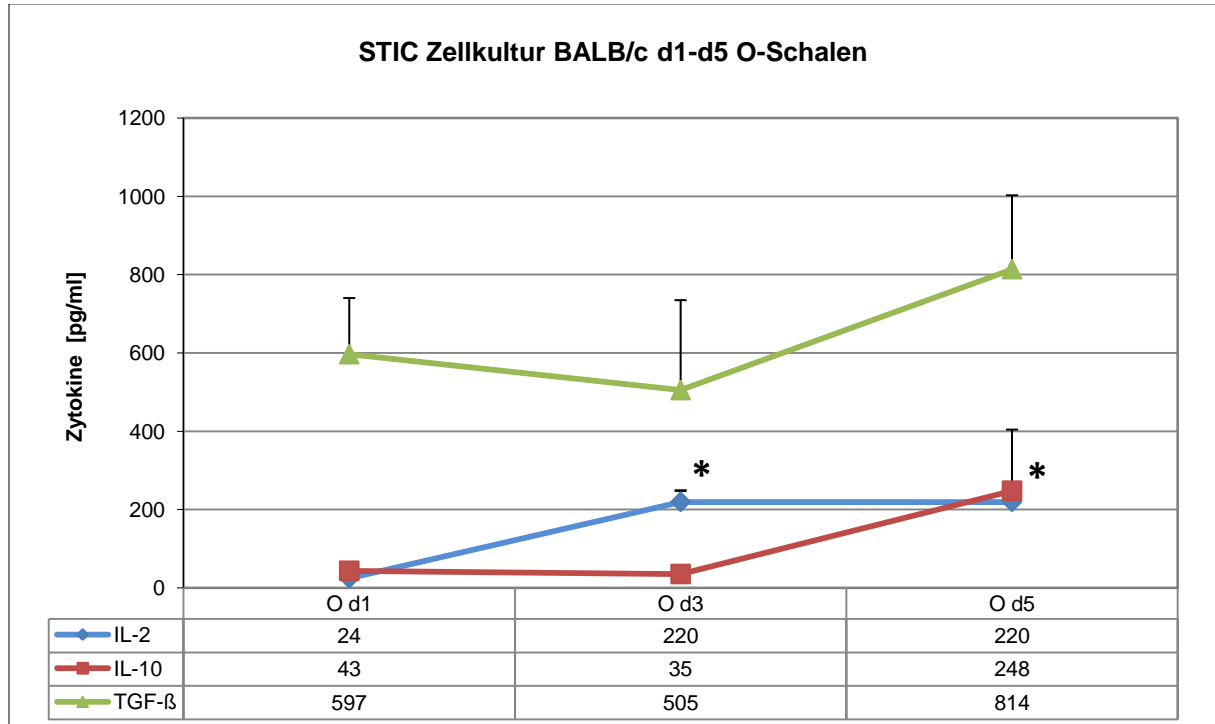
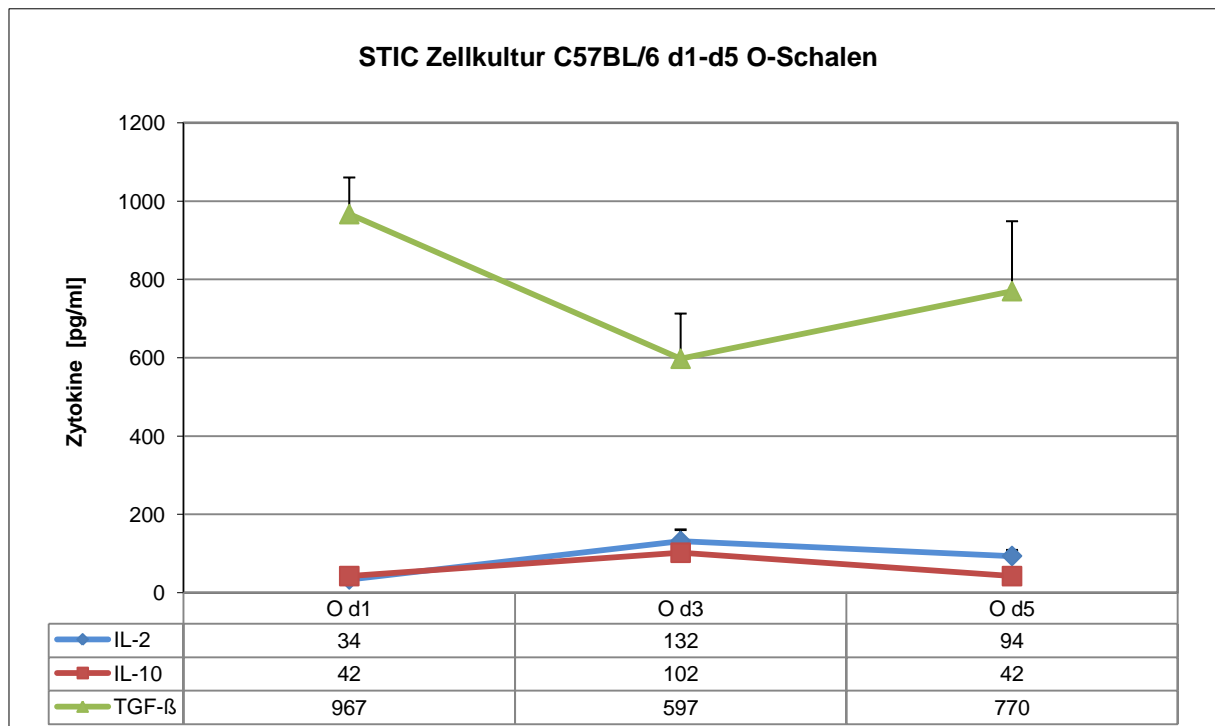


Abbildung 16b (C57BL/6)



**Abbildung 16: Verlauf der Zytokinkonzentrationen der STIC Zellkultur**

Mit Hilfe von ELISA Assays werden die Zytokin-Konzentrationen in der STIC Zellkultur an den Kulturtagen d1, d3 und d5 bestimmt. Zeitpunkt d1 ist 24h nach Ansätzen der Kulturen. Zwischen d1, d3 und d5 liegen je 48h. Es sind nur die Werte der O-Schalen dargestellt. Abbildung 16a zeigt die Ergebnisse der BALB/c Tiere, Abbildung 16b die der C57BL/6 Tiere.

\* Kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe „O d1“ mit  $P < 0,05$

In Abbildung 16 zeigt sich, dass nur bei den BALB/c Tieren ein Anstieg aller untersuchten Zytokine in den ersten 5 Tagen der Zellkultur zu erkennen ist. Allerdings sind nur die Veränderungen der IL-2 Konzentration an den Tagen d3 und d5 im Vergleich zum Tag d1 statistisch signifikant (Abb. 16a). So liegen die IL-2 Werte der O-Schalen der Balb/c Zellkulturen an den Tagen d3 und d5 mit je 220 pg/ml (Standardfehler 29) signifikant höher als am Tag d1 mit 24 pg/ml (Standardfehler 5). Die IL-10 Werte der Balb/c Kulturen zeigen mit 248 pg/ml (Standardfehler 156) am Tag d5 ihren höchsten Wert im Vergleich zu 43 pg/ml (Standardfehler 2) am Tag d1 und 35 pg/ml (Standardfehler 9) am Tag d3. Die gemessenen Konzentrationsunterschiede sind jedoch statistisch nicht signifikant (Abb. 16a). Auch bei TGF- $\beta$  zeigt sich mit 814 pg/ml (Standardfehler 188) am Tag d5 der höchste Wert. Der Unterschied zu den Tagen d1 mit 597 pg/ml (Standardfehler 143) und d3 mit 505 pg/ml (Standardfehler 230) sind auch hier statistisch nicht signifikant (Abb. 16a).

Abbildung 16b zeigt die Verläufe der Zytokinkonzentrationen der C57BL/6 Zellen. Dabei lässt sich bei allen drei untersuchten Zytokinen keine deutliche Konzentrationssteigerung im zeitlichen Verlauf nachweisen. Außerdem sind die Unterschiede der Messwerte statistisch nicht signifikant.

Von den untersuchten Zytokinen zeigen IL-2 und IL-10 den deutlichsten Konzentrationsanstieg in Anwesenheit der STIC Zellen (Abb. 10 und 11), sowie einen Anstieg der Konzentration im Verlauf der Kulturtage d1 bis d5 (Abb. 16a). Diese Ergebnisse, zusammen mit der Tatsache, dass in der Literatur die Bedeutung von IL-10 für die Bildung der iT<sub>reg</sub> Zellen beschrieben ist [45, 46], haben uns veranlasst, die Arbeitshypothese aufzustellen, dass IL-10 für die beobachtete Anreicherung der T<sub>reg</sub> Zellen in der STIC Zellkultur verantwortlich sein könnte.

### **4.3 Bedeutung des Zytokins IL-10**

Um die Bedeutung von IL-10 weiter zu untersuchen, haben wir die STIC Zellkultur (Abb. 6) mit Zellen von IL-10 knockout Mäusen auf BALB/c Hintergrund und mit Wildtyp BALB/c Kontrollzellen durchgeführt. Bei den knockout Kulturen stammen die STIC Zellen von IL-10 defizienten Tieren, während die Splenozyten und Monozyten für die Cokulturen von Wildtyp Tieren stammen. Am Kulturtag d7 erfolgte eine

Zellzählung der Splenozytenzahlen. Dabei zeigte sich, dass die Unfähigkeit der knockout Zellen, das Zytokin IL-10 zu bilden, keinen Einfluss auf die Splenozyten Zellzahlen in der Cokultur von Splenozyten mit STIC Zellen hat. Außerdem zeigen am Tag d8 durchgeführte durchflusszytometrische Untersuchungen, dass in Kulturen der knockout Tiere die Anreicherung der T<sub>reg</sub> Zellen ebenso wie bei den Zellkulturen der Wildtyp Tiere messbar ist.

Um zu bestätigen, dass in den Kulturen der IL-10 defizienten STIC Zellen keine nennenswerten IL-10 Spiegel vorliegen, wurden analog zur regulären STIC Zellkultur ELISA Assays bei jedem Mediumwechsel durchgeführt. In Abbildung 17 sind die Ergebnisse der IL-10 Messungen der Cokulturen der Wildtyp und der IL-10 knockout Zellen an den Kulturtagen d7 und d8 dargestellt. Wie erwartet zeigt sich, dass in den Kulturen der knockout Zellen im Gegensatz zu den Wildtyp BALB/c Zellen keine relevanten IL-10 Konzentrationen vorhanden sind. Auffällig ist, dass die IL-10 Messwerte bei den knockout Zellen nicht bei allen Cokulturen gleich Null sind. So liegt etwa der IL-10 Wert der Cokultur „splenos + STICs“ am Tag d7 bei den knockout Zellen bei 1,2 pg/ml (Abb. 17 a). Auch am Tag d8 (Abb. 17b) lassen sich bei den Kulturen der IL-10 defizienten STIC Zellen sehr niedrige IL-10 Werte detektieren. Diese Tatsache wird mit einer unspezifischen Bindung von IL-10 Antikörpern während des ELISAs erklärt. Außerdem ist denkbar, dass geringe IL-10 Mengen von den Wildtyp Splenozyten bzw. Monozyten gebildet werden. Wir können also trotz der schwach positiven IL-10 Messwerte davon ausgehen, dass die STIC Zellen in den knockout Kulturen nicht zu einer IL-10 Bildung imstande sind.

Abbildung 17a

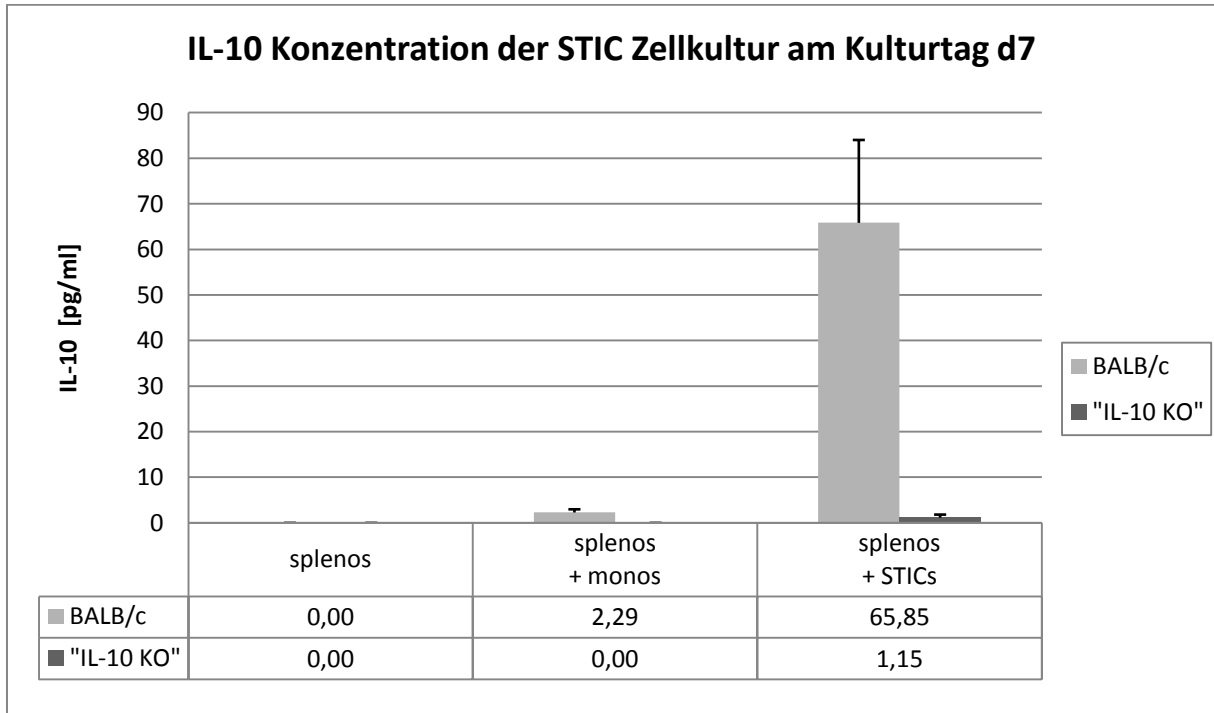
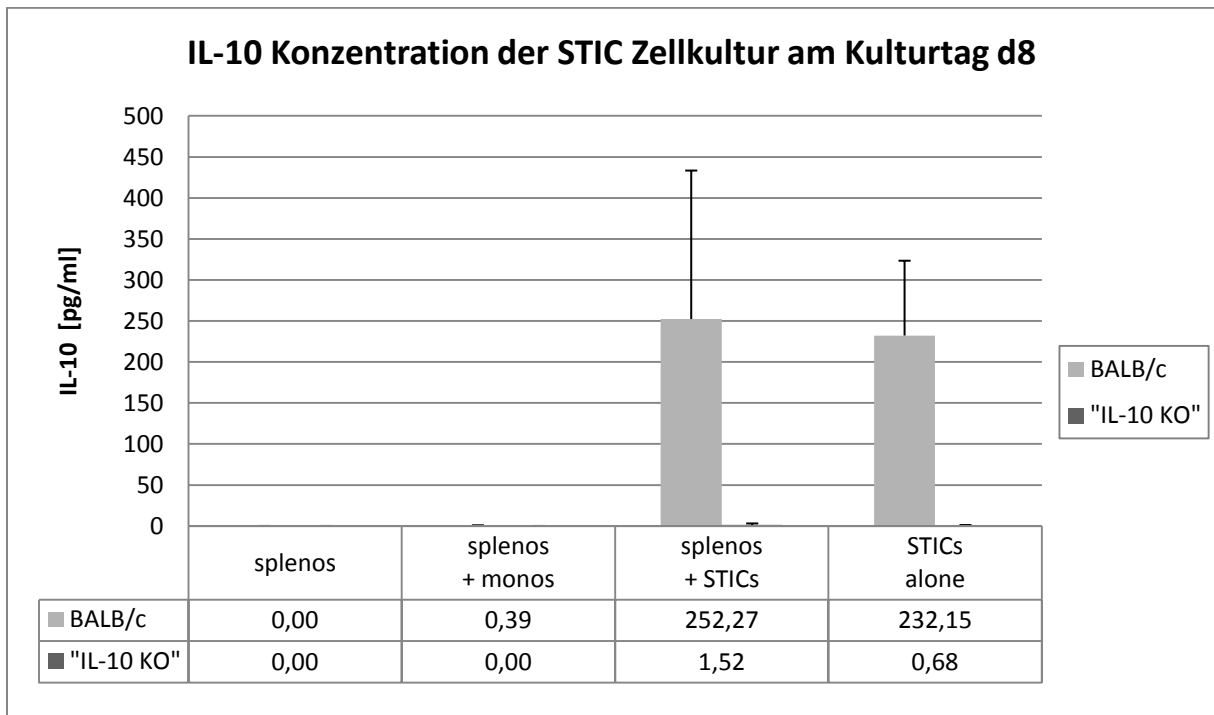


Abbildung 17b



**Abbildung 17: Ergebnisse des IL-10 ELISAs an den Tagen d7 und d8 der STIC Zellkultur mit IL-10 knockout Tieren**

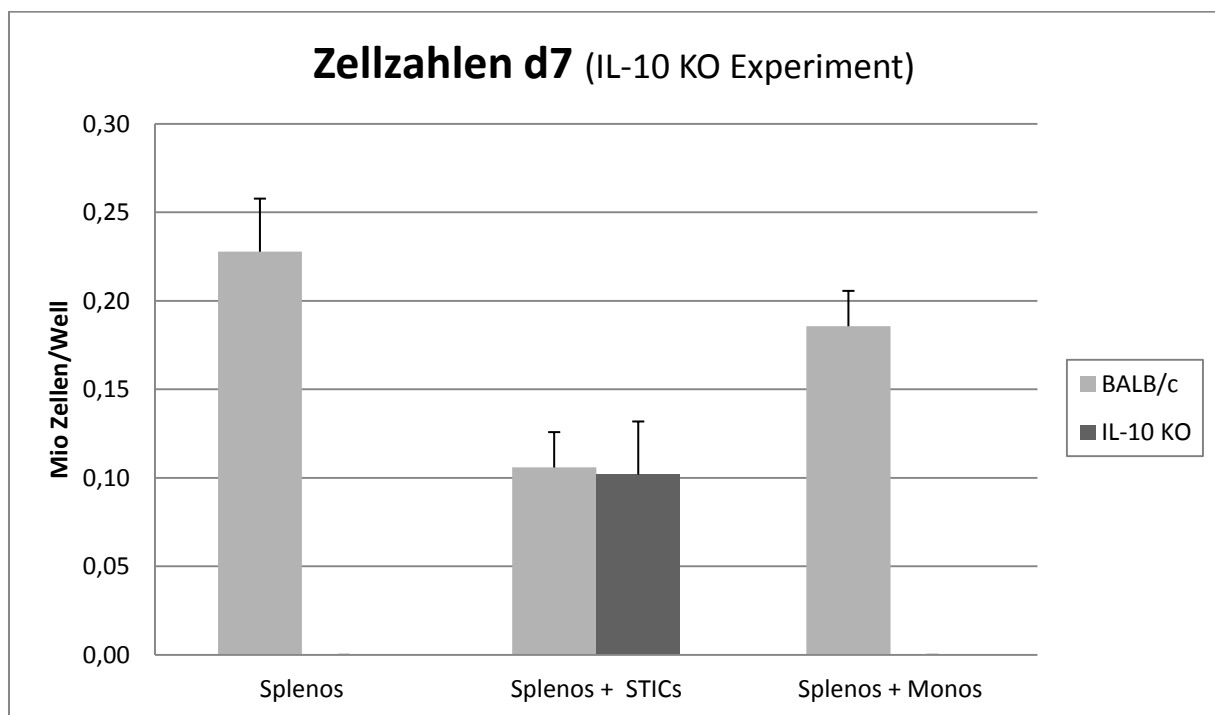
Dargestellt ist die IL-10 Konzentration in den verschiedenen Cokulturen an den Kulturtagen d7 (Abb. 17a) und d8 (Abb. 17b). Bei den IL-10 knockout Tieren wurde die IL-10 Konzentration nur in den Cokulturen Splenozyten + STIC Zellen sowie STIC alone gemessen. Erwartungsgemäß wird das Zytokin IL-10 nur von den Wildtyp BALB/c Zellen produziert, welche ein intaktes IL-10 Gen haben. Die IL-10 knockout Tiere zeigen praktisch keine Produktion von IL-10.

Gezeigt sind die zusammengefassten Daten von zwei unabhängigen Experimenten.

Die Fehlerindikatoren zeigen den Standardfehler.

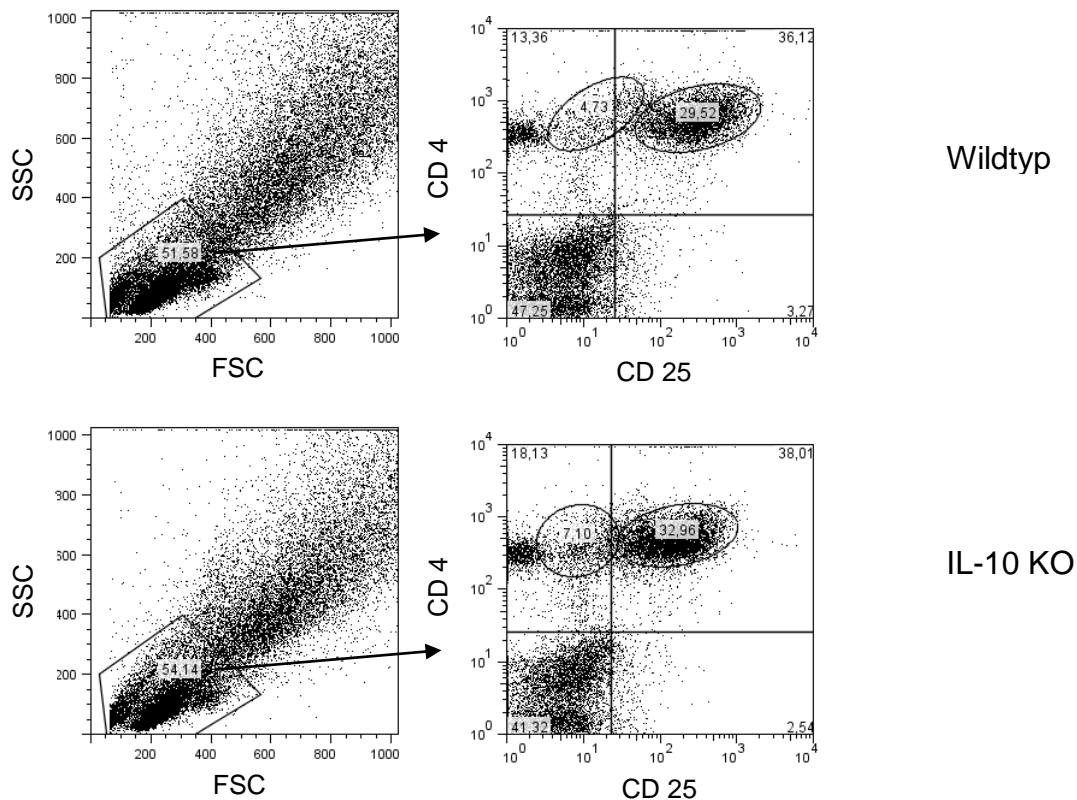
Keine Signifikanzberechnung wegen zu geringer Probenzahl.

Abbildung 18 zeigt die Splenozyten Zellzahlen am Kulturtag d7. Bei den IL-10 knockout Zellen wurde aus Kostengründen nur die Cokultur „splenos + STICs“ angesetzt. Von den Kontrollen aus Balb/c Wildtyp Zellen sind alle drei Cokulturen durchgeführt worden. Bei der Cokultur „splenos + STICs“ zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Wildtyp und den IL-10 knockout Zellen. Die Unfähigkeit zur IL-10 Bildung hat also keinen Einfluss auf die Fähigkeit der STIC Zellen in Cokulturen mit Splenozyten zu einem Rückgang von deren Zellzahlen zu führen.



**Abbildung 18: Zellzählung der Splenozyten am Kulturtag d7 bei BALB/c und bei IL-10 KO (knockout) Mäusen**  
Bei den BALB/c Mäusen (Kontrollgruppe) wurden die Cokulturen von Splenozyten, von Splenozyten + STIC Zellen sowie von Splenozyten + Monozyten durchgeführt. Bei den IL-10 knockout Tieren wurde hingegen nur die Cokultur der Splenozyten + STIC Zellen angesetzt. Es zeigt sich, dass die Splenozytenzahlen in Anwesenheit der STIC Zellen bei den Versuchstieren und der Kontrollgruppe annähernd gleich sind. Dargestellt sind die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten.

Aufgrund der Bedeutung des Zytokins IL-10 für die Erzeugung von iT<sub>reg</sub> Zellen [45, 46] wurden analog zu den in Abbildung 8 gezeigten Untersuchungen am Kulturtag d8 durchflusszytometrische Untersuchungen mit IL-10 knockout Zellen im Vergleich zu Zellen aus Wildtyp BALB/c Mäusen durchgeführt (Abb. 19). Damit sollte analysiert werden, ob der Mangel des Zytokins IL-10 in den Kulturen der knockout Zellen die bei den Wildtyp Kulturen beobachtete Anreicherung an regulatorischen T-Zellen (vgl. Abbildung 8) beeinflusst.



**Abbildung 19: Nachweis von regulatorischen T-Zellen bei Wildtyp Zellen und IL-10 knockout Zellen**

Am Tag 8 (d8) der Zellkultur wird eine durchflusszytometrische Untersuchung durchgeführt. Der jeweils linke Dot-Plot zeigt das Gate (umrandetes Feld) der zu untersuchenden Zellen anhand von Größe und Granularität.

Der jeweils rechte Dot-Plott zeigt das Ergebnis der weiteren Analyse dieser Zellen. Auf der x-Achse ist die Expression von CD 25 und auf der y-Achse die Expression von CD 4 dargestellt. Dabei können bei beiden Mäusestämmen  $CD4^+ CD25^{high}$  Zellen (rechtes gate) in vergleichbarer Anzahl nachgewiesen werden. Diese Zellen sind ebenfalls Foxp3 positiv (Daten nicht gezeigt) und können somit als regulatorische T-Zellen bezeichnet werden.

Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, dass in der STIC Zellkultur bei Wildtyp Zellen und bei IL-10 knockout Zellen beinahe identische Zahlen an regulatorischen T-Zellen nachweisbar sind. Unsere Arbeitshypothese, dass IL-10 für das Zustandekommen der Anreicherung von  $T_{reg}$  Zellen in Kulturen mit STIC Zellen von Bedeutung ist, konnte somit falsifiziert werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass trotz unterschiedlicher IL-10 Sekretion in den untersuchten Kulturen das Zytokin weder Einfluss auf die Zellzahlen der Lymphozyten noch auf die Anzahl der regulatorischen T-Zellen hat.

#### 4.4 Veränderung der Gentranskription bei STIC Zellen

Weiterhin sollte ein Screening mit dem Focus auf die Expression immunologisch relevanter Proteine durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurde mit einem RNA-Microarray die m-RNA-Expressionen der STIC Zellen mit denen von unbehandelten Makrophagen (MP unb.) und von IFN- $\gamma$  stimulierten Makrophagen (MP IFN- $\gamma$ ) verglichen. Die Präparation der m-RNA wurde von Frau Dr. Kronenberg, Herrn Dr. James Hutchinson und Herrn Dr. Doenicke durchgeführt. Der Assay wurde von Prof. Rehli durchgeführt und ausgewertet. Dabei wurde der Whole Mouse Genome Oligo Microarray der Firma Agilent Technologies verwendet. Die m-RNA-Expressionen des gesamten analysierbaren Transkriptoms wurden uns dann zur Analyse auf einem Datenträger übermittelt. Von der Gesamtheit der über 21.000 vorliegenden Genexpressionenswerte wurden zunächst die klassischen Zytokine betrachtet. Tabelle 7 zeigt eine nach Zytokin-Familien angeordnete Auswahl der analysierten Zytokine. Wir suchten dabei (jetzt auf Genebene) erneut nach Zytokinen, mit denen die STIC Zellen ihre Wirkungen vermitteln könnten. Deswegen legten wir besonderes Augenmerk auf Proteine, deren Genexpressionen bei den STIC Zellen eine Steigerung erfahren haben. Wir definierten dabei als relevante Steigerung der Genexpression, wenn das Verhältnis der Werte der STIC Zellen zu denen der IFN- $\gamma$  stimulierten Makrophagen (STIC / MP IFN- $\gamma$ ) größer als der Faktor 2 ist (Tabelle 7, letzte Spalte).

Familie	Zytokin	Gen Name	MP unb.	MP IFN- $\gamma$	STIC adh.	STIC / MP unb.	STIC / MP IFN- $\gamma$	>2 x Steigerung
Hämatopoese	IL-4	Il4	3,1	1,7	2,1	0,7	1,2	nein
	IL-6	Il6	0,0	14,2	0,3	16,0	0,0	nein
	IL-7	Il7	0,6	1,7	2,3	3,9	1,4	nein
	G-CSF	Csf3	0,5	6,3	0,5	1,1	0,1	nein
	IL-15	Il15	0,1	1,0	1,2	11,1	1,2	nein
	GM-CSF	Csf2	0,6	1,0	2,7	4,7	2,7	ja
	OSM	Osm	0,7	3,0	1,1	1,5	0,4	nein
	LIF	Lif	0,5	0,6	0,5	1,0	0,8	nein
	M-CSF	Csf1	0,0	0,4	1,1	48,8	3,0	ja
Interferone	IFN- $\gamma$	lfng	0,8	1,0	13,4	15,9	13,2	ja
	IFN- $\alpha$	lfna1	0,6	0,6	1,7	3,1	2,9	ja
	IFN- $\beta$	lfnb1	0,0	0,8	1,6	107,5	2,0	ja

Familie	Zytokin	Gen Name	MP unb.	MP IFN-γ	STIC adh.	STIC / MP unb.	STIC / MP IFN-γ	>2 x Steigerung
IL-12 Familie	IL-21a	Il12a	0,2	2,1	0,7	<b>2,9</b>	<b>0,3</b>	nein
	IL-12b	Il12b	0,0	10,4	0,8	<b>52,0</b>	<b>0,1</b>	nein
	IL-23	Il23a	0,8	1,0	1,0	<b>1,2</b>	<b>1,0</b>	nein
	IL27	Il27	0,2	1,3	0,8	<b>3,3</b>	<b>0,6</b>	nein
IL-10 Familie	IL-10	Il10	0,2	0,3	1,7	<b>9,1</b>	<b>6,7</b>	ja
TNF Familie	TNF-α	Tnf	0,1	2,4	0,5	<b>3,8</b>	<b>0,2</b>	nein
	TNF-β	Tnfrsf1b	0,1	1,1	1,5	<b>12,3</b>	<b>1,3</b>	nein
	LT-β	Ltb	0,3	0,8	10,1	<b>35,4</b>	<b>12,9</b>	ja
	CD40L	Tnfrsf5	0,0	1,5	2,0	<b>84,6</b>	<b>1,3</b>	nein
	CD30L	Tnfsf8	0,0	0,0	0,1	<b>2,9</b>	<b>3,9</b>	ja
	4-1BBL	Tnfrsf9	0,5	1,2	1,6	<b>3,4</b>	<b>1,3</b>	nein
	Trail	Tnfsf10	0,0	1,0	1,4	<b>140,5</b>	<b>1,4</b>	nein
	OPG-L	Tnfrsf11a	1,5	0,7	1,3	<b>0,9</b>	<b>1,8</b>	nein
	APRIL	Tnfsf13	0,8	0,2	1,1	<b>1,3</b>	<b>7,2</b>	ja
	LIGHT	Tnfsf14	1,6	0,1	0,6	<b>0,4</b>	<b>4,3</b>	ja
	TWEAK	Tnfsf12	0,7	0,4	1,2	<b>1,6</b>	<b>3,2</b>	ja
	BlyS	Tnfsf13b	0,3	2,8	1,9	<b>7,1</b>	<b>0,7</b>	nein
Weitere Zytokine	TGF-β1	Tgfb1	1,4	0,9	1,2	<b>0,9</b>	<b>1,2</b>	nein
	TGF-β3	Tgfb3	2,1	1,2	0,8	<b>0,4</b>	<b>0,7</b>	nein
	Inhibin	Inhba	0,0	5,2	5,6	<b>555,4</b>	<b>1,1</b>	nein
	Inhibin	Inhbe	1,0	1,3	0,9	<b>0,9</b>	<b>0,7</b>	nein
	IL-1α	Il1a	0,0	6,1	1,8	<b>145,2</b>	<b>0,3</b>	nein
	IL-1β	Il1b	0,0	4,4	0,2	<b>24,8</b>	<b>0,1</b>	nein
	IL-1RA	Il1rn	0,0	3,0	1,9	<b>52,5</b>	<b>0,6</b>	nein
	MIF	Mif	2,6	4,4	1,6	<b>0,6</b>	<b>0,4</b>	nein
	IL-16	Il16	1,2	0,1	0,6	<b>0,5</b>	<b>6,5</b>	ja
	IL-17	Il17d	0,7	0,6	0,5	<b>0,7</b>	<b>0,8</b>	nein
	IL-18	Il18	0,1	0,6	1,5	<b>11,0</b>	<b>2,4</b>	ja
	IL-18 bp	Il18bp	0,0	6,4	4,0	<b>116,0</b>	<b>0,6</b>	nein
IL-33	9230117N10Rik	0,4	7,3	13,3	<b>34,6</b>	<b>1,8</b>	nein	

**Tabelle 7: Expressionswerte einer Auswahl der im Microarray analysierten Zytokingene**

Die Tabelle zeigt immunregulatorisch bedeutsame Zytokine. Diese sind in Gruppen zusammengefasst. Es sind die Expressionswerte für unbehandelte Makrophagen (MP unb.) und für Interferon-γ stimulierte Makrophagen (MP IFN-γ) dargestellt. Weiterhin finden sich die Werte für adhärenente (STIC adh.)

Es wurde das Verhältnis aus STIC Zellen zu unstimulierten Makrophagen (STIC / MP unb.) und aus STIC Zellen zu IFN-γ stimulierten Makrophagen (STIC / MP IFN-γ) gebildet. In der letzten Spalte wird aufgezeigt, ob die jeweilige Genexpression bei den STIC Zellen um mehr als den Faktor 2 im Vergleich zu IFN-γ stimulierten Makrophagen gesteigert ist.

Das Gen für das Zytokin IL-2 wurde nicht analysiert.

Um weitere potentiell für die Immunregulation wichtige Proteine im Transkriptom der STIC Zellen zu identifizieren, haben wir aus den im Microarray gewonnenen Daten diejenigen Gene ausgewählt, deren Transkription bei den STIC Zellen im Vergleich zu unstimulierten und zu IFN- $\gamma$  stimulierten Makrophagen hochreguliert wurde. Die am stärksten hochregulierten Genexpressionen sind in Tabelle 8 dargestellt.

Gen Name	MP unb.	MP IFN- $\gamma$	STIC adh.	STIC / MP unb.	STIC / MP IFN- $\gamma$	Kodiertes Protein
<b>Ngp</b>	0,1	0,1	42,3	<b>625</b>	<b>819</b>	neutrophilic granule protein (Ngp)
<b>Ltf</b>	0,0	0,0	10,8	<b>251</b>	<b>493</b>	lactotransferrin (Ltf)
<b>Chi3l4</b>	0,1	0,0	20,1	<b>379</b>	<b>406</b>	chitinase 3-like 4 (Chi3l4)
<b>Chi3l3</b>	0,1	0,1	22,0	<b>286</b>	<b>395</b>	chitinase 3-like 3 (Chi3l3)
<b>S100a9</b>	0,0	0,0	16,1	<b>420</b>	<b>357</b>	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B) (S100a9)
<b>Hp</b>	0,0	0,1	31,8	<b>1196</b>	<b>282</b>	haptoglobin (Hp)
<b>Ltf</b>	0,1	0,0	13,0	<b>173</b>	<b>279</b>	lactotransferrin (Ltf)
<b>Chi3l1</b>	0,2	0,2	45,0	<b>294</b>	<b>245</b>	chitinase 3-like 1 (Chi3l1)
<b>1100001G20Rik</b>	0,1	0,1	20,2	<b>284</b>	<b>212</b>	RIKEN cDNA 1100001G20 gene (1100001G20Rik)
<b>Ccl6</b>	0,3	0,0	4,8	<b>18</b>	<b>189</b>	chemokine (C-C motif) ligand 6 (Ccl6)
<b>Padi4</b>	0,2	0,0	3,1	<b>16</b>	<b>150</b>	peptidyl arginine deiminase, type IV (Padi4)
<b>TC1500960</b>	0,2	0,0	3,1	<b>19</b>	<b>132</b>	PDI4_MOUSE (Q9Z183) Protein-arginine deiminase type IV
<b>LOC238447</b>	0,1	0,2	20,2	<b>151</b>	<b>126</b>	similar to immunoglobulin heavy chain variable region
<b>Itgb2l</b>	0,2	0,2	23,3	<b>151</b>	<b>121</b>	integrin beta 2-like (Itgb2l)
<b>Mogat2</b>	0,2	0,2	21,2	<b>139</b>	<b>115</b>	monoacylglycerol O-acyltransferase 2 (Mogat2)
<b>Klk11</b>	0,0	0,0	2,2	<b>122</b>	<b>103</b>	kallikrein 11 (Klk11)
<b>Pglyrp1</b>	0,2	0,3	31,2	<b>138</b>	<b>97</b>	peptidoglycan recognition protein 1 (Pglyrp1)
<b>LOC381240</b>	3,2	0,2	17,8	<b>6</b>	<b>95</b>	similar to guanine nucleotide exchange factor I
<b>Ly6c</b>	0,0	0,3	25,2	<b>719</b>	<b>93</b>	lymphocyte antigen 6 complex, locus C (Ly6c)
<b>Camp</b>	0,0	0,5	47,0	<b>1301</b>	<b>91</b>	cathelicidin antimicrobial peptide (Camp)
<b>Pdlim1</b>	0,7	0,1	6,0	<b>9</b>	<b>85</b>	PDZ and LIM domain 1 (elfin) (Pdlim1)
<b>Igh-6</b>	0,3	0,0	0,9	<b>3</b>	<b>84</b>	partial m-RNA for immunoglobulin heavy chain constant region
<b>Mgl1</b>	0,1	0,0	0,8	<b>14</b>	<b>83</b>	macrophage galactose N-acetyl-galactosamine spec. lectin 1
<b>Mgl2</b>	0,0	0,1	3,4	<b>68</b>	<b>68</b>	macrophage galactose N-acetyl-galactosamine spec. lectin 2

**Tabelle 8: Hochregulierte Gene bei STIC Zellen**

Von denen im Microarray analysierten Genexpressionen sind diejenigen dargestellt, die bei den STIC Zellen im Vergleich zu den IFN- $\gamma$  stimulierten Makrophagen am stärksten hochreguliert sind. Das jeweils kodierte Protein ist in der letzten Spalte aufgeführt.

Es sind die Expressionswerte für unbehandelte Makrophagen (MP unb.) und für Interferon- $\gamma$  stimulierte Makrophagen (MP IFN- $\gamma$ ) dargestellt. Weiterhin finden sich die Werte für adhärenente (STIC adh.)

Weiterhin wurde das Verhältnis aus STIC Zellen zu unstimulierten Makrophagen (STIC / MP unb.) und aus STIC Zellen zu IFN- $\gamma$  stimulierten Makrophagen (STIC / MP IFN- $\gamma$ ) gebildet.

Genauso wie über die Hochregulation bestimmter Genprodukte können Zellen auch über die Herunterregulation von Genexpressionen immunologische Wirkungen vermitteln. So könnten die in der STIC Zellkultur beobachteten Effekte auch dadurch

verursacht sein, dass die Produktion von bestimmten Immunbotenstoffen reduziert wird. Um herauszufinden, welche Gene dabei eine Rolle spielen könnten, haben wir die Microarray Daten nach Genen durchsucht, deren Expression bei den STIC Zellen stark herunterreguliert werden (Tabelle 9).

Gen Name	MP unb.	MP IFN- $\gamma$	STIC adh.	MP unb. / STIC	MP IFN- $\gamma$ / STIC	Kodiertes Protein
Pcp4	0,4	269,1	1,0	0,4	262,0	Purkinje cell protein 4 (Pcp4)
Pcsk1	1,2	2,7	0,1	21,4	48,5	proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 (Pcsk1)
Il6	0,0	14,2	0,3	0,1	41,8	interleukin 6 (Il6)
Indo	0,1	69,1	2,0	0,0	34,5	indoleamine-pyrrole 2,3 dioxygenase (IDO)
Col18a1	1,0	0,2	0,0	85,8	20,8	procollagen, type XVIII, alpha 1 (Col18a1)
Pdzk6	0,7	26,6	1,3	0,6	20,0	PDZ domain containing 6 (Pdzk6)
TC1536702	0,0	54,2	2,9	0,0	18,7	predicted protein (Methanosarcina acetivorans C2A;)
Hmga2	3,6	0,5	0,0	138,3	18,1	high mobility group AT-hook 2 (Hmga2)
Il1b	0,0	4,4	0,2	0,0	17,6	interleukin 1 beta (Il1b)
Col18a1	1,0	0,2	0,0	78,7	16,5	procollagen, type XVIII, alpha 1 (Col18a1)
Magee1	1,1	4,5	0,3	3,8	15,4	melanoma antigen, family E, 1 (Magee1)
AK052777	0,2	4,5	0,3	0,8	15,1	0 day neonate kidney cDNA, clone:D630049N15
Clic5	0,0	24,6	1,9	0,0	13,3	chloride intracellular channel 5 (Clic5)
Il12b	0,0	10,4	0,8	0,0	12,8	interleukin 12b (Il12b)
Ptgs2	0,0	7,7	0,6	0,0	12,5	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (Ptgs2)
B3gnt4	0,6	15,9	1,3	0,5	12,5	UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransf. 4
Edil3	0,9	0,7	0,1	15,7	12,3	EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3 (Edil3)
Csf3	0,5	6,3	0,5	0,9	12,2	colony stimulating factor 3 (granulocyte) (Csf3)
Kalrn	0,6	18,9	1,6	0,4	12,2	kalirin, RhoGEF kinase, m-RNA (cDNA clone IMAGE:6432820)
Ptgs2	0,0	7,1	0,6	0,0	11,6	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (Ptgs2)
Nap1l2	0,3	4,6	0,4	0,7	11,4	nucleosome assembly protein 1-like 2 (Nap1l2)
Dmwd	32,8	41,7	4,0	8,2	10,5	dystrophia myotonica-containing WD repeat motif (Dmwd)
Ctgf	0,9	1,7	0,2	5,4	10,1	connective tissue growth factor (Ctgf)
Antxr1	0,2	6,0	0,6	0,4	10,1	anthrax toxin receptor 1 (Antxr1)
Slc17a8	0,4	16,3	1,6	0,3	10,1	solute carrier family 17 member 8 (Slc17a8)
Filip1	1,0	12,0	1,2	0,8	9,7	PREDICTED: filamin A interacting protein 1
Park2	2,1	4,9	0,5	4,1	9,7	parkin (Park2)
Dcn	0,6	6,7	0,7	0,8	9,6	decorin (Dcn)

**Tabelle 9: Herunterregulierte Gene bei STIC Zellen**

Von denen im Microarray analysierten Genexpressionen sind diejenigen dargestellt, die bei den STIC Zellen im Vergleich zu den IFN- $\gamma$  stimulierten Makrophagen am stärksten herunterreguliert sind. Das jeweils kodierte Protein ist in der letzten Spalte aufgezeigt.

Es sind die Expressionswerte für unbehandelte Makrophagen (MP unb.) und für Interferon- $\gamma$  stimulierte Makrophagen (MP IFN- $\gamma$ ) dargestellt. Weiterhin finden sich die Werte für adhärenzte (STIC adh.)

Weiterhin wurde das Verhältnis aus STIC Zellen zu unstimulierten Makrophagen (STIC / MP unb.) und aus STIC Zellen zu IFN- $\gamma$  stimulierten Makrophagen (STIC / MP IFN- $\gamma$ ) gebildet.

Aus den in Tabelle 9 gezeigten Genexpressionswerten sollen einige im Folgenden genauer betrachtet werden. So zeigen die ruhenden, unbehandelten Makrophagen

(MP unb.) keine Expression des proinflammatorischen [1] Zytokins IL-6, während die IFN- $\gamma$  aktivierten Makrophagen (MP IFN- $\gamma$ ) erwartungsgemäß hohe Expressionswerte aufzeigen. Bei den STIC Zellen (STIC adh.) zeigt sich dagegen eine deutlich niedrigere Expression.

Auch ist die Expression des Proteins Indoleamine-pyrrole 2,3 dioxygenase (IDO) bei den STIC Zellen im Vergleich zu den IFN- $\gamma$  aktivierten Makrophagen deutlich erniedrigt. Diese Tatsache spricht dafür, dass die von uns untersuchten STIC Zellen nicht mit den von Munn et al. beschriebenen, IDO exprimierenden Makrophagen [54, 55] gleichzusetzen sind. Diese Beobachtungen bestätigen die von unserer Arbeitsgruppe auf Proteinebene durchgeführten Untersuchungen der STIC Zellen [13].

Mit Hilfe der Gen-Datenbank von pubmed wurden aus den Daten des Microarrays Gene ausgewählt, bei denen andere Arbeitsgruppen eine Beteiligung der jeweiligen Genprodukte bei der Immunregulation aufzeigen konnten und die außerdem eine deutlich hochregulierte Genexpression bei den STIC Zellen zeigen. Diese in Tabelle 10 angeführten Genprodukte könnten für die Vermittlung der Effekte der STIC Zellen ebenfalls eine Rolle spielen.

Gen Name	MP unb.	MP IFN- $\gamma$	STIC adh.	Kodiertes Protein
Gzma	1,3	1,5	3,2	granzyme A
Gzmb	0,8	0,9	30,8	granzyme B
Gzmc	0,4	0,5	3,6	granzyme C
Ltb	0,3	0,8	10,1	lymphotoxin B
Mgl1	0,1	0,0	0,8	mp gal. N-acetyl-galactosamine specific lectin 1 (CD301a)
Mgl2	0,0	0,1	3,4	mp gal. N-acetyl-galactosamine specific lectin 2 (CD301b)
Ngp	0,1	0,1	42,3	neutrophilic granule protein
Pdcd1	0,3	0,4	2,9	programmed cell death 1 (PD-1)
Pdcd2	1,5	1,1	1,4	programmed cell death 2 (PD-2)
Pdcd1lg2	0,2	3,2	30,4	programmed cell death 1 ligand 2 (PD-L2)
S100a8	0,1	0,6	26,5	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)
S100a9	0,0	0,0	16,1	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)
Tnfsf18	0,5	0,7	9,0	TNF (ligand) superfamily member 18 (GITRL)
Tnfsf4	0,1	0,6	9,8	TNF (ligand) superfamily member 4 (OX40L)

**Tabelle 10: Hochregulierte und immunologisch relevante Gene bei STIC Zellen**

Von denen im Microarray analysierten Genexpressionen wurden bekanntermaßen immunologisch relevante Gene näher betrachtet. In der Tabelle sind nur die Gene dargestellt, die außerdem eine deutliche Hochregulation in den STIC Zellen erfahren haben. Das jeweils kodierte Protein ist in der letzten Spalte gezeigt.

## 4.5 Oberflächenmarker der STIC Zellen

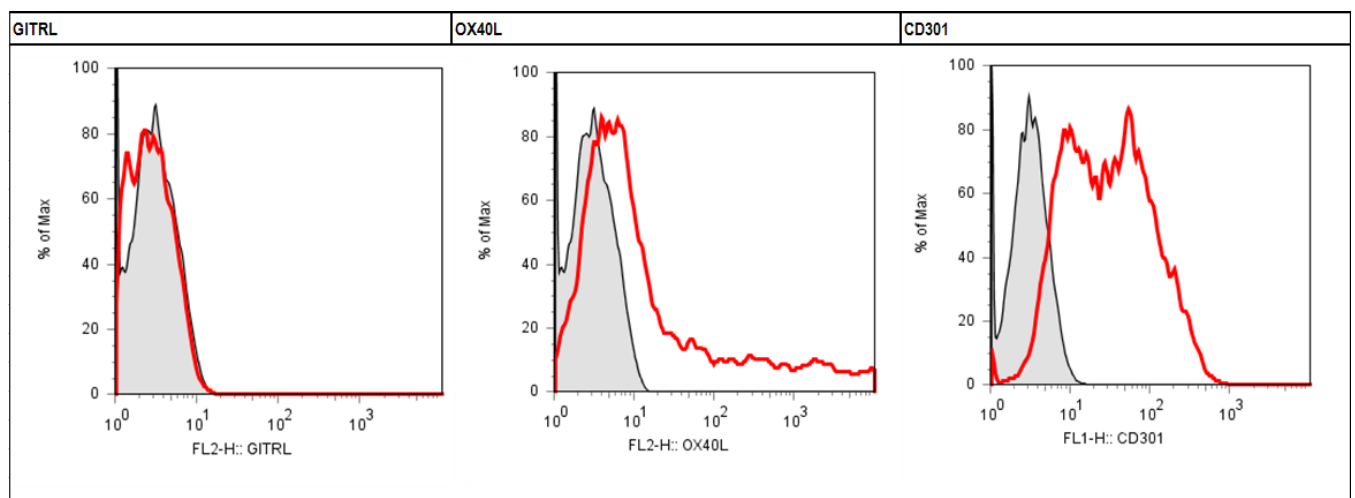
Nach der Auswertung der Ergebnisse des Microarray sollte für einige als potentiell wichtig erachtete Proteine untersucht werden, ob die gemessene Steigerung der Transkription auch tatsächlich mit einer nachweisbaren Expression der entsprechenden Proteine einhergeht. Dabei wurden Proteine ausgewählt, die sich an der Zelloberfläche nachweisen lassen und für die kommerziell Antikörper erhältlich sind, welche für die Durchflusszytometrie geeignet sind. In Tabelle 11 sind die von den MTAs der Abteilung durchflusszytometrisch untersuchten Proteine dargestellt.

Gen Name	MP unb.	MP IFN- $\gamma$	STIC adh.	Kodiertes Protein
Mgl1	0,1	0,0	0,8	mp gal. N-acetyl-galactosamine specific lectin 1 ( <b>CD301a</b> )
Mgl2	0,0	0,1	3,4	mp gal. N-acetyl-galactosamine specific lectin 2 ( <b>CD301b</b> )
Tnfsf18	0,5	0,7	9,0	TNF (ligand) superfamily member 18 ( <b>GITRL</b> )
Tnfsf4	0,1	0,6	9,8	TNF (ligand) superfamily member 4 ( <b>OX40L</b> )

**Tabelle 11: Genprodukte zur durchflusszytometrischen Untersuchung**

Es sind die Genprodukte aus Tabelle 10 aufgezeigt, die nachfolgend durchflusszytometrisch untersucht wurden.

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung (von Frau Dr. Kronenberg durchgeführt) der in Tabelle 11 aufgeführten Proteine sind in Abbildung 20 dargestellt. Obwohl alle drei untersuchten Proteine auf m-RNA Ebene eine deutliche Hochregulation der Genaktivität erfahren haben (Tabelle 10 und 6), kommt es nur bei OX40L zu einer schwachen und bei CD301 zu einer starken Expression auf der Zelloberfläche, während sich das Protein GITRL dort nicht nachweisen lässt.



**Abbildung 20: Durchflusszytometrische Untersuchung der STIC Zellen auf Oberflächenmarker**

Die Genprodukte einer Auswahl (Tabelle 11) der im Microarray identifizierten Gene werden in der Durchflusszytometrie analysiert. Dabei wird die Expression der Oberflächenmarker GITRL, OX40L und CD301 (Mgl) auf den STIC Zellen aufgezeigt. Der Wert für GITRL (rote Kurve) entspricht dem Isotypen des verwendeten Antikörpers (graue Kurve) und ist somit als negativ anzusehen. Es zeigt sich eine schwache Expression von OX40L und eine starke von CD301.

## 5 Diskussion

### 5.1 Charakterisierung der STIC Zellen

Wie in der Einleitung dargestellt, haben STIC Zellen immunregulatorische Eigenschaften, welche von Brem-Exner et al. erstmals umfangreich beschrieben worden sind [13]. So kommt es in Cokulturen von STIC Zellen mit Lymphozyten zu einem Rückgang der Lymphozyten Zellzahl und außerdem zu einer Anreicherung von regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass chronisch entzündliche Darmerkrankungen bei Mäusen durch die Applikation von STIC Zellen gebessert werden können [13]. Weitere Studien [11, 12] konnten aufzeigen, dass sich die *in vitro* und im Tierexperiment beobachteten immunsuppressiven Eigenschaften der STIC Zellen auch auf den Menschen übertragen lassen und eine klinische Applikation dieser Zellen prinzipiell praktikabel ist.

Für die Bildung von STIC Zellen in den Kulturen der gemischten Zellen aus Knochenmark, Milz und Blut sind verschiedene Signale wichtig. Neben den Zytokinen M-CSF und IFN- $\gamma$  ist die Aktivierung des CD40 Rezeptors der Makrophagen erforderlich, damit sie sich zu STIC Zellen differenzieren [13]. Der CD40 Signalweg wird mit Hilfe von CD154 aktiviert, welches sich auf  $CD4^+$  T-Zellen findet [1]. Bei Abwesenheit von  $CD4^+$  Zellen unterbleibt trotz experimenteller Aktivierung des CD40 Signalweges mit einem löslichen CD40 Liganden die Bildung funktionsfähiger STICs. Es muss also neben dem CD40 Signalweg noch weitere, für die STIC Bildung essentielle Faktoren der  $CD4^+$  T-Zellen geben. Im Gegensatz zu der wichtigen Rolle der  $CD4^+$  T-Zellen hat die Deletion von  $CD8^+$  T-Zellen oder von B-Zellen aus den Mischkulturen keinen Effekt auf die STIC Bildung. Für die Bildung von STIC Zellen *in vitro* ist also die Anwesenheit von M-CSF, IFN- $\gamma$  und  $CD4^+$  T-Zellen erforderlich [13]. Die erforderliche Anwesenheit von  $CD4^+$  T-Zellen bei der Erzeugung der STIC Zellen grenzt sie von den von Munn et al. beschriebenen regulatorischen Makrophagen ab. Diese entstehen bei Abwesenheit von  $CD4^+$  T-Zellen und Zugabe von löslichem CD40 Ligand [13, 54, 55].

Brem-Exner et al konnten weiterhin durch durchflusszytometrische Untersuchungen von Oberflächenmarkern aufzeigen, dass es sich bei den als STICs bezeichneten Zellen um Makrophagen handelt. Die weiteren beobachteten Eigenschaften dieser Zellen lassen keine Zuordnung zu einem bereits beschriebenen Subtyp von

Makrophagen zu. Deswegen muss davon ausgegangen werden, dass es sich hier um einen neu entdeckten Funktionszustand von Makrophagen handelt [13].

Es muss festgestellt werden, dass es sich bei den von uns am Kulturtag d5 geernteten und als STICs bezeichneten Zellen um ein Zellgemisch handelt, das neben den Makrophagenähnlichen STIC Zellen noch weitere Zellpopulationen enthält. Die beobachteten Effekte können also nicht ohne weitere Untersuchungen den STIC Makrophagen zugeschrieben werden, sondern müssen als Wirkungen des STICs enthaltenden Zellgemisches verstanden werden.

Charakterisiert sind die STIC Zellen durch ihre Fähigkeit in Cokultur mit Lymphozyten deren Zellzahl zu reduzieren und außerdem in den Kulturen zu einer Anreicherung von regulatorischen T-Zellen zu führen. Es ist bekannt, dass STIC Makrophagen den Adhäsionsmarker CD11b exprimieren. Um auszuschließen, dass ein unbekannter, in der Zellkultur enthaltener Zelltyp für die Fähigkeit der  $T_{reg}$  Bildung und Lymphozytenreduktion verantwortlich ist, wurden von Brem-Exner et al. am Tag d5 die  $CD11b^+$  Zellen deletiert. Dies führte dazu, dass beide Wirkungen nicht eintraten. Dagegen bildeten sich in einer Kultur aus am Tag d0 selektionierten und dann cokultivierten  $CD11b^+$  und  $CD4^+$  Zellen voll funktionstüchtige STIC Zellen. Somit konnte gezeigt werden, dass die adhärennten  $CD11b^+$  Zellen zusammen mit  $CD4^+$  T-Zellen für die oben beschriebenen Effekte essentiell sind [13].

## 5.2 Lymphozyten Zellzahlen

Die Intention zur genauen Untersuchung der Eigenschaften und vor allem der Wirkungsweise der STIC Zellen liegt in ihrem beobachteten immunsuppressiven Potential. In verschiedenen Veröffentlichungen konnten die Arbeitsgruppen um Professor Fändrich und Professor Geissler diese aufzeigen. So sind i.v. verabreichte STIC Zellen dazu in der Lage, in intestinales lymphatisches Gewebe, intestinale Mucosa und Payersche Plaques einzuwandern und zu einer histologisch und klinisch nachweisbaren Besserung von entzündlichen Darmerkrankungen bei Mäusen zu führen [13]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Verabreichung von STIC Zellen bei humanen Nierentransplantationen erfolgreich und sicher durchgeführt werden kann. Diese aus Zellen der Organspender differenzierten STICs erlaubten eine deutliche Reduktion der immunsuppressiven Medikamente bei den Organempfängern [11, 12].

Diese Beobachtungen zeigen, dass STIC Zellen prinzipiell ein therapeutisches Potential beim Menschen haben und sowohl die Therapie von Autoimmunerkrankungen als auch die Möglichkeiten der Immunsuppression bei allogenen Organtransplantationen bereichern könnten. Um diese Zellen oder ihre immunologischen Mediatoren routinemäßig anwenden zu können, ist jedoch ein besseres Verständnis der Wirkungsweise der STIC Zellen erforderlich.

Wie Brem-Exner et al. zeigen konnten, führen die STIC Zellen in Cokulturen mit Splenozyten zu einem Rückgang der Splenozyten Zellzahlen [13]. Diese Ergebnisse konnten durch unsere Versuche mit Zellen der Mausstämme BALB/c und C57BL/6 bestätigt werden. Die Splenozyten Zellzahl wurde als Test für die erfolgreiche Bildung der STIC Zellen in den Kulturen verwendet. Während in der Cokultur von Splenozyten mit Monozyten kein wesentlicher Rückgang der Splenozyten Zellzahl festzustellen ist, kommt es bei Anwesenheit der STIC Zellen zu einem signifikanten Rückgang der Splenozytenzahlen (Abbildung 7).

Diese Beobachtung lässt vermuten, dass STIC Zellen die in Cokultur befindlichen Lymphozyten aktiv abtöten oder dazu bringen, in Apoptose zu gehen. Hierbei könnte man sich vorstellen, dass entweder lösliche Immunbotenstoffe oder auch durch Zell-Zell Kontakt vermittelte Signale eine Rolle spielen. Weiterhin ist denkbar, dass die STIC Zellen die Lymphozyten Reduktion nicht direkt, sondern mit Hilfe anderer Zellen erreichen.

Obwohl der genaue Mechanismus der Wirkung der STIC Zellen nach wie vor unbekannt ist, liegen durch die Arbeiten von Brem-Exner et al. erste Hinweise vor, welche Faktoren dabei von Bedeutung sind. So konnte während der am Mikroskop durchgeführten Zellzählungen am Kulturtag d7 beobachtet werden, dass STIC Zellen in engem räumlichen Kontakt zu den am Kulturtag d5 zugesetzten Lymphozyten stehen [13]. Diese Beobachtungen konnten durch Versuche im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Durch Verwendung einer speziellen Transwell Kulturkammer, die die STIC Zellen von den zugegebenen Lymphozyten räumlich trennt und nur einen Austausch von löslichen Botenstoffen erlaubt, wurde gezeigt, dass ein direkter Zell-Zell Kontakt für den Rückgang der Lymphozytenzahl notwendig ist. Durch Zugabe eines Caspase Inhibitors konnte gezeigt werden, dass der sonst beobachtete Rückgang der Lymphozytenzahl ausbleibt. Dies führt zu der Annahme, dass Apoptose dabei eine wichtige Rolle spielt. Weiterhin stellten Brem-Exner et al.

die Hypothese auf, dass apoptotische Lymphozyten von STIC Zellen phagozytiert werden, da sich bei der Mikroskopie der STIC Zellen Partikel der Lymphozyten Färbung innerhalb der STICs zeigten [13].

Die *in vivo* beobachteten immunsuppressiven Wirkungen der STICs [11-13] könnten somit auf die Reduktion von proinflammatorischen Lymphozyten zurückzuführen sein.

### 5.3 Regulatorische T-Zellen

Weiterhin haben Brem-Exner et al. herausgefunden, dass Lymphozytenpopulationen, die in Cokulturen mit STIC Zellen überleben, eine Anreicherung an regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ) aufweisen [13]. Diese Ergebnisse konnten wir durch unsere durchflusszytometrischen Untersuchungen am Kulturtag d8 bestätigen, wie die Abbildungen 8 und 9 zeigen. Weiterhin haben wir die Anreicherung an  $T_{reg}$  Zellen ebenso wie den Rückgang der Lymphozytenzahl als Qualitätskontrolle für die STIC Kulturen verwendet.

Wie in der Einleitung bereits dargestellt, kann man zwei unterschiedliche Typen von regulatorischen T-Zellen unterscheiden. Neben den im Thymus gebildeten und bereits kurz nach der Geburt peripher nachweisbaren  $nT_{reg}$  Zellen existieren  $iT_{reg}$  Zellen, die in der Peripherie aus  $CD25^-$  Effektor T-Zellen entstehen [24, 29, 35].

Während  $nT_{reg}$  Zellen eine relativ stabile Foxp3 Expression zeigen, nimmt die der  $iT_{reg}$  Zellen in Abwesenheit von IL-2 und TGF- $\beta$  sehr schnell ab. Die Zytokine sind also neben der Erzeugung auch für die Aufrechterhaltung der regulatorischen Eigenschaften der  $iT_{reg}$  Zellen wichtig [34]. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass sich  $nT_{reg}$  und  $iT_{reg}$  Zellen auch in ihrer Reaktion auf das Zytokin IL-6 unterscheiden. Während sich  $nT_{reg}$  Zellen durch die Wirkung von IL-6 in proinflammatorische, IL-17 produzierende  $T_H17$  Zellen umwandeln ließen, konnten  $iT_{reg}$  Zellen nicht konvertiert werden. Sollten diese *in vitro* Ergebnisse auch *in vivo* zutreffen, würde dies darauf hindeuten, dass die Funktionen beider  $T_{reg}$  Zellpopulationen in der Modulation der adaptiven Immunantwort unterschiedlich sind [34]. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten belegen, dass *in vitro* durch IL-2 und TGF- $\beta$  induzierte  $iT_{reg}$  Zellen therapeutisches Potential haben. So konnte gezeigt werden, dass ein Transfer dieser polyklonalen  $iT_{reg}$  Zellen in Versuchstiere mit Autoimmunerkrankungen eine deutliche Besserung der Pathologien bewirken konnte [34, 56].

### 5.3.1 Wirkung der T<sub>reg</sub> Zellen

Die Fähigkeit, in Zellkulturen zu einer Anreicherung von T<sub>reg</sub> Zellen zu führen, ist eine entscheidende Eigenschaft der STIC Zellen [13]. Somit liegt die Vermutung nahe, dass T<sub>reg</sub> Zellen auch bei der Vermittlung der immunsuppressiven Wirkungen der STICs eine Rolle spielen. Deswegen ist in diesem Zusammenhang eine Diskussion der Wirkung von regulatorischen T-Zellen notwendig.

Zum heutigen Zeitpunkt sind vier verschiedene Wege bekannt, über die T<sub>reg</sub> Zellen ihre immunsuppressiven Wirkungen an Effektorzellen vermitteln. Zunächst sind sie in der Lage, die Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$  zu bilden und diese sowohl frei zu sezernieren als auch an ihren Zellmembranen zu präsentieren [29]. Asseman et al. konnten zeigen, dass von T<sub>reg</sub> Zellen gebildetes IL-10 gemeinsam mit TGF- $\beta$  entscheidenden Einfluss auf die Kontrolle von intestinalen Infektionen und von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nimmt [57]. Außerdem ist bekannt, dass IL-10 bei vielen anderen Pathologien, wie zum Beispiel bei Entzündungen der Atemwege, protektive Funktionen hat und sogar für die feto-maternale Immuntoleranz wichtig ist [29]. Neben ihren bekannten immunsuppressiven Wirkungen wird den Zytokinen IL-10 und TGF- $\beta$  auch die Fähigkeit zugeschrieben, an der Bildung von iT<sub>reg</sub> Zellen mitzuwirken [29]. Daneben wurde vor Kurzem das inhibitorische Zytokin IL-35 beschrieben [58]. Es konnte eine hohe Expression des Gens Epstein-Barr-virus-induced gene 3 (Ebi3), welches das Zytokin IL-27 $\beta$  kodiert, und des Interleukin-12 alpha gene (Il12a) in Foxp3 positiven T<sub>reg</sub> Zellen der Maus gezeigt werden. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass diese T<sub>reg</sub> Zellen einen Ebi3 – IL-12 $\alpha$  Heterodimer sezernieren, welcher offiziell als IL-35 bezeichnet wurde [58]. Man erkannte darüber hinaus, dass IL-35 *in vitro* die Proliferation von Effektor T-Zellen inhibiert und für die maximale Aktivität von T<sub>reg</sub> Zellen erforderlich ist [29, 58]. Zusammenfassend kann man IL-10, TGF- $\beta$  und IL-35 als bedeutendste bisher bekannte Zytokine der T<sub>reg</sub> Zellen bezeichnen.

Der zweite Suppressionsmechanismus von T<sub>reg</sub> Zellen funktioniert über die Sekretion von Granzymen und Perforin. Diese Form der Cytolyse wurde lange Zeit nur CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten und NK-Zellen zugeschrieben. Inzwischen ist bekannt, dass auch T<sub>reg</sub> Zellen dadurch Effektorzellen, wie zum Beispiel B-Zellen zerstören können [29].

Weitere immunsuppressive Funktionen von T<sub>reg</sub> Zellen können als „metabolische Störung“ der Effektorzellen subsumiert werden. Es wird kontrovers diskutiert, ob die hohe Expression der  $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) zur lokalen Bindung von IL-

2 führt und proliferierenden Effektor T-Zellen dieser wichtige Wachstumsfaktor somit entzogen wird [29, 34]. Durch gleichzeitige Expression der Ektoenzyme CD39 und CD73 können  $T_{reg}$  Zellen perizelluläres Adenosin erzeugen. Dieser kurzlebige Mediator unterdrückt die Funktion von Effektor T-Zellen durch die Aktivierung des Adenosin Rezeptors 2A ( $A_{2A}R$ ). Der aktivierte  $A_{2A}R$  führt außerdem zu einer verstärkten TGF- $\beta$  Sekretion und einem Rückgang der IL-6 Produktion. Diese Veränderung des Zytokinprofils der Effektor T-Zellen führt zu einer verstärkten Bildung von  $iT_{reg}$  Zellen, da TGF- $\beta$  die Bildung von  $iT_{reg}$  Zellen fördert, während IL-6 diese inhibiert [29]. Zusätzlich können  $T_{reg}$  Zellen durch direkten Zell-Zell Kontakt über Gap Junctions mit Effektor T-Zellen in Kontakt treten. Durch diese können die  $T_{reg}$  Zellen den inhibitorischen second messenger cAMP direkt in das Cytosol der Effektor T-Zellen einschleusen und diese dadurch supprimieren [29]. Welche Bedeutung diesen Mechanismen jeweils *in vivo* zukommt, ist allerdings noch nicht hinreichend geklärt [29].

Zuletzt soll unter den bekannten Mechanismen der  $T_{reg}$  Zellen noch die direkte Beeinflussung von Antigen präsentierenden Zellen (APC), wie Dendritischen Zellen (DC) und Makrophagen, erwähnt werden. Durch Intravitalmikroskopie konnte gezeigt werden, dass  $T_{reg}$  Zellen *in vivo* auch in engem Kontakt mit APCs stehen [29]. Es wird vermutet, dass  $T_{reg}$  Zellen so die Fähigkeit der APCs, die Effektor T-Zellen zu aktivieren herunterregulieren und unreifen DCs die Fähigkeit verleihen,  $iT_{reg}$  Zellen zu induzieren. Auf welche Weise die  $T_{reg}$  Zellen hier ihre Wirkungen vermitteln, ist noch nicht ausreichend geklärt. Es wird vermutet, dass neben Zytokinen zelloberflächen-gebundenes Neurophilin-1 hierbei eine Rolle spielt [29, 34].

### **5.3.2 Wechselwirkungen zwischen STICs und $T_{reg}$ Zellen**

Unsere Ergebnisse zeigen, dass in Kulturen mit STIC Zellen eine deutliche Anreicherung an regulatorischen T-Zellen zu beobachten ist. Wie erwartet lassen sich in der Zellkultur, die lediglich Splenozyten enthält, keine  $T_{reg}$  Zellen nachweisen (Abb. 9) während die Kulturen in Anwesenheit der STIC Zellen einen prozentualen Anteil an  $T_{reg}$  Zellen von etwa 30 % aufweisen (Abb. 8 a und b). Es ist also gezeigt, dass die Anreicherung von  $T_{reg}$  Zellen in unseren Kulturbedingungen an die Anwesenheit der STIC Zellen gebunden ist. Anhand der obigen Ausführungen wäre denkbar, dass es sich dabei um  $iT_{reg}$  Zellen handelt, welche sich unter dem Einfluss

der STIC Zellen aus in der Kultur vorhandenen naiven T-Zellen bilden. Eine andere Möglichkeit ist, dass durch STIC Zellen keine neuen T<sub>reg</sub> Zellen gebildet werden, sondern die regulatorischen T-Zellen, die schon am Tag d0 in der Zellkultur vorhanden waren, die Cytotoxizität der STIC Zellen selektiv überleben und eventuell durch Wirkungen der STIC Zellen zur Vermehrung angeregt werden. Die genauen Mechanismen müssen den Ergebnissen weiterer Untersuchungen vorbehalten bleiben. Auch zeigen die obigen Ausführungen, dass T<sub>reg</sub> Zellen selbst vielfältige Wirkungen auf APCs und somit möglicherweise auch auf die STIC Zellen haben. Dadurch wird verständlich, dass zwischen den in der STIC Zellkultur enthaltenen Zelltypen vielfältige Wechselwirkungen zu erwarten sind, was das Aufdecken der genauen immunologischen Vorgänge erschwert.

Wie bereits erwähnt konnten wir also aufzeigen, dass die STIC Zellen zu einer Reduktion von zugegebenen Lymphozyten führen und dass es sich bei den verbleibenden Lymphozyten zum großen Teil um regulatorische T-Zellen handelt. Die vermutete Fähigkeit der STIC Zellen, die Bildung von regulatorischen T-Zellen zu induzieren, stellt einen vielversprechenden Ansatz in der Transplantatimmunologie dar. Während bisherige Therapieverfahren darauf abzielen, die proinflammatorischen Lymphozyten abzutöten oder in ihrer Funktion zu hemmen, kann durch die antiinflammatorischen Wirkungen der T<sub>reg</sub> Zellen die immunologische Akzeptanz von Transplantaten induziert werden, ohne wesentlichen Einfluss auf die Infekt- und Tumorabwehr des Organempfängers zu nehmen.

## 5.4 Zytokine

STIC Zellen entstehen *in vitro* unter dem Einfluss der Zytokine M-CSF und IFN- $\gamma$ . Um Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus der STIC Zellen ziehen zu können, haben wir in der Literatur nach Zytokinen gesucht, die zum einen immunsuppressive Wirkungen haben und zum anderen zu einer Bildung von T<sub>reg</sub> Zellen führen können. Wir haben uns dabei für die Analyse der Zytokine IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, TGF- $\beta$  und IFN- $\gamma$  in den STIC Zellkulturen entschieden [1, 2, 29, 32, 34, 37].

Unsere Ergebnisse zeigen, dass in der STIC Zellkultur die Zytokine IL-2, IL-10 und TGF- $\beta$  gebildet werden, während keine Expression der Zytokine IL-4, IL-12 und IFN- $\gamma$  gesehen wurde. Im Folgenden werden die untersuchten Zytokine einzeln diskutiert.

Dabei soll mit den in unseren Versuchen nicht nachgewiesenen Zytokinen begonnen werden.

#### **5.4.1 IL-4**

In den von uns durgeführten ELISA Assays aus Proben der STIC Zellkultur lagen die **IL-4** Spiegel stets unterhalb der Nachweisgrenze (Tabelle 6). Das Zytokin IL-4 wird von T<sub>H</sub>2 polarisierten T-Zellen, Basophilen Granulozyten und Mastzellen gebildet [3]. Die Tatsache, dass diese Zellen in unseren Kulturen nicht in wesentlichen Anteilen vorhanden sind, kann das Fehlen dieses Immunbotenstoffes erklären. IL-4 ist wichtig bei der Differenzierung von Makrophagen zu M2 polarisierten Makrophagen oder Wundheilungsmakrophagen [3, 21]. Somit deckt sich das Fehlen von IL-4 in der STIC Zellkultur mit der Annahme, dass es sich bei den STIC Makrophagen um einen Aktivierungszustand handelt, der sich von den beiden genannten unterscheidet.

#### **5.4.2 IL-12**

Auch das Zytokin **IL-12** konnte in den von uns analysierten Proben der STIC Zellkulturen nicht nachgewiesen werden (Tabelle 6). IL-12 ist neben weiteren Zytokinen, wie IL-1, TNF- $\alpha$  und IL-6 ein von klassisch aktivierten Makrophagen gebildeter Mediator. IL-12 aktiviert NK-Zellen und führt zu einer Differenzierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Richtung T<sub>H</sub>1 Zellen [1, 3]. Die Abwesenheit von IL-12 in unseren Kulturen bestätigt unsere Hypothese, dass es sich bei den STIC Zellen um Makrophagen handelt, die sich nicht in einem klassischen Aktivierungszustand befinden. Daneben zeigen die von Mosser et al. beschriebenen regulatorischen Makrophagen eine im Gegensatz zu klassisch aktivierten eine stark reduzierte IL-12 Produktion, allerdings eine deutliche Produktion von IL-10 [3, 59]. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass es sich bei den STIC Makrophagen eher um einen regulatorischen Typen handelt, als um klassisch aktivierte Makrophagen. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Brem-Exner et al. [13].

### 5.4.3 IL-2

Das Glykoprotein Interleukin-2 (**IL-2**) ist neben TGF- $\beta$  für die Bildung von  $iT_{reg}$  Zellen aus naiven  $CD4^+$  T-Zellen in den peripheren lymphatischen Organen verantwortlich [34]. Da die STIC Zellen unter anderem durch ihre Fähigkeit charakterisiert sind, in Zellkulturen zu einer Anreicherung von  $T_{reg}$  Zellen zu führen, ist der positive Nachweis von IL-2 in unseren Kulturen (Abbildung 10) von besonderem Interesse. IL-2 hat eine komplexe Stellung in der Regulation des Immunsystems und vermittelt neben proinflammatorischen auch regulatorische Wirkungen [32]. Gebildet wird es neben aktivierten  $CD4^+$  T-Zellen und  $CD8^+$  T-Zellen auch von Dendritischen Zellen nach Stimulation mit bakteriellen Antigenen [32]. Entsprechende IL-2-Rezeptoren finden sich unter anderem auf B- und T-Zellen, NK-Zellen, neutrophilen Granulozyten und mononukleären Phagozyten. Drei transmembrane Ketten ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ) bilden den IL-2-Rezeptor. Die  $\alpha$ -Kette (CD 25) wird verstärkt von aktivierten T-Zellen ausgebildet, während die  $\beta$ -, und  $\gamma$ -Ketten konstitutiv exprimiert werden [2]. Während die  $\alpha$ -Kette nur eine sehr kleine intrazelluläre Domäne hat, sind die  $\beta$ - und die  $\gamma$ -Kette für die intrazelluläre Signaltransduktion verantwortlich [32]. Um eine hoch affine IL-2 Bindung zu ermöglichen, sind alle drei Ketten erforderlich. Die  $\alpha$ - sowie die  $\beta$ -Kette alleine können IL-2 mit geringer Affinität binden, während die  $\gamma$ -Kette, die auch Bestandteil anderer Zytokinrezeptoren (IL-4, IL-7, IL-9, IL-15) ist und deswegen auch  $\gamma_c$ -Kette genannt wird, alleine keine IL-2 Bindung ermöglicht [2, 32]. IL-2 wirkt vor allem als auto- und parakriner Wachstumsfaktor für reife T-Lymphozyten. So kommt es zu einer Reduktion der Zelltodrate, zu gesteigerter Proliferation und klonaler Expansion und zu erhöhter Zytokinproduktion dieser Zellen [32].

Im Gegensatz zu diesen proinflammatorischen Effekten zeigt IL-2 jedoch auch verschiedene regulatorische Wirkungen. So ist IL-2 zum Beispiel für die Induktion des activation-induced cell death (AICD) mit verantwortlich. Dabei kommt es durch wiederholte T-Zell Aktivierung in Anwesenheit von IL-2 zur Hochregulation von Fas (CD 95) und Fas Ligand (CD 95L) und damit zur Induktion von Apoptose [2, 32]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass IL-2 bei der intrathymischen Entwicklung von  $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+ nT_{reg}$  Zellen sowie bei der Induktion von  $iT_{reg}$  Zellen in der Peripherie maßgeblich beteiligt ist [2, 32], was möglicherweise für die Anreicherung von  $T_{reg}$  Zellen in den STIC Zellkulturen mit von Bedeutung ist. Verantwortlich für die Induktion der  $iT_{reg}$  Zellen ist wahrscheinlich der Transkriptionsfaktor STAT-5, der an

der  $\beta$ -Kette des aktivierten IL-2 Rezeptors dimerisiert und in den Zellkern transloziert. Dort führt er unter anderem zur Transkription des Foxp3 Gens, welches für die Funktion von  $T_{reg}$  Zellen essentiell ist [32]. Im Gegensatz zu ihrer Induktion spielt für die Wirkung der  $T_{reg}$  Zellen, also die Suppression von Effektor T-Zellen, IL-2 aber wohl keine wesentliche Rolle [32]. Die Bedeutung von IL-2 für die Entwicklung von  $T_{reg}$  Zellen wurde auch durch verschiedene *in vivo* Experimente untersucht. So zeigten IL-2 defiziente Mäuse erstaunlicherweise keinen Rückgang der absoluten  $T_{reg}$  Zellzahlen. Diese Beobachtung erklärt man sich durch die Redundanz der mit dem IL-2 Rezeptor in Beziehung stehenden Zytokinen (IL-4, IL-7, IL-9, IL-15), die wie IL-2 alle die  $\gamma_c$ -Kette in ihrem Rezeptorkomplex aufweisen. Allerdings kam es bei den IL-2 defizienten Versuchstieren zur Entwicklung von diversen Autoimmunerkrankungen [32], was eventuell auf eine gestörte Funktionalität der  $T_{reg}$  Zellen hindeuten könnte. Mäuse, denen die  $\beta$ -Kette des IL-2 Rezeptors fehlt, zeigten dagegen einen deutlich stärkeren Mangel an  $nT_{reg}$  Zellen und vor allem an  $iT_{reg}$  Zellen. Konnte aber die  $\gamma_c$ -Kette, die auch bei den Rezeptoren für IL-4, IL-7, IL-9 und IL-15 beteiligt ist, nicht ausgebildet werden, zeigten Versuchstiere  $nT_{reg}$  und  $iT_{reg}$  Zellenzahlen unter der Nachweisgrenze [32].

Tiere, die weder Foxp3 noch die IL-2 Rezeptor  $\alpha$ -Kette ausbilden konnten, zeigten erstaunlicherweise weniger gravierende Symptome als Tiere, die nur Foxp3 defizient waren. Für diese Ergebnisse sind wohl die bereits erwähnten proinflammatorischen Wirkungen von IL-2 verantwortlich, die in den Versuchstieren ja ebenfalls wegfallen, während die Induktion von  $T_{reg}$  Zellen schon durch den Mangel an Foxp3 unmöglich ist [32]. IL-2 ist also gerade durch seine so gegensätzlichen Wirkungen ein interessantes Zytokin, dessen weitere Erforschung zu einem besseren Verständnis von immunologischen Regulationsvorgängen beitragen könnte [32].

Unsere Ergebnisse zeigen deutlich, dass das Zytokin IL-2 nur in Anwesenheit der STIC Zellen in den Kulturen nachzuweisen ist. So zeigen die Konzentrationsmessungen an den Tagen d7 und d8 nur in den Kulturen „splenos + STICs“ und „STICs alone“ relevante IL-2 Spiegel (Abbildung 10). Betrachten wir den Konzentrationsverlauf von IL-2 während der ersten Phase der STIC Zellkultur, also vom Tag d1 bis zum Tag d5, so lassen sich weitere Aussagen treffen. Zunächst kann festgestellt werden, dass es vom Tag d1 zu den Tagen d3 bzw. d5 zu einem statistisch signifikanten Anstieg der IL-2 Konzentrationen in Kulturen der Balb/c Zellen kommt (Abbildung 16). Dieser Anstieg wäre mit einer zunehmenden Bildung

von STIC Zellen in der Kultur zu erklären, welche ja eine potentielle Quelle des IL-2 darstellen.

Bei der Interpretation der Abbildung 15a stellt man weiterhin fest, dass die Werte für die BALB/c Zellen am Tag d1, also nach 24h Kultur sehr niedrig liegen. Die nächste Messung der O-Schalen am Tag d3 geschieht 48h nach dem letzten Mediumwechsel. Obwohl damit die Inkubationszeit nur doppelt so hoch liegt wie bei der Messung am Tag d1, zeigt sich ein etwa vier-fach erhöhter IL-2 Wert (Abbildung 15a). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Zellen in der Kultur nach ihrer Präparation am Tag d0 erst nach einer gewissen Zeit ihre normale metabolische Tätigkeit wieder aufnehmen. Eine andere Hypothese ist, dass die Erzeugung der STIC Zellen in der Kultur – welche, wie erwähnt, die mögliche Quelle des IL-2 darstellen – eine gewisse Zeit in Anspruch nimmt. Dafür spricht auch, dass die IL-2 Werte am Tag d3 von O- und von Ü-Schalen ähnlich hoch sind.

Durch unsere Versuchsanordnung kann jedoch nicht sicher aufgezeigt werden, ob das nachgewiesene IL-2 von den STIC Zellen stammt. Wie oben beschrieben, ist das Zytokin IL-2 für die Bildung von iT<sub>reg</sub> Zellen von besonderer Bedeutung [34]. Diese Tatsache führt zu der Annahme, dass das in der Kultur nachweisbare IL-2 von den STIC Zellen gebildet wird und möglicherweise für die beobachtete Anreicherung an regulatorischen T-Zellen mit verantwortlich ist. Andererseits wäre denkbar, dass IL-2 von einer anderen Zellpopulation, wie etwa den regulatorischen T-Zellen selbst gebildet wird. Gegen diese Überlegung spricht jedoch, dass IL-2 nicht zu den klassischen, in der Literatur beschriebenen Effektorzytokinen der T<sub>reg</sub> Zellen gezählt wird [29, 34]. Dies lässt die Hypothese zu, dass es sich bei den STIC Zellen tatsächlich um die Quelle des im Kulturmedium nachweisbaren IL-2 handelt. Diese Hypothese zu überprüfen, muss Gegenstand weiterer Untersuchungen, zum Beispiel mit IL-2 defizienten Zellen sein.

#### 5.4.4 IL-10

Die Messungen der **IL-10** Konzentrationen in der Zellkultur an den Tagen d7 und d8 zeigen analog zu den Ergebnissen bei IL-2, dass IL-10 praktisch nur in Anwesenheit der STIC Zellen gebildet wird (Abbildung 11).

Interleukin-10 (IL-10) ist ein etwa 17 – 21 kD großes Peptid [2] und eines der wichtigsten Zytokine mit immunsuppressiven und antiinflammatorischen

Eigenschaften [37]. *In vivo* wird es vor allem von T-Lymphozyten, insbesondere von T<sub>reg</sub> Zellen, aber auch von B-Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen gebildet. Der IL-10 Rezeptor ist unter anderem an Makrophagen, Lymphozyten, NK-Zellen und Mastzellen zu finden [2].

Die Wirkungen von IL-10 auf seine Zielzellen sind vielfältig und im Detail nicht immer vollständig bekannt. So werden durch Aktivierung des IL-10 Rezeptors an T-Lymphozyten second messenger aktiviert, die in die Signaltransduktionskaskade des CD28 hemmend eingreifen. Damit wird die costimulatorische Wirkung des CD28 bei der Interaktion der T-Zellen mit APCs reduziert und dadurch die T-Zell-Aktivierung gehemmt. Neben dieser Wirkung auf die T-Zellen führt IL-10 an den APCs zu einer reduzierten Expression von MHC-II und CD80/86 und damit ebenfalls zu einer reduzierten T-Zell-Aktivierung [2].

Weitere immunsuppressive Wirkungen des IL-10 kommen durch eine Hemmung der Bildung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$  und - $\beta$  in aktivierten Makrophagen zustande. Daneben induziert IL-10 in diesen Zellen die Bildung des IL-1-Rezeptor-Antagonisten und blockiert somit zusätzlich die proinflammatorische IL-1 Wirkung. Außerdem wird durch IL-10 die zytotoxische Wirkung aktivierter Makrophagen reduziert [2]. Weiterhin kann IL-10 die Differenzierung von Gewebemakrophagen zu klassisch aktivierten Makrophagen verhindern [37, 60]. Die Bedeutung des Zytokins IL-10 in der Immunregulation zeigt sich auch daran, dass IL-10 defiziente Mäuse spontan inflammatorische Darmerkrankungen entwickeln [61].

Für unsere Untersuchungen könnten vor allem folgende Wirkungen des IL-10 von Bedeutung sein. Effektor T-Zellen, die in Gegenwart des für sie spezifischen Antigens mit hohen Konzentrationen von IL-10 und TGF- $\beta$  in Kontakt kommen, können in einen Zustand der funktionellen Anergie übergehen. Ebenso kann ein IL-10 Kontakt von APCs eine Anergie von T-Zellen induzieren. Diese wird dabei durch die fehlende costimulatorische Wirkung von CD80/86 bei der Antigenpräsentation bewirkt [2].

Bei einer regelrecht ablaufenden Immunreaktion ist die Quelle des IL-10 und damit vor allem der Zeitpunkt seiner Freisetzung von entscheidender Bedeutung. So können zu früh ansteigende IL-10 Konzentrationen bei hoch virulenten Pathogenen zur Ausbreitung der Infektion führen, während ein verspäteter Anstieg bei niedrig pathogenen Erregern zu unnötig starker Gewebeschädigung führt [37].

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass IL-10 das Ausmaß der Immunantwort bei vielen Infektionen hemmt und dadurch eine übermäßige immunologische Gewebeschädigung verhindert [2].

In den von uns durchgeführten Zellkulturen sind relevante IL-10 Werte nur in Anwesenheit der STIC Zellen nachzuweisen. So zeigen die Messungen an den Tagen d7 und d8 (Abbildung 11), dass in den Kulturen „splenos + STICs“ sowie „STICs alone“ deutliche IL-10 Spiegel – bei den Balb/c Zellen stets über 100 pg/ml – vorhanden sind. Dagegen liegen die Messwerte der Kulturen „splenos“ sowie „splenos + monos“ bei beiden untersuchten Mausstämmen unter 0,9 pg/ml (Abbildung 11).

Neben den Konzentrationsmessungen an den Kulturtagen d7 und d8 wurden auch Zytokinbestimmungen in der ersten Phase unserer Kulturen durchgeführt. Abbildung 16 zeigt, dass es bei den Balb/c Zellen vom Tag d3 zum Tag d5 zu einem Anstieg der IL-10 Konzentration kommt, der allerdings statistisch nicht signifikant ist. Bei den C57BL/6 Zellen ist keine eindeutige Tendenz des Konzentrationsverlaufes abzulesen. Man könnte den Anstieg der IL-10 Werte bei den Balb/c Zellen zum einen mit einer zunehmenden Bildung von STIC Zellen in der Kultur erklären, welche eine mögliche Quelle des IL-10 darstellen. Zum anderen wäre denkbar, dass die zunehmend in der Kultur angereicherten regulatorischen T-Zellen für die IL-10 Sekretion verantwortlich sind.

Die in Abbildung 15b dargestellten Konzentrationswerte zeigen auf, dass IL-10 während der gesamten ersten Phase der STIC Zellkultur von beiden untersuchten Mausstämmen gebildet wird. Auffällig ist der starke Anstieg am Kulturtag d5 bei den O und Ü Platten der Balb/c Zellen.

Wie bereits oben beschrieben, ist bekannt, dass IL-10 ein wichtiges Effektorzytokin von regulatorischen T-Zellen ist [29]. Eine Erklärung für die hohen IL-10 Spiegel in unseren Zellkulturen wäre also die Produktion des Zytokins durch die regulatorischen T-Zellen, die wie oben beschrieben, in den STIC Zellkulturen angereichert werden. Aus diesen Daten könnte man schließen, dass es in den Kulturen nicht nur zu einer Anreicherung von CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Zellen kommt (Abbildung 8), sondern dass diese auch ein Zytokinprofil von kompetenten regulatorischen T-Zellen zeigen und somit in der Lage sind, auch tatsächlich immunsuppressive Wirkungen auszuführen. Andererseits wäre aber auch denkbar, dass das IL-10 von den STIC Zellen gebildet wird und dass diese ohne Beteiligung von T<sub>reg</sub> Zellen direkt immunsuppressive

Wirkungen auf Effektor Lymphozyten ausüben. So konnte etwa bei den von Mosser et al. beschriebenen regulatorischen Makrophagen eine direkte IL-10 Bildung gezeigt werden [3]. Es wäre also durchaus vorstellbar, dass die STIC Zellen für die Bildung des in der Kultur nachweisbaren IL-10 verantwortlich sind oder zumindest mit dazu beitragen. Allerdings können unsere Ergebnisse nicht sicher aufzeigen, ob das Zytokin in den Kulturen tatsächlich von den STIC Zellen direkt oder von anderen Zellpopulationen wie den T<sub>reg</sub> Zellen gebildet wird.

Da es in der Literatur Evidenz gibt, dass IL-10 auch für die Bildung von regulatorischen T-Zellen eine Rolle spielt [45, 46], wollten wir überprüfen, ob sich eine Unfähigkeit der STIC Zellen, das Zytokin IL-10 zu bilden, auf die Anteile der regulatorischen T-Zellen in der Zellkultur auswirkt. Aus diesem Grund haben wir die STIC Zellkultur mit Zellen aus IL-10 knockout Mäusen durchgeführt. Unsere Messungen zeigen, dass in diesen Kulturen keine nachweisbaren IL-10 Spiegel vorhanden sind (Abbildung 17). Trotzdem kommt es in den Kulturen zu einer Anreicherung an regulatorischen T-Zellen, die mit jener von Wildtyp Kulturen vergleichbar ist (Abbildung 19). Daraus können wir schließen, dass IL-10 für die beobachtete Anreicherung an regulatorischen T-Zellen nicht essentiell ist. Auch hat die Zellzählung am Kulturtag d7 (Abbildung 18) ergeben, dass es bei Kulturen aus Wildtyp Zellen und bei solchen aus IL-10 knockout Zellen zu einem vergleichbaren Abfall der Lymphozyten Zellzahlen kommt. Aus dem bisher Gesagten können wir schlussfolgern, dass in unseren Kulturen das immunsuppressive Zytokin IL-10 weder für die Anreicherung der regulatorischen T-Zellen noch für den beobachteten Rückgang der Zahl an Effektorlymphozyten verantwortlich ist. Dennoch ist möglich, dass *in vivo* die Wirkung des Zytokins IL-10 für die beobachteten immunmodulatorischen und immunsuppressiven Effekte der STIC Zellen [11-13] von Bedeutung ist.

#### 5.4.5 TGF- $\beta$

Die Ergebnisse der Konzentrationsbestimmungen von **TGF- $\beta$**  sind nicht so deutlich wie diejenigen für IL-2 oder IL-10. Zwar zeigen sich auch bei TGF- $\beta$  die höchsten Werte in Anwesenheit der STIC Zellen (Abbildung 12), dennoch lassen sich auch in den Kulturen von Lymphozyten und von Lymphozyten und Monozyten deutliche TGF- $\beta$  Spiegel nachweisen. Diese Tatsache hat uns zunächst dazu geführt, unser

Vorgehen beim Durchführen der Zellkultur und vor allem bei der Messung der Zytokinkonzentrationen kritisch zu hinterfragen. Bedingt durch die Tatsache, dass wir in den Überständen der STIC Zellkulturen verschiedene Zytokine bestimmt haben, wurden die Proben an verschiedenen Tagen aufgetaut, um die ELISA Assays durchzuführen. Die Proben wurden daraufhin wieder eingefroren. Die Proben, mit denen die TGF- $\beta$  Bestimmungen durchgeführt wurden, hatten somit mehrere Auftau- und Gefrierungsvorgänge, sowie eine mehrwöchige Lagerungszeit hinter sich. Um festzustellen, ob es dadurch zu einer Verfälschung der Ergebnisse kommt, haben wir erneut STIC Zellkulturen durchgeführt, die entsprechenden Überstände eingefroren und die TGF- $\beta$  Konzentrationen in den Proben nach nur einem Auftauvorgang bestimmt. Wir konnten aufzeigen, dass die gemessenen Ergebnisse (Abbildung 13) denen unserer ersten Messreihe sehr ähnlich waren. Eine Beeinflussung unserer Daten durch Präparation und Lagerung der Proben konnten wir somit weitgehend ausschließen.

Transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) wurde ursprünglich als ein von Tumorzellen gebildeter Wachstumsfaktor beschrieben [2]. Im Zentrum heutiger Forschungen steht vor allem die negative immunregulatorische Wirkung von TGF- $\beta$ , die unter anderem durch Proliferationshemmung verschiedener Leukozyten entsteht [2].

Die drei bekannten Formen von TGF- $\beta$  ( $\beta$ 1- $\beta$ 3) gehören zu einer Familie von mehr als 30 in der Evolution gut konservierten Polypeptiden. Diese TGF- $\beta$ -Familie umfasst daneben auch die Aktivine und die Bone morphogenic proteins (BMP), welche beide wichtige Funktionen in der Organogenese wahrnehmen [2, 62].

TGF- $\beta$ 1 ist das für das Immunsystem wichtigste Mitglied der TGF- $\beta$ -Familie [2]. TGF- $\beta$  wird als Präpropeptid synthetisiert, welches posttranslationell einer komplexen proteolytischen Reifung unterworfen ist und in seiner reifen Form als Homodimer vorliegt [42]. Besonders wichtig ist dabei die Abspaltung des C-terminal gelegenen Propeptids. Dieses dimerisiert ebenfalls, lagert sich nichtkovalent an das reife TGF- $\beta$  an und bildet dadurch das latency-associated peptide (LAP) [41]. TGF- $\beta$  wird also durch die Bindung an LAP in einer inaktiven Form von der Zelle freigesetzt (latentes TGF- $\beta$ ), in der es nicht an seinen Rezeptor binden kann und somit auch keinen biologischen Effekt zeigt [41].

Durch verschiedene Mechanismen kann latentes TGF- $\beta$  im Extrazellularraum in seine aktive Form überführt werden, welche nur eine Halbwertszeit von etwa 3 Minuten hat. So kann zum Beispiel das LAP durch verschiedene Proteasen

abgespalten werden oder die Struktur von LAP wird so verändert, dass das aktive Zentrum von TGF- $\beta$  freigelegt wird [42]. Außerdem können extreme pH Werte latentes TGF- $\beta$  aktivieren [42], womit bei den von uns durchgeführten ELISA Assays der Nachweis des Zytokins ermöglicht wurde.

Von den 6 bis jetzt identifizierten Rezeptoren für TGF- $\beta$  sind die Typen I bis III am genauesten untersucht [42]. Der TGF- $\beta$  Rezeptor Typ III (T $\beta$  RIII) ist nicht in der Lage, nach Ligandenbindung ein Signal nach intrazellulär zu transduzieren. Er ermöglicht jedoch eine lokale Konzentration von TGF- $\beta$  und dadurch eine verstärkte Aktivierung der Typ I und II Rezeptoren [2], welche für die Signaltransduktion verantwortlich sind [63].

Die biologische Wirkung von TGF- $\beta$  ist von der Zielzelle und deren Differenzierungsgrad abhängig. Bei hämatopoetischen und lymphoiden Zellen hemmt TGF- $\beta$  die Proliferation und Differenzierung [2]. Bei Makrophagen reduziert TGF- $\beta$  die Bildung von proinflammatorischen Zytokinen und Sauerstoffradikalen, sowie die Hochregulation von MHC Klasse-II Molekülen. Durch diese Mechanismen hemmt TGF- $\beta$  die Immunantwort und die Vorgänge bei Entzündungen [2].

Daneben spielt TGF- $\beta$  auch bei der Aufrechterhaltung der peripheren T-Zell Toleranz eine wichtige Rolle. So ist TGF- $\beta$  für die Bildung von T<sub>reg</sub> Zellen von entscheidender Bedeutung [34]. Außerdem kann von APCs oder T<sub>reg</sub> Zellen gebildetes TGF- $\beta$  hemmend auf autoreaktive Effektor T-Zellen wirken. Zum Beispiel erkennen Phosphatidylserin Rezeptoren bei der Apoptose freigesetzte Phosphatidylserine und aktivieren bei der APC die Freisetzung von TGF- $\beta$  [2]. Werden nun Reste einer apoptotischen Zelle von einer APC phagozytiert, führt dies dazu, dass Selbst-Peptide über das MHC-System der APC präsentiert werden. Autoreaktive T-Zellen, welche die so präsentierten Selbst-Antigene erkennen, werden nun über zwei Mechanismen gehemmt. Zum einen fehlen bei der APC die costimulatorischen Moleküle CD80/86 und zum anderen wirkt das freigesetzte TGF- $\beta$  direkt hemmend auf die T-Zelle [2].

Aufgrund der sehr kurzen Halbwertszeit des aktiven TGF- $\beta$  ist unter Berücksichtigung der Zeit von der Probenentnahme bis zur Durchführung des ELISAs nicht zu erwarten, dass in den von uns analysierten Proben noch wesentliche Mengen von aktiven TGF- $\beta$  enthalten sind [42]. Deswegen soll in den Proben die Konzentration des latenten TGF bestimmt werden. Dazu wird in den von uns durchgeführten ELISA Assays latentes TGF- $\beta$  durch Veränderung des pH Wertes in seine aktive Form überführt, welche dann gemessen wird. Die

angegebenen Werte sind also als Konzentrationen des latenten, experimentell durch pH Änderung aktivierten TGF- $\beta$  zu interpretieren.

TGF- $\beta$  wird während der gesamten ersten Phase unserer STIC Zellkultur in relativ konstanten, hohen Konzentrationen gebildet (Abbildung 15c). Nur bei der Betrachtung der O Platen bei den Balb/c Zellen (Abbildung 16a) lässt sich eine leichte, statistisch nicht signifikante Steigerung der TGF- $\beta$  Spiegel im Zeitverlauf erkennen. Aus diesen Daten lässt sich die Hypothese ableiten, dass die monozytären STIC Zellen schon sehr früh mit der Produktion des Zytokins TGF- $\beta$  beginnen. Dies wird vor allem deutlich, wenn man zum Vergleich den Verlauf der IL-2 Konzentration heranzieht (Abbildung 15a). Am Tag d1 ist, wie oben beschrieben, der IL-2 Spiegel deutlich niedriger als am Kulturtag d3. Somit kann vermutet werden, dass die sich in der Kultur differenzierenden STIC Zellen ihre TGF- $\beta$  Produktion bereits steigern, bevor es zu einer Steigerung anderer Zytokine, wie etwa von IL-2 kommt. Es kann allerdings nicht sicher ausgeschlossen werden, dass zumindest ein Teil der TGF- $\beta$  Produktion von Zellpopulationen gebildet wird, welche die STIC Kulturen kontaminieren.

Wie bereits erwähnt, zeigen unsere Messungen in der zweiten Phase der Zellkultur, dass an den Tagen d7 und d8 die höchsten TGF- $\beta$  Spiegel in Anwesenheit der STIC Zellen erreicht werden (Abbildung 12).

Aufgrund der obigen Ausführungen ist denkbar, dass die Wirkung des Zytokins TGF- $\beta$  für die Anreicherung der T<sub>reg</sub> Zellen in unseren Zellkulturen eine wichtige Rolle spielt. Um diese genauer zu untersuchen, sind weitere Experimente, wie etwa die Verwendung von TGF- $\beta$  oder TGF- $\beta$  Rezeptor negativen Zellen aus entsprechenden Mausstämmen erforderlich.

#### **5.4.6 M-CSF**

Der Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (M-CSF) gehört wie der Granulozyten-Makrophagen- und der Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF und G-CSF) zur Gruppe der Kolonie-stimulierenden Faktoren (CFS) [64]. M-CSF kommt in verschiedenen Isoformen vor. Während die Glykoprotein- und die Proteoglykan-Isoformen im Blutkreislauf zirkulieren, wirkt die Zelloberflächengebundene-Isoform lokal auf Zielzellen [64]. Der M-CSF Rezeptor

bildet bei Substratbindung Homodimere aus und gehört zu der Gruppe der Tyrosinkinase-Rezeptoren [64].

M-CSF fördert das Überleben von Monozyten und Makrophagen und steigert ihre Reaktionsbereitschaft gegenüber proinflammatorischen Stimuli, wie etwa dem Lipopolysaccharid (LPS). Außerdem stimuliert M-CSF die Differenzierung von unreifen monozytären Vorläuferzellen im Knochenmark und führt zu einer Freisetzung von Monozyten und anderen myeloiden Zellpopulationen in die Blutbahn [2]. M-CSF wird *in vivo* von verschiedenen Zellen, wie Fibroblasten, Endothelzellen oder Knochenmarkstromazellen gebildet [2]. Bei Infektionen oder verschiedenen Autoimmunerkrankungen kommt es zu einem Anstieg aller CSF und damit zu einer verstärkten Rekrutierung und Aktivierung von monozytären Zellen [64].

Es wird angenommen, dass viele gewebeständige Makrophagenpopulationen normalerweise unter dem Einfluss von M-CSF stehen, welches vom umgebenden Gewebe gebildet wird. Dadurch werden die Makrophagen in einem M2 ähnlichen Zustand gehalten, in dem sie nur eingeschränkte Fähigkeiten zur Produktion proinflammatorischer Zytokine haben [64]. Bei Infektionen kommt es vor allem zu einem Anstieg der GM-CSF Konzentration und zur Freisetzung weiterer proinflammatorischer Stimuli wie IFN- $\gamma$  und LPS. Diese Mediatoren überwiegen über die M-CSF Wirkung und führen bei den monozytären Zellen zu einer M1 ähnlichen Polarisation und damit zur verstärkten Produktion proinflammatorischer Zytokine. Interessanterweise können steigende M-CSF Spiegel einer so eingeleiteten Entzündungsreaktion entgegenwirken, indem sie die Polarisation der Makrophagen wieder in Richtung M2 verschieben [64].

In unseren Experimenten wurde M-CSF neben IFN- $\gamma$  zur Erzeugung der STIC Zellen verwendet (Abbildung 6). Konzentrationsmessungen von M-CSF in den Zellkulturen wurden allerdings nicht durchgeführt. Die Ergebnisse des RNA Microarray zeigen jedoch bei den STIC Zellen im Vergleich zu den IFN- $\gamma$  stimulierten Makrophagen eine Steigerung der M-CSF Expression um den Faktor 3 (Tabelle 7). Ob diese Steigerung der Genexpression auch auf Proteinebene nachweisbar ist, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass M-CSF zum Teil gegensätzliche Wirkungen aufweist. Auf der einen Seite führt es zu einer verstärkten Freisetzung von Makrophagen aus dem Myelon und einer verstärkten Aktivierung von monozytären Zellen. Auf der anderen Seite gibt es vielfältige Hinweise, dass eine

weitere physiologische Funktion des M-CSF die Abschirmung der Makrophagen von zu starken proinflammatorischen Signalen darstellt [64]. Sicherlich sind weitere Untersuchungen notwendig, um das komplexe Zusammenspiel der Koloniestimulierenden Faktoren bei der Regulation der monozytären Funktionen besser zu verstehen und eventuell therapeutisch eingreifen zu können.

#### **5.4.7 Interferon- $\gamma$**

Neben M-CSF wurde auch Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) zur Erzeugung der STIC Zellen in unseren Kulturen verwendet (Abbildung 6). IFN- $\gamma$  ist der einzige Vertreter der Typ II Interferone, die strukturell nicht mit den Typ I Interferonen verwandt sind [65]. Das homodimere Zytokin [66] besitzt antivirale und immunregulatorische Eigenschaften und wird hauptsächlich von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Lymphozyten, von NK-Zellen und auch von APCs gebildet [2]. Während am Anfang einer Entzündungsreaktion das IFN- $\gamma$  im Wesentlichen von APCs gebildet wird, die sich damit in auto- und parakriner Weise selbst aktivieren, werden die T-Lymphozyten im späteren Verlauf der adaptiven Immunantwort zur Hauptquelle des Zytokins [65].

Die Wirkungen von IFN- $\gamma$  auf seine Zielzellen sind vielfältig. Im Vordergrund steht sicherlich dessen stimulierende Wirkung auf Makrophagen [2], was es auch zu seinem früheren Namen „Makrophagen aktivierender Faktor“ brachte [65]. So wird durch die Wirkung des Zytokins die Expression von MHC Molekülen und costimulatorischen CD80/86 erhöht und somit die Antigenpräsentation und T-Zell Aktivierung verbessert. Parallel dazu wird die Produktion proinflammatorischer Zytokine gesteigert und die Makrophagen werden zu einer verstärkten Antwort auf bakterielle Produkte wie LPS angeregt [2]. Der „oxidative burst“ wird durch IFN- $\gamma$  mehr als 10<sup>5</sup> mal stärker aktiviert als durch andere Makrophagen-aktivierende Zytokine wie TNF $\alpha$  oder Typ I Interferone [67]. Unter anderem deswegen ist die IFN- $\gamma$  Wirkung vor allem für die effektive Zerstörung von intrazellulären Erregern verantwortlich [67].

Daneben beeinflusst IFN- $\gamma$  auch viele andere Zellen. So aktiviert es neutrophile Granulozyten und NK-Zellen und induziert bei Endothelzellen die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen. Das Zytokin fördert die Produktion von Antikörpern und führt zu einer Verschiebung der Polarisation peripherer T-Zellen von

T<sub>H2</sub> zu T<sub>H1</sub> [2]. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass IFN- $\gamma$  die Ausbildung einer vor allem von Makrophagen gekennzeichneten Entzündungsreaktion fördert [2]. Um zu untersuchen, ob die Zellen in der STIC Zellkultur selbst IFN- $\gamma$  produzieren, haben wir Proben der Kulturen vor dem Kulturtag d4 auf IFN- $\gamma$  untersucht. Am Tag d4 wurde IFN- $\gamma$  der STIC Zellkultur zugesetzt (Abbildung 14). Weil danach nicht mehr identifiziert werden kann, ob im ELISA nachgewiesenes IFN- $\gamma$  von den in der Kultur vorhandenen Zellen stammt, wurden nur Proben der Zellkultur vor dem Tag d4 auf IFN- $\gamma$  untersucht. Die ELISAs haben ergeben, dass in den Kulturen kein IFN- $\gamma$  nachweisbar ist (Tabelle 6). Deswegen können wir feststellen, dass die STIC Zellen bis zum Kulturtag d4 kein IFN- $\gamma$  produzieren. Um zu überprüfen, ob nach dem Tag d4 eine IFN- $\gamma$  Produktion stattfindet, sind weitere Experimente erforderlich.

## 5.5 Microarray

Die Durchführung und Auswertung des RNA Microarrays hat uns die Untersuchung von weitaus mehr potentiell immunologisch relevanten Proteinen ermöglicht, als dies bei Analysen auf Proteinebene denkbar gewesen wäre. Aus den umfangreichen, durch den Microarray generierten Daten haben wir zunächst eine Zusammenstellung wichtiger Zytokine angefertigt (Tabelle 7).

Die Tabelle zeigt Genexpressionswerte von unbehandelten, ruhenden Makrophagen, von klassisch mit IFN- $\gamma$  aktivierten Makrophagen und von adhärennten STIC Makrophagen. Mögliche Steigerungen der Genexpression bei den STIC Zellen können also im Bezug zu den unbehandelten, oder zu den IFN- $\gamma$  aktivierten Makrophagen gesehen werden. Wir halten dabei die Steigerung im Vergleich zu den klassisch aktivierten Makrophagen für den bedeutenderen Faktor.

Deswegen sind diejenigen Zytokine, deren Genexpression bei den STIC Zellen im Vergleich zu klassisch durch IFN- $\gamma$  aktivierten Makrophagen um mehr als den Faktor 2 hochreguliert sind, in der Tabelle besonders gekennzeichnet. Damit soll aufgezeigt werden, wie sich das Zytokinprofil der STIC Zellen von dem von klassisch aktivierten Makrophagen unterscheidet.

Es fällt sofort auf, dass Steigerungen der Genexpression im Microarray nicht zwangsläufig mit dem Nachweis des entsprechenden Zytokins in der STIC Zellkultur einhergehen müssen. So ist die Genexpression der Interferone  $\alpha$ ,  $\beta$  und vor allem  $\gamma$  bei den STIC Zellen deutlich gesteigert. Dennoch zeigen unsere ELISA Assays, dass

auf Proteinebene keine Expression von IFN- $\gamma$  nachzuweisen ist. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass es vielfältige posttranskriptionelle Modifikationen gibt, bis die m-RNA tatsächlich in ein Protein translatiert wird. Weiterhin wird dadurch aufgezeigt, dass im Microarray gefundene Steigerungen in der Genexpression erst auf Proteinebene verifiziert werden müssen, bevor dem entsprechenden Protein eine Bedeutung bei der Wirkung der STIC Zellen zugeschrieben werden kann.

Neben den bereits erwähnten Interferonen zeigt die Tabelle 7, dass es zu einer Steigerung der Expressionen der Kolonie stimulierenden Faktoren M-CSF und GM-CSF kommt. Außerdem sind die Expressionen der Zytokine IL-10, IL-16 und IL-18 gesteigert. Weiterhin kommt es zur Expressionssteigerung bei einigen Mitgliedern der TNF Familie.

IL-16 ist ein proinflammatorisches Zytokin, das bei vielen Autoimmunerkrankungen wie SLE, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, atopischer Dermatitis und neurodegenerativen Erkrankungen eine Rolle spielt [68, 69]. IL-16 wirkt unter anderem durch eine Hochregulation von CD25 sowie durch eine Proliferationsförderung von Zielzellen, bei denen es sich vor allem um CD4<sup>+</sup> T-Zellen handelt [68].

IL-18 ist ein proinflammatorisches Zytokin, das zur IL-1 Familie gezählt wird. Die IL-18 Wirkung führt bei T<sub>H</sub>1 polarisierten T-Zellen zu verstärkter Proliferation und IFN- $\gamma$  Sekretion [70]. Ob die gesteigerte m-RNA Expression der Zytokine IL-16 und IL-18 bei den STIC Zellen auch zu einer Sekretion der Zytokine führt und ob diese zu den STIC Wirkungen beiträgt, müssen weitere Experimente zeigen.

Hochregulierte Genexpressionswerte, bei denen wir nach Literaturrecherchen eine immunologische Relevanz vermuten, sind in Tabelle 10 dargestellt.

### 5.5.1 NGP

Die STIC Zellen zeigen die deutlichste Steigerung in der Bildung der m-RNA für das Protein Neutrophilic Granule Protein (**NGP**). Während der dimensionslose Genexpressionswert bei den unstimulierten und bei den IFN- $\gamma$  stimulierten Makrophagen jeweils bei 0,1 liegt, findet sich bei den STIC Zellen mit 42,3 ein etwa 400-fach gesteigerter Expressionswert (Tabelle 8). Bis heute liegen nur wenige

Arbeiten vor, die Aussagen über die Wirkung von NGP treffen. Es gibt Hinweise, dass es sich dabei um ein von T<sub>H</sub>2 Zellen gebildetes Zytokin handelt [47]. NGP zeigt Homologien zu der Cystatin Superfamilie, welcher immunmodulatorische Wirkungen zugeschrieben werden. Untersuchungen von Xie et al. konnten zeigen, dass NGP vor allem im Zytoplasma der untersuchten humanen Zelllinien (HeLa) vorkommt [47]. Diese Tatsache erschwert einen möglichen Nachweis des Proteins mit Hilfe von ELISAs oder der Durchflusszytometrie. Aus den bisher vorliegenden Informationen ergeben sich aber keine konkreten Hinweise auf eine Bedeutung von NGP bei der Wirkung der STIC Zellen.

### 5.5.2 S100a8 und S100a9

Die Expression der m-RNA der Proteine **S100a8** und **S100a9** ist bei den STIC Zellen ebenfalls stark gesteigert. So liegt der Wert für S100a8 bei den STICs mit 26,5 deutlich höher als bei den unstimulierten Makrophagen mit 0,1 und den IFN- $\gamma$  stimulierten mit 0,6. Während die S100a9 Expression bei den beiden Kontrollgruppen bei 0 liegt, zeigen die STICs auch hier einen hohen Expressionswert von 16,1. Beide Proteine können zum Ca<sup>2+</sup> bindenden Calgranulin dimerisieren und spielen eine Rolle in der Immuntoleranz gegenüber Tumoren [48]. Calgranulin findet sich im Zytoplasma von myeloiden Zellen und kann auch sezerniert werden. Durch seine intrazytoplasmatischen Wirkungen kann Calgranulin die Differenzierung von Dendritischen Zellen und Makrophagen inhibieren [48]. Wird es sezerniert führt es zum Recruitment von Leukozyten in Tumoren oder Entzündungen. Dadurch kommt es zu einer Akkumulation von immunsuppressiven myeloiden Zellen wie Makrophagen, Dendritischen Zellen und myeloiden Vorläuferzellen in Neoplasien [48]. Diese Zellen werden auch als myeloid-derived suppressor cells (MDSC) bezeichnet. Cheng et al. konnten aufzeigen, dass es in Tumoren von S100a9 knockout Mäusen zu keiner Akkumulation der MDSC Zellen kommt. Weiterhin zeigten diese Tumoren im Vergleich zu denen von Wildtyp Tieren eine verstärkte Infiltration von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, sowie eine gesteigerte Nekrose- und Apoptoserate [48]. Die Tatsache, dass die Zytokine IL-10 und M-CSF zu einer Hochregulation der S100a9 Expression führen [48], ist eine mögliche Erklärung für die bei den STICs gemessenen Expressionswerte. Es ist durchaus denkbar, dass die Expression der Proteine S100a8 und S100a9 zur Wirkung der STIC Zellen beiträgt.

So wie sich diese Proteine im Umfeld von Neoplasien immunsuppressiv auswirken, wäre ebenso vorstellbar, dass sie auch bei Autoimmunerkrankungen und bei Transplantaten die beschriebenen suppressiven Wirkungen auf Leukozyten ausüben. Weitere Erkenntnisse könnte ein erfolgreicher Nachweis von S100a8 und S100a9 bei den STIC Zellen auf Proteinebene in künftigen Experimenten bringen.

### 5.5.3 MGL1 und MGL 2

Bei den STIC Zellen kommt es zu einer Steigerung der m-RNA Expression der Oberflächenproteine macrophage galactose N-acetyl-galactosamine specific lectin 1 (**MGL1**, CD301a) und **MGL2** (CD301b). So liegt die Expression von MGL1 bei den STICs mit 0,8 höher als bei den unstimulierten Makrophagen mit 0,1 und den IFN- $\gamma$  stimulierten mit 0. MGL2 zeigt bei den STICs einen Expressionswert von 3,4, während dieser bei den Kontrollgruppen bei 0 beziehungsweise 0,1 liegt (Tabelle 10).

Saba et al. konnten die Rolle des an der Zelloberfläche vor allem von Makrophagen vorkommenden MGL1 Rezeptors aufzeigen [49]. Dieser ist dazu in der Lage, Kohlenhydrat Strukturen auf der Oberfläche von Bakterien zu erkennen und bei den Makrophagen eine verstärkte IL-10 Sekretion zu induzieren. Der verwandte MGL2 Rezeptor unterscheidet sich von MGL1 durch seine Spezifität für andere Kohlehydrat Strukturen [49]. Die von Saba et al. untersuchten MGL1 knockout Mäuse zeigten nach oraler DSS Gabe eine deutlich stärkere Colitis als die Wildtyp Tiere, während die IL-10 Genexpression bei den MGL1 defizienten Tieren um den Faktor 2,6 niedriger lag [49]. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass MGL1 vermittelte IL-10 Sekretion in der intestinalen Mucosa einen wichtigen Beitrag zur Immuntoleranz von kommensalen Darmbakterien leistet und dadurch vor dem Auftreten chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED) schützt [49]. Die Arbeitsgruppe um Saba konnte weiterhin aufzeigen, dass es nach der Etablierung einer experimentellen Colitis zu einer Herunterregulation der MGL1 Expression in den intestinalen Makrophagen kommt und somit ein Mangel an MGL1<sup>+</sup> Makrophagen bei etablierter Colitis besteht [49]. Unter dem Hintergrund dieser Ergebnisse ist die bei den STIC Zellen beobachtete deutliche Hochregulation der Genexpression von MGL1 und MGL2 (Tabelle 10) von besonderem Interesse. Durchflusszytometrische Untersuchungen konnten außerdem aufzeigen, dass MGL1 und MGL2 auch

tatsächlich auf der Zelloberfläche der STIC Zellen ausgebildet werden (Abbildung 20). Auch die von Saba et al. beschriebene IL-10 Bildung kann in unseren STIC Zellkulturen beobachtet werden. Weiterhin zeigen die Ergebnisse von Brem-Exner et al., dass die Verabreichung von STIC Zellen an Versuchstiere, die unter einer CED leiden, zu einem Rückgang der Entzündung führt [13].

Aus dem Gesagten lässt sich die Hypothese ableiten, dass die MGL1 und MGL2 Rezeptoren für die Wirkung der STIC Zellen von Bedeutung sein könnten. So ist denkbar, dass in die intestinale Mucosa und in mesenteriale Lymphknoten einwandernde STIC Zellen [13], vermittelt über die MGL Rezeptoren, zu einer verstärkten IL-10 Produktion führen. Die STIC Zellen könnten also den beschriebenen Mangel an MGL1<sup>+</sup> Makrophagen in der Mucosa kompensieren und somit zur Wiederherstellung der intestinalen Immunhomeostase beitragen.

#### **5.5.4 PD-1, PD-2, PD-L1 und PD-L2**

Die Expressionswerte der programmed cell death 1 (PD-1) und PD-2 Rezeptoren, sowie des Liganden PD-L2 sind der Tabelle 10 zu entnehmen. Die PD-L1 m-RNA wurde im Microarray nicht untersucht. Während der **PD-2** Rezeptor vor allem eine Rolle bei der Embryogenese spielt [71], hat der **PD-1** Rezeptor und seine Liganden **PD-L1** und **PD-L2** hauptsächlich eine Bedeutung bei der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz [50, 72]. So führte eine PD-1 Defizienz bei Versuchstieren zur Ausbildung von Autoimmunkrankheiten. Der PD-1 Rezeptor kommt auf Effektorzellen des Immunsystems wie CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen vor. Während PD-L1 von vielen Zelltypen wie etwa B-Zellen, T-Zellen, Makrophagen, aber auch vielen parenchymatösen Zellen ausgebildet wird, ist die PD-L2 Expression auf aktivierte Makrophagen und Dendritische Zellen beschränkt. Es gibt Hinweise, dass die Expression von PD-L1 in parenchymatösen Organen die Aktivierung von T-Zellen inhibieren kann und so einen wichtigen Beitrag zur Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz leistet. Dagegen ist über die physiologische Funktion von PD-L2 kaum etwas bekannt [50]. Menke et al. konnten jedoch aufzeigen, dass eine PD-L2 Defizienz bei Mäusen zu einer Verschlechterung von Autoimmunerkrankungen der Niere führt. Weitere Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe führten zu der Hypothese, dass von Makrophagen ausgebildetes PD-L2 für die Kontrolle von renalen Entzündungsreaktionen von besonderer Bedeutung ist [50]. Zhang et al. konnten *in*

*vitro* zeigen, dass APCs von PD-L2 knockout Mäusen zu einer stärkeren Aktivierung von Effektor T-Zellen führen als Zellen von Wildtyp Tieren [73]. Diese Arbeitsgruppe hat weiterhin Hinweise für eine wichtige Rolle von PD-L2 bei der Induktion einer T-Zell Toleranz gegenüber oral zugeführten Antigenen gefunden. Die orale Toleranz ist eine klassische Form der peripheren Toleranz [73].

Es ist bekannt, dass eine IFN- $\gamma$  Stimulation bei humanen Monozyten zu einer verstärkten PD-L1 und PD-L2 Expression führt [72]. So haben Brem-Exner et al. bereits aufgezeigt, dass PD-L1 auch von STIC Zellen gebildet wird [13]. Die Expression des entsprechenden Genes war in dem von uns durchgeführten Microarray allerdings nicht erfasst. Wir konnten jedoch zeigen, dass es bei den STIC Zellen im Vergleich zu den anderen untersuchten Makrophagen zu einer starken Erhöhung der Genexpression von PD-1 wie auch seines Liganden PD-L2 kommt (Tabelle 10). Die Tatsache, dass eine PD-L2 Defizienz zu einer Verschlechterung von Autoimmunerkrankungen der Niere führt, ist vor dem Hintergrund der *in vivo* beobachteten immunsuppressiven Wirkungen der STIC Zellen bei nierentransplantierten Menschen besonders interessant [11, 12]. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die Rolle von PD-1 und seiner Liganden PD-L1 und PD-L2 bei der Wirkung der STIC Zellen besser zu verstehen.

### 5.5.5 Granzyme

Unsere Untersuchungen haben bestätigt, dass es in der STIC Zellkultur zu einem Rückgang der Zellzahlen der sich in Kokultur mit den STICs befindenden Lymphozyten kommt (Abbildung 7). In Übereinstimmung mit den Hypothesen von Brem-Exner et al. sehen wir die Ursache für diese Beobachtung in einer direkten zytotoxischen Wirkung der STIC Zellen [13], wobei der genaue Mechanismus bisher nicht aufgedeckt werden konnte. Weiterhin konnten Brem-Exner et al. zeigen, dass ein direkter Zell-Zell Kontakt erforderlich ist, damit es zu einem Absterben der kokultivierten Lymphozyten in den STIC Kulturen kommt [13].

Vor dem Hintergrund dieser Überlegungen ist die Steigerung der Genexpression der **Granzyme** A,B und C bei den STIC Zellen von besonderem Interesse (Tabelle 10). Gondek et al. konnten aufzeigen, dass regulatorische T-Zellen mit Hilfe von Granzym B bei CD25<sup>-</sup> Effektorzellen Apoptose auslösen [51]. So zeigten Zellen von Granzym B defizienten Versuchstieren *in vitro* eine reduzierte immunsuppressive Potenz.

Normalerweise ist für die Granzym abhängige Apoptoseinduktion die Anwesenheit von Perforinen erforderlich, welche den Granzymen die Penetration ins Zytoplasma der Zielzellen ermöglicht [1, 51]. Interessanterweise zeigten die Untersuchungen von Gondek et al. mit Perforin knockout Mäusen, dass die Granzym B abhängige Suppression von Effektorzellen von Perforin unabhängig ist [51]. Die Arbeitsgruppe postuliert also, dass T<sub>reg</sub> Zellen zu einer kontaktvermittelten Granzym B abhängigen, Perforin unabhängigen Suppression von Effektorzellen imstande sind [51].

Darüber hinaus konnten Gondek et al. 2008 aufzeigen, dass die Granzym B Expression von T<sub>reg</sub> Zellen für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz und das Langzeitüberleben von Transplantaten essentiell ist [74]. So führte ein Granzym B Mangel *in vivo* zu einer deutlich verkürzten Transplantat Überlebenszeit, während der Verlust des Apoptose induzierenden Fas Liganden keinen Einfluss auf das Transplantatüberleben hatte [74].

Bei den von uns untersuchten STIC Zellen zeigt Granzym B die stärkste Expressionssteigerung unter den Granzymen (Tabelle 10). Deswegen stellen wir die Hypothese auf, dass bei den STIC Zellen ähnliche Granzym abhängige zytotoxische Mechanismen aktiviert sein könnten wie dies bei T<sub>reg</sub> Zellen bereits beschrieben ist [51, 74].

T<sub>reg</sub> Zellen schützen sich mit Serin Protease Inhibitor 6 (Spi-6) vor einer Granzym induzierten Apoptose [74]. Diese Tatsache wäre eine mögliche Erklärung dafür, dass in unseren STIC Zellkulturen – wie oben beschrieben – vor allem Effektor T-Zellen von den STICs getötet werden, während die regulatorischen T-Zellen überleben und sich somit in den Kulturen anreichern.

Die obigen Ausführungen sind ein weiterer Hinweis dafür, dass die STIC Zellen ihre immunsuppressiven Wirkungen sowohl über die Induktion von T<sub>reg</sub> Zellen als auch direkt ausüben könnten.

### 5.5.6 GITRL

Der glucocorticoid-induced tumor-necrosis-factor receptor (GITR) und sein Ligand **GITRL** stellen einen costimulatorischen Parhway zur T-Zell Aktivierung dar. Neben regulatorischen T-Zellen wird GITR in niedriger Dichte auch von CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> Effektor T-Zellen exprimiert [52]. Da die Aktivierung von GITR sowohl auf T<sub>reg</sub> Zellen als auch auf Effektor T-Zellen wirkt, ist nicht klar, welcher der beiden gegensätzlichen Effekte

überwiegt. Die Untersuchungen zur immunologischen Rolle von GITRL gestalten sich somit als schwierig [52]. Obwohl der Ligand GITRL vor allem von APCs gebildet wird, findet man auf gewöhnlichen APCs nur eine geringe GITRL Expression [52]. Unsere Untersuchungen auf genomischer Ebene zeigen dagegen, dass die m-RNA Transkription von GITRL bei den STIC Zellen gegenüber anderen Makrophagen deutlich erhöht ist. So liegt der Expressionswert bei den STIC Zellen mit 9,0 höher als bei den unstimulierten Makrophagen mit 0,5 und den IFN- $\gamma$  stimulierten mit 0,7 (Tabelle 10). Dennoch ließ sich bei den daraufhin durchgeführten durchflusszytometrischen Untersuchungen das GITRL Protein nicht auf der Zelloberfläche der STIC Zellen nachweisen (Abbildung 20). Diese Beobachtung macht erneut deutlich, dass auf m-RNA Ebene detektierte Veränderungen im Anschluss auf Proteinebene verifiziert werden müssen. Wir können somit postulieren, dass das GITRL Protein für die Wirkungen der STIC Zellen keine Rolle spielt.

### 5.5.7 OX40L

OX40, ein Mitglied der TNF Rezeptor Familie, spielt eine wichtige Rolle als costimulatorischer Rezeptor für T-Zellen [53]. So konnte OX40 auf aktivierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, jedoch nicht auf naiven T-Zellen gefunden werden. Daneben können auch T<sub>reg</sub> Zellen, NK Zellen und neutrophile Granulozyten OX40 ausbilden [75]. Die OX40 Aktivierung fördert Proliferation, Überleben und Zytokinproduktion der aktivierten T-Zellen. Daneben scheint OX40 der Bildung von regulatorischen T-Zellen aus CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T-Zellen entgegenzuwirken. So führt ein Mangel an OX40 zu einer verstärkten Foxp3 Induktion in CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Weiterhin führt die OX40 Aktivierung zu einem Rückgang der immunsuppressiven Fähigkeiten der T<sub>reg</sub> Zellen [53, 75]. OX40L, der Ligand des OX40 Rezeptors wird vor allem von APCs ausgebildet [75]. Unsere Untersuchungen zeigen, dass es bei den STIC Zellen zu einer verstärkten Genexpression von **OX40L** kommt. So ist die OX40L Genexpression bei den STIC Zellen mit einem Wert von 9,8 im Vergleich zu unstimulierten Makrophagen mit 0,1 und IFN- $\gamma$  stimulierten mit 0,6 gesteigert (Tabelle 10). Die hohen OX40L Expressionswerte der STIC Zellen sind zunächst überraschend, da OX40L der beobachteten Anreicherung von T<sub>reg</sub> Zellen in den STIC Zellkulturen entgegenwirken müsste.

Die daraufhin durchgeführte Durchflusszytometrie zeigt, dass es nur zu einer sehr schwachen Expression von OX40L auf der Oberfläche der STIC Zellen kommt (Abbildung 20), so dass wir davon ausgehen können, dass OX40L bei der Wirkung der STIC Zellen keine wesentliche Rolle spielt. Diese Ergebnisse korrelieren gut mit der starken, durch STIC Zellen hervorgerufenen Anreicherung von T<sub>reg</sub> Zellen in unseren Kulturen.

### 5.5.8 Herunterregulierte Genexpressionen

Neben den hochregulierten könnten auch die herunterregulierten Genexpressionswerte (Tabelle 9) für die Funktionsweise der STIC Zellen von Bedeutung sein. Im Folgenden sind die beiden immunologisch bedeutsamen Proteine IL-6 undIDO genauer betrachtet, deren m-RNA Expression bei den STICs herunterreguliert ist.

**IL-6** ist ein proinflammatorisches Zytokin, das neben APCs auch von nicht hämatopoetischen Zellen wie Epithelzellen und Fibroblasten gebildet wird [76]. IL-6 hat eine antiapoptotische Wirkung auf T-Zellen, induziert die Proliferation von B-Zellen, aktiviert Granulozyten und führt zu einer Akuten-Phase-Reaktion der Leber. Neben Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wurden erhöhte IL-6 Spiegel auch bei rheumatoider Arthritis, Glomerulonephritis und Sepsis gefunden [77].

Nur wenige Zellen wie etwa Makrophagen, Hepatozyten oder Epithelzellen exprimieren den membrangebundenen IL-6 Rezeptor und können somit direkt durch IL-6 aktiviert werden [77]. Daneben kann IL-6 noch auf eine weitere Weise auf vielfältige Zielzellen wirken, die als IL-6 trans-signaling bezeichnet wird. Dabei bindet IL-6 an den löslichen IL-6 Rezeptor, welcher zum Beispiel von Makrophagen sezerniert wird [77]. Der Komplex aus IL-6 und dem löslichen IL-6 Rezeptor kann dann an den gp130 Rezeptor binden, der auf allen Körperzellen vorkommt. Die Aktivierung von gp130 führt über den second messenger STAT-3 zu antiapoptotischen Wirkungen auf Zielzellen. Dieser Signalweg spielt bei der Wirkung von IL-6 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine wichtige Rolle [77]. Daneben kann IL-6 trans-signaling die Foxp3 Induktion bei T-Zellen verhindern und dadurch der Erzeugung von iT<sub>reg</sub> Zellen entgegenwirken [76].

Dagegen kommt es durch die Wirkung von IL-6 zur Bildung von proinflammatorischen, IL-17 produzierenden T<sub>H</sub>17 Zellen aus naiven T-Zellen [78]. Die T<sub>H</sub>17 Zellen haben eine Schlüsselrolle bei der Entstehung vieler Autoimmunerkrankungen. Somit führt die Wirkung von IL-6 zu einer Autoimmunität begünstigenden Immunreaktion und wirkt einer Immuntoleranz entgegen [78].

Bei der Auswertung der Ergebnisse des Microarrays ist die deutliche Herunterregulation der IL-6 m-RNA Expression bei den STIC Zellen aufgefallen (Tabelle 9). So liegt der dimensionslose IL-6 Expressionswert der STICs mit 0,3 deutlich niedriger als der der IFN- $\gamma$  stimulierten Makrophagen mit 14,2 und beinahe so niedrig wie derjenige der unbehandelten Makrophagen mit 0,0. Die niedrige IL-6 Expression der STIC Zellen grenzt diese von den klassisch aktivierten IFN- $\gamma$  stimulierten Makrophagen ab und steht im Einklang mit ihren antiinflammatorischen Wirkungen und mit ihrer Fähigkeit, in Zellkulturen zu einer Anreicherung an regulatorischen T-Zellen zu führen.

Indolamin-2,3-Dioxygenase (**IDO**) wurde ursprünglich als Tryptophan abbauendes, intrazelluläres Enzym beschrieben. 1998 konnten Munn et al. erstmals aufzeigen, dass die IDO Expression darüber hinaus entscheidend zur feto-maternalen Immuntoleranz beiträgt [79, 80]. Seitdem ist bekannt, dass IDO neben dem reinen Tryptophan Metabolismus wichtige immunregulatorische Funktionen wahrnimmt [79, 81]. Proinflammatorische Zytokine wie IFN- $\gamma$  führen zu einer IDO Aktivierung vor allem in APCs. Die verstärkte IDO Aktivität führt zu einem lokalen Rückgang der Tryptophan Konzentration, was wiederum zu einem Zellzyklus Arrest von T-Zellen führt [81]. Weiterhin kommt es zu einem Anstieg der Konzentration von Tryptophan Abbauprodukten, die auch als Kynurenine bezeichnet werden. Diese Kynurenine haben immunregulatorische Effekte [79]. So konnten in vitro Experimente zeigen, dass sie direkt toxisch auf T-Zellen wirken [81].

Die Ergebnisse des von uns durchgeführten Microarrays zeigen einen IDO Expressionswert der STICs von 2,0 (Tabelle 9). Dieser liegt etwa 35-fach niedriger als der der IFN- $\gamma$  stimulierten Makrophagen mit 69,1 und nahe des Expressionswertes der unbehandelten Makrophagen mit 0,1. Es kommt also bei den STIC Zellen nicht zu einer Hochregulation der m-RNA Expression des IDO Proteins, obwohl die IFN- $\gamma$  Stimulation der STIC Zellen während der Zellkultur dieses erwarten lassen würde. Des Weiteren zeigen die Experimente von Brem-Exner et al., dass

STIC Zellen aus IDO knockout Mäusen voll funktionsfähig sind [13]. Diese Ergebnisse sind ein Hinweis darauf, dass die Wirkung des Enzymes IDO für die Funktion der STIC Zellen nicht von Bedeutung ist [13]. Weiterhin zeigen diese Ergebnisse, dass es sich bei den STIC Zellen um einen Zelltyp handelt, der sich von den von Munn et al. beschriebenen immunregulatorischen Makrophagen, deren Wirkung IDO abhängig ist, unterscheidet [13, 54, 55].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass durch die Auswertung der Daten des Microarrays einige potentiell für die Wirkung der STIC Zellen bedeutsame Gene identifiziert werden konnten. Dabei muss man sich jedoch immer bewusst machen, dass eine Veränderung der Genexpression nicht zwangsläufig mit einer Veränderung der Expression des kodierten Proteins einhergehen muss. Beispielsweise kann eine posttranskriptionelle Modifikation oder der Abbau der m-RNA dazu führen, dass gesteigerte Genexpressionen nicht zu einer erhöhten Proteinbiosynthese führen. Somit müssen – wie teilweise auch schon durchgeführt – die gefundenen Änderungen der m-RNA Bildung auf Proteinebene verifiziert werden.

## **6 Wertung und Ausblick**

Die bisherigen Ausführungen haben 4 verschiedene mögliche zelluläre Wege aufgezeigt, über die die STIC Zellen ihre in vitro und in vivo beobachteten [11-13] immunsuppressiven Effekte ausüben könnten.

Zunächst wäre eine direkte Abtötung von Effektorlymphozyten durch Phagozytose denkbar, wofür Brem-Exner et al. bereits verschiedene Hinweise gefunden haben [13]. Außerdem wäre eine andere, durch Zell-Zell-Kontakt vermittelte Abtötung von Effektorzellen möglich. So lassen etwa die Ergebnisse unseres Microarrays die Hypothese zu, dass Granzym B induzierte Apoptose bei der Wirkung der STIC Zellen von Bedeutung sein könnte.

Weiterhin ist denkbar, dass die STIC Zellen durch die Produktion antiinflammatorischer Zytokine wie etwa IL-2, IL-10 oder TGF- $\beta$  direkte hemmende Wirkung auf Effektorlymphozyten ausüben. Die Anwesenheit dieser Zytokine in den STIC Zellkulturen konnte durch die von uns durchgeführten ELISA Assays aufgezeigt werden.

Darüber hinaus ist auch vorstellbar, dass STIC Zellen ihre suppressiven Wirkungen auf immunologische Effektorzellen indirekt, also unter Vermittlung eines anderen Zelltypen ausüben. So könnten die in den STIC Kulturen angereicherten regulatorischen T-Zellen zur immunsuppressiven Wirkung der STICs beitragen.

Natürlich sind auch bis jetzt unbekannt immunologische Mechanismen bei der Vermittlung der STIC Wirkungen möglich. Auch um diese durch künftige Experimente aufdecken zu können, wurde der Microarray durchgeführt. Dabei wurden verschiedene immunologisch interessante hochregulierte Genexpressionswerte detektiert. Die weitere Analyse der entsprechenden Genprodukte könnte zusätzliche Erkenntnisse zur Funktionsweise der STIC Zellen liefern. Dazu bietet sich ein direkter Nachweis der entsprechenden Substanzen auf Proteinebene, sowie die Durchführung von Zellkulturen aus entsprechenden knockout Tieren an, sofern diese erhältlich sind.

Um zweifelsfrei zu klären, ob die in den Kulturen durch unsere ELISA Assays nachgewiesenen Zytokine auch tatsächlich von den STIC Zellen gebildet werden, und nicht von anderen in der Kultur vorkommenden Zellpopulationen, wie etwa den T<sub>reg</sub> Zellen, sollten weiterführende Experimente durchgeführt werden. So erscheint es sinnvoll, monozytäre Zellen und T-Zellen in der STIC Zellkultur mit Hilfe des magnetic cell sorting aufzutrennen und die jeweiligen Subpopulationen isoliert für einige Tage in Kultur zu nehmen. Daraufhin sollte von den getrennten Kulturen erneut eine Zytokinbestimmung durchgeführt werden. Somit könnten die STIC Zellen eindeutig als Quelle der nachgewiesenen Zytokine identifiziert werden.

Wenn die zellulären Vorgänge besser bekannt sind und somit Wirkungen vorhersehbar sind, kann ein klinischer Einsatz von STIC Zellen erfolgen.

Nach der Identifikation der Wirkungsweise dieser neuartigen Makrophagenpopulation sollte das Ziel weiterer Forschungen sein, zelluläre Therapieverfahren wie etwa die Behandlung mit STIC Zellen zu etablieren, um Patienten mit Organtransplantaten oder Autoimmunerkrankungen effektiver und nebenwirkungsärmer behandeln zu können.

## 7 Zusammenfassung

STIC Zellen sind monozytäre Zellen, die *in vitro* und *in vivo* immunsuppressive Fähigkeiten besitzen [11-13]. So führen sie in Cokulturen mit Lymphozyten zu einem Rückgang der Lymphozyten Zellzahl. Außerdem kommt es in den STIC Kulturen zu einer Anreicherung von regulatorischen T-Zellen [13].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, STIC Zellen näher im Bezug auf ihr Zytokin- und Genexpressionsprofil zu charakterisieren. Dadurch sollte dieser Zelltyp besser definiert werden und Hinweise auf dessen immunmodulatorischen Wirkmechanismus gefunden werden.

Dazu wurden Zellkulturen der STIC Zellen mit Hilfe von ELISA Assays auf die Zytokine IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$  untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Zytokine IL-2, IL-10 und TGF- $\beta$  in den STIC Kulturen gebildet werden. Um unsere Hypothese zu überprüfen, dass IL-10 für die in den Zellkulturen beobachtete Anreicherung von regulatorischen T-Zellen verantwortlich ist, führten wir die STIC Zellkulturen mit Zellen von IL-10 knockout Mäusen durch. Unsere Ergebnisse zeigen, dass IL-10 für die Anreicherung der T<sub>reg</sub> Zellen keine Rolle spielt.

Um zusätzliche potentiell immunologisch bedeutsame Proteine der STIC Zellen zu identifizieren, haben wir einen RNA Microarray durchgeführt. Zur Auswertung haben wir die Daten nach Genexpressionswerten durchsucht, die bei den STIC Zellen im Vergleich zu unstimulierten und zu klassisch aktivierten Makrophagen entweder hoch- oder herunterreguliert sind und denen in der Literatur immunregulatorische Eigenschaften zugeschrieben werden. So vermuten wir bei den Proteinen NGP, S100a8, S100a9, MGL1, MGL2, PD-L2, Granzym B, GITRL und OX40L eine mögliche Beteiligung bei der Wirkung der STIC Zellen. Zusätzlich durchgeführte durchflusszytomtrische Untersuchungen auf die Proteine GITRL, OX40L, MGL1/2 haben ergeben, dass GITRL auf der Oberfläche der STIC Zellen nicht exprimiert wird, währenddessen OX40L eine schwache, MGL1/2 aber eine starke Expression zeigt.

Die von uns identifizierten Veränderungen der Genexpression bei den STIC Zellen sind ein möglicher Anknüpfungspunkt für weitere Untersuchungen auf Proteinebene.

## **8 Danksagung**

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Professor Edward Geissler für die Möglichkeit bedanken, in seiner Abteilung für Experimentelle Chirurgie an der Klinik und Poliklinik für Chirurgie der Universität Regensburg unter der Leitung von Professor Dr. Hans Jürgen Schlitt eine wissenschaftliche Arbeit anfertigen zu können. Vor allem möchte ich mich für seine ständige Diskussionsbereitschaft und die wertvollen Vorschläge im Bezug auf meine Arbeit, aber auch für die Unterstützung bei der Planung eines klinischen Aufenthaltes in den USA im Rahmen meines praktischen Jahres nochmals sehr herzlich bedanken. Der Person von Professor Geissler ist ein großer Teil meines Interesses für die medizinische Forschung zu verdanken.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. Katharina Kronenberg bedanken, die den experimentellen Teil meiner Arbeit betreut hat, bevor sie aus persönlichen Gründen aus dem Team von Professor Geissler ausgeschieden ist. Besonderer Dank gebührt auch Frau Dr. Gudrun Köhl, die die Betreuung meiner Arbeit übernommen hat und mir wertvolle Hilfe beim Schreiben gegeben hat.

Vielen Dank auch an Dr. Hutchinson, Dr. Doenicke und Prof. Rehli für die zur Verfügung Stellung der Daten des Microarray zur weiteren Auswertung.

Zusätzlicher Dank gebührt den Medizinisch Technischen Angestellten der Abteilung für Experimentelle Chirurgie Frau Bärbel Schell, Frau Anna Höhn und Frau Erika Frank für ihre Zusammenarbeit, Organisation und Hilfe bei der Durchführung der Experimente für diese Arbeit.

Für die computertechnische Unterstützung bei der Erstellung meiner Abbildungen möchte ich Frau Dunja Robin danken.

Einen besonderen Dank möchte ich meinen Eltern für ihre uneingeschränkte Unterstützung meiner Ausbildung aussprechen. Speziell meinem Vater möchte ich für die Diskussion meiner Ergebnisse im Familienkreis und für die daraus entstandenen Anregungen danken.

## 9 Lebenslauf

### Ausbildung

1995 – 2004	Auersperg Gymnasium, Passau. Abiturnote: 1,5
2004 – 2010	Studium der Humanmedizin, Universität Regensburg Klinik und Vorklinik
2006	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung. Note: 1,5
2007	Experimentelle Doktorarbeit, Chirurgie Universität Regensburg Thema: „Evaluation of characteristic patterns of monocyte-derived IFN- $\gamma$ activated transplant acceptance inducing cells“
2010	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung. Note 1,5
2011	Beginn des Zweitstudiums Zahnmedizin an der Universität Würzburg mit dem Berufsziel Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

### Praktisches Jahr

Sept. 2009	Yale University, New Haven, CT, USA <i>Dept. of Plastic Surgery (Prof. Persing)</i> <i>Dept. of Surgical Critical Care (Prof. Maerz)</i>
Nov. 2009	Klinikum Passau <i>Abteilung Viszeralchirurgie (Prof. Grimm)</i>
Jan. 2010	Universität Regensburg <i>HNO Klinik (Prof. Strutz)</i>
Apr. 2010	Klinikum Passau <i>Klinik für Innere Medizin</i>

### Famulaturen

März 2007	Klinikum Passau <i>Klinik für Anästhesie und operative Intensivmedizin (Dr. Nusser)</i>
Sept. 2007	Universität Freiburg <i>Abteilung Plastische und Handchirurgie (Prof. Stark)</i>
Feb. 2008	Universität Regensburg <i>Klinik für MKG Chirurgie (Prof. Reichert)</i>
Jul. 2008	Technische Universität München <i>Klinik für MKG Chirurgie (Prof. Wolff)</i>
Sept. 2008	Universität Würzburg <i>Klinik für MKG Chirurgie (Prof. Kübler)</i>
Feb. 2009	Universität Erlangen <i>Abteilung Plastische und Handchirurgie (Prof. Horch)</i>

## 10 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
<b>A2AR</b>	adenosine receptor 2A
<b>AICD</b>	activation-induced cell death
<b>AIRE</b>	autoimmune regulator
<b>APC</b>	antigenpräsentierende Zelle
<b>BMP</b>	bone morphogenic protein
<b>CED</b>	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
<b>CTLA-4</b>	cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
<b>DC</b>	Dendritische Zelle
<b>Ebi3</b>	Epstein-Barr-virus-induced gene 3
<b>ELISA</b>	enzyme linked immunosorbent Assay
<b>FACS</b>	fluorescence activated cell sorting
<b>Foxp3</b>	forkhead box P3
<b>FSC</b>	forward scatter
<b>GITRL</b>	glucocorticoid-induced tumor-necrosis-factor receptor ligand
<b>GM-CSF</b>	Granulozyten, Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
<b>HCV</b>	Hepatitis C Virus
<b>IDO</b>	indolamin-2,3-dioxygenase
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IFN<math>\gamma</math>-M<math>\delta</math>C</b>	Interferon- $\gamma$ -stimulated monocyte-derived cells
<b>IL</b>	Interleukin
<b>IPEX</b>	Immudysregulations, Polyendokrinopathie und Enteropathie X-linked Syndrom
<b>iT<sub>reg</sub></b>	induced regulatory T-cell
<b>LAP</b>	latency-associated peptide
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>M-CSF</b>	Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
<b>MDSC</b>	myeloid-derived suppressor cells
<b>MGL</b>	macrophage galactose N-acetyl-galactosamine specific lectin
<b>MHC</b>	major histocompatibility complex
<b>MP IFN-<math>\gamma</math></b>	IFN- $\gamma$ stimulierte Makrophagen
<b>MP unb.</b>	unbehandelte bzw. unstimulierten Makrophagen
<b>MPS</b>	mononukleäres Phagozytensystem
<b>NGP</b>	neutrophilic granule protein
<b>NK-Zelle</b>	natürliche Killerzelle
<b>nT<sub>reg</sub></b>	naturally occurring regulatory T-cell
<b>PD-1 /-2</b>	programmed cell death 1 / 2 receptor
<b>PD-L1 / -L2</b>	programmed cell death ligand 1 / 2
<b>PRR</b>	pattern recognition receptor
<b>Spi-6</b>	serin protease inhibitor 6

<b>SSC</b>	sideward scatter
<b>STIC</b>	self tolerance inducing cell
<b>TAIC</b>	transplant acceptance inducing cell
<b>TCR</b>	T-Zell Rezeptor
<b>TGF</b>	transforming growth factor
<b>TLR</b>	toll like Rezeptor
<b>TNF</b>	Tumor Nekrose Faktor
<b>T<sub>reg</sub></b>	regulatorische T-Zelle

## 11 Chemikalien- und Geräteverzeichnis

### Chemikalienverzeichnis

Name im Text	Name nach Hersteller	Hersteller	Ort
<b>HBSS</b>	Hank's BSS	PAA	Pasching, Österreich
<b>PBS</b>	Dulbecco's PBS	PAA	Pasching, Österreich
<b>Tween-20</b>	Tween-20	Sigma Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
<b>FCS/FBS</b>	fetal bovine serum	Biochrom AG	Berlin
<b>Biocoll</b>	Biocoll Separating Solution	Biochrom AG	Berlin
<b>CFSE Färbung</b>	Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit <i>enthält:</i> <i>Component A CFDA SE</i> <i>Component B DMSO</i>	invitrogen	Carlsbad, California, USA
<b>IFN-γ</b>	recombinant mouse interferon-γ IF005	Merck Millipore	Billerica, Massachusetts, USA
<b>CD11b MACS AK</b>	MACS CD11b MicroBeads	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach
<b>NH4Cl Lysis Puffer</b>	BioWhittaker Cell Culture ACK Lysing Buffer 10-548E	Lonza AG	Basel, Schweiz
<b>MACS Puffer</b>	195 ml PBS + 5 ml Humanes Albumin (20%) + 0,8 ml EDTA (0,5M)		
<b>Humanes Albumin (20%)</b>	Humanalbumin 20% octalbin	octapharma	Langenfeld
<b>EDTA (0,5M)</b>	GIBCO UltraPure 0.5M EDTA, pH 8.0	invitrogen	Carlsbad, California, USA
<b>Kulturmedium 1</b>	GIBCO RPMI + 10% FCS + 1% Penicillin – Streptomycin + 1% L-Glutamin + 0,5 µg/ml M-CSF		

<b>Kulturmedium 2</b> = Kulturkontrolle	GIBCO RPMI + 10% FCS + 1% Penicillin – Streptomycin + 1% L-Glutamin		
<b>GIBCO RPMI</b>	GIBCO RPMI 1640	invitrogen	Carlsbad, California, USA
<b>FCS/FBS</b>	fetal bovine serum	Biochrom AG	Berlin
<b>Penicillin - Streptomycin</b>	Penicillin - Streptomycin Solution P0781-100ML	Sigma Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
<b>L-Glutamin</b>	L-Glutamine 200mM	Sigma Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
<b>M-CSF</b>	Macrophage-Colony Stimulating Factor M9170	Sigma Aldrich	St. Louis, Missouri, USA

## ELISAs

<b>IL-2 ELISA</b>	Mouse IL-2 ELISA Ready-SET-Go! 88-7024 / Sensitivity: 2pg/ml	eBioscience	San Diego, California, USA
<b>IL-4 ELISA</b>	Mouse IL-4 ELISA Set 555232	BD Biosciences	Franklin Lakes, New Jersey, USA
<b>IL-10 ELISA</b>	Mouse IL-10 ELISA Set 555252	BD Biosciences	Franklin Lakes, New Jersey, USA
<b>IL-12 ELISA</b>	mouse IL-12 p70 DuoSet ELISA DY419	R&D Systems	Minneapolis, Minnesota, USA
<b>IFN-<math>\gamma</math> ELISA</b>	mouse IFN- $\gamma$ DuoSet ELISA DY485	R&D Systems	Minneapolis, Minnesota, USA
<b>TGF-<math>\beta</math>1 ELISA</b>	mouse TGF- $\beta$ 1 DuoSet ELISA DY1679	R&D Systems	Minneapolis, Minnesota, USA
<b>Substrate Solution</b>	TMB Substrate Reagent Set 555214, Reagent A and B	BD Biosciences	Franklin Lakes, New Jersey, USA

## Microarray

<b>RNA-Microarray</b>	Agilent Whole Mouse Genome Oligo Microarray Kit	Agilent Technologies	Santa Clara, California, USA
-----------------------	---	-------------------------	---------------------------------

## FACS Antikörper

<b>anti CD4</b>	APC-H7 Rat anti-Mouse CD4 RM4-5	eBioscience	San Diego, California, USA
<b>anti CD25</b>	PE Rat anti-Mouse CD25 PC61	BD Biosciences	Franklin Lakes, New Jersey, USA
<b>anti Foxp3</b>	FITC Conjugated Anti-mouse/rat Foxp3	eBioscience	San Diego, California, USA
<b>MGL1/2</b>	rat anti mouse CD301: Alexa Fluor 488	AbD serotec	Düsseldorf
<b>GITRL</b>	Phycoerythrin (PE) anti-mouse GITRL	eBioscience	San Diego, California, USA
<b>OX-40L</b>	PE anti-mouse OX40 Ligand	eBioscience	San Diego, California, USA

## Mäuse

<b>Balb/c</b>	BALB/cAnNCrI male	Charles River	Sulzfeld
<b>C57BL6</b>	C57BL/6J male	Charles River	Sulzfeld
<b>IL-10KO</b>	C.129P2(B6)-IL10 <sup>tm1Cgn</sup> /J (BALB/c)	JAX Mice	Bar Harbor, Maine, USA

## Geräte- und Materialienverzeichnis

Name im Text	Name nach Hersteller	Hersteller	Ort
<b>Zentrifuge</b>	Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments	Hanau
<b>MACS Magneten</b>	Midi MACS	Miltenyi Biotec GmbH	Bergisch Gladbach
<b>ELISA Photometer</b>	Emax precision microplate reader	Molecular Devices	Sunnyvale, California, USA
<b>gelber Filter</b>	Falcon Cell Strainer 100µm Nylon	BD Biosciences	Franklin Lakes, New Jersey, USA
<b>FACS Röhrchen</b>	RF 55.1579 Tubes	Sarstedt	Nümbrecht
<b>24well Platte</b>	costar 24 Well Cell Culture Cluster 3524	Corning Inc.	New York, USA
<b>96well ELISA Platte</b>	costar 96 Well Cell Culture Cluster 3595	Corning Inc.	New York, USA
<b>Pipetten</b>		Eppendorf	Hamburg
<b>Fluoreszenz Mikroskop</b>	Axiotech II	Zeiss	Göttingen

Die restlichen Chemikalien stammen von namhaften Herstellern wie Merck und Sigma.

## 12 Literaturverzeichnis

1. Janeway, C., et al., *Janeway's immunobiology*. 7th ed. 2008, New York, NY: Garland Science.
2. Hollaender, G.A., *Immunologie: Grundlagen für Klinik und Praxis*. 2006, München: Elsevier GmbH.
3. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(12): p. 958-69.
4. Hakim, N.S. and G.M. Danovitch, *Transplantation surgery*. Springer specialist surgery series. 2001, London ; New York: Springer. xiv, 450 p.
5. Melter, M., *Presseinformation: Erstmals Lebertransplantation bei Neugeborenem in Bayern*. 2008, Universitätsklinikum Regensburg - Pressestelle: Regensburg.
6. Tuffs, A., *Munich surgeons perform world's first transplantation of whole arms*. *BMJ*, 2008. **337**: p. a1162.
7. Geissler, E.K. and H.J. Schlitt, *Immunosuppression for liver transplantation*. *Gut*, 2009. **58**(3): p. 452-63.
8. Siewert, J.R., *Chirurgie*. Vol. 8. 2006, Berlin ; Heidelberg ; New York: Springer
9. Aktories, K., et al., *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Vol. 10. 2009, München: Urban & Fischer Verlag in Elsevier GmbH.
10. Campistol, J.M., et al., *Sirolimus therapy after early cyclosporine withdrawal reduces the risk for cancer in adult renal transplantation*. *J Am Soc Nephrol*, 2006. **17**(2): p. 581-9.
11. Hutchinson, J.A., et al., *Transplant acceptance-inducing cells as an immune-conditioning therapy in renal transplantation*. *Transpl Int*, 2008. **21**(8): p. 728-41.
12. Hutchinson, J.A., et al., *A cell-based approach to the minimization of immunosuppression in renal transplantation*. *Transpl Int*, 2008. **21**(8): p. 742-54.
13. Brem-Exner, B.G., et al., *Macrophages driven to a novel state of activation have anti-inflammatory properties in mice*. *J Immunol*, 2008. **180**(1): p. 335-49.
14. Litman, G.W., J.P. Cannon, and L.J. Dishaw, *Reconstructing immune phylogeny: new perspectives*. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(11): p. 866-79.
15. Staal, J. and C. Dixelius, *Tracing the ancient origins of plant innate immunity*. *Trends Plant Sci*, 2007. **12**(8): p. 334-42.
16. Rocha, N. and J. Neefjes, *MHC class II molecules on the move for successful antigen presentation*. *EMBO J*, 2008. **27**(1): p. 1-5.
17. Hume, D.A., *Macrophages as APC and the dendritic cell myth*. *J Immunol*, 2008. **181**(9): p. 5829-35.
18. Granucci, F., I. Zanoni, and P. Ricciardi-Castagnoli, *Central role of dendritic cells in the regulation and deregulation of immune responses*. *Cell Mol Life Sci*, 2008. **65**(11): p. 1683-97.
19. Griffiths, K.L. and H.C. O'Neill, *Dendritic cells as immune regulators: the mouse model*. *J Cell Mol Med*, 2008. **12**(5B): p. 1909-14.
20. Ferenbach, D. and J. Hughes, *Macrophages and dendritic cells: what is the difference?* *Kidney Int*, 2008. **74**(1): p. 5-7.
21. Mantovani, A., A. Sica, and M. Locati, *New vistas on macrophage differentiation and activation*. *Eur J Immunol*, 2007. **37**(1): p. 14-6.
22. Benoit, M., B. Desnues, and J.L. Mege, *Macrophage polarization in bacterial infections*. *J Immunol*, 2008. **181**(6): p. 3733-9.

23. Edwards, J.P., et al., *Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations*. J Leukoc Biol, 2006. **80**(6): p. 1298-307.
24. Hoglund, P., *Induced peripheral regulatory T cells: the family grows larger*. Eur J Immunol, 2006. **36**(2): p. 264-6.
25. Suzuki, E., et al., *Expression of AIRE in thymocytes and peripheral lymphocytes*. Autoimmunity, 2008. **41**(2): p. 133-9.
26. Mathis, D. and C. Benoist, *A decade of AIRE*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(8): p. 645-50.
27. Zheng, Y., Y. Zha, and T.F. Gajewski, *Molecular regulation of T-cell anergy*. EMBO Rep, 2008. **9**(1): p. 50-5.
28. Schwartz, R.H., *T cell anergy*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 305-34.
29. Vignali, D.A., L.W. Collison, and C.J. Workman, *How regulatory T cells work*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(7): p. 523-32.
30. Banham, A.H., *Cell-surface IL-7 receptor expression facilitates the purification of FOXP3(+) regulatory T cells*. Trends Immunol, 2006. **27**(12): p. 541-4.
31. van der Vliet, H.J. and E.E. Nieuwenhuis, *IPEX as a result of mutations in FOXP3*. Clin Dev Immunol, 2007. **2007**: p. 89017.
32. Lan, R.Y., C. Selmi, and M.E. Gershwin, *The regulatory, inflammatory, and T cell programming roles of interleukin-2 (IL-2)*. J Autoimmun, 2008. **31**(1): p. 7-12.
33. Fontenot, J.D., et al., *Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny*. J Exp Med, 2005. **202**(7): p. 901-6.
34. Horwitz, D.A., S.G. Zheng, and J.D. Gray, *Natural and TGF-beta-induced Foxp3(+)CD4(+) CD25(+) regulatory T cells are not mirror images of each other*. Trends Immunol, 2008. **29**(9): p. 429-35.
35. Bluestone, J.A. and A.K. Abbas, *Natural versus adaptive regulatory T cells*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(3): p. 253-7.
36. Sansom, D.M. and L.S. Walker, *The role of CD28 and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) in regulatory T-cell biology*. Immunol Rev, 2006. **212**: p. 131-48.
37. Couper, K.N., D.G. Blount, and E.M. Riley, *IL-10: the master regulator of immunity to infection*. J Immunol, 2008. **180**(9): p. 5771-7.
38. *Kursmanual Grundkurs BD FACS Diva 6*. 2011.
39. Crowther, J.R., *The ELISA Guidebook*. methods in molecular biology. 2001, Totowa, New Jersey: Humana Press.
40. Argarana, C.E., et al., *Molecular cloning and nucleotide sequence of the streptavidin gene*. Nucleic Acids Res, 1986. **14**(4): p. 1871-82.
41. Khalil, N., *TGF-beta: from latent to active*. Microbes Infect, 1999. **1**(15): p. 1255-63.
42. Bosse, Y. and M. Rola-Pleszczynski, *Controversy surrounding the increased expression of TGF beta 1 in asthma*. Respir Res, 2007. **8**: p. 66.
43. Dufva, M., *DNA microarrays for biomedical research : methods and protocols*. 1st ed. Methods in molecular biology. 2009, New York: Springer.
44. Heumann, A., *Charakterisierung nichtdendritischer monozytärer Zellen mit immunregulatorischen Eigenschaften*. Chirurgisches Forum, 2005.
45. Gorantla, V.S., et al., *T regulatory cells and transplantation tolerance*. Transplant Rev (Orlando), 2010. **24**(3): p. 147-59.
46. Horwitz, D.A., S.G. Zheng, and J.D. Gray, *The role of the combination of IL-2 and TGF-beta or IL-10 in the generation and function of CD4+ CD25+ and CD8+ regulatory T cell subsets*. J Leukoc Biol, 2003. **74**(4): p. 471-8.

47. Xie, D., et al., *Differential expression of neutrophilic granule proteins between Th1 and Th2 cells*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2007. **39**(1): p. 67-72.
48. Cheng, P., et al., *Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein*. J Exp Med, 2008. **205**(10): p. 2235-49.
49. Saba, K., K. Denda-Nagai, and T. Irimura, *A C-type lectin MGL1/CD301a plays an anti-inflammatory role in murine experimental colitis*. Am J Pathol, 2009. **174**(1): p. 144-52.
50. Menke, J., et al., *Programmed death 1 ligand (PD-L) 1 and PD-L2 limit autoimmune kidney disease: distinct roles*. J Immunol, 2007. **179**(11): p. 7466-77.
51. Gondek, D.C., et al., *Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism*. J Immunol, 2005. **174**(4): p. 1783-6.
52. Igarashi, H., et al., *GITR ligand-costimulation activates effector and regulatory functions of CD4<sup>+</sup> T cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **369**(4): p. 1134-8.
53. So, T., S.W. Lee, and M. Croft, *Immune regulation and control of regulatory T cells by OX40 and 4-1BB*. Cytokine Growth Factor Rev, 2008. **19**(3-4): p. 253-62.
54. Munn, D.H., et al., *Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism*. J Exp Med, 1999. **189**(9): p. 1363-72.
55. Munn, D.H., et al., *Selective activation-induced apoptosis of peripheral T cells imposed by macrophages. A potential mechanism of antigen-specific peripheral lymphocyte deletion*. J Immunol, 1996. **156**(2): p. 523-32.
56. Selvaraj, R.K. and T.L. Geiger, *Mitigation of experimental allergic encephalomyelitis by TGF-beta induced Foxp3<sup>+</sup> regulatory T lymphocytes through the induction of anergy and infectious tolerance*. J Immunol, 2008. **180**(5): p. 2830-8.
57. Asseman, C., et al., *An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation*. J Exp Med, 1999. **190**(7): p. 995-1004.
58. Collison, L.W., et al., *The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function*. Nature, 2007. **450**(7169): p. 566-9.
59. Gerber, J.S. and D.M. Mosser, *Reversing lipopolysaccharide toxicity by ligating the macrophage Fc gamma receptors*. J Immunol, 2001. **166**(11): p. 6861-8.
60. Katakura, T., et al., *CCL17 and IL-10 as effectors that enable alternatively activated macrophages to inhibit the generation of classically activated macrophages*. J Immunol, 2004. **172**(3): p. 1407-13.
61. Kuhn, R., et al., *Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis*. Cell, 1993. **75**(2): p. 263-74.
62. Licona Limon, P. and G. Soldevila, *The role of TGF-beta superfamily during T cell development: new insights*. Immunol Lett, 2007. **109**(1): p. 1-12.
63. Shi, Y. and J. Massague, *Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus*. Cell, 2003. **113**(6): p. 685-700.
64. Hamilton, J.A., *Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(7): p. 533-44.
65. Schroder, K., et al., *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(2): p. 163-89.

66. Chen, J. and X. Liu, *The role of interferon gamma in regulation of CD4+ T-cells and its clinical implications*. Cell Immunol, 2009. **254**(2): p. 85-90.
67. Shenoy, A.R., et al., *Emerging themes in IFN-gamma-induced macrophage immunity by the p47 and p65 GTPase families*. Immunobiology, 2007. **212**(9-10): p. 771-84.
68. Glass, W.G., R.T. Sarisky, and A.M. Vecchio, *Not-so-sweet sixteen: the role of IL-16 in infectious and immune-mediated inflammatory diseases*. J Interferon Cytokine Res, 2006. **26**(8): p. 511-20.
69. Schreiber, S., *Monocytes or T cells in Crohn's disease: does IL-16 allow both to play at that game?* Gut, 2001. **49**(6): p. 747-8.
70. Smith, D.E., *The biological paths of IL-1 family members IL-18 and IL-33*. J Leukoc Biol, 2011. **89**(3): p. 383-92.
71. Mu, W., et al., *PDCD2 is essential for inner cell mass development and embryonic stem cell maintenance*. Dev Biol, 2010. **347**(2): p. 279-88.
72. Yamazaki, T., et al., *Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC*. J Immunol, 2002. **169**(10): p. 5538-45.
73. Zhang, Y., et al., *Regulation of T cell activation and tolerance by PDL2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(31): p. 11695-700.
74. Gondek, D.C., et al., *Transplantation survival is maintained by granzyme B+ regulatory cells and adaptive regulatory T cells*. J Immunol, 2008. **181**(7): p. 4752-60.
75. Croft, M., et al., *The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease*. Immunol Rev, 2009. **229**(1): p. 173-91.
76. Dienz, O. and M. Rincon, *The effects of IL-6 on CD4 T cell responses*. Clin Immunol, 2009. **130**(1): p. 27-33.
77. Mudter, J. and M.F. Neurath, *Il-6 signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance*. Inflamm Bowel Dis, 2007. **13**(8): p. 1016-23.
78. Kimura, A. and T. Kishimoto, *IL-6: regulator of Treg/Th17 balance*. Eur J Immunol, 2010. **40**(7): p. 1830-5.
79. Lob, S. and A. Konigsrainer, *Is IDO a key enzyme bridging the gap between tumor escape and tolerance induction?* Langenbecks Arch Surg, 2008. **393**(6): p. 995-1003.
80. Munn, D.H., et al., *Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism*. Science, 1998. **281**(5380): p. 1191-3.
81. Quan, J., et al., *Manipulation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) for clinical transplantation: promises and challenges*. Expert Opin Biol Ther, 2008. **8**(11): p. 1705-19.